

目次

2.6.6	毒性試験の概要文	4
2.6.6.1	まとめ	4
2.6.6.2	単回投与毒性試験	10
2.6.6.3	反復投与毒性試験	10
2.6.6.4	遺伝毒性試験	21
2.6.6.5	がん原性試験	22
2.6.6.6	生殖発生毒性試験	23
2.6.6.7	局所刺激性試験	25
2.6.6.8	その他の毒性試験	25
2.6.6.9	考察及び結論	29
2.6.6.10	図表	36
2.6.6.11	参考文献	36

表

表 2.6.6-1	毒性試験プログラム	5
表 2.6.6-2	ラット、カニクイザル及びヒトに静脈内投与した時の AGS-22M6E 又はエンホルツマブ ベドチンの曝露量比較	9
表 2.6.6-3	反復投与毒性試験一覧	11
表 2.6.6-4	エンホルツマブ ベドチンまたは AGS-22M6E 反復投与毒性試験における主な所見	35

略語及び用語の一覧

略語及び用語	定義
ADC	antibody-drug conjugate：抗体薬物複合体
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
ALP	alkaline phosphatase：アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase：アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	activated partial thromboplastin time：活性化部分トロンボプラスチン時間
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）
AST	aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
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 _{0-7d}	area under the concentration-time curve from time 0 to 7 days：投与 7 日後までの濃度時間曲線下面積
AUC _{0-t}	area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration：投与 t 時間後までの濃度時間曲線下面積
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 _{max}	maximum concentration：最高濃度
ECG	Electrocardiogram：心電図
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定
GGT	gamma glutamyltransferase：γ-グルタミルトランスフェラーゼ
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GMR	geometric mean ratio：幾何平均比
h00-1006(4)	humanized nonbinding immunoglobulin G1 control antibody conjugated with MMAE via the same protease-cleavable linker used in enfortumab vedotin：エンホルツマブ ベドチンと同一のタンパク質分解酵素で切断されるリンカーを介して MMAE を結合させた標的非結合性ヒト化 IgG1 対照抗体
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
MCH	mean corpuscular hemoglobin：平均赤血球ヘモグロビン
MCV	mean corpuscular volume：平均赤血球容積
MEC	molar extinction coefficient：モル吸光係数
MMAE	monomethyl auristatin E, also SGD-1010：モノメチルアウリスタチン E, SGD-1010

略語及び用語	定義
MTD	maximum tolerated dose : 最大耐用量
NOAEL	no observed adverse effect level : 無毒性量
RDW	red blood cell distribution width : 赤血球分布幅
SGD-1006	valine citrulline linker-MMAE, also vc-MMAE : バリン-シトルリンリンカー-モノメチルアウリスタチン E, vc-MMAE
SGD-1010	monomethyl auristatin E, also MMAE : モノメチルアウリスタチン E, MMAE
SGD-1427	<i>N</i> -acetylcysteine-vc-MMAE : <i>N</i> -アセチルシステイン-バリン-シトルリンリンカー-モノメチルアウリスタチン E
TA _b	total antibody : 総抗体
TFT	5-trifluorothymidine : 5-トリフルオロチミジン
TFT _r	5- trifluorothymidine resistance : 5-トリフルオロチミジン耐性
<i>Tk</i>	thymidine kinase : チミジンキナーゼ
<i>t</i> _{1/2}	half-life : 半減期
vc	valine-citrulline : バリン-シトルリン

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

エンホルツマブ ベドチン（ASG-22CE, AGS-22C3E）は、タンパク質分解酵素で切断されるバリリン-シトルリン（vc）マレイミドカプロイルリンカーを介して、完全ヒト型免疫グロブリン（Ig）G1 κ 抗体と微小管阻害薬モノメチルアウリスタチンE（MMAE）を結合させた抗体薬物複合体（ADC）である [Challita-Eid et al, 2016]。エンホルツマブ ベドチンは、以下のような多段階のプロセスを経て生物活性を発揮すると考えられている。すなわち、エンホルツマブ ベドチンは癌細胞表面の Nectin-4 タンパク質に結合して ADC-Nectin-4 複合体を形成する。形成された複合体は細胞内に移行し、リソソーム小胞へと輸送された後、タンパク質分解酵素による切断によって MMAE が細胞内に遊離される [Doronina et al, 2003]。この MMAE がチューブリン重合を阻害し、G2/M 期に細胞周期を停止させ、癌細胞のアポトーシスを引き起こす [Francisco et al, 2003]。医薬品規制調和国際会議（ICH）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、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、エンホルツマブ ベドチンの種々の非臨床毒性試験を実施した。

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 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 ベドチン及び AGS-22M6E は、ヒト Nectin-4 と同等の結合親和性を有してラット及びカニクイザルの Nectin-4 に対して交差反応性を示すことから、反復投与毒性試験には両動物種を用いた。動物種間で同様の毒性プロファイルが認められたため、13 週間反復投与毒性試験にはラットのみを用いた（ICH S6, S9, S9 Q&A）。静脈内投与での週 1 回の投与スケジュールは、臨床試験における投与経路とレジメンに基づいて選択した。MMAE 及び薬物非結合型抗体 AGS-22M6 の毒性は、カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験で評価し、薬物非結合型抗体についてはラットを用いた 4 週間反復投与試験でも評価した。

主要な非臨床毒性試験の概要を表 2.6.6-1 に示す。実施した各試験の一覧表は毒性試験概要表（2.6.7.1 毒性試験：一覧表）に示す。

表 2.6.6- 1 毒性試験プログラム

Study Type	ROA	Species	Test Articles
Repeat Dose Toxicity			
1 month†	iv	Rat	AGS-22M6, AGS-22M6E
1 month	iv	Rat	AGS-22M6, AGS-22M6E
3 month	iv	Rat	enfortumab vedotin
1 month	iv	Cynomolgus Monkey	AGS-22M6, AGS-22M6E, MMAE
1 month	iv	Cynomolgus Monkey	AGS-22M6E, enfortumab vedotin
Genotoxicity			
Reverse mutation assay	In vitro	Nonmammalian cells	MMAE
Forward mutation assay	In vitro	Mammalian cells	MMAE
In vivo micronucleus test	iv	Rat	MMAE
Reproductive and Developmental Toxicity			
Embryo-fetal development toxicity	iv	Rat	enfortumab vedotin
Embryo-fetal development toxicity	iv	Rat	MMAE

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; GLP: Good Laboratory Practice; MMAE: monomethyl auristatin E; ROA: route of administration

† Non-GLP.

主要な非臨床毒性試験で使用した被験物質は、臨床試験で使用した製剤及び市販予定の製品と比較して、組成、構造、生化学的、生物物理的及び免疫化学的性質、製剤組成並びに不純物プロファイルの点で同一又は同等であった（2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧）。

エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E をラット及びカニクイザルに反復投与した時の主な標的臓器は、皮膚及び骨髄であった。加えて、ADC を反復投与したラットでは、精巣毒性が認められた。ラット及びカニクイザルの両種で認められた皮膚毒性は用量制限毒性であり、皮膚での Nectin-4 発現に関連していると考えられた。MMAE のみを投与したカニクイザルでは、骨髄毒性が用量制限毒性であり、標的（Nectin-4）非依存的な毒性と考えられる。臨床推奨用量投与時のヒトでの全身曝露量（AUC）以下で、ラットのみで精巣毒性が認められたが、それも MMAE を介したものと考えられた。

薬物非結合型抗体では毒性は認められず、標的阻害や機能的な抗体活性による顕著な影響はないことが示された。

ラットを用いた 4 週間及び 13 週間反復投与毒性試験（週 1 回投与）において、最大耐用量（MTD）は 5 mg/kg であり、この時の全身曝露量（AUC）は臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 2~3 倍であった。カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験（週 1 回投与）におい

て、無毒性量（NOAEL）は 3 mg/kg であり、MTD でもあった。この時の全身曝露量（AUC）は、臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 3 倍であった。

標的臓器

ラット及びカニクイザルにおいて、皮膚毒性は用量制限毒性であり、抗原の発現と一致していた。いずれの動物種においても皮膚の剥離及び／又は皮膚の乾燥、発赤が最初にみられ、カニクイザルでは 1 mg/kg（週 1 回投与）以上（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 1 倍）の投与で認められた。これらの一般状態の変化に関連する皮膚の病理組織学的所見には、痂皮、表皮肥厚、及び多巢性の真皮及び皮下血管周囲への単核細胞浸潤、有糸分裂像の増加及びびらん／潰瘍形成が含まれていた。これらの皮膚関連の所見は、4 週間の反復投与に続いて 6 週間の休薬期間を設定した試験で回復性を示した。

投与部位（静脈内）の病理組織学的所見は皮膚の所見と類似しており、全身曝露量及び抗原発現に関連すると考えられた。2 mg/kg を 1 週間に 1 回投与したラットの 1 例では、中等度の皮下組織の壊死及び局所的に広範な表皮の潰瘍が認められた（20117437 試験）。これは、投与中の被験物質の血管外漏出と関連している可能性が高かった。

ラット及びカニクイザルでは、両種ともに骨髄毒性を伴う血液学的変化が認められた。これらには赤血球産生の低下を示す赤血球系パラメータの変化が含まれていた。カニクイザルのみで、好中球数及び好酸球数の減少も認められた。これらの変化は骨髄の病理組織学的変化と関連しており、6 週間の休薬期間後に完全な回復性を示した。

ラットのみで、雄性生殖器（精巣、精巣上部、前立腺、精嚢）の重量減少がみられ、これは精巣（精細管の変性）及び精巣上部（精子減少及び異常精子細胞）の病理組織学的所見と相関していた。前立腺及び精嚢では、上皮細胞の有糸分裂像の増加が認められた（8226169 試験）。精巣及び精巣上部の所見は、24 週間の休薬により部分的な回復がみられた（20135474 試験）。これらの所見は、精巣及び前立腺の上皮組織に存在する Nectin-4 発現に関連していると考えられる。しかしながら、精巣毒性は vc-MMAE を有する ADC の毒性試験においては共通してみられ、分裂の速い細胞における MMAE の薬理作用と一致している。

ラットにおいて、4 週間反復投与試験（週 1 回投与）の 10 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 6 倍）群で胸腺重量の減少が認められた（8226169 試験）。さらに、13 週間反復投与試験（週 1 回投与）の 2 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 1 倍）以上の群の雌で、副腎重量の減少が認められた（20117437 試験）。リンパ組織では、有糸分裂像の増加、炎症、皮質濾胞及びリンパ球の減少がみられ、6 週間の休薬期間後には回復性が認められた（8226169 試験）。リンパ系の毒性は vc-MMAE を有する ADC に共通であり、標的に依存しない機序においても MMAE の薬理作用と一致している。

ラットを用いた 4 週間反復投与試験（8226169 試験）で脾臓重量の増加が認められ、その変化は有糸分裂像／単細胞壊死の増加、赤脾髄への炎症細胞浸潤の増加、及び血液中の細胞数減少に反応した髄外造血の亢進と相関していた。

肝臓重量の増加がラットを用いた 13 週間反復投与試験（20117437 試験）で認められ、それは MMAE の薬理作用及びクリアランスに対する副次的作用と考えられる肝酵素の上昇（軽微から軽度）及び有糸分裂像の増加（8226169 試験）と相関していた。Nectin-4 は肝臓に発現するものの、ADC を用いた組織交差反応試験では肝臓での交差反応はみられなかった。肝毒性は、MMAE で認められる既知の標的非依存性の効果のひとつである [Saber and Leighton, 2015]。この病理組織学的所見は、4 週間の反復投与に続いて 6 週間の休薬期間を設定した試験（8226169 試験）において完全な回復性を示した。

ラットを用いた 4 週間反復投与試験（8226169 試験）では、10 mg/kg（週 1 回投与）以上の用量（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 6 倍）で、乳腺に有糸分裂像の増加がみられ、更に雄ラットでは乳腺の雌性化が認められた。これらの所見は、ラットを用いた別の 4 週間反復投与試験（20005662 試験）においては、同じ用量でもみられなかった。一方、ラットを用いた 13 週間反復投与試験（20117437 試験）では、ごく軽微な異常有糸分裂像及び中等度から重度の乳腺の萎縮が認められ、この時の全身曝露量（AUC）は臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 1 倍であった。これらの所見は標的発現と MMAE の副次的な薬理作用に関連すると考えられた。これらの所見は、4 週間の反復投与に続いて 6 週間の休薬期間を設定した試験（8226169 試験）において完全な回復性を示した。

エンホルツマブ ベドチンをラットに週 1 回、13 週間投与した際に、0.5 mg/kg 以上の群（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 0.2 倍）で、眼（角膜）に軽微な異常有糸分裂像が認められた。その所見は標的発現及び MMAE の薬理作用に関連すると考えられるものであった。なお、ラットに 4 週間反復投与した時には同様の所見は認められなかった。

MMAE の薬理作用に関連すると考えられる軽微な異常有糸分裂像及び／又は単細胞壊死が、ラットの他の組織でも認められた。これらの組織には、腸管、副腎、ハーダー腺が含まれていた。腸管の変化は標的発現に関連している可能性があると考えられたが、上皮の分裂が速い細胞に対する MMAE の標的非依存的な影響によることも予想された。この異常有糸分裂像に関連する肉眼的変化や一般症状は認められなかった。

遺伝毒性

細胞傷害性薬物である MMAE について遺伝毒性試験を実施した。MMAE は in vivo ラット骨髄小核試験において異数性誘発能を示したが、これは分裂装置に対する MMAE の薬理作用（微小管ネットワーク阻害）と一致している。

生殖発生毒性

エンホルツマブ ベドチン及び MMAE は胚・胎児毒性を示す。妊娠 6 及び 13 日に MMAE の 0.2 mg/kg を妊娠ラットに静脈内投与すると、吸収胚数、着床後死亡率の増加及び生存胎児数の減少が認められた。外表異常児もみられた。

妊娠 6 及び 13 日にエンホルツマブ ベドチンの 2 及び 5 mg/kg（それぞれ臨床推奨用量投与時のヒト血中 C_{max} の約 1 及び 3 倍）を妊娠ラットに静脈内投与したところ、吸収胚数、着床後死亡率の増加及び生存胎児数の減少が認められた。また骨格変異を有する胎児の発現率が増加した。

両試験で認められた吸収胚数及び着床後死亡率の増加は、胚発生初期に急速に分裂する細胞に影響を及ぼす MMAE による薬理的な微小管障害作用と一致している。

その他の試験

ビオチン化 AGS-22M6E を用いて組織交差反応性試験を実施した。カニクイザルの組織では、皮膚、食道及び扁桃の上皮細胞で免疫染色陽性を示した。ヒト組織では、皮膚（上皮細胞）、眼（角膜上皮）、食道（表層上皮）、胎盤（合胞体性栄養膜細胞）、扁桃（扁平上皮）及び子宮頸部（扁平上皮）に免疫染色陽性が認められた。ヒト組織における Nectin-4 は、精巣、乳腺（腺房及び導管）、腸管、前立腺、及び肝臓を含む他の臓器で様々な程度で発現していた。

エンホルツマブ ベドチンの成分である薬物及びリンカー-薬物複合体の光毒性リスクを評価した。MMAE 及び vc-MMAE（リンカー-MMAE）は ICH S10 ガイドラインで規定されている光毒性試験の実施基準に満たないことから、エンホルツマブ ベドチンは光毒性の懸念はないと考えられる。

臨床での高血糖所見の裏付けのため、グルコース恒常性に及ぼすエンホルツマブ ベドチンの影響を検討した。MMAE 又は標的結合性 ADC（vc-MMAE ADC、エンホルツマブ ベドチンと同じリンカー及びペイロードを結合）とヒト膵島細胞を 4 時間インキュベートしたところ、検討したいずれの濃度でも細胞生存率の低下は認められなかった。高濃度グルコース条件下でのより長時間のインキュベーション（12 時間）では、臨床推奨用量投与時の血中薬物濃度（ C_{max} ）に相当する MMAE 濃度では *in vitro* で膵島細胞の生存率を約 20%低下させた。インスリン分泌又は骨格筋におけるグルコース取り込みに対して、vc-MMAE ADC 又は MMAE はいずれも影響を示さなかった。

トキシコキネティクスと免疫原性

ラット及びカニクイザルを用いた毒性試験の一部として、エンホルツマブ ベドチン又は AGS-22M6E、総抗体（TA_b）及び MMAE の血清中濃度のトキシコキネティクス評価を実施した。また抗薬物抗体（ATA）の発現についても評価した。ADC のトキシコキネティクスプロファイルは雌雄間で同等であり、AUC 及び C_{max} は用量に比例して増加した。カニクイザルに AGS-22M6E の高用量（6 mg/kg）を投与した時の等モルに相当する非結合型 MMAE を投与したところ、MMAE の C_{max} （270000 pg/mL）は、AGS-22M6E 投与時の遊離 MMAE の C_{max} （202 pg/mL）に比べて 1340 倍に到達した。

エンホルツマブ ベドチンの平均血清中消失半減期（ $t_{1/2}$ ）は、ラット及びカニクイザルの MTD でそれぞれ 1.0 日及び 1.5 日であった。エンホルツマブ ベドチンの動物種ごとの曝露量の

概要を表 2.6.6-2 に示す。ヒトの曝露量は、臨床推奨用量である 1.25 mg/kg（EV-201 試験，データカットオフ日：2019 年 3 月 1 日）について収集されたデータを反映している。

表 2.6.6-2 ラット，カニクイザル及びヒトに静脈内投与した時の AGS-22M6E 又はエンホルツマブ ベドチンの曝露量比較

Study No.	Species	Regimen	Dose Association	Dose Level (mg/kg)	ADC Systemic Exposure†		
					C _{max} (µg/mL)	AUC _{0-7d} (µg·hr/mL)	X-fold Human AUC
20005662	Rat	4-week AGS-22M6E	MTD	5	131‡	1630‡	1.8
20117437	Rat	13-week enfortumab vedotin	MTD	5	125	2300¶	2.5
20005664	Cynomolgus Monkey	4-week AGS-22M6E	NOAEL	3	77	2450	2.7
20021751	Cynomolgus Monkey	4-week AGS-22M6E	Bridging study	3	78	2592	2.8††
		4-week enfortumab vedotin		3	98	3000	3.3††
EV-201	Human	Once weekly for first 3 weeks of 4-week cycle	Clinical dose	1.25	27.4	914.4	NA

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma-derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; MTD: maximum tolerated dose; NA: not applicable; NOAEL: no observed adverse effects level

† Data are arithmetic means derived from individuals' concentration-time data unless otherwise specified.

‡ Toxicokinetic parameters were derived using median concentration-time profiles.

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

¶ AUC_{0-t}

†† X-fold human C_{max} at the recommended clinical dose.

エンホルツマブ ベドチンの免疫原性は、動物種及び試験によって変動した。概して、AGS-22M6E に対する ATA の発現頻度は、カニクイザルの方がラットよりも高く、AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンに対する ATA の発現率はカニクイザルでは類似しているようであった（2.6.4.3.3, 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）。

結語：エンホルツマブ ベドチンの毒性プロファイルは、エンホルツマブ ベドチン，AGS-22M6E，MMAE，及び AGS-22M6（薬物非結合型抗体）を用いた一連の非臨床毒性試験において評価された。ラット及びカニクイザルでのエンホルツマブ ベドチンの反復投与でみられた皮膚及び静脈内投与部位における影響は、MMAE を有する Nectin-4 特異的 ADC の標的を介した毒性と一致している。皮膚毒性は用量制限毒性であった。骨髄毒性，精巣毒性及び関連する末梢血細

胞の減少は、ADC のペイロードである MMAE によって引き起こされる薬理的な微小管阻害作用と一致している。さらに標的臓器として、精巣上体、脾臓、眼（角膜）、リンパ組織、副腎、ハーダー腺、腸管、前立腺、乳腺、及び肝臓が特定された。エンホルツマブ ベドチン（MMAE 及びリンカー-MMAE）は光毒性を示さないと考えられる。さらに、臨床推奨用量投与時の血中薬物濃度（ C_{max} ）に相当する MMAE 濃度は、*in vitro* で臍島細胞の生存率を約 20%低下させたが、骨格筋細胞のグルコース取り込みに対する影響は認められず、また、カニクイザルではグルコース恒常性に対する影響を示唆するような血糖値の変動も認められなかった。MMAE は異数性誘発により遺伝毒性を示し、エンホルツマブ ベドチンと MMAE はいずれも胚・胎児毒性を示した。

以上、認められた毒性がモニタリング可能であること、及び可逆的であることに基づき、エンホルツマブ ベドチンの毒性プロファイルは、対象患者集団での使用を妨げるものではないと結論される。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E の単回投与毒性試験は実施しなかったが、急性毒性については、AGS-22M6E の週 1 回投与の反復投与毒性試験成績から評価した。ラットでは GLP 試験（20005662 試験）の用量設定のために、より高用量を投与された非 GLP 4 週間毒性試験（8226169 試験、投与量：1.5, 10 及び 15 mg/kg, 週 1 回投与）の成績から評価した。15 mg/kg の投与 8 日目（初回投与後 7 日）に 12 例のうち 1 例で皮膚の潰瘍/痂皮が認められ、その動物の投与 1~8 日目の体重増加量（17 g）は、対照群の体重増加量の平均値（44 g）に比べて低値を示した。しかし、単回投与後 7 日までの間に、死亡や瀕死に繋がるような重篤な変化は認められなかった。したがって、ラットの単回投与における概略の致死量は 15 mg/kg（この際の AUC は、臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 9 倍）を超えると判断した。カニクイザルの GLP 4 週間毒性試験（20005664 試験、投与量：1, 3 及び 6 mg/kg, 週 1 回投与）では、6 mg/kg の投与 5 日目（初回投与後 4 日）から皮膚の発赤、投与 7 日目（初回投与後 6 日）から皮膚剥離が認められた。投与 7 日目（初回投与後 6 日）の体重は対照群とほぼ変わらなかった。この用量を 2 回投与した後には状態が悪化し安楽死に至ったものの、単回投与後に重篤な変化は認められず、概略の致死量は 6 mg/kg（この際の AUC は、臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 6 倍）を超えると判断した。ラット及びカニクイザルの反復投与試験に基づく急性毒性プロファイルは、主に皮膚毒性であった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

エンホルツマブ ベドチン、AGS-22M6E、MMAE 及び AGS-22M6（薬物非結合型抗体）の毒性については、用量設定のための非 GLP（Good Laboratory Practice）試験を経て、GLP を遵守した反復投与毒性試験において、ラットでは 4 週間（AGS-22M6E）又は 13 週間（エンホルツマブ

ベドチン)、カニクイザルでは4週間までの投与期間を設定して詳細に評価した。MMAEのような分裂の速い細胞を標的とする遺伝毒性薬剤に関するICH S9 Q&A ガイドラインに準じて、また4週間のカニクイザル毒性試験で更なる潜在的な標的臓器が特定されなかったことを考慮して、13週間の毒性試験の動物種としてラットを選択した。皮膚、静脈内投与部位、骨髄、雄性生殖器（精巣、精巣上部、前立腺及び精嚢）、脾臓、眼（角膜）、リンパ組織、腸管、乳腺及び肝臓において、用量依存的かつ可逆的な標的臓器毒性が認められた。皮膚毒性はいずれの動物種においても用量制限毒性であった。骨髄毒性は、低用量群では主に赤血球系への影響として特徴づけられ、高用量群では細胞数低下及び汎血球減少症に進行した。脾臓及びリンパ組織における毒性は、リンパ球減少を特徴としていた。ラットでのみ認められた肝毒性は、病理組織学的に肝細胞の単細胞壊死/異常有糸分裂像の所見とそれらに関連した肝胆道系酵素の上昇であった。ラットで認められた精巣毒性は、用量依存的な精巣の精細管の変性及び精巣上部の精子減少及び異常精子細胞を特徴としていた。投与に関連した所見は、最終投与後24週までに部分的に回復した精巣毒性を除き、最終投与後6週以内に概ね回復性を示した。

反復投与試験の一覧を表 2.6.6-3 に示し、続いて各試験の概要を示す。

表 2.6.6-3 反復投与毒性試験一覧

Species	Study Number	GLP	Animal/ Sex per Group	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Duration of Dosing†
Rat	8226169	No	6M‡	AGS-22M6E, AGS-22M6	1.5, 10, 15 10	4 weeks with 6-week recovery
	20005662	Yes	10/5§	AGS-22M6E, AGS-22M6	2, 5, 10 10	4 weeks with 6-week recovery
	20117437	Yes	10¶	Enfortumab vedotin	0.5, 2, 5	13 weeks with 1-week recovery
Cynomolgus Monkey	20005664	Yes	3/2§	AGS-22M6E, AGS-22M6, MMAE	1, 3, 6 6 0.1093/0.0545	4 weeks with 6-week recovery
	20021751	Yes	3/2§	AGS-22M6E, enfortumab vedotin	3 3	4 weeks with 6-week recovery

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; GLP: Good Laboratory Practice; MMAE: monomethyl auristatin E.

† Dosing period is defined as the period from administration of the first to the last dose, e.g., dosing once weekly for 4 weeks (q1w×4) has a dosing period of 1 month (4 weeks).

‡ Male only.

§ Terminal necropsy/recovery necropsy.

¶ 9 animals/sex per group were used for toxicokinetic analysis

2.6.6.3.1 試験の概要：げっ歯類

2.6.6.3.1.1 雄性ラットを用いた AGS-22M6E 及び AGS-22M6 の反復静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験

添付資料 4.2.3.2-1 (参)

雄性ラットに AGS-22M6E 及び AGS-22M6 を週 1 回、4 週間（計 4 回）静脈内投与し、毒性及びトキシコキネティクスを評価する非 GLP 試験を実施した（8226169 試験）。さらに、5 週間後（最終投与後 6 週間）に影響の可逆性又は遅発性を評価した。本試験の結果は GLP 試験の用量設定に供した。

Sprague-Dawley 系雄性ラットを 9 群（6 例／群）に割り付け、溶媒又は AGS-22M6E の 1.5、10 又は 15 mg/kg 及び AGS-22M6 の 10 mg/kg を週 1 回、静脈内投与した。生死、一般状態、体重、摂餌量、臨床化学的検査及び病理学的検査に関する評価を行った。また、トキシコキネティクス（非結合型 MMAE, ADC, TAB）及び ATA 評価のために血液サンプルを採取した。

AGS-22M6E の 1.5 mg/kg 及び AGS-22M6 の 10 mg/kg をラットに週 1 回、計 4 回投与したとき、忍容性が確認された。AGS-22M6E の 15 mg/kg 群では用量制限毒性がみられ、体重減少又は重篤な一般状態（重度の潰瘍／痂皮、自発運動低下、及び／又は蒼白もしくは低体温）を呈したため、3 回目の投与後にこの群を早期に終了させ、回復期間に移行した。被験物質投与に関連した平均体重及び摂餌量の低値並びに重度の潰瘍／痂皮が、AGS-22M6E の 10 mg/kg 以上の群で観察された。

AGS-22M6E の 10 mg/kg 以上の群で、平均赤血球容積（MCV）及び網状赤血球数の増加を伴う赤血球パラメータの減少、血小板数、総白血球数、リンパ球数及び好酸球数の減少、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）の短縮、グロブリン濃度の増加、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、γグルタミルトランスフェラーゼ（GGT）及びアルカリフォスファターゼ（ALP）活性の上昇、並びにアルブミン／グロブリン比の減少を含む可逆的な臨床化学的変化が認められた。

AGS-22M6E 投与に関連した器官重量の減少が、10 mg/kg 群の前立腺、精囊、精巣及び胸腺で認められ、病理組織学的所見は、AGS-22M6E の 10 mg/kg 以上の群の皮膚（静脈内投与部位の一部として採取した皮膚を含む）、精巣、精巣上部、前立腺、精囊、骨髄、乳腺、脾臓、肝臓、リンパ組織及び腸管で最も顕著であった。AGS-22M6E の 10 mg/kg 以上の群では、骨髄細胞減少に加えて、血中の細胞数の減少に反応した脾臓における髄外造血の亢進が認められた。乳腺では雌性化、細胞破碎像、壊死、有糸分裂像の所見のみがみられた。1.5 mg/kg 群では、副腎及び精巣の所見に限られていた。

AGS-22M6E を週 1 回、計 4 回の静脈内投与した時の NOAEL は、1.5 mg/kg 群で不可逆的な精巣の病理組織学的所見がみられたため、求められなかった。AGS-22M6 を週 1 回、計 4 回静脈内投与した時の無影響量は 10 mg/kg であった。

2.6.6.3.1.2 Sprague-Dawley ラットを用いた AGS-22M6E 及び AGS-22M6 の 4 週間静脈内投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

添付資料 4.2.3.2-2

Sprague-Dawley ラットに AGS-22M6E 及び AGS-22M6 を週 1 回、計 4 回静脈内投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価するとともに、6 週間の休薬期間後に影響の回復性を評価する GLP 試験を実施した（20005662 試験）。

各群雌雄各 15 例のラットに溶媒（米国薬局方 0.9%塩化ナトリウム注射液）又は 2, 5 又は 10 mg/kg の AGS-22M6E を週 1 回、計 4 回静脈内投与した。さらに雌雄各 15 例のラットに AGS-22M6（非薬物結合型抗体）を 10 mg/kg の用量で同様に投与した。トキシコキネティクス評価のため、全ての群にサテライト群を設けた。最終投与の 1 週間後（29 日）に、主試験群の各群雌雄各 10 例を屠殺した。各群雌雄各 5 例は引き続き休薬期間に進み、64 日に剖検し、投与終了時にみられた所見の回復性を評価した。

本試験では、一般状態（死亡／瀕死状態のチェック及び詳細な一般症状観察）、体重、体重増加量、摂餌量、眼科学的検査、臨床化学的パラメータ（血液学的検査及び血液生化学的検査）、トキシコキネティクス及び ATA パラメータ、剖検、器官重量、及び病理組織学的検査について評価した。

AGS-22M6E の 2 及び 5 mg/kg、並びに AGS-22M6 の 10 mg/kg を週 1 回、計 4 回静脈内投与したとき、良好な忍容性を示した。AGS-22M6E の 10 mg/kg 群で、27 日に 1 例が死亡発見された。この動物は、11 日から背側頸部、頭部、尾側背部に中等度から重度の皮膚剥離／潰瘍を示し、2 週から 3 週の間 14 g の体重減少を示した。16 日の血液生化学検査データでは、ALT（対照群雄の平均値と比較して 76 倍以上）及び AST 活性（対照群雄の平均値と比較して 54 倍以上）の顕著な増加を示した。また、ALP 活性、GGT 活性、ビリルビン値は対照群の平均値と比較して 2～5 倍に上昇していた。またこの動物では、16 日に好中球数の顕著な高値（対照群の平均値と比較して 10 倍以上）、白血球数の中等度の高値、リンパ球数の中等度の低値、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の軽微な低値がみられた。以上の変化とそれに続く死亡は、AGS-22M6E 投与との関連性があるものと考えられた。なお、自己融解のため、病理組織学的検査による死因特定には至らなかった。

AGS-22M6E 投与に関連する一般状態の変化として、5 mg/kg 群の大部分の動物における軽度の皮膚剥離、10 mg/kg 群の全例における軽度から中等度の皮膚剥離／潰瘍、10 mg/kg 群の一部の動物における尿の付着が認められた。10 mg/kg 群の雄で中等度の体重増加抑制、10 mg/kg 群の雄で 3 週～4 週に軽微な摂餌量減少が認められた。休薬動物では、AGS-22M6E 投与に関連する一般状態や摂餌量の変化は認められなかった。

眼科学的検査において、AGS-22M6E 及び AGS-22M6 投与に関連した変化は認められなかった。

5 及び 10 mg/kg 群で AGS-22M6E 投与に関連する血液学的検査値の変化が認められ、その内訳は 16 及び 29 日の赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）の減

少、MCV、赤血球分布幅（RDW）、平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）及び網赤血球数の増加であった。10 mg/kg 群では、軽度の球状赤血球、分裂赤血球及び有棘赤血球を含む異常な赤血球形状の発現頻度が高かった。休薬期間終了時（64 日）、5 mg/kg 群の雄及び 10 mg/kg 群の雌雄の赤血球数及び MCV を除き、全ての赤血球パラメータは対照群と同程度に回復した。なお、10 mg/kg 群で RDW（雄のみ）及び MCH の軽微な増加が認められたが、これら変化は生物学的には重要でないと考えられる。

AGS-22M6E 投与に関連する血液生化学的検査値の変化として、5 及び 10 mg/kg 群で ALT、AST、ALP 及び GGT 活性の上昇が認められた。さらに、10 mg/kg 群でアルブミン濃度（及び総タンパク量）の低下が認められた。血液生化学パラメータは 64 日には完全に回復していた。

AGS-22M6E の曝露量には用量比例性が認められ、性差はみられなかった。AGS-22M6E 投与後の MMAE の最高濃度は、ADC の C_{max} の約 0.3~0.5% であった。AGS-22M6E の週 1 回の投与による、ADC、TA_b 及び MMAE の全身への蓄積はほとんどなかった。AGS-22M6E 又は AGS-22M6 の週 1 回反復静脈内投与により、ATA の形成を伴う中等度の免疫応答（主試験群の動物によって示されている）が誘発された。セロコンバージョンの程度は雌雄ラットで同様であった。ラットにおける更なるトキシコキネティクス評価については、[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、TA_b 及び MMAE のトキシコキネティクス](#)に記載する。

AGS-22M6E 投与に関連する精巣及び脾臓の絶対重量及び相対重量の変化が、29 日に認められた。64 日には、AGS-22M6E に関連する器官重量の変化は、すべての投与群でみられた精巣重量の減少のみであった。

AGS-22M6E 投与に関連する病理組織学的変化として、精巣（精上皮の変性）、精巣上体（管内の精子減少／異常精子細胞）、大腿骨骨髓（細胞数減少）に認められた。また 29 日に、雌雄の皮膚（潰瘍形成、表皮過形成、及び／又は表皮の炎症）においても、AGS-22M6E 投与に関連した病理組織学的変化が認められた。休薬期間終了後（64 日）、精巣及び精巣上体の所見はさらに顕著となり、概して増悪化した。休薬動物では骨髓の細胞数減少及び皮膚潰瘍／炎症は認められなかった。1 週間に 1 回、計 4 回静脈内投与時の AGS-22M6E の MTD は、5 mg/kg である。

2.6.6.3.1.3 Sprague-Dawley ラットを用いたエンホルツマブ ベドチンの 3 カ月間静脈内投与毒性試験

添付資料 [4.2.3.2-3](#)

Sprague-Dawley ラットにエンホルツマブ ベドチンを週 1 回、計 13 回静脈内投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価し、特性を明らかにする GLP 試験を実施した（20117437 試験）。

主試験群 80 例（1~4 群に雌雄各 10 例）及びトキシコキネティクス評価のためのサテライト群 54 例（5~7 群に雌雄各 9 例）の Sprague Dawley ラットに対照物質（5% [w/v] 滅菌デキストロース溶液）又はエンホルツマブ ベドチンを 0.5、2.0 及び 5.0 mg/kg の用量で週 1 回、計 13 回

(1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 及び 85 日) 静脈内投与した。投与液濃度は全群 1.0 mg/mL とし、所定の用量となるように、各例の投与液量を調節した。動物は初回投与後 13 週間観察し、92 日に主試験群の全例で予定通り剖検を実施した。試験評価項目は、生死及び瀕死の有無、一般状態、摂餌量、体重及び体重増加量、眼科学的検査、臨床化学的検査（血液学的検査、血液生化学的検査、凝固系検査及び尿検査）、トキシコキネティクス及び ATA 評価、並びに病理学的検査（剖検、器官重量及び病理組織学的検査）とした。

Sprague Dawley ラットにエンホルツマブ ベドチンを週 1 回、計 13 回静脈内投与した結果、評価した全用量で忍容性を示し、被験物質投与群の全ての動物が予定剖検時まで生存した。手技に関連した尾部傷害のため、64 日に対照群の 1 例を安楽死させた。体重（体重及び体重増加量）、摂餌量、眼科学的検査、凝固系検査及び尿検査では、エンホルツマブ ベドチンに関連する所見は認められなかった。

エンホルツマブ ベドチン投与に伴う明確な一般状態の所見が認められたのは 5 mg/kg 群のみであり、身体の種々の部位（頭部、顔面、背部及び／又は背側頸部領域）に軽微から中等度の皮膚剥離が認められた。さらに剖検時に認められたこれらの変化には、5 mg/kg 群で認められた病理組織学的所見の表皮及び／又は付属器の軽微な異常有糸分裂像及び単細胞壊死との相関があり、多くは痂皮、表皮肥厚、びらん／潰瘍及び単核細胞浸潤等の他の変化を伴っていた。

血液学的検査値及び血液生化学的検査値にエンホルツマブ ベドチン投与に関連する変化が認められ、5 mg/kg 群で最も顕著であった。血液学的検査値の変化は、5 mg/kg 群の雄及び 0.5 mg/kg 以上の群の雌で認められた軽微な赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）の減少であり、5 mg/kg 群では軽微から軽度の網赤血球数、MCV（雄のみ）、MCH（雄のみ）及び RDW の増加、2 mg/kg 以上の群では軽微から軽度の血小板増加を伴っていた。血液生化学的検査値の変化は、5 mg/kg 群における軽微から軽度の ALT, AST, ALP, GGT（雄 1 例）活性及びビリルビン値の増加、並びに 5 mg/kg 群における軽微なアルブミン（雌のみ）減少、アルブミン／グロブリン比の低下、グロブリン増加であった。これらの変化には病理組織学的所見との相関は認められなかった。5 mg/kg 群の雄及び 2 mg/kg 以上の群の雌には、軽微から軽度のコレステロール増加も認められた。

92 日に認められた剖検所見は、2 mg/kg 以上の群における精巣の小型化及び／又は軟化（病理組織学的には変性／萎縮）であり、精巣の絶対重量及び相対重量の減少との相関が認められた。エンホルツマブ ベドチン投与に関連する精巣変性／萎縮に対し、2 mg/kg 以上の群では精巣上体に二次的な細胞残屑及び精子減少が認められた。エンホルツマブ ベドチンの投与に伴うその他の雄性生殖器にみられた病理組織学的所見は、2 mg/kg 以上の群における精巣間細胞の異常有糸分裂像、5 mg/kg 群における精巣上体上皮細胞の単細胞壊死であった。5 mg/kg 群で背部皮膚に痂皮が認められたほか、2 mg/kg 群の 1 例に静脈内投与部位付近の遠位尾部の皮膚剥離（被験物質の血管外漏出に関連する可能性のある壊死）が認められた。雌では、2 mg/kg 以上の群で副腎重量の減少、5 mg/kg 群で肝臓重量の増加が認められた。この他のエンホルツマブ ベドチン投与に関連する病理組織学的変化は、雄の乳腺の萎縮（5 mg/kg 群）、乳腺（雄 [5 mg/kg] 及び雌

[2 mg/kg 以上]), 角膜 (雄 [0.5 mg/kg 以上] 及び雌 [5 mg/kg]) で対照群と比較して有糸分裂像が増加), ハーダー腺 (5 mg/kg), 静脈内投与部位の表皮及び付属器 (0.5 mg/kg 以上), 並びに背部皮膚の表皮及び付属器 (5 mg/kg) の異常有糸分裂像及び/又は単細胞壊死であった。また背部皮膚において, 5 mg/kg 群で認められた痂皮, 表皮肥厚, びらん/潰瘍及び単核細胞浸潤等の病理組織学的変化は, 主体となる有糸分裂抑制及び単細胞壊死により二次的に発生したか, あるいはエンホルツマブ ベドチンに関連する皮膚毒性で生じた刺激による軽微な搔創により二次的に発生した可能性があると考えられた。5 mg/kg 群の雄 1 例における骨髓の軽度造血細胞の増加は, エンホルツマブ ベドチン投与に関連する赤血球減少により二次的に発生したものと考えられ, 血液学的検査で認められた網赤血球数増加と相関を示したが, 単発的に発生したことから, 0.5 mg/kg 以上の群におけるエンホルツマブ ベドチン投与に起因した血液学的変化は, 概ね骨髓における形態変化を示すほどではないことが示された。

エンホルツマブ ベドチンの曝露量には用量比例性が認められ, 性差はみられなかった。0.5, 2 及び 5 mg/kg の初回投与時のエンホルツマブ ベドチンの全身曝露量 (AUC_{0-t}) は, それぞれ 168, 766 及び 2300 µg·hr/mL であり, 最高濃度 (C_{max}) はそれぞれ 15.9, 40.4 及び 125 µg/mL であった。エンホルツマブ ベドチン投与後の 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。エンホルツマブ ベドチンの週 1 回投与による, ADC 及び MMAE の全身への蓄積はほとんどなかった。エンホルツマブ ベドチンを週 1 回で反復静脈内投与すると, ATA 形成を伴う免疫反応が誘発され, 85 日のトキシコキネティクスプロファイルに影響を及ぼした。

結論として, Sprague Dawley ラットにエンホルツマブ ベドチンを 0.5, 2 及び 5 mg/kg の用量で週 1 回, 計 13 回静脈内投与した結果, エンホルツマブ ベドチン群の全例が所定の期間生存し, 忍容性を示した。精巣 (2 mg/kg 以上), 精巣上体 (2 mg/kg 以上), 乳腺 (2 mg/kg 以上), 眼 (0.5 mg/kg 以上), ハーダー腺 (5 mg/kg), 投与部位 (0.5 mg/kg 以上) 及び皮膚 (5 mg/kg) など, 幾つかの臓器が毒性標的として認められた。これらの組織で認められた主要な病理組織学的所見は, 異常有糸分裂像, 単細胞壊死及び/又は変性/萎縮であった。認められた所見及び組織の性質を考慮すると, 病理組織学的変化は毒性と考えられたが, 死亡が認められず, 臨床的な影響 (皮膚剥離を除く) も認められないことを考慮すると, 本試験で観察された程度のこれらの所見は重篤な毒性を示すものではないと考えられた。さらに, 血液学的パラメータ及び血液生化学的パラメータの変化は, 5 mg/kg 群で明らかであったが, 毒性とは判断しない程度 (軽微から軽度) であった。エンホルツマブ ベドチンに関連した臨床的影響は, 5 mg/kg 群の皮膚剥離に限られていた。エンホルツマブ ベドチンを週 1 回, 計 13 回投与したときの MTD は 5 mg/kg である。

2.6.6.3.2 試験の概要：非げっ歯類

2.6.6.3.2.1 カニクイザルを用いた AGS-22M6E 及び AGS-22M6 の 4 週間静脈内持続投与 毒性試験及び 6 週間回復性試験

添付資料 4.2.3.2-4

カニクイザルに AGS-22M6E を週 1 回、計 4 回、30 分間静脈内持続投与したときの毒性及びトキシコキネティクスプロファイルを明らかにするとともに、6 週間の休薬期間後に変化の回復性を評価するために本 GLP 試験を実施した（20005664 試験）。ADC（AGS-22M6E）の毒性を明確にするために、薬物非結合型抗体（AGS-22M6）を ADC の高用量と同量で投与し、MMAE を ADC の高用量群の等モルに相当する量で投与した。

60 例のカニクイザルを各群雌雄各 5 例に割り付け、溶媒（米国薬局方 0.9%塩化ナトリウム注射液）又は AGS-22M6E を 1, 3, 6 mg/kg, AGS-22M6 を 6 mg/kg, 又は MMAE を ADC の高用量の等モル相当量（0.1093/0.0545 mg/kg）で投与した。割り付けられた各群雌雄各 5 例のうち、各群雌雄各 3 例を投与 29 日（最終投与後 1 週間）に剖検し、雌雄各 2 例を 63 日（6 週間の休薬期間）に剖検した。投与容量は全群 5 mL/kg とした。被験物質投与に関連する毒性として、AGS-22M6E の高用量群（6 mg/kg）で 3 例が 11～13 日に計画外の安楽死に至ったことに基づき、15 日の投与前に投与を中止した。6 mg/kg 群の全例に 2 回投与された。健康状態を総合的に評価した結果、15 及び 22 日の投与を中止することを獣医スタッフと協議して決定し、生存した 6 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 2 例の剖検日を 18 及び 19 日に変更した。残りの雄 2 例及び雌 2 例を回復動物とし、49 及び 50 日（8 日の投与から約 6 週間後）に安楽死させた。AGS-22M6E の 6 mg/kg の投与を中止したことにより、残る 15 日と 22 日の MMAE の投与量については、高用量ではなく、中間用量（3 mg/kg）と整合するように、投与量を 0.1093 mg/kg から 0.0545 mg/kg（投与容量を 5 mL/kg から 2.5 mL/kg）に変更した。

試験評価項目は、一般状態（死亡及び瀕死の有無、詳細な症状観察）、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図（ECG）、血圧、心拍数、臨床化学パラメータ（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学検査及び尿検査）、トキシコキネティクス及び ATA 評価、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。

カニクイザルに AGS-22M6E の 1 及び 3 mg/kg、薬物非結合型抗体（AGS-22M6）の 6 mg/kg を週 1 回、計 4 回静脈内持続投与したときの忍容性は良好であり、被験物質投与に関連した毒性所見は認められなかった。AGS-22M6E の 6 mg/kg 投与では、2 回目投与後の瀕死と関連しており、11～13 日に 3 例が計画外の安楽死に至った。MMAE は 1 日と 8 日に 0.1093 mg/kg を、15 日と 22 日には 0.0545 mg/kg を投与した結果、19 日に 1 例の計画外の安楽死が生じた。MMAE 群の 1 例が 13 日に死亡したが、MMAE 投与に起因するものではなかった。尿検査、プロトロンビン時間、APTT、ECG、血圧及び心拍数に対して AGS-22M6E、AGS-22M6 及び MMAE 投与の影響は認められず、評価したいずれの群でも眼に対する影響は認められなかった。被験物質投与に関連した影響を以下に要約する。

AGS-22M6E の 1 mg/kg 群では、被験物質投与に関連した影響は、29 日に剖検した雌雄各 1 例でみられた病理組織学的な投与部位の病変と、皮膚剥離及び乾燥／発赤皮膚に限られていた。皮膚の乾燥は休薬期間終了時には明らかではなく、病理組織学的な変化は認められなかった。

AGS-22M6E の 3 mg/kg 投与は良好な忍容性を示したが、皮膚の剥離及び乾燥／発赤、対照群との比較で、8 及び 15 日に網状赤血球数の減少（雌のみ）、15、22 及び 29 日には赤血球パラメータの低下（雌のみ）、15 及び 22 日の好中球の減少、22 及び 29 日の好酸球の減少、1 例の雌で病理組織学的な静脈内投与部位の病変（軽度の真皮の炎症及び重度の非敗血性血栓）、並びに 2 例の雌で軽度の胸腺萎縮を含む、いくつかの被験物質投与に関連した影響が認められた。雌 2 例の胸腺萎縮は、被験物質投与に直接関連しているのではなく、安楽死前の動物の全身状態に関連していた可能性がある。すべての所見は休薬期間中に回復した。

AGS-22M6E の 6 mg/kg を 1 及び 8 日に投与した結果、全身及び眼周囲に重度の皮膚の乾燥／発赤及び皮膚剥離が生じたため、11～13 日に 3 例が計画外の安楽死に至った。これらの動物は嗜眠状態にあり、活動性の低下を示した。残る動物の全身状態を考慮して、15 日の投与は中止し、18 及び 19 日に剖検を実施した。これらの皮膚変化は、6 mg/kg 群の他の例でも主に 5 日（発赤）から始まり、49 及び 50 日まで認められたが、投与中止後には発現率は顕著に低下し、臨床状態の不良との関連は認められなかった。その他の被験物質投与に関連した所見として血液学的変化（網状赤血球数及び白血球数の減少）が認められ、それらは骨髄毒性と一致するものであった。網状赤血球数は、赤血球パラメータが低下したにもかかわらず、8 及び 15 日（雄のみ）に減少した。白血球数（総白血球数、好中球数、リンパ球数、単球数及び好酸球数）は 8 日に減少したが、それらの変化は 15 日には部分的に回復性を示した。さらに、これらの動物では、急性期反応（アルブミンの減少及びグロブリン及びフィブリノーゲンの増加）及びカリウムの増加などの臨床化学的变化が認められた。早期に安楽死させた動物の病理組織学的所見として、真皮及び血管周囲の炎症及び／又は出血、皮下の静脈の軽度な変性及び表皮の中等度のびらん、皮膚の潰瘍、炎症及び過角化を特徴とする投与部位の障害、並びに動物の全身健康状態に関連していると考えられる胸腺萎縮が認められた。

以上より（AGS-22M6E の結果）、6 mg/kg 群では 3 例を 18 及び 19 日に安楽死させて剖検を行った。病理組織学的所見として、投与部位の中等度の皮下炎症、リンパ節のリンパ過形成、皮膚の炎症、過形成及び過角化が認められた。また、6 mg/kg 群で 18 及び 19 日に剖検を行った全例で、軽度又は中等度の胸腺萎縮が認められた。投与終了時に認められたすべての病理組織学的所見は、休薬期間の終了時には回復性を示した。6 mg/kg 群で認められた血液学的変化は、RDW（網状赤血球数の増加を反映）及び好酸球数の部分的な回復を除いて、休薬期間終了時には対照値と同等の値を示した。皮膚の乾燥は休薬期間中に散発的に認められたが、その発現頻度及び程度は投与期間と比較して軽減していた。

1 日と 8 日に MMAE の 0.1093 mg/kg を投与し、15 日と 22 日に MMAE の 0.0545 mg/kg を投与した結果、臀部付近に外科的に修復できない大きな皮膚欠損が生じたため、1 例の計画外の安楽死が生じた。MMAE 投与による標的臓器は、忍容性不良であった AGS-22M6E の 6 mg/kg 群で同

定されたものと類似していたが、皮膚の乾燥／発赤及び皮膚剥離はほとんど認められず、摂餌量の減少及び水様便が認められた。これらの動物での臨床化学的变化については、忍容性不良であった AGS-22M6E の高用量を投与した動物の変化と類似しており、8日に骨髓毒性と一致する変化（赤血球パラメータの減少及び白血球数の減少にもかかわらず、網状赤血球数の減少）が認められ、投与量を下げた15日にはこれらの変化のほとんどが少なくとも部分的には回復していた。さらにこれらの動物では、15、22及び／又は29日の急性期反応（アルブミンの減少、グロブリン及びフィブリノーゲンの増加）及びカリウムの増加などの臨床化学的变化が認められた。計画外の安楽死動物については、投与部位（皮膚及びリンパ節を含む）の障害、脾臓の赤脾髄における混合性炎症細胞浸潤がみられ、被験物質投与に関連している可能性が高いと考えられる。MMAE群で29日に安楽死させた動物では、静脈内投与部位の病変は認められなかったが、雄1例では静脈内投与部位付近に皮膚障害が認められ、4例全てで胸腺萎縮が認められた。MMAE群で29日に安楽死させた雌2例の脾臓の赤脾髄での中等度の混合性炎症細胞浸潤は、被験物質投与に関連している可能性が高いと考えられた。MMAE群で13日に死亡した雄1例では、病理組織学的に、大腸における中等度から重度の出血及び重度の壊死（原因不明）並びに重度の胸腺萎縮が認められたが、これらの障害がMMAEを投与した他の動物のいずれにも認められなかったことから、これらの障害が被験物質投与に直接起因する可能性は低いと考えられた。

休薬期間終了時には、MMAE群で病理組織学的変化は認められなかった。好酸球数は休薬期間終了時までに対照群の値と同程度、あるいはその値に近づく傾向を示した。

AGS-22M6Eの曝露量には用量比例性が認められ、性差はみられなかった。AGS-22M6E投与後のMMAEの最高濃度は、モル濃度換算で、ADCの最高濃度の約0.04%であった。AGS-22M6Eの週1回投与スケジュールによるADC、TA_b及びMMAEの全身への蓄積はほとんどなかった。AGS-22M6E又はAGS-22M6を週1回反復静脈内投与すると、中等度の免疫応答（ATA形成）が誘発された。セロコンバージョンの程度は性別及び用量とは無関係であった。カニクイザルにおける更なるトキシコキネティクス評価については、[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, TA_b及びMMAEのトキシコキネティクスに記載する。](#)

以上より、AGS-22M6Eの（週1回投与時の）無毒性量は3 mg/kg（投与1日のC_{max}：76.6 µg/mL, AUC_{0-7d}：2450 µg·h/mL）であり、3 mg/kgはMTDでもあった。

2.6.6.3.2.2 カニクイザルを用いたAGS-22M6E及びエンホルツマブ ベドチンの4週間静脈内持続投与毒性試験及び6週間回復性試験

添付資料 [4.2.3.2-5](#)

ハイブリドーマあるいはCHO由来製品であるAGS-22M6Eあるいはエンホルツマブ ベドチンをカニクイザルに週1回、計4回、同じ用量（3 mg/kg）で静脈内持続投与したときの毒性及びトキシコキネティクスプロファイルを比較するためにGLP試験を実施した（20021751試験）。

同等性の主な解析は、AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンの初回投与後の AUC_{0-7d} 及び C_{max} の計算に基づいて行った。

24 例のカニクイザルを、対照群に雌雄各 2 例（FCG1015 製剤緩衝液 [20 mM ヒスチジン-HCl pH 6.0, 10% ショ糖 (w/v), 0.02% ポリソルベート-20], 最終剖検のみ）、被験物質投与群に雌雄各 5 例（29 日の最終剖検に指定された雌雄各 3 例 [最終投与後 1 週間]、71 日の休薬終了時剖検に雌雄各 2 例 [最終剖検後の 6 週間の休薬期間]）割り付けた。投与容量は全群 5 mL/kg とした。

本試験における評価項目は、一般状態、体重、摂餌量評価（定性的）、獣医学的身体検査（一般症状、体温、心拍数、呼吸数）、眼科学的検査、臨床化学的パラメータ（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査）、トキシコキネティクスパラメータ、剖検、器官重量、及び病理組織学的検査とした。

体重、摂餌量評価（定性的）、獣医学的身体検査（呼吸数、心拍数、体温）、眼科学的検査、血液生化学的検査、尿検査及び器官重量において、AGS-22M6E 又はエンホルツマブ ベドチン投与に関連した変化は認められなかった。

カニクイザルに AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンの 3 mg/kg を 1 週間に 1 回、計 4 回静脈内持続投与したとき、良好な忍容性を示した。AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチン投与群のいずれにおいても被験物質投与に関連した影響が認められた。被験物質投与に関連する影響のうち、生物学的に重要と判断されたのは、皮膚の乾燥、発赤、赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）、網状赤血球数、好中球及び好酸球数の軽微な低下、並びに骨髓、投与部位及び皮膚の病理組織学的所見であった。

最終剖検時、AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチン群の雌の皮膚に被験物質投与に関連する剖検所見（鱗屑）が認められた。鱗屑に関連する病理組織学的所見として、びまん性表皮肥厚（過形成）が認められた。AGS-22M6E 群の雌雄 6 例中 3 例、エンホルツマブ ベドチン群の雌雄 6 例中 2 例の胸骨髓で、対照群と比較して細胞数減少が認められた。これらの骨髓の所見に伴い、臨床病理学的な変化が認められた。各被験物質投与群の一部の動物の投与部位に軽微又は軽度のびまん性表皮肥厚、軽度の血管周囲単核細胞浸潤及び軽微な皮下の線維化が認められた。これらの変化は、対照群で認められた手技に関連する炎症性変化と比較して、AGS-22M6E 群及びエンホルツマブ ベドチン群の投与部位で炎症反応が僅かに増強したことを示している。AGS-22M6E 群の雌 3 例中 2 例、エンホルツマブ ベドチン群の雌 3 例中 3 例の皮膚で、軽度の慢性炎症性変化（過角化症、表皮肥厚及び真皮血管周囲単核細胞浸潤）が認められた。これらの変化は、一部の動物で剖検にてみられた鱗屑や一般状態の観察でみられた皮膚の乾燥及び発赤と関連していた。器官重量においては、被験物質投与に関連する変化は認められなかった。

いずれの ADC の血清中濃度も、おおむね静脈内持続投与終了時に最高濃度に達し、その後低下した。酵素免疫測定（ELISA）法により測定した TAb の血清中濃度は、概して ADC 濃度よりも高かった。ADC、TAbs、及び両 ADC 投与時の MMAE のトキシコキネティクスに性差は認められなかった。

同等性の主要解析は、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 AUC₀₋₇ 及び C_{max} の算出に基づいて実施した。C_{max} 及び AUC₀₋₇ について、幾何平均比（GMR）90%信頼区間（CI）が 0.70~1.43 の範囲内であることを満たす場合、試料は同等であるとみなした。この比較は、これまでに実施された試験に基づいて、真の GMR を 1.1、変動係数が約 20% であるという仮定に基づいて実施された。ADC 初回投与後の AUC₀₋₇ 及び C_{max} の GMR の 90% CI が、事前に規定した同等性基準の範囲内であったことから、AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンのトキシコキネティクスは同等であると判断された。

免疫原性のモニタリングを目的として血液検体を全ての群から採取したところ、セロコンバージョンの発生率は、1 群（対照）、2 群（AGS-22M6E 投与）、及び 3 群（エンホルツマブ ベドチン投与）でそれぞれ 0%、40%、及び 40%であった。カニクイザルにおける更なるトキシコキネティクス評価については、[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](#)に記載する。

AGS-22M6E 群及びエンホルツマブ ベドチン群で確認された被験物質投与に関連する影響は全て、発現頻度及び程度が群間で同程度であった。AGS-22M6E 群及びエンホルツマブ ベドチン群の休薬群全例では、71 日までに被験物質投与に関連する影響（骨髄、投与部位及び皮膚の病理組織学的所見を含む）は回復した。AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンの毒性及びトキシコキネティクスは、同等と考えられた。週 1 回、計 4 回の静脈内持続投与後の両 ADC の NOAEL は 3 mg/kg である。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 細菌もしくは細胞を用いた In vitro 試験

2.6.6.4.1.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）

添付資料 [4.2.3.3.1-1](#)（参）

MMAE の変異原性を評価するため、細菌を用いた復帰突然変異試験（GLP 試験）を実施した（[503](#) 試験）。MMAE の 75, 200, 600, 1800 及び 5000 µg/plate の用量について、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いて、それぞれ Aroclor で酵素誘導したラット肝 S9 画分の存在下及び非存在下で試験した。本試験の条件下では、MMAE は細菌を用いた復帰突然変異試験において陰性であると結論された。

エンホルツマブ ベドチンのリンカー部分は、マレイミド、カプロイルスパーサー、バリニールリンジペプチド及び p-アミノベンジルオキシカルボニル基から構成される。リンカー分子の遺伝毒性は、公的に利用可能なデータ及び in silico 解析に基づいて評価した。マレイミドは、細菌を用いた復帰突然変異試験及び L5178Y 細胞を用いるマウスリンフォーマチミジンキナーゼ（Tk）試験の両試験で変異原性を示し [[TOXNET Toxicology Data Network; search term: maleimide](#)], カプロン酸は、細菌を用いた復帰突然変異試験では陰性であると報告されている

[[TOXNET Toxicology Data Network; search term: caproic acid](#)]. バリン, シトルリン及び p - アミノベンジルオキシカルボニル基の DEREK for Windows (version 12) による in silico 評価では、いずれの部分にも変異原性の警告構造は示されなかった。

2.6.6.4.1.2 L5178Y 細胞を用いるマウスリンフォーマ Tk 試験

添付資料 [4.2.3.3.1-2](#) (参)

マウスリンパ腫細胞 L5178Y の TK 遺伝子座に対する MMAE の突然変異誘発能を評価する in vitro GLP 試験を実施した (8204155 試験)。代謝活性化系 (S9) の存在下及び非存在下で分析を行い、5-トリフルオロチミジン存在下でのコロニー形成 (TFT 耐性 [TFT_r] を示す) を指標として突然変異誘発能を評価した。

いずれの処理系列においても、用量依存的な突然変異頻度の上昇は認められず、生存細胞 10⁶ 個当たり TFT_r 変異体総数が溶媒対照群の平均値をはるかに上回る 90 個以上の増加は認められなかった。以上から、MMAE は L5178Y 細胞を用いるマウスリンフォーマ Tk 試験では陰性であると判定された。

2.6.6.4.2 哺乳類動物を用いた in vivo 試験

2.6.6.4.2.1 ラット骨髄小核試験

添付資料 [4.2.3.3.2-1](#) (参)

MMAE の in vivo での染色体異常や分裂装置障害の誘発能を評価するため、推定最大耐量を単回静脈内投与し、ラット骨髄の多染性赤血球中の小核形成について評価する GLP 試験を実施した (8204151 試験)。

35 匹の雄ラットを 5 群に割り付け、溶媒対照 (3.9%0.01 N HCl/96.1%米国薬局方 0.9%塩化ナトリウム注射液) 及び MMAE の 0.01, 0.1 又は 0.2 mg/kg の単回静脈内投与、あるいはシクロホスファミド (陽性対照) の 60 mg/kg の単回経口投与を行った。

被験物質投与に関連した一般状態の変化は認められなかったが、MMAE の 0.1 及び 0.2 mg/kg 群で、骨髄細胞中の小核を有する多染性赤血球数の有意な増加 (P≤0.01) が認められた。

小核形成の機序を検討するために、MMAE の染色体構造異常誘発能 (染色体切断) 及び異数性誘発能 (染色体損失) を評価する追加試験を実施した。その結果、MMAE は主に動原体陽性の小核形成を誘発することが判明した。このことから、MMAE による異数性誘発性の小核形成と微小管障害作用が整合しているものと考えられた。

2.6.6.5 がん原性試験

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

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

エンホルツマブ ベドチンの投与中又は曝露されている間に妊娠している患者あるいは妊娠する可能性のある患者における胚・胎児発生への潜在的リスクを確認するため、ICH S9 に従って、エンホルツマブ ベドチン及び MMAE を用いて、胚・胎児発生毒性の評価を実施した。なお、エンホルツマブ ベドチンは進行がんの治療を目的としているため、受胎能及び初期胚発生に関する試験並びに出生前及び出生後の発生に関する試験は実施しなかった。

2.6.6.6.1 胚・胎児発生

2.6.6.6.1.1 ラットを用いた MMAE の胚・胎児発生に関する試験

添付資料 4.2.3.5.2-1 (参)

MMAE を妊娠ラットに投与して、その胚・胎児発生毒性を評価する GLP 試験を実施した (8204397 試験)。

母動物に溶媒対照又は MMAE (0.2 mg/kg) を妊娠 6 及び 13 日に静脈内投与した。主試験の母動物を妊娠 21 日に屠殺した。検査項目は、母動物の一般状態、体重及び体重変化、摂餌量、血液学的検査及び剖検、帝王切開時評価、胚・胎児評価 (生存、成長及び発生) 及び胎児評価 (外表、内臓及び骨格) とした。さらに、母動物及び胎児の血液試料並びに羊水を採取し、トキシコキネティクスの評価を行った。

妊娠 21 日に早産し、他の動物よりも前に屠殺された母動物 1 例を除いて、全例が計画屠殺時まで生存した。MMAE 投与による胚・胎児発生に関する毒性所見は、吸収胚数、着床後死亡、外表異常児の増加及び生存胎児数の減少であった。対照と比較して、平均黄体数、平均着床数、着床前死亡に対して MMAE 投与に関連した影響は認められなかった。

母動物への投与に関連した影響としては、膈分泌物、蒼白、ケージ受け皿上の赤色液体、体重及び摂餌量の顕著な減少、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、及び好中球数の減少、網状赤血球数、MCV 及び単球数の軽度の増加であり、これらの変化は MMAE の 0.2 mg/kg を投与した妊娠ラットでの胸腺のリンパ球枯渇及び脾臓の髄外造血の亢進といった病理組織所見と関連するものであった。MMAE は胎盤を通過し、胎児血清中で検出された。

2.6.6.6.1.2 エンホルツマブ ベドチンのラットを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する予備試験

添付資料 4.2.3.5.2-2

妊娠 Sprague Dawley ラットでの着床から硬口蓋閉鎖までの期間の胚・胎児発生に及ぼすエンホルツマブ ベドチンの影響を評価するために GLP 試験を実施した (20119695 試験)。本試験では、ICH M3 (R2) に準じて胎児の生存性、体重及び外表・内臓検査を評価した。この試験は、

ICHの3極合意ガイドラインに規定されている生殖発生過程のステージC~Dについて評価するデザインとした。

交尾を認めた各群6例のSprague Dawley雌ラットに、エンホルツマブ ベドチンの0（対照物質、5% [w/v] 滅菌デキストロース溶液）、2又は5 mg/kgを静脈内投与した。溶媒又はエンホルツマブ ベドチン（2又は5 mg/kg）は妊娠6日に1回投与し、妊娠13日のほぼ同時刻に再度投与した。投与液量は、投与当日の投与前に測定した各個体の体重に基づいて算出した。試験評価項目は、母動物の一般状態、体重及び摂餌量とした。全ての母動物を妊娠21日に安楽死させ、黄体数、着床数及び子宮内容物の状態を検査した。胸腹部内臓器及び骨盤内臓器の剖検を実施し、妊娠状態及び子宮内容物を記録した。胎児については、体重を測定し、性別を判定して外表変化を記録した。胎児の内臓及び骨格の評価も実施した。

全例が予定の安楽死日（妊娠21日）まで生存したが、検討した両用量でエンホルツマブ ベドチン投与により母動物及び胚・胎児に対する毒性が認められた。

2及び5 mg/kg群では用量依存性の体重又は体重増加量の減少が認められた。2 mg/kg群で認められた母動物への毒性は体重増加量の減少のみであり、同用量での胚・胎児毒性は限定的であった。5 mg/kg群では母動物の体重、体重増加量及び摂餌量の減少が認められ、全母動物で全胚吸収であった。

エンホルツマブ ベドチンの5 mg/kgを投与した母動物では、生存胎児は認められなかった。2 mg/kg群でも、1腹あたりの平均生存胎児数（9.2）は、対照群（12.3）と比較して有意に減少した。このことは、同用量における早期吸収胚増加にも現れていた。2 mg/kg群では、平均胎児体重（全体、雄又は雌）が減少した（対照群に対してそれぞれ10.2%、11.7%又は9.9%減少）。

2 mg/kg群で胸骨分節非対称性、癒合、不完全骨化及び不整形、頸椎弓不整形及び胸椎体片側性骨化を含む骨格変異（主に発育遅延）が認められ、エンホルツマブ ベドチン投与に起因したものと考えられた。また、2 mg/kg群の1胎児では、さらに変異及び異常が認められた。用量設定試験では評価された同腹児数及び胎児数が限られていたため、これらの単一事象と投与との関係は明らかにできなかった。

2回目の投与から10分後に採取した母動物の血漿を分析した結果、妊娠13日のエンホルツマブ ベドチンの曝露量は、2及び5 mg/kgで、それぞれ28.6及び82.1 µg/mL（臨床推奨用量投与時のヒトC_{max}の約1倍及び3倍）に達した。

本試験の結果から、母動物及び発生に関するNOAELは決定できなかった。5 mg/kgのエンホルツマブ ベドチンを妊娠期に2回（妊娠6及び13日）投与した結果、同腹児全死亡（100%の早期吸収胚）が認められ、2 mg/kg群では、着床後死亡の増加、胎児体重の減少、骨格発達の遅延及び骨格変異の増加が認められた。

2.6.6.7 局所刺激性試験

エンホルツマブ ベドチンの局所刺激性を評価するための個別の試験は実施しなかった。静脈内投与部位の病理組織学的検査は、ラット及びカニクイザルにおける GLP 反復投与毒性試験の一環として行った。

エンホルツマブ ベドチンをラットに週 1 回、計 13 回静脈内投与したところ（20117437 試験）、エンホルツマブ ベドチン投与の影響と考えられる所見は、0.5 mg/kg 以上の群でみられ、主に毛包及び皮脂腺を含む表皮及び／又は付属器の軽微な異常有糸分裂像及び単細胞壊死に限られていた。皮下組織及び局所的に広範な表皮の中等度の壊死（潰瘍形成を伴う）は、2 mg/kg 群の 1 例に限られており、高用量群では同様の所見が認められなかったことから、それらは投与中の被験物質の血管外漏出と関連している可能性が考えられた。

エンホルツマブ ベドチンをカニクイザルに週 1 回、計 4 回投与したところ（20021751 試験）、3 mg/kg を投与した一部の動物の投与部位で、軽微又は軽度なびまん性の表皮肥厚、軽度の血管周囲単核細胞浸潤及び軽微な線維化が認められた。これらの変化は、FCG1015 製剤緩衝液（20 mM ヒスチジン-HCl pH 6.0, 10% ショ糖 (w/v), 0.02% ポリソルベート-20）を投与した対照群で認められた投与手技に関連した炎症性変化と比較して僅かに増強していた。

投与部位や投与部位近傍での投与関連の影響は、皮膚の表皮及び付属器の上皮における Nectin-4 の発現に関連しているものと考えられ、休薬期間終了時には回復性が認められた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

反復投与毒性試験で認められた精巣毒性の特性をより明らかにし、ペイロード（MMAE）が高血糖及び光毒性に何らかの特異的な影響を呈するかどうかを明確にするため、追加の毒性機序試験を実施した。

2.6.6.8.1 試験の概要：機序試験

2.6.6.8.1.1 ラットを用いたエンホルツマブ ベドチンの 4 週間静脈内投与精巣毒性試験及び 24 週間回復性試験

添付資料 [4.2.3.7.7-1](#)

Sprague-Dawley 系ラットにエンホルツマブ ベドチンを週 1 回、計 4 回静脈内投与したときの精巣毒性の回復性を検討するため、24 週間の回復期間を設けた GLP 4 週間試験を実施した（20135474 試験）。

40 例のラットを、各群の各時点で 5 例ずつとなるよう溶媒対照群又はエンホルツマブ ベドチン群に割り付けた。29 日（最終投与から 1 週間後）に最終剖検を実施し、64 日（6 週間の休薬）、127 日（15 週間の休薬）及び 190 日（24 週間の休薬）に休薬後剖検を実施した。溶媒対照物質の 5% (w/v) 滅菌デキストロース溶液又はエンホルツマブ ベドチンの 2 mg/kg を週 1 回、

試験の 1, 8, 15 及び 22 日のほぼ同時刻に尾静脈に静脈内投与した。投与容量は 5 mL/kg として投与直前に測定された各個体の体重に基づいて投与液量を調節した。

試験評価項目は、生死、一般状態、体重、摂餌量、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。

2 mg/kg 群ではエンホルツマブ ベドチン投与に伴う死亡は認められず、全例が計画された安楽死時点まで生存した。また、エンホルツマブ ベドチンの 2 mg/kg 群では投与に関連する一般症状、体重及び摂餌量の変化は認められなかった。

29 日から 127 日の剖検において、エンホルツマブ ベドチン投与に関連する精巣あるいは精巣上体重量の低下が認められた。精巣では、精子細胞／精母細胞減少及び／又は精細管空胞化が、29 日 (2/5 例)、64 日 (2/5 例)、127 日 (1/5 例) 及び 190 日 (1/5 例) に認められた。精巣上体では、29 日 (1/5 例)、64 日 (1/5 例)、127 日 (2/5 例) 及び 190 日 (1/5 例) に軽微から軽度の細胞残屑が認められた。

29 日に精巣及び精巣上体で認められた臓器重量の変化は、190 日の休薬期間終了までに回復した。29 日の精巣及び精巣上体に認められた組織学的所見は、64, 127 及び 190 日においても認められたが、休薬期間終了時点までに発現率が低下した。したがって、エンホルツマブ ベドチン投与に関連する精巣毒性は部分的に回復性を示すものと考えられた。

2.6.6.8.1.2 グルコース取り込み、膵島細胞生存率及びインスリン分泌に関する試験

添付資料 4.2.3.7.7-2 (参)

ヒト膵島細胞を、MMAE (SGD-1010)、又は標的非結合性ヒト化 IgG1 対照抗体と MMAE をエンホルツマブ ベドチンと同一のタンパク質分解酵素で切断されるリンカーを介して結合させた h00-1006 (4) とインキュベーションした (022-076622 試験)。ADC の標的非依存的な影響を調べるために標的非結合性 ADC を用い、遊離細胞傷害性薬物によるグルコース恒常性への影響の有無を明らかにするために MMAE を用いた。なお、エンホルツマブ ベドチンの臨床試験では、高血糖が散発的に発現しており、現時点ではエンホルツマブ ベドチンの曝露量と高血糖の因果関係は明らかになっていない。

骨格筋細胞によるグルコース取り込みは、グルコース取り込み発光アッセイを用いて評価した。h00-1006 (4) 及び MMAE はいずれも検討した濃度で骨格筋細胞によるグルコース取り込みを阻害しなかった。MMAE では検討した最高濃度 (100 ng/mL) で骨格筋によるグルコース取り込みの増加が認められたが、この作用はエンホルツマブ ベドチンの臨床推奨用量投与時の遊離 MMAE のヒト C_{max} の 27 倍の濃度で認められた。したがって、エンホルツマブ ベドチンの臨床推奨用量を投与した時の MMAE 濃度では、骨格筋によるグルコース取り込みを変化させないと結論される。

ヒト膵島細胞の生存率は、レサズリンを用いた細胞生存率測定用マイクロプレートアッセイ及びヨウ化プロピジウム染色による画像分析を用いて評価した。ヒト膵島細胞を MMAE 又は h00-1006 (4) と 4 時間インキュベーションした結果、検討したいずれの濃度でも細胞生存率の低下は

認められなかった。高濃度グルコース条件（11 mmol/L）でのより長時間のインキュベーション（12時間）では、被験物質濃度に依存した膵島細胞生存率の低下が認められ、0.1 ng/mL MMAE以上の濃度では統計学的にも有意であった。生存率の低下は100 ng/mLで最大変化である約30%に達し、IC₅₀は決定できなかった。エンホルツマブ ベドチンの臨床推奨用量を投与された時のヒトC_{max}と同程度のMMAE濃度では、ヒト膵島細胞の生存率を約20%低下させた。一方、h00-1006 (4) と12時間インキュベーションした後の膵島細胞の生存率は、用量に依存しないわずかな低下を示した。これは濃度に関連しない影響であったため、h00-1006 (4) と膵島細胞生存率の低下との因果関係は不明である。

ELISA法によって膵島細胞培養上清中のインスリン濃度を測定し、MMAE又はh00-1006 (4) がインスリン分泌に及ぼす影響を評価した。MMAEは、高グルコース培地中でインキュベーションしたヒト膵島細胞のインスリン分泌のわずかな低下をもたらしたが、この低下に濃度依存性はなく、統計学的有意差もなかった。h00-1006 (4) と4時間インキュベーションした際には、検討したいずれの濃度でもヒト膵島細胞のインスリン分泌に生物学的に意義のある変化は認められなかった。

2.6.6.8.2 試験の概要：組織交差性試験

2.6.6.8.2.1 免疫組織化学評価によるAGS-22M6Eのカニクイザル組織に対する組織交差反応性試験

添付資料 4.2.3.7.7-3 (参)

ADC (AGS-22M6E) と正常カニクイザル組織との組織交差反応性を免疫組織化学的に評価するための非GLP試験を実施した (ES-002試験)。AGS-22M6EはNectin-4に特異的に結合する。免疫組織化学的検出のために、AGS-22M6Eにビオチンリンカーを結合させ (AGS-22M6E-ビオチン)、その後の染色における一次抗体の1つとして使用した。AGS-22M6Eと同じアイソタイプであるが、Nectin-4又は他の抗原のいずれにも結合しないコントロールADC (H3-1.4.1.2-vcE) もビオチン化された (H3-1.4.1.2-vcE-ビオチン)。先ずNectin-4発現が知られている凍結保存組織切片 (陽性及び陰性対照組織) を用いて、両抗体の特異性を確認し、至適濃度を求めた。Nectin-4抗原の保存性は、メタノール、アセトン、中性ホルマリンのいずれかで固定されたか、又は固定されていない異種移植腫瘍の凍結保存組織切片及びカニクイザルから採取された正常組織のパネルを用いて調べた。30 µg/mLのAGS-22M6E-ビオチンの染色条件は、メタノールで固定した凍結保存組織切片において特異的で、他の条件よりも強い反応をもたらした。その条件において、正常カニクイザル組織では、皮膚、食道及び扁桃の上皮においてAGS-22M6E-ビオチンに対する免疫反応性を示した。AGS-22M6E-ビオチンで染色した他の組織 (副腎、膀胱、小脳、大脳、結腸、子宮内膜、心臓、空腸、腎臓、喉頭、肝臓、肺、リンパ節、乳腺、卵巣、膵臓、副甲状腺 (上皮小体)、下垂体、前立腺、唾液腺、骨格筋、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺及

び子宮頸部）は陰性であった。これらの知見は、AGS-22M6Eがある種の正常カニクイザル組織に交差反応することを示している。

2.6.6.8.2.2 正常ヒト組織における Nectin-4 発現の免疫化学的評価に関する試験

添付資料 4.2.3.7.7-4 (参)

市販のホルマリン固定・パラフィン包埋組織マイクロアレイ（[米国バイオマックス社，ロックビル，MD] から得た MNO961, FDA995 及び FDA998）を用いて，正常ヒト組織における Nectin-4 発現を免疫組織化学的に評価するための非 GLP 試験を実施した（ES-001 試験）。Agensys が開発したマウス抗ヒト Nectin-4 モノクローナル抗体 M22-244b3.1.1.1 を用いて，膀胱，乳腺（腺房及び導管），食道，喉頭，下垂体，胎盤，唾液腺，皮膚，胃，精巣，尿管及び子宮の主要な構成細胞において，Nectin-4 に対する特異的な陽性染色が示された。特異的な陽性染色は，腎臓，肝臓，肺，膵臓，前立腺，胸腺及び扁桃のわずかな細胞でもみられた。小腸，結腸，直腸を含む他の消化管の腺の染色は非常に弱かった。副腎，骨髄，脳，眼，卵管，心臓，中皮，神経，卵巣，副甲状腺，脊髄，脾臓，横紋筋及び甲状腺に特異的な染色はみられなかった。これらの免疫組織化学的所見は，Nectin-4 は成人期の様々な正常ヒト組織で発現していることを示している。少数の組織を除いて，Nectin-4 はほとんどが弱い免疫組織化学的染色で示されるように低レベルで発現していることは注目される。このように，ヒト癌において Nectin-4 が過剰発現していることは，Nectin-4 発現癌の治療に対する AGS-22M6E の開発のための治療域を提供する可能性がある。

2.6.6.8.2.3 ヒト組織パネルを用いた AGS-22M6E の組織交差反応性に関する試験

添付資料 4.2.3.7.7-5

ビオチン結合 AGS-22M6E（AGS-22M6E-ビオチン）を使用した免疫組織化学的手法を用いて，AGS-22M6E の正常ヒト組織パネルに対する組織交差性を評価するための GLP 試験を実施した（8236219 試験）。

特定の対照組織及び検査用のヒト組織のそれぞれから凍結切片を作製した。対照及び検査用組織の染色条件設定のための固定には，アセトンとメタノールを利用した 2 段階固定法を用いた。組織活性評価のための固定液としてはアセトンを用いた。

対照の条件設定では，AGS-22M6E-ビオチンの 5 µg/mL の濃度が至適濃度であることが示された。

組織染色の条件設定に際しては，10，5 及び 2.5 µg/mL の 3 濃度の AGS-22M6E-ビオチンを用いた。

組織染色の結果の要約を以下に示す：

- 眼（角膜上皮細胞，2 例のドナー），食道（表層上皮細胞，1 例のドナー），胎盤（合胞体性栄養膜細胞，3 例のドナー），皮膚（上皮細胞，3 例のドナー），扁桃（扁平上皮細胞，3 例

のドナー）及び子宮頸部（扁平上皮細胞，2例のドナー）において，AGS-22M6E-ビオチンで特異陽性染色が認められた。

- 検討した多くの組織において，AGS-22M6E-ビオチン及び／又は H3-1.4.1.2-vcE-ビオチン（対照物質）で非特異的染色が認められた。
- AGS-22M6E-ビオチン及び／又は H3-1.4.1.2-vcE-ビオチンでいくつかの非特異的染色が多く組織中の散在細胞で観察された。
- 抗体希釈液対照で検査した多くの組織で，血液中の多形核細胞や散在する細胞において，時に，非特異的染色が観察された。
- 精巣，骨髄では特異陽性染色は認められなかった。

結論として，AGS-22M6E-ビオチンでは，検討した多くの組織内の上皮に由来する組織構造及び細胞において特異的な陽性染色がみられた。

2.6.6.8.3 試験の概要：光毒性評価

2.6.6.8.3.1 SGD-1006, SGD-1427 及び SGD-1010 の光毒性評価

添付資料 4.2.3.7.7-6（参）

SGD-1006（vc-MMAE），SGD-1427（N-acetylcysteine-vcMMAE）及び SGD-1010（MMAE）の光安全性評価の必要性を評価するため，非 GLP で光吸収を測定した（TRN-2926-A 試験）。ICH S10 ガイドラインでは，化合物が 290～700 nm の間の波長で $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を超えるモル吸光係数（MEC）を有する場合は，光反応性を考慮すべきとされている。メタノール中の SGD-1006 と SGD-1427 について吸収スペクトルを測定すると，両化合物の 290～700 nm の範囲での最大吸収波長は 290 nm であった。この波長での MEC は 3 回の調製試料から計算した。290 nm での MEC は，SGD-1006 は $770 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ に対して，SGD-1427 は $425 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。したがって，SGD-1006 も SGD-1427 も ICH S10 で定義されている光毒性試験の実施を求められる基準を満たさなかった。SAFC（Millipore Sigma 社）で実施された試験により，MMAE は 290～700 nm の範囲では吸収がないことが確認され，そのため，直接的な光毒性を引き起こすほどのリスクは有さないと考えられる。

2.6.6.9 考察及び結論

エンホルツマブ ベドチンの毒性試験プログラムに関しては，エンホルツマブ ベドチン及び MMAE を用いた試験と同様に，ハイブリドーマ細胞株由来 ADC である AGS-22M6E 及び薬物非結合型抗体である AGS-22M6 を用いて実施された一連の非臨床試験が含まれる。毒性試験は，現行の規制ガイドライン（ICH S1A, S2 [R1], S5 [R2], S6 [R1], S9, S9 Q&A, S10, M3 [R2]）を考慮してデザインし，主要な試験はすべて GLP を遵守した試験であった。重要な in vivo 試験では，エンホルツマブ ベドチン又は AGS-22M6E をラットでは週 1 回，最長 13 週

間、カニクイザルでは最長 4 週間静脈内投与した。両動物種で認められた主要な用量制限毒性が発現する標的臓器は、皮膚及び骨髄であった。その他、肝臓、脾臓、リンパ組織、乳腺、眼、副腎、ハーダー腺、腸管、及び雄性生殖器が標的臓器として同定された。

ハイブリドーマ細胞株由来の ADC である AGS-22M6E（臨床開発を中止している）及び CHO 細胞株由来の ADC であるエンホルツマブ ベドチンの毒性学的及び体内動態学的結果は、同等であると考えられる。これら ADC は、アミノ酸配列、リンカー及び細胞傷害性薬物が同一で、カニクイザルでのブリッジング試験において、毒性所見、所見の発現率及び程度、並びにトキシコキネティクスプロファイルについてそれらの同等性が確認された。エンホルツマブ ベドチンの標的臓器を同定し、毒性学的及び体内動態プロファイルを明らかにするために、それぞれの ADC を用いた試験が実施された。Nectin-4 結合親和性及び発現プロファイル、エンホルツマブ ベドチンの体内動態及び代謝プロファイルにおけるヒトとの類似性、並びに毒性及び病理学的データの有用性に基づいて、これらの試験にはラット及びカニクイザルを用いた。MMAE（エンホルツマブ ベドチンのペイロード）の遺伝毒性については、標準的な試験バッテリーで評価した。妊娠ラットにエンホルツマブ ベドチン及び MMAE を投与した際の胚・胎児発生への影響を検討した。カニクイザル及びヒト組織への交差性反応を調べるとともに、グルコース取り込み並びにヒト膵島細胞の生存率及びインスリン分泌に対する MMAE が結合している ADC の影響を評価するために、追加試験を実施した。精巣毒性とその回復性は、24 週間の休薬期間を設定したラットでの 4 週間反復投与毒性試験で評価した。最後に、MMAE は 290~700 nm の波長範囲で光吸収がなかったため、光毒性試験は実施しなかった。

重要な反復投与試験における主要な毒性所見の概要は、毒性試験概要表（[2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験](#)）に示す。これらの試験で得られた AGS-22M6E 及びエンホルツマブ ベドチンの曝露量と臨床推奨用量でのヒト曝露量との比較を[表 2.6.6-2](#)に示す。

死亡：AGS-22M6E の 10 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 6~7 倍）を週 1 回、静脈内投与したラットでの 4 週間反復投与試験で、薬剤投与に起因する死亡が認められた。1 例の雄ラットが初回投与後 27 日に死亡した。この動物では、11 日から頸背部、頭部、尾側背部に中等度から重度の皮膚剥離／潰瘍がみられ、2 週から 3 週の間 14 g の体重減少を示した。16 日の血液生化学検査値では、顕著な ALT（対照群の雄平均値と比較して 76 倍以上）及び顕著な AST（対照群の雄平均値と比較して 54 倍以上）活性の上昇が認められた。加えて ALP 及び GGT 活性やビリルビン値は対照群平均値と比較して 2~5 倍の上昇を示した。また本例は、16 日に対照群の平均値と比較して 10 倍以上の顕著な好中球数の増加、中等度の白血球数の増加、中等度のリンパ球数の減少、赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値）の軽微な減少を呈した。以上の変化及びそれに続く死亡は、AGS-22M6E 投与に関連したものと考えられた。自己融解のために病理組織学的検査によっても本例の死因は確定できなかった。エンホルツマブ ベドチンの 5 mg/kg までの用量（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 3 倍）を週 1 回、13 週間投与したラットでは、死亡は認められなかった。

カニクイザルに、AGS-22M6E の 6 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 6 倍）を週 1 回、投与した際、初回投与後 11～13 日に投与に関連した瀕死状態が認められた。これらの動物では、身体の広範囲にわたる皮膚剥離を含む乾燥及び発赤した皮膚などの一般症状がみられた。摂餌量が減少し、瀕死状態の動物は嗜眠状態であった。一般状態が悪化したため、瀕死動物を安楽死させた。計画外の臨床病理検査では、赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）及び網状赤血球数の低下、白血球数（好中球、リンパ球数、好酸球数）の低下、急性期反応を示す変化（アルブミン減少、グロブリン及び／又はフィブリノーゲンの増加）が認められた。

エンホルツマブ ベドチンの高曝露は、ラット及びカニクイザルの死亡と関連している。臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の少なくとも 6 倍以上の全身曝露量で死亡が認められた。ラット及びカニクイザルの死亡は突然ではなく、明確かつモニタリング可能な毒性徴候が先行した。

皮膚及び静脈内投与部位の所見：AGS-22M6E 又はエンホルツマブ ベドチンを、週 1 回、1 mg/kg 以上を投与した際に、皮膚剥離が認められた。AGS-22M6E 又はエンホルツマブ ベドチンを週 1 回、ラットに 5 mg/kg 以上又はカニクイザルに 1 mg/kg 以上（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量のそれぞれ約 2～3 倍又は 1 倍）を投与したとき、表皮炎症、表皮肥厚及び軽微なびらん／潰瘍の病理組織学的な相関が生じた。ラットにエンホルツマブ ベドチンを週 1 回、13 回投与したところ、皮膚の痂皮及び表皮、毛包、皮脂腺に軽微な異常有糸分裂像が認められた。4 週間試験の評価では、皮膚所見は 6 週間の休薬期間の後に完全に回復した。

投与部位の所見としては、ラットに週 1 回 0.5 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 0.2 倍）以上を投与した群で、表皮及び／又は付属器における軽微な異常有糸分裂像と単細胞壊死及び壊死が認められた。2 mg/kg 群の 1 例で、皮下組織の中等度の壊死と静脈近傍の表皮の潰瘍形成が認められ、高用量群では同様の所見が認められなかったことから、投与中の被験物質の血管外漏出と関連している可能性が高いと考えられた。AGS-22M6E 又はエンホルツマブ ベドチンをカニクイザルに投与した際の投与部位の所見としては、1 mg/kg 以上（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 1 倍）の群で単核細胞浸潤がみられ、3 mg/kg 以上の群で軽度の皮膚炎症、線維化及び過形成が認められた。4 週間試験の評価では、皮膚所見は 6 週間の休薬期間の後に完全に回復した（20005664 試験及び 20021751 試験）。

組織交差反応性試験では AGS-22M6E が皮膚に結合することが示されたが、Nectin-4 は正常角化細胞により発現していることが知られている [Fortugno et al, 2014; Mollo et al, 2015]。そのため、皮膚所見は標的依存性の影響の可能性が高い。ラットとカニクイザルの両種で認められた生前及び病理組織学的所見の程度は、概して、軽度から中等度であり、致死量投与時（カニクイザルの 4 週間試験）にのみ、より重篤なレベルに達していた。この影響は用量依存的であり、投与を中止すると完全に可逆であることから、臨床所見は薬剤投与に関連しているが、管理可能であると結論される。

血液学的所見／骨髄所見：ラットに、AGS-22M6E 又はエンホルツマブ ベドチンを投与した結果、赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低下並びに MCV, RDW, MCH 及び網状赤血球数の増加）の変化が認められた。4 週間及び 13 週間試験では、これらの所見は 5 mg/kg 以上（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量のそれぞれ約 2～3 倍）の群で認められた。

カニクイザルでは、AGS-22M6E を週 1 回、3 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 3 倍）以上の用量を投与すると、赤血球系に優勢な骨髄毒性がみられ、白血球系にも影響が認められた。カニクイザルに AGS-22M6E の 6 及び 3 mg/kg を投与した時の等モルに相当する MMAE (0.1093/0.0545 mg/kg) を単体で静脈内投与したところ、同様の所見が認められた。

これらの血液学的所見は、ラットに 5 又は 10 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 2 倍及び 6～7 倍）を 4 週間投与したときの骨髄細胞減少と関連していた。逆に、13 週間反復投与ラット試験では、5 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 3 倍）群の 1 例の骨髄に軽度の赤血球系細胞の増加が認められたが、赤血球数の低下及び網状赤血球数の増加に関連している変化である可能性が考えられた。

種を越えて観察されたこれらの血液学的影響は MMAE に起因していることを示している。ビンクリスチン等の微小管障害薬や他の vc-MMAE ADC の投与による血液学的影響が報告されており、標的非依存的に発現すると考えられている [Donaghy, 2016; Lin et al, 2015]。AGS-22M6E 投与により発現した血液学的所見は、臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 2 倍の曝露により認められ、これらの変化は急激には発現せず、加えて、投与中止により回復性が確認された。

血液学的所見は、モニタリング可能で、可逆的で、微小管障害薬で予想されたものであることから、この影響は管理可能であると結論された。

雄性生殖器の所見：ラットでの 4 週間反復投与試験の 29 日及び 13 週間反復投与試験の投与 92 日の時点で精巣毒性が認められた。精巣の変化は、4 週間試験では 1.5 mg/kg 以上（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の 1 倍）、13 週間試験では 2 mg/kg 以上（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 1 倍）の群で認められた。雄性生殖器（精巣、精巣上体、前立腺、精囊）の重量減少は、病理組織学的な精巣での精上皮の変性、精巣上体での異常精子細胞及び精子減少と関連していた。精巣及び精巣上体の所見は、24 週間の休薬期間終了時に部分的な回復性が認められた。

ビンクリスチン等の他の微小管障害薬でも雄性生殖器に所見が認められており、これらの化学療法剤は臨床的に精子数を減少させることが報告されている [VINCASAR PFS prescribing information, 2018]。ブレンツキシマブ ベドチンを含む他の MMAE ADC [ADCETRIS prescribing information, 2019; Lin et al, 2015] もラットに精巣毒性を誘発している。これらの所見は、腫瘍治療におけるリスク-ベネフィット評価の一環として受け入れられると考えられる。

胚・胎児発生に関する所見：胚・胎児発生に関する評価はラットのみで実施された。器官形成期にエンホルツマブ ベドチンの 2 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト C_{max} の約 1 倍）を投与した結果、着床後死亡が増加し、生存胎児数が減少した。2 mg/kg のエンホルツマブ ベドチンは胎児体重の減少と骨格変異の増加を示し、胎児に対して発育遅延作用を有すると考えられた。エンホルツマブ ベドチンの 5 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト C_{max} の約 3 倍）を投与した時には、生存胎児は認められなかった。MMAE の単独投与でも同様の所見が得られ、胎児の外表面異常を引き起こした。

エンホルツマブ ベドチンは胎児の生存性に影響を及ぼすと結論された。化学療法剤はしばしば胚・胎児毒性と関連しており、このリスクを軽減するために適切な表示と患者カウンセリングをすべきである。

眼の所見：エンホルツマブ ベドチン投与に起因する眼に対する懸念は、ヒト組織交差反応性試験（角膜上皮で発現する標的）で示されていた。vc-MMAE を有する ADC では眼の所見は一般的に観察されないが [Eatonet al, 2015]、エンホルツマブ ベドチンで治療された一部の患者では低グレードの眼への事象が観察されており（2.7.4 臨床的安全性）、MMAE の標的依存性送達に起因する可能性が示唆されている。毒性試験では、ラット（4 週間及び 13 週間反復投与試験）及びカニクイザル（4 週間反復投与試験）で薬物投与関連の眼科学的所見はみられず、4 週間反復投与毒性試験ではラット及びカニクイザルの眼に組織学的所見は認められなかった。ラットの 13 週間反復投与試験では、眼科学的検査で所見はみられなかったが、病理組織学的に、0.5 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の 0.2 倍）以上の群で角膜上皮細胞に軽微な異常有糸分裂像が認められた。MMAE のみの投与では、眼所見は一般的には観察されないため、この異常有糸分裂像は、角膜への MMAE の標的依存性送達を表しているのかもしれない。

他の標的臓器：AGS-22M6E の 4 週間投与試験（8226169 試験）の 10 mg/kg（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 6 倍）群で胸腺重量の低下、及びエンホルツマブ ベドチンの 13 週間投与試験の 2 mg/kg 以上（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 1 倍）の群の雌ラットで副腎重量の低下が認められた。リンパ組織の所見としては、有糸分裂像の増加、炎症、皮質の濾胞及びリンパ球の減少が認められ、6 週間の休薬期間後には回復性が認められた。これらの所見はリンパ組織に存在する Nectin-4 発現に関連すると考えられるが、リンパ系の毒性は vc-MMAE ADC で認められており、標的非依存性機序においても MMAE の予想される薬理作用と一致するものと思われる（8204397 試験）。

ラット 4 週間投与試験（AGS-22M6E の週 1 回投与）では、5 及び 10 mg/kg 群（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量のそれぞれ約 2 及び 7 倍）で脾臓重量の増加が認められた。これは、有糸分裂像／単細胞壊死、赤脾髄における炎症細胞浸潤、血液中の細胞数減少に反応した髄外造血の亢進と関連した。

肝臓重量の増加がラット 13 週間投与試験でみられ、それは MMAE の薬理作用及びクリアランスに対する副次的作用と考えられる軽微から軽度の肝酵素の上昇及び有糸分裂像の増加と関連していた。MMAE の標的非依存性の影響に加えて、Nectin-4 が肝組織に存在していることで MMAE の標的依存的な送達が毒性に寄与した可能性は否定できない。この病理組織学的所見は、ラットに週 1 回、AGS-22M6E の 10 mg/kg 以上を投与した群（臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 6 倍）で発現し、6 週間の休薬期間後を設定した 4 週間試験で完全な回復性を示した（8226169 試験）。

ラットの他の組織で観察された有糸分裂像の増加及び／又は単細胞壊死は軽微であり、MMAE の薬理作用に関連すると考えられた。それら組織所見は、腸管、副腎、ハーダー腺でもみられた。腸管の変化は標的発現に関連している可能性があると考えられたが、分裂の速い上皮細胞に対する MMAE の標的非依存的な影響によることも予想された。

血糖関連の所見：臨床試験において高血糖が特定されたリスクとして同定されている。反復投与毒性試験（ラット及びカニクイザル）では血糖値の変化は認められず、ラット 4 週間投与試験（8226169 試験）では、臨床推奨用量投与時のヒト全身曝露量の約 9 倍の曝露においても、膵臓、骨格筋に対する肉眼的又は病理組織学的変化も認められなかった。一連の研究では、vc-MMAE ADC 又は MMAE のいずれも、インスリン分泌又は骨格筋へのグルコース取り込みに対する明確な影響を示さなかった。ヒト膵島細胞に MMAE 又は h00-1006 (4) を添加して 4 時間インキュベートしたところ、検討したいずれの濃度でも細胞生存率の低下を示さなかった。高濃度グルコース条件下（11 mmol/L）でのより長時間インキュベーション（12 時間）では、MMAE の 0.1 ng/mL 以上の濃度で、濃度依存的な膵島細胞の生存率の低下が認められ、臨床推奨用量投与時のヒト C_{max} と同程度の MMAE 濃度では、生存率は約 20%低下した。臨床試験において高血糖が認められている一方で、非臨床毒性試験においてグルコース恒常性の変化を示す徴候は認められなかった。

末梢神経障害所見：臨床試験において、末梢神経障害は特定されたリスクと判断されている。ラット及びカニクイザル反復投与毒性試験において、末梢神経障害を示唆する一般症状及び病理組織学的所見は認められていない。

表 2.6.6- 4 エンホルツマブ ベドチンまたは AGS-22M6E 反復投与毒性試験における主な所見

	Key Findings	Rat		Cynomolgus Monkey	
		LOAEL (mg/kg)	X-Fold Human Exposure	LOAEL (mg/kg)	X-fold Human Exposure
Skin	Ulceration	5	1.8	NP	NP
	Epidermal inflammation	5	1.8	3	2.7
	Mononuclear cell infiltration	5	1.8	3	2.7
Bone Marrow	Hypocellularity	5	1.8	3	2.7
Male Reproductive	Reduced weight	2	0.8	NP	NP
	Tubular degeneration	2	0.8	NP	NP
	Hypospermia	2	0.8	NP	NP
	Abnormal spermatids	2	0.8	NP	NP
Embryo-fetal Development	Postimplantation loss	2	1.0	ND	ND
	Reduced fetal viability	2	1.0	ND	ND
	Fetal skeletal findings	2	1.0	ND	ND
Ocular	Increased number of mitoses in the corneal epithelium	0.5	0.2	NP	NP

LOAEL: lowest observed adverse effect level; ND: not determined; NP: not present

X-Fold is the lowest fold exposure across studies performed.

Embryo-fetal development fold-exposure based on approximate C_{max} comparison.

Human AUC at clinically recommended clinical dose of 1.25 mg/kg = 38.1 $\mu\text{g}\cdot\text{day/mL}$ and C_{max} of 27.4 $\mu\text{g/mL}$

Source: Study EV-201 Data cutoff date: 01 Mar 2019

2.6.6.9.1 全体的結論

エンホルツマブ ベドチンの毒性試験プログラムに関しては、エンホルツマブ ベドチン、MMAE 及び薬物非結合型抗体である AGS-22M6 を用いた試験と同様に、ハイブリドーマ細胞株由来 ADC である AGS-22M6E を用いて実施された一連の非臨床試験が含まれる。毒性試験はエンホルツマブ ベドチンの臨床開発、本医薬品製造販売承認申請を支援するために必要なデータを提供するものである。ラット及びカニクイザルにおけるエンホルツマブ ベドチンの反復投与試験での主要で用量制限毒性となる影響は、標的 (nectin-4) 依存的な皮膚毒性であり、次いで標的非依存的な骨髄毒性（主に赤血球系であるが、白血球系にも影響を及ぼす）であった。さらには、雄性生殖器（精巣、精巣上体、前立腺、精嚢）、脾臓、眼（角膜）、リンパ組織、乳腺、腸

管、副腎、ハーダー腺、肝臓も標的臓器として同定された。また、非臨床毒性試験において、グルコース恒常性の変化を示す徴候は認められず、ヒト骨格筋及び膵島細胞を用いた *in vitro* の研究を実施したところ、ADC と血糖値上昇との関連性は示されなかった。エンホルツマブ ベドチン（MMAE 及びリンカー-MMAE）は光毒性を示さないと考えられる。MMAE は微小管阻害作用による異数性誘発機序により遺伝毒性を示す。エンホルツマブ ベドチン及び MMAE はいずれも胚・胎児発生毒性を示す。エンホルツマブ ベドチンはまた精巣毒性を引き起こしたが、これは部分的に可逆的であった。これらの所見は、MMAE の薬理作用による影響と一致している。

以上をまとめると、認められた毒性のモニタリング可能性及び可逆性にに基づき、非臨床安全性プロファイルからは、局所進行性又は転移性尿路上皮癌の患者へのエンホルツマブ ベドチンの使用は支持されると考えられる。

2.6.6.10 図表

図表は各項の本文中の適切な場所に挿入した。

2.6.6.11 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

TOXNET Toxicology Data Network; <https://toxnet.nlm.nih.gov/>, Accessed May 2019.

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

目次

2.6.7	毒性試験概要表.....	2
2.6.7.1	毒性試験：一覧表.....	2
2.6.7.2	トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表.....	5
2.6.7.3	トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧.....	6
2.6.7.4	毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧.....	7
2.6.7.5	単回投与毒性試験.....	11
2.6.7.6	反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験.....	12
2.6.7.7	反復投与毒性試験：重要な試験.....	13
2.6.7.8	In vitro 遺伝毒性試験.....	30
2.6.7.9	In vivo 遺伝毒性試験.....	36
2.6.7.10	がん原性試験.....	38
2.6.7.11	生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験.....	38
2.6.7.12	生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験.....	38
2.6.7.13	生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験.....	39
2.6.7.14	生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験.....	48
2.6.7.15	新生児を用いた試験.....	48
2.6.7.16	局所刺激性試験.....	49
2.6.7.17	その他の毒性試験.....	50

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

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

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses†	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	CTD No.
Repeat Dose Toxicity								
4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in rats	Male Sprague-Dawley rat	iv bolus	4 weeks (q1wx4)	0, 1.5, 10, 15 (AGS-22M6E) and 10 mg/kg (AGS-22M6)	No	██████████	8226169	4.2.3.2-1 (参)
4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in rats	Sprague-Dawley rat	iv bolus	4 weeks (q1wx4)	0, 2, 5, 10 (AGS-22M6E) and 10 mg/kg (AGS-22M6)	Yes¶	██████████	20005662	4.2.3.2-2
3-month toxicity study of enfortumab vedotin in rats	Sprague-Dawley rat	iv bolus	13 weeks (q1wx13)	0, 0.5, 2, and 5 mg/kg	Yes¶	██████████	20117437	4.2.3.2-3
4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in monkeys	Cynomolgus monkey	iv infusion (MMAE iv bolus)	4 weeks (q1wx4)	0, 1, 3, 6 (AGS-22M6E), 6 (AGS-22M6), and 0.1093/0.0545 mg/kg (MMAE)	Yes¶	██████████	20005664	4.2.3.2-4
Bridging 4-week toxicity study of enfortumab vedotin and AGS-22M6E in monkeys	Cynomolgus monkey	iv infusion	4 weeks (q1wx4)	0, 3 (AGS-22M6E) and 3 mg/kg (enfortumab vedotin) ††	Yes¶	██████████	20021751	4.2.3.2-5
<i>Table continued on next page</i>								

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses†	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	CTD No.
Genotoxicity								
Reverse mutation assay of MMAE	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	In vitro	-	-S9: 0.25 to 5000 µg/plate +S9: 0.25 to 5000 µg/plate	Yes¶	██████████	██████████503.	4.2.3.3.1-1 (参)
Forward mutation assay of MMAE	Mouse lymphoma L5178Y TK ^{+/+} cell line	In vitro	-	-S9, 4h; 0.01 to 15 ng/mL +S9, 4h; 0.05 to 100 ng/mL -S9, 24h; 0.005 to 3 ng/mL	Yes¶	██████████	8204155	4.2.3.3.1-2 (参)
In vivo micronucleus test of MMAE	Male Sprague-Dawley rat	iv bolus	Single dose	0, 0.01, 0.1, 0.2 mg/kg	Yes¶	██████████	8204151	4.2.3.3.2-1 (参)
Reproductive and Developmental Toxicity								
Embryo-fetal development of MMAE	Female Sprague-Dawley rat	iv bolus	GD 6 and 13‡	0, 0.2 mg/kg MMAE	Yes¶	██████████	8204397	4.2.3.5.2-1 (参)
Embryo-fetal development of enfortumab vedotin	Female Sprague-Dawley rat	iv bolus	GD 6 and 13‡	0, 2, 5 mg/kg	Yes¶	██████████	20119695	4.2.3.5.2-2
Other Toxicity								
4-week testicular toxicity study of enfortumab vedotin in rats	Male Sprague-Dawley rat	iv bolus	4 weeks (q1wx4)	0, 2 mg/kg	Yes¶	██████████	20135474	4.2.3.7.7-1
Effect on peripheral glucose uptake and islet viability and insulin secretion of MMAE in vitro	Human islets and skeletal muscle cells	in vitro	4 or 12 hours‡‡	0.01 – 100 ng/mL MMAE 0.01 – 100 µg/mL MMAE ADC§	No	██████████	██████022-076622	4.2.3.7.7-2 (参)
Table continued on next page								

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses†	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	CTD No.
Other Toxicity <i>continued</i>								
Tissue cross reactivity of AGS-22M6E with cynomolgus tissues	Cynomolgus monkey	Tissue titration-Frozen tissue	NA	AGS-22M6E-biotin at 3, 10, or 30 µg/mL	No	Agensys, Inc.	ES-002	4.2.3.7.7-3 (参)
Nectin-4 expression by IHC with human tissues	Human	Tissue microarray-Formalin-fixed and paraffin-embedded	NA	Mouse anti-human Nectin-4 M22-244b3.1.1.1 at 7.5 µg/mL	No	Agensys, Inc.	ES-001	4.2.3.7.7-4 (参)
Tissue cross reactivity of AGS-22M6E with human tissues	Human	Tissue titration - Frozen tissue	NA	AGS-22M6E-biotin at 2.5, 5, and 10 µg/mL	Yes¶		8236219	4.2.3.7.7-5
Photosafety: molar extinction coefficient determination	NA	NA	NA	NA	No	Seagen Inc.	TRN-2926-A	4.2.3.7.7-6 (参)

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; GD: gestational day; GLP: Good Laboratory Practice; IHC: immunohistochemistry; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; NOAEL: no observed adverse effect level; TK: thymidine kinase; q1wx4: once per week for 4 weeks.

† Underline represents the NOAEL dose.

‡ Treatment on GD 6 and 13 covers the period from implantation to closure of the hard palate.

§ MMAE ADC=h00-1006(4), a non-binding ADC conjugated with the same linker and payload (MMAE) as enfortumab vedotin.

¶ Test article characterization and/or stability testing were not conducted under GLP or statement of compliance was not available.

†† The NOAEL from study 20005664 was used to select the bridging dose level of study 20021751.

‡‡ Incubation period.

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

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

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses†	GLP Compliance	Study No.	CTD No.
4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in rats	Male Sprague-Dawley rat	iv bolus	0, 1.5, 10, 15 (AGS-22M6E) and <u>10</u> mg/kg (AGS-22M6)	No	8226169	4.2.3.2-1 (参)
4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in rats	Sprague-Dawley rat	iv bolus	0, 2, 5, 10 (AGS-22M6E) and 10 mg/kg (AGS-22M6)	Yes‡	20005662	4.2.3.2-2
3-month toxicity study of enfortumab vedotin in rats	Sprague-Dawley rat	iv bolus	0, 0.5, 2, and 5 mg/kg	Yes‡	20117437	4.2.3.2-3
4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in monkeys	Cynomolgus monkey	iv infusion (MMAE iv bolus)	0, 1, <u>3</u> , 6 (AGS-22M6E), <u>6</u> (AGS-22M6), and 0.1093/0.0545 mg/kg (MMAE)	Yes‡	20005664	4.2.3.2-4
Bridging 4-week toxicity study of enfortumab vedotin and AGS-22M6E in monkeys	Cynomolgus monkey	iv infusion	0, <u>3</u> (AGS-22M6E) and 3 mg/kg (enfortumab vedotin)§	Yes‡	20021751	4.2.3.2-5
Embryo-fetal development of enfortumab vedotin	Female Sprague-Dawley rat	iv bolus	0, 2, 5 mg/kg	Yes‡	20119695	4.2.3.5.2-2

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; GLP: Good Laboratory Practice; MMAE: monomethyl auristatin E; NOAEL: no observed adverse effect level.

† Underline represents the NOAEL dose.

‡ Test article characterization and/or stability testing were not conducted under GLP or statement of compliance was not available.

§ The NOAEL from study 20005664 was used to select the bridging dose level of study 20021751.

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

被験物質：エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E

ADC AUC _{0-t} (μg·hr/mL) [†]					
Weekly Dose	Rats		Monkeys		Humans
(mg/kg)	M	F	M	F	
0.5 [§]	134	183			
1.25 [¶]					914.4
1.5 ^{††}	619 [‡]				
2 [§]	798	734			
3 ^{‡‡}			3072	2952	
5 [§]	2560	2030			
6 ^{§§}			5110	5060	
10 ^{††}	5620 [‡]				
15 ^{††}	8230 [‡]				

ADC: antibody-drug conjugate

[†] Data are arithmetic means unless otherwise specified

[‡] Derived using median concentration-time profiles

[§] Study 20117437, 2 and 5 mg/kg: AUC_{0-96h}, 0.5 mg/kg: AUC_{0-48h} for male, AUC_{0-96h} for female

[¶] Study EV-201 AUC_{0-7d}, cycle 1, n=134

^{††} Study 8226169, AUC_{0-168h}

^{‡‡} Study 20021751 (enfortumab vedotin group), AUC_{0-7d}

^{§§} Study 20005664, AUC_{0-168h}

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

2.6.7.4.1 毒性試験：被験物質（エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E）

Batch No.	Purity (% Main)	Total Quantifiable Impurities † (%w/w)	Study No.	Type of Study
PROPOSED SPECIFICATION	≥ 90.0	ND		
AGS-22M6E				
AGS-22M6-VCE-01‡	98.1	< LOD	8226169	4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in rats
FCG1001 TOX-01§	97.2	0.009	20005662	4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in rats
FCG1001 TOX-01§	97.2	0.009	20005664	4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in cynomolgus monkeys
0K001A¶	97.8	< LOQ	20021751	Bridging 4-week toxicity study of enfortumab vedotin and AGS-22M6E in monkeys
1198-80§§	ND	ND	ES-002	Immunohistochemical evaluation of the tissue cross reactivity of AGS-22M6E with normal cynomolgus monkey tissues
1198-80§§	ND	ND	8236219	Assessment of the potential tissue cross reactivity of AGS-22M6E with a selected panel of human tissues
Enfortumab vedotin				
2C003AG††	95.6	< LOQ	20021751	Bridging 4-week toxicity study of enfortumab vedotin and AGS-22M6E in cynomolgus monkeys
ASY-012 ADC FB, Batch 1‡‡	97.7	< 0.15	20117437	3-month toxicity study of enfortumab vedotin in rats
ASY-012 ADC FB, Batch 1‡‡	97.7	< 0.15	20119695	Embryo-fetal development of enfortumab vedotin
ASY-012 ADC FB, Batch 1‡‡	97.7	< 0.15	20135474	4-week testicular toxicity study of enfortumab vedotin in rats

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; HCl: hydrochloric acid; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantitation; ND: not determined

† Total Quantifiable Impurities includes SGD-1006 (MMAE) and unidentified impurities

‡ Lot AGS-22M6-VCE-01 was a research batch of AGS-22M6E formulated in 20 mM histidine, 10% sucrose, 0.02% polysorbate 20, pH 6.0. Purity defined as % nonaggregate.

§ Lot FCG1001 TOX-01 was formulated in 20 mM histidine-HCl, 10% sucrose, 0.02% polysorbate 20, pH 6.0.

¶ Lot 0K001A was reconstituted to achieve 5% dextrose in sterile water for injection. Purity defined as % monomer.

†† Lot 2C003AG was reconstituted to achieve 5% dextrose in sterile water for injection.

Footnotes continued on next page

‡‡ ASY-012 ADC FB, Batch 1 was formulated in 20 mM Histidine-HCl pH 6.0, 5.5% Trehalose (w/v) with 0.02% Polysorbate-20 and diluted with 5% sterile dextrose solution.

§§ Lot 1198-80 was biotinylated AGS-22M6E from lot FCG1001 TOX-01 (97.2% purity) and was formulated in 20mM histidine, 5% sucrose, pH 6.0

2.6.7.4.2 毒性試験：被験物質 (MMAE)

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities		Study No.	Type of Study
		Dichloromethane	Methanol		
<i>PROPOSED SPECIFICATION</i> ‡	<i>NA</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>		
SGD-1010-0-01§	98.7¶	ND	ND	██████████503██████████	Reverse mutation assay of MMAE
2002E	92.8	1000 ppm	680 ppm	8204155	Forward mutation assay of MMAE
2002E	92.8	1000 ppm	680 ppm	8204151	In vivo micronucleus test of MMAE
2002E	92.8	1000 ppm	680 ppm	8204397	Embryo-fetal development of MMAE
0902375063	97.4†	1.06%	ND	20005664	4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in cynomolgus monkeys
MOR-C-65(A)	94.3	ND	ND	18022-076622	Effect on peripheral glucose uptake and islet viability and insulin secretion of MMAE in vitro
SG10-045	96.4	3165 ppm	2042 ppm	TRN-2926-A	Photosafety: molar extinction coefficient determination

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; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; ND: not determined.

† A purity factor incorporating high performance liquid chromatography purity and % water and solvents was applied in this study.

‡ MMAE is not an active pharmaceutical ingredient, it is released from enfortumab vedotin by proteolytic cleavage in lysosomes following uptake into cells.

§ SGD-1010-0-01 is also known as RIL-B-114(8) on the Certificate of Testing.

¶ High performance liquid chromatography analysis (area percent)

2.6.7.4.3 毒性試験：被験物質（AGS-22M6）

Batch No.	Purity (%)	Study No.	Type of Study
<u>PROPOSED SPECIFICATION</u> †	<u>NA</u>		
7022B-T02B‡	99.9	20005664	4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in cynomolgus monkeys
1129-88§	99.5	8226169	4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in rats
7022B-T02B‡	99.9	20005662	4-week toxicity study of AGS-22M6E and AGS-22M6 in rats

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; NA: not applicable.

† AGS-22M6 is the antibody backbone of the anti-Nectin-4 ADC AGS-22M6E.

‡ 7022B-T02B was formulated in 10 mM sodium acetate, 1% sorbitol, 3% arginine, pH 5.0 and purity defined as % monomer.

§ 1129-88 was formulated in 10mM sodium succinate, 5% sorbitol, pH 4.7 and purity defined as % nonaggregate.

2.6.7.5 単回投与毒性試験

エンホルツマブ ベドチンの単回投与毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：AGS-22M6E 及び AGS-22M6

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses † (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy findings	CTD No. (Study No.)
Sprague- Dawley rat	iv bolus	4 weeks (q1w x 4) with a 6-week recovery period‡	0, 1.5, 10, 15 (AGS-22M6E) and <u>10</u> (AGS-22M6)	M:6	NA	<p>AGS-22M6E-related findings: Organ weight decreases were observed in the prostate, seminal vesicle, testes, and thymus at 10 mg/kg. Microscopic changes in the adrenal gland and testes (terminal and recovery) were observed at all dose levels tested \geq 1.5 mg/kg. Dose levels \geq 10 mg/kg were not tolerated: general debilitation and body weight loss; skin (sores and scabs) and hematology changes consistent with bone marrow hypocellularity; microscopic changes in skin, testes, epididymis, prostate, seminal vesicle, bone marrow, mammary gland, spleen, liver, lymphoid tissue and intestine. The NOAEL of AGS-22M6E was not established.</p> <p>AGS-22M6-related findings: The NOAEL of AGS-22M6 was 10 mg/kg.</p>	4.2.3.2-1 (参) (8226169)

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; NOAEL: no observed adverse effect level; NA: not applicable; q1wx4: once per week for 4 weeks.

† Underline represents the NOAEL dose.

‡ Due to adverse clinical signs in animals given 15 mg/kg per dose AGS-22M6E, these animals received three weekly doses and entered the recovery phase starting on Study Day 22.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 反復投与毒性試験：ラットを用いた4週間反復投与毒性試験

被験物質 AGS-22M6E 及び AGS-22M6

Report Title: A 4-Week Toxicity Study of AGS-22M6E and AGS-22M6 Administered by Intravenous Injection to Sprague-Dawley Rats, with a 6-Week Recovery Period							Study No.: 20005662		CTD No.: 4.2.3.2-2	
Species/Strain: Rat/ Sprague-Dawley				Duration of Dosing: 4 weeks (q1w)						
Initial Age: 8 to 9 weeks				Duration of Postdose: 6 weeks						
Date of First Dose: ████████ 20██				Method of Administration: iv bolus						
Vehicle/Formulation: 0.9% sodium chloride, USP							GLP Compliance: Yes††			
Special Features: Main study, recovery and toxicokinetic groups. Comparison of ADC and unconjugated antibody.										
No Observed Adverse Effect Level: Not identified										
Dose (mg/kg/dose)	0 (control)		2		5		10		10 (AGS-22M6)	
Number of Animals†:	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Main Study	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Toxicokinetic	M:3	F:3	M:9	F:8¶	M:9	F:9	M:9	F:9	M:9	F:9
ADC Toxicokinetics: AUC_{0-168h} (µg•h/mL)										
Day 1	0	0	1180	1120	2250	883	6570	5630	15700††	16600††
Day 22	0	0	1050	549	1960	1390	4170	3570	18700††	21800††
ADC C_{max} (µg/mL)										
Day 1	0	0	59.7	55.0	137	24.6	271	280	336††	320††
Day 22	0	0	55.3	52.8	124	96.9	209	153	368††	370††
MMAE Toxicokinetics: AUC_{0-168h} (ng•h/mL)										
Day 1	0	0	12.6	9.86	20.5	20.0	51.3	43.0	NA	NA
Day 22	0	0	11.9	7.19	25.4	14.5	69.6	36.2	NA	NA
MMAE C_{max} (ng/mL)										
Day 1	0	0	0.255	0.291	0.644	0.516	0.870	0.820	NA	NA
Day 22	0	0	0.405	0.473	1.09	1.11	2.82	1.89	NA	NA
Table continued on next page										

Dose (mg/kg/dose)	0 (control)		2		5		10		10 (AGS-22M6)	
Number of Animals†	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Noteworthy Findings: Main Study										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	1§§	0	0	0
Body Weight (%)‡	24.9	13.4	24.7	16.6	19.9	14.5	8.5	13.1	22.0	12.9
Food Consumption (week 3-4) - g/animal/day	26.5	19.2	25.5	18.9	24.9	19.7	21.5	19.0	26.8	18.5
Clinical Observations (Day 1 to 29)										
Abrasions §	4 (14)	-	3 (15)	1 (1)	11 (140)	12 (137)	15 (274)	15 (270)	5 (31)	4 (24)
Urine staining (# of animals)	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	↓ RBC, HCT, HGB; ↑ RETIC, RDW, MCH, MCV: days 16 and/or 29	↓ RBC, HCT, HGB; ↑ RETIC, RDW, MCV: days 16 and/or 29	↓ RBC, HCT, HGB; ↑ RETIC, RDW, MCH, MCV: days 16 and/or 29	↓ RBC, HCT, HGB; ↑ RETIC, RDW, MCH, MCV: days 16 and/or 29	-	-
Chemistry	-	-	-	-	-	↑ ALT and AST; days 16	↑ ALT, AST, ALP and GGT; ↓ ALB and TOTProt; days 16 and/or 29	↑ ALT, AST, ALP and GGT; ↓ ALB and TOTProt; days 16 and/or 29	-	-
<i>Table continued on next page</i>										

Dose (mg/kg/dose)	0 (control)		2		5		10		10 (AGS-22M6)	
Number of Animals†	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Terminal Necropsy, Day 29 (No. Evaluated)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)
Organ Weights	-	-	-	-	↓ Testes	↑ Spleen	↓ Testes; ↑ Spleen	↑ Spleen	-	-
Gross Pathology (No. of animals)										
Skin scab	-	-	-	-	3	1	7	7	-	-
Histopathology (No. of animals with severity)										
Testes:										
Tubular epithelial degeneration	-	NA	2+	NA	5+, 1+,, 1++++	NA	2+, 5+,, 2+++	NA	-	NA
Epididymides:										
Hypospermia/Abnormal Spermatis	-	NA	3+, 3++	NA	2+, 5+,, 1++++	NA	1+, 2+,, 5+,, 1++++	NA	-	NA
Bone Marrow, femur:										
Hypocellularity	-	-	-	-	1+, 3++	-	3+, 2+,, 1+++	-	-	-
Skin:										
Ulceration	-	-	-	-	2++	-	5++	1+, 3++	-	-
Epidermal Inflammation	-	-	-	-	1+	1++	3++	5+,, 1++++	-	-
Epidermal hyperplasia	-	-	-	-	-	1++	3++	5++	-	-
Noteworthy Findings in Recovery Period (Day 30 to Recovery Necropsy, Day 64)										
Dose (mg/kg/dose)	0 (control)		2		5		10		10 (AGS-22M6)	
Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations										
Abrasions§	-	1 (1)	2 (9)	-	4 (35)	3 (26)	5 (110)	5 (41)	2 (11)	3 (10)
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	↓ Testes	-	↓ Testes	-	↓ Testes	-	-	-

Table continued on next page

Dose (mg/kg/dose)	0 (control)		2		5		10		10 (AGS-22M6)	
Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology (No. of animals with severity)										
Testes:										
Tubular epithelial degeneration	-	NA	3++, 2+++	NA	5++++	NA	5++++	NA	1++++	NA
Epididymides:										
Hypospermia/Abnormal Spermatis	-	NA	2++, 2+++, 1++++	NA	5++++	NA	5++++	NA	1++++	NA

-: no noteworthy findings; ↓ : decreased; ↑ : increased; += minimal; ++ = mild; +++ = moderate, ++++ = marked.

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; ALB: albumin; ALP: alkaline phosphatase; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; GGT: gamma glutamyl transferase; GLP: Good Laboratory Practice; HCT: hematocrit; HGB: hemoglobin; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; RBC: red blood cell; RDW: red blood cell distribution width; RETIC: reticulocyte; TOTProt: total protein; USP: United States Pharmacopeia.

† Number of animals includes main study animals euthanized on day 29 and recovery animals euthanized on day 64.

‡ Body weight percent calculated by the percent increase in body weight from week -1 to week 4.

§ Number of animals (number of incidences) are shown and includes animals assigned to recovery and terminal necropsy groups with observations from Study Day 1 to 29. Slight to moderate abrasions (generally on the dorsal neck, head, and cranial back) were present after day 11 and continuing to the end of the dosing phase, day 29. In the recovery phase all animals in the 10 mg/kg AGS-22M6E group had slight to moderate abrasions. While a majority of animals recovered by day 40-41, abrasions were noted in individual animals (Animal Nos. 4013, 4015) until the end of recovery phase (day 62 or 64).

¶ Animal 7504 was found dead on day 3 immediately after blood collection

†† These values represent the toxicokinetic parameters for the unconjugated antibody

‡‡ Test article characterization and/or stability testing were not conducted under GLP or statement of compliance was not available.

§§ The cause of death for this animal could not be established by microscopic examination of the tissues as autolysis, particularly in the intestinal tract, precluded definitive evaluation.

2.6.7.7.2 反復投与毒性試験： ラットを用いた3カ月反復投与毒性試験

被験物質：エンホルツマブ ベドチン

Report Title: A GLP 3-Month Intravenous Toxicity Study of Enfortumab Vedotin in Sprague-Dawley Rats						Study No.: 20117437		CTD No.: 4.2.3.2-3	
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley			Duration of Dosing: 3 months (q1w x 13 [13 doses])†						
Initial Age: 10 to 12 weeks			Duration of Postdose: 1 week						
Date of First Dose: [REDACTED] 20[REDACTED]			Method of Administration: iv injection (slow bolus)†						
Vehicle/Formulation: 5% (w/v) sterile dextrose solution (prepared from powder in sterile water for injection, USP)						GLP Compliance: Yes¶¶¶			
Special Features: None									
No Observed Adverse Effect Level: Not applicable									
Dose Level (mg/kg/dose):		0 (Control)		0.5		2		5	
Number of Animals:‡									
Main Study		M: 10		F: 10		M: 10		F: 10	
Toxicokinetic		M: 0		F: 0		M: 9		F: 9	
Toxicokinetics (Mean): Enfortumab vedotin ADC §									
C _{max} (ng/mL), Day 1		NA		15500		16200		42900	
Day 85		NA		NC¶		NC¶		37800	
AUC _{0-t} (ng•hr/mL)§§§, Day 1		NA		134000		183000		798000	
Day 85		NA		NC¶		NC¶		167000	
Toxicokinetics (Mean): MMAE §									
C _{max} (pg/mL), Day 1		NA		28.9		29.9		107	
Day 85		NA		74.5		37.8		241	
AUC _(0-t) (pg•hr/mL), Day 1		NA		1190		1090		6990	
Day 85		NA		NR††		NR††		5850	
Anti-therapeutic antibody‡‡		NA		9/9		8/9		6/9	
Table continued on next page									

Dose Level (mg/kg/dose):	0 (Control)		0.5		2		5	
Number of Animals: Main Study ‡	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Noteworthy Findings								
Died/Unscheduled Euthanasia §§	0	1	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations								
Abrasions ¶¶	1(8)	2(18)	4(65)	2(33)	0(0)	2(14)	3(138)	2(88)
Body Weight/Body Weight Gain	–	–	–	–	–	–	–	–
Food Consumption	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology, Day 92 (No. Evaluated) ††††	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)	(9)	(10)
Red blood cell count (10 ⁶ /uL)	8.515	8.204	–	7.914	–	7.748*	6.759*	7.342*
Hemoglobin concentration (g/dL)	14.83	15.12	–	14.62*	–	14.40*	13.24*	13.74*
Hematocrit (%)	44.77	44.33	–	42.57*	–	42.16*	40.08*	40.30*
Reticulocyte count (10 ⁹ /L)	174.95	147.16	–	–	–	–	297.74*	186.50*
Mean Corpuscular Volume (fL)	52.59	–	–	–	–	–	61.13	–
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	17.40	–	–	–	–	–	20.10*	–
Red Blood Cell Distribution Width (%)	14.11	12.40	–	–	–	–	17.19*	13.61*
Platelet Count (10 ³ /μL)	846.3	813.0	–	–	965.9	901.5	1153.1*	1033.4*
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Chemistry, Day 92 (No. Evaluated) †††	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Alanine Aminotransferase (U/L)	43.6	24.6	–	–	–	–	79.3*	54.5
Aspartate Aminotransferase (U/L)	125.5	99.3	–	–	–	–	206.7*	197.5
Alkaline Phosphatase (U/L)	75.3	29.1	–	–	–	–	89.6	37.4
Total Bilirubin (mg/dL)	0.15	–	–	–	–	–	0.26*	–
Albumin (g/dL)	–	3.60	–	–	–	–	–	3.41
Globulin (g/dL)	2.82	3.00	–	–	–	–	3.17*	3.30*

Table continued on next page

Dose Level (mg/kg/dose):	0 (Control)		0.5		2		5	
Number of Animals: Main Study ‡	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Chemistry, Day 92 (No. Evaluated) †††, continued	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Albumin/Globulin Ratio	1.04	1.20	–	–	–	–	0.90*	1.04*
Cholesterol (mg/dL)	62.2	80.1	–	–	–	98.9	94.9*	122.7*
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Terminal Euthanasia, Day 92 (No. Evaluated)	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Gross Pathology (No. Animals)								
Testis								
Small and/or soft	1	NA	1	NA	3	NA	6	NA
Skin								
Scab; red; multifocal	–	–	–	–	–	–	1	2
Abrasion	–	–	–	–	–	1	–	–
Organ Weights								
Testis								
Absolute (g)	3.6034	NA	3.5150	NA	2.6022*	NA	1.7616*	NA
% body weight	0.6516	NA	0.6388	NA	0.4685*	NA	0.3286*	NA
% brain weight	160.9840	NA	160.3304	NA	116.0021*	NA	80.0763*	NA
Epididymis								
Absolute (g)	1.5687	NA	1.4903	NA	1.4315	NA	1.2547*	NA
% body weight	0.2836	NA	0.2706	NA	0.2583	NA	0.2391	NA
% brain weight	70.1163	NA	68.0233	NA	64.2216	NA	57.2463	NA
Adrenal Gland								
Absolute (g)	0.0538	0.0724	0.0547	0.0605	0.0557	0.0532*	0.0523	0.0590*
% body weight	0.0097	0.0248	0.0099	0.0209	0.0101	0.0182*	0.0101	0.0205
% brain weight	2.4030	3.5255	2.4936	3.0256	2.4870	2.6368*	2.3929	2.9687
Liver								
Absolute (g)	12.2337	6.9926	12.5044	6.7143	12.6424	7.1268	12.3266	7.7157
% body weight	2.1731	2.3744	2.2566	2.2974	2.2854	2.4139	2.3190	2.6643*
% brain weight	545.6039	341.3666	568.6152	336.2991	565.7805	353.3634	562.0882	387.7557*

Table continued on next page

Dose Level (mg/kg/dose):	0 (Control)		0.5		2		5	
Number of Animals: Main Study ‡	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Terminal Euthanasia, Day 92 (No. Evaluated), continued	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Histopathology †††								
Testis (No. Examined)	(10)	(0)	(10)	(0)	(10)	(0)	(10)	(0)
Degeneration/atrophy; seminiferous tubule	1+++	NA	1+++	NA	2+, 1+++, 3++++	NA	2+, 7++++	NA
Mitotic figures, abnormal; interstitial	–	NA	–	NA	2+	NA	6+	NA
Epididymis (No. Examined)	(10)	(0)	(10)	(0)	(10)	(0)	(10)	(0)
Cell debris; luminal	1+	NA	1+	NA	4++, 1++++	NA	1+, 5++, 2+++	NA
Reduced sperm; luminal	1++	NA	1++	NA	2++, 2+++, 1++++	NA	1++, 3+++, 4++++	NA
Single cell necrosis; epithelial	–	NA	–	NA	–	NA	2+	NA
Gland, Mammary (No. Examined)	(9)	(8)	(4)	(10)	(6)	(9)	(2)	(10)
Atrophy	–	–	–	–	–	–	1+++ 1++++	–
Mitotic figures, abnormal	–	–	–	–	–	1+	1+	2+
Single cell necrosis	–	–	–	–	–	–	–	2+
Eye (No. Examined)	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Mitotic figures, abnormal; cornea	–	–	3+	–	4+	–	1+	2+
Gland, Harderian (No. Examined)	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Mitotic figures, abnormal; epithelial	–	–	–	–	–	–	1+	1+
Single cell necrosis; epithelial	–	–	–	–	–	–	1+	1+
Site, administration iv tail (No. Examined)	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Mitotic figures, abnormal; epidermal; adnexa	–	–	4+	7+	8+	5+	5+	7+

Table continued on next page

Dose Level (mg/kg/dose):	0 (Control)		0.5		2		5	
Number of Animals: Main Study ‡	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Site, administration iv tail, <i>continued</i>								
Single cell necrosis; epidermal; adnexa	–	–	2+	3+	5+	2+	3+	2+
Necrosis	–	–	–	–	–	1+++	–	–
Skin (No. Examined)	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Crust; serocellular	–	–	–	–	–	–	1++	2+, 1++
Acanthosis; epidermal	–	–	–	–	–	–	1++	1+, 1++
Erosion/ulcer; epidermal	–	–	–	–	–	–	1+	–
Infiltration, mononuclear cell; dermal; subcutaneous tissue	–	–	–	–	–	–	1++	1+
Mitotic figures, abnormal; epidermal; adnexa	–	–	–	–	–	–	3+	2+
Single cell necrosis; epidermal; adnexa	–	–	–	–	–	–	1+	1+
Bone marrow (No. Examined)	(10)	(9)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Increased cellularity, erythroid	–	–	–	–	–	–	1++	–

– No Noteworthy Findings; +: minimal severity; ++: mild severity; +++: moderate severity; ++++: marked severity;

ADC: antibody-drug conjugate; ATA: anti therapeutic antibodies; GLP: Good Laboratory Practice; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; NC: not calculable; NR: not reported; USP: United States Pharmacopeia.

*ANOVA with Dunnett's/Dunn's (P ≤0.05).

† The test and control articles were administered to the appropriate animals via intravenous (slow bolus) injection over a target of 10 to 30 seconds into the tail vein once weekly (q1w) on days 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, and 85.

‡ Main study animals includes animals euthanized on Day 92 with the exception of a control female that was euthanized on day 64 for reasons unrelated to the administration of the control article. Toxicokinetic animals were euthanized without necropsy following collection of the final samples on day 99.

§ There were no quantifiable serum concentrations of enfortumab vedotin or MMAE (free drug) on day 1 at predose. All animals (ATA positive and negative) were included for the calculation of parameters on day 85; the decrease of serum ADC concentration observed on day 85 correlates with the presence of ATA on day 99 (14 days after last iv bolus injection on day 85) in samples and likely had an impact on the toxicokinetic profile, exposure and the terminal phase on day 85.

¶ Enfortumab vedotin serum concentration was generally not quantifiable on day 85 at 0.5 mg/kg/dose, and therefore toxicokinetic parameters were not calculable.

†† Not reported because less than 3 consecutive quantifiable concentrations postdose.

Footnotes continued on next page

‡‡ Number of animals confirmed positive for the presence of anti-enfortumab vedotin antibodies on day 99 (14 days after last iv bolus injection on day 85) per number evaluated is shown. Anti-enfortumab vedotin antibodies were not detected in any of the animals from the treated groups at predose on day 1.

§§ There were no enfortumab vedotin-related deaths. A control female was euthanized at an unscheduled interval on day 64 due to a procedure-related injury.

¶¶ Number of animals (number of incidences) are shown. Slight to moderate abrasions, located on either the head, face, back, and/or dorsal cervical areas were present from 3 males and 2 females dosed with 5 mg/kg/dose beginning as early as day 8 and were more consistently observed by day 40, with 4 of 5 affected animals having abrasions, and by day 56, all 5 affected animals had abrasions that in general, persisted throughout the remainder of the study duration. While abrasions were also observed from control-dosed animals, given the increased incidence (defined as total number of animals affected) and frequency (defined as the total number of observations) at 5 mg/kg/dose, abrasions at this dose level were attributed to enfortumab vedotin administration. While there was an increased incidence of abrasions from males dosed at 0.5 mg/kg/dose as compared to controls, given the absence of this effect in males dosed at 2 mg/kg/dose or females dosed at 0.5 mg/kg or 2 mg/kg, and lack of any histological correlates, this was not definitively ascribed to enfortumab vedotin administration and was likely incidental.

††† Gamma glutamyltransferase was elevated in 1 male rat treated with 5 mg/kg/dose

‡‡‡ Number of animals with finding and severity is shown.

§§§ AUC_{0-t} values shown where on Day 1, 2 and 5 mg/kg: AUC_{0-96h}, 0.5 mg/kg: AUC_{0-48h} for male, AUC_{0-96h} for female and on Day 85, 2 mg/kg: AUC_{0-6h}, 5 mg/kg: AUC_{0-6h} for male, AUC_{0-96h} for female

¶¶¶ Test article characterization and/or stability testing were not conducted under GLP or statement of compliance was not available.

†††† Blood sample could not be measured due to clotting in 1 male rat treated with 5 mg/kg.

2.6.7.7.3 反復投与毒性試験：カニクイザルを用いた4週間反復投与毒性試験

被験物質：AGS-22M6E, AGS-22M6 及び MMAE

Report Title: A 4-Week Toxicity Study of AGS-22M6E and AGS-22M6 Administered by Intravenous Infusion to Cynomolgus Monkeys, with a 6-Week Recovery Period								Study No.: 20005664		CTD No.: 4.2.3.2-4		
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus (Country of Origin-China)				Duration of Dosing: 4 weeks (q1w)								
Initial Age: 2.7 to 4.1 yrs.				Duration of Postdose: 6 weeks								
Date of First Dose: ████████ 20██				Method of Administration: 30 minute iv infusion (AGS-22M6 and AGS-22M6E); slow iv bolus (MMAE)								
				Vehicle/Formulation: 0.9% sodium chloride, USP				GLP Compliance: Yes†††				
Special Features: Main study, recovery and toxicokinetic groups: Group 6 was administered MMAE as the free drug at the equivalent of the MMAE contained in a 6 mg/kg dose of ADC.												
No Observed Adverse Effect Level (AGS-22M6E): 3 mg/kg administered once weekly via intravenous infusion												
Dose Level (mg/kg/week)	0 (control)		1		3		6†		6 (AGS-22M6)		0.1093/0.0545 MMAE††	
No. of Animals (Main)	M:5	F: 5	M: 5	F: 5	M:5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F:5
Toxicokinetics (Mean): AGS-22M6E (ADC) and AGS-22M6 (Tab)												
AUC _{0-168h} (µg•hr/mL) Day 1	-	-	635	633	2490	2400	5110	5060	10900	12700	-	-
Day 22††	-	-	471		903		6150‡		23550		-	
C _{max} (µg/mL) Day 1	-	-	25.1	24.1	79.4	73.7	154	148	171	192	-	-
Day 22††	-	-	21.2		63.7		137‡		266		-	
Toxicokinetics (Mean): MMAE												
AUC _{0-168h} (pg•hr/mL) Day 1	-	-	3710		11700		24400		-		154000	151000
Day 22††	-	-	4040		15000		24500		-		55900	75200
C _{max} (pg/mL) Day 1	-	-	34.3		105		202		-		270000	303000
Day 22††	-	-	42.9		226		215		-		213000	431000
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2§§§	1§§§	NA	NA	1	1¶¶¶
Body Weight (%) [compared to week-2]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓ 15%: week 2
Food Consumption (week 4 compared to control animals)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓ (Day 2-12)	↓ (Day 6-19)
Table continued on next page												

Dose Level (mg/kg/week)	0 (control)		1		3		6†		6 (AGS-22M6)		0.1093/ 0.0545 MMAE††	
No. of Animals (Main)	M:5	F: 5	M: 5	F: 5	M:5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F:5
Clinical Observations (Incidences Days 1-29) †††												
Abrasions	1	4	11	20	33	42	41	32	13	34	5	22
Dry skin	3	-	3	25	120	117	44	38	12	8	-	-
Reddened area	5	6	14	21	100	64	64	63	15	7	14	11
Watery feces	-	-	1	-	-	-	1	9	-	-	7 (Day 8-15)	35 (Day 4- 29)
Lethargy	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Decrease activity	-	-	-	-	-	-	4	5	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography/ BP/HR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology (Day 8) §												
Reticulocytes	2.34	2.48	-	-	1.72	0.91*	0.42*	0.87*	-	-	0.39*	0.28*
RBC	0.94	0.91	-	-	0.90	0.88	0.84	0.87	-	-	0.75*	0.80
Neutrophils	-	-	-	-	1.32	0.78	0.21	0.61	-	-	0.07*	0.01*
Eosinophils	-	-	-	-	1.76	0.82	0.57	0.68	-	-	0.06*	0.02*
No. of Animals Evaluated	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(3)	(4)	(5)	(5)	(4)	(5)
Chemistry (Day 15)												
Albumin (g/dL)	-	-	-	-	-	-	↓2.83#	↓2.98#	-	-	↓3.20#	↓2.80#
Globulin (g/dL)	-	-	-	-	-	-	3.10	↑3.55#	-	-	3.05	↑3.42#
Potassium (mEq/L)	-	-	-	-	-	-	↑6.03#	↑6.70#	-	-	↑6.10#	↑5.62
Coagulation (Day 18/19 or 29)												
Fibrinogen (mg/dL)¶	-	-	-	-	-	-	↑386	↑398	-	-	↑266	↑285
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table continued on next page

Dose Level (mg/kg/week)	0 (control)		1		3		6†		6 (AGS-22M6)		0.1093/ 0.0545 MMAE††	
No. of Animals (Main)	M:5	F: 5	M: 5	F: 5	M:5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F:5
No. of Animals Evaluated (Terminal Necropsy, Day 18/19 or 29)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(1)†	(2)†	(3)	(3)	(2)	(2)
Organ Weights†	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology†	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology†												
Injection site												
Inflammation, Dermis	-	-	-	-	-	1++	-	-	-	-	-	-
Inflammation, Subcutaneous	-	-	1+++	-	-	-	1+++	-	-	-	-	-
Thrombus, non-septic	-	-	-	1+++	-	1++++	-	-	-	-	-	-
Skin												
Inflammation, Dermis	-	-	-	-	-	-	1++	2++	1++	-	-	-
Inflammation, Subcutaneous	-	-	-	-	-	-	-	1++	-	-	-	-
Hyperplasia	-	-	-	-	-	-	1+++	1++	1++	-	-	-
Hyperkeratosis	-	-	-	-	-	-	1++	1+, 1++	-	-	-	-
Lymph Node												
Hyperplasia, bilateral	-	-	-	-	-	-	-	1+++	-	-	-	-
Infiltrate, macrophage, mesenteric	-	-	-	-	-	1++	-	-	-	1++	-	-
Spleen												
infiltrate, mixed cell, red pulp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2+++
Thymus												
Atrophy	-	-	-	-	-	2++	1+++	2++	-	-	2++	2++++

Table continued on next page

Dose Level (mg/kg/week)	0 (control)		1		3		6†		6 (AGS-22M6)		0.1093/ 0.0545 MMAE††	
	M: 2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2
General Toxicity§§	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology¶¶¶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: no noteworthy findings; ↓: decreased; ↑: increased; +: minimal; ++: mild severity; +++: moderate severity; ++++: marked severity

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; BP: blood pressure; GLP: Good Laboratory Practice; HR: heart rate; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; RBC: red blood cell; TAB: total antibody; USP: United States Pharmacopeia.

† The 6 mg/kg dose group was discontinued prior to day 15 after 2 doses. Terminal necropsy for 1 male and 2 females in this dose group was conducted on days 18/19 and are included in terminal necropsy data reporting. The remaining 2 males and 2 females continued on recovery and were euthanized on day 49/50.

†† As a result of the discontinued 6 mg/kg/dose of AGS-22M6E, the MMAE dose level was reassessed from 0.1093 to 0.0545 mg/kg/dose to align with the mid-dose (3 mg/kg) rather than the high dose for the remaining day 15 and day 22 doses.

* Denotes values that are statistically ($P \leq 0.05$) different from concurrent controls.

ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($P \leq 0.05$) from baseline values.

§ The data of reticulocytes and RBC are presented as a fold change versus respective predose. The data of neutrophils and eosinophils are presented as a group mean fold change versus concurrent control. Other changes in hematology included reversible decreases in hematocrit and hemoglobin at doses greater than and equal to 3 mg/kg of AGS-22M6E, with reversible lymphocyte and monocyte decreases at doses 6 mg/kg/week and 0.1093/0.0545/mg/kg/week of MMAE.

‡ AUC_{0-168h} and C_{max} for the 6 mg/kg group were calculated from data from day 8.

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

¶ Fibrinogen data are included and the day of collection is day 18/19 for animals dosed with 6 mg/kg/dose of AGS-22M6E and day 29 for animals dosed with MMAE.

§§ Includes clinical observations, body weight, and food consumption.

¶¶ Includes organ weights and gross pathology.

††† Incidence derived from unscheduled, detailed, and routine observations. In the event that an observation was noted in more than one observation type on the same day (i.e., routine and detailed), the observation was only counted once. Animals in the 6 mg/kg group had dosing discontinued with terminal necropsy on days 18/19 and thus incidences were counted from day 1 to 18/19 to accurately capture the dosing phase.

‡‡‡ Test article characterization and/or stability testing were not conducted under GLP or statement of compliance was not available.

§§§ Microscopic findings in the animals euthanized early included injection site lesions characterized by inflammation and/or hemorrhage in the dermis and perivascular area, mild subcutaneous degeneration of the veins and moderate erosion of the epidermis; ulceration, inflammation and hyperkeratosis of the skin; and thymic atrophy, possibly related to the general health condition of the animals.

¶¶¶ Microscopic findings in the animal euthanized included injection site (including skin and lymph node) lesions and an increase in mixed cells in the red pulp of the spleen.

2.6.7.7.4 反復投与毒性試験：カニクイザルを用いた4週間反復投与ブリッジング試験

被験物質：エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E

Report Title: A 4-Week Study of AGS-22M6E and AGS-22C3E by Intravenous Infusion Administration in Cynomolgus Monkeys with a 6-Week Recovery Period				Study No.: 20021751		CTD No.: 4.2.3.2-5	
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus (Country of Origin-China)		Duration of Dosing: 4 weeks (q1w)					
Initial Age: 2.7 to 4.0 yrs.		Duration of Postdose: 6 weeks					
Date of First Dose: █████ 20██		Method of Administration: iv infusion (30 minutes ± 1 min)					
Vehicle/Formulation: FCG1015 formulation buffer (20 mM Histidine-HCL pH 6.0, 10% sucrose (w/v) with 0.02% Polysorbate-20) / Diluted with 5% Dextrose				GLP Compliance: Yes‡			
Special Features: Total antibody, antibody-drug conjugate, and antitherapeutic antibody evaluations.							
No Observed Adverse Effect Level: 3 mg/kg administered once weekly via intravenous infusion‡‡‡							
Dose Level (mg/kg/dose):		0 (Control)		3 (AGS-22M6E)		3 (Enfortumab Vedotin)	
Number of Animals:†		M:2		F:2		M:5	
		F:2		M:5		F:5	
Toxicokinetics (Mean): ADC							
C _{max} (µg/mL)§§, Day 1		BLQ		BLQ		76.4	
Day 22		BLQ		BLQ		79.3	
AUC _{0-7d} (µg•d/mL)¶¶, Day 1		BLQ		BLQ		41.4	
						109	
						108	
						128	
						123	
Toxicokinetics (Mean): TAb							
C _{max} (µg/mL), Day 1		BLQ		BLQ		72.7	
Day 22		BLQ		BLQ		71.5	
AUC _{0-7d} (µg•d/mL), Day 1		BLQ		BLQ		105	
						153	
						58.7	
						79.4	
						82.4	
						103	
						213	
						204	
Toxicokinetics (Mean): MMAE							
C _{max} (ng/mL), Day 1		BLQ		BLQ		0.0794	
Day 22		BLQ		BLQ		0.0822	
AUC _{0-7d} (ng•d/mL), Day 1		BLQ		BLQ		0.0938	
						0.0934	
						0.415	
						0.118	
						0.153	
						0.145	
						0.422	
						0.512	
Antitherapeutic antibody§		0/4 (0%)		3/5 (60%)		1/5 (20%)	
						2/5 (40%)	
						2/5 (40%)	

Table continued on next page

Dose Level (mg/kg/dose):	0 (Control)		3 (AGS-22M6E)		3 (Enfortumab Vedotin)	
Number of Animals:†	M:2	F:2	M:5	F:5	M:5	F:5
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Body Weight	–	–	–	–	–	–
Clinical Observations¶						
Dry skin	–	–	5 (82)	5 (45)	5 (64)	4 (64)
Reddened area, skin	–	–	4 (30)	4 (18)	5 (31)	4 (34)
Sunken eye(s)	–	–	1 (1)	1 (3)	2 (10)	–
Eye discharge	–	–	–	–	3 (3)	–
Food Consumption	–	–	–	–	–	–
Veterinary Physical Examinations	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–
Hematology						
Red blood cell count (10 ⁶ /μL), Day 29	6.020	5.305	4.818	4.706	4.928	4.892
Hemoglobin concentration (g/dL), Day 29	13.50	12.35	11.22 ***	11.56	11.04***	11.74
Hematocrit (%), Day 29	45.25	40.35	37.46***	38.94	38.08**	39.74
Reticulocyte count (10 ⁵ /μL), Day 22	0.995	0.920	0.722	0.506	0.762	0.728
Reticulocyte count (10 ⁵ /μL), Day 29	1.350	1.140	1.404	0.950	1.236	1.090
Neutrophil count (/μL), Day 22	3540.0	4992.5	1848.6	1118.4**	2100.8	1175.4**
Neutrophil count (/μL), Day 29	2338.0	5229.5	3159.0	1590.8 *	3061.4	2262.4 *
Eosinophil count (/μL), Day 29	62.5	89.0	15.4	5.6 *	33.2	22.4
Chemistry	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–
Terminal Evaluation, Day 29						
Number of Animals Evaluated:	(2)	(2)	(3)	(3)	(3)	(3)
Gross Pathology††						
Skin, scale	–	–	–	1	–	3
Organ Weights	–	–	–	–	–	–
Histopathology‡‡						
Bone Marrow, Sternum						
Hypocellularity	–	–	1+, 1++	1++	1+	1++

Table continued on next page

Dose Level (mg/kg/dose):	0 (Control)		3 (AGS-22M6E)		3 (Enfortumab Vedotin)	
Number of Animals: †	M:2	F:2	M:5	F:5	M:5	F:5
Histopathology‡‡ (continued)						
Injection Site						
Acanthosis; Diffuse	–	–	2+, 1++	2++	2+	1++
Infiltrate, Mononuclear Cell; Perivascular; Dermis; Multifocal	2+	2+	1+, 2++	2+, 1++	3+	2+, 1++
Fibrosis; Subcutaneous; Focal	–	–	1+	1+	1+	–
Skin						
Hyperkeratosis; Diffuse	–	–	–	2+	–	3+
Acanthosis; Diffuse	–	–	–	1+, 1++	–	2+, 1++
Infiltrate, Mononuclear Cell; Perivascular; Dermis; Multifocal	–	–	–	2+	–	3+
Recovery Necropsy (Day 71)						
Number of Animals Evaluated:	(0)	(0)	(2)	(2)	(2)	(2)
Noteworthy Findings†††	NA	NA	–	–	–	–

Group 2 (AGS-22M6E), 3 (enfortumab vedotin, AGS-22C3E) significantly different from Group 1 (control): *P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001 (adjusted Tukey)

There were no Group 3 (enfortumab vedotin) findings that significantly differed from Group 2 (AGS-22M6E).

-: no noteworthy findings; ; + Minimal, ++ Mild, +++ Moderate

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; BLQ: below limit of quantitation; GLP: Good Laboratory Practice; HCl: hydrochloric acid; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; TAB: total antibody

‡ Test article characterization and/or stability testing were not conducted under GLP or statement of compliance was not available.

† Number of animals includes main study animals euthanized on day 29 and recovery animals euthanized on day 71.

§ Number of animals with positive seroconversion per number of animals evaluated and overall incidences (% seroconversion) are shown.

¶ Number of animals with findings during the dosing phase (day 1 to day 29) are shown and number of incidences are indicated in parenthesis. Incidence derived from detailed and routine observations. Only one observation counted per animal per day.

†† Number of animals with finding is shown.

‡‡ Number of animals with finding and severity is shown.

§§ Geometric mean ratio of enfortumab vedotin to AGS-22M6E = 1.26 (90% CI = 1.17 to 1.36)

¶¶ Geometric mean ratio of enfortumab vedotin to AGS-22M6E = 1.14 (90% CI = 1.02 to 1.28)

††† The following examination items were conducted for the recovery necropsy evaluations: clinical observations, body weight, food consumption, veterinary physical examinations, ophthalmology, hematology, chemistry, urinalysis, gross pathology, organ weights, and histopathology.

‡‡‡ Doses for comparison were selected at the NOAEL of 3 mg/kg, based on findings from Study 20005664.

2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験

2.6.7.8.1 遺伝毒性試験：細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験)

被験物質：MMAE

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay			Study No.: ██████████ 503 ██████████		CTD No.: 4.2.3.3.1-1 (参)		
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells			No. of Independent Assays: 3				
Strains: <i>S. typhimurium</i> strains TA98, TA100, TA1535, TA1537, and <i>E. coli</i> strain WP2 <i>uvrA</i>			No. of Replicate Cultures: 2 (Assay 1) and 3 (Assays 2 and 3)				
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9†			No. of Cells Analyzed/Culture: ≥ 0.3x10 ⁹ cells/mL				
Vehicle for Test Article: DMSO			Vehicle for Positive Controls: DMSO (all except sodium azide), water (for sodium azide)		GLP Compliance: Yes¶		
Treatment: Plate incorporation for 48 to 72 hours					Treatment Period: ██████████ 20 ██████████		
Cytotoxic Effects: None							
Genotoxic Effects: None							
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay #1 Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 <i>uvrA</i>
Without Activation	DMSO	50 µL/plate	17±4	178±11	11±1	18±1	11±1
	SGD-001010	0.25	21±1	194±11	12±1	13±4	15±5
	SGD-001010	0.75	20±1	202±5	18±5	15±8	11±4
	SGD-001010	2.5	19±3	213±16	15±3	19±1	18±0
	SGD-001010	7.5	17±4	199±27	19±6	17±3	17±8
	SGD-001010	25	15±2	219±8	16±0	15±8	10±0
	SGD-001010	75	20±3	227±3	22±11	17±6	16±1
	SGD-001010	200	19±1	220±6	19±0	16±4	19±8
	SGD-001010	600	26±1	249±19	12±4	12±6	13±3
	SGD-001010	1800	21±4	181±6	18±4	13±0	17±4
	SGD-001010	5000	20±2	210±19	20±5	18±3	17±1
	2-Nitrofluorene	1.0	134±35				
	Sodium azide	1.0		574±74	398±48		
	9-Aminoacridine	75				62±1	
MMS	1000					124±6	
With Activation	DMSO	50 µL/plate	29±8	209±16	15±1	11±3	12±1
	SGD-001010	0.25	29±10	207±28	14±4	13±4	15±1
	SGD-001010	0.75	25±1	192±6	13±3	13±0	17±2
	SGD-001010	2.5	27±1	212±20	10±1	14±4	11±4

Table continued on next page

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay #1 continued Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 <i>uvrA</i>
With Activation (continued)	SGD-001010	7.5	21±5	190±22	14±1	10±0	14±1
	SGD-001010	25	18±4	210±3	11±0	9±1	10±1
	SGD-001010	75	28±8	201±8	12±2	13±1	17±1
	SGD-001010	200	30±2	180±25	12±1	12±4	15±6
	SGD-001010	600	26±1	217±9	15±1	16±1	14±3
	SGD-001010	1800	32±1	239±24	15±2	15±6	16±6
	SGD-001010	5000	19±1	197±17	17±4	10±3	13±2
	2-Aminoanthracene	1.0 (all <i>S. strains</i>) 10 (WP2 <i>uvrA</i>)	2117±203	1545±792	272±28	222±59	86±3
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay #2 and 3 Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA 98	TA 100†	TA 1535	TA 1537	WP2 <i>uvrA</i>
Without Activation	DMSO	50 µL/plate	13±2	125±11	13±1	12±2	11±1
	SGD-001010	75	11±1	133±26	13±1	11±1	13±2
	SGD-001010	200	11±1	132±21	12±1	11±1	11±2
	SGD-001010	600	11±1	133±13	13±4	11±1	11±1
	SGD-001010	1800	12±1	140±11	12±1	11±1	11±2
	SGD-001010	5000	12±2	129±14	12±1	10±1	10±1
	2-Nitrofluorene	1.0	152±19				
	Sodium azide	1.0		549±22	506±61		
	9-Aminoacridine	75				1087±122	
MMS	1000					208±21	
With Activation	DMSO	50 µL/plate	16±4	136±14	11±1	8±3	10±1
	SGD-001010	75	15±1	146±7	10±2	5±2	12±2
	SGD-001010	200	11±2	130±6	8±3	10±1	12±1
	SGD-001010	600	13±2	138±17	10±3	8±1	11±1
	SGD-001010	1800	13±2	141±17	10±2	10±2	11±1
	SGD-001010	5000	11±1	129±9	11±2	10±2	11±1
	2-Aminoanthracene	1.0 (all <i>S. strains</i>) 10 (WP2 <i>uvrA</i>)	890±85	828±90	171±54	1471±114	376±56

DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: Good Laboratory Practice; MMS: methyl methanesulfonate; SGD-001010: monomethyl auristatin E (MMAE)

¶ Test article characterization and/or stability testing were not conducted under GLP or statement of compliance was not available.

† Due to culture contamination, strain TA100 was not evaluated in Assay 2 but was retested in Assay 3.

‡ Each bulk preparation of S9 was assayed for its ability to metabolize 2-aminoanthracene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene to forms mutagenic to *Salmonella typhimurium* TA100.

2.6.7.8.2 遺伝毒性試験： L5178Y 細胞を用いるマウスリンフォーマ Tk 試験

被験物質： MMAE

Report Title: L5178Y TK ^{+/−} Mouse Lymphoma Forward Mutation Assay with a Confirmatory Assay				Study No.: 8204155	CTD No.: 4.2.3.3.1-2 (参)	
Test for Induction of: Forward mutation in mouse lymphoma cells		No. of Independent Assays: 3				
Strains: Mouse lymphoma L5178Y TK ^{+/−} cell line		No. of Replicate Cultures: 1 (test article and positive control) or 3 (vehicle control)				
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9		No. of Cells Analyzed/Culture: 3x10 ⁶				
Vehicle for Test Article: 0.9% sodium chloride injection USP		Vehicle for Positive Controls: Methyl methanesulfonate and methylcholanthrene		GLP Compliance: Yes††		
Treatment: Continuous treatment for 4 hours (initial, re-test, and confirmatory assays) or 24 hours (confirmatory assay) followed by a 2 day expression period				Treatment Period: ██████████ 20██████		
Cytotoxic Effects: Dose related decreases in total growth relative to average vehicle control growth						
Genotoxic Effects: None						
Metabolic Activation	Test Condition	Concentration	Initial Mutation Assay			
			Relative Growth (%)‡‡	Mutant Frequency (x10 ⁻⁶) †		
				Total	Small	Large
With Activation	Vehicle	10%	87.7	47.2	15.6	31.6
	Vehicle	10%	121.1	39.1	16.1	22.9
	Vehicle	10%	92.5	48.3	24.9	23.4
	MCA	1.5 µg/mL	11.9	382.6‡	202.7	179.9
	MCA	2.0 µg/mL	11.2	336.7‡	177.4	159.3
	SGD-1010	20 ng/mL	61.5	69.2	23.6	45.6
	SGD-1010	30 ng/mL	45.2	67.7	31.0	36.7
	SGD-1010	40 ng/mL	18.6	80.7	30.5	50.2
	SGD-1010	50 ng/mL	16.6	63.6	28.0	35.6
	SGD-1010	60 ng/mL	7.7	I	ND	ND
	SGD-1010	70 ng/mL	7.5	I	ND	ND
	SGD-1010	80 ng/mL	4.0	I	ND	ND
	SGD-1010	90 ng/mL	4.2	I	ND	ND
SGD-1010	100 ng/mL	2.2	I	ND	ND	
Without Activation (4 hours)	Vehicle	10%	91.4	38.1	9.3	28.8
	Vehicle	10%	100.6	54.9	14.2	40.6
	Vehicle	10%	106.8	42.7	11.4	31.3
	MMS	15 µg/mL	16.4	375.9‡	219.5	156.4
	MMS	20 µg/mL	7.6	471.9‡	305.6	166.3
	SGD-1010	0.05 ng/mL	93.3	59.8	18.8	41.0

Table continued on next page

Metabolic Activation	Test Condition	Concentration	Initial Mutation Assay, <i>continued</i>			
			Relative Growth (%) ^{‡‡}	Mutant Frequency (x10 ⁻⁶) [†]		
				Total	Small	Large
Without Activation, <i>continued</i>	SGD-1010	0.1 ng/mL	99.7	44.1	19.6	24.5
	SGD-1010	0.5 ng/mL	95.3	45.4	12.5	32.9
	SGD-1010	1.0 ng/mL	92.1	43.0	15.5	27.5
	SGD-1010	2.5 ng/mL	82.4	39.8	11.5	28.3
	SGD-1010	5.0 ng/mL	30.0	59.2	19.5	39.7
	SGD-1010	7.5 ng/mL	22.1	69.3	20.4	48.9
	SGD-1010	10 ng/mL	7.3	I	ND	ND
	SGD-1010	12.5 ng/mL	3.4	I	ND	ND
	SGD-1010	15 ng/mL	2.5	I	ND	ND
Re-test Mutation Assay						
Metabolic Activation	Test Condition	Concentration	Relative Growth (%) ^{‡‡}	Mutant Frequency (x10 ⁻⁶) [†]		
				Total	Small	Large
With activation	Vehicle	10%	91.9	35.2	9.8	25.4
	Vehicle	10%	102.0	53.9	16.2	37.8
	Vehicle	10%	100.4	48.5	14.5	34.1
	MCA	1.5 µg/mL	15.0	352.3§	187.9	164.5
	MCA	2.0 µg/mL	9.4	395.8§	216.0	179.8
	SGD-1010	0.25 ng/mL	103.5	49.2	17.8	31.4
	SGD-1010	0.5 ng/mL	111.5	50.3	13.5	36.8
	SGD-1010	1.0 ng/mL	112.9	27.9	11.2	16.8
	SGD-1010	5 ng/mL	91.8	49.9	16.5	33.4
	SGD-1010	10 ng/mL	78.7	45.5	14.4	31.0
	SGD-1010	20 ng/mL	70.0	38.9	16.2	22.7
	SGD-1010	30 ng/mL	44.0	56.9	19.9	37.0
	SGD-1010	40 ng/mL	18.0	51.7	15.8	35.8
	SGD-1010	50 ng/mL	15.7	100.0	40.3	59.7
SGD-1010	60 ng/mL	6.4	I	ND	ND	
Without activation (4 hours)	Vehicle	10%	81.2	42.7	8.9	33.9
	Vehicle	10%	88.4	36.4	12.1	24.2
	Vehicle	10%	133.4	28.7	11.8	16.9
	MMS	15 µg/mL	19.9	357.9§	240.8	117.1
	MMS	20 µg/mL	7.2	523.5§	320.6	202.9
	SGD-1010	0.01 ng/mL	73.5	34.5	12.9	21.5
	SGD-1010	0.05 ng/mL	71.7	25.9	9.8	16.1
	SGD-1010	0.1 ng/mL	90.3	24.7	4.6	20.1
	SGD-1010	0.25 ng/mL	83.7	35.2	9.8	25.4

Table continued on next page

Metabolic Activation	Test Condition	Concentration	Re-test Mutation Assay, <i>continued</i>			
			Relative Growth (%) ^{‡‡}	Mutant Frequency (x10 ⁻⁶) [†]		
				Total	Small	Large
Without activation, continued	SGD-1010	0.5 ng/mL	83.1	30.5	8.5	22.0
	SGD-1010	0.75 ng/mL	57.3	37.4	9.5	27.9
	SGD-1010	2.5 ng/mL	61.8	47.9	14.6	33.3
	SGD-1010	5 ng/mL	27.0	69.6	14.8	54.8
	SGD-1010	7.5 ng/mL	9.4	I	ND	ND
	SGD-1010	10 ng/mL	2.6	I	ND	ND
Confirmatory Mutation Assay						
Metabolic Activation	Test Condition	Concentration	Relative Growth (%) ^{‡‡}	Mutant Frequency (x10 ⁻⁶) [†]		
				Total	Small	Large
With activation	Vehicle	10%	86.4	49.9	18.1	31.8
	Vehicle	10%	112.1	45.9	14.9	31.1
	Vehicle	10%	102.1	48.4	12.7	35.7
	MCA	1.5 µg/mL	15.5	419.3 [¶]	202.0	217.3
	MCA	2.0 µg/mL	12.0	341.5 [¶]	163.1	178.5
	SGD-1010	0.05 ng/mL	89.0	31.3	6.8	24.5
	SGD-1010	0.25 ng/mL	79.4	50.6	12.7	38.0
	SGD-1010	0.5 ng/mL	62.4	57.0	11.0	46.0
	SGD-1010	2.5 ng/mL	62.9	46.3	17.1	29.2
	SGD-1010	5 ng/mL	79.4	45.6	16.7	28.9
	SGD-1010	10 ng/mL	80.5	39.6	12.0	27.6
	SGD-1010	20 ng/mL	40.3	60.8	21.4	39.5
	SGD-1010	30 ng/mL	24.8	74.4	24.4	50.0
	SGD-1010	50 ng/mL	9.7	I	ND	ND
SGD-1010	60 ng/mL	6.8	I	ND	ND	
Without activation (24 hours)	Vehicle	10%	75.5	44.9	12.0	32.9
	Vehicle	10%	118.3	29.3	7.2	22.1
	Vehicle	10%	108.7	31.3	12.1	19.2
	MMS	6.5 µg/mL	25.5	204.1 [¶]	109.6	94.5
	MMS	10 µg/mL	17.8	321.7 [¶]	173.3	148.3
	SGD-1010	0.005 ng/mL	80.5	44.6	9.6	35.1
	SGD-1010	0.01 ng/mL	73.3	35.7	8.7	27.0
	SGD-1010	0.1 ng/mL	96.1	27.4	6.2	21.2
	SGD-1010	0.5 ng/mL	96.4	33.3	9.0	24.4
	SGD-1010	0.75 ng/mL	93.0	34.4	6.9	27.5
	SGD-1010	1 ng/mL	78.9	27.2	3.9	23.3
	SGD-1010	1.5 ng/mL	61.4	44.9	10.7	34.1

Table continued on next page

Confirmatory Mutation Assay, <i>continued</i>						
Metabolic Activation	Test Condition	Concentration	Relative Growth (%) ^{‡‡}	Mutant Frequency (x10 ⁻⁶) [†]		
				Total	Small	Large
Without activation, <i>continued</i>	SGD-1010	2 ng/mL	50.1	66.7	17.8	48.9
	SGD-1010	2.5 ng/mL	17.8	92.5	21.5	71.0
	SGD-1010	3 ng/mL	9.0	I	ND	ND

I: Insufficient data due to excessive toxicity; MCA: Methylcholanthrene; MMS: Methyl methanesulfonate; ND: not determined; SGD-1010: monomethyl auristatin E (also MMAE); TK: thymidine kinase; USP: United States Pharmacopeia.

† Mutant frequency = (total mutant colonies/total viable colonies)x(2x10⁻⁴).

‡ Mutagenic. Exceeds minimum criterion of 134.9x10⁻⁶ (with activation), 135.2x10⁻⁶ (without activation).

§ Mutagenic. Exceeds minimum criterion of 135.9x10⁻⁶ (with activation), 125.9x10⁻⁶ (without activation).

¶ Mutagenic. Exceeds minimum criterion of 138.1x10⁻⁶ (with activation), 125.2x10⁻⁶ (without activation).

†† Stability testing and test article characterization were conducted for the stock but not freshly prepared serial dilutions however, this was formally assessed in the report as no impact as SGD-1010 was dosed to cytotoxic limits without evidence of mutagenicity.

‡‡ Relative growth is calculated as: relative suspension growth x relative cloning efficiency/100

2.6.7.9 In vivo 遺伝毒性試験

2.6.7.9.1 遺伝毒性試験：ラット骨髄小核試験

被験物質：MMAE

Report Title: In Vivo Rat Bone Marrow Micronucleus Assay			Study No.: 8204151	CTD No.: 4.2.3.3.2-1 (参)
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei		Treatment Schedule: Single dose		
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley		Sampling Time: 24 and 48 hours after dosing		
Age: 8 weeks		Method of Administration: Intravenous bolus injection	GLP Compliance: Yes‡‡	
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes		Vehicle/Formulation: 3.9% 0.01N HCl/96.1% 0.9% sodium chloride for injection. USP (HCl/saline)		
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000			Treatment Period: ██████████ 20████	
Special Features: Confirmatory micronucleus assay with antikinetochose analysis				
Toxic/Cytotoxic Effects: Cytotoxicity found in 0.2 mg/kg 48 hour group.				
Genotoxic Effects: Increase in micronucleated PCEs at 0.1 and 0.2 mg/kg. Induced micronuclei were predominately centromere+ (aneugenic mode of action).				
Evidence of Exposure: Cytotoxicity and increase in micronuclei in bone marrow.				
Test Article	Dose (mg/kg)	Harvest Time	Micronucleus Assay¶	
			% Micronucleated PCEs (Mean±SD)	Ratio PCE:NCE (Mean±SD)
HCl/saline	5 mL/kg	24	0.07±0.07	0.70±0.11
HCl/saline	5 mL/kg	48	0.08±0.09	0.82±0.21
SGD-1010	0.01	24	0.12±0.15	0.70±0.18
SGD-1010	0.1	24	1.18±0.33*	0.66±0.16
SGD-1010	0.2	24	1.34±0.46*	0.55±0.07
SGD-1010	0.2	48	1.59±0.33*	0.38±0.07**
Cyclophosphamide positive control	60	24	1.77±0.99*	0.69±0.10
Test Article	Dose (mg/kg)	Harvest Time	Confirmatory Micronucleus Assay††	
			% Micronucleated PCEs (Mean±SD)	Ratio PCE:NCE (Mean±SD)
HCl/saline‡	5 mL/kg	24	0.16±0.10	0.72±0.12
SGD-1010†	0.1	24	1.23±0.53	0.48±0.15
SGD-1010†	0.2	24	0.93±0.46	0.23±0.10
<i>Positive controls:</i>				
Cyclophosphamide†	60	24	2.13±0.33	0.46±0.05
Carbendazim†‡§	1250	24	0.48±0.39	0.19±0.04
Carbendazim‡§	1500	24	0.51±0.46	0.43±0.08

Footnotes appear on next page

HCl: hydrochloric acid; GLP: Good Laboratory Practice; NCE: normochromatic erythrocyte; PCE: polychromatic erythrocyte; SGD-1010: monomethyl auristatin E (MMAE); USP: United States Pharmacopeia.

*Significantly greater than the vehicle control, $P \leq 0.01$ (Dunnett's t-test).

**Significantly less than the vehicle control, $P \leq 0.01$ (Dunnett's t-test).

† 1 animal from each of the cyclophosphamide, carbendazim, and 0.2 mg/kg groups, and 2 animals from the 0.1 mg/kg group, were used in the antikinetochose analysis.

‡ 4000 cells evaluated per animal.

§ Animals were dosed once daily for 2 days prior to harvest timepoint.

¶ Five animals per treatment group were evaluated unless otherwise specified.

†† Three animals per treatment group were evaluated unless otherwise specified.

‡‡ Test article characterization and/or stability testing were not conducted under GLP or statement of compliance was not available.

2.6.7.10 がん原性試験

エンホルツマブ ベドチンは進行がんの治療を目的としているため、医薬品規制調和国際会議（ICH）S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」に従い、がん原性試験は実施しなかった。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

エンホルツマブ ベドチンは重要な試験以外の生殖発生毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

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

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.1 MMAE の胚・胎児発生に関する試験

被験物質：MMAE

Report Title: Intravenous Injection Study for Effects on Embryo-fetal Developmental and Toxicokinetics with SGN-35 and SGD-1010 in Rats		Study No: 8204397	CTD No.: 4.2.3.5.2-1 (参)
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		Duration of Dosing: GD 6 and 13	
Initial Age: 12 weeks		Day of Mating: Prior to confirmation, Day 0	
Date of First Dose: [REDACTED] 20[REDACTED]		Day of Caesarean Section: Day 21 of gestation	
Special Features: None		Method of Administration: Intravenous bolus injection	
Basis for High Dose Selection: R-Toxicity-34 (pilot study conducted at Seattle Genetics) and MMAE dose is the molar equivalent of 10 mg/kg ADC dose		Vehicle/Formulation: 3.9% 0.01 N hydrochloric acid / 96.1% 0.9% sodium chloride for injection, USP	GLP Compliance: Yes††
No Observed Adverse Effect Level: Not determined			Design Similar to ICH 4.1.3: Yes
Treatment	Control	MMAE	
Dose Level (mg/kg/dose)	0	0.2	
Dams			
Toxicokinetics: AUC _{0-last} (µg·day/mL)			
GD 6	NA	0.0162	
GD 13	NA	0.0256	
No. Pregnant	25	24§	
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	1	
Clinical Observations (No. Animals)			
Red/Black Vaginal Discharge (GD 13-21)	0	2	
Pale, entire body (GD 21)	0	1	
Pale, both ears (GD 16-21)	0	5	
Red Fluid in Cage Pan (GD 19-20)	0	2	
Body Weight†	379.4g	92.4%	
<i>Table continued on next page</i>			

Treatment	Control	MMAE
Dose Level (mg/kg/dose)	0	0.2
Food Consumption (g/day)‡	30.5	27.4
Mean No. Corpora Lutea	13.8	14.2
Mean No. Implantation Sites	12.8	12.8
Mean % Preimplantation Loss	6.8	9.3
Hematology (GD20)		
Erythrocytes (E ⁶ /μL)	6.29	4.07
Hemoglobin (g/dL)	12.2	8.4
Hematocrit (%)	34.7	24.5
MCV (fL)	55.2	60.8
MCH (pg)	19.4	20.6
MCHC (g/dL)	35.1	33.9
Platelets (E ³ /μL)	1256	1152
White Blood Cells (E ³ /μL)	10.74	8.68
Neutrophils (E ³ /μL)	3.83	2.27
Lymphocytes (E ³ /μL)	6.26	5.76
Monocytes (E ³ /μL)	0.45	0.48
Eosinophils (E ³ /μL)	0.10	0.03
Basophils (E ³ /μL)	0.02	0.02
Large Unstained Cells (E ³ /μL)	0.09	0.13
Reticulocytes (E ³ /μL)	174.7	555.9
Necropsy Observations		
No remarkable observations (No. Animals)	25	25§
Macroscopic Observations		
Spleen, large	0	2
<i>Table continued on next page</i>		

Treatment	Control	MMAE
Dose Level (mg/kg/dose)	0	0.2
Microscopic Observations		
No. animals examined	3	5
Spleen, Hematopoiesis, Extramedullary, Increased	1	5
Thymus, Depletion, Lymphocytes	0	1
Thymus, Tingible-Body Macrophages, Increased	0	0
Uterus, Placentation Site, Involution/Resorption	0	0
Vagina, Mucification, Pregnancy-Associated	3	5
Bone Marrow, Sternum, Erythroid Hyperplasia	0	0
Bone Marrow, Sternum, Hypercellular	0	2
Litters		
No. Litters Evaluated¶	25	23
Mean No. Live Fetuses Per Litter	12.7	9.6
No. Live Fetuses	317	220
Mean No. Resorptions	0.1	3.3
Mean % Postimplantation Loss	1.0	24.3
Mean Fetal Body Weight (g)	5.63	5.37
Fetal Sex Ratios (M:F)	52:48	45:55
Fetal Anomalies:		
Gross External Anomalies		
External Variation, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.5)
External Variation, Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
Curly Tail, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.5)
Curly Tail, Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
External Malformations, Fetal Incidence (%)	0	3 (1.4)
External Malformations, Litter Incidence (%)	0	3 (13)
<i>Table continued on next page</i>		

Treatment	Control	MMAE
Dose Level (mg/kg/dose)	0	0.2
Protruding Tongue, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.5)
Protruding Tongue, Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
Malrotated Hindlimbs, Fetal Incidence (%)	0	2 (0.9)
Malrotated Hindlimbs, Litter Incidence (%)	0	2 (8.7)
Umbilical Hernia, Fetal Incidence (%)	0	0
Umbilical Hernia, Litter Incidence (%)	0	0
Gastroschisis, Fetal Incidence (%)	0	2 (0.9)
Gastroschisis, Litter Incidence (%)	0	2 (8.7)
Agnathia, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.5)
Agnathia, Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
Visceral Anomalies		
Soft Tissue Variations, Fetal Incidence (%)	1 (0.6)	0
Soft Tissue Variations, Litter Incidence (%)	1 (4.0)	0
Dilation of Lateral Ventricle(s), Fetal Incidence (%)	0	0
Dilation of Lateral Ventricle(s), Litter Incidence (%)	0	0
Absent Innominate Artery, Fetal Incidence (%)	1 (0.6)	0
Absent Innominate Artery, Litter Incidence (%)	1 (4.0)	0
Dilated Ureter(s), Fetal Incidence (%)	0	0
Dilated Ureter(s), Litter Incidence (%)	0	0
Soft Tissue Malformations, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
Soft Tissue Malformations, Litter Incidence (%)	0	1 (4.5)
Situs Inversus, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
Situs Inversus, Litter Incidence (%)	0	1 (4.5)
Testis(es), Reduced Size, Fetal Incidence (%)	0	0
Testis(es), Reduced Size, Litter Incidence (%)	0	0
<i>Table continued on next page</i>		

Treatment	Control	MMAE
Dose Level (mg/kg/dose)	0	0.2
Skeletal Anomalies		
Skeletal Variations, Fetal Incidence (%)	18 (11)	21 (19)
Skeletal Variations, Litter Incidence (%)	11 (44)	12 (52)
Incomplete Ossification of Skull, Fetal Incidence (%)	0	0
Incomplete Ossification of Skull, Litter Incidence (%)	0	0
Bipartite Vertibral Centrum (A), Fetal Incidence (%)	7 (4.3)	8 (7.1)
Bipartite Vertibral Centrum (A), Litter Incidence (%)	5 (20)	6 (26)
Less Than Four Caudal Vertebrae Ossified, Fetal Incidence (%)	0	0
Less Than Four Caudal Vertebrae Ossified, Litter Incidence (%)	0	0
25 Presacral Vertebrae, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
25 Presacral Vertebrae, Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
5th/6th Sternebra(e) Incomplete Ossification, Fetal Incidence (%)	2 (1.2)	3 (2.7)
5th/6th Sternebra(e) Incomplete Ossification, Litter Incidence (%)	2 (8.0)	3 (13)
5th/6th Sternebra(e) Bipartite, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
5th/6th Sternebra(e) Bipartite, Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
Other Sternebra(e) Bipartite, Fetal Incidence (%)	1 (0.6)	0
Other Sternebra(e) Bipartite, Litter Incidence (%)	1 (4.0)	0
5th Sternebra(e) Unossified, Fetal Incidence (%)	2 (1.2)	0
5th Sternebra(e) Unossified, Litter Incidence (%)	1 (4.0)	0
Sternebra(e) Asymmetrically Ossified, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
Sternebra(e) Asymmetrically Ossified, Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
6th Sternebra(e) Unossified, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
6th Sternebra(e) Unossified, Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
Other Sternebra(e) Incomplete Ossification, Fetal Incidence (%)	0	0
Other Sternebra(e) Incomplete Ossification, Litter Incidence (%)	0	0
<i>Table continued on next page</i>		

Treatment	Control	MMAE
Dose Level (mg/kg/dose)	0	0.2
14th Rudimentary Rib(s), Fetal Incidence (%)	8 (5.0)	7 (6.2)
14th Rudimentary Rib(s), Litter Incidence (%)	6 (24)	6 (26)
13th Rudimentary Rib(s), Fetal Incidence (%)	1 (0.6)	1 (0.9)
13th Rudimentary Rib(s), Litter Incidence (%)	1 (4.0)	1 (4.3)
Wavy/Bent Rib(s), Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
Wavy/Bent Rib(s), Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
Incomplete Ossification of Rib(s), Fetal Incidence (%)	0	0
Incomplete Ossification of Rib(s), Litter Incidence (%)	0	0
Less Than Four Metatarsals Ossified, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
Less Than Four Metatarsals Ossified, Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
Skeletal Malformations, Fetal Incidence (%)	0	2 (1.8)
Skeletal Malformations, Litter Incidence (%)	0	2 (8.7)
Mandible(s) Malformed, Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
Mandible(s) Malformed, Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
Misaligned, Fused, and/or Absent Caudal Vertebra(e), Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
Misaligned, Fused, and/or Absent Caudal Vertebra(e), Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
Split Sternebra(e), Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
Split Sternebra(e), Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)
Shortened Long Bone(s), Fetal Incidence (%)	0	1 (0.9)
Shortened Long Bone(s), Litter Incidence (%)	0	1 (4.3)

ADC: antibody-drug conjugate; GD: gestational day; GLP: Good Laboratory Practice; ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV: mean corpuscular volume; MMAE: monomethyl auristatin E (also known as SGD-1010); NA: not applicable (or insufficient number of fetuses to determine parameters); USP: United States Pharmacopeia.

† Evaluated at GD 21 at scheduled caesarean section. For control, group mean is shown. For treated groups, percent differences from control are shown.

‡ Evaluated at GD 4-21.

§ Planned for 25 dams; 1 female was not pregnant. Clinical and examination at necropsy (gross and microscopic) were performed.

¶ Number of litters with viable fetuses

†† Stability testing and test article characterization were not conducted under GLP.

2.6.7.13.2 エンホルツマブ ベドチンの胚・胎児発生に関する試験

被験物質：エンホルツマブ ベドチン

Report Title: A Preliminary Embryo-Fetal Development Study of Enfortumab Vedotin by Intravenous Injection in Rats			
Design similar to ICH 4.1.3: Yes	Duration of Dosing: Day 6 and 13 of gestation (GD 6 and 13)	Study No. 20119695	CTD No.: 4.2.3.5.2-2
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	Day of Mating: GD 0		
Initial Age: 59 to 73 days of age	Day of Caesarean Section: GD 21		
Date of First Dose: 2011-01-20	Method of Administration: Intravenous bolus	GLP Compliance: Yes¶	
Special Features: None	Vehicle/Formulation: 5% (w/v) sterile dextrose solution		
No Observed Adverse Effect Level:			
F ₀ Females: Not determined			
F ₁ Litters: Not determined			
Dose Level (mg/kg/dose)	0 (Control)	2.0	5.0
Noteworthy Findings			
Dams			
No. Pregnant	6	6	5
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	5
ADC C_{max} (µg/mL)§§	-	28.6	82.1
Clinical Observations	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-
Body Weight on GD 21(%)†	384.7g	-8.6	-29.7**
Food Consumption from GD 6 to 21 (%)†	24.7 g/day	-4.0	-8.7‡
Mean No. Corpora Lutea	15.3	14.0	20.8
Mean No. Implantations	13.3	12.7	15.6
Mean % Preimplantation Loss	10.13	9.08	20.34
Litters			
No. Litters Evaluated‡‡‡	6	6	0§
Mean No. Live Fetuses	12.3	9.2	0#
Mean No. Resorptions	1.0	3.5	15.6#
No. Dead Fetuses	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	7.23	26.38	100.00#
<i>Table continued on next page</i>			

Dose Level (mg/kg/dose)	0 (Control)	2.0	5.0
Litters, continued			
No. Litters Evaluated ^{††}	6	6	0
No. Fetuses Evaluated	74	55	0
Mean Fetal Body Weight (g)	5.698	5.118\$	NA
Fetal Sex Ratios (% males) ^{††}	41.20	50.08	NA
Fetal Abnormalities			
Gross External, No. Fetuses (%)	-	1 (1.8)	NA
Visceral Abnormalities, No. Fetuses (%)	1 (2.8)	1 (3.8)	NA
Skeletal Abnormalities, No. Fetuses (%)	-	1 (3.4)	NA
Skeletal Variations			
Asymmetric Sternebrae			
No. Fetuses (%)	0	3 (10.3)	NA
No. Litters (%)	0	3 (50.0)	NA
Fused Sternebrae			
No. Fetuses (%)	0	2 (6.9)	NA
No. Litters (%)	0	2 (33.3)	NA
Incomplete Ossification of Sternebrae			
No. Fetuses (%)	0	5 (17.2)	NA
No. Litters (%)	0	5 (83.3)&	NA
Misshapen Sternebrae			
No. Fetuses (%)	1 (2.6)	3 (10.3)	NA
No. Litters (%)	1 (16.7)	2 (33.3)	NA
Misshapen Cervical Arch			
No. Fetuses (%)	0	2 (6.9)	NA
No. Litters (%)	0	2 (33.3)	NA
Unilateral Ossification of Thoracic Centra			
No. Fetuses (%)	0	3 (10.3)	NA
No. Litters (%)	0	3 (50.0)	NA
Total Affected Litters (Fetuses)	2 (3)	6 (10)	NA

-: No noteworthy findings

ADC: antibody-drug conjugate; GD: gestational day; GLP: Good Laboratory Practice; NA: not applicable.

Dunnett's Test *: P < 0.05, **: P < 0.01; Dunn's Test #: P < 0.01; Wilcoxon Test \$: P < 0.05; Fisher's Exact 2-Sided Test &: P < 0.05

¶ Test article characterization and/or stability testing were not conducted under GLP.

Footnotes continued on next page

† After 2 weeks from first dosing. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual weights (not on the percent differences).

‡ Group excluded from statistical analysis because $n < 3$

§ Number of Litters Examined is defined as only animals euthanized on schedule with at least 1 live fetus for that examination, thus due to no viable fetuses, 0 litters

§§ ADC concentrations determined at 10 minutes following the second dose (GD13)

‡‡ Includes all animals scheduled to be euthanized and at least 1 live fetus for all examinations.

†† Calculated based on litter means/values.

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

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

2.6.7.15 新生児を用いた試験

新生児の毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.16 局所刺激性試験

被験物質：エンホルツマブ ベドチン及び AGS-22M6E

Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. Per Group	Noteworthy Findings	CTD No. (Study No.)
Sprague-Dawley rat	iv bolus	0, 0.5, 2, and 5	M:10 F:10	Injection site findings were limited predominantly to minimal abnormal mitotic figures and single cell necrosis of the epidermis and/or adnexa including hair follicles and sebaceous glands at ≥ 0.5 mg/kg/dose. Moderate necrosis of the subcutaneous tissue and regionally extensive area of epidermis, with ulceration, was limited to a single female animal at the 2 mg/kg/dose level and considered possibly associated with extravasated test material during injection due to the lack of similar findings at higher dose levels.	4.2.3.2-3 (20117437)
Cynomolgus monkey	iv infusion	0, 3	M:5† F:5†	Injection sites of some animals dosed with enfortumab vedotin had minimal or mild diffuse acanthosis, mild perivascular mononuclear inflammatory cell infiltrates and minimal fibrosis. These changes indicate a slightly increased inflammatory response at injection sites in animals dosed with AGS-22M6E and enfortumab vedotin, compared to the procedure-related inflammatory changes noted in controls.	4.2.3.2-5 (20021751)

Local tolerance was evaluated as part of the GLP studies.

M: male; F: female

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

† Number of animals includes main and study animals euthanized on day 29 and recovery animals euthanized on day 71.

2.6.7.17 その他の毒性試験

被験物質：エンホルツマブ ベドチン， AGS-22M6E 及び MMAE

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	CTD No. (Study No.)
Sprague-Dawley rat	iv bolus	4 weeks (q1w)	0, 2	M:5	<p>A 24-week recovery study was conducted (GLP) to determine the recovery of testicular toxicity of enfortumab vedotin, when given by intravenous bolus injection once weekly for a total of 4 doses (on study days 1, 8, 15 and 22) to Sprague Dawley rats.</p> <p>Enfortumab vedotin-related decreased testis and epididymis weights were noted from day 29 through day 127, and resolved by the end of the recovery period on day 190. Enfortumab vedotin-related microscopic findings were noted in the testes (spermatid/spermatocyte depletion and/or vacuolation of the seminiferous tubules) and epididymis (cell debris) on day 29 and on recovery days 64, 127 and 190 but had decreased incidence by the end of the recovery period. Therefore, it was concluded that the testicular toxicity associated with enfortumab vedotin was partially reversible.</p>	4.2.3.7.7-1 (20135474)
<i>Table continued on next page</i>						

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	CTD No. (Study No.)
Human islets and skeletal muscle cells	NA	4 and 12 hour incubation periods	0.01 – 100 ng/mL MMAE 0.01 – 100 µg/mL MMAE ADC†	2 donors (human islets) and human skeletal muscle cells	Neither h00-1006(4) nor MMAE inhibited glucose uptake by skeletal muscle cells at the relevant in vivo concentrations tested. There was no change in human islet cell viability after a 4-hour exposure to either test article at these same concentrations. There was no biologically relevant change in the amount of insulin secreted from islets at 4 hours in response to h00- 1006(4) at any concentration tested. When exposed to h00-1006(4) at low or high glucose, there was a non-concentration-dependent slight decline in islet viability at 12 hours but not at 4 hours; due to the lack of dose response, these changes are of uncertain relationship to h00-1006(4). While most changes from treatment with MMAE occurred at concentrations that were not biologically relevant, MMAE did cause changes in islet cell viability in high glucose conditions. However, these data do not demonstrate a relationship of enfortumab vedotin contributing to the onset of hyperglycemia.	4.2.3.7.7-2 (参) (022-076622)
Tissue cross reactivity of AGS-22M6E with cynomolgus tissues	Tissue titration- Frozen tissue	NA	AGS-22M6E-biotin at 3, 10, or 30 µg/mL	5 donors	Positive immunostaining was localized in the epithelium of the skin, esophagus and tonsil.	4.2.3.7.7-3 (参) (ES-002)

Table continued on next page

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	CTD No. (Study No.)
Immunohistochemical evaluation of Nectin-4 expression in normal human tissues	Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue	NA	Mouse anti-human Nectin-4 M22-244b3.1.1.1 at 7.5 µg/mL	Tissue microarray‡	Using the mouse anti-human Nectin-4 monoclonal antibody M22-244b3.1.1.1, specific positive staining for Nectin-4 was identified in the major types of constitutive cells of the bladder, breast, esophagus, larynx, pituitary gland, placenta, salivary gland, skin, stomach, testis, ureter and uterus. Specific positive staining was also seen in a minor population of cells of the kidney, liver, lung, pancreas, prostate, thymus and tonsil. The staining of the mucosal glands of the other gastrointestinal tract organs, including small intestine, colon and rectum, were mostly weak.	4.2.3.7.7-4 (参) (ES-001)
Tissue cross reactivity of AGS-22M6E with human tissues	Tissue titration-Frozen tissue	NA	AGS-22M6E-biotin at 2.5, 5, and 10 µg/mL	3 donors	In a GLP TCR study, positive immunoreactivity was observed in the eye (corneal epithelium), esophagus (surface layers of epithelium), placenta (syncytiotrophoblast), skin (surface epithelium and luminal aspects of hair follicles and occasional glands), tonsil (squamous epithelium), uterus (surface layers of squamous epithelium).	4.2.3.7.7-5 (8236219)
Photosafety: molar extinction coefficient determination	In vitro	NA	NA	NA	MMAE has no absorption in the range of 290-700 nm, and vcMMAE (MMAE with valine-citrulline linker) and N-acetylcysteine-vcMMAE did not meet the criteria for phototoxicity testing as defined in ICH S10 and therefore is not considered to present a direct risk for phototoxicity.	4.2.3.7.7-6 (参) (TRN-2926-A)

ADC: antibody-drug conjugate; AGS-22M6E: hybridoma derived fully human monoclonal antibody conjugated to cytotoxic agent monomethyl auristatin E targeting Nectin-4; ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; TCR: tissue crossreactivity; vc: valine-citrulline.

† MMAE ADC=h00-1006(4), a non-binding ADC conjugated with the same linker and payload (MMAE) as enfortumab vedotin.

‡ Three tissue microarrays were used representing 36 human tissues.