# 目次

1. タルラタマブ（AMG 757） ....2
2. 小細胞肺癌（SCLC）とその背景....3
3. 臨床適応と投与レジメン....3
4. 参考文献 ....4

# 図一覧

図 1　AMG 757の化学構造....2

# 1. タルラタマブ（AMG 757）

AMG 757（一般的名称：タルラタマブ）は、T細胞上の分化抗原群3のε鎖（CD3ε）に結合し、腫瘍関連抗原であるデルタ様リガンド3（DLL3）を標的とする、二重特異性T細胞誘導（BiTE®）分子であり、982個のアミノ酸からなる単鎖の組換えタンパクである。この分子は、DLL3に結合する一本鎖可変領域フラグメント（scFv）、及びT細胞受容体サブユニットのCD3εへ結合するscFv、それに血中半減期延長を目的として加えられエフェクター機能を持たない一本鎖結晶化フラグメント（scFc）領域が短いリンカーを介して繋がった構造をとる（図 1、より詳細はモジュール3.2.S.1.2項参照）。翻訳後修飾を加味したAMG 757の理論上の分子量は還元、非還元型ともに105 kDaである。

**図 1　AMG 757の化学構造**



AMG 757は、腫瘍細胞上に発現するDLL3とT細胞上に発現するCD3に同時に結合するように設計されている。その薬理活性は、特異的な細胞血中半減期傷害性T細胞による再指向性細胞溶解を介して、標的であるDLL3を発現する腫瘍細胞を傷害する。すなわち、T細胞活性化、一過性の炎症性サイトカイン産生、並びにT細胞が仲介する小孔形成酵素であるパーフォリン及びグランザイム等を活性化し、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する。これにより本薬は、DLL3発現小細胞肺癌（SCLC）やその他神経内分泌系腫瘍に対する標的免疫療法薬となることが期待される。

## 2. 小細胞肺癌（SCLC）とその背景

SCLCは侵攻性の肺癌のサブタイプであり、世界の肺癌の約15%を占めている（National Cancer Institute [NCI], 2023、National Organization for Rare Disorders [NORD], 2021、Rudin et al, 2021、Sung et al, 2021）。SCLCは、遺伝子変異性が高く、高増殖性、かつ早期転移性といった特徴を持つ高悪性度の神経内分泌系腫瘍である。また、極めて予後不良でそのほとんどすべてが致死的である。したがって、SCLCに対する新しい治療標的、及び有効な治療法の開発が望まれている。

SCLCは、それが1回の放射線療法で治療可能な範囲にあるか、それを超えた状況かで限局型（LS）と進展型（ES）に分類される。プラチナベース化学療法（例えば、エトポシドと併用したシスプラチン又はカルボプラチンなど）は現在もなお一次治療であり、LS-SCLCには放射線療法との併用、ES-SCLCではPD-L1阻害剤との併用が標準治療となっている（National Comprehensive Cancer Network [NCCN] SCLC Guidelines, 2023、肺癌診療ガイドライン2021年版, 2021、Rudin et al, 2021、Ganti et al, 2021）。ただし、一次治療での反応性は通常一時的で、その後再発及び難治性となる（Rudin et al, 2021、Yoon et al, 2019、Chan and Coward, 2013）。二次治療としては、米国では2種の薬剤のみが承認されている。それらは、化学療法であるトポテカン（通常承認）及びRNAポリメラーゼ阻害剤であるlurbinectedin（迅速承認）である。これらの薬剤は、全生存期間（OS）に対しては効果が限定的である（Zepzelca® United States [US] Prescribing Information, 2023、Topotecan Hydrochloride US Prescribing Information, 2012、von Pawel et al, 1999）。なお、現在ではSCLCに対する三次治療としては承認されていない状況である（NCCN SCLC Guidelines, 2023）。

非古典的Notchファミリーリガンド DLL3は、新規SCLC治療標的である。正常組織ではDLL3は細胞内タンパクであり、胎児発生時の体節形成に働くことが知られている。またこの分子は脳細胞、下垂体や膵臓ランゲルハンス島の細胞質にわずかに発現が認められる。DLL3発現は、SCLCで増加が認められ、SCLCの85%では細胞表面に局在している（Saunders et al, 2015、Giffin et al, 2021）。DLL3発現は転写因子achaete-scute homolog 1（ASCL1）により調節され、この分子は神経内分泌細胞分化及びSCLCの進行に関わっている。DLL3の分化発現プロファイルは、AMG 757のようなDLL3標的療法に腫瘍特異的な作用があることを示唆している。

さらに、他のDLL3標的療法及び免疫療法から得られた臨床データは、AMG 757の開発を進めるさらなる根拠となった。抗DLL3抗体-薬物複合体であるrovalpituzumab tesirineは、再発SCLCに対して単剤で抗腫瘍活性を示した。しかしながら、臨床開発は結局のところ薬物部分の遊離による毒性発現のため中止となった（Cortinovis et al, 2022）。抗PD-L1免疫療法は、ES-SCLCに対する一次治療ではあるが（NCCN SCLC Guidelines, 2023）、OSに対するベネフィットは十分ではない。（Paz-Ares et al, 2019、Horn et al, 2018）。AMG 757は、免疫チェックポイント阻害剤とは明らかに異なる作用機序を有するファースト・イン・クラスのDLL3標的免疫療法薬として期待される。

## 3. 臨床適応と投与レジメン

本薬は成人SCLC患者の治療を適応として開発が進んでいる。ヒト初回投与（FIH）試験（20160323試験）では、本薬を再発又は難治性SCLCに対して隔週で0.03～100 mg点滴静注（IV）を行った。また、現在実施中の臨床第II相試験（20200491試験）では、プラチナベース治療（±免疫チ

ェックポイント阻害剤）及び少なくともう1つの他の治療後の進行又は再発SCLC患者に対し、28日を1サイクルとして本薬を1日目に1 mg、8、15日目に10又は100 mgを、その後隔週で投与した。AMG 757の対象患者は、プラチナベース治療中又は治療後の成人進行SCLC患者と考えている。

## 4. 参考文献

Chan BA, Coward JIG. Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013;5:S565-S578.

Cortinovis DL, Colonese F, Abbate MI, et al. Harnessing DLL3 inhibition: From old promises to new therapeutic horizons. *Front Med.* 2022;9:989405.

Ganti AKP, Loo BW, Bassetti M, et al. Small Cell Lung Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021;19:1441-1464.

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.

日本肺癌学会. ガイドライン検討委員会. 肺癌診療ガイドライン2021年版. https://www.haigan.gr.jp/guideline/2021 Accessed 15 August 2022.

Horn L, Mansfield AS, Szczęsna A, et al. First-line atezolizumab plus chemotherapy in extensive-stage small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2018;379:2220-2229

National Cancer Institute. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. Small Cell Lung Cancer Treatment. Updated 02 March 2023. https://www.cancer.gov/types/lung/hp/small-cell-lung-treatment-pdq Accessed 11 May 2023.

National Organization for Rare Disorders. Rare Disease Database. Small Cell Lung Cancer. 2021. /https://rarediseases.org/rare-diseases/small-cell-lung-cancer/ Accessed May 2022.

National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Small Cell Lung Cancer V.3.2023. 21 December 2022.

Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y, et al. Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2019;394:1929-1939.

Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, & Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7:3.

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.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-249.

Topotecan Hydrochloride for Injection US Prescribing Information. Revised August 2012. https://cdn.pfizer.com/pfizercom/products/uspi_topotecan.pdf. Accessed 22 September 2023.

von Pawel J, Schiller JH, Shepherd FA, et al. Topotecan versus cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17:658-667.

Yoon HG, Noh JM, Ahn YC, et al. Higher thoracic radiation dose is beneficial in patients with extensive small cell lung cancer. *Radiat Oncol J*. 2019;37:185-192.

Zepzelca® (lurbinectedin) US Prescribing Information. Revised July 2023. https://pp.jazzpharma.com/pi/zepzelca.en.USPI.pdf. Accessed 22 September 2023.

# 目次

1. まとめ ....5
2. 効力を裏付ける試験....8
2.1 AMG 757の*in vitro*作用....8
2.1.1 結合親和性 ....8
2.1.2 FcRに対するAMG 757のscFc領域の結合特性 ....9
2.1.3 AMG 757の結合特異性 ....9
2.1.4 AMG 757誘導によるT細胞再指向性細胞溶解 ....10
2.1.5 T細胞に対するAMG 757の作用 ....12
2.2 AMG 757のサロゲート分子であるmuS757を用いたマウスにおける胚・胎児発生毒性評価 ....18
2.2.1 AMG 757のマウスサロゲート分子であるmuS757の作製 ....19
2.2.2 muS757の結合特性 ....19
2.2.2.1 マウスのDLL3及びCD3に対するmuS757の結合 ....19
2.2.2.2 マウスFcγRI、II、III及びIV並びにFcRnに対するmuS757の結合親和性 ....20
2.2.2.3 ヒトDLL3、マウスDLL3及びマウスCD3に対するmuS757の結合親和性....20
2.2.3 muS757誘導のT細胞再指向性標的細胞溶解、T細胞活性化及びサイトカイン産生....21
2.3 AMG 757の*in vivo*作用 ....24
2.3.1 SCLCの同所性マウスモデルでのSHP-77-Luc腫瘍に対するAMG 757投与の効果....24
2.3.2 転移性SCLCの同所性マウスモデルを用いたNCI-H82-Luc腫瘍に対するAMG 757投与の効果 ....26
2.3.3 SCLCのPDXモデルにおけるAMG 757投与の効果....27
2.3.4 NEPCのNCI-H660異種移植モデルにおけるAMG 757投与の効果 ....28
3. 副次的薬理試験....28
3.1 ヒト及びカニクイザルの正常組織におけるDLL3発現 ....28
3.2 血小板活性化アッセイ ....29
4. 安全性薬理試験....30
5. 薬力学的薬物相互作用....30
5.1 AMG 757の*in vitro*活性に対するデキサメタゾンの影響....30
5.2 AMG 757誘導のT細胞再指向性標的細胞溶解に対する免疫チェックポイント阻害の影響 ....33
5.3 AMG 757誘導のT細胞再指向性細胞溶解に対する化学療法の影響 ....34
6. 考察及び結論....37
7. 参考文献 ....38

# 表一覧

表 1 AMG 757：非臨床薬理試験の一覧....7
表 2 ヒト及びカニクイザルのDLL3及びCD3εに対するAMG 757の結合親和性 ....9
表 3 AMG 757誘導のヒト及びカニクイザルT細胞による再指向性細胞溶解の$EC_{50}$値....11
表 4 muS757及びAMG 757の結合親和性 ....21
表 5 muS757誘導のT細胞再指向性標的細胞溶解の$EC_{50}$値....22
表 6 AMG 757のT細胞再指向性細胞溶解誘導の$EC_{50}$に対するデキサメタゾンの影響....33

# 図一覧

図 1 AMG 757の機能的特異性....10
図 2 AMG 757誘導のカニクイザルT細胞によるカニクイザルDLL3発現細胞に対する再指向性細胞溶解 ....11

図 3 AMG 757誘導のヒトCD4+及びCD8+ T細胞による再指向性標的細胞溶解.....12
図 4 AMG 757により誘導されたヒトT細胞の活性化.....13
図 5 AMG 757により誘導されたカニクイザルT細胞の活性化.....14
図 6 DLL3発現標的細胞の非存在下でのヒトT細胞に対するAMG 757の影響.....15
図 7 DLL3発現細胞非存在下でのカニクイザルT細胞に対するAMG 757の影響.....16
図 8 AMG 757により誘導されたヒトサイトカインの遊離.....17
図 9 AMG 757により誘導されたカニクイザルサイトカインの遊離.....18
図 10 AMG 757により誘導されたカニクイザルT細胞によるサイトカイン遊離の特異性.....18
図 11 マウスのDLL3及びCD3に対するmuS757の結合.....20
図 12 muS757誘導のマウスT細胞によるCHO-muDLL3及びCHO-huDLL3細胞に対する再指向性細胞溶解.....22
図 13 muS757により誘導されたT細胞活性化マーカーの発現.....23
図 14 muS757により誘導されたマウスサイトカインの遊離.....23
図 15 SHP-77-Luc同所性SCLCモデルでの肺領域BLIに対するAMG 757の効果.....25
図 16 AMG 757によるNCI-H82-Luc実験的肝転移へのT細胞浸潤の増加.....26
図 17 AMG 757による同所性NCI-H82-Luc SCLC腫瘍増殖の抑制.....27
図 18 AMG 757誘導のT細胞再指向性細胞溶解に対するデキサメタゾンの影響.....32
図 19 免疫チェックポイント阻害によるAMG 757誘導のT細胞再指向性細胞溶解の強化.....34
図 20 カルボプラチン、シスプラチン又はエトポシドのヒトT細胞に対する用量依存的な影響.....35
図 21 カルボプラチン、シスプラチン及びエトポシドとの併用によるAMG 757誘導のT細胞再指向性細胞溶解.....36
図 22 プラチナ／エトポシド化学療法によるNCI-H82 SCLC異種移植モデルでのAMG 757の抗腫瘍活性の強化.....37

## 略号一覧

| 略号又は用語 | 定義／説明 |
|---|---|
| + | positive　陽性 |
| ADA | anti-drug antibody　抗薬物抗体 |
| ADCC | antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity　抗体依存性細胞傷害 |
| AMG 757 | tarlatamab　タルラタマブ |
| ANOVA | analysis of variance　分散分析 |
| APC | allophycocyanin　アロフィコシアニン |
| ASCL1 | achaete-scute homolog 1　achaete-scuteホモログ1 |
| B2M | beta(2)-microglobulin　ベータ(2)ミクログロブリン |
| BD | Becton Dickinson　ベクトン・ディッキンソン |
| BiTE® | bispecific T cell engager　二重特異性T細胞誘導 |
| BLI | bioluminescence　生物発光 |
| C1q | complement component 1q　補体成分1q |
| CBA | cytometric bead array　サイトメトリックビーズアレイ |
| CD3/CD3ε | cluster of differentiation 3, epsilon chain　分化抗原群3、イプシロン鎖 |
| CD4 | cluster of differentiation 4; surface antigen on T helper cells　分化抗原群4；Tヘルパー細胞上の表面抗原 |
| CD8 | cluster of differentiation 8; surface antigen on cytotoxic T cells and natural killer cells　分化抗原群8；細胞傷害性T細胞及びナチュラルキラー細胞上の表面抗原 |
| CD25 | cluster of differentiation 25; T cell activation antigen　分化抗原群25；T細胞活性化抗原 |
| CD69 | cluster of differentiation 69; early T cell activation antigen　分化抗原群69；T細胞初期活性化抗原 |
| 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 |
| CHO-cyDLL3 | CHO cells expressing cynomolgus monkey DLL3　カニクイザルDLL3を発現するCHO細胞 |
| CHO-huDLL3 | CHO cells expressing human DLL3　ヒトDLL3を発現するCHO細胞 |
| COR-L279 | human small cell lung cancer cell line　ヒト小細胞肺癌細ECE胞株 |
| DART | developmental and reproductive toxicity　生殖発生毒性 |
| DLL3 | delta-like ligand 3　デルタ様リガンド3 |
| DMS 79 | human small cell lung carcinoma cell line　ヒト小細胞肺癌細胞株 |
| E:T | effector-to-target　エフェクター対標的 |
| $EC_{50}$ | half-maximal effective concentration　50%有効濃度 |
| ECG | Electrocardiographic　心電図 |
| EMA | European Medicines Agency　欧州医薬品庁 |
| EpCAM | epithelial cell adhesion molecule　上皮細胞接着因子 |
| F | female　雌 |
| Fc | fragment crystallizable　結晶化フラグメント |
| FcγR | Fc gamma receptor　Fcガンマ受容体 |
| FcR | Fc receptor　Fc受容体 |
| FcRn | neonatal Fc receptor　新生児Fc受容体 |
| FDA | Food and Drug Administration (United States)　米国食品医薬品局 |
| HCT-116 | human colon carcinoma cell line　ヒト結腸癌細胞株 |
| HLE | half-life extended　半減期延長 |
| hr | hour　時間 |
| hu | human　ヒト |
| huIgG | human IgG　ヒト免疫グロブリンG |
| $IC_{50}$ | half-maximal inhibitory concentrations　50%阻害濃度 |
| IFN-γ | interferon gamma　インターフェロンガンマ |
| IgG | immunoglobulin G　免疫グロブリンG |

| 略号又は用語 | 定義／説明 |
|---|---|
| IHC | Immunohitochemistry　免疫組織染色 |
| IL-2 | Interleukin-2　インターロイキン2 |
| IP | intraperitoneally　腹腔内 |
| ISH | *in situ* hybridization　*in situ*ハイブリダイゼーション |
| IV | intravenous　静脈内 |
| $K_D$ | equilibrium dissociation constant　平衡解離定数 |
| kg | kilogram　キログラム |
| μM | micromolar, micromol/L　マイクロモル |
| mg | milligram　ミリグラム |
| MHC | major histocompatibility complex　主要組織適合性複合体 |
| MHRA | Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (United Kingdom)　英国医薬品・医療製品規制庁 |
| mL | milliliter　ミリリットル |
| $mm^3$ | millimeters cubed　ミリ立方メートル |
| mRNA | messenger RNA　メッセンジャーRNA |
| mu | mouse　マウス |
| muDLL3 | mouse delta-like ligand 3　マウスデルタ様リガンド3 |
| muS757 | mouse surrogate molecule of AMG 757　AMG 757のマウスサロゲート分子 |
| n | number　数 |
| NEPC | neuroendocrine prostate cancer　神経内分泌前立腺癌 |
| NHP | nonhuman primate　非ヒト霊長類 |
| NK | natural killer　ナチュラルキラー |
| nM | nanomolar, nanomol/L　ナノモル |
| NOG | NOD.Cg-*Prkdc*$^{scid}$*Il2rg*$^{tm1Sug}$, nonobese-diabetic/severe combined immunodeficient IL-2 receptor γ (mice)　IL-2受容体γ鎖細胞外ドメイン欠損（マウス） |
| 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） |
| 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） |
| PI | propidium iodide　ヨウ化プロピジウム |
| pM | picomolar, picomol/L　ピコモル |
| qRT-PCR | quantitative reverse transcription polymerase chain reaction　定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 |
| RNA | ribonucleic acid　リボ核酸 |
| RNA-seq | RNA-sequencing　RNAシーケンシング |
| ROI | region of interest　関心領域 |
| scFc | single chain Fc　一本鎖Fc |
| scFv | single chain variable fragment　一本鎖可変領域フラグメント |
| SCLC | small cell lung cancer　小細胞肺癌 |
| SD | standard deviation　標準偏差 |
| SEM | standard error of the mean　平均値の標準誤差 |
| SHP-77 | human pulmonary small cell carcinoma cell line　ヒト小細胞肺癌細胞株 |
| SHP-77-Luc | SHP-77 SCLC cells expressing luciferase　ルシフェラーゼ発現SHP-77 SCLC細胞 |
| SPR | surface plasmon resonance　表面プラズモン共鳴 |
| TCR | T cell receptor　T細胞受容体 |
| Th1/Th2 | T helper cells 1/2　Tヘルパー細胞1/2 |
| TNF | tumor necrosis factor　腫瘍壊死因子 |

# 1. まとめ

小細胞肺癌（SCLC）は、米国における肺癌の約14%を占める侵襲性かつ難治性の疾患である（Cancer.Net, 2023）。日本でも進展型SCLCの一次治療として、プラチナーエトポシド化学療法剤との併用で抗プログラム細胞死リガンド1（PD-L1）阻害剤が、また米国では二次治療のための別の選択肢としてlurbinectedinが、それぞれ比較的最近承認された（Rudin et al, 2021）にもかかわらず、患者生存期間への影響は短期かつ軽度であり、全体の予後は依然として極めて不良である。新規の効果的なSCLC治療薬の開発への差し迫ったニーズがある。

デルタ様リガンド3（DLL3）は、SCLC及びその他の神経内分泌癌の細胞表面上に特異的に発現するNotchファミリーリガンドである（Saunders et al, 2015、Giffin et al, 2021）。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）。成人組織では、低レベルのDLL3が、脳、下垂体及び膵島細胞の細胞質内に検出される（123377試験）。DLL3は主に正常細胞内のゴルジ体に局在し、そこでNotch受容体の細胞表面への移行とそれに続くNotchシグナル伝達経路の活性化を抑制している（Chapman et al, 2011）。DLL3の発現は、神経内分泌細胞分化及びSCLC発生に関与する転写因子achaete-scuteホモログ1（ASCL1）により制御されている（Borromeo et al, 2016）。がん細胞ではDLL3発現が上昇してそのタンパク質が細胞表面に局在化し、SCLC患者の85%超でDLL3発現が認められる（Saunders et al, 2015、Giffin et al, 2021）。また、DLL3はSCLC患者から分離された腫瘍幹細胞にも発現している（Saunders et al, 2015）。

このようなDLL3の腫瘍選択的発現プロファイル並びに神経内分泌細胞及びがん発生における役割から、DLL3はSCLC及びその他の高グレード神経内分泌癌を治療するための有力な標的分子となる可能性がある。

AMG 757（一般名称：タルラタマブ）は、がん細胞表面上のDLL3及びT細胞表面上のT細胞受容体の構成要素である分化抗原群3のイプシロン鎖（CD3ε）に同時結合するよう設計された半減期延長（HLE）型の二重特異性T細胞誘導（BiTE®）分子である。AMG 757は一本鎖分子であり、DLL3に対する一本鎖可変領域フラグメント（scFv）に短いリンカーを介してCD3に対するscFvが繋がり、これら2つの結合アームがエフェクター機能をサイレンシングした免疫グロブリンG（IgG）由来の一本鎖結晶化フラグメント（scFc）領域のN末端に遺伝子的に融合している（TRPT-028632試験）。結晶化フラグメント（Fc）との融合は、二重特異性抗体を含むタンパク質製剤において半減期を延長するために確立されている（Kontermann, 2011）。Fc融合タンパク質の半減期延長は、分子量増大により、またIgGホメオスタシスに重要な役割を果たしている新生児Fc受容体（FcRn）とFcとの相互作用によりもたらされる。FcRnと結合したタンパク質は、一旦細胞内タンパク質リザーバーが形成され、ライソゾームによるタンパク質分解から保護される、その後再び細胞外空間へと再循環することにより半減期が大幅に延長する（Rath et al, 2015）。

AMG 757の作用機序はT細胞依存性の腫瘍細胞溶解である。AMG 757の薬理作用には標的細胞とT細胞（エフェクター細胞）への同時結合を必要とし、DLL3発現細胞に対する細胞傷害性$CD8^+$又は$CD4^+$ T細胞の特異的再指向によって媒介される。DLL3陽性標的細胞及びCD3陽性T細胞に対するAMG 757の二重特異性結合の結果として、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生じる。

AMG 757は、*in vitro*でのヒトT細胞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はカニクイザルのDLL3及びCD3とも交差反応する。AMG 757はカニクイザルT細胞も動員及び活性化し、各種ヒトSCLC細胞株への殺傷誘導の$EC_{50}$値はヒトT細胞と比較してわずかに弱い52～603 pMであった。同じヒト標的細胞に対し、ヒトT細胞の効力はカニクイザルT細胞と比較して最大で7.2倍であった。結合及び生物活性データにより、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ている（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細胞による腫瘍壊死因子（TNF）、インターフェロンガンマ（IFN-γ）及びインターロイキン2（IL-2）といった炎症性サイトカインの一過性の産生並びに細孔形成タンパク質パーフォリン及びタンパク分解酵素グランザイムBの放出による標的細胞アポトーシスの誘導が起こる（122717試験）。*In vitro*試験において、AMG 757活性化T細胞によるサイトカイン放出はコルチコステロイドにより減少し、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）。

ヒトSCLC細胞株を用いた原発性及び転移性SCLCのマウス異種移植モデルにおいて、ヒトT細胞移植後のAMG 757単剤投与により腫瘍消失を含む腫瘍縮小が見られた。AMG 757単剤投与により、同所性SHP-77-Luc肺腫瘍の縮小（R20150125、R20190093試験）及び同所性NCI-H82 SCLCモデルにおける転移性病巣の消失（R20190094試験）が誘導された。2つのSCLC患者由来異種移植（PDX）モデル（Giffin et al, 2021）及び1つのヒト神経内分泌前立腺癌（NEPC）細胞株異種移植モデル（154545試験、Chou et al, 2023）においても、ヒトT細胞移植後のAMG 757単剤投与により、腫瘍縮小が認められた。予想される作用機序に一致して、AMG 757の抗腫瘍活性に関連する腫瘍浸潤T細胞の数的増加及び活性化状態向上が認められた。

化学免疫療法はSCLC治療の主流であることから、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も評価した。*In vitro*でAMG 757を抗プログラム細胞死1（PD-1）抗体のAMG 404と併用したところ、PD-L1を過剰発現するよう遺伝子改変されたSCLC細胞株SHP-77に対するAMG 757誘導のT細胞性細胞傷害が強化された。同様に、*in vitro*でAMG 757にシスプラチン、カルボプラチン又はエトポシドを追加したところ、SCLC細胞株SHP-77及びCOR-L279に対する腫瘍細胞溶解が亢進し、より強力な$EC_{50}$値が得られた（155262試験）。NCI-H82異種移植モデルにおいてヒトT細胞移植後のAMG 757をカルボプラチン及びエトポシドと併用したところ、AMG 757あるいは化学療法剤単独と比較して、有意に強い抗腫瘍活性が見られた（156568試験）。

AMG 757について独立した安全性薬理試験は実施せず、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。

カニクイザルを用いた1カ月間反復投与毒性試験の心電図（ECG）検査において、AMG 757の500 µg/kg以上の用量で軽度の心拍数増加が見られ（初回投与後のDay 2に見られたが、曝露継続にもかかわらずDay 23には見られなかった）、それに関連してPR、RR及びQT間隔短縮が認められた（121424試験）。

3カ月間反復投与毒性試験でのAMG 757の忍容性は50及び4500 µg/kgの用量で良好であり、ECG、体温、呼吸数及び神経学的検査のパラメータにおいてAMG 757関連の変化は認められなかった（122516試験）。

米国食品医薬品局（FDA）の提言により、マウスの胚・胎児発生におけるDLL3/CD3結合BiTE®分子の影響を評価するため、AMG 757のマウスサロゲート分子であるmuS757を開発した。muS757はAMG 757と同一でマウスDLL3と交差反応する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AMG 757と同様にエフェクター機能をサイレンシングしたscFc領域を有する。muS757とAMG 757との同等性については、結合特性、*in vitro*生物活性、薬物動態（モジュール2.6.4）及びマウスを用いた反復投与毒性試験（モジュール2.6.6）で評価した。マウスを用いた1カ月間反復投与毒性試験でのmuS757の忍容性は良好であり、神経行動検査においてmuS757関連の変化は認められなかった。

非臨床薬理試験の一覧を表 1に示す。

表 1　AMG 757：非臨床薬理試験の一覧

| Study No. | Study Title | Status |
|---|---|---|
| **Primary Pharmacodynamics - *In vitro*** | | |
| TRPT-028632 | AMG 757: DL 8-A7 CC x I2C0-scFc_delGK Molecule History | Non-GLP Final |
| 122717 | In Vitro Pharmacology of AMG 757 | Non-GLP Final |
| 157053 | SPR Analysis of AMG 757 Interactions with Human Fc gamma RI, RIIA, RIIIA Receptors, FcRn and C1q | Non-GLP Final |
| R20140017 | Species-specific CD3 Binding of Mec14 × I2C | Non-GLP Final |
| 154479 | Generation and In Vitro Characterization of muS757 | Non-GLP Final |
| 157054 | SPR Analysis of muS757 Interactions with Mouse Fc gamma RI, RII, RIII Receptors and FcRn | Non-GLP Final |
| **Primary Pharmacodynamics - *In vivo*** | | |
| R20150125 | The Effect of AMG 757 Treatment on SHP-77 Tumors in a Female NOD/SCID Mouse Orthotopic Model of SCLC | Non-GLP Final |
| R20190093 | Evaluation of the Efficacy and Pharmacodynamic Effects of AMG 757 in the SHP-77 Orthotopic Model of SCLC in Female NSG Mice | Non-GLP Final |
| R20190094 | Evaluation of the Efficacy and Pharmacodynamic Effects of AMG 757 on T Cell Infiltration and Activation in an NCI-H82 Orthotopic Liver Metastasis Model of SCLC in Female NSG Mice | Non-GLP Final |
| 154545 | Evaluation of the efficacy of AMG 757 in the NCI-H660 Xenograft Model of Neuroendocrine Prostate Cancer (NEPC) | Non-GLP Final |
| 154546 | Evaluation of the Pharmacodynamic Effects of AMG 757 on T Cell Infiltration and Activation in an H660 Orthotopic Model of Neuroendocrine Prostate Cancer (NEPC) | Non-GLP Final |
| **Secondary Pharmacodynamics** | | |
| 123377 | DLL3 Immunohistochemistry: Expression in Normal Human and Cynomolgus Monkey Tissues and in Human Tumor Tissue Microarrays | Non-GLP Final |
| 123658 | mRNA Expression Assessment of DLL3 | Non-GLP Final |
| 124207 | XpressWay® Profile Report – DLL3: Non-isoform Specific | Non-GLP Final |
| 124208 | XpressWay® Profile Report – DLL3: Isoform Specific | Non-GLP Final |

表 1　AMG 757：非臨床薬理試験の一覧（続き）

| Study No. | Study Title | Status |
|---|---|---|
| **Secondary Pharmacodynamics (continued)** | | |
| 123875 | Measurement of DLL3 Transcript Levels in Cynomolgus Monkey Tissues Using Taqman Analysis | Non-GLP Final |
| 122642 | DLL3 mRNA Expression by *In Situ* Hybridization (ISH) in Normal Cynomolgus Monkey Tissues | Non-GLP Final |
| 123293 | DLL3 Protein Expression Analysis in Human and Cynomolgus Monkey Brain, Pituitary, Pancreas, and Liver by Capillary Electrophoresis/Western Blot | Non-GLP Final |
| 122111 | Platelet Activation Assay for DLL3 BiTE HLE: scFc CC (Lys-ve) | Non-GLP Final |
| **Safety Pharmacology** | | |
| 121423 | AMG 757: 10-Day Intravenous Toxicology Study in the Female Cynomolgus Monkey | Non-GLP Final |
| 121424 | AMG 757: 28-Day Intravenous Infusion Toxicology Study in the Cynomolgus Monkeys with a 28-Day Recovery Period | GLP Final |
| 122516 | AMG 757: 3-Month Intravenous Toxicology Study in the Cynomolgus Monkey | GLP Final |
| 153960 | muS757: 1-Month Intravenous Toxicology Study in the BALB/c Mouse | Non-GLP Final |
| **Pharmacodynamic Drug Interactions** | | |
| 122718 | Influence of Dexamethasone on AMG 757 Activity In Vitro | Non-GLP Final |
| R20190104 | Evaluation of TMG 757-mediated Induction of PD-1 Expression Following T Cell Redirected Lysis of Target Cells and Changes in Target Cell Killing Upon Combination of AMG 757 with an Anti-PD-1 Antibody (AMG 404) | Non-GLP Final |
| 155262 | In Vitro Combination Studies of AMG 757 with Etoposide, Cisplatin or Carboplatin | Non-GLP Final |
| 156568 | Evaluation of the Efficacy of AMG 757 Alone or in Combination with Carboplatin + Etoposide in the NCI-H82 Xenograft Model of Small Cell Lung Cancer (SCLC) | Non-GLP Final |

Page 2 of 2

AMG 757 = also designated as tarlatamab or DLL3 BiTE® HLE: scFc CC (Lys-ve); CD3 = cluster of differentiation 3; DLL3 = delta-like ligand 3; Fc = fragment crystallizable; FcRn = neonatal Fc receptor; HLE = half-life extended; ISH = *in situ* hybridization; mRNA = messenger ribonucleic acid; mu = murine; NEPC = neuroendocrine prostate cancer; NOD/SCID = non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (mice); NSG = non-obese diabetic/severe combined immunodeficient, interleukin 2 receptor gamma; PD-1 = programmed cell death protein 1; scFc = single chain Fc; SCLC = small cell lung cancer; SPR = surface plasmon resonance

# 2.　効力を裏付ける試験

## 2.1　AMG 757の*in vitro*作用

### 2.1.1　結合親和性

ヒト及びカニクイザルのDLL3に対するAMG 757の平衡解離定数（$K_D$）を、ヒトあるいはサルのDLL3を発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いたフローサイトメトリー及び非線形回帰解析により算出した（122717試験）。また、ヒト及びカニクイザルのCD3εに対するAMG 757の$K_D$を、表面プラズモン共鳴（SPR）解析により算出した（122717試験）。両動物種のDLL3及びCD3εに対するAMG 757の平均$K_D$値を表 2に示す。

定量的結合解析によりこれらの標的分子に対するAMG 757の$K_D$値は、ヒトとカニクイザルの間で同程度であり、差は10倍未満であった。カニクイザルはDLL3及びCD3εに対する結合に関係する非臨床安全性評価に適切な動物種であると考えられた。

表 2　ヒト及びカニクイザルのDLL3及びCD3εに対するAMG 757の結合親和性

| $K_D$ (nM) | Human | | | Cynomolgus monkey | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antigen | Sample I | Sample II | Mean* | Sample I | Sample II | Mean* |
| DLL3 | 0.68 | 0.60 | 0.64 | 0.49 | 0.51 | 0.50 |
| CD3ε | 14.6 | 15.1 | 14.9 | 11.8 | 12.2 | 12.0 |

CD3ε = cluster of differentiation 3, epsilon subunit; DLL3 = delta-like ligand 3; $K_D$ = equilibrium dissociation constant; nM = nanomolar

*Source: Study 122717*

### 2.1.2　FcRに対するAMG 757のscFc領域の結合特性

本試験では、ヒト各種Fcガンマ受容体（FcγRs；FcγRI/CD64、FcγRIIA/CD32a、FcγRIIIA/CD16a）、ヒトFcRn/ベータ(2)ミクログロブリン（B2M）ヘテロ二量体及びヒトC1qに対するAMG 757のscFc領域の結合能を、SPR解析により測定した（157053試験）。

IgG分子のFc領域グリカン組成の変化はFcγRに対する結合親和性に影響を及ぼすことが示されている。脱グリコシル化は、Fc領域のFcγRI/CD64への親和性を劇的に低下させ、FcγRIIA/CD32a及びFcγRIIIA/CD16aへの結合を消失させた（Liu, 2015）。AMG 757のscFc領域では、天然IgG分子のFc領域の重鎖におけるAsn297に相当する位置のN-グリコシル化部位が除去されている。

AMG 757はヒトのFcγRIIA/CD32a及びFcγRIIIA/CD16aとのいかなる相互作用も示さなかったが、FcγRI/CD64には低い親和性で結合した。このAMG 757とFcγRI/CD64との相互作用の特徴は極めて速やかな結合及び解離速度であり、算出された$K_D$値の297 nMは、コントロールIgGとしたモノクローナル抗体リツキシマブの値の約7000分の1であった（157053試験）。

FcγRとの結合とは対照的に、Fc領域のグリカン組成はIgG分子のFcRn/B2Mとの結合には影響せず、脱グリコシル化IgG分子のFcRnへの結合親和性はNグリコシル化分子と同程度である（Liu, 2015）。AMG 757はヒトFcRn/B2Mヘテロ二量体とpH依存的な相互作用を示し、pH = 6.0での$K_D$値は444 nMであった。この値はリツキシマブ（345 nM）と同程度であった（157053試験）。これらの値は、同じアッセイを用いた公表ヒトIgG1データと一致していた（Abdiche et al, 2015）。

これらのデータにより、AMG 757のscFc領域はFcγRI/CD64に対して低親和性での結合能を有するが、FcγRIIA/CD32a、FcγRIIIA/CD16a及びC1qとは相互作用を示さないため、抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）といったエフェクター機能を媒介しないと考えられる。AMG 757は半減期延長のために重要と考えられるFcRnとの結合親和性はコントロールIgGと同等であった（157053試験）。

### 2.1.3　AMG 757の結合特異性

ヒト及びカニクイザルのDLL3に対するAMG 757の結合特異性を、ヒトあるいはカニクイザルのDLL3を発現する遺伝子組換えCHO細胞、また、対照とした非遺伝子導入CHO細胞に対する結合（フローサイトメトリー）により検証した。AMG 757は、ヒトDLL3発現CHO細胞（CHO-huDLL3）

及びカニクイザルDLL3発現CHO細胞（CHO-cyDLL3）に特異的に結合したが、非遺伝子導入細胞とは結合しなかった（122717試験）。なお、AMG 757のDLL3結合アームはマウスDLL3に対しても交差反応した（2.2項）。

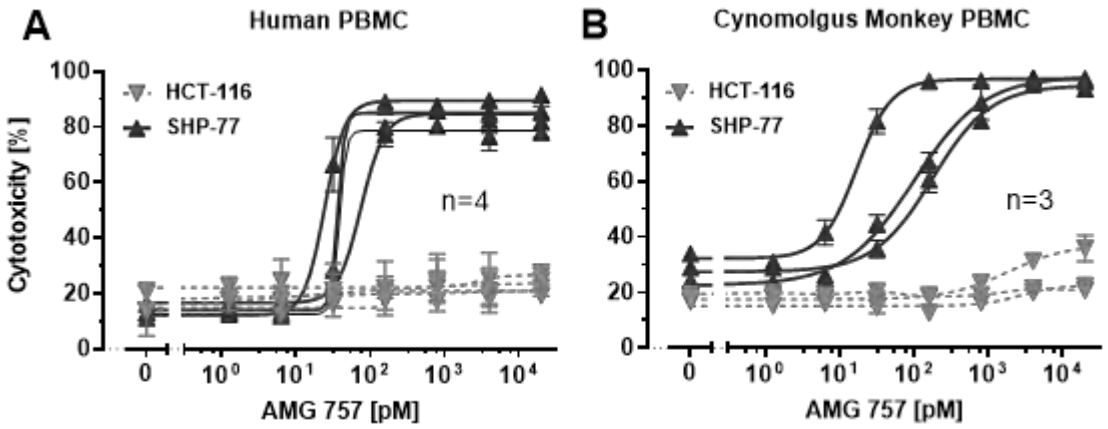
AMG757のCD3結合アームはヒト及びカニクイザルのT細胞と特異的に結合するが、ビーグル犬、ミニブタ、ウサギ、ラット及びマウスのCD3とは交差反応しなかった（R20140017試験）。

### 2.1.4 AMG 757誘導によるT細胞再指向性細胞溶解

ヒトあるいはカニクイザルT細胞（エフェクター細胞）とDLL3発現ヒトSCLC細胞株SHP-77（標的細胞）との共培養において、AMG 757誘導のT細胞による再指向性細胞溶解を検討した。以下T細胞としては特にことわらない限り、健常人あるいはカニクイザルドナーから採取した末梢血単核細胞（PBMC）を用いた。細胞溶解の指標としてはヨウ化プロピディウム（PI）の取込みを、フローサイトメトリーにより測定した。

AMG 757は、これらの共培養において濃度依存的な細胞溶解を誘導した（122717試験、図 1）。対照的にT細胞とDLL3陰性のHCT-116細胞との共培養では、高濃度のAMG 757においても細胞溶解が認められなかった（図 1）。このことは、AMG 757の活性発現がDLL3発現細胞に対し特異的であることを示している（122717試験）。

図 1 AMG 757の機能的特異性



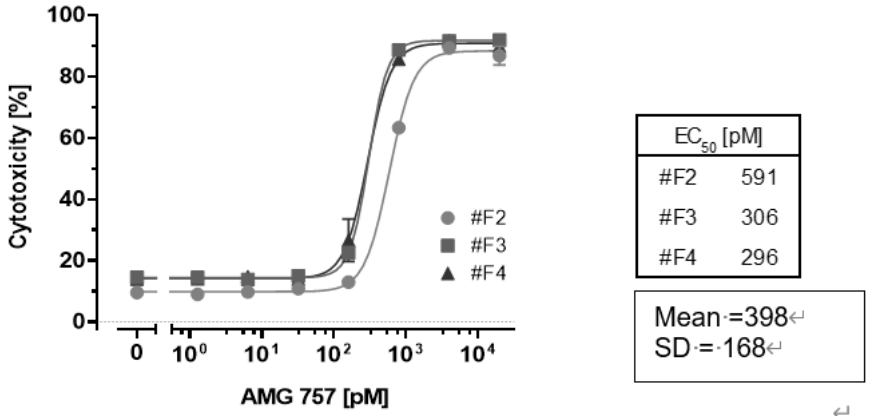

HCT-116 = human colon carcinoma cell line; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; PI = propidium iodide; pM = picomolar; SD = standard deviation; SHP-77 = human pulmonary small cell carcinoma cell line

DLL3-negative HCT-116 and DLL3-positive SHP-77 cells were co-cultivated at a ratio of 5:1 with human (n = 4) or cynomolgus monkey (n = 3) PBMC of healthy donors and increasing concentrations of AMG 757. Cell lysis was measured by PI uptake using flow cytometry after 48 hours. Each data point represents the mean of duplicate wells. Error bars represent the SD.

*Source: Study 122717*

AMG 757はカニクイザルT細胞のCHO-cyDLL3に対する再指向性細胞溶解も用量依存的に誘導したことから（図 2）、カニクイザルのDLL3及びCD3に対するAMG 757の交差反応性が支持された。

図 2　AMG 757誘導のカニクイザルT細胞によるカニクイザルDLL3発現細胞に対する再指向性細胞溶解




CHO = Chinese hamster ovary (cells); CHO-cyDLL3 = CHO cells transfected with cynomolgus DLL3; DLL3 = delta-like ligand 3; $EC_{50}$ = half-maximal effective concentration; E:T = effector-to-target; F = female; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; PI = propidium iodide; pM = picomolar; SD = standard deviation

CHO-cyDLL3 cells were co-cultured with cynomolgus monkey PBMC from three different female donors (#F2 to #F4) at an E:T cell ratio of 5:1 and increasing concentrations of AMG 757 for 48 hours. Target cell lysis was monitored by flow cytometric determination of PI uptake. Each data point represents the mean of duplicate measurements. Error bars represent the SD

*Source: Study 122717*

DLL3発現各種ヒトSLCL細胞株を標的細胞とした、AMG 757誘導によるヒトあるいはカニクイザルのT細胞（PBMC）による再指向性細胞溶解を評価した（122717試験）。各SCLC細胞株の細胞溶解を誘導するAMG 757の$EC_{50}$値は、ヒトT細胞では、32～447 pM（表 3）であったのに対し、カニクイザルT細胞では、これより若干弱い52～603 pMであった（表 3）。

表 3　AMG 757誘導のヒト及びカニクイザルT細胞による再指向性細胞溶解の$EC_{50}$値

| | $EC_{50}$ Cytotoxicity [pM]; 48 hours | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Human PBMC | | | | Cynomolgus Monkey PBMC | | | |
| Target Cells | Mean | ± | SD | N | Mean | ± | SD | N |
| COR-L279 | 57 | ± | 34 | 12 | 67 | ± | 39 | 3 |
| DMS 79 | 33 | ± | 27 | 10 | 52 | ± | 26 | 3 |
| H-2171 | 161 | ± | 127 | 9 | 603 | ± | 585 | 4 |
| NCI-H82 | 37 | ± | 31 | 6 | — | — | — | — |
| NCI-H889 | 447 | ± | 314 | 5 | — | — | — | — |
| SHP-77 | 32 | ± | 24 | 16 | 231 | ± | 283 | 3 |

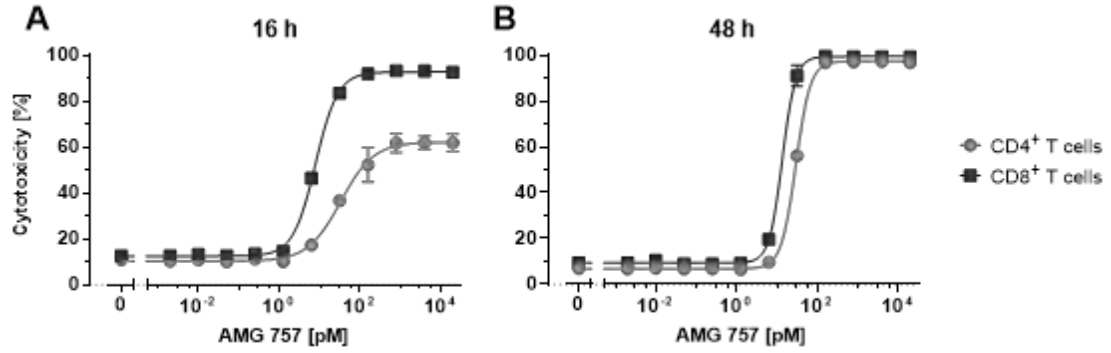
— = not done; $EC_{50}$ = concentration required for half-maximal effect; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; pM = picomolar; SD = standard deviation

*Source: Study 122717*

同じヒト標的細胞に対しては、ヒトT細胞による細胞溶解の誘導は、カニクイザルT細胞による細胞溶解の誘導に比べ1.2～最大7.2倍強力であった。一部の細胞株でのAMG 757誘導による標的細胞溶解の程度及び効力（$EC_{50}$値）は、ヒトとカニクイザルのT細胞間及び同種のドナーの個体間でばらつきが認められた。このばらつきは、個々のドナーから調製したT細胞（エフェクター細胞）の細胞傷害能の差、また標的細胞の細胞表面上のDLL3発現量の違いにも起因する可能性がある。例えば、CD33 BiTE®分子AMG 330では、標的発現と細胞傷害の$EC_{50}$値との定量的相関が認められ、CD33発現レベルが増加するとより強力な$EC_{50}$値が得られた（Laszlo et al, 2014）。

T細胞は、T細胞受容体（TCR）／CD3複合体によるがん抗原ペプチドー主要組織適合性複合体（MHC）の認識機構の違いによって、CD8+T細胞（MHCクラスI拘束性）とCD4+ T細胞（MHCクラスII拘束性）に細分化される。AMG 757により誘導されたT細胞再指向性細胞溶解全体に対する両T細胞サブセットの寄与を検討するために、PBMCより分離したCD8+ T細胞とCD4+ T細胞をそれぞれSHP-77細胞と共培養し、AMG 757による細胞溶解誘導を評価した（122717試験）。CD8+ T細胞及びCD4+ T細胞は、それぞれ*in vitro*でAMG 757誘導によりSHP-77細胞に対して溶解を起こした（図 3A）。最大細胞溶解は、共培養16時間後ではCD8+ T細胞のほうがCD4+ T細胞よりも高レベルであったが（図 3A）、48時間後にはどちらもほぼ100%になった（図 3B）。これらのデータは、*in vitro*でのAMG 757を介した細胞傷害には、CD8+及びCD4+ T細胞が同程度に寄与することを示している。

**図 3　AMG 757誘導のヒトCD4+及びCD8+ T細胞による再指向性標的細胞溶解**




CD4+ = surface antigen on T helper cells; CD8+ = surface antigen on cytotoxic T cells and natural killer cells; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; PI = propidium iodide; pM = picomolar; SD = standard deviation; SHP-77 = human pulmonary small cell carcinoma cell line

SHP-77 cells were co-cultivated at a ratio of 5:1 with human CD4+ or CD8+ T cells, enriched from human PBMC of 1 healthy donor (purity >98%), and increasing concentrations of AMG 757. SHP-77 cell lysis was measured by PI uptake using flow cytometry after 16 and 48 hours. Each data point represents the mean of duplicate wells. Error bars represent the SD.

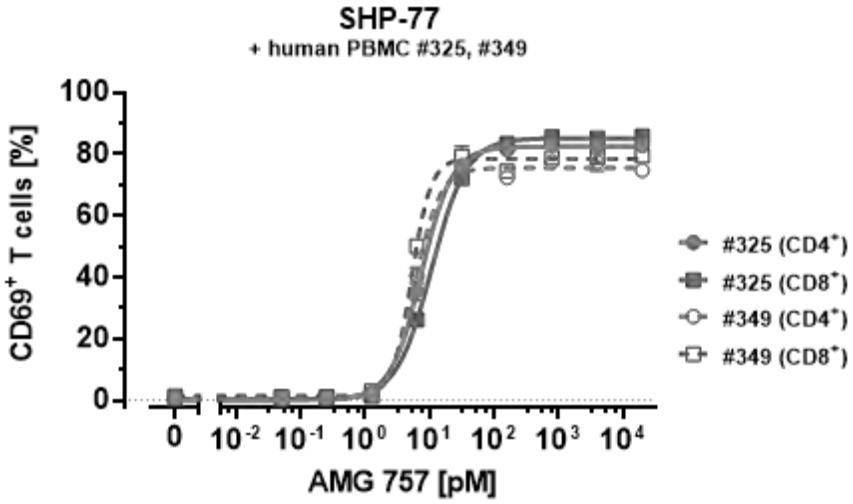
*Source: Study 122717*

## 2.1.5　T細胞に対するAMG 757の作用

AMG 757の腫瘍細胞上のDLL3及びT細胞上TCR/CD3複合体中のCD3εに対する二重特異性結合により、T細胞のTCRによるがん抗原ペプチドーMHCの抗原特異的認識による変化と類似した活性化が誘導されると考えられる。本試験では、AMG 757によるT細胞上の主要な活性化マーカー分子の発現上昇及びT細胞からの一過性のサイトカイン産生を検討した（122717試験）。

DLL3発現SHP-77細胞とヒトT細胞（PBMC）との共培養において、AMG 757は、CD69（図 4）、CD25、PD-1及びPD-L1を含むT細胞活性化マーカーの用量依存的な発現上昇を誘導した（122717試験）。また、AMG 757は、CHO-cyDLL3細胞の存在下で、カニクイザルT細胞上のCD25及びCD69の用量依存的な発現上昇を誘導した（図 5）。

図 4　AMG 757により誘導されたヒトT細胞の活性化

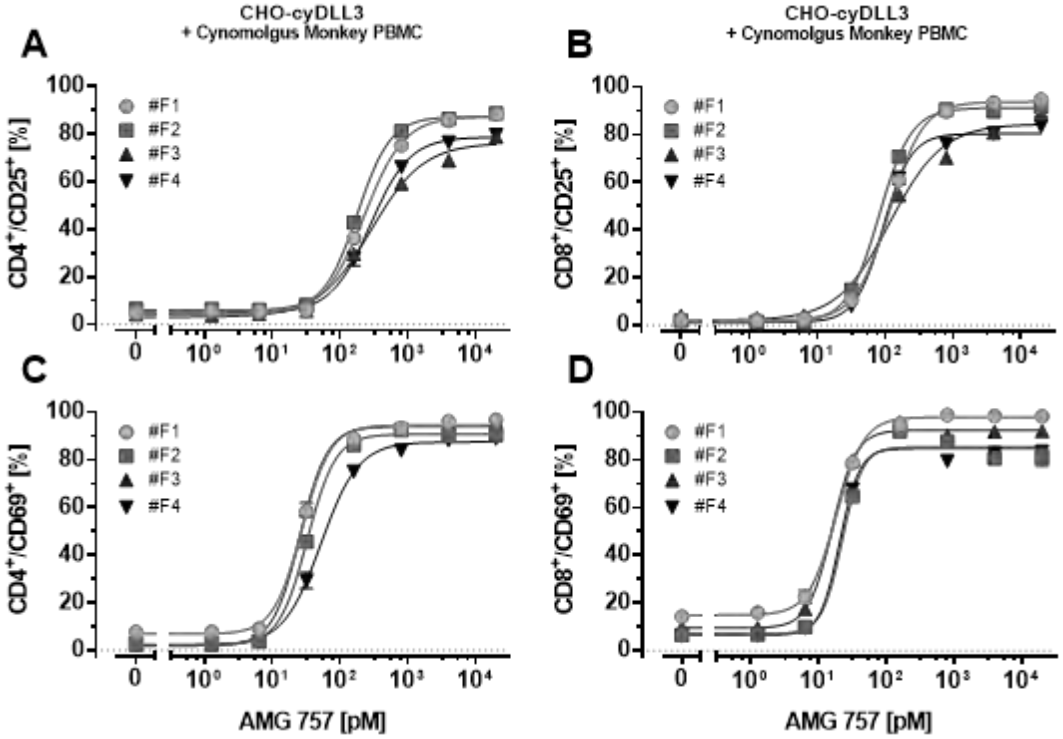



$CD4^+$ = surface antigen on T helper cells; $CD8^+$ = surface antigen on cytotoxic T cells and natural killer cells; $CD69^+$ = early T cell activation antigen; E:T = effector-to-target; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; pM = picomolar; SD = standard deviation; SHP-77 = human pulmonary small cell carcinoma cell line

SHP-77 cells were co-cultivated with human PBMC at an E:T cell ratio of 5:1 with increasing concentrations of AMG 757 for 48 hours. Surface expression of CD69 on $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells was determined by flow cytometry using antigen-specific fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. Each data point represents the mean of duplicate measurements. Error bars represent the SD.

*Source: Study 122717*

図 5　AMG 757により誘導されたカニクイザルT細胞の活性化




$CD4^+$ = surface antigen on T helper cells; $CD8^+$ = surface antigen on cytotoxic T cells and natural killer cells; $CD25^+$ = T cell activation antigen; $CD69^+$ = early T cell activation antigen; CHO = Chinese hamster ovary cells; CHO-cyDLL3 = CHO cells transfected with cynomolgus DLL3; DLL3 = delta-like ligand 3; E:T = effector-to-target; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; pM = picomolar; SD = standard deviation

CHO-cyDLL3 cells were co-cultured with cynomolgus monkey PBMC (n = 4) at an E:T cell ratio of 5:1 and increasing concentrations of AMG 757 for 48 hours. Surface expression of CD25 (A, B) and CD69 (C, D) on $CD4^+$ (A, C) and $CD8^+$ T cells (B, D) was detected by flow cytometry using antigen-specific fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. Each data point represents the mean of duplicate measurements. Error bars represent the SD.

*Source: Study 122717*

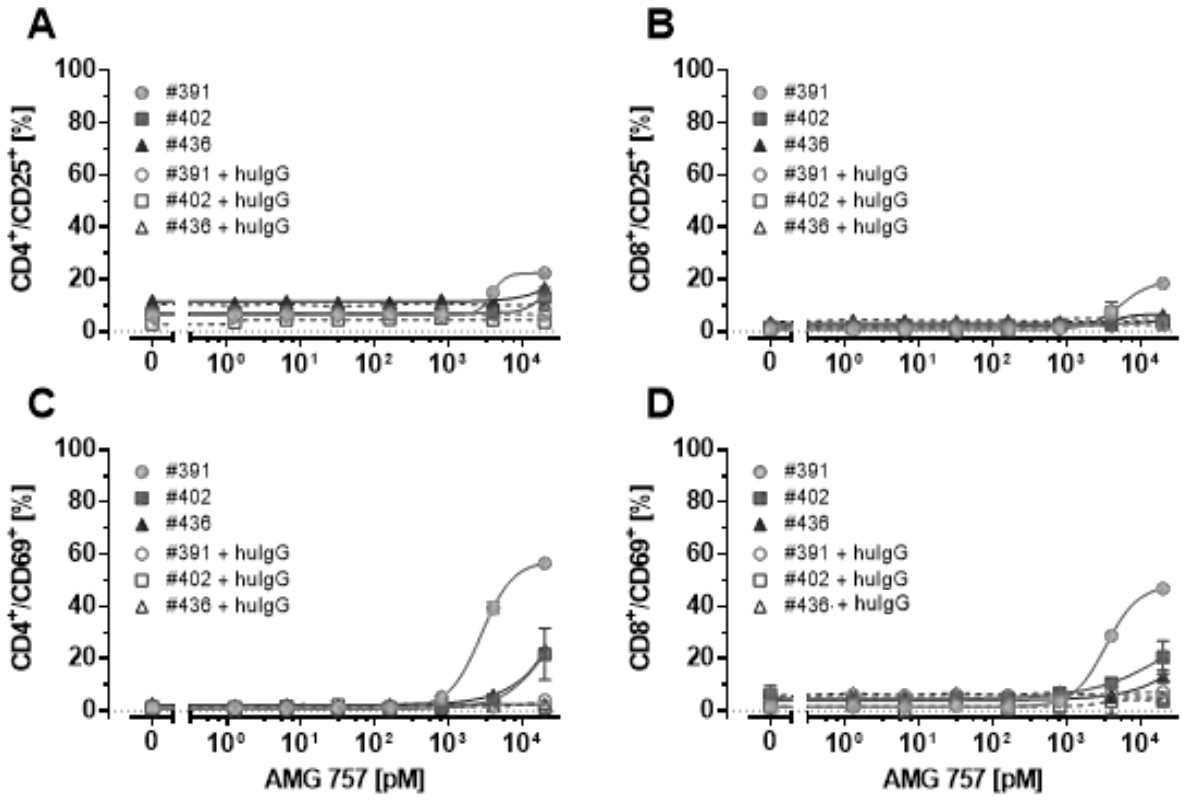
AMG 757により誘導されたT細胞活性化の特異性を検討するために、10 mg/mLのヒトIgG（ヒト及びカニクイザルの血中における生理的IgG濃度に相当する値）の非存在下又は存在下、標的細胞非存在下あるいはDLL3陰性HCT-116細胞存在下で48時間培養したT細胞における活性化マーカーCD69あるいはCD25の発現を解析した（Biagini et al, 1988、Gonzalez-Quintela et al, 2008、122717試験）。

標的細胞の非存在下で、高濃度のAMG 757により、ヒトT細胞上のCD69（図 6）並びにカニクイザルT細胞上のCD25及びCD69（図 7）の発現上昇が誘導された。これらの活性化マーカーを誘導するAMG 757の濃度では、T細胞ドナーの個体間のばらつき、及びT細胞の種による違いが認められた。これらAMG 757による標的非依存のT細胞の活性化は、生理的濃度のヒトIgGの存在下で完全に消失した（図 6、図 7）。また、AMG 757により誘導された標的非依存のヒトT細胞上のCD69発現上昇は、抗ヒトCD64（FcγRI）中和抗体の存在下で完全に抑制された（122717試験）。なお同様の試験において、標的細胞としてDLL3陰性HCT-116細胞を加えた場合でも、標的細胞非存在下と同じ結果が得られた（122717試験）。

これらのデータは、AMG 757のscFc領域のCD64（FcγRI）に対する低い親和性での結合（2.1.2項）が、高濃度のAMG 757による標的非依存的なT細胞活性化マーカーの発現上昇を誘導するのに十分である可能性を示している。しかし、いずれにしてもこのような非特異的活性化は、*in vivo*に

おいては、生理的濃度のIgGがAMG 757 scFc領域のFcγRへの結合を競合阻害することから考慮する必要はないと考えられる。実際この仮説に一致して、カニクイザルの毒性試験では、AMG 757の4500 µg/kgまでの用量での投与後に、T細胞活性化マーカーCD25及びCD69の変化は認められなかった（121424試験）。

図 6　DLL3発現標的細胞の非存在下でのヒトT細胞に対するAMG 757の影響

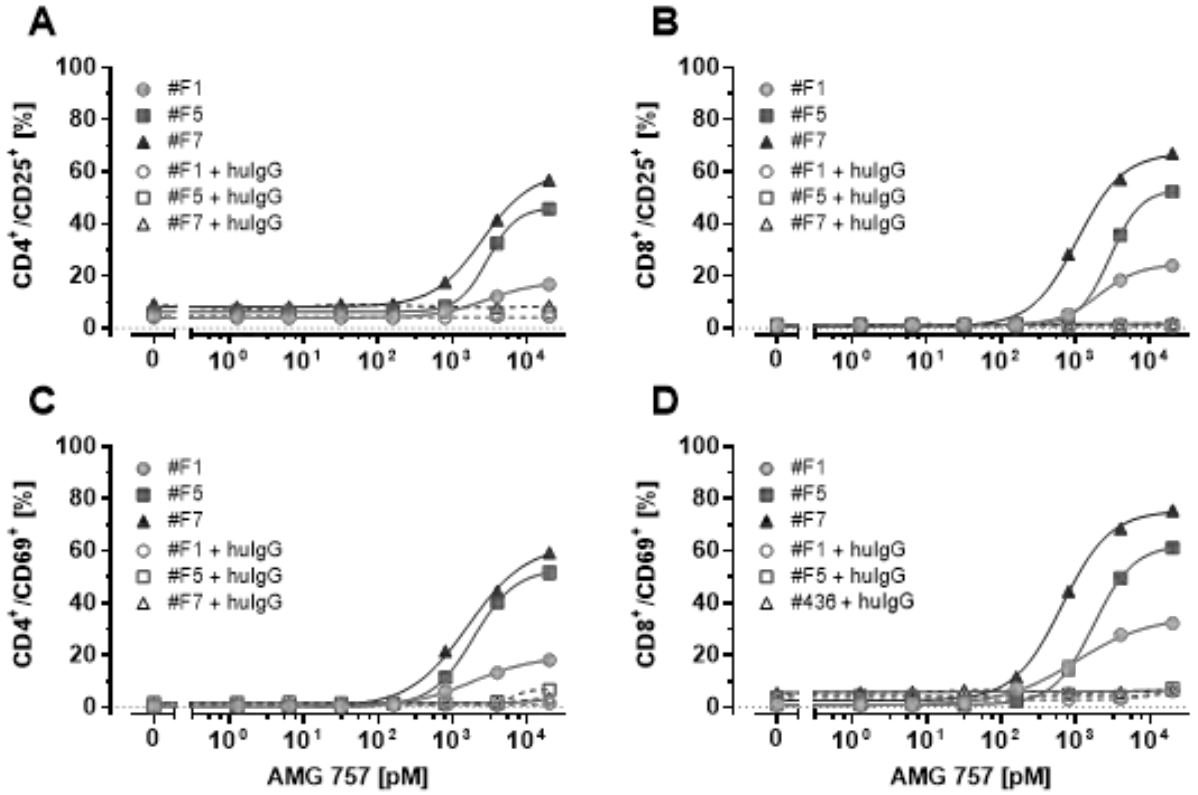



$CD4^+$ = surface antigen on T helper cells; $CD8^+$ = surface antigen on cytotoxic T cells and natural killer (NK) cells; $CD25^+$ = IL-2 receptor α chain, activation marker on T, B, and NK cells; $CD69^+$ = early T cell activation antigen; DLL3 = delta-like ligand 3; huIgG = human immunoglobulin G; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; pM = picomolar; SD = standard deviation

Human PBMC of 3 different donors were cultivated with increasing concentrations AMG 757 in presence or absence of a physiological concentration of human IgG (10 mg/mL) for 48 hours. Surface expression of CD25 (A, B) and CD69 (C, D) on $CD4^+$ (A, C) and $CD8^+$ T cells (B, D) was detected by flow cytometry using antigen-specific fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. Each data point represents the mean of duplicate measurements. Error bars represent the SD.

*Source: Study 122717*

図 7　DLL3発現細胞非存在下でのカニクイザルT細胞に対するAMG 757の影響




$CD4^+$ = surface antigen on T helper cells; $CD8^+$ = surface antigen on cytotoxic T cells and natural killer (NK) cells; $CD25^+$ = IL-2 receptor α chain, activation marker on T, B, and NK cells; $CD69^+$ = early T cell activation antigen; DLL3 = delta-like ligand 3; huIgG = human immunoglobulin G; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; pM = picomolar; SD = standard deviation

Cynomolgus monkey PBMC of 3 different donors were cultivated with increasing concentrations AMG 757 in presence or absence of a physiological concentration of human IgG (10 mg/mL) for 48 hours. Surface expression of CD25 (A, B) and CD69 (C, D) on $CD4^+$ (A, C) and $CD8^+$ T cells (B, D) was detected by flow cytometry using antigen-specific fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. Each data point represents the mean of duplicate measurements. Error bars represent the SD.

*Source: Study 122717*

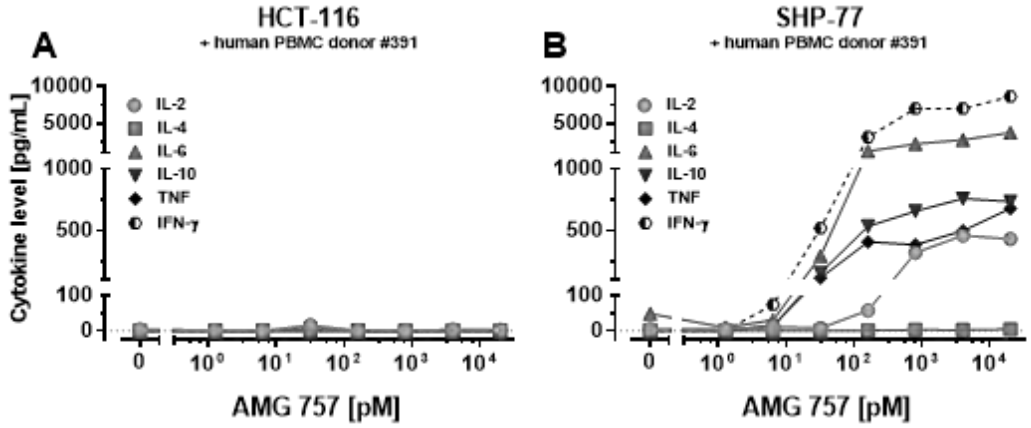
活性化細胞傷害性T細胞は、TCR活性化結合後に炎症性サイトカインを分泌する。AMG 757によるサイトカイン放出促進作用を、ヒトあるいはカニクイザルのT細胞（PBMC）と標的細胞の共培養で検討した（122717試験）。DLL3陽性SHP-77細胞の存在下で、AMG 757により誘導されたヒトT細胞による標的細胞溶解に伴って、培養液中にIFN-γ、IL-6、IL-10、TNF及びIL-2のAMG 757濃度依存的な遊離が認められた（図 8B）。ヒトT細胞とDLL3陰性HCT-116細胞との共培養では、AMG 757によるサイトカイン遊離は検出されなかったことから、このサイトカイン遊離はDLL3発現細胞との共培養に極めて特異的であった（図 8A、122717試験）。

DLL3陽性H-2171細胞とカニクイザルT細胞の共培養の培養液中に、AMG 757はIFN-γ、IL-6及びTNFの遊離を誘導した（図 9）。ヒトとカニクイザルのT細胞からそれぞれ遊離されたサイトカインの濃度には違いがあった（このことはT細胞が異なるドナーから得られたため予想された）ものの、IFN-γ、IL-6及びTNFは全例で検出された。

標的細胞非存在下、AMG 757によるカニクイザルT細胞（PBMC）からのサイトカイン遊離誘導を、10 mg/mLのヒトIgGの非存在下及び存在下で評価した（Biagini et al, 1988、Gonzalez-Quintela

et al, 2008、122717試験）。高濃度のAMG 757により標的非依存的IL-6、TNF及びIFN-γの放出が誘導されたが、この作用は生理的な濃度のヒトIgGの添加により完全に阻害された（図 10）。上述したように（2.1.2項）、*in vitro*において、高濃度のAMG 757の存在下で、AMG 757のscFc領域がCD64（FcγRI）に対して低親和性の結合をし、また同時にCD3への結合により、サイトカイン遊離を含むT細胞活性化が誘導された可能性がある（図 10）。しかし、これは生理的濃度のヒトIgG（10 mg/mL）により完全に抑制されたことから、*in vivo*においては考慮する必要はないと考えられる。

図 8　AMG 757により誘導されたヒトサイトカインの遊離

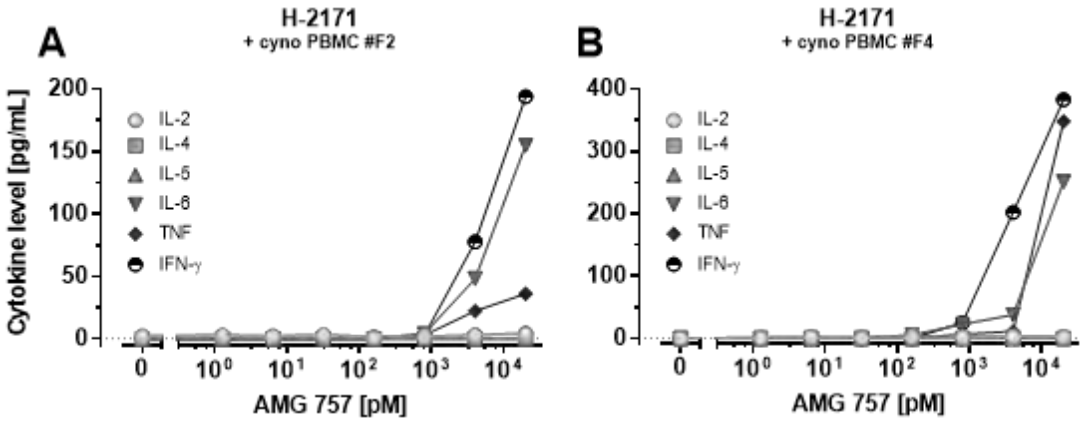



BD = Becton Dickinson; CBA = cytometric bead array; DLL3 = delta-like ligand 3; E:T = effector-to-target; HCT-116 = human colon carcinoma cell line; IFN-γ = interferon gamma; IL = interleukin; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; pM = picomolar; SHP-77 = human pulmonary small cell carcinoma cell line; Th1/Th2 = T helper cells 1/2; TNF = tumor necrosis factor

Human PBMC of 1 healthy donor were co-cultured with either target-negative HCT-116 (A) or DLL3-expressing SHP-77 (B) at an E:T cell ratio of 5:1 and increasing concentrations of AMG 757 for 48 hours. Cytokine concentrations in the cell culture supernatants were measured with the human BD CBA Th1/Th2 kit.

*Source: Study 122717*

図 9　AMG 757により誘導されたカニクイザルサイトカインの遊離

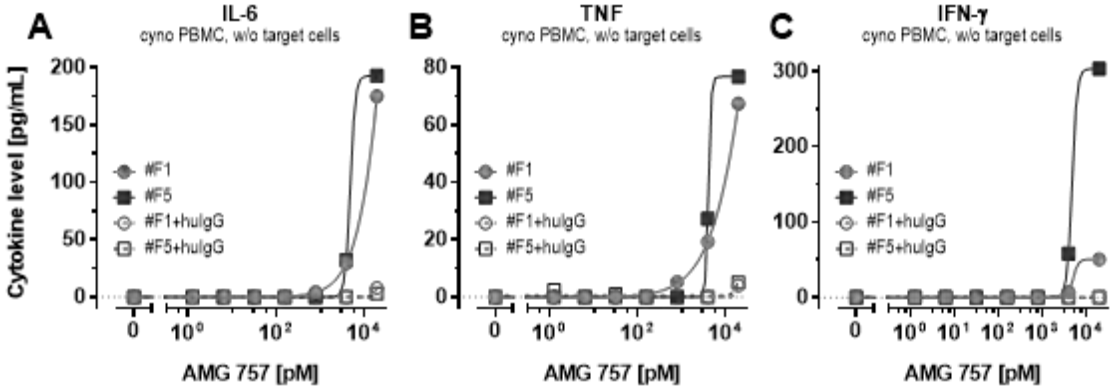



BD = Becton Dickinson; CBA = cytometric bead array; E:T = effector-to-target; IFN-γ = interferon gamma; IL = interleukin; NHP = nonhuman primate; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; pM = picomolar; Th1/Th2 = T helper cells 1/2; TNF = tumor necrosis factor

Cynomolgus PBMC (n = 2) were co-cultivated with H-2171 tumor cells at an E:T cell ratio of 5:1 and increasing AMG 757 concentrations for 48 hours. Cytokine concentrations in the cell culture supernatants were measured with the NHP BD CBA Th1/Th2 kit.

*Source: Study 122717*

図 10　AMG 757により誘導されたカニクイザルT細胞によるサイトカイン遊離の特異性




BD = Becton Dickinson; CBA = cytometric bead array; IFN-γ = interferon gamma; huIgG = human immunoglobulin G; IL-6 = interleukin 6; NHP = nonhuman primate; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; pM = picomolar; Th1/Th2 = T helper cells 1/2; TNF = tumor necrosis factor; w/o = without

Cynomolgus monkey PBMC of 2 donors were cultured with increasing concentrations of AMG 757, without or with human IgG (10 mg/mL) for 48 hours. Cytokine concentrations in the cell culture supernatants were measured with the NHP BD CBA Th1/Th2 kit.

*Source: Study 122717*

## 2.2　AMG 757のサロゲート分子であるmuS757を用いたマウスにおける胚・胎児発生毒性評価

ヒトにのみ薬理活性を示すバイオ医薬品の一部については、サロゲート分子が作製され、非臨床安全性評価に使用されている（Bussiere et al, 2009）。さらに、バイオ医薬品がカニクイザルで活性を示す場合であっても、カニクイザルの使用を減らすため、生殖発生毒性（DART）試験でサロゲートの使用が考慮されることがある（Martin et al, 2009）。

AMG 757のさらなる開発をサポートするため、マウスのDLL3/CD3εを標的とするBiTE®分子のマウスを用いた非臨床安全性試験を可能にする目的でmuS757を開発した。muS757は、マウスDLL3と交差反応するAMG 757のDLL3結合アーム及びマウスCD3εに特異的なCD3ε結合アームをマウスscFc領域のN末端に遺伝子融合させたBiTE®分子である。

### 2.2.1 AMG 757のマウスサロゲート分子であるmuS757の作製

AMG 757のDLL3に対するscFv（結合アーム）がヒト、カニクイザル及びマウスのDLL3に結合するのに対し、CD3結合アーム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。

AMG 757のDLL3結合アームにはマウスのDLL3との交差反応性があるため、muS757の作製に当たっては、このAMG 757のDLL3結合アームを利用し、これに申請者が独自に開発したマウスCD3εを特異的に認識するCD3結合アームがマウスscFc領域のN末端に繋がったものを遺伝子融合させた。

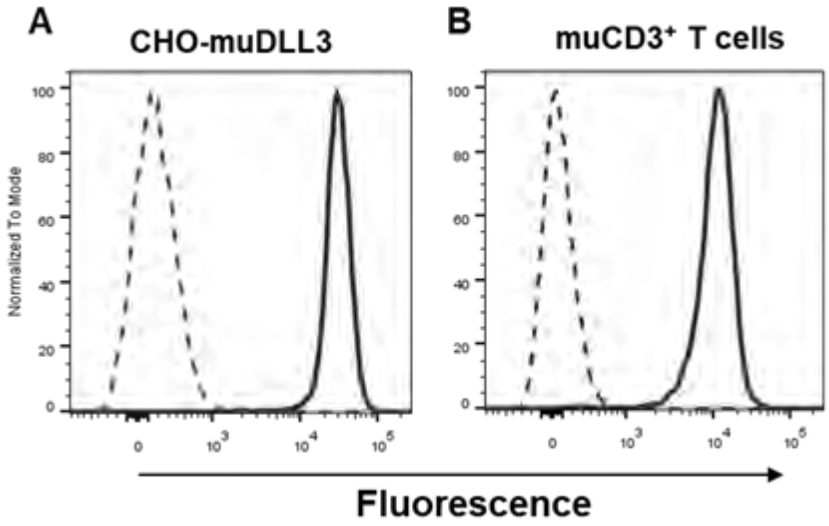
AMG 757では、scFc領域における二つのFcのNグリコシル化を防ぐため、アスパラギンがグリシンに変換されており、これによりヒトにおけるFcγR誘導型エフェクター機能が最小化又は障害されている（Liu et al, 2017、Jefferis, 2009）。muS757においても同様にFcγR誘導型エフェクター機能を消失させるため、マウスscFc領域にもこの変換を適用した。

### 2.2.2 muS757の結合特性

#### 2.2.2.1 マウスのDLL3及びCD3に対するmuS757の結合

マウスのDLL3及びCD3に対するmuS757の結合を、フローサイトメトリーにより評価した。細胞に結合したmuS757を、アロフィコシアニン（APC）に結合させた抗マウスIgG二次抗体により検出した。muS757はマウスDLL3を発現する組換えCHO細胞（mCHO-muDLL3）とマウスCD3εを発現するマウスCD3$^+$ T細胞に結合した（図 11）。

図 11　マウスのDLL3及びCD3に対するmuS757の結合




APC = allophycocyanin; CD3 = marker on T cells; CHO = Chinese hamster ovary; DLL3 = delta-like ligand 3; IgG = immunoglobulin G; µg = microgram; min = minutes; mL = milliliter; muDLL3 = mouse delta-like ligand 3; muS757 = mouse surrogate of AMG 757

CHO-muDLL3 cells (A) or mouse $CD3^+$ T cells (B) were incubated with muS757 (10 µg/mL) for up to 90 min at 4°C. Cell-bound muS757 was detected by flow cytometry after incubation with an APC-conjugated anti-mouse IgG antibody (solid line). Cells which were stained only with the secondary antibody served as a negative control (dashed line).

*Source: Study 154479*

### 2.2.2.2　マウスFcγRI、II、III及びIV並びにFcRnに対するmuS757の結合親和性

SPR解析を用いて、マウスFcγRI、II、III及びIV並びに新生児Fc受容体（FcRn；FCGRT/B2Mヘテロ二量体）に対するmuS757のscFc領域の結合を評価した。muS757はマウスのFcγRI/CD64及びFcγRIV/CD16-2に結合しなかった。muS757は、マウスFcγRIIB/CD32b（外挿$K_D$：18.2 µM）及びマウスFcγRIII/CD16（外挿$K_D$：34.3 µM）に対して、マウスコントロールIgG1と比較して、一過性かつ低親和性の結合を示した。これらの$K_D$値は、コントロールIgG1の$K_D$値のそれぞれ約93倍及び140倍であった（157054試験）。

muS757のFcRnに対する一過性かつ低親和性の結合が認められ、これは、scFcを付加したBiTE®分子に一般的な特徴である。muS757とマウスFcRn/B2Mヘテロ二量体受容体との相互作用はpH依存的であり、pH 6.0での$K_D$はコントロールIgGとほぼ同じ453 nMであった（157054試験）。

### 2.2.2.3　ヒトDLL3、マウスDLL3及びマウスCD3に対するmuS757の結合親和性

ヒト及びマウスのDLL3に対するmuS757の$K_D$を、ヒトあるいはマウスのDLL3を発現する組換えCHO細胞に対する結合（フローサイトメトリー）の非線形回帰解析により求めた。ヒト及びマウスのDLL3に対するmuS757の$K_D$値（それぞれ1.08及び0.51 nM）は、ヒトDLL3に対するAMG 757の$K_D$値（0.64 nM；表 4）と同程度であった。

マウスCD3に対するmuS757の$K_D$値を、マウス$CD3^+$ T細胞に対する結合（フローサイトメトリー）の非線形回帰解析により求めた。マウスCD3に対するmuS757の$K_D$値（19.58 nM）は、ヒトCD3に対するAMG 757の$K_D$値（14.9 nM；表 4）と同程度であった。

まとめると、マウスDLL3及びマウスCD3に対してサロゲート分子muS757が示す結合親和性は、ヒトDLL3及びヒトCD3に対してAMG 757が示す結合親和性と同程度であった。

表 4　muS757及びAMG 757の結合親和性

| | | | |
|---|---|---|---|
| **muS757** | | | |
| Antigen | Human $K_D$ [nM] Mean ± SD | Murine $K_D$ [nM] Mean ± SD | Analytical Method |
| DLL3 | 1.08 ± 0.24 | 0.51 ± 0.14 | cell-based (nonlinear regression) |
| CD3ε | NA | 19.58 ± 1.28 | cell-based (nonlinear regression) |
| **AMG 757** | | | |
| | | Mean $K_D$ [nM] (N = 2) | |
| DLL3 | 0.64 | n.d. | cell-based (nonlinear regression) |
| CD3ε | 14.9 | NA | SPR analysis |

CD3ε = cluster of differentiation 3, epsilon subunit; DLL3 = delta-like ligand 3; $K_D$ = equilibrium dissociation constant; muS757 = mouse surrogate of AMG 757; NA = not applicable; n.d. = not determined; nM = nanomolar; SD = standard deviation; SPR = surface plasmon resonance

*Source: AMG 757: Study 122717, muS757: Study 154479*

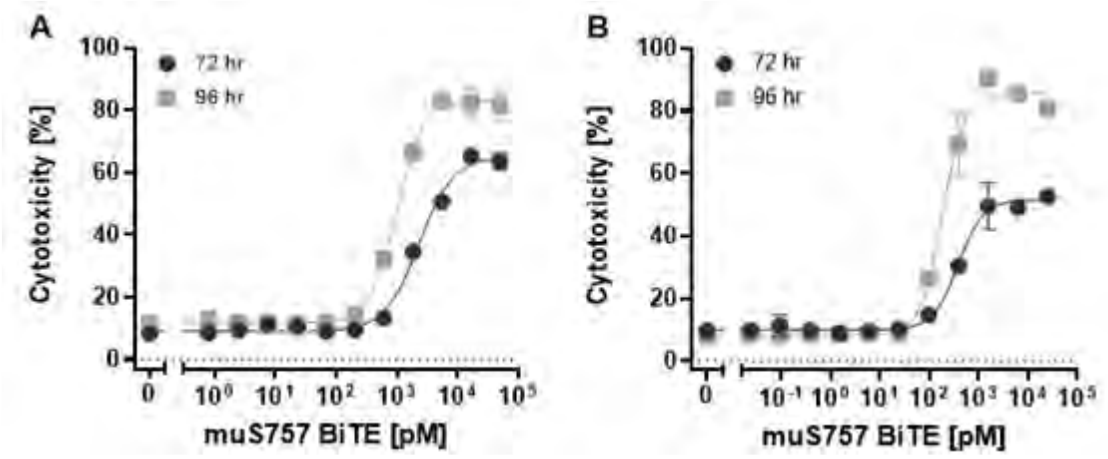
### 2.2.3　muS757誘導のT細胞再指向性標的細胞溶解、T細胞活性化及びサイトカイン産生

マウスあるいはヒトのDLL3を発現するCHO細胞（それぞれCHO-muDLL3及びCHO-huDLL3）を標的としたmuS757によるマウスT細胞（エフェクター細胞）の再指向性細胞溶解を評価した。エフェクター対標的（E：T）細胞比5：1の共培養系に系列希釈したmuS757を加え、標的細胞溶解は、72及び96時間後のPI取込みにより測定した。

muS757は濃度依存的に、CHO-muDLL3及びCHO-huDLL3に対するT細胞再指向性細胞溶解を誘導した。72時間後の細胞溶解誘導はCHO-muDLL3に対してのほうが、CHO-huDLL3に比べて1/5ほどに弱く、muS757の$EC_{50}$値は、CHO-muDLL3及びCHO-huDLL3細胞に対しそれぞれ、1999及び351 pMであった。培養時間を延長すると、用量反応曲線の最大値が増加し、どちらの細胞に対しても$EC_{50}$値が減少した（図 12及び表 5）。

DLL3発現ヒト腫瘍細胞株に対するAMG 757によるヒトT細胞再指向性細胞溶解誘導の$EC_{50}$値は、上述のように32～447 pM（表 3）であり、これは、異種動物のT細胞とDLL3を高発現するCHO細胞を用いたアッセイ系で得られた$EC_{50}$値より強力であった。

図 12　muS757誘導のマウスT細胞によるCHO-muDLL3及びCHO-huDLL3細胞に対する再指向性細胞溶解




BiTE = bispecific T cell engager; CHO = Chinese hamster ovary; DLL3 = delta-like ligand 3; E:T = effector to target; hr = hours; hu = human; mu = mouse; muS757 = mouse surrogate molecule of AMG 757; PI = propidium iodide; pM = picomolar; SD = standard deviation

CHO-muDLL3 (A) and CHO-huDLL3 (B) cells were co-cultured with murine T cells at an E:T cell ratio of 5:1 and increasing muS757 concentrations for 72 and 96 hours. Target cell lysis was monitored by flow cytometric determination of PI uptake. Each data point represents the mean of duplicate measurements. Error bars represent the SD.

*Source: Study 154479*

表 5　muS757誘導のT細胞再指向性標的細胞溶解の$EC_{50}$値

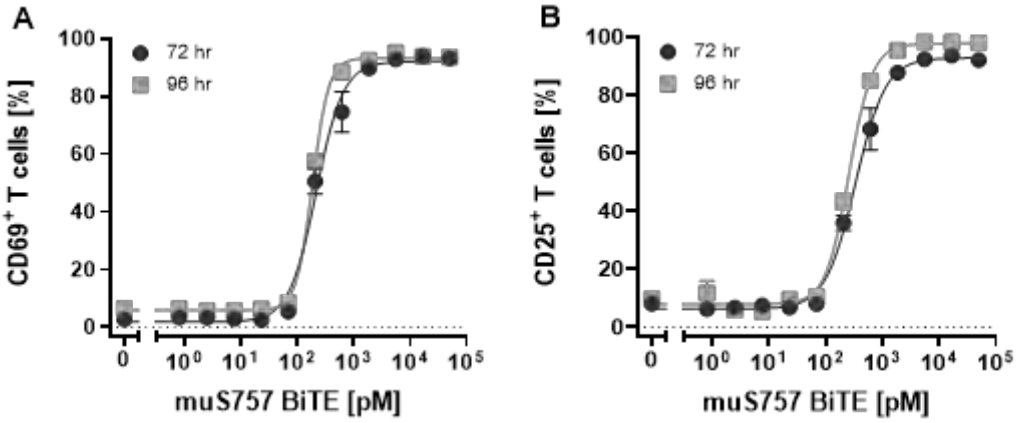
| $EC_{50}$ Mean ± SD [pM] | | | |
|---|---|---|---|
| CHO muDLL3 | | CHO huDLL3 | |
| 72 h | 96 h | 72 h | 96 h |
| 1999 ± 474 | 991 | 351 ± 46 | 185 |

CHO = Chinese hamster ovary; DLL3 = delta-like ligand 3; $EC_{50}$ = concentration required for half-maximal effect; h = hours; hu = human; mu = mouse; muS757 = mouse surrogate molecule of AMG 757; pM = picomolar; SD = standard deviation

*Source: Study 154479*

DLL3発現CHO細胞存在下、muS757によるマウスT細胞活性化能を検討した。E：T細胞比5：1の共培養系に系列希釈したmuS757を加え、72及び96時間培養後のCD25及びCD69のT細胞表面上発現をフローサイトメトリーにより検出した。CHO-muDLL3細胞の存在下で、muS757は濃度依存的にT細胞上のCD25及びCD69の発現上昇を誘導した（図 13）。

図 13　muS757により誘導されたT細胞活性化マーカーの発現



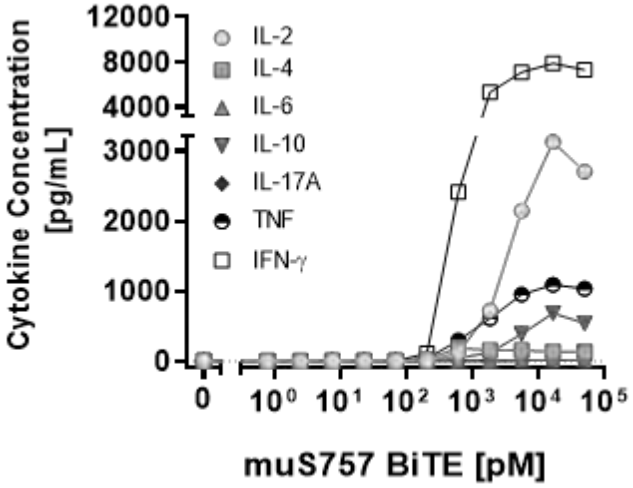

BiTE = bispecific T cell engager; CD3 = cluster of differentiation 3; CD25 = marker of T cell activation; CD69 = early marker of T cell activation; CHO = Chinese hamster ovary; E:T = effector to target; hr = hours; muS757 = mouse surrogate molecule of AMG 757; pM = picomolar; SD = standard deviation

CHO cells stably expressing murine DLL3 were co-cultured with murine $CD3^+$ T cells at an E:T cell ratio of 5:1 and increasing muS757 concentrations for 72 and 96 hours. T cell surface expression of CD69 (A) and CD25 (B) was determined by flow cytometry using antigen-specific fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. Each data point represents the mean of duplicate measurements. Error bars represent the SD.

*Source: Study 154479*

muS757によるT細胞活性化に関連するサイトカインの新たな産生を検討するため、マウスT細胞（$CD3^+$ T細胞）をCHO-muDLL3細胞及び系列希釈したmuS757とともに共培養した。細胞培養上清を72時間後に採取し、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、TNF及びIFN-γの濃度を測定した（図14）。muS757は濃度依存的にマウスT細胞によるサイトカイン産生を誘導し、産生された主なサイトカインはIFN-γ、IL-2、TNF及びIL-10であった。

図 14　muS757により誘導されたマウスサイトカインの遊離




BD = Becton Dickinson; BiTE = bispecific T cell engager; CBA = cytometric bead array; E:T = effector to target; IFN-γ = interferon gamma; IL = interleukin; mL = milliliter; muS757 = mouse surrogate molecule of AMG 757; pg = picogram; pM = picomolar; Th1/Th2 = T helper cells 1/2; TNF = tumor necrosis factor

Murine $CD3^+$ T cells were co-cultured with CHO-muDLL3 target cells at an E:T cell ratio of 5:1 and increasing muS757 concentrations for 72 hours. Cytokine concentrations in the cell culture supernatants were measured with the BD mouse CBA Th1/Th2/Th17 kit.

*Source: Study 154479*

以上、AMG 757と同様に、muS757はポリクローナルなT細胞の活性化を誘導し、安定的に遺伝子導入されたCHO-muDLL3及びCHO-huDLL3細胞に対するマウスT細胞による時間及び濃度依存的な再指向性細胞溶解を媒介した。この細胞傷害アッセイにおけるmuS757の$EC_{50}$値がAMG 757のヒトT細胞による再指向性細胞溶解誘導の$EC_{50}$値と比較してわずかに高かったことは、ヒトT細胞に比べてマウスT細胞の効力がより低いこと、メモリー$CD8^+$ T細胞の数がより少ないこと、加えて、無菌の環境で飼育される動物におけるエフェクターに分化したメモリー$CD8^+$ T細胞の欠如に起因した可能性がある（Beura et al, 2016）。まとめると、*in vitro*試験において、muS757がAMG 757と同様にT細胞活性化、一過性のサイトカイン産生及びT細胞再指向性のDLL3発現腫瘍細胞の溶解を誘導することが示された。

## 2.3 AMG 757の*in vivo*作用

AMG 757の*in vivo*活性として、SCLC細胞株SHP-77を用いた原発性SCLCのマウス同所性移植モデル（R20150125、R20190093試験）、SCLC細胞株NCI-H82を用いたマウス同所性移植のSCLC肝転移モデル（R20190094試験）及びSCLCの2つのPDXモデル（Giffin et al, 2021）を含む、SCLCのマウス異種移植モデルにおける抗腫瘍活性を評価した。SCLC以外のDLL3陽性腫瘍として、NEPC細胞株であるNCI-H660の異種移植モデルにおける抗腫瘍活性も評価した（154545、154546試験）。AMG 757はマウスCD3を認識しないため、これらの試験で使用したマウスには、投与開始前にヒトT細胞を腹腔内（IP）又は静脈内（IV）投与した。*In vivo*試験ではAMG 757の薬理活性及び抗腫瘍活性を検討した。

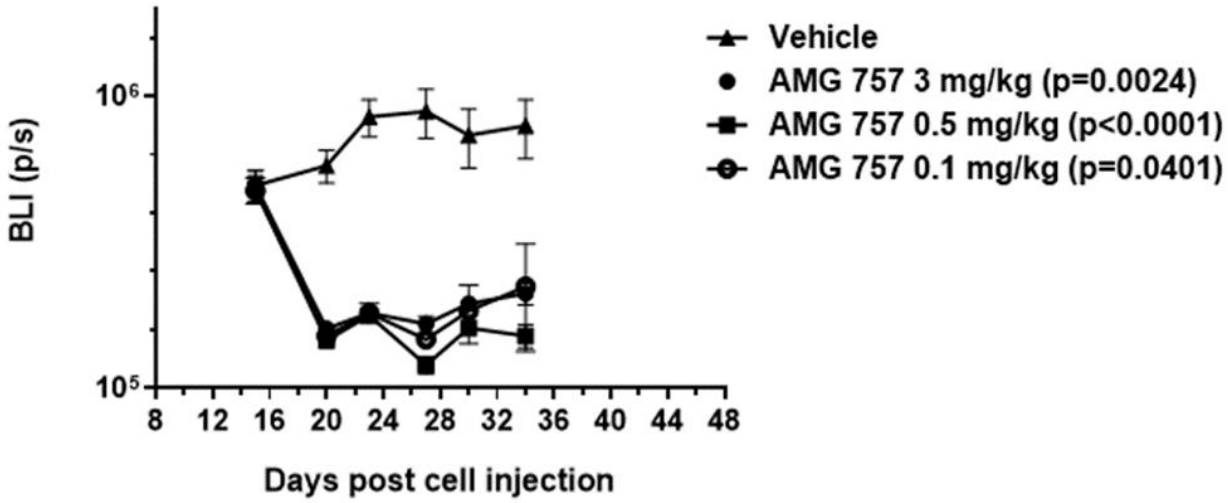
### 2.3.1 SCLCの同所性マウスモデルでのSHP-77-Luc腫瘍に対するAMG 757投与の効果

最初の試験では、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（NSG）マウスに、ルシフェラーゼを発現するSHP-77 SCLC細胞（SHP-77-Luc）をIV注入し、腫瘍増殖を肺領域における生物発光（BLI）の定量により観察した（R20150125試験）。移植15日後（Day 15）にベースラインのBLI画像検査を実施したところ、すべてのマウスで検出可能な肺腫瘍の発現が認められた。動物を5群（1群10例）にランダム割付けし、ヒトT細胞をIV注入した。続いてマウスにAMG 757あるいはFc領域を有しない抗DLL3 BiTE®分子（PL-38991）を投与した。溶媒あるいはAMG 757（0.1、0.5及び3 mg/kg）を、週1回、Day 16、23及び30にIP投与した。PL-38991は0.5 mg/kg/日の用量で5日連続（Day 16～20）IP投与した後、2日間休薬し、Day 23～27に5回の追加投与を実施した。Day 34の試験終了時まで、肺領域のBLI及び体重を週2回記録した。

AMG 757の投与を受けたマウスでは、Day 34に肺領域BLIを指標として腫瘍増殖をモニターした結果、溶媒対照群と比較して有意な腫瘍減少が認められた（図 15）。AMG 757の0.1、0.5及び3 mg/kgの用量での投与群で、それぞれ投与開始から53%、69%及び57%の腫瘍縮小が示された。抗DLL3 BiTE®分子PL-38991投与群ではDay 34に60%の腫瘍増殖縮小が認められた。

これらのデータは、AMG 757が原発性SCLCのマウスモデルにおいて抗腫瘍活性を有することを示した。

図 15　SHP-77-Luc同所性SCLCモデルでの肺領域BLIに対するAMG 757の効果




ANOVA = analysis of variance; BLI = bioluminescence; kg = kilogram; mg = milligram; ROI = region of interest; SHP-77-Luc = human pulmonary small cell carcinoma cell line expressing luciferase

On day 1, female NSG mice were injected intravenously with SHP-77-Luc cells. On day 15 mice were imaged and randomized into treatment groups (n = 10/group) and then injected intravenously with human T cells. AMG 757 was administered intraperitoneally on days 16, 23 and 30. The data show the BLI (photons/second) from an ROI on the upper chest/ lung region of the mice and represents the mean ± standard error of the mean as a function of time. Tumor growth inhibition compared to vehicle control group and associated statistical significance was analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test using Study Director Biostats Tool and is shown in the figure legend.

*Source: Study R20150125*

2番目の試験（R20190093試験）では、SHP-77-Luc同所性肺モデルを用いて、AMG 757の薬力学作用及び抗腫瘍活性を検討した。

薬力学的評価では、NSGマウスにSHP-77-Luc細胞をDay 0にIV注入後、Day 32にヒトT細胞を注入し、Day 35にBLI画像検査により肺腫瘍形成を評価した。その後マウスを2群（1群4例）にランダム割付けし、AMG 757あるいはコントロールBiTE®（標的DLL3を認識しない陰性BiTE®）分子としてのEGFRvIII HLE BiTE®を、3 mg/kgの用量で単回投与した。7日後に試験を終了し、肺組織から分離したT細胞をフローサイトメトリーにより解析した。AMG 757の投与を受けたマウスの肺組織1 mg当たりのT細胞数は、$CD4^+$ T細胞が61個、$CD8^+$ T細胞が120個であり、陰性コントロールBiTE®分子の投与を受けたマウスの$CD4^+$ T細胞数（7.8個）及び$CD8^+$ T細胞数（17個）と比較して有意に多かった（それぞれP=0.013及びP=0.018）。これはAMG 757の作用機序に一致している。

抗腫瘍活性評価では、NSGマウスにSHP-77-Luc細胞をDay 0にIV注入し、Day 7にベースラインのBLIを決定するためマウスの画像検査を実施、ヒトT細胞を注入した後、3つの試験群（1群10例）にランダム割付けした。Day 8よりマウスにAMG 757あるいはコントロールBiTE®分子を3 mg/kgの用量で週1回、2週間投与した。試験を通してBLIにより腫瘍量を測定したところ、AMG 757の投与を受けたマウスでは、Day 22の腫瘍増殖が、コントロールBiTE®分子投与群と比較して76.1%抑制された。

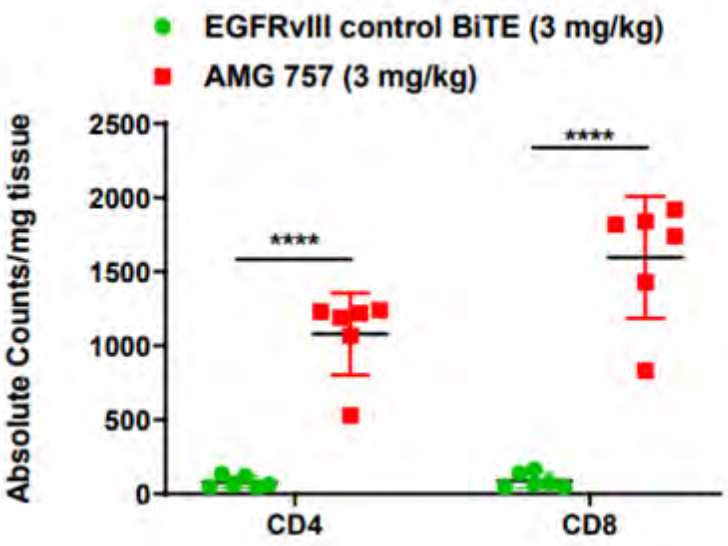
これらのデータは、SCLCの同所性マウスモデルにおいて、AMG 757が腫瘍に浸潤するT細胞を増加させ、抗腫瘍活性を発揮することを示した。

### 2.3.2 転移性SCLCの同所性マウスモデルを用いたNCI-H82-Luc腫瘍に対するAMG 757投与の効果

AMG 757の薬力学作用及び抗腫瘍活性を、SCLC肝転移のNCI-H82-Luc同所性移植モデルも用いて検討した。

薬力学的評価では、NSGマウスにNCI-H82-Luc SCLC細胞をDay 0に注入した。Day 19に腹部BLI画像検査を用いて腫瘍形成を可視化したところ、主に肝臓内の転移性病巣として認められた。次にマウスを2群（1群6例）にランダム割付けし、Day 22にヒトT細胞を注入するとともに、AMG 757あるいはコントロールBiTE®分子（EGFRvIII HLE BiTE®）を3 mg/kgの用量でIV単回投与した。Day 25に肝組織を回収して可視的腫瘍を摘出し、フローサイトメトリーによるT細胞フェノタイピング解析を実施した（R20190094試験）。AMG 757の投与を受けたマウスでは、コントロールBiTE®分子投与群と比較して、肝病巣内のT細胞数が有意な増加を示した［$CD4^+$ T細胞78.2個/mg及び$CD8^+$ T細胞89.6個/mgに対し、$CD4^+$ T細胞1080個/mg及び$CD8^+$ T細胞1597個/mg（P<0.0001）；図 16］。AMG 757投与マウスの肝病巣から分離したT細胞では、T細胞活性化マーカーCD25、PD-1及び4-1BBの有意な増加（P<0.0001）も認められた（R20190094試験）。

図 16 AMG 757によるNCI-H82-Luc実験的肝転移へのT細胞浸潤の増加




BiTE = bispecific T cell engager; CD4 = cluster of differentiation 4; CD8 = cluster of differentiation 8; IP = intraperitoneally; IV = intravenously; kg = kilogram; mg = milligram; NSG = NOD/SCID gamma mice

Evaluation of T cell infiltration in NCI-H82-Luc experimental liver metastases 72 hours after treatment with AMG 757 or an EGFRvIII control BiTE®. On day 0, female NSG mice were injected IV with 5 $\times 10^4$ NCI-H82- Luc cells. On day 19, mice were redistributed into new groups and injected IV with 2 $\times$ $10^7$ human T cells. AMG 757 treatment (3 mg/kg, IP) or EGFRvIII control BiTE® (3 mg/kg, IP) was given on day 22. Livers were collected on day 25, visible tumors were excised, weighed and enzymatically dissociated into single cell suspensions and labeled with antibodies for flow cytometry. Data show the absolute counts for each animal for each cell surface marker, normalized to the weight of the tumor tissue; these data depict the total number of human $CD4^+$ and $CD8^+$ cells per mg of tissue. Significance was determined using an unpaired Student's t-test with a cutoff value of p<0.0001.

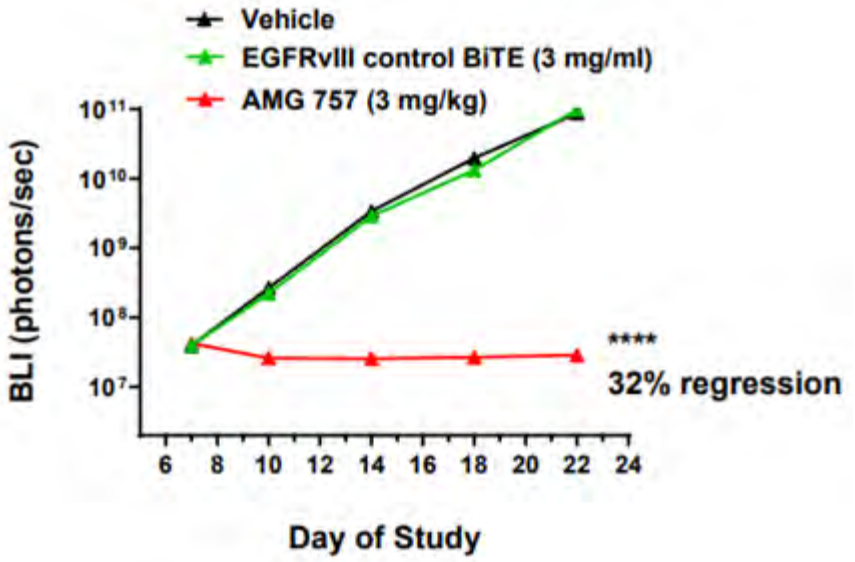
*Source: Study R20190094*

抗腫瘍活性の評価では、NSGマウスにNCI-H82-Luc SCLC細胞をDay 0及びDay 7に注入し、BLIにより腫瘍形成を測定した後、マウスを投与群（1群10例）にランダム割付けしてヒトT細胞を投与した。Day 8及びDay 15に、マウスにAMG 757、コントロールBiTE®分子（EGFRvIII HLE BiTE®）あるいは溶媒のみを投与した。このモデルにおいて、AMG 757投与により転移性肝病巣がDay 22までに

完全に消失したこと（P<0.0001）が、BLIシグナル減少により（図 17）、また試験終了時に切除したマウス肝臓の目視検査でも認められた（R20190094試験）。一方、コントロールBiTE®分子投与群及び溶媒投与群では、複数の肝病変が残存していた（R20190094試験）。

これらのデータは、SCLCの同所性転移性マウスモデルにおいて、AMG 757が腫瘍浸潤T細胞を増加させ、抗腫瘍活性を発揮することを示した。

図 17　AMG 757による同所性NCI-H82-Luc SCLC腫瘍増殖の抑制




BiTE = bispecific T cell engager; BLI = bioluminescence; IP = intraperitoneally; IV = intravenously; kg = kilogram; mg = milligram; ml = milliliter; NSG = NOD/SCID gamma mice; ROI = region of interest

Evaluation of AMG 757 antitumor activity against NCI-H82-Luc tumors in mouse livers. Tumor growth curves in mice bearing NCI-H82-Luc experimental liver metastases treated with vehicle (black), an EGFRvIII control BiTE® (green) or AMG 757 (red) 3 mg/kg. On day 0, female NSG mice were injected IV with $5 \times 10^4$ NCI-H82-Luc cells. The mice were redistributed into vehicle control, EGFRvIII control BiTE® and AMG 757 treatment groups on day 7, and then injected IV with $2 \times 10^7$ human T cells. AMG 757 treatment (3 mg/kg, IP) or EGFRvIII control BiTE® (3 mg/kg, IP) was administered on days 8, 15 and 22. Data shown is mean BLI for each treatment group out to study day 22 collected from an ROI drawn around the upper torso (to capture BLI emanating from the liver). BLI measurements were taken bi-weekly until study end on day 22.**** A p-value of < 0.0001. Statistical analysis was performed using Linear Mixed Effects model implemented within the custom application IVEA (v1.2.1.019).

*Source: Study R20190094*

### 2.3.3　SCLCのPDXモデルにおけるAMG 757投与の効果

AMG 757の抗腫瘍活性を、SCLCの2つのPDXモデルを用いて評価した。

SCLCの腫瘍断片LXFS 1129及びLXFS 538を、NOD.Cg-Prkdc$^{scid}$ Il2rg$^{tm1Sug}$/JicTac（NOG）マウスに皮下移植した。腫瘍が平均体積94～123 mm$^3$まで増殖したとき（2つのモデルでそれぞれ41日及び29日）、マウスを群にランダム割付けし（1群9～10例）、ヒトT細胞を投与した（Day 0）。次に、マウスにAMG 757あるいはコントロールBiTE®分子（EGFRvIII HLE BiTE®）を週1回、3週間（Day 1、8及び15）投与した。腫瘍体積をキャリパーにより測定した。LXFS 1129モデルでは、AMG 757投与により有意な抗腫瘍活性（P<0.0001）が見られ、投与開始時からDay 23までに83%の腫瘍縮小及び10例中8例での腫瘍消失が認められた（Giffin et al, 2021）。LXFS 538モデルにおいてもAMG 757投与により有意な抗腫瘍活性（P<0.0001）が見られ、Day 32に10例中9例で腫瘍消失（残る1例でも残存細胞塊5 mm$^3$未満）が認められた（Giffin et al, 2021）。

まとめると、これらの試験は、SCLCの非臨床モデルにおいてAMG 757の単剤投与が明らかな抗腫瘍活性を有すること、また原発性肺腫瘍及び肝転移巣での腫瘍消失を誘導する作用があることを示している。

### 2.3.4 NEPCのNCI-H660異種移植モデルにおけるAMG 757投与の効果

SCLCに加えて、DLL3標的はNEPCのような他の神経内分泌腫瘍型の表面上にも発現する（Saunders et al, 2015、Puca et al, 2019）。そのため、AMG757の薬力学作用及び抗腫瘍活性を、NEPC細胞株NCI-H660を用いたマウス異種移植モデルを用いて検討した（154546、154545試験）。

薬力学的評価では、NSGマウスにNCI-H660細胞を皮下注入し（Day 0）、腫瘍を形成させた。Day 39にマウスを2群（1群5例）にランダム割付けし、ヒトT細胞を注入した。Day 41に、マウスにAMG 757あるいはコントロールBiTE®分子（EGFRvIII HLE BiTE®）を3 mg/kgの用量で単回IV投与した。4日後に腫瘍を採取し、フローサイトメトリー及び免疫組織染色（IHC）によりT細胞数及びその活性化状態を評価した。AMG 757の投与を受けたマウスでは、コントロールBiTE®分子投与群と比較して、腫瘍浸潤T細胞数の有意な増加が示された［$CD4^+$ T細胞0.96個/mg及び$CD8^+$ T細胞1.46個/mgに対し、$CD4^+$ T細胞117.9個/mg（P=0.009）及び$CD8^+$ T細胞127.7個/mg（P=0.002）］（154546試験）。AMG 757の投与を受けたマウスから採取した腫瘍に浸潤したT細胞上では、T細胞活性化マーカーCD25、PD-1及び4-1BBの発現も有意に増加した（154546試験）。AMG 757の投与を受けたマウスの腫瘍におけるT細胞数の増加は、IHCによっても示された（154546試験）。

このモデルにおけるAMG 757の抗腫瘍活性の評価では、NSGマウスにNCI-H660細胞を皮下注入し（Day 0）、腫瘍を形成させた。マウスを4群（1群10例）にランダム割付けし、ヒトT細胞をDay 20に注入した後、Day 21よりAMG 757（0.03、0.3、3 mg/kg）あるいはコントロールBiTE®分子（EGFRvIII HLE BiTE®）の3 mg/kgを週1回、3週間投与した。AMG 757投与により有意な抗腫瘍活性（P<0.0001）が示され、0.03、0.3及び3 mg/kgの用量でそれぞれ投与開始から88%、97%及び100%の腫瘍縮小が認められた（154545試験）。

以上、AMG 757はSCLC以外のDLL3陽性腫瘍であるNEPCに対しても単独投与で抗腫瘍活性を発揮することが示された。AMG 757の抗腫瘍活性はNEPCのPDXモデルでも示されている（Chou et al, 2023）。

## 3. 副次的薬理試験

### 3.1 ヒト及びカニクイザルの正常組織におけるDLL3発現

AMG 757の作用機序は細胞表面上に発現するDLL3への結合に依存することから、正常なヒト及びカニクイザルの組織におけるDLL3のタンパク質及びメッセンジャーリボ核酸（mRNA）レベルでの発現の詳細な解析を、複数の異なる技法を組み合わせて実施した。まとめると、これらのデータは、DLL3のタンパク質はほとんどの正常組織で検出できない、あるいは正常組織の限られたサブセットで極めて低く検出されることを示した。正常組織で検出される場合でもDLL3のタンパク質は細胞質で発現しており（123377試験）、AMG 757はアクセス不能と考えられる。対照的に、SCLC腫

瘍細胞においてDLL3は細胞質内及び細胞表面上の両方に発現すると考えられるため、AMG 757は腫瘍細胞表面上のDLL3に結合するものと予想される（123377試験）。

リボ核酸（RNA）シーケンシング（RNA-seq）を用いて、ヒト及びカニクイザルの正常組織パネルにおけるDLL3のmRNAレベルを測定した（123658試験）。ヒト及びカニクイザルの標準的な完全長DLL3転写物に加えて、過去に解析されていない幾つかのエクソン欠損バリアントが特定された。これらのバリアントのうち一部の転写物は複数の組織において標準的なDLL3転写物より高く検出されたが、AMG 757により認識されるDLL3内の抗原領域をコードする配列を含有しないことから、それらの翻訳産物はT細胞再指向性細胞溶解を引き起こすようなAMG 757の標的とはならないと予想された。このようなDLL3のmRNAバリアントの存在は、72種類のヒト正常組織パネルにおける定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）解析でも確認された。そこではすべてのDLL3転写産物を検出するプライマー（124207試験）、及びDLL3のAMG 757に認識される領域をコードする配列を含む転写産物のみを検出するプライマー（124208試験）を用いた。これらの試験結果に加えて、qRT-PCR試験（123875試験）及び*in situ*ハイブリダイゼーション試験（122642試験）の結果に基づくと、AMG 757により認識される領域をコードする配列を含む転写物が、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。

DLL3のタンパク質レベルでの組織内分布を評価するため、ヒト及びカニクイザルの正常組織パネルを用い、AMG 757により認識されるDLL3の抗原領域に特異的な抗体を用いたIHCアッセイ（123377試験）及びキャピラリー電気泳動／ウェスタンブロット（123293試験）を実施した。mRNA発現のデータに一致して、DLL3のIHC染色は、ヒトの大脳、小脳、視床下部及び海馬のニューロンに限定して認められた。また、ウェスタンブロット又はIHC染色によりDLL3タンパク質が検出されたのは、ヒト及びカニクイザルの組織のいずれにおいても、下垂体前葉の好塩基性下垂体細胞及び膵島であった。ヒト及びカニクイザルの正常組織におけるIHC染色の強度は全体として弱く（1+）、軽度（2+）が散見され、細胞質に局在するパターンを示したことから、AMG 757のアクセスは不可能と予想された。

これらの異なるデータセットを用いて得られる結論として、（a）AMG 757により認識される配列を含まないDLL3の転写物バリアントが存在した、（b）AMG 757結合領域を含有する標準的なDLL3の転写物は、正常組織の小サブセットにおいて極めて低レベルで発現していた、（c）この正常組織の限定的なサブセットにおけるDLL3のタンパク質発現は極めて低度であり、検出された場合でも、発現パターンは細胞質に限定されていた（ただし、膜表面上においても検出限界以下のレベルで発現している可能性はある）。したがって、AMG 757投与に関連して正常組織損傷を引き起こす副次的薬理作用が生じることはないと予想された。

## 3.2 血小板活性化アッセイ

血小板のオフターゲット活性化の有無を評価するため、健常人あるいはカニクイザルの全血にAMG 757の125、41.7、13.9、4.6、1.5及び0.5 µg/mLを加え、血小板活性化マーカーの発現量をフローサイトメトリーにより検討した。ヒト及びカニクイザルの全血のいずれにおいても、AMG 757による血小板活性化は認められなかった（122111試験）。

## 4. 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。

カニクイザル（1群2例）を用いた探索的10日間反復投与毒性試験（121423試験）において、AMG 757を100及び1000 µg/kgの用量で週1回投与したときの忍容性は良好であった。高用量での2回目投与の2日後に、1例で体温上昇が認められた。カニクイザルを用いた28日間反復投与毒性試験（121424試験）及び3カ月間反復投与毒性試験（122516試験）では、心電図検査（定量的体外ジャケット式テレメトリー）及び呼吸数測定を実施した（モジュール2.6.6 2.2項）。

28日間反復投与毒性試験では、AMG 757を0、50、500及び4500 µg/kgの用量で週1回IV注入（約4分間）により投与した。Day 2に500 µg/kg以上の用量でAMG 757に関連した軽度の心拍数増加が見られ、それに関連してPR、RR及びQT間隔短縮が認められた。24時間の採取期間を通して、心拍数の平均変化は対照群を10%未満上回った（23%までの個体別変化が記録された）。次回の測定時点であるDay 23には、抗薬物抗体（ADA）の状態にかかわらず、いずれの動物においてもこれらの変化は認められなかった。心拍数増加は低度であり、投与継続にもかかわらず試験終了時には変化が認められなかったことから、この所見は毒性変化ではないと考えられた。

28日間反復投与毒性試験では、体温及び呼吸数においてAMG 757関連の神経学的所見及び変化は認められなかった。

3カ月間反復投与毒性試験において、AMG 757の50及び4500 µg/kgの用量での忍容性は良好であり、心電図、体温、呼吸数及び神経学的検査のパラメータにAMG 757関連の変化は認められなかった（122516試験、モジュール2.6.6 2.2.3項）。

さらに、マウスを用いた1カ月間反復投与毒性試験におけるmuS757の50、500及び4500 µg/kgの用量での忍容性は良好であり、神経学的検査でmuS757関連の変化は認められなかった（153960試験、モジュール2.6.6 2.2.4項）。

## 5. 薬力学的薬物相互作用

### 5.1 AMG 757の*in vitro*活性に対するデキサメタゾンの影響

臨床において、デキサメタゾン（又は同等の作用を示すコルチコステロイド）は、AMG 757により誘導される炎症性サイトカイン放出を制限し、付随する有害事象を軽減するために使用される。そのため、AMG 757によるT細胞活性化とそれによる標的細胞の溶解に対するデキサメタゾンの影響を、細胞培養試験で検討した（122718試験）。

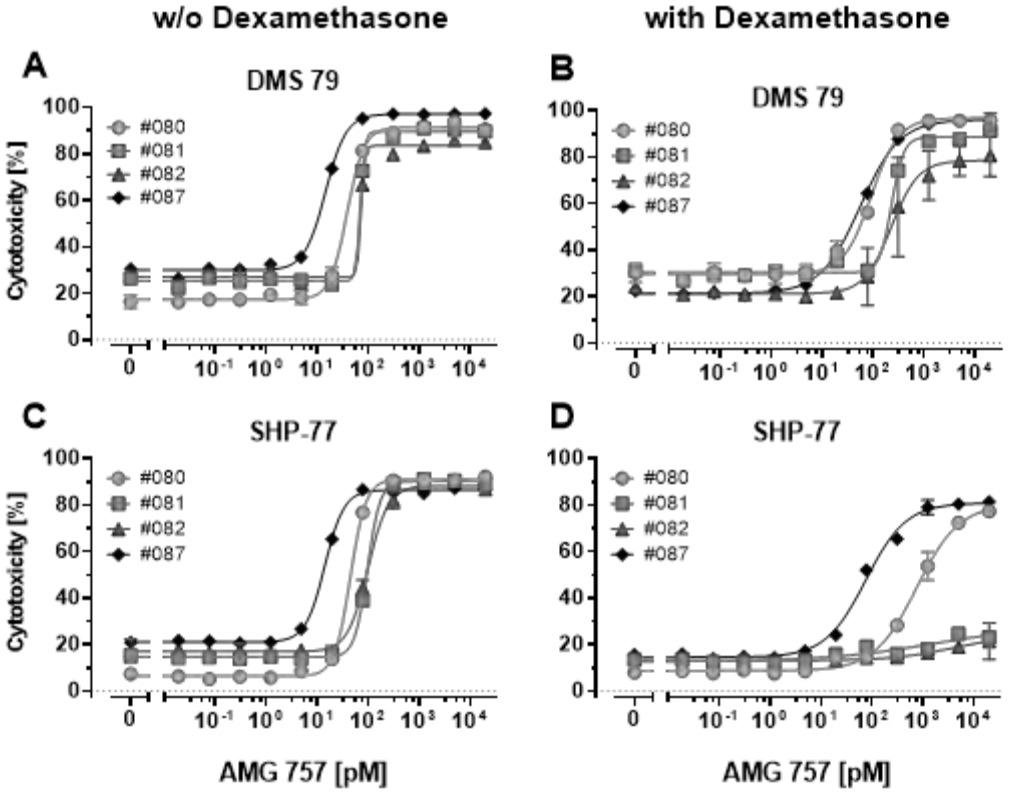
デキサメタゾン7.5 mg経口投与後の患者におけるデキサメタゾンの血清中濃度は、2.5～98.1 ng/mLである（Weijtens et al, 1998）。4 mg IV投与後の血清中濃度は最高で100 ng/mLに達する（Spoorenberg et al, 2014）。このIV用量範囲で投与量とデキサメタゾン血清中濃度の線形性が示されている（Rohdewald et al, 1987）。これより、臨床でBiTE®分子の投与を受ける患者で併用される可能性がある4～8 mgのデキサメタゾンをIV投与したときの血清中濃度の外挿が可能である。

デキサメタゾンは、IV又は経口投与後の血清中濃度に相当する濃度（Spoorenberg et al, 2014、Weijtens et al, 1998）で、T細胞（健常人ドナー由来PBMC）におけるAMG 757誘導のサイトカイン放出を減少させた（122718試験）。サイトカイン放出減少に伴って、T細胞上のCD69及びCD25の新たな発現が減少した。デキサメタゾンの存在下で、T細胞上でのCD69及びCD25の発現上昇を誘導するAMG 757の平均$EC_{50}$値が、最大で3.7倍（CD69）及び3.3倍（CD25）に増加した。

SCLC細胞株DMS 79又はSHP-77を標的としたAMG 757誘導によるT細胞再指向性溶解での最大細胞溶解レベル並びに$EC_{50}$及び$EC_{90}$値も、デキサメタゾンの存在下で抑制的影響を受けた（図 18、表 6）。DMS 79細胞では、SHP-77細胞と比較して影響がより軽度であった。SHP-77細胞では、健常人ドナー2例からのPBMCを用いたAMG 757誘導によるT細胞再指向性溶解が、デキサメタゾンによりほぼ完全に阻害された（図 18D）。当該再指向性溶解におけるAMG 757誘導の平均$EC_{50}$値は、DMS 79細胞では約3倍に、SHP-77細胞では6.6倍に、それぞれ増加した（表 6）。

これらの試験は、AMG 757誘導T細胞による炎症性サイトカイン産生がデキサメタゾンにより減少する可能性があるものの、その結果として、患者への併用投与時にAMG 757の細胞傷害活性が低下する可能性があることを示している。

図 18　AMG 757誘導のT細胞再指向性細胞溶解に対するデキサメタゾンの影響




DMS 79 = human small cell lung carcinoma cell line; E:T = effector-to-target; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; PI = propidium iodide; pM = picomolar; SD = standard deviation; SHP-77 = human pulmonary small cell carcinoma cell line; w/o = without

Human PBMC from 4 donors were preincubated in the presence (500 ng/mL) or absence of dexamethasone, before AMG 757 and DMS 79 (A) or SHP-77 (B) cells were added (E:T cell ratio = 5:1). AMG 757-mediated redirected lysis of target cells in presence or absence of dexamethasone was determined. PI-uptake of target cells was measured by flow cytometric analysis after 48 hours. Error bars indicate the SD of duplicate measurements.

*Source: Study 122718*

表 6　AMG 757のT細胞再指向性細胞溶解誘導のEC50に対するデキサメタゾンの影響

| Donor | DMS 79 EC50 Cytotoxicity [pM] | | SHP-77 EC50 Cytotoxicity [pM] | |
|---|---|---|---|---|
| | w/o Dexamethasone | with Dexamethasone [500 ng/mL] | w/o Dexamethasone | with Dexamethasone [500 ng/mL] |
| #080 | 39 | 92 | 45 | 758 |
| #081 | 71* | 231 | 97 | — |
| #082 | 73* | 228 | 98 | — |
| #087 | 15 | 56 | 14 | 76 |
| Mean | 49.2 | 152.0 | 63.4 | 416.9 |
| SD | 27.9 | 91.1 | 41.3 | 482.4 |

* = ambiguous (due to steepness of the response curve); — = not calculated; $EC_{50}$ = concentration required for half-maximal effect; mL = milliliter; ng = nanograms; pM = picomolar; SD = standard deviation; w/o = without

*Source: Study 122718*

## 5.2　AMG 757誘導のT細胞再指向性標的細胞溶解に対する免疫チェックポイント阻害の影響

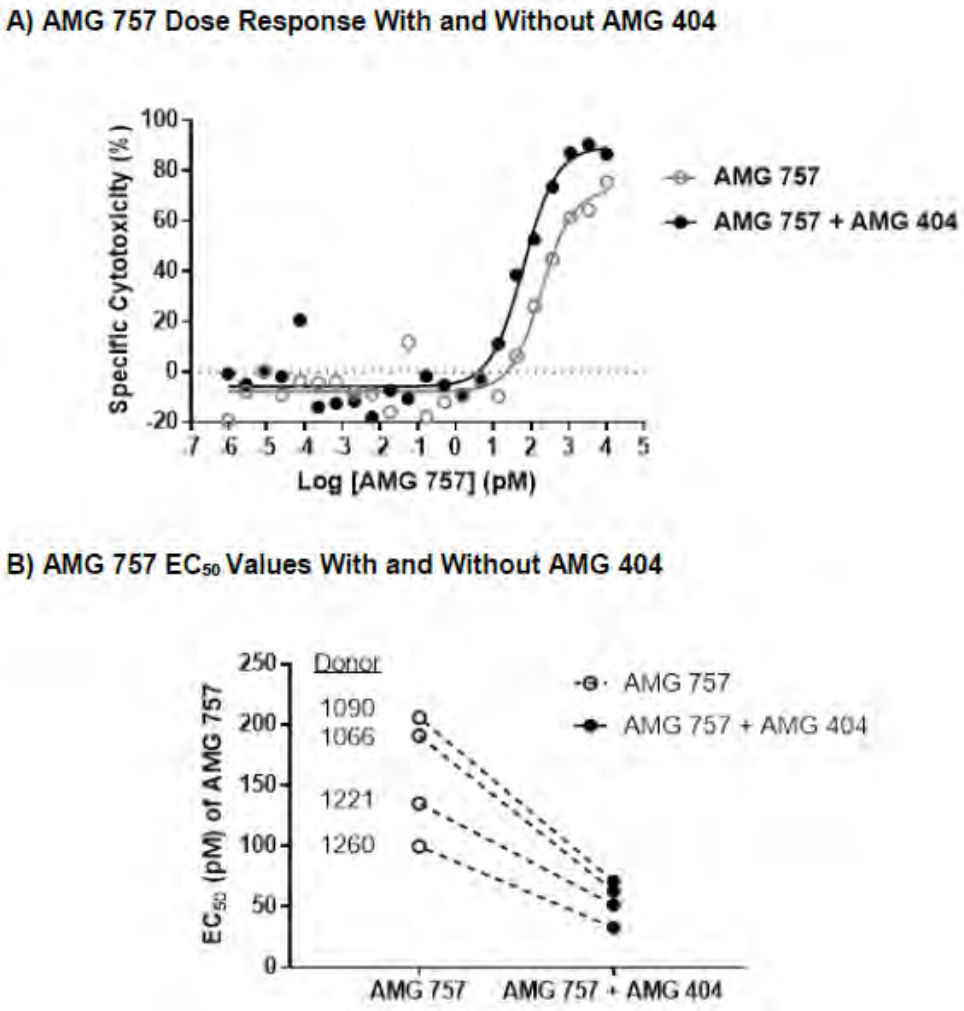
AMG 757投与によりT細胞上の免疫チェックポイントマーカーであるPD-1の発現上昇が起こり、それによりT細胞再指向性の標的細胞溶解が制限される可能性がある。AMG 757の細胞溶解誘導活性に対する免疫チェックポイント阻害の影響を*in vitro*で評価した（R20190104試験）。

PD-1のリガンドであるPD-L1を過剰発現するよう遺伝子改変されたDLL3陽性SCLC細胞株SHP-77を、抗PD-1抗体としてAMG 404の非存在下又は存在下で、ヒトT細胞及び一連の用量範囲のAMG 757とともにインキュベートした。AMG 757とAMG 404との共処理により、AMG 757単独と比較して細胞傷害がより強力になり、健常人ドナー4例からのぞれぞれのT細胞を用いたときのAMG 757の$EC_{50}$値が低下した（AMG 757単独での平均158 ± 49.4 pMと比較して、併用では平均54.6 ± 16.5 pM；P=0.008）（図 19）。

AMG 757の*in vitro*細胞溶解誘導活性に対するAMG 404の影響の評価は、PD-L1過剰発現SCLC細胞株COR-L279でも実施した。COR-L279細胞をAMG 757とAMG 404で共処理した際にもAMG 757誘導の細胞殺傷が強化され、健常人ドナー4例からのぞれぞれのT細胞を用いたときの平均の$EC_{50}$値が1.3分の1に低下したが、統計学的有意差は認められなかった（P=0.06）。

以上、免疫チェックポイント阻害によりAMG 757誘導のT細胞再指向性標的細胞溶解が強化される可能性がある。

図 19　免疫チェックポイント阻害によるAMG 757誘導のT細胞再指向性細胞溶解の強化




DLL3 = delta-like ligand 3; $EC_{50}$ = half-maximal effective concentration; E:T = effector to target; PD-1 = programmed death 1; PD-L1 = programmed death ligand 1; pM = picomolar; SCLC = small cell lung cancer; SHP-77-Luc = human pulmonary small cell carcinoma cell line expressing luciferase; TDCC = T cell-dependent cellular cytotoxicity

$DLL3^+$ SHP-77-Luc SCLC target cells overexpressing PD-L1 were co-cultured with $PD\text{-}1^+$ activated T cells (1:1 E:T ratio) and AMG 757 + AMG 404 (10 µg/mL) for 24 hours. Specific cytotoxicity was determined by luminescence and calculated relative to target cells incubated with T cells without BiTE® molecule or AMG 404. A) AMG 757 dose response with and without AMG 404 using 1 representative T cell donor (donor ID RG1066). B) AMG 757 $EC_{50}$ values were reduced by addition of AMG 404 using all 4 T cell donors in TDCC assays.

*Source: Study R20190104*

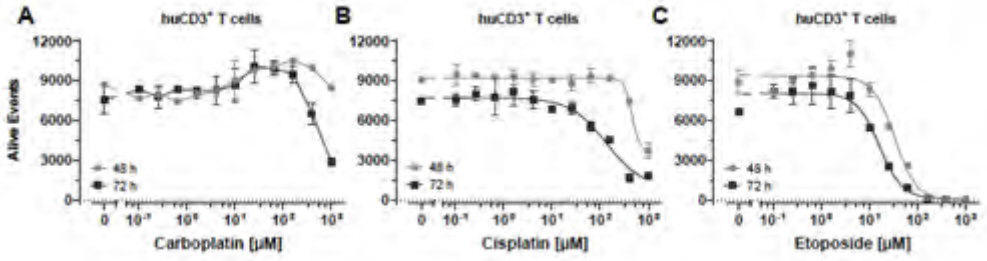
## 5.3　AMG 757誘導のT細胞再指向性細胞溶解に対する化学療法の影響

AMG 757とプラチナ及びエトポシド化学療法の併用効果を、SCLC細胞株を用いて*in vitro*で評価するとともに（155262試験）、SCLC異種移植モデルを用いて*in vivo*で評価した（156568試験）。

予備試験として、DLL3発現SCLC細胞株又はヒトT細胞（$CD3^+$細胞）の生存率への化学療法剤の影響を*in vitro*で検討した。カルボプラチン、シスプラチン又はエトポシドの希釈系列を、SCLC細胞株SHP-77、COR-L279、DMS 79、又はヒトT細胞とともに48あるいは72時間インキュベートした後、PIの取込み（フローサイトメトリー）により細胞生存率を評価した。化学療法剤処理の結果として、SHP-77細胞及びCOR-L279細胞では用量依存的な細胞傷害が見られた。DMS 79細胞ではシス

プラチン又はエトポシドの高濃度のみで細胞傷害が認められた（155262試験）。T細胞の細胞傷害は、すべての化学療法剤処理によりある程度認められた（図 20）。T細胞生存率は、>160 μMカルボプラチンで72時間後に、>160 μMシスプラチンで48時間後に、>64 μMシスプラチンで72時間後に、それぞれ低下した。エトポシド処理では最も強い傷害をうけ、エトポシドの50%阻害濃度（$IC_{50}$）は、48時間後には34 μM、72時間後には16 μMであった（155262試験）。

**図 20　カルボプラチン、シスプラチン又はエトポシドのヒトT細胞に対する用量依存的な影響**




CD3 = surface antigen on T cells, subunit of the T cell receptor complex; h = hours; hu = human; μM = micromolar; PI = propidium iodide; SD = standard deviation

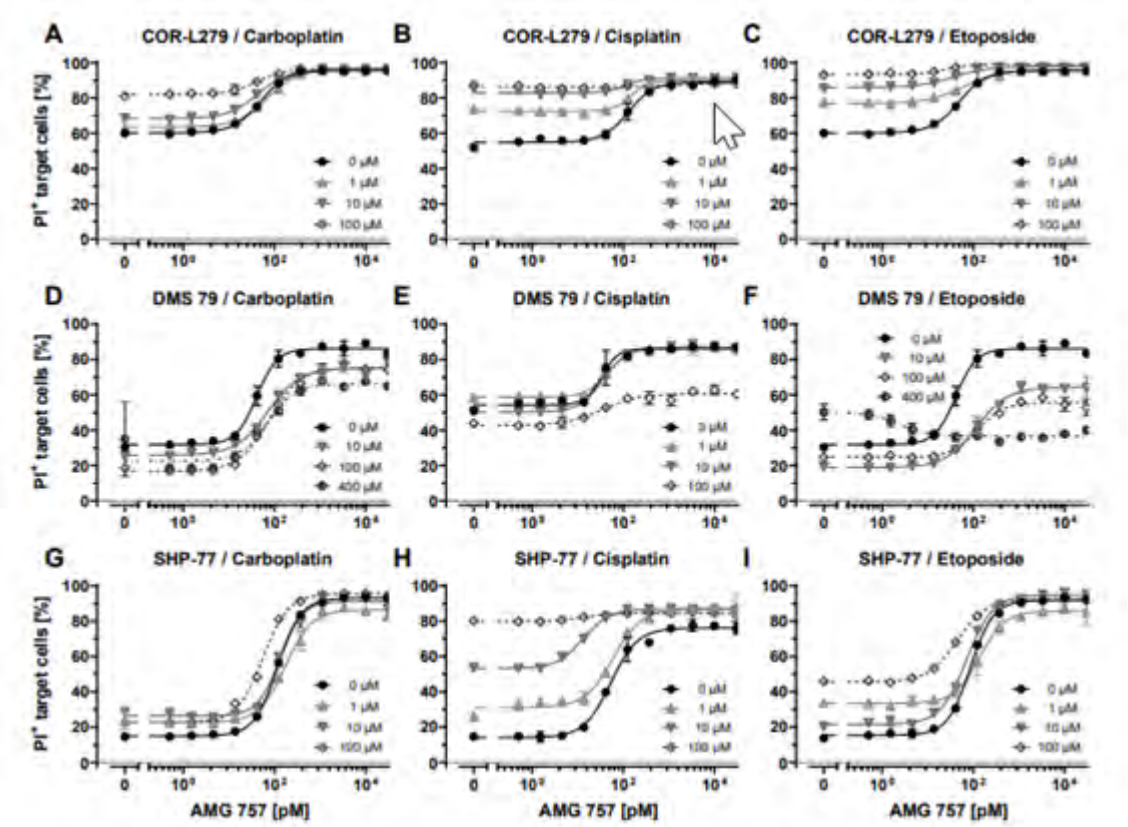
Human $CD3^+$ T cells were cultured without or with serial dilutions of carboplatin (A), cisplatin (B) or etoposide (C) starting with at a concentration of 1000 mM (dilution 1:2.5) for 48 and 72 hours. Cell death (PI uptake) was determined by flow cytometry. The analysis of T cell donors #411 (A), #193 (B), and #959 (C) are shown. Data points represent the mean of duplicate measurements. Error bars indicate the SD.

*Source: Study 155262*

上述の結果を基に、AMG 757とカルボプラチン、シスプラチン又はエトポシド（0、1、10、100 μMあるいは0、10、100、400 μM）との併用による各種SCLC細胞株に対するT細胞再指向性細胞溶解の誘導を検討した。エフェクター対標的細胞比は2：1（COR-L279及びDMS 79）又は1：1（SHP-77）とした。全体として、併用処理により、AMG 757単独での誘導と比較して、より強力な細胞溶解が誘導された（図 21）。したがって、化学療法剤によりT細胞が減少するにもかかわらず、生存しているT細胞が効果的にAMG 757誘導による再指向性細胞溶解を起こすことができた。

化学療法との併用によってAMG 757誘導の細胞傷害活性が増強され、異なる2つの作用機序が併用効果を示したと考えられた。

図 21　カルボプラチン、シスプラチン及びエトポシドとの併用によるAMG 757誘導のT細胞再指向性細胞溶解




CD3 = surface antigen on T cells, subunit of the T cell receptor complex; COR-L279 = human small cell lung cancer cell line; DMS 79 = human small cell lung cancer cell line; E:T = effector-to-target; µM = micromolar; PI = propidium iodide; pM = picomolar; SD = standard deviation; SHP-77 = human small cell lung cancer cell line

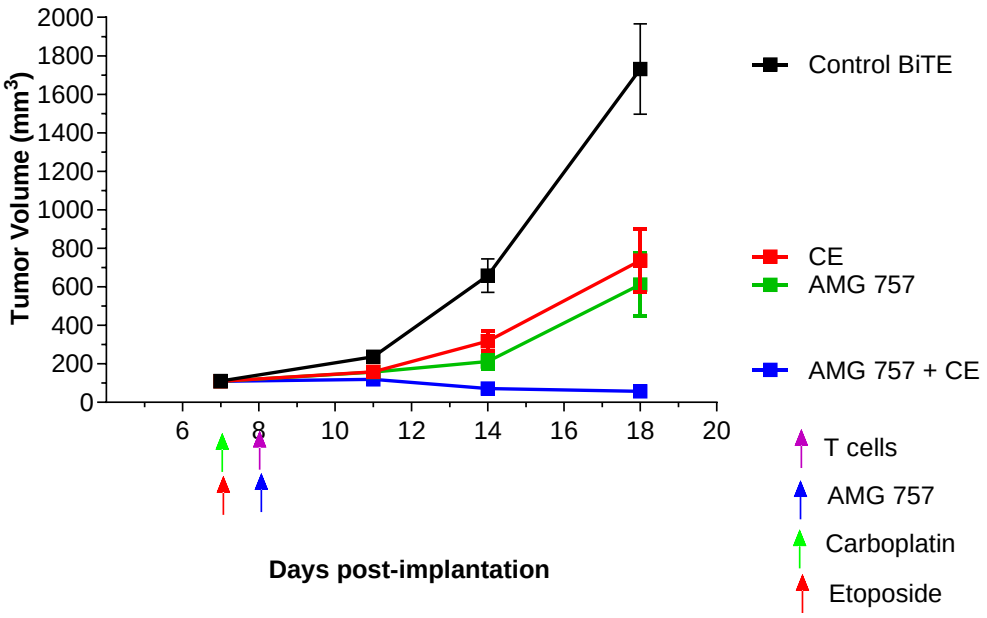
Human $CD3^+$ T cells (1 out of 2 donors illustrated) were co-cultured with COR-L279 (A-C), DMS 79 (D-F) or SHP-77 (G-I) cells at E:T cell ratios of 2:1 (COR-L279, DMS 79) or 1:1 (SHP-77) and increasing AMG 757 concentrations in the absence or presence of 1, 10, and 100 µM carboplatin (A, G), cisplatin (B, E, H) or etoposide (C, I), or 10, 100, or 400 µM carboplatin or etoposide and DMS 79 cells (D, F). Cytotoxicity (PI uptake) was determined after 48 hours by flow cytometry. Data points represent the mean of duplicate measurements. Error bars indicate the SD.

*Source: Study 155262*

AMG 757と化学療法の併用を、SCLC細胞株NCI-H82の異種移植モデルを用いて*in vivo*でも検討した（156568試験）。NCI-H82細胞をNSGマウスに皮下注入し腫瘍を形成させた。Day 7にマウスを4群（1群10例）にランダム割付けし、カルボプラチン（60 mg/kg）及びエトポシド（10 mg/kg）を投与、あるいは無投与対照とした。Day 8にヒトT細胞を投与後、AMG 757あるいはコトントールBiTE®分子（EGFRvIII BiTE®）をそれぞれ0.05 mg/kg投与した。試験を通して、腫瘍体積及びマウスの体重を測定した（図 22）。Day 18に、化学療法単独投与群は61%の腫瘍増殖抑制を示したのに対し、AMG 757の単独投与群は69%の腫瘍増殖抑制（コトントールBiTE®投与群との比較）を示した。化学療法及びAMG 757の併用群では10例中2例で腫瘍消失が認められ、平均の腫瘍縮小は投与開始時から48%であった。

AMG 757及び化学療法の単回投与でも著しい抗腫瘍活性の増加が認められたことから、この併用によりSCLC患者へのベネフィットが得られる可能性が示唆される。

図 22　プラチナ／エトポシド化学療法によるNCI-H82 SCLC異種移植モデルでのAMG 757の抗腫瘍活性の強化




BiTE = bispecific T cell engager; CE = carboplatin plus etoposide; $mm^3$ = millimeters cubed; n = number; SCLC = small cell lung cancer; SEM = standard error of the mean

Tumor growth curves in mice bearing NCI-H82-Luc tumors treated with a control BiTE® molecule (EGFRvIII BiTE®) or AMG 757 alone or in combination with carboplatin + etoposide (CE). Green arrow indicates carboplatin treatment, red arrow indicates etoposide treatment, purple arrow indicates the day of T cell injection, and blue arrow indicates BiTE® dosing. Data in the figure represent mean ± SEM tumor volume (n = 10/group).

*Source: Study 156568*

## 6.　考察及び結論

AMG 757は、腫瘍細胞表面上のDLL3及びT細胞上のCD3に同時結合することによりT細胞の活性化を介して腫瘍細胞を殺傷するよう設計されたDLL3を標的とするBiTE®分子である。AMG 757によるT細胞の活性化に関連して、T細胞からの一過性の炎症性サイトカイン産生並びに腫瘍細胞アポトーシスの引き金となるパーフォリン及びグランザイムの放出が起こる。AMG 757は、ヒトT細胞による各種ヒトSCLC細胞株に対する細胞傷害を強力に誘導し、$EC_{50}$値は32～447 pMであった。AMG 757の活性はDLL3発現の標的細胞に対して特異的であり、生理学的に適切なアッセイ条件下では、標的細胞非存在下あるいはDLL3陰性細胞存在下はAMG 757の活性は認められなかった。

各種ヒトSCLCのマウス異種移植モデルにおいて、ヒトT細胞移植後のAMG 757単剤投与により、腫瘍消失を含めたT細胞依存的腫瘍縮小が見られた。AMG 757は、原発性SCLCモデル（皮下及び同所性肺モデル）及び転移性SCLCモデル（同所性肝臓モデル）のいずれにおいても、著しい腫瘍縮小を示した。BiTE®の作用機序に一致して、AMG 757の抗腫瘍活性は、腫瘍に浸潤するT細胞数の増加と活性化に相関していた。SCLC以外のDLL3陽性がんであるヒトNEPCの異種移植モデルにおいても、ヒトT細胞移植後のAMG 757投与により効果的な腫瘍縮小が誘導された。

*In vitro*試験で得られたデータでは、カニクイザルの試験系で薬理学的反応が見られ、カニクイザルがAMG 757の毒性試験に適切な動物種であることが示された。AMG 757はカニクイザルのDLL3及びCD3に結合し、カニクイザルDLL3を発現する標的細胞に対しカニクイザルのT細胞による細胞

殺傷を媒介した。AMG 757は、DLL3陽性標的細胞の存在下、カニクイザルT細胞の活性化を誘導し、サイトカイン産生を促進した。カニクイザル試験系におけるAMG 757の結合親和性及び細胞ベースでの活性は、ヒト試験系での値と同程度であった。まとめると、これらの試験は、AMG 757がカニクイザルのDLL3及びCD3に対して交差反応性を有することを示している。

AMG 757のDLL3結合アームはマウスのDLL3に対しても交差反応することから、このDLL3結合アームとマウスCD3に特異的なCD3結合アームを用いて、さらなる非臨床安全性評価のためマウスサロゲート分子muS757を作製した。muS757は、AMG 757がヒトDLL3及びヒトCD3に結合するのと同程度の親和性でマウスDLL3及びマウスCD3に結合した。また、muS757をマウスT細胞及びマウスDLL3を発現する標的細胞と共培養したところ、マウスT細胞の活性化及び標的細胞のT細胞依存的溶解が誘導された。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は、これらのデータに基づき、マウスを用いた胚・胎児発生毒性評価に関して、muS757がAMG 757の信頼できるサロゲートであることに同意した。

カニクイザルにおけるECGの変化は軽度の心拍数増加並びにそれに対応するPR、RR及びQT間隔の短縮のみであり、これらの変化はAMG 757の500 μg/kg以上の用量での初回投与後のDay 2に見られたが、次回測定時点のDay 23には認められなかった。これらの変化は毒性所見ではないと考えられた。

カニクイザルにおいてAMG 757に関連した神経学的所見並びに体温及び呼吸数の変化は見られず、マウスにおいてmuS757に関連した呼吸系及び中枢神経系機能の変化は認められなかった。

以上、様々な*in vitro*及び*in vivo*試験により、AMG 757の作用機序であるDLL3発現腫瘍細胞の再指向性T細胞溶解が確認され、SCLCに対するAMG 757の強力かつ特異的な活性が示されている。

## 7. 参考文献

Abdiche YN, Yeung YA, Chaparro-Riggers J, et al. The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. *MAbs*. 2015;7:331-343.

Beura LK, Hamilton SE, Bi K, et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*. 2016;532:512-516.

Biagini RE, Moorman WJ, Lal JB, Gallagher JS, Bernstein IL. Normal serum IgE and IgG antibody levels in adult male cynomolgus monkeys. *Lab Anim Sci*. 1988;38:194-196.

Borromeo MD, Savage TK, Kollipara RK, et al. ASCL1 and NEUROD1 reveal heterogeneity in pulmonary neuroendocrine tumors and regulate distinct genetic programs. *Cell Rep*. 2016;16:1259-1272.

Bussiere JL, Martin P, Horner M, et al. Alternative strategies for toxicity testing of species-specific biopharmaceuticals. *Int J Toxicol*. 2009;28:230-253.

Cancer.Net. Lung Cancer - Small Cell: Statistics. Available at: https://www.cancer.net/cancer-types/lung-cancer-small-cell/statistics [2023, accessed August 29, 2023].

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.

Chou J, Egusa EA, Wang S, et al. Immunotherapeutic targeting and PET imaging of DLL3 in small-cell neuroendocrine prostate cancer. *Cancer Res*. 2023;83:301-315.

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.

Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, et al. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol*. 2008;151:42-50.

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

Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8:226-234.

Kontermann RE. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Curr Opin Biotechnol*. 2011;22:868-876.

Laszlo GS, Gudgeon CJ, Harrington KH, et al. Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML. *Blood*. 2014;123:554-561.

Liu L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J Pharm Sci*. 2015;104:1866-1884.

Liu L, Jacobsen FW, Everds N, et al. Biological characterization of a stable effector functionless (SEFL) monoclonal antibody scaffold in vitro. *J Biol Chem*. 2017;292:1876-1883.

Martin PL, Breslin W, Rocca M, et al. Considerations in assessing the developmental and reproductive toxicity potential of biopharmaceuticals. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2009;86:176-203.

Offner S, Hofmeister R, Romaniuk A, Kufer P, Baeuerle PAl. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol Immun*. 2006;43:763-771.

Puca L, Gavyert K, Sailer V, et al. Delta-like protein 3 expression and therapeutic targeting in neuroendocrine prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2019;11:eaav0891.

Rath T, Baker K, Dumont JA, et al. Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Crit Rev Biotechnol*. 2015;35:235-254.

Rohdewald P, Möllmann H, Barth J, Rehder J, Derendorf H. Pharmacokinetics of dexamethasone and its phosphate ester. *Biopharm Drug Dispos*. 1987;8:205-212.

Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7:3.

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.

Spoorenberg SM, Deneer VH, Grutters JC, et al. Pharmacokinetics of oral vs. intravenous dexamethasone in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78:78-83.

Weijtens O, Schoemaker RC, Cohen AF, et al. Dexamethasone concentration in vitreous and serum after oral administration. *Am J Ophthalmol*. 1998;125:673-679.

# 表一覧

表 1　薬理試験：一覧表 ..... 2
表 2　安全性薬理試験 ..... 7

## 表 1　薬理試験：一覧表

被験物質：AMG 757

| Type of Study | Study Title (Study Number) | Study Objective | Test System | Method/Route of Administration |
|---|---|---|---|---|
| Primary Pharmacodynamics | AMG 757: DL 8-A7 CC x I2C0-scFc_delGK Molecule History (TRPT-028632) | Describe the generation of the anti-DLL3 BiTE lead candidate directed against DLL3-expressing cells | NA | NA |
| Primary Pharmacodynamics | In Vitro Pharmacology of AMG 757 (122717) | To characterize the pharmacological properties of the NHP cross-reactive BiTE antibody construct AMG 757 | CHO DHFR-; CHO-cyDLL3; CHO-huDLL3; COR-L279; HCT-116; DMS 79; H-2171; NCI-H82; NCI-H889; SHP-77; human and cynomolgus monkey $CD3^+$ T cells | In vitro |
| Primary Pharmacodynamics | SPR Analysis of AMG 757 Interactions with Human Fc gamma RI, RIIA, RIIIA Receptors, FcRn, and C1q (157053) | Characterize the binding of AMG 757 to human FcγRI/CD64, FcγRIIA/CD32a (H167) and FcγRIIIA/CD16a (V176), FcRn receptors, and complement component 1q by SPR | Recombinant human FcγRI/CD64, FcγRIIACD32a, FcγRIIIACD16a, and FcRn/FCGRT&B2M proteins, and purified human C1q protein | In vitro |
| Primary Pharmacodynamics | Species-specific CD3 Binding of Mec14 x I2C (R20140017) | Support relevant species selection for nonclinical in vivo studies with I2C-based BiTE antibodies | Lymphocytes isolated from blood from human, cynomolgus monkey, rhesus monkey, Beagle dog, minipig, rabbit, Sprague Dawley rat, and BALB/c mouse | In vitro |
| Primary Pharmacodynamics | Generation and In Vitro Characterization of muS757 (154479) | Describe the generation of muS757 and characterize its binding affinity to human DLL3, mouse DLL3 and mouse CD3, T cell activation, and target cell lysis | CHO; CHO-muDLL3; CHO-huDLL3; murine T cells | In vitro |
| Primary Pharmacodynamics | SPR Analysis of muS757 Interactions with Mouse Fc gamma RI, RII, RIII Receptors and FcRn (157054) | Characterize the binding of muS757 to mouse FcγRI/CD64, FcγRIIB/CD32b, FcγRIII/CD16, FcγRIV/CD16-2, and mouse FcRn receptors by SPR | Recombinant mouse FcγRI/CD64, FcγRIIB/CD32b, FcγRIII/CD16, FcγRIV/CD16-2, and FcRn/FCGRT&B2M proteins | In vitro |
| Primary Pharmacodynamics, in vivo | The Effect of AMG 757 Treatment on SHP-77 Tumors in a Female NOD/SCID Mouse Orthotopic Model of Small Cell Lung Cancer (SCLC) (R20150125) | Evaluate the in vivo efficacy of AMG 757 in an orthotopic xenograft model of SHP-77-Luc SCLC in female NOD/SCID IL-2Rγ mice | Female NOD/SCID IL-2Rγ mice bearing SHP-77-Luc tumor cells | IP injection |



Footnotes included on the last page of this table.

## 表 1　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：AMG 757

| Type of Study | Study Title (Study Number) | Study Objective | Test System | Method/Route of Administration |
|---|---|---|---|---|
| Primary Pharmacodynamics, in vivo | Evaluation of the Efficacy and Pharmacodynamic Effects of AMG 757 in the SHP77 Orthotopic Model of SCLC in Female NSG Mice (R20190093) | Evaluate the efficacy and pharmacodynamic effects of AMG 757 treatment on SHP-77-Luc lung tumors and T cells in femひale NOD/SCID IL-2Rγ mice | Female NOD/SCID IL-2Rγ mice bearing SHP-77-Luc tumor cells; human $CD3^+$ T cells | IP injection |
| Primary Pharmacodynamics, in vivo | Evaluation of the Efficacy and Pharmacodynamic Effects of AMG 757 on T cell Infiltration and Activation in an NCI-H82 Orthotopic Liver Metastasis Model of SCLC in Female NSG Mice (R20190094) | Evaluate the efficacy and pharmacodynamic effects of AMG 757 treatment on NCI-H82-Luc model of SCLC with experimental liver metastases in female NOD/SCID IL-2Rγ mice | Female NOD/SCID IL-2Rγ mice bearing NCI-H82-Luc tumor cells; human $CD3^+$ T cells | IP injection |
| Primary Pharmacodynamics, in vivo | Evaluation of the Efficacy of AMG 757 in the NCI-H660 Xenograft Model of Neuroendocrine Prostate Cancer (NEPC) (154545) | Evaluate the in vivo efficacy of AMG 757 in an NCI-H660 xenograft model of NEPC in male NOD/SCID IL-2Rγ mice | Male NOD/SCID IL-2Rγ mice bearing NCI-H660 tumor cells | IV injection |
| Primary Pharmacodynamics, in vivo | Evaluation of the Pharmacodynamic Effects of AMG 757 on T cell Infiltration and Activation in an H660 Orthotopic Model of NEPC (154546) | Evaluate the in vivo efficacy of AMG 757 on T cell infiltration and activation in an NCI-H660 xenograft model of NEPC in male NOD/SCID IL-2Rγ mice | Male NOD/SCID IL-2Rγ mice bearing NCI-H660 tumor cells | IV injection |
| Secondary Pharmacodynamics | DLL3 Protein Expression Analysis in Human and Cynomolgus Monkey Brain, Pituitary, Pancreas, and Liver by Capillary Electrophoresis/Western Blot (123293) | Evaluate DLL3 protein expression and protein tissue distribution in human and cynomolgus monkey brain (cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, and brain stem), pituitary, pancreas, and liver tissue lysates by capillary electrophoresis/western blot | Human and cynomolgus monkey brain (cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, and brain stem), pituitary, pancreas, and liver tissues | in vitro |



Footnotes included on the last page of this table.

## 表 1　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：AMG 757

| Type of Study | Study Title (Study Number) | Study Objective | Test System | Method/Route of Administration |
|---|---|---|---|---|
| Secondary Pharmacodynamics | DLL3 Immunohistochemistry: Expression in Normal Human and Cynomolgus Monkey Tissues and in Human Tumor Tissue Microarrays (123377) | 1) Develop a DLL3 IHC assay for FFPE tissues<br>2) Characterize DLL3 expression in normal human tissues, normal cynomolgus monkey tissues, and multiple human tumor types | Tissues and cell types from human and cynomolgus monkey | In vitro |
| Secondary Pharmacodynamics | DLL3 mRNA Expression by In Situ Hybridization (ISH) in Normal Cynomolgus Monkey Tissues (122642) | Examine DLL3 mRNA expression by ISH in a panel of normal cynomolgus monkey tissues | Tissues from cynomolgus monkey | In vitro |
| Secondary Pharmacodynamics | Measurement of DLL3 Transcript Levels in Cynomolgus Monkey Tissues Using Taqman Analysis (123875) | Measure DLL3 transcript levels in cynomolgus monkey tissues using RT-PCR analysis | Tissues from cynomolgus monkey | In vitro |
| Secondary Pharmacodynamics | mRNA Expression Assessment of DLL3 (123658) | Evaluate the mRNA expression of DLL3 | Tissue and cell types from human and cynomolgus monkey | In vitro |
| Secondary Pharmacodynamics | XpressWay Profile Report – DLL3: Non-isoform Specific (124207) | Evaluate the mRNA expression of DLL3 | Tissue from human | In vitro |
| Secondary Pharmacodynamics | XpressWay Profile Report – DLL3: Isoform Specific (124208) | Evaluate the mRNA expression of DLL3 | Tissue from human | In vitro |
| Secondary Pharmacodynamics | Platelet Activation Assay for DLL3 BiTE HLE: scFc CC (Lys-ve) (122111) | Determine if DLL3 BiTE HLE activated human and cynomolgus monkey platelets in vitro | Blood from human and cynomolgus monkey | In vitro |



Footnotes included on the last page of this table.

## 表 1　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：AMG 757

| Type of Study | Study Title (Study Number) | Study Objective | Test System | Method/Route of Administration |
|---|---|---|---|---|
| Safety Pharmacology | muS757: 1-Month Intravenous Toxicology Study in the BALB/c Mouse (153960) | Evaluate the potential toxicity of muS757 when administered by IV bolus injection once weekly for 4-weeks to BALB/c mice | BALB/c mice | IV injection |
| Safety Pharmacology | AMG 757: 10-Day Intravenous Toxicology Study in the Female Cynomolgus Monkey (121423) | Evaluate the potential toxicity of AMG 757 when administered by IV slow bolus injection to female cynomolgus monkeys on Days 1 and 8 | Cynomolgus monkeys | IV slow bolus injection |
| Safety Pharmacology | AMG 757: 28-Day Intravenous Infusion Toxicology Study in the Cynomolgus Monkeys with a 28-Day Recovery Period (121424) | Evaluate the potential toxicity of AMG 757 when administered by IV infusion to monkeys once weekly for 28 days with a 28-day recovery period | Cynomolgus monkeys | IV infusion |
| Safety Pharmacology | AMG 757: 3-Month Intravenous Toxicology Study in the Cynomolgus Monkey (122516) | Evaluate the potential toxicity of AMG 757 when administered by IV slow bolus injection once weekly for 3-months to cynomolgus monkeys | Cynomolgus monkeys | IV slow bolus injection |
| Pharmacodynamic Drug Interactions | Influence of Dexamethasone on AMG 757 Activity In Vitro (122718) | Investigate the influence of the glucocorticoid dexamethasone on AMG 757-induced T cell activation, cytokine release, and target cell lysis | DMS 79; SHP-77; human PBMC | In vitro |
| Pharmacodynamic Drug Interactions | Evaluation of AMG 757-mediated Induction of PD-1 Expression Following T Cell Redirected Lysis of Target Cells and Changes in Target Cell Killing Upon Combination of AMG 757 with an Anti-PD-1 Antibody (AMG 404) (R20190104) | Evaluate induction of PD-1 on T cells when co-incubated with target cells expressing DLL3 and AMG 757, and to evaluate combinations of AMG 757 and AMG 404 in in vitro T cell-dependent cellular cytotoxicity assay | GP2-293; SHP-77_Luc; SHP-77_Luc_GFP_PD-L1; COR-L279_Luc; COR-L279_Luc_GFP _PD-L1; human T cells | In vitro |



Footnotes included on the last page of this table.

## 表 1　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：AMG 757

| Type of Study | Study Title (Study Number) | Study Objective | Test System | Method/Route of Administration |
|---|---|---|---|---|
| Pharmacodynamic Drug Interactions | In Vitro Combination Studies of AMG 757 with Etoposide, Cisplatin or Carboplatin (155262) | Determine the bioactivity of AMG 757 in combination with etoposide, carboplatin, or cisplatin in in vitro cytotoxicity assays | COR-L279; DMS 79; SHP-77; human $CD3^+$ T cells | In vitro |
| Pharmacodynamic Drug Interactions | Evaluation of the Efficacy of AMG 757 Alone or in Combination with Carboplatin + Etoposide in the NCI-H82 Xenograft Model of SCLC (156568) | Evaluate the anti-tumor effect of AMG 757 alone and in combination with chemotherapy (carboplatin + etoposide) in an established NCI-H82-Luc xenograft model of SCLC in female NOD/SCID IL-2Rγ mice | Female NOD/SCID IL-2Rγ mice bearing NCI-H82-Luc tumor cells; human $CD3^+$ T cells | IV injection |



AMG 757 = bispecific single-chain antibody specific for DLL3 and CD3; BiTE = bispecific T cell engager; CD16 = also known as FcγRIII; CD16-2 = also known as FcγRIV; CD3 = surface antigen on T cells, subunit of T cell receptor complex; CD32 = also known as FcγRII; CD64 = also known as FcγRI; CHO = Chinese hamster ovary; CHO DHFR- = CHO cells deficient for dihydrofolate reductase; CHO-cyDLL3 = CHO cells transfected with cynomolgus DLL3; CHO-huDLL3 = CHO cells transfected with human DLL3; CNS = central nervous system; COR-L279 = human small cell lung carcinoma cell line; delGK = one glycine and one lysine removed; DHFR = dihydrofolate reductase; DLL3 = delta-like ligand 3; DMS 79 = human small cell lung carcinoma cell line,; F = female; FcγRI = Fc gamma receptor I; FcγRII/CD32 = Fc gamma receptor II; FcγRIII/CD16 = Fc gamma receptor III; FcγRIV/CD16-2 = Fc gamma receptor IV; FcRn = neonatal Fc receptor; FFPE = formalin-fixed, paraffin-embedded; GLP = Good Laboratory Practice; H-2171 = human small cell lung carcinoma cell line; HCT-116 = human colon carcinoma cell line; HLE = half-life extension; IHC = immunohistochemistry; IL-2Rγ = interleukin 2 gamma receptor; IP = intraperitoneal; ISH = in situ hybridization; IV = intravenous; M = male; MA = manufacturability assessment; MABEL = minimal anticipated biological effect level; Mec14 x I2C = bispecific single chain antibody specific for Mecoprop and CD3; mRNA = messenger ribonucleic acid; NEPC = neuroendocrine prostate cancer; NCI-H660 =human neuroendocrine prostate cancer cell line; NCI-H82 = human small cell lung carcinoma cell line; NCI-H889 = human small cell lung carcinoma cell line; NHP = non-human primate; NOAEL = no observed adverse effect level; NOD/SCID = non-obese diabetic, severe combined immunodeficiency mouse strain; RT-PCR = reverse transcription-polymerase chain reaction; scFc = single chain fragment crystallizable; SCLC = small cell lung cancer; SHP-77 = human small cell lung carcinoma cell line; SPR = surface plasmon resonance

## 表 2　安全性薬理試験

被験物質：AMG 757

| Type of Study | Species/ Strain | Method of Administration | Doses (mg/kg) | Sex and No. per Group | Organ System Evaluated | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Potential toxicity of muS757 | BALB/c mouse | IV bolus once weekly for 4 weeks | 0.05, 0.5, 4.5 | 10M, 10F | CNS | NOAEL was 4.5 mg/kg (4500 µg/kg)<br>No muS757-related effects on neurobehavioral assessment | No | 153960 |
| Potential toxicity of AMG 757 | Cynomolgus monkey | IV slow bolus on Days 1 and 8, in-life until Day 10 | 0.1, 1 | 2F | Vital function | NOAEL for all dosage levels<br>Limited increase in body temperature in 1 of 2 females at 1 mg/kg (1000 µg/kg) on Day 10 (41.5°C) | No | 121423 |
| Potential toxicity of AMG 757 | Cynomolgus monkey | 4-minute IV infusion, once weekly for 28 days | 0, 0.05, 0.5, 4.5 | 3M, 3F | Cardiovascular, CNS, Digestive, Excretory, Respiratory | NOAEL for all dosage levels<br>Increased heart rate on Day 2 for 0.5 and 4.5 mg/kg/dose but not on Day 23<br>Decreases in total T-, Th- and Tc-lymphocytes were observed after the second dose in 4 of 6 animals at 4.5 mg/kg/dose with a trend towards predose values by Day 29 | Yes | 121424 |
| Potential toxicity of AMG 757 | Cynomolgus monkey | IV slow bolus, once weekly for 3 months | 0, 0.05, 4.5 | 4M, 4F | Cardiovascular, CNS, Respiratory | NOAEL for all dosage levels; HNSTD is 4.5 mg/kg<br>No AMG 757-related changes in the ECG, respiration rates, or neurological exams. | Yes | 122516 |

BALB/c = inbred immune-competent albino mouse strain; CNS = central nervous system; ECG = electrocardiogram; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; HNSTD = highest non-severely toxic dose; IV = intravenous; M = male; NOAEL = no observed adverse effect level.