目次

1. 非臨床試験計画概略....4
1.1 背景....4
1.2 作用機序....5
1.3 薬理学的モデル及び選択の理由....5
1.4 非臨床試験計画のGLP遵守に関する情報及び試験計画からの逸脱....6
1.5 動物種の選択及び根拠....6
1.6 投与量の設定....7
1.7 添加剤....7
1.8 AMG 757非臨床試験プログラムの主な結論....8
2. 薬理試験（モジュール2.6.2）....8
2.1 効力を裏付ける試験....8
2.2 副次的薬理試験....9
2.3 安全性薬理試験....10
3. 薬物動態（モジュール2.6.4）....10
3.1 分析法....10
3.2 薬物動態試験....10
4. 毒性試験（モジュール2.6.6）....11
4.1 毒性試験の概要....12
4.1.1 単回投与毒性試験....12
4.1.2 AMG 757の反復投与毒性試験....12
4.1.3 AMG 757：雌性カニクイザルを用いた10日間反復静脈内投与毒性試験（121423試験）..12
4.1.4 AMG 757：カニクイザルを用いた28日間反復静脈内投与毒性試験及び28日間回復性試験（121424試験）....12
4.1.5 AMG 757：カニクイザルを用いた3カ月間反復静脈内投与毒性試験（122516試験）....15
4.1.6 muS757：BALB/cマウスを用いた1カ月間反復投与毒性試験（153960試験）....15
4.2 生殖発生毒性試験....16
4.2.1 胚・胎児発生に対するDLL3標的BiTE®分子の影響の有無の評価（122517試験）....16
4.3 局所刺激性試験....18
5. 非臨床試験プログラムの総括及び結論....19
6. 参考文献....20
7. 補遺....23

表一覧

表 1 カニクイザル及びマウスにおけるAMG 757及びmuS757のPK/TKパラメータ....16
表 2 カニクイザルとマウスとの非臨床所見の比較....16

図一覧

図 1 AMG 757の作用機序....5

略号一覧

略号又は用語	定義／説明
ADA	anti-drug antibody　抗薬物抗体
AMG 757	tarlatamab　タルラタマブ（の開発コード名）
AR	accumulation ratio　蓄積比
AUC	area under curve　濃度-時間曲線下面積
AUC_{last}	area under concentration-time curve from time 0 until the last measurable concentration　0から最終測定可能時間までの濃度-時間曲線下面積
BALB/c	Bagg Inbred immune-competent albino mouse strain　Baggアルビノ近交系免疫正常マウス系統
BiTE®	bispecific T cell engager　二重特異性T細胞誘導
C_0	estimated initial concentration after iv admi nistration　IV投与後の推定初期濃度
CD3/CD3ε	cluster of differentiation 3, epsilon chain　分化抗原群3、イプシロン鎖
C_{max}	maximum observed drug concentration　最高血清中濃度
Crl:CD1	mouse strain　マウスの系統名
CRP	C-reactive protein　C反応性タンパク
CSF	cerebrospinal fluid　脳脊髄液
CTD	Common Technical Document　国際共通化資料
DLL3	delta-like ligand 3　デルタ様リガンド3
DP	drug product　製剤
EC_{50}	half-maximal effective concentration　50%有効濃度
ECL	electrochemiluminescence　電気化学発光
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay　酵素免疫吸着測定
EMA	European Medicines Agency　欧州医薬品庁
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule　上皮細胞接着因子
Fc	fragment crystallizable　結晶化フラグメント
FcRn	neonatal Fc receptor　新生児結晶化フラグメント受容体
FDA	Food and Drug Administration　米国食品医薬品局
GD	gestational day　妊娠日
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
HLE	half-life extended　半減期延長
IC	immune complex　免疫複合体
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use　医薬品規制調和国際会議
IFN-γ	interferon-γ　インターフェロンガンマ
IgG	immunoglobulin G　免疫グロブリンG
IHC	Immunohistochemistry　免疫組織化学
IL	Interleukin　インターロイキン
IV	Intravenous　静脈内
IVSS	intravenous solution stabilizer　IV溶液安定化剤
LOF	loss of function　機能喪失
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1　単球走化性タンパク1
MFD	maximal feasible dose　投与可能な最大用量
MHC	major histocompatibility complex　主要組織適合性複合体
MHRA	Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (United Kingdom)　医薬品・医療製品規制庁（英国）
muS757	mouse surrogate to AMG 757; bispecific T cell engager with binding specificities for mouse/human DLL3, and mouse CD3 and mouse FcRn　AMG 757のマウスサロゲート抗体（マウス/ヒトDLL3、マウスCD3及びマウスFcRnに結合特異性を有する二重特異性T細胞誘導分子）

略語又は用語	定義／説明
NEPC	neuroendocrine prostate cancer　神経内分泌前立腺癌
NHP	non human primate　非ヒト霊長類
NSG	NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}, nonobese diabetic/severe combined immunodeficient IL-2 receptor γ (mice)　非肥満性糖尿病／重症複合免疫不全IL-2受容体γ鎖完全欠損（マウス）
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development　経済協力開発機構
PBMC	peripheral blood mononuclear cells　末梢血単核細胞
PD-1	programmed death 1　プログラム細胞死1
PD-L1	programmed death-ligand 1　プログラム細胞死リガンド1
PDX	patient-derived xenograft　患者由来異種移植（片）
PK	pharmacokinetic(s)　薬物動態
PR interval	measurement of time from beginning of P wave (onset of atrial depolarization) until beginning of QRS complex (onset of ventricular depolarization)　PR間隔
QT interval	measurement of time from beginning of Q wave and end of T wave　QT間隔
RR interval	measurement of time between QRS complexes　RR間隔
SC	subcutaneous　皮下
scFc	single chain fragment crystallizable　一本鎖結晶化フラグメント
scFv	single chain variable fragment　一本鎖可変領域フラグメント
SCDO	spondylo-costal dysostosis　脊椎肋骨異骨症
SCLC	small cell lung cancer　小細胞肺癌
$t_{1/2}$	terminal half-life　終末相における消失半減期
TCR	T cell receptor　T細胞受容体
TK	toxicokinetics　トキシコキネティクス
TNF	tumor necrosis factor　腫瘍壊死因子
w/v	weight per volume　体積当たりの質量

1. 非臨床試験計画概略

1.1 背景

デルタ様リガンド3（DLL3）は、1回膜貫通型のNotchファミリーリガンドであり、細胞内ゴルジ体において完全長のNotchと相互作用することで胚発生期に重要なシグナル伝達の役割を果たす（Chapman et al, 2011）。DLL3は神経内分泌細胞の分化及び小細胞肺癌（SCLC）を含む神経内分泌腫瘍の発生に関与している。DLL3は正常細胞では発現が低く、主に細胞質に発現しているが、神経内分泌腫瘍細胞では発現が上昇し細胞表面に局在する（Saunders et al, 2015、Giffin et al, 2021）。この発現プロファイルの違いから、DLL3は有力な腫瘍選択的治療標的になると考えられる。特に、二重特異性T細胞誘導（BiTE®）分子のような抗体ベースの薬物療法においてDLL3を標的とすれば、正常組織の細胞内DLL3にはアクセスできず、腫瘍外オンターゲット毒性を伴わない腫瘍特異的な薬効を発揮することが期待できる。

SCLCは、腫瘍免疫の攻撃対象となると考えられている遺伝子変異が多いという特徴があるにもかかわらず、難治性を示し、プログラム細胞死（リガンド）1（PD［L］-1）阻害剤を標準治療の化学療法と併用しても、患者の生存率はわずかしか改善しない（Dómine et al, 2020）。AMG 757（一般的名称；タルラタマブ）は、患者のT細胞を活性化及び再指向させてDLL3発現腫瘍細胞を殺傷させるよう設計された新規の標的BiTE®免疫療法薬である。

AMG 757は、腫瘍細胞上のDLL3及びT細胞上のT細胞受容体（TCR）の構成分子である分化抗原群3のイプシロン鎖（CD3ε）に結合する半減期延長型（HLE）BiTE®分子である。AMG 757は、DLL3及びCD3εに特異的な2つの1本鎖可変領域フラグメント（scFv）が短いリンカーで連結され、ヒト免疫グロブリンG（IgG）由来の一本鎖結晶化フラグメント（scFc）領域のアミノ末端（N末端）に遺伝子融合させた1本鎖分子である。scFc領域は、非特異的エフェクター機能を封じてあり、新生児Fc受容体（FcRn）に結合することによりAMG 757の血清中半減期を延長させる。AMG 757とSCLC細胞上のDLL3及びT細胞上のCD3εとの二重特異性結合は、T細胞の活性化及び増殖、T細胞による一過性のサイトカイン産生並びにDLL3発現標的細胞に対する再指向性細胞溶解を誘導する。AMG 757はSCLC患者の治療薬として開発中である。

AMG 757の非臨床試験戦略は、バイオ医薬品として一般的な開発経路に従っており、既存の規制ガイダンスに沿ったものである。具体的には、AMG 757の非臨床開発は、抗悪性腫瘍薬のガイダンス「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」（ICH S9, 2010）、「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインに関する質疑応答集（Q&A）」（ICH S9, 2018）及び「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」（ICH S6(R1), 2011）に従った。薬理試験、薬物動態試験、探索的毒性試験、及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠した毒性試験は、欧州連合及び米国の科学研究所及び受託研究機関で実施した。重要な試験は、米国食品医薬品局（FDA）及び／又は経済協力開発機構（OECD）のGLP規制を遵守して実施した。AMG 757について実施した非臨床試験の詳細はモジュール2.6.2、2.6.4及び2.6.6に、非臨床試験の報告書はモジュール4に示す。国際共通化資料（CTD）の見出しのうち、報告書が含まれていないものについては、その理由を7項に示す。

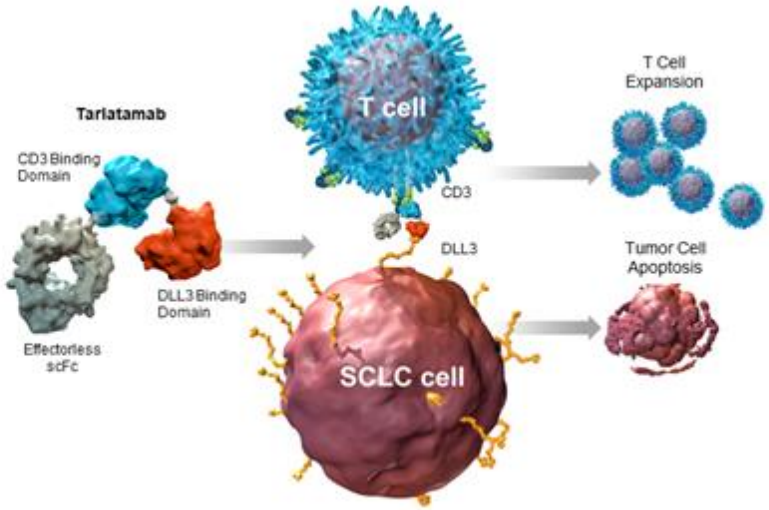
本概括評価の目的は、モジュール2.6及びモジュール4に示した非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験の総合評価を行い、AMG 757のヒトでの安全な使用に対するその意義を考察することである。

1.2 作用機序

AMG 757の作用機序は、T細胞依存的な腫瘍細胞溶解である（図 1）。AMG 757が薬理作用を示すには、標的細胞とT細胞の両方に同時に結合する必要があり、細胞傷害性Tリンパ球の特異的再指向によるDLL3発現細胞の殺傷を介して作用する。AMG 757がDLL3陽性標的細胞とCD3陽性T細胞に二重特異的に結合すると、T細胞の活性化及び増殖、T細胞による一過性のサイトカイン産生並びに標的細胞のアポトーシスが起こる。

したがって、AMG 757はT細胞に対し腫瘍抗原認識に応じたTCRの活性化と同様の反応を誘導するが、主要組織適合性複合体クラスI（MHC-I）によるペプチド提示やT細胞における腫瘍特異的なTCRの存在は必要としない。

図 1　AMG 757の作用機序



1.3 薬理学的モデル及び選択の理由

AMG 757の活性は、SCLCの非臨床モデルを用いて評価した（モジュール2.6.2）。AMG 757の*in vitro*活性を評価するために使用した細胞株は、ヒトSCLC由来であり（Rudin et al, 2019）、DLL3発現量は、患者から採取されたSCLCと同程度であった（Giffin et al, 2021）。これらのSCLC細胞株をヒト又はカニクイザルのドナー由来T細胞と共培養し、AMG 757が誘導するT細胞の活性化、サイトカイン産生及び腫瘍細胞に対するT細胞依存性細胞傷害を検討した。これらの試験では、T細胞の能力の潜在的個体差を考慮して、複数のドナーから得られたエフェクター細胞を用いた。

*In vivo*試験では、SCLCの異種移植マウスモデルでAMG 757の活性を評価した。*In vitro*試験で評価したSHP-77及びNCI-H82細胞株を同所性異種移植モデルに使用した。移植したSHP-77細胞は主に肺に腫瘍を形成して原発性SCLCを模倣し、NCI-H82細胞は主に肝臓に腫瘍転移巣を形成して典型的なSCLC転移の特徴を示した。また、患者由来異種移植（PDX）腫瘍モデル使用した2つのPDX、LXFS 1129及びLXFS 538は、ヒトSCLCでみられるDLL3発現レベル及び腫瘍の不均一性を示した（Giffin et al, 2021）。神経内分泌前立腺癌（NEPC）由来細胞株NCI-H660を用いたNEPC皮下異種移植マウ

スモデルにより、SCLC以外のDLL3陽性腫瘍であるNEPCに対するAMG 757の治療の可能性に関する初期データが得られた。

AMG 757の作用機序は、腫瘍細胞上のDLL3とT細胞上のCD3への同時結合を必要とする。非臨床薬理試験の異種移植モデルには免疫不全マウス（非肥満性糖尿病／重症複合免疫不全IL-2受容体γ完全欠損［NSG］マウス）を使用し、AMG 757はマウスCD3と交差反応しないため、活性化及び増殖させて調製したヒトT細胞をAMG 757投与前に注入した。総合すると、これらの異種移植マウスモデルにおいて、ヒトT細胞の移植により臨床用分子AMG 757を直接評価することが可能になり、腫瘍における薬力学的活性（T細胞の浸潤及び／又は増殖、T細胞の活性化並びに腫瘍細胞のアポトーシス）及び抗腫瘍活性の評価が容易になった。

1.4 非臨床試験計画のGLP遵守に関する情報及び試験計画からの逸脱

試験全体の完全性又は試験結果の解釈及び結論に影響を与えるような非臨床試験計画からの逸脱はなかった。カニクイザルを用いた28日間反復投与毒性試験（121424試験）、カニクイザルを用いた3カ月間反復投与毒性試験（122516試験）及びマウスを用いたmuS757の胚・胎児発生に関する試験（122517試験）は、GLP規制に従って実施した。

1.5 動物種の選択及び根拠

AMG 757の抗CD3 scFvはヒト及び非ヒト霊長類（NHP、例えばカニクイザル）のCD3には特異的に結合するが、マウス、ラット、ウサギ、ビーグル犬及びミニブタのCD3とは交差反応しないため、非臨床毒性試験に適した動物種としてカニクイザルを選択した。

AMG 757は、ヒトDLL3及びCD3と同程度の結合親和性で、カニクイザルDLL3及びCD3に結合し、カニクイザルのT細胞とカニクイザルのDLL3を発現している標的細胞の共培養において、ヒトの系と同程度に、T細胞の活性化と一過性のサイトカイン産生及びT細胞による標的細胞の溶解を誘導した。さらに、カニクイザルの正常組織におけるDLL3の発現はヒトと類似していたことから、カニクイザルは適切なモデル動物であると考えられた。

AMG 757の結合特性及び標的分子の生物学に基づく薬理学的に適切なモデル動物はカニクイザルのみであることから、医薬品規制調和国際会議（ICH S6）（ICH S6(R1), 2011）に従い、AMG 757の非臨床安全性評価は、単一の動物種で実施した。

しかし、申請者はFDAの提案に従い、AMG 757のマウスサロゲート分子（muS757）を構築し、マウスのDLL3及びCD3双方を認識するBiTE®分子がマウスの胚・胎児発生に影響を及ぼすか否かを評価した。

AMG 757のDLL3を認識するscFvはヒト、カニクイザル及びマウスのDLL3に結合する一方、CD3を認識するscFvはヒト及びカニクイザルのCD3に結合するが、マウスのCD3とは交差反応しない。そこでmuS757の作製に当たっては、AMG 757と同様に非特異的エフェクター機能を消失させたマウスscFc領域のN末端に申請者が独自に作製したマウスCD3ε特異的scFvを繋げ、さらにそのN末端にマウスDLL3に対する交差反応性を有するAMG 757のDLL3認識scFvを遺伝子的に融合させた。

muS757とAMG 757の包括的な比較評価は、モジュール2.6.2、モジュール2.6.4及びモジュール2.6.6に要約する。

これらの比較データに基づき、マウスにおける胚・胎児発生毒性の評価に当たってmuS757がAMG 757の正当なサロゲートであることについて、FDA、欧州医薬品庁（EMA）、英国医薬品・医療製品規制庁（MHRA）及びスイス医薬品局の同意が得られた。

1.6 投与量の設定

GLP適用毒性試験の用量は、被験物質に対する段階的な反応を誘導することを目的として、*in vitro*試験及び探索的毒性試験の結果に基づいて設定した。高用量は、ある程度の毒性変化は生じるが、意味のある評価ができないほどの過度の毒性変化は生じないことが予想される用量とした。中用量は、軽微～中等度の毒性変化が生じることが予想される用量とした。低用量は、観察可能な毒性の徴候は生じないことが予想される用量とした。AMG 757及びmuS757の物理化学的特性から、カニクイザル及びマウスに投与可能な最大用量（MFD）はそれぞれ4500 µg/kgに制限された。

カニクイザル及びマウスへの投与経路は、臨床での予定投与経路に基づき、静脈内（IV）投与を選択した。

さらに、カニクイザルにおいてAMG 757の単回皮下投与後の薬物動態（PK）特性も評価した。

1.7 添加剤

カニクイザルを用いたGLP適用毒性試験で使用したAMG 757製剤バッチは、臨床試験に使用されたものと同一又は類似の製造工程により、異なるスケールで製造されたものである。

GLP適用試験に使用された製剤バッチは、臨床試験材料と同じ製剤（10 mmol/L L-グルタミン酸、9.0%（w/v）精製白糖、0.01%（w/v）ポリソルベート80、pH 4.2）である。カニクイザルを用いたGLP適用毒性試験には、AMG 757製剤（DP）のLot 0010293357（28日間、122717試験）又はLot 0010352681（3カ月間、122516試験）を使用した。

マウスを用いたGLP適用の胚・胎児発生に関する試験（122517試験）で使用したmuS757製剤（Lot 0010656863）は、AMG 757と同様の工程で製造され、10 mM L-グルタミン酸、9.0%（w/v）精製白糖、0.01%（w/v）ポリソルベート80、pH 4.2で製剤化されたものである。

AMG 757及びmuS757のGLP適用毒性試験における投与液の容量及び容器のサイズは、実製剤の容量及び用量に合わせた。適量のIV溶液安定化剤［IVSS；25 mMクエン酸、1.25 Mリシン塩酸塩、0.1%（w/v］ポリソルベート80、pH 7.0）を最終IVSS濃度が5%となるように容器に添加した後、適量の希釈剤［10 mM L-グルタミン酸、9%（w/v）精製白糖、0.01%（w/v）ポリソルベート80、pH 4.2）を添加して、用量に関係なく同じ添加剤濃度及び実製剤の容量となるようにした。最後に、設定した投与量に適した量の液体製剤又は凍結乾燥製剤の再溶解液を添加した。

IV投与製剤の成分は、注射剤の標準的な添加剤であり、臨床での使用に適したものであることが確認されている。

1.8 AMG 757非臨床試験プログラムの主な結論

AMG 757は、非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験データに基づき、ベネフィット／リスク比が良好であることが示された。非臨床データパッケージから、SCLCの治療を目的としてDLL3を標的とするファースト・イン・クラスのBiTE®分子としてのAMG 757の開発が支持される。

2. 薬理試験（モジュール2.6.2）

AMG 757は、T細胞を活性化して再指向させることにより、DLL3発現腫瘍細胞を殺傷するように設計された二重特異性分子である。AMG 757の生物活性及び薬理作用の作用機序について、*in vivo*及び*in vitro*試験の多面的なSCLCモデルにおいて検討された（モジュール2.6.2、Giffin et al, 2021）。

2.1 効力を裏付ける試験

AMG 757は、標的細胞上のDLL3とT細胞（エフェクター細胞）上のCD3に二重特異性結合し、これによりT細胞の活性化及び増殖、T細胞による一過性のサイトカイン産生並びにT細胞による標的細胞のアポトーシスが生じる。

AMG 757は、*in vitro*試験でのヒトT細胞（末梢血単核細胞［PBMC］）によるヒト腫瘍細胞株溶解を強力に誘導し、各種ヒトSCLC細胞株に対する50%有効濃度（EC_{50}）値は32～447 pMであった（122717試験）。AMG 757誘導の細胞傷害活性については、SCLC細胞株のパネルに対し、様々な健常人ドナー由来のT細胞において観察された。この活性はDLL3発現細胞に対し特異的であり、またT細胞（PBMC）単独、あるいはT細胞とDLL3陰性の細胞との共培養では、生理的に適切な条件下で活性は認められなかった（122717試験）。

T細胞活性化過程の一環として、AMG 757のようなBiTE®分子は、T細胞と標的細胞の間で細胞溶解性シナプス形成を引き起こす。このことは、EpCAM特異的BiTE®分子を用いて例証されている（Offner et al, 2006）。AMG 757を介したT細胞活性化に伴って、T細胞上のT細胞活性化マーカーであるCD25、CD69、プログラム細胞死1（PD-1）及びプログラム細胞死リガンド1（PD-L1）の発現上昇、またインターロイキン（IL）6、腫瘍壊死因子（TNF）、インターフェロンガンマ（IFN-γ）等の炎症性サイトカインの一過性の産生誘導がみられた。活性化T細胞はさらにパーフォリン及びタンパク分解酵素グランザイムB（これらは標的細胞膜に細孔を形成する）を放出し、標的細胞内ではカスパーゼカスケードが活性化されアポトーシスに至った（122717試験）。

AMG 757は一本鎖の結晶化フラグメント（Fc）を有するが遺伝子操作によりFcのエフェクター機能は排除されている。このためAMG 757は、DLL3とCD3への二重特異性結合に依存したT細胞性細胞傷害を介して標的細胞を殺傷する。

AMG 757活性化T細胞によるサイトカイン遊離はコルチコステロイド処理により抑制することが可能であるが、その結果、細胞傷害活性がわずかに低下することが示された（122718試験）。

AMG 757の非臨床毒性試験に用いるための適切な動物を決めるために、AMG 757のヒト以外の分子に対する交差反応を検討した。AMG 757はカニクイザルのDLL3及びCD3ともフルに交差反応し、その結合親和性はそれぞれヒトのDLL3及びCD3に対する親和性と近いレベルであった。AMG 757はカニクイザルT細胞（PMBC）とカニクイザルDDL3発現の標的細胞の共培養系において、ヒト細胞

培養系と同様、カニクイザルT細胞を活性化し、一過性のサイトカイン産生を誘導し、T細胞依存の標的細胞融解を起こした（122717試験）。以上、カニクイザルは非臨床評価のための適切な動物種であることが確認された（122717試験）。

一方、AMG 757のDLL3に対するscFv（結合アーム）はマウスのDLL3にも交差反応するのに対し、CD3結合アームはマウスのCD3とは交差反応しない。そこでマウスの胚・胎児発生毒性試験を追加実施するに当たり、AMG 757のマウスサロゲート分子であるmuS757を作製した。muS757は、マウスDLL3と交差反応するAMG 757と同じDLL3結合アーム、マウスCD3εを特異的に認識するCD3ε結合アーム、及びマウスのscFc領域を有する。muS757はマウス標的分子に対しAMG 757と同レベルの結合親和性を示し、またマウスT細胞とマウスDLL3を発現する標的細胞との共培養系で、AMG 757がヒト細胞の共培養系で示したのと同様のT細胞依存性標的細胞傷害を誘導した。したがって、muS757はAMG 757のマウスサロゲートとして適切であると考えられた。

AMG 757の*in vivo*活性は、ヒトT細胞を補充した免疫不全NSGマウスを用いたヒトSCLC細胞株の同所性移植モデル、及びSCLCのPDXモデルを用いて評価した。AMG 757は、すべてのモデルにおいて単独投与で有意な抗腫瘍活性を示し、SHP-77-Luc原発性肺腫瘍モデルとPDXのLXFS 1129とLXFS 538の肺腫瘍皮下移植モデル、NCI-H82肝転移巣モデル（R20150125、R20190093試験、Giffin et al, 2021）においては腫瘍消失例がみられた。AMG 757の抗腫瘍活性は、腫瘍へのT細胞浸潤とその活性化亢進を伴っており、想定される作用機序（R20190094試験、Giffin et al, 2021）と整合した。同様の薬力学作用と抗腫瘍活性は、ヒト神経内分泌前立腺癌（NEPC）細胞株異種移植モデル（154546、154545試験）でも示され、AMG 757のSCLC以外の腫瘍に対する治療にも有効である可能性を示した。

現在のSCLC治療の主流は化学免疫療法であり、両治療法ともその殺傷メカニズムはAMG 757とは異なることから、AMG 757と免疫チェックポイント阻害剤又は化学療法剤の併用を評価した。SCLC細胞株を標的細胞とした*in vitro*試験で、AMG 757を抗PD-1抗体のAMG 404あるいはプラチナーエトポシド化学療法と組み合わせたところ、AMG 757単独に比べより強い腫瘍細胞殺傷が得られた（R20190104、155262試験）。*In vivo* NCI-H82皮下異種移植モデルにおいてAMG 757とプラチナーエトポシド化学療法を併用したところ、AMG 757又は化学療法単独と比較して、有意に強い抗腫瘍活性がみられた（156568試験）。これらのデータは、互いに異なる作用機序の薬剤の組み合わせを探求することの根拠となり、SCLC治療においてAMG 757と既存の標準治療との併用の有効性を示唆している。

効力を裏付ける試験の一覧は、モジュール2.6.3 表 1に記載する。

2.2 副次的薬理試験

DLL3は通常の標的分子とは異なり、正常細胞では細胞質内ゴルジ体のシス面及び細胞質小胞に局在している（Chapman et al, 2011）が、SCLCを含む神経内分泌腫瘍細胞では発現が亢進し、細胞表面上にも発現するようになる（Saunders et al, 2015、Giffin et al, 2021）。このため、ヒト及びカニクイザル正常組織におけるDLL3のmRNAレベル及びタンパク質レベルでの発現について詳細な解析を行い、正常組織障害に繋がる腫瘍外オンターゲット作用の可能性について検討した。

mRNA解析により、DLL3のAMG 757により認識される抗原領域をコードするDDL3の転写産物は、ごく一部の正常組織において低レベルで発現していた。細胞当たり1コピー以上検出されたのは、カニクイザルの視神経（123658試験）並びにヒト及びカニクイザルの脳（123658、124208、122642試験）のみであった。免疫組織化学（IHC）及びウェスタンブロット解析の結果、mRNA解析結果と同様、DLL3のタンパク質はごく一部の正常組織において低レベルで発現していた。ヒト又はカニクイザルの正常組織で発現がみられたのは、脳のニューロン、下垂体、膵島であった。しかしIHC解析では、その発現は細胞質内に局在した低レベルのもので、AMG 757がアクセスし結合することは不可能と予想された。

副次的薬理試験の一覧は、モジュール2.6.3 表 1に記載する。

2.3 安全性薬理試験

医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインS9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」（ICH, 2010）に従い、AMG 757についての独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、重要な器官機能（心血管系、呼吸系及び中枢神経系を含む）に対するAMG 757の影響の有無については、カニクイザルを用いた毒性試験で評価した。4.1.3及び4.1.4項で後述する。

3. 薬物動態（モジュール2.6.4）

カニクイザルを用いて、単回又は反復投与によりIV又は皮下（SC）投与したときのAMG 757の薬物動態（PK）を評価した。また、マウスを用いて、マウスサロゲート抗体であるmuS757のPKを評価した。本項では、AMG 757及びmuS757のPK特性について示す。

3.1 分析法

カニクイザルの血清及び脳脊髄液（CSF）中のAMG 757濃度は、DLL3又はCD3をAMG 757の捕捉試薬として用い、検出用にそれぞれCD3又は、DLL3若しくはFcを利用した酵素免疫吸着測定（ELISA）法により測定した（モジュール2.6.4）。抗薬物抗体（ADA）の検出は、電気化学発光（ECL）イムノアッセイを用いて実施した。

マウス血清中のmuS757濃度の測定は、ECLベースのリガンド結合アッセイを用いて実施した。

使用された分析法はAMG 757及びmuS757に対して感度及び特異性が高く、GLP適用試験におけるAMG 757及びmuS757の定量下限は、それぞれ1.50 ng/mL（CSF）～15.0 ng/mL（血清）及び30.0 ng/mL（マウス血清）～300 ng/mL（胎児血清）であった。

3.2 薬物動態試験

カニクイザルを用いて、単回急速IV注入、短時間IV投与、低速IV注入及びSC投与によりAMG 757のPKを評価した。

カニクイザルに12 µg/kgの用量で単回急速IV注入したときの血清中AMG 757濃度は二相性を示して低下し、平均クリアランス（CL）は0.487 mL/h/kgであり、定常状態での分布容積（V_{ss}）は146 mL/kgであった。終末相における消失半減期（$t_{1/2}$）の平均値は234時間であった。

カニクイザルに50、500及び4500 µg/kgの用量で週1回最長3カ月間IV投与したときのAMG 757のトキシコキネティクス（TK）を評価した。これらの試験及びTK成績の詳細は、モジュール2.6.6 2.2項及び表 1に示す。要約すると、AMG 757の曝露量は用量の増加及び反復投与に伴い増加した。0から最終測定可能時間までの濃度-時間曲線下面積（AUC_{last}）及びIV投与後の推定初期濃度（C_0）により評価した場合、曝露量に性差は認められなかった（2倍未満の差）。AMG 757を投与した多くの動物で試験終了までにADAが検出された。

BALB/cマウスにAMG 757のマウスサロゲート抗体であるmuS757を週1回反復急速IV投与したときのPK特性及び免疫原性の可能性について評価した。動物には、Day 1、8、15及び22に0.5 mg/kgのmuS757を投与し、最終投与から7日後（Day 29）に試験を終了した。0.5 mg/kgのmuS757を急速IV投与したときの最高血清中濃度（C_{max}）は、初回投与及び4回目投与（Day 22）でそれぞれ8.08及び11.50 µg/mL、AUC_{last}はそれぞれ500及び754 µg·h/mLであった。最終IV投与後、muS757の蓄積が認められ、蓄積比（AR）は2.1であった。初回投与及び4回目投与（Day 22）の$t_{1/2}$は、それぞれ119及び140時間であった。

BALB/cマウスに50、500及び4500 µg/kgのmuS757を週1回最長28日間IV投与したときのmuS757のTKを評価した。この試験の詳細は、モジュール2.6.6 2.2項に記載した。muS757の曝露量は用量比例的に増加し、特に500 µg/kg以上の用量では投与回数の増加に伴い増加した。Day 1及びDay 22における曝露量（AUC_{last}及びC_{max}）に性差は認められなかった。

マウスにおけるmuS757の反復投与PK試験及び4週間反復投与毒性試験で得られたmuS757のPK/TKパラメータ（C_{max}及びAUC_{last}）は、カニクイザルを用いた毒性試験で確認されたAMG 757のTKパラメータと類似していた（表 1）。薬物動態試験の一覧は、モジュール2.6.5 表 1（薬物動態試験の概要表）に示す。

4. 毒性試験（モジュール2.6.6）

毒性試験プログラムの目的は、AMG 757及びそのマウスサロゲートmuS757の毒性プロファイルを十分に評価し、SCLC患者への使用を可能にすることであった。

カニクイザルはヒトに類似した標的結合親和性及び生物活性データを示した（122717試験）ことから、適切な毒性試験動物種として選択した。マウスサロゲートmuS757は、ヒトエフェクター細胞及び標的細胞を用いると、AMG 757と同程度の結合親和性及びT細胞依存性細胞傷害作用を示した（122717試験）。したがって、muS757はAMG 757の適切なサロゲート分子と考えられた。

AMG 757の非臨床安全性評価は、AMG 757のカニクイザルを用いたGLP適用の反復IV投与毒性試験並びにマウスサロゲートmuS757のマウスを用いた反復投与毒性試験及びそれに続く胚・胎児発生に関する試験に基づいて実施した。

予定される臨床投与経路に基づき、IV投与を選択した。

4.1 毒性試験の概要

4.1.1 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は実施しなかったが、AMG 757による急性の影響については、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験で評価した。

4.1.2 AMG 757の反復投与毒性試験

AMG 757の非臨床安全性評価は、4500 µg/kgまでの用量を週1回IV投与によるカニクイザルを用いた探索的10日間反復投与毒性試験並びにGLP適用の28日間及び3カ月間反復投与毒性試験に基づいて実施した。AMG 757の物理化学的特性のため、カニクイザルにおけるMFDは4500 µg/kgであった。

カニクイザルの毒性試験では、4500 µg/kgまでの用量でAMG 757に直接起因する毒性変化は認められなかった。このことは標的の組織内分布は限定的で細胞質でのDLL3発現が低レベルであるため、AMG 757が到達して結合することができないことと一致する（モジュール2.6.2 2.1.4項及びモジュール2.6.2 3.1項）。

ICHガイドラインS9「抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性評価に関するガイドライン」（ICH, 2010）に従い、AMG 757について独立した安全性薬理試験は実施しなかった。しかし、心血管系、呼吸系及び中枢神経系を含む重要な器官機能に対するAMG 757の影響の有無を、カニクイザルを用いた毒性試験で評価した。その結果を以下に要約する。

4.1.3 AMG 757：雌性カニクイザルを用いた10日間反復静脈内投与毒性試験（121423試験）

本探索的試験では、雌カニクイザル（1群2例）に、AMG 757を100又は1000 µg/kgの用量で、Day 1及びDay 8にIV投与したときの毒性及びTKを、10日間にわたって評価した。

AMG 757血清中濃度の経時的推移から、試験期間を通した持続的な曝露が確認された。また、AMG 757の曝露量は用量の増加に伴ってほぼ用量比例的に増加し、用量を10倍に増加させるとAUC及びC_{max}値は約7倍に増加した。

一般状態、体重及び眼科学的検査には、AMG 757関連の変化は認められなかった。高用量群の1例でDay 10に体温が上昇した。AMG 757関連の変化は、リンパ球集団減少並びにC反応性タンパク（CRP）、単球走化性タンパク1（MCP-1）及びIFN-γ血清中濃度の軽微な増加のみであった。

剖検時にAMG 757関連の肉眼的組織所見は認められなかった。AMG 757関連の病理組織学的所見は、肺、肝臓及び下垂体における軽微及び軽度の混合炎症性細胞浸潤のみであった。いずれの組織にも細胞傷害は認められなかった。

4.1.4 AMG 757：カニクイザルを用いた28日間反復静脈内投与毒性試験及び28日間回復性試験（121424試験）

本試験では、AMG 757を低速で週1回28日間急速静脈注入（約4分間）したときの毒性及びTKを評価した。投与期間中、カニクイザル（1群雌雄各3例）にAMG 757を0、50、500又は4500 µg/kgの用

量で投与し、さらに1群雌雄各2例に0又は500 µg/kgの用量で投与した後、28日間の休薬期間を設けた。AMG 757の物理化学的特性のため、MFDは4500 µg/kgに制限された。

TK解析の結果を表 1及びモジュール2.6.6 2.2.2項に示す。初回IV投与後のAUC_{last}及びC_0を指標とする曝露量は、50 µg/kg群で雄性サルの曝露量が雌の4倍であったのを除いて、すべての群の雌雄間で同程度（2倍以内）であった。初回IV投与後のAMG 757曝露量はほぼ用量に比例して増加した。最終IV投与後にAMG 757の蓄積が50及び500 µg/kg群でみられたが、4500 µg/kg群では認められなかった。結合性のADAが、500 µg/kg群の10例中6例及び4500 µg/kg群の6例中6例で認められた。ADAの存在が、最終投与後に観察された曝露量のばらつきに影響した可能性がある。

試験終了時に、すべての動物でCSF中AMG 757濃度も測定した。Day 29に3例（500 µg/kg群におけるADA陰性の2例と4500 µg/kg群のADA陽性の1例）でCSF中にAMG 757が検出され、その濃度は500 µg/kgで2.13 及び4.28 ng/mL、4500 µg/kgで3.15 ng/mLであった。これは同じ時点での血清曝露量の約0.05%に相当する。カニクイザルエフェクター細胞によるヒトSCLC細胞株パネルでの再指向性溶解を評価した*in vitro*アッセイに基づく平均EC_{50}は、CSFにおける曝露量の6～12倍であった（最も感受性の高い細胞株のDMS 79では1.3～2.6倍高い）（モジュール2.6.2 2.1.4項）。以上のことから、AMG 757の曝露量は血清中では高いものの、CSF中ではごくわずかな薬理活性を示す程度の曝露量であることが確認された。休薬期間終了時にはCSF中のAMG 757濃度は定量できなかった。

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、呼吸数、体温、神経学的検査、臨床検査、サイトカイン、器官重量及び剖検において、AMG 757関連の変化は試験を通して認められなかった。免疫活性化療法に通常伴うサイトカインの変化や一般状態の変化が認められないことは、正常組織において到達可能なDLL3の発現量が極めて低いことと一致している。

500 µg/kg以上の投与群で、Day 2にAMG 757に関連したPR、RR及びQT間隔の短縮を伴う心拍数のごく軽度の増加がみられた。24時間の測定期間を通して、心拍数の変化の平均値は対照群と比較して10%未満であるが増加した（個々で比較した場合最大23%の変化）。次回測定時点のDay 23には、ADAの有無を問わず、いずれの動物においてもこれらの変化は明らかでなかった。心拍数の増加の程度が小さく、投与を継続しても試験終了時に影響が認められなかったことから、これは毒性所見ではないと考えられた。

フローサイトメトリーによるイムノフェノタイピングで、4500 µg/kgのAMG 757の投与に関連したすべてのTリンパ球サブセット（総T細胞、Tヘルパー細胞及び細胞傷害性T細胞）の軽度かつ一過性の減少が、6例中4例で2回目投与の4時間後より認められた。AMG 757の作用機序には、Tリンパ球の再配分及び活性化、並びにそれに続くDLL3発現細胞の溶解が関与している。したがって、循環血中T細胞の軽度の減少は、AMG 757の作用機序と正常組織においてDLL3発現量が低いことと一致している。この再配分に関連した毒性変化は認められなかった。DLL3がSCLC腫瘍表面上に局在し、AMG 757及びT細胞が到達可能なSCLC患者では、T細胞のより効果的な再配分及び活性化が予想される。T細胞活性化マーカー（CD25及びCD69）に検出可能な増加はみられず、これらの動物の病理組織学的検査に基づくと細胞／組織傷害は示されなかった。

50及び500 µg/kg群のいずれにおいても、6例中3例で、投与期間終了時に、軽微から軽度のAMG 757関連の混合細胞浸潤が下垂体に認められた。浸潤巣は主にリンパ球と様々な程度の好酸球で構成され、中間部と後葉の間の境界面に局在しており、これは下垂体におけるDLL3の発現パター

ンに一致していた（123377試験）。浸潤と関連し組織傷害のエビデンスは認められなかった。DLL3の発現は下垂体前葉の好塩基球にも観察されたが、下垂体のこの部分には関連する浸潤は認められなかった。4500 µg/kgでは曝露レベルがより高かったにもかかわらず、この変化が認められなかったことに関連して、ADAがこの用量で全例に、500 µg/kgで6例中3例に認められた。血清中AMG 757濃度の測定に使用したアッセイでは、AMG 757を捕捉するためにAMG 757の抗CD3抗体部分に対するモノクローナル抗体を使用し、検出のため可溶性DLL3を使用している。そのため、このアッセイでは、中和（すなわち抗イディオタイプ）抗体に結合していないAMG 757の部分が測定される。しかし、AMG 757濃度の測定に使用したアッセイでは、ADAが分子の他の部分（一本鎖Fc等）に結合したAMG 757が検出される可能性は否定できない。BiTE®分子が標的細胞及びTリンパ球の両方に接触すると、細胞溶解性シナプスが形成され、それにより標的細胞が溶解する（Offner et al, 2006）。したがって、AMG 757へのADAの結合に伴うサイズの増加が、立体的に細胞溶解性シナプスの形成を妨げる可能性があり、これにより、曝露量がより高かったにもかかわらず、すべてのADA陽性例で浸潤が認められなかったことが説明される。下垂体の変化が認められなかった50 µg/kg群の3例では、下垂体の変化を示した動物と比較して、初回投与後の曝露量（C_0及びAUC_{last}の両方）が低かった。

休薬期間後に、500 µg/kg（休薬期間で評価した唯一の用量）群の4例中3例で、下垂体に軽微な巣状ないし多巣性の単核細胞浸潤が認められた。投与期間終了時の所見と同様に、浸潤は一貫して中間部と後葉の間の境界面にみられたが、投与期間終了時にはこの変化が境界面に沿ってびまん性に認められたのに対し、回復性試験例では、浸潤は巣状領域に局在していた。分布の減少と混合細胞浸潤から単核細胞浸潤への変化に基づき、投与終了時屠殺例で観察された混合細胞浸潤の存在は、休薬期間後に部分的に回復したと判断され、これは時間の経過とともに完全に回復すると考えられる（Perry et al, 2013）。

カニクイザルの下垂体におけるAMG 757関連の混合細胞浸潤は、免疫チェックポイント阻害薬を投与した一部の患者で報告され、臨床的に管理されている下垂体炎とは形態学的に異なっており、はるかに重症度は低い。チェックポイント阻害薬による下垂体炎は自己免疫関連疾患であり、組織損傷を引き起こすびまん性の炎症、磁気共鳴画像法で認められる下垂体腫大、臨床症状（頭痛、疲労等）、並びに副腎、甲状腺及び性腺に関与する続発性の内分泌機能障害を伴うことが報告されている（Rossi et al, 2016、Torino et al, 2016）。一方、カニクイザルにおけるAMG 757関連の混合細胞浸潤の分布は限局性であり、下垂体重量の変化、細胞傷害、内分泌腺機能障害を示す明らかな所見及び一般状態の変化は認められなかった。これらの違い及び所見の可逆性から、AMG 757に関連した下垂体における混合細胞浸潤は毒性変化ではないと考えられた。

投与終了時に屠殺した50 µg/kg群の1例で、心臓及び肺の血管変化が認められたが、これはADAとAMG 757により形成された免疫複合体（ADA-IC）の二次的影響に一致していた。心臓では、冠動脈周囲の冠状溝に肉芽腫性炎症がみられ、肺では肺動脈に2つの小さな器質化血栓が認められた。病理学的特徴から慢性の変化とみられることから、本試験の早期にADA-ICが影響を及ぼしたことが示唆される。この動物の血清中においてADAは検出されなかったが、これらの変化の解剖学的部位及び病理学的特徴に基づく科学的根拠の重み付けは、ADA-ICによる血管傷害と一致していた（Rojko et al, 2014、Schrieber and Penny, 1984、Germuth, 1953、Germuth et al, 1955）。さらに、ADAは

4500 µg/kg群の全例及び500 µg/kg群の10例中6例に認められたが（血管変化のエビデンスなし）、ADA-IC関連の変化が用量に依存せずにみられることは稀ではなく、一般に高用量で認められる可能性は低い（Ponce et al 2009、Rojko et al, 2014）。要約すると、この動物における炎症性変化の解剖学的部位及び特徴は、抗AMG 757抗体の発現に続発したICによる炎症に一致しており、AMG 757との直接的な関連はなかった。

4.1.5 AMG 757：カニクイザルを用いた3カ月間反復静脈内投与毒性試験（122516試験）

本試験では、カニクイザル（1群雌雄各4例）に、AMG 757を0、50又は4500 µg/kgの用量で週1回3カ月間、低速静脈注入したときの毒性及びTKを評価した。

AMG 757の曝露量は、用量及び反復投与に伴って増加した（モジュール2.6.6 2.2.2項）。TK解析の結果を表 1に示す。AUC_{last}及びC_0を指標とする曝露量には、雌雄間で差は認められなかった（2倍以内）。AMG 757の投与を受けた多くの動物で、試験終了時までにADAが検出された。以下のパラメータにはAMG 757関連の変化は認められなかった：心電図、体温、呼吸数及び神経学的検査。

AMG 757に関連した臨床病理学的変化は、4500 µg/kgで雄4例中2例及び雌4例中3例の軽微なリンパ球減少のみであった。1カ月間反復投与毒性試験で既に観察されたように、病理組織学的所見として、50 µg/kg以上の用量でAMG 757に関連した、主にリンパ球からなる軽微から軽度の単核細胞浸潤を特徴とする変化が下垂体で観察された。浸潤は中間部と後葉の境界面に位置していたほか、中間部内に浸潤している例もあった。これは下垂体におけるDLL3の発現パターンに一致している（123377試験）。下垂体には組織傷害を示す病理組織学的徴候はみられなかった。

50 µg/kg以上の用量にみられたその他の病理組織学的所見としては、複数の組織（心臓、肺、脳及び胆嚢）で認められた、主に血管周囲に位置するリンパ球の小さい浸潤巣で構成される軽微な単核球及び／又は混合炎症性細胞浸潤であった。認められた細胞浸潤は、この動物種に共通して観察される自然発生的浸潤と組成、重症度及び分布の点で類似しているが、AMG 757を投与した動物の複数組織で発生率が増加した原因は、異物となる生物学的薬剤のIV投与及び／又はADAの存在と考えられた（Naylor et al, 2019、Rojko et al, 2014）。

4.1.6 muS757：BALB/cマウスを用いた1カ月間反復投与毒性試験（153960試験）

本試験の目的は、マウスにおけるmuS757の毒性及びTKを評価するとともに、AMG 757をカニクイザルに投与したときに認められた変化と比較することであった。

BALB/cマウスにmuS757を週1回4週間、IVボーラス投与した。動物（1群雌雄各10例）にmuS757を0、50、500又は4500 µg/kgの用量でDay 1、8、15及び22に投与した。muS757の物理化学的特性により、マウスに投与可能なMFDは4500 µg/kgに制限された。

TK解析の結果を表 1に示す。muS757の曝露量は、特に500 µg/kg以上で用量比例的かつ経時的に増加した。Day 1及び22のAUC_{last}及びC_{max}には性差は認められなかった。

途中死亡はみられず、muS757に関連した一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、神経学的評価及び器官重量の変化、並びに剖検所見及び病理組織学的所見は認められなかった。

500 µg/kg以上でDay 29にmuS757投与に関連した軽微な臨床病理学的変化がみられたが、総白血球の軽微な減少（雌雄）、並びに不随するリンパ球及び好中球の減少（雄のみ）に限定されていた。また、雄のみで軽微なトリグリセリド減少が認められた（表 2）。

以上、BALB/cマウスにmuS757を週1回4週間（Day 1、8、15及び22）、IV投与したときの忍容性は良好であり、500 µg/kg以上の群でDay 29に軽微な白血球減少がみられ、雄に軽微なトリグリセリド減少が認められたのみであった。

表 1　カニクイザル及びマウスにおけるAMG 757及びmuS757のPK/TKパラメータ

				Day 1		Day 22	
Study	Molecule	Species	Dose (µg/kg)	C_0 or C_{max} (µg/mL)	AUC_{last} (µg·h/mL)	C_0 or C_{max} (µg/mL)	AUC_{last} (µg·h/mL)
1-month	AMG 757	Cyno	50	0.465	24.3	0.801	61.6
3-month	AMG 757	Cyno		1.37	74.4	2.05	195
1-month	muS757	Mouse		1.15	62.5	1.44	91.8
1-month	AMG 757	Cyno	500	9.41	490	12.5	861
1-month	muS757	Mouse		9.28	493	13.9	1110
1-month PK[a]	muS757	Mouse		8.08	500	11.5	754
1-month	AMG 757	Cyno	4500	95.1	4950	62.3	1940
3-month	AMG 757	Cyno		126	7000	222	20600
1-month	muS757	Mouse		88.1	6080	171	15000

AUC_{last} = area under concentration-time curve from time 0 until the last measurable concentration; C_0 = estimated initial concentration after iv administration; C_{max} = maximum observed drug concentration; Cyno = cynomolgus monkey; muS757 = bispecific T cell engager with binding specificities for mouse/human DLL3, mouse CD3 and mouse FcRn, PK = pharmacokinetics; TK = toxicokinetics.

Source: Toxicology studies: Study 153960 (1-month muS757 study); Study 121424 (1-month AMG 757 study); Study 122516 (3-month AMG 757 study); [a] Pharmacokinetic Study 154480 (Repeat-dose muS757)

表 2　カニクイザルとマウスとの非臨床所見の比較

	Molecule	muS757	AMG 757	AMG 757
Finding	Duration	1-month	1-month	3-month
Minimal decrease in lymphocytes		Yes	Yes	Yes
Minimal decrease in triglycerides		Yes	No	No
Minimal to mild inflammatory cell infiltrate in the pituitary gland		No	Yes	Yes
Minimal increase in heart rate		NA	Yes	No

muS757 = bispecific T cell engager with binding specificities for mouse DLL3 and mouse CD3.

Source: Toxicology studies: Study 153960 (1-month muS757 study); Study 121424 (1-month AMG 757 study); Study 122516 (3-month AMG 757 study)

4.2　生殖発生毒性試験

4.2.1　胚・胎児発生に対するDLL3標的BiTE®分子の影響の有無の評価（122517試験）

DLL3は胚パターン形成に関与する抑制性Notch経路リガンドであり、一般にゴルジ体のシス面及び細胞質小胞に存在し、そこでNotchの処理及び細胞表面発現を妨げることによりNotchシグナル伝達を抑制する（Chapman et al, 2011）。

成獣の組織では、低レベルのDLL3が脳、下垂体及び膵島細胞の細胞質内で検出される（123377試験）。

成獣組織での限定的な発現とは対照的に、DLL3は胚発生時に発現し、体節形成及びパターン形成において機能する（Chapman et al, 2011）。胚・胎児発生時におけるより広範なDLL3の発現パター

ンが、いくつかの試験で特徴付けられている。具体的には、マウスの卵母細胞、受精卵、二細胞胚、桑実胚、胚盤胞及び孵化胚盤胞における*DLL3*の発現を評価したところ、*DLL3*転写物は卵母細胞及び受精卵から後期胚盤胞期までの全段階で検出された（Cormier et al, 2004）。マウスの発生において、DLL3転写物は原腸形成時及び早期器官形成期に検出される（Dunwoodie et al, 1997）。

*DLL3*発現は、マウスの中脳、後脳及び脊髄と推定される場所（Kusumi et al, 1998）、並びに発生中の蝸牛（Hartman et al, 2007）及び網膜（Dvoriantchikova et al, 2015）においても検出された。

発生時のDLL3発現パターンがより広範であることに一致して、DLL3の遺伝子突然変異に関連する先天異常の脊椎分節症候群である脊椎肋骨異骨症（SCDO、Chapman et al, 2011）が認められている。

マウスでは、DLL3機能喪失（LOF）変異の結果として、神経弓障害及び肋骨分岐を伴った半椎体症を含む軸骨格障害のため、体長が短縮した（Dunwoodie et al, 2002、Kusumi et al, 1998）。LOF変異による生存率への影響もみられ、胎生9.5日までに20%が喪失し、生後10日にはDLL3変異型マウスに87%の減少が認められた（Dunwoodie et al, 2002、Kusumi et al, 1998）。

ヒトでは、DLL3のような遺伝子の突然変異により、1型SCDO症候群にみられるような椎骨の異常分節化が生じる。SCDOは脊椎分節異常症候群の一種であり、マウスで特徴付けられたのと同様の低身長及び軸骨格障害を伴う（Bulman et al, 2000）。

公表データにより、DLL3は細胞表面に存在しない代わりに細胞内に存在し、胚・胎児発生時にはゴルジ体のシス面及び細胞質内小胞に局在することが明確に示されており（Chapman et al, 2011）、したがってAMG 757が到達して結合することはできないと考えられる。可能性は低いが、DLL3は胚・胎児発生時に特定の細胞の形質膜に局在する可能性があり、これらがAMG 757の標的となって発生中の胚及び／又は胎児に影響を及ぼす可能性がある。AMG 757によるDLL3発現胚細胞の溶解が、LOF変異に起因する表現型を直接再現することはないと予想されるが、胚がAMG 757に曝露されることにより胚・胎児毒性が生じる可能性がある。

DLL3標的BiTE®分子の胚・胎児発生に対するこれらの毒性作用の有無を、マウスサロゲートmuS757を用いてマウスで評価した（モジュール2.6.6 2.5項）。

標的発現に加えて、発生中の胎児におけるmuS757活性はT細胞を必要とすると考えられ、妊娠中に胎児及び母動物のTリンパ球がいずれも存在することが示されている（Erlebacher 2013、Holt and Jones 2000、Nancy and Erlebacher 2014）。

適時交配した雌のCrl:CD1マウスに、muS757を0、500又は4500 µg/kgの用量で、着床から硬口蓋閉鎖まで、すなわち妊娠日（GD）6及び13にIVボーラス投与した。muS757の物理化学的特性のため、マウスに投与可能なMFDは4500 µg/kgに制限された。

すべてのマウスについて、母動物の生死、母動物の一般状態、母動物の体重及び母動物の体重変化を検討した。胎児については、GD 18に外表、内臓及び／又は骨格異常の検査を実施した。

母動物から血液検体を採取してmuS757の血清中濃度及びTKを測定するとともに、胎児血液検体を採取して胎児内muS757濃度を測定し、母動物・胎児曝露量比を算出した。

妊娠雌マウスにおけるmuS757曝露量は、ほぼ用量に比例して増加した（2倍以内）。1回の検体採取時点（GD 18）での胎児血清中濃度は、母動物血清中濃度の22.6～29.5倍であった（モジュール2.6.4 3.2.2項）。

胎児内濃度がより高かったことは公表データと一致しており、マウスでは他の動物種と異なり、器官形成期終了後からGD 18の妊娠末期まで胎児／母動物濃度比が高いことが示されている。これは胎児内濃度の絶対的な増加によるものではなく、IgGベース分子の自然消失過程に関連する母動物内濃度の減少に起因すると考えられ、胎児クリアランスが母動物クリアランスより低いことを示している（Bowman et al, 2013）。

muS757関連の一般状態の変化及びGD 18より前の分娩は認められなかった。4例の雌が計画屠殺日に分娩したため途中屠殺したのを除いて、すべてのマウスが計画屠殺まで生存した。

平均母動物体重及び体重増加量を含むいずれの母動物パラメータにも、muS757関連の変化は認められなかった。また、いずれの用量においてもmuS757関連の肉眼所見はみられず、いずれの卵巣、子宮及び同腹児パラメータにも変化は認められなかった。また、muS757投与により、胎児外表、内臓及び骨格のいかなる奇形及び変異も誘発されなかった。

以上、DLL3は細胞内に発現するためmuS757は到達できず、4週間反復投与毒性試験に一致して、いずれの用量においてもmuS757関連の母動物の変化は認められなかった。胎児は薬理作用のみられる血清中濃度に曝露されたが、それに続いて胚・胎児の生存性及び成長にはmuS757関連の影響はみられず、外表、内臓及び骨格検査ではmuS757関連の奇形及び変異は認められなかった。

胚・胎児発生時のDLL3発現パターンが高度に制限されていること、DLL3が細胞内に局在していること及びマウスを用いた胚・胎児発生に関する試験の結果によると、妊娠患者でAMG 757による胚・胎児発生毒性が発現する可能性は低い。

4.3 局所刺激性試験

AMG 757の局所刺激性を、カニクイザルを用いた28日間反復投与毒性試験（121424試験）及び3カ月間反復投与毒性試験（122516試験）、並びに単回SC投与局所刺激性試験（157064試験）で評価した。

28日間反復投与毒性試験では、IV投与部位に刺激性及びその他の局所変化は認められなかった。2例で投与部位に軽微な病理組織学的変化（出血及び血栓）が観察されたが、投与処置に起因するものでAMG 757関連ではないと考えられた。IV投与部位の出血及び血管血栓は、反復IVカテーテル挿入に付随することが報告されている（Morton et al, 1997）。

3カ月間反復投与毒性試験では、溶媒及びAMG 757投与動物のいずれにおいても、IV投与部位に軽微な病理組織学的変化（すなわち単核細胞浸潤、壊死、線維増殖）が認められたが、これらは注射処置に起因するものでAMG 757との関連はないと考えられた。

SC局所刺激性試験では、3例の雌カニクイザルを単回投与群に割り付け、対照物質（G42SuT希釈剤）を左肩甲骨部位に、AMG 757を1 mg/kgの用量で右肩甲骨部位に、それぞれ注射した。

Day 4に注射部位の皮膚生検検体を採取したところ、観察／皮膚採点及び病理組織学的検査においてAMG 757関連の変化は認められなかった。SC投与部位の投与関連の変化は軽微であり、所見として、血管周囲単核細胞浸潤が対照物質注射部位の1カ所に、皮膚好中球浸潤が対照物質注射部位の1箇所及びAMG 757注射部位の1箇所に、それぞれ認められた。これらの変化の発現頻度及び重症度は、対照物質注射部位とAMG 757注射部位で同程度であったことから、AMG 757の直接作用に起因するものではなく、注射処置による二次的な変化と考えられた。

以上、非臨床局所刺激性評価により、AMG 757をヒトにSC投与しても安全性に問題なく、AMG 757関連の局所変化が発現する可能性は低いことが示唆される。

毒性試験の一覧をモジュール2.6.7 表 1に示す。

5. 非臨床試験プログラムの総括及び結論

AMG 757はDLL3を標的とするファースト・イン・クラスのBiTE®分子であり、SCLCの治療薬として開発中である。AMG 757は、DLL3発現腫瘍細胞及びCD3陽性T細胞への結合によって作用し、T細胞の活性化及び増殖、一過性の炎症性サイトカイン産生、並びにパーフォリン及びグランザイムの放出による腫瘍細胞のアポトーシス誘導を引き起こす。AMG 757を用いて実施された非臨床薬理試験において、この作用機序が*in vitro*試験のSCLC細胞株及び*in vivo*試験のSCLC異種移植マウスモデルで実証された。

AMG 757はSCLC細胞に対して強力な抗腫瘍活性を示したが、それにはDLL3を発現する標的細胞とエフェクター細胞であるT細胞（CD3陽性）の両方が必要であった。AMG 757の活性はDLL3発現細胞に対して選択的であり、エフェクター細胞単独あるいはエフェクター細胞とDLL3陰性標的細胞との共培養では、生理学的に適切な条件下で活性は認められなかった。

細胞結合及び生物活性アッセイにおけるAMG 757のカニクイザルDLL3及びCD3に対する交差反応性、並びにカニクイザルとヒトにおけるDLL3の発現プロファイルの類似性から、カニクイザルは非臨床毒性評価に適した動物種であることが確認された。胚・胎児発生に関する毒性評価を可能にするために、AMG 757と同じDLL3結合ドメイン、並びにマウスCD3結合ドメイン及びFcドメインを有するAMG 757のマウスサロゲート分子であるmuS757を作製した。マウスT細胞とマウスDLL3発現標的細胞の共培養におけるmuS757の生物活性は、ヒトの系におけるAMG 757の生物活性と同程度であった。

AMG 757とmuS757を用いたPK及びTK試験において、C_{max}及びAUC_{last}に関する薬物動態学的特性は同程度であることが示された（表 1）。カニクイザルにAMG 757を単回急速静脈注入したとき、血清中濃度は二相性に低下し、終末相における消失半減期（$t_{1/2}$）の平均値は234時間であった。マウスにmuS757を4回急速静脈注入したとき、ARは2.1、$t_{1/2}$は1回目投与後が119時間、4回目投与後が140時間であった。

非臨床毒性試験において、カニクイザルにAMG 757を4500 µg/kg（MFD）以下の用量で週1回、最長3カ月間IV投与したときの忍容性は良好であった。AMG 757に直接起因する毒性変化は認められなかった。

標的であるDLL3の組織内分布が限定的であるとともに、AMG 757がDLL3タンパク質に到達して結合することができないと予想される脳、下垂体及び膵島細胞において、主に細胞質内で低度に局在することを考慮すると、AMG 757関連の変化は想定される作用機序に一致する。

毒性試験で観察されたAMG 757関連の変化は可逆的かつ臨床モニタリング（バイタルサイン、心電図、臨床徴候及び症状）が可能である（モジュール 2.5.6 4.2項）。

AMG 757関連の病理組織学的所見は、心臓、肺、脳、肝臓、胆嚢及び下垂体における軽微及び軽度の炎症性細胞浸潤のみであり、いずれの組織にも細胞傷害は認められなかった。

GLP適用の3カ月間反復投与毒性試験ではGLP適用の1カ月間反復投与毒性試験の所見が確認され、新たな所見及び予想外の所見は認められなかった。

muS757の忍容性も極めて良好であり、それぞれの4週間反復投与毒性試験で被験物質関連の毒性変化は認められず、軽微なリンパ球減少はマウスとカニクイザルで同程度であった（表 2）。

さらに、胚・胎児発生に関する試験では、いずれの母動物パラメータにもmuS757関連の変化はみられなかった。また、いずれの用量においてもmuS757関連の肉眼所見はみられず、いずれの卵巣、子宮及び同腹児パラメータの変化も認められなかった。muS757投与により、いかなる胎児外表、内臓及び骨格の奇形及び変異も誘発されなかった。このことは胚・胎児発生時の高度に制限されたDLL3発現パターン及びDLL3の細胞内局在に一致している。

要約すると、それぞれの毒性試験におけるAMG 757及びmuS757の忍容性は極めて良好で、被験物質関連の毒性変化は認められなかった。動物試験で認められた影響は、AMG 757又はmS757が結合できない分子（その標的であるDLL3が細胞内のゴルジ体及び細胞質小胞に通常存在するため）について予想されるものであった。

まとめると、非臨床薬理、薬物動態及び毒性データプログラムは、SCLC患者の治療を目的としたAMG 757の製造販売承認申請を支持するものである。

6. 参考文献

Bowman CJ, Breslin WJ, Connor AV, et al. Placental transfer of Fc-containing biopharmaceuticals across species, an industry survey analysis. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2013;98:459-485

Bulman MP, Kusumi K, Frayling TM, et al. Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nature Genetics*. 2000;24:438-441.

Chapman G, Sparrow DB, Kremmer E, Dunwoodie SL. Notch inhibition by the ligand Delta-Like 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis. *Hum Mol Genet.* 2011;20:905-916.

Cormier S, Vandormael-Pournin S, Babinet C, Cohen-Tannoudji M. Developmental expression of the Notch signaling pathway genes during mouse preimplantation development. *Gene expression patterns: GEP.* 2004;4:713-717.

Dómine M, Moran T, Isla D, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of small-cell lung cancer (SCLC) (2019). *Clin Transl Oncol.* 2020;22:245-255.

Dunwoodie SL, Clements M, Sparrow DB, et al. Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene Dll3 are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development.* 2002;129:1795-1806.

Dunwoodie SL, Henrique D, Harrison SM, Beddington RS. Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development.* 1997;124:3065-3076.

Dvoriantchikova G, Perea-Martinez I, Pappas S, et al. Molecular Characterization of Notch1 Positive Progenitor Cells in the Developing Retina. *PloS One.* 2015;10:e0131054.

Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:387-411.

Germuth FG, Jr. A comparative histologic and immunologic study in rabbits of induced hypersensitivity of the serum sickness type. *The Journal of Experimental Medicine.* 1953;97:257-282.

Germuth FG, Pace MG, Tippett JC. Comparative histologic and immunologic studies in rabbits of induced hypersensitivity of the serum sickness type. II. The effect of sensitization to homologous and cross-reactive antigens on the rate of antigen elimination and the development of allergic lesions. *The Journal of Experimental Medicine.* 1955;101:135-150.

Giffin MJ, Cooke K, Lobenhofer EK, et al. AMG 757, a half-life extended, DLL3-targeted bispecific T-cell engager, shows high potency and sensitivity in preclinical models of small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2021;27:1526-1537.

Hartman BH, Hayashi T, Nelson BR, Bermingham-McDonogh O, Reh TA. Dll3 is expressed in developing hair cells in the mammalian cochlea. *Developmental Dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2007;236:2875-2883.

Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy.* 2000;55:688-697.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. S6(R1): Addendum to ICH S6: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, 2011.ICH Guideline S6(R1).

ICH Harmonized Tripartite Guideline. S9: Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals, 2010.ICH Guideline S9.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. S9 Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals questions and answers.ICH 2018.

Kusumi K, Sun ES, Kerrebrock AW, et al. The mouse pudgy mutation disrupts Delta homologue Dll3 and initiation of early somite boundaries. *Nature Genetics.* 1998;19:274-278.

Morton D, Safron JA, Glosson J, et al. Histologic lesions associated with intravenous infusions of large volumes of isotonic saline solution in rats for 30 days. *Toxicol Pathol* 1997;25:390-394.

Nancy P, Erlebacher A. T cell behavior at the maternal-fetal interface. *The International Journal of Developmental Biology.* 2014;58:189-198.

Naylor SW, Czajkowski M, Harvey W, et al. Histopathological findings in cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) consistent with secondary immunological reaction to biotherapeutics with an emphasis on the CNS and eye. *Toxicol Pathol* 2019;47:165-173.

Offner S, Hofmeister R, Romaniuk A, Kufer P, Baeuerle PA. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol Immunol* 2006;743:763-771.

Perry R, Farris G, Bienvenu JG, et al. Society of Toxicologic Pathology position paper on best practices on recovery studies: the role of the anatomic pathologist. *Toxicol Pathol.* 2013;41:1159-1169.

Ponce R, Abad L, Amaravadi L, et al. Immunogenicity of biologically-derived therapeutics: assessment and interpretation of nonclinical safety studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP.* 2009;54:164-182.

Reff ME, Hariharan K, Braslawsky G. Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Control.* 2002;9(2):152-166.

Rojko JL, Evans MG, Price SA, et al. Formation, clearance, deposition, pathogenicity, and identification of biopharmaceutical-related immune complexes: review and case studies. *Toxicologic Pathology.* 2014;42:725-764.

Rossi E, Sgambato A, De Chiara G, et al. Endocrinopathies induced by immune-*checkpoint* inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Expert Review of Clinical Pharmacology.* 2016;9:419-428.

Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer.* 2019;19:289-297.

Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, et al. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med.* 2015;7:302ra136.

Schrieber L and Penny R. Factors influencing immune complex localisation. *Rheumatology International.* 1984;4:95-109.

Torino F, Corsello SM, Salvatori R. Endocrinological side-effects of immune checkpoint inhibitors. *Current Opinion in Oncology.* 2016;28:278-287.

7. 補遺

表 補遺　モジュール4に以下の項目がない理由

4.2.1 Pharmacology	
4.2.1.3 Safety Pharmacology	The effects of AMG 757 in toxicology studies in the cynomolgus monkey that are relevant to safety pharmacology are described in Module 4.2.3.2 (Repeat Dose Toxicology).
4.2.2 Pharmacokinetics	
4.2.2.3 Distribution	No *in vitro* or *in vivo* distribution studies have been conducted with AMG 757.
4.2.2.4 Metabolism	No conventional *in vitro* metabolism studies have been conducted with AMG 757.
4.2.2.5 Excretion	As a half-life extended BiTE® molecule that contains an Fc domain, AMG 757 is approximately 105 kDa. It is expected that AMG 757 is catabolized by the liver, consistent with excretion of molecules > 60 kDa (Reff et al., 2002).
4.2.2.6 Pharmacokinetic drug interactions	Pharmacokinetic drug interaction studies have not been conducted.
4.2.2.7 Other pharmacokinetic studies	There are no nonclinical pharmacokinetic studies classified to this section.
4.2.3 Toxicology	
4.2.3.1 Single dose toxicity	No standalone single-dose toxicity studies were conducted. Acute effects of AMG 757 were evaluated in the repeat-dose cynomolgus monkey toxicology studies.
4.2.3.3 Genotoxicity	No studies evaluating genotoxicity or mutagenic potential of AMG 757 have been conducted in accordance to ICHS6(R1), 2011.
4.2.3.4 Carcinogenicity	Carcinogenicity studies were not conducted in accordance with ICH S9, 2010.
4.2.3.5 Reproductive and Developmental Toxicity	
4.2.3.5.1 Fertility and early embryonic development	A study of fertility and early embryonic development was not conducted in accordance with ICH S9
4.2.3.5.3 Prenatal and postnatal development, including maternal function	A pre- and post-natal toxicology study was not conducted in accordance with ICH S9.
4.2.3.5.4 Studies in which the offspring (juvenile animals) are dosed and/or further evaluated.	Nonclinical studies in juvenile animals were not considered to be relevant to the proposed indication and patient population for AMG 757.
4.2.3.7 Other Toxicity Studies	There are no nonclinical toxicology studies classified to this section.