

## 目次

2.6.4	薬物動態試験の概要文	5
2.6.4.1	まとめ	5
2.6.4.2	分析法	7
2.6.4.3	吸収及び血清中濃度	10
2.6.4.4	分布	25
2.6.4.5	代謝	27
2.6.4.6	排泄	32
2.6.4.7	薬物動態学的薬物相互作用	32
2.6.4.8	その他の薬物動態試験	35
2.6.4.9	考察及び結論	35
2.6.4.10	図表	37
2.6.4.11	参考文献	37

## 表

表 2.6.4- 1	ADC の分析法一覧	8
表 2.6.4- 2	TAb の分析法一覧	8
表 2.6.4- 3	MMAE の分析法一覧	9
表 2.6.4- 4	ATA の分析法一覧	10
表 2.6.4- 5	雌雄ラットに AGS-22M6E を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの Day 1 及び Day 22 における血清中 ADC, TAb 及び MMAE の TK パラメータ	13
表 2.6.4- 6	雌雄ラットに AGS-22M6 を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの Day 1 及び Day 22 における血清中 AGS-22M6 の TK パラメータ	14
表 2.6.4- 7	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初回及び最終投与後の ADC 及び TAb の TK パラメータ	17
表 2.6.4- 8	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初回及び最終投与後の MMAE の TK パラメータ	18
表 2.6.4- 9	カニクイザルに AGS-22M6 あるいは AGS-22M6E の 6 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの初回投与後の TK パラメータの比較	18
表 2.6.4- 10	AGS-22M6E（対照物質）とエンホルツマブ ベドチン（被験物質）の ADC の AUC <sub>168h</sub> 及び C <sub>max</sub> の幾何平均比並びに 90%信頼区間	23
表 2.6.4- 11	被験物質、投与方法及び動物種ごとの ATA 発現率	25

表 2.6.4- 12 ヒトにブレンツキシマブ ベドチンを単回静脈内投与したとき及びラットに MMAE を単回静脈内投与したときの MMAE の in vivo 代謝物プロファイル.....	30
表 2.6.4- 13 ラットに <sup>3</sup> H]MMAE の 0.056 mg/kg を単回静脈内投与したときの放射能の尿及び糞中排泄 .....	32

図

図 2.6.4- 1 ラットに AGS-22M6E を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中 ADC, TAb 及び MMAE 濃度推移.....	12
図 2.6.4- 2 ラットに AGS-22M6 あるいは AGS-22M6E の 10 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中 AGS-22M6 濃度推移並びに血清中 AGS-22M6E の ADC 及び TAb 濃度推移の比較.....	14
図 2.6.4- 3 カニクイザルに AGS-22M6E の 1, 3 及び 6 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの平均血清中 ADC 及び TAb 濃度推移 .....	19
図 2.6.4- 4 カニクイザルに AGS-22M6E の 1, 3 及び 6 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの初回投与後の血清中 MMAE 濃度推移と ADC 及び TAb 濃度推移の比較 .....	20
図 2.6.4- 5 カニクイザルに AGS-22M6 あるいは AGS-22M6E の 6 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中 AGS-22M6 あるいは AGS-22M6E の ADC 及び TAb 濃度推移の比較.....	21
図 2.6.4- 6 雌雄カニクイザルに AGS-22M6E あるいは MMAE を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中 MMAE 濃度推移の比較.....	22
図 2.6.4- 7 カニクイザルに AGS-22M6E あるいはエンホルツマブ ベドチン（AGS-22C3E）を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中 ADC, TAb 及び MMAE 濃度推移 .....	24
図 2.6.4- 8 MMAE のラット, カニクイザル及びヒトにおける in vitro 推定代謝経路.....	28
図 2.6.4- 9 MMAE のラット糞中で同定された代謝物.....	29
図 2.6.4- 10 MMAE のヒトにおける in vivo 推定代謝経路.....	31

## 略語及び用語の一覧

略語及び用語	定義
$^3\text{H}$	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
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
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 antibody : 抗薬物抗体
AUC	area under the concentration-time curve : 濃度時間曲線下面積
AUC <sub>168h</sub>	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
AUC <sub>last</sub>	area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration : 最終測定可能時点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
CHO	Chinese hamster ovary : チャイニーズハムスター卵巣（細胞）
CI	confidence interval : 信頼区間
C <sub>max</sub>	maximum concentration : 最高濃度
CYP	cytochrome P450 : チトクロム P450
DAP	dolaproline : ドラプロリン
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay : 酵素免疫測定
GMR	geometric mean ratio : 幾何平均比
HEK	human embryonic kidney : ヒト胎児由来腎
HPLC	high performance liquid chromatography : 高速液体クロマトグラフィー
IC <sub>50</sub>	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 <sub>I</sub>	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
K <sub>inact</sub>	maximal inactivation rate constant : 最大不活性化速度定数
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry : 液体クロマトグラフィーータンデムマススペクトロメトリー
LLQ	lower limit of quantitation : 定量下限
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
NADPH	reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate : 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
OAT	organic anion transporter : 有機アニオントランスポーター

略語及び用語	定義
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
P-gp	P-glycoprotein：P-糖蛋白
QC	quality control：精度管理
$t_{1/2}$	(apparent) terminal half-life：（見かけの）消失半減期
TA <sub>b</sub>	total antibody：総抗体
t	time to reach maximum concentration：最高濃度到達時間
ULQ	upper limit of quantitation：定量上限
vc	valine-citrulline：バリンーシトルリン

## 2.6.4 薬物動態試験の概要文

### 2.6.4.1 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ニン-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  $\kappa$  抗体と微小管阻害薬モノメチルアウリスチン 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、一連の非臨床薬物動態試験によりエンホルツマブ ベドチンの薬物動態学的評価を実施した。

当初、ハイブリドーマ細胞株由来 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）細胞株由来の 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。

エンホルツマブ ベドチン、AGS-22M6E、AGS-22M6（薬物非結合型抗体）及び MMAE の薬物動態は、ラット及びカニクイザルの両方、あるいはいずれか一方を用いた反復静脈内投与の毒性試験におけるトキシコキネティクスとして評価した。ラット及びカニクイザルにおけるトキシコキネティクス並びに分布、代謝及び排泄に関する *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果を本薬物動態試験の概要文及び 2.6.5 薬物動態試験概要表に記載した。これらの動物種はエンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E が Nectin-4 と交差反応性を示し、エンホルツマブ ベドチン、AGS-22M6E 及び MMAE の毒性評価動物としても選択されている。エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E は、ブレンツキシマブ ベドチン [アドセトリス® US 添付文書, 2019 年 10 月] と同じリンカーを有するため、MMAE の血漿蛋白結合率、代謝、排泄及び *in vitro* 薬物相互作用はブレンツキシマブ ベドチンの試験結果で評価した。したがって、エンホルツマブ ベドチンあるいは AGS-22M6E に関して、新たな分布、代謝及び排泄試験は実施していない。

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（GMR）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抗薬物抗体（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の ADC 及び総抗体（TA<sub>b</sub>）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 TA<sub>b</sub> 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 TA<sub>b</sub> 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 TA<sub>b</sub> の方が ADC と比較して大きかった。ADC の  $t_{1/2}$  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。TA<sub>b</sub> 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、TA<sub>b</sub> 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 TA<sub>b</sub> 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、ラットに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。MMAE をカニクイザルに 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの初回投与後の  $t_{1/2}$  は雌で 23.8 時間、雄で 21.6 時間であった。

トリチウム標識した MMAE ( $[^3H]$ 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。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 の血球移行率にも種差が認められ、2～20 nmol/L における血液／血漿濃度比はマウスで 9.47～11.8、ラットで 1.86～2.36、カニクイザルで 1.40～1.57 及びヒトで 0.926～0.976 であった。

AGS-22C3（薬物非結合抗体）はイムノグロブリン分子であり、体内でペプチドやアミノ酸へと分解され、その後、排泄若しくは体内で再利用されることが考えられることから、抗体部分の代謝試験は実施していない。MMAE は合成されたペンタペプチドであり、*in vitro* 代謝試験においてチトクロム P450（CYP）により代謝された。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あるい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。

$[^3H]$ 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。

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において、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。

## 2.6.4.2 分析法

各動物におけるトキシコキネティクスを評価するために、エンホルツマブ ベドチンの抗体部分及び低分子部分の測定に、それぞれ異なる分析法を使用した。種々の生体試料における抗体の測定には酵素免疫測定（ELISA）法を、MMAE の測定には液体クロマトグラフィー・タンデムマスペクトロメトリー（LC-MS/MS）法を使用した。全てのトキシコキネティクス評価にはバリデートされた分析法を使用した。

### 2.6.4.2.1 分析対象

エンホルツマブ ベドチンのトキシコキネティクス評価における分析対象は、ADC（AGS-22M6E あるいはエンホルツマブ ベドチン）、TAb, MMAE 及び ATA とした。

#### 2.6.4.2.2 バリデートされた分析法

全ての分析は、各試料中で安定性が確認された条件下で実施した。また、市販の試薬は全て使用期限内のものを使用した。

##### 2.6.4.2.2.1 ADC 分析法

添付資料 4.2.2.1-1, 4.2.2.1-2, 4.2.2.1-3, 4.2.2.1-4

ラット及びカニクイザルの血清中の ADC 濃度は、マイクロタイタープレートを用いるバリデートされたサンドイッチ ELISA 法により測定した。[REDACTED] 抗体（SG15.22）をコーティングしたウェルで試料中 ADC を捕捉し、洗浄後、[REDACTED] 化 [REDACTED] [REDACTED] 抗体（M22-id6-1a21.1）を用いて、[REDACTED] 結合 [REDACTED] [REDACTED] 及び [REDACTED] 発色反応により検出した。真度及び精度の測定内及び測定間の許容基準は、高濃度及び中濃度精度管理（QC）試料ではそれぞれ  $100\% \pm 20\%$  及び  $\leq 20\%$ 、低濃度 QC 試料では  $100\% \pm 25\%$  及び  $\leq 25\%$  とした。各動物試料を用いた分析法の定量下限（LLQ）及び定量上限（ULQ）を表 2.6.4-1 に示す。

表 2.6.4- 1 ADC の分析法一覧

Matrix	LLQ (ng/mL)	ULQ (ng/mL)	Validation Report Number	Drug substance with which assay validated
Rat serum	40	1280	AR3587	AGS-22M6E
	80	1280	AR161-C1128-0075	Enfortumab vedotin
Cynomolgus monkey serum	40	1280	AR3590	AGS-22M6E
	80	640	AR4559	Enfortumab vedotin

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; LLQ: lower limit of quantitation; ULQ: upper limit of quantitation.

## 2.6.4.2.2.2 TAb 分析法

添付資料 4.2.2.1-5, 4.2.2.1-6, 4.2.2.1-7

ラット及びカニクイザルの血清中の TAb 濃度は、マイクロタイタープレートを用いるバリデートされたサンドイッチ ELISA 法により測定した。抗体（M22-id6-1a21.1）をコーティングしたウェルで試料中 TAb を捕捉し、洗浄後、抗体（M22-id6-1a34.1）を用いて、結合及び発色反応により検出した。真度及び精度の測定内及び測定間の許容基準は、高濃度及び中濃度 QC 試料ではそれぞれ  $100\% \pm 20\%$  及び  $\leq 20\%$ 、低濃度 QC 試料では  $100\% \pm 25\%$  及び  $\leq 25\%$  とした。各動物試料を用いた分析法の LLQ 及び ULQ を表 2.6.4- 2 に示す。

表 2.6.4- 2 TAb の分析法一覧

Matrix	LLQ (ng/mL)	ULQ (ng/mL)	Validation Report Number	Drug substance with which assay validated
Rat serum	40	1280	AR3588	AGS-22M6E
Cynomolgus monkey serum	40	1280	AR3591	AGS-22M6E
	80	640	AR4560	Enfortumab vedotin

AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; LLQ: lower limit of quantitation; ULQ: upper limit of quantitation.

## 2.6.4.2.2.3 MMAE 分析法

添付資料 4.2.2.1-8, 4.2.2.1-9

ラット及びカニクイザルの血清中の MMAE 濃度は、バリデートされた LC-MS/MS 法により測定した。MMAE 及び内標準物質（ ）は固相抽出により各試料から抽出した。抽出液を窒素下で蒸発乾固し残渣を再溶解した後、LC-MS/MS を用いて測定した。真度及び精度の測定内及び測定間の許容基準は、高濃度、中濃度及び低濃度 QC 試料ではそれぞれ  $100\% \pm 15\%$  及び  $\leq 15\%$ 、LLQ 試料では  $100\% \pm 20\%$  及び  $\leq 20\%$  とした。各動物試料を用いた分析法の LLQ 及び ULQ を表 2.6.4- 3 に示す。



表 2.6.4-3 MMAE の分析法一覧

Matrix	LLQ (ng/mL)	ULQ (ng/mL)	Validation Report Number
Rat serum	0.01	10	8226174
Cynomolgus monkey serum	0.01	10	8226175

LLQ: lower limit of quantitation; MMAE: monomethyl auristatin E; ULQ: upper limit of quantitation.

#### 2.6.4.2.2.4 ATA 分析法

添付資料 4.2.2.1-10、4.2.2.1-11、4.2.2.1-12、4.2.2.1-13

ラット及びカニクイザルの血清中の ATA 検出には、バリデートされた ELISA 法（ATA の捕捉及び検出に AGS-22M6E あるいはエンホルツマブ ベドチンを用いるブリッジング法）を使用した。AGS-22M6E あるいはエンホルツマブ ベドチンをコーティングしたウェルで試料中の ATA を捕捉し、XXXXXXXXXX 化 AGS-22M6E あるいは XXXXXXXXXX 化エンホルツマブ ベドチンを用いて、XXXXXX  
XXXXXXXXXX 結合 XX 及び XXXXXX 発色反応により検出した。陽性対照には AR161-C1128-XXXXXX-0077 試験では M22-id6-1a21.1 を用い、その他の試験では M22-id6-1b40p を用いた。各動物試料を用いた分析法の感度及び試料中に共存する薬物による影響を表 2.6.4-4 に示す。

AGS-22M6E の試験では、AGS-22M6E 100 ng/mL までの共存下で陽性対照 30 ng/mL の ATA 検出に影響がなく（AR3589 試験及び AR3592 試験）、カニクイザル血清を用いたエンホルツマブ ベドチンの試験では、エンホルツマブ ベドチン 1000 ng/mL までの共存下で陽性対照 30 ng/mL の ATA 検出に影響がなかった（AR4562 試験）。ラット血清を用いたエンホルツマブ ベドチンの試験では、当時の FDA の免疫原性試験のアッセイに関するドラフトガイダンスに基づいて、陽性対照 30 ng/mL ではなく 500 ng/mL を代替指標として用いた。この測定法において必要な最小希釈倍率が増加することにもない感度は低下したが、エンホルツマブ ベドチン 250 ng/mL までの共存下で ATA 検出に影響はなかった（AR161-C1128-0077 試験）。

表 2.6.4- 4 ATA の分析法一覧

Matrix	Sensitivity (ng/mL)	Drug tolerance† at 30 ng/mL M22- id6-1b40p or M22-id6- 1a21.1 (ng/mL)	Drug tolerance† at 2.5 ng/mL M22-id6-1b40p or M22-id6- 1a21.1 (ng/mL)	Validation Report Number	Drug product with which assay validated
Rat serum	0.5	100	10	AR3589	AGS-22M6E
Rat serum	63.94	250‡	ND	AR 1-C1128- -0077	Enfortumab vedotin
Cynomolgus monkey serum	1.0	100	10	AR3592	AGS-22M6E
Cynomolgus monkey serum	1.96	1000	1000	AR4562	Enfortumab vedotin

AGS-22M6E: hybridoma-derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; ND: not determined.

† Drug is equivalent to enfortumab vedotin or AGS-22M6E.

‡ Drug tolerance was determined with 500 ng/mL rather than 30 ng/mL of M22-id6-1a21.1.

### 2.6.4.3 吸収及び血清中濃度

ラット及びカニクイザルに AGS-22M6E, AGS-22M6 あるいはエンホルツマブ ベドチンを静脈内投与したときの AGS-22M6E, AGS-22M6, エンホルツマブ ベドチン, MMAE 及び TAb のトキシコキネティクスを評価した。また、カニクイザルに MMAE を静脈内投与したときの MMAE のトキシコキネティクスについても評価した。これらの試験で得られた主な知見を以下に示す。

- ラット及びカニクイザルにおいて、AGS-22M6E の曝露量はほぼ投与量に比例しており、性差は認められなかった。また、TAbs の曝露量は ADC と比較して高かった。ラット及びカニクイザルに AGS-22M6E を投与したときの血清中の MMAE の最高濃度は、モル濃度換算でそれぞれ ADC の最高濃度の約 0.2%及び約 0.04%であった。AGS-22M6E を 1 週間に 1 回 4 週間反復投与したとき、ADC, TAb 及び MMAE の曝露量に蓄積性は認められなかった。
- カニクイザルにおいて、エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E のトキシコキネティクスは同等であった。
- AGS-22M6E に対する ATA の発現率は、ラットに比べてカニクイザルで高い傾向にあった。カニクイザルにおいて、エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E に対する ATA の発現率は同等であった。ATA の生成は、反復投与したときの血清中の ADC 濃度及び TAb 濃度に影響を与える可能性が示唆された。

### 2.6.4.3.1 ラットにおける血清中濃度

#### 2.6.4.3.1.1 Sprague-Dawley ラットに AGS-22M6E あるいは AGS-22M6 を反復投与したときの AGS-22M6E, AGS-22M6, TAb 及び MMAE のトキシコキネティクス

添付資料 4.2.3.2-2

ラットを用いた 4 週間毒性試験において、AGS-22M6E あるいは AGS-22M6 を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときのトキシコキネティクスを評価した（20005662 試験）。

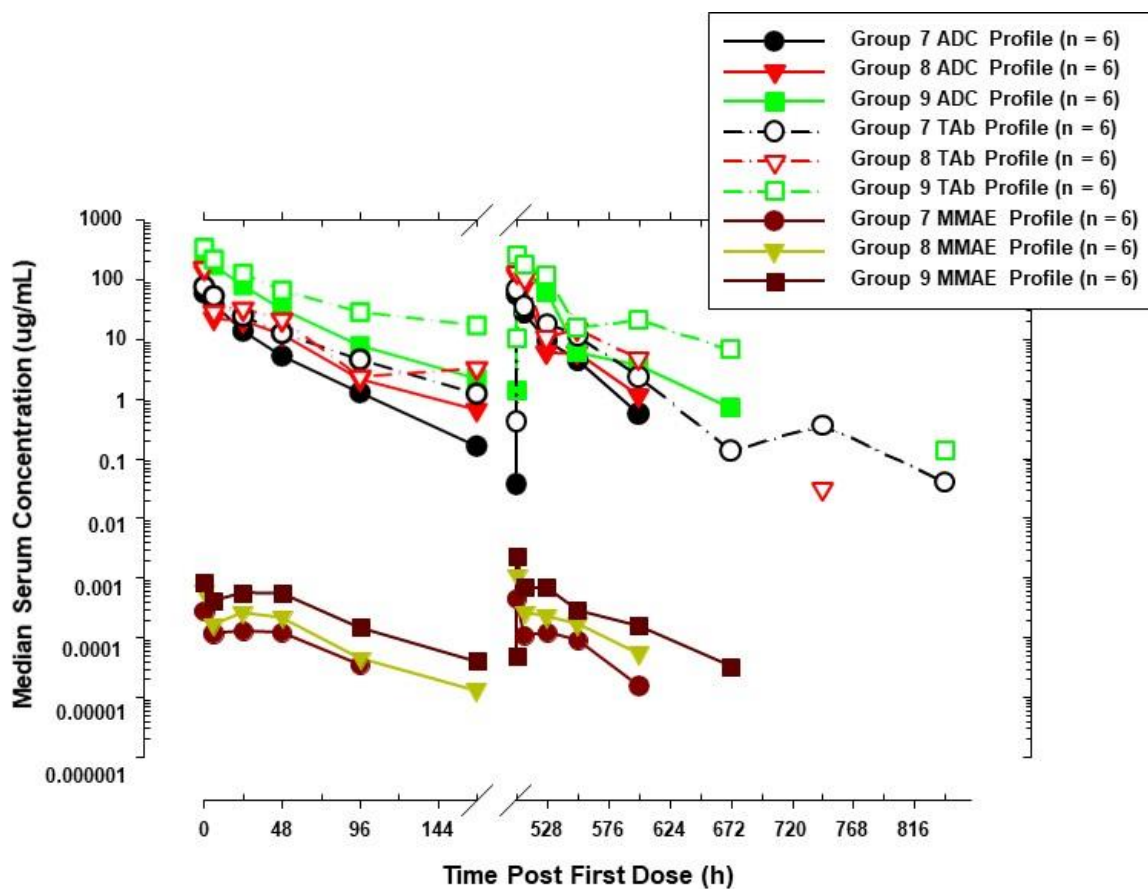
AGS-22M6E を投与後の血清中の ADC 濃度及び TAb 濃度は、投与終了直後に最高濃度に達し、その後速やかに低下した。消失は二相性を示し、AGS-22M6E の投与量が 2～10 mg/kg の範囲において、 $t_{1/2}$  は ADC で 0.887～1.29 日及び TAb で 1.33～2.16 日であった（表 2.6.4-5 及び図 2.6.4-1）（2.6.5.4.1 AGS-22M6E をラットに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス）。AGS-22M6E を投与後の ADC 及び TAb の AUC 及び  $C_{max}$  は、2～10 mg/kg の範囲で投与量に比例して増加した。血清中の TAb 濃度は ADC 濃度と比較して特に遅い時間で高く、TAб の  $AUC_{last}$  は ADC の  $AUC_{last}$  と比較して大きかった。ADC 及び TAb のトキシコキネティクスは、雌雄のラットで同等であった。

AGS-22M6E を投与後の血清中 MMAE 濃度は、定量可能ではあるが非常に低かった。MMAE のトキシコキネティクスは、雌雄のラットで同等であった。MMAE の  $t_{1/2}$  は、2～10 mg/kg の投与量範囲で 0.940～1.93 日であった。MMAE の  $AUC_{168h}$  及び  $C_{max}$  は、AGS-22M6E の投与量に比例して増加した。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  $AUC_{168h}$  は初回及び最終投与後で同程度であり、1 週間に 1 回の投与による全身への蓄積はほとんどないか、全くないと考えられた。AGS-22M6E を投与したときの MMAE の最高濃度は、モル濃度換算で ADC の最高濃度の約 0.2% であった。

AGS-22M6 の 10 mg/kg を静脈内投与したときの血清中の AGS-22M6 濃度は AGS-22M6E を投与したときの ADC 濃度と比較して長時間持続し、初回投与後の  $t_{1/2}$  は雄で 4.62 日及び雌で 4.66 日であった（表 2.6.4-6 及び図 2.6.4-2）（2.6.5.4.2 AGS-22M6 をラットに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス）。AGS-22M6 のトキシコキネティクスは雌雄のラットで同等であった。

AGS-22M6E を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの AGS-22M6E の蓄積性は ATA の発現により正確には確認できなかったが、ATA の発現により AUC は減少する傾向が認められた。AGS-22M6E あるいは AGS-22M6 を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したとき、免疫応答が誘導され ATA が生成した。セロコンバージョンの程度は、雌雄のラットで同等であった。セロコンバージョン率は、AGS-22M6E の 2, 5 及び 10 mg/kg の投与群で、それぞれ 35%（陽性 10 例／総数 29 例）、20%（6／30）及び 7%（2／29）であった。また、AGS-22M6 の 10 mg/kg の投与群では 10%（3／30）であった。AGS-22M6E の投与量の増加に伴いセロコンバージョン率が低下する傾向が認められたが、AGS-22M6E が ATA 検出に影響を与えている可能性が考えられた。

図 2.6.4- 1 ラットに AGS-22M6E を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中 ADC, TAb 及び MMAE 濃度推移



ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; MMAE: monomethyl auristatin E; TAb: total antibody. Rats were administered AGS-22M6E intravenously once per week at 2 mg/kg (Group 7), 5 mg/kg (Group 8) or 10 mg/kg (Group 9). Data are from sex-combined groups.

Source: Study 20005662, Figure 7

表 2.6.4- 5 雌雄ラットに AGS-22M6E を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの Day 1 及び Day 22 における血清中 ADC, TAb 及び MMAE の TK パラメータ

AGS-22M6E Dose	2 mg/kg				5 mg/kg				10 mg/kg			
Day	1		22		1		22		1		22	
Sex	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
TK Parameters†	ADC (Antibody Drug Conjugate)											
AUC <sub>last,‡</sub> (µg·h/mL)	1120	1180	549	1050	883	2250	1390	1960	5630	6570	3570	4170
C <sub>max</sub> (µg/mL)	55.0	59.7	52.8	55.3	24.6	137	96.9	124	280	271	153	209
t <sub>1/2</sub> (day)	0.887	1.13	NR	NR	1.21	1.09	NR	NR	1.20	1.29	NR	NR
TK Parameters	TAbs (Total Antibody)											
AUC <sub>last,‡</sub> (µg·h/mL)	1910	2190	832	2330	974	3940	1770	3370	9680	11600	6720	7700
C <sub>max</sub> (µg/mL)	69.6	74.8	63.2	69.6	27.5	160	121	147	332	324	194	260
t <sub>1/2</sub> (day)	1.33	1.50	NR	NR	1.68	NR	NR	NR	2.01	2.16	NR	NR
TK Parameters	MMAE											
AUC <sub>168h</sub> (ng·h/mL)	9.86	12.6	7.19	11.9	20.0	20.5	14.5	25.4	43.0	51.3	36.2	69.6
C <sub>max</sub> (ng/mL)	0.291	0.255	0.473	0.405	0.516	0.644	1.11	1.09	0.820	0.870	1.89	2.82
t <sub>max</sub> (h)	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167
t <sub>1/2</sub> (day)	1.46	1.40	NR	1.93	1.30	0.940	1.61	NR	1.46	1.32	1.52	1.42

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; MMAE: monomethyl auristatin E; NR: not reported due to unacceptable curve fitting; TAb: total antibody; TK: toxicokinetic.

† TK parameters were characterized by non-compartmental analysis and derived using median concentration-time profiles obtained using sparse sampling (3 animals/sex/group).

‡ AUC<sub>last</sub> for ADC = AUC<sub>168h</sub> for Day 1 and Day 22; AUC<sub>last</sub> for TAb = AUC<sub>168h</sub> for Day 1 and AUC<sub>336h</sub> for Day 22.

Source: Study 20005662

表 2.6.4- 6 雌雄ラットに AGS-22M6 を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの Day 1 及び Day 22 における血清中 AGS-22M6 の TK パラメータ

AGS-22M6 Dose	10 mg/kg			
Day	1		22	
Sex	F	M	F	M
TK Parameters†	AGS-22M6			
AUC <sub>last</sub> ‡ (µg·h/mL)	16600	15700	36000	23100
AUC <sub>168h</sub> (µg·h/mL)	16600	15700	21800	18700
C <sub>max</sub> (µg/mL)	320	336	370	368
t <sub>max</sub> (h)	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167
t <sub>1/2</sub> (day)	4.66	4.62	NR	NR

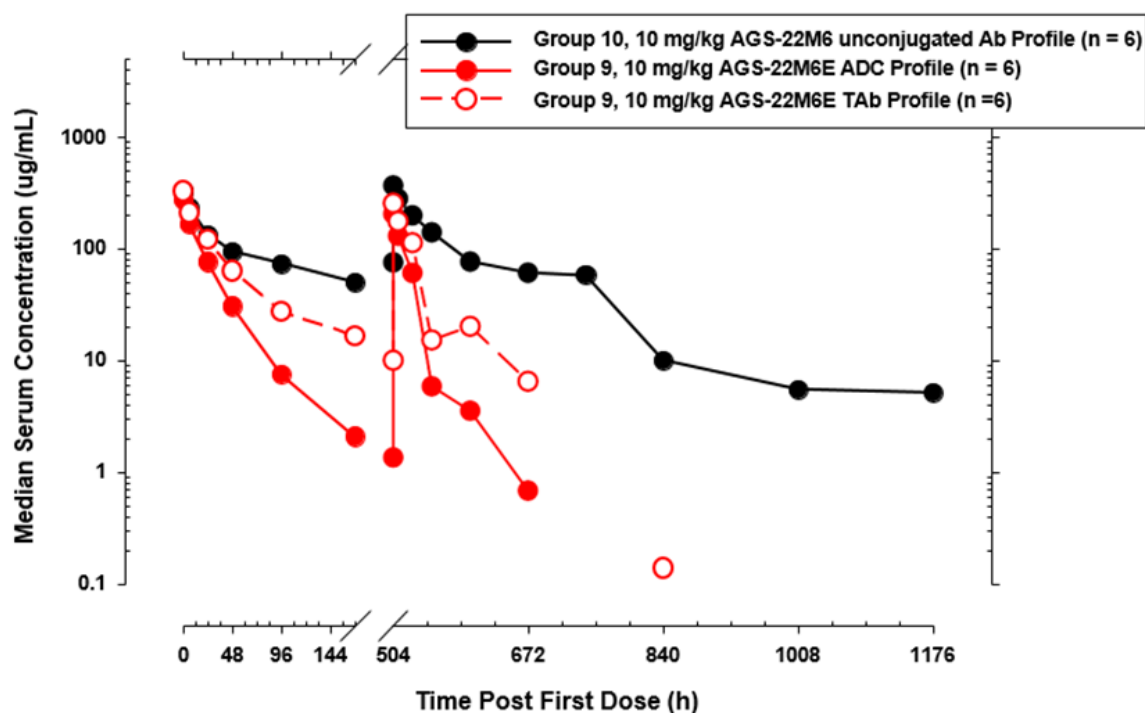
AGS-22M6: unconjugated hybridoma derived fully human monoclonal antibody targeting Nectin-4; NR: not reported due to unacceptable curve fitting; TK: toxicokinetic.

† Toxicokinetic parameters were characterized by noncompartmental analysis and derived using median concentration-time profiles obtained using sparse sampling (3 animals/sex/group).

‡ AUC<sub>last</sub> = AUC<sub>168h</sub> for Day 1 and AUC<sub>672h</sub> for Day 22.

Source: Study 20005662

図 2.6.4- 2 ラットに AGS-22M6 あるいは AGS-22M6E の 10 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中 AGS-22M6 濃度推移並びに血清中 AGS-22M6E の ADC 及び TAb 濃度推移の比較



Rats were administered AGS-22M6E (Group 9) or AGS-22M6 (Group 10) intravenously once per week. Data are from sex-combined groups.

Ab: antibody; ADC: antibody-drug conjugate; 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; TAb: total antibody.

Source: Study 20005662, Figure 8

### 2.6.4.3.2 カニクイザルにおける血清中濃度

#### 2.6.4.3.2.1 カニクイザルに AGS-22M6E, AGS-22M6 あるいは MMAE を反復投与したときの AGS-22M6E, AGS-22M6, TAb 及び MMAE のトキシコキネティクス

添付資料 4.2.3.2-4

カニクイザルを用いた 4 週間毒性試験において、AGS-22M6E, AGS-22M6 あるいは MMAE を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときのトキシコキネティクスを評価した（20005664 試験）。

血清中の ADC 濃度は、AGS-22M6E の投与終了直後に最高濃度に達し、その後二相性を示して消失した。ADC のトキシコキネティクスは雌雄のカニクイザルで同等であった。ADC の AUC 及び  $C_{\max}$  は、1~6 mg/kg の範囲で投与量に比例して増加した。初回投与後の ADC の  $t_{1/2}$  は 1.37~1.72 日で、投与量に依存しなかった（表 2.6.4-7 及び図 2.6.4-3）（2.6.5.4.3 AGS-22M6E をカニクイザルに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス）。

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かった。また、その結果として、ADC と比べて TAb の AUC は大きく、半減期も長かった。TAb のトキシコキネティクスは雌雄のカニクイザルで同等であった。AGS-22M6E の投与量が 1~6 mg/kg の範囲において、TAb の AUC 及び  $C_{\max}$  は投与量に比例して増加した。初回投与後の  $t_{1/2}$  は 2.14~2.75 日であり、投与量に依存しなかった。

AGS-22M6E の静脈内投与後、血清中の MMAE 濃度は増加し、投与後約 48 時間に最高濃度に達した（表 2.6.4-8 及び図 2.6.4-4）。MMAE のトキシコキネティクスに、明確な性差は認められなかった。MMAE の AUC 及び  $C_{\max}$  は、検討した投与量範囲において AGS-22M6E の投与量に比例して増加した。AGS-22M6E を 1~6 mg/kg で投与したときの MMAE の初回投与後の  $t_{1/2}$  は、2.58~3.08 日であった。AGS-22M6E 投与したときの MMAE の最高濃度は、モル濃度換算で ADC の最高濃度の 0.1%未満であった。

AGS-22M6E を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの ADC, TAb 及び MMAE の蓄積性は一部の動物での ATA の発現により正確には確認できなかったが、AGS-22M6E の 1 あるいは 3 mg/kg を投与したときの初回及び最終投与後の  $AUC_{\text{last}}$  に基づき算出した ADC, TAb 及び MMAE の蓄積率の平均値（標準偏差）は、それぞれ 0.51 (0.38), 0.62 (0.48) 及び 1.10 (0.30) であり、顕著な蓄積性は認められなかった。

AGS-22M6E の投与前、投与期間中の 8, 15, 22 日目及び回復期間中の 29, 50, 63 日目に得られた血清試料を用いた免疫原性試験において、AGS-22M6E 投与群の約 40%~50%の動物において ATA が発現した。さらに、1~6 mg/kg の全ての投与群において、セロコンバージョン率に性差及び投与量依存性は認められなかった。一方で、対照群では ATA が確認されなかったことから、AGS-22M6E は 1 週間に 1 回静脈内投与したとき、雌雄カニクイザルで免疫原性を示すと考えられた。



AGS-22M6E との比較のために、AGS-22M6 のトキシコキネティクスを評価した。AGS-22M6 のトキシコキネティクスは、AGS-22M6E の同用量を投与したときの ADC 及び TAb のトキシコキネティクスと比較して、より長い血中滞留性を示した（表 2.6.4-9 及び図 2.6.4-5）（2.6.5.4.4 AGS-22M6 をカニクイザルに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス）。AGS-22M6 及び AGS-22M6E の 6 mg/kg を静脈内投与したときの初回投与後の  $t_{1/2}$  の平均値（標準偏差）は、AGS-22M6 で 4.74 (0.61) 日、AGS-22M6E の ADC で 1.72

(0.18) 日及び AGS-22M6E の TAb で 2.75 (0.89) 日であった。AUC 及び  $C_{max}$  で評価した AGS-22M6 の曝露量は、同用量の AGS-22M6E を投与したときの ADC の曝露量と比較して高かった。AGS-22M6 の  $AUC_{168h}$  は、AGS-22M6E の ADC 及び TAb の  $AUC_{168h}$  のそれぞれ 2.3 倍及び 1.2 倍高かったが、AGS-22M6 の  $C_{max}$  は、AGS-22M6E の ADC 及び TAb の  $C_{max}$  と同程度であった。AGS-22M6 のトキシコキネティクスは、雌雄のカニクイザルで同等であった。

AGS-22M6E の 6 mg/kg とモル濃度換算で等しい投与量の MMAE (0.1093 mg/kg) を、カニクイザルに静脈内投与したときの MMAE のトキシコキネティクスを評価した（図 2.6.4-6）

（2.6.5.4.5 MMAE をカニクイザルに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス）。MMAE を静脈内投与したときの初回投与後の  $C_{max}$  は、雄で 270000 pg/mL 及び雌で 303000 pg/mL であり、AGS-22M6E を投与したときの初回投与後の MMAE の  $C_{max}$  (202 pg/mL) より 1340~1500 倍高かった。MMAE を静脈内投与したときの初回投与後の  $AUC_{168h}$  は雄で 154000 pg·h/mL 及び雌で 151000 pg·h/mL であり、AGS-22M6E を投与したときの初回投与後の MMAE の  $AUC_{168h}$  (24400 pg·h/mL) と比較して約 6 倍高かった。MMAE を静脈内投与したときの初回投与後の  $t_{1/2}$  は、雄で 21.6 時間及び雌で 23.8 時間であった。一方、AGS-22M6E を投与したときの初回投与後の MMAE の  $t_{1/2}$  は、雌雄平均値で 3.08 日 (73.9 時間) であった。



表 2.6.4- 7 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初回及び最終投与後の ADC 及び TAB の TK パラメータ

Analyte		ADC						TAB					
AGS-22M6E Dose		1 mg/kg		3 mg/kg		6 mg/kg		1 mg/kg		3 mg/kg		6 mg/kg	
Dosing Day		1	22†	1	22†	1	8†	1	22†	1	22†	1	8†
AUC <sub>168h</sub> (µg·h/mL)	Mean	634	471	2450	903	5080	6150	1120	1070	4530	1610	10200	9210
	SD	73.1	264	319	732	573	858	122	689	625	1220	2100	2760
	N§	10	5	10	6	10	7	6	5	10	6	9	3
AUC <sub>last</sub> (µg·h/mL)	Mean	631	466	2430	856	5050	6310	1110	1060	4470	1850	10400	11900
	SD	72.5	266	315	689	567	850	104	687	611	1290	2360	3160
	N§	10	5	10	7	10	7	10	5	10	7	10	7
C <sub>max</sub> (µg/mL)	Mean	24.6	21.2	76.6	63.7	151	137	30.3	29.6	94.4	106	200	162
	SD	2.05	5.17	7.65	16.9	16.8	24.1	3.45	7.53	12.8	59.6	33.8	21.5
	N§	10	5	10	7	10	7	10	5	10	7	10	7
t <sub>1/2</sub> (day)	Mean	1.37	1.20	1.43	0.700	1.72	1.53	2.14	1.66	2.46	1.02	2.75	1.82
	SD	0.0936	0.604	0.132	0.419	0.177	ND	0.173	1.08	0.332	0.649	0.888	0.596
	N§	10	5	10	6	10	2	6	5	10	6	9	3

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; ND: not determined; TAB: total antibody.

Sex-combined results.

† Day 8 and day 22 toxicokinetic parameters were from animals with no seroconversion on day of dosing.

§ Differences in animal numbers between analytes were due to insufficient samples from individual animals for toxicokinetic curve fitting.

Source: Study 20005664, Table 13

表 2.6.4- 8 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初回及び最終投与後の MMAE の TK パラメータ

AGS-22M6E Dose		1 mg/kg		3 mg/kg		6 mg/kg	
Dosing Day		1	22	1	22	1	8
AUC <sub>168h</sub> (pg·h/mL)	Mean	3710	4040	11700	15000	24400	24500
	SD	690	917	1040	2000	2990	2290
	N	8	7	4	8	4	7
AUC <sub>last</sub> (pg·h/mL)	Mean	3400	3370	12000	14100	23200	28900
	SD	790	1400	1400	3150	2600	2680
	N	10	10	10	10	10	7
C <sub>max</sub> (pg/mL)	Mean	34.3	42.9	105	226	202	215
	SD	5.96	6.69	12.2	142	34.2	40.0
	N	10	10	10	10	10	7
t <sub>1/2</sub> (day)	Mean	2.58	2.32	2.92	1.87	3.08	2.52
	SD	0.248	0.64	0.173	0.573	0.554	ND
	N	8	7	4	8	5	1

AGS 22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; ND: not determined

Sex-combined results.

Source: Study 20005664, Table 17

表 2.6.4- 9 カニクイザルに AGS-22M6 あるいは AGS-22M6E の 6 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの初回投与後の TK パラメータの比較

Test Article	AGS-22M6	AGS-22M6E	AGS-22M6E
Analyte	Unconjugated Ab	ADC	TAb
AUC <sub>168h</sub> (µg·h/mL)	11800 (1240)	5080 (573)	10200 (2100)
AUC <sub>last</sub> (µg·h/mL)	11500 (1210)	5050 (567)	10400 (2360)
C <sub>max</sub> (µg/mL)	182 (16.7)	151 (16.8)	200 (33.8)
t <sub>1/2</sub> (day)	4.74 (0.611)	1.72 (0.177)	2.75 (0.89)

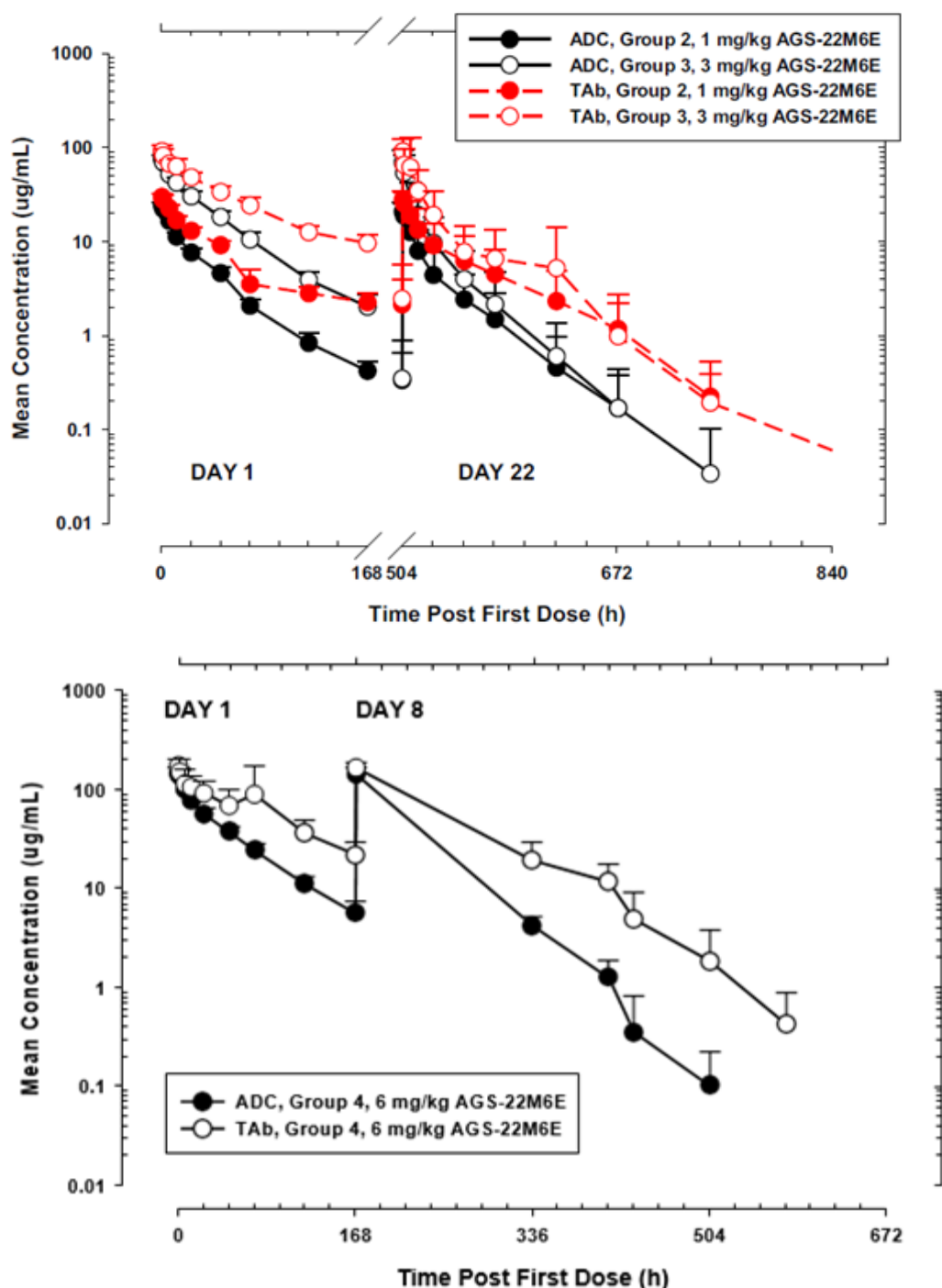
Ab: antibody; ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; TAb: total antibody.

Sex-combined results.

Toxicokinetic parameters are shown as mean (SD).

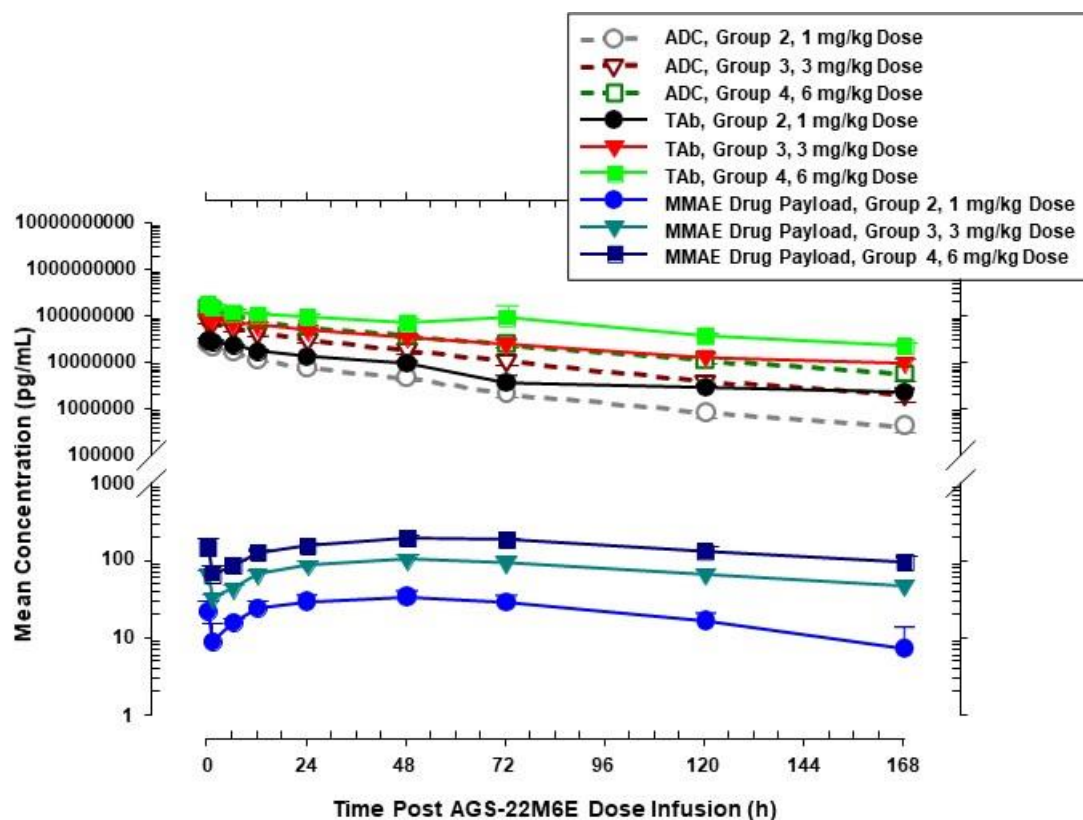
Source: Study 20005664, Table 21

図 2.6.4-3 カニクイザルに AGS-22M6E の 1, 3 及び 6 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの平均血清中 ADC 及び TAb 濃度推移



Cynomolgus monkeys were administered AGS-22M6E intravenously once per week. Data are from sex-combined groups.  
 ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; TAb: total antibody.  
 Source: Study 20005664, Figures 3 and 4

図 2.6.4- 4 カニクイザルに AGS-22M6E の 1, 3 及び 6 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの初回投与後の血清中 MMAE 濃度推移と ADC 及び TAb 濃度推移の比較

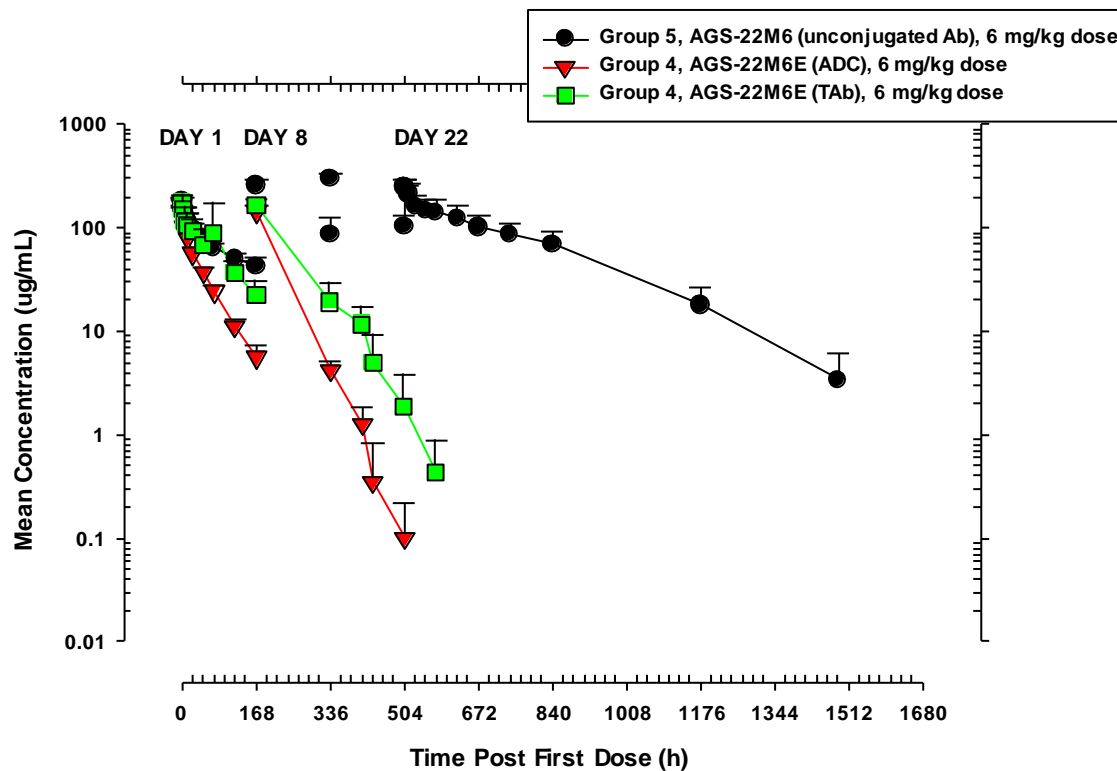


Cynomolgus monkeys were administered AGS-22M6E intravenously once per week. Data are from sex-combined groups.

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; MMAE: monomethyl auristatin E; TAb: total antibody.

Source: Study 20005664, Figure 6

図 2.6.4- 5 カニクイザルに AGS-22M6 あるいは AGS-22M6E の 6 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中 AGS-22M6 あるいは AGS-22M6E の ADC 及び TAb 濃度推移の比較

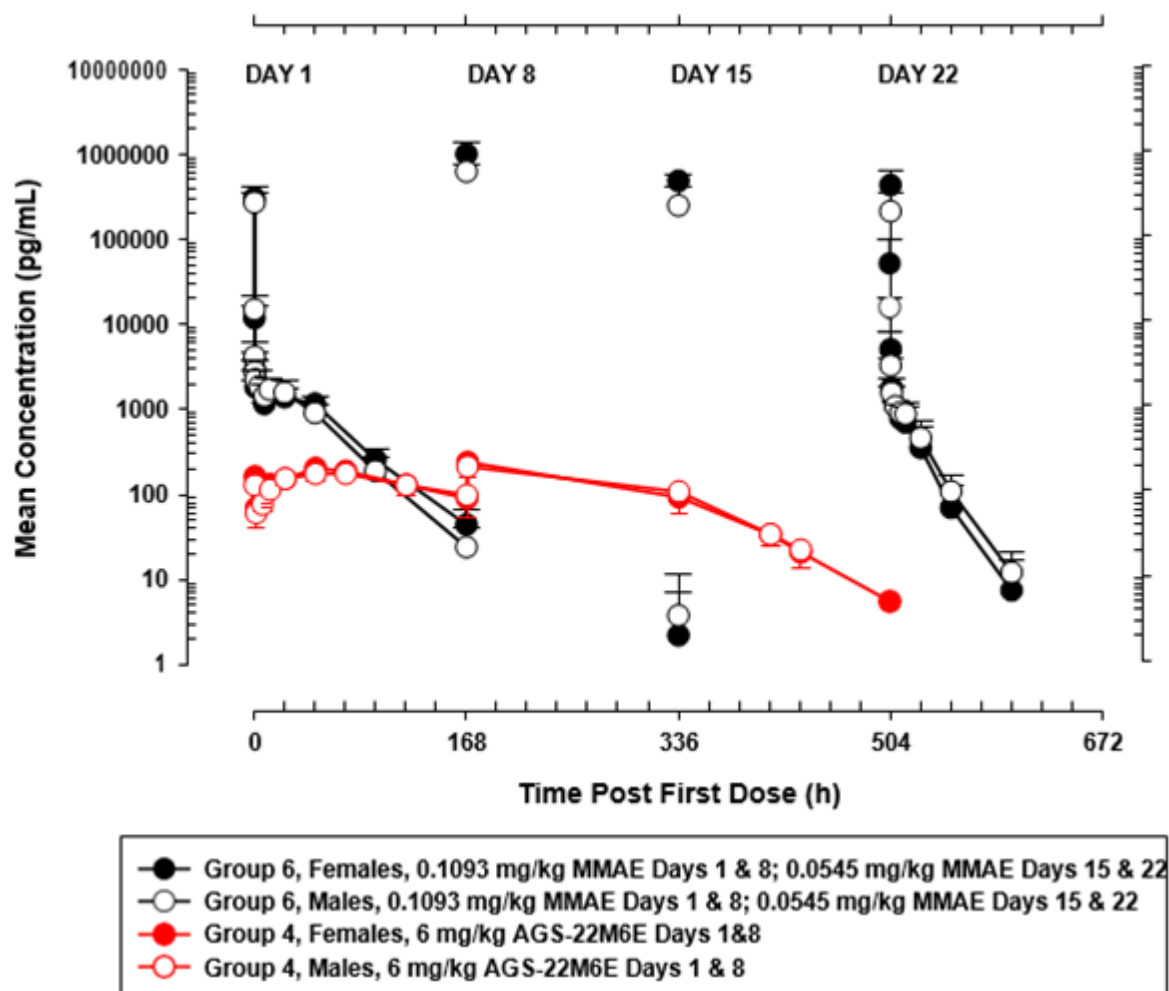


Cynomolgus monkeys were administered AGS-22M6E (Group 4) or AGS-22M6 (Group 5) intravenously once per week. Data are from sex-combined groups.

ADC: antibody-drug conjugate; 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; TAb: total antibody.

Source: Study 20005664, Figure 8

図 2.6.4-6 雌雄カニクイザルに AGS-22M6E あるいは MMAE を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中 MMAE 濃度推移の比較



Cynomolgus monkeys were administered AGS-22M6E or MMAE payload intravenously once per week.

AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; MMAE: monomethyl auristatin E.

Source: Study 20005664, Figure 10

#### 2.6.4.3.2.2 カニクイザルに AGS-22M6E あるいはエンホルツマブ ベドチンを反復静脈内投与したときの ADC, TAb 及び MMAE のトキシコキネティクス

添付資料 4.2.3.2-5

カニクイザルを用いた 4 週間毒性試験において、AGS-22M6E とエンホルツマブ ベドチンのトキシコキネティクスを比較した（20021751 試験）。AGS-22M6E あるいはエンホルツマブ ベドチンの 3 mg/kg を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中の TAb 濃度は、概して ADC 濃度よりも高かった（図 2.6.4-7）（2.6.5.4.6 AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンをカニクイザルに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス）。

クス)。ADC, TAb 及び MMAE のトキシコキネティクスに性差は認められなかった。AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンを投与したときの初回投与後の MMAE の  $t_{1/2}$  は、それぞれ 4.31 日及び 3.54 日であった。

AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンを初回投与したときの  $AUC_{168h}$  及び  $C_{max}$  に基づいて、同等性を評価した（表 2.6.4- 10）。初回投与後の  $AUC_{168h}$  及び  $C_{max}$  の GMR の 90%信頼区間（CI）が事前に規定した同等性基準（0.70～1.43）の範囲内であったことから、AGS-22M6E とエンホルツマブ ベドチンのトキシコキネティクスは同等であると考えられた。また、セロコンバージョン率は、対照群，AGS-22M6E 投与群及びエンホルツマブ ベドチン投与群で、それぞれ 0%（陽性 0 例／総数 10 例），40%（4／10）及び 40%（4／10）であった。

表 2.6.4- 10 AGS-22M6E（対照物質）とエンホルツマブ ベドチン（被験物質）の ADC の  $AUC_{168h}$  及び  $C_{max}$  の幾何平均比並びに 90%信頼区間

	No. of animals	$AUC_{168h}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )	$C_{max}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
AGS-22M6E	10	2592 (195)	77.9 (8.40)
Enfortumab vedotin	10	3000 (564)	98.0 (8.96)
GMR†	-	1.14	1.26
90% CI of the GMR	-	1.02-1.28	1.17-1.36

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; CI: confidence interval; GMR: geometric mean ratio.

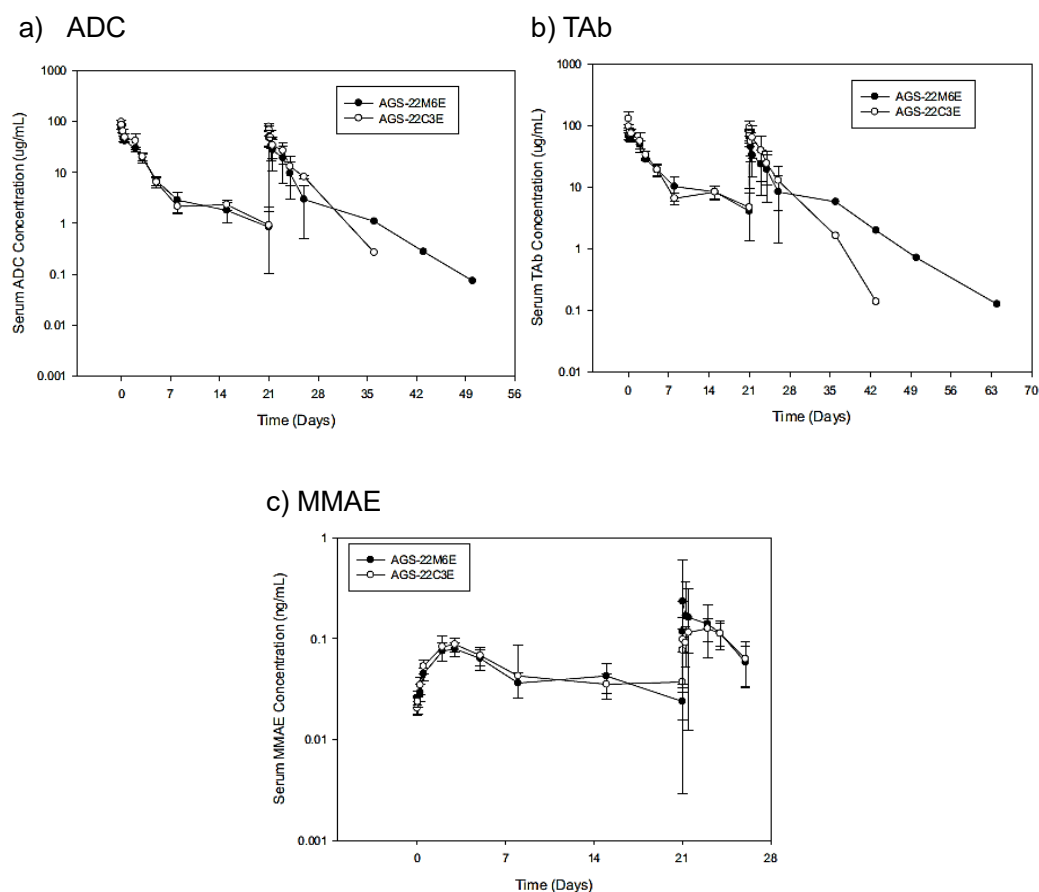
Sex-combined results.

$AUC_{168h}$  and  $C_{max}$  are presented as mean (SD).

† Ratio of test material (enfortumab vedotin) to reference material (AGS-22M6E).

Source: Study 20021751, Appendix 14, Table 3

図 2.6.4- 7 カニクイザルに AGS-22M6E あるいはエンホルツマブ ベドチン（AGS-22C3E）を 1 週間に 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの血清中 ADC, TAb 及び MMAE 濃度推移



Cynomolgus monkeys were administered AGS-22M6E or enfortumab vedotin (AGS-22C3E) intravenously once per week. Data are from sex-combined groups.

Values represent the mean  $\pm$  SD.

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22C3E: enfortumab vedotin liquid drug substance; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; MMAE: monomethyl auristatin E; TAb: total antibody.

Source: Study 20021751, Figures 1, 2 and 3

### 2.6.4.3.3 免疫原性

添付資料 [4.2.3.2-2](#), [4.2.3.2-4](#), [4.2.3.2-5](#)

ヒトの治療に用いられる多くの抗体薬は、実験動物において免疫反応を誘発する。特に、ATAの発現により、動物における全身曝露量に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、AGS-22M6E、AGS-22M6 及びエンホルツマブ ベドチンの非臨床試験では、トキシコキネティクス評価と同時に、ATA の発現についても評価した（表 2.6.4- 11）。AGS-22M6E に対する ATA の発現



率は、概してラットよりもカニクイザルで高かった。また、カニクイザルにおける ATA の発現率は、エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E で同程度であった。

表 2.6.4- 11 被験物質、投与方法及び動物種ごとの ATA 発現率

Test Material	Species	Dose Schedule	Dose (mg/kg)	ATA Incidence N/N (%)†			Report Number
				Male	Female	Pooled (M & F)	
AGS-22M6E	Rat	q1wk × 4	2	5/14 (36)	5/15 (33)	10/29 (35)	20005662
		q1wk × 4	5	4/15 (27)	2/15 (13)	6/30 (20)	
		q1wk × 4	10	1/14 (7.1)	1/15 (6.7)	2/29 (6.9)	
	Cynomolgus monkey	q1wk × 4	1	3/5 (60)	2/5 (40)	5/10 (50)	20005664
		q1wk × 4	3	2/5 (40)	2/5 (40)	4/10 (40)	
		q1wk × 2	6	1/3 (33)	2/4 (50)	3/7 (43)	
AGS-22M6	Rat	q1wk × 4	10	1/15 (6.7)	2/15 (13)	3/30 (10)	20005662
	Cynomolgus monkey	q1wk × 4	6	0/5 (0.0)	1/5 (20)	1/10 (10)	20005664
AGS-22M6E	Cynomolgus monkey	q1wk × 4	3	3/5 (60)	1/5 (20)	4/10 (40)	20021751
Enfortumab vedotin	Cynomolgus monkey	q1wk × 4	3	2/5 (40)	2/5 (40)	4/10 (40)	

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; ATA: anti-therapeutic antibody; q1wk × 4: once weekly for 4 weeks; q1wk × 2: once weekly for 2 weeks.

† Number of positive animals out of a total number of animals in the group (percent of animals with positive ATA results).

Source: Study 20005662, Table 13; Study 20005664, Table 25; Study 20021751, Table 4

#### 2.6.4.4 分布

AGS-22M6E あるいはエンホルツマブ ベドチンの分布試験は実施していないが、MMAE の分布を<sup>3</sup>H]MMAE のラット組織分布、血漿蛋白結合率及び血球移行率試験により評価した。これらの試験で得られた主な知見を、以下に示す。

- <sup>3</sup>H]MMAE 由来の放射能は Long-Evans ラットにおいて広く全身に分布し、投与後 96 時間までにほとんどの組織から消失した。
- MMAE の血漿蛋白結合率には種差が認められ、マウス及びカニクイザルと比べヒト及びラットで高かった。
- MMAE の血球移行性には種差が認められ、血液／血漿中濃度比は、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 を超えていた。

#### 2.6.4.4.1 定量的全身オートラジオグラフィー

添付資料 4.2.2.3-1 (参)

[<sup>3</sup>H]MMAE の 0.056 mg/kg を雄性 Long-Evans ラットに単回静脈内投与したときの放射能の組織分布を定量的全身オートラジオグラフィーにより評価した（96D-1201 試験）（2.6.5.5 薬物動態試験：組織分布）。Long-Evans ラットにおいて，[<sup>3</sup>H]MMAE 由来の放射能は広く全身に分布し，投与後 0.17～24 時間において，大部分の組織中放射能濃度は血液中放射能濃度よりも高かった。高い放射能濃度が測定された組織は，胆汁（投与後 0.17 時間に 1.476 µg eq./g），消化管内容物（投与後 24 時間の胃内容物の 0.019 µg eq./g～投与後 12 時間の大腸内容物の 0.975 µg eq./g）及び膀胱内容物（投与後 4 時間に 0.369 µg eq./g）であった。C<sub>max</sub> が 0.20 µg eq./g より高かった組織は，脳下垂体前葉，肺，腎皮質及び腎髄質であった。大部分の組織において，放射能は投与後 96 時間までに消失したが，胸腺，脳下垂体前葉，脳下垂体後葉及び眼球ブドウ膜では，放射能濃度がそれぞれ 0.013，0.006，0.005 及び 0.009 µg eq./g と僅かに検出された。放射能濃度は，眼球ブドウ膜（0.005 µg eq./g）を除く全ての組織において，投与後 672 時間までに定量限界未満に低下した。眼球ブドウ膜における放射能の消失が緩徐であることから，[<sup>3</sup>H]MMAE 由来の放射能成分のメラニンへの結合が示唆された。

本試験では，特に投与後 4 時間以降に血漿における <sup>3</sup>H 交換が認められたことから，組織分布結果の解釈に影響を与えている可能性が考えられた。投与後 0.17 時間で約 10%の <sup>3</sup>H 交換が認められ，以降交換率は上昇し，投与後 4 時間で 36%，投与後 12 時間で 49%，投与後 24 時間で 73%及び投与後 96 時間で 96%であった。

#### 2.6.4.4.2 血漿蛋白への結合

添付資料 4.2.2.3-2 (参)

MMAE のマウス，ラット，カニクイザル及びヒトにおける in vitro 血漿蛋白結合率を超遠心法により測定した（XXXX-0025 試験）（2.6.5.6 薬物動態試験：血漿蛋白との結合）。1～100 nmol/L の [<sup>3</sup>H]MMAE を含む血漿の蛋白結合画分を超遠心法にて分離した。血漿及び上清中の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し，血漿蛋白結合率を算出した。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。ラット及びカニクイザルでは 1～100 nmol/L の濃度範囲で血漿蛋白結合率に変化は認められなかったが，マウス及びヒトでは若干の濃度依存性が認められた。

#### 2.6.4.4.3 血球への移行

添付資料 4.2.2.3-3

MMAE のマウス，ラット，カニクイザル及びヒトにおける in vitro 血球移行性を評価した（14-0271 試験）（2.6.5.8.1 MMAE のマウス，ラット，カニクイザル及びヒトにおける血球移行

率)。2～5000 nmol/L の $^3\text{H}$ ]MMAE を含む血液を 37°C で 1 時間インキュベートした後、血液／血漿中放射能濃度比を算出した。2～20 nmol/L（臨床的に意義のある濃度）における MMAE の血液／血漿中放射能濃度比は、マウスで 9.47～11.8，ラットで 1.86～2.36，カニクイザルで 1.40～1.57 及びヒトで 0.926～0.976 であった。マウス，ラット及びカニクイザルにおける MMAE の血球への移行性は、1000 nmol/L 未満では濃度の増加とともに低下した。一方，ヒトでは顕著な濃度依存性は認められなかった。

#### 2.6.4.5 代謝

AGS-22C3 は、体内でペプチド及びアミノ酸にまで分解され排泄あるいは再利用され则认为られるため、抗体を対象とした代謝試験は実施していない。一方，MMAE については， $^3\text{H}$ ]MMAE を用いて肝細胞及び肝ミクロソームによる *in vitro* 代謝試験を実施した。代謝物の同定試験では肝細胞，CYP 同定試験では肝ミクロソーム及び CYP 発現系を使用した。これらの試験で得られた主な知見を以下に示す。

- ヒト肝細胞で生成した MMAE の代謝物は，ラットあるいはカニクイザルの肝細胞でも生成した。
- MMAE は CYP3A4 の基質であった。

##### 2.6.4.5.1 *In vitro* での代謝

###### 2.6.4.5.1.1 *In vitro* 代謝プロファイル

添付資料 4.2.2.4-1 (参)

$^3\text{H}$ ]MMAE (10  $\mu\text{mol/L}$ ) をラット，カニクイザル及びヒト肝細胞とインキュベートしたときの代謝プロファイルを検討した (■4007 試験) (2.6.5.10.3 肝細胞で生成する代謝物の推定)。ラット，カニクイザル及びヒト肝細胞と 240 分間インキュベートしたときの $^3\text{H}$ ]MMAE の減少率はそれぞれ 32%，18%及び 32%であり，肝細胞における代謝速度に大きな差は認められなかった。マススペクトロメトリー分析の結果，MMAE は水酸化，脱メチル化，脱水素及び加水分解代謝を受けると考えられた。ヒト肝細胞で生成した代謝物は，ラット，カニクイザルの両方，あるいはいずれか一方の肝細胞でも生成した。

###### 2.6.4.5.1.2 代謝酵素の同定

添付資料 4.2.2.4-2 (参)

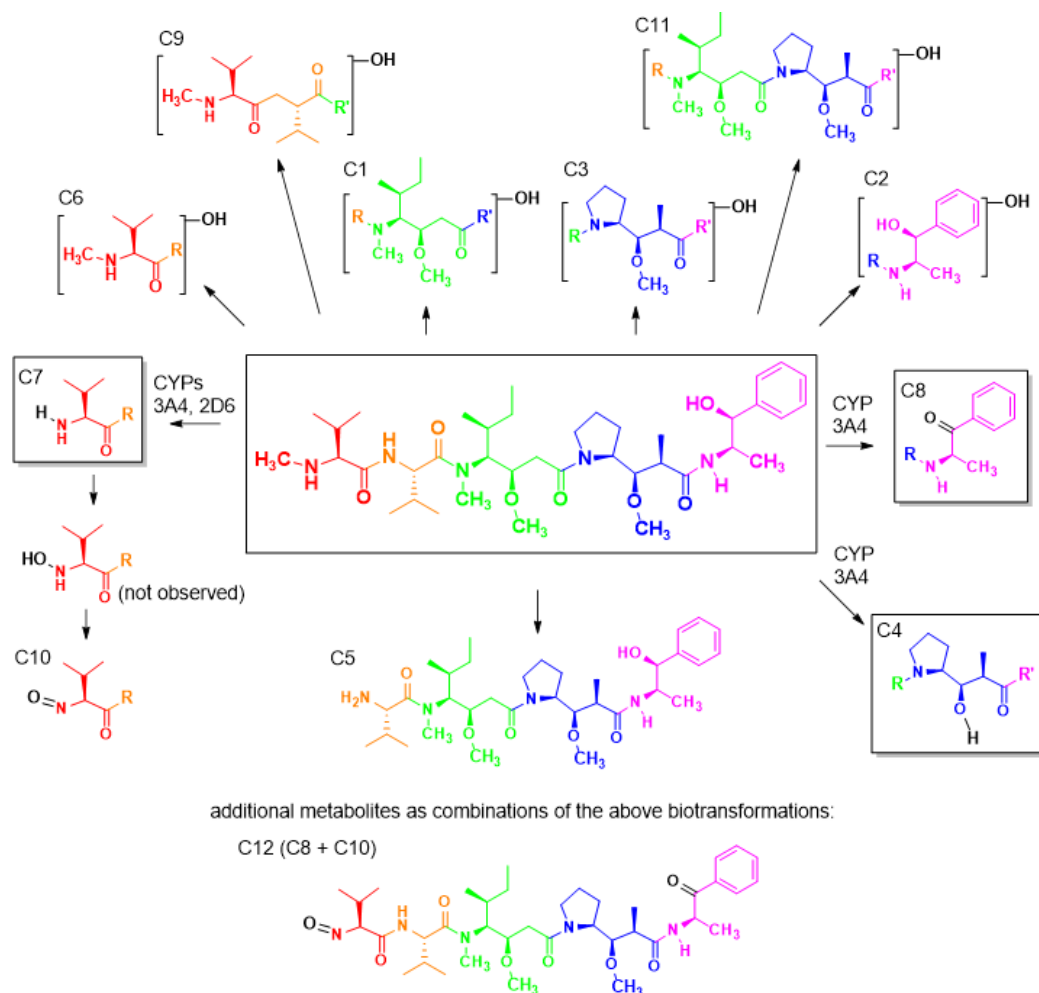
$^3\text{H}$ ]MMAE (6 及び 16  $\mu\text{mol/L}$ ) の代謝に寄与する CYP 分子種を，代謝物の生成を指標に同定した (■4006 試験) (2.6.5.10.2 MMAE の代謝に寄与する CYP 分子種の同定)。代謝物の生成は，高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -放射能検出法により定量した。 $^3\text{H}$ ]MMAE は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) 存在下に，ヒト肝ミクロソーム中

で 8 種の放射性代謝物に変換された。8 種の放射性代謝物の中で 3 種が主要な代謝物であり、質量分析の結果、これらの代謝物は [2.6.5.10.3 肝細胞で生成する代謝物の推定](#) で同定された C4 (*O*-脱メチル化体)、C7 (*N*-脱メチル化体) 及び C8 (脱水素化体) であることが確認された。

[<sup>3</sup>H]MMAE をヒト CYP 発現系とインキュベートしたところ、CYP3A4 により C4、C7 及び C8 が生成した。加えて、CYP2D6 により C7 が生成した。16 例のヒト肝ミクロソームにおける C4、C7 及び C8 の生成活性は、CYP3A4 活性と強い相関を示した。さらに、C4、C7 及び C8 の生成は、CYP3A4 の阻害剤であるケトコナゾール及び抗 CYP3A4 抗体で強く阻害された。以上の結果から、MMAE はヒト肝ミクロソームにおいて主に CYP3A4 により代謝され、一部 CYP2D6 も寄与すると考えられた。

In vitro 試験の結果に基づく MMAE の推定代謝経路を [図 2.6.4- 8](#) に示す。

図 2.6.4- 8 MMAE のラット、カニクイザル及びヒトにおける in vitro 推定代謝経路



CYP: cytochrome P450; MMAE: monomethyl auristatin E.

Metabolic profile of MMAE in vitro in rat, cynomolgus monkey and human hepatocytes. Reaction phenotyping was performed for C4, C7 and C8 (boxed), and the CYP enzymes involved in producing these metabolites are indicated.

Source: Study XXXX 4006; XXXX 4007; CPH-SGN35-001

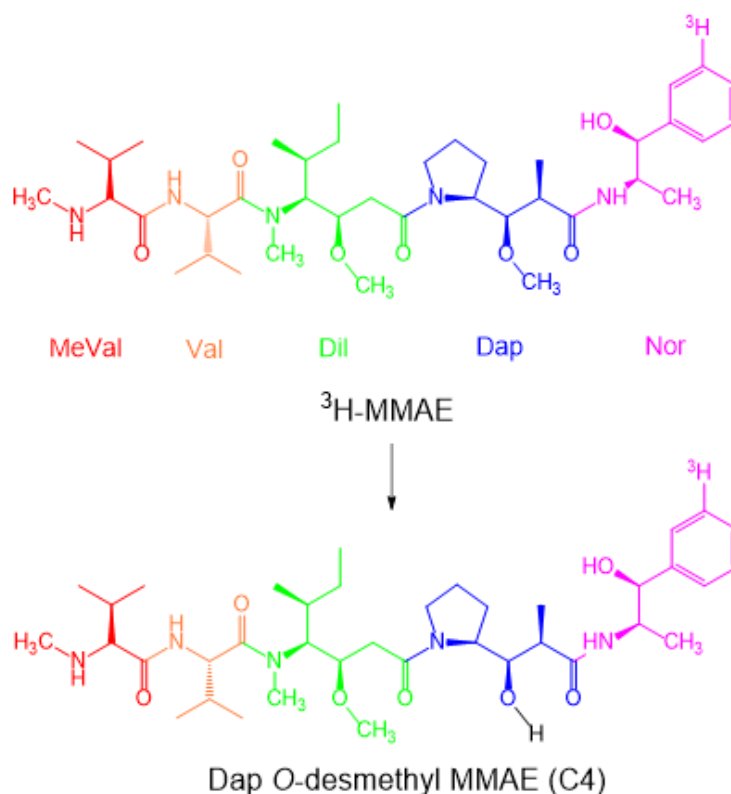
## 2.6.4.5.2 In vivo での代謝

## 2.6.4.5.2.1 MMAE のラットにおける代謝

添付資料 4.2.2.4-3（参）

[<sup>3</sup>H]MMAE の 0.056 mg/kg をラットに静脈内投与したときの尿及び糞中の代謝物について検討した（420501 試験）。尿及び糞中の代謝物は、HPLC-放射能／紫外分光法で検出し、LC-MS/MS で構造を同定した。[<sup>3</sup>H]MMAE をラットに静脈内投与したときの尿及び糞中の最大の放射能成分は未変化体であった。糞中では、未変化体に加えて、ドラプロリン（Dap）部分の *O*-脱メチル化体（C4）が検出された（表 2.6.4- 12 及び図 2.6.4- 9）。尿中にはいくつかの代謝物が認められたが、存在量が少なかったため LC-MS/MS による構造同定は実施しなかった。

図 2.6.4- 9 MMAE のラット糞中で同定された代謝物



[<sup>3</sup>H]MMAE: tritiated monomethyl auristatin E.

Structure of MMAE and metabolite identified in rat feces following dosing with [<sup>3</sup>H]MMAE.

Source: Study 420501

## 2.6.4.5.2.2 MMAE のヒトにおける代謝

添付資料 4.2.2.4-4（参）

エンホルツマブ ベドチンと同一のリンカー-薬物複合体を有するブレンツキシマブ ベドチンをヒトに単回静脈内投与したときの尿及び糞試料を用いて、MMAE の代謝プロファイルを検討した（CPH-SGN35-001 試験）。ブレンツキシマブ ベドチンの 1.8 mg/kg を投与した CD30 陽性の造血器腫瘍患者から、投与後 7 日間にわたり尿及び糞を採取した。尿及び糞中の MMAE の代謝物は、LC-MS/MS 法により分析した（表 2.6.4- 12）。尿中には複数の微量代謝物が検出され、それらはアミド加水分解体（C5）、水酸化体（C6）、*N*-脱メチル化体（C7）、脱水素化体（C8）、*N*-脱メチル化及び酸化体（C10）、脱水素化、*N*-脱メチル化及び酸化体（C12）並びに *O*-脱メチル化及び脱水素化体（C13）であった。糞中で検出された代謝物は、*O*-脱メチル化体（C4）と前述の C5、C8 及び C13 であった。尿及び糞中で認められた代謝物は、C13 を除き、全て *in vitro* 試験でも認められた代謝物であった（2.6.5.10.3 肝細胞で生成する代謝物の推定）。C13 は C4 と C8 の代謝経路の組み合わせによる生成物と考えられた。MMAE のヒトにおける *in vivo* 推定代謝経路を図 2.6.4- 10 に示す。

表 2.6.4- 12 ヒトにブレンツキシマブ ベドチンを単回静脈内投与したとき及びラットに MMAE を単回静脈内投与したときの MMAE の *in vivo* 代謝物プロファイル

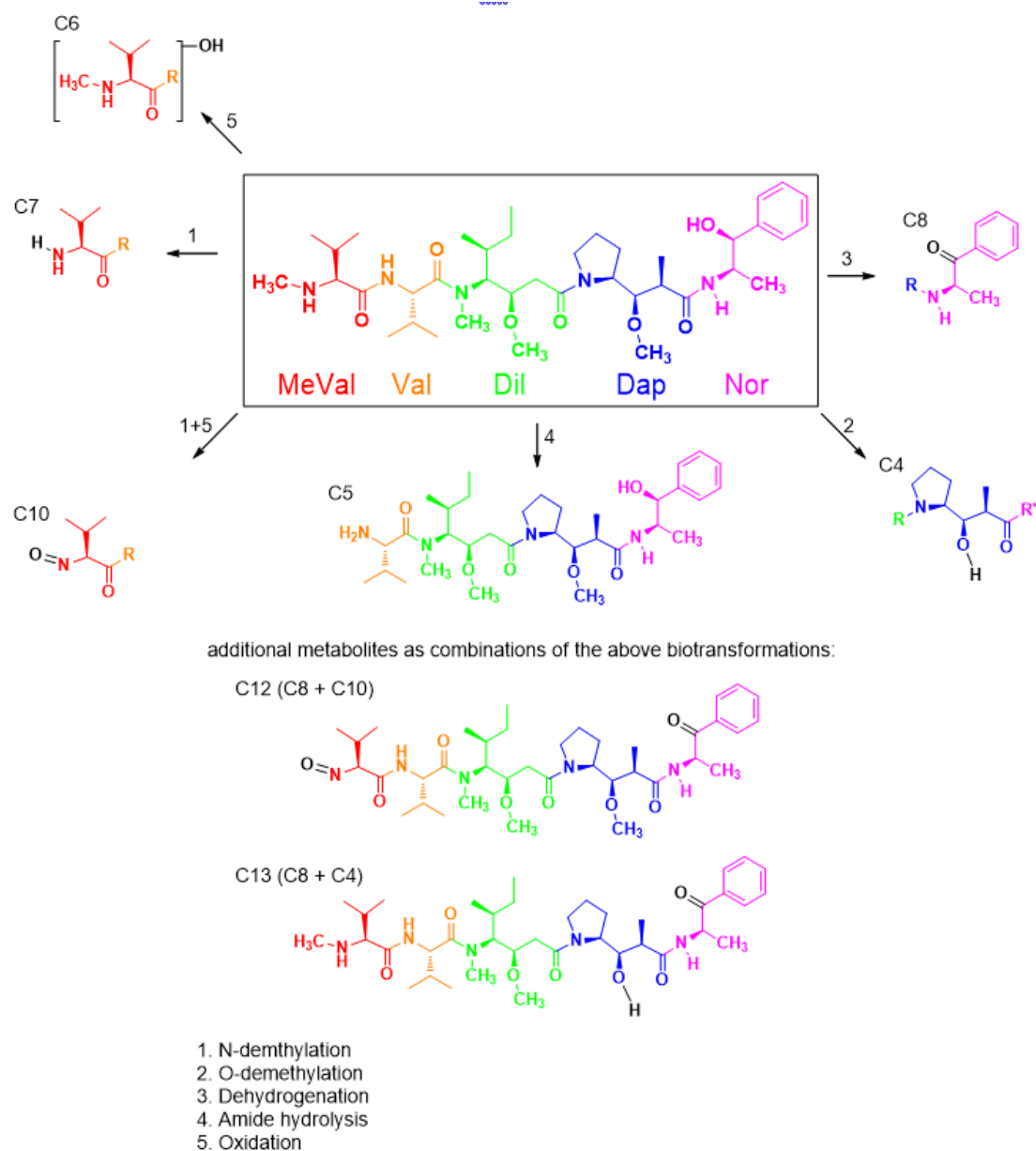
Metabolite Designation	<i>m/z</i>	Change in mass (amu) from Parent	Proposed Transformation from MMAE	Human Urine	Human Feces	Rat Feces
C1	734	+16	Hydroxylation			
C2	734	+16	Hydroxylation			
C3	734	+16	Hydroxylation			
C4	704	-14	<i>O</i> -demethylation		+	+
C5	605	-113	Amide hydrolysis	+	+	
C6	734	+16	Hydroxylation	+		
C7	704	-14	<i>N</i> -demethylation	+		
C8	716	-2	Oxidation of alcohol to form a carbonyl	+	+	
C9	734	+16	Hydroxylation			
C10	718	+0	<i>N</i> -demethylation + hydroxylation to form a nitroso compound	+		
C11	734	+16	Hydroxylation			
C12	716	-2	Oxidation of alcohol to form a carbonyl (following formation of the nitroso compound)	+		
C13	702	-16	<i>O</i> -demethylation and oxidation of alcohol to form a carbonyl	+	+	
Parent	718	+0	—	+	+	+

LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E.

In rat urine, additional metabolites were observed, but no attempt was made to identify them by LC-MS/MS because of their low abundance.

Source: Study CPH-SGN35-001, Table 1 and Study 420501

図 2.6.4- 10 MMAE のヒトにおける in vivo 推定代謝経路



MMAE: monomethyl auristatin E.

Source: Study CPH-SGN35-001

## 2.6.4.5.2.3 代謝経路及び代謝物の種間比較

ラット及びヒトにおける MMAE の主な消失経路は、未変化体の糞中排泄と考えられた。ラット、カニクイザル及びヒトの主要代謝経路は類似していた。ラット、カニクイザル及びヒト肝細胞において、MMAE から 12 種の代謝物が生成した (4007 試験)。ヒト肝細胞で検出された全ての代謝物は、ラット及びカニクイザル肝細胞の両方、あるいはいずれか一方で検出された。ブレンツキシマブ ベドチン及びエンホルツマブ ベドチンは同一のリンカー薬物結合を使用し



ているため、MMAE の代謝経路はブレンツキシマブ ベドチン及びエンホルツマブ ベドチンで同様であると推測された。

#### 2.6.4.6 排泄

抗体薬では排泄試験は必要でないと考えられたため、AGS-22M6E あるいはエンホルツマブ ベドチンを対象とした排泄試験は実施していない。AGS-22M6E あるいはエンホルツマブ ベドチンは、分子サイズが大きいためにそのまま尿中へ排泄されることは想定されない [Keizer et al, 2010]。MMAE については、ラットにおいて<sup>3</sup>H]MMAE を単回静脈内投与したときの排泄試験を実施した結果、主要な排泄経路は糞中排泄であった。

##### 2.6.4.6.1 ラットに<sup>3</sup>H]MMAE を単回静脈内投与したときの排泄、マスバランス及び薬物動態

添付資料 4.2.2.4-3（参）

<sup>3</sup>H]MMAE の 0.056 mg/kg をラットに静脈内投与したときの尿及び糞中排泄について検討した（420501 試験）。血液、血漿、尿、糞及び屍体中の放射能濃度は、液体シンチレーションカウンターにより測定した。<sup>3</sup>H]MMAE をラットに単回静脈内投与したときの主要な排泄経路は糞中排泄であった。雌雄ラットにおける放射能回収率は約 112%であった（表 2.6.4- 13）。雌雄ラットのいずれにおいても投与した放射能の多くは糞中に排泄され（96.7%～101.8%）、残りの放射能は尿中に排泄された（9.4%～15.1%）。

表 2.6.4- 13 ラットに<sup>3</sup>H]MMAE の 0.056 mg/kg を単回静脈内投与したときの放射能の尿及び糞中排泄

Sex	Route	Percentage (SD) of Administered Dose†‡			
		Urine	Feces	Carcass	Total§
Male	iv	15.1 (1.2)	96.7 (1.8)	0	112.1 (1.2)
Female	iv	9.4 (0.6)	101.8 (1.9)	0	111.5 (1.5)

<sup>3</sup>H]MMAE: tritiated monomethyl auristatin E, iv: intravenous, SD: standard deviation.

† Values represent mean percentage (SD) (n = 4 animals per timepoint).

‡ Excretion was determined over 672 h in Sprague-Dawley rats.

§ Total includes radioactivity in cage washes.

Source: Study 420501, Table 8

#### 2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用

MMAE が薬物相互作用を引き起こす可能性について in vitro 試験で評価した。ヒト肝細胞において、MMAE は CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4/5 を誘導しなかった。MMAE は比較的弱い可逆的な CYP3A4/5 阻害作用及び時間依存的な CYP3A4/5 阻害作用を示した。エンホルツマブ ベドチンを 1.25 mg/kg で週 1 回、ヒトに静脈内投与したときの MMAE の C<sub>max</sub> は約 5.2 nmol/L（約



3.7 ng/mL）であり（EV-201 試験）、CYP3A4/5 に対する 50%阻害濃度（ $IC_{50}$ ）よりも極めて低い値であった。MMAE は P-gp の基質であるが、検討した他のトランスポーターの基質ではなかった。MMAE は、臨床的に意義のある濃度において検討した全てのトランスポーターの阻害作用を示さなかった。

#### 2.6.4.7.1 CYP 誘導

添付資料 4.2.2.6-1

3 例のドナー由来のヒト肝細胞を用いて、MMAE の CYP 誘導作用を評価した（XXXXXXXXXX3043 試験）（2.6.5.12.1 薬物代謝酵素の誘導）。肝細胞を 1 日 1 回 3 日間 4 濃度（1, 10, 100 及び 1000 nmol/L）の MMAE で処理した。本試験において、MMAE は 1000 nmol/L まで CYP1A2, CYP2B6 及び CYP3A4/5 の代謝活性を上昇させなかった。また、MMAE は CYP1A2, CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA や蛋白量を上昇させなかった。しかしながら、高濃度（100 及び 1000 nmol/L）の MMAE 処理では、MMAE の細胞障害性が原因と考えられる CYP1A2, CYP2B6 及び CYP3A4/5 の代謝活性、mRNA 並びに蛋白量の減少が検討した肝細胞 3 ロット全てで認められた。以上の結果から、MMAE は CYP1A2, CYP2B6 及び CYP3A4/5 の酵素誘導剤ではないと考えられた。

#### 2.6.4.7.2 CYP 阻害

添付資料 4.2.2.6-2（参）

MMAE の CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 及び CYP3A4/5 に対する阻害作用について、ヒト肝ミクロソームを用いて評価した（XXXXXXXXXX5021 試験）（2.6.5.12.2 薬物代謝酵素の阻害）。

MMAE は、CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 及び CYP2D6 に対して、直接的な阻害作用をほとんどあるいは全く示さなかった。MMAE はミダゾラム 1'-水酸化を指標とした CYP3A4/5 活性に対して直接的な阻害作用を示し、 $IC_{50}$  値は 10  $\mu$ mol/L であった。一方、MMAE はテストステロン 6 $\beta$ -水酸化を指標とした CYP3A4/5 活性に対しては直接的な阻害作用を示さなかった。MMAE はミダゾラム 1'-水酸化及びテストステロン 6 $\beta$ -水酸化を指標とした CYP3A4/5 活性に対して、時間依存的な阻害作用を示した。更なる検討の結果、MMAE の CYP3A4/5 に対する時間依存的阻害は NADPH 依存的であり、CYP 代謝により生成した代謝物が関与すると考えられた。さらに、阻害反応後のミクロソームを再精製したところ、CYP3A4/5 の代謝活性が部分的に回復した。また、ミクロソームの再精製前にフェリシアニドで処理することにより、CYP3A4/5 の代謝活性は完全に回復した。以上の結果から、MMAE は CYP3A4/5 に対する準不可逆的な阻害剤であると考えられた。最大不活性化速度定数（ $K_{inact}$ ）、最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害薬の濃度（ $K_I$ ）及び  $K_{inact}/K_I$  は、それぞれ 0.10 min<sup>-1</sup>、1.12  $\mu$ mol/L 及び約 90 min<sup>-1</sup>·(mmol/L)<sup>-1</sup> と算出された。

### 2.6.4.7.3 トランスポーターに対する基質性及び阻害

添付資料 4.2.2.6-3 (参), 4.2.2.6-4 (参), 4.2.2.6-5 (参), 4.2.2.6-6 (参), 4.2.2.6-7 (参),  
4.2.2.6-8 (参), 4.2.2.6-9 (参), 4.2.2.6-10

MMAE の排出トランスポーターである P-gp, BCRP 及び MRP2 に対する基質性及び P-gp に対する阻害作用を評価した (RPT-01709 試験及び 8004 試験) (2.6.5.15.2 MMAE の P-gp, BCRP 及び MRP2 に対する基質性及び 2.6.5.15.1 MMAE の P-gp に対する基質性及び阻害)。MMAE (1, 10 及び 100  $\mu\text{mol/L}$ ) の Caco-2 細胞単層膜における頂端側から側底側 (A-B) への透過性は低く、透過係数は  $1 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$  未満であった。側底側から頂端側 (B-A) への透過係数は A-B への透過係数より大きく、efflux ratio (B-A への透過係数/A-B への透過係数) は評価した全ての濃度で 8.8 以上であった。Efflux ratio は P-gp 阻害剤である PSC833 (10  $\mu\text{mol/L}$ ), LY335979 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) あるいはベラパミル (60  $\mu\text{mol/L}$ ) の添加により、およそ 2 まで低下した。以上の結果から、MMAE は P-gp の基質と考えられた。一方で、MMAE の B-A への透過性は BCRP 阻害剤 Ko143 (5  $\mu\text{mol/L}$ ) あるいは MRP2 阻害剤インドメタシン (100  $\mu\text{mol/L}$ ) により阻害されず、また efflux ratio も 2 以上であったことから、MMAE は BCRP 及び MRP2 の基質ではないと考えられた。MMAE は P-gp の基質であるジゴキシンの能動輸送を僅かに阻害したが ( $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{mol/L}$ )、臨床的に意義のある濃度において P-gp 阻害作用はないと考えられた。

取り込みトランスポーターである OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1 及び OAT3 に対する [ $^3\text{H}$ ]MMAE (10 あるいは 100 nmol/L) の基質性を、それぞれのトランスポーターを過剰発現させた CHO 細胞あるいはヒト胎児由来腎 (HEK) 293 細胞を用いて評価した (PDM-0008 試験, PDM-0009 試験, PDM-0010 試験, PDM-0011 試験及び PDM-0012 試験) (2.6.5.15.4 MMAE の OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1 及び OAT3 に対する基質性)。10 分間インキュベーションしたときの [ $^3\text{H}$ ]MMAE の細胞内への取り込み量は、コントロール細胞とトランスポーターを発現させた CHO 細胞あるいは HEK293 細胞で同程度であった。また、[ $^3\text{H}$ ]MMAE の細胞内への取り込み量は、阻害剤を添加しても阻害されなかった (OATP1B1 及び OATP1B3 阻害剤シクロスポリン A : 50  $\mu\text{mol/L}$ , OCT2 阻害剤シメチジン : 200  $\mu\text{mol/L}$ , OAT1 及び OAT3 阻害剤プロベネシド : 400  $\mu\text{mol/L}$ )。以上のとおり、[ $^3\text{H}$ ]MMAE の細胞膜透過に能動輸送の寄与が示唆されなかったことから、MMAE は今回検討したトランスポーターの基質ではないと考えられた。

排泄トランスポーターである BCRP, BSEP 及び MRP2 に対する MMAE の阻害作用について膜ベシクルを用いて評価した (3234 試験) (2.6.5.15.3 MMAE の BCRP, BSEP, MRP2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 及び OCT2 に対する阻害)。加えて、取り込みトランスポーターである OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 及び OCT2 に対する阻害作用を CHO 細胞あるいは HEK293 細胞を用いて評価した (3234 試験)。MMAE は BCRP, BSEP 及び MRP2 に対するプローブ基質のベシクル内取り込みを、検討した濃度範囲 (0.008~5  $\mu\text{mol/L}$ ) で阻害しなかった。MMAE は OCT1 及び OCT2 の基質であるメトホルミンの輸送を検討した最高濃度 5  $\mu\text{mol/L}$  で、それぞれ 29%及び 23%阻害した。MMAE は OAT1, OAT3, OATP1B1 並びに OATP1B3 に対するプローブ基質の輸送を、検討した最高濃度 5  $\mu\text{mol/L}$  まで阻害しなかった。

#### 2.6.4.8 その他の薬物動態試験

該当する試験はない。

#### 2.6.4.9 考察及び結論

エンホルツマブ ベドチン（CHO 細胞株由来）、AGS-22M6E（ハイブリドーマ細胞株由来）、AGS-22M6（薬物非結合型抗体）あるいは MMAE のトキシコキネティクス、分布、代謝及び排泄について、*in vitro* 試験並びに毒性試験で使用したラット及びカニクイザルを用いて評価した。

カニクイザル 4 週間反復静脈内投与試験において、エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E のトキシコキネティクスを比較した結果、エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E の 3 mg/kg を 1 週間に 1 回投与したときのトキシコキネティクスは同等であった。また、本試験における ATA の発現率も同程度であった。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 をラット及びカニクイザルに反復静脈内投与したときの血清中の ADC 及び TAb の AUC 及び  $C_{\max}$  は、投与量にほぼ比例して増加した。ADC 及び TAb は投与直後に  $C_{\max}$  に達し、その後二相性を示して減少した。ラットにおける血清中の ADC 及び TAb の  $t_{1/2}$  はそれぞれ 0.887～1.29 日及び 1.33～2.16 日であり、カニクイザルではそれぞれ 0.700～1.72 日及び 1.02～2.75 日であった。ラット及びカニクイザルにおいて、ADC 及び TAb のトキシコキネティクスに明確な性差は認められなかった。

ラット及びカニクイザルのいずれにおいても、血清中の TAb 濃度は ADC 濃度と比較して高く、特に投与後の遅い時間で顕著であった。その結果、ADC と比べて TAb の AUC は大きく、 $t_{1/2}$  も長かった。AGS-22M6E を 1 週間に 1 回反復投与したとき、一部の動物で ATA が発現したことにより蓄積性を正確には評価できなかったが、ADC 及び TAb に蓄積性はほとんど認められなかった。ATA の発現率は動物種及び投与量によって異なり、AGS-22M6E に対する ATA の発現率はラットと比較してカニクイザルで概して高かった。

AGS-22M6E を 1 週間に 1 回投与したときの MMAE の曝露量は、ラット及びカニクイザルにおいてほぼ投与量に比例して増加した。ラット及びカニクイザルにおける MMAE の  $C_{\max}$  は、モル濃度換算で ADC の最高濃度のそれぞれ約 0.2% 及び約 0.04% であった。カニクイザルにおいて、MMAE 濃度は AGS-22M6E の投与後約 48 時間に  $C_{\max}$  に達し、 $t_{1/2}$  は 2.58～3.08 日であった。モル換算で AGS-22M6E と同等量の MMAE（AGS-22M6E 6 mg/kg に対して MMAE 0.1093 mg/kg）を静脈内投与したときの MMAE の  $t_{1/2}$  は 22.7 時間であった。一方、AGS-22M6E を投与したときの MMAE の  $t_{1/2}$  は 73.9 時間であった。これらの結果より、AGS-22M6E を投与したときの MMAE のトキシコキネティクスは、AGS-22M6E からの MMAE の生成が律速になっていると考えられた。

エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E は、MMAE が vc マレイミドカプロイルリンカーを介して結合しているブレンツキシマブ ベドチン（アドセトリス）と同一のリンカー-薬物複合体を有している。臨床試験においてエンホルツマブ ベドチンの 1.25 mg/kg を投与したときの MMAE の最高濃度は約 5 nmol/L であり（EV-201 試験）、ブレンツキシマブ ベドチンの 1.8 mg/kg を投与したときの MMAE の最高濃度（約 7 nmol/L）と同程度であった [Han et al, 2013]。以上の構造類似性並びに両剤投与後の MMAE の薬物動態の類似性により、ブレンツキシマブ ベドチンあるいは MMAE を使用した過去の非臨床試験を基に MMAE の代謝及び薬物動態について評価することが可能と考えられた。

MMAE の血漿蛋白への結合は低～中程度であり、種差が認められた。血漿蛋白結合率はマウス及びカニクイザル（17.1%～28.5%）と比べて、ラット及びヒト（67.9%～82.2%）で高かった。MMAE の血液／血漿濃度比には種差が認められ、2～20 nmol/L の濃度（臨床的に意義のある濃度）において、マウスで 9.47～11.8、ラットで 1.86～2.36、カニクイザルで 1.40～1.57 及びヒトで 0.926～0.976 であった。「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）において ADC の分布試験に関しては求められていないが、Long-Evans ラットを用いて [ $^3\text{H}$ ]MMAE の分布を評価した。血漿で確認された  $^3\text{H}$  交換が組織分布データの解釈に影響を与える可能性はあるが、[ $^3\text{H}$ ]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 時間後までには、ほとんどの組織から放射能が消失した。

ヒト肝細胞で生成した MMAE の代謝物は、ラットあるいはカニクイザル肝細胞でも生成した。CYP 発現系を用いた試験により、MMAE は CYP3A4 の基質であると考えられた。ブレンツキシマブ ベドチンの臨床試験において、投与後の MMAE の曝露量は強力な CYP3A4/5 阻害剤（ケトコナゾール）との併用により 34%増加し、CYP3A4/5 の誘導剤（リファンピシン）との併用により 46%減少することが報告されている [Han et al, 2013]。

抗体薬において、排泄試験は必要ないと考えられたため、エンホルツマブ ベドチンあるいは AGS-22M6E を対象とした排泄試験は実施していない。エンホルツマブ ベドチンあるいは AGS-22M6E は、分子サイズが大きいためにそのまま尿中へ排泄されることは想定されない [Keizer et al, 2010]。ラットにおいて、[ $^3\text{H}$ ]MMAE は主に未変化体のまま糞中に排泄され、代謝による消失は限定的であった。これらの結果は、ブレンツキシマブ ベドチンを単回静脈内投与したときのヒトの結果と一致しており [アドセトリス US 添付文書, 2019 年 10 月]、MMAE の代謝経路がヒト及びラットで類似していることが示唆された。ラットにおいて MMAE の尿中排泄はおよそ 15%未満であった。また、循環血中の代謝物の評価は実施しなかった。

MMAE は、CYP3A4/5 に対して強力な可逆的な阻害剤あるいは誘導剤ではなかったが、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  $C_{\text{max}}$  が約 5.2 nmol/L（約 3.7 ng/mL）であったのと比較して、 $K_i$  値（1.12  $\mu\text{mol/L}$ ）が極めて高いことから、MMAE が CYP3A4/5 により代謝される併用薬の薬物動態を顕著に変化させることはないと考えられた。ブレンツキシマブ ベドチンの臨床試験において、CYP3A4/5 基質であるミダゾラムの曝露量に影響を与えないことが報告されている [Han et al, 2013]。

In vitro 試験の結果より、MMAE は P-gp の基質であるが、BCRP, MRP2, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1 あるいは OATP1B3 の基質ではないことが示唆された。さらに、MMAE は臨床的に意義のある濃度範囲において P-gp, BCRP, BSEP, MRP2, OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1 あるいは OATP1B3 の阻害剤ではなかった。

以上をまとめると、エンホルツマブ ベドチンと AGS-22M6E のトキシコキネティクスは同等であった。ラット及びカニクイザルにおいて AGS-22M6E の曝露量は概して投与量に比例して増加した。AGS-22M6E を投与したときの MMAE のトキシコキネティクスは、AGS-22M6E からの MMAE の生成が律速となり、MMAE を投与したときと比べて曝露時間が長くなったと考えられた。MMAE の曝露量は AGS-22M6E の曝露量と比較して、モル濃度換算で非常に低かった。In vitro 試験において、MMAE は CYP3A4 の基質であったが、CYP3A4/5 に対する強力な阻害剤あるいは誘導剤ではなかった。MMAE は、排出トランスポーター P-gp の基質であるが、他の排出あるいは取り込みトランスポーターの基質あるいは阻害剤ではなかった。

#### 2.6.4.10 図表

図表は各項の本文中の適切な場所に挿入した。

#### 2.6.4.11 参考文献

ADCETRIS (prescribing information). Bothell, WA. Seagen Inc; October 2019.

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, Cervený CG, Chace DF, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol.* 2003;21:778-84.

Francisco JA, Cervený 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.

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.

Keizer RJ, Huitema ADR, Schellens JHM, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49:493-507.

## 目次

2.6.5	薬物動態試験概要表 .....	2
2.6.5.1	薬物動態試験：一覧表 .....	2
2.6.5.2	分析法及びバリデーション試験.....	5
2.6.5.3	薬物動態試験：吸収：単回静脈内投与.....	9
2.6.5.4	薬物動態試験：吸収：反復静脈内投与.....	10
2.6.5.5	薬物動態試験：組織分布.....	18
2.6.5.6	薬物動態試験：血漿蛋白との結合 .....	21
2.6.5.7	薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 .....	22
2.6.5.8	薬物動態試験：その他の分布試験 .....	23
2.6.5.9	薬物動態試験：In vivo での代謝 .....	24
2.6.5.10	薬物動態試験：In vitro での代謝.....	25
2.6.5.11	薬物動態試験：推定代謝経路 .....	31
2.6.5.12	薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 .....	33
2.6.5.13	薬物動態試験：尿・糞中排泄 .....	36
2.6.5.14	薬物動態試験：胆汁中排泄 .....	38
2.6.5.15	薬物動態試験：薬物相互作用 .....	39
2.6.5.16	薬物動態試験：その他 .....	46



## 2.6.5 薬物動態試験概要表

## 2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表

## 2.6.5.1.1 分析法

被験物質：AGS-22M6E, AGS-22M6, エンホルツマブ ベドチン, MMAE

Type of Study	Species	Analytical Instrument and Detection Method	Testing Facility	Study Number	CTD Number
<b>Analytical method (ADC)</b>					
AGS-22M6E ADC in serum	Rat	ELISA/Colorimetric		AR3587	4.2.2.1-1
AGS-22M6E ADC in serum	Cynomolgus monkey	ELISA/Colorimetric		AR3590	4.2.2.1-3
Enfortumab vedotin ADC in serum	Rat	ELISA/Colorimetric		AR161-C1128-0075	4.2.2.1-2
Enfortumab vedotin ADC in serum	Cynomolgus monkey	ELISA/Colorimetric		AR4559	4.2.2.1-4
<b>Analytical method (TAb)</b>					
AGS-22M6E or AGS-22M6 TAb in serum	Rat	ELISA/Colorimetric		AR3588	4.2.2.1-5
AGS-22M6E or AGS-22M6 TAb in serum	Cynomolgus monkey	ELISA/Colorimetric		AR3591	4.2.2.1-6
Enfortumab vedotin TAb in serum	Cynomolgus monkey	ELISA/Colorimetric		AR4560	4.2.2.1-7
<b>Analytical method (ATA)</b>					
Anti-AGS22M6E antibody in serum	Rat	ELISA/Colorimetric		AR3589	4.2.2.1-10
Anti-AGS22M6E antibody in serum	Cynomolgus monkey	ELISA/Colorimetric		AR3592	4.2.2.1-12
Anti-enfortumab vedotin antibody in serum	Rat	ELISA/Colorimetric		AR161-C1128-0077	4.2.2.1-11
Anti-enfortumab vedotin antibody in serum	Cynomolgus monkey	ELISA/Colorimetric		AR4562	4.2.2.1-13
<b>Analytical method (MMAE)</b>					
MMAE in serum	Rat	LC-MS/MS		8226174	4.2.2.1-8
MMAE in serum	Cynomolgus monkey	LC-MS/MS		8226175	4.2.2.1-9

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6: unconjugated hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; XXXXXXXXXX; ATA: anti-therapeutic antibodies; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; TAb: total antibody

## 2.6.5.1.2 吸収, 分布, 代謝及び排泄

被験物質 : AGS-22M6E, AGS-22M6, エンホルツマブ ベドチン, MMAE, ブレンツキシマブ ベドチン

Type of Study	Test System	Test Article	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Number
<b>Absorption</b>						
Single and repeat dose pharmacokinetics	Sprague-Dawley rat	AGS-22M6E AGS-22M6	iv		20005662	4.2.3.2-2
Single and repeat dose pharmacokinetics	Cynomolgus monkey	AGS-22M6E AGS-22M6 MMAE	iv		20005664	4.2.3.2-4
Single and repeat dose pharmacokinetics	Cynomolgus monkey	AGS-22M6E Enfortumab vedotin	iv		20021751	4.2.3.2-5
<b>Distribution</b>						
Tissue distribution	Long-Evans rat	[ <sup>3</sup> H]MMAE	iv		96D-1201	4.2.2.3-1 (参)
Protein binding	Mouse, rat, cynomolgus monkey and human plasma	[ <sup>3</sup> H]MMAE	In vitro		-0025	4.2.2.3-2 (参)
Red blood cell partitioning	Mouse, rat, cynomolgus monkey and human blood	[ <sup>3</sup> H]MMAE	In vitro		14-0271	4.2.2.3-3
<b>Metabolism</b>						
Reaction phenotyping	Human liver microsomes, recombinant enzymes	[ <sup>3</sup> H]MMAE	In vitro		4006	4.2.2.4-2 (参)
Metabolite characterization	Rat, cynomolgus monkey and human hepatocytes	[ <sup>3</sup> H]MMAE	In vitro		4007	4.2.2.4-1 (参)
Metabolite identification	Human	Brentuximab vedotin	iv	Seagen, Inc.	CPH-SGN35-001	4.2.2.4-4 (参)
Metabolite identification	Sprague-Dawley rat	[ <sup>3</sup> H]MMAE	iv		420501	4.2.2.4-3 (参)
<b>Excretion</b>						
Excretion mass balance	Sprague-Dawley rat	[ <sup>3</sup> H]MMAE	iv		420501	4.2.2.4-3 (参)
Table continued on next page						



Type of Study	Test System	Test Article	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD No.
<b>Pharmacokinetic drug interactions</b>						
CYP induction	Human hepatocytes	MMAE	In vitro		3043	4.2.2.6-1
CYP inhibition	Human liver microsomes	MMAE	In vitro		5021	4.2.2.6-2 (参)
P-gp-mediated transport	Caco-2 cell monolayer	MMAE	In vitro		8004	4.2.2.6-3 (参)
P-gp, BCRP and MRP2-mediated transport	Caco-2 cell monolayer	MMAE	In vitro		RPT-01709	4.2.2.6-4 (参)
BCRP, BSEP, MRP2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2 inhibition	Membrane vesicles, CHO cells, HEK293 cells	MMAE	In vitro		-3234	4.2.2.6-10
OATP1B1-mediated transport	CHO cells	[ <sup>3</sup> H]MMAE	In vitro	Seagen, Inc.	PDM-0008	4.2.2.6-5 (参)
OATP1B3-mediated transport	CHO cells	[ <sup>3</sup> H]MMAE	In vitro	Seagen, Inc.	PDM-0009	4.2.2.6-6 (参)
OCT2-mediated transport	CHO cells	[ <sup>3</sup> H]MMAE	In vitro	Seagen, Inc.	PDM-0010	4.2.2.6-7 (参)
OAT1-mediated transport	CHO cells	[ <sup>3</sup> H]MMAE	In vitro	Seagen, Inc.	PDM-0011	4.2.2.6-8 (参)
OAT3-mediated transport	HEK293 cells	[ <sup>3</sup> H]MMAE	In vitro	Seagen, Inc.	PDM-0012	4.2.2.6-9 (参)

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; BCRP: breast cancer resistance protein; BSEP: bile salt export pump; CHO: Chinese hamster ovary; CYP: cytochrome P450; [<sup>3</sup>H]MMAE: tritiated monomethyl auristatin E; HEK: human embryonic kidney; MMAE: monomethyl [redacted] P2: multidrug resistance-associated protein 2; OAT: organic anion transporter; OATP: organic anion transporting polypeptide; OCT: organic cation transporter; P-gp: P-glycoprotein; [redacted]

## 2.6.5.2 分析法及びバリデーション試験

## 2.6.5.2.1 抗体薬物複合体濃度の分析法

被験物質：AGS-22M6E, エンホルツマブ ベドチン

CTD number	4.2.2.1-1	4.2.2.1-3	4.2.2.1-2	4.2.2.1-4
Study number	AR3587	AR3590	AR161-C1128-0075	AR4559
Species	Rat	Cynomolgus monkey	Rat	Cynomolgus monkey
Sample	Serum	Serum	Serum	Serum
Analyte	AGS-22M6E	AGS-22M6E	Enfortumab vedotin	Enfortumab vedotin
Assay	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
Validation data				
Lower limit of quantitation (ng/mL)	40	40	80	80
Concentration range (ng/mL)	40 - 1280	40 - 1280	80 - 1280	80 - 640
Selectivity (%)	100 ± 20	100 ± 20	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for Low QC)
Intraday precision (%)	≤20 (25 for LLQ)	≤20 (25 for LLQ)	≤20 (25 for LLQ)	≤20 (25 for Low2 QC)
Interday precision (%)	≤20 (25 for LLQ)	≤20 (25 for LLQ)	≤20 (25 for LLQ)	≤20 (25 for Low2 QC)
Intraday accuracy (%)	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for Low2 QC)
Interday accuracy (%)	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for Low2 QC)
LTS (months at -60°C to -80°C)	6	6	16	12
Additional information: The values for precision and accuracy described above are not validation data, but acceptance criteria that the results must have met.				

AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; LLQ: lower limit of quantitation; LTS: long term stability; QC: quality control sample

## 2.6.5.2.2 総抗体濃度の分析法

被験物質：AGS-22M6E, AGS-22M6, エンホルツマブ ベドチン

CTD number	4.2.2.1-5	4.2.2.1-6	4.2.2.1-7
Study number	AR3588	AR3591	AR4560
Species	Rat	Cynomolgus monkey	Cynomolgus monkey
Sample	Serum	Serum	Serum
Analyte	AGS-22M6E	AGS-22M6E	Enfortumab vedotin
Assay	ELISA	ELISA	ELISA
Validation data			
Lower limit of quantitation (ng/mL)	40	40	80
Concentration range (ng/mL)	40 - 1280	40 - 1280	80 - 640
Selectivity (%)	100 ± 20	100 ± 20	100 ± 20 (100 ± 25 for Low QC)
Intraday precision (%)	≤20 (25 for LLQ)	≤20 (25 for LLQ)	≤20 (25 for Low2 QC)
Interday precision (%)	≤20 (25 for LLQ)	≤20 (25 for LLQ)	≤20 (25 for Low2 QC)
Intraday accuracy (%)	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for Low2 QC)
Interday accuracy (%)	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for LLQ)	100 ± 20 (100 ± 25 for Low2 QC)
LTS (months at -60°C to -80°C)	6	6	12
Additional information: The values for precision and accuracy described above are not validation data, but acceptance criteria that the results must have met.			

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; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; LLQ: lower limit of quantitation; LTS: long term stability; QC quality control sample

## 2.6.5.2.3 抗薬物抗体の分析法

被験物質：AGS-22M6E, AGS-22M6, エンホルツマブ ベドチン

CTD number	4.2.2.1-10	4.2.2.1-11	4.2.2.1-12	4.2.2.1-13
Study number	AR3589	AR161-C1128-0077	AR3592	AR4562
Species	Rat	Rat	Cynomolgus monkey	Cynomolgus monkey
Sample	Serum	Serum	Serum	Serum
Positive control	M22-id6-1b40p	M22-id6-1a21.1#6	M22-id6-1b40p	M22-id6-1b40p
Assay	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
Validation data				
Sensitivity (ng/mL)	0.5	63.94	1.0	1.96
Drug tolerance† (ng/mL) at 30 ng/mL positive control	100	250‡	100	1000
Drug tolerance† (ng/mL) at 2.5 ng/mL positive control	10	ND	10	1000
Specificity confirmation	>50% inhibition ADC	≥43.8% inhibition ADC	>50% inhibition ADC	>50% inhibition ADC
Intraday precision of positive control (%)	≤25	≤30	≤25	≤25
Additional information: The values for precision described above are not validation data, but acceptance criteria that the results must have met.				

ADC: antibody-drug conjugate; 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; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ND: not determined

† Drug is enfortumab vedotin or AGS-22M6E.

‡ Drug tolerance was determined with 500 ng/mL rather than 30 ng/mL of M22-id6-1a21.1#6.

## 2.6.5.2.4 MMAE 濃度の分析法

被験物質：AGS-22M6E, エンホルツマブ ベドチン, MMAE

CTD number	4.2.2.1-8	4.2.2.1-9
Study number	8226174	8226175
Species	Rat	Cynomolgus monkey
Sample	Serum	Serum
Analyte	MMAE	MMAE
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Validation data		
Lower limit of quantitation (pg/mL)	10.0	10.0
Sample volume used (mL)	0.05	0.05
Concentration range (pg/mL)	10 - 10000	10 - 10000
Selectivity	<20% of the response of MMAE from LLQ sample	<20% of the response of MMAE from LLQ sample
Extraction recovery (%)	82.5	87.2
Intraday precision (%)	≤15.0 (≤20.0 at LLQ)	≤15.0 (≤20.0 at LLQ)
Interday precision (%)	≤15.0 (≤20.0 at LLQ)	≤15.0 (≤20.0 at LLQ)
Intraday accuracy (%)	85.0 to 115.0 (80.0 to 120.0 at LLQ)	85.0 to 115.0 (80.0 to 120.0 at LLQ)
Interday accuracy (%)	85.0 to 115.0 (80.0 to 120.0 at LLQ)	85.0 to 115.0 (80.0 to 120.0 at LLQ)
LTS (days at -60°C to -80°C)	226	191
<b>Additional information:</b> The values for precision and accuracy described above are not validation data, but acceptance criteria that the results must have met.		

AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LLQ: lower limit of quantitation; LTS: long term stability; MMAE: monomethyl auristatin E

### 2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回静脈内投与

該当なし

## 2.6.5.4 薬物動態試験：吸収：反復静脈内投与

## 2.6.5.4.1 AGS-22M6E をラットに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス

被験物質：AGS-22M6E

CTD number	4.2.3.2-2											
Study number	20005662											
Species/Strain	Rat/Sprague-Dawley											
Feeding condition	Nonfasted											
Vehicle/Formulation	Saline/Solution											
Method of administration	Weekly iv bolus											
Dose (mg/kg per week)	2				5				10			
Sex (M/F)/Number of animals	F/3 per time point		M/3 per time point		F/3 per time point		M/3 per time point		F/3 per time point		M/3 per time point	
Study day	1	22	1	22	1	22	1	22	1	22	1	22
Sample	Serum											
Analyte	ADC											
Assay	ELISA											
Pharmacokinetic parameters												
t <sub>max</sub> (h)	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167
C <sub>max</sub> (µg/mL)	55.0	52.8	59.7	55.3	24.6	96.9	137	124	280	153	271	209
AUC <sub>168h</sub> (µg·h/mL)	1120	549	1180	1050	883	1390	2250	1960	5630	3570	6570	4170
t <sub>1/2</sub> (day)	0.887	NR	1.13	NR	1.21	NR	1.09	NR	1.20	NR	1.29	NR
Sample	Serum											
Analyte	Tab											
Assay	ELISA											
Pharmacokinetic parameters												
t <sub>max</sub> (h)	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167
C <sub>max</sub> (µg/mL)	69.6	63.2	74.8	69.6	27.5	121	160	147	332	194	324	260
AUC (µg·h/mL)	1910	832	2190	2330	974	1770	3940	3370	9680	6720	11600	7700
(Time for calculation - h)	(0-168)	(0-336)	(0-168)	(0-336)	(0-168)	(0-336)	(0-168)	(0-336)	(0-168)	(0-336)	(0-168)	(0-336)
t <sub>1/2</sub> (day)	1.33	NR	1.50	NR	1.68	NR	NR	NR	2.01	NR	2.16	NR
Sample	Serum											
Analyte	MMAE											
Assay	LC-MS/MS											
Pharmacokinetic parameters												
t <sub>max</sub> (h)	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167
C <sub>max</sub> (ng/mL)	0.291	0.473	0.255	0.405	0.516	1.11	0.644	1.09	0.820	1.89	0.870	2.82
AUC <sub>168h</sub> (ng·h/mL)	9.86	7.19	12.6	11.9	20.0	14.5	20.5	25.4	43.0	36.2	51.3	69.6
t <sub>1/2</sub> (day)	1.46	NR	1.40	1.93	1.30	1.61	0.940	NR	1.46	1.52	1.32	1.42

Footnotes appear on next page

Toxicokinetic parameters were derived using median concentration-time profiles of 3 animals.

ADC: antibody drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; NR: not reportable results due to unacceptable toxicokinetic curve fitting; TAb: total antibody



## 2.6.5.4.2 AGS-22M6 をラットに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス

被験物質：AGS-22M6

CTD number	4.2.3.2-2			
Study number	20005662			
Species/Strain	Rat/Sprague-Dawley			
Feeding condition	Nonfasted			
Vehicle/Formulation	Saline/Solution			
Method of administration	Weekly iv bolus			
Dose (mg/kg per week)	10			
Study day	1		22	
Sex (M/F)/Number of animals	F/3 per time point	M/3 per time point	F/3 per time point	M/3 per time point
Analyte	AGS-22M6			
Assay	ELISA			
AUC <sub>168h</sub> (µg·h/mL)	16600	15700	21800	18700
AUC <sub>last</sub> (µg·h/mL)†	16600	15700	36000	23100
C <sub>max</sub> (µg/mL)	320	336	370	368
t <sub>max</sub> (h)	0.0167	0.0167	0.0167	0.0167
t <sub>1/2</sub> (day)	4.66	4.62	NR	NR

† AUC<sub>last</sub> is AUC<sub>168h</sub> for day 1 and AUC<sub>672h</sub> for day 22.

Toxicokinetic parameters were derived using median concentration-time profiles of 3 animals.

AGS-22M6: unconjugated hybridoma derived fully human monoclonal antibody targeting Nectin-4; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; NR: not reportable results due to unacceptable toxicokinetic curve fitting

## 2.6.5.4.3 AGS-22M6E をカニクイザルに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス

被験物質：AGS-22M6E

CTD number	4.2.3.2-4								
Study number	20005664								
Species	Cynomolgus monkey								
Feeding condition	Nonfasted								
Vehicle/Formulation	Saline/Solution								
Method of administration	Weekly 30 min iv infusion								
Dose (mg/kg per week)	1			3			6		
Study day	1		22	1		22	1		8
Sex (M/F)/Number of animals	F/5	M/5	F/5/M/5	F/5	M/5	F/5/M/5	F/5	M/5	F/5/M/5
Sample	Serum								
Analyte	ADC								
Assay	ELISA								
C <sub>max</sub> (µg/mL)	24.1 (2.59)	25.1 (1.48)	21.2 (5.17)	73.7 (9.27)	79.4 (5.01)	63.7 (16.9)	148 (20.1)	154 (14.5)	137 (24.1)
AUC <sub>168h</sub> (µg·h/mL)	633 (78.2)	635 (76.8)	471 (264)	2400 (340)	2490 (330)	903 (732)	5060 (848)	5110 (135)	6150 (858)
AUC <sub>last</sub> (µg·h/mL)	630 (77.7)	632 (76.1)	466 (266)	2390 (335)	2480 (325)	856 (689)	5030 (839)	5070 (139)	6310 (850)
t <sub>1/2</sub> (day)	1.41 (0.0490)	1.32 (0.108)	1.20 (0.604)	1.42 (0.110)	1.45 (0.163)	0.700 (0.419)	1.63 (0.111)	1.80 (0.204)	1.53 (ND)
Sample	Serum								
Analyte	TAb								
Assay	ELISA								
C <sub>max</sub> (µg/mL)	28.3 (2.63)	32.4 (3.06)	29.6 (7.53)	89.6 (16.4)	99.2 (6.59)	106 (59.6)	209 (44.7)	191 (19.2)	162 (21.5)
AUC <sub>168h</sub> (µg·h/mL)	1170 (121)	1020 (ND)	1070 (689)	4390 (625)	4680 (660)	1610 (1220)	11000 (3140)	9490 (397)	9210 (2760)
AUC <sub>last</sub> (µg·h/mL)	1140 (110)	1090 (102)	1060 (687)	4330 (607)	4610 (650)	1850 (1290)	11500 (3070)	9330 (353)	11900 (3160)
t <sub>1/2</sub> (day)	2.18 (0.207)	2.06 (ND)	1.66 (1.08)	2.27 (0.236)	2.66 (0.319)	1.02 (0.649)	2.34 (1.19)	3.08 (0.457)	1.82 (0.596)
Table continued on next page									

Dose (mg/kg per week)	1		3		6	
Study day	1	22	1	22	1	8
Sex (M/F)/Number of animals	F/5/M/5	F/5/M/5	F/5/M/5	F/5/M/5	F/5/M/5	F/5/M/5
Sample	Serum					
Analyte	MMAE					
Assay	LC-MS/MS					
C <sub>max</sub> (pg/mL)	34.3 (5.96)	42.9 (6.69)	105 (12.2)	226 (142)	202 (34.2)	215 (40.0)
AUC <sub>168h</sub> (pg·h/mL)	3710 (690)	4040 (917)	11700 (1040)	15000 (2000)	24400 (2990)	24500 (2290)
AUC <sub>last</sub> (pg·h/mL)	3400 (790)	3370 (1400)	12000 (1400)	14100 (3150)	23200 (2600)	28900 (2680)
t <sub>1/2</sub> (day)	2.58 (0.248)	2.32 (0.64)	2.92 (0.173)	1.87 (0.573)	3.08 (0.554)	2.52 (ND)

Toxicokinetic parameters are shown as mean (SD).

ADC: antibody drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; ND: not determined; Tab: total antibody

## 2.6.5.4.4 AGS-22M6 をカニクイザルに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス

被験物質：AGS-22M6

CTD number	4.2.3.2-4			
Study number	20005664			
Species	Cynomolgus monkey			
Feeding condition	Nonfasted			
Vehicle/Formulation	Saline/Solution			
Method of administration	Weekly 30 min iv infusion			
Dose (mg/kg per week)	6			
Study day	1		22	
Sex (M/F)/Number of animals	F/5	M/5	F/5	M/5
Analyte	AGS-22M6			
Assay	ELISA			
AUC <sub>168h</sub> (µg·h/mL)	12700 (986)	10900 (745)	24400 (7650)	22700 (5630)
AUC <sub>last</sub> (µg·h/mL)	12400 (947)	10600 (746)	33400 (16900)	37000 (24500)
C <sub>max</sub> (µg/mL)	192 (17.9)	171 (5.35)	280 (65.5)	252 (23.6)
t <sub>1/2</sub> (day)	4.39 (ND)	4.91 (0.578)	6.09 (ND)	7.52 (ND)

Toxicokinetic parameters are shown as mean (SD).

AGS-22M6: unconjugated hybridoma derived fully human monoclonal antibody targeting Nectin-4; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ND: not determined

## 2.6.5.4.5 MMAE をカニクイザルに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス

被験物質：MMAE

CTD number	4.2.3.2-4			
Study number	20005664			
Species	Cynomolgus monkey			
Feeding condition	Nonfasted			
Vehicle/Formulation	Saline/Solution			
Method of administration	iv bolus			
Sample	Serum			
Analyte	MMAE			
Assay	LC-MS/MS			
Dose (mg/kg per week)	0.1093		0.0545	
Study day	1		22	
Sex (M/F)/Number of animals	F/5	M/5	F/4	M/4
PK parameters				
C <sub>max</sub> (pg/mL)	303000 (104000)	270000 (76800)	431000 (192000)	213000 (135000)
C <sub>max</sub> /D (ng/mL/[mg/kg])	2770 (948)	2470 (702)	7900 (3530)	3900 (2480)
AUC <sub>168h</sub> (pg·h/mL)	151000 (21100)	154000 (27300)	75200 (7340)	55900 (15400)
AUC <sub>last</sub> (pg·h/mL)	150000 (21000)	154000 (27300)	74700 (7520)	55300 (15400)
AUC/D (ng·h/mL/[mg/kg])	1380 (193)	1410 (250)	1380 (135)	1030 (282)
(Time for calculation - h)	(0-168)	(0-168)	(0-168)	(0-168)
AUC/D (ng·h/mL/[mg/kg])	1380 (192)	1410 (250)	1370 (138)	1010 (282)
(Time for calculation - h)	(0-last)	(0-last)	(0-last)	(0-last)
t <sub>1/2</sub> (h)	23.8 (5.10)	21.6 (5.09)	12.5 (3.13)	13.1 (2.31)
CL (mL/h/kg)	732 (117)	722 (123)	732 (75.4)	1050 (332)
V <sub>ss</sub> (mL/kg)	22300 (5860)	17200 (5330)	3680 (2450)	10400 (4110)

Toxicokinetic parameters are shown as mean (SD).

CL: clearance; D: dose; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; PK: pharmacokinetics; V<sub>ss</sub>: volume of distribution at steady state

## 2.6.5.4.6 AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンをカニクイザルに週 1 回 4 週間反復投与したときの初回投与後及び最終投与後のトキシコキネティクス

被験物質：AGS-22M6E, エンホルツマブ ベドチン

CTD number	4.2.3.2-5		
Study number	20021751		
Species	Cynomolgus monkey		
Feeding condition	Nonfasted		
Vehicle/Formulation	5% dextrose /Solution		
Method of administration	Weekly 30 min iv infusion		
Sex (M/F)/Number of animals	F/5/M/5	F/5/M/5	F/5/M/5
Sample	Serum	Serum	Serum
Analyte	ADC	TAb	MMAE
Assay	ELISA	ELISA	LC-MS/MS
Test article, dose	AGS-22M6E, 3 mg/kg per week		
Pharmacokinetic parameters			
C <sub>max</sub> , first dose (µg/mL)	77.9 (8.40)	72.1 (10.8)	0.0000808 (0.0000130)
C <sub>max</sub> , last dose (µg/mL)	48.9 (14.9)	69.1 (15.9)	0.000267 (0.000351)
AUC <sub>168h</sub> , first dose (µg·h/mL)	2592 (195)	4536 (360)	0.00979 (0.00154)
t <sub>1/2</sub> , first dose (day)	1.70 (0.469)	3.23 (1.63)	4.31 (1.20)
Test article, dose	Enfortumab vedotin, 3 mg/kg per week		
Pharmacokinetic parameters			
C <sub>max</sub> , first dose (µg/mL)	98.0 (8.96)	129 (37.0)	0.0000936 (0.0000207)
C <sub>max</sub> , last dose (µg/mL)	78.4 (10.6)	92.5 (25.0)	0.000149 (0.0000322)
AUC <sub>168h</sub> , first dose (µg·h/mL)	3000 (564)	5016 (823)	0.0112 (0.00206)
t <sub>1/2</sub> , first dose (day)	1.53 (0.129)	2.09 (0.217)	3.54 (1.62)

Toxicokinetic parameters are shown as mean (SD).

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; TAb: total antibody

## 2.6.5.5 薬物動態試験：組織分布

被験物質：[<sup>3</sup>H]MMAE

<b>CTD number</b>	4.2.2.3-1 (参)						
<b>Study number</b>	96D-1201						
<b>Species/Strain</b>	Rat/Long-Evans						
<b>Sex (M/F)/Number of animals</b>	M/8						
<b>Feeding condition</b>	Nonfasted						
<b>Vehicle/Formulation</b>	Ethyl alcohol in 0.9% (w/v) sodium chloride for injection/Solution						
<b>Method of administration</b>	iv						
<b>Dose (mg/kg)</b>	0.056						
<b>Radionuclide</b>	<sup>3</sup> H						
<b>Specific activity</b>	28369.920 µCi/mg MMAE						
<b>Analyte/Assay</b>	<sup>3</sup> H/Quantitative whole-body autoradiography						
<b>Sampling time (h)</b>	0.17, 4, 12, 24, 96, 336 and 672						
	<b>Concentration (µg eq./mL or µg eq./g)</b>						
<b>Tissue/organs</b>	<b>0.17 h</b>	<b>4 h</b>	<b>12 h</b>	<b>24 h</b>	<b>96 h</b>	<b>336 h</b>	<b>672 h</b>
Plasma (wet plasma by LSC)	0.004	0.001	0.001	0.001	BQL	BQL	BQL
Blood (cardiac)	0.008	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
Bone marrow	0.074	0.042	0.069	0.032	BQL	BQL	BQL
Lymph node	0.032	0.049	0.036	0.025	BQL	BQL	BQL
Spleen	0.101	0.096	0.065	0.023	BQL	BQL	BQL
Thymus	0.027	0.021	0.033	0.024	0.013	BQL	BQL
Bile (in duct)	1.476†	0.279	0.085	0.052	BQL	BQL	BQL
Kidney cortex	0.232	0.049	0.022	0.008	BQL	BQL	BQL
Kidney medulla	0.217	0.044	0.024	0.007	BQL	BQL	BQL
Liver	0.158	0.018	0.015	0.006	BQL	BQL	BQL
Urinary bladder	0.018	0.036	0.015	0.011	BQL	BQL	BQL
Urinary bladder (contents)	0.325	0.369	0.039	0.017	BQL	BQL	BQL
Brain (cerebellum)	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
Brain (cerebrum)	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
Brain (medulla)	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
Choroid plexus	0.134	0.041	0.038	0.010	BQL	BQL	BQL
Spinal cord	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
Adrenal gland	0.165	0.051	0.024	0.007	BQL	BQL	BQL
Table continued on next page							

Tissue/organs	Concentration (µg eq./mL or µg eq./g)						
	0.17 h	4 h	12 h	24 h	96 h	336 h	672 h
Anterior pituitary gland	0.520	0.316	0.167	0.032	0.006	BQL	BQL
Posterior pituitary gland	0.055	0.073	0.064	0.033	0.005	BQL	BQL
Thyroid	0.172	0.128	0.078	0.018	BQL	BQL	BQL
Harderian gland	0.031	0.021	0.020	0.010	BQL	BQL	BQL
Mammary gland region	0.005	0.003	0.006	0.005	BQL	BQL	BQL
Pancreas	0.083	0.043	0.017	0.003	BQL	BQL	BQL
Salivary gland	0.115	0.053	0.038	0.010	BQL	BQL	BQL
Adipose (brown)	0.053	0.045	0.032	0.004	BQL	BQL	BQL
Adipose (white)	0.004	0.004	0.005	BQL	BQL	BQL	BQL
Skin (nonpigmented)	0.016	0.010	0.012	0.006	BQL	BQL	BQL
Skin (pigmented)	0.016	0.014	0.013	0.006	BQL	BQL	BQL
Epididymis	0.007	0.007	0.011	0.006	BQL	BQL	BQL
Prostate gland	0.015	0.018	0.011	0.006	BQL	BQL	BQL
Seminal vesicles	0.007	0.005	0.005	0.003	BQL	BQL	BQL
Testis	0.003	BQL	0.003	BQL	BQL	BQL	BQL
Bone	0.003	0.003	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
Heart (myocardium)	0.131	0.065	0.022	BQL	BQL	BQL	BQL
Skeletal muscle	0.034	0.016	0.032	BQL	BQL	BQL	BQL
Lung	0.242	0.095	0.062	0.009	BQL	BQL	BQL
Cecum	0.103	0.062	0.044	0.018	BQL	BQL	BQL
Cecum (contents)	0.009	0.708	0.761	0.127	0.003	BQL	BQL
Esophagus	0.027	0.019	0.017	0.005	BQL	BQL	BQL
Large intestine	0.097	0.030	0.030	0.014	BQL	BQL	BQL
Large intestine (contents)	0.008	0.035	0.975	0.138	BQL	BQL	BQL
Oral mucosa	0.028	0.020	0.013	0.006	BQL	BQL	BQL
Small intestine	0.071	0.025	0.045	0.022	BQL	BQL	BQL
Small intestine (contents)	0.603	0.224	0.264	0.150	BQL	BQL	BQL
Stomach (gastric mucosa)	0.080	0.036	0.021	0.005	BQL	BQL	BQL
Stomach (contents)	BQL	0.003	0.011	0.019	BQL	BQL	BQL
Eye (uveal tract)	0.044	0.021	0.025	0.012	0.009	0.009	0.005
Eye (lens)	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
<b>Additional information:</b> There was approximately 10% in vivo <sup>3</sup> H-exchange in plasma observed at 0.17 hours, and the extent of <sup>3</sup> H-exchange increased to approximately 36% at 4 hours, 49% at 12 hours, 73% at 24 hours and 96% at 96 hours. The observed <sup>3</sup> H-exchange in the plasma may have an effect on the interpretation of the tissue distribution data, especially after 4 hours postdose.							

Footnotes appear on next page



[<sup>3</sup>H]MMAE: tritiated monomethyl auristatin E; BQL: below the quantitation limit; LSC: liquid scintillation counting; MMAE: monomethyl auristatin E.

† Value is above the upper limit of quantitation (ULQ).; lower limit of quantitation (LLQ) for plasma assayed by LSC was  $2 \times$  background dpm.; LLQ = 0.003 µg equivalent/g tissue; ULQ = 1.210 µg equivalent/g tissue

## 2.6.5.6 薬物動態試験：血漿蛋白との結合

被験物質：[<sup>3</sup>H]MMAE

CTD number	4.2.2.3-2 (参)	
Study number	-0025	
Study system	In vitro plasma	
Target entity, test system and method	Ultracentrifugation of plasma containing <sup>3</sup> H at three concentrations	
Species	Concentration tested (nmol/L)	% Bound (SD)
Mouse	1	18.8 (1.4)
	10	19.6 (1.2)
	100	28.5 (0.9)
Rat	1	72.9 (0.6)
	10	73.5 (0.4)
	100	72.0 (0.4)
Cynomolgus monkey	1	17.1 (4.8)
	10	17.8 (4.3)
	100	18.9 (4.2)
Human	1	67.9 (5.7)
	10	77.5 (3.1)
	100	82.2 (1.5)
<b>Additional information:</b> Plasma was collected from male animals/volunteers. All plasma samples of the same species were combined. Plasma was stored on an ice bath prior to use and was used on the same day as collection.		

[<sup>3</sup>H]MMAE: tritiated monomethyl auristatin E

#### 2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

該当なし

## 2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験

## 2.6.5.8.1 MMAE のマウス、ラット、カニクイザル及びヒトにおける血球移行率

被験物質： $[^3\text{H}]$ MMAE

<b>CTD number</b>	4.2.2.3-3				
<b>Study number</b>	14-0271				
<b>Study system</b>	In vitro blood				
<b>Method</b>	$[^3\text{H}]$ MMAE was spiked into the appropriate matrix along with unlabeled MMAE at final concentrations of 2, 20, 200, 1000 and 5000 nmol/L. After incubation at 37°C with gentle rotation for 1 h, each sample was split into two equal aliquots, with one processed for plasma by centrifugation at $11000 \times g$ for 5 min at 4°C and the other aliquot taken as whole blood. Plasma samples were analyzed by a liquid scintillation counter for radioactivity. Blood samples were decolorized by treating with $\text{H}_2\text{O}_2$ before being analyzed by a liquid scintillation counter for radioactivity. The radioactivity was converted into concentration based on specific activity with adjustment based on the blood hematocrit percentage, then the blood to plasma concentration ratio was calculated. Incubation was conducted in triplicate for each concentration.				
<b>Test compound</b>	<b>Nominal concentration (nmol/L)</b>	<b>Mean (SD) blood to plasma concentration ratio</b>			
		<b>Mouse</b>	<b>Rat</b>	<b>Cynomolgus monkey</b>	<b>Human</b>
MMAE	2	11.8 (0.291)	2.36 (0.0825)	1.57 (0.0250)	0.976 (0.0620)
	20	9.47 (0.156)	1.86 (0.00808)	1.40 (0.0359)	0.926 (0.0102)
	200	2.28 (0.0991)	1.33 (0.0555)	1.14 (0.00169)	0.794 (0.0366)
	1000	1.18 (0.0249)	1.02 (0.0540)	1.10 (0.00537)	0.792 (0.0207)
	5000	1.07 (0.0341)	0.954 (0.0194)	1.22 (0.176)	0.804 (0.0272)
<b>Additional information:</b> $[^3\text{H}]$ verapamil and $[^3\text{H}]$ chloroquine were used as control. Verapamil is known to have low red blood cell partitioning, and chloroquine is known to have high red blood cell partitioning [Yu S, Li S, Yang H, Lee F, Wu JT, Qian MG. A novel liquid chromatography/tandem mass spectrometry based depletion method for measuring red blood cell partitioning of pharmaceutical compounds in drug discovery. Rapid Commun Mass Spectrom 2005;19:250-4].					

 $[^3\text{H}]$ MMAE: tritiated monomethyl auristatin E; MMAE: monomethyl auristatin E

#### 2.6.5.9 薬物動態試験：In vivo での代謝

該当なし

## 2.6.5.10 薬物動態試験：In vitro での代謝

## 2.6.5.10.1 MMAE のヒト肝ミクロソームにおける in vitro 代謝

被験物質：[<sup>3</sup>H]MMAE

CTD number	4.2.2.4-2 (参)										
Study number	4006										
Study system	Human liver microsomes										
Method	Human liver microsomes were incubated with [ <sup>3</sup> H]MMAE. Samples were analyzed for metabolite profiling and characterization by HPLC with radiometric detection or LC-MS/MS.										
[ <sup>3</sup> H]MMAE†	Time (min)	Protein (mg/mL)	Cofactor (NADPH)	Radioactive component (pmol/incubation)‡							
				7.0	8.6	11.1	12.3	15.7	17.4	18.2	19.2
0	10	1	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
0.9 μmol/L (10.5 Ci/mmol)	10	1	–	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10	0	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		0.5		5.21	5.51	12.1	NC	NC	3.78	NC	NC
		1		11.2	8.91	26.5	NC	6.84	5.50	3.56	3.43
		2		12.8	12.2	29.0	4.53	12.0	8.18	4.90	3.18
	0	1		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	5			5.47	6.58	18.8	NC	3.67	4.15	NC	NC
	20			14.4	15.5	31.3	4.79	8.99	9.38	5.07	3.65
	40			13.0	17.6	27.6	5.93	12.6	12.1	6.42	5.76
10 μmol/L (0.871 Ci/mmol)	10	1	–	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10	0	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		0.5		NC	NC	46.2	NC	NC	NC	NC	NC
		1		38.7	33.3	139	NC	NC	NC	NC	NC
		2		87.5	70.8	214	NC	33.5	36.7	NC	NC
	0	1		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	5			24.9	29.4	105	NC	NC	NC	NC	NC
	20			53.9	59.1	157	NC	NC	32.6	NC	NC
	40			66.2	89.5	186	NC	NC	49.8	NC	NC

Table continued on next page

Table continued on next page

[ <sup>3</sup> H]MMAE†	Time (min)	Protein (mg/mL)	Cofactor (NADPH)	Radioactive component (pmol/incubation)‡							
				7.0	8.6	11.1	12.3	15.7	17.4	18.2	19.2
100 μmol/L (0.0861 Ci/mmol)	10	1	–	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10	0	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		0.5		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		1		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		2		NC	210	373	NC	NC	NC	NC	NC
	0	NC		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	5	NC		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	20	NC		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	40	NC		NC	380	NC	NC	NC	NC	NC	NC

† Determined by liquid scintillation counting

‡ Component names are based on retention time (minutes).

+ = NADPH present

– = NADPH absent

[<sup>3</sup>H]MMAE: tritiated monomethyl auristatin E; HPLC: high performance liquid chromatography; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NADPH: reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NC: not calculated (peak was not detected or was below the lowest standard [1 ng/mL].)

## 2.6.5.10.2 MMAE の代謝に寄与する CYP 分子種の同定

被験物質：[<sup>3</sup>H]MMAE

<b>CTD number</b>	4.2.2.4-2 (参)				
<b>Study number</b>	4006				
<b>Study system</b>	Human CYP enzymes				
<b>Method</b>	Recombinant human CYP enzymes rCYP2B6, 2C8, 2C9, 2C19 and 3A4 were expressed with cytochrome b <sub>5</sub> . Recombinant CYP enzymes rCYP1A2 and 2D6 were not expressed with cytochrome b <sub>5</sub> . Reactions were started by addition of the NADPH-generating system and terminated by addition of stop reagent (2% v/v formic acid in acetonitrile). Recombinant CYP enzymes were normalized with control microsomes. For Loss of [ <sup>3</sup> H]MMAE, the zero-time incubation with human liver microsomes served as the 100% value (not shown).				
[ <sup>3</sup> H]MMAE†	Test system	Radioactive component (pmol/incubation)‡			Substrate loss %
		7.0	8.6	11.1	
6 µmol/L (24.1 Ci/mmol)	Control bacosomes	NC	NC	NC	No Loss
	Reductase control	NC	NC	0.105	No Loss
	Insect cell control + b <sub>5</sub>	NC	NC	0.152	No Loss
	CYP1A2	NC	NC	0.130	0.6
	CYP2B6 + b <sub>5</sub>	NC	NC	0.00190	No Loss
	CYP2C8 + b <sub>5</sub>	NC	NC	0.0669	No Loss
	CYP2C9 + b <sub>5</sub>	NC	NC	0.361	No Loss
	CYP2C19 + b <sub>5</sub>	NC	NC	0.278	No Loss
	CYP2D6	NC	1.28	0.226	No Loss
	CYP3A4 + b <sub>5</sub>	1.77	1.66	2.26	2.7
16 µmol/L (10.9 Ci/mmol)	Control bacosomes	NC	NC	NC	No Loss
	Reductase control	NC	NC	0.192	No Loss
	Insect cell control + b <sub>5</sub>	NC	NC	0.0877	No Loss
	CYP1A2	NC	NC	0.109	No Loss
	CYP2B6 + b <sub>5</sub>	NC	NC	0.195	No Loss
	CYP2C8 + b <sub>5</sub>	NC	NC	0.148	1.8
	CYP2C9 + b <sub>5</sub>	NC	NC	0.265	No Loss
	CYP2C19 + b <sub>5</sub>	NC	NC	0.303	No Loss
	CYP2D6	NC	1.11	0.169	No Loss
	CYP3A4 + b <sub>5</sub>	1.31	1.18	1.44	2.1

† Determined by liquid scintillation counting.

‡ Component names are based on retention time (minutes). Values are the mean of duplicate determinations.

Footnote continued on next page



+ b<sub>5</sub> = Expressed with cytochrome b<sub>5</sub>.

[<sup>3</sup>H]MMAE: tritiated monomethyl auristatin E; CYP: cytochrome P450; NADPH: reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NC: not calculated (represents a zero or negative value after blank correction); No Loss: Substrate loss was zero or negative.

## 2.6.5.10.3 肝細胞で生成する代謝物の推定

被験物質：[<sup>3</sup>H]MMAE

<b>CTD number</b>	4.2.2.4-1 (参)			
<b>Study number</b>	4007			
<b>Study system</b>	Rat, cynomolgus monkey and human hepatocytes			
<b>Method</b>	Hepatocytes were incubated with 10 µmol/L [ <sup>3</sup> H]MMAE for up to 4 h, with appropriate controls. Samples were analyzed for changes in substrate concentration over the incubation time course and for qualitative metabolite profiling and characterization by LC-MS/MS.			
<b>Species†</b>	<b>Incubation time (min)</b>	<b>Cell concentration (million/mL)</b>	<b>Peak area counts of parent compound‡</b>	<b>Percent loss of substrate [<sup>3</sup>H]MMAE</b>
Rat (Sprague-Dawley)	0	1	1780	NA
	60	1	1450	18.3
	120	1	1280	27.9
	240	1	1200	32.4
	0	1 (boiled)	1530	NA
	240	1 (boiled)	1350	11.5
Cynomolgus monkey	0	1	1580	NA
	60	1	1310	17.1
	120	1	1320	16.8
	240	1	1300	18.0
	0	1 (boiled)	1500	NA
	240	1 (boiled)	1420	5.7
Human	0	1	1520	NA
	60	1	1320	13.2
	120	1	1330	12.5
	240	1	1040	31.5
	0	1 (boiled)	1530	NA
	240	1 (boiled)	1410	8.2

† Hepatocytes from three individuals were used to create pooled samples for each species.

‡ Peak area counts of the parent compound are the mean of duplicate determinations and are rounded to three significant figures.

[<sup>3</sup>H]MMAE: tritiated monomethyl auristatin E; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA: not applicable

## 2.6.5.10.3 肝細胞で生成する代謝物の推定（続き）

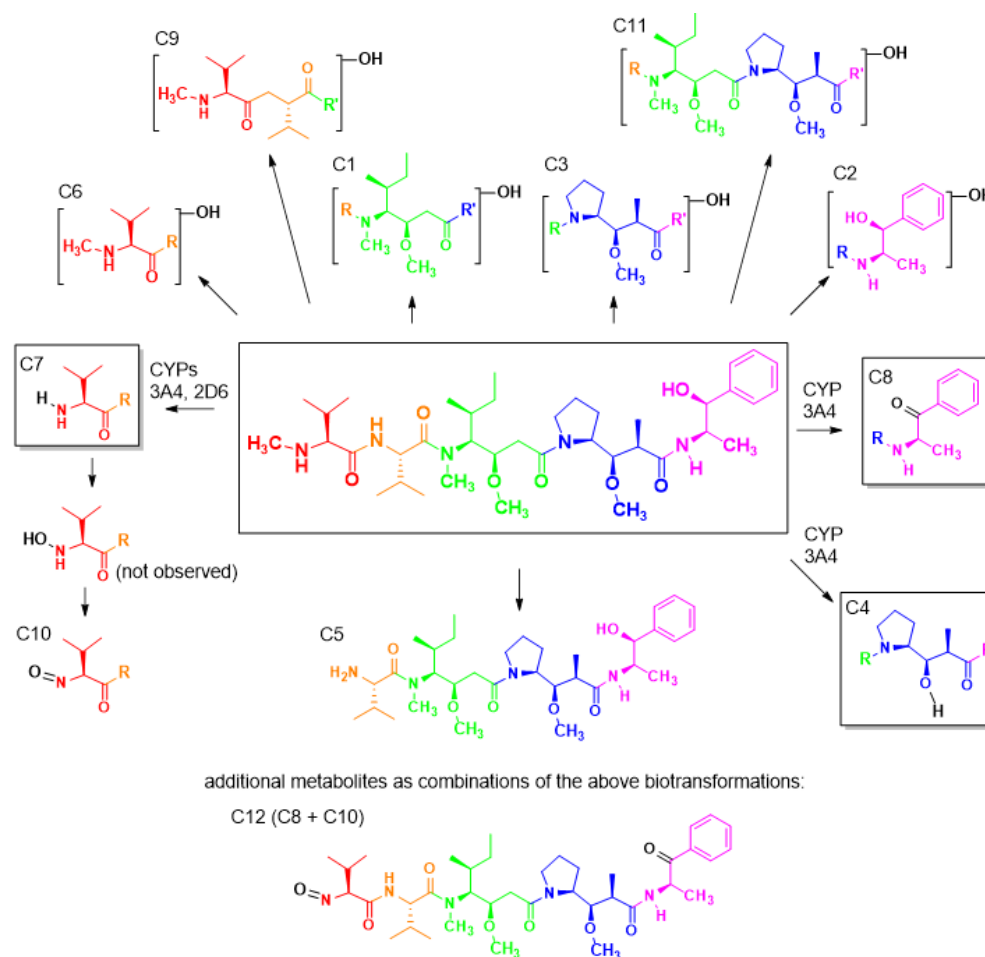
被験物質：[<sup>3</sup>H]MMAE

<b>CTD number</b>	4.2.2.4-1 (参)					
<b>Study number</b>	4007					
<b>Study system</b>	Rat, cynomolgus monkey and human hepatocytes					
<b>Method</b>	Hepatocytes were incubated with 10 µmol/L [ <sup>3</sup> H]MMAE for up to 4 h, with appropriate controls. Samples were analyzed for changes in substrate concentration over the incubation time course and for qualitative metabolite profiling and characterization by LC-MS/MS.					
<b>Metabolite</b>	<b><i>m/z</i></b>	<b>Change in mass (amu) from parent</b>	<b>Proposed transformation from MMAE</b>	<b>Rat</b>	<b>Cynomolgus monkey</b>	<b>Human</b>
C1	734	+16	Hydroxylation	+	+	ND
C2	734	+16	Hydroxylation	ND	+	ND
C3	734	+16	Hydroxylation	+	+	+
C4	704	-14	<i>O</i> -demethylation	+	+	+
C5	605	-113	Amide hydrolysis	+	+	+
C6	734	+16	Hydroxylation	+	+	+
C7	704	-14	<i>N</i> -demethylation	+	+	+
C8	716	-2	Oxidation of alcohol to form a ketone	+	+	+
C9	734	+16	Hydroxylation	+	+	+
C10	718	+0	<i>N</i> -demethylation + hydroxylation to form a nitroso compound	+	+	+
C11	734	+16	Hydroxylation	ND	+	ND
C12	716	-2	Oxidation of alcohol to form a carbonyl (following formation of the nitroso compound)	ND	+	+
Parent	718	+0	-	+	+	+

+: peak detected; [<sup>3</sup>H]MMAE: tritiated monomethyl auristatin E; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; ND: not detected

## 2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路

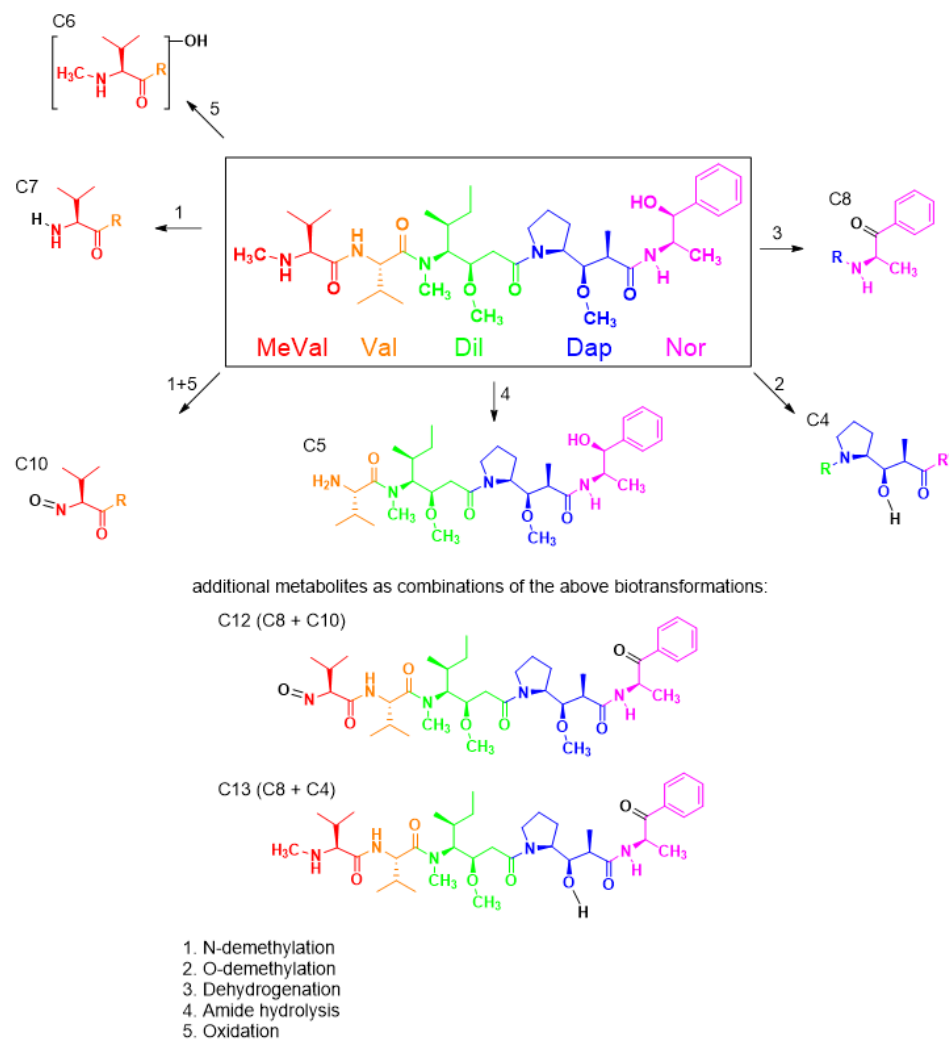
### 2.6.5.11.1 MMAE の推定代謝経路 (in vitro)



Metabolic profile of MMAE in vitro in rat, cynomolgus monkey and human hepocytes [Studies 4007 and CPH-SGN35-001]. Reaction phenotyping was performed for C4, C7 and C8 (boxed) and the CYP enzymes involved in producing these metabolites are indicated [Study 4006].

CYP: cytochrome P450; MMAE: monomethyl auristatin E

## 2.6.5.11.2 MMAE のヒトにおける推定代謝経路 (in vivo)



Pathways involved in the metabolism of MMAE in humans following dosing with brentuximab vedotin and proposed structures of metabolites are presented [Study CPH-SGN35-001].

MMAE: monomethyl auristatin E

## 2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

## 2.6.5.12.1 薬物代謝酵素の誘導

被験物質：MMAE

CTD number	2.6-1						
Study number	3043						
Type of study	In vitro evaluation of MMAE as an inducer of cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes						
Method	Three preparations of cultured human hepatocytes from three separate livers were treated once daily for three consecutive days with dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.1% v/v, vehicle control), flumazenil (25 μmol/L, negative control), one of four concentrations of MMAE (1, 10, 100 or 1000 nmol/L) or one of three known human CYP inducers, namely, omeprazole (50 μmol/L), phenobarbital (750 μmol/L) and rifampin (10 μmol/L). After treatment, the cells were harvested to isolate microsomes for the analysis of phenacetin <i>O</i> -dealkylation (marker for CYP1A2), bupropion hydroxylation (marker for CYP2B6), and midazolam 1'-hydroxylation (marker for CYP3A4/5) by LC-MS/MS, as well as immunoreactive protein levels for CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4. Additional hepatocytes from the same treatment groups were harvested with TRIzol to isolate RNA, which was analyzed by qRT-PCR to assess the effect of MMAE on CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 mRNA levels.						
CYP1A2							
Treatment	Concentration	Activity fold change†			mRNA fold change‡		
		H1165	H1167	H1169	H1165	H1167	H1169
DMSO	0.1% (v/v)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
MMAE	1 nmol/L	1.51	1.51	0.882	0.941	1.47	0.964
MMAE	10 nmol/L	1.75	0.984	0.996	1.17	1.57	0.695
MMAE	100 nmol/L	0.435	0.601	0.366	0.197	0.130	0.0940
MMAE	1000 nmol/L	0.229	0.660	0.292	0.0280	0.0280	0.0210
Flumazenil	25 μmol/L	1.46	1.05	0.899	0.898	1.29	1.06
Omeprazole	50 μmol/L	26.4	34.9	27.7	23.1	160	70.9
CYP2B6							
Treatment	Concentration	Activity fold change†			mRNA fold change‡		
		H1165	H1167	H1169	H1165	H1167	H1169
DMSO	0.1% (v/v)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
MMAE	1 nmol/L	1.31	0.915	0.999	0.982	1.39	0.859
MMAE	10 nmol/L	1.13	0.853	0.925	1.09	1.19	0.783
MMAE	100 nmol/L	0.186	0.484	0.256	0.110	0.108	0.0800
MMAE	1000 nmol/L	0.117	0.512	0.225	0.0200	0.0390	0.0320
Flumazenil	25 μmol/L	1.52	0.909	1.03	0.832	1.57	1.16
Phenobarbital	750 μmol/L	19.8	7.38	12.6	6.38	7.45	8.43
Table continued on next page							

Table continued on next page

CYP3A4							
Treatment	Concentration	Activity fold change†			mRNA fold change‡		
		H1165	H1167	H1169	H1165	H1167	H1169
DMSO	0.1% (v/v)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
MMAE	1 nmol/L	1.48	1.01	1.07	1.32	1.56	1.34
MMAE	10 nmol/L	1.90	0.827	1.17	1.94	1.66	1.21
MMAE	100 nmol/L	0.804	0.225	0.452	0.697	0.280	0.188
MMAE	1000 nmol/L	0.517	0.213	0.400	0.0780	0.0390	0.0380
Flumazenil	25 µmol/L	1.44	0.995	1.08	0.631	1.57	1.24
Rifampin	10 µmol/L	6.48	4.84	5.57	6.97	10.0	15.7
<b>Additional information:</b> Under the conditions of this study, where the positive controls caused anticipated and appropriate increases in CYP enzyme expression, treatment of cultured human hepatocytes with up to 1000 nmol/L MMAE caused little or no increase in CYP1A2, 2B6 and 3A4/5 activity, mRNA levels or western immunoblot protein levels. However, treatment of MMAE at the higher treatment concentrations (100 and 1000 nmol/L) caused decreases in CYP1A2, 2B6 and 3A4 activity, mRNA levels or western immunoblot protein levels from all three hepatocyte preparations tested.							

† Fold change = activity of test article treated cells / activity of vehicle control.

‡ Fold change values are relative to vehicle control, normalized to GAPDH. All values are the mean of triplicate determinations.

CYP: cytochrome P450; DMSO: dimethyl sulfoxide; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; qRT-PCR: quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

## 2.6.5.12.2 薬物代謝酵素の阻害

被験物質：MMAE

CTD number	4.2.2.6-2 (参)					
Study number	5021					
Type of study	In vitro evaluation of MMAE as an inhibitor of human cytochrome P450 enzymes (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4/5)					
Method	Human liver microsomes from a pool of 16 individuals were incubated with marker substrates, at concentrations approximately equal to their apparent $K_m$ , in the presence or absence of MMAE. The target concentrations of MMAE ranged from 0.1 to 100 $\mu\text{mol/L}$ . In addition, MMAE was evaluated for its ability to function as a time-dependent inhibitor at the same concentrations mentioned above, in which case MMAE was preincubated with human liver microsomes and an NADPH-generating system for 30 minutes to allow for the generation of metabolites that might inhibit CYP activity.					
Enzyme	CYP reaction	Direct inhibition		Time-dependent inhibition		
		Zero-minute preincubation		30-minute preincubation		Potential for time dependent inhibition
		IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )	Maximum inhibition at 100 $\mu\text{mol/L}$ (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )	Maximum inhibition at 100 $\mu\text{mol/L}$ (%)	
CYP1A2	Phenacetin <i>O</i> -deethylation	>100	17	>100	19	Little or no
CYP2B6	Bupropion hydroxylation	>100	2.6	>100	NA	Little or no
CYP2C8	Amodiaquine <i>N</i> -dealkylation	>100	NA	>100	NA	Little or no
CYP2C9	Diclofenac 4'-hydroxylation	>100	NA	>100	2	Little or no
CYP2C19	<i>S</i> -Mephenytoin 4'-hydroxylation	>100	17	>100	18	Little or no
CYP2D6	Dextromethorphan <i>O</i> -demethylation	>100	10	>100	10	Little or no
CYP3A4/5	Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation	>100	27	0.6	92	Yes†
CYP3A4/5	Midazolam 1'-hydroxylation	10	89	0.4	97	Yes
<p><b>Additional information:</b> MMAE caused direct inhibition of CYP3A4/5 as measured by midazolam 1'-hydroxylation with an IC<sub>50</sub> value of 10 <math>\mu\text{mol/L}</math>. There was little or no direct inhibition of CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 or 3A4/5 as measured by testosterone 6<math>\beta</math>-hydroxylation. The IC<sub>50</sub> values for these enzymes were reported as greater than 100 <math>\mu\text{mol/L}</math>, the highest concentration of MMAE examined.</p> <p>MMAE caused time-dependent inhibition of CYP3A4/5 (as measured by testosterone 6<math>\beta</math>-hydroxylation and midazolam 1'-hydroxylation) as an increase in inhibition was observed with preincubation. There was no evidence of time-dependent inhibition of CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19 or 2D6 by MMAE as no distinct increase in inhibition was observed upon preincubation. Further characterization of this time-dependent inhibition shows that MMAE is a mechanism-based inhibitor of CYP3A4/5 as measured by testosterone 6<math>\beta</math>-hydroxylation with a <math>K_{\text{inact}}</math> value of 0.10 min<sup>-1</sup> and a <math>K_I</math> of 1.12 <math>\mu\text{mol/L}</math>.</p>						

† Time dependent inhibition of CYP3A4/5 as measured by testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation was found to be partially reversed with microsomal re-isolation and fully reversed with treatment by potassium ferricyanide prior to re-isolation. MMAE was found to form a metabolite inhibitory complex with CYP3A4/5.

CYP: cytochrome P450; IC<sub>50</sub>: half maximal inhibitory concentration;  $K_I$ : inhibitor concentration causing half-maximal inactivation;  $K_{\text{inact}}$ : maximal inactivation rate constant; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable (no value was obtained as the rates at the highest concentration of MMAE evaluated [100  $\mu\text{mol/L}$ ] were higher than the control rates.); NADPH: reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate



## 2.6.5.13 薬物動態試験：尿・糞中排泄

被験物質：[<sup>3</sup>H]MMAE

<b>CTD number</b>	4.2.2.4-3 (参)					
<b>Study number</b>	420501					
<b>Species</b>	Rat			Rat		
<b>Sex (M/F)/Number of animals</b>	M/4			F/4		
<b>Feeding condition</b>	Fed			Fed		
<b>Vehicle/Formulation</b>	Ethyl alcohol in 0.9% (w/v) sodium chloride for injection/Solution			Ethyl alcohol in 0.9% (w/v) sodium chloride for injection/Solution		
<b>Method of administration</b>	iv			iv		
<b>Dose (mg/kg)</b>	0.056			0.056		
<b>Analyte</b>	Total radioactivity			Total radioactivity		
<b>Assay</b>	LSC with <sup>3</sup> H-labeled compound			LSC with <sup>3</sup> H-labeled compound		
<b>Excretion route</b>	<b>Urine</b>	<b>Feces</b>	<b>Total</b>	<b>Urine</b>	<b>Feces</b>	<b>Total</b>
<b>Time (h)</b>	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id
0-12	9.633	1.520	11.153	6.816	20.903	20.752
12-24	2.861	45.760	48.620	1.275	47.792	49.067
24-48	1.659	39.237	40.896	0.782	34.944	35.726
48-72	0.567	7.453	8.313	0.237	3.477	4.016
72-96	0.151	1.749	1.900	0.080	1.055	1.135
96-120	0.074	0.552	0.627	0.045	0.320	0.366
120-144	0.048	0.244	0.292	0.038	0.125	0.163
144-168	0.035	0.116	0.183	0.025	0.080	0.150
168-192	0.019	0.046	0.065	0.017	0.033	0.050
192-216	0.013	0.031	0.044	0.015	0.007	0.022
216-240	0.011	0	0.011	0.015	0	0.015
240-264	0.007	0	0.007	0.004	0	0.004
264-288	0.006	0	0.006	0	0	0
288-312	0.001	0	0.001	0	0	0
312-336	0.002	0	0.002	0.003	0	0.003
336-360	0	0	0	0	0	0
360-384	0	0	0	0	0	0
384-408	0	0	0	0	0	0
408-432	0	0	0	0	0	0
432-456	0	0	0	0	0	0
Table continued on next page						

Excretion route	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
Time (h)	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id
456-480	0	0	0	0	0	0
480-504	0	0	0	0	0	0
504-528	0	0	0	0	0	0
528-552	0	0	0	0	0	0
552-576	0	0	0	0	0	0
576-600	0	0	0	0	0	0
600-624	0	0	0	0	0	0
624-648	0	0	0	0	0	0
648-672	0	0	0	0	0	0

Total radioactivity includes cage wash, which is not included in either urine or feces.

[<sup>3</sup>H]MMAE: tritiated monomethyl auristatin E; id: injected dose; LSC: liquid scintillation counting

#### 2.6.5.14 薬物動態試験：胆汁中排泄

該当なし

## 2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用

## 2.6.5.15.1 MMAE の P-gp に対する基質性及び阻害

被験物質：MMAE

CTD number	4.2.2.6-3 (参)		
Study number	8004		
Study system	Caco-2 monolayer assay		
Method	Efflux ratio and apparent permeability of MMAE in the Caco-2 monolayer assay system in the apical to basolateral (P <sub>app</sub> A-B) and basolateral to apical (P <sub>app</sub> B-A) directions in the presence and absence of specific P-gp (MDR1) inhibitors.		
Test compounds	P <sub>app</sub> A-B (10 <sup>-6</sup> cm/sec)	P <sub>app</sub> B-A (10 <sup>-6</sup> cm/sec)	Efflux ratio
<i>Efflux ratio and apparent permeability of MMAE at varying MMAE concentrations</i>			
1 µmol/L MMAE	0.5 (0.0)	8.1 (1.1)	15 (0.8)
10 µmol/L MMAE	0.2 (0.0)	6.8 (1.6)	34 (1.1)
100 µmol/L MMAE	0.1 (0.0)	6.7 (0.4)	49 (0.3)
<i>Efflux ratio and apparent permeability of MMAE in the presence and absence of specific P-gp inhibitors</i>			
10 µmol/L MMAE	0.3 (0.0)	8.4 (2.1)	28 (0.3)
10 µmol/L MMAE + 10 µmol/L PSC833	1.7 (0.2)	2.3 (0.6)	1.3 (0.3)
10 µmol/L MMAE + 60 µmol/L verapamil	1.9 (0.4)	5.5 (0.3)	2.9 (0.2)
<i>Efflux ratio and apparent permeability of digoxin in the presence and absence of MMAE and verapamil</i>			
10 µmol/L digoxin	1.3 (0.1)	19 (1.4)	14 (0.1)
10 µmol/L digoxin + 60 µmol/L verapamil	4.2 (1.2)	6.3 (0.4)	1.5 (0.3)
10 µmol/L digoxin + 50 µmol/L MMAE	1.5 (0.1)	17 (1.4)	11 (0.1)

Data are mean (SD).

Efflux ratio: P<sub>app</sub> B-A/ P<sub>app</sub> A-B; MDR1: multidrug resistance 1; MMAE: monomethyl auristatin E; P<sub>app</sub> A-B: apparent permeability coefficient from apical to basolateral; P<sub>app</sub> B-A: apparent permeability coefficient from basolateral to apical; P-gp: P-glycoprotein

## 2.6.5.15.2 MMAE の P-gp, BCRP 及び MRP2 に対する基質性

被験物質：MMAE

CTD number	4.2.2.6-4 (参)		
Study number	RPT-01709		
Study system	Caco-2 monolayer assay		
Method	This study evaluated the transport mechanisms of MMAE in both the A-to-B and B-to-A directions using the Caco-2 cell monolayer system in the absence or presence of the efflux pump inhibitors LY335979 (for P-gp), Ko143 (for BCRP) and indomethacin (for MRP2). All experiments were performed in triplicate.		
Test compounds	<b>P<sub>app</sub> A-B</b> (10 <sup>-6</sup> cm/sec)†	<b>P<sub>app</sub> B-A</b> (10 <sup>-6</sup> cm/sec)†	<b>Efflux ratio</b>
MMAE (10 µmol/L)	0.10 ± 0.02	0.91 ± 0.04	8.8
MMAE (10 µmol/L) + LY335979‡ (10 µmol/L)	0.13 ± 0.03	0.20 ± 0.01	1.6
MMAE (10 µmol/L) + Ko143‡ (5 µmol/L)	0.15 ± 0.05	0.93 ± 0.06	6.0
MMAE (10 µmol/L) + Indomethacin‡ (100 µmol/L)	0.25 ± 0.10	1.10 ± 0.02	4.3
Propranolol§ (10 µmol/L)	17.60 ± 2.90	27.02 ± 0.27	1.5
Nadolol§ (10 µmol/L)	0.37 ± 0.02	0.90 ± 0.07	2.4
<b>Additional information:</b> Low permeability, ≤ 1 × 10 <sup>-6</sup> cm/second; medium permeability, 1 × 10 <sup>-6</sup> cm/second to 10 × 10 <sup>-6</sup> cm/second; and high permeability, ≥ 10 × 10 <sup>-6</sup> cm/second. An efflux ratio (P <sub>app</sub> B-A/ P <sub>app</sub> A-B) > 2 indicates that the test compound is an efflux pump substrate.			

† Data expressed as mean ± SEM (n=3).

‡ LY335979 is an inhibitor of P-gp, Ko143 is an inhibitor of BCRP and indomethacin is an inhibitor of MRP2.

§ Propranolol: transcellular control; nadolol: paracellular control

BCRP: breast cancer resistance protein; Efflux ratio: P<sub>app</sub> B-A/ P<sub>app</sub> A-B; MMAE: monomethyl auristatin E; MRP2: multidrug resistance-associated protein 2; P<sub>app</sub> A-B: apparent permeability coefficient from apical to basolateral; P<sub>app</sub> B-A: apparent permeability coefficient from basolateral to apical; P-gp: glycoprotein; SEM: standard error of the mean

## 2.6.5.15.3 MMAE の BCRP, BSEP, MRP2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 及び OCT2 に対する阻害

被験物質：MMAE

CTD number	4-2.6-10			
Study number	-3234			
Study system	Vesicular transport assays were performed with inside-out membrane vesicles prepared from cells overexpressing human ABC transporters BCRP, BSEP and MRP2. Uptake experiments were performed using CHO or HEK293 cells stably expressing the respective human uptake transporters OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1 and OCT2.			
Method	<b>Vesicular transport inhibition assay:</b> MMAE was incubated with membrane vesicle preparations and the probe substrate. Incubations were carried out in the presence of 4 mmol/L ATP or AMP to distinguish between transporter-mediated uptake and passive diffusion into the vesicles. Reaction mixtures were preincubated for 10 min at 37°C for BSEP and MRP2, and 32°C for BCRP. Reactions were quenched by ice-cold washing buffer and immediate filtration. The filters were washed, dried, and the amount of substrate inside the filtered vesicles was determined by liquid scintillation counting. <b>Uptake transporter inhibition assay:</b> Cells were plated onto standard 96-well tissue culture plates. Uptake experiments were carried out at 37°C in 50 μL of HK buffer (pH 7.4) containing the probe substrate, MMAE, reference inhibitor and/or vehicle control solvent. After the experiment, cells were washed and lysed with 50 μL of 0.1 mol/L NaOH. Radiolabeled probe substrate transport was determined by measuring an aliquot (35 μL) from each well for liquid scintillation counting.			
Vesicular transport inhibition assay				
BCRP-mediated transport of estrone-3-sulfate				
Compound	Nominal concentration (μmol/L)	ATP dependent transport (pmol/mg/min)	Relative ATP dependent transport (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	326.33 (9.22)	103.91 (3.25)	-4
	1.00	332.76 (5.17)	105.96 (2.17)	-6
	0.20	319.67 (18.54)	101.79 (6.06)	-2
	0.04	316.81 (10.17)	100.88 (3.51)	-1
	0.008	319.31 (34.16)	101.68 (10.96)	-2
DMSO	1 (% v/v)	314.05 (4.21)	100.00 (1.90)	0
BSEP-mediated transport of taurocholate				
Compound	Nominal concentration (μmol/L)	ATP dependent transport (pmol/mg/min)	Relative ATP dependent transport (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	10.61 (0.33)	97.83 (3.26)	2
	1.00	10.93 (0.56)	100.77 (5.30)	-1
	0.20	10.25 (0.45)	94.51 (4.32)	5
	0.04	10.16 (0.71)	93.72 (6.64)	6
	0.008	11.28 (1.24)	104.08 (11.55)	-4
DMSO	1 (% v/v)	10.84 (0.14)	100.00 (1.78)	0

Table continued on next page

Table continued on next page

Vesicular transport inhibition assay (continued)				
MRP2-mediated transport of estradiol-17-β-glucuronide				
Compound	Nominal concentration (μmol/L)	ATP dependent transport (pmol/mg/min)	Relative ATP dependent transport (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	486.30 (19.90)	101.71 (5.38)	-2
	1.00	491.92 (33.33)	102.89 (7.78)	-3
	0.20	478.98 (14.44)	100.18 (4.52)	0
	0.04	464.73 (32.90)	97.20 (7.61)	3
	0.008	486.51 (23.15)	101.76 (5.92)	-2
DMSO	1 (% v/v)	478.11 (16.02)	100.00 (4.74)	0
Uptake transporter inhibition assay				
OAT1-mediated transport of tenofovir				
Compound	Nominal concentration (μmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	940.33 (66.15)	95.14 (7.78)	5
	1.00	983.67 (30.60)	99.53 (5.18)	0
	0.20	954.33 (25.97)	96.56 (4.81)	3
	0.04	1039.33 (15.34)	105.16 (4.66)	-5
	0.008	1015.67 (51.89)	102.77 (6.78)	-3
DMSO	1 (% v/v)	988.33 (41.25)	100.00 (5.90)	0
OAT3-mediated transport of estrone-3-sulfate				
Compound	Nominal concentration (μmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	3046.00 (84.89)	87.42 (9.19)	13
	1.00	3251.33 (198.37)	93.31 (11.04)	7
	0.20	3355.67 (182.08)	96.31 (11.07)	4
	0.04	3343.33 (174.93)	95.95 (10.94)	4
	0.008	3421.67 (399.37)	98.20 (15.18)	2
DMSO	1 (% v/v)	3484.33 (353.07)	100.00 (14.33)	0

Table continued on next page

Uptake transporter inhibition assay (continued)				
<i>OATP1B1-mediated transport of estradiol-17-β-glucuronide</i>				
Compound	Nominal concentration (μmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	2826.67 (16.08)	88.45 (1.16)	12
	1.00	3264.33 (71.64)	102.15 (2.55)	-2
	0.20	3276.00 (42.39)	102.51 (1.80)	-3
	0.04	3373.33 (82.59)	105.56 (2.87)	-6
	0.008	3413.33 (54.81)	106.81 (2.13)	-7
DMSO	1 (% v/v)	3195.67 (37.73)	100.00 (1.67)	0
<i>OATP1B3-mediated transport of cholecystokinin octapeptide</i>				
Compound	Nominal concentration (μmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	520.33 (33.61)	90.49 (6.62)	10
	1.00	599.33 (61.05)	104.23 (11.21)	-4
	0.20	572.33 (10.55)	99.54 (3.89)	0
	0.04	610.67 (16.86)	106.20 (4.69)	-6
	0.008	666.67 (25.27)	115.94 (5.94)	-16
DMSO	1 (% v/v)	575.00 (19.80)	100.00 (4.87)	0
<i>OCT1-mediated transport of metformin</i>				
Compound	Nominal concentration (μmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	109.00 (14.62)	71.24 (9.80)	29
	1.00	139.33 (7.30)	91.07 (5.53)	9
	0.20	150.67 (12.36)	98.47 (8.62)	2
	0.04	161.33 (14.74)	105.45 (10.16)	-5
	0.008	164.33 (7.70)	107.41 (6.02)	-7
DMSO	1 (% v/v)	153.00 (4.69)	100.00 (4.34)	0
<i>OCT2-mediated transport of metformin</i>				
Compound	Nominal concentration (μmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	231.33 (12.06)	76.52 (5.10)	23
	1.00	269.67 (9.13)	89.20 (4.78)	11
	0.20	309.67 (17.94)	102.43 (7.30)	-2
	0.04	280.00 (3.56)	92.61 (4.02)	7
	0.008	318.33 (13.03)	105.29 (6.14)	-5
DMSO	1 (% v/v)	302.33 (12.54)	100.00 (5.87)	0

Footnotes appear on next page



Data expressed as mean (SD), n=3.

ABC: ATP-binding cassette; AMP: adenosine monophosphate; ATP: adenosine triphosphate; BCRP: breast cancer resistance protein; BSEP: bile salt export pump; CHO: Chinese hamster ovary; DMSO: dimethyl sulfoxide; HEK: human embryonic kidney; HK: Henseleit-Krebs; MMAE: monomethyl auristatin E; MRP2: multidrug resistance-associated protein 2; NaOH: sodium hydroxide; OAT: organic anion transporter; OATP: organic anion transporting polypeptide; OCT: organic cation transporter

## 2.6.5.15.4 MMAE の OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1 及び OAT3 に対する基質性

被験物質： $[^3\text{H}]$ MMAE

CTD number	4.2.2.6-5 (参)	4.2.2.6-6 (参)	4.2.2.6-7 (参)	4.2.2.6-8 (参)	4.2.2.6-9 (参)
Study number	PDM-0008	PDM-0009	PDM-0010	PDM-0011	PDM-0012
Study system	CHO control cells and CHO cells over-expressing each transporter (OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1) HEK293 control cells and HEK293 cells over-expressing OAT3				
Method	Transporter over-expressing and respective control cells were incubated with $[^3\text{H}]$ MMAE (10 and 100 nmol/L for OATP1B1 and OATP1B3; 100 nmol/L for OCT2, OAT1 and OAT3) or each positive control ( $[^3\text{H}]$ estrone-3-sulfate at 1 $\mu\text{mol/L}$ for OATP1B1; Fluo-3 at 100 nmol/L for OATP1B3; $[^{14}\text{C}]$ metformin at 1 $\mu\text{mol/L}$ for OCT2; $[^3\text{H}]$ methotrexate at 1 $\mu\text{mol/L}$ for OAT1; $[^3\text{H}]$ estrone-3-sulfate at 1 $\mu\text{mol/L}$ for OAT3) for 10 min in the absence and presence of seven or eight increasing concentrations of each inhibitor (cyclosporine A for OATP1B1 and OATP1B3; cimetidine for OCT2; probenecid for OAT1 and OAT3). The cells were washed, lysed and added to scintillation fluid for liquid scintillation counting of the radioactivity. For Fluo-3 uptake experiments, 50 mmol/L $\text{CaCl}_2$ in 5% sodium dodecyl sulfate was added to rinsed wells and the plate was incubated at 37°C for 15 min. The plate was then analyzed on the fluorescent reader with following wavelengths: excitation 495 nm and emission 530 nm.				
Transporter	OATP1B1	OATP1B3	OCT2	OAT1	OAT3
Test article	$[^3\text{H}]$ MMAE	$[^3\text{H}]$ MMAE	$[^3\text{H}]$ MMAE	$[^3\text{H}]$ MMAE	$[^3\text{H}]$ MMAE
Substrate?	No	No	No	No	No
<b>Additional Information:</b> In each study, the accumulation of $[^3\text{H}]$ MMAE was similar in control cells and CHO or HEK293 cells over-expressing each transporter after 10 min incubations. The accumulation of MMAE in either cell line was independent of each inhibitor concentration. Active uptake was not a significant contributor to MMAE movement across cell membranes, suggesting a primarily diffusion mediated process. In contrast, uptake of each positive control was greater in transporter expressing cells than control cells, and was inhibited by each inhibitor ( $\text{IC}_{50}$ values of 0.54, 0.29, 6.33, 83.28 and 3.77 $\mu\text{mol/L}$ for OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1 and OAT3, respectively).					

$[^3\text{H}]$ MMAE: tritiated monomethyl auristatin E; CHO: Chinese hamster ovary; HEK: human embryonic kidney;  $\text{IC}_{50}$ : half maximal inhibitory concentration; MMAE: monomethyl auristatin E; OAT: organic anion transporter; OATP: organic anion transporting polypeptide; OCT: organic cation transporter

#### 2.6.5.16 薬物動態試験：その他

該当なし