1 緒言

Gallium (^{68}Ga) gozetotide（[^{68}Ga]Ga-PSMA-11，以下，^{68}Ga-PSMA-11 と記載）は，前立腺特異的膜抗原（PSMA）を標的とした放射性診断薬であり，陽電子放出断層撮影（PET）による PSMA 陽性前立腺癌の診断のために開発された。[^{68}Ga]Ga-PSMA-11 は，^{68}Ga-PSMA-11 を指す新しい命名法によるものであるが，概要文では参照した引用文献及び試験報告書で記載された名称と一貫性を保つため ^{68}Ga-PSMA-11 と表記した。また，異なる核種の標識体である[^{67}Ga]Ga-PSMA-11 及び[^{nat}Ga]Ga-PSMA-11 は，それぞれ ^{67}Ga-PSMA-11 及び ^{nat}Ga-PSMA-11 と表記した。

PSMA は，葉酸ヒドロラーゼ又はグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ II としても知られる 2 型の膜貫通タンパク質であり，前立腺癌の画像診断や治療の生物学的標的として知られている（Silver et al. 1997，O'Keefe et al. 2018）。PSMA は，ポリ-γ-グルタミル葉酸に対し N-アセチル化-α-結合酸性ジペプチダーゼ（NAALADase）活性を有し，ペプチドからポリ-γ-グルタミン酸を順次遊離させる作用を有する（Pinto et al. 1996，Smith-Jones et al. 2000，Hillier et al. 2009）。PSMA は，ほぼすべての前立腺癌で高発現する。一方で，十二指腸粘膜，腎近位尿細管，唾液腺等の正常組織での発現レベルは前立腺癌の数百分の一と限定的である（Silver et al. 1997，Bostwick et al. 1998，Sokoloff et al. 2000，Ghosh and Heston 2004，Mannweiler et al. 2009）。さらに，PSMA の発現と進行性で悪性度の高い転移性アンドロゲン非依存性前立腺癌の進展には相関が認められている（Wright et al. 1995，Silver et al. 1997，Bostwick et al. 1998，Murphy et al. 1998，Sweat et al. 1998，Ross et al. 2003，Queisser et al. 2015）。腫瘍組織と非腫瘍組織との間で PSMA の発現レベルに差があることから，PSMA を標的とした放射性診断及び放射線治療は共に支持されており，転移性去勢抵抗性前立腺癌（mCRPC）患者にとって有用と考えられる。

当初，PSMA の酵素活性を直接阻害する低分子リガンドの開発に焦点が当てられた（Zhou et al. 2005，Tsukamoto et al. 2007，Barinka et al. 2008）。そして，PSMA を標的とした放射性リガンド療法や診断法が開発された（Hillier et al. 2009，Maresca et al. 2009，Benešová et al. 2015）。^{68}Ga-PSMA-11 は，PSMA を標的とした放射性診断薬であり，前立腺癌患者における PSMA 陽性病変の診断のために開発されている。

^{68}Ga-PSMA-11 は，PSMA-11 を ^{68}Ga で標識することにより調製される。PSMA-11 は，OH-Glu-CO-Lys(Ahx-CC-HBED)-OH とも表記される。その構造式を Figure 1-1 に示す。PSMA-11 のように分子量が小さい化合物は，固形癌に高い透過性を有し循環血中から速やかに消失することから，画像診断及び治療薬のいずれの適用にとっても利点を有する。^{68}Ga-PSMA-11 が有するグルタミン酸-尿素-リジン構造は，PSMA に高い結合親和性を示し，PSMA に結合後，エンドサイトーシスを介する内在化により標的がん細胞内に取り込まれ保持される（Rajasekaran et al. 2003，Eder et al. 2012）。標識された ^{68}Ga から放出される陽電子（β^+線）が PET による PSMA 陽性病変の同定を可能とする。

以下に，効能又は効果及び用法及び用量（案）を記載する。

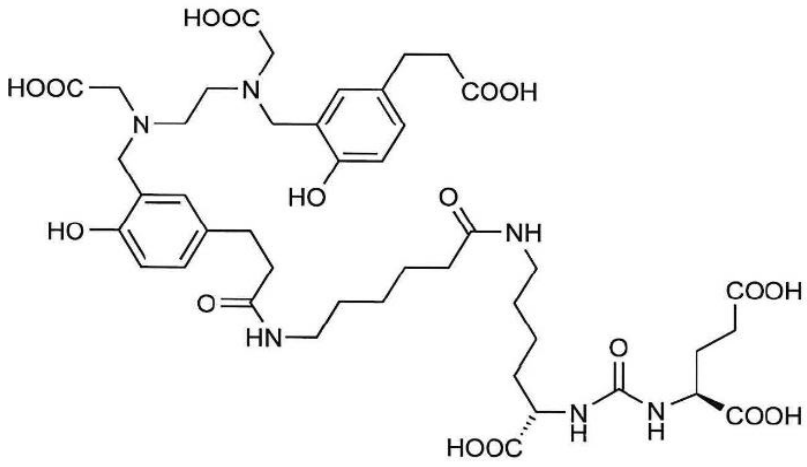
効能又は効果

ガリウム（^{68}Ga）を用いた標識後に，前立腺癌を有する成人の前立腺特異的膜抗原（PSMA）陽性病変の陽電子放出断層撮影（PET）による PSMA 標的療法の適応となる前立腺癌患者の選択

用法及び用量

通常，成人にはガリウム（^{68}Ga）ゴゼトチドとして 111 MBq（3 mCi）～259 MBq（7 mCi）を静脈内投与する。

Figure 1-1　　PSMA-11 の構造式



^{68}Ga-PSMA-11 は PSMA-11 を ^{68}Ga で標識することにより調製される。PSMA-11 の分子式は $C_{44}H_{62}N_6O_{17}$，分子量は 947.0 g/mol である。放射性医薬品調製キットには，有効成分の放射線分解抑制及び安定性確保のための添加剤として酢酸ナトリウム水和物，塩化ナトリウム，及びゲンチジン酸が含まれている。最大活性 1110 MBq を有する ^{68}Ga-PSMA-11 溶液が画像撮影のための放射性診断薬である。

2　　参考文献

[Barinka C, Byun Y, Dusich CL, et al. (2008)] Interactions between human glutamate carboxypeptidase II and urea-based inhibitors: structural characterization. J Med Chem; 51(24):7737-43.

[Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. (2015)] Preclinical evaluation of a tailor-made DOTA-conjugated PSMA inhibitor with optimized linker moiety for imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. J. Nucl Med; 56(6):914-20.

[Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, et al. (1998)] Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 case. Cancer; 82(11):2256-61.

[Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. (2012)] ^{68}Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. Bioconjug Chem; 23(4):688-97.

[Ghosh A and Heston WD (2004)] Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. J Cell Biochem; 91(3):528-39.

[Hillier SM, Maresca KP, Femia FJ, et al. (2009)] Preclinical evaluation of novel glutamate-urea-lysine analogues that target prostate-specific membrane antigen as molecular imaging pharmaceuticals for prostate cancer. Cancer Res; 69(17):6932-40.

[Mannweiler S, Amersdorfer P, Trajanoski S, et al. (2009)] Heterogeneity of prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate carcinoma with distant metastasis. Pathol Oncol Res; 15:167-72.

[Maresca KP, Hillier SM, Femia FJ, et al. (2009)] A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer. J Med Chem; 52(2):347-57.

[Murphy GP, Elgamal AA, Su SL, et al. (1998)] Current evaluation of the tissue localization and diagnostic utility of prostate specific membrane antigen. Cancer; 83(11):2259-69.

[O'Keefe DS, Bacich DJ, Huang SS, et al. (2018)] A perspective on the evolving story of PSMA biology, PSMA-based imaging, and endoradiotherapeutic strategies. J Nucl Med; 59(7):1007-13.

[Pinto JT, Suffoletto BP, Berzin TM, et al. (1996)] Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. Clin Cancer Res; 2:1445-51.

[Queisser A, Hagedorn SA, Braun M, et al. (2015)] Comparison of different prostatic markers in lymph node and distant metastases of prostate cancer. Mod Pathol; 28(1):138-45.

[Rajasekaran SA, Anilkumar G, Oshima E, et al. (2003)] A novel cytoplasmic tail MXXXL motif mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen. Mol Biol Cell; 14(12):4835-45.

[Ross JS, Sheehan CE, Fisher HA, et al. (2003)] Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. Clin Cancer Res; 9(17):6357-62.

[Silver DA, Pellicer I, Fair WR, et al. (1997)] Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. Clin Cancer Res; 3:81-5.

[Smith-Jones PM, Vallabahajosula S, Goldsmith SJ, et al. (2000)] In vitro characterization of radiolabeled monoclonal antibodies specific for the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen. Cancer Res; 60(18):5237-43.

[Sokoloff RL, Norton KC, Gasior CL, et al. (2000)] A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: Levels in tissues, seminal fluid and urine. Prostate; 43:150-7.

[Sweat SD, Pacelli A, Murphy GP, et al. (1998)] Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. Urology; 52(4):637-40.

[Tsukamoto T, Wozniak KM, Slusher BS (2007)] Progress in the discovery and development of glutamate carboxypeptidase II inhibitors. Drug Disc Today; 12(17-18):767-76.

[Wright GL Jr, Haley C, Beckett ML, et al. (1995)] Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. Urol Oncol; 1(1):18-28.

[Zhou J, Neale JH, Pomper MG, et al. (2005)] NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy. Nat Rev Drug Discov; 4:1015-26.

目　次

目　次 2
図 一 覧 2
略号一覧 3
1 薬理試験の概要文 4
2 効力を裏付ける試験 4
2.1 *In vitro* 薬理 4
2.1.1 PSMA に対する結合親和性 4
2.1.2 細胞内取り込み及び内在化 5
2.2 *In vivo* 薬理 6
2.2.1 担癌マウスにおける体内分布及び集積 6
2.3 作用機序 7
3 副次的薬理試験 8
3.1 オフターゲット作用の検討 8
3.2 PSMA-11 の細胞に対する作用 8
4 安全性薬理試験 8
4.1 *In vitro* 安全性薬理試験 8
4.1.1 hERG チャネル電流に及ぼす影響 8
4.2 *In vivo* 安全性薬理試験 9
4.2.1 中枢神経系に及ぼす影響 9
4.2.2 呼吸系に及ぼす影響 9
4.2.3 心血管系に及ぼす影響 10
5 薬力学的薬物相互作用試験 10
6 考察及び結論 10
7 参考文献 11

図 一 覧

Figure 2-1 ^{nat}Ga-PSMA-11 の PSMA に対する結合親和性及び NAALADase 阻害活性 5
Figure 2-2 PSMA 陽性 PC-3 PIP（a）及び PSMA 陰性 PC-3 flu 細胞（b）を用いた PSMA 標的放射性リガンドの取り込みと内在化 6
Figure 2-3 PSMA 陽性 PC-3 PIP 細胞及び PSMA 陰性 PC-3 flu 細胞を異種移植したマウスに ^{68}Ga-PSMA-11 を投与した 2 時間後の PET/CT 画像 7

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
BCA	bicinchoninic acid	ビシンコニン酸
Cmax	maximal drug plasma (serum/blood) concentration	最高血漿（血清／血液）中薬物濃度
CT	computerized tomography	コンピュータ断層撮影
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK-293	human embryonic kidney-293	ヒト胎児腎細胞 293
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC50	half maximal (50%) inhibitory concentration	50%阻害濃度
keV	kiloelectronvolt	キロ電子ボルト
Ki	inhibition constant	阻害定数
LNCaP	lymph node carcinoma of the prostate	-
MBq	megabecquerel	メガベクレル
mCRPC	metastatic castration-resistant prostate cancer	転移性去勢抵抗性前立腺癌
NAALADase	N-acetylated-α-linked-acidic dipeptidase	N-アセチル化-α-結合酸性ジペプチダーゼ
PET	positron emission tomography	陽電子放射断層撮影
PSMA	prostate-specific membrane antigen	前立腺特異的膜抗原
rhPSMA	recombinant human PSMA	遺伝子組み換えヒト PSMA
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	-
^{68}Ga	gallium-68	ガリウム 68

1 薬理試験の概要文

前立腺特異的膜抗原（PSMA）は，葉酸ヒドロラーゼ又はグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ II としても知られる膜貫通タンパク質であり，前立腺癌の画像診断や治療の生物学的標的として確立されている（Silver et al. 1997，O'Keefe et al. 2018）。PSMA は，ほぼすべての前立腺癌で高発現している。一方で，十二指腸粘膜，腎近位尿細管，唾液腺等の正常組織での発現レベルは前立腺癌の数百分の一と限定的である（Silver et al. 1997，Bostwick et al. 1998，Sokoloff et al. 2000，Ghosh and Heston 2004，Mannweiler et al. 2009）。さらに，PSMA の発現と進行性で悪性度の高い転移性アンドロゲン非依存性前立腺癌への進展には相関が認められている（Wright et al. 1995，Silver et al. 1997，Bostwick et al. 1998，Murphy et al. 1998，Sweat et al. 1998，Ross et al. 2003，Queisser et al. 2015）。腫瘍と非腫瘍組織との間で PSMA の発現量に差があることから，PSMA を標的とした放射性診断及び放射線治療を行う両者の戦略は支持されており，このような診断及び治療法は転移性去勢抵抗性前立腺癌（mCRPC）患者にとって重要な選択肢となり得るものと考えられる。

Gallium (^{68}Ga) gozetotide（[^{68}Ga]Ga-PSMA-11，以下 ^{68}Ga-PSMA-11 と記載）は，PSMA を標的とした放射性診断薬であり，陽電子放射断層撮影（PET）による PSMA 陽性病変同定のために開発された。

^{68}Ga-PSMA-11 は，PSMA リガンドであるグルタミン酸-尿素-リジン［Glu-urea-Lys(Ahx)］に放射性核種 ^{68}Ga で標識されたキレーターである N,N'-bis [2-hydroxy-5-(carboxyethyl)benzyl]ethylenediamine-N,N'-diacetic acid（HBED-CC）が結合したものである（Eder et al. 2012）。グルタミン酸-尿素-リジン構造は PSMA に高い結合親和性を示し，^{68}Ga-PSMA-11 は PSMA に結合後，エンドサイトーシスを介する内在化により標的のがん細胞に取り込まれ，細胞内に保持される（Rajasekaran et al. 2003，Eder et al. 2012）。PSMA のこの特徴により，がん細胞を標的として優れた薬物動態特性と透過性を備えた低分子の放射性医薬品開発が可能となる（Haberkorn et al. 2016）。

画像診断に用いる放射性医薬品の特性を明らかにするため，非標識体である PSMA-11，^{68}Ga-PSMA-11，異なる核種を標識した ^{67}Ga-PSMA-11 及び ^{nat}Ga-PSMA-11 を用いて薬理試験を実施した。

2 効力を裏付ける試験

2.1 *In vitro* 薬理

2.1.1 PSMA に対する結合親和性

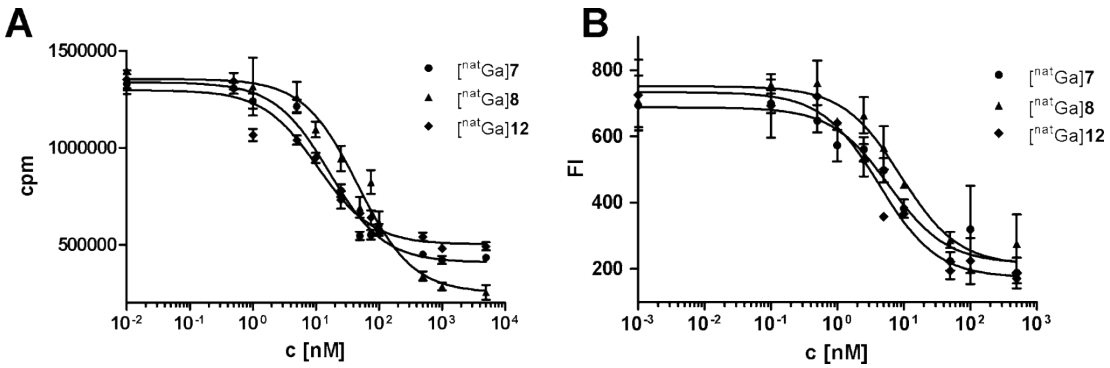
PSMA-11 の PSMA に対する結合親和性について，PSMA 陽性 LNCaP 細胞を用いたリガンド競合アッセイ並びに N-アセチル化-α-結合酸性ジペプチダーゼ（NAALADase）活性を指標とした酵素阻害アッセイにより検討した（Figure 2-1）（Eder et al. 2012）。

リガンド競合アッセイでは，LNCaP 細胞（1×10^5 個/ウェル）を ^{nat}Ga（硝酸ガリウム III）標識 PSMA-11（最終濃度 0～5000 nM）存在下で ^{67}Ga-PSMA-11（0.2 nM）と室温で 1 時間インキュベーションし，細胞を洗浄後，結合放射能をガンマカウンターで測定した。非線形回帰モデルを用いて Ki 値を求めたところ，Ki 値は 12.0 ± 2.8 nM（平均値 ± 標準偏差，n = 4）であった。

NAALADase 阻害アッセイでは，基質として Ac-Asp-Glu（最終濃度 40 µM）を用い，アッセイ用緩衝液中で終濃度 0.05～1000 nM の ^{nat}Ga-PSMA-11 と混合した。その後，rhPSMA 溶液（0.4 µg/mL）を添加し，37°C で 1 時間インキュベーションした。95°C で 5 分間の加熱により反応を停止させた後，マイクロプレートリーダー（励起波長 330 nm，蛍光波長 450 nm）にて蛍光強度を測定した。GraphPad Prism を用いて非線形回帰により IC50 値を求めたところ，IC50 値は 7.5 ± 2.2 nM（平均値 ± 標準偏差，n = 4）であった。

以上の成績から PSMA-11 の PSMA に対する高い結合親和性が示された。

Figure 2-1　　^{nat}Ga-PSMA-11 の PSMA に対する結合親和性及び NAALADase 阻害活性



Source：Eder et al. 2012

^{nat}Ga：硝酸ガリウム III，[^{nat}Ga]7：[^{nat}Ga]PSMA-11，[^{nat}Ga]8：[^{nat}Ga]Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA，[^{nat}Ga]12：[^{nat}Ga]8 とは別の PSMA リガンドと DOTA との複合体

A：PSMA-11 の PSMA に対する結合親和性について，PSMA 陽性 LNCaP 細胞と PSMA に対する放射性リガンド ^{67}Ga-PSMA-11 を用いた競合アッセイで検討した。値はガンマカウンターで測定したときの細胞に結合した放射能（cpm）を示す。

B：NAALADase 活性の酵素阻害を指標に PSMA に対する結合親和性について検討した。マイクロプレートリーダー（励起波長 330 nm，蛍光波長 450 nm）で蛍光強度（FI）を測定し，酵素阻害活性を評価した。

値は平均値 ± 標準偏差で示す（n = 4）

2.1.2　細胞内取り込み及び内在化

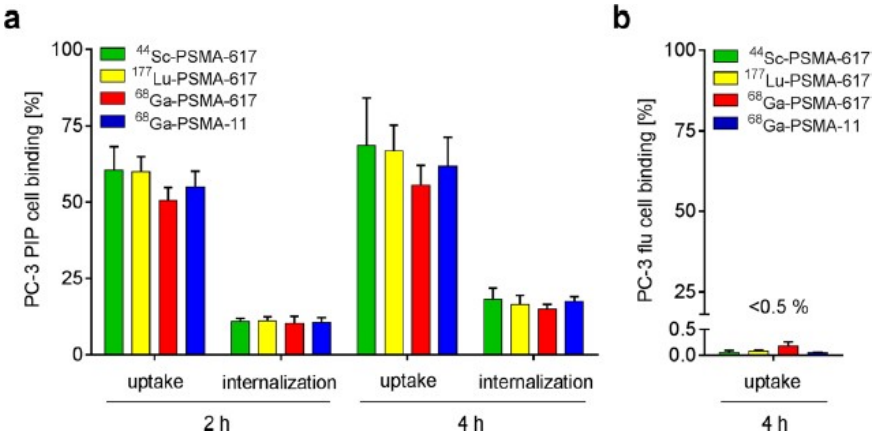
PSMA 陽性のヒト前立腺癌細胞である PC-3 PIP 細胞を用いて ^{68}Ga-PSMA-11 の細胞内取り込みを評価した（Umbricht et al. 2017）。なお，PSMA への特異性を検討するため，PSMA 陰性のヒト前立腺癌細胞（PSMA 陰性 PC-3 flu）の細胞内取り込みについても評価した。

PC-3 PIP 又は PC-3 flu 細胞を 12 ウェルプレートに播種し（5×10^5 細胞/ウェル），37°C で一晩培養した後，放射性標識 PSMA リガンド（25 µL，7.5 pmol）と 37°C で 2 又は 4 時間インキュベー

ションした。インキュベーション終了後，放射性リガンドの総取り込み量（細胞表面上の PSMA 結合画分と内在化画分）を測定した。プレート洗浄後，各ウェルに NaOH（1 M，1 mL）を加えて細胞を溶解した後，細胞懸濁液サンプルをガンマカウンターで測定し，放射性リガンドの内在化率を測定した。細胞懸濁液をホモジナイズした後，Micro BCA タンパク質 Assay キットを用いて各サンプルのタンパク量を測定し，放射能の補正に用いた。

その結果，PC-3 PIP 細胞では，^{68}Ga-PSMA-11 添加後 2 時間又は 4 時間で添加量の約 55%～70%が細胞内に取り込まれ，約 10%～15%が内在化した（Figure 2-2）。一方，PSMA 陰性 PC-3 flu 細胞では，^{68}Ga-PSMA-11 の取り込みは 0.5%未満に低下し，^{68}Ga-PSMA-11 の PSMA 特異的な取り込みと内在化が確認された。

Figure 2-2　PSMA 陽性 PC-3 PIP（a）及び PSMA 陰性 PC-3 flu 細胞（b）を用いた PSMA 標的放射性リガンドの取り込みと内在化



Source：Umbricht et al. 2017

uptake：取り込み，internalization：内在化

図の縦軸は 300 µg/mL タンパク質あたりの全添加放射能に対するパーセンテージ（平均値 ± 標準偏差）

2.2　*In vivo* 薬理

2.2.1　担癌マウスにおける体内分布及び集積

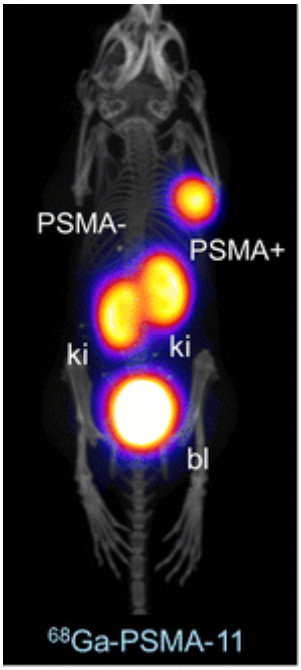
PSMA 陽性 PC-3 PIP 細胞又は PSMA 陰性 PC-3 flu 細胞を異種移植したマウスを用い，PET/CT により ^{68}Ga-PSMA-11 の体内分布及び腫瘍への集積を検討した。

雌胸腺欠損ヌードマウス（Balb/c nude）の右肩に PC-3 PIP 細胞（6×10^6個），左肩に PC-3flu 細胞（5×10^6個）を皮下移植した。移植から 2 週間後に ^{68}Ga-PSMA-11（約 5 MBq，1 nmol）を静脈内投与し，投与 2 時間後に小動物用ベンチトップ PET/CT スキャナーを用いて PET/CT スキャン（150 keV～650 keV）を実施した。

その結果，右肩の PSMA 陽性 PC-3 PIP 腫瘍に顕著な ^{68}Ga-PSMA-11 の集積が認められたが，左肩の PC-3 flu 腫瘍では集積は観察されなかった（Figure 2-3）。また，腎臓での放射能の集積及び膀胱への排泄も明らかであった。

以上より，^{68}Ga-PSMA-11 は PSMA 特異的に分布することから，精度や感度の高い PSMA 陽性腫瘍の画像化に寄与する可能性が示された。

Figure 2-3　PSMA 陽性 PC-3 PIP 細胞及び PSMA 陰性 PC-3 flu 細胞を異種移植したマウスに ^{68}Ga-PSMA-11 を投与した 2 時間後の PET/CT 画像



Source：Umbricht et al. 2017

PSMA+：PSMA 陽性 PC-3 PIP 腫瘍，PSMA-：PSMA 陰性 PC-3 flu 腫瘍，ki：腎臓，bl：膀胱

担癌マウス背部の CT 像。画像解析には VivoQuant® ソフトウェア（ガウシアンフィルタ：1 mm）を用いた。膀胱で最も強い X 線強度がみられ，腎臓と右肩の腫瘍において同程度の X 線強度がみられている。

2.3　作用機序

^{68}Ga-PSMA-11 は，PSMA を高発現する前立腺癌を含む PSMA 発現細胞に結合し，標識部位の HBED-CC 部分から放出される陽電子（β^+線）が PET による PSMA 陽性病変の同定を可能とする（Eder et al. 2012）。^{68}Ga-PSMA-11 は PSMA に結合するだけでなく，標的であるがん細胞に取り込まれ内在化されるが，血中やほとんどの正常組織から速やかに消失する。^{68}Ga-PSMA-11 の PSMA 選択的な取り込みと内在化は，その速やかな全身クリアランスと併せて，PSMA 標的療法の適用となる前立腺癌患者を診断するための重要な特徴である。

3 副次的薬理試験

3.1 オフターゲット作用の検討

PSMA-11 のオフターゲット作用について検討する目的で，87 種類の受容体，イオンチャネル，酵素，又はトランスポーターに対する結合親和性又は阻害活性を評価した[Table2.6.3.1-100053460-3]。結合親和性は標的に対する放射性標識リガンドを用いた競合試験により，また，酵素阻害は各基質を用いた生化学試験により評価した。本試験では PSMA-11 濃度として 10 μM を用いた。これはヒトに ^{68}Ga-PSMA-11 の予定最高臨床用量 25 μg を投与した際の推定 Cmax（10 nM）の約 1000 倍の濃度である。

その結果，PSMA-11 を 10 μM処置することにより 50%を超える競合阻害や酵素活性阻害はみられなかった。

3.2 PSMA-11 の細胞に対する作用

非標識 PSMA-11 が細胞に対して作用を示すかどうか検討するために，PSMA 陽性 22RV1 細胞及び PSMA 陰性 KB 細胞を用いて評価した[Table 2.6.3.1-R-0587]。

PSMA 陽性 22RV1 細胞又は PSMA 陰性 KB 細胞（1×10^5 個）を 24 ウェルプレートに播種し，葉酸含有 RPMI1640 培地又は FDRPMI 培地を用いて 10%FBS 存在下で培養した。翌日から PSMA-11（最終濃度 1.0 nM～10 μM）とのインキュベーションを開始し，72 時間後に細胞を洗浄した後，チミジン取り込みアッセイを実施して生細胞数を測定した。

その結果，PSMA-11 処置ではいずれの濃度においても生細胞数の明らかな減少はみられなかった。PSMA 陽性細胞に対して PSMA-11 濃度依存的に細胞数の減少傾向がわずかに認められるものの，最高濃度（10 μM）以外での細胞生存率はほぼ 100%又はそれ以上であった。このことから，PSMA-11 は PSMA 陽性細胞及び PSMA 陰性細胞に対して影響を及ぼさないことが確認された。

4 安全性薬理試験

PSMA-11 を用いた安全性薬理コア・バッテリー試験を実施した。試験は医薬品規制調和国際会議ガイドライン S7A に従い，「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）」を遵守し，欧州連合加盟国，経済協力開発機構加盟国，又はデータ相互受け入れ制度参加国の受託研究機関の GLP 適合試験施設で実施した。

4.1 *In vitro* 安全性薬理試験

4.1.1 hERG チャネル電流に及ぼす影響

PSMA-11 の hERG（human ether-à-go-go-related gene）チャネル電流に及ぼす影響について，hERG 遺伝子を安定的に発現させた HEK-293 細胞に PSMA-11 の 0（媒体），1.0，10，及び

100 µM を適用し，パッチクランプ法で検討した[Table 2.6.3.4-20200008PEHPP]。媒体は Tyrode 溶液を用い，陽性対照として E-4031（100 nM）を用いた。

その結果，PSMA-11 は 1.0，10，及び 100 µM の濃度で hERG 電流をそれぞれ 8 ± 4%，15 ± 4%，及び 17 ± 5%（平均値 ± 標準誤差）阻害した。対照群での最大阻害率は 10%未満であり，陽性対照薬の E-4031（100 nM）は hERG 電流を 91%阻害した。

本試験での最高濃度 100 µM はヒトに ^{68}Ga-PSMA-11 の予定最高臨床用量 25 µg を投与した際の推定 Cmax（10 nM）の約 10000 倍である。当該濃度下でも hERG 電流への影響は認められなかったことから，PSMA-11 が臨床において hERG 電流に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

4.2 *In vivo* 安全性薬理試験

4.2.1 中枢神経系に及ぼす影響

各群 5 例の SD 系雄性ラットに PSMA-11 を 0（媒体），0.08，0.25，及び 0.75 mg/kg の用量で単回静脈内投与し，投与後 5，15，30 分，1，2，及び 24 時間に Irwin 法により行動，神経，自律神経系への影響を評価した[Table 2.6.3.4-A3756]。また，投与後 6 日まで死亡及び症状観察を実施した。対照群には媒体（塩化ナトリウム 40 mg/mL を含む酢酸ナトリウム緩衝液）を投与した。

その結果，投与後 24 時間まで Irwin 法による評価項目に影響は認められなかった。また，投与後 6 日間，死亡例はみられず，異常な症状も観察されなかった。

以上，PSMA-11 を 0.75 mg/kg まで投与しても，ラットの中枢神経系に影響は認められなかった。ヒトの体表面積を平均 1.7 m^2 として体表面積換算した場合，0.75 mg/kg は予定最高臨床用量 25 µg の約 300 倍に相当する。

4.2.2 呼吸系に及ぼす影響

各群 8 例の SD 系雄性ラットに PSMA-11 を 0（媒体），0.08，0.25，及び 0.75 mg/kg の用量で単回静脈内投与し，全身プレチスモグラフィーにより呼吸機能へ及ぼす影響を評価した [Table 2.6.3.4-A3757]。投与前，並びに投与後 5，15，30 分，1，1.5，2，及び 3 時間に呼吸パラメータ（吸気及び呼気時間，最大及び最小換気量，分時換気量，1 回換気量，及び呼吸数）を測定した。対照群には媒体として塩化ナトリウム 40 mg/mL を含む酢酸ナトリウム緩衝液を投与し，陽性対照群にはテオフィリン（20 mg/kg）を静脈内投与した。

その結果，PSMA-11 群では呼吸パラメータに毒性変化及び生物学的に意義ある変化は認められなかった。一方，テオフィリン（20 mg/kg）群では，ほぼすべての測定時点で，対照群及び投与前値と比較して統計的に有意な呼吸パラメータの変化が認められた。

以上，PSMA-11 を 0.75 mg/kg まで投与しても，ラットの呼吸系に影響は認められなかった。ヒトの体表面積を平均 1.7 m^2 として体表面積換算した場合，0.75 mg/kg は予定最高臨床用量 25 µg の約 300 倍に相当する。

4.2.3 心血管系に及ぼす影響

テレメトリー装置を装着した 4 例の覚醒下雄性ゲッチンゲンミニブタに，クロスオーバーデザインで，PSMA-11 の 0（媒体），0.03，0.09，及び 0.29 mg/kg を 7 日間ごとに単回静脈内投与し，心血管機能へ及ぼす影響を評価した[Table2.6.3.4-A3758]。投与前，並びに投与後 5，15，30 分，1，2，4，8，及び 24 時間に，収縮期血圧，拡張期血圧，平均動脈血圧，心拍数，及び心電図を測定した。対照群には媒体（塩化ナトリウム 40 mg/mL を含む酢酸ナトリウム緩衝液）を投与した。

その結果，投与前値及び対照群と比較して，PSMA-11 群の心拍数及び血圧に毒性変化は認められず，心電図（PR，RR，QT，QTcB，QTcF，QTcV 間隔，及び QRS 時間）にも有意な変化はみられなかった。また，心電図波形に PSMA-11 投与に関連した変化は認められなかった。

以上，PSMA-11 を 0.29 mg/kg まで投与しても，覚醒下ミニブタの心血管系に影響は認められなかった。ヒトの体表面積を平均 1.7 m^2 として体表面積換算した場合，0.29 mg/kg は予定最高臨床用量 25 µg の約 680 倍に相当する。

5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6 考察及び結論

PSMA は前立腺癌細胞に発現する膜貫通タンパク質であり，正常組織での発現は限られている。また，PSMA はリガンド結合後に内在化する特性を有することから，新たに PSMA を標的とした放射性リガンドによる診断への期待が高まっている。^{68}Ga-PSMA-11 は PSMA を標的とした放射性診断薬であり，PET による PSMA 陽性病変同定のために開発された。

^{67}Ga-PSMA-11 は前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞上の PSMA に対して高い結合親和性を示し，Ki 値は 12.0 ± 2.8 nM であった。さらに，PSMA は NAALADase 活性を有することから，本酵素活性の阻害を指標に ^{nat}Ga-PSMA-11 の PSMA に対する結合親和性について検討したところ，IC50 値は 7.5 ± 2.2 nM であった。

^{68}Ga-PSMA-11 は PSMA 陽性前立腺癌細胞に対して結合親和性が高く，PSMA 陽性前立腺癌細胞内に取り込まれ，内在化することが示されたが，PSMA 陰性前立腺癌細胞では細胞内への取り込みは認められなかった。

PSMA 陽性 PC-3 PIP 及び PSMA 陰性 PC-3 flu 細胞を異種移植したマウスを用いて体内分布試験を実施したところ，^{68}Ga-PSMA-11 は静脈内投与後に腫瘍への顕著な取り込みが PET/CT により確認され，腎臓及び膀胱以外にその他組織への集積は観察されなかった。

副次的薬理試験では，PSMA-11 のオフターゲット作用について検討する目的で，87 種類の受容体，イオンチャネル，酵素，又はトランスポーターに対する結合親和性又は阻害活性を評価した。その結果，PSMA-11 の 10 µM の処置により 50%を超える競合阻害や酵素活性の阻害はみられなかった。さらに，PSMA-11 は，ヒトでの推定 Cmax より 1000 倍高い濃度においても PSMA 陽性及

び PSMA 陰性細胞株に対して影響を及ぼさなかったことから，PSMA-11 は臨床においてオフターゲット作用を示す可能性は低いと考えられた。

PSMA-11 を用いた安全性薬理試験において，中枢神経系，呼吸系，及び心血管系に対する影響は認められなかった。各 *in vivo* 安全性薬理試験の最高用量は，^{68}Ga-PSMA-11 の予定最高臨床用量 25 µg を投与したときの非標識 PSMA-11 総量と比較して，300～680 倍であった。

Table 6-1 安全性薬理試験における非標識 PSMA-11 の安全域

試験の種類	動物種	無毒性量 (mg/kg) [a]	ヒト等価用量 (mg/m^2) [b]	安全域 [c]
中枢神経系	ラット	0.75	4.5 [d]	300
呼吸系	ラット	0.75	4.5 [d]	300
心血管系	ミニブタ	0.29	10.2 [e]	680

a = PSMA-11 の用量
b = 体表面積換算用量
c = PSMA-11 ペプチド（標識＋非標識の全質量）の予定臨床最高用量を 25 µg/1.7 m^2（0.015 mg/m^2）とした。
d = 体表面積換算係数を 6 として算出
e = 体表面積換算係数を 35 として算出

以上より，^{68}Ga-PSMA-11 の PSMA 陽性病変前立腺癌患者を診断する放射性診断薬としての有用性が示された。

7 参考文献

[Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, et al. (1998)] Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 case. Cancer; 82(11):2256-61.

[Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. (2012)] ^{68}Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. Bioconjug Chem; 23(4):688-97.

[Ghosh A and Heston WD (2004)] Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. J Cell Biochem; 91(3):528-39.

[Haberkorn U, Eder M, Kopka K, et al. (2016)] New strategies in prostate cancer: prostate-specific membrane antigen (PSMA) ligands for diagnosis and therapy. Clin Cancer Res; 22(1):9-15.

[Mannweiler S, Amersdorfer P, Trajanoski S, et al. (2009)] Heterogeneity of prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate carcinoma with distant metastasis. Pathol Oncol Res; 15:167-72.

[Murphy GP, Elgamal AA, Su SL, et al. (1998)] Current evaluation of the tissue localization and diagnostic utility of prostate specific membrane antigen. Cancer; 83(11):2259-69.

[O'Keefe DS, Bacich DJ, Huang SS, et al. (2018)] A perspective on the evolving story of PSMA biology, PSMA-based imaging, and endoradiotherapeutic strategies. J Nucl Med; 59(7):1007-13.

[Queisser A, Hagedorn SA, Braun M, et al. (2015)] Comparison of different prostatic markers in lymph node and distant metastases of prostate cancer. Mod Pathol; 28(1):138-45.

[Rajasekaran SA, Anilkumar G, Oshima E, et al. (2003)] A novel cytoplasmic tail MXXXL motif mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen. Mol Biol Cell; 14(12):4835-45.

[Ross JS, Sheehan CE, Fisher HA, et al. (2003)] Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. Clin Cancer Res; 9(17):6357-62.

[Silver DA, Pellicer I, Fair WR, et al. (1997)] Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. Clin Cancer Res; 3:81-5.

[Sokoloff RL, Norton KC, Gasior CL, et al. (2000)] A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine. Prostate; 43:150-7.

[Sweat SD, Pacelli A, Murphy GP, et al. (1998)] Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. Urology; 52(4):637-40.

[Umbricht CA, Benešová M, Schmid RM, et al. (2017)] ^{44}Sc-PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with ^{177}Lu-PSMA-617-preclinical investigations in comparison with ^{68}Ga-PSMA-11 and ^{68}Ga-PSMA-617. EJNMMI Res; 7(1):9.

[Wright GL Jr, Haley C, Beckett ML, et al. (1995)] Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. Urol Oncol; 1(1):18-28.

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.3.1　薬理試験一覧表 4
2.6.3.2　薬効を裏付ける試験 5
2.6.3.3　副次的薬理試験 5
2.6.3.4　安全性薬理試験 6
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 7

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
Balb/c	in-bred strain of albino mice	-
CT	computerized tomography	コンピュータ断層撮影
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
iv	intravenous	静脈内
HEK-293	human embryonic kidney-293	ヒト胎児腎細胞 293
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
LNCaP	human lymph node carcinoma of the prostate	-
NA	not applicable	該当なし
PC-3	human prostate cancer cell line	-
PC-3 PIP	PC-3 cells transfected to express human PSMA	-
PC-3 flu	PC-3 cells that do not express PSMA, but that have been transduced with the flu peptide as a control cell line	-
PET	positron emission tomography	陽電子放出断層撮影
PSMA	prostate-specific membrane antigen	前立腺特異的膜抗原
$PSMA^{[+]}$	PSMA-positive	前立腺特異的膜抗原陽性
$PSMA^{[-]}$	PSMA-negative	前立腺特異的膜抗原陰性
^{68}Ga-PSMA-11	[^{68}Ga]Ga-PSMA-11	-

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing Facility	Report number or literature reference	Location in CTD
効力を裏付ける試験					
> *In vitro* 薬理試験					
Binding affinity of ^{68}Ga-PSMA-11 for PSMA in cell based and enzymatic assays	Determination of PSMA-binding affinity in a cell-based competitive binding assay in PSMA$^{[+]}$ human LNCaP cells and determination of enzymatic inhibition using purified recombinant human PSMA	*In vitro* (cellular and biochemical assays)	German Cancer Research Center	[Eder et al 2012]	-
Uptake and internalization study using PC-3 PIP and PC-3 flu cells	Determination of the PSMA-dependent uptake and internalization of ^{68}Ga-PSMA-11 in PSMA$^{[+]}$ PC-3 PIP and PSMA$^{[-]}$ PC-3 flu human prostate cancer cells	*In vitro* (cellular assays)	Center for Radiopharmaceutical Science ETH-PSI-USZ	[Umbricht et al 2017]	-
> *In vivo* 薬理試験					
Imaging (PET/CT) of ^{68}Ga-PSMA-11 in tumor-bearing athymic balb/c mice	PET/CT of ^{68}Ga-PSMA-11 biodistribution in mice bearing PSMA$^{[+]}$ PC-3 PIP and PSMA$^{[-]}$ PC-3 flu prostate cancer xenografts	*In vivo* (intravenous)	Center for Radiopharmaceutical Science ETH-PSI-USZ	[Umbricht et al 2017]	-
副次的薬理試験					
> *In vitro* 薬理試験					
Off-target receptor binding and functional profiling of PSMA-11 against 87 potential different targets	The in vitro inhibition was evaluated in competitive radioligand binding and enzymatic inhibition biochemical assays with PSMA-11 at a concentration of 10 µM	*In vitro*	Eurofins Cerep	[100053460-3]	4.2.1.2-1
Non-radioactive cytotoxicity screen to evaluate radiation-independent pharmacologic effects of PSMA-11	*In vitro* cytotoxicity of PSMA-11 in PSMA$^{[+]}$ and PSMA$^{[-]}$ cells lines at a concentration range of 1.0 nM to 10 µM	*In vitro*	Advanced Accelerator Applicatons	[R-0587]	4.2.1.2-2
安全性薬理試験	2.6.3.4 項参照				

2.6.3.2　薬効を裏付ける試験

2.6.3.1 項に記載

2.6.3.3　副次的薬理試験

2.6.3.1 項に記載

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin. (vehicle)	Dose or concentration [a]	Gender and no. per Group	Significant findings	GLP	Report number	Location in CTD
hERG potassium channel	HEK-293 cells	*In vitro* (Tyrode's solution)	1, 10, 100 µM	NA	No effect on hERG tail current at any of the tested concentrations	Yes	[20200008PEHPP]	4.2.1.3-1
Central Nervous (Irwin)	Rat /Sprague Dawley	iv (sodium acetate buffer containing 40 mg/mL of sodium chloride)	0.08, 0.25, 0.75 (mg/kg)	Male / 5	No effects on behavioral, neurologic or autonomic parameters were observed up to 24 hours post-dose. No deaths occurred during the study and no clinical signs were observed during the 6 days observation period	Yes	[A3756]	4.2.1.3-2
Respiratory	Rat /Sprague Dawley	iv (sodium acetate buffer containing 40 mg/mL of sodium chloride)	0.08, 0.25, 0.75 (mg/kg)	Male / 8	No changes of biological significance in respiratory parameters were recorded by means of whole body plethysmography in freely moving rats	Yes	[A3757]	4.2.1.3-3
Cardiovascular	Minipig /Göttingen	iv (sodium acetate buffer containing 40 mg/mL of sodium chloride)	0.03, 0.09, 0.29 (mg/kg)[b]	Male / 4	No changes of biological significance in heart rate, arterial blood pressure and electrocardiographic activity recorded by means of telemetric implants up to 24 hours after dosing	Yes	[A3758]	4.2.1.3-4

GLP = good laboratory practice, HEK-293 = human embryonic kidney-293, hERG = human ether-à-go-go related gene, iv = intravenous, NA = not applicable

[a] Single dose unless specified otherwise

[b] At 7 day intervals, each animal received vehicle or one of the three doses of the test item, following a crossover design

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

実施していない