目次

2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.1.1 非臨床試験の概要 4
2.4.1.2 被験物質 5
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.1.1 CLDN18.2 に対する結合 5
2.4.2.1.2 作用機序：ADCC 及び CDC 6
2.4.2.1.3 生体内組織選択性 6
2.4.2.1.4 抗腫瘍効果 6
2.4.2.2 副次的薬理試験 7
2.4.2.3 安全性薬理試験 7
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 7
2.4.3 薬物動態試験 7
2.4.3.1 分析法 7
2.4.3.2 吸収 7
2.4.3.3 分布・代謝・排泄 8
2.4.3.4 薬物動態学的薬物相互作用 8
2.4.3.5 その他の薬物動態試験 8
2.4.4 毒性試験 8
2.4.4.1 単回投与毒性試験 8
2.4.4.2 反復投与毒性試験 8
2.4.4.3 遺伝毒性試験 9
2.4.4.4 がん原性試験 9
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 9
2.4.4.6 局所刺激性試験 9
2.4.4.7 その他の毒性試験 9
2.4.4.7.1 毒性発現の機序に関する試験（嘔吐に関する検討） 9
2.4.4.7.2 組織交差反応性 10

2.4.4.8 免疫毒性 10
2.4.5 総括及び結論 10
2.4.5.1 薬理 10
2.4.5.2 薬物動態 12
2.4.5.3 毒性 12
2.4.5.4 製剤に含まれるリン酸に関する非臨床安全性評価 13
2.4.5.5 結論 13
2.4.6 参考文献一覧 14

表

表 2.4- 1 動物の重要な試験における NOAEL での C_{max} 又は AUC ベースの曝露比 12
表 2.4- 2 重要な試験の NOAEL におけるリン酸の量 13

略語及び用語の一覧

略語及び用語	定義
ADA	antidrug-antibody：抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害
AUC	area under the concentration-time curve：濃度-時間曲線下面積
AUC_{168h}	AUC from the time of dosing to 168 h post dosing：投与時から 168 時間までの濃度-時間曲線下面積
AUC_{21d}	AUC from time 0 to 21 d：投与後 0 から 21 日後までの濃度時間曲線下面積
CD	cluster of differentiation：分化抗原群
CDC	complement-dependent cytotoxicity：補体依存性細胞傷害
CHO	Chinese Hamster Ovary：チャイニーズハムスター卵巣
CLDN18.1	claudin-18 splice variant 1, Claudin 18.1：クローディン 18.1
CLDN18.2	claudin-18 splice variant 2, Claudin 18.2：クローディン 18.2
C_{max}	maximum concentration：最高濃度
ECL	electrochemiluminescence：電気化学発光
ECLIA	electrochemiluminescence immunoassay：電気化学発光免疫測定
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定
EOF	epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil：エピルビシン，オキサリプラチン及びフルオロウラシル
Fc	fragment crystallizable：結晶化可能フラグメント
FLO	5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin：フルオロウラシル，ロイコボリン及びオキサリプラチン
FQI	flowcytometric quantification immunoassay：フローサイトメトリー免疫測定
GEJ	gastroesophageal junction：食道胃接合部
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
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
IHC	immunohistochemistry：免疫組織化学
IgG1	immunoglobulin G subclass 1：免疫グロブリン G サブクラス 1
K_D	dissociation constant：解離定数
NK	natural killer：ナチュラルキラー
NOAEL	no observed adverse effect level
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OF	oxaliplatin and 5-fluorouracil：オキサリプラチン及びフルオロウラシル
PBMC	peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核細胞
Zolbetuximab	ゾルベツキシマブ：ゾルベツキシマブ（遺伝子組換え）

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

2.4.1.1　非臨床試験の概要

胃癌関連死亡は，過去数十年にわたって減少しているものの［Amiri et al, 2011］，世界中の癌死亡原因の第 4 位を占める［Sung et al, 2021］。一方，組織型の変化や原発部位の変遷に伴って，GEJ 腺癌の患者はこの数十年で増加してきている［Waddell et al, 2013; Sahin et al, 2008］。2020 年には，世界中で約 769000 人が胃癌で死亡したと推定され［Sung et al, 2021］，東アジア（主に中国）は全世界の胃癌患者の約半数を占めている［Strong et al, 2015］。これらの癌の治療に各種併用化学療法が適用されるが，その効果は十分とは言えないことから，モノクローナル抗体などの標的薬の使用に関する研究が盛んになってきた。

ゾルベツキシマブ（化合物番号：IMAB362）の標的である CLDN18.2 は，上皮及び内皮におけるタイトジャンクションの形成に関与するクローディンファミリーに属する［Niimi et al, 2001］。タイトジャンクションは，隣り合う細胞を密に接着することで物質の通過を制御するバリアを形成し，細胞間のイオン透過を制御するのに不可欠である。CLDN18.2 は，4 つの膜貫通ドメインと 2 つの細胞外ループを持つ 27.7 kDa の蛋白質である［Günzel & Yu, 2013; Sahin et al, 2008］。CLDN18.2 は細胞特異的に分化した抗原であり，正常細胞では胃粘膜の上皮細胞に限定的に発現している［Türeci et al, 2011］。CLDN18.2 の mRNA やタンパク発現は悪性形質転換時も保持されるために，ヒト胃癌では高頻度に細胞表面で検出される［Sahin et al, 2008］。原発性胃腺癌での発現率は 74～87%であり［Baek et al, 2019; Rohde et al, 2019; Sahin et al, 2008］，びまん性胃癌及び腸型胃癌における発現率も高い。CLDN18.2 は胃癌の主要なアイソフォームであるが，ヒトのさまざまな癌にも発現しており，食道腺癌の 78%に CLDN18.2 が高発現することが明らかとなっている［Sahin et al, 2008］。

ゾルベツキシマブは，CLDN18.2 を標的とした IgG1 定常領域を有するキメラ（マウス／ヒト）抗体であり，標準的な組換え発現技術により CHO 細胞で産生される。ゾルベツキシマブは旧 Ganymed Pharmaceuticals 社によって創製され，現在はアステラス社によって開発されている。

ゾルベツキシマブについて，ヒト，マウス及びカニクイザルの CLDN18.2 に対する結合，作用機序，並びに in vivo での生体内組織選択性及び抗腫瘍効果など，一連の効力を裏付ける試験を実施した。また，化学療法剤との併用効果についても，in vitro 及び in vivo 試験において評価した。

ゾルベツキシマブの薬物動態をマウス及びカニクイザルを用いて評価した。ゾルベツキシマブはキメラ（マウス／ヒト）IgG1 抗体であることから，その分布，代謝及び排泄は内因性の IgG1 分子と同様であり，ペプチド及び個々のアミノ酸に分解されると考えられる。そのため，ICH S6 に従いゾルベツキシマブを用いた分布，代謝及び排泄試験は実施しなかった。

非臨床毒性試験は，規制ガイドライン（ICH S6 及び S9）に準拠し，ゾルベツキシマブの毒性プロファイルを明らかにするために実施した。

ゾルベツキシマブがヒト，マウス及びカニクイザルの CLDN18.2 に同程度の親和性で結合することから，毒性試験にはマウス及びカニクイザルを用いた。4 週間までの反復投与試験は両動物種を用いて実施した。マウス及びカニクイザルで同様の毒性プロファイルが認められたことから，13 週間反復投与試験はマウスのみで実施した。投与経路は臨床に合わせて静脈内ボーラス投与を選択した。投与頻度は，臨床の投与頻度（3 週間に 1 回）を上回る週 1 回とした。投与量は，臨床における曝露量に対して約 10 倍の曝露比を得られるように設定した。

すべての重要な試験は，OECD 及び厚生労働省の基準に適合し，GLP に従って実施した。

開発当初，ゾルベツキシマブはクローン#15 から製造された。その後，クローンをクローン F02 に変更した。1 試験を除き重要な試験はいずれも，クローン F02 から製造された被験物質を用いて実施した。例外的にクローン#15 から製造された被験物質を用いて実施したのは，カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験である。クローン#15 及び F02 から製造されたゾルベツキシマブの毒性プロファイルは，マウスを用いた 13 週間反復投与試験及びヒト組織交差反応性試験において比較した。その結果により，2 つのクローンから製造された被験物質の非臨床安全性の観点での同等性が示された。したがって，クローン#15 から製造された被験物質を用いたカニクイザルの 4 週間反復投与試験から得られた結果をゾルベツキシマブの安全性評価に用いることは，妥当であると考えられた。

2.4.1.2　被験物質

化合物番号:	IMAB362
INN 名:	zolbetuximab
一般的名称:	ゾルベツキシマブ（遺伝子組換え）
化学名:	マウス/ヒト IgG1，ヒトアロタイプ G1m(3)及び Km(3)の定常領域，κ 鎖抗体

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1　CLDN18.2 に対する結合

ゾルベツキシマブはヒト CLDN18.2 を発現させた HEK-293 及び CHO-K1 細胞株に結合したが，mock 細胞には結合しなかった。ゾルベツキシマブは，CLDN18.2 を内因性に発現するヒト胃癌細胞株の KATO-III や NUGC-4 に結合した。ゾルベツキシマブは，CLDN18.2 を発現していないヒト乳癌細胞株の SK-BR-3 に結合しなかった。さらに，ゾルベツキシマブは，CLDN18.2 と高い配列相同性（91%）を有するヒト CLDN18.1［Türeci et al, 2011］を発現させた HEK-293 細胞株には結合しなかった。ゾルベツキシマブにより認識される CLDN18.2 エピトープを，単一アミノ酸変異により検討した結果，ゾルベツキシマブは CLDN18.2 の細胞外ドメイン 1 を認識すると考えられた。ゾルベツキシマブの結合親和性（K_D 値）は，ヒト CLDN18.2 に対しては 2.90 ± 0.86 nmol/L（平均値 ± 標準偏差，n = 9），マウス CLDN18.2 に対しては 2.41 nmol/L（2.60

及び 2.22 の平均値），カニクイザル CLDN18.2 に対しては 2.73 ± 1.48 nmol/L（平均値 ± 標準偏差，n = 3）であり，同程度だった。化学療法剤（EOF 又は FLO）でヒト CLDN18.2 発現細胞を処置すると，ゾルベツキシマブの結合が増加した。

2.4.2.1.2 作用機序：ADCC 及び CDC

ゾルベツキシマブはヒト PBMC の存在下で，CLDN18.2 を発現する NUGC-4 及び KATO-III の ADCC を引き起こした。一方，CLDN18.2 を発現していない SK-BR-3 では，ADCC は認められなかった。ゾルベツキシマブはヒト血清の存在下で，CLDN18.2 を発現する NUGC-4，KATO-III 及び CHO-K1 の CDC を引き起こした。加熱により不活性化したヒト血清を用いた場合には，ゾルベツキシマブによる NUGC-4 及び KATO-III に対する溶解が観察されなかった。また，CHO-K1 の mock 細胞，並びに CLDN18.1 を発現する CHO-K1 では，CDC は認められなかった。化学療法剤（OF，FLO 又は EOF）で NUGC-4 及び KATO-III を処置すると，ゾルベツキシマブによる ADCC 及び CDC の活性が増強された。

2.4.2.1.3 生体内組織選択性

NUGC-4 腫瘍細胞を移植したヌードマウスにおいて，ゾルベツキシマブは，投与 24 時間後に腫瘍細胞で強く検出された。ゾルベツキシマブは腫瘍細胞に保持され，投与 120 時間後でも同程度の強度で検出された。投与 6 日後に採取した臓器では，ゾルベツキシマブは CLDN18.2 を発現した腫瘍移植片で強く検出されたが，正常胃における検出は僅かであった。その他の正常組織ではゾルベツキシマブは検出されなかった。投与 72 時間後の検体を用いた免疫組織化学分析では，ゾルベツキシマブは腫瘍組織で強く検出され，正常な胃上皮及び評価した他の組織では，僅かに検出されたか若しくは全く検出されなかった。

2.4.2.1.4 抗腫瘍効果

異種腫瘍移植免疫不全マウスモデルにおいて，ゾルベツキシマブにより，腫瘍の増殖が遅延した。同種腫瘍移植マウスモデルにおいて，ゾルベツキシマブ及び EOF の併用投与により，ゾルベツキシマブ又は EOF 単独投与と比較して腫瘍の増殖が抑制され，ゾルベツキシマブ単独投与と比較して生存期間が延長した。ゾルベツキシマブ及び EOF の併用投与では，$CD45^+/CD8^+$ T 細胞の腫瘍組織への浸潤が増加した。別の同種腫瘍移植マウスモデルにおいて，ゾルベツキシマブ及び OF を併用投与すると，ゾルベツキシマブ又は OF 単独投与と比較して，腫瘍体積が有意に小さかった。$CD8^+$ T 細胞の腫瘍組織への浸潤は，対照群と比較して，併用投与群で有意に増加した。同じ実験において，NK 細胞は，対照群と比較して，ゾルベツキシマブ単独投与群で増加する傾向であった。

2.4.2.2　副次的薬理試験

ゾルベツキシマブの副次的薬理試験は実施しなかった。

2.4.2.3　安全性薬理試験

中枢神経系に対するゾルベツキシマブの作用は，独立したマウスを用いた試験で評価した。媒体又はゾルベツキシマブを 0，10，30 及び 100 mg/kg の投与量で単回静脈内投与した。

心血管系及び呼吸系に対する作用は，カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験に組み込まれた形で評価した。媒体又はゾルベツキシマブを 0，10，30 及び 100 mg/kg の投与量で 4 週間，週 1 回の頻度で静脈内投与した

いずれの器官系に対してもゾルベツキシマブによる作用は認められなかった。

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験

ゾルベツキシマブ及び化学療法剤の併用試験を，効力を裏付ける試験として実施した。マウス腫瘍モデルにおいて，ゾルベツキシマブは化学療法剤との併用により，より強力な抗腫瘍効果を示した（2.4.2.1.4 抗腫瘍効果）。

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　分析法

マウス，フェレット及びカニクイザル血清中のゾルベツキシマブ濃度は，適格性を評価あるいはバリデートされた ELISA，FQI あるいは ECLIA 法により測定した。マウス及びカニクイザル血清中の ADA は，適格性を評価あるいはバリデートされた ELISA あるいは ECLIA 法により検出した。

2.4.3.2　吸収

ゾルベツキシマブ 100，200 及び 300 mg/kg をマウスに週 1 回 13 週間並びに 10，30 及び 100 mg/kg をカニクイザルに週 1 回 4 週間反復静脈内投与したとき，C_{max} 及び AUC はほぼ用量に比例して増加した。いずれの動物種においても，C_{max} 及び AUC に反復投与による顕著な蓄積並びに性差は認められなかった。

臨床試験において使用されている [redacted] 社及び [redacted] 社で製造した 2 種類のゾルベツキシマブ原薬 10 mg/kg を雄性カニクイザルに単回静脈内投与したとき，ゾルベツキシマブの薬物動態プロファイルは 2 種類の原薬間で同等であった。

2.4.3.3　分布・代謝・排泄

ゾルベツキシマブはキメラ（マウス／ヒト）IgG1 抗体であることから，分布，代謝及び排泄は内因性の IgG1 分子と同様であり，ペプチド及び個々のアミノ酸に分解されると考えられる。そのため，ICH S6 に従いゾルベツキシマブを用いた分布，代謝及び排泄試験は実施していない。

2.4.3.4　薬物動態学的薬物相互作用

ゾルベツキシマブを用いた薬物動態学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.4.3.5　その他の薬物動態試験

ゾルベツキシマブを用いたその他の薬物動態試験は実施していない。

2.4.4　毒性試験

2.4.4.1　単回投与毒性試験

すべての単回投与試験を非 GLP 下で実施した。マウスには最高 100 mg/kg，カニクイザルには最高 150 mg/kg を投与したが，いずれの試験でも毒性はみられなかった。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

投与頻度は，臨床の投与頻度（3 週間に 1 回）を上回る週 1 回とした。

ゾルベツキシマブを，マウスに 0，100，200 及び 300 mg/kg/week の用量で 13 週間投与した。いずれの用量でも毒性はみられなかった。

ゾルベツキシマブを，カニクイザルに 0，10，30 及び 100 mg/kg/week の用量で 4 週間投与した。本試験では，毒性はみられなかった。

嘔吐が 10 mg/kg 群の雄 1 例の投与 8 日（第 2 回投与日），30 mg/kg 群の雄 1 例の投与 8 日（第 2 回投与日）にみられた。これら雄 2 例にみられた嘔吐は軽度であり，第 2 回投与の投与後 5 分以内にみられた。10 及び 30 mg/kg 群の雌に嘔吐はみられなかった。高用量の 100 mg/kg 群でも雌雄ともに嘔吐はみられなかった。なお，媒体対照群でも，雌雄ともに嘔吐はみられなかった。

媒体対照群で投与期間中に嘔吐がみられなかったことから，雄 2 例にみられた嘔吐は薬剤性である可能性を否定できなかった。しかし，用量相関性がないこと（高用量の 100 mg/kg 群でみられていない），低頻度であること（4 週間の投与観察期間中の 1 回の事象）から，雄 2 例にみられた嘔吐の毒性学的意義は小さいと考えた。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は，ゾルベツキシマブが抗体であり，DNA に直接相互作用するとは考えにくいため実施しなかった。

2.4.4.4　がん原性試験

がん原性試験は，ゾルベツキシマブが ICH S9 ガイドラインの適用範囲である進行がん患者の治療を目的としているため実施しなかった。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

妊娠中又は妊娠する可能性のある患者に，胚や胎児に対する潜在的なリスクに関する情報を提供するために，マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験を 0，100 及び 300 mg/kg の用量で実施した。妊娠動物又は胎児のいずれにも毒性はみられなかった。

ゾルベツキシマブは，進行がん患者の治療を目的としている。したがって，ICH S9 ガイドラインを参考に，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。雌雄生殖器に関しては，重要な反復投与試験（マウスを用いた 13 週間反復投与試験及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験）の中で病理組織学的に検査した。いずれの試験でも生殖器に毒性はみられなかった。

2.4.4.6　局所刺激性試験

局所刺激性の評価は，マウスを用いた 13 週間反復投与試験及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験の一部として行った。いずれの試験でも，肉眼的検査及び病理組織学的検査で投与部位に毒性はみられなかった。

2.4.4.7　その他の毒性試験

2.4.4.7.1　毒性発現の機序に関する試験（嘔吐に関する検討）

ゾルベツキシマブを投与された患者で悪心及び嘔吐が報告されている。この機序を調べる目的で，制吐剤の薬理モデルとしてしばしば用いられるフェレット［Goineau & Castagné, 2016; Percie du Sert & Andrews, 2014］を用いて，毒性発現の機序に関する試験（非 GLP）を実施した。投与後 6 時間までの観察において，空嘔吐は 1 例当たり平均 212 回，嘔吐は 1 例当たり平均 18 回であった。特に最初の 1 時間は，空嘔吐及び嘔吐ともに高頻度にみられた。その後，投与後 6 時間までの間に次第にその頻度は低下した。投与後 6 時間のポイントでは，空嘔吐も嘔吐も消失した。病理組織学的検査により，1）ゾルベツキシマブ投与後の初期病変は胃粘膜表層の傷害であること，2）この傷害がフェレットの嘔吐の発症と関連があること，が明らかになった。さら

に，ゾルベツキシマブによって誘発される嘔吐及び胃粘膜表層の傷害に対する制吐剤の効果を調べた。制吐剤であるホスアプレピタント単独又は他の制吐剤との併用は，ゾルベツキシマブによって誘発される嘔吐回数を抑制する効果を示した。また，デキサメタゾン又はホスアプレピタントと他の制吐剤との併用により胃粘膜表層の傷害軽減傾向が観察された。

フェレットでは，正常の胃組織における CLDN18.2 タンパクの発現部位は，嘔吐の発症と関連している組織傷害の初発部位と一致していた。それゆえ，ゾルベツキシマブを投与したフェレットでみられた嘔吐は，CLDN18.2 タンパクを発現している胃粘膜に対する傷害に関連していると考えられた。ヒトでも，CLDN18.2 タンパクは胃粘膜に発現している。フェレットでの制吐剤の効果は，臨床試験でみられたゾルベツキシマブの悪心及び嘔吐を制吐剤が軽減できる可能性を示唆しているが，情報は限定的であり臨床での効果は不明である。

2.4.4.7.2　組織交差反応性

ヒト組織交差反応性試験では，ゾルベツキシマブが細胞膜に陽性反応を示す組織は胃粘膜のみであった。予期せぬ結合はみられなかった。

2.4.4.8　免疫毒性

ゾルベツキシマブは，上皮のタイトジャンクションに関与する分子 CLDN18.2 に対する抗体である。CLDN18.2 は免疫細胞には発現していない。ADCC 及び CDC を除きゾルベツキシマブの薬理作用が，免疫系にもみられることは想定されていない。

マウスを用いた 13 週間反復投与試験及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験において，白血球数などの血液学的検査やグロブリン値を含む血液生化学的検査に対する影響はみられなかった。剖検時肉眼検査，器官重量及び病理組織学的検査を実施したが，リンパ系臓器組織に対する作用はみられなかった。

カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験において，イムノフェノタイピングや血清中サイトカイン濃度を測定した。いずれの項目においても変化はみられなかった。

以上をまとめると，ゾルベツキシマブが免疫毒性を有する可能性は低いと考えた。

2.4.5　総括及び結論

2.4.5.1　薬理

ゾルベツキシマブは，ヒト IgG1 定常領域を有するキメラ（マウス／ヒト）抗体である。ゾルベツキシマブは，ヒト CLDN18.2 発現細胞に結合したが，mock 細胞やヒト CLDN18.1 発現細胞には結合しなかった。また，ゾルベツキシマブは，CLDN18.2 の細胞外ドメイン 1 を認識すると考えられた。CLDN18.1 は，細胞外ドメイン 1 において CLDN18.2 と多くの違いがあるが，CLDN18.2 と相同性の高いスプライスバリアントである［Türeci et al, 2011］。これらの結果か

ら，ゾルベツキシマブはCLDN18.2に選択的に結合し，CLDN18.1を含む他のクローディンファミリーには作用しないことが示唆される。また，マウス及びカニクイザルのCLDN18.2オルソログに対するゾルベツキシマブの結合親和性は，ヒトCLDN18.2と類似していた。したがって，ゾルベツキシマブはそれらの種のCLDN18.2に対して同程度に作用することが示唆され，毒性試験にはマウス及びカニクイザルを用いた。

ヌードマウスを用いた組織選択性試験では，ゾルベツキシマブはCLDN18.2を発現したヒト腫瘍移植細胞において，選択的に強く，加えて長時間検出された。したがって，ゾルベツキシマブは，CLDN18.2発現腫瘍に作用することが期待される。ゾルベツキシマブの第3相試験では，IHC検査を用いて，腫瘍細胞の75%以上で中程度～強度のCLDN18.2発現の膜染色が認められる被験者を組み入れた。CLDN18.2陽性の判定には，VENTANA CLDN18（43-14A）RxDxアッセイを使用した。

In vitroにおいて，ゾルベツキシマブは，ヒトPBMCの存在下でCLDN18.2を発現する腫瘍細胞を溶解した。免疫系が正常なマウスを用いたin vivo実験では，腫瘍中のNK細胞は，対照群と比較してゾルベツキシマブ投与群で増加する傾向にあった。NK細胞は，IgG1抗体のFc領域との結合を介してADCCに関与することが知られている［Wang et al, 2015］。したがって，CLDN18.2発現の腫瘍細胞に対するゾルベツキシマブの細胞傷害活性には，ADCC活性が関与すると考えられた。また，ゾルベツキシマブは，ヒト血清の存在下で，CLDN18.2を発現する腫瘍細胞を溶解した。血清を加熱により不活性化させると，ゾルベツキシマブによる腫瘍細胞の溶解は観察されなかったことから，血清中の補体タンパク質の関与が示唆され，ゾルベツキシマブの細胞傷害活性にはCDCも寄与していると考えられた。以上より，ADCC及びCDCが，ゾルベツキシマブの作用機序であると同定された。

免疫不全マウス（ヌードマウス）において，ゾルベツキシマブはCLDN18.2を発現する胃腫瘍の増殖を遅延させた。一般に，ヌードマウスではT細胞の数が減少しており，免疫系が抑制されている。一方，NK細胞及び補体系の因子は維持されており［Szadvari et al, 2016］，それぞれADCC及びCDCを引き起こすことが出来ると考えられる。したがって，ヌードマウスにおけるゾルベツキシマブの抗腫瘍効果は，ADCC及びCDCに由来していると推察される。

免疫系が正常なマウスを用いて，化学療法剤と併用したゾルベツキシマブの有効性及び作用機序を検討した。ゾルベツキシマブ又は化学療法剤の単独と比較して，併用により強力な抗腫瘍効果を示した。In vitroでは，化学療法剤を胃癌細胞株に処置すると，細胞表面のCLDN18.2発現が増加し，ゾルベツキシマブによるADCC及びCDC活性が増強された。免疫系が正常なマウス及びin vitro試験の結果を考慮すると，併用投与のより強力な抗腫瘍効果は，化学療法剤によるCLDN18.2発現の増加，並びにゾルベツキシマブ誘発ADCC及びCDCの増強によって引き起こされたと推察される。さらに，ゾルベツキシマブ及び化学療法剤の併用は，腫瘍組織への$CD8^+$ T細胞の浸潤を有意に増加させた。したがって，併用投与によって誘導されたT細胞免疫が，抗腫瘍効果の増強に寄与した可能性が示唆される。

以上より，薬理試験におけるゾルベツキシマブと化学療法剤の併用効果から，臨床においてゾルベツキシマブと化学療法剤の併用効果を検証することは妥当であると考える。

2.4.5.2　薬物動態

ゾルベツキシマブをマウス（100，200 及び 300 mg/kg を 13 週間）及びカニクイザル（10，30 及び 100 mg/kg を 4 週間）に週 1 回投与したとき，C_{max} 及び AUC はほぼ用量に比例して増加した。いずれの動物種においても，C_{max} 及び AUC に反復投与による顕著な蓄積並びに性差は認められなかった。

[redacted]社及び[redacted]社で製造した 2 種類のゾルベツキシマブ原薬 10 mg/kg を雄性カニクイザルに単回静脈内投与したとき，ゾルベツキシマブの薬物動態プロファイルは 2 種類の原薬間で同等であった。

2.4.5.3　毒性

臨床における曝露量に対して約 10 倍の曝露比を得られるように設定した用量においても，マウス及びカニクイザルを用いた反復投与試験では毒性はみられなかった。

マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験では，妊娠動物又は胎児のいずれにも毒性はみられなかった。

投与部位の毒性はみられなかった。

重要な非臨床毒性試験における NOAEL での血清中 C_{max} 又は AUC の値及び臨床用量（600 mg/m^2）との曝露比を下表に示す（表 2.4- 1）

NOAEL での血清中 AUC 値は，臨床用量（600 mg/m^2）の少なくとも 7.5 倍であった。

表 2.4- 1　動物の重要な試験における NOAEL での C_{max} 又は AUC ベースの曝露比

Study Type	NOAEL (mg/kg/week)	Sex	Serum C_{max}		Serum AUC	
			C_{max} (μg/mL) †	Exposure multiple ‡	AUC_{168h} (μg·h/mL) †	Exposure multiple ‡
Mouse/ 13-week (iv) (Study 25469)	300	M	9454	22	232743	8.7
		F	9891	23	230768	8.6
Cynomolgus monkey/ single (iv) (Study 8951-TX-0001)	100 §	M	3010	7.1	232000	8.6
		F	2850	6.7	202000	7.5

NOAEL: no observed adverse effect level; iv: intravenous

†: day 1.

‡: The time factor of AUC was different between animals (AUC_{168h}) and humans (AUC_{21d}). Exposure multiple calculations, therefore, were adjusted for the following equation:

Exposure multiple = [animal C_{max}] or [animal AUC_{168h} x 3] / [human exposure at 600 mg/m^2]. The human exposure of C_{max} or AUC_{21d} was 425 µg/mL or 3359 µg·day/mL (80616 µg·h/mL), respectively (Report 8951-PK-0005).
§: NOAEL of 100 mg/kg/week was determined in the 4-week repeat dose study in cynomolgus monkeys (Study 22337).
Source: Study 25469; Study 8951-TX-0001; Report 8951-PK-0005

2.4.5.4 製剤に含まれるリン酸に関する非臨床安全性評価

リン酸は賦形剤として，製剤中に 100 mg バイアル当たり [redacted] mg 含まれている。ヒトに 800 mg/m^2 を投与した際，この賦形剤の量は [redacted] mg と推定される（体表面積を 1.65 m^2 と仮定）。

リン酸は，非臨床安全性試験で使われたバッチにも含まれていた。マウスを用いた 13 週間反復投与試験，カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験及びマウスを用いた胚・胎児発生に関する試験における NOAEL でのリン酸の量は，それぞれ [redacted]，[redacted] 及び [redacted] mg/kg であった。ヒトに換算する（体重 60 kg と仮定）と，[redacted] mg から [redacted] mg の範囲であった（表 2.4- 2）。

マウスやカニクイザルの NOAEL でのリン酸の量は，ヒトの投与量の少なくとも 2.6 倍以上であった。したがって，製剤に含まれるリン酸の量に関し，安全性は確認できたと考えた。

表 2.4- 2 重要な試験の NOAEL におけるリン酸の量

Study (Study No.)	NOAEL (mg/kg)	Dosing Volume (mL/kg)	Batch ID	Phosphoric Acid Concentration in the Dosing Formulation of the Batch Used (mg/mL)	Phosphoric Acid Level at NOAEL (mg/kg)	Equivalent Phosphoric Acid Level to Humans (60 kg)
13-week study in mice (Study 25469)	300	10	P412118	[redacted]	[redacted]	[redacted]
4-week study in cynomolgus monkeys (Study 22337)	100	3.3	63309002	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Effects on embryo-fetal development in mice (Study 8951-TX-0002)	300	15	7D900	[redacted]	[redacted]	[redacted]

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level
Source: Study 25469; Study 22337; Study 8951-TX-0002

2.4.5.5 結論

ゾルベツキシマブは，ヒト CLDN18.2 発現細胞に結合し，CLDN18.2 の細胞外ドメイン 1 を認識すると考えられた。ゾルベツキシマブは，CLDN18.2 を発現する細胞で，ADCC 及び CDC を引き起こした。In vitro では，化学療法剤を胃癌細胞株に処置すると，細胞表面の CLDN18.2 発現

が増加し，ゾルベツキシマブによる ADCC 及び CDC 活性が増強された。マウス腫瘍モデルでは，ゾルベツキシマブは CLDN18.2 を発現する腫瘍の増殖を抑制し，化学療法剤との併用により，より強力な抗腫瘍効果を示した。

ゾルベツキシマブの薬物動態をマウス及びカニクイザルを用いて評価した。ゾルベツキシマブを反復静脈内投与したとき，C_{max} 及び AUC はほぼ用量に比例して増加した。いずれの動物種においても，C_{max} 及び AUC に反復投与による顕著な蓄積並びに性差は認められなかった。

マウス及びカニクイザルを用いた，重要な反復投与毒性試験（GLP）では，臨床における曝露量に対して約 7.5 倍の用量において，毒性はみられなかった。マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験では，妊娠動物又は胎児のいずれにも毒性はみられなかった。投与部位に毒性はみられなかった。ヒト組織交差反応性試験では，ゾルベツキシマブが細胞膜に陽性反応を示す組織は胃粘膜のみであった。予期せぬ結合はみられなかった。

フェレットを用いた毒性発現の機序に関する試験の結果，病理組織学的検査により，1）ゾルベツキシマブ投与後の初期病変は胃粘膜表層の傷害であること，2）この傷害がフェレットの嘔吐の発症と関連があること，が明らかになった。ゾルベツキシマブ投与によって誘発される嘔吐は，ホスアプレピタント又はホスアプレピタントと他の制吐剤の併用により抑制される可能性が示唆された。ただし，フェレットでの制吐剤の結果は，臨床試験でみられたゾルベツキシマブの悪心及び嘔吐を制吐剤が軽減できる可能性を示唆しているが，情報は限定的であり臨床での効果は不明である。

以上より，ゾルベツキシマブの非臨床における有効性，安全性薬理，薬物動態及び毒性のプロファイルが明らかとなった。それらの結果は，CLDN18.2 陽性癌を有する患者にゾルベツキシマブを用いることの妥当性を裏付けている。

2.4.6　参考文献一覧

Amiri M, Janssen F, Kunst AE. The decline in stomach cancer mortality: exploration of future trends in seven European countries. Eur J Epidemiol. 2011;26:23-8.

Baek JH, Park DJ, Kim GY, Cheon J, Kang BW, Cha HJ, et al. Clinical implications of claudin18.2 expression in patients with gastric cancer. Anticancer Res. 2019;39(12):6973-9.

Goineau S, Castagné V. Comparison of three preclinical models for nausea and vomiting assessment. J Pharmacol Toxicol Methods. 2016;82:45-53.

Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol Rev. 2013;93:525-69.

Niimi T, Nagashima K, Ward JM, Minoo P, Zimonjic DB, Popescu NC, et al. Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. Mol Cell Biol. 2001;21:7380-90.

Rohde C, Yamaguchi R, Mukhina S, Sahin U, Itoh K, Türeci Ö. Comparison of Claudin 18.2 expression in primary tumors and lymph node metastases in Japanese patients with gastric adenocarcinoma. Jpn J Clin Oncol. 2019;49(9):870-6.

Percie du Sert N, Andrews PLR. The ferret in nausea and vomiting research: lessons in translation of basic science to the clinic. In: Fox JG and Marini RP, editors. Biology and Diseases of the Ferret, 3rd edition, John Wiley & Sons;2014:735-78.

Sahin U, Koslowski M, Dhaene K, Usener D, Brandenburg G, Seitz G, et al. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. Clin Cancer Res. 2008;14(23):7624-34.

Strong VE, Wu A-W, Selby LV, Gonen M, Hsu M, Song KY, et al. Differences in gastric cancer survival between the U.S. and China. J Surg Oncol. 2015;112(1):31-7.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021;71:209-49.

Szadvari I, Krizanova O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. Physiol Res. 2016;65(Suppl 4):S441-53.

Türeci Ö, Koslowski M, Helftenbein G, Castle J, Rohde C, Dhaene K, et al. Claudin-18 gene structure, regulation, and expression is evolutionary conserved in mammals. Gene. 2011;481:83-92.

Waddell T, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D, et al. Gastric cancer: ESMO–ESSO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2013;24(Suppl 6):vi57-vi63.

Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 2015;6:368.