目次

2.4　非臨床試験の概括評価 6
2.4.1　非臨床試験の概括評価 6
2.4.1.1　非臨床試験の概要 6
2.4.1.2　被験物質 8
2.4.2　薬理試験 9
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 9
2.4.2.1.1　膀胱癌の細胞表面に高発現する細胞接着分子である Nectin-4 に対するエンホルツマブ　ベドチンの結合 9
2.4.2.1.2　In vitro 効力薬理試験 10
2.4.2.1.3　In vivo 効力薬理試験 11
2.4.2.1.4　野生型 Nectin-4 及び変異体に対する細胞傷害活性 11
2.4.2.1.5　エンホルツマブ　ベドチンの活性に対する Nectin-1 の影響 12
2.4.2.1.6　抗原非媒介性細胞傷害作用の役割 12
2.4.2.1.7　癌の増殖，転移及び血管新生における Nectin-4 の役割 13
2.4.2.2　副次的薬理試験 14
2.4.2.2.1　細胞接着分子としての Nectin-4 の役割 14
2.4.2.2.2　胎盤及び発生組織におけるエンホルツマブ　ベドチンの影響 15
2.4.2.2.3　エンホルツマブ　ベドチン及び乳腺組織 16
2.4.2.2.4　ワクチン接種における Nectin-4 16
2.4.2.2.5　血管新生における Nectin-4 の役割 17
2.4.2.3　安全性薬理試験 17
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験 18
2.4.3　薬物動態試験 18
2.4.3.1　分析法 18
2.4.3.2　吸収 18
2.4.3.3　分布 19
2.4.3.4　代謝 19
2.4.3.5　排泄 19
2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用 19

2.4.4　毒性試験.....19
2.4.4.1　単回投与毒性.....20
2.4.4.2　反復投与毒性.....20
2.4.4.2.1　死亡.....20
2.4.4.2.2　皮膚所見.....20
2.4.4.2.3　血液及び骨髄所見.....21
2.4.4.2.4　雄性生殖器所見.....21
2.4.4.2.5　眼（角膜）所見.....22
2.4.4.2.6　その他の標的臓器.....22
2.4.4.2.7　末梢神経障害所見.....23
2.4.4.3　遺伝毒性.....23
2.4.4.4　がん原性.....23
2.4.4.5　生殖発生毒性.....23
2.4.4.5.1　受胎能及び着床までの初期胚発生.....23
2.4.4.5.2　胚胎児発生.....24
2.4.4.5.3　出生前及び出生後の発生.....24
2.4.4.6　幼若動物.....24
2.4.4.7　局所刺激性.....24
2.4.4.8　その他の毒性試験.....25
2.4.4.8.1　精巣毒性回復性試験.....25
2.4.4.8.2　光毒性試験.....25
2.4.4.8.3　生存率，グルコース取り込み，インスリン分泌に関する in vitro 試験.....25
2.4.4.8.4　ヒト及びカニクイザル組織における Nectin-4 発現.....26
2.4.5　総括及び結論.....26
2.4.6　参考文献一覧.....28

表

表 2.4- 1　非臨床試験で用いた被験物質.....9
表 2.4- 2　動物とヒトの定常状態における最高血清中薬物濃度（C_{max}）と全身曝露量（AUC）の比較.....27

図

図 2.4- 1　エンホルツマブ　ベドチンの構造 8
図 2.4- 2　細胞間接着に関与する Nectin 相互作用の種類 10
図 2.4- 3　エンホルツマブ　ベドチンの作用機序 11

略語及び用語の一覧

略語及び用語	定義
^{3}H	tritium, a radioactive isotope of hydrogen：トリチウム，水素の放射性同位体
ADC	antibody-drug conjugate：抗体薬物複合体
AGS22d8	Nectin-4 variant lacking exon 8：エクソン 8 を欠失した Nectin-4 の変異体
AGS-22C3E	enfortumab vedotin：エンホルツマブ　ベドチン チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いて製造した抗 Nectin-4 完全ヒト型モノクローナル抗体にモノメチルアウリスタチン E を結合させた抗体薬物複合体（溶液製剤）
AGS-22M6	ハイブリドーマ細胞を用いて製造した抗 Nectin-4 完全ヒト型モノクローナル抗体
AGS-22M6E	ハイブリドーマ細胞を用いて製造した抗 Nectin-4 完全ヒト型モノクローナル抗体にモノメチルアウリスタチン E を結合させた抗体薬物複合体
ASG-22CE	enfortumab vedotin：エンホルツマブ　ベドチン チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いて製造した抗 Nectin-4 完全ヒト型モノクローナル抗体にモノメチルアウリスタチン E を結合させた抗体薬物複合体（凍結乾燥製剤）
ATA	anti-therapeutic antibodies：抗薬物抗体
AUC	area under the concentration-time curve：濃度時間曲線下面積
AUC_{168h}	area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours：投与 168 時間後までの濃度時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein：乳癌耐性蛋白
BSEP	bile salt export pump：胆汁酸塩排泄ポンプ
C_{max}	maximum concentration：最高濃度
CYP	cytochrome P450：チトクロム P450
DAMP	danger-associated molecular pattern：危険関連分子パターン
EDSS	ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome：外胚葉形成不全合指症候群
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定
ER	endoplasmic reticulum：小胞体
FcγR	Fc-gamma-receptor：Fc-gamma 受容体
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	human ether-à-go-go related gene：ヒト ether-à-go-go
ICD	immunogenic cell death：免疫原性細胞死
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
IHC	Immunohistochemistry：免疫組織化学
K_I	inhibitor concentration causing half-maximal inactivation：最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害薬の濃度
mAb	monoclonal antibody：モノクローナル抗体
MMAE	monomethyl auristatin E：モノメチルアウリスタチン E
MRP	multidrug resistance-associated protein：多剤耐性関連蛋白
OAT	organic anion transporter：有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide：有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter：有機カチオントランスポーター

略語及び用語	定義
PDX	patient derived xenograft：患者由来腫瘍異種移植
P-gp	P-glycoprotein：P-糖蛋白
PI3K	phosphoinositide 3-kinase：ホスホイノシチド 3-キナーゼ
shRNA	short hairpin RNA：短いヘアピン型 RNA
$t_{1/2}$	terminal half-life：（見かけの）消失半減期
TAb	total antibody：総抗体
t_{max}	time to reach maximum concentration：最高濃度到達時間
vc	valine-citrulline：バリンーシトルリン
VEGF	vascular endothelial growth factor：血管内皮増殖因子

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験の概括評価

2.4.1.1　非臨床試験の概要

エンホルツマブ　ベドチン（ASG-22CE，AGS-22C3E）は，プロテアーゼ切断可能なバリン-シトルリン（vc）マレイミドカプロイルリンカーを介して微小管阻害薬モノメチルアウリスタチンE（MMAE）に結合した完全ヒト型 IgG1κ 抗体からなる抗体薬物複合体（ADC）である［Challita-Eid et al, 2016］。Nectin-4 は，接着分子の Nectin ファミリーに属する 66kDa の I 型膜貫通タンパク質である。Nectin は，接着結合におけるホモ及びヘテロの双方のトランス相互作用を介して Ca^{2+}非依存性の細胞間接着を仲介し，細胞の移動，増殖，極性化，生存及び分化を含む広範な生物学的機能を有すると考えられている［Rikitake et al, 2012］。Nectin-4 は複数の癌，特に尿路上皮癌，乳癌，肺癌，膵癌及び卵巣癌で発現しており［Challita-Eid et al, 2016］，Nectin-4 の高発現は疾患の進行及び／又は予後不良と関連することが報告されている［Sethy et al, 2020; Zhang et al, 2018; Nishiwada et al, 2015; Takano et al, 2009］。Nectin-4 は尿路上皮癌細胞表面に高発現していることから，理想的な治療標的となる。エンホルツマブ　ベドチンは細胞表面の Nectin-4 に結合した結果，ADC-Nectin-4 複合体が細胞内に移行し，次にリソソーム画分に輸送され，リンカーがタンパク質分解酵素により切断され MMAE が放出される。細胞内に放出された MMAE はチューブリン重合を阻害し，癌細胞の G2/M 期における細胞周期停止とアポトーシスを引き起こす［Francisco et al, 2003］。

臨床開発中に，ADC の抗体成分の収率，品質及び製造工程を改善するため，ハイブリドーマ細胞由来 ADC（AGS-22M6E）からチャイニーズハムスター卵巣細胞由来 ADC（エンホルツマブ ベドチン）へと製造方法を変更した。両 ADC はいずれも臨床グレードであり，同じアミノ酸配列を有し，リンカー及び細胞傷害性薬物も共通である。両 ADC は，組成，構造，生化学的性質，生物物理学的性質，免疫化学的性質，製剤，不純物の量／プロファイル，毒性及び免疫原性の観点から，同等であると考えられた（表 2.4- 1 及び 2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧）。いずれの ADC も，本申請を裏付けるための非臨床試験で使用されており，理解を容易にするために，エンホルツマブ　ベドチンと AGS-22M6E の両者を「ADC」と互換的に用いる。各毒性試験に使用された ADC の詳細は（2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧）に記載した。

ADC の作用機序の特徴を明らかにするために試験を実施した。Nectin-4 遺伝子を導入した細胞を用いて，薬物非結合型抗体及び ADC の細胞傷害活性を評価した。ADC の細胞傷害活性は Nectin−4 を内因性に発現する癌細胞においても検討した。さらに，周囲の Nectin-4 陰性癌細胞に対する間接的なバイスタンダー効果による ADC の細胞傷害活性を検討した。ADC が，細胞表面の Nectin-4 と結合した後に細胞内に取り込まれることを確認し，細胞内で放出される MMAE の濃度を定量した。潜在的な内因性結合競合物質である Nectin-1 が ADC の Nectin-4 への結合に対して競合するかについて，フローサイトメトリー及び細胞傷害活性評価により検討した。ADC

による腫瘍増殖の阻害を，ヒト膀胱癌患者及び乳癌患者由来腫瘍異種移植（PDX）モデルを用いて評価した。

ADC の Nectin-4 への結合特異性を評価した。ADC による細胞傷害作用を，Nectin-4 又は Nectin-4 変異体の遺伝子を導入した細胞を用いて評価した。組織交差反応性を検討するとともに非臨床毒性評価に用いる動物種の選択をサポートするため，Nectin-4 オルソログ（ヒト，カニクイザル，ラット及びマウス）の遺伝子を導入した細胞を用いて，結合親和性及び細胞傷害活性を比較した。ADC がカニクイザルとラットの Nectin-4 オルソログに対してヒト Nectin-4 と同等の親和性及び細胞傷害活性を示したことから，カニクイザル及びラットを非臨床毒性評価に使用する動物種として選択した。

MMAE の心血管に対する in vitro 安全性薬理評価として，ヒト ether-à-go-go related gene（hERG）チャンネルアッセイを実施した。ADC の抗体部分については，細胞膜を透過せず hERG チャネルに影響する可能性が低いことから［Vargas et al, 2008］，評価を行わなかった。心電図，心拍数，血圧，呼吸系及び中枢神経系の安全性薬理パラメータは，ADC を用いて実施した一般毒性試験の中で評価した。

ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において，ADC，総抗体（TAb）及び MMAE のトキシコキネティクスを検討した。反復投与後の ADC の免疫原性を考察するため，抗薬物抗体（ATA）も分析した。また，エンホルツマブ　ベドチンに含まれ細胞障害活性を有する低分子である MMAE の分布及び排泄を，トリチウム標識した MMAE（[^{3}H]MMAE）をラットに投与することにより評価した。MMAE の血漿蛋白結合率及び血球移行率を in vitro で評価した。MMAE の代謝プロファイル，代謝に寄与する酵素の同定，チトクロム P450（CYP）阻害作用並びに CYP 誘導作用を，肝細胞，肝ミクロソームあるいは CYP 発現系を用いて評価した。さらに，排泄並びに取り込みトランスポーターに対する MMAE の阻害作用及び基質性を評価した。

毒性試験プログラムとして，GLP（Good Laboratory Practice）を遵守した一連のカニクイザル及びラットを用いた反復投与試験において ADC の安全性を評価した。薬物非結合型抗体の毒性はラット及びカニクイザルでの反復投与毒性試験の両方で評価したが，MMAE の毒性はカニクイザルでの反復投与毒性試験でのみ評価した。MMAE 及びリンカー-MMAE については，医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン「医薬品の光安全性ガイドライン」（ICH S10）に準拠して，紫外可視吸収分光法により光毒性を評価した。

MMAE の遺伝毒性は，標準的な試験バッテリー（細菌及び哺乳動物細胞を用いた in vitro 試験及び in vivo 小核試験）で評価した。

妊娠ラットを用いて，エンホルツマブ　ベドチン及び MMAE の胚・胎児毒性を評価した。

進行がん患者への使用を目的としていることから，がん原性試験，受胎能試験，出生前及び出生後の発生に関する試験は実施しなかった（ICH S9，抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン）。また，幼若動物を用いた毒性試験についても実施しなかった。

MMAE による高血糖の誘発機序を明らかにするための探索的検討を行った。また，エンホルツマブ　ベドチンの精巣毒性の回復性を検討する試験を実施した。

非臨床薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験のリストは，2.6.3.1 薬理試験：一覧表，2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表，2.6.7.1 毒性試験：一覧表及び 2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表に記載した。

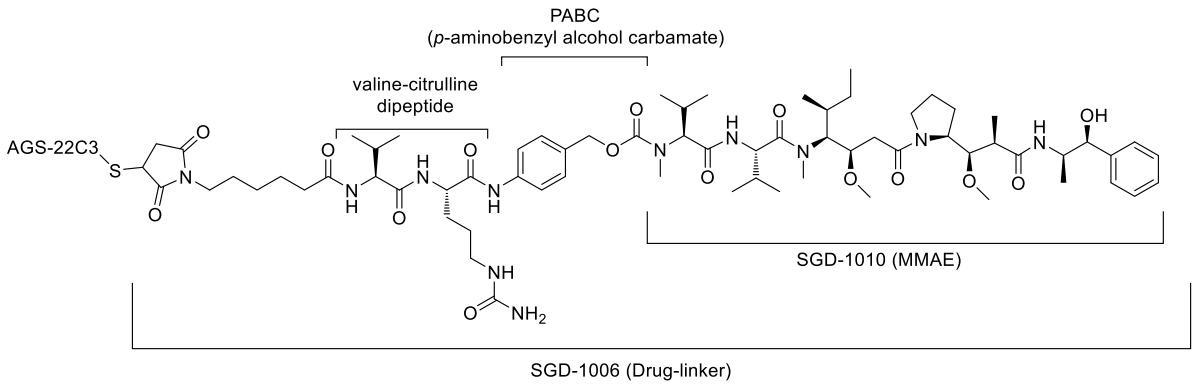
この一連の非臨床試験パッケージは，局所進行性又は転移性尿路上皮癌患者の治療薬としてのエンホルツマブ　ベドチンの本申請を支持するものである。

2.4.1.2　被験物質

化合物番号：ASG-22CE

一般名：エンホルツマブ　ベドチン

図 2.4- 1　エンホルツマブ　ベドチンの構造



AGS-22C3: IgG1 kappa monoclonal antibody; IgG1: immunoglobulin G1; MMAE: monomethyl auristatin E; PABC: *p*-aminobenzyl alcohol carbamate

表 2.4- 1 に，非臨床薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験で使用された ADC 及びコンポーネントについて記載し，それぞれのコンポーネントコードを示した。

表 2.4- 1　非臨床試験で用いた被験物質

Investigational Product	Component	Component Code	Description
Enfortumab vedotin (ASG-22CE)	ADC	ASG-22CE (lyophilized drug product)	CHO cell-derived anti-Nectin-4 ADC comprised of antibody (AGS-22C3) conjugated to MMAE
		AGS-22C3E (liquid drug substance)	
AGS-22M6E	ADC	AGS-22M6E	Initial clinical anti-Nectin-4 ADC (hybridoma-derived) comprised of antibody (AGS-22M6) conjugated to MMAE
	Antibody	AGS-22M6	Antibody backbone of AGS-22M6E, referred to as “unconjugated antibody”
MMAE	Released drug	SGD-1010	Released cytotoxic small molecule conjugated by the same protease cleavable linker (vc) on both enfortumab vedotin and AGS-22M6E

ADC: antibody-drug conjugate; ASG 22CE: Chinese hamster ovary derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; ASG 22M6: unconjugated hybridoma derived fully human monoclonal antibody targeting Nectin-4; ASG 22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; CHO: Chinese hamster ovary; MMAE: monomethyl auristatin E; vc: valine-citrulline

2.4.2　薬理試験

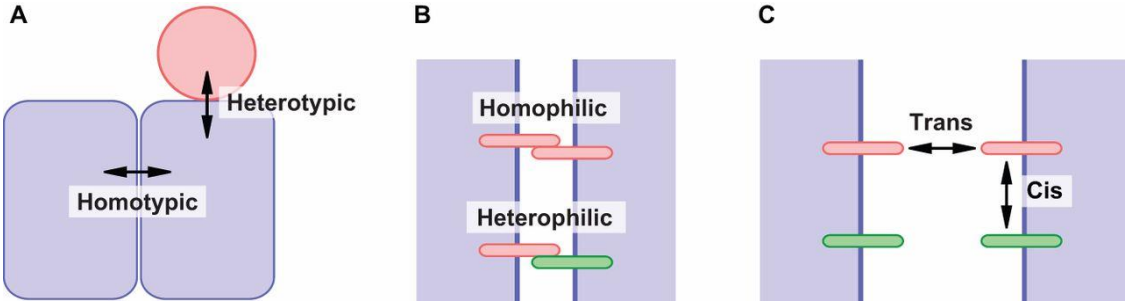
2.4.2.1　効力を裏付ける試験

一連の薬力学的評価は，文献調査とともに，in vitro 及び in vivo 試験により実施した。実施した薬理試験は，2.6.3.1 薬理試験：一覧表に記載した。

2.4.2.1.1　膀胱癌の細胞表面に高発現する細胞接着分子である Nectin-4 に対するエンホルツマブ　ベドチンの結合

Nectin-4 は，細胞接着を媒介する糖タンパク質であり，免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである［Challita-Eid et al, 2016; Delpeut et al, 2014］。Nectin-4 はそれ自体が結合パートナーとして（ホモフィリック結合），また Nectin-1 を結合パートナーとして（ヘテロフィリック結合），さらに同じ細胞内（シス）又は細胞間（トランス）でも結合する［図 2.4- 2］。これらの結合は，同一の細胞型（ホモティピック）間でも異なる細胞型（ヘテロティピック）間でも起こりうる［Rikitake et al, 2012］。ADC が他の Nectin ホモログ（Nectin-1，Nectin-2，及び Nectin-3）に対して特異的に結合するかについて検討した。ADC は，Nectin-4 を発現する細胞には特異的に結合したが，他の Nectin ホモログを発現する細胞には結合しなかった。また，ADC は，ヒト，カニクイザル及びラットの Nectin-4 発現細胞に対して同等の結合親和性及び細胞傷害活性を示したが，マウス Necin-4 発現細胞に対する結合親和性及び細胞傷害活性はそれらと比較して弱かったことから，毒性試験に用いた動物種が適切であったことが示された。

図 2.4- 2　細胞間接着に関与する Nectin 相互作用の種類



Types of cell–cell adhesion and interactions between cell adhesion molecules.　(A) Cell adhesion can occur homotypically (i.e. between the same cell types) or heterotypically (i.e. between two different cell types).　(B) Along similar lines, cell adhesion molecules can interact with each other in a number of different ways.　They can interact homophilically (i.e. forming interactions between molecules of the same type) or heterophilically (i.e. forming interactions between two different molecules).　(C) Additionally, cell adhesion molecules can form interactions in cis (i.e. cell adhesion molecules on the surface of one cell interact) or in trans (i.e. cell adhesion molecules on the surface of one cell interact with adhesion molecules on the surface of an opposing cell) [Rikitake et al, 2012].

Nectin-4 は多くの異なるタイプの腫瘍において高発現し，検討したヒト癌種の 50%以上において，ある程度以上の Nectin-4 の発現が認められた。Nectin-4 は膀胱癌に高頻度に認められ，被験者としてプレスクリーニングされた全膀胱癌患者の Nectin-4 発現陽性率は 98.3%であった（EV-101 試験）。膀胱癌の大部分は，Nectin-4 の免疫組織化学的（IHC）評価において高度から中等度のスコアを示した。Nectin-4 は，悪性度の高い癌においてより高レベルの発現が認められ，様々な癌種（乳癌，胃癌，胆嚢癌及び卵巣癌）において予後不良と関連していることが報告されている［Zhang et al, 2018; Pils et al, 2017; Rajc et al, 2017; Zhang et al, 2016; Nishiwada et al, 2015; Lattanzio et al, 2014; Takano et al, 2009; Fabre-Lafay et al, 2007; Fabre-Lafay et al, 2005］。

Nectin-4 が膀胱癌において高頻度で発現し，かつ発現レベルも高いことから，この膜上に発現するタンパク質を尿路上皮癌に対する ADC の標的とすることが適切であることが示された。

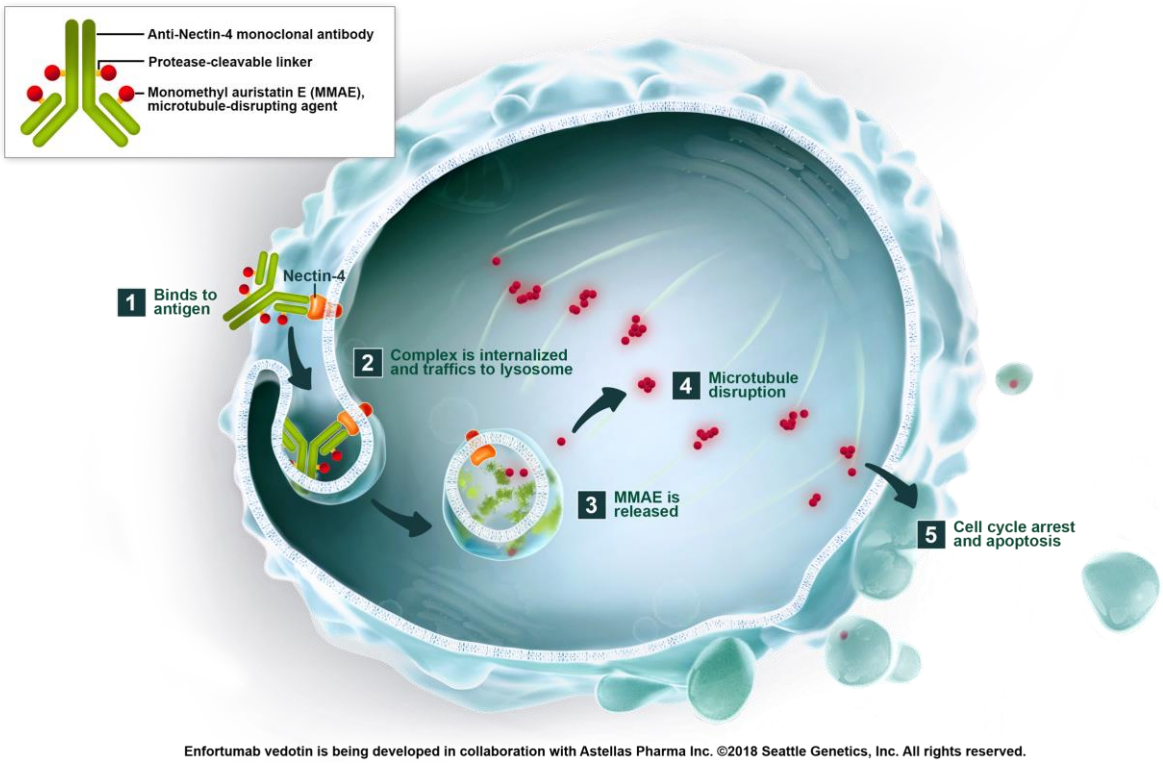
2.4.2.1.2　In vitro 効力薬理試験

ADC の主要な生物学的活性は，多段階の過程を経て発揮されると考えられている。癌細胞表面の Nectin-4 に ADC が結合すると，ADC-Nectin-4 複合体の細胞内への移行が開始され，その後，リソソームに輸送され，リンカーがタンパク質分解酵素により切断されて細胞内に MMAE が放出される（図 2.4- 3）［Doronina et al, 2003］。

In vitro で，Nectin-4 発現細胞における ADC の細胞内取り込みを確認した。細胞内取り込みのピークは 4 時間であり，その時点で ADC の大部分はリソソームに局在していた。ADC からの MMAE の細胞内放出は，Nectin-4 陽性細胞においてのみ起こることが示された。1000 ng/mL のエンホルツマブ　ベドチンを Nectin-4 遺伝子導入細胞とインキュベートすることにより，249 nmol/L の MMAE が細胞内画分に放出された。細胞傷害活性評価により，Nectin-4 遺伝子導入細胞及び内因性 Nectin-4 発現細胞において ADC がアポトーシスを引き起こすことが確認され

た。加えて，ADC は周囲の Nectin-4 陰性癌細胞に対して間接的なバイスタンダー効果により細胞傷害活性を示した。

図 2.4- 3　エンホルツマブ　ベドチンの作用機序



2.4.2.1.3　In vivo 効力薬理試験

ADC の in vivo における有効性は，膀胱癌患者及び乳癌患者由来腫瘍異種移植モデルを用いて検討した。膀胱癌患者由来腫瘍（AG-B1）異種移植モデルにおいて，ADC は 0.8 mg/kg で腫瘍増殖を阻害し，溶媒投与群を対照とした腫瘍増殖阻害率は 75.7%であった。ADC が腫瘍増殖を阻害する一方で，薬物非結合型抗体は阻害作用を示さなかった。膀胱癌患者由来腫瘍（AG-B8）異種移植モデルにおいても，ADC は検討した最低用量（0.5 mg/kg）で腫瘍増殖を阻害した。これらの結果より，Nectin-4 発現患者由来膀胱癌細胞に ADC によって MMAE が送達されたこと，尿路上皮癌に対する有効性が期待できることが確認された。

2.4.2.1.4　野生型 Nectin-4 及び変異体に対する細胞傷害活性

Nectin-4 の変異体（AGS22d8）は，膀胱癌の組織プールを用いたクローニングにより同定された。これはエクソン 8 を欠く転写産物に由来し，Nectin-4 タンパク質の細胞内ドメインにある 25 アミノ酸の欠失をもたらす。野生型又は変異体を発現する細胞において，ADC は同等の細胞傷

害活性を示した。この結果により，エンホルツマブ　ベドチンが腫瘍細胞上に発現する野生型及び変異体に対して同等の有効性を示すことが示唆された。

2.4.2.1.5　エンホルツマブ　ベドチンの活性に対する Nectin-1 の影響

Nectin-4 は細胞間で Nectin-1 とヘテロ二量体を形成する。フローサイトメトリーによる結合競合評価において，可溶性 Nectin-1 と Nectin-4 との結合に対して ADC が競合したことから，ADC の結合エピトープが Nectin-4 上の Nectin-1 相互作用部位と重複していることが示唆された。しかしながら，ADC の 25 倍以上の濃度の Nectin-1-Fc タンパク質を添加しても，ADC の Nectin-4 発現細胞に対する細胞傷害活性は変化しなかった。これらの結果から，ADC の細胞傷害活性が Nectin-1 によって阻害されないことが示された。

2.4.2.1.6　抗原非媒介性細胞傷害作用の役割

上述した標的細胞に対する ADC の傷害作用の主な作用機序に加えて，報告されている他のマイナーな細胞傷害作用の機序について以下に考察する。

標的癌細胞からの MMAE の放出による 2 次的なバイスタンダー効果：この作用の基本的なメカニズムは，ADC からの低分子細胞傷害性物質の放出と，抗体を介さない細胞傷害性物質の隣接細胞への拡散である。エンホルツマブ　ベドチンは，Nectin-4 陽性癌細胞に対する直接的な細胞傷害作用及び周囲の Nectin-4 陰性癌細胞に対する間接的なバイスタンダー効果による細胞傷害作用を惹起した。細胞傷害作用は，Nectin-4 を発現する標的細胞におけるエンホルツマブ　ベドチンの細胞内移行及び MMAE の細胞内への放出によって媒介され，その後，隣接細胞へと拡散した。このことは，MMAE と結合した非標的モノクローナル抗体（mAb）を共培養細胞とインキュベートした場合には Nectin-4 陽性細胞及び Nectin-4 陰性細胞のいずれに対しても細胞傷害活性を示さなかったことにより裏付けられた。

腫瘍随伴マクロファージからの MMAE 放出によるバイスタンダー効果：この作用のメカニズムは，上述の標的腫瘍細胞依存性バイスタンダー効果の機序と類似している。しかしながら，こちらは ADC の Fc 領域が腫瘍随伴マクロファージ上の Fc-γ receptor（FcγR）と相互作用すると考えられている。FcγR-ADC 複合体はマクロファージ内に取り込まれて MMAE が放出され，放出された MMAE はその後マクロファージから拡散し，周囲の腫瘍細胞に対して細胞傷害作用を惹起すると考えられる。この機序に関して，Li らは，非腫瘍標的 ADC が異種移植モデルにおいて腫瘍細胞を死滅させたことを報告している［Li et al, 2017］。同試験で FcγR との結合親和性を低下させた変異 Fc 領域を有する ADC を投与すると，抗腫瘍活性が低下した。

免疫原性細胞死（ICD）：ICD は，死にゆく癌細胞から放出される特定の抗原に対する抗腫瘍免疫応答を刺激する，細胞死の特別な形態である。ICD は，小胞体（ER）ストレス応答の誘導と，それに続く危険関連分子パターン（DAMP）と呼ばれる免疫活性化分子の細胞表面への露出によって特徴付けられる。エンホルツマブ　ベドチンと同じ vc リンカーで MMAE が結合した

ADC であるブレンツキシマブ　ベドチンを用いた in vitro の検討において，ブレンツキシマブ　ベドチンにより ER ストレス応答の誘導及び DAMP（カルレチクリン及び熱ショックタンパク質 90）の細胞表面への露出が引き起こされることが示された［Gardai et al, 2015］。ブレンツキシマブ　ベドチンによる腫瘍細胞におけるこれら免疫活性化分子の露出は，in vitro 及び in vivo で自然免疫細胞活性化を誘導した［Cao et al, 2017］。

他の二次的な抗腫瘍作用が生じる可能性もあるが，尿路上皮癌におけるエンホルツマブ　ベドチンの臨床試験結果に対するこれらの二次的抗腫瘍作用の寄与は現在のところ不明である。以上より，エンホルツマブ　ベドチンの抗腫瘍作用は主に Nectin-4 を介した ADC の腫瘍細胞内への取り込みと細胞内で放出された MMAE による細胞傷害作用によるものと結論づけた。

2.4.2.1.7　癌の増殖，転移及び血管新生における Nectin-4 の役割

癌における Nectin-4 の役割を文献調査によって評価し，Nectin-4 を標的とすることによってさらなる抗腫瘍活性をもたらす可能性のある，潜在的な 3 つのメカニズムを見出した。これらは，癌細胞の増殖，転移，及び血管新生において Nectin-4 の果たす役割に基づいている。しかしながら，現在のところこれらがエンホルツマブ　ベドチンの薬効に関連していることを示す非臨床試験結果は得られていない。

Nectin-4 の発現により，細胞増殖及び腫瘍増殖が亢進することが示されている［Nishiwada et al, 2015; Pavlova et al, 2013］。卵巣癌細胞において，短いヘアピン型 RNA（shRNA）により Nectin-4 をノックダウンすると，細胞倍加時間が約 2 倍（18 時間から 30 時間以上）に延長した［Boylan et al, 2017］。この効果は in vivo でも認められ，乳癌異種移植モデル（SUM190, SUM185 及び BT-474）において，Nectin-4 発現を shRNA で枯渇させると腫瘍増殖遅延が生じた［Pavlova et al, 2013］。shRNA による Nectin-4 の枯渇は，胆嚢腫瘍の増殖及び遊走を阻害したが，過剰発現は，腫瘍細胞の増殖及び遊走を促進した［Zhang et al, 2016］。

Nectin-4 は遺伝子スクリーニングにより同定され，足場非依存性増殖に関与することが明らかとなっている［Siddharth et al, 2017; Pavlova et al, 2013］。マトリックス剥離細胞では，Nectin-4 を添加しなければ自発的なアポトーシスが起こると考えられるが，Nectin-4 の添加により細胞が自発的にクラスターを形成し，生存した［Brown et al, 2018］。Nectin-4 の枯渇により，理論的にはマトリックス剥離細胞死を起こし得る［Zhang et al, 2016］。平均して，乳癌及び肺癌の血中循環腫瘍細胞の 50%が凝集体として存在しており［Cho et al, 2012］，クラスター形成が転移を促進し，Nectin-4 を介したクラスター形成がこの過程に寄与している可能性が示唆されている。Nectin-4 が発現していない癌細胞では形成できない大きなマトリックス剥離スフェロイドの形成が，Nectin-4 の発現により促進されたとの報告もある［Boylan et al, 2017］。

Nectin-4 の細胞内シグナルはホスホイノシチド 3-キナーゼ（PI3K）/AKT 経路を介して伝達されるが，この PI3K/AKT 経路は卵巣癌，乳癌，及び尿路上皮癌などの多くの癌で調節が破綻していることが知られている［Siddharth et al, 2017］。PI3K/AKT 経路は，転写因子と細胞周期タンパク質の発現を亢進することにより細胞の増殖と分化を誘導する。Nectin-4 及び細胞表面から脱落

した可溶性 Nectin-4 は，血管内皮増殖因子（VEGF）及び塩基性線維芽細胞増殖因子の促進を介してインテグリン-β4 タンパク質と直接相互作用し，血管新生を刺激する［Pavlova et al, 2013; Siddharth et al, 2018; Giancotti, 2007］。乳癌幹細胞の条件培地から分離された可溶性 Nectin-4 と組換え Nectin-4 はいずれも，ヒト臍帯静脈内皮細胞において機能的に管腔形成を誘導した［Siddharth et al, 2018］。また，Nectin-4 を BALB/c マウスの卵子又は耳に注入した場合でも in vivo で血管新生を誘導した［Siddharth et al, 2018］。さらに膵癌患者において，Nectin-4 と VEGF 転写産物レベル，及び Nectin-4 転写産物レベルと IHC による腫瘍内微小血管密度との間には有意な正の相関が認められた［Nishiwada et al, 2015］。

以上をまとめると，文献において，癌細胞表面の Nectin-4 を標的とすることは，抗腫瘍効果の発現において様々な利点がある可能性が示唆されている。これらの作用は，これまでに ADC を用いた効力薬理試験では検討されていないが，薬物非結合型抗体は細胞傷害作用や腫瘍増殖阻害作用を示さなかった。抗血管新生作用は，2.4.2.2.5 血管新生における Nectin-4 の役割に記載したように，いずれの非臨床毒性試験においても認められなかった。これらのデータ及び ADC に結合した MMAE の効力を考慮すると，エンホルツマブ　ベドチンの抗腫瘍作用は主として MMAE の細胞内薬理作用に基づいており，抗 Nectin-4 抗体によるものではないと考えられた。

2.4.2.2　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかったが，ADC が Nectin-4 に結合することによる二次的な作用の仮説について，文献調査に基づいて記載する。これらの二次的効果の仮説を非臨床及び臨床試験から得られたデータを引用して考察する。

2.4.2.2.1　細胞接着分子としての Nectin-4 の役割

Nectin-4 は他の細胞接着分子とともに細胞間接着の維持に関与している［Rikitake et al, 2012］。Nectin-4 発現におけるホモ接合性変異が，Nectin-1-Nectin-4 の異種間反応の破綻を引き起こし，外胚葉形成不全合指症候群（EDSS）の原因であることが報告されている［Boudghene-Stambouli et al, 1991; Brancati et al, 2010; Jelani et al, 2011; Fortugno et al, 2014; Raza et al, 2015］。Nectin-4 にホモ接合性の機能欠損変異を有する成人患者の組織生検では，接着関連タンパクの発現は毛包の外毛根鞘で破綻していたが，表皮では破綻していなかった［Brancati et al, 2010］。表現型として，これらの患者は，とりわけ，脱毛症や手掌足底過角化症を呈する。

動物及び患者でエンホルツマブ　ベドチンによる皮膚毒性が認められたが，これは分裂の速い上皮細胞への ADC を介した標的依存的な MMAE の取り込みによるものと考えられている（2.6.6 毒性試験の概要文）。臨床試験被験者の皮膚生検から，ADC と Nectin-4 の共局在が認められ（EV-101 試験），皮膚における標的発現及び標的介在性の MMAE の取り込みが関連していることが明らかになった。このことは，薬物非結合型抗体による毒性が全くみられないこと，又

はこの変異に起因する表現型と類似の臨床症状が確認されていることと相まって，エンホルツマブ　ベドチンは細胞間接着を有意に阻害しないという有力な証拠と考えられる。

2.4.2.2.2　胎盤及び発生組織におけるエンホルツマブ　ベドチンの影響

胚・胎児発生に関する試験では，妊娠ラットにエンホルツマブ　ベドチン（5 mg/kg）を妊娠 6 及び 13 日に投与したとき，妊娠 21 日までに同腹児の全例が死亡した（20119695 試験）。Ito らは，正常及び子癇前症を伴う妊娠のいずれの胎盤においても Nectin-4 が発現していることを報告している［Ito et al, 2018］。また，ヒト組織パネルを用いた AGS-22M6E の組織交差反応性に関する試験において，ヒト胎盤の合胞体栄養膜細胞に特異的な陽性染色が認められた（8236219 試験）。

外胚葉組織の発生過程においてマウス胚で Nectin-4 の発現が増加することや，ヒトにおける Nectin-4 の機能欠損変異と EDSS との関連性が示されており，Nectin-4 は胚発生における組織発達において重要な分子であることが確認されている［Brancati et al, 2010］。Nectin-4 ノックアウトマウスの予備的な特徴評価から，Nectin-4 ノックアウトのホモ接合が胎児の生存能に負の影響を及ぼす可能性が示唆されている［International Mouse Phenotyping Consortium, 2016］。ただし，ヒト及びラットにおいて同腹児の損失（早期吸収）が起こる時点での ADC のような大きな分子の胎盤移行は非常に低いことから，ADC と胎児 Nectin-4 との直接的な相互作用が関連メカニズムとは考えられない［Moffat et al, 2014］（ICH S6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」）。

胎盤染色所見は，ラット胚・胎児発生試験で観察された同腹児損失を含む胎児所見のメカニズムの可能性を提供するものである。仮説として，ADC は胎盤細胞上の Nectin-4 に結合して MMAE を細胞内に放出し，胎盤に直接損傷を与えて同腹児を損失させた可能性が考えられる。しかしながら，ADC を投与した母動物の胎盤は肉眼的評価により正常であったことから，明白な胎盤毒性はないことが示された。

Nectin-4 を標的とした MMAE の局所での放出は，胎盤組織から拡散し，分裂の速い胚・胎児細胞に直接影響を与える可能性がある。このことを裏付けるように，MMAE を単独で投与すると，同腹児が完全に損失することが判明している。しかしながら，Nectin-4 非結合性の MMAE を有する ADC を投与しても同腹児の完全な損失をもたらすことから（8204397 試験），毒性は抗原を介した取り込みと類似の機序で，胎盤において Fc を介して取り込まれて MMAE が放出されたことに関連している可能性がある。

要約すると，観察された胚・胎児毒性は，分裂が速い細胞に対する MMAE の薬理作用と一致しており，ADC の標的依存的及び非依存的な取り込みと MMAE の放出の組み合わせによるものである可能性がある。

2.4.2.2.3　エンホルツマブ　ベドチン及び乳腺組織

マウス抗ヒト Nectin-4 mAb を用いた免疫組織化学的評価（重要な試験以外の試験）において，ヒト乳腺組織の乳管及び腺房上皮細胞が特異的に染色されることが示された（ES[redacted]-001　試験）。しかしながら，重要な試験であるビオチン化 AGS-22M6E を用いた交差反応性試験では，この所見は確認できなかった（8236219 試験）。

ADC と乳腺との交差反応が疑われたため，毒性プログラム及び文献のレビューを行った。重要な試験以外の試験であるラットでの 4 週間反復投与試験では，致死量（週 1 回，10 又は 15 mg/kg 投与）の ADC を投与した雄ラットにおいて，乳腺組織の雌性化の組織学的徴候が認められた（8226169 試験）。この所見は重要な 4 週間反復投与ラット試験では曝露量が同等であったにも関わらず確認されなかった（20005662 試験）。同様に，ラットでの 13 週間反復投与 GLP 試験においては，雄乳腺の雌性化の組織学的所見はみられず，実際には雄の乳腺の萎縮を示唆する組織学的所見が認められている（20117437 試験）。さらに，カニクイザル反復投与毒性試験の雄動物でも，致死量（週 1 回，6 mg/kg 投与）を投与しても，乳腺への影響を示す変化は認められなかった（20005664 試験）。

Nectin-4 の細胞外ドメインがプロラクチン受容体と相互作用し，マウス乳腺の腺房の発達をもたらす活性化シグナルを誘導することが，Maruoka らによって報告されている［Maruoka et al, 2017］。この報告は，ラットでの反復投与毒性試験（非 GLP 試験）における乳腺所見に生物学的に妥当な機序があることを示している。

以上をまとめると，ヒト Nectin-4 に対するマウス mAb では，ヒト乳腺組織が免疫組織化学的に染色されたが，臨床的に同等な ADC の AGS-22M6E ではそのような染色は認められなかった。雄性ラットに AGS-22M6E を致死用量で 4 週間反復投与したところ病理組織学的に乳腺の雌性化が認められたが，重要な試験であるラットでの 4 週間反復試験（GLP 試験）では同等の全身曝露に達していたにも関わらず，乳腺雌性化の所見は認められなかった。さらに，文献では，乳腺組織の影響について生物学的に妥当な機序を提供しているが，ADC の抗体部分である AGS-22M6 は 4 週間の投与によっても乳腺の雌性化を誘導しなかった。したがって，エンホルツマブ ベドチンは，プロラクチン受容体との相互作用を介して，男性の乳腺組織に影響を及ぼす危険性はほとんどないと結論づけられる。

2.4.2.2.4　ワクチン接種における Nectin-4

ヒトにおいて Nectin-4 は，マクロピノサイトーシスを介して麻疹ウイルスが細胞内に侵入する際のメディエーターとして関与している［Sato et al, 2012; Delpeut et al, 2017］。最近の研究により，全てのモルビリウイルスのユニバーサル免疫受容体である CD150 を介して感染した骨髄系細胞は，麻疹ウイルスが Nectin-4 を介して呼吸器上皮細胞に侵入できるように，麻疹ウイルスを基底膜側に提示することが明らかになっている［Ludlow et al, 2010; Delpeut et al, 2014］。その後，麻疹ウイルスは，上皮細胞接合部からの Nectin-4 を介した取り込みを介して気道上皮全体に拡散

することができる［Delpeut et al, 2014］。理論的には，Nectin-4 の阻害により，麻疹ウイルスが上皮組織内外に拡散するのを減少させる可能性がある。このことは，麻疹ウイルスの感染能を低下させることから，成人全体にプラスの影響があると想定される。

一方で，このことはエンホルツマブ　ベドチンと麻疹生ワクチンが併用で投与される際の理論的なリスクにもなり得る。しかしながら，麻疹ワクチン接種に用いられる弱毒化生ウイルスは，細胞培養での増殖から細胞に侵入する適応を獲得し，有核細胞表面に広く発現するヒト膜受容体である CD46 を介しても細胞に侵入する［Naniche et al, 1993; Delpeut et al, 2014］。したがって，エンホルツマブ　ベドチンが投与される患者層において，Nectin-4 を遮断することがワクチン接種に及ぼす影響は極めて低いと考えられる。

2.4.2.2.5　血管新生における Nectin-4 の役割

2.4.2.1.7 癌の増殖，転移及び血管新生における Nectin-4 の役割で述べたように，Nectin-4 は血管新生に何らかの役割を果たしている可能性がある。エンホルツマブ　ベドチンに血管新生の阻害作用があれば，仮説的には VEGF 阻害剤のような抗血管新生化合物に類似した悪影響（骨の成長板の変化及びラット卵巣における黄体数の低下）を有すると考えられる［Hall et al, 2016; Wedge et al, 2005; Gerber and Ferrara, 2005; Ryan et al, 1999］。2.4.2.1.7 癌の増殖，転移及び血管新生における Nectin-4 の役割に記載したように，毒性試験の結果は，ADC 及び薬物非結合型抗体は，抗血管新生化合物で認められる所見と類似の毒性所見を発現していないことを示しており，血管新生阻害作用はエンホルツマブ　ベドチンの薬理作用とは考えられない。

2.4.2.3　安全性薬理試験

MMAE は，臨床推奨用量（1.25 mg/kg）投与時の MMAE の C_{max} の 19405 倍の濃度（100 µmol/L）で，hERG チャンネルを介するカリウム電流の阻害を示したが，抑制率としては 50%未満であった。10 µmol/L では，hERG チャネル活性の有意な阻害は認められなかった。カニクイザルでは Fridericia の式で補正した QT 間隔及び RR 間隔に対して，臨床推奨用量（1.25 mg/kg）投与時のエンホルツマブ　ベドチンの C_{max} の約 6 倍まで AGS-22M6E の影響は認められなかった（2.6.2.4 安全性薬理試験）。ADC の抗体成分は細胞膜を通過せず hERG チャネルに影響する可能性が低いと考えられるため［Vargas et al, 2008］，ADC の評価は行わなかった。

心電図，心拍数，血圧，呼吸系あるいは中枢神経系の安全性薬理パラメータについては，ADC を投与したカニクイザルにおける一般毒性試験の一部として評価し，その結果，影響は認められなかった。

結論として，エンホルツマブ　ベドチンは安全性薬理エンドポイントに対して影響を及ぼさず，また，臨床でも安全性薬理シグナルへの影響を示唆する所見は認められなかった。

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験

エンホルツマブ　ベドチン及び AGS-22M6E の薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　分析法

ラット及びカニクイザル血清中の ADC 及び TAb 濃度は，バリデートされたサンドイッチ酵素免疫測定（ELISA）法により測定した。ラット及びカニクイザル血清中の MMAE 濃度は，バリデートされた液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー法により測定した。血清中の ATA は，エンホルツマブ　ベドチンあるいは AGS-22M6E を捕捉及び検出抗体に用いたバリデートされたブリッジング ELISA 法により測定した。

2.4.3.2　吸収

エンホルツマブ　ベドチンあるいは AGS-22M6E の 3 mg/kg をカニクイザルに静脈内投与したとき，ADC の AUC_{168h} 及び C_{max} の幾何平均比はそれぞれ 1.14 及び 1.26 であったことから，両抗体のトキシコキネティクスは同等と考えられた。また，カニクイザルにおける ATA の発現率もエンホルツマブ　ベドチンと AGS-22M6E で同程度であった。したがって，AGS-22M6E のトキシコキネティクスの結果から，エンホルツマブ　ベドチンの薬物動態特性を評価可能と考えられた。

AGS-22M6E をラット（2～10 mg/kg）及びカニクイザル（1～6 mg/kg）に 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したとき，ADC 及び TAb の AUC あるいは C_{max} は投与量にほぼ比例して上昇した。ADC 及び TAb のトキシコキネティクスに，性差は認められなかった。血清中の TAb 濃度は ADC 濃度と比較して特に投与後の遅い時間で高く，AUC は TAb の方が ADC と比較して大きかった。ADC の半減期（$t_{1/2}$）はラットで 0.887～1.29 日であり，カニクイザルで 0.700～1.72 日であった。TAb の $t_{1/2}$ はラットで 1.33～2.16 日であり，カニクイザルで 1.02～2.75 日であった。AGS-22M6E を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したとき，ADC，TAb 及び MMAE に顕著な蓄積性は認められなかったが，反復投与後の ADC 及び TAb の AUC は ATA の発現により低下する傾向が認められた。ATA の発現率は，ラットと比べてカニクイザルの方が概して高かった。ラット及びカニクイザルに AGS-22M6E を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの MMAE の曝露量は，投与量にほぼ比例して上昇した。AGS-22M6E を静脈内投与したときの MMAE の薬物動態は，AGS-22M6E からの MMAE の生成速度に依存すると考えられた。MMAE をカニクイザルに静脈内投与したときの全身クリアランスは高く，分布容積は大きかった。

2.4.3.3　分布

MMAE の動物及びヒトにおける血漿蛋白結合率はそれほど高くなかったが，種差が認められ，マウス（18.8%～28.5%）及びカニクイザル（17.1%～18.9%）と比べヒト（67.9%～82.2%）及びラット（72.0%～73.5%）で高かった。MMAE の血球移行率には種差が認められ，血液/血漿濃度比はヒトでは 1 未満であったが，マウス，ラット及びカニクイザルでは概して 1 より大きかった。[^{3}H]MMAE 由来の放射能は Long-Evans ラットの全身に広く分布し，投与 96 時間後には大部分の組織から消失した。

2.4.3.4　代謝

MMAE の代謝は，ラット，カニクイザル及びヒト肝細胞で類似していた。ヒト肝細胞で生成した代謝物はラット若しくはカニクイザルの肝細胞でも生成した。ヒト CYP 発現系を用いた試験において，MMAE は主に CYP3A4 により代謝された。

2.4.3.5　排泄

[^{3}H]MMAE をラットに単回静脈内投与したとき，放射能は主に糞中に排泄され，尿中に排泄された放射能は投与量のおよそ 15%未満であった。また，尿及び糞中に排泄された放射能の主な成分は未変化体であった。

2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用

MMAE は準不可逆的で代謝依存的な CYP3A4/5 の阻害剤であったが，CYP1A2，CYP2B6 あるいは CYP3A4/5 の誘導剤ではなかった。MMAE は P-糖蛋白（P-gp）の基質であったが，乳癌耐性蛋白（BCRP），多剤耐性関連蛋白（MRP）2，有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1，OATP1B3，有機カチオントランスポーター（OCT）2，有機アニオントランスポーター（OAT）1 あるいは OAT3 の基質ではなかった。MMAE は臨床的に意義のある濃度で胆汁酸塩排泄ポンプ（BSEP），P-gp，BCRP，MRP2，OCT1，OCT2，OAT1，OAT3，OATP1B1 及び OATP1B3 の阻害剤ではなかった。

2.4.4　毒性試験

エンホルツマブ　ベドチンの毒性プロファイルは，一連の非臨床安全性試験において明らかにされた。本プログラムは，現行の規制ガイドライン（ICH S1A，S2［R1］，S5［R2］，S6［R1］，S9，S9 Q&A，S10，M3［R2］）に十分配慮してデザインされ，重要な試験はすべて GLP 適合試験（2.6.7.1 毒性試験：一覧表）であった。

ラット，カニクイザル及びヒト Nectin-4 に対する ADC の結合親和性が同等であったことに基づき，ラット及びカニクイザルを非臨床試験動物種として選択した。動物種間で類似した毒性プ

ロファイルが認められたため，13 週間反復投与毒性試験にはラットのみを用いた（ICH S6，S9，S9 Q&A）。これらの試験で得られたエンホルツマブ　ベドチンの全身曝露量と臨床推奨用量（1.25 mg/kg）で得られた曝露量の比較を表 2.4- 2 に示す。

2.4.4.1　単回投与毒性

独立した単回投与毒性試験は実施しなかった。なお，反復投与試験において 2 回目投与の前までに急性毒性（瀕死／死亡）は認められなかった。

2.4.4.2　反復投与毒性

4 週間サイクルの 3 週間にわたる週 1 回投与（28 日サイクルの 1，8，15 日）の臨床用法・用量を裏付けるために，重要な試験では，ラットにエンホルツマブ　ベドチンを 3 カ月間（週 1 回，計 13 回投与），カニクイザルに 1 カ月間（週 1 回，計 4 回投与）までの静脈内投与を行った。カニクイザル及びラットに AGS-22M6E 及び薬物非結合型抗体である AGS-22M6 を 1 カ月間（週 1 回，計 4 回投与）投与した。両種に跨る主な標的臓器は，皮膚及び骨髄であった。その他の毒性学的標的臓器として，雄性生殖器（精巣，精巣上体，前立腺，精嚢），肝臓，脾臓，リンパ組織，乳腺，眼（角膜），ハーダー腺，副腎，腸管などが挙げられる。

AGS-22M6 は毒性を引き起こさなかったため，観察された毒性はすべて MMAE に関連するものと考えられた。これらの毒性は，MMAE に感受性があると推定される分裂の速い細胞に対して，標的依存的又は標的非依存的ないずれかの機序を介して引き起こされた。

重要な反復投与試験における主要な毒性所見の概要を 2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験に示す。これらの試験でのエンホルツマブ　ベドチンの全身曝露量と臨床推奨用量（1.25 mg/kg）での曝露量の比較を表 2.4- 2 及び（2.6.6.1 まとめ）に示した。

2.4.4.2.1　死亡

AGS-22M6E の高曝露とラット及びカニクイザルの死亡については関連性があった。死亡は，臨床推奨用量（1.25 mg/kg）でのヒト全身曝露量の少なくとも 6 倍の曝露で認められた。いずれの動物種においても，全身状態悪化の主要な原因として顕著な皮膚毒性がみられ，骨髄毒性も認められた。加えてラットでは肝毒性もみられた。ラット及びカニクイザルでの死亡は突然のものではなく，明確かつモニタリング可能な毒性徴候が先行していた。

2.4.4.2.2　皮膚所見

ラット及びカニクイザルにおいて，皮膚毒性は用量制限毒性であり，抗原の発現と一致していた。いずれの動物種においても，ヒト全身曝露量の約 1 倍で皮膚剥離及び／又は皮膚の乾燥及び発赤が認められた。これらの所見に関連する典型的な病理組織学的変化としては，痂皮，表皮肥

厚，真皮及び皮下組織に多巣性の血管周囲の単核細胞浸潤，有糸分裂像の増加及びびらん／潰瘍形成であった。静脈内投与部位の病理組織学的所見は皮膚の所見と概ね類似しており，2.4.4.7 局所刺激性で更に考察する。これらの皮膚に関連した所見は可逆的であった。

組織交差反応性試験では，Nectin-4 を発現している正常角化細胞［Fortugno et al, 2014; Mollo et al, 2015］に AGS-22M6E が結合することが示された（2.4.4.8.4 ヒト及びカニクイザル組織における Nectin-4 発現）。皮膚の所見は，標的依存性の送達及び分裂の速い細胞に対する MMAE の薬理作用によるものである。ラットとカニクイザルの両方で認められた生前及び病理組織学的所見は，概して軽度から中等度であり，致死量でのみより重度のレベルに達していた。

臨床的に，発疹はエンホルツマブ　ベドチンの特定されたリスクと考えられ，このリスクに関する臨床データは 2.7.4.2.1.6 注目すべき有害事象の解析に詳細に記載されている。

2.4.4.2.3　血液及び骨髄所見

ラット及びカニクイザルでは同様に，骨髄毒性と一致する血液学的所見が認められた。これらには，造血抑制を示す赤血球パラメータの変化が含まれていた。カニクイザルでのみ，好中球数及び好酸球数の減少も認められた。これらの血液学的変化は骨髄の病理組織学的変化と関連しており，MMAE の単独投与によっても認められた。これらの変化は 6 週間の休薬期間後に完全に回復した。

種を越えて観察されたこれらの血液学的な影響は MMAE に起因していることを示している。ビンクリスチン等の微小管阻害薬や他の vc-MMAE ADC でも血液学的影響が報告されている［Donaghy, 2016; Lin et al, 2015］。血液学的所見は，臨床推奨用量（1.25 mg/kg）投与時のヒト全身曝露量に対してラットでは約 2 倍，カニクイザルでは約 3 倍で発現した。

貧血及び好中球減少症はエンホルツマブ　ベドチンの潜在的リスクと考えられ，これらのリスクに関する臨床データは 2.7.4.2.1.6 注目すべき有害事象の解析に詳細に記載されている。

2.4.4.2.4　雄性生殖器所見

ラットのみで，精巣，精巣上体，前立腺，精嚢において，関連する病理組織学的所見を伴った臓器重量の減少がみられた。精巣及び精巣上体での精細管変性，精子減少及び異常精子細胞は，24 週間の休薬期間終了時に部分的な回復性を示した。

これらの所見は，精巣及び前立腺の上皮組織に存在する Nectin-4 発現に関連している可能性が考えられる。しかしながら，精巣毒性は vc-MMAE ADC で共通しており，分裂の速い細胞に対する MMAE の薬理作用と一致している［Saber and Leighton, 2015; Lin et al, 2015］。ビンクリスチン等の他の微小管阻害薬で雄の生殖器所見が認められており，臨床的に精子数を減少させることが報告されている［VINCASAR prescribing information, September 2018］。

2.4.4.2.5　眼（角膜）所見

ヒト組織交差反応性試験において，角膜上皮における Necin-4 の発現が確認された。しかし，ラット（4 週間及び 13 週間反復投与試験）及びカニクイザル（4 週間反復投与試験）のいずれにおいても，被験物質投与に関連した眼科学的所見は認められなかった。病理組織学的所見はラットでの 13 週間反復投与試験でのみ認められたが，これらの所見は角膜上皮における軽微な異常有糸分裂像に限られていた。

眼の所見は，vc-MMAE ADC では一般的に観察されないことから［Eaton et al, 2015］，この異常有糸分裂像は，MMAE の角膜への標的依存性送達に関連していると考えられる。角膜への影響はエンホルツマブ　ベドチンの潜在的リスクと考えられ，このリスクに関する臨床データは 2.7.4.2.1.6 注目すべき有害事象の解析に詳細に記載されている。

2.4.4.2.6　その他の標的臓器

ラットでは，臨床推奨用量（1.25 mg/kg）投与時のヒト全身曝露量の約 6 倍の曝露で，胸腺重量の減少とリンパ組織の組織学的所見が認められた。これらの所見は生存動物において可逆的であった。カニクイザルでは，臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 6 倍である致死用量で胸腺の萎縮が認められた。臨床試験データの安全性評価では，エンホルツマブ　ベドチン治療のリスクとしてリンパ系への影響は確認されていない（2.7.4 臨床的安全性）。

ラットでは脾臓重量の増加が認められたが，これは血液の細胞数減少に反応した髄外造血に関連した二次的な変化と考えられた。臨床的には，エンホルツマブ　ベドチン投与に起因すると考えられる脾臓の変化に関連する事象は認められていない（2.7.4 臨床的安全性）。

軽微から軽度の肝臓の酵素の上昇は，MMAE の薬理作用及びクリアランスの副次的な影響と考えられた。肝臓では限定的に Nectin-4 発現がみられるが，MMAE に共通した標的非依存的な影響に加えて，標的に依存した MMAE の送達がこれらの毒性に寄与している可能性は低いと考えられた［Saber and Leighton, 2015; Lin et al, 2015］。これら肝臓の所見は回復性を示した。エンホルツマブ　ベドチンの肝機能検査に対する臨床での影響については，2.7.4.3.2.2 肝酵素及び総ビリルビンに詳述する。臨床試験において，エンホルツマブ　ベドチンは肝機能に関して臨床的意義のある副作用や薬物性肝障害を誘発する可能性は低いと考えられる。

臨床推奨用量（1.25 mg/kg）投与時のヒト全身曝露量の約 6 倍の曝露で雄ラットの乳腺の雌性化が認められた。4 週間の非 GLP 予備試験で認められたこの所見は，ラットでの重要な 4 週間反復投与試験では同等の曝露量によっても確認されなかった。さらに，カニクイザルでの重要な 4 週間反復投与試験でも，乳腺への影響は認められなかった。一方，ラットでの重要な 13 週間反復投与試験では，最高用量で乳腺の萎縮が認められた。これらの一貫性のない矛盾した反応は，いずれも高濃度の全身曝露で生じたものであり，エンホルツマブ　ベドチンは乳腺組織に対するリスクが低いことを示唆している。臨床試験データの安全性評価では，エンホルツマブ　ベドチン治療のリスクとして乳腺への影響は確認されていない（2.7.4 臨床的安全性）。

ラットの他の組織で観察された有糸分裂像の増加及び／又は単細胞壊死は，程度が軽微であり，MMAE の薬理作用に関連すると考えられた。これらの組織には，腸管，副腎及びハーダー腺が含まれていた。腸管の変化は標的発現に関連している可能性があると考えられたが，上皮における分裂の速い細胞に対する MMAE の標的非依存的な寄与は否定できない。MMAE を単独で投与したカニクイザルでは，水様便が認められ，休薬することにより回復した。下痢，悪心及び嘔吐はエンホルツマブ　ベドチンの特定されたリスクと考えられ，これらのリスクに関する臨床データは 2.7.4.2.1.6 注目すべき有害事象の解析に詳細に記載されている。

2.4.4.2.7　末梢神経障害所見

ラット及びカニクイザルのいずれの反復投与毒性試験においても，末梢神経障害を示唆する症状や病理組織学的所見は認められなかった。末梢神経障害は，臨床的には他の vc-MMAE ADC で認められており［Ramchandren et al, 2019］，MMAE の副次的な，標的非依存性の機序を介したものと考えられている［de Bono et al, 2019］。末梢神経障害はエンホルツマブ　ベドチンの特定されたリスクと考えられ，このリスクに関する臨床データは 2.7.4.2.1.6 注目すべき有害事象の解析に詳細に記載されている。

2.4.4.3　遺伝毒性

細胞傷害性薬物である MMAE について遺伝毒性試験を実施した。MMAE は in vivo ラット骨髄小核試験において異数性誘発能を示し，有糸分裂装置に対する MMAE の薬理作用（微小管ネットワーク阻害）と一致していた（2.6.6.4.2 哺乳類動物を用いた in vivo 試験）。MMAE は，細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）や，L5178Y 細胞を用いるマウスリンフォーマ *Tk* 試験において，in vitro 遺伝毒性作用を示さなかった（2.6.6.4.1 細菌もしくは細胞を用いた In vitro 試験）。

2.4.4.4　がん原性

エンホルツマブ　ベドチンは進行がんの治療を目的としているため，ICH S9 に従い，がん原性試験は実施しなかった。

2.4.4.5　生殖発生毒性

2.4.4.5.1　受胎能及び着床までの初期胚発生

エンホルツマブ　ベドチンは進行がんの治療を目的としているため，ICH S9 に従い，受胎能及び初期胚発生に関する試験は実施しなかった。

精巣毒性はラットでのみ認められ，上述のように部分的に回復性が示された（2.4.4.2.4 雄性生殖器所見）。

2.4.4.5.2　胚胎児発生

エンホルツマブ　ベドチンは胚・胎児毒性を示した。妊娠ラットにエンホルツマブ　ベドチンを臨床推奨用量（1.25 mg/kg）投与時の血中薬物濃度（C_{max}）の約 1 倍の C_{max} をもたらす用量で妊娠 6 及び 13 日に静脈内投与したところ，吸収胚数，着床後死亡率が増加し，生存胎児数も減少した。骨格変異を有する胎児の発現率が高かった（2.6.7.13.2 エンホルツマブ　ベドチンの胚・胎児発生に関する試験）。

エンホルツマブ　ベドチン投与により認められた胚・胎児毒性における MMAE の役割を評価した。妊娠ラットに 0.2 mg/kg の用量で妊娠 6 及び 13 日に MMAE を静脈内投与したところ，吸収胚数及び着床後死亡率の増加，生存胎児数の減少がみられ，外表異常児も認められた（2.6.7.13.1 MMAE の胚・胎児発生に関する試験）。

エンホルツマブ　ベドチン及び MMAE を用いた両試験で認められた吸収胚数及び着床後死亡率の増加は，胚発生初期に分裂の速い細胞に影響を及ぼす MMAE の薬理学的な微小管阻害作用と一致している。

2.4.4.5.3　出生前及び出生後の発生

エンホルツマブ　ベドチンは進行がんの治療を目的としているため，ICH S9 に従い，出生前及び出生後の発生に関する試験は実施しなかった。

2.4.4.6　幼若動物

幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.7　局所刺激性

投与部位の病理組織学的検査は，ラット及びカニクイザルを用いた GLP を遵守した反復投与毒性試験の一部として実施した。

投与部位の病理組織学的所見は皮膚と概ね類似しており，有糸分裂像の増加と，表皮及び／又は付属器（毛包及び皮脂腺を含む）における単細胞壊死，表皮肥厚，血管周囲の単核細胞浸潤及び線維化であった。これらの軽微から軽度の所見は，皮膚における抗原発現及び MMAE の薬理作用に関連すると考えられ，概ね回復性が認められた。

投与部位の血管外漏出はエンホルツマブ　ベドチンの特定されたリスクと考えられ，このリスクに関する臨床データは 2.7.4.2.1.6 注目すべき有害事象の解析に詳細に記載されている。

2.4.4.8　その他の毒性試験

2.4.4.8.1　精巣毒性回復性試験

ラットにエンホルツマブ　ベドチンの 2 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量に相当する曝露）を週 1 回，計 4 回投与したところ，精巣及び精巣上体の重量変化及び病理組織学的所見が認められた。29 日における精巣及び精巣上体の臓器重量の変化は，190 日の回復期間終了までに回復した。4 週間の投与期間終了時に認められた精巣及び精巣上体の病理組織学的所見は，24 週間の回復期間終了時までに部分的に回復した。

これらのデータ及び 4 週間及び 13 週間反復投与毒性試験における前述の精巣毒性所見は，微小管阻害薬が雄の生殖器に影響を及ぼすことが報告されていることから，MMAE によって引き起こされたものと考えられる（2.4.4.2.4　雄性生殖器所見）。

2.4.4.8.2　光毒性試験

プロテアーゼで切断可能な vc-MMAE は，290～700 nm の波長範囲で，光毒性試験実施に必要な閾値を超える光吸収を示さなかった（ICH S10）。MMAE については，290～700 nm の波長範囲で吸収がないことが示された。そのため，MMAE 及びリンカー-MMAE は光毒性を発現しないものと考えられる。

2.4.4.8.3　生存率，グルコース取り込み，インスリン分泌に関する in vitro 試験

非臨床毒性試験において，グルコース恒常性の変化を示す徴候は認められなかった。高血糖は，エンホルツマブ　ベドチンの特定されたリスクとして評価されており（2.7.4.2.1.6　注目すべき有害事象の解析），vc-MMAE ADC との関連性が考えられるが［Gopal et al, 2012; Rosenberg et al, 2018a; Rosenberg et al, 2018b］，因果関係は確立されていない。

ラット及びカニクイザルの反復投与毒性試験において血糖値への影響は認められず，ラット 4 週間投与試験（8226169 試験）では，臨床推奨用量（1.25 mg/kg）投与時のヒト全身曝露量の約 9 倍までの曝露においても，膵臓及び骨格筋組織のいずれにも病理組織学的所見は認められなかった。一連の研究では，vc-MMAE ADC 又は MMAE がインスリン分泌又は骨格筋のグルコース取り込みに及ぼす影響は示されなかった。高濃度グルコース条件下（11 mmol/L）で培養したヒト膵島細胞の生存率は，推奨臨床用量（1.25 mg/kg）投与時のヒト C_{max} と同程度の MMAE 濃度で約 20%低下した。したがって，これらの試験からは MMAE を介した高血糖の発現機序を明らかにすることができなかった。

2.4.4.8.4　ヒト及びカニクイザル組織における Nectin-4 発現

正常ヒト組織における Nectin-4 発現の免疫組織化学的解析（ES[redacted]-001 試験）では，膀胱，乳腺（腺房及び導管），食道，喉頭，下垂体，胎盤，唾液腺，皮膚，胃，精巣，尿管及び子宮において特異的な陽性染色が認められた。

正常カニクイザル組織において，ビオチン化 AGS-22M6E は皮膚，食道，扁桃の扁平上皮と交差反応した。この組織交差反応性は，カニクイザルの Nectin-4 への ADC の結合親和性と併せて，この種で ADC の毒性試験を実施することの妥当性を示している。また，組織交差反応性データは，カニクイザルで認められた皮膚毒性の機序を説明し，臨床的に認められた皮膚所見の機序の可能性を提供している（2.7.4.2.1.6 注目すべき有害事象の解析）。

副腎，空腸，喉頭，肝臓，肺，膵臓，下垂体，脾臓，胸腺に非特異的な染色が認められた。MMAE は肝臓で処理，排泄され，他の MMAE ADC や MMAE 単独でも同様の影響が認められるため，肝臓に対する Nectin-4 のターゲティングの寄与は不明である［Donaghy, 2016］。臨床的には，これらの組織の大部分に関連する有害事象は認められていないが，エンホルツマブ　ベドチン投与患者では肝酵素の上昇が認められている。

エンホルツマブ　ベドチン又は MMAE で観察された毒性については，（2.4.4.2 反復投与毒性及び 2,6,6 毒性試験の概要文）に詳述する。

2.4.5　総括及び結論

エンホルツマブ　ベドチンは，プロテアーゼ切断可能な vc マレイミドカプロイルリンカーを介して MMAE と結合させた Nectin-4 を標的とした抗体である。

Nectin-4 は，尿路上皮癌を含む固形癌で過剰発現する細胞間接着タンパク質である。エンホルツマブ　ベドチンの主要な薬理学的作用機序は，MMAE を標的である Nectin-4 発現癌細胞へと送達させることである。In vitro 及び in vivo の試験において，エンホルツマブ　ベドチンは Nectin-4 陽性の細胞に対し傷害作用を示した。In vitro では，Nectin-4 を発現していない細胞に対しては傷害作用を示さなかったことから，抗原特異的な細胞傷害作用であることが確認された。Nectin-4 陰性膀胱癌細胞に対するエンホルツマブ　ベドチンのバイスタンダー効果は，Nectin-4 陽性膀胱癌細胞と共培養したときに観察された。さらに，エンホルツマブ　ベドチンは，他の vc-MMAE ADC について報告されているのと同様の標的非依存性メカニズムによって，非標的発現腫瘍細胞を傷害する可能性が想定されている。

エンホルツマブ　ベドチンは，ヒト Nectin-4 変異体を発現する腫瘍細胞に対して有効性を示し，またエンホルツマブ　ベドチンの活性は，組換え Nectin-4 結合パートナー（Nectin-1）の存在によって影響を受けなかった。

Nectin-4 への結合に起因する副次的作用仮説を詳細に検討したが，文献的考察及び非臨床及び臨床における安全性の所見から，これらは臨床用量においては生じないと考えられた。

Nectin-4 オルソログに対してヒト Nectin-4 に対するのと同等の結合親和性を有するという事実に基づいて，非臨床試験に用いる動物種としてラット及びカニクイザルが適切であると判断した。動物種別のエンホルツマブ　ベドチンの曝露量の概略を表 2.4- 2 に示す。ヒトの曝露量は，推奨用量である 1.25 mg/kg 投与で得られたデータを示す。ラットの最大耐用量（5 mg/kg）でのエンホルツマブ　ベドチンの C_{max} 及び AUC は，臨床推奨用量（1.25 mg/kg）投与時のヒト C_{max} 及び AUC の約 3～5 倍であった。カニクイザルの無毒性量（3 mg/kg）でのエンホルツマブ　ベドチンの C_{max} 及び AUC は，ヒト C_{max} 及び AUC の約 3～4 倍であった。動物試験で達成した ADC の曝露量は臨床での曝露量を上回っており，臨床での安全性を評価するための実験結果の妥当性を支持した。また用量制限毒性は薬理学的機序に基づいていた。AGS-22M6E をラット及びカニクイザルに静脈内投与したときの MMAE のモル濃度換算した C_{max} は，ADC の C_{max} のそれぞれ 0.2%及び 0.04%であった。AGS-22M6E を静脈内投与したときの MMAE の薬物動態は，AGS-22M6E からの MMAE の生成速度に依存し，ADC と比較して t_{max} は遅かった。ADC と MMAE のラット及びカニクイザルにおける薬物動態は，ヒトと類似していた。MMAE は主に未変化体として糞中に排泄された。

表 2.4- 2　動物とヒトの定常状態における最高血清中薬物濃度（C_{max}）と全身曝露量（AUC）の比較

Species	Dose Association	Dose Level (mg/kg)	Enfortumab Vedotin Systemic Exposure†	
			C_{max} (µg/mL)	AUC_{168h} (µg·hr/mL)
Rat (13-week)	MTD	5	125‡	2300‡
Cynomolgus Monkey (4-week)	NOAEL§	3	98‡	3000‡
Human	Clinical dose	1.25	27.4¶	914.4¶

MTD: maximum tolerated dose; NOAEL: no observed adverse effect level

† Representative exposure data (C_{max} and AUC) are presented (AUC_{96h} for rats and AUC_{168h} for cynomolgus monkeys and humans).

‡ Mean C_{max} and AUC for enfortumab vedotin serum concentrations are presented following the first dose from repeat-dose toxicity studies in rats (3 months, [Study 20117437]) and cynomolgus monkeys (1 month, [Study 20021751]).

§ 3 mg/kg per dose was the NOAEL but also the maximum tolerated dose.

¶ Mean C_{max} and AUC for enfortumab vedotin serum concentrations are presented from [Study EV-201] (data cutoff date: 01 Mar 2019).

MMAE をヒト肝細胞とインキュベートしたとき，ラット及びカニクイザルの肝細胞と同じ代謝物が認められた。CYP 発現系を用いた in vitro 試験から，MMAE は CYP3A4 により代謝されると考えられた。臨床試験において，ブレンツキシマブ　ベドチンを CYP3A4/5 の強力な阻害剤であるケトコナゾールあるいは CYP3A4/5 の誘導剤であるリファンピシンと併用したとき，MMAE の曝露量はそれぞれ 34%増加あるいは 46%低下することが報告されている[Hanet al, 2013]。

MMAE は強力な CYP3A4/5 の可逆的阻害剤及び誘導剤ではないが，CYP3A4/5 の準不可逆的で代謝依存的な阻害剤であった。ヒトにおける MMAE の血漿中濃度の C_{max}（平均値：3.7 ng/mL；5.2 nmol/L）（EV-201 試験）と比べて，最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害薬の濃度

（K_I）値（1.12 μmol/L）が極めて高いことから，MMAE は他の CYP3A4/5 の基質薬の薬物動態に大きな影響は与えないと考えられた。臨床試験において，ブレンツキシマブ　ベドチンを CYP3A4/5 の基質であるミダゾラムと併用したとき，ミダゾラムの曝露量は影響を受けないことが報告されている[Han et al, 2013]。In vitro 試験の結果から，MMAE は P-gp の基質であるが，BCRP，MRP2，OCT2，OAT1，OAT3，OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではないと考えられた。また，MMAE は臨床的に意義のある濃度で P-gp，BCRP，BSEP，MRP2，OCT1，OCT2，OAT1，OAT3，OATP1B1 及び OATP1B3 の阻害剤ではなかった。

中枢神経系，呼吸系及び心循環器系において in vivo 及び in vitro の安全性薬理パラメータへの影響はみられず，これらの器官系に対して許容可能な安全性プロファイルを示した。

動物で認められた毒性は，エンホルツマブ　ベドチンの標的を介した取り込み並びに MMAE の標的非依存的な作用に一致していた。皮膚毒性は Nectin-4 発現と相関しており，標的介在性であった。骨髄細胞数低下は主な標的非依存性の毒性であり，ADC と MMAE の両投与群で認められた。皮膚，骨髄，眼（角膜上皮）及び腸管の標的器官は，臨床で認められた毒性と関連し，投与中止後に回復性が認められた。薬物非結合型抗体投与による毒性は認められず，抗原の結合のみに起因する影響はないことが示唆された。

非臨床毒性試験では，グルコース恒常性の変化を示す徴候は認められなかった。探索的検討では，臨床で認められる高血糖の発症機序は解明できなかった。

エンホルツマブ　ベドチン及び MMAE は，臨床推奨用量の曝露量に近いところで，妊娠ラットにおける胚・胎児毒性を示した。これらの毒性は胎児の MMAE 曝露に関連し，抗 Nectin-4 抗体の影響ではない可能性が高い。精巣毒性はラットでのみ認められ，24 週間の休薬期間終了時までに部分的な回復性を示した。

MMAE は，その薬理作用により遺伝毒性を示した。

以上のように，本申請をサポートするためにエンホルツマブ　ベドチンの薬理学的，薬物動態学的及び毒性学的特性を検討した。非臨床において示された薬効とエンホルツマブ　ベドチン投与により得られると考えられる有益な抗腫瘍効果を考慮すると，エンホルツマブ　ベドチンを局所進行性又は転移性尿路上皮癌の対象患者集団に用いることを妨げるような非臨床所見は認められなかった。

2.4.6　参考文献一覧

Boudghene-Stambouli O, Merad-Boudia A. Association of ectodermal dysplasia and syndactylia. Ann Dermatol Venereol. 1991;118:107-10.

Boylan KL, Buchanan PC, Manion RD, Shukla DM, Braumberger K, Bruggemeyer C, et al. The expression of Nectin-4 on the surface of ovarian cancer cells alters their ability to adhere, migrate, aggregate, and proliferate. Oncotarget. 2017;8:9717-38.

Brancati F, Fortugno P, Bottillo I, Lopez M, Josselin E, Boudghene-Stambouli O, et al. Mutations in PVRL4, encoding cell adhesion molecule nectin-4, cause ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome. Am J Hum Genet. 2010;87:265-73.

Brown CW, Amante JJ, Mercurio AM. Cell clustering mediated by the adhesion protein PVRL4 is necessary for α6β4 integrin-promoted ferroptosis resistance in matrix-detached cells. J Biol Chem. 2018;293:12741-8.

Cao AT, Law CL, Gardai SJ, Heiser RA. Abstract 5588: Brentuximab vedotin-driven immunogenic cell death enhances antitumor immune responses, and is potentiated by PD1 inhibition in vivo. Proceedings of the AACR Annual Meeting; 2017 Apr 1-5; Washington, DC.

Challita-Eid PM, Satpayev D, Yang P, An Z, Morrison K, Shostak Y, et al. Enfortumab vedotin antibody-drug conjugate targeting Nectin-4 is a highly potent therapeutic agent in multiple preclinical cancer models. Cancer Res. 2016;76:3003-13.

Cho EH, Wendel M, Luttgen M, Yoshioka C, Marrinucci D, Lazar D, et al. Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. Phys Biol. 2012;9:016001.

de Bono JS, Concin N, Hong DS, Thistlethwaite FC, Machiels JP, Arkenau HT, et al. Tisotumab vedotin in patients with advanced or metastatic solid tumours (InnovaTV 201): a first-in-human, multicenter, phase 1-2 trial. Lancet Oncol. 2019;20:383-93.

Delpeut S, Noyce RS, Richardson CD. The tumor-associated marker, PVRL4 (nectin-4), is the epithelial receptor for morbilliviruses. Viruses. 2014;6:2268-86.

Delpeut S, Sisson G, Black KM, Richardson CD. Measles virus enters breast and colon cancer cell lines through a PVRL4-mediated macropinocytosis pathway. J Virol. 2017;91:e02191-16.

Donaghy H. Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates. MAbs. 2016;8:659-71.

Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, Mendelsohn BA, Cerveny CG, Chace DF, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nat Biotechnol. 2003;21:778-84.

Eaton JS, Miller PE, Mannis MJ, Murphy CJ. Ocular adverse events associated with antibody-drug conjugates in human clinical trials. J Ocul Pharmacol Ther. 2015;31:589-604.

Fabre-Lafay S, Garrido-Urbani S, Reymond N, Gonçalves A, Dubreuil P, Lopez M. Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis fator-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. J Biol Chem. 2005;280:19543-50.

Fabre-Lafay S, Monville F, Garrido-Urbani S, Berruyer-Pouyet C, Ginestier C, Reymond N, et al. Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. BMC Cancer. 2007;7:73.

Fortugno P, Josselin E, Tsiakas K, Agolini E, Cestra G, Teson M, et al. Nectin-4 mutations causing ectodermal dysplasia with syndactyly perturb the rac1 pathway and the kinetics of adherens junction formation. J Invest Dermatol. 2014;134:2146-53.

Francisco JA, Cerveny CG, Meyer DL, Mixan BJ, Klussman K, Chace DF, et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood. 2003;102:1458-65.

Gardai SJ, Epp A, Law CL. Abstract 2469: Brentuximab vedotin-mediated immunogenic cell death. Proceedings of the AACR 106th Annual Meeting; 2015 Apr 18-22; Philadelphia, PA.

Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. Cancer Res. 2005;65:671-80.

Giancotti FG. Targeting integrin beta4 for cancer and anti-angiogenic therapy. Trends Pharmacol Sci. 2007;28:506-11.

Gopal AK, Ramchandren R, O'Connor OA, Berryman RB, Advani RH, Chen R, et al. Safety and efficacy of brentuximab vedotin for Hodgkin lymphoma recurring after allogenic stem cell transplantation. Blood. 2012;120:560-8.

Hall AP, Mitchard T, Rolf MG, Stewart J, Duffy P. Femoral head growth plate dysplasia and fracture in juvenile rabbits induced by off-target antiangiogenic treatment. Toxicol Pathol. 2016;44:866-73.

Han TH, Gopal AK, Ramchandren R, Goy A, Chen R, Matous JV, et al. CYP3A-mediated drug-drug interaction potential and excretion of brentuximab vedotin, an antibody-drug conjugate, in patients with CD30-positive hematologic malignancies. J Clin Pharmacol. 2013;53:866-77.

International Mouse Phenotyping Consortium. Gene: Nectin4. c2016 [cited 30 Apr 2019]. Available from: http://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1918990

Ito M, Nishizawa H, Tsutsumi M, Kato A, Sakabe Y, Noda Y, et al. Potential role for nectin-4 in the pathogenesis of pre-eclampsia: A molecular genetic study. BMC Med Genet. 2018;19:166.

Jelani M, Chishti MS, Ahmad W. Mutation in PVRL4 gene encoding nectin-4 underlies ectodermal-dysplasia-syndactyly syndrome (EDSS1). J Hum Genet. 2011;56:352-7.

Lattanzio R, Ghasemi R, Brancati F, Sorda RL, Tinari N, Perracchio L, et al. Membranous Nectin-4 expression is a risk factor for distant relapse of T1-T2, N0 luminal-A early breast cancer. Oncogenesis. 2014;3:e118.

Li F, Ulrich M, Jonas M, Stone IJ, Linares G, Zhang X, et al. Tumor-associated macrophages can contribute to antitumor activity through FcγR-mediated processing of antibody-drug conjugates. Mol Cancer Ther. 2017;16:1347-54.

Lin K, Rubinfeld B, Zhang C, Firestein R, Harstad E, Roth L, et al. Preclinical development of an anti-NaPi2b (*SLC34A2*) antibody-drug conjugate as a therapeutic for non-small cell lung and ovarian cancers. Clin Cancer Res. 2015;21:5139-50.

Ludlow M, Rennick LJ, Sarlang S, Skibinski G, McQuaid S, Moore T, et al. Wild-type measles virus infection of primary epithelial cells occurs via the basolateral surface without syncytium formation or release of infectious virus. J Gen Virol. 2010;91(Pt4):971-9.

Maruoka M, Kedashiro S, Ueda Y, Mizutani K, Takai Y. Nectin-4 co-stimulates the prolactin receptor by interacting with SOCS1 and inhibiting its activity on the JAK2-STAT5a signaling pathway. J Biol Chem. 2017;292:6895-909.

Moffat GJ, Retter MW, Kwon G, Loomis M, Hock MB, Hall C, et al. Placental transfer of a fully human IgG2 monoclonal antibody in the cynomolgus monkey, rat, and rabbit: a comparative assessment from during organogenesis to late gestation. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2014;101:178-88.

Mollo MR, Antonini D, Mitchell K, Fortugno P, Costanzo A, Dixon J, et al. p63-dependent and independent mechanisms of nectin-1 and nectin-4 regulation in the epidermis. Exp Dermatol. 2015;24:114-9.

Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, et al. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. J Virol. 1993;67:6025-32.

Nishiwada S, Sho M, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, et al. Nectin-4 expression contributes to tumor proliferation, angiogenesis and patient prognosis in human pancreatic cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2015;34:30.

Pavlova NN, Pallasch C, Elia AE, Braun CJ, Westbrook TF, Hemann M, et al. A role for PVRL4-driven cell-cell interactions in tumorigenesis. Elife. 2013;2:e00358.

Pils D, Aust S, Bekos C, Kölbl H. Gene co-expression network analysis reveals nectin 4 as new therapeutic target for a poor prognosis subtype of ovarian cancer. Presented at the 20th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology; 2017; Vienna, Austria.

Rajc J, Gugic D, Frohlich I, Marjanovic K, Dumencic B. Prognostic role of Nectin-4 expression in luminal B (HER2 negative) breast cancer. Pathol Res Pract. 2017;213:1102-8.

Ramchandren R, Advani RH, Ansell SM, Bartlett NL, Chen R, Connors JM, et al. Brentuximab vedotin plus chemotherapy in North American subjects with newly diagnosed stage III or IV Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res. 2019;25:1718-26.

Raza SI, Nasser Dar R, Shah AA, Ahmad W. A novel homozygous nonsense mutation in the PVRL4 gene and expansion of clinical spectrum of EDSS1. Ann Hum Genet. 2015;79:92-8.

Rikitake Y, Mandai K, Takai Y. The role of nectins in different types of cell-cell adhesion. J Cell Sci. 2012;125(Pt16):3713-22.

Rosenberg JE, Heath EI, O'Donnell PH, Hahn NM, Balar AV, Gartner EM, et al. EV-201 Study: a single-arm, open-label, multicenter study of enfortumab vedotin for treatment of patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer who previously received immune checkpoint inhibitor therapy. J Clin Oncol. 2018a; 36(15 Suppl):4590

Rosenberg JE, Sridhar SS, Zhang J, Smith DC, Ruether JD, Flaig TW, et al. Updated results from the enfortumab vedotin phase 1 (EV-101) study in patients with metastatic urothelial cancer (mUC). J Clin Oncol. 2018b;36(15 Suppl):4504.

Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL, et al. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. Toxicol Pathol. 1999;27:78-86.

Saber H, Leighton JK. An FDA oncology analysis of antibody-drug conjugates. Regul Toxicol Pharmacol. 2015;71:444-52.

Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C. Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection. Front Microbiol. 2012;3:75.

Sethy C, Goutam K, Nayak D, Pradhan R, Molla S, Chatterjee S, et al. Clinical significance of a pvrl 4 encoded gene Nectin-4 in metastasis and angiogenesis for tumor relapse. J Cancer Res Clin Oncol. 2020;146:245-59.

Siddharth S, Goutam K, Das S, Nayak A, Nayak D, Sethy C, et al. Nectin-4 is a breast cancer stem cell marker that induces WNT/β-catenin signaling via Pi3k/Akt axis. Int J Biochem Cell Biol. 2017;89:85-94.

Siddharth S, Nayak A, Das S, Nayak D, Panda J, Wyatt MD, et al. The soluble nectin-4 ecto-domain promotes breast cancer induced angiogenesis via endothelial integrin-β4. Int J Biochem Cell Biol. 2018;102:151-60.

Takano A, Ishikawa N, Nishino R, Masuda K, Yasui W, Inai K, et al. Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. Cancer Res. 2009;69:6694-703.

Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, Feldman HS, Gintant GA, Harmer AR, et al. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. J Pharmacol Toxicol Methods. 2008;58:72-6.

VINCASAR (prescribing information). Irvine, CA. Teva Parenteral Medicines, Inc; September 2018.

Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Valentine PJ, Barry ST, Brave SR, et al. AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. Cancer Res. 2005;65:4389-400.

Zhang Y, Liu S, Wang L, Wu Y, Hao J, Wang Z, et al. A novel PI3K/AKT signaling axis mediates Nectin-4-induced gallbladder cancer cell proliferation, metastasis and tumor growth. Cancer Lett. 2016;375:179-89.

Zhang Y, Zhang J, Shen Q, Yin W, Huang H, Liu Y, et al. High expression of Nectin-4 is associated with unfavorable prognosis in gastric cancer. Oncol Lett. 2018;15:8789-95.