目次

1. 医薬品の構造 5
2. 抗体薬物複合体の設計 7
3. 薬理的特性 8
4. 申請した効能・効果、用法及び用量 9
5. 参考文献 10

図一覧

図 2.6.1.1-1　DS-8201a の構造 6
図 2.6.1.1-2　DS-8201a から遊離した薬物 MAAA-1181a の構造 6

略語一覧

略語	略していない表現（英）	略していない表現（日）
ADC	antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxic	抗体依存性細胞傷害
CPT	camptothecin	カンプトテシン
DAR	drug-to-antibody ratio	1 抗体あたりの薬物抗体比
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2
IgG1	immunoglobulin G1	免疫グロブリン G1
T-DM1	trastuzumab emtansine	トラスツズマブ　エムタンシン

用語一覧

用語	定義
MAAA-1181a	DS-8201a から遊離した薬物: トポイソメラーゼ I 阻害剤であるエキサテカンの誘導体
MAAL-9001	DS-8201a の中間体: トラスツズマブとアミノ酸配列が同一のヒト化抗 HER2 IgG1κ モノクローナル抗体

1.　医薬品の構造

DS-8201a（トラスツズマブ　デルクステカン［遺伝子組換え］）は、抗ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2（human epidermal growth factor receptor 2: HER2）抗体である MAAL-9001 とトポイソメラーゼ I 阻害剤である MAAA-1181a を切断可能なペプチド含有リンカーを介して共有結合させた HER2 を標的とした抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate: ADC）である。MAAL-9001 は、トラスツズマブとアミノ酸配列が同一のヒト化抗 HER2 免疫グロブリン G1（immunoglobulin G1: IgG1）κ モノクローナル抗体である。薬物リンカーは、MAAL-9001 の重鎖－軽鎖間又は重鎖－重鎖間ジスルフィド結合を還元することにより生成したシステイン残基とのチオエーテル結合を介して、MAAL-9001 に結合している。1 抗体あたりの薬物抗体比（drug-to-antibody ratio: DAR）は約 8 である。リンカーは、標的腫瘍細胞内に内在化した後にリソソーム酵素により特異的に切断されるようにデザインした[1,2]。したがって、HER2 を発現する腫瘍細胞内に内在化した後に MAAA-1181a は DS-8201a から遊離し、遊離された MAAA-1181a が標的腫瘍細胞に対してトポイソメラーゼ I 阻害によるデオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid: DNA）損傷及び細胞死を誘導する。DS-8201a の構造を図 2.6.1.1-1 に、MAAA-1181a の構造を図 2.6.1.1-2 に示す。

図 2.6.1.1-1　DS-8201a の構造

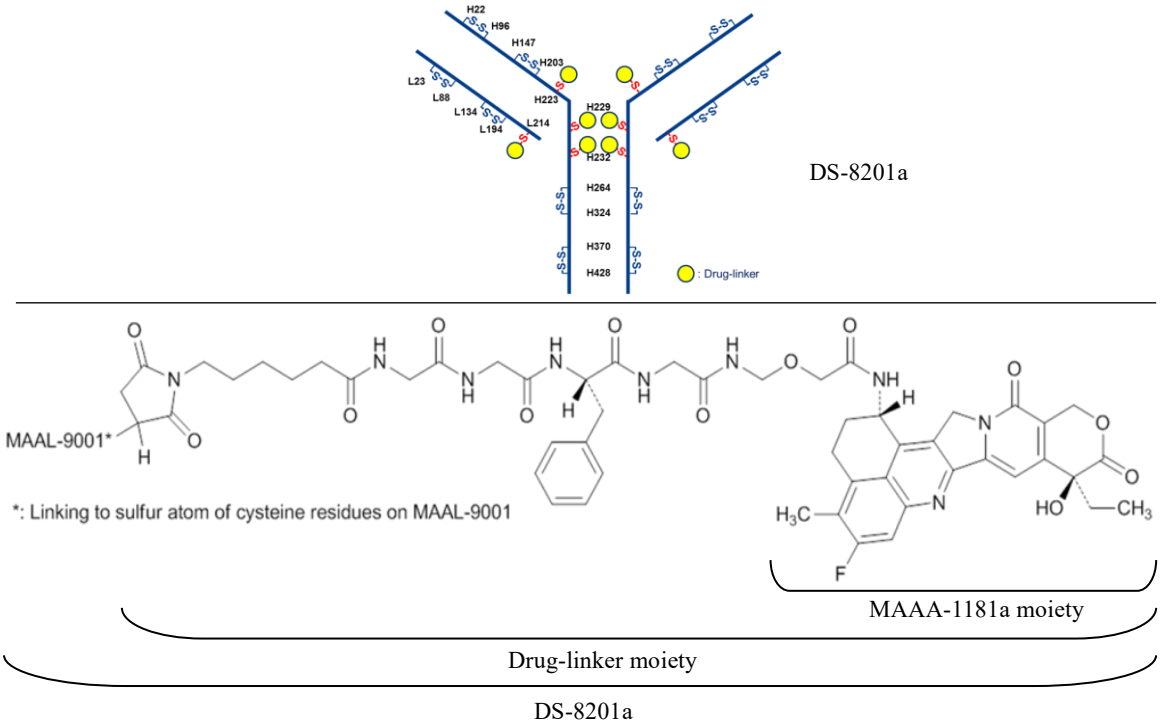
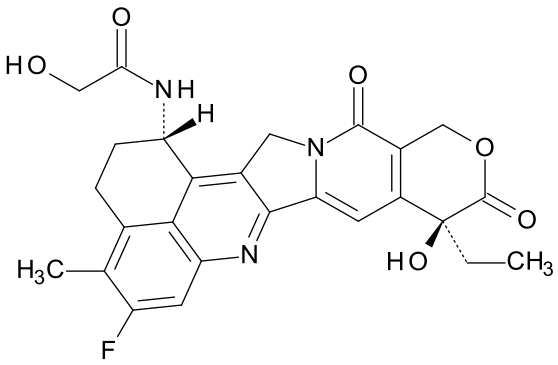


図 2.6.1.1-2　DS-8201a から遊離した薬物 MAAA-1181a の構造



2.　抗体薬物複合体の設計

ADC の概念は、毒性を抑えながらその効果を最大化するために、モノクローナル抗体の特異性を介して、抗原発現腫瘍細胞選択的に強力な殺細胞活性を有する薬物を送達することである[3,4,5]。本概念は、1900 年代初期にドイツの医師及び科学者 Paul Ehrlich により提案されたが、ADC 開発の歴史は困難を伴った[3,4]。その ADC 技術には、薬物の活性や種類、抗体あたりの薬物結合数、薬物リンカーの安定性、薬物結合数の不均一性など、課題が種々あった[3,4,6]。1 抗体に結合できる薬物数は限られているため、特に標的細胞表層の抗原分子数が少ない場合は、薬物の活性及び薬物結合数が重要となる。薬物リンカーの安定性は、毒性全般、薬物動態（PK）の特性、及び ADC の治療指数（therapeutic index）に影響を与える。薬物結合数が少ない ADC の薬効は低く、薬物結合数が多い ADC は PK 及び毒性に悪影響を及ぼすと考えられるため、薬物結合数の不均一性は ADC の有効性及び安全性に重大な影響を及ぼす可能性がある[3,4]。したがって、これらの課題すべてを克服するような新規の薬物リンカーシステムが求められていた。DS-8201a は以下 7 つの特長を有するようデザインした。すなわち、1）新規薬物、2）高活性、3）バイスタンダー効果、4）半減期の短い薬物、5）血中安定性の高い薬物リンカー、6）腫瘍内で選択的に切断されるリンカー、7）高 DAR[2,3,7,8,9] である。

カンプトテシン（CPT）は DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤であり、広範囲の腫瘍に対する有効性が確認されている[10]。エキサテカンメタンスルホン酸 2 水和物（DX-8951f）は他の CPT 類縁体に比べて強いトポイソメラーゼ I 阻害活性及び抗腫瘍活性を示す水溶性の CPT 類縁体であるため、様々なリンカーとエキサテカン誘導体を研究した[2,3]。その結果、イリノテカン活性代謝物の SN-38 よりも 10 倍高いトポイソメラーゼ I 阻害活性を有する新規エキサテカン誘導体 MAAA-1181a を選択し、ADC の薬物として十分に高い効果を示すと考えた[2,3,7]。DS-8201a は、現在承認されている ADC と比べて約 8 の高 DAR 化を可能とし、薬物結合数の分布が均一である[3,7]。DAR8 は理論上、従来の鎖間システイン結合で結合できる最大薬物数である[7]。DAR が高いにもかかわらず、DS-8201a はカニクイザルで良好な PK 及び安全性プロファイルを示した[3,7,9]。リンカーは、リソソーム酵素によって切断されるペプチドをベースにしたリンカーであり、自己解離型のアミノメチレンスペーサーは従来の p-アミノベンジルスペーサーに比べて疎水性を下げ、高い血中安定性をもたらした[2,3]。本ペプチドリンカーは、腫瘍細胞で高発現しているカテプシン類などのリソソーム酵素によって切断されるため[1,11,12,13]、DS-8201a は標的腫瘍細胞内で選択的にリソソーム酵素によって切断され、MAAA-1181a を遊離すると推測される[2,3,7]。また、MAAA-1181a は非特異的な毒性を軽減するために、血中半減期が短くなるようデザインした[3,7,9]。さらに、MAAA-1181a は ADC がバイスタンダー効果を示すように細胞膜透過性を有するようデザインしたため、DS-8201a は不均一な腫瘍に対しても有効性が期待される[3,8]。

3. 薬理的特性

DS-8201a は、DS-8201a から遊離した MAAA-1181a のトポイソメラーゼ I 阻害により HER2 発現癌細胞で抗腫瘍活性を示す。また、DS-8201a は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性と HER2 を介した Akt リン酸化阻害活性も示す。In vitro の検討では、DS-8201a は HER2 発現に依存した細胞増殖抑制活性を示し、HER2 結合活性及び ADCC 活性において薬物の結合による影響はほとんどないことが確認された。マウス移植モデルを用いた in vivo の検討では、DS-8201a は、DS-8201a に使用している抗 HER2 抗体である MAAL-9001 単独に比べて HER2 を標的とした抗腫瘍活性及び腫瘍退縮効果が強力であることが確認された。

HER2 を標的とした ADC としては、トラスツズマブ　エムタンシン（trastuzumab emtansine: T-DM1）がトラスツズマブ及びタキサン系薬剤（それぞれの単独又は併用）既治療の HER2 陽性転移性乳癌患者に対する治療薬として日本[14]、米国、欧州などで承認されている。T-DM1 は薬物にチューブリン重合阻害剤を用いており、DAR が平均 3.5 である。T-DM1 と比べて、DS-8201a は、薬物の作用機序が異なり（DS-8201a ではトポイソメラーゼ I 阻害、T-DM1 ではチューブリン重合阻害）、DAR が T-DM1 の 2 倍（約 8）であり、結合している薬物分布が均一である。DAR は ADC の重要なパラメータと考えられており、DAR が高いと薬物を効率的に送達できるため、DAR が高いほど抗腫瘍活性も高くなることが知られている。ただし、DAR が高くなると in vivo で安定性の低下につながる可能性がある[5,6]。DS-8201a の薬物リンカーは DAR が高いにもかかわらず血漿中安定性が高く、その結果、薬物動態及び安全性プロファイルが良好である。不均一な腫瘍に対する抗腫瘍活性を高める上で別の重要な要素としてバイスタンダー殺細胞効果が考えられている。このバイスタンダー効果は、標的発現腫瘍細胞で ADC から遊離された膜透過性を有する薬物が抗原非発現の隣接腫瘍細胞に対しても細胞傷害を引き起こす効果である[5,8]。DS-8201a から遊離した薬物は膜透過性を有するが、T-DM1 から遊離した薬物は膜透過性を示さないことが報告されている[5,8]。

各種マウス移植モデルを用いた in vivo 試験で、DS-8201a は T-DM1 よりも抗腫瘍活性が強力であった。また、DS-8201a は T-DM1 が無効の HER2 低発現腫瘍及び HER2 発現が不均一の腫瘍に対しても有効であった。

以上、DS-8201a は、新規トポイソメラーゼ I 阻害剤を HER2 発現腫瘍に送達する新規の ADC 薬物リンカー技術を適用した ADC である。これまでに得られた結果より、DS-8201a は HER2 低発現腫瘍及び HER2 発現が不均一の腫瘍を含め、既承認の HER2 標的治療に無効又は耐性化した腫瘍に対して有効性が期待される。

4. 申請した効能・効果、用法及び用量

申請品目	エンハーツ点滴静注用 100 mg
効能又は効果（案）	トラスツズマブ　エムタンシン（遺伝子組換え）による治療歴のある HER2 陽性の手術不能又は再発乳癌
用法及び用量（案）	通常、成人にはトラスツズマブ　デルクステカン（遺伝子組換え）として 1 回 5.4 mg/kg（体重）を 3 週間間隔で点滴静注する。

5. 参考文献

1. Shiose Y, Ochi Y, Kuga H, et al. Relationship between drug release of DE-310, macromolecular prodrug of DX-8951f, and cathepsins activity in several tumors. Biol Pharm Bull. 2007;30(12):2365-70.
2. Nakada T, Masuda T, Naito H, et al. Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads. Bioorg Med Chem Lett. 2016;26(6):1542-5.
3. Nakada T, Sugihara K, Jikoh T, et al. The latest research and development into the antibody-drug conjugate, [fam-] trastuzumab deruxtecan (DS-8201a), for HER2 cancer therapy. Chem Pharm Bull. 2019;67(3):173-85.
4. Perez HL, Cardarelli PM, Deshpande S, et al. Antibody-drug conjugates: current status and future directions. Drug Discov Today. 2014;19(7):869-81.
5. Trail PA, Dubowchik GM, Lowinger TB. Antibody drug conjugates for treatment of breast cancer: Novel targets and diverse approaches in ADC design. Pharmacol Ther. 2018;181:126-42.
6. Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. Clin Cancer Res. 2004;10(20):7063-70.
7. Ogitani Y, Aida T, Hagihara K, et al. DS-8201a, A novel HER2-targeting ADC with a novel DNA topoisomerase I inhibitor, demonstrates a promising antitumor efficacy with differentiation from T-DM1. Clin Cancer Res. 2016;22(20):5097-108.
8. Ogitani Y, Hagihara K, Oitate M, et al. Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody-drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. Cancer Sci. 2016;107(7):1039-46.
9. Nagai Y, Oitate M, Shiozawa H, et al. Comprehensive Preclinical Pharmacokinetic Evaluations of Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a), a HER2-targeting antibody-drug conjugate, in cynomolgus monkeys. Xenobiotica. 2019;49(9):1086-96.
10. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nat Rev Cancer. 2006;6(10):789-802.
11. Niedergethmann M, Wostbrock B, Sturm JW, et al. Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma. Pancreas. 2004;29(3):204-11.
12. Aggarwal N, Sloane BF. Cathepsin B: multiple roles in cancer. Proteomics Clin Appl. 2014;8(5-6):427-37.
13. Ruan J, Zheng H, Fu W, et al. Increased expression of cathepsin L: a novel independent prognostic marker of worse outcome in hepatocellular carcinoma patients. PLoS One. 2014;9(11):e112136.
14. カドサイラ®点滴静注用 100mg／カドサイラ®点滴静注用 160mg [添付文書]. 中外製薬株式会社; 2017 Jan.

目次

1. まとめ 7
1.1 効力を裏付ける試験 7
1.2 副次的薬理試験 10
1.3 安全性薬理試験 10
2. 効力を裏付ける試験 11
2.1 In vitro 試験 11
2.1.1 ヒト HER2 に対する DS-8201a の結合活性及び特異性 11
2.1.2 ヒト癌細胞に対する DS-8201a の HER2 特異的な細胞増殖抑制活性 11
2.1.3 MAAA-1181a のトポイソメラーゼ I 阻害活性 12
2.1.4 DS-8201a による DNA 損傷及びアポトーシスの誘導 13
2.1.5 DS-8201a の細胞内 Akt リン酸化阻害活性 14
2.1.6 DS-8201a の抗体依存性細胞傷害活性 14
2.1.7 DS-8201a（Process 1 及び Process 2）の抗体依存性細胞傷害活性 15
2.2 In Vivo 試験 16
2.2.1 HER2 陽性胃癌細胞移植ヌードマウスモデルに対する DS-8201a の HER2 を標的とした抗腫瘍活性 16
2.2.2 HER2 陽性胃癌細胞移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a の用量依存性 17
2.2.3 HER2 陽性乳癌細胞移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a（Process 1 及び Process 2）及びその抗体部分の抗腫瘍活性 18
2.2.4 HER2 発現乳癌患者腫瘍組織移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a の抗腫瘍活性 19
2.2.5 トラスツズマブ抵抗性 HER2 陽性乳癌移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a の抗腫瘍活性 21
2.2.6 HER2 陽性胃癌患者腫瘍組織移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a の抗腫瘍活性 22
2.2.7 HER2 発現が不均一な胃癌の移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a の抗腫瘍活性 23
3. 副次的薬理試験 25
4. 安全性薬理試験 26
4.1 ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子導入チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた MAAA-1181a のヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル電流に対する影響を評価する安全性薬理試験（GLP 試験） 26
4.2 サル心血管系、呼吸器系、及び中枢神経系に対する影響を評価する安全性薬理試験（GLP 試験） 26
5. 薬力学的薬物相互作用 28

6. 考察及び結論 29
7. 参考文献 30

表一覧

表 2.6.2.1-1　DS-8201a の効力を裏付ける試験の概要 9
表 2.6.2.1-2　DS-8201a 又は MAAA-1181a の安全性薬理試験の概要 10
表 2.6.2.2-1　MAAL-9001 及び MAAA-9001b と比較した DS-8201a の HER2 特異的細胞増殖抑制活性 12

図一覧

図 2.6.2.2-1　MAAA-1181a のヒトトポイソメラーゼ I 阻害活性.....12
図 2.6.2.2-2　DS-8201a、MAAL-9001、又は MAAA-1181a 添加によるリン酸化 Chk1、リン酸化ヒストン H2A.X、及び切断化ポリ（アデノシン二リン酸リボース）ポリメラーゼの変化.....13
図 2.6.2.2-3　DS-8201a と MAAL-9001 の抗体依存性細胞傷害活性.....15
図 2.6.2.2-4　DS-8201a（Process 1）、DS-8201a（Process 2）、及び MAAA-9001b の抗体依存性細胞傷害活性.....16
図 2.6.2.2-5　HER2 陽性胃癌細胞 NCI-N87 を移植した CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a、MAAL-9001、及び MAAA-9001b の抗腫瘍活性.....17
図 2.6.2.2-6　HER2 陽性胃癌細胞 NCI-N87 移植 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a の用量依存性.....18
図 2.6.2.2-7　HER2 陽性乳癌細胞 KPL-4 移植 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a 及び MAAL-9001 の抗腫瘍活性.....19
図 2.6.2.2-8　HER2 発現乳癌患者腫瘍組織 CTG-0708 及び CTG-2308 移植 Hsd:Athymic Nude-*Foxn1*^{nu} マウスモデルでの DS-8201a、T-DM1、及び MAAL-9002b の抗腫瘍活性..21
図 2.6.2.2-9　HER2 陽性乳癌細胞 JIMT-1 移植 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a、T-DM1、及び MAAL-9002b の抗腫瘍活性.....22
図 2.6.2.2-10　HER2 陽性胃癌患者腫瘍組織 NIBIO G016 移植 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a、T-DM1、及び MAAL-9002b の抗腫瘍活性.....23
図 2.6.2.2-11　HER2 陽性胃癌 NCI-N87、HER2 陰性胃癌 MKN45、及び HER2 発現不均一胃癌 NCI-N87/MKN45 移植 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a 及び T-DM1 の抗腫瘍活性.....24

略語一覧

略語	略していない表現（英）	略していない表現（日）
ADC	antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxic	抗体依存性細胞傷害
AUC	area under the curve	時間曲線下面積
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
DAR	drug-to-antibody ratio	1 抗体あたりの薬物抗体比
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EC_{50}	50% effective concentration	50%有効濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IgG1	immunoglobulin G1	免疫グロブリン G1
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学
I_{Kr}	delayed rectifier potassium current	急速活性型遅延整流カリウム電流
NA	not applicable	該当なし
NK	natural killer	ナチュラルキラー
pAkt	phosphorylated Akt	リン酸化 Akt
PARP	poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase	ポリ（アデノシン二リン酸リボース）ポリメラーゼ
PDX	patient-derived xenograft	患者腫瘍組織移植
T-DM1	trastuzumab emtansine	トラスツズマブ エムタンシン
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖抑制率

用語一覧

用語	定義
DS-8201a	HER2 を標的とした抗体薬物複合体（DAR: 約 8）、トラスツズマブ　デルクステカン（遺伝子組換え）
DS-8201a（Process 1）	MAAL-9001（Process 1）を用いて製造した原薬
DS-8201a（Process 2）	MAAL-9001（Process 2）を用いて製造した原薬
MAAA-1181a	DS-8201a から遊離した薬物: トポイソメラーゼ I 阻害剤であるエキサテカンの誘導体
MAAA-9001b	DS-8201a と薬物リンカーが同一の対照ヒト IgG 抗体薬物複合体
MAAL-9001	DS-8201a の中間体: トラスツズマブとアミノ酸配列が同一のヒト化抗 HER2 IgG1κ モノクローナル抗体
MAAL-9001（Process 1）	MAb Process-1 で生産した MAAL-9001
MAAL-9001（Process 2）	MAb Process-2 で生産した MAAL-9001
MAAL-9002b	DS-8201a と抗体及び薬物リンカーが同一の低 DAR の HER2 を標的とした抗体薬物複合体（DAR: 3.7）
MAb Process-1	CHO[redacted] CHO[redacted] 細胞株を用いた MAAL-9001 生産工程 1
MAb Process-2	CHO[redacted] CHO[redacted] 細胞株を用いた MAAL-9001 の生産工程 2
総抗体 [a]	薬物結合型及び非結合型抗体をあわせた抗体

[a] 臨床の項では、総抗 HER2 抗体と記載

1. まとめ

DS-8201a（トラスツズマブ　デルクステカン［遺伝子組換え］）は、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2（human epidermal growth factor receptor 2: HER2）を標的とした抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate: ADC）であり、抗 HER2 抗体 MAAL-9001 にトポイソメラーゼ I 阻害剤 MAAA-1181a を切断可能なペプチド含有リンカーを介して結合させ、1 抗体あたりの薬物抗体比（drug-to-antibody ratio: DAR）は約 8 である。MAAL-9001 は、トラスツズマブとアミノ酸配列が同一のヒト化抗 HER2 免疫グロブリン G1（immunoglobulin G1: IgG1）κ モノクローナル抗体である。MAAA-1181a は、トポイソメラーゼ I 阻害活性を有するエキサテカン誘導体である。リンカーは、DS-8201a が標的腫瘍内に取り込まれた後にリソソーム酵素によって特異的に切断されるよう設計した[1,2]。したがって、DS-8201a は HER2 を発現する腫瘍に特異的に結合し、MAAA-1181a がトポイソメラーゼ I 阻害によって腫瘍の増殖を抑制する。また、DS-8201a は抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cellular cytotoxic: ADCC）活性及び HER2 を介した Akt のリン酸化阻害も示す。

MAAL-9001 は、MAAL-9001 の DNA 配列を導入したチャイニーズハムスター卵巣（Chinese hamster ovary: CHO）細胞で生産される。DS-8201a の開発では 2 種類の MAAL-9001 産生 CHO 細胞株を樹立した。DS-8201a の非臨床試験及び開発初期段階では、MAAL-9001 産生[redacted] CHO[redacted]細胞株を用いた。開発の初期段階、後期段階、及び最終的な実生産では第 2 の MAAL-9001 産生[redacted] CHO[redacted] 細胞株を使用している。それぞれの MAAL-9001 産生細胞株について MAAL-9001 の製造工程（MAb Process-1 及び MAb Process-2）を開発した（2.3.S.2.6.1［抗体］参照）。

非臨床試験に用いた MAAL-9001 及び DS-8201a について、MAb Process-1 で生産した MAAL-9001 を MAAL-9001（Process 1）、MAb Process-2 で生産した MAAL-9001 を MAAL-9001（Process 2）、MAAL-9001（Process 1）を用いて製造した DS-8201a を DS-8201a（Process 1）、MAAL-9001（Process 2）を用いて製造した DS-8201a を DS-8201a（Process 2）とする。

1.1 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける in vitro 及び in vivo 試験を表 2.6.2.1-1 に示す。In vitro 結合活性試験で、DS-8201a は HER2 細胞外ドメインに特異的に結合し、HER ファミリーに属する他のタンパク質とは結合しなかった。また、DS-8201a の HER2 結合活性は MAAL-9001 と同等であったことから、MAAL-9001 への MAAA-1181a の結合は HER2 結合活性には影響しないと考えられた。

複数の癌細胞株を用いた in vitro 細胞増殖抑制活性試験では、DS-8201a は HER2 陽性ヒト癌細胞に対して MAAL-9001 よりも強い増殖抑制活性を示したことから、MAAA-1181a を抗 HER2 抗体に結合することにより強力な活性を有することが示された。さらに、HER2 陰性ヒト癌細胞に対する DS-8201a の増殖抑制活性は認められず、DS-8201a の HER2 特異性が示された。

作用機序に関する検討では、MAAA-1181a はトポイソメラーゼ I を阻害し、DS-8201a は MAAA-1181a が DS-8201a から遊離することによるデオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid: DNA）損傷及びアポトーシスを誘導した。DS-8201a は HER2 を介した Akt リン酸化阻害活性及び ADCC 活性を示した。以上より、DS-8201a は遊離薬物である MAAA-1181a 及び抗 HER2 抗体の薬理活性による HER2 特異的な細胞増殖抑制活性を示すと考えられる。

HER2 陽性胃癌細胞 NCI-N87 を移植したマウスモデルでは、DS-8201a は HER2 を標的とした用量依存的な強い抗腫瘍活性を示し、その活性は MAAL-9001 より強かった。DS-8201a は、HER2 陽性ヒト乳癌細胞 KPL-4 移植マウスモデルでも、MAAL-9001 より強い抗腫瘍活性を示し、腫瘍退縮がみられた。これらの結果から、DS-8201a の抗腫瘍活性は主に MAAA-1181a の活性に起因することが示唆された。

さらに、DS-8201a は、下記の各種移植マウスモデルで、HER2 陽性の手術不能又は再発乳癌の適応を有する ADC、トラスツズマブ エムタンシン（trastuzumab emtansine: T-DM1）に比べ、より強い抗腫瘍活性を示した。

1) HER2 陽性乳癌患者腫瘍組織移植（patient-derived xenograft: PDX）モデル、CTG-0708
2) HER2 低発現乳癌 PDX モデル、CTG-2308
3) トラスツズマブ耐性 HER2 陽性乳癌 JIMT-1
4) HER2 陽性胃癌 PDX モデル、NIBIO G016
5) HER2 陽性（NCI-N87）及び HER2 陰性（MKN45）胃癌細胞からなる HER2 発現が不均一な胃癌移植モデル

CTG-2308 モデル及び JIMT-1 モデルでは、DS-8201a は MAAL-9002b（DS-8201a と同じ抗体及び薬物リンカーを結合させた低 DAR［DAR 3.7］の抗 HER2 ADC）に比べて有意に高い抗腫瘍活性を示した。このことから、DS-8201a は DAR が約 8 と高いため、より効率的な薬物送達が可能であり、HER2 陽性腫瘍のみならず HER2 低発現腫瘍でも強力な有効性をもたらすことが示唆された。DS-8201a は HER2 発現が不均一な腫瘍モデルでも有効であったが、T-DM1 は有効ではなかった。この結果より、標的発現腫瘍細胞内で ADC から遊離した膜透過性を有する薬物が隣接した抗原陰性腫瘍細胞にも細胞傷害活性を示すバイスタンダー殺細胞効果が DS-8201a の有効性に寄与している可能性が示唆された [3,4]。

以上、DS-8201a は、HER2 低発現腫瘍及び HER2 発現が不均一な腫瘍など、既承認の HER2 標的治療に無効又は耐性化した腫瘍に対しても強い抗腫瘍活性を示した。

表 2.6.2.1-1　DS-8201a の効力を裏付ける試験の概要

試験名	試験系	被験物質及び対照物質	投与経路	添付資料番号
In vitro				
結合活性	In vitro 無細胞系	DS-8201a (Process 1 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted])	NA	4.2.1.1-1
細胞増殖抑制活性	ヒト肺腺癌細胞株 Calu-3、ヒト胃癌細胞株 NCI-N87、ヒト乳腺癌細胞株 SK-BR-3 及び MDA-MB-468、並びにヒト乳癌細胞株 KPL-4	DS-8201a (Process 1 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted]), MAAA-9001b	NA	4.2.1.1-2
ヒトトポイソメラーゼ I 阻害活性	In vitro 無細胞系	MAAA-1181a·3/10 C_2H_3N 2/5 CH_4O 3/10 H_2O[a]	NA	4.2.1.1-3
DNA 損傷及びアポトーシス誘導	ヒト乳癌細胞株 KPL-4	DS-8201a (Process 1 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted]), MAAA-1181a·3/10 C_2H_3N 2/5 CH_4O 3/10 H_2O[a]	NA	4.2.1.1-4
細胞内 Akt リン酸化阻害活性	ヒト乳腺癌細胞株 SK-BR-3	DS-8201a (Process 1 [redacted])	NA	4.2.1.1-5
抗体依存性細胞傷害活性	ヒト末梢血単核細胞（エフェクター細胞）及びヒト乳腺癌細胞 SK-BR-3（ターゲット細胞）	DS-8201a (Process 1 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted])	NA	4.2.1.1-6
抗体依存性細胞傷害活性	ヒト CD16 発現 NK 細胞（エフェクター細胞）及びヒト乳腺癌細胞株 SK-BR-3（ターゲット細胞）	DS-8201a (Process 1 [redacted] and Process 2 [redacted])	NA	4.2.1.1-7
In vivo				
抗腫瘍活性（胃癌）	ヒト胃癌細胞 NCI-N87 移植ヌードマウス	DS-8201a (Process 1 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted]), MAAA-9001b	静脈内	4.2.1.1-8
抗腫瘍活性（胃癌）	ヒト胃癌細胞 NCI-N87 移植ヌードマウス	DS-8201a (Process 1 [redacted])	静脈内	4.2.1.1-9
抗腫瘍活性（乳癌）	ヒト乳癌細胞 KPL-4 移植ヌードマウス	DS-8201a (Process 1 [redacted] and Process 2 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted] and Process 2 [redacted])	静脈内	4.2.1.1-10
抗腫瘍活性（乳癌）	ヒト乳癌患者腫瘍組織 CTG-0708 及び CTG-2308 移植ヌードマウス	DS-8201a (Process 2 [redacted]), T-DM1, MAAL-9002b	静脈内	4.2.1.1-11, 4.2.1.1-12, 4.2.1.1-13
抗腫瘍活性（乳癌）	ヒト乳癌細胞 JIMT-1 移植ヌードマウス	DS-8201a (Process 2 [redacted]), T-DM1, MAAL-9002b	静脈内	4.2.1.1-14

試験名	試験系	被験物質及び対照物質	投与経路	添付資料番号
抗腫瘍活性（胃癌）	ヒト胃癌患者腫瘍組織 NIBIO G016 移植ヌードマウス	DS-8201a (Process 2 [redacted]), T-DM1, MAAL-9002b	静脈内	4.2.1.1-15
抗腫瘍活性（胃癌）	ヒト胃癌細胞 NCI-N87 移植、ヒト胃腺癌細胞 MKN45 移植、又は NCI-N87 及び MKN45 の混合移植ヌードマウス	DS-8201a (Process 2 [redacted]), T-DM1	静脈内	4.2.1.1-16, 4.2.1.1-13

DNA, deoxyribonucleic acid; NA, not applicable; NK, natural killer; T-DM1, trastuzumab emtansine.
[a] MAAA-1181a·3/10 C_2H_3N 2/5 CH_4O 3/10 H_2O was referred to MAAA-1181c in the report.

1.2　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

1.3　安全性薬理試験

DS-8201a 又は MAAA-1181a の安全性薬理試験を表 2.6.2.1-2 に示す。DS-8201a をテレメトリー送信機を装着した雄性カニクイザルに単回静脈内投与した結果、78.8 mg/kg まで心血管系、呼吸器系、及び中枢神経系への作用は認められなかった。また、MAAA-1181a のヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子（human ether-à-go-go-related gene: hERG）導入 CHO 細胞を用いた試験では、10 µmol/L（約 5000 ng/mL）まで hERG チャネル電流を阻害しなかった。

表 2.6.2.1-2　DS-8201a 又は MAAA-1181a の安全性薬理試験の概要

試験名	試験系	被験物質	投与経路	添付資料番号
In vitro				
hERG チャネル電流に対する阻害作用	hERG 導入 CHO 細胞	MAAA-1181a 一水和物 [a]	NA	4.2.1.3-1
In vivo				
心血管系、中枢神経系、及び呼吸器系に対する影響	カニクイザル	DS-8201a (Process 1 [redacted])	静脈内	4.2.1.3-2

CHO, Chinese hamster ovary; hERG, human ether-à-go-go-related gene; NA, not applicable.
[a] MAAA-1181a monohydrate was referred to MAAA-1181d in the report.

2.　効力を裏付ける試験

2.1　In vitro 試験

2.1.1　ヒト HER2 に対する DS-8201a の結合活性及び特異性

添付資料番号: 4.2.1.1-1

ヒト HER ファミリータンパク質（上皮細胞増殖因子受容体、HER2、HER3、及び HER4）及び他動物種 HER2 相同タンパク質（マウス、ラット、及びカニクイザル）に対する DS-8201a 及び MAAL-9001 の結合活性を酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA）で評価した。

DS-8201a 及び MAAL-9001 はヒト及びカニクイザルの HER2 タンパク質に対して特異的に結合した。一方、他のヒト HER ファミリータンパク質やラット、マウスの HER2 タンパク質に対しては結合しなかった。DS-8201a 及び MAAL-9001 の解離定数は、ヒト HER2 タンパク質に対してそれぞれ 7.33 及び 7.84 ng/mL、カニクイザル HER2 タンパク質に対してそれぞれ 7.46 及び 7.48 ng/mL であった。

以上の結果より、DS-8201a 及び MAAL-9001 はヒト及びカニクイザルの HER2 に特異的に結合し、薬物の結合は HER2 結合活性にほとんど影響を与えなかった。

2.1.2　ヒト癌細胞に対する DS-8201a の HER2 特異的な細胞増殖抑制活性

添付資料番号: 4.2.1.1-2

5 種類のヒト癌細胞株（肺腺癌 Calu-3 細胞、胃癌 NCI-N87 細胞、乳腺癌 SK-BR-3 及び MDA-MB-468 細胞、並びに乳癌 KPL-4 細胞）に対する DS-8201a の細胞増殖抑制活性及び特異性を検討した。各癌細胞に DS-8201a、MAAL-9001、又は MAAA-9001b（MAAL-9001 の代わりにヒト IgG1 アイソタイプに DS-8201a と同じ薬物リンカー結合した ADC）を終濃度が 0.64～10,000 ng/mL となるように添加し、培養 6 日後の生細胞数をアデノシン三リン酸検出法によって測定した。各癌細胞の HER2 発現はフルオレセインイソチオシアネート標識抗 HER2 抗体又はアイソタイプを用いたフローサイトメトリ分析によって測定した。

50%阻害濃度（50% inhibitory concentration: IC_{50}）及びヒト HER2 発現を表 2.6.2.2-1 に示す。ヒト HER2 は Calu-3、KPL-4、NCI-N87、及び SK-BR-3 細胞で発現し、MDA-MB-468 細胞では発現していなかった。DS-8201a は HER2 陽性の Calu-3、KPL-4、NCI-N87、SK-BR-3 細胞に対して細胞増殖抑制活性を示したが、HER2 陰性の MDA-MB-468 細胞に対しては細胞増殖抑制活性を示さなかった。一方、MAAA-9001b は検討した細胞に対して細胞増殖抑制活性を示さなかった。MAAL-9001 は NCI-N87 及び SK-BR-3 細胞に対してのみ細胞増殖抑制活性を示したが、DS-8201a に比べ活性が弱かった。

以上の結果より、DS-8201a は HER2 特異的に細胞増殖阻抑制活性を示した。その活性は抗 HER2 抗体である MAAL-9001 よりも強く、HER2 陰性の MDA-MB-468 細胞を除いて MAAL-9001 が無効のヒト癌細胞でも認められた。

表 2.6.2.2-1　MAAL-9001 及び MAAA-9001b と比較した DS-8201a の HER2 特異的細胞増殖抑制活性

細胞株	IC_{50} (ng/mL)			HER2 発現
	DS-8201a	MAAL-9001	MAAA-9001b	
Calu-3	9.29	>10,000	>10,000	陽性
KPL-4	26.80	>10,000	>10,000	陽性
NCI-N87	25.36	204.20	>10,000	陽性
SK-BR-3	6.65	65.92	>10,000	陽性
MDA-MB-468	>10,000	>10,000	>10,000	陰性

Calu-3, human lung adenocarcinoma cell line; KPL-4, human breast cancer cell line; MDA-MB-468, human breast adenocarcinoma cell line; NCI-N87, human gastric carcinoma cell line; SK-BR-3, human breast adenocarcinoma cell line.
IC_{50}, 50% inhibitory concentration.

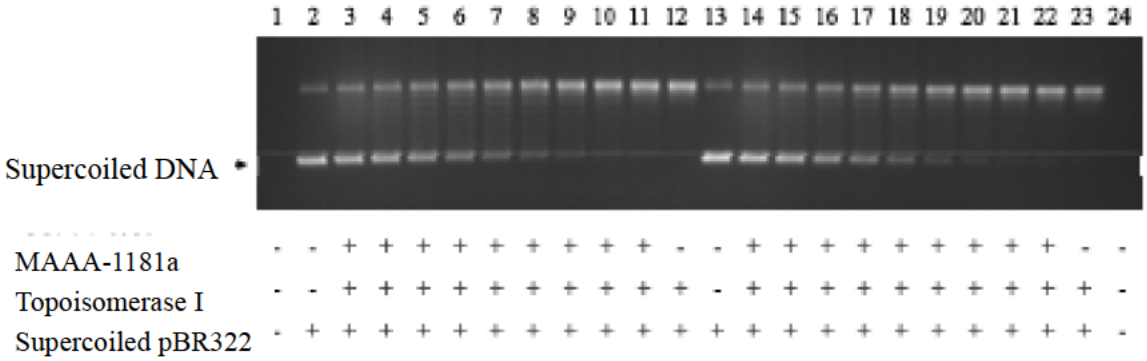
2.1.3　MAAA-1181a のトポイソメラーゼ I 阻害活性

添付資料番号: 4.2.1.1-3

MAAA-1181a は DS-8201a が HER2 に結合し、腫瘍細胞内に取り込まれた後に、DS-8201a から細胞質内に遊離すると想定される。MAAA-1181a のヒトトポイソメラーゼ I 阻害活性を DNA 超らせん弛緩測定法によって検討した。遺伝子組換えヒトトポイソメラーゼ I を MAAA-1181a と 5 分間反応後、超らせん型 DNA を加えて 37°C で 30 分間反応した（MAAA-1181a の終濃度: 20,000、10,000、5,000、2,500、1,250、625、312.5、156.25、及び 78.125 nmol/L）。アガロースゲル電気泳動後に DNA の超らせん型の量を定量した。

結果を図 2.6.2.2-1 に示す。MAAA-1181a は、ヒトトポイソメラーゼ I による超らせん型 DNA の弛緩を濃度依存的に阻害した。以上の結果より、MAAA-1181a はヒトトポイソメラーゼ I に対して阻害活性を有することが示された。

図 2.6.2.2-1　MAAA-1181a のヒトトポイソメラーゼ I 阻害活性



Supercoiled pBR322 was treated with 20,000, 10,000, 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5, 156.25, and 78.125 nmol/L of MAAA-1181a (lane 3 to 11 and lane 14 to 22, respectively) in the presence of 2 units of topoisomerase I. The assay buffer alone was applied to lane 1 and 24 as the blank lanes.
Supercoiled DNA: the supercoiled form of Supercoiled pBR322.

2.1.4　DS-8201a による DNA 損傷及びアポトーシスの誘導

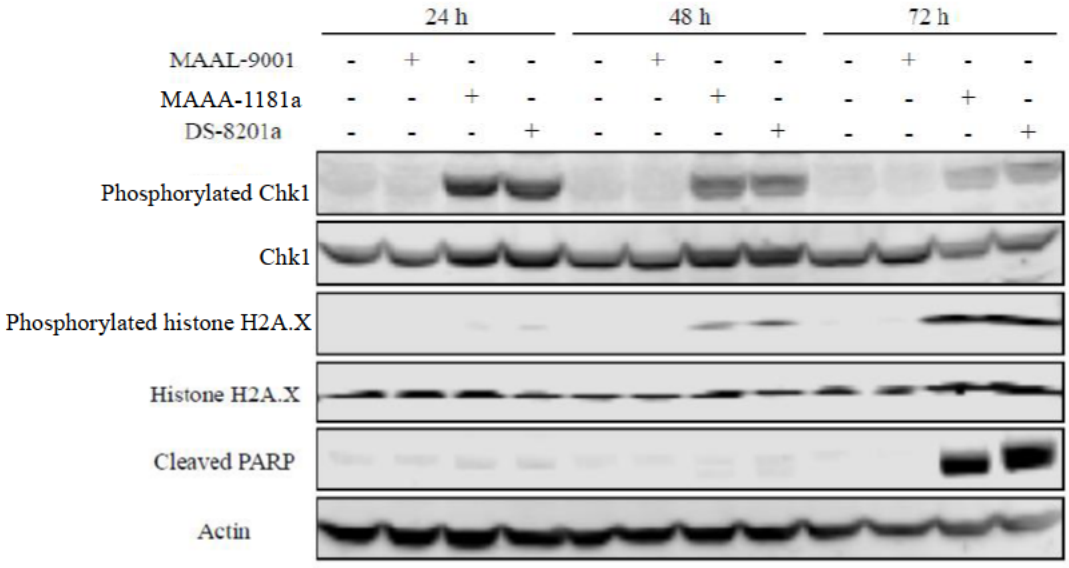
添付資料番号: 4.2.1.1-4

トポイソメラーゼ I 阻害剤は二本鎖 DNA 切断及びアポトーシスを誘導することが報告されているため[5,6]、ヒト乳癌細胞株 KPL-4 を用いて、DS-8201a の DNA 損傷及びアポトーシス誘導作用を MAAL-9001 及び MAAA-1181a と比較した。KPL-4 細胞に DS-8201a、MAAL-9001、又は MAAA-1181a を添加し、24、48、及び 72 時間培養後に DNA 損傷のマーカーである Chk1 及びヒストン H2A.X のリン酸化を、アポトーシスのマーカーであるポリ（アデノシン二リン酸リボース）ポリメラーゼ（poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase: PARP）の切断をウェスタンブロッティング法によって評価した。

結果を図 2.6.2.2-2 に示す。DS-8201a 及び MAAA-1181a は 24 時間後に Chk1 のリン酸化を、48 時間後にヒストン H2A.X のリン酸化を、72 時間後に PARP の切断を引き起こした。一方、MAAL-9001 はいずれのマーカーでも大きな変化は認められなかった。

以上の結果より、MAAA-1181a と同様に DS-8201a も DNA 損傷とアポトーシスを誘導することが示され、これらの変化は DS-8201a から遊離した MAAA-1181a によるトポイソメラーゼ I 阻害に起因することが示唆された。

図 2.6.2.2-2　DS-8201a、MAAL-9001、又は MAAA-1181a 添加によるリン酸化 Chk1、リン酸化ヒストン H2A.X、及び切断化ポリ（アデノシンニリン酸リボース）ポリメラーゼの変化



The KPL-4 cells were treated with DS-8201a (10 μg/mL), MAAL-9001 (10 μg/mL), and MAAA-1181a (10 nmol/L) for 24, 48, or 72 hours, and DNA damage and the apoptosis were evaluated by detection of phosphorylated Chk1, phosphorylated histone H2A.X, and cleaved PARP by a Western blotting method.　The expression of actin, as a house-keeping protein, was also confirmed.
PARP, poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase.

2.1.5　DS-8201a の細胞内 Akt リン酸化阻害活性

添付資料番号: 4.2.1.1-5

MAAL-9001 はトラスツズマブとアミノ酸配列が同一であるため、DS-8201a は HER2 を介した Akt リン酸化阻害活性及び ADCC 活性を有すると考えられる[7]。本試験では、ヒト乳腺癌細胞株 SK-BR-3 の細胞内 Akt リン酸化に対する DS-8201a の阻害活性を ELISA で検討した。SK-BR-3 細胞に 1.524～10,000 ng/mL の DS-8201a を添加後 24 時間培養し、リン酸化 Akt（phosphorylated Akt: pAkt）及び総 Akt を市販の ELISA キットによって測定した。

DS-8201a は濃度依存的に SK-BR-3 細胞の細胞内 pAkt を減少させ、無処理細胞と比較して DS-8201a 処理によるリン酸化 Akt の推定最小値は 17.2%であった。

2.1.6　DS-8201a の抗体依存性細胞傷害活性

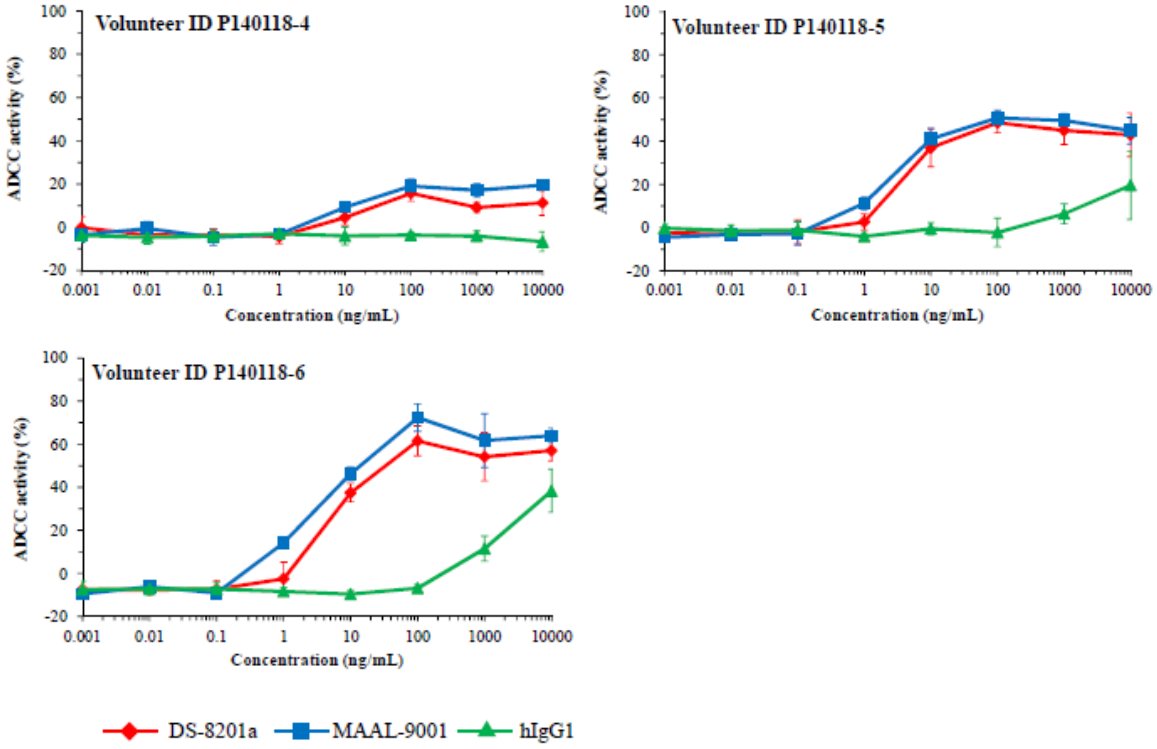
添付資料番号: 4.2.1.1-6

健康人ボランティア 3 名の血液からそれぞれ分離したヒト末梢血単核細胞をエフェクター細胞、ヒト乳腺癌細胞 SK-BR-3 をターゲット細胞として、DS-8201a 及び MAAL-9001 の ADCC 活性を評価した。エフェクター細胞と ^{51}Cr で標識したターゲット細胞に、DS-8201a 又は MAAL-9001 を終濃度が 0.001～10,000 ng/mL となるように添加し、培養 4 時間後、ターゲット細胞から遊離した放射線量に基づき ADCC 活性を算出した。

DS-8201a 及び MAAL-9001 は SK-BR-3 細胞に対して ADCC 活性を示した（図 2.6.2.2-3）。DS-8201a の 50%有効濃度（50% effective concentration: EC_{50}）は 2 名のドナー検体でそれぞれ 3.8 及び 5.9 ng/mL、MAAL-9001 の EC_{50} はそれぞれ 2.1 及び 2.7 ng/mL であった。一方、残り 1 名のドナー検体ではナチュラルキラー（natural killer: NK）細胞の割合が低かったため、EC_{50} は計算できなかった。

以上の結果より、DS-8201a、MAAL-9001 はともにヒト末梢血単核球の存在下で ADCC 活性を有し、薬物結合は ADCC 活性にほとんど影響しなかった。

図 2.6.2.2-3　DS-8201a と MAAL-9001 の抗体依存性細胞傷害活性



Data represent the mean ± standard deviation (triplicate).
ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxic; hIgG1, human immunoglobulin G1.

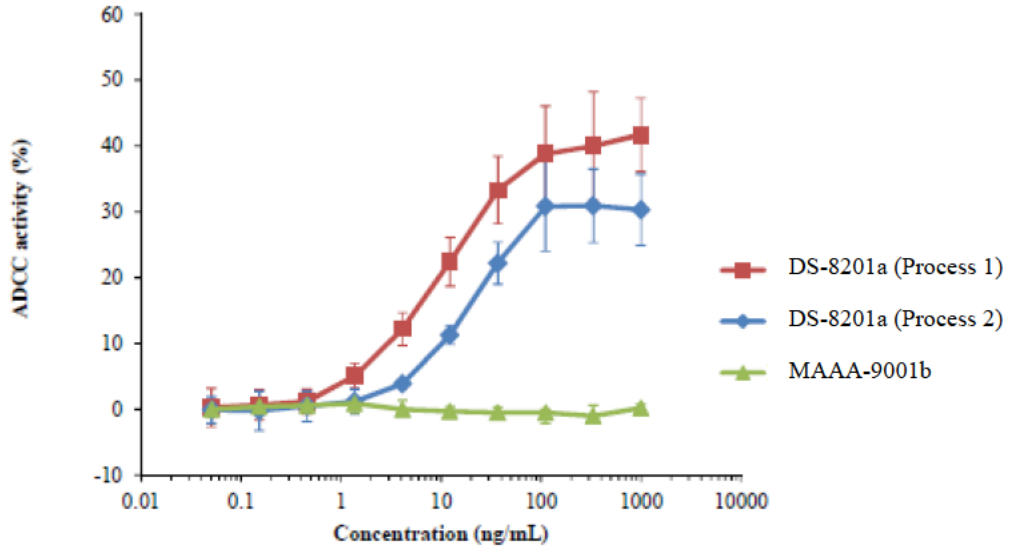
2.1.7　DS-8201a（Process 1 及び Process 2）の抗体依存性細胞傷害活性

添付資料番号: 4.2.1.1-7

ヒト CD16 を発現するヒト NK 細胞をエフェクター細胞、ヒト乳腺癌細胞株 SK-BR-3 をターゲット細胞として、DS-8201a（Process 1）及び DS-8201a（Process 2）の ADCC 活性を評価した。エフェクター細胞と ^{51}Cr で標識したターゲット細胞に、DS-8201a を終濃度が 0.0508～1000 ng/mL となるように添加し、培養 4 時間後、ターゲット細胞から遊離した放射線量に基づき ADCC 活性を算出した。MAAA-9001b も陰性対照として検討した。

DS-8201a（Process 1）及び DS-8201a（Process 2）は、SK-BR-3 細胞に対して ADCC 活性を示した（図 2.6.2.2-4）。DS-8201a（Process 1）及び DS-8201a（Process 2）の EC_{50} はそれぞれ 10.1 及び 18.2 ng/mL であった。推定最大活性値は、DS-8201a（Process 1）及び DS-8201a（Process 2）でそれぞれ 41.8%及び 31.4%であった。

図 2.6.2.2-4　DS-8201a（Process 1）、DS-8201a（Process 2）、及び MAAA-9001b の抗体依存性細胞傷害活性



The data are expressed as the mean ± standard deviation (n = 3).
ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxic.

2.2　In Vivo 試験

2.2.1　HER2 陽性胃癌細胞移植ヌードマウスモデルに対する DS-8201a の HER2 を標的とした抗腫瘍活性

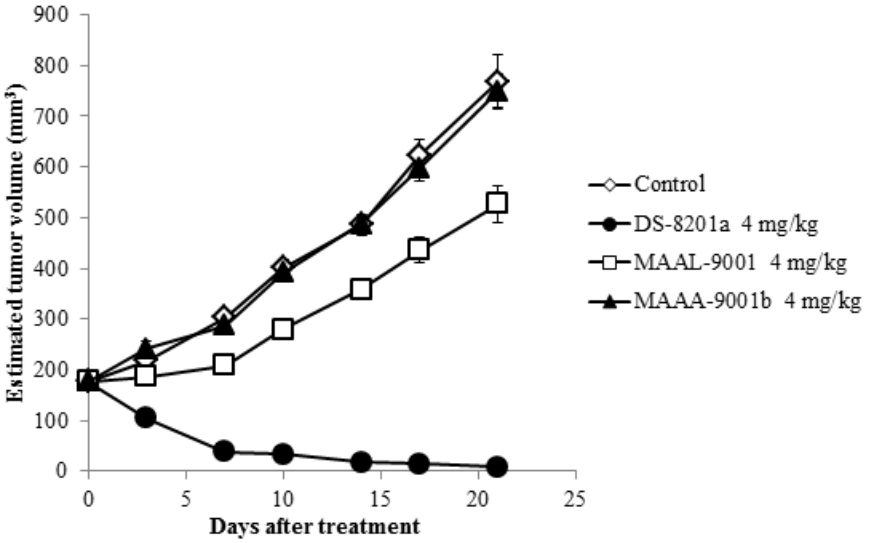
添付資料番号: 4.2.1.1-8

HER2 陽性胃癌細胞 NCI-N87 を移植した雌性 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウス（ヌードマウス）を用いて、DS-8201a の in vivo 効果を MAAL-9001 及び MAAA-9001b を対照に、検討した[4,8]。移植 6 日後（投与日 Day 0）に、DS-8201a、MAAL-9001、及び MAAA-9001b を 4 mg/kg の投与量でマウス（各群 10 例）に単回静脈内投与した。各マウスの腫瘍径及び体重を週 2 回、投与 21 日後まで測定した。

結果を図 2.6.2.2-5 に示す。DS-8201a 及び MAAL-9001 は 4 mg/kg で腫瘍増殖を有意に抑制し、溶媒コントロールと比較して投与 21 日後の腫瘍増殖抑制率（tumor growth inhibition: TGI）はそれぞれ 99%及び 31%であった（それぞれ $P < 0.0001$ 及び $P = 0.0013$、Student の t 検定）。一方、MAAA-9001b は腫瘍増殖を有意に抑制しなかった。さらに、DS-8201a は MAAL-9001 に比べて有意に強い抗腫瘍活性を示した（$P = 0.0003$、Steel 検定）。

以上の結果より、DS-8201a は HER2 を標的として抗腫瘍活性を示し、DS-8201a の抗体部分である MAAL-9001 に比べて活性が強いことが示された。

図 2.6.2.2-5　HER2 陽性胃癌細胞 NCI-N87 を移植した CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a、MAAL-9001、及び MAAA-9001b の抗腫瘍活性



The data are expressed as the mean ± standard error (n = 10).
Mice were subcutaneously inoculated with NCI-N87 cells.
Estimated tumor volume of each mouse was calculated using the following equation:
Estimated tumor volume (mm^3) = 1/2 × length × $width^2$

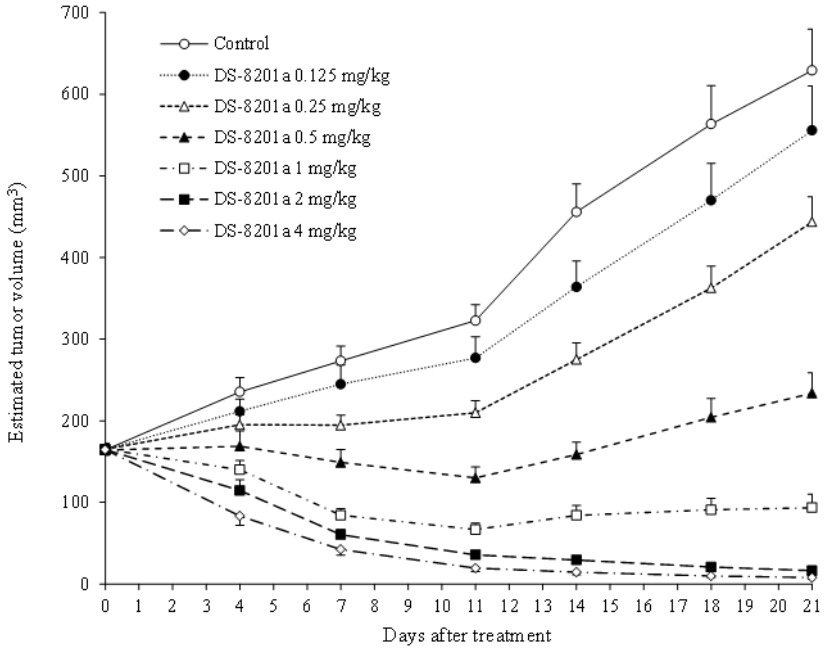
2.2.2　HER2 陽性胃癌細胞移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a の用量依存性

添付資料番号: 4.2.1.1-9

ヒト胃癌細胞 NCI-N87 を移植した雌性 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウス（ヌードマウス）を用いて、DS-8201a の用量依存性を検討した。移植 6 日後（投与日 Day 0）に DS-8201a を 0.125、0.25、0.5、1、2、又は 4 mg/kg の投与量でマウス（各群 10 例）に単回静脈内投与した。各マウスの腫瘍径及び体重を週 2 回、投与 21 日後まで測定した。

結果を図 2.6.2.2-6 に示す。溶媒コントロールと比較して DS-8201a の 0.125、0.25、0.5、1、2、及び 4 mg/kg の投与 21 日後の TGI は、それぞれ 11.7%、29.5%、62.8%、85.1%、97.4%、及び 98.7%であり、その効果は用量依存的であった（Spearman の順位相関係数: –0.9495）。

図 2.6.2.2-6　HER2 陽性胃癌細胞 NCI-N87 移植 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a の用量依存性



The data are expressed as the mean + standard error (n = 10).
Mice were subcutaneously inoculated with NCI-N87 cells.
Estimated tumor volume of each mouse was calculated using the following equation:
Estimated tumor volume (mm^3) = 1/2 × length × $width^2$

2.2.3　HER2 陽性乳癌細胞移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a（Process 1 及び Process 2）及びその抗体部分の抗腫瘍活性

添付資料番号: 4.2.1.1-10

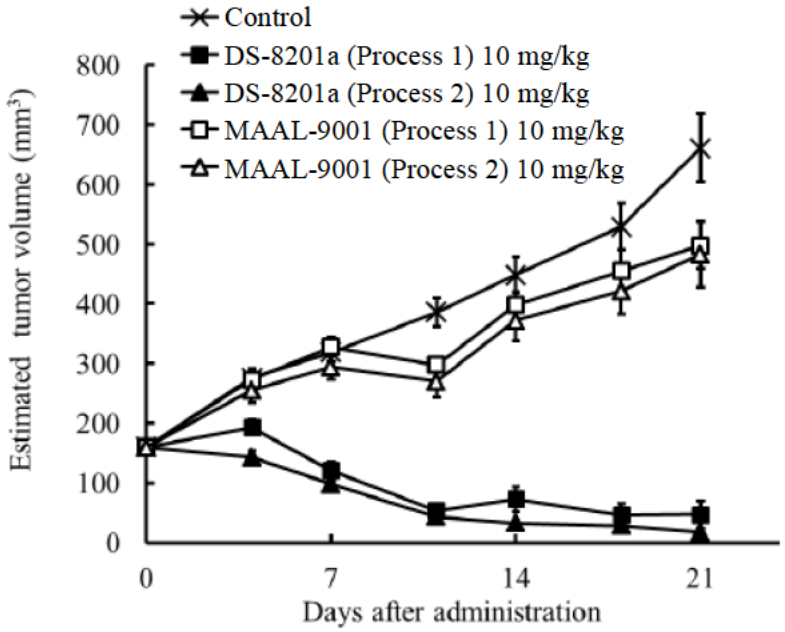
HER2 陽性乳癌細胞 KPL-4 を移植した雌性 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウス（ヌードマウス）を用いて、DS-8201a と MAAL-9001 の in vivo 効果を検討した[9,10,11]。本試験では、2.1.7 項に示したように、ロット間における in vitro ADCC 活性の差の影響を検討するため、DS-8201a の 2 ロットの抗腫瘍活性を比較した。また、MAAL-9001 の 2 ロットの in vivo 効果も評価した。移植 13 日後（投与日 Day 0）に DS-8201a（Process 1）、DS-8201a（Process 2）、MAAL-9001（Process 1）、及び MAAL-9001（Process 2）を 10 mg/kg の投与量でマウス（各群 12 例）に単回静脈内投与した。各マウスの腫瘍径及び体重を週 2 回、投与 21 日後まで測定した。DS-8201a では、投与後の TGI の曲線下面積（area under the curve: AUC）を算出した。

結果を図 2.6.2.2-7 に示す。DS-8201a（Process 2）は 10 mg/kg で有意に腫瘍増殖を抑制し、溶媒コントロールと比較して投与 21 日後の TGI は 97.4%であった（$P < 0.0001$、Student の t 検定）。平均 TGI AUC の比率（DS-8201a［Process 2］／DS-8201a［Process 1］）は、110.8%（95%信頼区間: 98.4%～123.1%）であり、DS-8201a（Process 2）と DS-8201a（Process 1）の抗腫瘍活性に有意な差がないことが示された。MAAL-9001（Process 1）群及

び MAAL-9001（Process 2）群では、投与 21 日後の TGI はそれぞれ 24.7%及び 26.9%であった。

以上の結果より、DS-8201a の抗腫瘍活性は主として結合薬物 MAAA-1181a に起因することが示唆され、DS-8201a 及び MAAL-9001 の in vivo 抗腫瘍活性に明らかなロット間差は認められなかった。

図 2.6.2.2-7　HER2 陽性乳癌細胞 KPL-4 移植 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a 及び MAAL-9001 の抗腫瘍活性



The data are expressed as the mean ± standard error (n = 12).
Mice were subcutaneously inoculated with KPL-4 cells.
Estimated tumor volume of each mouse was calculated using the following equation:
Estimated tumor volume (mm^3) = 1/2 × length × $width^2$
AUC of TGI against days after administration of each mouse was calculated using the following equation:

$$AUC = \frac{(TGI_{Day0} + TGI_{Day4}) \times (4-0)}{2} + \frac{(TGI_{Day4} + TGI_{Day7}) \times (7-4)}{2} + \frac{(TGI_{Day7} + TGI_{Day11}) \times (11-7)}{2}$$
$$+ \frac{(TGI_{Day11} + TGI_{Day14}) \times (14-11)}{2} + \frac{(TGI_{Day14} + TGI_{Day18}) \times (18-14)}{2} + \frac{(TGI_{Day18} + TGI_{Day21}) \times (21-18)}{2}$$

TGI_{DayX}: the individual TGI on Day X

2.2.4　HER2 発現乳癌患者腫瘍組織移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a の抗腫瘍活性

添付資料番号: 4.2.1.1-11、4.2.1.1-12、4.2.1.1-13

PDX モデルは患者での有効性を予測する上で有用と報告されている[12]。本試験では、HER2 陽性（CTG-0708）及び HER2 低発現（CTG-2308）乳癌の PDX モデルを用いて、DS-8201a の in vivo 効果を T-DM1 及び MAAL-9002b（DS-8201a と同じ抗体及び薬物リンカ

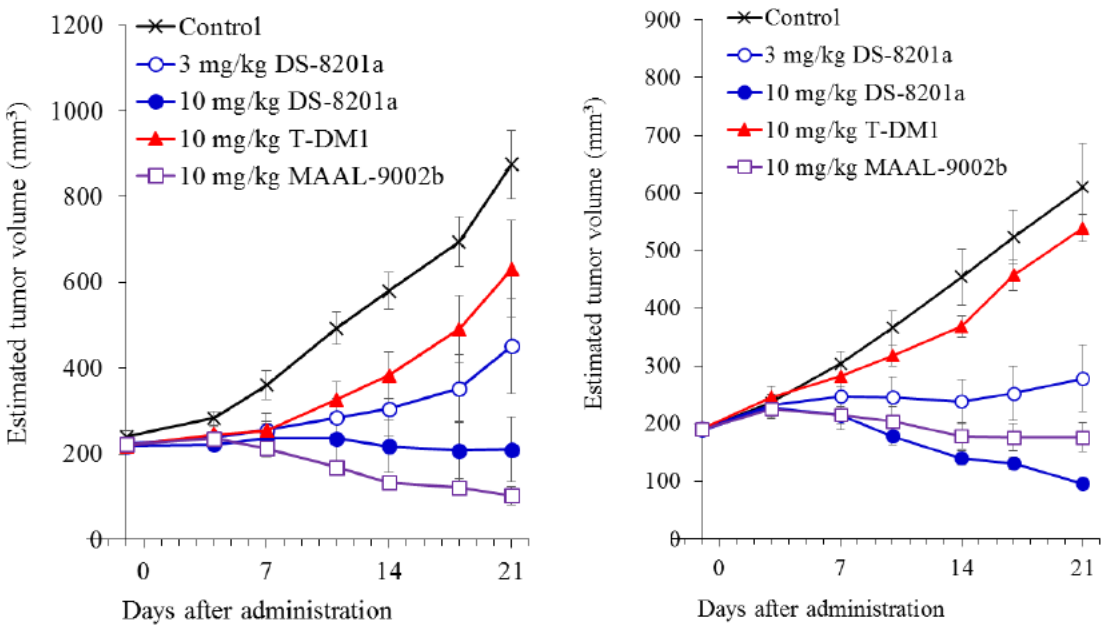
ーを結合し、DAR が低い［DAR: 3.7］HER2 に対する ADC）と比較した。各モデルの腫瘍組織を雌 Hsd:Athymic Nude-*Foxn1*^{nu} マウスに移植し、DS-8201a を 3 又は 10 mg/kg、T-DM1 及び MAAL-9002b を 10 mg/kg の投与量でマウス（各群 10 例）に単回静脈内投与した（投与日 Day 0）。各マウスの腫瘍径及び体重を週 2 回、投与 21 日後まで測定した。

結果を図 2.6.2.2-8 に示す。CTG-0708 モデルでは、DS-8201a は 3 及び 10 mg/kg、MAAL-9002b は 10 mg/kg で腫瘍増殖を有意に抑制し、溶媒コントロールと比較して投与 21 日後の TGI はそれぞれ 48%、76%、及び 88%であった（それぞれ $P = 0.0044$、$P < 0.0001$、及び $P < 0.0001$、Dunnett 検定）。一方、T-DM1 は 10 mg/kg で有意な腫瘍増殖抑制効果を示さなかった（$P = 0.1599$、Dunnett 検定）。さらに、DS-8201a は 10 mg/kg で T-DM1 と比べて有意に強い抗腫瘍活性を示したが（$P = 0.0062$、Student の t 検定）、MAAL-9002b の抗腫瘍活性との比較では有意差はなかった（$P = 0.2014$、Welch 検定）。CTG-2308 モデルでは、DS-8201a は 3 及び 10 mg/kg、MAAL-9002b は 10 mg/kg で腫瘍増殖を有意に抑制し、溶媒コントロールと比較して投与 21 日後 TGI はそれぞれ 54%、84%、及び 71%であった（それぞれ $P < 0.0001$、$P < 0.0001$、及び $P < 0.0001$、Dunnett 検定）。一方、T-DM1 は 10 mg/kg で腫瘍増殖を有意に抑制しなかった（$P = 0.6413$、Dunnett 検定）。さらに、DS-8201a は 10 mg/kg で T-DM1 及び MAAL-9002b と比べて有意に強い抗腫瘍活性を示した（それぞれ $P < 0.0001$ 及び $P = 0.0117$、Welch 検定）。

以上の結果より、DS-8201a は T-DM1 に比べて、より強い抗腫瘍活性を有することが示された。また、DS-8201a は高 DAR の新規薬物リンカーを有しているため、T-DM1 に不応となった HER2 陽性乳癌腫瘍及び HER2 低発現乳癌腫瘍に対しても有効であることが示唆された。

図 2.6.2.2-8　HER2 発現乳癌患者腫瘍組織 CTG-0708 及び CTG-2308 移植 Hsd:Athymic Nude-*Foxn1*^{nu} マウスモデルでの DS-8201a、T-DM1、及び MAAL-9002b の抗腫瘍活性

CTG-0708（HER2 陽性）　　CTG-2308（HER2 低発現）



The data are expressed as the mean ± standard error (n = 10).
Mice were subcutaneously implanted with tumor fragments of CTG-0708 or CTG-2308.
Estimated tumor volume of each mouse was calculated using the following equation:
Estimated tumor volume (mm^3) = 0.52 × length × $width^2$

2.2.5　トラスツズマブ抵抗性 HER2 陽性乳癌移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a の抗腫瘍活性

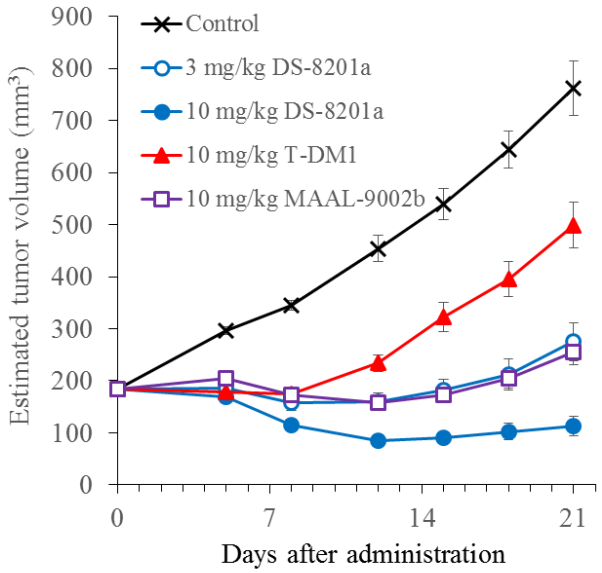
添付資料番号: 4.2.1.1-14

HER2 陽性乳癌細胞株 JIMT-1 は、トラスツズマブ耐性患者由来であり、T-DM1 が無効であることが知られている[8,9,13]。本試験では、JIMT-1 細胞を移植したマウスモデルを用いて、DS-8201a の in vivo 効果を T-DM1 及び MAAL-9002b と比較した。JIMT-1 細胞を雌性 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウス（ヌードマウス）に移植し、移植 10 日後（投与日 Day 0）に DS-8201a を 3 又は 10 mg/kg、T-DM1 及び MAAL-9002b を 10 mg/kg の投与量でマウス（各群 10 例）に単回静脈内投与した。各マウスの腫瘍径及び体重を週 2 回、投与 21 日後まで測定した。

結果を図 2.6.2.2-9 に示す。DS-8201a は 3 又は 10 mg/kg、T-DM1 及び MAAL-9002b は 10 mg/kg で腫瘍増殖を有意に抑制し、溶媒コントロールと比較して投与 21 日後の TGI はそれぞれ 64%、85%、35%、及び 66%であった（いずれも $P < 0.0001$、Dunnett 検定）。さらに、DS-8201a の 10 mg/kg は T-DM1 及び MAAL-9002b と比べて有意に高い有効性を示した（それぞれ $P < 0.0001$ 及び $P = 0.0003$、Student の t 検定）。

以上の結果より、DS-8201a は、T-DM1 耐性 HER2 陽性乳癌腫瘍に対しても有効であり、高 DAR が有効性に寄与していることが示唆された。

図 2.6.2.2-9　HER2 陽性乳癌細胞 JIMT-1 移植 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a、T-DM1、及び MAAL-9002b の抗腫瘍活性



The data are expressed as the mean ± standard error (n = 10).
Mice were subcutaneously inoculated with JIMT-1 cells.
Estimated tumor volume of each mouse was calculated using the following equation:
Estimated tumor volume (mm^3) = 1/2 × length × $width^2$

2.2.6　HER2 陽性胃癌患者腫瘍組織移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a の抗腫瘍活性

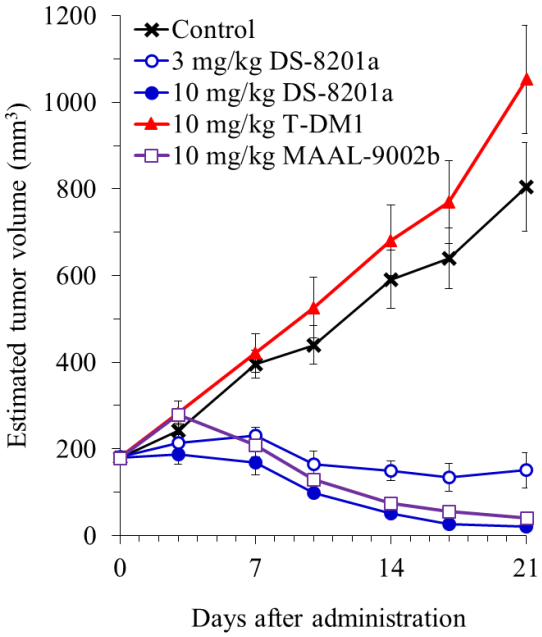
添付資料番号: 4.2.1.1-15

HER2 陽性胃癌 NIBIO G016 の PDX モデルを用いて、DS-8201a の in vivo 効果を T-DM1 及び MAAL-9002b と比較した[8]。腫瘍組織を雌性 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウス（ヌードマウス）に移植し、DS-8201a を 3 又は 10 mg/kg、T-DM1 及び MAAL-9002b を 10 mg/kg の投与量でマウス（各群 8 例）に単回静脈内投与した（投与日 Day 0）。各マウスの腫瘍径及び体重を投与 21 日後まで週 2 回測定した。

結果を図 2.6.2.2-10 に示す。DS-8201a は 3 及び 10 mg/kg、MAAL-9002b は 10 mg/kg で腫瘍増殖を有意に抑制し、溶媒コントロールと比較して投与 21 日後の TGI はそれぞれ 81%、97%、及び 95%であった（それぞれ $P < 0.0001$、$P < 0.0001$、及び $P < 0.0001$、Dunnett 検定）。一方、T-DM1 の 10 mg/kg は有意に腫瘍増殖を抑制しなかった（$P = 0.0781$）。DS-8201a の 10 mg/kg は T-DM1 の 10 mg/kg に比べて優位に強い抗腫瘍活性を示した（$P < 0.0001$、Welch 検定）。

以上の結果より、DS-8201a は T-DM1 が無効の HER2 陽性胃癌腫瘍に対しても有効であることが示唆された。

図 2.6.2.2-10　HER2 陽性胃癌患者腫瘍組織 NIBIO G016 移植 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a、T-DM1、及び MAAL-9002b の抗腫瘍活性



The data are expressed as the mean ± standard error (n = 8).
Mice were subcutaneously implanted with tumor fragments of NIBIO G016.
Estimated tumor volume of each mouse was calculated using the following equation:
Estimated tumor volume (mm^3) = 1/2 × length × $width^2$

2.2.7　HER2 発現が不均一な胃癌の移植ヌードマウスモデルでの DS-8201a の抗腫瘍活性

添付資料番号: 4.2.1.1-16、4.2.1.1-13

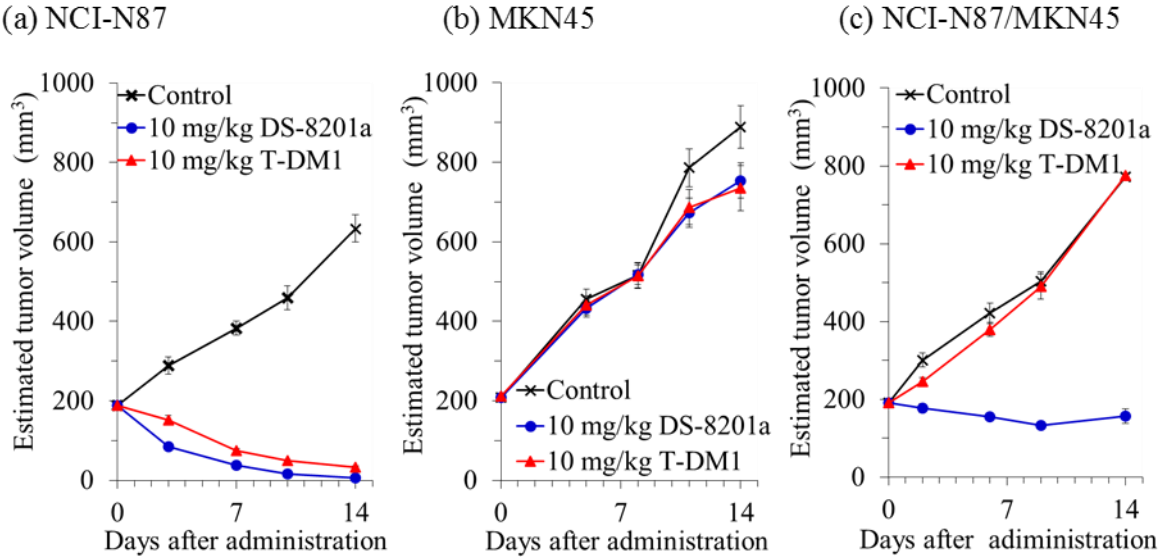
バイスタンダー殺細胞効果は、ADC が胃癌などの多様な腫瘍に対して抗腫瘍活性を示す上で重要であると考えられている [3,4]。バイスタンダー効果は、標的発現腫瘍細胞で DS-8201a から遊離された膜透過性を有する薬物 MAAA-1181a が抗原非発現の隣接腫瘍細胞に対しても細胞傷害を引き起こす効果である [3,4]。MAAA-1181a は膜透過性を有するが、T-DM1 から遊離する薬物は膜透過性を示さないことが報告されている [3,4]。本試験では、HER2 陽性胃癌細胞（NCI-N87、免疫組織化学［immunohistochemistry: IHC］3+）と HER2 陰性胃癌細胞（MKN45、IHC 0）を混合移植することによって作製した HER2 発現が不均一なマウスモデルを用いて、DS-8201a の in vivo 効果を T-DM1 と比較した。混合した細胞を雌性 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウス（ヌードマウス）に移植し、移植 7 日後に DS-8201a 及び T-DM1 を 10 mg/kg の投与量でマウス（各群 8 例）に単回静脈内投与した（投与日 Day 0）。同様に、各細胞の移植モデル（NCI-N87 又は MKN45 のみ）でも DS-8201a と T-DM1 を評価した。各マウスの腫瘍径及び体重を投与 14 日後まで週 2 回測定した。

結果を図 2.6.2.2-11 に示す。NCI-N87 モデルでは、DS-8201a 及び T-DM1 は 10 mg/kg で腫瘍増殖を有意に抑制し、溶媒コントロールと比較して投与 14 日後の TGI はそれぞれ 99%及

び 95%であった（それぞれ $P < 0.0001$ 及び $P < 0.0001$、Dunnett 検定）。一方、DS-8201a 及び T-DM1 は MKN45 モデルに対して有意な抗腫瘍活性を示さず、TGI はそれぞれ 15%及び 17%であった（それぞれ $P = 0.1380$ 及び $P = 0.0852$、Dunnett 検定）。これらの結果より、DS-8201a の抗腫瘍活性は HER2 特異的であることが示された。HER2 発現が不均一なモデルでは、DS-8201a は有意な抗腫瘍活性を示し、TGI は 80%であった。しかしながら、T-DM1 は有意な抗腫瘍活性を示さなかった（それぞれ $P < 0.0001$ 及び $P = 0.9980$、Dunnett 検定）。

以上の結果より、DS-8201a は胃癌などの HER2 発現が不均一な腫瘍に対しても有効であり、その有効性にはバイスタンダー効果が寄与していることが示唆された。

図 2.6.2.2-11　HER2 陽性胃癌 NCI-N87、HER2 陰性胃癌 MKN45、及び HER2 発現不均一胃癌 NCI-N87/MKN45 移植 CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj マウスモデルでの DS-8201a 及び T-DM1 の抗腫瘍活性



The data are expressed as the mean ± standard error (n = 8).
Mice were subcutaneously inoculated with (a) NCI-N87, (b) MKN45, or (c) mixture of NCI-N87 and MKN45 cells.
Estimated tumor volume of each mouse was calculated using the following equation:
Estimated tumor volume (mm^3) = 1/2 × length × $width^2$

3. 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

4. 安全性薬理試験

4.1 ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子導入チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた MAAA-1181a のヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル電流に対する影響を評価する安全性薬理試験（GLP 試験）

添付資料番号: 4.2.1.3-1

急速活性型遅延整流カリウム電流（delayed rectifier potassium current: I_{Kr}）に寄与する hERG チャネル電流に対する MAAA-1181a の作用を、ホールセルパッチクランプ法を用いて評価した。MAAA-1181a 一水和物を 1、3、及び 10 µmol/L の濃度で hERG 導入 CHO 細胞に室温条件下で曝露した（n = 5／濃度）。テールピーク電流を hERG 電流の指標とし、被験物質の hERG 電流に対する作用は陰性対照により補正したテールピーク電流の抑制率（補正抑制率）によって評価した。Tyrode 液で 188 倍希釈した生理食塩液を陰性対照として、また I_{Kr} に対する選択的阻害薬として知られている E-4031 の 0.1 µmol/L を陽性対照として被験物質と同様の方法で評価した。

MAAA-1181a の 1、3、及び 10 µmol/L を適用したときのテールピーク電流の補正抑制率は、それぞれ−4.24%、0.42%、及び−0.74%であった。MAAA-1181a は陰性対照と比べて、いずれの濃度でもテールピーク電流に対して統計学的有意な影響を与えなかった。

陽性対照である E-4031 は、0.1 µmol/L の濃度で陰性対照と比べて統計学的有意にテールピーク電流を減少させた（79.34%）。この結果は、被験物質の hERG チャネル電流抑制作用を検出する上で試験系が十分な感度を有し、信頼できることを示している。

以上の結果より、本試験条件下で、MAAA-1181a の 1、3、及び 10 µmol/L は hERG 導入 CHO 細胞の hERG チャネル電流に対して影響を与えなかった。

4.2 サル心血管系、呼吸器系、及び中枢神経系に対する影響を評価する安全性薬理試験（GLP 試験）

添付資料番号: 4.2.1.3-2

DS-8201a の心血管系、呼吸器系、及び中枢神経系に対する影響を評価する安全性薬理試験を、テレメトリーシステム、血液ガス分析、及び機能観察総合評価（FOB）法によって 8 例の覚醒・非拘束下の雄性カニクイザル（4〜6 歳齢）を用いて実施した。陰性対照物質（10 mmol/L ヒスチジン緩衝液［pH 5.8］、10 w/v%トレハロース、0.02 w/v%ポリソルベート 20）に溶解した DS-8201a を 30 又は 78.8 mg/kg の投与量で単回静脈内投与した（投与容量: 4 mL/kg、投与速度: 3 mL/min）。陰性対照物質は Day 1 に全 8 例に投与し、被験物質は Day 22 に 30 mg/kg 及び 78.8 mg/kg（4 例／群）群に投与した。

血圧（収縮期、拡張期、及び平均血圧）、心拍数、心電図パラメータ（PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔、及び Bazett の式で補正した QT）、呼吸数、血液ガスパラメータ（動脈血 pH、動脈血酸素分圧、動脈血炭酸ガス分圧、及びヘモグロビン酸素飽和度）、腹腔内体温、不整脈の有無、一般行動、及び神経行動学的機能を評価した。さらに、一般状態、体重、及び摂餌量を評価した。

30 及び 78.8 mg/kg では、血圧、心拍数、心電図パラメータ、呼吸数、血液ガスパラメータ、腹腔内体温、一般行動、及び神経行動学的機能に対して被験物質に起因した変化はみられなかった。また、いずれの投与量でも被験物質に起因した不整脈はみられなかった。

30 mg/kg では、一般状態に異常はみられなかった。78.8 mg/kg では、嘔吐（空嘔吐を含む）が 3 例に投与終了約 6～47.5 時間後に散発的にみられた。軟便又は下痢が 3 例に投与 4～11 日後にみられ、皮膚色の異常（黒褐色）が全例に投与 9 日後から最終観察日までにみられた。

摂餌量の低下が 30 mg/kg では 2 例に投与 1～8 日後、78.8 mg/kg では 3 例に投与 1～10 日後にみられた。78.8 mg/kg を投与した 3 例は、体重の低下も投与 6、13、及び 20 日後にみられた。

以上の結果より、本試験条件下で雄性サルに DS-8201a を単回静脈内投与した場合、78.8 mg/kg まで心血管系、呼吸器系、及び中枢神経系に影響はみられなかった。

5.　薬力学的薬物相互作用

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

DS-8201a は HER2 発現腫瘍細胞に特異的に結合し、トポイソメラーゼ I 阻害によって腫瘍増殖を抑制する。DS-8201a は ADCC 活性及び HER2 を介した Akt リン酸化阻害活性も示す。

In vitro 及び in vivo 非臨床薬理試験では DS-8201a が HER2 発現に依存した細胞増殖抑制を示した。マウス移植モデルを用いた in vivo 薬理試験では DS-8201a は抗 HER2 抗体の MAAL-9001 又は T-DM1 と比べて、より強い抗腫瘍活性を示し、腫瘍を退縮させた。様々な試験により、血中安定性が高く、高い DAR とバイスタンダー効果を有する薬物リンカーによって、DS-8201a は T-DM1 が無効の HER2 低発現腫瘍及び HER2 発現が不均一な腫瘍に対しても抗腫瘍活性を有することが示された。したがって、DS-8201a は T-DM1 に無効又は耐性の HER2 低発現腫瘍又は HER2 発現が不均一な腫瘍に対しても有効であることが期待される。

DS-8201a（Process 2）は DS-8201a（Process 1）と比較して、FcγRIIIA に対する結合活性がわずかに弱いために ADCC 活性もわずかに弱いと考えられたが（2.3.S.2.6.2.1.4［原薬］参照）、in vivo 抗腫瘍活性に明らかな差は認められなかった。DS-8201a は MAAL-9001 と比べて強い抗腫瘍活性を示すため、その抗腫瘍活性は主に薬物である MAAA-1181a の細胞傷害活性によるものと考えられる。

サルに DS-8201a を単回静脈内投与した安全性薬理試験では、最大用量の 78.8 mg/kg まで心血管系、呼吸器系、及び中枢神経系への影響は認められなかった。また、hERG 導入 CHO 細胞を用いた検討では、MAAA-1181a は 10 μmol/L（約 5000 ng/mL）まで hERG チャネル電流に影響を及ぼさなかった。なお、この濃度は臨床試験（DS8201-A-U201）で乳癌患者に DS-8201a を 5.4 mg/kg の投与量で投与したときの MAAA-1181a の Cmax（7.2 ng/mL）と比較して十分な曝露マージンが得られる濃度である。

7. 参考文献

1. Shiose Y, Ochi Y, Kuga H, et al. Relationship between drug release of DE-310, macromolecular prodrug of DX-8951f, and cathepsins activity in several tumors. Biol Pharm Bull. 2007;30(12):2365-70.
2. Nakada T, Masuda T, Naito H, et al. Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads. Bioorg Med Chem Lett. 2016;26(6):1542-5.
3. Trail PA, Dubowchik GM, Lowinger TB. Antibody drug conjugates for treatment of breast cancer: Novel targets and diverse approaches in ADC design. Pharmacol Ther. 2018;181:126-42.
4. Ogitani Y, Hagihara K, Oitate M, et al. Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody-drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. Cancer Sci. 2016;107(7):1039-46.
5. Hsiang YH, Lihou MG, Liu LF. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. Cancer Res. 1989;49(18):5077-82.
6. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nat Rev Cancer. 2006;6(10):789-802.
7. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to trastuzumab in breast cancer. Clin Cancer Res. 2009;15(24):7479-91.
8. Li JY, Perry SR, Muniz-Medina V, et al. A biparatopic HER2-targeting antibody-drug conjugate induces tumor regression in primary models refractory to or ineligible for HER2-targeted therapy. Cancer Cell. 2016;29(1):117-29.
9. Ogitani Y, Aida T, Hagihara K, et al. DS-8201a, A novel HER2-targeting ADC with a novel DNA topoisomerase I inhibitor, demonstrates a promising antitumor efficacy with differentiation from T-DM1. Clin Cancer Res. 2016;22(20):5097-108.
10. Kurebayashi J, Otsuki T, Tang CK, et al. Isolation and characterization of a new human breast cancer cell line, KPL-4, expressing the Erb B family receptors and interleukin-6. Br J Cancer. 1999;79(5-6):707-17.
11. Scheuer W, Friess T, Burtscher H, et al. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. Cancer Res. 2009;69(24):9330-6.
12. Izumchenko E, Paz K, Ciznadija D, et al. Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors. Ann Oncol. 2017;28(10):2595-605.
13. Nagy P, Friedländer E, Tanner M, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. Cancer Res. 2005;65(2):473-82.

目次

1. 薬理試験： 一覧表 2
2. 効力を裏付ける試験 5
2.1 In vitro 試験 5
2.2 In vivo 試験 7
3. 副次的薬理試験 9
4. 安全性薬理試験 10
5. 薬力学的薬物相互作用試験 11

1.　薬理試験：　一覧表

Type of Study	Test System	Test Article	Method of Administration	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics						
In Vitro						
Binding activity	In vitro cell-free system	DS-8201a (Process 1 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted])	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-1	4.2.1.1
Cell growth inhibitory activity	Calu-3 (human lung adenocarcinoma cell line), NCI-N87 (human gastric carcinoma cell line), SK-BR-3 and MDA-MB-468 (human breast adenocarcinoma cell lines), and KPL-4 (human breast cancer cell line)	DS-8201a (Process 1 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted]), MAAA-9001b	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-2	4.2.1.1
Inhibitory activity against human topoisomerase I	In vitro cell-free system	MAAA-1181a・3/10 C_2H_3N 2/5 CH_4O 3/10 H_2O[a]	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-3	4.2.1.1
Induction of DNA damage and apoptosis	KPL-4 (human breast cancer cell line)	DS-8201a (Process 1 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted]), MAAA-1181a・3/10 C_2H_3N 2/5 CH_4O 3/10 H_2O[a]	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-4	4.2.1.1
Inhibitory activity against the intracellular phosphorylation of Akt	SK-BR-3 (human breast adenocarcinoma cell line)	DS-8201a (Process 1 [redacted])	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-5	4.2.1.1

Type of Study	Test System	Test Article	Method of Administration	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Antibody-dependent cellular cytotoxic activity	Human peripheral blood mononuclear cells as effector cells and SK-BR-3 (human breast adenocarcinoma cell line) cells as target cells	DS-8201a (Process 1 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted])	In vitro	[redacted] Japan	4.2.1.1-6	4.2.1.1
Antibody-dependent cellular cytotoxic activity	Human CD16-expressing NK cells as effector cells and SK-BR-3 (human breast adenocarcinoma cell line) cells as target cells	DS-8201a (Process 1 [redacted] and Process 2 [redacted])	In vitro	[redacted] Japan	4.2.1.1-7	4.2.1.1
In Vivo						
Antitumor activity in gastric cancer	Nude mice; NCI-N87 (human gastric carcinoma cell line) xenograft model	DS-8201a (Process 1 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted]), MAAA-9001b	Single intravenous	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-8	4.2.1.1
Antitumor activity in gastric cancer	Nude mice; NCI-N87 (human gastric carcinoma cell line) xenograft model	DS-8201a (Process 1 [redacted])	Single intravenous	[redacted] Japan	4.2.1.1-9	4.2.1.1
Antitumor activity in breast cancer	Nude mice; KPL-4 (human breast cancer cell line) xenograft model	DS-8201a (Process 1 [redacted] and Process 2 [redacted]), MAAL-9001 (Process 1 [redacted] and Process 2 [redacted])	Single intravenous	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-10	4.2.1.1
Antitumor activity in breast cancer	Nude mice; CTG-0708 and CTG-2308 (breast cancer) patient-derived xenograft models	DS-8201a (Process 2 [redacted]), T-DM1, MAAL-9002b	Single intravenous	[redacted] USA Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan [redacted] Japan	4.2.1.1-11, 4.2.1.1-12, 4.2.1.1-13	4.2.1.1

Type of Study	Test System	Test Article	Method of Administration	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Antitumor activity in breast cancer	Nude mice; JIMT-1 (human breast carcinoma cell line) xenograft model	DS-8201a (Process 2 [redacted]), T-DM1, MAAL-9002b	Single intravenous	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-14	4.2.1.1
Antitumor activity in gastric cancer	Nude mice; NIBIO G016 (gastric cancer) patient-derived xenograft model	DS-8201a (Process 2 [redacted]), T-DM1, MAAL-9002b	Single intravenous	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-15	4.2.1.1
Antitumor activity in gastric cancer	Nude mice; NCI-N87 (human gastric carcinoma cell line), MKN45 (human gastric adenocarcinoma), and co-inoculation of NCI-N87/MKN45 xenograft models	DS-8201a (Process 2 [redacted]), T-DM1	Single intravenous	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan [redacted] Japan	4.2.1.1-16, 4.2.1.1-13	4.2.1.1
Secondary Pharmacodynamics						
No studies have been conducted.						
Safety Pharmacology						
In Vitro						
Inhibitory effects on hERG channels[b]	hERG transfected CHO cells	MAAA-1181a monohydrate[c]	In vitro	[redacted] Japan	4.2.1.3-1	4.2.1.3
In Vivo						
Effects on cardiovascular, central nervous, respiratory system[b]	Cynomolgus monkeys with a telemetry system	DS-8201a (Process 1 [redacted])	Single intravenous	[redacted] Japan	4.2.1.3-2	4.2.1.3
Pharmacodynamic Drug Interactions						
No studies have been conducted.						

CHO, Chinese hamster ovary; hERG, human ether à go go-related gene.

[a] MAAA-1181a・3/10 C_2H_3N 2/5 CH_4O 3/10 H_2O was referred to MAAA-1181c in the reports (4.2.1.1-3 and 4.2.1.1-4).

[b] Studies were conducted in accordance with Good Laboratory Practice.

[c] MAAA-1181a monohydrate was referred to MAAA-1181d in the report.

2.　効力を裏付ける試験

2.1　In vitro 試験

				Test Article: DS-8201a, MAAA-1181a･3/10 C_2H_3N 2/5 CH_4O 3/10 H_2O[a], MAAL-9001, MAAA-9001b		
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Binding activity	In vitro cell-free system	In vitro	200 ng/mL for human HER family, 0.09, 0.27, 0.82, 2.47, 7.41, 22.22, 66.67, 200 ng/mL for HER2 ortholog proteins	Triplicate wells/ concentration	DS-8201a and MAAL-9001 specifically bound to human HER2 and cynomolgus monkey HER2, but not to other human HER family and other HER2 ortholog proteins.	4.2.1.1-1
Cell growth inhibitory activity	Calu-3 (human lung adenocarcinoma cell line), NCI-N87 (human gastric carcinoma cell line), SK-BR-3 and MDA-MB-468 (human breast adenocarcinoma cell lines), and KPL-4 (human breast cancer cell line)	In vitro	0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2,000, 10,000 ng/mL	Triplicate wells/ concentration	Human HER2 was expressed on the Calu-3, KPL-4, NCI-N87, and SK-BR-3 cells, but not on the MDA-MB-468 cells. DS-8201a showed cell growth inhibitory activity against HER2-positive cells, but not against HER2-negative cells. MAAA-9001b did not show activity against any cells tested.	4.2.1.1-2
Inhibitory activity against human topoisomerase I	In vitro cell-free system	In vitro	78.125, 156.25, 312.5, 625, 1,250, 2,500, 5,000, 10,000, 20,000 nM	Duplicate wells/ concentration	MAAA-1181a inhibited the relaxation of supercoiled DNA caused by human topoisomerase I in a dose-dependent manner.	4.2.1.1-3
Induction of DNA damage and apoptosis	KPL-4 (HER2-positive human breast cancer cell line)	In vitro	10 μg/mL of DS-8201a or MAAL-9001, 10 nmol/L of MAAA-1181a	Single well/ test article/ time	DS-8201a and MAAA-1181a induced the phosphorylation of Chk1 after 24 h treatment, the phosphorylation of histone H2A.X after 48 h treatment, and PARP cleavage after 72 h treatment, but MAAL-9001 did not.	4.2.1.1-4
Inhibitory activity against an intracellular phosphorylation of Akt	SK-BR-3 (HER2-positive human breast adenocarcinoma cell line)	In vitro	1.524, 4.572, 13.72, 41.15, 123.5, 370.4, 1,111, 3,333, 10,000 ng/mL	Triplicate wells/ concentration	DS-8201a induced the downregulation of the intracellular pAkt in a dose-dependent manner.	4.2.1.1-5

				Test Article: DS-8201a, MAAA-1181a･3/10 C_2H_3N 2/5 CH_4O 3/10 H_2O[a], MAAL-9001, MAAA-9001b		
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Antibody-dependent cellular cytotoxic (ADCC) activity	Human peripheral blood mononuclear cells as effector cells and SK-BR-3 (HER2-positive human breast adenocarcinoma cell line) cells as target cells	In vitro	0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000, 10,000 ng/mL	Triplicate wells/ concentration, human peripheral blood mononuclear cells from 3 donors	DS-8201a and MAAL-9001 showed ADCC activity against SK-BR-3 cells.	4.2.1.1-6
Antibody-dependent cellular cytotoxic (ADCC) activity	Human CD16-expressing NK cells as effector cells and SK-BR-3 (HER2-positive human breast adenocarcinoma cell line) cells as target cells	In vitro	0.0508, 0.152, 0.457, 1.37, 4.12, 12.3, 37.0, 111, 333, 1,000 ng/mL	Triplicate wells/ concentration, n=3	DS-8201a (Process 1) and DS-8201a (Process 2) exhibited ADCC activity against SK-BR-3 cells.	4.2.1.1-7

[a] MAAA-1181a･3/10 C_2H_3N 2/5 CH_4O 3/10 H_2O was referred to MAAA-1181c in the reports (4.2.1.1-3 and 4.2.1.1-4).

2.2　In vivo 試験

				Test Article: DS-8201a, MAAL-9001, MAAA-9001b, MAAL-9002b, T-DM1		
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Antitumor activity in gastric cancer	CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj mice, NCI-N87 (HER2-positive human gastric cancer cell line) xenograft model	Single intravenous	4 mg/kg	Female, 10/group	DS-8201a and MAAL-9001 significantly inhibited the tumor growth by 99% and 31%, respectively, compared with the control 21 days after administration, but MAAA-9001b did not.	4.2.1.1-8
Antitumor activity in gastric cancer	CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj mice, NCI-N87 (HER2-positive human gastric cancer cell line) xenograft model	Single intravenous	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, or 4 mg/kg	Female, 10/group	DS-8201a at 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, and 4 mg/kg inhibited the tumor growth by 11.7%, 29.5%, 62.8%, 85.1%, 97.4%, and 98.7%, respectively, compared with the control 21 days after administration.	4.2.1.1-9
Antitumor activity in breast cancer	CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj mice, KPL-4 (HER2-positive human breast cancer cell line) xenograft model	Single intravenous	10 mg/kg	Female, 12/group	DS-8201a (Process 1) and DS-8201a (Process 2) at 10 mg/kg inhibited the tumor growth by 92.9% and 97.4%, respectively, compared with the control 21 days after administration. There was no significant difference in the efficacy between DS-8201a (Process 1) and DS-8201a (Process 2).	4.2.1.1-10
Antitumor activity in breast cancer	Athymic nude-*Foxn1*^{nu} mice, CTG-0708 (HER2-positive breast cancer) and CTG-2308 (HER2-low-expressing breast cancer) patient-derived xenograft models	Single intravenous	3, 10 mg/kg of DS-8201a and 10 mg/kg of T-DM1 or MAAL-9002b	10/group	DS-8201a at 3 and 10 mg/kg and MAAL-9002b at 10 mg/kg significantly inhibited tumor growth compared with the control 21 days after administration, while T-DM1 at 10 mg/kg did not. DS-8201a at 10 mg/kg showed significantly stronger efficacy than T-DM1 at 10 mg/kg.	4.2.1.1-11, 4.2.1.1-12, 4.2.1.1-13
Antitumor activity in breast cancer	CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj mice, JIMT-1 (HER2-positive human breast carcinoma cell line) xenograft model	Single intravenous	3, 10 mg/kg of DS-8201a and 10 mg/kg of T-DM1 or MAAL-9002b	10/group	DS-8201a at 3 and 10 mg/kg, T-DM1 at 10 mg/kg, and MAAL-9002b at 10 mg/kg significantly inhibited tumor growth by 64%, 85%, 35%, and 66%, respectively, compared with the control 21 days after administration. DS-8201a at 10 mg/kg showed significantly stronger efficacy than T-DM1 at 10 mg/kg.	4.2.1.1-14

				Test Article: DS-8201a, MAAL-9001, MAAA-9001b, MAAL-9002b, T-DM1		
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Antitumor activity in gastric cancer	CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj mice, NIBIO G016 (HER2-positive gastric cancer) patient-derived xenograft model	Single intravenous	3, 10 mg/kg of DS-8201a and 10 mg/kg of T-DM1 or MAAL-9002b	8/group	DS-8201a at 3 and 10 mg/kg and MAAL-9002b at 10 mg/kg significantly inhibited tumor growth by 81%, 97%, and 95%, respectively, compared with the control 21 days after administration, whereas T-DM1 at 10 mg/kg did not. DS-8201a at 10 mg/kg showed significantly stronger efficacy than T-DM1 at 10 mg/kg.	4.2.1.1-15
Antitumor activity in gastric cancer	CAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlCrlj mice; NCI-N87 (HER2-positive human gastric carcinoma cell line), MKN45 (HER2-negative human gastric adenocarcinoma), and co-inoculation of NCI-N87/MKN45 xenograft models	Single intravenous	10 mg/kg of DS-8201a and 10 mg/kg of T-DM1	8/group	DS-8201a and T-DM1 at 10 mg/kg significantly inhibited tumor growth in the NCI-N87 model by 99% and 95%, respectively, compared with the control 14 days after administration, while they did not in the MKN45 model. DS-8201a significantly inhibited tumor growth by 80% tumor growth inhibition in the heterogeneous xenograft model, while T-DM1 did not.	4.2.1.1-16, 4.2.1.1-13

3.　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

4.　安全性薬理試験

				Test Article: DS-8201a, MAAA-1181a monohydrate[a]			
Organ Systems Evaluated	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Attachment Number**
hERG channels	hERG transfected CHO cells	In vitro	1, 3, and 10 µmol/L of MAAA-1181a	5/concentration	No statistically significant effect on tail peak currents.	Yes	4.2.1.3-1
Cardiovascular, respiratory, and central nervous systems	Cynomolgus monkeys	Single intravenous	30, 78.8 mg/kg of DS-8201a	Male, 4/group	No effect on the cardiovascular, respiratory, or central nervous system.	Yes	4.2.1.3-2

CHO, Chinese hamster ovary; hERG, human ether à go go-related gene.
[a] MAAA-1181a monohydrate was referred to MAAA-1181d in the report (4.2.1.3-1).

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。