

2.6.1 緒言

2.6.1.1 被験物質

化合物番号：ASG-22CE

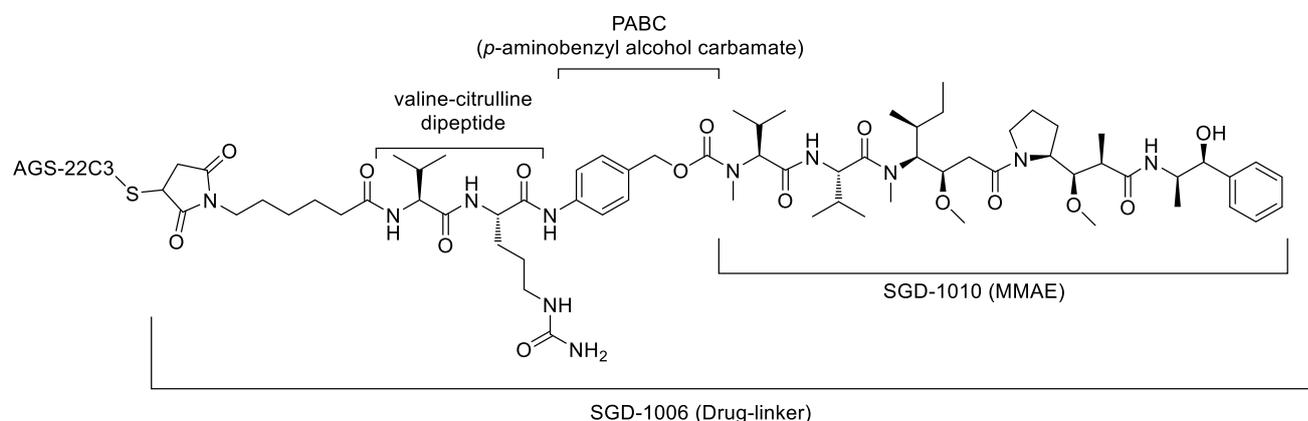
一般名：エンホルツマブ ベドチン

2.6.1.2 エンホルツマブ ベドチンの薬理作用

エンホルツマブ ベドチンは、タンパク質分解酵素で切断されるバリン-シトルリン (vc) マレイミドカプロイルリンカーを介して、完全ヒト型 IgG1κ モノクローナル抗体 (AGS-22C3) と微小管障害薬モノメチルアウリスタチン E (MMAE) を結合させた抗体薬物複合体 (ADC) である (図 2.6.1-1)。抗体の鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基で結合させるため、得られる複合体の薬物抗体比は約 3.8 である。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 Ca²⁺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 Nectin-4 タンパク質の V ドメインに結合する。推定される作用機序としては、エンホルツマブ ベドチンは細胞表面の Nectin-4 に結合後、細胞内に移行し、vc リンカーがタンパク質分解酵素により切断され MMAE が細胞内に放出される。細胞内に放出された MMAE はチューブリン重合を阻害し、有糸分裂停止を引き起こす。

図 2.6.1-1 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

2.6.1.3 効能・効果

癌薬物療法後に増悪した根治切除不能な尿路上皮癌

2.6.1.4 用法・用量

通常、成人にはエンホルツマブ ベドチン（遺伝子組換え）として1回 1.25 mg/kg（体重）を30分以上かけて点滴静注し、週1回投与を3週連続し、4週目は休薬する。この28日間を1サイクルとして投与を繰り返す。体重が100 kgを超える場合は100 kgとして計算し、1回当たりの総投与量は125 mgを超えないこと。

2.6.1.5 参考文献一覧

- 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.
- 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.
- 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.
- Sethy C, Goutam K, Nayak D, Pradhan R, Molla S, Chatterjee S, et al. Clinical significance of a pvr14 encoded gene Nectin-4 in metastasis and angiogenesis for tumor relapse. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020;146:245-59.
- 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.
- 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.

目次

2.6.2	薬理試験の概要文	5
2.6.2.1	まとめ	5
2.6.2.1.1	効力を裏付ける試験	5
2.6.2.1.2	安全性薬理試験	6
2.6.2.2	効力を裏付ける試験	7
2.6.2.2.1	ヒト癌組織における Nectin-4 発現	7
2.6.2.2.2	様々な種の Nectin-4 オルソログタンパク質への結合	7
2.6.2.2.3	エンホルツマブ ベドチンの作用機序	8
2.6.2.2.4	Nectin-4 発現細胞に対する細胞傷害活性	10
2.6.2.2.5	効力を裏付ける In Vivo 試験	12
2.6.2.3	副次的薬理試験	15
2.6.2.4	安全性薬理試験	15
2.6.2.4.1	In vitro 試験：hERG 電流への影響	15
2.6.2.4.2	In vivo 試験：中枢神経系、心血管系及び呼吸系への影響	15
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験	16
2.6.2.6	考察及び結論	17
2.6.2.6.1	薬理作用及び作用機序	17
2.6.2.6.2	安全性薬理	17
2.6.2.6.3	結論	18
2.6.2.7	図表	18
2.6.2.8	参考文献	18

表

表 2.6.2-1	PC3 細胞上に発現した様々な Nectin-4 オルソログタンパク質に対する AGS-22M6E の見かけの結合親和性 (K_D) と最大抗体結合蛍光量 (B_{max})	8
表 2.6.2-2	T47D 上に発現したヒト Nectin-4 に対する AGS-22M6E 及び AGS-22M6 の見かけの結合親和性 (K_D) と最大抗体結合蛍光量 (B_{max})	9
表 2.6.2-3	様々な細胞株における AGS-22M6E の細胞傷害活性	11
表 2.6.2-4	ヒト Nectin-4 発現 PC-3 細胞におけるエンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E の細胞傷害活性	11



図 2.6.2-1	ヒト膀胱癌異種移植マウスにおける腫瘍体積に対する AGS-22M6E の作用.....	13
図 2.6.2-2	ヒト膀胱癌異種移植マウスにおける腫瘍体積に対するエンホルツマブ ベドチンの作用	14

略語及び用語の一覧

略語及び用語	定義
ADC	antibody-drug conjugate：抗体薬物複合体
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis：抗体依存性貪食
AGS22	Nectin-4
AGS22d8	Nectin-4 variant lacking exon 8：エクソン 8 を欠失した Nectin-4 の変異体
AGS-22C3	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
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
AGS22-tag5	human Nectin-4 protein：ヒト Nectin-4
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）
CHO	Chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣（細胞）
C_{max}	maximum concentration：最高濃度
CPI	checkpoint inhibitor：チェックポイント阻害薬
EC ₅₀	half maximal effective concentration：50%有効濃度
ECG	electrocardiogram：心電図
GFP	green fluorescent protein：緑色蛍光タンパク質
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
H3-1.4.1.2-vcE	control antibody conjugated using the same linker and toxin as AGS-22M6E and enfortumab vedotin：AGS-22M6E やエンホルツマブ ベドチンと同一のリンカーと toxin を結合させた対照抗体
hERG	human ether-à-go-go-related gene：ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration：50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
K _D	dissociation constant (apparent binding affinity)：解離定数（見かけの結合親和性）
MMAE	monomethyl auristatin E：モノメチルアウリスタチン E
PC3 細胞	human prostate cancer cell line：ヒト前立腺癌細胞株
PC3-AGS22	PC3 cells engineered to express human Nectin-4：ヒト Nectin-4 発現 PC3 細胞
PI	particular intensity：特定の強度
QTcF	Fridericia corrected QT interval：Fridericia の式により補正した QT 間隔
SCID	immunodeficient mouse strain：重症複合免疫不全
T24-hNectin-4	human Nectin-4 expressing T24 cell line：Nectin-4 を高発現させた膀胱癌

略語及び用語	定義
	細胞株
TMA	tissue microarray : 腫瘍組織マイクロアレイ
UC	urothelial cancer : 尿路上皮癌
UM-UC-3-hNectin-4	human Nectin-4 expressing UM-UC-3 cell line : ヒト Nectin-4 を細胞表面に発現する UM-UC-3 細胞株
vc	valine-citrulline : バリン-シトルリン

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

エンホルツマブ ベドチン（ASG-22CE, AGS-22C3E）は、タンパク質分解酵素で切断されるバリリン-シトルリン（vc）マレイミドカプロイルリンカーを介して、完全ヒト型 IgG1 κ 抗体と微小管阻害薬モノメチルアウリスタチン E（MMAE）を結合させた抗体薬物複合体（ADC）である [Challita-Eid et al, 2016]。エンホルツマブ ベドチンは、以下のような多段階のプロセスを経て生物活性を発揮すると考えられている。すなわち、エンホルツマブ ベドチンは癌細胞表面の Nectin-4 タンパク質に結合して ADC-Nectin-4 複合体を形成する。形成された複合体は細胞内に移行し、リソソーム小胞へと輸送された後、タンパク質分解酵素による切断によって MMAE が細胞内に遊離される [Doronina et al, 2003]。この MMAE がチューブリン重合を阻害し、G2/M 期に細胞周期を停止させ、癌細胞のアポトーシスを引き起こす [Francisco et al, 2003]。医薬品規制調和国際会議（ICH）のガイドライン「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」（ICH S9 及び ICH S9 Q&A）に従い、チェックポイント阻害薬（CPI）療法中又は療法後に病勢が進行した局所進行性又は転移性尿路上皮癌（UC）患者の治療における使用をサポートするために、一連の非臨床薬理試験によりエンホルツマブ ベドチンの薬理的評価を実施した。

当初、ハイブリドーマ細胞由来 ADC である AGS-22M6E を用いて一連の非臨床試験を実施した。その後、製品の収率、品質及び製造工程の向上を目的として、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞由来の ADC であるエンホルツマブ ベドチンを開発した。エンホルツマブ ベドチンは、AGS-22M6E と同様の構造である（アミノ酸配列、リンカー及び細胞傷害性薬物が同一）。エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E の同等性は、幅広い分析及び生物学的な特性検討、非臨床ブリッジング試験、及び臨床ブリッジング試験により確認され、薬物動態学的及び毒性学的特性が同等であることが示された（20021751 試験及び AGS-22M6E-11-1 試験）。AGS-22M6E は現在では臨床開発を中止しているが、エンホルツマブ ベドチンと同等であると考えられることから、本申請を裏付ける多くの試験に使用されている。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

Nectin-4 は、多くの異なったタイプの腫瘍に過剰発現しており、検討したヒト癌種の 50%以上に発現していた。顕著な発現が認められたのは膀胱癌、乳癌及び膵癌であった。

AGS-22M6E は、ヒト前立腺癌細胞株（PC3 細胞）の表面に外因性に発現させたヒト、カニクイザル、ラット及びマウスの Nectin-4 オルソログタンパク質、並びに Nectin-4 を内因性に発現するヒト癌細胞株に特異的に結合した。AGS-22M6E のヒト、カニクイザル、ラット及びマウス Nectin-4 に対する見かけの結合親和性（解離定数、 K_D 値）は、それぞれ 0.387, 0.434, 0.463 及び 3.79 nmol/L であった。CHO 由来のエンホルツマブ ベドチン及びハイブリドーマ由来の AGS-22M6E はいずれも、ほぼ同一の見かけの K_D 値でヒト Nectin-4 発現 PC3 細胞に特異的に結合したことから、標的抗原に対する結合親和性は同等であることが示された。AGS-22M6E は、

Nectin-4 を発現する Rat1(E)細胞（ラット由来の線維芽細胞株）に結合したが、ホモログタンパク質である Nectin-1, Nectin-2 又は Nectin-3 を発現する Rat1(E)細胞には結合しなかった。

エンホルツマブ ベドチンは、細胞表面の Nectin-4 タンパク質と結合し、ADC-Nectin-4 複合体を形成することにより、癌細胞に対して細胞傷害性を示すと考えられている。AGS-22M6E は、内因性 Nectin-4 発現細胞株及び遺伝子組換えにより細胞表面に Nectin-4 を発現させた細胞株によって細胞内に取り込まれた。取り込みは 4 時間までに最大レベルに達し、その後減少した。放出された細胞傷害性物質である MMAE は、Nectin-4 に依存して送達されることが示された。1 $\mu\text{g/mL}$ のエンホルツマブ ベドチンにより、最大 249 nmol/L の MMAE が Nectin-4 発現細胞の細胞内に送達されたが、Nectin-4 を発現しない親細胞株では MMAE の細胞内濃度は検出限界未満レベルであった。

エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E はいずれも、Nectin-4 発現細胞に対してほぼ同程度の効力で細胞傷害活性を誘導したことから、Nectin-4 発現細胞に対するエンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E の細胞傷害活性は同程度であることが示された。さらに、エクソン 8 を欠失し細胞内ドメインにおいて 25 アミノ酸を欠失した Nectin-4 変異体（AGS22d8）を導入した PC3 細胞において、エンホルツマブ ベドチンによる細胞傷害反応は野生型 Nectin-4 と同程度であった。エンホルツマブ ベドチンの Nectin-4 への結合に対して競合する可能性のある Nectin-1-Fc タンパク質（1 $\mu\text{g/mL}$ ）を添加してもエンホルツマブ ベドチンによる細胞傷害活性には影響しなかった。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活性と、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活性を示した。

膀胱癌患者由来腫瘍 AG-B1 異種移植モデルにおいて、AGS-22M6E 0.8 mg/kg は 5%デキストロース（対照）と比較して統計学的に有意に腫瘍増殖を阻害し（ $P < 0.0001$ ）、75.7%の腫瘍増殖抑制を示した。また、エンホルツマブ ベドチンは 0.5 mg/kg で膀胱癌患者由来腫瘍 AG-B8 異種移植モデルにおける腫瘍増殖を阻害した。乳癌患者由来腫瘍 AG-Br7 異種移植モデルにおいて、1.0 又は 2.0 mg/kg を週 2 回投与した際のエンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E の抗腫瘍作用は同程度であった。開始時の腫瘍の体積に対する 21 日目における腫瘍の退縮率は、エンホルツマブ ベドチン及び AGS 22M6E 2.0 mg/kg でそれぞれ 68 及び 70%（ $P < 0.01$ ）であり、異種移植モデルにおける両者の同等性が示された。

2.6.2.1.2 安全性薬理試験

ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネルを介したカリウム電流に対する MMAE の影響を *in vitro* で評価した。ADC（エンホルツマブ ベドチン又は AGS-22M6E）の *in vivo* 安全性薬理評価は、一般毒性試験の一部として行った。

MMAE は濃度依存的にカリウム電流を阻害し（129-09-001 試験）、50%阻害濃度（ IC_{50} ）は 100 $\mu\text{mol/L}$ （臨床推奨用量でのエンホルツマブ ベドチン投与時に認められた MMAE のヒト C_{max} [EV-201 試験，データカットオフ日：2019年3月1日] の 19405 倍）を超え、エンホルツ

マブ ベドチンはQT 間隔に影響するリスクがほとんどないことが示された。AGS-22M6E は、カニクイザルに 6 mg/kg（ADC の C_{max} は臨床推奨用量でのヒト C_{max} の 5.5 倍）まで静脈内投与しても、QTc 間隔及びRR 間隔（心拍数）を含む心電図（ECG）パラメータに影響を及ぼさず、血行動態パラメータ（血圧）にも影響を及ぼさなかった（20005664 試験）。カニクイザルにエンホルツマブ ベドチンを 3 mg/kg まで（20021751 試験）及びAGS-22M6E を 6 mg/kg まで（20005664 試験）投与しても、行動や呼吸への影響を示唆する一般症状はみられなかった。更に、エンホルツマブ ベドチン又はAGS-22M6E のいずれを静脈内投与（3 mg/kg）しても、被験物質投与に起因した体温又は呼吸数の変化は認められなかった（20021751 試験）。

以上をまとめると、ADC（AGS-22M6E 又はエンホルツマブ ベドチン）の心血管系、中枢神経系及び呼吸系に対する影響は、少なくとも臨床推奨用量投与時のヒト C_{max} の 5.5 倍の曝露まで認められなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 ヒト癌組織における Nectin-4 発現

添付資料 4.2.1.1-1 (参)

Nectin-4 に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体を用いて、ヒト腫瘍組織における Nectin-4 発現を評価した [Challita-Eid et al, 2016] (ES-007 試験)。サンプルにおける Nectin-4 の発現は、細胞の染色強度 (I , 3=強, 2=中, 1=低, 0=陰性) 及び特定の強度 (PI) における陽性腫瘍細胞の百分率により評価し、スコア化した。0~300 の範囲の H-スコアを次式に従って個々のサンプルについて算出した：

$$H = \sum_{I=0}^3 I * PI$$

7種の癌から作製した 34 枚の腫瘍組織マイクロアレイ (TMA) 上で、ヒト癌計 2394 症例における Nectin-4 発現を免疫組織化学法 (IHC) により評価した。評価した癌種の全てにおいて、TMA 癌サンプルの過半数 (>50%) が Nectin-4 陽性であり、200~300 の範囲の H-スコアを示したサンプルの割合は膀胱癌で 31%、乳癌で 27%及び膵癌で 13%であった。

2.6.2.2.2 様々な種の Nectin-4 オルソログタンパク質への結合

添付資料 4.2.1.1-2

AGS-22M6E は、PC3 細胞の表面に外因性に発現させたヒト、カニクイザル、ラット及びマウスの Nectin-4 オルソログタンパク質に特異的に結合した (RD-018 試験)。

AGS-22M6E の K_D 値は、ヒト、カニクイザル、ラット及びマウス Nectin-4 に対して、それぞれ 0.387, 0.434, 0.463 及び 3.79 nmol/L であった (表 2.6.2-1)。

表 2.6.2- 1 PC3 細胞上に発現した様々な Nectin-4 オルソログタンパク質に対する AGS-22M6E の見かけの結合親和性 (K_D) と最大抗体結合蛍光量 (B_{max})

	PC3-human-Nectin-4	PC3-Cyno-Nectin-4	PC3-rat-Nectin-4	PC3-mouse-Nectin-4
B_{max} (MFI)	822.9	1106	667.6	242.0
K_D (nmol/L)	0.387	0.434	0.463	3.79

B_{max} : maximal antibody binding fluorescence; Cyno: cynomolgus monkey; K_D : dissociation constant (apparent binding affinity); MFI: mean fluorescence intensity; PC3: human prostate cancer cell line.

Source: Study RD-018

これらの結果は、カニクイザルとラットが毒性試験に使用する適切な動物種であることを示している。

2.6.2.2.3 エンホルツマブ ベドチンの作用機序

添付資料 4.2.1.1-3 (参), 4.2.1.1-4 (参), 4.2.1.1-5

エンホルツマブ ベドチンは、細胞表面の標的 Nectin-4 と結合し、ADC-Nectin-4 複合体を形成することにより、癌細胞に対して細胞傷害性を示すと考えられている。この複合体は細胞内に移行し、リソソーム小胞に輸送され、そこで vc リンカーがタンパク質分解酵素により切断されることにより MMAE が放出される [Doronina et al, 2003]。細胞内に放出された MMAE は、チューブリン重合を阻害し、細胞周期を G2/M 期に停止させ、アポトーシスを引き起こす [Francisco et al, 2003]。エンホルツマブ ベドチンは、これまでに抗体依存性細胞傷害/補体依存性細胞傷害活性は認められていない (ES-046 試験, ES-047 試験)。一方、エンホルツマブ ベドチンはある程度の抗体依存性貪食 (ADCP) 活性を示した。AGS-22C3 (薬物非結合型抗体) 又はエンホルツマブ ベドチンでオプソニン化された標的細胞に対する貪食作用の総量は、40~70%であった (TRN-5259 試験)。しかしながら、薬物非結合型抗体は腫瘍異種移植モデルにおいて有効性を示さなかったことから、ADCP 活性はエンホルツマブ ベドチンの抗腫瘍活性の主要な作用機序とは考えられていない [Challita-Eid et al, 2016]。

2.6.2.2.3.1 ヒト Nectin-4 への結合親和性

添付資料 4.2.1.1-6, 4.2.1.1-7, 4.2.1.1-8, 4.2.1.1-9

AGS-22M6E (ADC) 及び薬物非結合型抗体である AGS-22M6 は、Nectin-4 を内因性に発現するヒト癌細胞 (PANC-02-03, HT-1376, NCI-H322M, AG-OV1-XCL 及び T47D) に特異的に結合した。T47D 細胞に対する見かけの K_D 値は、AGS-22M6E 及び AGS-22M6 のいずれにおいても 0.011 nmol/L であった (表 2.6.2- 2) (RD-013 試験)。

表 2.6.2-2 T47D 上に発現したヒト Nectin-4 に対する AGS-22M6E 及び AGS-22M6 の見かけの結合親和性 (K_D) と最大抗体結合蛍光量 (B_{max})

	AGS-22M6E	AGS-22M6
B_{max} (MFI)	215.1	243.2
K_D (nmol/L)	0.011	0.011

B_{max} : maximal antibody binding fluorescence; K_D : dissociation constant (apparent binding affinity); MFI: mean fluorescence intensity

Source: Study RD-013

AGS-22M6E は、Nectin-4 発現 Rat1(E)細胞に特異的に結合したが、ホモログタンパク質である Nectin-1, Nectin-2, 又は Nectin-3 を発現する Rat1(E)細胞には結合しなかった (RD-015 試験)。

エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E はいずれも、ヒト Nectin-4 発現 PC3 細胞 (PC3-AGS22) の表面に特異的に結合した。見かけの K_D 値は、エンホルツマブ ベドチンで 0.060 nmol/L, AGS-22M6E で 0.057 nmol/L であった (RD-003 試験)。

エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E はいずれも、組換えヒト Nectin-4 (AGS22-tag5) に特異的に結合することが酵素免疫測定法によって示された。AGS-22M6E に対するエンホルツマブ ベドチンの相対結合能を、抗体濃度-結合曲線から得られたそれぞれの 50%有効濃度 (EC_{50}) 値の比率として決定した。エンホルツマブ ベドチンの相対的結合能は、平均で AGS-22M6E の 92.4%と算出された (RD-001 試験)。これらの結果から、エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E は Nectin-4 に対する特異性と親和性が同等であることが示された。

2.6.2.2.3.2 膀胱癌における細胞内移行と輸送

添付資料 4.2.1.1-10 (参), 4.2.1.1-11

AGS-22M6E は、内因性 Nectin-4 発現細胞株並びに外因性に Nectin-4 を発現させた細胞株の細胞内に移行した (ES-006 試験)。エンホルツマブ ベドチンは、細胞表面に Nectin-4 を高発現させた膀胱癌細胞株 T24-hNectin-4 (クローン:1A9) において、Nectin-4 と複合体を形成した後、リソソーム小胞に輸送された。2 時間又は 4 時間のインキュベーション後に、エンホルツマブ ベドチンの大部分は細胞膜、特に細胞間結合部位に残存していたが、エンホルツマブ ベドチンが細胞内に移行してリソソーム小胞と共局在することが確認された。処置後 24 時間では、エンホルツマブ ベドチン細胞膜染色シグナルは無視できる程度であったことから、Nectin-4 に結合したエンホルツマブ ベドチンの大部分は細胞内に移行し、分解されたことが示唆された (TRN-5257 試験)。

2.6.2.2.3.3 MMAE の細胞内放出

添付資料 4.2.1.1-12

エンホルツマブ ベドチンによって送達された MMAE の細胞内濃度を測定するために、T24 親細胞及び T24-hNectin-4（クローン: 1A9）細胞を 100 又は 1000 ng/mL のエンホルツマブ ベドチンで 24 時間処理した。各実験条件において、質量分析により MMAE の細胞内濃度を測定した。エンホルツマブ ベドチンは、処理濃度 100 及び 1000 ng/mL でそれぞれ 95 及び 249 nmol/L の MMAE を T24-hNectin-4（クローン: 1A9）細胞内に送達した。一方で、Nectin-4 陰性 T24 親細胞に送達された細胞内 MMAE の濃度は、処理濃度 100 ng/mL では定量下限（3.2 fmol/L）未満であり、1000 ng/mL では 0.6 nmol/L であった。このことから、エンホルツマブ ベドチンが Nectin-4 依存的に癌細胞内に MMAE を送達することが示された。また、蛍光顕微鏡により、1000 ng/mL のエンホルツマブ ベドチン処理によって T24-hNectin-4（クローン: 1A9）細胞の多核化及び微小管ネットワークの破壊が観察された。これらの結果により、エンホルツマブ ベドチンが Nectin-4 陽性膀胱癌細胞の細胞内に、有糸分裂を阻害するのに十分な濃度（249 nmol/L）の MMAE を送達したことが示唆された。（TRN-5260 試験）。

2.6.2.2.4 Nectin-4 発現細胞に対する細胞傷害活性

AGS-22M6（薬物非結合型抗体）、AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンの細胞傷害活性を検討した。

2.6.2.2.4.1 エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E の細胞傷害活性

添付資料 [4.2.1.1-13](#), [4.2.1.1-14](#)

ヒト、カニクイザル、ラット及びマウス由来の Nectin-4 を発現させた PC3 細胞株を用いて、AGS-22M6E の細胞傷害作用を検討した。Nectin-4 オルソログタンパク質を発現させた PC3 細胞において、AGS-22M6E は特異的かつ強力な細胞傷害作用を示し、その IC₅₀ 値は 0.008～0.20 nmol/L であった。また、AGS-22M6E はヒト Nectin-4 を内因性に発現する T47D 細胞においても強力な細胞傷害活性を示し、その IC₅₀ 値は 0.28 nmol/L であった。AGS-22M6（薬物非結合型抗体）は、いずれの Nectin-4 発現細胞株の細胞増殖に対しても影響を及ぼさなかった（RD-017 試験）。AGS-22M6E はヒト、カニクイザル、及びラット Nectin-4 発現細胞に対して細胞傷害性を示し、細胞傷害作用はこれら 3 種間でほぼ同等であったが、マウス Nectin-4 発現細胞に対する細胞傷害作用は弱かった（表 2.6.2-3）。これらの結果は、毒性評価のための動物種としてラット及びカニクイザルを選択したことをさらに支持する。

表 2.6.2-3 様々な細胞株における AGS-22M6E の細胞傷害活性

Cell Line	IC ₅₀ (nmol/L)
PC3-human-Nectin-4	0.008
PC3-cyno-Nectin-4	0.02
PC3-rat-Nectin-4	0.03
PC3-mouse-Nectin-4	0.20
T47D	0.28

cyno: cynomolgus monkey; IC₅₀: half maximal inhibitory concentration; PC3: human prostate cancer cell line; T47D: human breast cancer cell line.

Source: Study RD-017

ヒト Nectin-4 発現 PC3 細胞（PC3-AGS22 細胞）を用いてエンホルツマブ ベドチンの細胞傷害活性を AGS-22M6E と比較した。エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E はいずれも PC3-AGS22 細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示した。相対的な効力比較では、両薬ともほぼ同一の強度であった（表 2.6.2-4）。これらの結果から、ヒト Nectin-4 発現組換え PC3 細胞に対して、エンホルツマブ ベドチンが AGS-22M6E と同程度の細胞傷害活性を有することが示された（RD-004 試験）。

表 2.6.2-4 ヒト Nectin-4 発現 PC-3 細胞におけるエンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E の細胞傷害活性

	IC ₅₀ (ng/mL)
Enfortumab vedotin	1.674
AGS-22M6E	1.523
Relative potency (%)	91%

AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; IC₅₀: half maximal inhibitory concentration; PC3: human prostate cancer cell line.

Source: Study RD-004

2.6.2.2.4.2 ADC の活性に対する Nectin-4 変異体（エクソン 8 欠失）の影響

添付資料 4.2.1.1-15（参）

Nectin-4 変異体 AGS22d8 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おける 25 アミノ酸を欠失している。定量的ポリメラーゼ連鎖反応のデータによれば、この Nectin-4 変異体は野生型と同程度のレベルで正常及び腫瘍組織に広く発現している。PC3-AGS22 及び PC3-AGS22d8 細胞株に対するエンホルツマブ ベドチンの細胞傷害活性を検討した。両細胞株に対するエンホルツマブ ベドチンの細胞傷害活性はほぼ同等であり、IC₅₀ 値は 0.046 nmol/L（PC3-AGS22）及び 0.041 nmol/L（PC3-AGS22d8）であった。これらの結果は、エンホルツマブ ベドチンが野生型 Nectin-4 又は exon 8 欠失 Nectin-4 変異体を有する腫瘍に対して同等の細胞傷害活性を示すことを示唆している（ES-077 試験）。

2.6.2.2.4.3 ADCの活性に対するNectin-1の影響

添付資料 4.2.1.1-16, 4.2.1.1-17

Nectin-1は、Nectin-4とトランス-ヘテロ二量体を形成することが報告されている [Fabre et al, 2002]。Nectin-4結合競合アッセイにおいて、AGS-22M6EがNectin-1を置換したことは、AGS-22M6E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を示唆する (RD-016試験)。

Nectin-4発現PC-3細胞 (PC3-AGS22細胞) に対するエンホルツマブ ベドチンの細胞傷害活性に及ぼすNectin-1-Fcタンパク質の影響を検討した。エンホルツマブ ベドチンは1 µg/mLのNectin-1-Fcタンパク質の有無にかかわらず同等の細胞傷害活性を示し、EC₅₀値はいずれも2.4 ng/mL (16 pmol/L)であったことから、Nectin-1はエンホルツマブ ベドチンの細胞傷害活性に影響を及ぼさないと考えられた (7465-PH-0001試験)。

2.6.2.2.4.4 標的癌細胞からのMMAE拡散による2次的バイスタンダー効果

添付資料 4.2.1.1-18

本作用の基本的なメカニズムは、ADCから放出された細胞膜透過性細胞傷害性物質が抗体を介さずに隣接した細胞へ拡散することによる。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を、Nectin-4陽性膀胱癌細胞と共培養することにより検討した。ヒトNectin-4を細胞表面に高発現する安定細胞株T24-hNectin-4 (クローン: 1A9) 及びUM-UC-3-hNectin-4 (クローン: 1D11) を使用した。エンホルツマブ ベドチンは、T24-hNectin-4及びUM-UC-3-hNectin-4細胞株に対して強力な細胞傷害活性を示したが、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を過剰発現させたNectin-4陰性のT24及びUM-UC-3細胞株に対しては活性を示さなかった。このことから、エンホルツマブ ベドチンによる細胞傷害活性と微小管阻害薬MMAEの癌細胞への送達にNectin-4依存性であることが示された。Nectin-4陽性膀胱癌細胞を、対照のNectin-4陰性膀胱癌細胞と1:1の比率で混合し、エンホルツマブ ベドチンにより168時間処理した。バイスタンダー効果の活性は、Nectin-4陰性、GFP陽性癌細胞集団の細胞死をフローサイトメトリーを用いてモニターすることにより測定した。検討した最高濃度1000 ng/mLのエンホルツマブ ベドチンにより、Nectin-4陰性、GFP陽性癌細胞の細胞生存率が最大80%低下した。すなわち、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と、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有することが示唆された (TRN-6096試験)。

2.6.2.2.5 効力を裏付けるIn Vivo試験

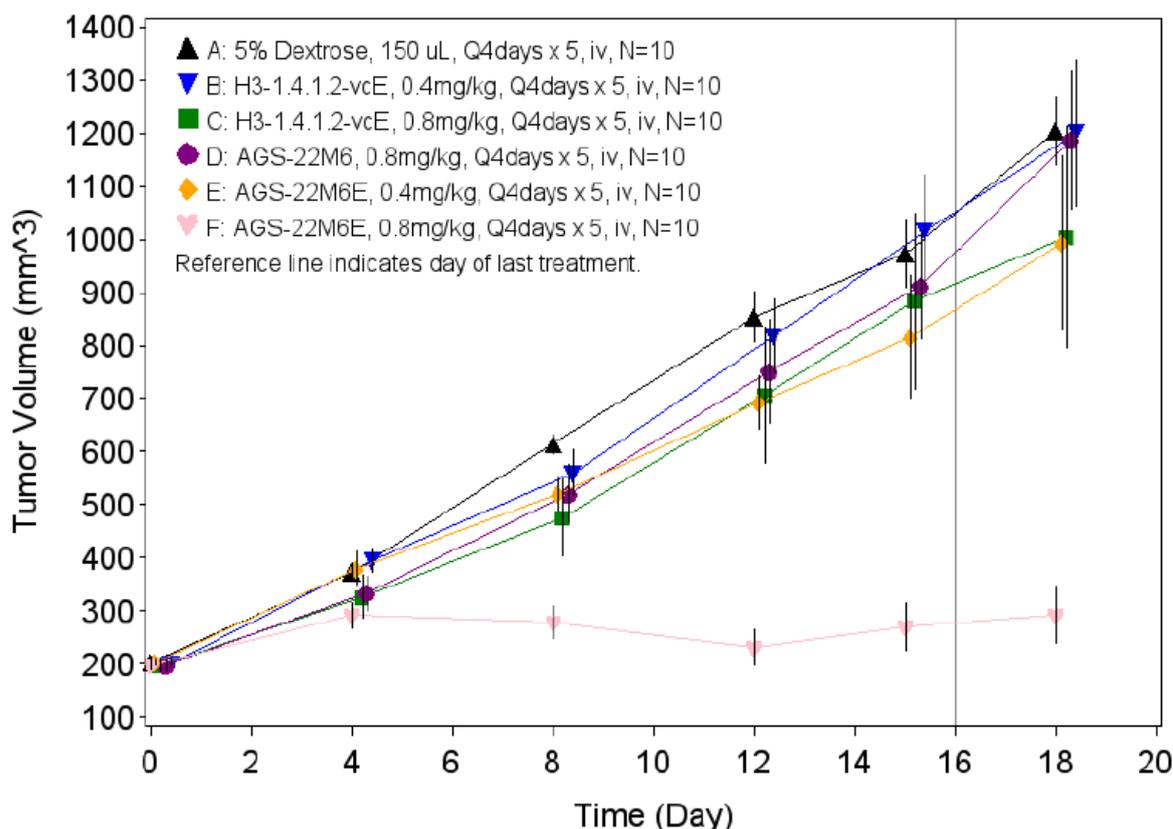
AGS-22M6 (薬物非結合型抗体)、AGS-22M6E及びエンホルツマブ ベドチンの抗腫瘍活性を、Nectin-4の発現が確認されている様々な癌を移植した腫瘍異種移植モデルを用いて評価した。

2.6.2.2.5.1 膀胱癌モデルにおけるエンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E の有効性

添付資料 4.2.1.1-19, 4.2.1.1-20 (参)

膀胱癌患者由来腫瘍 AG-B1 を異種皮下移植した重症複合免疫不全（SCID）マウスにおいて、AGS-22M6E の効果を評価した。AGS-22M6E（0.4 及び 0.8 mg/kg）は 4 日ごとに投与した（RD-009 試験）。その結果、AGS-22M6E は 0.8 mg/kg において、腫瘍増殖を統計学的に有意に阻害し、5%デキストロースを投与した対照群と比較して 75.7%の腫瘍増殖抑制作用を示した（ $P<0.0001$ ）。低用量（0.4 mg/kg）では、対照群と比較して有意な抗腫瘍活性を示さなかった（ $P>0.05$ ）。AGS-22M6E の上記 2 用量を比較したところ、統計的有意差が検出され（ $P=0.0063$ ）、AGS-22M6E の有効性が用量依存的であることが示された。AGS-22M6（薬物非結合型抗体）0.8 mg/kg では、対照群と比較して腫瘍増殖に有意な作用は認められなかった（ $P=0.9959$ ）。AGS-22M6E の腫瘍体積に及ぼす経時的な作用を図 2.6.2-1 に示す。

図 2.6.2-1 ヒト膀胱癌異種移植マウスにおける腫瘍体積に対する AGS-22M6E の作用



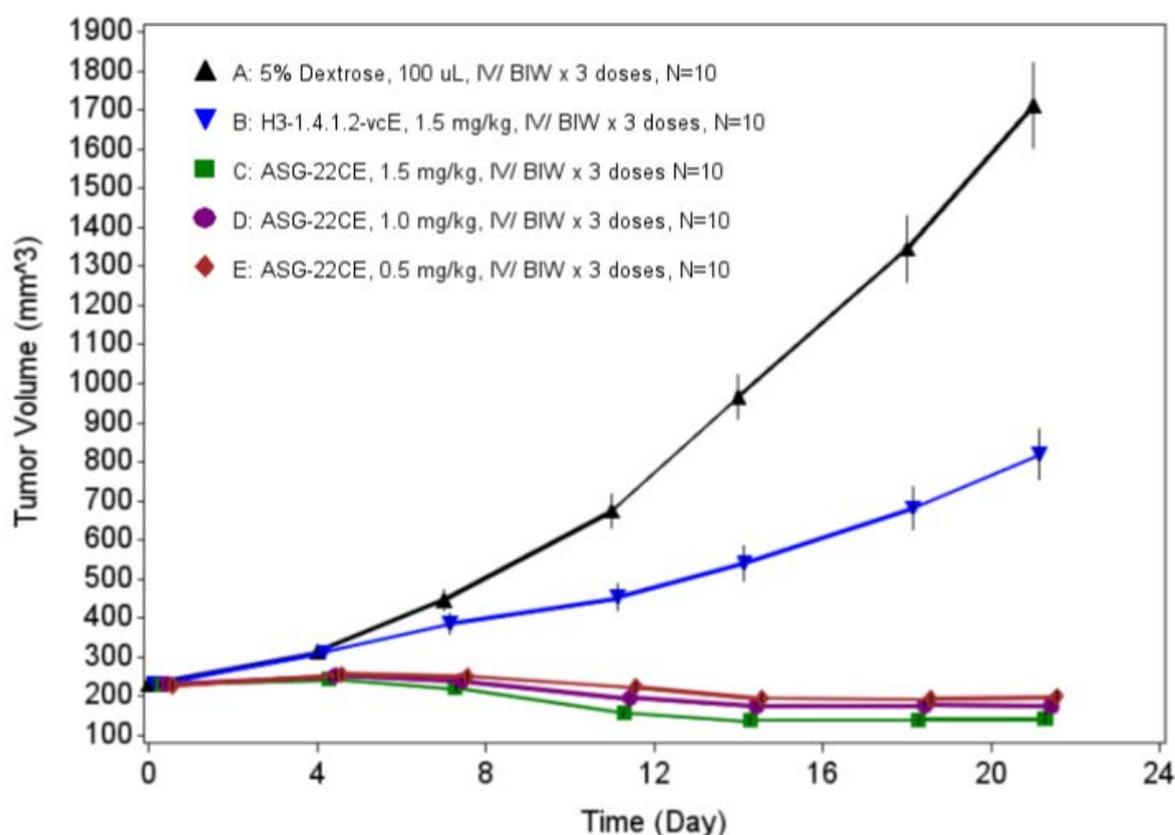
Human bladder cancer xenografts (AG-B1) were implanted in SCID mice. Treatment was started when tumors reached 200 mm³. H3-1.4.1.2-vcE is a control antibody that is conjugated using the same linker and toxin as AGS-22M6E. All agents were given intravenously every 4 days at the dosages indicated. The last dose was given on day 16. Statistical analysis was performed on day-18 tumor volume data using Tukey's test (2-sided on the ranked data). Error bars represent standard error.

AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; SCID: immunodeficient mouse strain; Q4days: every 4 days.

Source: Study RD-009

CB17/SCID マウスに膀胱癌患者由来腫瘍 AG-B8 を異種皮下移植したモデルを用いて、種々の投与量のエンホルツマブ ベドチンの抗腫瘍効果を検討した（ES-015 試験）。エンホルツマブ ベドチンを週 2 回、3 週間静脈内投与したところ、投与開始後 21 日において、検討した全ての用量（0.5, 1.0, 及び 1.5 mg/kg）で、5%デキストロースを投与した対照群と比較して統計学的に有意な抗腫瘍活性を示した（ $P < 0.0001$ ）。エンホルツマブ ベドチンの腫瘍体積に及ぼす経時的な作用を図 2.6.2-2 に示す。

図 2.6.2-2 ヒト膀胱癌異種移植マウスにおける腫瘍体積に対するエンホルツマブ ベドチンの作用



Human bladder cancer xenografts (AG-B8) were implanted in CB17/SCID mice. Treatment was started when tumors reached approximately 250 mm³. H3-1.4.1.2-vcE is a control antibody that is conjugated using the same linker and toxin as enfortumab vedotin. All agents were given intravenously twice per week for a total of 3 doses at the dosages indicated. Kruskal-Wallis test on day 21 data indicated that statistically significant differences existed among the groups ($p < 0.0001$). Error bars represent standard error.

BIW: biweekly; SCID: immunodeficient mouse strain.

Source: Study ES-015

2.6.2.2.5.2 乳癌モデルにおけるエンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E の有効性

添付資料 4.2.1.1-21

乳癌患者由来腫瘍 AG-Br7 皮下異種移植モデルを用いて、エンホルツマブ ベドチンの抗腫瘍活性を AGS-22M6E と比較した。各群の SCID マウスにエンホルツマブ ベドチン又は AGS-22M6E を 1.0 又は 2.0 mg/kg を週 2 回静脈内投与した (RD-002 試験)。投与開始後 21 日における、開始時の腫瘍体積に対する腫瘍退縮率は、2.0 mg/kg のエンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E でそれぞれ 68%及び 70%であった (P<0.01)。腫瘍増殖抑制に関して、エンホルツマブベドチン投与群と AGS-22M6E 投与群の間に統計的な有意差は認められなかった (P>0.9999, 2 mg/kg 群間)。エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E のいずれも、1.0 mg/kg の低用量では 5%デキストロースを投与した対照群と比較して有意な抗腫瘍活性を示さなかった。

2.6.2.3 副次的薬理試験

エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E の副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

エンホルツマブ ベドチンは ADC であることから、*in vitro* での安全性薬理評価としては、MMAE の hERG チャネルを介したカリウム電流に及ぼす影響のみを調べた。ADC である AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンの *in vivo* 安全性薬理評価（心血管系、呼吸系及び中枢神経系）は、一般毒性試験の一部として実施した。

2.6.2.4.1 *In vitro* 試験：hERG 電流への影響

添付資料 4.2.1.3-1 (参)

HEK (human embryonic kidney) 293 細胞に発現させた hERG チャネルを介するカリウム電流 (hERG 電流) に対する MMAE 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 (129-09-001 試験)。MMAE (10 及び 100 $\mu\text{mol/L}$) による影響を、陰性対照である 0.1%ジメチルスルホキシドとの比較により評価した。陽性対照であるシサプリド水和物 (25 nmol/L) を用いて、試験系の反応を確認した。MMAE の 10 及び 100 $\mu\text{mol/L}$ における hERG 電流の阻害率 (平均±標準誤差) は、それぞれ、 0.103 ± 0.030 及び 0.237 ± 0.056 で、濃度依存性がみられ、100 $\mu\text{mol/L}$ では有意な抑制を示した。しかしながら、 IC_{50} は 100 $\mu\text{mol/L}$ (臨床推奨用量で認められた MMAE のヒト C_{max} の 19405 倍) を超えると判断された。この結果から、ヒトに臨床推奨用量を投与したときの MMAE の曝露においては、hERG チャネルにほとんど影響を及ぼさないと考えられる。

2.6.2.4.2 *In vivo* 試験：中枢神経系、心血管系及び呼吸系への影響

添付資料 4.2.3.2-2, 4.2.3.2-4, 4.2.3.2-5

心血管系への影響として、カニクイザルに AGS-22M6E を週に 1 回、1, 3, 6 mg/kg の用量で静脈内投与したところ、初回又は 4 回目のいずれかの投与後 1 時間の Fridericia の式により補正

した QT 間隔（QTcF 間隔）に有意な延長は認められず、また、6 mg/kg までの投与でいずれの観察時期でも RR 間隔に変化は認められなかった（20005664 試験）。さらに、カニクイザルに MMAE を 0.1093 mg/kg の用量で静脈内投与したときの C_{max} は、推奨臨床用量のエンホルツマブ ベドチンをヒトに投与したときの遊離型 MMAE の C_{max} の 73.0 倍（雄）及び 81.9 倍（雌）に達したが、投与 1 後時間の QTcF 又は RR 間隔のいずれにも変化はみられなかった。以上より、AGS-22M6E、エンホルツマブ ベドチン及びその細胞傷害性薬物である MMAE は、いずれも、ヒトに臨床推奨用量を投与したときには心臓に明らかな電気生理学的影響を及ぼさないと考えられた。

カニクイザルでの 4 週間反復静脈内投与試験（20005664 試験）において、AGS-22M6E 及び MMAE 投与による血行動態への影響を評価した。AGS-22M6E は 6 mg/kg まで、収縮期、拡張期又は平均血圧、及び心拍数に影響を及ぼさなかった。また、MMAE の単回静脈内投与（0.1093 mg/kg）では、収縮期、拡張期、平均血圧、心拍数に影響しなかった。これらの結果から、生物学的に同等な抗体薬物複合体であるエンホルツマブ ベドチン、及び細胞傷害性薬物である MMAE のいずれも、ヒトに臨床推奨用量を投与したときには血行動態に明らかな影響を及ぼさないと考えられた。

中枢神経系への影響は、AGS-22M6E のラット 4 週間反復投与試験（20005662 試験）及びカニクイザル 4 週間反復投与（20005664 試験）において評価した。ラットでは 10 mg/kg まで、カニクイザルでは 6 mg/kg の用量まで AGS-22M6E の投与による行動の変化は認められなかった。また、カニクイザル反復投与試験において、エンホルツマブ ベドチン又は AGS-22M6E を 3 mg/kg の用量で週 1 回静脈内投与した結果、体温変化が認められたが、試験施設の正常動物で認められる変動範囲内であったため、毒性学的意義はないと考えられた（20021751 試験）。これら 3 つの試験から、エンホルツマブ ベドチンは中枢神経系にほとんど影響を及ぼさないことが示された。

呼吸系への影響については、エンホルツマブ ベドチン又は AGS-22M6E を静脈内投与したときのカニクイザルの呼吸数を測定して評価した（20021751 試験）。いずれの ADC も、3 mg/kg の用量で週 1 回、計 4 回投与したときには、溶媒対照と比較して呼吸数に明らかな影響を及ぼさなかった。また、カニクイザルでの 4 週間反復投与試験（20005664 試験）において、AGS-22M6E の 6 mg/kg までの投与で、呼吸系への影響を示唆する一般症状は認められなかった。これらの結果から、エンホルツマブ ベドチンは、ヒトに臨床推奨用量を投与したときには呼吸系にほとんど影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.5 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。

2.6.2.6 考察及び結論

エンホルツマブ ベドチンは、タンパク質分解酵素で切断されるリンカーを介して完全ヒト型 IgG1κ 抗体と微小管阻害薬 MMAE を結合させた ADC である。

2.6.2.6.1 薬理作用及び作用機序

1. Nectin-4 の発現は、種々のヒト腫瘍組織で確認されたが、正常ヒト組織での発現は低かった（ES-001 試験、2.6.6.8.2.2 正常ヒト組織における Nectin-4 発現の免疫化学的評価に関する試験）。このことは、Nectin-4 が ADC 療法の標的候補であることを示している。
2. 抗 Nectin-4 抗体に MMAE を結合させた AGS-22M6E は、マウス Nectin-4 よりもヒト、カニクイザル及びラット Nectin-4 に対して高い親和性で結合したことから、毒性試験に用いた動物種が適切であったことが支持された。
3. AGS-22M6E は、ヒト、カニクイザル又はラット Nectin-4 を発現させた細胞に対してほぼ同程度の細胞傷害活性を示し、マウス Nectin-4 を発現させた細胞に対しては細胞傷害活性が低かったことから、毒性試験に用いた動物種が適切であったことがさらに支持された。
4. エンホルツマブ ベドチンの生物学的活性は、多段階の過程に起因すると考えられている。すなわち、ADC が癌細胞表面上の Nectin-4 に結合することにより ADC-Nectin-4 複合体の内在化が始まり、次いでリソソーム画分へと輸送され、タンパク質分解酵素により切断されて細胞内で MMAE を放出する [Doronina et al, 2003]。
5. 細胞内 MMAE 濃度は、エンホルツマブ ベドチンと Nectin-4 発現癌細胞とのインキュベーション後に増加したが、Nectin-4 を発現していない細胞では増加しなかったことから、エンホルツマブ ベドチンが Nectin-4 を標的とした治療薬であるとの結論が支持された。
6. エンホルツマブ ベドチンは、野生型 Nectin-4 又はエクソン 8 を欠失した主要変異体のいずれを発現する細胞に対しても同等の細胞傷害活性を示したことから、Nectin-4 発現腫瘍に対して広く活性を示すことが示唆された。
7. エンホルツマブ ベドチンは、Nectin-4 陽性及び陰性細胞を共培養することにより、その両方に対して細胞傷害活性を示した。このことは、エンホルツマブ ベドチンが Nectin-4 陰性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作用を示すことを示唆している。
8. AGS-22M6E は膀胱癌患者由来腫瘍異種移植モデルにおいて腫瘍増殖を阻害するか、あるいは腫瘍を退縮させた。
9. エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E は乳癌患者由来腫瘍異種移植モデルにおいて同等の薬理活性を示した。

2.6.2.6.2 安全性薬理

1. in vitro では、MMAE の hERG チャンネルを介するカリウム電流に対する阻害作用の IC₅₀ は 100 μmol/L 以上であり、この濃度は臨床推奨用量でのヒト C_{max} より 19405 倍高かった。

2. *in vivo* では、MMAE は、臨床推奨用量でのヒト C_{max} の 73.0 倍（雄）又は 81.9 倍（雌）の曝露量で、カニクイザルの心電図に影響を及ぼさなかった。
3. AGS-22M6E は、臨床推奨用量でのヒト C_{max} の 5.5 倍までの曝露量において、血行動態（収縮期、拡張期、平均血圧又は心拍数）に影響を及ぼさなかった。
4. エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E は、それぞれラット及びカニクイザルの中枢神経系（一般状態観察及び体温）に対して、臨床推奨用量でのヒト C_{max} の 10.1 倍（ラット）又は 5.5 倍（カニクイザル）までの曝露量において、明らかな影響を及ぼさなかった。
5. エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E は、臨床推奨用量でのヒト C_{max} の 5.5 倍までの曝露で、カニクイザルの呼吸系に明らかな影響（呼吸数の変化、呼吸異常を示唆する一般症状）を及ぼさなかった。

2.6.2.6.3 結論

エンホルツマブ ベドチンは Nectin-4 に対して高度の特異性を有する ADC である。エンホルツマブ ベドチンは臨床的に意義のある濃度で、心血管系、呼吸系、中枢神経系における安全性薬理学的所見を示さなかった。以上の非臨床成績から、エンホルツマブ ベドチンは、局所進行性又は転移性尿路上皮癌を有する標的 patient 集団の治療に安全かつ有効な治療薬となる可能性が示唆された。

2.6.2.7 図表

図表は、各項の本文中の適切な場所に挿入した。

2.6.2.8 参考文献

- 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.
- 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.
- Fabre S, Reymond N, Cocchi F, Menotti L, Dubreuil P, Campadelli-Fiume G, et al. Prominent role of the Ig-like V Domain in trans-interactions of Nectins. *J Biol Chem.* 2002;277:27006-13.
- 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.

目次

2.6.3	薬理試験概要表.....	2
2.6.3.1	薬理試験：一覧表.....	2
2.6.3.2	効力を裏付ける試験.....	6
2.6.3.3	副次的薬理試験.....	15
2.6.3.4	安全性薬理試験.....	16
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	17

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その1）

被験物質：エンホルツマブ ベドチン， AGS-22M6E

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Number
Primary Pharmacodynamics					
Immunohistochemical evaluation of Nectin-4 expression in human cancers	Human tissues	Ex vivo	Agensys, Inc.	ES-007	4.2.1.1-1 (参)
AGS-22M6E bind to recombinant human, cynomolgus monkey, rat and murine orthologs of Nectin-4	PC3 cells	In vitro	Agensys, Inc.	RD-018	4.2.1.1-2
ADCC activity of enfortumab vedotin	BT-483, PC3-AGS22 cells and PBMCs	In vitro	Agensys, Inc.	ES-046	4.2.1.1-3 (参)
CDC activity of enfortumab vedotin	BT-483 and PC3-AGS22 cells	In vitro	Agensys, Inc.	ES-047	4.2.1.1-4 (参)
Antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP) of enfortumab vedotin	PC3-AGS22 and MDA-MB-468 cells	In vitro	Seagen Inc.	TRN-5259	4.2.1.1-5
AGS-22M6E and AGS-22M6 bind to Nectin-4 expressed on the surface of cancer cells	PANC-02-03, HT-1376, NCI-H322M, AG-OV1-XCL and T47D cells	In vitro	Agensys, Inc.	RD-013	4.2.1.1-6
AGS-22M6E do not cross-react with other Nectin family members	Rat1(E) cells	In vitro	Agensys, Inc.	RD-015	4.2.1.1-7
<i>Table continued on next page</i>					

2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その2）

被験物質：エンホルツマブ ベドチン，AGS-22M6E

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Number
Primary Pharmacodynamics (continued)					
Comparison study of enfortumab vedotin and AGS-22M6E binding activity using recombinant human Nectin-4	PC3-AGS22 cells	In vitro	Agensys, Inc.	RD-003	4.2.1.1-8
Comparison study of AGS-22M6E and enfortumab vedotin using AGS22-tag5 antigen binding ELISA	AGS22-tag5	In vitro	Agensys, Inc.	RD-001	4.2.1.1-9
Confocal microscopy evaluation of AGS-22M6E internalization	T47D and PC3-AGS22 cells	In vitro	Agensys, Inc.	ES-006	4.2.1.1-10 (参)
Fluorescence microscopy evaluation of enfortumab vedotin internalization and lysosomal trafficking in a Nectin-4 positive bladder carcinoma cell line model	T24-hNectin-4 (clone: 1A9)	In vitro	Seagen Inc.	TRN-5257	4.2.1.1-11
Measurement of intracellular release of MMAE by enfortumab vedotin in a Nectin-4 positive bladder carcinoma cell line model	T24 parental and T24-hNectin-4 (clone: 1A9)	In vitro	Seagen Inc.	TRN-5260	4.2.1.1-12
AGS-22M6E is cytotoxic to Nectin-4 expressing cells	PC3 and T47D cells	In vitro	Agensys, Inc.	RD-017	4.2.1.1-13
Enfortumab vedotin and AGS-22M6E cytotoxicities on PC3-AGS22 cells	PC3-AGS22 cells	In vitro	Agensys, Inc.	RD-004	4.2.1.1-14
Effect of Nectin-4 variant lacking exon 8 on the cytotoxicity of enfortumab vedotin on tumor cells	PC3-AGS22 and PC3-AGS22d8 cells	In vitro	Agensys, Inc.	ES-077	4.2.1.1-15 (参)
<i>Table continued on next page</i>					

2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その3）

被験物質：エンホルツマブ ベドチン, AGS-22M6E

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Number
Primary Pharmacodynamics (continued)					
AGS-22M6E competes with Nectin-1-Fc for binding to Nectin-4	Rat1(E)-Nectin-4 cells	In vitro	Agensys, Inc.	RD-016	4.2.1.1-16
Effect of Nectin-1-Fc protein on enfortumab vedotin cytotoxicity	PC3-AGS22 cells	In vitro	Astellas Pharma, Inc.	7465-PH-0001	4.2.1.1-17
Bystander effect secondary to release of MMAE from targeted tumor cells	T24-hNectin-4 (clone: 1A9), UM-UC-3-hNectin-4 (clone: 1D11), and T24 and UM-UC-3 cell lines engineered to overexpress GFP	In vitro	Seagen Inc.	TRN-6096	4.2.1.1-18
Efficacy of AGS-22M6E in a subcutaneously established xenograft model of human bladder cancer	Mice xenografted with AG-B1	In vivo (iv)	Agensys, Inc.	RD-009	4.2.1.1-19
Efficacy study of enfortumab vedotin in a subcutaneously established xenograft model of human bladder cancer	Mice xenografted with AG-B8	In vivo (iv)	Agensys, Inc.	ES-015	4.2.1.1-20 (参)
Efficacy study comparing AGS-22M6E and enfortumab vedotin in a subcutaneously established xenograft model of human breast cancer	Mice xenografted with AG-Br7	In vivo (iv)	Agensys, Inc.	RD-002	4.2.1.1-21
<i>Table continued on next page</i>					

2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その4）

被験物質：エンホルツマブ ベドチン，AGS-22M6E，MMAE

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Number
Safety Pharmacology					
Effects of MMAE on hERG channel†	hERG transfected HEK293 cells	in vitro		129-09-001	4.2.1.3-1（参）
Effect of AGS-22M6E on central nervous system†	Sprague-Dawley rat	iv bolus		20005662	4.2.3.2-2
Effect of AGS-22M6E on cardiovascular system†	Cynomolgus monkey	iv infusion/ (MMAE iv bolus)		20005664	4.2.3.2-4
Effect of AGS-22M6E or enfortumab vedotin on central nervous and respiratory system†	Cynomolgus monkey	iv infusion		20021751	4.2.3.2-5

ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCP: antibody-dependent cellular phagocytosis; AG-B1: bladder cancer patient derived cell; AG-B8: bladder cancer patient derived cell; AG-Br7: breast cancer patient derived cell; AG-OV1-XCL: human ovarian carcinoma cell line; AGS-22M6: unconjugated hybridoma-derived fully human monoclonal antibody targeting Nectin-4; AGS-22M6E: hybridoma-derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; BT-483: human breast cancer cell line; CDC: complement-dependent cytotoxicity; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GFP: green fluorescent protein; hERG: human ether-à-go-go-related gene; HEK: human embryonic kidney; HT-1376: human bladder carcinoma cell line; MDA-MB-468: human breast cancer cell line; MMAE: monomethyl auristatin E; NCI-H322M: human non-small cell lung carcinoma cell line; Nectin-1-Fc: a potential competitor of enfortumab vedotin binding; PANC-02-03: human pancreatic cancer cell line; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; PC3: human prostate cancer cell line; PC3-AGS22: PC3 cells engineered to express human Nectin-4; PC3-AGS22d8: PC3 cells engineered to express Nectin-4 variant lacking exon 8; Rat1(E) cell: fibroblast cell line of rat origin; Rat1(E)-Nectin-4 cell: human Nectin-4 expressing Rat1(E) cell line; T24 cell: human bladder carcinoma cell line; T24-hNectin-4: human Nectin-4 expressing T24 cell line; T47D cell: human breast cancer cell line, UM-UC-3: human bladder carcinoma cell line; UM-UC-3-hNectin-4: human Nectin-4 expressing UM-UC-3 cell line.

† GLP-compliant study

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験（In vitro, その1）

被験物質：エンホルツマブ ベドチン, AGS-22M6E

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	CTD number (Study Number)
Immunohistochemical evaluation of Nectin-4 expression in human cancers	human tissues	NA	NA	The majority of cancer specimens (> 50%) were positive for Nectin-4 across all evaluated cancer indications, with strong H-scores (200 to 300) for 31%, 27% and 13% of bladder, breast and pancreatic cancer specimens, respectively.	4.2.1.1-1 (参) (ES-007)
To investigate the species cross-reactivity of AGS-22M6E	human, cynomolgus monkey, rat and mouse Nectin-4 expressing PC3 cells	n=1, triplicate	0.002 to 40 nmol/L (human, cynomolgus monkey and rat) 0.004 to 80 nmol/L (mouse)	The apparent K_D value of AGS-22M6E was determined to be 0.387, 0.434, 0.463 and 3.79 nmol/L when tested against human, cynomolgus monkey, rat and mouse Nectin-4, respectively. The B_{max} (MFI) values for AGS-22M6E when tested against human, cynomolgus monkey, rat and mouse Nectin-4 were 822.9, 1106, 667.6 and 242.0, respectively.	4.2.1.1-2 (RD-018)
To investigate ADCC activity of enfortumab vedotin	BT-483 and PC3-AGS22 cells	n=1, triplicate	2.5 µg/mL	Enfortumab vedotin did not promote ADCC activity when tested using BT-483 and human Nectin-4 expressing PC3 cells in the presence of effector cells, normal human PBMCs.	4.2.1.1-3 (参) (ES-046)
To investigate CDC activity of enfortumab vedotin	BT-483 and PC3-AGS22 cells	n=1, triplicate	0.1, 1, 10, 100 µg/mL	Enfortumab vedotin did not promote CDC activity when tested using BT-483 or human Nectin-4 expressing PC3 cells in the presence of baby rabbit complement.	4.2.1.1-4 (参) (ES-047)
<i>Table continued on next page</i>					

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (In vitro, その2)

被験物質：エンホルツマブ ベドチン, AGS-22M6E

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	CTD number (Study Number)
To investigate the ADCP activity of enfortumab vedotin	PC3-AGS22 and MDA-MB-468 cells	n=6, single	0.0002, 0.002, 0.02, 0.2, 2.0 µg/mL	The total amount of phagocytosis observed ranged between 40% and 70% in the AGS-22C3 or enfortumab vedotin opsonized target cells, and optimal ADCP activity was seen at concentrations ≥ 200 ng/mL.	4.2.1.1-5 (TRN-5259)
To investigate binding activity of AGS-22M6 and AGS-22M6E to human Nectin-4 expressing cell lines	PANC-02-03, HT-1376, NCI-H322M, AG-OV1-XCL, T47D cell lines	n=1, triplicate	1, 3, 10 µg/mL (MFI for various cell lines) 0.00004 to 10 nmol/L (K _D , B _{max} for T47D cells)	AGS-22M6 and AGS-22M6E bound specifically to all 5 cell types. The apparent K _D values were determined to be 0.011 nmol/L for both AGS-22M6 and AGS-22M6E in the T47D cell line. The B _{max} values for AGS-22M6 and AGS-22M6E were determined to be 243.2 and 215.1, respectively.	4.2.1.1-6 (RD-013)
<i>Table continued on next page</i>					

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (In vitro, その3)

被験物質：エンホルツマブ ベドチン, AGS-22M6E

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	CTD number (Study Number)																	
To investigate binding activity of AGS-22M6E to human Nectin families	human Nectin-1, 2, 3, 4 expressing Rat1(E) cell lines	n=1, triplicate	10 µg/mL	<p>AGS-22M6E did not bind significantly to Nectin-1, -2 or -3, but significantly bound to Nectin-4</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Cell lines</th> <th colspan="2">MFI</th> </tr> <tr> <th>Mean</th> <th>SE</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Rat1(E)-Nectin-1</td> <td>6.73</td> <td>0.05</td> </tr> <tr> <td>Rat1(E)-Nectin-2</td> <td>6.28</td> <td>0.26</td> </tr> <tr> <td>Rat1(E)-Nectin-3</td> <td>7.51</td> <td>0.27</td> </tr> <tr> <td>Rat1(E)-Nectin-4</td> <td>684</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>	Cell lines	MFI		Mean	SE	Rat1(E)-Nectin-1	6.73	0.05	Rat1(E)-Nectin-2	6.28	0.26	Rat1(E)-Nectin-3	7.51	0.27	Rat1(E)-Nectin-4	684	12	<p>4.2.1.1-7 (RD-015)</p>
Cell lines	MFI																					
	Mean	SE																				
Rat1(E)-Nectin-1	6.73	0.05																				
Rat1(E)-Nectin-2	6.28	0.26																				
Rat1(E)-Nectin-3	7.51	0.27																				
Rat1(E)-Nectin-4	684	12																				
To investigate affinity of AGS-22M6E and enfortumab vedotin to human Nectin-4	PC3-AGS22	n=3, triplicate	0.003 to 40 nmol/L	<p>K_D values were determined to be 0.060 nmol/L for enfortumab vedotin and 0.057 nmol/L for AGS-22M6E. The B_{max} values for enfortumab vedotin and AGS-22M6E were determined to be 222 and 204, respectively.</p>	<p>4.2.1.1-8 (RD-003)</p>																	
To compare binding activity to human Nectin-4 protein between AGS-22M6E and enfortumab vedotin	AGS22-tag5 ELISA	n=3, triplicate	0.03 to 1500 ng/mL	<p>The result of this study indicated the relative potency of enfortumab vedotin to be 92.4% of AGS-22M6E.</p>	<p>4.2.1.1-9 (RD-001)</p>																	
<i>Table continued on next page</i>																						

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験（In vitro, その4）

被験物質：AGS-22M6E

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	CTD number (Study Number)
To investigate the internalization of AGS-22M6E in human Nectin-4 expressing cell lines	PC3-AGS22, T47D	n=1, single	5 µg/mL	<p>AGS-22M6E internalizes in endogenously expressing and recombinant expressing cell lines in vitro. In T47D cells, AGS-22M6E was predominantly localized to the surface membrane junctions between cells at the onset, followed by trafficking to the lysosomes within 4 hours of ADC incubation. After ADC incubation for 8 hours, overall reduced expression and limited co-localization with CD107a/LAMP1 suggests lack of Nectin-4 antigen recycling/new antigen expression. Conversely, in PC3-AGS22 cells, AGS-22M6E was predominantly localized contiguously throughout the surface membrane at the onset. While internalization of AGS-22M6E was observed with 4 hours of ADC incubation, the lack of colocalization within the lysosomal compartments suggests differing internalization kinetics and/or mechanism of internalization in Nectin-4 recombinant expressing cells.</p>	<p>4.2.1.1-10 (参) (ES-006)</p>
<i>Table continued on next page</i>					

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (In vitro, その5)

被験物質：エンホルツマブ ベドチン

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	CTD number (Study Number)
To investigate internalization and trafficking of enfortumab vedotin	T24-hNectin-4 (clone: 1A9)	n=1, single	2 µg/mL	In T24-hNectin-4 (clone: 1A9) cells at T=0, enfortumab vedotin was predominantly localized to the plasma membrane. It was also enriched in cell-cell junctions and largely absent in the cytosol or other intracellular compartments. After a 2 hour incubation at 37°C, enfortumab vedotin was present at reduced levels on the plasma membrane, and was also observed within punctate structures in the cytosol, many of which were colocalized with the lysosomal marker, CD107a/LAMP1. After 4 hours of incubation at 37°C, there was a further decrease of enfortumab vedotin on the plasma membrane and less punctate staining in the cytoplasm. The enfortumab vedotin that remained on the plasma membrane at both the 2 and 4 hour timepoints appeared to be enriched at cell-cell junctions. Enfortumab vedotin localization at both the membrane and the cytosol was greatly reduced after an extended 24 hour incubation.	4.2.1.1-11 (TRN-5257)
<i>Table continued on next page</i>					

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験（In vitro, その6）

被験物質：エンホルツマブ ベドチン, AGS-22M6E

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	CTD number (Study Number)																				
To investigate intracellular release of MMAE in enfortumab vedotin treated bladder carcinoma cells	T24 parental and T24-hNectin-4 (clone: 1A9)	n=1, triplicate	100 and 1000 ng/mL	Mass spectrometry was used to determine the intracellular concentrations of MMAE for each experimental condition. Enfortumab vedotin delivered 95 nmol/L and 249 nmol/L MMAE to T24-hNectin-4 (clone: 1A9) cells at 100 ng/mL and 1000 ng/mL treatment concentrations, respectively. In contrast, MMAE drug delivered to T24 parental cells was below or near the lower limit of quantitation. This demonstrated that enfortumab vedotin delivers MMAE to tumor cells in a Nectin-4 dependent manner.	4.2.1.1-12 (TRN-5260)																				
To investigate cytotoxicity of AGS-22M6 and AGS-22M6E	human, cynomolgus monkey, rat, mouse Nectin-4 expressing PC3 cell lines, T47D cell line	n=1, triplicate	0.0003 to 0.5133 nmol/L for AGS-22M6E and 0.0003 to 0.4422 nmol/L for AGS-22M6 (human, rat, cynomolgus monkey) 0.0022 to 3.33 nmol/L (mouse) 0.0102 to 66.667 nmol/L (T47D)	AGS-22M6E specifically induces a potent cytotoxic effect in cells expressing Nectin-4 <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Cell Line</th> <th colspan="2">IC₅₀ (nmol/L)</th> </tr> <tr> <th>AGS-22M6E</th> <th>AGS-22M6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PC3-human Nectin-4</td> <td>0.008</td> <td>NA</td> </tr> <tr> <td>PC3-cyno Nectin-4</td> <td>0.02</td> <td>NA</td> </tr> <tr> <td>PC3-rat Nectin-4</td> <td>0.03</td> <td>NA</td> </tr> <tr> <td>PC3-mouse Nectin-4</td> <td>0.20</td> <td>NA</td> </tr> <tr> <td>T47D</td> <td>0.28</td> <td>NA</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Line	IC ₅₀ (nmol/L)		AGS-22M6E	AGS-22M6	PC3-human Nectin-4	0.008	NA	PC3-cyno Nectin-4	0.02	NA	PC3-rat Nectin-4	0.03	NA	PC3-mouse Nectin-4	0.20	NA	T47D	0.28	NA	4.2.1.1-13 (RD-017)
Cell Line	IC ₅₀ (nmol/L)																								
	AGS-22M6E	AGS-22M6																							
PC3-human Nectin-4	0.008	NA																							
PC3-cyno Nectin-4	0.02	NA																							
PC3-rat Nectin-4	0.03	NA																							
PC3-mouse Nectin-4	0.20	NA																							
T47D	0.28	NA																							

Table continued on next page

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (In vitro, その7)

被験物質：エンホルツマブ ベドチン, AGS-22M6E

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	CTD number (Study Number)																				
To compare enfortumab vedotin with AGS-22M6E cytotoxicities	PC3-AGS22	n=3, triplicate	AGS-22M6E: 0.15 to 39 ng/mL enfortumab vedotin: 0.16 to 41 ng/mL	AGS-22M6E and enfortumab vedotin had near identical specific cytotoxic potencies <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="3">IC₅₀ (ng/mL)</th> </tr> <tr> <th></th> <th>Mean</th> <th>SD</th> <th>%CV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AGS-22M6E</td> <td>1.523</td> <td>0.052</td> <td>3%</td> </tr> <tr> <td>Enfortumab vedotin</td> <td>1.674</td> <td>0.061</td> <td>4%</td> </tr> <tr> <td>% Relative Potency</td> <td>91%</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>		IC ₅₀ (ng/mL)				Mean	SD	%CV	AGS-22M6E	1.523	0.052	3%	Enfortumab vedotin	1.674	0.061	4%	% Relative Potency	91%	-	-	4.2.1.1-14 (RD-004)
	IC ₅₀ (ng/mL)																								
	Mean	SD	%CV																						
AGS-22M6E	1.523	0.052	3%																						
Enfortumab vedotin	1.674	0.061	4%																						
% Relative Potency	91%	-	-																						
To investigate effect of Nectin-4 variant lacking exon 8 on the cytotoxicity of enfortumab vedotin	PC3-AGS22 and PC3-AGS22d8	n=2, duplicate	0.0003 to 0.5 nmol/L	The IC ₅₀ values for both cell lines were very similar with mean IC ₅₀ values of 0.046 nmol/L (PC3-AGS22) and 0.041 nmol/L (PC3-AGS22d8) from two experiments.	4.2.1.1-15 (参) (ES-077)																				
To investigate the effect of Nectin-1-Fc protein on AGS-22M6E binding activity	Rat1(E)-Nectin-4	n=1, triplicate	0.02 to 1000 ng/mL (AGS-22M6E)	AGS-22M6E competed with Nectin-1-Fc protein for binding to Nectin-4 on the surface of Rat1(E)-Nectin-4 cells.	4.2.1.1-16 (RD-016)																				
To investigate the effect of Nectin-1-Fc protein on enfortumab vedotin cytotoxicity	PC3-AGS22	n=3, triplicate	0.31 to 40 ng/mL (enfortumab vedotin)	Enfortumab vedotin exerted cytotoxicity with or without 1 µg/mL of Nectin-1-Fc protein with EC ₅₀ values of 2.4 ng/mL (16 pmol/L).	4.2.1.1-17 (7465-PH-0001)																				
<i>Table continued on next page</i>																									

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (In vitro, その 8)

被験物質：エンホルツマブ ベドチン

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	CTD number (Study Number)
To investigate the bystander effect of enfortumab vedotin	T24-hNectin-4 (clone: 1A9), UM-UC-3-hNectin-4 (clone: 1D11), and T24 and UM-UC-3 cell lines engineered to overexpress GFP	n=1, single (72 and 168 hour time points)	31.3 to 1000 ng/mL (enfortumab vedotin)	Enfortumab vedotin treatment produced a maximum of 80% reduction in the cell viability of Nectin-4 negative, GFP positive bystander tumor cells at 1000 ng/mL, when Nectin-4 positive tumor bladder carcinoma cells were mixed with Nectin-4 negative tumor bladder carcinoma cells at controlled 1:1 ratio, then treated 168 hours with a dose titration of enfortumab vedotin.	4.2.1.1-18 (TRN-6096)

ADC: antibody-drug conjugate; ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCP: antibody-dependent cellular phagocytosis; AG-OV1-XCL: human ovarian carcinoma cell line; AGS-22C3: unconjugated Chinese hamster ovary derived fully human monoclonal antibody targeting Nectin-4; AGS-22M6: unconjugated hybridoma-derived fully human monoclonal antibody targeting Nectin-4; AGS-22M6E: hybridoma-derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; Bmax: maximum specific binding; BT-483: human breast cancer cell line; CDC: complement-dependent cytotoxicity; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GFP: green fluorescent protein; HT-1376: human bladder carcinoma cell line; KD: dissociation constant (apparent binding affinity); MDA-MB-468: human breast cancer cell line; MFI: mean fluorescence intensity; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; NCI H322M: human non-small cell lung carcinoma cell line; Nectin-1-Fc: a potential competitor of enfortumab vedotin binding; PANC-02-03: human pancreatic cancer cell line; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; PC3: human prostate cancer cell line, PC3-AGS22: PC3 cells engineered to express human Nectin-4; PC3-AGS22d8: PC3 cells engineered to express Nectin-4 variant lacking exon 8; Rat1(E) cell: fibroblast cell line of rat origin; Rat1(E)-Nectin-4 cell: human Nectin-4 expressing Rat1(E) cell line; T24: human bladder carcinoma cell line; T24-hNectin-4: human Nectin-4 expressing T24 cell line; T47D cell: human breast cancer cell line, UM-UC-3: human bladder carcinoma cell line; UM-UC-3-hNectin-4: human Nectin-4 expressing UM-UC-3 cell line

2.6.3.2.2 効力を裏付ける試験 (In vivo)

被験物質：エンホルツマブ ベドチン, AGS-22M6E

Objective	Species/Test System	n	Regimen	Key Results	Study Number
To study anti-tumor efficacy of AGS-22M6E	Male ICR SCID mice xenografted subcutaneously with AG-B1	n=10	0 (vehicle control), 0.4, 0.8 mg/kg every 4 days iv administration x 5 times	When compared to vehicle control, AGS-22M6E 0.8 mg/kg inhibited tumor growth by 75.7% (P<0.0001). AGS-22M6E given at 0.4 mg/kg did not demonstrate a statistically significant antitumor effect in this model when compared to vehicle control (P=0.7349).	4.2.1.1-19 (RD-009)
To study anti-tumor efficacy of enfortumab vedotin	Female CB17/SCID mice xenografted subcutaneously with AG-B8	n=10	0 (vehicle control), 0.5, 1.0, 1.5 mg/kg biweekly iv administration x 3 times	Enfortumab vedotin at all tested dosages of 0.5, 1.0 and 1.5 mg/kg statistically significantly regressed the tumors when compared to the starting tumor size at the commencement of dosing.	4.2.1.1-20 (参) (ES-015)
To study anti-tumor efficacy of AGS-22M6E and enfortumab vedotin	Female ICR SCID mice xenografted subcutaneously with AG-Br7	n=10	0 (vehicle control), 1.0, 2.0 mg/kg biweekly iv administration x 6 times	Both AGS-22M6E and enfortumab vedotin when dosed at 2 mg/kg showed statistically significant tumor growth inhibition compared to the control. AGS-22M6E and enfortumab vedotin resulted in similar tumor regression at 2.0 mg/kg and no statistical difference was observed between the 2 groups at both 1.0 and 2.0 mg/kg. These results demonstrate that the in vivo efficacy of AGS-22M6E and enfortumab vedotin is comparable.	4.2.1.1-21 (RD-002)

AG-B1: bladder cancer patient derived cell; AG-B8: bladder cancer patient derived cell; AG-Br7: breast cancer patient derived cell; AGS-22M6E: hybridoma-derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; CB17/SCID: immunodeficient mouse strain; ICR SCID: immunodeficient mouse strain

2.6.3.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験に該当する試験は実施しなかった。

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：エンホルツマブ ベドチン, MMAE 及び AGS-22M6E

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP compliance	CTD number (Study Number)
Cardiovascular system (hERG current)	hERG transfected HEK293 cells	in vitro	MMAE: 0, 10, 100 µmol/L Cisapride hydrate: 25 nmol/L	4 cells (MMAE: 0, 10, 100 µmol/L) 2 cells (Cisapride hydrate: 25 nmol/L)	MMAE resulted in concentration related inhibition of peak hERG tail current Suppression rate (compared to baseline) Control: 0.063 MMAE 10 µmol/L: 0.103 MMAE 100 µmol/L: 0.237* Cisapride hydrate 25 nmol/L: 0.743 IC ₅₀ value: > 100 µmol/L	Yes	4.2.1.3-1 (129-09-001)
Central nervous system (behavior)	Sprague-Dawley rat	iv bolus	0 (vehicle control), 2, 5, 10 (AGS-22M6E) 10 mg/kg (AGS-22M6) (weekly, 4 doses)	15 males and 15 females	No abnormal behavior was observed at doses up to 10 mg/kg.	Yes	4.2.3.2-2 (20005662)
Cardiovascular system (blood pressure, heart rate, ECG)	Cynomolgus monkey	iv infusion/ (MMAE iv bolus)	0 (vehicle control), 1, 3, 6 (AGS-22M6E), 6 (AGS-22M6), and 0.1093/0.0545 mg/kg (MMAE)† (weekly, 4 doses)	5 males and 5 females	No changes in blood pressure, ECG or heart rate were noted at dose of AGS-22M6E up to 6 mg/kg or doses of MMAE up to 0.1093 mg/kg	Yes	4.2.3.2-4 (20005664)
Central nervous and respiratory system (behavior, body temperature, respiratory rate, heart rate)	Cynomolgus monkey	iv infusion	0 (vehicle control), 3 (AGS-22M6E) and 3 mg/kg (enfortumab vedotin) (weekly, 4 doses)	5 males and 5 females (2 males and 2 females in the control group)	In the veterinary physical examinations, there were no reports of abnormal behavior, body temperatures were within the normal range, and there were no significant changes in respiratory rate or heart rate.	Yes	4.2.3.2-5 (20021751)

AGS-22M6: unconjugated hybridoma-derived fully human monoclonal antibody targeting Nectin-4; AGS-22M6E: hybridoma-derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; ECG: electrocardiogram; GLP: Good Laboratory Practice; HEK: human embryonic kidney; hERG: human ether-à-go-related gene; MMAE: monomethyl auristatin E

*significantly different compared to control, P<0.05 (Student's t-test)

†The first two doses of MMAE on Days 1 and 8 were administered at 0.1093 mg/kg. Dose level reduction to 0.0545 mg/kg commenced beginning with the Day 15 dose.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験に該当する試験は実施しなかった。