2.4 非臨床試験の概括評価

目次

2.4 非臨床試験の概括評価 1
2.4.1 非臨床試験計画概略 3
2.4.2 薬理試験 6
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 6
2.4.2.2 副次的薬理試験 7
2.4.2.3 安全性薬理試験 7
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用 7
2.4.2.5 薬理総括 7
2.4.3 薬物動態試験 8
2.4.3.1 分析法 8
2.4.3.2 吸収 8
2.4.3.3 分布 9
2.4.3.4 代謝 9
2.4.3.5 排泄 9
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 9
2.4.3.7 その他の薬物動態試験 9
2.4.3.8 薬物動態総括 9
2.4.4 毒性試験 11
2.4.4.1 単回投与毒性試験 11
2.4.4.2 反復投与毒性試験 11
2.4.4.3 遺伝毒性試験 14
2.4.4.4 がん原性試験 14
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 14
2.4.4.6 局所刺激性試験 15
2.4.4.7 その他の毒性試験 15
2.4.4.8 毒性総括 15
2.4.5 総括及び結論 16
2.4.6 参考文献一覧 18

略語一覧表

語句略語	語句略語内容
ADA	anti-drug antibody：抗薬物抗体
ADP	adenosine diphosphate：アデノシン二リン酸
ALT	alanine aminotransferase：アラニンアミノトランスフェラーゼ
AML	acute myeloid leukemia：急性骨髄性白血病
AST	aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under plasma concentration-time curve：血漿中濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-\infty}$：時間 0 から無限大までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BPDCN	blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm：芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍
CL	total clearance：全身クリアランス
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
DT	diphtheria toxin：ジフテリア毒素
ECL	electrochemiluminescence：電気化学発光
ECL-IA	electrochemiluminescence-immunoassay 電気化学発光免疫測定
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
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration：50%阻害濃度
IL-3	interleukin-3：インターロイキン-3
IL-3Rα	IL-3 receptor α subunit：インターロイキン-3 受容体 α サブユニット、CD123
K_d	dissociation constant：解離定数
MTD	maximum tolerated dose：最大耐用量
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
PDX	patient-derived xenograft：患者腫瘍組織移植
PK	pharmacokinetics：薬物動態
SPR	surface plasmon resonance：表面プラズモン共鳴
Vz	volume of distribution：分布容積

2.4.1 非臨床試験計画概略

タグラキソフスプはジフテリア毒素（DT）の C 末端側の受容体結合ドメイン（膜結合型ヘパリン結合性上皮成長因子様前駆体への結合部位）をヒトインターロイキン-3（IL-3）に置換した遺伝子組換え融合タンパク質で、ヒト IL-3 受容体 α サブユニット（IL-3Rα）を標的とした初の薬剤であり、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（BPDCN）の治療を目的として開発された。

タグラキソフスプの詳細を表 2.4.1-1 に示す。

表 2.4.1-1 タグラキソフスプの詳細

一般名	タグラキソフスプ（遺伝子組換え）
分子式	$C_{2553}H_{4022}N_{692}O_{798}S_{16}$
分子量	57690.45
アミノ酸配列及びジスルフィド結合	MGADDVVDSS KSFVMENFSS YHGTKPGYVD SIQKGIQKPK SGTQGNYDDD 50 WKGFYSTDNK YDAAGYSVDN ENPLSGKAGG VVKVTYPGLT KVLALKVDNA 100 ETIKKELGLS LTEPLMEQVG TEEFIKRFGD GASRVVLSLP FAEGSSSVEY 150 INNWEQAKAL SVELEINFET RGKRGQDAMY EYMAQACAGN RVRRSVGSSL 200 SCINLDWDVI RDKTKTKIES LKEHGPIKNK MSESPNKTVS EEKAKQYLEE 250 FHQTALEHPE LSELKTVTGT NPVFAGANYA AWAVNVAQVI DSETADNLEK 300 TTAALSILPG IGSVMGIADG AVHHNTEEIV AQSIALSSLM VAQAIPLVGE 350 LVDIGFAAYN FVESIINLFQ VVHNSYNRPA YSPGHKTRPH MAPMTQTTSL 400 KTSWVNCSNM IDEIITHLKQ PPLPLLDFNN LNGEDQDILM ENNLRRPNLE 450 AFNRAVKSLQ NASAIESILK NLLPCLPLAT AAPTRHPIHI KDGDWNEFRR 500 KLTFYLKTLE NAQAQQTTLS LAIF 524

医薬品製造販売承認申請書添付資料の作成にあたり、Stemline Therapeutics 社（現 Menarini 社）が実施/委託した薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の試験成績及び学術論文を収集した。薬理試験については *in vitro* 薬効薬理試験を日本新薬で新たに実施した。

（1） 薬理試験

効力を裏付ける試験として、タグラキソフスプの作用機序［受容体への結合特性及びアデノシン二リン酸（ADP）リボシル化活性］、IL-3Rα を発現する白血病及び BPDCN に対するタグラキソフスプの有効性（*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験）を検討した。

副次的薬理試験では、タグラキソフスプのヒト正常組織への結合を免疫組織化学的検査により評価した。また、カニクイザルにおける 3 ヵ月間静脈内投与毒性試験における脳脈絡叢の切片を用いて免疫組織化学的染色試験を実施した。

安全性薬理試験については独立した試験は実施せず、反復投与毒性試験において中枢神経系、心血管系及び呼吸系への影響を評価した。

薬力学的薬物相互作用に該当する試験は実施しなかった。

（2） 薬物動態試験

カニクイザルを用いてタグラキソフスプの吸収（血漿中濃度推移）及び免疫原性を評価した。投与経路は臨床投与経路と同じ静脈内投与とした。試験では凍結溶液製剤を主に使用し、一部試験では凍結乾燥製剤は凍結溶液製剤との比較試験にのみ使用した。投与後の血漿中タグラキソフスプ濃度並びに血清中の抗薬物抗体（ADA）濃度は、バリデートした電気化学発光免疫測定（ECL-IA）法にて分析した。

なお、タグラキソフスプは DT とヒト IL-3 の遺伝子組換え融合タンパク質であり、ICH S6 ガイドライン（「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について、平成 24 年 3 月 23 日付 薬食審査発 0323 第 1 号）が適用されること等から、分布、代謝及び排泄に関する試験は実施しなかった。

（3） 毒性試験

カニクイザルを用いて反復投与毒性試験を実施し、タグラキソフスプの一般毒性、全身曝露及び免疫原性について評価した。一部試験を除き、反復投与毒性試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した。

なお、独立した単回投与毒性試験及び局所刺激性試験は実施せず、反復投与毒性試験の中で評価した。遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験は、ICH S6(R1)ガイドライン又は ICH S9 ガイドライン（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインについて、平成 22 年 6 月 4 日付 薬食審査発 0604 第 1 号）に基づき実施しなかった。なお、生殖毒性（生殖・発達へのリスク）については、本適応症の重篤度及び限られた治療選択肢を考慮し、胚胎児に及ぼすタグラキソフスプの影響について公表文献により評価した。

タグラキソフスプに係る非臨床試験のデータパッケージを表 2.4.1-2 に示す。

表 2.4.1-2 非臨床試験のデータパッケージ（タグラキソフスプ）

試験の種類	動物種	試験内容等	試験番号等
薬理試験			
効力を裏付ける試験	*in vitro*	受容体への結合特性	Stemline 2018-01（4.2.1.1-1） Urieto JO, et al. [1)]
		ADP リボシル化活性	Urieto JO, et al. [1)]
		白血病細胞及び BPDCN 細胞に対する作用	PH-401-001（4.2.1.1-2） Urieto JO, et al. [1)] Testa U, et al. [2)]
	マウス	マウスモデルに対する作用	Angelot-Delettre F, et al. [3)] Togami K, et al. [4)] Mani R, et al. [5)]
副次的薬理試験	*in vitro*	免疫組織化学	Urieto JO, et al. [1)] 20255431（4.2.1.2-1）
安全性薬理試験	反復投与毒性試験（2231-002 試験、2231-007 試験）の一部として評価		
薬物動態試験			
薬物動態 [a]	カニクイザル	5 日間反復静脈内投与	2231-001（4.2.3.2-1） 2231-002（4.2.3.2-3）
	カニクイザル	3 ヵ月間反復静脈内投与 [b]	2231-007（4.2.3.2-4）
その他の薬物動態試験	カニクイザル	製剤比較（単回静脈内投与） （凍結溶液製剤、凍結乾燥製剤）	2231-006（4.2.2.7-1）
毒性試験			
単回投与毒性試験	反復投与毒性試験（2231-002 試験）の一部として評価		
反復投与毒性試験	カニクイザル	5 日間反復静脈内投与	2231-001（4.2.3.2-1、非 GLP） 2231-004（4.2.3.2-2、非 GLP） 2231-002（4.2.3.2-3、GLP）
	カニクイザル	3 ヵ月間反復静脈内投与 [b]	2231-007（4.2.3.2-4、GLP）
局所刺激性試験	反復投与毒性試験（2231-002 試験、2231-007 試験）の一部として評価		

a：ADA 検出を含む
b：5 日間投与＋21～22 日間休薬を 1 サイクルとし、3 サイクル投与

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 タグラキソフスプの作用機序

（1） 受容体への結合能

表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いて、タグラキソフスプのヒト及びマウス IL-3Rα への結合能を調べたところ、タグラキソフスプはヒト IL-3Rα に解離定数（K_d）470 nmol/L で結合したが、マウス IL-3Rα には結合しなかった（試験番号 Stemline 2018-01）。

TF/H-ras 細胞（*H-ras* 遺伝子を導入したヒト白血病細胞株）を用いて、IL-3R と ^{125}I 標識 IL-3 の結合におけるタグラキソフスプの阻害活性を調べたところ、50%阻害濃度（IC_{50} 値）は 1.5 nmol/L であった [1)]。

（2） ADP リボシル化活性

ウサギ網状赤血球溶解液中で、^{14}C 標識ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）を ADP リボースの供給源としてタグラキソフスプの ADP リボシル化活性を調べたところ、濃度依存的な ADP リボシル化活性が認められた [1)]。

2.4.2.1.2 白血病細胞及び BPDCN 細胞に対する作用（*in vitro*）

TF/H-ras 細胞の ^{3}H 標識チミジン取り込みに対するタグラキソフスプ（AT-1 及び AT-2）の阻害作用を調べたところ、IC_{50} 値はそれぞれ 6.1 pmol/L 及び 8.7 pmol/L であった [1)]。

タグラキソフスプは CAL-1 細胞（BPDCN 患者由来のヒト形質細胞様樹状細胞株：IL-3Rα 発現細胞）に対して濃度依存的な細胞傷害作用を示し、IC_{50} 値は 2.7 pmol/L であった。一方、IL-3Rα を発現しない DAUDI 細胞（バーキットリンパ腫患者由来細胞株）には作用しなかった（試験番号 PH-401-001）。

急性骨髄性白血病（AML）患者由来細胞に対するタグラキソフスプの作用を調べたところ、細胞表面の IL-3R の発現量に相関したアポトーシス誘導作用が認められた [2)]。

2.4.2.1.3 BPDCN 細胞及び AML 細胞を移植したマウスモデルに対する作用（*in vivo*）

GEN2.2 細胞（ヒト BPDCN 細胞株：IL-3Rα 発現細胞）をマウスに移植した xenograft モデルにおいて、生存期間の平均値が媒体投与群で移植後 17 日であったのに対し、タグラキソフスプ投与群では 58 日と有意に延長した（P<0.001）[3)]。

IL-3Rα 陽性 BPDCN 患者由来細胞をマウスに移植した patient-derived xenograft（PDX）モデルでは、媒体投与群の生存期間中央値が投与開始後 35 日であったのに対し、タグラキソフスプ投与群では 71 日と有意に延長した（P=0.0003）。また、タグラキソフスプは本 PDX モデルにおいて末梢血中の腫瘍細胞の割合を減少させた。さらに、1 サイクル目のタグラキソフスプ投与終了後に腫瘍細胞が再増殖した後、タグラキソフスプを 2 サイクル目として再投与すると、再び腫瘍細胞の割合が減少した [4)]。

IL-3Rα 陽性 AML 患者由来細胞を移植した PDX モデルにおいて、タグラキソフスプ投与群では媒体投与群に比べて移植後の生存期間が有意に延長し（P=0.0069）、骨髄中の腫瘍細胞数が有意に減少した（P=0.004）[5)]。

2.4.2.2 副次的薬理試験

副次的薬理試験については、タグラキソフスプのヒト正常組織への結合を免疫組織化学的検査により評価した。その結果、タグラキソフスプは IL-3Rα への結合特異性を有しており、ヒトの正常組織（骨髄、小脳、脊髄、肺、心臓、骨格筋、脾臓、肝臓、膵臓、胃、乳房、副腎、結腸、腎臓、膀胱及び皮膚）には結合しないことが示された [1)]。

カニクイザルにおける 3 ヵ月間静脈内投与毒性試験では、タグラキソフスプ投与に起因した変化として、脳脈絡叢の変性／壊死／炎症等が観察されたため、同試験の脳脈絡叢の切片を用いて、IL-3Rα、IL-3 又はサル IgG に対する免疫組織化学的染色試験を実施した。その結果、対照群とタグラキソフスプ群間で明らかな差は認められず、タグラキソフスプの脈絡叢への結合と脈絡叢の傷害性変化との関連性は明らかでなかった（試験番号 20255431）。

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験については独立した試験は実施せず、反復投与毒性試験（GLP、試験番号 2231-002、2231-007）において影響を評価した。その結果、タグラキソフスプ投与による心血管系及び呼吸系への影響は認められなかった。一方、一般状態観察で、食欲不振、振戦、円背位及び活動性低下等が認められ、病理組織学的検査では、脳脈絡叢の種々の傷害性変化（変性／壊死／炎症等）が認められていることから、中枢神経系への影響が示唆された。ただし、国内第 I/II 相試験（NS401-P1-02 試験）では問題となる重篤な中枢神経系の副作用は認められていない。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用

該当試験なし。

2.4.2.5 薬理総括

一連の薬理試験において、タグラキソフスプの次の薬理学的特徴が明らかになった。

- タグラキソフスプはヒト IL-3Rα に特異的に結合した。
- タグラキソフスプは ADP リボシル化活性を示した。
- タグラキソフスプは IL-3Rα を発現する CAL-1 細胞（BPDCN 細胞株）に対して IC_{50} 値 2.7 pmol/L で細胞傷害作用を示したが、IL-3Rα を発現しない DAUDI 細胞（バ―キットリンパ腫細胞株）には作用しなかった。また、白血病細胞に対して細胞傷害作用及びアポトーシス誘導作用を示した。
- タグラキソフスプは、IL-3Rα 陽性の BPDCN 細胞や AML 細胞を移植したモデルマウスにおいて、腫瘍細胞減少作用及び生存延長作用を示した。
- 副次的薬理試験では、免疫組織化学的検査により、タグラキソフスプは IL-3Rα への結合特異性を有しておりヒトの正常組織には結合しないことが示された。
- 安全性薬理試験では、タグラキソフスプによる心血管系及び呼吸系への影響は認められなかったが、中枢神経系への影響が示唆された。

これらの結果は、タグラキソフスプの薬理作用を科学的に裏付けるものであり、タグラキソフスプは BPDCN や AML などの IL-3Rα を発現する悪性腫瘍の治療に貢献できるものと考えられた。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

カニクイザルの血漿中タグラキソフスプ濃度は非競合サンドイッチ酵素結合免疫吸着測定法で測定した。なお、分析感度を最大化するため、電気化学発光（ECL）をタグラキソフスプ濃度の検出に用いた。

また、カニクイザル血清中の ADA の検出とその性質の判断はブリッジング ECL-IA 法及び図 2.4.3.1-1 に示す段階的な試験フローを用いて実施した。このフローにより、ADA 陽性の確認並びに ADA のドメイン選択性及び力価を確認した。

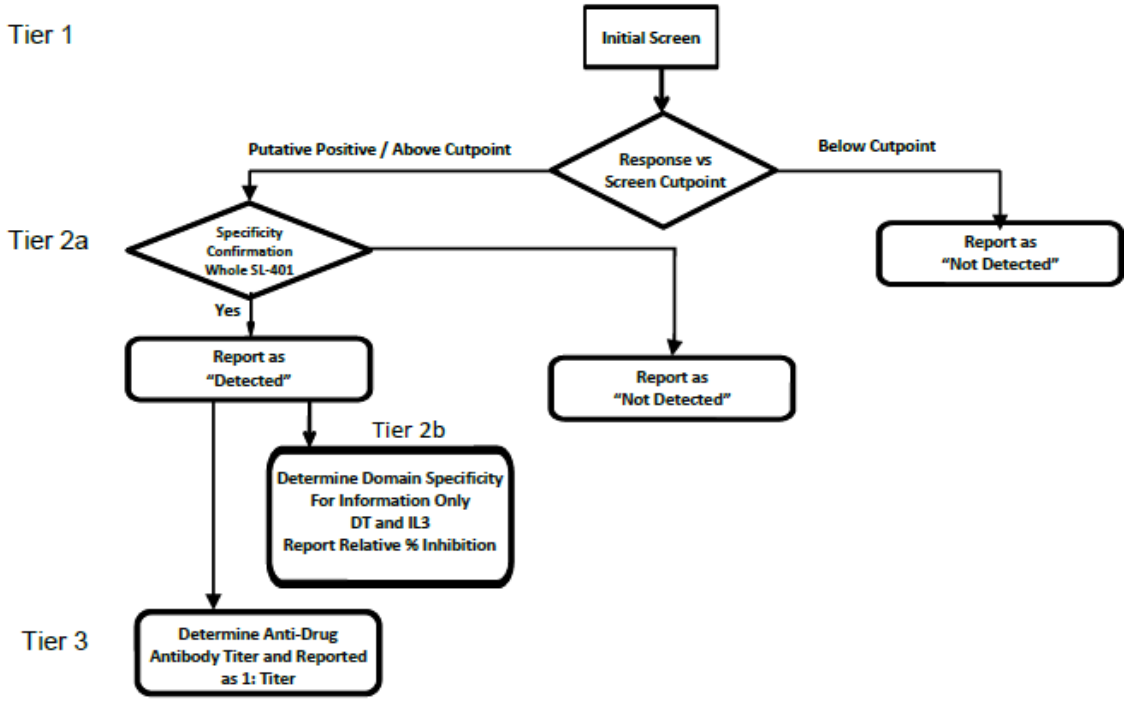


図 2.4.3.1-1 非臨床における免疫原性の段階的な試験フロー

DT：ジフテリア毒素、IL3：インターロイキン-3、SL-401：タグラキソフスプ

2.4.3.2 吸収

2.4.3.2.1 タグラキソフスプの血漿中動態：反復

雌雄カニクイザルにタグラキソフスプを 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与したときの薬物動態（PK）を評価した（試験番号 2231-001）。

初日と最終日の PK プロファイルに顕著な差は無く、性差も認められなかった。最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0-\infty}$）は、40～80 µg/kg/日の投与量の範囲で概ね投与量に比例して増加した。

2.4.3.2.2 タグラキソフスプの血漿中動態及び血清中 ADA 検出：反復

雌雄カニクイザルにタグラキソフスプを 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与（試験番号 2231-002）又は「1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与＋21～22 日間休薬」を 3 サイクル投与（試験番号 2231-007）したときの PK を評価した。

血漿中タグラキソフスプ濃度について、概ね投与量に比例した曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$）の増加が認められ、PK プロファイルに顕著な性差は無かった。また、血漿中タグラキソフスプ濃度は反復投与回数又はサイクルを経るごとに減少した。タグラキソフスプの半減期はいずれのサイクルでも約 0.5 時間で顕著な変化はなかったが、全身クリアランス（CL）及び分布容積（Vz）はともに増加した。

溶媒対象群では ADA が検出されなかったものの、タグラキソフスプ投与群では一部個体で ADA が検出された。

2.4.3.3 分布

該当試験なし。

2.4.3.4 代謝

該当試験なし。

2.4.3.5 排泄

該当試験なし。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

該当試験なし。

2.4.3.7 その他の薬物動態試験

2.4.3.7.1 カニクイザルを用いた製剤比較試験

雌性カニクイザルに凍結溶液製剤または凍結乾燥製剤のタグラキソフスプをクロスオーバーデザインでそれぞれ単回静脈内投与した際の PK パラメータを比較した（試験番号 2231-006）。

凍結溶液製剤及び凍結乾燥製剤投与時の C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$について比較した結果、両製剤でカニクイザルの全身曝露は類似していた。

2.4.3.8 薬物動態総括

カニクイザルを用いてタグラキソフスプの PK を評価した。投与経路は臨床投与経路と同じ静脈内投与とした。試験では凍結溶液製剤を主に使用し、一部の試験では凍結乾燥製剤を使用した。投与後の血漿中タグラキソフスプ濃度並びに ADA 濃度は、バリデートした ECL-IA 法にて分析した。

カニクイザルにタグラキソフスプを反復投与した際、血漿中タグラキソフスプ濃度はサイクルを経るごとに減少した。タグラキソフスプの半減期はいずれのサイクルでも約 0.5 時間で顕著な

変化はなかったが、CL および Vz はともに増加した。溶媒対照群では ADA は検出されなかったが、タグラキソフスプ投与群では一部個体で ADA が検出された。

本剤は ICH S6 ガイドラインが適用されること等から、組織分布、代謝及び排泄に関する検討を実施していない。

2.4.4 毒性試験

カニクイザルを用いて反復投与毒性試験を実施し、タグラキソフスプの一般毒性について評価した。タグラキソフスプは、配列中に含まれるヒト IL-3 を介して IL-3Rα と結合する。IL-3 及び IL-3Rα のアミノ酸配列について、ヒトはカニクイザルとの相同性は高いが、げっ歯類を含む他の動物との相同性は低かった。ヒト IL-3 はカニクイザル以外の動物の IL-3Rα への結合親和性は低いと考えられたことから、毒性試験の動物種としてカニクイザルを選択した。

なお、独立した単回投与毒性試験及び局所刺激性試験は実施せず、反復投与毒性試験の中で評価した。遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施せず、カニクイザルにおける 5 日間静脈内投与毒性試験及び 3 週間回復性試験（GLP、試験番号 2231-002、投与量：0、30、60 μg/kg/日）の中で評価した。60 μg/kg/日群の雌 1 例がタグラキソフスプ投与に起因した腎障害により状態悪化を示し、6 日目に安楽死した。しかし、初回投与後にはタグラキソフスプ投与に起因した変化は認められず、タグラキソフスプを単回静脈内投与した際の概略の致死量は 60 μg/kg/日超と判断した。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

カニクイザルを用いた反復静脈内投与毒性試験を 4 試験（5 日間投与、3 ヵ月間投与）実施した。反復投与毒性試験（GLP）及び国内臨床試験における曝露量を表 2.4.4.2-1 に示す。反復投与によって ADA 産生に起因すると考えられる曝露量の低下が認められるものの、ADA の影響が少ない 1 サイクルの曝露量（1 日目及び 5 日目）を比較したところ、カニクイザルでの曝露量はヒト曝露量よりも高かったことから、反復投与毒性試験におけるタグラキソフスプの曝露は十分であり、これら試験によってヒトの安全性を評価するためのタグラキソフスプの毒性プロファイルは得られていると考える。

表 2.4.4.2-1 ヒト及びカニクイザルにおける血漿中タグラキソフスプの曝露量（C_{max}、AUC）

曝露量	測定時点		ヒト[a]	カニクイザル 5 日間[b]		カニクイザル 3 サイクル[c]	
			12 μg/kg/日	30 μg/kg/日	60 μg/kg/日	35 μg/kg/日	45 μg/kg/日
C_{max}（ng/mL）	サイクル 1	1 日目	155	602	1170	543	665
		5 日目	160	566	1110	309	439
	サイクル 3	1 日目	28.4	—	—	9.33	12.7
		5 日目	6.99	—	—	BLQ	BLQ
AUC（μg·min/mL）	サイクル 1	1 日目	12.4	22.8	44.8	19.6	26.3
		5 日目	17.5	26.7	65.3	16.9	23.7
	サイクル 3	1 日目	3.3	—	—	0.2	0.8
		5 日目	0.9	—	—	—	—

BLQ：定量下限未満、－：該当なし

a：国内第 I/II 相試験（NS401-P1-02 試験）において、BPDCN 患者にタグラキソフスプ 12 μg/kg/日を投与した際の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$
b：2231-002 試験において、カニクイザルにタグラキソフスプ 30 及び 60 μg/kg/日を投与した際の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}\infty}$（雌雄平均）
c：2231-007 試験において、カニクイザルにタグラキソフスプ 35 及び 45 μg/kg/日を投与した際の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}\infty}$（雌雄平均）

2.4.4.2.1 カニクイザルにおける 5 日間静脈内投与毒性試験（1）

およそ 2～4 歳齢の雌雄カニクイザル（雌雄各群 1 例）に、タグラキソフスプ（媒体：リン酸緩衝生理食塩液）を 40、60、及び 80 μg/kg/日の用量で 1 日 1 回、5 分間かけて 5 日間静脈内投与した（非 GLP、試験番号 2231-001）。

80 μg/kg/日群の雄において、円背位、顕著な活動性の低下、握力障害、運動能力の低下、四肢冷感、後肢の疼痛反応の消失などの状態悪化が認められたため、5 日目に安楽死した。生存例では、全ての群の雌雄で活動性の低下、円背位、被毛の菲薄化が用量依存的に観察された。また、全ての群の雌及び 60 μg/kg/日群の雄で食欲不振が認められ、全ての群の雄並びに 40 及び 80 μg/kg/日群の雌で体重減少が認められた。血液学的検査では、主に 80 μg/kg/日群において好中球数の増加、血小板数及び網状赤血球数の減少が散見され、血液生化学検査では、全ての群の雌雄でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の増加、並びに腎機能障害を示唆する尿素窒素ないしクレアチニンの増加等が認められた。

以上、本試験では 80 μg/kg/日群の雄 1 例で顕著な状態悪化が認められたため、最大耐用量（MTD）は 60 μg/kg/日と判断した。

2.4.4.2.2 カニクイザルにおける 5 日間静脈内投与毒性試験（2）

およそ 2～4 歳齢の雌雄カニクイザル（雌雄各群 1 例）に、タグラキソフスプ（媒体：5%ブドウ糖溶液）を 30 及び 60 μg/kg/日の用量で 1 日 1 回、5 分かけて 5 日間静脈内投与した（非 GLP、試験番号 2231-004）。

投与期間中に死亡は認められなかった。30 μg/kg/日以上の群の雌雄で体重減少が認められた。血液学的検査では、30 μg/kg/日群の雄及び 60 μg/kg/日群の雌雄で網状赤血球数の減少が、30 μg/kg/日群の雌及び 60 μg/kg/日群の雌雄で好中球数の増加がみられた。血液生化学的検査では、全ての群の雌雄で AST、ALT 及びグロブリン増加等が、60 μg/kg/日群の雌雄でクレアチニンの上昇が観察されたが、変動は軽度であり毒性学的意義はないと判断した。

以上、本試験で認められた毒性変化はいずれも忍容性があると考えられたことから、MTD は 60 μg/kg/日と判断した。

2.4.4.2.3 カニクイザルにおける 5 日間静脈内投与毒性試験及び 3 週間回復性試験

およそ 2～4 歳齢の雌雄のカニクイザル（雌雄各群 3 例）にタグラキソフスプを 0（対照群、媒体：5%ブドウ糖溶液）、30 及び 60 μg/kg/日の用量で 1 日 1 回、5 分間かけて 5 日間静脈内投与した。0 及び 60 μg/kg/日群については各群雌雄 2 例ずつ動物を設け（回復群）、3 週間の休薬後の回復性を評価した（GLP、試験番号 2231-002）。

60 μg/kg/日の雌 1 例が状態悪化を示し、6 日目に安楽死した。当該動物では、重度の腎機能障害、重度の尿細管変性及び壊死、AST、ALT、アルカリホスファターゼ、ガンマグルタミルトランスフェラーゼの上昇等の肝細胞及び肝胆道系障害を示唆する変化が認められた。生存例では、30 μg/kg/日以上の群の全例で食欲不振が認められ、30 μg/kg/日以上の群の雌雄で体重減少が認められた。体重減少は 60 μg/kg/日群では回復期間中も持続した。血液学的検査では、30 μg/kg/日以上の群の雌雄で網状赤血球数の減少及びリンパ球を含む一部の白血球数の減少、Döhle 小体を伴った好中球数の増加、フィブリノーゲンの増加、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)とプロトロンビン時間の延長が認められた。血液生化学的検査では、30 μg/kg/日群の雄及び 60 μg/kg/日群の雌雄で AST 及び ALT の上昇が、60 μg/kg/日群の雌雄で尿素窒素及びクレアチニンの上昇が、30 μg/kg/日以上の群の雌雄でグロブリンの増加及びアルブミンの減少が認められた。尿検査では、30 μg/kg/日群の雌及び 60 μg/kg/日群の雌雄で尿蛋白の増加が、30 μg/kg/日以上の群の雌で尿量の減少及び尿比重増加が認められた。器官重量では、60 μg/kg/日群の雄で肝臓及び腎臓重量の増加が認められ、病理解剖学的検査では、60 μg/kg/日群の雄 1 例で腎臓の褐色化が、回復期間終了後解剖動物では、60 μg/kg/日群の雄 1 例で胸腺の小型化が認められた。病理組織学的検査では、30 μg/kg/日以上の群の雌雄で脳脈絡叢の炎症／壊死／変性が認められ、毒性変化と考えられた。同変化は 60 μg/kg/日群の雌雄で回復期間終了後にも認められた。30 μg/kg/日以上の群の雌及び 60 μg/kg/日群の雄で腎皮質尿細管の変性／壊死が認められ、毒性変化と考えられた。60 μg/kg/日群の雄で AST 及び ALT の上昇を伴う、軽微な小葉中心性肝細胞壊死と軽度の空胞化(少葉中心性又はびまん性)が認められた。変化の程度が軽かったものの肝細胞の傷害性変化を伴っていたことから毒性変化と判断した。30 μg/kg/日以上の群の雌（安楽殺した雌 1 例含む）、60 μg/kg/日群の雄及び回復群の 60 μg/kg/日群の雌雄で胸腺の広範囲のリンパ球減少が認められたが、タグラキソフスプ投与に関連した変化及び／又は状態悪化によるストレス性変化と考えられた。投与期間中に認められた変化は、体重減少及び脳脈絡叢の変化を除き、いずれも回復性が認められた。

以上、カニクイザルにタグラキソフスプを 5 日間反復静脈内投与した結果、60 μg/kg/日群の雌 1 例が状態悪化により安楽死したため、本試験の MTD は 30 μg/kg/日と判断した。30 μg/kg/日以上の群で脳脈絡叢の変性／壊死／炎症及び腎皮質尿細管の変性／壊死等が認められたことから、本試験の無毒性量（NOAEL）は 30 μg/kg/日未満と判断した。

2.4.4.2.4 カニクイザルにおける 3 ヵ月間静脈内投与毒性試験

およそ 2～4 歳齢の雌雄カニクイザル（雌雄各群 3 例）にタグラキソフスプを 0（対照群、媒体：生理食塩液）、35 及び 45 μg/kg/日の用量で 3 サイクル投与した。各投与は 1 日 1 回、5 分間かけて 5 日間静脈内投与し、「5 日間投与＋21～22 日間休薬」を 1 サイクルとして 3 サイクル投与した［投与日は 1～5（1 サイクル）、27～31（2 サイクル）及び 54～58 日目（3 サイクル）］（GLP、試験番号 2231-007）。

45 μg/kg/日の雌 1 例で、中等度の活動性低下、削痩、中等度の脱水等の状態悪化が認められ、9 日目に安楽死した。生存例では、35 μg/kg/日以上の群の雌雄で、食欲不振、振戦、円背位、皮膚の菲薄化、乾燥、活動性の低下等が、主に投与後 1～2 及び 4 時間で認められた。また、4 週目及び 8 週目に実施した詳細な一般状態観察では、35 μg/kg/日以上の群の雌雄で脱水を示唆する皮膚の

弾力性の喪失が認められた。35 μg/kg/日以上の群の雄において対照群に比べて平均体重の低値が認められた。血液学的検査では、35 μg/kg/日以上の群の雌雄で赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び網状赤血球数）の減少が、45 μg/kg/日群の雌雄で血小板数の減少が認められ、造血抑制に起因する変化と考えられた。また、骨髄塗抹検査を実施した個体（35 μg/kg/日群の雄 1 例、45 μg/kg/日群の雌雄各 1 例）では、顆粒球／赤芽球比の減少及び多染性赤血球の減少が認められ、35 μg/kg/日以上の群の雌雄でフィブリノーゲンの増加及び APTT の延長等が認められた。血液生化学的検査では、35 μg/kg/日以上の群の雌雄において、グロブリン濃度の上昇、アルブミン濃度の低下、AST 及び ALT の上昇が認められた。血液学的及び血液生化学的な変化は主に 1 及び 2 サイクルで顕著に認められ、3 サイクルには軽減もしくは消失した。器官重量測定では、35 μg/kg/日以上の群の雌雄において胸腺の絶対重量並びに体重及び脳に対する相対重量比が用量依存的に減少した。病理組織学的検査では、35 μg/kg/日以上の群の雌雄で脳脈絡叢の変性／壊死及び単核細胞浸潤、脈絡叢の脳室との癒着、脈絡叢間質の線維化、色素（ヘモジデリン）沈着が認められ、毒性と判断した。35 μg/kg/日以上の群の雌及び 45 μg/kg/日群の雄で胸腺の広範囲のリンパ球減少が認められ、タグラキソフスプ投与に関連した変化及び／又は状態悪化によるストレス性変化と考えられた。投与部位では、35 μg/kg/日群の雌 1 例で軽微な表皮過形成が、45 μg/kg/日群の雄 1 例で軽度の血管周囲結合組織の限局性壊死が認められ、タグラキソフスプ投与による局所刺激に起因するものと考えられた。

以上、カニクイザルにタグラキソフスプを 3 ヵ月間（3 サイクル）静脈内投与した結果、35 μg/kg/日以上の群で脳脈絡叢に変性／壊死や胸腺の広範囲のリンパ球減少等が認められたことから、本試験での NOAEL は 35 μg/kg/日未満と判断した。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

ICH S6(R1)ガイドラインに基づき遺伝毒性試験は実施していない。

2.4.4.4 がん原性試験

ICH S6(R1)ガイドライン及び ICH S9 ガイドラインに基づき、がん原性試験は実施していない。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験は実施していない。

タグラキソフスプは重篤かつ致死性の進行がんを治療対象としており ICH S9 ガイドラインの適用範囲に含まれること、また、ICH S9 Q&A（「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」に関する質疑応答集（Q&A）について、平成 31 年 3 月 27 日付 事務連絡）の Q&A2.9 に基づき、胚・胎児発生に関する試験を実施する意義は低いと判断した。

なお、生殖毒性（生殖・発達へのリスク）については、本適応症の重篤度及び限られた治療選択肢を考慮し、胚胎児に及ぼすタグラキソフスプの影響について公表文献により評価した。タグラキソフスプはジフテリア毒素（DT）とヒト IL-3 の遺伝子融合タンパク質であり、配列中に含まれるヒト IL-3 を介して IL-3 受容体（IL-3R）に結合して細胞内に取り込まれた後に、DT に起因する細胞毒性によって薬理作用を発揮する。マウスを用いた検討で、IL-3R を標的とした薬剤（IL-3R 抗体など）によって IL-3R を介したシグナル伝達を阻害すると胎児の造血幹細胞数の減少が認め

られたとの報告[6]があることから、タグラキソフスプが正常細胞における IL-3R を介したシグナル伝達経路を阻害することによって、胎児造血幹細胞の発達（分化や増殖）に有害な影響を及ぼす可能性が懸念される。

2.4.4.6 局所刺激性試験

独立した局所刺激性試験は実施せず、カニクイザルにおける反復投与毒性試験の投与部位の一般状態観察及び病理組織学的検査にて評価した。

5 日間静脈内投与毒性試験及び 3 週間回復性試験（GLP、試験番号 2231-002、投与量：0、30、60 μg/kg/日）では、タグラキソフスプ投与に起因した投与部位の変化は認められなかった。

3 ヵ月間静脈内投与毒性試験（GLP、試験番号 2231-007、投与量：0、35、45 μg/kg/日）では、投与部位の病理組織学的検査において、35 μg/kg/日群の雌 1 例で軽微な表皮過形成が、45 μg/kg/日群の雄 1 例で軽度の血管周囲結合組織の限局性壊死が認められ、タグラキソフスプ投与の局所刺激に起因した変化と考えられた。

以上より、タグラキソフスプは軽度の局所刺激性を有すると判断した。

2.4.4.7 その他の毒性試験

該当試験なし。

2.4.4.8 毒性総括

タグラキソフスプの主な標的臓器は脳、腎臓、肝臓及び胸腺であった。脳脈絡叢では変性／壊死／炎症等が認められ、腎臓では腎皮質尿細管の変性／壊死や、血中尿素窒素及びクレアチニンの上昇、尿蛋白の増加、尿量の減少等の腎機能障害を示唆する変化が認められたことから毒性変化と判断した。肝臓では、AST 及び ALT の上昇を伴う肝臓の傷害性変化として、軽微な小葉中心性肝細胞壊死及び軽度の空胞化が認められ、毒性変化と判断した。胸腺では広範囲のリンパ球減少が認められ、タグラキソフスプ投与に関連した変化及び／又は状態悪化によるストレス性変化と考えられた。また、造血抑制を示唆する変化として、赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び網状赤血球数）の減少が認められた。脳脈絡叢の変化は 3 週間の休薬後も継続して認められ回復性はなかったが、その他の変化については概ね回復性が認められた。

タグラキソフスプの用法・用量（案）は、タグラキソフスプ 12 μg/kg/日を 1 日 1 回 5 日間、15 分かけて静脈内投与し 16 日間休薬する 21 日間を 1 サイクルとして、サイクルを繰り返す。一連の毒性試験において観察された毒性変化が回復期間終了後に概ね回復することを考慮すると、臨床使用にあたりヒトで重篤な副作用を発現する可能性は低いと考えられた。

2.4.5 総括及び結論

タグラキソフスプは、N 末端のメチオニンの後ろに位置する DT ドメイン（DT の酵素活性部位である触媒ドメインを含む）と IL-3 ドメイン（ヒト IL-3 の全配列）がヒスチジン-メチオニンジペプチドリンカーで繋がった、524 アミノ酸残基から構成される遺伝子組換え融合タンパク質である。DT の受容体結合ドメインがヒト IL-3 に置換されていることから、タグラキソフスプは細胞膜上に発現する IL-3Rα に結合し、エンドサイトーシスによって細胞内エンドソームに取り込まれる。その後、プロテアーゼによって DT ドメインから触媒ドメインが切り離され、遊離した DT の触媒ドメインは ADP リボシルトランスフェラーゼ活性によって伸長因子-2 を不活性化し、タンパク質合成を阻害してアポトーシスを誘導することで細胞傷害作用を示すと考えられる。

IL-3Rα は正常細胞での発現は限られるが、様々な造血器腫瘍において過剰に発現していることが数多く報告されている（2.6.1.2 項参照）。そのため、タグラキソフスプの、正常細胞への毒性を抑えつつ IL-3Rα を過剰に発現している腫瘍細胞を標的とする治療薬としての可能性を模索した。BPDCN は形質細胞様樹状細胞を起源とする進行の速い悪性腫瘍であり、ほぼすべての患者で IL-3Rα の発現が認められていることから、タグラキソフスプの BPDCN に対する作用を非臨床試験により検討した。

効力を裏付ける試験では、まず、タグラキソフスプのヒト IL-3Rα への結合特異性が確認できた。これはマウスを含むげっ歯類とヒトとの間で IL-3Rα のアミノ酸配列の相同性が低いことからも支持される結果である。また、*in vitro* 試験によってタグラキソフスプの ADP リボシルトランスフェラーゼ活性、並びに IL-3Rα を発現する BPDCN 細胞及び白血病細胞に対するタグラキソフスプの細胞傷害作用及び／又はアポトーシス誘導作用を示し、さらに *in vivo* 試験によって IL-3Rα 陽性の BPDCN 細胞や AML 細胞を移植したモデルマウスにおけるタグラキソフスプの腫瘍細胞減少作用及び／又は生存延長作用を明らかにした。

毒性試験の実施にあたり、実験動物とヒトとの間の IL-3Rα のアミノ酸配列の相同性を基にカニクイザルが最も適切な動物種であると判断し、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験を実施した。本毒性試験では、臨床での用法・用量（案）に準じた投与方法を選択し、タグラキソフスプの一般毒性に加えて、安全性薬理、薬物動態（全身曝露）及び免疫原性も含めて評価した。

薬物動態の評価では、投与サイクルを経るごとにタグラキソフスプの曝露量は減少し、ADA 産生による影響が示唆された。国内第 I/II 相試験（NS401-P1-02 試験）においても投与サイクルに伴って ADA 産生によると考えられる曝露量の減少が認められていることから、動物を用いた非臨床試験において臨床使用時の薬物動態を反映できており、さらにヒトとの曝露量比較も考慮すると反復投与毒性試験におけるタグラキソフスプの曝露は十分であり、臨床安全性に繋がる毒性評価は可能であると判断した。

安全性薬理の評価では、心血管系及び呼吸系への影響は認められなかったが、脳脈絡叢の変化（変性／壊死／炎症等）が認められたことから中枢神経系への影響が示唆された。

毒性の評価では、タグラキソフスプの標的臓器は脳（脈絡叢）、腎臓、肝臓及び胸腺であると考えられた。脳脈絡叢の変化（変性／壊死／炎症等）は休薬による回復性はなかったが、国内第 I/II 相試験において中枢神経系の重篤な副作用は認められていないこと、並びに、それ以外の毒性変化は休薬後に概ね回復したこと等に鑑み、臨床使用にあたりヒトで重篤な副作用を発現する可能性は低いと考えられた。

また、2 歳以上の小児 BPDCN 患者への適応を含めるにあたり、以下に示す観点から実施した非臨床試験の妥当性・充足性は明確であると考え、幼若動物を用いた毒性試験を含めて追加の非臨床試験は実施しなかった。

- BPDCN では、成人、小児によらず腫瘍細胞で IL-3Rα が発現することから、成人と小児で同一の作用機序を介して効果を発揮すると考えられる。また、効力を裏付ける試験で用いた *in vitro* 及び *in vivo* 病態モデルは、成人もしくは小児に限定されるものではない。
- BPDCN では、成人、小児によらず腫瘍細胞で IL-3Rα が発現することから、成人と小児の薬物動態に違いはないと考えられる。
- 反復投与毒性試験では性成熟前（およそ 2～4 歳齢）の雌雄カニクイザルを用いており、神経系の機能的発達が活発である児童期の神経機能への影響も評価可能であると考えられる。
- 反復投与毒性試験で認められたタグラキソフスプの毒性標的臓器（脳脈絡叢、腎臓、肝臓及び胸腺）について、ヒトにおけるこれら器官の活発な成長や機能的成熟は 2 歳までに終了しており、2 歳以上の小児に投与した場合も毒性発現によりこれらの器官発達に与える影響は小さいと考えられる。
- 海外での小児 BPDCN 患者への使用経験において、成人患者と比べて小児患者で新たな安全性の懸念は確認されておらず（2.5.5.8 項参照）、成人と小児でタグラキソフスプの毒性標的臓器に明確な差異はないと考えられる。

一連の非臨床試験の結果から、タグラキソフスプは BPDCN に対して IL-3α 特異的に抗腫瘍効果を示した。また、臨床使用にあたり許容可能な薬物動態プロファイル及び毒性プロファイルを有していると考えられた。

以上より、タグラキソフスプは BPDCN 治療薬として期待できると判断した。

2.4.6 参考文献一覧

1. Urieto JO, Liu T, Black JH, Cohen KA, Hall PD, Willingham MC, et al. Expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin $DT_{388}IL3$ for phase I clinical trials. Protein Expr Purif. 2004; 33: 123-33. ＜資料番号 4.3-1＞

2. Testa U, Riccioni R, Biffoni M, Diverio D, Lo-Coco F, Foà R, et al. Diphtheria toxin fused to variant human interleukin-3 induces cytotoxicity of blasts from patients with acute myeloid leukemia according to the level of interleukin-3 receptor expression. Blood. 2005; 106: 2527-9. ＜資料番号 4.3-2＞

3. Angelot-Delettre F, Roggy A, Frankel AE, Lamarthee B, Seilles E, Biichle S, et al. *In vivo* and *in vitro* sensitivity of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm to SL-401, an interleukin-3 receptor targeted biologic agent. Haematologica. 2015; 100: 223-30. ＜資料番号 4.3-3＞

4. Togami K, Pastika T, Stephansky J, Ghandi M, Christie AL, Jones K, et al. DNA methyltransferase inhibition overcomes diphthamide pathway deficiencies underlying CD123-targeted treatment resistance. J Clin Invest. 2019; 129: 5005-19. ＜資料番号 4.3-4＞

5. Mani R, Goswami S, Gopalakrishnan B, Ramaswamy R, Wasmuth R, Tran M, et al. The interleukin-3 receptor CD123 targeted SL-401 mediates potent cytotoxic activity against $CD34^{+}CD123^{+}$ cells from acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome patients and healthy donors. Haematologica. 2018; 103: 1288-97. ＜資料番号 4.3-5＞

6. Robin C, Durand C. The roles of BMP and IL-3 signaling pathways in the control of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. Int J Dev Biol. 2010; 54: 1189-200. ＜資料番号 4.3-6＞