

Table 2 トランスジェニック植物での発現が報告されているタンパク質の例

| 分類 | 酵素関連   | ホルモン・サイトカイン  | 血液関連   | 抗体関連   | その他                     |
|----|--|--|--|--|-------------------------|
| 実例 | アデニンデアミナーゼ<br>グルタミン酸デカルボキシラーゼ<br>グルコセセラブロンダーゼ<br>リゾチーム<br>胃リパーゼ<br>膵リパーゼ<br>分泌型アルカリホスファターゼ<br>アプロチニン | GH<br>EGF<br>IGF-1<br>EPO<br>IL-2<br>IL-4<br>IL-10<br>IL-12<br>IL-18<br>IFN $\alpha$ | 血清アルブミン<br>第VII因子<br>(A $\beta$ メイン)<br>プロテインC<br>ヘモグロビン | IgG<br>IgM<br>sIgA/G<br>Fab<br>scFv<br>Diabody | 内因子<br>ラクトフェリン<br>コラーゲン |

Table 3 組換え植物を用いて生産されたタンパク質医薬品の臨床試験

| 組換えタンパク質                                 | 適応症               | 生産方法          | 収獲後 | 臨床試験     | 投与方法 | 備考            |
|--|-------------------|---------------|-----|----------|------|---------------|
| 抗 <i>S. mutans</i> 抗体 (分泌型IgA/G: CaroRx) | 虫歯                | 組換えタバコ        | 精製  | Phase II | 口腔内  | 組タンパク質        |
| 胃リパーゼ (Merisose)                         | 悪酸性胃酸過多症、肺炎       | 組換えトウモロコシ     | 精製  | Phase II | 経口   | 組タンパク質        |
| ヒト内因子                                    | ビタミンB $_{12}$ 欠損症 | 組換えシロイタナズナ    | 精製  | Phase II | 経口   | 組タンパク質        |
| インターフェロン $\alpha$ (発散性製剤 Lacteron)       | C型肝炎              | 組換えウキウキ       | 精製  | Phase II | 皮下   | 対照薬: ペグインターロン |
| インターフェロン $\alpha$ (BLX-833)              | Lacteronの有効成分     | 組換えウキウキ       | 精製  | Phase I  | 筋肉内  | 対照薬: インターロン   |
| ラクトフェリン                                  | ドライアイ             | 組換えトウモロコシ     | 精製  | Phase I  | 点眼   | 組タンパク質        |
| 大腸菌 具熱性腸管毒素E $\beta$ ワクチン                | 下痢                | 組換えトウモロコシ     | 未精製 | Phase I  | 経口   |               |
| 大腸菌 具熱性腸管毒素E $\beta$ ワクチン                | 下痢                | 組換えジャガイモ      | 未精製 | Phase I  | 経口   |               |
| HBV表面抗原 ワクチン                             | B型肝炎              | 組換えジャガイモ      | 未精製 | Phase I  | 経口   |               |
| HBV表面抗原 ワクチン                             | B型肝炎              | 組換えレタス        | 未精製 | Phase I  | 経口   |               |
| ノーウォークウイルススチアジド ワクチン                     | ノーウォークウイルス感染      | 組換えジャガイモ      | 未精製 | Phase I  | 経口   |               |
| scFv (ワクチン)                              | 非ホジキンリンパ腫         | タバコ(一過性発現)    | 精製  | Phase I  | 皮下   |               |
| 狂犬病ウイルス ワクチン                             | 狂犬病               | ホウレンソウ(一過性発現) | 未精製 | Phase I  | 経口   |               |

EMBO Rep. 6, 593, 2005  
Expert Opin. Emerg Drugs 10, 185, 2005  
をもとに作成

\*投与方法が明らかでないため、対照薬の投与方法を記載した。

Table 4 タンパク質性医薬品に対する抗体産生の頻度

|         | 製品                           | 抗体出現率    |
|---------|------------------------------|----------|
| ホルモン    | hGH                          | <1-75%   |
|         | Follitropin                  | -        |
|         | Insulin                      | variable |
| 血液凝固因子  | Factor IX                    | 1.8-3.6% |
|         | Factor VIII                  | ~30%     |
| 酵素類     | Glucocerebrosidase           | 13%      |
|         | $\alpha$ -galactosidase      | 88%      |
| 線溶系因子   | tissue plasminogen activator | <1%      |
| サイトカイン類 | PEG-MGDF(*)                  | 0.6-4%   |
|         | Thrombopoietin               | <10%     |
|         | Erythropoietin(*)            | rare     |
|         | Bone Morphogenic Protein-7   | 13-38%   |
|         | Interferon $\alpha$ 2a       | 30-50%   |
|         | Interferon $\alpha$ 2b       | 0.8-7%   |
|         | Interferon $\beta$           | 10-45%   |
|         | Interferon $\gamma$          | -        |
|         | IL-2                         | 47-74%   |
|         | GM-CSF                       | 4-55%    |
|         | IL-11                        | <1%      |
| G-CSF   | -                            |          |

Koren E. et al. *Curr. Pharm. Biotech.* 3, 349, 2002 を元で作成

(\*)産生された抗体が内因性タンパク質の活性を中和することにより重篤な臨床症状が生じたことが報告されている。

Table 5 EMEA および FDA より公表されている Tg 植物関連  
ガイドライン案中の翻訳後修飾関連の記載

**EMEA ガイドライン案**

Guideline on the Quality of Biological Active Substances Produced by Stable Transgene Expression in Higher Plants (2006年7月)

|   |   |
|---|---|
| <p>緒言</p>   | <p>原核生物、酵母、あるいは、動物細胞を用いた永年の実績を有する組換えタンパク質の生産システムを補完し得るものとして、トランスジェニック植物を用いた方法が台頭してきている。しかし、トランスジェニック植物に特有な事項について考慮していかなければならない。例えば、植物では糖鎖修飾等の翻訳後修飾が他の真核生物とは異なるため、生産物の品質特性に差が生じる可能性があり、生産された有効成分の免疫原性等の安全性・有効性プロファイルに影響が生じることも考えられる。例として、植物の N 結合型糖鎖には末端のシアル酸がなく、ハイマンノース型糖鎖にはリン酸が付加されない。また、植物の複合型糖鎖には、ヒトにはない結合様式を持つフコースやキシロースを含むものが多い。</p> |
| <p>4.1<br/>遺伝子組換え体の<br/>作製<br/>4.1.1<br/>宿主植物</p> | <p>選択した植物については、分類学に関する参考文献を引用して、科、属、種、亜種、栽培品種、一般名を記載する。植物の糖鎖修飾パターン、成長特性、耐性などのような宿主植物の特性も改変されることがあるが、そのような場合は、改変された宿主植物の樹立についても詳細に記載し、用いられた方法も説明すること。</p>  |
| <p>4.3<br/>有効成分の品質<br/>管理<br/>4.3.1 特性解析</p>      | <p>植物の糖鎖付加に関しては、定性的および定量的な包括的な特性解析を行う必要がある。これには、単糖組成の決定、タンパク質から切り出される糖鎖の分析(例:分岐構造の決定、マッピング)、タンパク質への糖鎖の結合(例:部位ごとの糖鎖付加、グリコフォームの分布)を含むこと。特性解析では、糖鎖以外の翻訳後修飾(例:アセチル化、リン酸化、レクチン、脂質、ポリフェノールの付加)の分析も行うこと。天然のヒトタンパク質に存在することが知られていない残基や結合様式には特に注意を払う必要がある。ヒトタンパク質にない修飾が存在する場合は、その点に特に注目し、それらをモニターする手法あるいは除去する手法を詳細に記載すること。</p>                      |

**FDA ガイダンス案**

Guidance for Industry: Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals (2002年9月)

|  |   |
|--|---|
| <p>V ヒトに用いられる医薬品生産用組換え植物由来製品の<br/>前臨床段階での<br/>留意事項</p> | <p>C. アレルゲン性</p> <p>製造に用いる原材料植物がアレルゲン性あるいは免疫原性をもつ場合、製品中のそれらの物質について試験を行うこと。糖鎖(例:キシロース)のような植物特異的な修飾が製品の免疫原性あるいはアレルゲン性に影響する可能性について考慮すること。</p> <p>最終製品について、N 型糖鎖のようなアレルゲン性を決定するものを評価すること。原材料に対してアレルギーを持つ患者の血清を用いて特異的血清による発現タンパク質のスクリーニングができる。特異的血清を用いて陽性の結果が得られた場合は、製品がアレルゲン性を持つことが示唆される。</p> |
|  | <p>D. 免疫原性</p> <p>意図しない免疫原性の原因となる植物特異的な修飾について評価すること。製品の免疫原性に関する標準的な試験を、既存のガイダンス(ICH ガイドライン S5B, S6)および FDA との協議にしたがって実施すること。</p>  |

Table 6 臨床試験後に実施されたTGN1412の品質評価

|  |
|--|
| <p><b>開発企業により定められた規格試験</b></p> <p>紫外吸光度測定<br/>                 エンドトキシン試験(LALゲル化法)<br/>                 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動<br/>                 等電点電気泳動<br/>                 サイズ排除高速液体クロマトグラフィー<br/>                 細胞結合性試験(BIAcore)<br/>                 生菌数試験<br/>                 無菌試験</p> <p><b>規格試験以外の試験</b></p> <p>ウサギ発熱性物質試験<br/>                 異常毒性試験(英国薬局方)<br/>                 Toxicity Screen (FDA's Forensic Chemistry Centre)</p> |
|--|

<Expert Scientific Group Final Report (P.40)をもとに作成>

Table 7 TGN1412を投与されたカニクイザルの血中サイトカイン濃度

| Cytokine     | Inflammatory type | Mean peak cytokine concentration (range) in pg/ml |                   |                     |
|--------------|-------------------|---|-------------------|---------------------|
|              |                   | Control   | Low dose (5mg/kg) | High dose (50mg/kg) |
| IL-2         | Pro-inflammatory  | 37 (20-60)  | 25 (0-84)         | 100 (25-211)        |
| IL-4         | Anti-inflammatory | 12 (0-18)   | 13 (8-18)         | 17 (0-40)           |
| IL-5         | Anti-inflammatory | 6 (3-7)   | 49 (6-139)        | 107 (11-458)        |
| IL-6         | Pro-inflammatory  | 7 (0-22)  | 68 (32-101)       | 128 (24-390)        |
| TNF $\alpha$ | Pro-inflammatory  | 20 (11-26)  | 20 (15-27)        | 22 (19-26)          |
| IFN $\gamma$ | Pro-inflammatory  | 18 (0-35)   | 23 (19-32)        | 33 (17-93)          |

<治験薬概要書(P.46), Kenter MJH and Cohen AF *Lancet* 368, 1387, 2006をもとに作成>

Table 8 TGN1412 (IgG4) とTGN1112 (IgG1) の活性比較

|             | 標的   | サブクラス | CDC<br>hPBMC | ADCC<br>Jurkat<br>CD28+, CD52+ | ADCC<br>Jurkat<br>CD28+, CD52- |
|-------------|------|-------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Alemtuzumab | CD52 | IgG1  | +            | +                              | -                              |
| TGN1112     | CD28 | IgG1  | -            | +                              | +                              |
| TGN1412     | CD28 | IgG4  | -            | -                              | -                              |

CDC: 補体依存性細胞障害

ADCC: 抗体依存性細胞障害

アカゲザル リンパ球の活性化(ex vivo): TGN1112 > TGN1412

<治験薬概要書(P.30, 36)をもとに作成>

Table 9 TGN1412の臨床試験後に作成された報告書およびガイドライン

| タイトル  | 作成者  | 発行年月日      |
|---|--|------------|
| Early stage clinical taskforce<br>- Joint ABPI/BIA Report   | Association of the British<br>Pharmaceutical Industry (ABPI) /<br>Bioindustry Association (BIA)<br>Taskforce | 2006.7.4   |
| Expert scientific group on phase<br>one clinical trials<br>- Interim Report   | Expert Scientific Group  | 2006.7.20  |
| Expert scientific group on phase<br>one clinical trials<br>- Final Report   | Expert Scientific Group  | 2006.11.30 |
| Guideline on requirements for<br>first-in-man clinical trials for<br>potential high-risk medicinal<br>products (DRAFT)                      | Committee for Medical Products for<br>Human Use (CHMP), EMEA   | 2007.3.22  |
| Guideline on strategies to identify<br>and mitigate risks for first-in-<br>human clinical trials with<br>investigational medicinal products | Committee for Medical Products for<br>Human Use (CHMP), EMEA   | 2007.7.19  |

Table 10 治療薬のヒト初回投与試験におけるリスク要因の特定およびリスクの低減のための方策に関するガイドライン

- 概要
1. 緒言
  2. 適用範囲
  3. 法的な位置付け
  4. ガイドライン
    - 4.1 リスク要因
    - 4.2 品質
    - 4.3 非臨床試験
      - 4.3.1 動物モデルの妥当性評価
      - 4.3.2 薬力学
      - 4.3.3 薬物動態
      - 4.3.4 安全性薬理
      - 4.3.5 毒性
      - 4.3.6 ヒト初回投与量の算出
    - 4.4 臨床試験
      - 4.4.1 一般的留意事項
      - 4.4.2 プロトコルデザイン
        - 4.4.2.1 ヒト初回投与試験における被験者の選択
        - 4.4.2.2 投与経路および投与速度
        - 4.4.2.3 ヒト初回投与量の算出
        - 4.4.2.4 用量群間を移行する際の注意
        - 4.4.2.5 対照群が変わる際の注意
        - 4.4.2.6 用量の漸増スキーム
        - 4.4.2.7 中止のルールと判断基準
        - 4.4.2.8 有害事象/反応のモニタリング
      - 4.4.3 臨床試験実施施設の設備および人員

Table 11 これまでに認可された抗体医薬品および融合タンパク質医薬品

| 名称                     | 商品名                 | 種類      | 構造                      | 標的            | 主な適応疾患        | 承認年  |      |       |
|------------------------|---------------------|---------|-------------------------|---------------|---------------|------|------|-------|
|                        |                     |         |                         |               |               | US   | EU   | Japan |
| Muromonab-CD3          | Orthoclone OKT3     | マウス抗体   | IgG2a                   | CD3           | 腎移植後の急性拒絶反応   | 1986 | NA   | 1991  |
| Abciximab              | ReoPro              | キメラ抗体   | IgG1 (Fab)              | GP1b/IIIa     | 心筋虚血          | 1994 | NA   | NA    |
| Rituximab              | Rituxan, MabThera   | キメラ抗体   | IgG1κ                   | CD20          | B細胞性非ホジキンリンパ腫 | 1997 | 1998 | 2001  |
| Dacizumab              | Zenapax             | ヒト化抗体   | IgG1κ                   | CD25          | 腎移植後の急性拒絶反応   | 1997 | 1999 | NA    |
| Basiliximab            | Simulect            | キメラ抗体   | IgG1κ                   | CD25          | 腎移植後の急性拒絶反応   | 1998 | 1998 | 2002  |
| Palivizumab            | Synagis             | ヒト化抗体   | IgG1κ                   | RSV F protein | RSウイルス感染      | 1998 | 1999 | 2002  |
| Infliximab             | Remicade            | キメラ抗体   | IgG1κ                   | TNFα          | 関節リウマチ        | 1998 | 1999 | 2002  |
| Trastuzumab            | Herceptin           | ヒト化抗体   | IgG1κ                   | HER2          | 転移性乳癌         | 1998 | 2000 | 2001  |
| Gemtuzumab ozogamicin  | Mylotarg            | ヒト化抗体   | IgG4κ (カリゲアマイシン結合)      | CD33          | 急性骨髄性白血病      | 2000 | NA   | 2005  |
| Alemtuzumab            | Campath, MabCampath | ヒト化抗体   | IgG1κ                   | CD52          | B細胞性慢性リンパ性白血病 | 2001 | 2001 | NA    |
| Adalimumab             | Humira              | ヒト抗体    | IgG1κ                   | TNFα          | 関節リウマチ        | 2002 | 2003 | NA    |
| Ibritumomab tiuxetan   | Zevalin             | マウス抗体   | IgG1κ (Y-90標識)          | CD20          | B細胞性非ホジキンリンパ腫 | 2002 | 2004 | NA    |
| Omalizumab             | Xolair              | ヒト化抗体   | IgG1κ                   | IgE           | 喘息            | 2003 | 2005 | NA    |
| Iodine 131 Tositumomab | Bexxar              | マウス抗体   | IgG2aλ (I-131標識)        | CD20          | 非ホジキンリンパ腫     | 2003 | NA   | NA    |
| Efalizumab             | Raptiva             | ヒト化抗体   | IgG1κ                   | CD11          | 尋常性乾癬         | 2003 | 2004 | NA    |
| Cetuximab              | Erbix               | キメラ抗体   | IgG1κ                   | EGFR          | 頭頸部癌、結腸・直腸癌   | 2004 | 2004 | NA    |
| Bevacizumab            | Avastin             | ヒト化抗体   | IgG1                    | VEGF          | 結腸・直腸癌        | 2004 | 2005 | 2007  |
| Natalizumab            | Tysabri             | ヒト化抗体   | IgG4κ                   | α4 integrin   | 多発性硬化症        | 2004 | 2006 | NA    |
| Tocilizumab            | Actemra             | ヒト化抗体   | IgG1                    | IL-6R         | キャプスルマン病      | NA   | NA   | 2005  |
| Ranibizumab            | Lucentis            | ヒト化抗体   | IgG1κ (48Kフラグメント)       | VEGF-A        | 加齢黄斑変性        | 2006 | 2007 | NA    |
| Panitumumab            | Vectibix            | ヒト抗体    | IgG2κ                   | EGFR          | 結腸・直腸癌        | 2006 | NA   | NA    |
| Eculizumab             | Soliris             | ヒト化抗体   | IgG2/4κ                 | C5a           | 発作性夜間血色素尿症    | 2007 | 2007 | NA    |
| Denileukin Diftitox    | Ontak               | 融合タンパク質 | IL-2 + Diphtheria toxin | IL-2受容体       | 皮膚T細胞リンパ腫     | 1999 | NA   | NA    |
| Etanercept             | Enbrel              | 融合タンパク質 | TNFR + Fc               | TNF           | 関節リウマチ        | 1998 | 2000 | 2005  |
| Alefacept              | Amevive             | 融合タンパク質 | ILFA3 + Fc              | CD2           | 尋常性乾癬         | 2003 | NA   | NA    |
| Abatacept              | Orencia             | 融合タンパク質 | CTL A4 + Fc             | CD80/CD86     | 関節リウマチ        | 2005 | NA   | NA    |

Reichert JM et al. Nature Biotech. 23, 1073, 2005 をもとに作成

NA: not approved

Table 12 遺伝子治療臨床試験において Shedding 分析に用いられたアッセイの種類と数

(参考文献 79 より)

| アッセイ法          | 非増殖性<br>ヒトウイルスベクター<br>(n=27) | 非増殖性<br>アデノウイルスベクター<br>(n=52) | 制限増殖性<br>アデノウイルス<br>(n=11) | AAV<br>(n=7) | ホックスウイルスベクター<br>(n=5) |
|----------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------|-----------------------|
| <b>アッセイの種類</b> |                              |                               |                            |              |                       |
| PCR 法          | 23 (85%)                     | 31 (60%)                      | 11 (100%)                  | 5            | 3                     |
| ・定量 PCR        | 3                            | 6                             | 5                          | 0            | 0                     |
| ・非定量 PCR       | 14                           | 13                            | 5                          | 5            | 0                     |
| ・詳細不明          | 6                            | 12                            | 1                          | 0            | 3                     |
| 生物学的試験         | 7 (26%)*                     | 35 (67%)                      | 5 (31%)                    | 5            | 5                     |
| ELISA          | 0 (0%)                       | 9 (17%)                       | 0 (0%)                     | 0            | 0                     |
| 詳細不明           | 2 (7%)                       | 2 (4%)                        | 0 (0%)                     | 0            | 0                     |
| <b>使用アッセイ数</b> |                              |                               |                            |              |                       |
| ・1 アッセイ        | 18 (74%)                     | 28 (54%)                      | 6 (55%)                    | 4            | 2                     |
| ・2 アッセイ        | 5 (19%)                      | 21 (40%)                      | 5 (45%)                    | 3            | 3                     |
| ・2 アッセイ以上      | 0 (0%)                       | 1 (2%)                        | 0 (0%)                     | 0            | 0                     |
| ・不明            | 2 (7%)                       | 2 (4%)                        | 0 (0%)                     | 0            | 0                     |

数字は論文数(カッコ内はベクターの種類別の比率)を示す

\*RCR 測定にのみ使用

Table 13 遺伝子治療臨床試験において Shedding 分析に用いられた生体試料

(参考文献 79 より)

| ベクター                                | 投与経路   | 生体試料の種類  |
|-------------------------------------|--|--|
| ヒトウイルスベクター (n=27)<br>In vivo (n=16) | ip (2), it (13), iv (1)  | 血液関連試料(16), 糞便(1), 唾液(1), 精液(1),<br>皮膚(1), 尿(2)              |
| Ex vivo (n=11)                      | id (2), it (1), iv (8)   | 血液関連試料(11)   |
| 非増殖性アデノウイルスベクター<br>(n=50)           | ic (2), im (2), inh/in (9), ip<br>(3), it (26), ivi (2), その他*(6) | 血液関連試料(35), 糞便(23), 鼻咽頭液(26),<br>唾液(15), 精液(2), 皮膚(1), 尿(44) |
| 制限増殖性アデノウイルス<br>(n=11)              | ip (1), it (8), it+iv (1), it/ip<br>(1)                          | 血液関連試料(9), 皮膚(1), 尿(3)                                       |
| AAV (n=7)                           | ia (1), im (1), inh/in (5)                                       | 血液関連試料(5), 糞便(4), 鼻咽頭液(3), 唾液(4),<br>精液(2), 尿(5)             |
| ホックスウイルスベクター<br>(n=5)               | id (2), im (2), it (1)   | 血液関連試料(3), 糞便(1), 鼻咽頭液(2), 唾液(1),<br>皮膚(2), 尿(3)             |

カッコ内は論文数を示す

血液関連試料は血清、血漿、末梢血単核球を、鼻咽頭液は鼻腔スワブ、咽頭スワブ、気管支肺胞洗浄液を含む

ip; 腹腔内, it; 腫瘍内, iv; 静脈内, ic; 冠動脈内, im; 筋肉内, inh/in; 吸入/鼻腔内, ivi; 硝子体内

\*その他は動脈内(1), 皮内(1), 心筋内(1), 胸膜内(2), 静脈内(1)を含む

Table 14 日本の遺伝子治療臨床研究におけるウイルス排出試験の現状

(生物多様性影響評価書より)

| 実施機関                    | ベクター・<br>搭載遺伝子<br>(略称)                              | 投与部位                                    | 被験者の<br>隔離  | 試験試料・<br>対象・<br>アッセイ法                             | 関連データ   |
|-------------------------|---|---|-------------|---|---|
| 北海道大学<br>病院             | 非増殖性レトロウイルス<br>ベクター・<br>ADA<br>(GCsapM-ADA)         | 遺伝子導入<br>CD34陽性細胞<br>の輸注                | 投与後<br>3日間  | 末梢血単核<br>球、血漿・<br>RCR・<br>PCR法                    | 患者に遺伝子導入 CD34 陽性細胞を静脈内投与後、7.5 ヶ月、9 ヶ月後に RCR の存在は認められず、第 3 者への感染も確認されていない。海外でも最長 3 年間の観察期間中、患者 4 名の末梢血単核球及び血清中で RCR は認められなかった。   |
| 癌研究会附<br>属病院            | 非増殖性レトロウイルス<br>ベクター・MDR1<br>(HaMDR)                 | 遺伝子導入<br>CD34陽性細胞<br>の輸注                | 投与後<br>10日間 | 末梢血、骨<br>髄・<br>RCR・<br>PCR法(陽性<br>の場合 S+L-<br>試験) | 遺伝子治療を実施した患者について入院中は月に 1 回、退院後は 2 から 4 ヶ月に 1 回末梢血の RCR を検査しているが、RCR を検出したことはない。ウイルスベクターは遺伝子導入後に洗浄除去され、洗浄後の細胞からベクターが検出されたことはない。  |
| 筑波大学附<br>属病院            | 非増殖性レトロウイルス<br>ベクター・<br>HSV-TK、Δ LNGFR<br>(SFCMM-3) | 遺伝子導入<br>ドナーリンパ<br>球の輸注                 | 投与後<br>3日間  | 末梢血単核<br>球、血漿・<br>RCR・<br>PCR法、<br>S+L-試験         | 海外で再発白血病に対する遺伝子治療 15 例、HLA 半一致同種造血幹細胞移植に対する遺伝子治療 7 例に、同一の SFCMM-3 を用いて遺伝子を導入したドナーリンパ球を用いてドナーリンパ球輸注療法が行われた。投与後、患者細胞、ならびに血清を用いた頻回なる検査 (S+L-アッセイ、EnvPCR) においても RCR は検出されず、治療を受けた患者において SFCMM-3 の活性を認めた症例もない。 |
| 岡山大学医<br>学部・歯学部<br>附属病院 | 非増殖性アデノウイルス<br>ベクター・HSV-TK<br>(Adv.RSV-TK)          | 前立腺腫瘍<br>内投与                            | 投与後<br>24時間 | 血液、尿・<br>ベクター・<br>RCA・<br>PCR法                    | ・患者 7 例に投与後、血液、尿及び喀痰中のベクターは投与 24 時間後に消失した。医療従事者や家族等への感染、環境中への放出は認められなかった。   |
| 北里大学病<br>院              | 非増殖性アデノウイルス<br>ベクター・HSV-TK<br>(Adv.RSV-TK)          | 前立腺腫瘍<br>内投与                            | 投与後<br>24時間 | 血液、尿・<br>ベクター・<br>RCA・<br>PCR法                    | ・マウスモデルに投与後一週間では尿、精液、精子にベクターは検出されず、血中では 40 匹中 1 匹のみ検出された。ベクターの分布は前立腺、精囊、精巣、骨髄リンパ節、消化管、肝臓で一過性に観察された。<br>・海外では、18 名の患者に投与後、症例により差があるが尿中に 0~32 日間(平均 6.8 日間)検出された (PCR 法)。                                   |
| 神戸大学医<br>学部附属病<br>院     | 非増殖性アデノウイルス<br>ベクター・HSV-TK<br>(Ad-OC-TK)            | 前立腺癌の<br>骨転移巣又<br>は局所再発<br>巣内投与         | 投与後<br>3日間  | 血清、尿・<br>ベクター・<br>RCA・<br>293 細胞感<br>染性試験         | ・マウス前立腺癌モデルに局所投与した場合、72 時間以内に動物体内及び排泄物中から消失した。<br>・4 例の患者に投与 72 時間後の血液、尿及び喀痰中にベクター、RCA は検出されなかった。被験者の個室からの排水を PCR 法で検査した結果及び医療従事者や家族等の健康状態から、環境中への放出、第 3 者への感染は認められなかった。                                  |
| 岡山大学医<br>学部・歯学部<br>附属病院 | 非増殖性アデノウイルス<br>ベクター・IL-12<br>(Adv/IL-12)            | 前立腺癌腫<br>瘍内、局所<br>再発巣又は<br>遠隔転移巣<br>内投与 | 投与後<br>24時間 | 血液、尿・<br>ベクター・<br>RCA・<br>PCR法                    | ・マウスモデルで同一ベクター、同一投与経路の検討はしていない。Adv.RSV-TK の例を記載。<br>・Adv.RSV-TK を患者 9 例の前立腺癌腫瘍内に投与後、血液中への移行は低用量群では認められず、中用量群で投与後 30 分をピークに翌日消失した。尿中への移行は投与直後に認められたが多くは 2 日目に消失した。   |
| 九州大学病<br>院              | 非伝播型センダイウイルス<br>ベクター・FGF2<br>(SeV/dF-hFGF2)         | 下肢骨格筋<br>内投与                            | 投与後<br>1週間  | 血液、尿・<br>ベクター・<br>PCR法及び<br>トリ血球凝集<br>反応          | ・マウス、ラット、サルに SeV/ dF-hFGF2 を投与した場合、血中、尿中の検出は一過性であり一週間後には前例で陰転した。<br>・カニクイザルに増殖伝播型センダイウイルスを接種しても同一ゲージ内の水平感染は認められなかった。  |
| 自治医科大<br>学附属病院          | 非増殖性アデノ随伴<br>ウイルスベクター・AADC<br>(AAV-hAADC-2)         | 脳内投与                                    | 投与後<br>72時間 | 血液、尿・<br>ベクター・<br>PCR法                            | ラット及びサルのパーキンソン病モデルに対して脳内へ AAV-hAADC-2 の注入を行った前臨床試験では、血液中へ AAV-hAADC-2 は検出されていない。  |



国際的動向を踏まえた医薬品等の品質・安全性確保に関する研究  
タンパク質単独、核酸、細胞以外の抗血管新生療法の現状と展望

分担研究者 早川堯夫（独立行政法人医薬品医療機器総合機構 顧問）  
協力研究者 櫻井文教（独立行政法人医薬基盤研究所）

## 研究要旨

抗血管新生療法とは血管新生を阻害することにより主に腫瘍の成長を抑制する治療法である。最近、抗血管新生療法として血管新生に関与する分子を標的とした低分子化合物の治療薬の開発が進んでいる。例えば VEGFR チロシンキナーゼおよび EGFR チロシンキナーゼに対する分子標的薬剤はその典型的な例である。これら分子標的薬剤のなかには非臨床試験では有効性を示すことできたが、臨床試験において重篤な有害事象の発現と有効性を示すことができなかつたことから開発が中止されたものも多い。一方、数は少ないが承認まで至った薬剤もある。VEGFR ファミリーおよび PDGFR ファミリーのチロシンキナーゼを標的とする Sorafenib は進行性腎癌の患者に対して承認された。PDGFR、VEGFR2 を含む多くのチロシンキナーゼ受容体を標的とする Sunitinib は Imatinib mesylate に耐性の胃腸間質腫瘍の患者に対して承認されている。EGFR チロシンキナーゼを標的とする Gefitinib は進行性非小細胞肺癌の患者に対して承認されている。HER1/EGFR チロシンキナーゼを標的とした Erlotinib は少なくとも過去に 1 回化学療法レジメンが失敗した後の局所進行性あるいは転移性非小細胞癌の患者に対して承認された。接着因子の発現および VEGF の分泌を阻害する Lenalidomide は過去に 1 回治療を受けた多発性骨髄腫の患者に対して Dexamethasone との組み合わせで承認された。これら薬剤は単剤あるいは化学療法等作用機構が異なる薬剤との組み合わせで他の疾患に対する臨床試験が行われている。その他にも承認には至っていないが臨床試験において良好な結果が得られている分子標的薬剤もある。

### A. 研究目的

血管新生は腫瘍の成長および転移の播種に重要な役割を果たしている。過去数年の間に、血管新生を主に標的とした低分子化合物の抗癌治療薬を開発することのほうが従来の抗癌剤による治療を最適化するよりも重要となってきた。

これら分子標的の特異的な治療は治療上の有効性を最適化できる可能性があるが、正常細胞に対する毒性は最小限にする必要がある。腫瘍における理想的な分子標的は腫瘍と非腫瘍細胞で発現が異なるかあるいは

機能が異なる分子である。さらに、分子レベルにおける疫学によりそのような標的は予後の悪い疾患の結果の有力な予測因子となることが明らかになった。チロシンキナーゼはそのような標的の典型的な例である。チロシンキナーゼの活性化は正常細胞では厳密に制御されているが、腫瘍細胞ではその制御の崩壊により過剰にシグナルが発現しその結果腫瘍が進行する。そのなかで代表的なものが EGFR および VEGFR を介したシグナル伝達である。

EGFR、HER ファミリーのチロシンキナー

ぜは4種類のメンバーすなわち EGFR (HER1 および ERBB1)、HER2/neu (ERBB2)、HER3 (ERBB3) そして HER4 (ERBB4) から成り立っている。EGFR ファミリーのチロシンキナーゼはキナーゼ活性を有しており、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、多機能細胞質尾部を有している。尾部には ATP 結合部位とチロシンキナーゼ活性があり他のタンパク質だけでなく自己もリン酸化できる。

EGFR チロシンキナーゼは多くの腫瘍で変化している。腫瘍における過剰な EGFR シグナルが、EGFR の過剰発現およびその受容体のリガンドの過剰産生および利用の結果として起こる。例えば、神経膠腫、上気道消化管、肺、結腸、膵臓、胸、卵巣、膀胱、腎臓を含む各種ヒトの癌で EGFR mRNA およびタンパク質が過剰発現している。この過剰発現は EGFR 遺伝子の増幅が原因の場合があり、受容体のリガンドである TGF- $\alpha$ 、Amphiregulin の過剰発現と関連している場合も多い。他の異常な EGFR シグナルの機構には、ERBB2 (HER2) のような他の ERBBR とヘテロダイマー形成、異種のシグナルネットワークによるトランス活性化、受容体シグナルの調節機構の欠損および活性変異がある。過剰なシグナルの結果、増殖、血管新生、浸潤/転移の促進およびアポトーシスの阻害などにより腫瘍が進行する。腫瘍における EGFR 変異体の発現は病勢の進行、生存の不良、治療に対する反応の不良、細胞傷害性薬剤に対する抵抗性の獲得と関連する。

血管新生増殖因子である VEGF ファミリーには VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PlGF-1 および PlGF-2 と呼ばれる 6

種類の分泌糖タンパク質が含まれる。腫瘍細胞により分泌される血管透過性因子として最初に同定された VEGF-A は血管系の発達の最も重要な調節因子であり多様なヒト固形腫瘍で通常過剰発現している。VEGF のリガンドは3種類の細胞膜受容体に対する特異的な結合を介して作用する。それには内皮細胞で最初に同定されその後成人の各種造血細胞でも発現することが明らかになった VEGFR-1 (Flt-1)、VEGFR-2 (Flk/KDR) および VEGFR-3 (Flt-4) が含まれる。これら受容体は、特異的な VEGF リガンドと結合する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、チロシンキナーゼを含む細胞内領域から構成される。さらに、NRP-1 および NRP-2 が VEGF ファミリーメンバーの特異的なアイソフォームの共受容体であり、個々の受容体に対するこれらリガンドの結合親和性を増加させる。リガンド受容体の相互作用により VEGFR のチロシンキナーゼドメインの活性化が誘導され、細胞内シグナル伝達経路の活性化が起きる。その経路には Raf/MEK/ERK および PI3K/Akt 経路が含まれる。VEGFR-1 は生理的な発達段階の強力な促進調節因子であり、内皮細胞の遊走および分化に重要であると考えられている

VEGFR-2 は血管の透過性、内皮細胞の増殖、浸潤、遊走、生存等 VEGF-A 下流を介した作用の多くを仲介する。VEGFR-3 はリンパ管形成に関与し、その発現は局所的なリンパ結節に対する腫瘍細胞の播種と関連している。最近、VEGFR-1 がヒト結腸直腸癌に存在し機能を果たしていること、VEGF ファミリーリガンドによる活性化は腫瘍の進行および転移に関与する過程を活性化することも示された。VEGF および VEGFR はその

他にも肝細胞癌、乳癌、子宮内膜癌および急性白血病でも過剰発現する。また、VEGFの発現は結腸直腸癌、乳癌、小細胞および非小細胞肺癌の患者におけるネガティブな予後因子でもある。

以上の知見から VEGF および EGF を介したシグナル、特に VEGFR および EGFR を分子標的とした薬剤の開発が進んでおり、既に認可されたものもある。本研究においては VEGFR および EGFR などを分子標的とした薬剤についてその臨床開発の現状および今後の課題について調査および研究を行った。

## B. 研究方法

これまで試みられてきたタンパク質単独、核酸、細胞以外の抗血管新生療法として、低分子化学合成の分子標的薬等に関する現在の状況および今後の課題について、参考文献を中心に調査および研究を行った。

## C. 研究結果

### 1. 抗血管新生療法としての分子標的薬剤の現状

#### 1-1. SU6668

SU6668 は VEGFR2、bFGFR および PDGFR のチロシンキナーゼ領域で ATP と競合し、チロシンキナーゼ活性を阻害する。SU6668 は *in vivo* において VEGFR2 および PDGFR  $\beta$  におけるリン酸化チロシンレベルを低下させることにより腫瘍微小血管のアポトーシスを速やかに誘導する。SU6668 は細胞においてリガンド刺激による受容体のチロシンリン酸化および増殖を濃度依存的に阻害する。無胸腺マウスに SU6668 を経口あるいは腹腔内投与すると、神経膠腫、黒色腫、肺、結腸、卵巣および扁平上皮の多様なヒト腫

瘍異種移植の成長が顕著に阻害される。さらに、背部皮下脂肪チャンバーモデルにおける C6 神経膠腫異種移植において生体マルチ蛍光ビデオ顕微鏡により観察すると、SU6668 により腫瘍の血管新生が抑制される。SU6668 は生着した大きなヒト腫瘍の異種移植において顕著に奏功を誘導し、生存期間の中央値を 58%まで増加させる ( $P < 0.001$ )。SU6668 は肝臓への転移を起こす CT-26 結腸癌細胞を脾臓に移植した BALB/c マウスにおいて腫瘍細胞および内皮細胞のアポトーシスを徐々に増加させる。SU6668 を Paclitaxel と組み合わせると、ヌードマウスの腹腔腔に異種移植した卵巣癌モデルにおいて腹水の形成および腫瘍の広がりを抑え腹腔腔における卵巣癌の進行を抑制する。SU6668 は、腫瘍の容積がかなり大きい段階で治療を開始した場合でも、実験的な肺および結腸腫瘍の一時的な退行を誘導する。以上の非臨床試験における良好な結果から、SU6668 は進行性腫瘍および多発性骨髄腫の患者でフェーズ I / II 試験が行われたが、客観的な奏功はみられなかった。進行性固形悪性腫瘍の患者の三つの臨床試験で得られた腫瘍の生検および腫瘍異種移植を用いて SU5416 および SU6668 が受容体のリン酸化に及ぼす作用を調べた結果、異種移植で生物活性を示すことが明らかになった。しかし、これら薬剤の原発性腫瘍の患者における生物活性は弱かった。

#### 1-2. Vatalanib (PTK787/ZK222584)

Vatalanib は経口投与が可能な Aminophthalazine 誘導体であり、内皮細胞に発現する既知の全ての VEGFR チロシンキナーゼをマイクロモルかそれ以下の濃度で

活性を有する。Vatalanib は高濃度では PDGFR- $\beta$  および c-Kit チロシンキナーゼのような他のキナーゼも阻害する。Vatalanib は EGFR、FGFR1、c-Met および Tie-2 のような他の受容体ファミリーおよび c-Src、c-Abl およびプロテインキナーゼ C- $\alpha$  のような細胞内キナーゼに対しては活性を持たない。Vatalanib は細胞を用いたアッセイにおいてナノモルの濃度で内皮細胞の増殖、遊走および生存を阻害する。Vatalanib は経口投与により成長因子埋め込みモデルにおいて VEGF および PDGF により誘導される血管新生を濃度依存的に阻害し、同系同所モデルにおけるマウス腎癌の成長および転移さらにはヌードマウスに皮下移植した各種ヒト腫瘍の成長を阻害する。Vatalanib 単独の経口投与あるいは Gemcitabine との組み合わせで、ヌードマウスで同所性に成長させたヒト膵臓癌の成長および転移が減少する。

Vatalanib の臨床開発は最初幾つか有害事象が出現したため中止されたが、これら有害事象は可逆的であり良性であることが確認され再開された。フェーズ I の臨床試験で、結腸直腸癌、乳癌、多形膠芽細胞腫、膀胱癌および腎癌を含む VEGF および VEGFR を過剰発現していることが知られている数種類の進行性癌において単剤で安全性、薬物動態学、薬物力学的な効果および生物活性が評価された。1000 mg/日までの投与量の薬物動態学の結果で、1日に1回投与された Vatalanib は急速に吸収され、最大濃度まで1時間で達し最終的な半減期は約3-6時間であることが示された。

この薬剤の半減期が短いことを考慮して、非臨床のデータから、有効性を十分に引き

出すには VEGF のシグナルを妨害する閾値以上の薬物レベルを一定に維持する必要があることが示されたことから、1日に2回 Vatalanib を投与するフェーズ I 試験が行われた。薬物動態データおよび動的造影剤増強磁気共鳴イメージングにより、1日の全投与量が 1000 mg かそれ以上では生物学的に活性を有し、同量の毎日投与量では薬物の暴露は過去の1日に1回投与量の場合と同等であることが示された。しかし、トランプ濃度は1日に2回投与では高かった。比較のデータがないため、これにより1日1回投与を上回って薬物の活性が改善できるかどうかはこの時点では不明であった。活性はフェーズ I の主要評価項目ではなかったが、期待できる抗腫瘍活性が転移性結腸直腸癌でみられた。Vatalanib はその後転移性結腸直腸癌の一次選択治療として Oxaliplatin、5-Fluorouracil、Leucovorin (FOLFOX-4) あるいは Irinotecan、5-Fluorouracil、Leucovorin (FOLFIRI) と組み合わせて1日1回の投与で評価された。最初の研究では、Vatalanib および FOLFOX-4 両方の薬物動態および毒性は共投与により影響を受けなかった。目まいおよび神経毒性が高投与量の Vatalanib でみられた。28人の評価可能な患者における奏功率は54%、無憎悪生存期間の中央値は11箇月であり(95%信頼区間、6.8-12.0箇月)、推定全生存期間の中央値は16.6箇月であった(95%信頼区間、12.9-21.0箇月)。2番目の研究で、FOLFIRI と 1250 mg/日の Vatalanib の共投与は Irinotecan の暴露に軽微な影響を及ぼし、患者の血清における Irinotecan の活性代謝物である SN-38 の AUC は40%まで低下した。この効果の臨床学

的関連性は検討中である。17人の評価可能な患者における奏効率は41%、無増悪生存期間の中央値は7.1箇月(95%信頼区間、6.2-11.7箇月)、全生存期間の中央値は24.3箇月であった(95%信頼区間、18箇月-不明)。FOLFOX-4単独とFOLFOX-4および1日に1回1250mgのVatalanibの経口投与の組み合わせにおける有効性が、二つの無作為二重盲験プラセボコントロール試験すなわち転移性結腸直腸癌の第一選択Colorectal Oral Novel Therapy for the Inhibition of Angiogenesis and Retarding of Metastases (CONFIRM)-1および第二選択CONFIRM-2試験で評価された。CONFIRM-1において主要評価項目は満たされなかった。無増悪生存期間はVatalanibにFOLFOX-4を加えることにより中程度の有効性が示されたが、統計的に有意ではなかった。考えられる解釈は約6時間というVatalanibの短い半減期が原因の可能性があり、1日に1回の投与はVatalanibの血中レベルを一定に維持するには最適なスケジュールではなかった可能性が示唆される。しかし、これらのデータに反して、薬物動態の結果はVatalanibが活性を有する投与量が単回投与後24時間でも血液循環に維持されていることからかなり抗腫瘍効果を持つことが示唆されている。前治療において血清の乳酸脱水素酵素Lactate dehydrogenase (LDH)が高い患者の予備的な解析では、Vatalanibで治療した患者で統計的に有意に無増悪生存期間が長いことが示された(危険率0.68、95%信頼区間、0.50-0.92;  $p=0.12$ )。LDHレベルが高い患者では腫瘍においてVEGFが最も活性化されているので、HIF-1 $\alpha$ を介しVEGFおよびLDHが共に調節されることは

このグループの患者の好ましい結果と生物学的に関連しているかもしれない。従って、血清レベルのLDHが高い患者ではVatalanibによりVEGFRがより顕著に阻害され临床上における有効性が高い可能性がある。二つの治療投与群(Vatalanib+FOLFOX-4対FOLFOX-4)において最も高い頻度で報告された悪性度3-4の有害事象は高血圧(21%対6%)、好中球減少(31%対32%)、下痢(15%対10%)、吐き気(9%対5%)、末梢神経障害(9%対7%)、静脈血栓症(7%対4%)、目まい(7%対2%)、肺塞栓(6%対1%)であった。CONFIRM-4およびCONFIRM-2の最終結果は2006年に公表される予定である。Vatalanibの有効性はフランスおよびドイツのフェーズII試験において肺癌の患者でも評価されている。さらに、Hoosier Oncology Groupにより新たに診断されたHER-2過剰発現転移性乳癌の患者でTrastuzumabとVatalanibの組み合わせのフェーズI/II試験で評価されている。さらに、再発性の複数の型のグリア芽腫の患者におけるフェーズI/II試験において、Vatalanib単独治療あるいはTemozolomideあるいはLomustineとの組み合わせで有望な抗腫瘍活性がみられている。Vatalanibは最近骨髄異形成症候群、悪性中皮腫、フォン・ヒッペル・リンドウ病治療のフェーズII試験でも評価されている。

### 1-3. ZD4190、ZD6474

ZD4190は4-Anilinoquinazolineであり、*in vitro*においてVEGFによるヒト内皮細胞増殖の促進だけでなくVEGFR2およびVEGFR1チロシンキナーゼ活性を阻害する。ZD4190はヒトの乳房、肺、前立腺および卵

巣における腫瘍の異種移植において抗腫瘍活性を示し、治療をやめると腫瘍の成長が再開する。

ZD6474 は経口で生物学的利用が可能な Anilquinazoline 誘導体であり VEGFR2 チロシンキナーゼを選択的に阻害し、活性は低いが EGFR、RET および PDGFR のような他のチロシンキナーゼ活性も阻害する。ZD6474 は VEGF による内皮細胞の遊走および増殖促進を抑制する。長期にわたり毎日 ZD6474 を経口投与すると、ヌードマウスにおけるヒト腫瘍異種移植において広範囲の顕著な抗腫瘍活性が示される。ZD6474 は放射線療法の効果を増強し、*in vitro* および *in vivo* において Taxanes の抗腫瘍活性を高める可能性が示唆されている。最近の研究によると、ZD6474 による EGFR リン酸化の阻害がこの薬剤の抗腫瘍効果にかなり寄与していることが示されている。従って、この化合物は腫瘍の成長、VEGFR 依存的な腫瘍の血管新生、EGFR 依存的な腫瘍細胞の増殖および生存において二つの重要な経路を阻害する。ZD6474 は広い範囲の非臨床モデルで抗腫瘍活性を示す。

進行性固形腫瘍患者における ZD6474 のフェーズ I 試験では、ZD6474 (100-300 mg/日)の1日に1回の経口投与は十分忍容であり、フェーズ II 試験に進むことが推奨された。日本の研究では難治性非小細胞肺癌の患者9人のうち4人で部分奏功がみられた。二つの無作為フェーズ II 試験では、進行性非小細胞肺癌の患者で ZD6474 と化学療法の組み合わせが評価された。最初の研究では、前治療した非小細胞肺癌の患者 127 人が無作為に振り分けられ、Docetaxel (21 日毎に 75 mg/m<sup>2</sup>) と ZD6474 (1 日に 1 回 100

あるいは 300 mg) あるいはプラセボが投与された。その研究では有効性の主要評価項目である無憎悪期間は満たされた。無憎悪期間の危険率は Docetaxel 単独と ZD6474 (100 mg) + Docetaxel を比較すると 0.635 であり、Docetaxel 単独と ZD6474 (300 mg) + Docetaxel を比較すると 0.829 であった。推定無憎悪期間の中央値は Docetaxel + ZD6474 (100 mg) で 18.7 週、Docetaxel + ZD6474 (300 mg) で 17 週、Docetaxel 単独で 12 週であった。2 番目に現在行われている研究では、非小細胞肺癌患者の第 1 選択治療として ZD6474 (200mg あるいは 300mg) が Carboplatin (AUC 6mg/ml×分) および Paclitaxel (200 mg/m<sup>2</sup>) の組み合わせで評価されている。客観的な奏功が両方の投与量で 18 人の患者のうち 7 人でみられた。この研究における無作為試験が開始され募集が続けられている。これらの研究において ZD6474 で報告されている有害事象は対処可能であり、下痢、発疹、倦怠感、無症状の悪性度 I の補正 QT 間隔の延長 (一般に 500 mg/日以上)の投与量でみられる)を含む。最近、フェーズ II の無作為試験で、進行性の過去に治療した非小細胞肺癌の患者で ZD6474 (300 mg) と Gefitinib (250 mg) が比較された。予備的なデータによると、バイバー疲労自己報告スケールの持続時間が Gefitinib よりも ZD6474 で統計的に有意に長くなった (11.9 対 8.1 週、 $p=0.001$ )。以前に治療した回数が多い 46 人の乳癌の女性患者における単独治療では、客観的奏功が 0 人そして病勢の安定が 1 人しかみられなかった。小細胞肺癌および甲状腺癌において単剤としての ZD6474 の他のフェーズ試験が行われている。

#### 1-4. Semaxanib (SU5416)

Semaxanib は低分子の脂溶性の合成分子であり、VEGFR-1 および VEGFR-2 チロシンキナーゼを阻害する。Semaxanib は VEGF 依存的な内皮細胞の増殖を *in vivo* および *in vitro* で阻害し放射線療法に対するマウス B16 黒色腫およびマウス GL261 神経膠腫に対する感受性を増大させる。

フェーズ I 試験では、二つの Semaxanib の投与スケジュールが試験された。一方は五日間負荷投与しその後毎週負荷投与なしで静脈投与するというものであった。もう一方は負荷投与しないで2週間に1回静脈投与するというものであった。両方の投与スケジュールで 145 mg/m<sup>2</sup> が次の試験で推奨された。幾つかの試験では進行性の軟部組織の肉腫、転移性腎細胞癌、黒色腫、ホルモン難治性膀胱癌、多発性骨髄腫に対する単剤としての Semaxanib による治療では有意な抗腫瘍活性を示さなかった。転移性結腸直腸癌の患者 28 人に対する第 1 選択治療として Semaxanib を Fluorouracil + Leucovorin と組み合わせると 31.6% で良好な反応がみられた。しかし、無作為多施設フェーズ III 試験において 737 人の転移性結腸直腸癌患者の第 1 選択治療として Semaxanib と Fluorouracil + Leucovorin の組み合わせ対 Fluorouracil + Leucovorin では臨床転帰の改善は全くみられなかった。さらに Semaxanib 投与群では下痢、心血管事象、嘔吐、脱水症、敗血症などの有害事象がみられた。最終的に、固形腫瘍の患者において Cisplatin + Gemcitabine と Semaxanib を組み合わせたフェーズ I 試験で重篤な血栓塞栓事象の発生頻度が驚くほ

ど高くなり、このレジメンの継続を中止するよう勧告された。全体として、長期間治療の静脈投与による患者の不利益、フェーズ II/III 試験の否定的な結果、薬剤による重篤な有害事象の発現により Semaxanib をさらに臨床開発することは中止された。

#### 1-5. Sorafenib (BAY 43-9006)

Sorafenib は新規の bi-aryl urea の経口のマルチキナーゼ阻害剤であり、C-RAF および B-RAF キナーゼ活性を阻害し VEGFR ファミリー (VEGFR-2 および VEGFR-3) および PDGFR ファミリー (PDGFR- $\beta$  および Kit) を標的とする。Sorafenib は様々なヒト腫瘍異種移植モデルにおいて RAF/MEK/ERK のシグナル伝達系を標的とし腫瘍細胞の増殖および腫瘍の成長を抑制する。Sorafenib の毎日経口投与は、結腸直腸癌、乳癌および非小細胞肺癌の異種移植モデルにおいて広範囲の抗腫瘍活性が示す。抗マウス CD31 抗体を用いた腫瘍部分における微少血管密度および微少血管面積の解析により、これら三つ全ての異種移植モデルにおいて新血管形成が顕著に抑制される。これらのデータから Sorafenib は腫瘍に対する直接作用 (Raf および Kit のシグナル伝達の抑制を介して) および腫瘍の血管新生に対する作用 (VEGFR および PDGFR のシグナルの阻害を介して) により腫瘍の成長を阻害することが示唆された。

異なった持続経口投与スケジュールで治療した 163 人の患者を含むフェーズ I 試験から推奨されるフェーズ II の投与量として 1 日に 2 回 400 mg が確認された。これらの研究の基礎的なデータから、Sorafenib は進行性のほとんどが腎臓癌の難治性固形腫

瘍の患者において持続的な病勢の安定を起すことが示唆された。大規模無作為中止試験が様々なタイプの腫瘍の患者において Sorafenib 日に 2 回経口で 400 mg 投与された。進行性腎細胞癌の患者 202 人についての結果が報告された。12 週の誘導段階の後、65 人の患者で病勢が安定化し、無作為に Sorafenib (n=32) を持続するかあるいはプラセボを投与するかに割り振られた。振り分け後における無増悪生存期間の中央値はプラセボよりも Sorafenib のほうが長かった (24 週対 6 週、危険率=0.29、 $p=0.0087$ )。有害事象のプロファイルは許容できるものであり、発疹、手足皮膚反応、倦怠感、標準的な投薬治療で反応性の高血圧であった。TARGET と呼ばれるその後の無作為、プラセボコントロールフェーズ III 試験でサイトカイン難治性進行性腎癌の患者において有効性が確認された。この試験に登録した患者は Sorafenib 治療の 8 箇月前にサイトカインを基にしたレジメンの全身治療を受けた。無増悪生存期間の中央値は Sorafenib で 24 週であったのに対しプラセボで 12 週であった (危険率=0.44、 $p<0.0001$ )。12 週における無増悪率は Sorafenib で 79%であったのに対しプラセボでは 50%であった。Sorafenib は好ましい安全性プロファイルを示し、有害事象は対処可能であった。主な有害事象は、発疹 (31% 全ての悪性度、1% 悪性度 3/4)、手足皮膚反応 (26% 全ての悪性度、5% 悪性度 3/4)、脱毛症 (23% 全ての悪性度、0% 悪性度 3/4)、下痢 (30% 全ての悪性度、1% 悪性度 3/4)、嘔吐 (14% 全ての悪性度、1% 悪性度 3/4)、倦怠感 (18% 全ての悪性度、2% 悪性度 3/4) 高血圧 (8%

全ての悪性度、1% 悪性度 3/4) であった。プラセボ患者のクロスオーバーの効果を反映する暫定的な全生存解析がその後示された。全員で 903 人の患者が無作為に振り分けられ (Sorafenib 451 人、プラセボ 452 人)、200 人以上のプラセボ患者が Sorafenib にクロスオーバーされた。全生存期間の中央値は Sorafenib で 19.3 箇月であるのに対し、プラセボで 15.9 箇月であった (危険率=0.77、95%信頼区間 0.63-0.95、 $p=0.015$ )。クロスオーバーを審査すると、全生存期間の中央値は Sorafenib で 19.3 箇月であるのに対しプラセボで 14.3 箇月であった (危険率=0.74、95%信頼区間 0.58-0.93、 $p=0.010$ )。

これらの結果に基づき、米国 FDA は 2005 年の 12 月進行性腎癌の患者に対して Sorafenib の承認を公表した。さらに、ヨーロッパの委員会は肝細胞癌の治療について Sorafenib にオーファン医薬品の資格を与えた。この承認はヨーロッパ医薬品局からの推薦およびフェーズ II の単剤研究の結果に基づいている。この試験では、137 人の患者が 1 日に 2 回 4 週間を 1 サイクルとして持続的に Sorafenib (400 mg) が経口投与された。3 人の患者 (2.2%) が部分的な奏功、8 人 (5.8%) がやや有効、46 人の患者 (33.6%) で少なくとも 16 週間病勢が安定した。無増悪期間の中央値は 4.2 箇月であり、全生存期間の中央値は 9.2 箇月であった。悪性度 3 および 4 の薬剤に関連した有害事象は、倦怠感 (9.5%)、下痢 (8.0%)、手足皮膚反応 (5.1%) であった。Sorafenib で治療した患者の 43%が少なくとも 4 箇月病勢が安定し、さらに患者の 9%で腫瘍が小さくなった。最近、肝細胞癌において



Sorafenib 対プラセボの有効性を評価するフェーズⅢ臨床試験の登録が完了し、データは審理中である。さらに、予備的検討結果ではあるが Sorafenib はフェーズⅡ試験において化学療法剤との組み合わせ (Decarbazine および Temozolomide) で黒色腫に対して有望な抗腫瘍活性が示された。転移性黒色腫の治療における Sorafenib+化学療法剤のフェーズⅢ試験が行われている。

臨床反応および腫瘍生検におけるトランスレーショナルな評価項目を調べることを目的として、再発した非小細胞肺癌の患者で Sorafenib 単剤試験が行われた。米国東海岸癌臨床試験グループにより、過去に 1 回化学療法レジメンを受けた測定可能な疾患を有する 0-1 の一般状態の再発性非小細胞肺癌の患者が登録された。造影剤急速注入核磁気共鳴画像および腫瘍の生検が 1 サイクル前、1 サイクル、15 日に行われ、腫瘍の血管およびトランスレーショナルな評価項目の早期における変化が調べられた。6 人の患者で有害事象が評価可能であり、5 人の患者で反応が評価可能であった。最も良好な反応には 1 人の部分奏功が含まれ、8 週で 41%腫瘍が退行し 28 週まで部分奏功は続いた。また、2 人でそれぞれ 16 週および 19 週に病勢が安定化した。1 人は治療後 8 週で病勢が進行した。皮膚に関する有害事象全ては悪性度 1 あるいは 2 であり、Sorafenib の一過性の中断および対処療法により回復した。悪性度 2 の高血圧が 1 人の患者で起きた。造影剤急速注入核磁気共鳴画像の結果を考慮すると、サイクル 1、15 日に患者 1 人で透過性パラメーターおよび腫瘍のサイズが減少した。病勢が進行し

た患者 1 人、16 週病勢が安定した患者 1 人における造影剤急速注入核磁気共鳴画像の結果では透過性のパラメーターの減少はみられなかった。これらのデータから Sorafenib は十分忍容で再発性非小細胞肺癌に対して活性を有することが示唆された。客観的奏功を示す予備的な結果から、次の段階の臨床試験を進めることが妥当であることが示された。

多施設で対照群が設定されていないフェーズⅡ試験が行われ、再発性および難治性の進行性非小細胞肺癌患者における Sorafenib (1 日に 2 回 400 mg、持続) の有効性および安全性が評価された。プロテオームバイオマーカー解析 [酵素免疫測定 (n=44)、質量分析 (n=43)] に用いるため、サイクル 1 の 21 日、サイクル 3 の 1 日におけるスクリーニングで血漿が採取された。54 人の患者のうち 52 人が Sorafenib を投与された。Sorafenib が投与された患者のほとんど (49/52) は悪性度Ⅳの非小細胞肺癌であり、評価が可能な 51 人の患者のうち 30 人 (59%) の病勢が安定化した。部分奏功は確認されなかったが、15 人の患者 (29%) で腫瘍の収縮 (4 人で 30%以上の収縮) がみられた。病勢が安定化した患者の無増悪期間の中央値は 23.7 週、全ての評価可能な患者 (n=51) の無増悪期間の中央値は 11.9 週であり、全生存期間の中央値は 29.3 週であった。最も頻度が高い有害事象は、下痢 (21 人、40%)、手足皮膚反応 (19 人、37%)、倦怠感 (14 人、27%) であった。悪性度 3 の高血圧が 2 人の患者 (4%) で起こった。3 人の患者が有害事象 (手足皮膚反応、リパーゼの上昇、心筋梗塞) のため中止した。Sorafenib 中止後 30 日以内に 9 人が死亡し

た（進行性疾患が 5 人、心肺停止が 2 人、喀血が 1 人、不明が 1 人）。治療の継続期間を超えたスクリーニングにおいて ELISA で測定した 5 種類のタンパク質レベルは、無増悪期間および最大の腫瘍収縮と有意に一致した。質量分析により同定したさらに 5 種類のタンパク質レベルも無増悪期間と一致した。従って、同定されたバイオマーカーは非小細胞肺癌の患者における Sorafenib の有効性評価に有用であり、1 日に 2 回の 400mg の Sorafenib は十分忍容であり、進行性非小細胞肺癌患者の 60% で病勢が安定化し有効であることが示された。

多施設国際単一アームフェーズ II 試験では、進行性非小細胞肺癌に対する Sorafenib による治療が患者の健康に関連した生活の質（HRQL）および症状に与える影響について評価された。HRQL は癌治療肺質問表の機能評価により測定された。その結果、Sorafenib が治療期間における患者の機能および症状反応の転帰に悪影響を及ぼさないことが示された。

#### 1-6. Sunitinib (SU11248)

Sunitinib は PDGFR、VEGFR2、Flt-3 および c-Kit を含む多くの受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害する。Sunitinib は経口投与が可能で、非臨床試験では以下のように興味深い抗腫瘍活性を示した。Sunitinib は退行および成長の停止を含む広範囲にわたる強力な抗腫瘍活性を示し、ヒトあるいはラット腫瘍セルラインに由来する各種の生着したマウス異種移植の成長を十分に抑制する。Sunitinib は皮下腫瘍異種移植モデルにおいて FLT-3-ITD 腫瘍を顕著に退行させ、骨髄移植モデルにおいて生存を延長

する。Sunitinib はマウス乳癌腫瘍ウイルス-v-Ha-ras トランスジェニックマウスおよびラットにおいて 7,12-demethylbenz(a)anthracene により誘導される乳癌において、その成長を強く退行する。Sunitinib は皮下 MX-1 腫瘍のヒト乳癌異種移植においても腫瘍の成長を抑制する。Sunitinib と Docetaxel を組み合わせると、マウスの生存が効果的に延長される。Sunitinib は乳癌骨転移の成長を阻害できる効果的で忍容な治療法であり、腫瘍に関連した骨溶解も抑制することが示唆されている。マウス腫瘍モデルで分割放射線治療と組み合わせると、放射線照射治療により誘導される内皮細胞傷害が SU11248 により増強され、腫瘍血管が破壊されて腫瘍が抑制される。SU11248 と既存の抗白血病治療薬である Cytarabine あるいは Daunorubicin の相乗的な相互作用が白血病細胞において報告されている。

フェーズ I 臨床試験から、推奨される Sunitinib の投与量は毎日 1 回経口で 50 mg であり、それを 4 週間行った後 2 週間中断するサイクルを繰り返すことが妥当であることが示された。薬動学的なデータから経口吸収が良く、半減期が 40 時間以上と長いことが示された。腎癌の患者において有望な活性が観察された。このスケジュールを用いて、多施設フェーズ II 臨床試験が実施され、サイトカイン治療を 1 回行った後で病勢が進行した転移性腎癌の患者の第 2 治療として臨床上の活性および安全性が評価された。Sunitinib で治療した 63 人の患者のうち 25 人（40%）で客観的な奏功が得られ、さらに 17 人の患者（27%）で病勢が安定化した。無増悪期間の中央値は 8.7 箇

月 (95%信頼区間、5.5-10.7) であり、生存期間の中央値は 16.4 箇月 (95%信頼区間、10.8-未到達) であった。最も共通の有害事象は倦怠感であり、7 人の患者 (11%) で悪性度 3 と分類された。これらの結果は転移性腎癌の 2 次的治療として行った過去の研究と比較すると特に注目に値し、転移性腎臓癌の第一選択治療として Sunitinib 対 IFN- $\alpha$  のフェーズ III 試験の妥当性が支持された。この試験では無治療の転移性腎細胞癌の患者が無作為に 1:1 に振り分けられ、Sunitinib の投与 (6 週間を 1 サイクル、毎日 1 回経口で 50 mg、4 週間投与後 2 週間中断) あるいは IFN- $\alpha$  の投与 (6 週間を 1 サイクル、週に 3 回 900 万単位皮下注射) が行われた。主要な評価項目は無憎悪期間であった。副次的な評価項目には客観的な奏効率、全生存期間、有害事象が含まれた。750 人の患者が無作為に振り分けられ、375 人が Sunitinib、375 人が IFN- $\alpha$  が投与された。無憎悪期間の中央値は Sunitinib で 47.3 週 (95%信頼区間、40.9-到達せず) あるのに対し、IFN- $\alpha$  で 24.9% (95%信頼区間、21.9-37.1) であった (危険率=0.394、95%信頼区間、0.297-0.521 ;  $p < 0.000001$ )。客観的奏効率は Sunitinib で 24.8% (95%信頼区間、19.7-30.5) であるのに対し、IFN- $\alpha$  では 4.9% (95%信頼区間、2.7-8.1) であった。8%の患者が Sunitinib 投薬に伴う有害事象、13%の患者が IFN- $\alpha$  投薬による有害事象で離脱した。これらの結果から、転移性腎細胞癌の患者の第 1 選択治療において無憎悪期間および客観的な奏効率は Sunitinib のほうが IFN- $\alpha$  に比べて統計的に有意に改善されることが示された。

Sunitinib は VEGFR だけでなく胃腸間質

腫瘍において発現頻度が高い c-Kit も標的とすることから、胃腸間質腫瘍の治療薬の有望な候補である。Imatinib mesylate に難治性の進行性および転移性胃腸間質腫瘍の患者 97 人で行われたフェーズ I / II 試験において、Sunitinib は 65%の患者で臨床上的有用性 (部分奏効率 8%、病勢の安定率 58%) を誘導した。フェーズ III の多施設無作為 2 重盲験プラセボコントロール試験において Imatinib mesylate に抵抗性の胃腸間質腫瘍の患者の治療において Sunitinib の有効性が明確に示された。Sunitinib は 6 週間を 1 サイクルとして 1 日に 2 mg (4 週間治療、2 週間中断) 投与された。この試験では、治療により病状が進行後非盲験にされ、プラセボを投与された患者は Sunitinib にクロスオーバーされた。Sunitinib の治療により無憎悪期間の中央値が 6.3 箇月対 1.5 箇月 (危険率=0.335 ;  $p < 0.00001$ ) と 4 倍以上延長され、全生存期間が統計的に有意に延長された (危険率=0.491 ;  $p = 0.00674$ )。Sunitinib の延命効果はプラセボから Sunitinib へ患者をクロスオーバーした結果過少評価された可能性がある。Sunitinib は一般的に十分忍容で有害事象は対処可能であり、それには倦怠感、下痢、口の痛み、皮膚の変色、高血圧が含まれる。Sunitinib 治療は 14 人の患者 (6.8%) で部分奏功および 36 人の患者 (17.4%) で 22 週以上にわたる持続した病勢の安定を誘導した。一方、プラセボでは部分奏効が 0%、22 週以上にわたる持続した病勢の安定は 2 人 (1.9%) であった。Imatinib mesylate 不耐性の患者 9 人のうち 4 人は Sunitinib 治療で部分奏効が得られたが、プラセボで治療した患者 4 人では

部分奏功は得られなかった。結論として、Imatinib mesylate 治療が抵抗性あるいは不耐性により失敗した胃腸間質腫瘍の患者において Sunitinib は無憎悪期間および全生存期間を有意に延長した。この治療により異なったキナーゼ阻害剤に抵抗性の患者において複数を標的とするチロシンキナーゼ阻害剤の際立った臨床上的有効性が示された。これらの肯定的な結果が考慮され、2006年1月米国FDAは進行性腎細胞癌の患者および病勢が進行したあるいは Imatinib mesylate に不耐性の胃腸間質腫瘍患者に対して Sunitinib の承認を公表した。

再発性非小細胞肺癌における Sunitinib の単剤活性を評価する非盲験 2 段階多施設フェーズ II 試験の最初のデータが報告された。適格者の基準は非小細胞肺癌、米国東海岸癌臨床試験グループによる一般状態 0-1、大量の喀血がない、脳への転移がない、過去に 1 あるいは 2 回化学療法レジメンにより治療を受けた患者、末端器官が適切な機能を有する患者であった。患者には 1 サイクルを 6 週間とし 1 日に経口で 50 mg を 4 週間投与し、2 週間中断した。全部で 64 人の患者が登録し、63 人が治療された。悪性度 3/4 の有害事象には倦怠感/無力症 (21%)、高血圧 (5%) が含まれた。ほとんどの有害事象は悪性度 1/2 の倦怠感/無力症 (68%) および食欲不振 (40%) であった。悪性度 5 の有害事象には肺出血 (2 人)、脳出血 (1 人) が含まれた。これまで部分奏功が 6 人の患者で確認された (9.5%、95%信頼区間、3.6-19.6)。病勢の安定がさらに 27 人の患者でみられた (43%)。無憎悪生存期間は 11.3 週であり、全生存期間の中央値は 23.9 週であった。この結果から、Sunitinib

が非常に良好な単剤活性を有し、過去に治療した再発性および進行性非小細胞肺癌の患者において十分忍容であり、最近承認された薬剤と同様なレベルの活性を有することが示された。試験は拡大され、経口で 1 日に 37.5mg の Sunitinib の持続的な投与戦略が検討されている。この研究では三つの出血に関連した死亡が報告されている。この試験に登録された患者の 22%が扁平上皮癌の組織像を有したが、扁平上皮細胞癌の患者 2 人で肺出血が起こった。近い将来には、出血/血栓に関連する有害事象が起こる可能性について Sunitinib、Sorafenib 対 Bevacizumab で比較する必要がある。そのような比較により非小細胞肺癌に対する Sorafenib および Sunitinib の将来における治療が他の血管新生阻害剤である Bevacizumab のように非扁平上皮癌の非小細胞肺癌に限定されるかどうか明らかになると思われる。

#### 1-7. Gefitinib

Gefitinib は進行性非小細胞肺癌の臨床用途に 2003年4月に米国FDAにより承認された最初の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤であり、現在 30 以上の国で承認されている。

四つのフェーズ I 試験で非小細胞肺癌を含む幅広い腫瘍で Gefitinib の良好な忍容性および活性が示された。二つの大規模フェーズ II (IDEAL 1 および 2) 試験が報告されている。

以下に IDEAL 1 および 2 の試験結果を示す。IDEAL 1 の目的は過去に 1 度あるいは 2 度化学療法レジメンの治療 (少なくとも一度は Platinum) を受けた進行性非小細胞肺癌患者で二つの投与量の Gefitinib の有効