2.6.1 緒言

2.6.1.1 被験物質

ゾルベツキシマブ（遺伝子組換え，以降「ゾルベツキシマブ」）は，ヒト免疫グロブリン G サブクラス 1（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，タイトジャンクションの構成分子クローディン 18.2（CLDN18.2）を標的とする。正常組織では，CLDN18.2 は胃粘膜上皮細胞にのみ発現する膜貫通型タンパク質である［Türeci et al, 2011］。CLDN18.2 は，悪性形質転換の過程でも維持され，ヒト胃癌細胞の表面に高頻度に発現している。食道癌，膵臓癌及び肺腺癌においても高発現している［Sahin et al, 2008］。

非臨床薬理試験より，ゾルベツキシマブはヒト CLDN18.2 の細胞外ドメイン 1 に結合し，その結果，抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらす。ゾルベツキシマブは ADCC 及び CDC を介して抗腫瘍効果を発揮する。化学療法剤は，CLDN18.2 発現を増加させ，ゾルベツキシマブ誘発 ADCC 及び CDC を増強する。したがって，併用療法はゾルベツキシマブ又は化学療法剤単独よりも強力な抗腫瘍効果を示すことが期待される。

化合物番号及び被験物質の名称は，以下のとおりである。

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

2.6.1.2 想定する効能・効果及び用法・用量

アステラス製薬は，ゾルベツキシマブをフッ化ピリミジン系及びプラチナ系の化学療法との併用で，転移性又は局所進行切除不能 CLDN18.2 陽性であり（バリデートされた方法により，腫瘍細胞の 75%以上で中程度～強度の膜染色を示す），ヒト上皮増殖因子受容体 2 型（HER2）陰性の胃癌又は胃食道接合部腺癌を有する成人患者への一次治療として開発している。CLDN18.2 陽性の判定に，VENTANA CLDN18（43-14A）RxDx アッセイを使用している。

2 つの国際共同無作為化多施設プラセボ対照第 3 相試験が実施され，それらの結果は，主要試験として本承認申請を裏付けると考えられた。これらの試験では，ゾルベツキシマブは初回用量 800 mg/m^2（体表面積）とし，その後，3 週ごとに 600 mg/m^2（体表面積）で投与されている。国際共同第 3 相試験（SPOTLIGHT）［CL-0301］では mFOLFOX6（フルオロウラシル，ホリナート［又はレボホリナート］及びオキサリプラチンの併用レジメン），国際共同第 3 相試験（GLOW）［CL-0302］では CAPOX（カペシタビン及びオキサリプラチンの併用レジメン）と併用投与されている。ゾルベツキシマブは，化学療法前に最低 2 時間かけて静脈内に投与する。

本剤の想定する効能・効果及び用法・用量は，以下のとおりである。

効能又は効果：CLDN18.2 陽性の治癒切除不能な進行・再発の胃癌
用法及び用量：他の抗悪性腫瘍剤との併用において，通常，成人にはゾルベツキシマブ（遺伝子組換え）として，初回は 800 mg/m^2（体表面積）を，2 回目以降は 600 mg/m^2（体表面積）を 3 週間間隔又は 400 mg/m^2（体表面積）を 2 週間間隔で 2 時間以上かけて点滴静注する。

2.6.1.3 参考文献

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.

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.

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.2.2.1 In Vitro 効力を裏付ける試験 4
2.6.2.2.2 In Vivo 効力を裏付ける試験 13
2.6.2.3 副次的薬理試験 20
2.6.2.4 安全性薬理試験 20
2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用 20
2.6.2.4.2 心血管系及び呼吸系に対する作用 20
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 21
2.6.2.6 考察及び結論 21
2.6.2.7 図表 23
2.6.2.8 参考文献 23

表

表 2.6.2- 1 安全性薬理試験の最高投与量における C_{max} ベースの曝露比 22

図

図 2.6.2- 1 CLDN18.2 を発現する細胞に対するゾルベツキシマブの結合選択性 5
図 2.6.2- 2 ゾルベツキシマブ誘発 ADCC 活性 7
図 2.6.2- 3 ゾルベツキシマブ誘発 CDC 活性 9
図 2.6.2- 4 胃癌細胞へのゾルベツキシマブ結合に対する化学療法剤による影響 10
図 2.6.2- 5 ゾルベツキシマブ誘発 ADCC 活性に対する化学療法剤の効果 11
図 2.6.2- 6 ゾルベツキシマブ誘発 CDC 活性に対する化学療法剤の効果 12
図 2.6.2- 7 標識抗体を投与した NUGC-4 担癌マウスの in vivo 画像 13
図 2.6.2- 8 標識抗体を投与した NUGC-4 担癌マウスの臓器画像 14
図 2.6.2- 9 ゾルベツキシマブを投与した NUGC-4 担癌マウスの組織切片の免疫組織化学染色 15
図 2.6.2- 10 皮下移植された胃癌細胞の増殖に対するゾルベツキシマブの効果 16
図 2.6.2- 11 免疫系が正常な非近交系 NMRI マウスにゾルベツキシマブ及び化学療法剤（EOF）を併用したときの抗腫瘍効果 17

図 2.6.2- 12 免疫系が正常な非近交系 NMRI マウスの TIL に対するゾルベツキシマブ及び化学療法剤（EOF）の併用効果 18
図 2.6.2- 13 免疫系が正常な非近交系 NMRI マウスの腫瘍体積及び $CD8^+$ T 細胞に対するゾルベツキシマブ及び化学療法剤（OF）の併用効果 19

略語及び用語の一覧

略語及び用語	定義
5-FU	5-fluorouracil：フルオロウラシル
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害
ANOVA	analysis of variance
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
cldn18.2	murine claudin-18 splice variant 2：マウスクローディン 18.2
CLS-103~cldn18.2	CLS-103 murine gastric carcinoma cells lentivirally transduced with murine cldn18.2：マウスクローディン 18.2 をレンチウイルスで導入した CLS-103 マウス胃癌細胞
C_{max}	maximum concentration：最高濃度
E	epirubicin：エピルビシン
EGFR	epidermal growth factor receptor：上皮増殖因子受容体
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
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
HEK	Human Embryonic Kidney：ヒト胎児腎
HER2	human epidermal growth factor receptor 2：ヒト上皮増殖因子受容体 2 型
IgG	immunoglobulin G：免疫グロブリン G
IgG1	immunoglobulin G subclass 1：免疫グロブリン G サブクラス 1
IMAB362	former name of zolbetuximab
IV	intravenous：静脈内
K_D	dissociation constant：解離定数
L	leucovorin：ロイコボリン
Max	maximum：最大
MFI	mean fluorescence intensity：平均蛍光強度
NK	natural killer：ナチュラルキラー
NUGC-4	Nagoya University-Gastric Cancer-4
OF	oxaliplatin and 5-fluorouracil：オキサリプラチン及びフルオロウラシル
Ox	oxaliplatin：オキサリプラチン
PBMC	peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核細胞
PBS	phosphate buffered saline：リン酸緩衝生理食塩水
TIL	tumor-infiltrating lymphocyte：腫瘍浸潤リンパ球
Zolbetuximab	ゾルベツキシマブ：ゾルベツキシマブ（遺伝子組換え）

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

ゾルベツキシマブ（IMAB362）は，CLDN18.2 の強制発現細胞及び内因性発現細胞いずれにおいても，ヒト CLDN18.2 に結合親和性を示した。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。CLDN18.2 に対する結合親和性は，ヒト，マウス及びカニクイザルで同程度であった。ゾルベツキシマブはヒト CLDN18.2 発現細胞株において，ADCC 及び CDC を引き起こした。In vitro でヒト CLDN18.2 発現細胞株を化学療法剤で処置すると，細胞表面の CLDN18.2 の発現が増加し，ゾルベツキシマブによる ADCC 及び CDC の活性が増強された。In vivo での組織選択性について，蛍光標識したゾルベツキシマブをマウスに投与し，蛍光イメージングシステムを用いて評価したところ，CLDN18.2 を発現した異種移植腫瘍細胞片に強い蛍光シグナルが認められた。正常胃では弱い蛍光シグナルのみが観察され，他の正常組織ではシグナルは認められなかった。異種腫瘍移植免疫不全マウスにおいて，ゾルベツキシマブの反復投与により，CLDN18.2 陽性の胃腫瘍の増殖が遅延した。免疫系が正常なマウスにおいて，ゾルベツキシマブと化学療法剤の併用は，CLDN18.2 陽性の胃腫瘍に対して抗腫瘍効果を示し，その作用はそれぞれの単独作用と比較して強力であった。また，併用により腫瘍浸潤 $CD8^+$ T 細胞が増加した。

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。また，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。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。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　In Vitro 効力を裏付ける試験

本資料においては特に明記しない限り，KATO-III 及び NUGC-4 は，それぞれ KATO-III 由来ヒト胃癌細胞株及び NUGC-4 由来ヒト胃癌細胞株を表す。これらは，限界希釈法，蛍光活性化セルソーティング並びに遺伝子導入（例えば，線維芽細胞増殖因子結合タンパク質やルシフェラーゼ）によって作製された。

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験（In Vitro）に概要表を示した。

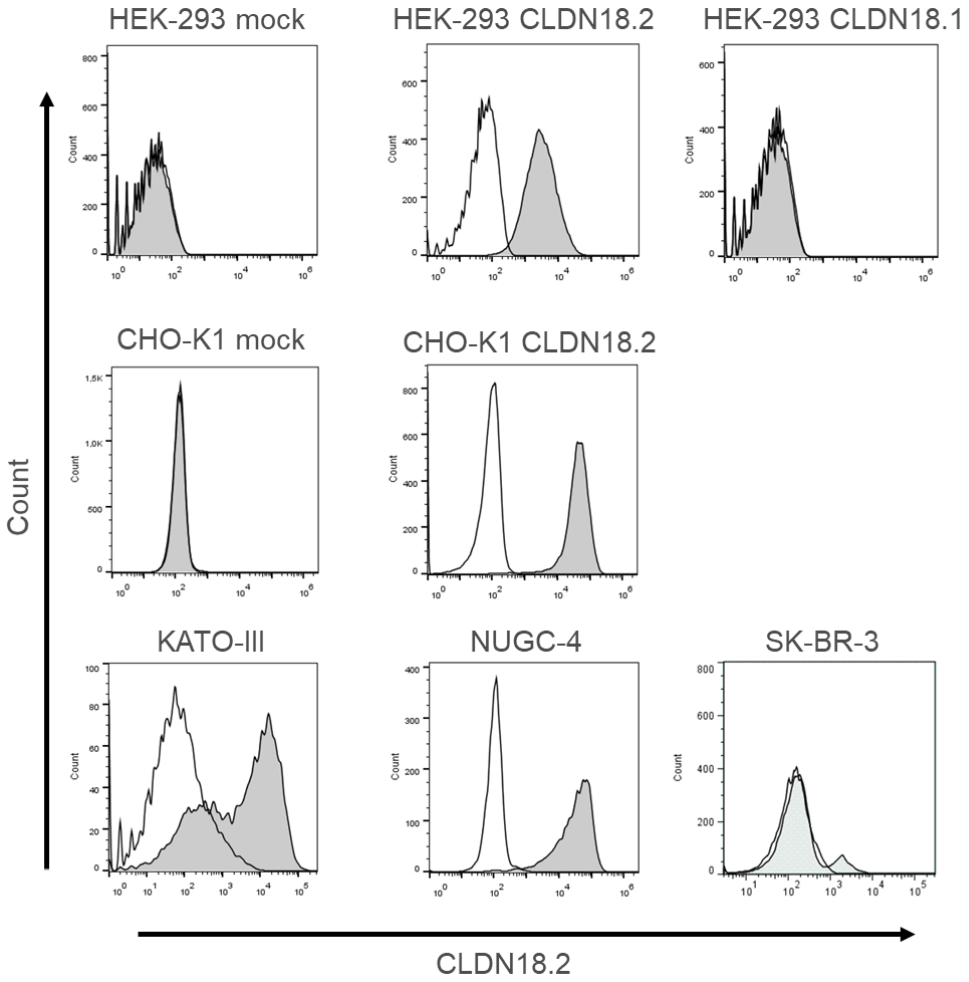
2.6.2.2.1.1　ヒト CLDN18.2 に対する結合選択性

添付資料 4.2.1.1-1

ゾルベツキシマブのヒト CLDN18.2 に対する結合選択性を，フローサイトメトリーにより検討した（GP_P0078 試験）。ゾルベツキシマブは 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，ヒト 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 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（図 2.6.2- 1）。これらの結果は，ゾルベツキシマブの結合が CLDN18.2 に特異的であるのみならず，アイソフォーム選択的であることを示す。

図 2.6.2- 1　CLDN18.2 を発現する細胞に対するゾルベツキシマブの結合選択性



Flow cytometry analyses were performed using parental HEK-293 mock and CHO-K1 mock transfected cell lines and their corresponding CLDN18.2 stably transfected (HEK-293, CHO-K1) counterparts, as well as gastric cancer cell lines (NUGC-4 and KATO-III) and a breast cancer cell line (SK-BR-3) as a CLDN18.2-negative control.　HEK-293 stably transfected with CLDN18.1 was also analyzed.　Histograms show cells stained or unstained with isotype control antibodies (white histograms) or stained with zolbetuximab (gray histograms).

CHO: Chinese Hamster Ovary; CLDN18.1: claudin-18 splice variant 1; CLDN18.2: claudin-18 splice variant 2; HEK: Human Embryonic Kidney; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4.

Source: Study GP_P0078.

2.6.2.2.1.2　ヒト CLDN18.2 の結合エピトープ

添付資料 4.2.1.1-2

ゾルベツキシマブにより認識される CLDN18.2 エピトープについて，CLDN18.2 の細胞外領域（87 アミノ酸残基）を単一アミノ酸変異させることにより検討した。それぞれの変異体は，FreeStyle™ 293-F 細胞を用いて点変異により各アミノ酸をアラニンと置換して作製し，ゾルベツキシマブの結合能はフローサイトメトリーで測定した（8951-PH-0002 試験）。ゾルベツキシマブの結合能が低かった（野生型と比較して MFI 比 25%未満）のは，12 の点変異（W30A，A42G，V43A，N45A，G48A，L49A，W50A，C53A，E56A，F60A，E62A 及び C63A）であった。これらの 12 アミノ酸は，ゾルベツキシマブの CLDN18.2 への結合に重要であると思われる。別の 2 つの点変異（G59A 及び R80A）では，野生型と比較して MFI 比が 25%以上 50%未満であり，結合能が中程度であった。これらのアミノ酸はいずれも細胞外ドメイン 1 に含まれる［Türeci et al, 2011］。したがって，ゾルベツキシマブは CLDN18.2 の細胞外ドメイン 1 に結合することが示唆された。

2.6.2.2.1.3　ヒト CLDN18.2 に対する結合親和性

添付資料 4.2.1.1-1

ゾルベツキシマブのヒト CLDN18.2 への結合親和性を，内因性にヒト CLDN18.2 を発現している KATO-III 及び NUGC-4 細胞株並びにヒト CLDN18.2 を発現させた HEK-293 細胞を用いて，フローサイトメトリーにより検討した（GP_P0078 試験）。ゾルベツキシマブの結合親和性（K_D 値）は，KATO-III，NUGC-4 及び強制発現 HEK-293 細胞でそれぞれ 11.0（9.93 及び 12.1 の平均値），17.3（17.6 及び 17.0 の平均値）及び 2.90 ± 0.86 nmol/L（平均値 ± 標準偏差，n = 9）であった。

2.6.2.2.1.4　マウス及びカニクイザル CLDN18.2 に対する結合親和性

添付資料 4.2.1.1-3

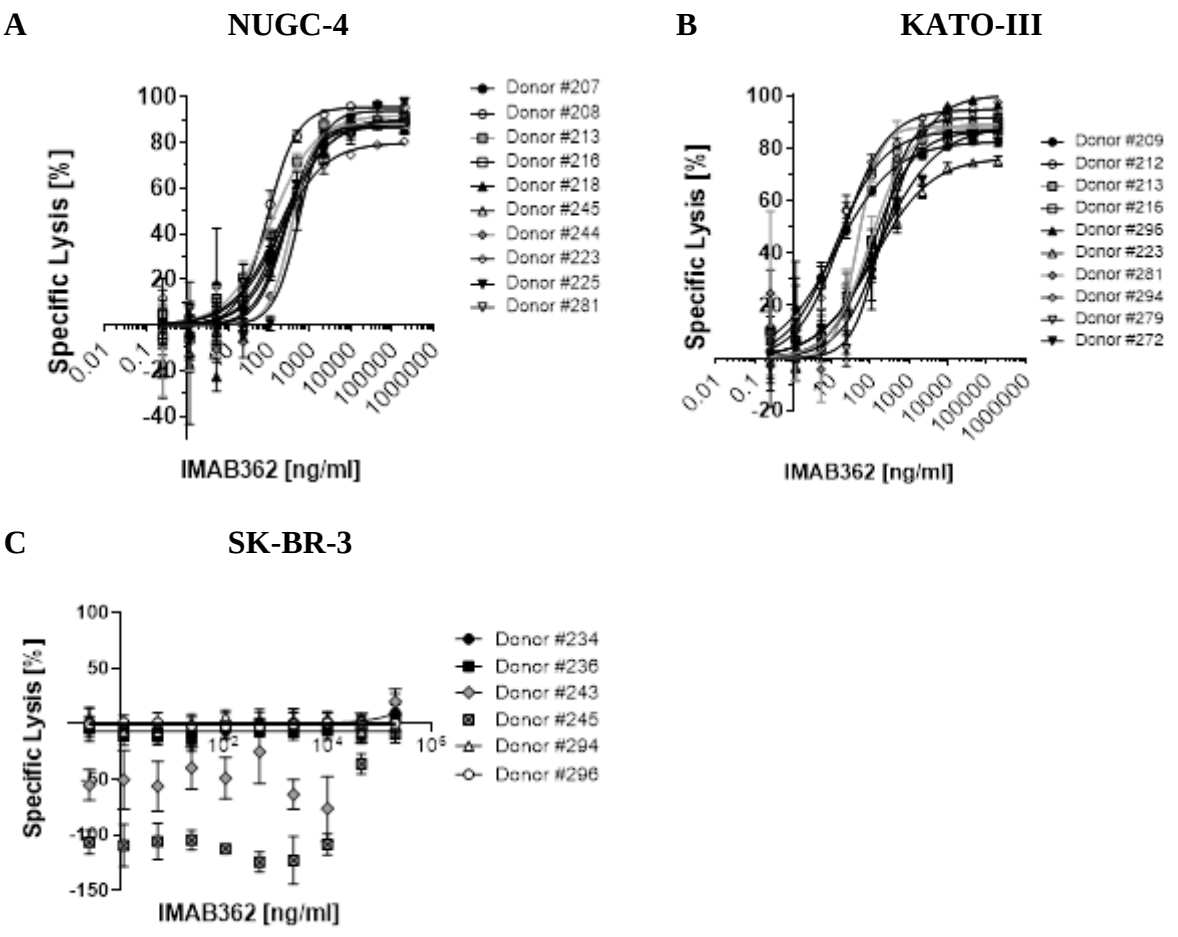
CLDN18.2 の配列は，種を超えて高度に保存されており，ゾルベツキシマブの推定エピトープのアミノ酸配列はヒト，マウス及びサルで高い相同性を持つ［Türeci et al, 2011］。マウス及びカニクイザル由来の CLDN18.2 オルソログを HEK-293 細胞に安定的に発現させて，これらの動物種由来の CLDN18.2 に対するゾルベツキシマブの結合をフローサイトメトリーにより検討した（GP_P0137 試験）。ゾルベツキシマブの結合親和性（K_D 値）は，マウス CLDN18.2 に対しては 2.41 nmol/L（2.60 及び 2.22 の平均値），カニクイザル CLDN18.2 に対しては 2.73 ± 1.48 nmol/L（平均値 ± 標準偏差，n = 3）であった。これらの値は，ヒト CLDN18.2 を発現させた HEK-293 に対するゾルベツキシマブの結合親和性（2.90 ± 0.86 nmol/L, n = 9）と同程度だった。

2.6.2.2.1.5　ゾルベツキシマブによる胃癌細胞に対する ADCC 活性

添付資料 4.2.1.1-1

ADCC 活性に対するゾルベツキシマブの作用を検討した。ルシフェラーゼ導入細胞（NUGC-4，KATO-III 及び SK-BR-3）を用い，健康なドナーの PBMC をエフェクター細胞として，ゾルベツキシマブと共に 24 時間インキュベートした。ADCC による細胞溶解を検出するために，ルシフェリンを添加した後に生物発光を測定した。細胞溶解の最大値は，TritonX-100 溶液の添加により検出した（GP_P0078 試験）。ゾルベツキシマブの処置により，CLDN18.2 発現胃癌細胞である NUGC-4 及び KATO-III は効率的に溶解した（図 2.6.2- 2A 及び図 2.6.2- 2B）。CLDN18.2 を発現しない SK-BR-3 では，ゾルベツキシマブによる細胞溶解は認められなかった。用いたドナーによっては，細胞溶解が認められなかった場合にマイナス値が示されることがあったが，その理由は不明である（図 2.6.2- 2C）。以上より，ゾルベツキシマブは CLDN18.2 を発現している癌細胞に対し，特異的な ADCC 活性を示した。

図 2.6.2- 2　ゾルベツキシマブ誘発 ADCC 活性



Zolbetuximab-induced ADCC response against endogenously CLDN18.2 expressing NUGC-4 (A), KATO-III (B) and CLDN18.2-negative SK-BR-3 breast cancer cells (C) in presence of human PBMCs derived from 10 or

6 healthy donors and zolbetuximab incubated for 24 h. Luciferase-introduced cell lines were used in this figure. Concentration-response curves are shown for 10 or 6 independent ADCC experiments using an effector/target ratio of 40:1. Data are shown as mean ± SD from quadruplicate.

ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; CLDN18.2: claudin-18 splice variant 2; IMAB362: former name for zolbetuximab; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4; PBMC: peripheral blood mononuclear cell.

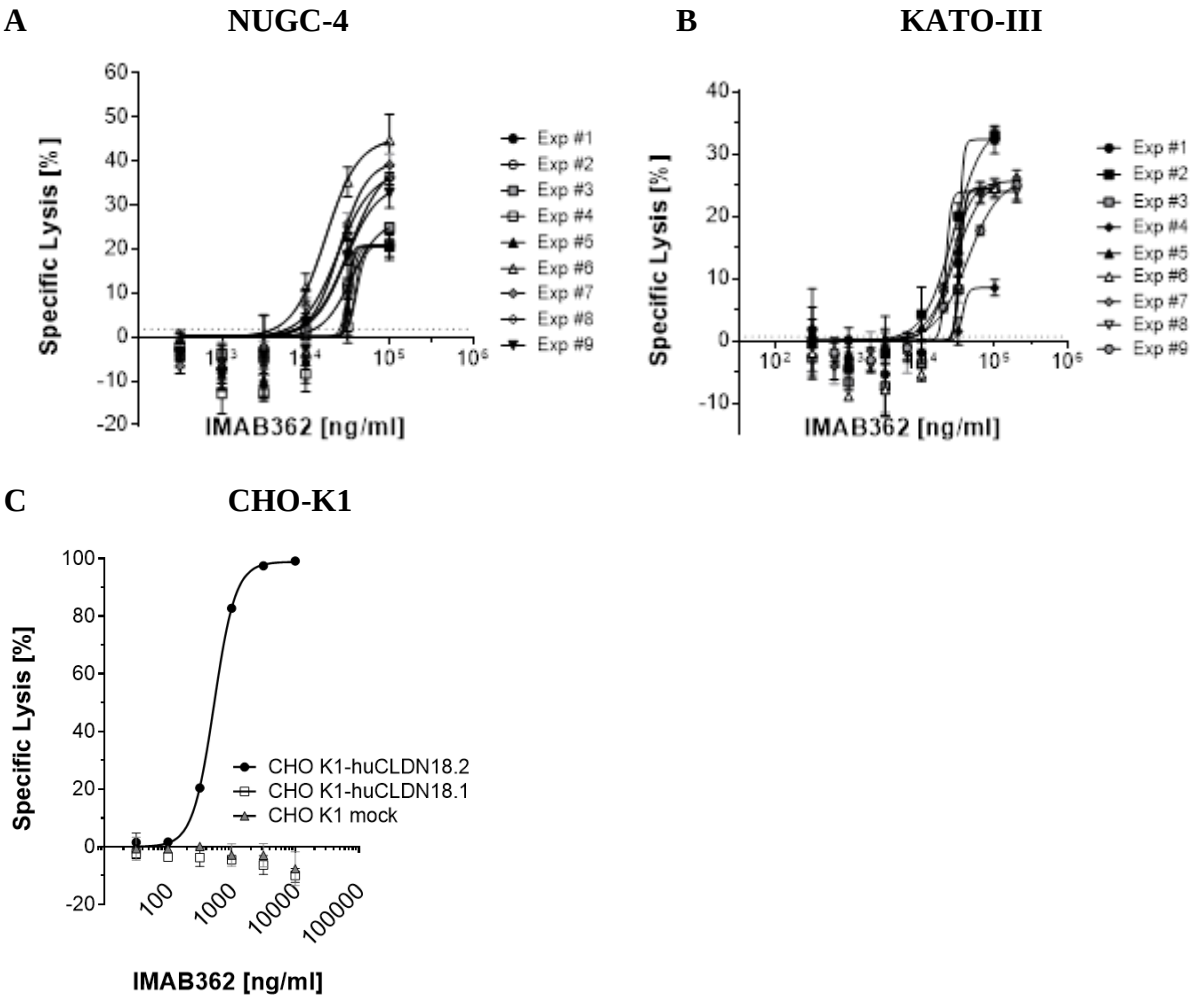
Source: Study GP_P0078.

2.6.2.2.1.6 ゾルベツキシマブによる胃癌細胞に対する CDC 活性

添付資料 4.2.1.1-1

CDC 活性に対するゾルベツキシマブの作用を検討した。NUGC-4，KATO-III 及び CHO-K1 細胞を用い，ヒト血清を補体源として，ゾルベツキシマブと共に 80 分間インキュベートした（GP_P0078 試験）。ゾルベツキシマブの処置により，NUGC-4 及び KATO-III は溶解した（図 2.6.2- 3A 及び図 2.6.2- 3B）。CLDN18.2 を発現させた CHO-K1 細胞は溶解したが，mock 細胞又は CLDN18.1 を発現させた CHO-K1 細胞は溶解しなかった（図 2.6.2- 3C）。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ことから，ゾルベツキシマブによる細胞溶解には，血清中の補体が関与することが示された。以上より，ゾルベツキシマブは，標的細胞における CLDN18.2 の発現に依存した CDC 活性を有することが示された。

図 2.6.2- 3　ゾルベツキシマブ誘発 CDC 活性



Zolbetuximab to induce CDC activity was determined using NUGC-4 and KATO-III gastric cancer cells endogenously expressing CLDN18.2 as well as CHO-K1 cells transfected with CLDN18.1 or CLDN18.2 in the presence of 20% human serum pool for 80 minutes.

Luciferase-introduced cell lines were used in this figure.

(A) Concentration-response curves for CDC on NUGC-4 cells for 9 independent experiments.　Dotted line indicates the average value (1.81%) of heat inactivated serum control based on 4 representative experiments.

(B) Concentration-response curves for CDC on KATO-III cells for 9 independent experiments.　Dotted line indicates the average value (0.71%) of heat inactivated serum control based on 4 representative experiments.

(C) Zolbetuximab-induced CDC activity using target-negative control cell line CHO-K1 (CHO K1 mock) or cell lines stably transfected with human variants of CLDN18.2 (CHO K1-huCLDN18.2) or CLDN18.1 (CHO K1-huCLDN18.1).

Data are shown as mean ± SD from triplicate.

CDC: complement-dependent cytotoxicity; CLDN18.1: claudin-18 splice variant 1; CLDN18.2: claudin-18 splice variant 2; CHO: Chinese Hamster Ovary; IMAB362: former name for zolbetuximab; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4.

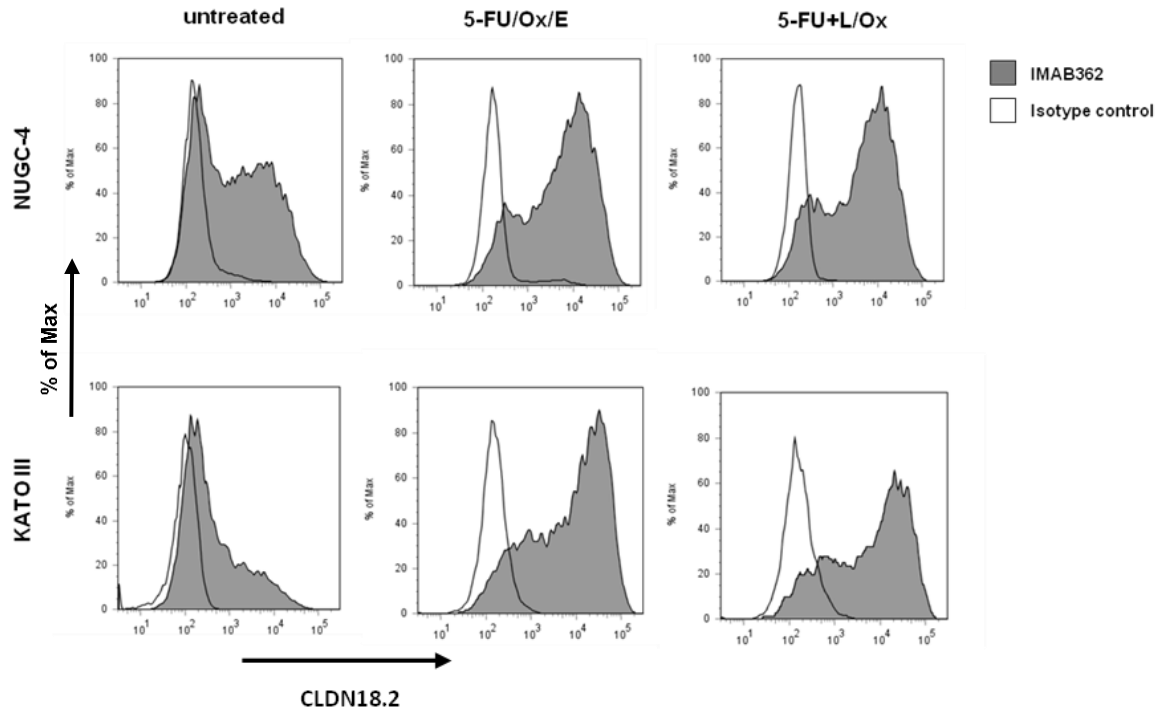
Source: Study GP_P0078.

2.6.2.2.1.7　化学療法剤によるヒト CLDN18.2 に対する結合の増加

添付資料 4.2.1.1-1

化学療法剤は，臨床において胃癌又は胃食道接合部癌の治療に使用されている。ゾルベツキシマブの CLDN18.2 に対する結合への化学療法剤の影響を，フローサイトメトリーを用いて検討した（GP_P0078 試験）。NUGC-4 及び KATO-III 細胞を，EOF（5-FU/Ox/E）又は FLO（5-FU+L/Ox）で処置すると，ゾルベツキシマブの結合が増加した（図 2.6.2- 4）。この結果は，化学療法剤が，細胞表面での CLDN18.2 タンパク質の発現量を増加させたことを示唆する。

図 2.6.2- 4　胃癌細胞へのゾルベツキシマブ結合に対する化学療法剤による影響



Flow cytometry analyses were performed using gastric cancer cell lines (NUGC-4 and KATO-III) treated with chemotherapy agents.　Histograms show cells stained with isotype control antibodies (white histograms) or zolbetuximab (gray histograms) upon 96 h treatment with EOF (5-FU/Ox/E; 5-FU: 10 ng/mL, Ox: 500 ng/mL E: 10 ng/mL), FLO (5-FU+L/Ox; 5-FU: 10 ng/mL, L: 50 ng/mL, Ox: 500 ng/mL) or untreated.　% of max (Y axis) = % of gated cells.

5-FU: 5-fluorouracil; CLDN18.2: claudin-18 splice variant 2; E: epirubicin; EOF: epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil; FLO: 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin; IMAB362: former name for zolbetuximab; L: leucovorin; Max: maximum; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4; Ox: oxaliplatin.

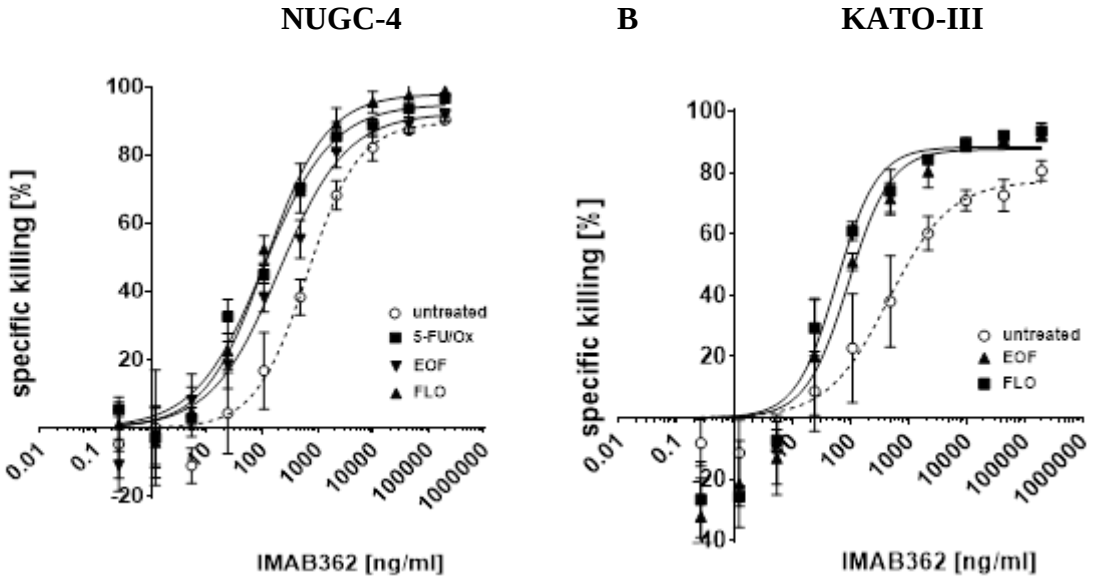
Source: Study GP_P0078.

2.6.2.2.1.8　ゾルベツキシマブ誘発 ADCC 活性に対する化学療法剤の増強効果

添付資料 4.2.1.1-1

ゾルベツキシマブ誘発 ADCC 活性に対する化学療法剤の効果を検討した。NUGC-4 及び KATO-III に，OF（5-FU/Ox），EOF 又は FLO を処置した。健康なドナーの PBMC をエフェクター細胞とした（GP_P0078 試験）。ADCC 活性の濃度反応曲線から，化学療法剤の処置により，ゾルベツキシマブを介した ADCC 活性の増強が示された（図 2.6.2- 5）。

図 2.6.2- 5　ゾルベツキシマブ誘発 ADCC 活性に対する化学療法剤の効果



Zolbetuximab-induced ADCC response against gastric cancer cells after treatment with chemotherapeutic agents at the following concentrations: OF (Ox: 500 ng/mL, 5-FU: 10 ng/mL), EOF (E: 10 ng/mL, Ox: 500 ng/mL, 5-FU: 10 ng/mL) or FLO (5-FU: 10 ng/mL, L: 50 ng/mL, Ox: 500 ng/mL).　Luciferase-introduced cell lines were used in this figure.

(A) Concentration-response curves of ADCC-induced specific killing (%) in NUGC-4 cells treated with OF, EOF or FLO for 96 h (1 representative donor out of 9).

(B) Concentration-response curves of ADCC-induced specific killing (%) of KATO-III cells treated with EOF or FLO for 120 h (1 representative donor out of 7).

Data are shown as mean ± SD from triplicate or quadruplicate.

5-FU: 5-fluorouracil; ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; EOF: epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil; FLO: 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin; IMAB362: former name for zolbetuximab; L: leucovorin; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4; OF: oxaliplatin and 5-fluorouracil; Ox: oxaliplatin.

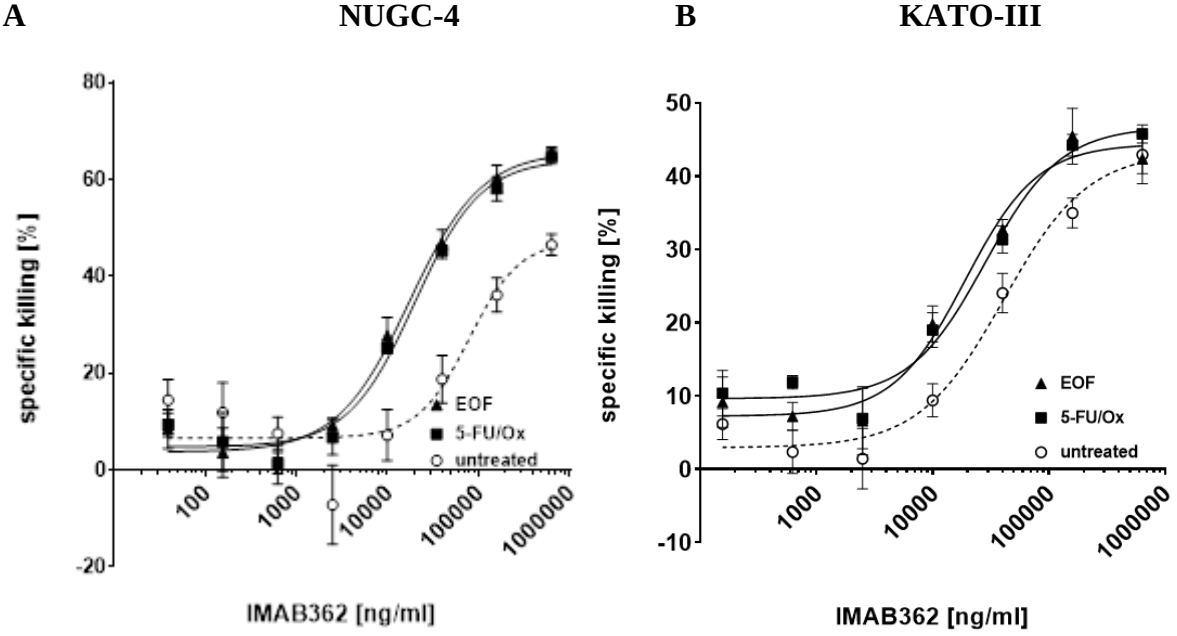
Source: Study GP_P0078.

2.6.2.2.1.9　ゾルベツキシマブ誘発 CDC 活性に対する化学療法剤の増強効果

添付資料 4.2.1.1-1

ゾルベツキシマブ誘発 CDC 活性に対する化学療法剤の効果を検討した。KATO-III 及び NUGC-4 に OF 又は EOF を処置した。ヒト血清を補体源とした（GP_P0078 試験）。ADCC 活性と同様に，胃癌細胞に化学療法剤を処置することにより，化学療法剤を処置していない細胞と比較して，ゾルベツキシマブはより低い濃度で溶解作用を示した。したがって，化学療法剤により，ゾルベツキシマブを介した CDC 活性に対する感受性が亢進することが示された（図 2.6.2- 6）。

図 2.6.2- 6　ゾルベツキシマブ誘発 CDC 活性に対する化学療法剤の効果



Zolbetuximab-induced CDC against gastric cancer cells after treatment with chemotherapeutic agents at the following concentrations:　EOF (E: 10 ng/mL, Ox: 500 ng/mL, 5-FU: 10 ng/mL) or OF (Ox: 500 ng/mL, 5-FU: 10 ng/mL).　Luciferase-introduced cell lines were used in this figure.

(A) Concentration-response curves of CDC-induced specific killing (%) in NUGC-4 cells treated with EOF or OF for 72 h.

(B) Concentration-response curves of CDC-induced specific killing (%) in KATO-III cells treated with EOF or OF for 48 h.

Data are representative of 3 (A) and 2 (B) experiments and shown as mean ± SD from triplicate.

5-FU: 5-fluorouracil; CDC: complement-dependent cytotoxicity; E: epirubicin; EOF: epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil; IMAB362: former name for zolbetuximab; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4; OF: oxaliplatin and 5-fluorouracil; Ox: oxaliplatin.

Source: Study GP_P0078.

2.6.2.2.2 In Vivo 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.2 効力を裏付ける試験（In Vivo）に概要表を示した。

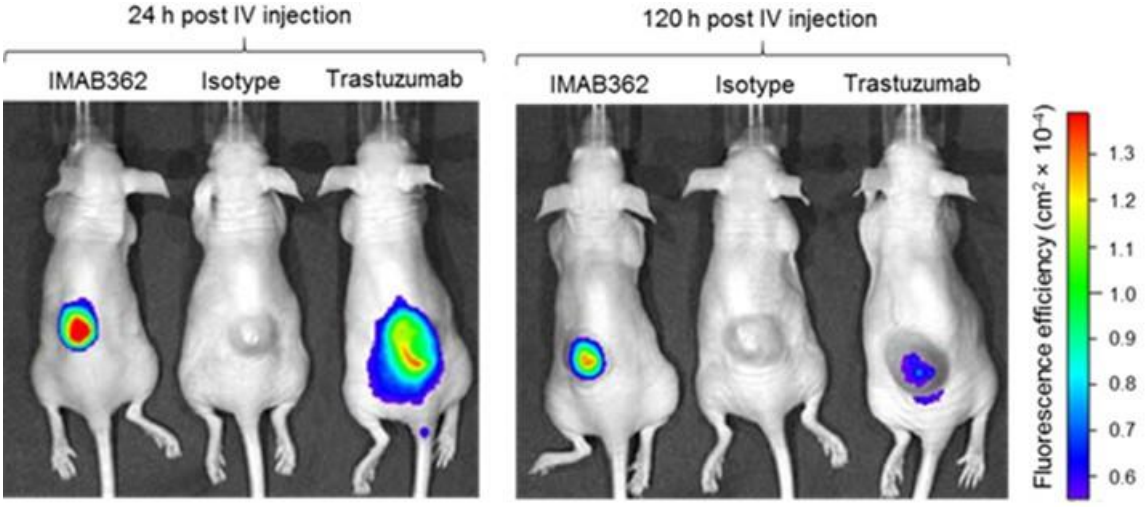
2.6.2.2.2.1 生体内組織選択性

2.6.2.2.2.1.1 ゾルベツキシマブの CLDN18.2 陽性腫瘍に対する選択性：画像解析

添付資料 4.2.1.1-1

CLDN18.2 は，正常胃組織や一部の癌組織に発現することが知られている［Sahin et al, 2008］。本試験では，CLDN18.2 を発現する腫瘍細胞を移植したヌードマウスを用いて，ゾルベツキシマブの CLDN18.2 に対する結合を検討した（GP_P0078 試験）。ヌードマウスに，1 × 10^6 個の NUGC-4 細胞を皮下に移植した。NUGC-4 細胞は，内因性に CLDN18.2 及び HER2 を同程度共発現するが，CD20 は発現していない。腫瘍を移植した 16 日後，担癌マウスに DyLight 680 標識ゾルベツキシマブ，同トラスツズマブ（抗 HER2 抗体；陽性対照）又は同リツキシマブ（抗 CD20 抗体；ゾルベツキシマブのアイソタイプ対照）をそれぞれ 45 µg（1.8 mg/kg に相当）静脈内投与した。各抗体の結合は，Xenogen®イメージングシステムにより蛍光シグナルを検出した。ゾルベツキシマブ及びトラスツズマブは，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，120 時間後でも同程度の強度で検出された。トラスツズマブの蛍光シグナルは，投与 120 時間以内に急速に低下した（図 2.6.2- 7）。

図 2.6.2- 7　標識抗体を投与した NUGC-4 担癌マウスの in vivo 画像



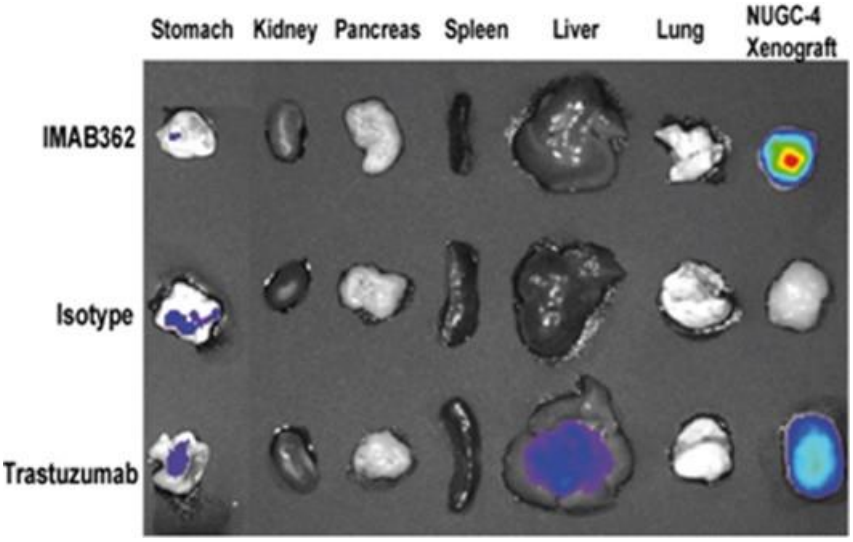
Xenogen® fluorescence analysis of NUGC-4 tumor cell engrafted nude mice after intravenous administration of the DyLight 680-labeled antibodies (1 mouse per group): zolbetuximab, trastuzumab as a positive control and rituximab as an isotype control.　Pseudocolors represent antibody-binding density to CLDN18.2 or HER2 ranging from low (blue) to high (red).

CLDN18.2: claudin-18 splice variant 2; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; IMAB362: former name for zolbetuximab; IV: intravenous; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4.

Source: Study GP_P0078.

抗体を投与したマウスを，投与 6 日後に安楽死させた。臓器を採取し，組織選択的結合を測定した。CLDN18.2 を発現した腫瘍移植片では強い蛍光シグナルが，正常胃では僅かな蛍光シグナルが認められたが，その他の正常組織では蛍光シグナルは検出されなかった（図 2.6.2- 8）。

図 2.6.2- 8　標識抗体を投与した NUGC-4 担癌マウスの臓器画像



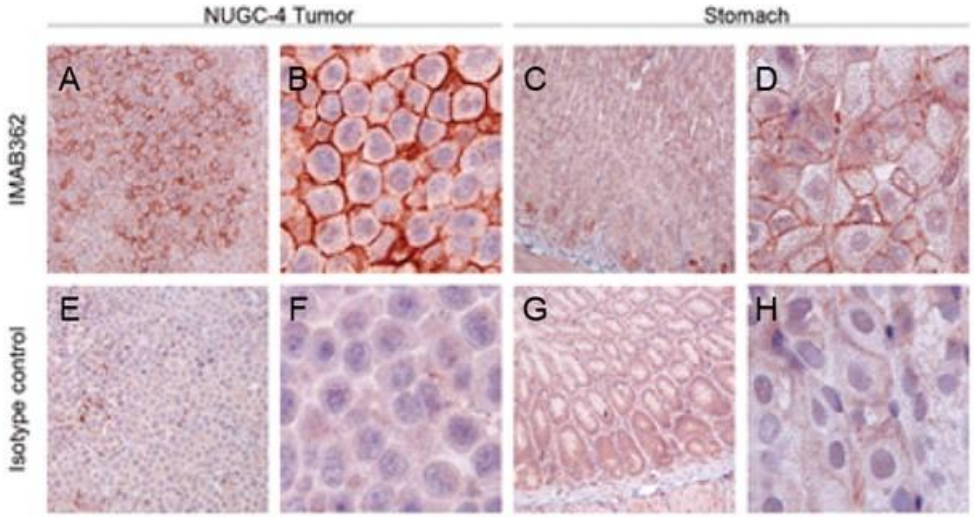
Organs of mice euthanized 6 days after administration of fluorescence-labeled antibodies (1 mouse per group) of zolbetuximab, trastuzumab as a positive control and rituximab as an isotype control antibody.　Tissue-bound fluorescence was measured using a Xenogen® system.
IMAB362: former name for zolbetuximab; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4.
Source: Study GP_P0078.

2.6.2.2.2.1.2　ゾルベツキシマブの CLDN18.2 陽性腫瘍に対する選択性：免疫組織化学分析

添付資料 4.2.1.1-1

免疫組織化学分析の手法を用い，ゾルベツキシマブの組織選択性を検討した。NUGC-4 腫瘍細胞を移植したヌードマウスに，ゾルベツキシマブ 200 µg（8 mg/kg に相当）を単回静脈内投与した。投与 72 時間後に NUGC-4 腫瘍移植片，胃，肝臓及び肺を採取し，抗ヒト IgG 抗体を用いてゾルベツキシマブの結合を検討した（GP_P0078 試験）。腫瘍移植組織では，ゾルベツキシマブの強い染色が検出された（図 2.6.2- 9A 及び図 2.6.2- 9B）。正常胃では，ゾルベツキシマブの染色が僅かに認められた（図 2.6.2- 9C 及び図 2.6.2- 9D）。肝臓及び肺では，ゾルベツキシマブの染色は検出されなかった。アイソタイプを投与したマウスの組織では，染色は検出されなかった（図 2.6.2- 9E から図 2.6.2- 9H）。

図 2.6.2- 9　ゾルベツキシマブを投与した NUGC-4 担癌マウスの組織切片の免疫組織化学染色



Immunohistochemistry analysis of paraffin section prepared from the organs of NUGC-4 tumor cell engrafted mice 72 h after zolbetuximab intravenous administration. Detection of zolbetuximab and isotype control was performed with an antihuman IgG antibody. Magnification: 100x (A, C, E and G) and 400x (B, D, F and H).
IgG: immunoglobulin G; IMAB362: former name for zolbetuximab; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4.
Source: Study GP_P0078.

以上より，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。

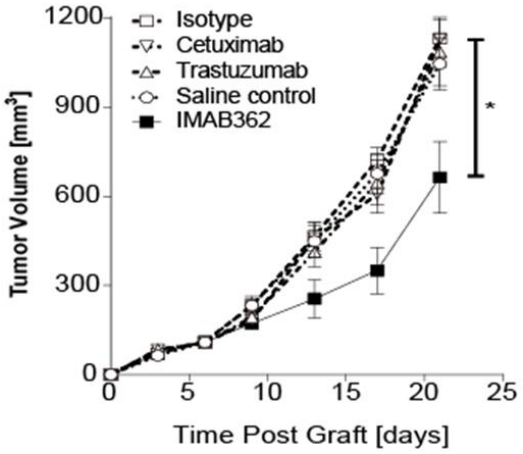
2.6.2.2.2.2　免疫不全マウスを用いた異種腫瘍移植モデル：ゾルベツキシマブ単独による抗腫瘍効果

添付資料 4.2.1.1-1

免疫不全マウスに異種腫瘍を移植したモデルを用い，ゾルベツキシマブ単独療法による抗腫瘍効果を検討した（GP_P0078 試験）。マウスに，内在的に CLDN18.2，EGFR 及び HER2 を発現する NUGC-4 腫瘍細胞を移植した。腫瘍を移植した 6 日目から，ゾルベツキシマブ，セツキシマブ（抗 EGFR 抗体），トラスツズマブ（抗 HER2 抗体），リツキシマブ（アイソタイプ対照）又は生理食塩水を，200 μg（8 mg/kg に相当）にて静脈内投与及び腹腔内投与を交互に週 2 回行った。腫瘍体積は週 2 回測定した。

ゾルベツキシマブ投与群は，セツキシマブ，トラスツズマブ，アイソタイプ対照及び生理食塩水対照群と比較し，腫瘍増殖の遅延がみられた（図 2.6.2- 10）。

図 2.6.2- 10　皮下移植された胃癌細胞の増殖に対するゾルベツキシマブの効果



NUGC-4 gastric cancer cells (1×10^7) were injected subcutaneously into the flank of immunocompromised mice (n = 9 for zolbetuximab group; n = 8 for other groups). Zolbetuximab, cetuximab, trastuzumab and controls (rituximab as isotype control and PBS + L-Arginine as saline control) at 200 µg were administered twice weekly by alternating intravenous and intraperitoneal injections. Treatments started 6 days after tumor inoculation with intravenous injection. Tumor sizes were measured twice weekly. Data are shown with means and SEM. One-way ANOVA followed by Tukey´s multiple comparisons test was used for statistical analysis.

ANOVA: analysis of variance; IMAB362: former name for zolbetuximab; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4; PBS: phosphate buffered saline.

*: $P < 0.05$ vs cetuximab, trastuzumab and isotype.

Source: Study GP_P0078.

2.6.2.2.2.3　免疫系が正常なマウスを用いた同種腫瘍移植モデル：ゾルベツキシマブ及び化学療法剤（EOF）との併用による抗腫瘍効果

添付資料 4.2.1.1-4

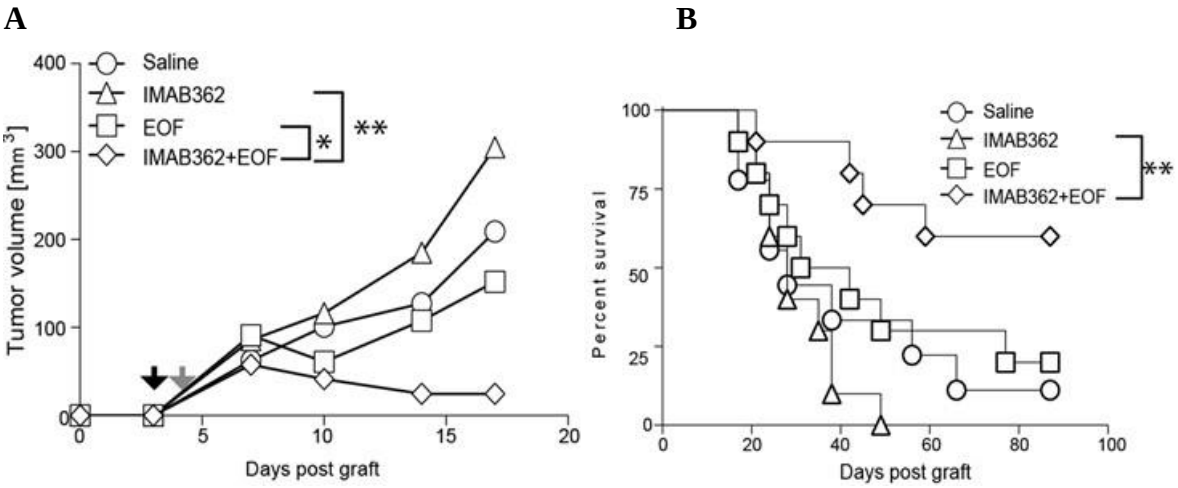
ゾルベツキシマブの作用機序は ADCC 及び CDC であり，免疫エフェクター機能によって媒介されるため，免疫不全マウスの治療モデルでは，十分に評価されない可能性がある。そこで，免疫系が正常なマウスの胃癌モデルを用いて，免疫エフェクターが機能する条件下で，ゾルベツキシマブと化学療法剤（EOF）の併用時の抗腫瘍効果を検討した（GP_P0165 試験）。

非近交系 NMRI マウスに，マウス cldn18.2 をレンチウイルスで導入した CLS-103 マウス胃癌細胞（CLS-103~cldn18.2）を皮下移植した。そのマウスに，ゾルベツキシマブ又は EOF 単独，あるいはゾルベツキシマブと EOF を併用投与した。腫瘍を移植した 3 日目から，EOF（E：1.25 mg/kg，Ox：3.25 mg/kg，5-FU：56.25 mg/kg）を，週 1 回 4 週間，腹腔内投与した。腫瘍を移植した 4 日目から，ゾルベツキシマブは 800 µg（32 mg/kg に相当）を，週 1 回 9 週間，静注内投与した。腫瘍体積を週 2 回，17 日目まで測定し，生存率は 87 日目まで評価した。

ゾルベツキシマブ及び EOF を併用投与すると，ゾルベツキシマブ又は EOF 単独と比較して，腫瘍体積の増加は有意に抑制された（図 2.6.2- 11A）。また，併用投与により，ゾルベツキシマブ

単独と比較して，腫瘍を移植したマウスの生存期間が延長した（図 2.6.2- 11B）。本試験においてはゾルベツキシマブ単独では抗腫瘍効果を示さなかったが，その理由は不明である。

図 2.6.2- 11　免疫系が正常な非近交系 NMRI マウスにゾルベツキシマブ及び化学療法剤（EOF）を併用したときの抗腫瘍効果



CLS-103~cldn18.2 cancer cells (1×10^6) were injected subcutaneously into the flank of NMRI mice (n = 10). EOF (E: 1.25 mg/kg, Ox: 3.25 mg/kg, 5-FU: 56.25 mg/kg) were administered intraperitoneally once weekly for 4 weeks from day 3 after tumor inoculation.　Zolbetuximab at 800 µg was administered intravenously once weekly for 9 weeks from day 4 after tumor inoculation.　Tumor volumes were measured twice weekly until day 17.　Survival was measured until day 87.　Mice were euthanized when tumor reached a volume of 1400 mm^3 or tumors became ulcerous.

(A) Tumor growth curve of subcutaneous CLS-103~cldn18.2 tumor.　Mean tumor volumes are shown. Black arrow indicates start of chemotherapy treatment and gray arrow indicates start of zolbetuximab treatment. Kruskall-Wallis test with Dunn's multiple comparisons were used for statistical analysis.

(B) Kaplan-Meier survival plots.　Log-rank (Mantel-Cox) Test was used for statistical analysis.

5-FU: 5-fluorouracil; CLS-103~cldn18.2: CLS-103 murine gastric carcinoma cells lentivirally transduced with murine cldn18.2; E: epirubicin; EOF: epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil; IMAB362: former name for zolbetuximab; Ox: oxaliplatin.

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

Source: Study GP_P0165.

2.6.2.2.2.4　免疫系が正常なマウスを用いた同種腫瘍移植モデル：ゾルベツキシマブ及び化学療法剤（EOF）との併用による TIL 増加効果

添付資料 4.2.1.1-4

ADCC 及び CDC に加え，それ以外の免疫調節作用の可能性について，ゾルベツキシマブ及び化学療法剤の併用が腫瘍組織への免疫細胞の浸潤に影響を及ぼすか検討した。同種腫瘍移植モデルを用いた（GP_P0165 試験）。

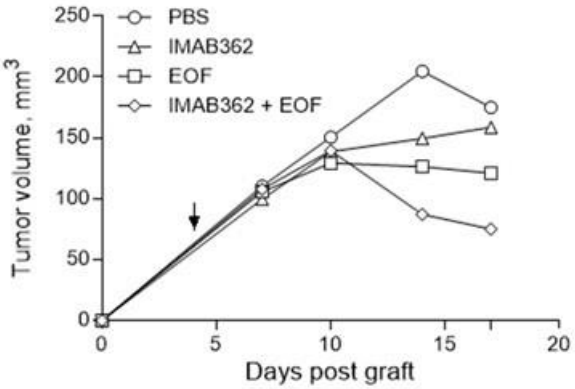
非近交系 NMRI マウスに，マウス cldn18.2 を過剰発現する同種腫瘍細胞 CLS-103~cldn18.2 を皮下に移植した。そのマウスに，ゾルベツキシマブ又は EOF 単独，あるいはゾルベツキシマブ

及び EOF を併用して投与した。腫瘍を移植した 4 日目から，ゾルベツキシマブは 200 µg（8 mg/kg に相当）を，週 2 回 3 週間，静脈内又は腹腔内投与した。同じく腫瘍を移植した 4 日目から，EOF（E：1.25 mg/kg，Ox：3.25 mg/kg，5-FU：56.25 mg/kg）を，週 1 回 2 週間，腹腔内投与した。腫瘍体積を週 2 回，17 日目まで測定した。TIL は 18 日目にフローサイトメトリーで解析した。

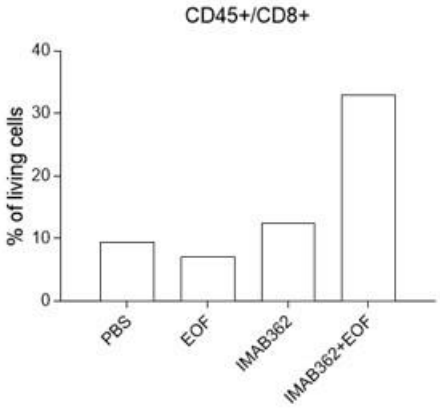
ゾルベツキシマブと EOF を併用投与した群では，他の投与群と比較して腫瘍体積が小さかった（図 2.6.2- 12A）。$CD45^+/CD8^+$ T 細胞の腫瘍組織内の割合は，ゾルベツキシマブ又は EOF 単独で投与しても，PBS 投与と同程度であった。ゾルベツキシマブ及び EOF の併用投与では，$CD45^+/CD8^+$ T 細胞の腫瘍組織への浸潤が増加した（図 2.6.2- 12B）。以上より，ゾルベツキシマブと化学療法剤の併用は，局所の腫瘍内微小環境において，$CD8^+$ T 細胞の増加を伴う T 細胞の集積を誘導する可能性が示唆された。

図 2.6.2- 12　免疫系が正常な非近交系 NMRI マウスの TIL に対するゾルベツキシマブ及び化学療法剤（EOF）の併用効果

A



B



CLS-103~cldn18.2 cancer cells (2×10^6) were injected subcutaneously into the flank of NMRI mice (n = 10). EOF (E: 1.25 mg/kg, Ox: 3.25 mg/kg, 5-FU: 56.25 mg/kg) were administered intraperitoneally once weekly for 2 weeks from day 4 after tumor inoculation. Zolbetuximab at 200 µg was administered intravenously or intraperitoneally twice weekly for 3 weeks from day 4 after tumor inoculation.

(A) Mean tumor growth curve of subcutaneous CLS-103~cldn18.2 tumor until day 17 (n = 10 on days 0, 7 and 10; n = 7 on days 14 and 17 because 3 mice were euthanized on day 11 for another experiment according to the study plan). Tumor volumes were measured twice weekly until day 17. Mean tumor volumes are shown. Black arrow indicates start of chemotherapy and zolbetuximab treatments.

(B) $CD45^+/CD8^+$ TILs on day 18 analyzed by flow cytometry. Data are from 3 tumors.

5-FU: 5-fluorouracil; CD: cluster of differentiation; CLS-103~cldn18.2: CLS-103 murine gastric carcinoma cells lentivirally transduced with murine cldn18.2; E: epirubicin; EOF: epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil; IMAB362: former name for zolbetuximab; Ox: oxaliplatin; PBS: phosphate buffered saline; TIL: tumor-infiltrating lymphocyte.

Source: Study GP_P0165.

2.6.2.2.2.5　免疫系が正常なマウスを用いた同種腫瘍移植モデル：ゾルベツキシマブ及び化学療法剤（OF）との併用による抗腫瘍及び TIL 増加効果

添付資料 4.2.1.1-5

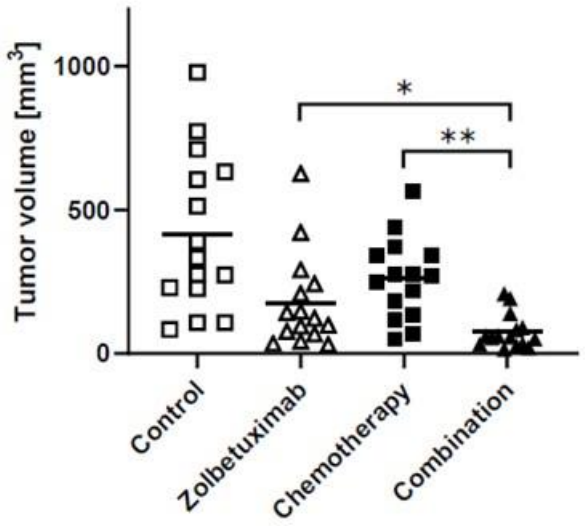
現在臨床で使用されている化学療法剤（OF）をゾルベツキシマブと併用した際の抗腫瘍効果及び TIL 増加効果について検討した。同種腫瘍移植モデルを用いた（8951-PH-0001 試験）。

非近交系 NMRI マウスに，CLS-103~cldn18.2 を皮下移植した。そのマウスに，ゾルベツキシマブ又は OF 単独，あるいはゾルベツキシマブ及び OF を併用して投与した。腫瘍を移植した 2 日目から，ゾルベツキシマブ 800 µg 及び OF（Ox：1 mg/kg，5-FU：30 mg/kg）を，週 2 回 2 週間，腹腔内投与した。腫瘍体積を週 2 回，16 日目まで測定した。TIL は 16 日目にフローサイトメトリーで解析した。

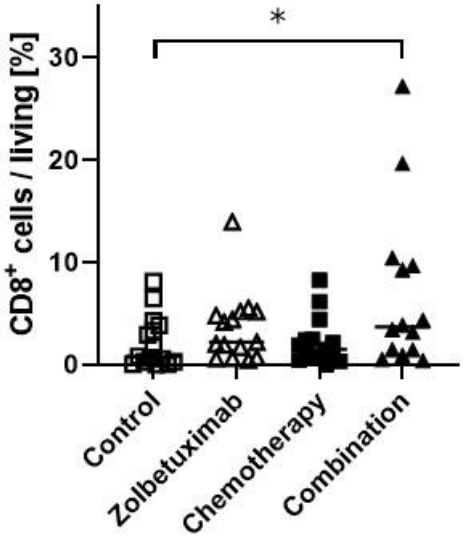
ゾルベツキシマブ及び OF を併用投与すると，ゾルベツキシマブ又は OF 単独投与と比較して，16 日目の腫瘍体積が有意に小さかった（図 2.6.2- 13A）。$CD8^+$ T 細胞の腫瘍組織への浸潤は，対照群と比較して，併用投与群で有意に増加した（図 2.6.2- 13B）。同じ実験において，NK 細胞は，対照群と比較して，ゾルベツキシマブ単独投与群で増加する傾向であった（P = 0.06）。

図 2.6.2- 13　免疫系が正常な非近交系 NMRI マウスの腫瘍体積及び $CD8^+$ T 細胞に対するゾルベツキシマブ及び化学療法剤（OF）の併用効果

A



B



CLS-103~cldn18.2 cancer cells (2×10^6) were injected subcutaneously into the flank of NMRI mice (n = 15). Zolbetuximab at 800 μg or rituximab (isotype control for zolbetuximab), Ox at 1 mg/kg or 5% glucose, and 5-FU at 30 mg/kg or PBS were administered intraperitoneally for 2 weeks from day 2 after tumor inoculation. Tumor volumes were measured until day 16 twice weekly. TILs on day 16 were analyzed by flow cytometry.

(A) Scatter plots of the individual tumor volume on day 16 (n = 15). Short horizontal lines represent the mean values. Unpaired Student's t-test was used for the comparison of values on day 16 in the combination group with those in the zolbetuximab group or the chemotherapy group, separately.

(B) Scatter plot of the frequency of $CD8^+$ T cells analyzed by flow cytometry (n = 15 for control, zolbetuximab and chemotherapy group, n = 14 for combination group because sufficient numbers of cells could not be obtained from 1 tumor sample). Short horizontal lines represent the medians. Mann-Whitney U test was used for the comparison of the combination group with the control group.

5-FU: 5-fluorouracil; CD: cluster of differentiation; CLS-103~cldn18.2: CLS-103 murine gastric carcinoma cells lentivirally transduced with murine cldn18.2; OF: oxaliplatin and 5-fluorouracil; Ox: oxaliplatin; PBS: phosphate buffered saline.

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

Source: Study 8951-PH-0001.

2.6.2.3 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。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

添付資料 4.2.1.3-1

中枢神経系に対する作用は，マウスを用いて Irwin 法により評価した（22508 試験）。媒体又はゾルベツキシマブを各群 8 例の雌の NMRI マウスに 0，10，30 及び 100 mg/kg の投与量で単回静脈内投与した。意識，気分，運動性，行動変化，姿勢，筋緊張，反射及び自律神経機能を含む神経薬理学的項目を投与後 5，15，30 及び 60 分に検査した。

中枢神経系に対するゾルベツキシマブの作用はみられなかった。

2.6.2.4.2 心血管系及び呼吸系に対する作用

添付資料 4.2.3.2-4

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 週間反復投与試験（22337 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各群雌雄各 3 例のカニクイザルに 0，10，30 及び 100 mg/kg の投与量で 4 週間，週 1 回の頻度で計 5 回（投与 1，8，15，22 及び 29 日）静脈内投与した。

心拍数を含む心電図，血圧及び呼吸数を投与 1 及び 29 日に記録した。

心血管系及び呼吸系に対するゾルベツキシマブの作用はみられなかった。

ゾルベツキシマブはモノクローナル抗体であり，カリウムチャネルを阻害する可能性は低いため，in vitro I_{Kr}（急速に活性化する遅延整流カリウムイオンチャネル）測定は実施しなかった。

2.6.2.5　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（2.6.2.2 効力を裏付ける試験）。

2.6.2.6　考察及び結論

クローディンは，細胞間のタイトジャンクションの構造に重要なタンパク質ファミリーである。ゾルベツキシマブの標的である CLDN18.2 は，胃に選択性が高い抗原である。正常ヒト組織では胃粘膜の上皮細胞にのみ発現しており，他の組織では検出されない。CLDN18.2 は，悪性形質転換の過程でも維持され，ヒト胃癌細胞の表面に高頻度に発現している。また，食道癌，膵臓癌及び肺腺癌においても高発現している［Sahin et al, 2008］。

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。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できる。

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。しかし，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投与と比較して，併用投与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考えられる。さらに，ゾルベツキシマブ及び化学療法剤の併用投与は，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。

安全性薬理試験において，中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対するゾルベツキシマブの作用は認められなかった。最高用量におけるマウス及びカニクイザルの血清中 C_{max} 値，及び臨床用量（600 mg/m^2）におけるヒトの血清中 C_{max} との曝露比を表 2.6.2- 1 に示す。マウスを用いて中枢神経系に対する作用を評価した試験では，血清中濃度は測定しなかった。そこで，マウスの血清中 C_{max} 値は，13 週間反復投与試験を参照した（25469 試験）。心血管系及び呼吸系に対する作用の評価を組み込んだカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験では，血清中濃度は非 GLP 施設で測定された。そこで，カニクイザルを用いたトキシコキネティクス試験（GLP）を補完的に実施した。カニクイザルの血清中 C_{max} 値は，この GLP 試験を参照した（8951-TX-0001 試験）。安全性薬理試験の血清中 C_{max} 値は，臨床用量（600 mg/m^2）におけるヒトの血清中 C_{max} の 4.5 倍から 7.1 倍であった。

表 2.6.2- 1　安全性薬理試験の最高投与量における C_{max} ベースの曝露比

Study Type	Highest dose tested (mg/kg)	Sex	Serum C_{max} (µg/mL)	Exposure multiple §
Central nervous system /mouse	100	F	1927 †	4.5
Cardiovascular and respiratory systems/cynomolgus monkey	100	M	3010 ‡	7.1
		F	2850 ‡	6.7

†: Data from day 1 of the 13-week repeat dose study in mice (Study 25469).

‡: Data from the single dose toxicokinetics study in cynomolgus monkeys (Study 8951-TX-0001).

§: Exposure multiple = [animal C_{max}] / [human C_{max} at 600 mg/m^2]. The human serum C_{max} was 425 µg/mL (Report 8951-PK-0005).

以上の結果より，ゾルベツキシマブはヒト CLDN18.2 を標的とした抗体であり，ADCC 及び CDC を介して抗腫瘍効果を示すと考えられる。ゾルベツキシマブ及び化学療法剤の併用は，ゾルベツキシマブ又は化学療法剤単独よりも，強力な抗腫瘍効果を発揮することが期待される。これは，化学療法剤による CLDN18.2 発現の増加，それに伴うゾルベツキシマブ誘発 ADCC 及び CDC の増強に起因すると考えられる。

2.6.2.7　図表

図表は，各項の本文中の適切な場所に挿入した。

2.6.2.8　参考文献

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.

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.

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.

目次

2.6.3 薬理試験概要表.....2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表.....2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....4
2.6.3.3 副次的薬理試験.....8
2.6.3.4 安全性薬理試験.....9
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....9

2.6.3　薬理試験概要表

2.6.3.1　薬理試験：一覧表

被験物質：ゾルベツキシマブ

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Number
Primary Pharmacodynamics					
In Vitro Studies					
Binding selectivity to human CLDN18.2-positive cells	HEK-293, CHO-K1, KATO-III, NUGC-4 and SK-BR-3 cells	NA	Ganymed, Germany	GP_P0078	4.2.1.1-1
Binding epitope of human CLDN18.2	FreeStyle™ 293-F cells	NA	[redacted], Japan	8951-PH-0002	4.2.1.1-2
Binding affinity to human CLDN18.2-positive cells	KATO-III, NUGC-4 and HEK-293 cells	NA	Ganymed, Germany	GP_P0078	4.2.1.1-1
Binding affinity to mouse and cynomolgus monkey CLDN18.2	HEK-293 cells	NA	Ganymed, Germany	GP_P0137	4.2.1.1-3
Zolbetuximab-induced ADCC	NUGC-4, KATO-III and SK-BR-3 cells with PBMCs	NA	Ganymed, Germany	GP_P0078	4.2.1.1-1
Zolbetuximab-induced CDC	NUGC-4, KATO-III and CHO-K1 cells with human serum	NA	Ganymed, Germany	GP_P0078	4.2.1.1-1
Increase in binding to CLDN18.2 with chemotherapy	NUGC-4 and KATO-III cells	NA	Ganymed, Germany	GP_P0078	4.2.1.1-1
Improved effect of chemotherapy on zolbetuximab-induced ADCC	NUGC-4 and KATO-III cells with PBMCs	NA	Ganymed, Germany	GP_P0078	4.2.1.1-1
Improved effect of chemotherapy on zolbetuximab-induced CDC	NUGC-4 and KATO-III cells with human serum	NA	Ganymed, Germany	GP_P0078	4.2.1.1-1

Table continued on next page

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Number
In Vivo Studies					
Tissue selectivity of zolbetuximab to CLDN18.2-positive tumors	NUGC-4 xenografted nude mice	iv	Ganymed, Germany	GP_P0078	4.2.1.1-1
Antitumor effect of zolbetuximab in xenograft immunocompromised mice	NUGC-4 xenografted nude mice	iv or ip	Ganymed, Germany	GP_P0078	4.2.1.1-1
Antitumor effect of zolbetuximab in combination with chemotherapy (EOF) in syngeneic immunocompetent mice	CLS-103~cldn18.2 isografted NMRI mice	iv or ip	Ganymed, Germany	GP_P0165	4.2.1.1-4
Antitumor effect of zolbetuximab in combination with chemotherapy (OF) in syngeneic immunocompetent mice	CLS-103~cldn18.2 isografted NMRI mice	ip	Astellas Pharma, Japan	8951-PH-0001	4.2.1.1-5
Secondary Pharmacodynamics					
No secondary pharmacodynamics studies have been performed.					
Safety Pharmacology					
Effect on Central Nervous System	NMRI mice	iv bolus	[redacted], Germany	22508	4.2.1.3-1
Effect on Cardiovascular and Respiratory Systems	Cynomolgus monkeys	iv bolus	[redacted], Germany	As part of 22337	4.2.3.2-4
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Studies have been performed with a combination of chemotherapeutic agents and zolbetuximab, which are described in the section primary pharmacodynamics.					

ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; CDC: complement-dependent cytotoxicity; CHO: Chinese Hamster Ovary; CLDN18.2: claudin-18 splice variant 2; CLS-103~cldn18.2: CLS-103 murine gastric carcinoma cells lentivirally transduced with murine cldn18.2; EOF: epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil; Ganymed: Ganymed Pharmaceuticals; [redacted]; NA: not applicable; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4; OF: oxaliplatin and 5-fluorouracil; PBMC: peripheral blood mononuclear cell.

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1　効力を裏付ける試験（In Vitro）

被験物質：ゾルベツキシマブ

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	Study Number	CTD Number
Binding selectivity to human CLDN18.2-positive cells	HEK-293, CHO-K1, KATO-III, NUGC-4 and SK-BR-3 cells	1	• NA	Zolbetuximab bound to HEK-293 and CHO-K1 cells transfected with CLDN18.2 but did not bind to both mock transfected cells. Zolbetuximab bound to KATO-III and NUGC-4 cells which endogenously express the target protein (CLDN18.2). Zolbetuximab did not bind to CLDN18.2-negative SK-BR-3 cells nor HEK-293 cells transfected with CLDN18.1.	GP_P0078	4.2.1.1-1
Binding epitope of human CLDN18.2	FreeStyle 293-F cells	1	• NA	Fourteen amino acids in extracellular domain 1 were characterized to be supportive for the binding to CLDN18.2.	8951-PH-0002	4.2.1.1-2
Binding affinity to human CLDN18.2-positive cells	KATO-III, NUGC-4 and HEK-293 cells	2 (KATO-III) 2 (NUGC-4) 9 (HEK-293)	• 0.0005 to 200 μg/mL	K_D values were 11.0 (mean of 9.93 and 12.1), 17.3 (mean of 17.6 and 17.0) and 2.90 ± 0.86 nmol/L (mean ± SD) in KATO-III, NUGC-4 cells and human CLDN18.2-transfected HEK-293 cells, respectively.	GP_P0078	4.2.1.1-1
Binding affinity to mouse and cynomolgus monkey CLDN18.2	HEK-293 cells	2 (mouse) 3 (cynomolgus monkey)	• 0.0005 to 200 μg/mL	K_D values to CLDN18.2 from mice and cynomolgus monkeys were 2.41 (mean of 2.60 and 2.22) and 2.73 ± 1.48 nmol/L (mean ± SD), respectively.	GP_P0137	4.2.1.1-3
Zolbetuximab-induced ADCC	NUGC-4, KATO-III and SK-BR-3 cells with PBMCs	10 (NUGC-4 and KATO-III) 6 (SK-BR-3)	• 0.00026 to 200 μg/mL (NUGC-4 and KATO-III) • 0.00003 to 200 μg/mL (SK-BR-3)	NUGC-4 and KATO-III cells were lysed but CLDN18.2-negative SK-BR-3 cells were not lysed.	GP_P0078	4.2.1.1-1

Table continued on next page

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	Study Number	CTD Number
Zolbetuximab-induced CDC	NUGC-4, KATO-III and CHO-K1 cells with human serum	9 (NUGC-4 and KATO-III) 1 (CHO-K1)	• 0.3 to 100 μg/mL (NUGC-4) • 0.3 to 200 μg/mL (KATO-III) • 0.03 to 10 μg/mL (CHO-K1)	NUGC-4, KATO-III and CLDN18.2-positive CHO-K1 cells were lysed, whereas CLDN18.1-positive CHO-K1 cells and CHO-K1 mock transfected cells were not.	GP_P0078	4.2.1.1-1
Increase in binding to CLDN18.2 with chemotherapy	NUGC-4 and KATO-III cells	5 (NUGC-4) 3 (KATO-III)	• EOF: 10 ng/mL of E, 500 ng/mL of Ox and 10 ng/mL of 5-FU • FLO: 10 ng/mL of 5-FU, 50 ng/mL of L and 500 ng/mL of Ox	EOF or FLO increased the amount of cell surface CLDN18.2 expression in NUGC-4 and KATO-III cells.	GP_P0078	4.2.1.1-1
Improved effect of chemotherapy on zolbetuximab-induced ADCC	NUGC-4 and KATO-III cells with PBMCs	9 (NUGC-4) 7 (KATO-III)	• Zolbetuximab: 0.00026 to 200 μg/mL • OF: 500 ng/mL of Ox and 10 ng/mL of 5-FU • EOF: 10 ng/mL of E, 500 ng/mL of Ox and 10 ng/mL of 5-FU • FLO: 10 ng/mL of 5-FU, 50 ng/mL of L and 500 ng/mL of Ox	OF, EOF or FLO in combination with zolbetuximab increased the lysis of NUGC-4 and KATO-III cells compared with zolbetuximab alone.	GP_P0078	4.2.1.1-1
Improved effect of chemotherapy on zolbetuximab-induced CDC	NUGC-4 and KATO-III cells with human serum	2 (each of NUGC-4 and KATO-III cells)	• Zolbetuximab: 0.039 to 640 μg/mL (NUGC-4); 0.156 to 640 μg/mL (KATO-III) • OF: 500 ng/mL of Ox and 10 ng/mL of 5-FU • EOF: 10 ng/mL of E, 500 ng/mL of Ox and 10 ng/mL of 5-FU	OF or EOF in combination with zolbetuximab increased the lysis of NUGC-4 and KATO-III cells compared with zolbetuximab alone.	GP_P0078	4.2.1.1-1

5-FU: 5-fluorouracil; ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; CDC: complement-dependent cytotoxicity; CHO: Chinese Hamster Ovary; CLDN18.1: claudin-18 splice variant 1; CLDN18.2: claudin-18 splice variant 2; E: epirubicin; EOF: epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil; FLO: 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin; L: leucovorin; NA: not applicable; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4; OF: oxaliplatin and 5-fluorouracil; Ox: oxaliplatin; PBMC: peripheral blood mononuclear cell.

2.6.3.2.2 効力を裏付ける試験（In Vivo）

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	Study Number	CTD Number
Tissue selectivity of zolbetuximab to CLDN18.2-positive tumors	NUGC-4 xenografted nude mice	A) 1 B) 1	A) 45 μg (corresponding to 1.8 mg/kg for a 25 g mouse) of DyLight 680-labeled zolbetuximab, positive control (labeled-trastuzumab) or isotype control (labeled-rituximab), single iv. Xenogen® fluorescence analysis of whole mice body 24 and 120 h after labeled-antibodies injection as well as the analysis of dissected organs 6 days after labeled-antibodies injection. B) 200 μg (corresponding to 8 mg/kg for a 25 g mouse) of zolbetuximab, single iv. Immunohistochemistry analysis 72 h after injection.	A) Zolbetuximab was detected strongly in the tumor xenografts 24 h after injection and efficiently retained in the target-positive tumor and detectable at a comparable intensity even after 120 h, whereas the trastuzumab signal was strongly detected 24 h after injection but rapidly declined within 120 h post injection. No or little detection of zolbetuximab was shown in normal organs including stomach. In dissected organs, strong detection of zolbetuximab was apparent in the harvested NUGC-4 tumor nodules, whereas there were no normal tissues including the stomach in which significant zolbetuximab fluorescence signals were strongly detected. B) Strong deposits of tissue-bound zolbetuximab were detectable in the tumor xenograft tissues. In the healthy stomach tissue, zolbetuximab signals were barely visible.	GP_P0078	4.2.1.1-1

Table continued on next page

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	Study Number	CTD Number
Antitumor effect of zolbetuximab in xenograft immunocompromised mice	NUGC-4 xenografted nude mice	9 (zolbetuximab group) 8 (other groups)	200 μg (corresponding to 8 mg/kg for a 25 g mouse) of zolbetuximab, cetuximab, trastuzumab, isotype control (rituximab) and saline control. Twice weekly iv or ip from day 6 after tumor inoculation.	Zolbetuximab slowed tumor growth compared with cetuximab, trastuzumab, isotype control and saline control groups.	GP_P0078	4.2.1.1-1
Antitumor effect of zolbetuximab in combination with chemotherapy (EOF) in syngeneic immunocompetent mice	CLS-103~cldn18.2 isografted NMRI mice	A) 10 B) 10 or 7	A) 800 μg (corresponding to 32 mg/kg for a 25 g mouse) of zolbetuximab. Once weekly iv for 9 weeks from day 4 after tumor inoculation; EOF: 1.25 mg/kg of E, 3.25 mg/kg of Ox and 56.25 mg/kg of 5-FU. Once weekly ip for 4 weeks from day 3 after tumor inoculation. B) 200 μg (corresponding to 8 mg/kg for a 25 g mouse) of zolbetuximab. Twice weekly iv or ip for 3 weeks from day 4 after tumor inoculation; EOF: 1.25 mg/kg of E, 3.25 mg/kg of Ox and 56.25 mg/kg of 5-FU. Once weekly ip for 2 weeks from day 4 after tumor inoculation.	A) The combination of EOF chemotherapy with zolbetuximab treatment resulted in a significantly improved inhibition of tumor growth compared with zolbetuximab or EOF alone. The combination also prolonged survival time of tumor-bearing mice compared with zolbetuximab alone. B) The combination of EOF chemotherapy with zolbetuximab treatment resulted in smaller tumor volume compared with the other treatment groups. The increase in tumor infiltrating $CD45^{+}/CD8^{+}$ T cells was found in mice treated with the combination on day 18 compared with other treatment groups.	GP_P0165	4.2.1.1-4

Table continued on next page

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	Study Number	CTD Number
Antitumor effect of zolbetuximab in combination with chemotherapy (OF) in syngeneic immunocompetent mice	CLS-103~cldn18.2 isografted NMRI mice	15	800 μg of zolbetuximab or isotype control (rituximab); OF: 1 mg/kg of Ox and 30 mg/kg of 5-FU. Twice weekly ip for 2 weeks from day 2 after tumor inoculation.	The combination of OF chemotherapy with zolbetuximab treatment resulted in a significant smaller tumor volume compared with zolbetuximab or OF alone on day 16. The frequency of infiltrating $CD8^+$ T cells was significantly higher in the combination group compared with the control group on day 16. The frequency of NK cells tended to be higher in the zolbetuximab group compared with the control group.	8951-PH-0001	4.2.1.1-5

5-FU: 5-fluorouracil; CD: cluster of differentiation; CLS-103~cldn18.2: CLS-103 murine gastric carcinoma cells lentivirally transduced with murine cldn18.2; E: epirubicin; EOF: epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil; NK: natural killer; NUGC-4: Nagoya University-Gastric Cancer-4; OF: oxaliplatin and 5-fluorouracil; Ox: oxaliplatin.

2.6.3.3 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。

2.6.3.4　安全性薬理試験

被験物質：ゾルベツキシマブ

Organ Systems Evaluated	Species and Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number	CTD Number
Central Nervous System	NMRI mice	iv bolus, single	0, 10, 30, 100	8 females	No effects in the assessment using Irwin's method	Yes	22508	4.2.1.3-1
Cardiovascular and Respiratory Systems	Cynomolgus monkeys	iv bolus Once weekly for 4 weeks	0, 10, 30, 100	3 males and 3 females	No effects on electrocardiogram including heart rate, blood pressure or respiratory rate on days 1 and 29	Yes	As part of 22337	4.2.3.2-4

2.6.3.5　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（2.6.3.2 効力を裏付ける試験）。