サシツズマブ　ゴビテカン（遺伝子組換え）

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁

略号一覧表 4
1　緒言 5

図目次

頁
図 1　SG の化学構造.....5

略号一覧表

略号	英語	日本語
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
SG	sacituzumab govitecan	サシツズマブ　ゴビテカン
mTNBC	metastatic triple-negative breast cancer	転移・再発トリプルネガティブ乳癌
TNBC	triple-negative breast cancer	トリプルネガティブ乳癌
Trop-2	trophoblast cell surface antigen 2	-

1　緒言

開発コード：本申請に係る薬剤は、Immunomedics 社の開発コード IMMU-132 として識別される一方、hRS7-CL2A-SN-38、hRS7-CL2A-SN38、hRS7-SN-38 又は hRS7-SN38 としても知られており、米国一般名称／国際一般名称（USAN/INN）は sacituzumab govitecan（サシツズマブ　ゴビテカン：以下、SG と表記）とされている。

SG は、Trophoblast cell surface antigen 2（Trop-2）標的抗体とトポイソメラーゼ阻害剤の複合体で、以下の 3 つの構成成分から成る。

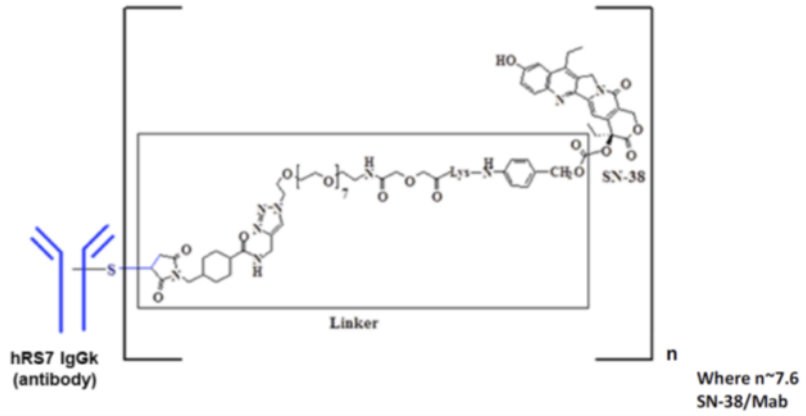
(1) Trop-2 に結合するヒト化モノクローナル抗体 hRS7 IgG1κ（サシツズマブ）

(2) トポイソメラーゼ I 阻害剤である SN-38

(3) ヒト化モノクローナル抗体と SN-38 を結合する加水分解性リンカー（CL2A）

遺伝子組換えモノクローナル抗体は哺乳類（マウス骨髄腫）細胞により産生され、低分子成分の SN-38 及び CL2A は化学合成品である。SG は、抗体 1 分子当たり平均 7～8 分子の SN-38 を含有しており、分子量は約 160 kDa である。SG の化学構造を以下に示す（図 1）。

図 1　SG の化学構造



製剤処方：注射用 SG は、無菌、保存料無添加の、微黄白色～帯黄色の凍結乾燥粉末で、50 mL の透明ガラス製単回投与用バイアルに、ゴム栓付きアルミニウム製フリップオフキャップで圧着密封されている。

本剤の単回投与用バイアルは、SG 200 mg、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES) 79.6 mg、ポリソルベート 80 2 mg 及びトレハロース水和物 189.2 mg を含有している。

申請効能・効果及び用法・用量：本剤の申請効能又は効果は、「化学療法歴のあるホルモン受容体陰性かつ HER2 陰性の手術不能又は再発乳癌」、また、本剤の申請用法及び用量は、「通常、成人には、サシツズマブ　ゴビテカン（遺伝子組換え）として 1 回 10 mg/kg（体重）を、21 日間を 1 サイクルとし、各サイクルの 1 日目及び 8 日目に点滴静注する。投与時間は 3 時間とし、初回投与の忍容性が良好であれば、2 回目以降は 1～2 時間に短縮できる。なお、患者の状態により適宜

減量する。」である。

サシツズマブ　ゴビテカン（遺伝子組換え）

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁

略号一覧表 6
1　まとめ 7
2　効力を裏付ける試験 9
2.1　In vitro 細胞毒性及び SG を介した二本鎖 DNA 損傷（RR ■-■-■; Cardillo, T. M., et al., 2011[5]） 9
2.1.1　標準的 in vitro 細胞毒性試験及び各種ヒト腫瘍細胞株における in vitro 細胞毒性評価 9
2.1.2　Trop-2 陽性 TNBC 細胞株における SG を介した dsDNA 損傷（Goldenberg, D. M., et al., 2015[7]） 11
2.2　SG 及び hRS7 IgG の結合特性（RR ■-■-■; RR ■-■-■） 12
2.2.1　SG 及び hRS7 IgG の組換えヒト FcRn に対する結合性 12
2.2.2　SG 及び hRS7 IgG の組換えヒト Trop-2 に対する結合性 12
2.3　抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性（Cardillo, T. M., et al., 2015[6]; TR-PD-IMMU-132-■-017） 12
2.3.1　SG を介した ADCC 活性（Cardillo, T. M., et al., 2015[6]） 13
2.3.2　第 1/2 相臨床試験用製剤と第 3 相臨床試験用製剤による ADCC 活性の比較（TR-PD-IMMU-132-■-017） 14
2.4　第 1/2 相臨床試験用製剤と第 3 相臨床試験用製剤による補体依存性細胞傷害(CDC)活性の比較 15
2.5　各種ヒト癌細胞株及び腫瘍異種移植部位における Trop-2 の発現状況（Cardillo, T. M., et al. 2015[6]; Goldenberg, D. M., et al., 2015[7]） 15
2.5.1　FACS 分析による Trop-2 発現の解析（Cardillo, T. M., et al., 2015[6]; Goldenberg, D. M., et al., 2015[7]） 16
2.5.2　様々なヒト癌の異種移植部位における Trop-2 の発現状況（Cardillo, T. M., et al., 2015[6]） 17
2.6　各種ヒト癌細胞株と腫瘍異種移植部位における Trop-2 の発現状況(Cardillo, T. M., et al., 2011[5]; Cardillo, T. M., et al., 2015[6]; Goldenberg, D. M., et al., 2015[7]; RR ■■■■-281） 18
2.6.1　各種ヒト腫瘍異種移植における有効性（Cardillo, T. M., et al., 2011[5]） 19
2.6.2　臨床投与スキームにおける抗腫瘍効果（Cardillo, T. M., et al., 2015[6]） 23
2.6.3　TNBC モデルにおける第 1/2 相臨床試験用製剤と第 3 相臨床試験用製剤の有効性の比較（120415-337） 25
2.7　組織交差反応性 27
2.7.1　マウス、ラット及びカニクイザル Trop-2 に対する hRS7 の交差反応性（RR ■-■-■, RR ■-■■■-20■, and RR ■-■■■ 20■） 27
2.7.2　hRS7 IgG-ビオチンの正常カニクイザル組織との交差反応性試験（IM1735） 28
2.7.3　hRS7 の正常ヒト組織との交差反応性試験（DMP 04_11） 29

3　副次的薬理試験 30
4　安全性薬理試験 32
5　薬力学的薬物相互作用 33
6　考察及び結論 34
7　参考文献 35

表目次

頁
表 1　SG の薬理試験の一覧.....7
表 2　Trop-2 の発現と各種細胞株に対する感受性.....11
表 3　ホスホ-H2AX（抗ヒストン）染色細胞を用いたフローサイトメトリーによる SG の抗腫瘍活性の in vitro での特異性の検討[a].....11
表 4　固形腫瘍における hRS7 IgG を介した ADCC の概要.....14
表 5　FACS 分析による各種固形腫瘍細胞株における細胞表面 Trop-2 発現数.....16

図目次

頁
図 1　PC-3 ヒト前立腺癌細胞株に対する細胞毒性 10
図 2　SG（IMMU-132）の ADCC 活性 13
図 3　各種ヒト腫瘍異種移植部位における Trop-2 の発現状況 18
図 4　ヌードマウスに皮下移植した 5 種類のヒト上皮性癌細胞株に対する hRS7-SN-38 ADC の治療効果 20
図 5　ヒト胃癌を異種移植した担癌マウスにおける SG（IMMU-132）の有効性 22
図 6　TNBC 異種移植モデルにおける SG（IMMU-132）の治療効果 23
図 7　膵癌及び胃癌細胞を異種移植した担癌マウスにおける IMMU-132 の種々の投与スキーム 24
図 8　ヒト TNBC 細胞（HCC1806）を異種移植した担癌マウスにおける サシツマブゴビテカン（IMMU-132）の同等性／同質性（N = 9～10） 26
図 9　SG（IMMU-132）の第 1/2 相臨床試験用製剤又は第 3 相臨床試験用製剤を投与した 担癌マウスにおける生存曲線 27
図 10　hRS7 IgG とインキュベートした種々の細胞株の増殖阻害曲線 （リンカーを添加した場合と添加しない場合の比較） 31

略号一覧表

略号	英語	日本語
ADC	antibody drug conjugate	抗体薬物複合体
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害性
AUC	area under the curve	曲線下面積
BSA	bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害性
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
dsDNA	double strand DNA	二本鎖 DNA
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
FACS	fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化セルソーティング
FcRn	neonatal Fc receptor	新生児 Fc 受容体
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
hRS7	humanized anti-Trop-2 monoclonal antibody	ヒト化抗 Trop-2 モノクローナル抗体
ICH	International Council for Harmonisation (of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)	医薬品規制調和国際会議
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学
LDH	lactate dehydrogenease	乳酸脱水素酵素
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetraxolium	3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム
NEM	N-ethylmaleimide	N-エチルマレイミド
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核エフェクター細胞
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝液
PE	phycoerythrin	フィコエリスリン
SG	sacituzumab govitecan	サシツズマブ　ゴビテカン
TNBC	triple-negative breast cancer	トリプルネガティブ乳癌
Trop-2	trophoblast cell surface antigen 2	-
TTP	time to progression	無増悪期間
TV	tumor volume	腫瘍体積
UGT1A1	uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1a1	UDP グルクロン酸転移酵素 1A1

1　まとめ

本申請に係る薬剤は、サシツズマブ　ゴビテカン（以下 SG 又は IMMU-132、hRS7-CL2A-SN-38、hRS7-CL2A-SN38、hRS7-SN-38、hRS7-SN38 と表記）であり、trophoblast cell surface antigen 2（Trop-2）を標的とする抗体とトポイソメラーゼ阻害剤の複合体である。ヒト化モノクローナル抗体である hRS7 IgG1κ（サシツズマブ）は、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）を含む多くの種類の上皮癌で過剰発現している Trop-2 に結合する。低分子薬である SN-38 は、トポイソメラーゼ I 阻害剤であり、加水分解可能なリンカー（CL2A）により、抗体と共有結合している。SG は抗体 1 分子当たり平均 7～8 分子の SN-38 を含有しており、分子量は約 160 kDa である。

SG は、Trop-2 を発現する癌細胞に結合して細胞内に取り込まれ、リンカーの加水分解により SN-38 が放出されることで抗腫瘍作用を発揮する。SN-38 は、トポイソメラーゼ I と相互に作用し、トポイソメラーゼ I による一本鎖切断の再ライゲーションを阻害する。その結果生じる DNA 損傷は、アポトーシスと細胞死につながる。SG から放出された遊離 SN-38 は、膜透過性により腫瘍微小環境中の近傍の癌細胞に拡散し、Trop-2 陰性腫瘍細胞の細胞死を誘発する [1,2,3,4]。

SG の薬理試験は、SG の作用機序の解明と抗腫瘍活性の評価を目的として実施した。SG の薬理試験では、in vitro 細胞毒性、トポイソメラーゼ阻害、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）、補体依存性細胞傷害性（CDC）、ヒト新生児 Fc 受容体（FcRn）結合並びに種交差反応性及び特異性を評価するための複数の動物種における Trop-2 との結合について評価した。ヌードマウス-ヒト癌異種移植モデルにおける in vivo 活性を、種々のヒト癌細胞株を用いて評価し、オリジナルクローン hRS7（[redacted]）と市販用製剤 hRS7 クローン（[redacted]）の同等性／同質性についても検討した [5,6]。Ex vivo での Trop-2 発現を、ヒト上皮癌のパネル及びヒト癌細胞株で評価した。さらに、正常組織における Trop-2 発現をより明確にし、ヒトと毒性学的外挿性を有するカニクイザルとの違いを明らかにするために、正常なヒト及びサル組織のパネルを用いて医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠した組織交差反応性試験を行い、hRS7 の結合性を評価した。安全性薬理に関する評価項目は、GLP に適合した反復投与による亜急性及び慢性毒性試験で評価した。

薬理試験の一覧を表 1 に示す。

表 1　SG の薬理試験の一覧

試験の種類	**試験番号**
効力を裏付ける試験	
hRS7-CL2A-SN-38のin vitro力価アッセイ開発：結合と細胞毒性	Research Report (RR) [redacted]
表面プラズモン共鳴（BIACORE）分析によるhRS7 IgG及びhRS7-CL2A-SN-38の組換えヒトTrop-2/TACSTD2（rhTrop-2/TACSTD2）への結合性の比較	Research Report (RR) [redacted]
表面プラズモン共鳴（BIACORE）分析によるhRS7 IgG及びhRS7-CL2A-SN-38のヒト新生児受容体（FcRn）への結合性の比較	Research Report (RR) [redacted]
2種類の異なるクローンに由来するhRS7抗体（hRS7-[redacted]及びhRS7-[redacted]）とそれに対応する抗体薬物複合体（IMMU-132-[redacted]及びIMMU-132-[redacted]）の抗体依存性細胞傷害性（ADCC）の同等性／同質性	TR-PD-IMMU-132-[redacted]-017

試験の種類	試験番号
2種類の異なるクローンに由来するhRS7抗体（hRS7-[redacted]及びhRS7-[redacted]）とそれに対応する抗体薬物複合体（IMMU-132-[redacted]及びIMMU-132-[redacted]）の補体依存性細胞傷害性（CDC）の同等性／同質性	TR-PD-IMMU-132-[redacted]-018
ヒトトリプルネガティブ乳癌(TNBC)（MDA-MB-468）を異種移植した担癌マウスにおけるTrop-2抗体薬物複合体（IMMU-132）の治療効果	[redacted]-281
オリジナルクローンhRS7（[redacted]）又は新規クローン（[redacted]）から作製されたIMMU-132のヒトTNBCを異種移植した担癌マウス（HCC1806）における同等性／同質性	120415-337
マウスTrop-2に対するhRS7 IgGの交差反応性	Research Report (RR) [redacted]
ラットTrop-2に対するhRS7 IgGの交差反応性	Research Report (RR) [redacted]-20[redacted]
カニクイザルTrop-2に対するhRS7 IgG及びサシツズマブ　ゴビテカンの交差反応性	(RR) [redacted]-20[redacted]
hRS7 IgGビオチンの正常カニクイザル組織との交差反応性試験	IM1735
hRS7の正常ヒト組織との交差反応性試験	DMP 04_11
副次的薬理試験	
腎細胞癌（ACHN、CAL-54、Caki-2、A-704）、結腸直腸腺癌（HT-29）及び乳腺癌（MDA-MB-468）に対する抗CEACAM6（hMN15）及び抗Trop-2（hRS7）モノクローナル抗体のin vitro増殖阻害	Research Report (RR) [redacted]
安全性薬理試験	
安全性薬理評価、カニクイザルにおける毒性試験（GLP適合、CTD 2.6.6）の一部として実施した。	

重要な点は、SG は、ヒト TNBC 細胞を異種移植した担癌ヌードマウスで有意な腫瘍退縮を誘導したことである。対照 ADC に反応しなかった 1.0 cm^3 超の大きな腫瘍を有するマウスにおいても、SG 投与により有意な腫瘍退縮が認められた [7]。

副次的薬理試験として、非結合 hRS7 抗体が複数の癌細胞株に対して in vitro で細胞毒性を示すか否かを評価したところ、hRS7 は、in vitro 試験ではいずれの細胞株に対しても増殖阻害を示さなかった。また、リンカーを添加しても、これらの細胞に対する増殖阻害は認められなかった。

ICH S9 に準拠し、GLP に適合したカニクイザルの反復投与毒性試験において、安全性薬理学的指標として一般状態、体温、呼吸数、心電図、心拍数及び血圧を評価した。これらの評価において、SG のヒトでの使用に懸念が生じるような所見は認められなかった。

なお、本モジュールでは、hRS7 は hRS7 抗体、hRS7 IgG 又は hRS7 IgG1κ とも、SN-38 は SN38 とも表記した。

2　効力を裏付ける試験

SG の薬力学的特性を種々の側面から検討した。まず、ヒト FcRn 受容体又はヒト遺伝子組換え Trop-2 受容体に対する SG の結合性を表面プラズモン共鳴分析（BIACORE）により確認した。また、結合ドメインである Trop-2 の発現を種々の癌細胞株で調べ、SG に対する感受性を明らかにした。さらに、Trop-2 発現細胞に対する SG の細胞毒性を検討した。一部の試験では、比較対照として Trop-2 低発現細胞を用いた。加えて、Trop-2 発現細胞における SG の ADCC 及び CDC 活性を評価した。

種々のマウス異種移植モデルを用い、SG の in vivo での有効性を明らかにした。これらの試験の 1 つでは、異なる 2 つの製剤の SG の同等性／同質性を評価した。

最後に、ヒトとカニクイザルの組織標準パネルを用い、マウス hRS7 抗体又は ADC である SG の組織交差反応性を評価した。

2.1　In vitro 細胞毒性及び SG を介した二本鎖 DNA 損傷（RR [redacted]; Cardillo, T. M., et al., 2011[5]）

SG の細胞毒性を、96 時間の増殖阻害試験並びに Trop-2 陽性及び陰性の TNBC 細胞株における SG を介した二本鎖 DNA（dsDNA）切断試験の in vitro の 2 試験によって評価した。

2.1.1　標準的 in vitro 細胞毒性試験及び各種ヒト腫瘍細胞株における in vitro 細胞毒性評価

増殖阻害について、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム色素還元アッセイ（MTS 色素還元アッセイ）を用いて測定した。細胞を 96 ウェルの透明平底プレートに入れ、一晩培養した。ジメチルスルホキシドに溶解した遊離 SN-38 及び培地で再構成した免疫複合体を培地で希釈し、ウェル内の最終濃度を 0.004～250 nmol/L とした。プレートをインキュベーター内で 37℃/5% CO_2 で 96 時間インキュベートした後、MTS 色素を添加してインキュベーターに戻し、無処理の対照細胞の吸光度が 1.0 以上になるまで 30 分ごとにプレートリーダーで吸光度を記録した。増殖阻害は、無処理細胞を対照とした増殖率で求めた。用量反応曲線は 3 回の測定値の平均値で作成し、EC_{50} 値は [redacted] ソフトウェアを使用して算出した。非結合 hRS7 IgG 及び別の非標的抗体（hMN-14 IgG）を陰性対照とした。

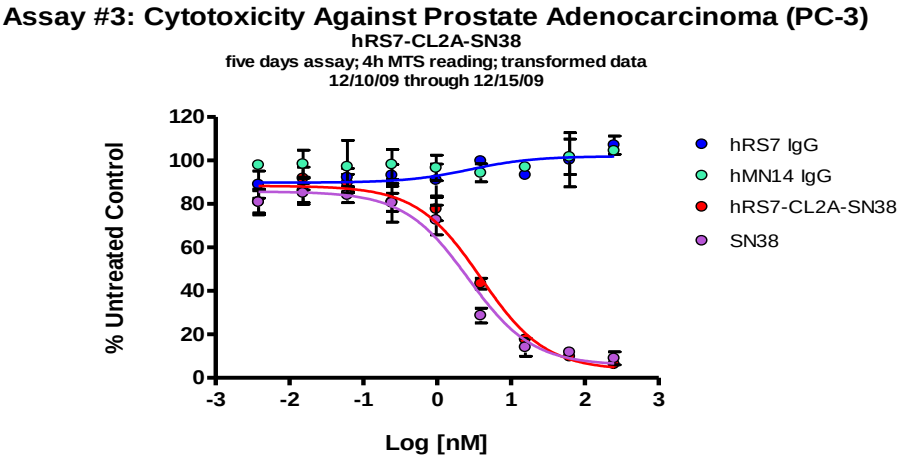
PC-3 細胞を用いた細胞毒性試験を本剤の標準力価試験とするため、先ず、PC-3 前立腺癌細胞株に対する SG の細胞毒性を複数回検討した（CTD 4.2.1.1.12、RR [redacted]）。

対照として遊離 SN-38 を用いた場合、5 回のアッセイにおける SG の EC_{50} は 4.328 ± 0.0744 nmol/L（SN-38 含量として）であった。遊離 SN-38 は細胞膜を容易に透過できるのに対し、複合体型 SN-38 は主に抗原結合を介して内在化される必要があるということから予想されるように、複合体の細胞毒性は、遊離 SN-38 ほど強くなかった（3 回のアッセイの平均 EC_{50} = 1.882 ± 0.657 nmol/L）。しかしながら、4 日間にわたる MTS アッセイの過程で、IgG から SN-38 が徐々に放出されることも確認された。したがって、この複合体の細胞毒性は、抗原結合を介して細胞に送達された SN-38 と、時間の経過とともに複合体から放出された SN-38 とによ

るものを反映したものと言える。事実、複合体の半減期は約 1 日であり、4 日以内に SN-38 の 94%が内在化されていない複合体から培地に放出されている。

グラフ（EC_{50} 曲線）の一例を図 1 に示す。

図 1　PC-3 ヒト前立腺癌細胞株に対する細胞毒性



	EC50(nM)	R^2	95%C.I. EC50 (nM)
hRS7-CL2A-SN38	3.915	0.97	2.785 to 5.504
SN38	2.638	0.96	1.700 to 4.093

SG の in vitro 細胞毒性を、代表的な上皮性腫瘍である PC-3（前立腺癌）、Calu-3（非小細胞肺癌）、COLO 205（結腸癌）、Capan-1（膵癌）、SK-MES-1（肺扁平上皮癌）、BxPC-3（膵癌）の 6 種類の細胞株を用いて評価した（表 2）。IC_{50} 値は 1.95～23.14 nmol/L の範囲であった [5]。また、非結合 hRS7 抗体には in vitro の細胞毒性がないことも確認された（CTD 4.2.1.2.1、RR-[redacted]、副次的薬理試験の項参照）。

力価試験に用いる PC-3 前立腺癌細胞株に対する細胞毒性の評価に加えて、他の複数の上皮癌細胞株に対する細胞毒性についても測定した [5]。表 2 に、非結合 hRS7 IgG を用いてフローサイトメトリーで測定した種々の細胞株における Trop-2 の相対的発現、並びに非複合体 SN-38 及び SG の細胞毒性の結果を示す。ADC/遊離 SN-38 比は、複合体 SN-38 と比較した遊離 SN-38 の活性の強さを示す指標である。この比率は、Trop-2 のレベルが低下するにつれて増加する。これは、より多くの抗原が存在する場合、複合体が結合して内在化される能力が高まる可能性があることと一致している。ただし、複合体の活性は抗原量と直接相関しないことから、これは、個々の細胞株による SN-38 に対する感受性の違いを反映している可能性が高い。

表 2　Trop-2 の発現と各種細胞株に対する感受性

	Trop-2 Expression		Cytotoxicity Results				
Cell Line	**Median Fluorescence (Background)**	**Percent Positive**	**SN-38 IC_{50} (nM)**	**95% C.I. IC_{50} (nM)**	**hRS7-SN−38* IC_{50} (nM)**	**95% C.I. IC_{50} (nM)**	**ADC/Free SN-38 Ratio**
Calu-3	282.2 (4.7)	99.6%	7.19	5.77 - 8.95	9.97	8.12 - 12.25	1.39
COLO 205	141.5 (4.5)	99.5%	1.02	0.66 - 1.57	1.95	1.26 - 3.01	1.91
Capan-1	100.0 (5.0)	94.2%	3.50	2.17 - 5.65	6.99	5.02 - 9.72	2.00
PC-3	46.2 (5.5)	73.6%	1.86	1.16 - 2.99	4.24	2.99 - 6.01	2.28
SK-MES-1	44.0 (3.5)	91.2%	8.61	6.30 - 11.76	23.14	17.98 - 29.78	2.69
BxPC-3	26.4 (3.1)	98.3%	1.44	1.04 - 2.00	4.03	3.25 - 4.98	2.80
*IC_{50}-value is shown as SN-38 equivalents of sacituzumab govitecan							

2.1.2　Trop-2 陽性 TNBC 細胞株における SG を介した dsDNA 損傷（Goldenberg, D. M., et al., 2015[7]）

Trop-2 陽性（HCC1806）及び Trop-2 陰性（HCC1395）の 2 種類の TNBC 細胞株を用いて、SG の特異性を in vitro で明らかにした。HCC1806 又は HCC1395 を、6 ウェルプレートに播種し、一晩インキュベートした。翌日、プレートを 10 分間氷冷した。続いて、SG、非標的対照 ADC（hA20-CL2A-SN-38）又は hRS7 IgG を最終濃度 20 μg/mL で、30 分間氷冷下でインキュベートし、新鮮培地で 3 回洗浄し、37℃に戻して一晩インキュベートを継続した。翌朝、細胞を短時間トリプシン処理し、スピンダウン後、生死判別試薬（Fixable Viability Stain 450）で染色し、1% BSA-PBS で洗浄後、4%ホルマリンで 15 分間固定、再度洗浄した後、さらに 15 分間 0.15% Triton X-100 含有 PBS で透過処理した。1%BSA-PBS で 2 回洗浄した後、細胞をマウス抗 γH2AXAF488 と 4℃で 45 分間インキュベートした。γH2AX のシグナル強度は、BD FACSCanto を用いたフローサイトメトリーで測定した[7]。

表 3 に示すように、30 分間のインキュベーションは、標的細胞に十分な SN-38 送達するのに十分な時間であり、Trop-2 陰性細胞と比較して Trop-2 陽性細胞株の dsDNA 切断が大幅に増加した。

表 3　ホスホ-H2AX（抗ヒストン）染色細胞を用いたフローサイトメトリーによる SG の抗腫瘍活性の in vitro での特異性の検討 [a]

	Median fluorescence intensity	
Treatment	**HCC1806(Trop-2^{pos})**	**HCC1395(Trop-2^{neg})**
Cells alone	4	6
Cells + anti-γH2AX-AF488	168	122
Cells + hA20-SN38 + anti-γH2AX-AF488	167	123
Cells + sacituzumab govitecan + anti-γH2AX-AF488	546	123

[a] The median fluorescence intensity (MFI) is given for (a) background staining of the cells alone (no anti-histone antibody), (b) the background level of dsDNA breaks for the cells that had no prior exposure to the conjugates, and (c) after exposed to IMMU-132 or hA20-SN-38 conjugates.

2.2　SG 及び hRS7 IgG の結合特性（RR [redacted]; RR [redacted]）

SG 及び hRS7 IgG のヒト FcRn 及びヒト Trop-2 に対する結合特性を、表面プラズモン共鳴分析（BIACORE）により検討した[8, 9]。低密度バイオセンサーチップを用い、各チップ上の各薬剤について 5 種類の濃度（400～25 nmol/L）で 3 回の独立した結合測定を行った。解析は 1:1 (Langmuir) Binding Model and Fit で行い、各サンプル測定の 5 つの濃度ポイントすべてを用いて、最適なフィット（最低のχ^2値）を決定した。K_D 値は、$K_D = k_d1/k_a1$ の式で算出した。なお、k_d1 は解離速度定数、k_a1 は会合速度定数である。

2.2.1　SG 及び hRS7 IgG の組換えヒト FcRn に対する結合性

組換えヒト FcRn 低密度チップ（密度＝1302 RU）では、hRS7 及び SG との結合性を比較した結果、両者に有意な差は認められなかった（CTD 4.2.1.1.6、RR [redacted]）。しかしながら、K_D 値は SG で 191.9 ± 47.6 nmol/L、hRS7 で 92.4 ± 5.7 nmol/L と、複合体形成後に結合親和性の軽度な低下傾向がみられた。

2.2.2　SG 及び hRS7 IgG の組換えヒト Trop-2 に対する結合性

組換えヒト Trop-2 低密度チップ（密度＝1110RU）における hRS7 及び SG の結合親和性には統計学的有意差が認められ、K_D 値は hRS7 で 0.51 ± 0.04 nmol/L、SG で 0.26 ± 0.14 nmol/L と、結合親和性は SN-38 と複合体形成後に向上した（P=0.0398）（CTD 4.2.1.1.5、RR [redacted]）。

2.3　抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性（Cardillo, T. M., et al., 2015[6]; TR-PD-IMMU-132-[redacted]-017）

非結合 hRS7 IgG がある程度の ADCC 活性を示したことから、SN-38 の抗体への結合がこの活性に影響するかどうかを明らかにするために、一連の試験を実施した[6]。SG、hRS7 IgG、hLL2-CL2A-SN-38 及び hLL2 IgG（hLL2 は固形腫瘍細胞株に対する非結合抗 CD22 複合体）によって誘発される ADCC 活性を評価するために、4 時間の乳酸脱水素酵素（LDH）放出アッセイを実施した。標的細胞を 96 ウェル黒色平底プレートに 1×10^4 細胞/ウェルで播種し、一晩インキュベートした。翌日、ドナーから単離した末梢血単核エフェクター細胞（PBMC）をエフェクター細胞対標的細胞（E:T）比 50:1 で反応プレートの各ウェルに添加した。被験薬物は最終濃度 33.3 nmol/L でそれぞれのウェルに添加した。1 組のウェルには背景対照のために ADCC アッセイ培地のみを、もう 1 組のウェルには最大細胞溶解対照のために Triton X-100 と細胞のみを加えたものを添加した。プレートは 37℃で 4 時間インキュベートした。4 時間後、標的細胞の溶解を、均一系蛍光 LDH 放出アッセイによって評価した。プレートは Envision プレートリーダーで読み取った（544～590 nm）。データは [redacted] で解析した。特異的溶解率（Percent Specific Lysis）を以下のように計算した。

$$\%Specific\ Lysis = \frac{\text{Experimental} - (\text{Effector} + \text{Target Control})}{\text{Max.Lysis} - (\text{TargetControl})} \times 100$$

注記：

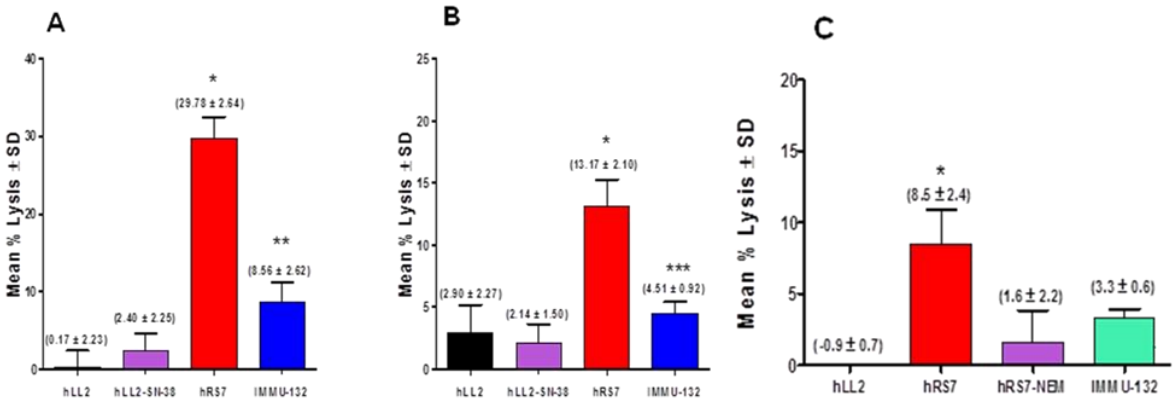
Experimental:	effector + target cells + antibody
Effector + Target Control:	effector + target cells

Max. Lysis:	target cells + TritonX-100
Target Control:	target cells only

2.3.1　SG を介した ADCC 活性（Cardillo, T. M., et al., 2015[6]）

TNBC（MDA-MB-468）、卵巣癌（NIH:OVCAR-3）及び膵癌（BxPC-3）の 3 種類の細胞株を用いて、SG の ADCC 活性を hRS7 IgG と比較した（図 2）。3 種類すべての細胞株において、hRS7 は SG を含む他のすべての被験薬物と比較して、統計学的に有意に細胞溶解を誘発した（P<0.0054）。SG による標的細胞に対する ADCC 活性は hRS7 IgG と比較して 60%以上減少した。例えば、MDA-MB-468 に対する特異的細胞溶解は、hRS7 IgG では 29.8±2.6%であったのに対し、SG では 8.6±2.6%であった（図 2A；P<0.0001）。SG による ADCC 活性の低下は、NIH:OVCAR-3 及び BxPC-3 細胞においても同様に認められた（図 2B 及び図 2C；それぞれ P<0.0001 及び P<0.0054）。同様の特異的細胞溶解の低下は、CL2A リンカーがなく、代わりに N-エチルマレイミド（NEM）でシステインをブロックした hRS7-NEM でも明らかであったことから(図 2C)、この ADCC 活性の低下は、複合体作製過程において抗体に加えられた変化によるものと考えられた。

図 2　SG（IMMU-132）の ADCC 活性



Specific cell lysis of target cells by human PBMCs mediated by IMMU-132 was compared to parental hRS7 IgG (hRS7). Target cells were plated the night before and the assay performed as described above. (A) MDA-MB-468 target cells. (B) NIH:OVCAR-3 target cells. (C) BxPC-3 target cells. * hRS7 IgG *versus* all the other test agents (P<0.0054). **IMMU-132 *versus* negative controls hLL2-SN-38 and hLL2 (P<0.0003). *** IMMU-132 *versus* negative control hLL2-CL2A-SN-38 (P<0.0019)

カップリングプロセスで、IgG 分子の Fc 部位（ADCC に関与する免疫細胞上の Fc 受容体と結合する部位）に CL2A-SN-38 が結合する可能性が高いことから、このような結果は想定外のものではなかった。また、SG の主要な作用機序は SN-38 の送達であることから、この ADCC 活性の低下が複合体の治療効果に影響を及ぼすとは考えにくい。また、試験は実施していないが、CL2A リンカーは極めて安定であると考えられることから、SN-38 は時間とともに複合体から放出されるものの、SN-38 の非存在下でも CL2A リンカーが存在するだけで、ADCC 活性の低下が持続すると考えられることに留意する必要がある。

Immunomedics 社が行った他のアッセイ（未報告）では、試験したほとんどの細胞株で、種々の

レベルの ADCC 活性がみられることが明らかになった（表 4）。

表 4　固形腫瘍における hRS7 IgG を介した ADCC の概要

Cell Line	Tumor Type	PBMC Donor No.	Percent Specific Lysis (mean ± s.d.)			
			Effector:Target Ratio 50:1		Effector:Target Ratio 25:1	
			hRS7 IgG	Control	hRS7 IgG	Control
Calu-3	NSCLC	006	11.5 ± 1.1	1.4 ± 1.3	6.1 ± 1.4	0
SK-MES-1	Squamous Cell Lung	006	3.1 ± 1.5	2.6 ± 3.7	1.8 ± 1.4	0
PC-3	Prostate	001	32.7 ± 2.3	0.4 ± 1.9	18.4 ± 1.7	0
MDA-MB-468	Breast	001	30.8 ± 2.4	0.6 ± 2.8	20.7 ± 3.2	1.4 ± 1.7
NIH:OVCAR-3	Ovarian	005	8.0 ± 1.7	0.7 ± 1.0	ND	ND
SK-OV-4	Ovarian	005	9.4 ± 1.1	0	ND	ND
ND = not determined						

2.3.2　第 1/2 相臨床試験用製剤と第 3 相臨床試験用製剤による ADCC 活性の比較（TR-PD-IMMU-132-[redacted]-017）

3 名のドナー（女性 1 名、男性 2 名）を用いて、オリジナルクローン（[redacted]）から得られた hRS7 IgG と新規クローン（[redacted]）から得られた hRS7 IgG の ADCC 活性を比較した（CTD 4.2.1.1.8、TR-PD-IMMU-132-[redacted]-017）。Trop-2 が高発現しているヒト TNBC 細胞株（MDA-MB-468）を標的細胞としてアッセイに使用した。E:T 比 100:1 では、非標的対照抗体と比較して、2 名のドナーのみが有意な ADCC 活性を示した（*P*<0.0001）。いずれの場合も、2 種類のクローンの間に有意差は認められなかった。他の 1 名のドナーの PBMC は、いかなる ADCC 活性も有意に媒介することはなかった。これらの抗体から作製した ADC（すなわち、IMMU-132-[redacted] 及び IMMU-132-[redacted]）を介した ADCC 活性は、それぞれの親抗体である hRS7 と比較して有意な活性低下がみられた（*P*<0.0003）。また、1 名のドナーだけが、対照 ADC と比較して、ADC による標的細胞に対して有意な溶解を示した（*P*<0.0001）。この 1 名のドナーについては、親抗体である hRS7 と同様に、IMMU-132-[redacted] 又は IMMU-132-[redacted] を介した特異的細胞溶解の間に有意差は認められなかった（すなわち、それぞれ第 1/2 相臨床試験用製剤と第 3 相臨床試験用製剤の間）。これらの hRS7 を介した ADCC 活性は、クローンの由来には関係なく、ドナーに依存し、みられた特異的細胞溶解は 2 種類のクローン間で同様であることを示している。さらに、SN-38 を hRS7 に結合させると、いずれのクローンでも ADCC 活性の著しい低下が認められたが、特異的細胞溶解が観察されており、IMMU-132-[redacted] 及び IMMU-132-[redacted] は、それぞれ第 1/2 相臨床試験及び第 3 相臨床試験で同様の有効性を示した。全体として、2 種類の抗体と ADC には同等性／同質性が認められ、hRS7 の由来間で顕著な違いはないことが明らかになった。

2.4　第 1/2 相臨床試験用製剤と第 3 相臨床試験用製剤による補体依存性細胞傷害（CDC）活性の比較

CDC を介した hRS7-[redacted]、hRS7-[redacted]、IMMU-132-[redacted] 及び IMMU-132-[redacted] の細胞毒性を、2 種類の Trop-2 陽性細胞株（MDA-MB-468 及び PC-3）を用いて 4 時間比色測定法により評価した。細胞は Trypsin-EDTA で回収し、96 ウェル透明平底プレートのウェルに 5.0×10^4 細胞/100 µL/ウェルを播種し、37℃、5% CO_2 の加湿インキュベーター内で一晩インキュベートした。翌日、試験抗体、対照抗体及び ADC を CDC 培地で、最終濃度範囲が 33.3～0.3 nmol/L となるよう 1:2 段階希釈を行った。抗体又は ADC を入れたウェルに、一定濃度の正常ヒト血清補体（25 µL/ウェル；ストック正常ヒト血清補体を 1:5 で希釈し、反応プレート内の最終濃度が 1:20 となるようにした）を添加した。背景対照として、4 種類の異なるセットのウェルに、それぞれ、アッセイ培地のみ、アッセイ培地を含む細胞、アッセイ培地及び正常ヒト血清補体を含む細胞、又は Triton X-100（最大細胞溶解対照）を含む細胞のいずれかを添加した。その後、プレートを 5 % CO_2 加湿インキュベーター内で 37℃、2 時間インキュベートした。このインキュベーションの後、MTS 基質を各ウェルに添加し、プレートをインキュベーターに戻した。Envision プレートリーダーを用い、490 nm の波長で、1 時間ごとに、細胞とアッセイ培地のみを含む対照ウェルの吸光度が 0.6 より大きくなるまで、プレートを読み取った。

CDC 活性（すなわち、アッセイに使用した補体の効力）の陽性対照として、Daudi 細胞を補体の存在下で抗 CD20 抗体（hA20 IgG）とともにインキュベートした [10]。Daudi 細胞はアッセイと同日に採取し、CDC アッセイ培地に再懸濁した後、96 ウェルの透明平底プレートに播種した（5×10^4 細胞/50 µL/ウェル）。最終濃度範囲は上述と同様とした。このアッセイでは、h679 非特異的対照 IgG を陰性対照抗体として使用した。

これらのアッセイでは、被験薬を介した CDC 活性は認められなかった。親抗体（hRS7-[redacted] 又は hRS7-[redacted]）及びそれらから作製した ADC（IMMU-132-[redacted] 又は IMMU-132-[redacted]）は、いずれも 2 種類の Trop-2 陽性細胞株（MDA-MB-468 及び PC-3）に対して CDC 活性を示さなかった（CTD 4.2.1.1.9、TR-PD-IMMU-132-[redacted]-018）。ほとんどの固形腫瘍細胞株は、補体活性を阻害する膜結合型補体調節タンパク質である CD55 及び CD59 を過剰発現していることから、これらの結果は想定外ではなかった [11]。これらのデータは、いずれのソースから得られた hRS7 もこれらの補体調節タンパク質の阻害効果を上回ることができないこと、さらに CDC アッセイは hRS7 又は SG の活性を測定するには適切なアッセイではないことを示すものであった。

2.5　各種ヒト癌細胞株及び腫瘍異種移植部位における Trop-2 の発現状況（Cardillo, T. M., et al. 2015[6]; Goldenberg, D. M., et al., 2015[7]）

種々のヒト固形腫瘍細胞株におけるヒト Trop-2 の発現レベルを、蛍光活性化セルソーティング（FACS 分析）により調べ、細胞表面当たりの Trop-2 分子数を求めた。また、同じヒト固形腫瘍細胞株をマウスに移植して皮下腫瘍を誘発し、腫瘍を採取してホルマリン固定した後、パラフィン包埋し、免疫組織化学（IHC）検査により Trop-2 発現を調べた [6,7]。

2.5.1 FACS 分析による Trop-2 発現の解析（Cardillo, T. M., et al., 2015[6]; Goldenberg, D. M., et al., 2015[7]）

ヒト固形腫瘍細胞株の細胞表面における Trop-2 発現を、フィコエリスリン（PE）結合マウス抗ヒト Trop-2 抗体による FACS 染色により調べた。Trop-2 分子の数を、飽和結合時の平均蛍光強度に基づいて、QuantiBRITE PE ビーズの平均蛍光強度から作成した標準曲線を用いて算出した。各細胞株について 3 回の測定を行った。陰性対照として、Trop-2 を発現していないヒト急性 T 細胞白血病細胞株（Jurkat）を使用した。

FACS 分析で評価した細胞表面 Trop-2 発現は、胃、膵臓、乳房、結腸及び肺を含む種々のヒト固形腫瘍細胞株で認められた（表 5）。極端に発現が高い腫瘍細胞はなく、個々の腫瘍細胞でも変動がみられた。例えば、胃腺癌では、細胞表面 Trop-2 分子数は、最も低いもので 494 ± 19（Hs 746T 細胞）から高いもので 246,857 ± 64,651（NCI-N87 細胞）と幅がみられた。

表 5　FACS 分析による各種固形腫瘍細胞株における細胞表面 Trop-2 発現数

Cell Line	Number of Surface Trop-2 Molecules per Cell (Mean ± SD)
Gastric	
NCI-N87	**246,857 ± 64,651**
AGS	**53,756 ± 23,527**
Hs 746T	**494 ± 19**
Pancreatic	
BxPC-3	**493,773 ± 97,779**
CFPAC-1	**162,871 ± 28,161**
Capan-1	**157,376 ± 36,976**
HPAF-II	**115,533 ± 28,627**
Breast (TN)	
MDA-MB-468	**301,603 ± 29,470**
HCC38	**181,488 ± 69,351**
HCC1806	**91,403 ± 20,817**
MDA-MB-231	**32,380 ± 5,460**
Breast	
SK-BR-3 (HER2$^+$)	**328,281 ± 47,996**
MCF-7 (ER2$^+$)	**110,646 ± 17,233**
Colon	
COLO 205	**58,179 ± 6,909**
HT-29	**68 ± 17**

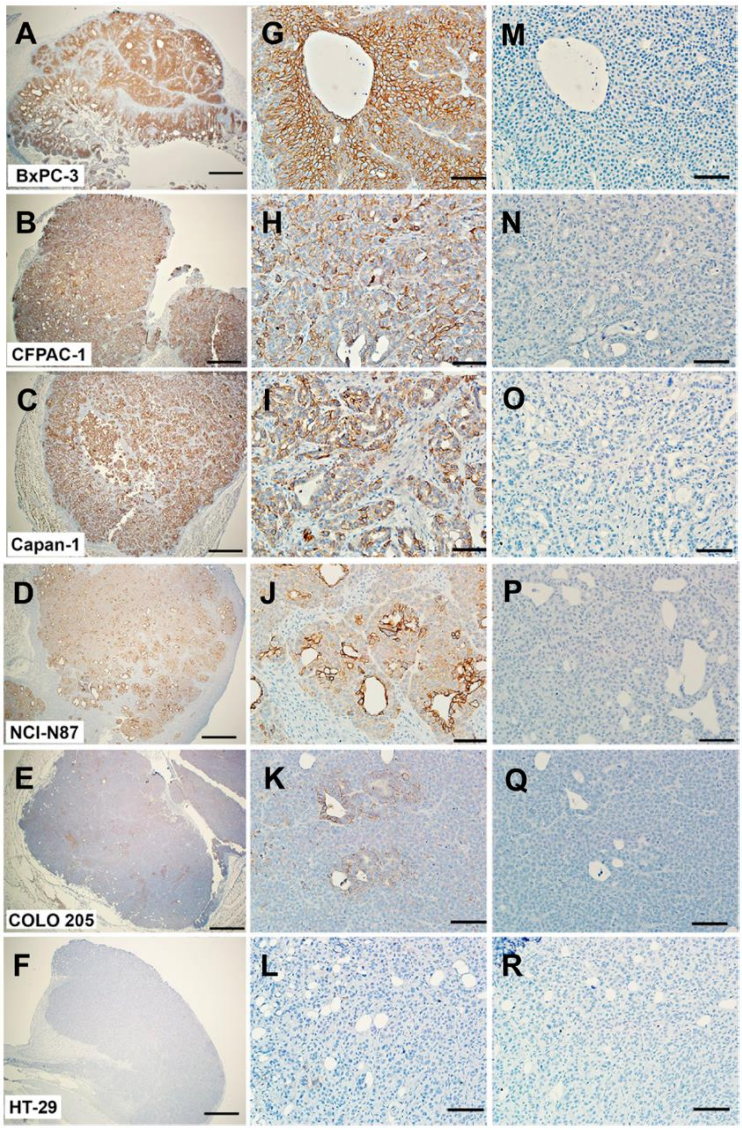
Cell Line	Number of Surface Trop-2 Molecules per Cell (Mean ± SD)
NSCLC	
Calu-3	**128,201 ± 50,708**
Sq. Cell Lung	
SK-MES-1	**29,488 ± 5,824**
Acute T-Cell Leukemia	
Jurkat	**0**
[a] Three separate assays were performed, with the mean and standard deviation provided.	

2.5.2　様々なヒト癌の異種移植部位における Trop-2 の発現状況（Cardillo, T. M., et al., 2015[6]）

種々のヒト癌細胞株を無胸腺 NCr *nu/nu* ヌードマウスの腹側部皮下に移植し、IHC 検査を行った。異種移植腫瘍の組織片を動物から採取し、10%緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋した。薄切(5 μm)後、NxGen Decloaking Chamber で 95°C の Tris/EDTA 緩衝液（pH 9.0）でスライドを 30 分間インキュベートして脱パラフィン処理し、抗原賦活化を行った。Trop-2 はヤギポリクローナル抗ヒト Trop-2 抗体で検出し、Vector VECTASTAIN® ABC Kit で染色した。陰性対照として正常ヤギ抗体を用いた。組織はヘマトキシリンで対比染色した。評点は、標本内の腫瘍細胞の 10%以上の染色強度に基づいて、強(3+)、中(2+)、弱(1+)、又は無(陰性)の 4 段階とした。

Trop-2 発現を染色した消化管腫瘍異種移植片では、細胞質と細胞膜の両方に染色性が認められた(図 3)。染色性は、FACS 分析で評価した細胞表面の Trop-2 発現と良好な相関性がみられた。膵癌の 3 細胞株はいずれも均質な染色性がみられ、BxPC-3 細胞は 2+～3+の染色性であった。胃癌の NCI-N87 細胞ではより不均一な染色パターンがみられ、腺の頂端側の染色性は 3+で、周囲の腫瘍細胞の染色性はそれよりも低かった。COLO 205 細胞では極めて限局性に 1+～2+の染色性がみられ、HT-29 細胞ではごくまれに数個の細胞に 1+の染色性が認められた。

図 3　各種ヒト腫瘍異種移植部位における Trop-2 の発現状況



Cells of various human carcinoma tumor lines were injected SC into nude mice. Once tumors appeared they were removed and processed for IHC and stained for Trop-2 expression as described above. A-F: Tumors stained with goat polyclonal anti-Trop-2 antibody (bar = 1 mm). G-L: Same tumors showing select areas of staining (bar = 100 µm). M-R: Same area, but stained with normal goat IgG (bar = 100 µm). Tumor types are pancreatic (BxPC-3, CFPAC-1, and Capan-1), gastric (NCI-N87), and colonic (COLO 205 and HT-29).

2.6　各種ヒト癌細胞株と腫瘍異種移植部位における Trop-2 の発現状況（Cardillo, T. M., et al., 2011[5]; Cardillo, T. M., et al., 2015[6]; Goldenberg, D. M., et al., 2015[7]; RR [redacted]-281）

In vivo 効力試験を、ヒト固形腫瘍細胞株を免疫不全マウスの皮下に移植して行った。これらの試験には 4～8 週齢の無胸腺 NCr 雌ヌード（*nu/nu*）マウスを用いた。組織培養から採取した細胞（5×10^6～1×10^7 細胞/マウス）をマウスの右脇腹の皮下に直接、又は移植前にマトリゲルと 1 対 1 に混合して移植した。いくつかの腫瘍株は、ストック腫瘍から腫瘍懸濁液を作って 20% w/v 腫瘍懸濁液とし、1×10^7 細胞を含む組織培養から採取した細胞を混合することによって樹立した。腫瘍

体積（TV）は、ノギスを用いた二次元の測定によって求め、体積は $L \times w^2/2$ と定義した。なお、L は腫瘍の長径、w は短径である。

腫瘍増殖データの統計解析は、曲線下面積（AUC）及び生存期間に基づいて行った。個々の腫瘍増殖のプロフィールは、線形曲線モデリングによって得た。増殖曲線の統計解析に先立ち、*f*-検定によって群間の等分散性を判断した。片側 *t*-検定を使用した生理食塩液対照群を除き、両側 *t*-検定により各処置群と対照群との間の統計的有意性を評価した。増殖曲線の一部が不完全であったことから（死亡のため）、AUC の統計学的比較は、群内で 1 例目を安楽死させた時点まで行った。生存期間は、[redacted] Software パッケージを用いて、Kaplan-Meier プロット（log-rank 分析）により解析した。有意水準は $P \leq 0.05$ とした。

2.6.1　各種ヒト腫瘍異種移植における有効性（Cardillo, T. M., et al., 2011[5]）

最初の試験では、非小細胞肺癌（Calu-3）、結腸癌（COLO 205）、膵癌（Capan-1、BxPC-3）及び肺扁平上皮癌（SK-MES-1）の 4 種類の腫瘍を代表するヒト腫瘍細胞 5 株をマウス皮下に移植した。ヌードマウス-ヒト腫瘍異種移植モデルにおける SG 薬物複合体の非臨床試験については、既に報告されている[5]。

本試験では、SN-38 免疫複合体とイリノテカンの用量を SN-38 換算値で示した。抗体（IgG）に平均 6 分子の SN-38 が結合していることから、20 g のマウスに 500 μg の ADC を投与すると（25 mg/kg）、SN-38 として 0.4 mg/kg（0.4 mg SN-38/kg）を投与することになる。イリノテカンの用量も、同様に SN-38 当量として示した（すなわち、40 mg イリノテカン/kg は 24 mg SN-38/kg と等価である）。

治療開始時の腫瘍の大きさは 0.10～0.47cm^3 であった。投与期間、投与量及び各試験の動物数は以下の通りである。イリノテカンを静脈内投与したことを除き、各被験薬物は腹腔内投与（0.1 mL）した。先に実施した試験の成績を参考に、ADC は、4 日ごと又は週 2 回、種々の期間投与した[12,13]。投与頻度の設定には、ADC のより持続的な曝露を可能にするために、複合体の in vitro での血清中半減期を考慮した。ほとんどの試験において、SG 投与群に加え、CL2A リンカーを用いて SG と同様の方法で調製した hLL2（epratuzumab、抗 CD22）又は hA20（ベルツズマブ、抗 CD20）のイレレバント複合体の投与群を設けた。

すべての試験において、SG は、体重推移から判断し、マウスに対して良好な忍容性を示した。

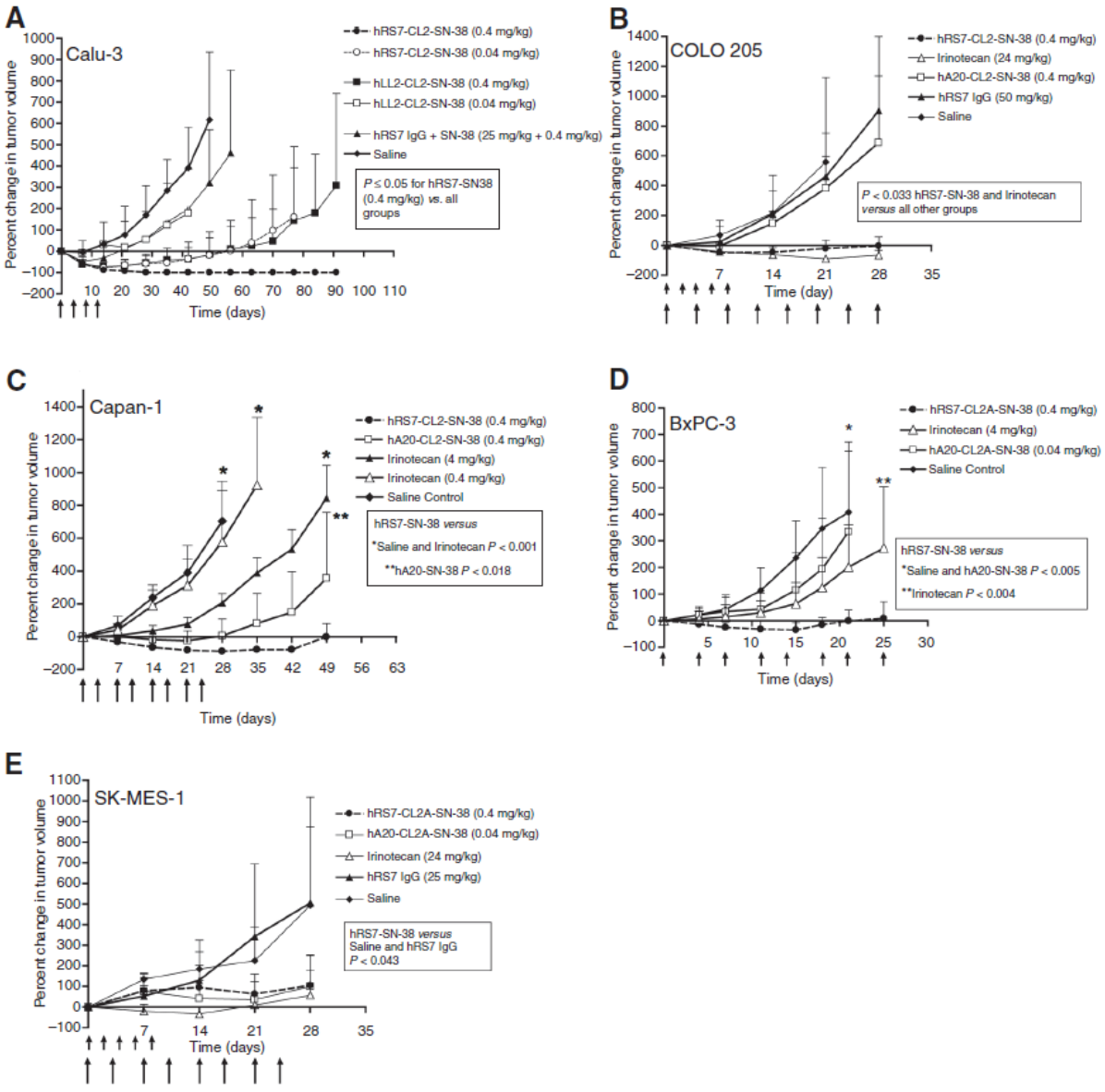
Calu-3 細胞を移植したヌードマウスに SG を 0.04 mg SN-38/kg の用量で 4 日ごとに投与したところ、イレレバント hLL2 抗 CD22-SN-38 を同一用量投与した動物と比較して、反応が有意に改善した（それぞれ TV=0.14 ± 0.22 cm^3 対 0.80 ± 0.91 cm^3；試験 42 日までの曲線下面積 [AUC_{42days}] $P<0.026$）。用量を 0.4 mg SN-38/kg に増加したところ、特異的 hRS7 IgG 複合体を投与したすべてのマウスは 28 日以内に「治癒」し、試験 147 日の試験終了まで無担癌状態が持続したが、イレレバント ADC を投与した動物では腫瘍が再度増殖した（SG 対イレレバント ADC AUC_{98days}; $P=0.05$）。hRS7 IgG と SN-38 の混合物を投与したマウスでは、腫瘍は試験 56 日までに 4.5 倍超に増殖した（TV=1.10 ± 0.88 cm^3；AUC_{56days} $P<0.006$ 対 SG）。

COLO205 細胞を移植した担癌動物において、SG 投与群（0.4 mg SN-38/kg、4 日ごとに 8 回投与）では、対照とした hA20 抗 CD20 ADC（hA20-CL2A-SN-38）、又は hRS7 IgG 投与群と比較して腫瘍が著しく小さく、28 日間の治療期間にわたって腫瘍の増殖が抑制された（それぞれ、TV=0.16 ± 0.09 cm^3 対 1.19 ± 0.59 cm^3 及び 1.77 ± 0.93 cm^3；AUC_{28days} $P < 0.016$）。イリノテカンの最

大耐量（MTD）（24 mg SN-38/kg、2 日ごとに 5 回投与）は、SG と同等の有効性を示したが、マウス血清がヒト血清よりも効率的にイリノテカンを SN-38 に変換できることに留意する必要がある[14,15,16,17]。したがって、イリノテカン中の SN-38 用量（累積 2400 μg）は、SG 中の SN-38 用量（累積 64 μg）の 37.5 倍であった。

結果を図 4 に示す。

図 4　ヌードマウスに皮下移植した 5 種類のヒト上皮性癌細胞株に対する hRS7-SN-38 ADC の治療効果



All the conjugates were administered in the amounts indicated, and again, are expressed as amount of SN-38 per dose; long arrows = conjugate injections, short arrows = irinotecan injections. *(A)* Mice bearing Calu-3 tumors (N = 5-7) were injected with sacituzumab govitecan (the ADC as indicated) every four days for a total of four injections (q4dx4). *(B)* COLO 205 tumor-bearing mice (N=5) were injected eight times (q4dx8) with the ADC or every two days for a total of five injections (q2dx5) with the MTD of irinotecan. Capan-1 (*C*; N=10) or BxPC-3 tumor-bearing mice (*D*; N = 10) were treated twice weekly

for 4 weeks with the agents indicated. (*E*) In addition to ADC given twice weekly for 4 weeks, SK-MES-1 tumor-bearing (N=8) mice received the MTD of irinotecan (q2dx5).

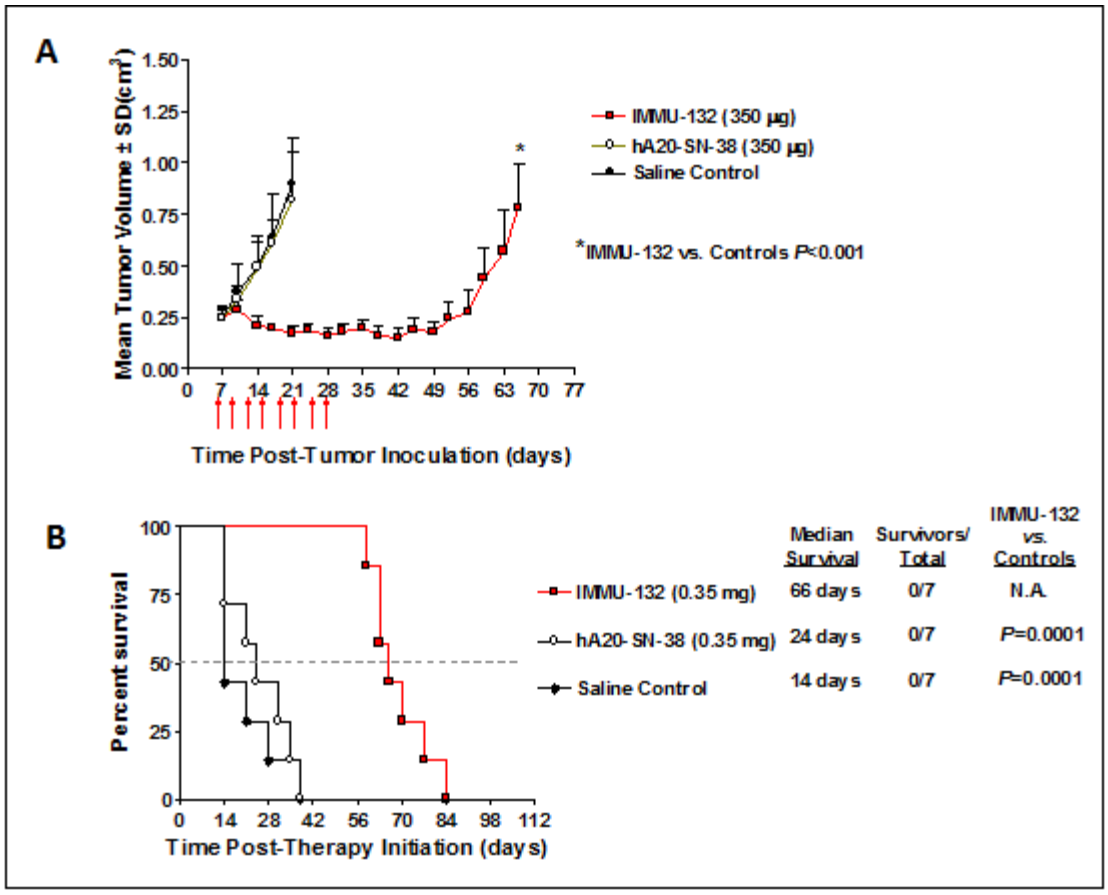
Capan-1 細胞を移植した担癌動物において、イリノテカン単独投与は SG で効果が認められた用量（SN-38 として同量）で有意な変化を示さなかった（例えば、試験 35 日の平均 TV は、SG 0.4 mg SN-38/kg 投与動物で 0.04 ± 0.05 cm^3 に対して、イリノテカン 0.4 mg SN-38/kg 投与動物では 1.78 ± 0.62 cm^3；AUC_{day35} P<0.001）。イリノテカンの用量を 10 倍の 4 mg SN-38/kg に増量すると、反応は改善したが、SG の 0.4 mg SN-38/kg ほど顕著ではなかった（TV=0.17 ± 0.18 cm^3 対 1.69 ± 0.47 cm^3；AUC_{day49} P<0.001）。同一用量の非標的 hA20-CL2A-SN-38 は、イリノテカンよりも顕著な抗腫瘍効果を示したが、hRS7 IgG に特異的な複合体は、イレレバント ADC よりも明らかに優れていた（TV=0.17 ± 0.18 cm^3 対 0.80 ± 0.68 cm^3；AUC_{day49} P<0.018）。

次に、他の 2 種類のヒト上皮性癌モデルを用いて SG の抗腫瘍効果を検討した。BxPC-3 ヒト膵臓腫瘍細胞を移植した担癌マウスにおいて、SG は、生理食塩液及び SG と同量の非標的 hA20-CL2A-SN-38 と比較して、腫瘍増殖を著しく抑制した（それぞれ、TV=0.24 ± 0.11 cm^3 対 1.17 ± 0.45 cm^3 及び 1.05 ± 0.73 cm^3；AUC_{day21} P<0.001）。また、SG は 10 倍の SN-38 相当量を投与したイリノテカンと比較して、有意な抑制効果を示した（TV = 0.27 ± 0.18 cm^3 対 0.90 ± 0.62 cm^3；AUC_{day25} P<0.004）。

SK-MES-1 ヒト肺扁平上皮癌を移植した担癌マウスに SG を 0.4 mg/kg 投与したとき、その腫瘍増殖阻害効果は、生理食塩液及び非結合 hRS7 IgG よりも優れていた（それぞれ、TV=0.36 ± 0.25 cm^3 対 1.02 ± 0.70 cm^3 及び 1.30 ± 1.08 cm^3；$AUC_{28\ days}$ P<0.043）。しかし、非標的 hA20-CL2A-SN-38 又は MTD のイリノテカンの投与は、SG と同等の抗腫瘍効果を示した。

これらの知見をさらに他の消化器癌に拡張するために、ヒト胃癌異種移植片である NCI-N87 を移植した担癌マウスで SG の抗腫瘍効果を検討した [6]。SG 投与群（用量は ADC のタンパク質量で表示）では、生理食塩液及び非標的 hA20（抗 CD20）-SN-38 ADC 対照群と比較して、有意な腫瘍退縮効果がみられた（図 5A ; P＜0.001）。腫瘍が 1.0 cm^3 を超える大きさに増殖した時点で疾患により死亡したと判断し、マウスを安楽死させた。腫瘍縮小効果の判定は、最長径に基づき以下のように定義した 。“部分奏効”：投与開始時の腫瘍体積から 30%以上の縮小。“安定”：腫瘍体積の縮小が 29%以内又は投与開始時の腫瘍体積から 20%未満の増大。“進行”：投与開始時又は最小時点の腫瘍体積から 20%以上の増大。無増悪期間（TTP）は、投与開始後、腫瘍体積が最小時点から 20%以上増大した時点までの期間とした。SG 投与群では、7 例中 6 例が、最終投与から 18 日間以上部分奏効が持続した。この結果、平均 TTP は 41.7±4.2 日となり、無奏効であった対照 ADC 投与群の TTP は 4.1±2.0 日であった（P<0.0001）。全体として、SG 投与群のマウスの生存期間中央値（MST）が 66 日であったのに対し、対照 ADC 投与群は 24 日、生理食塩液対照群は 14 日であった（図 5B ; P<0.0001）。

図 5　ヒト胃癌を異種移植した担癌マウスにおける SG（IMMU-132）の有効性



Mice bearing NCI-N87 human gastric tumors (TV = 0.249 ± 0.049 cm3) were treated with 0.35 mg IMMU-132 twice weekly for four weeks. (A) Mean tumor growth curves for IMMU-132 treated animals compared to saline and non-tumor-targeting control ADC, hA20-CL2A-SN-38, treated mice. Arrows indicate therapy days. (B) Survival curves for treated mice with a disease end-point of tumor progression greater than 1.0 cm^3.

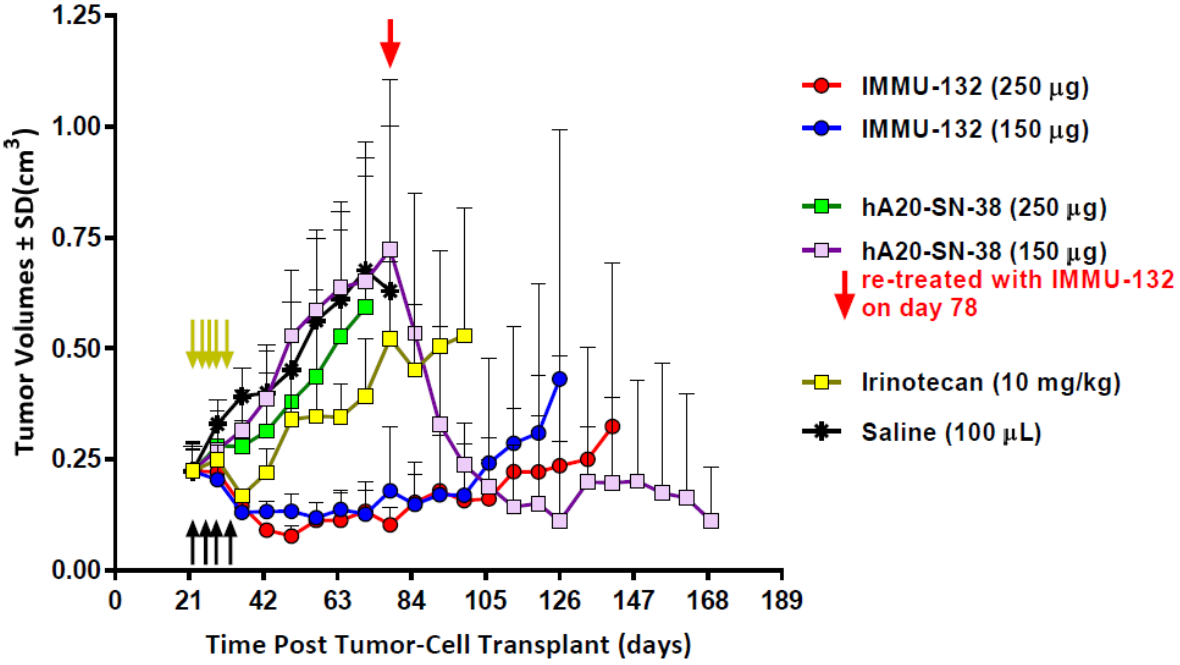
最後に、MDA-MB-468 TNBC 細胞を移植した担癌ヌードマウスを用いて、SG の有効性を評価した（CTD 4.2.1.1.1、[redacted]-281）。

無胸腺 NCr ヌード（*nu/nu*）マウスにヒト TNBC 細胞（MDA-MB-468）を皮下に移植した。腫瘍が約 0.25 cm^3 の大きさになった時点で、動物を 8 匹ずつの 6 群に群分けした。マウスには、SG の 250 又は 150 µg（それぞれ 12.5 及び 7.5 mg/kg）を週 2 回、2 週間、静脈内投与した（ヒト等価用量（HED）はそれぞれ 1 及び 0.6 mg/kg であった）。対照群として、非腫瘍標的 hA20-CL2A-SN-38（抗 CD20 抗体、veltuzumab-SN-38 複合体）を SG と同じ用量、同じ投与スケジュールで投与する 2 群を設けた。さらに、イリノテカンを 10 mg/kg で週 3 回、合計 5 回投与する群（HED=0.8 mg/kg）、及び生理食塩液（100 µL）を投与する群を設けた。腫瘍の計測とマウスの体重測定を週 1 回行った。

SG の 250 及び 150 µg の両投与群において、他の投与群と比較して、有意な腫瘍の退縮が認められた（P<0.0017；図 6）。さらに、対照群（低用量 hA20-CL2A-SN-38 群）では、すべての腫瘍が進行し、生理食塩液対照群と差はみられなかったが、その後の SG（250 µg）投与により、すべての動物で有意な腫瘍の退縮がみられた（P＝0.0031）。以上のデータは、SG が Trop-2 陽性のヒト TNBC 腫瘍に対して有意かつ特異的な効果を示し、SN-38 が非特異的 ADC の形で事前に曝露

されても、SG の抗腫瘍効果には影響がないことを示すものである。

図 6　TNBC 異種移植モデルにおける SG（IMMU-132）の治療効果



Mice bearing MDA-MB-468 tumors (N=7-8) were injected with sacituzumab govitecan twice a week for two weeks. All the ADCs (sacituzumab govitecan and control hA20-CL2A-SN-38) were administered i.v. in the amounts indicated at the times shown by the black arrows. Irinotecan was administered three times a week for a total of five injections as indicated by the gold arrows. Large downward pointing red arrow indicates the time-point when the low dose hA20-CL2A-SN-38 control group began treatment with sacituzumab govitecan.

2.6.2　臨床投与スキームにおける抗腫瘍効果（Cardillo, T. M., et al., 2015[6]）

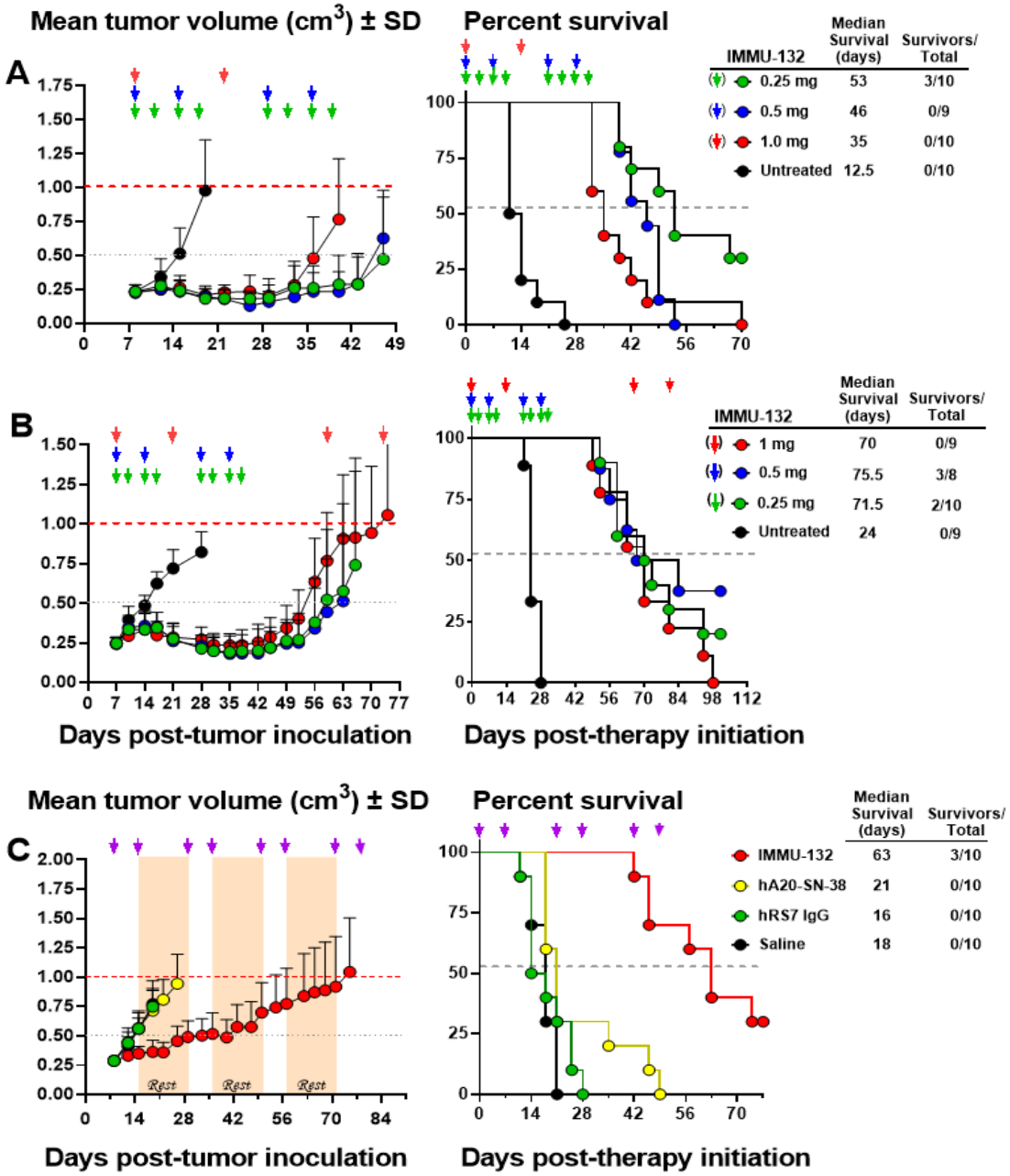
追加試験では、臨床投与スキームでの SG の有効性を検討した[6]。ヒト膵癌異種移植モデル（BxPC-3）を用いて、SG 2 mg（ADC のタンパク質量）を分割投与する 3 種類の投与スケジュールで検討した。すなわち、総投与量（HED＝8 mg/kg）を 3 種類の投与スケジュールに群分けし、分割投与した。第 1 群には SG 1 mg を 2 回投与（試験 1 日及び 15 日）、第 2 群には 0.5 mg を 4 回投与（試験 1、8、22 及び 29 日）、第 3 群には 0.25 mg を 8 回投与（試験 1、4、8、11、22、25、29 及び 32 日）した。3 種類の投与スキームのいずれにおいても、無処置対照動物と比較して、腫瘍増殖阻害と全生存期間の両方で、有意な抗腫瘍効果が認められた（図 7A；それぞれ $P<0.0009$ 及び $P<0.0001$）。3 群の TTP は、1 mg 投与群の 22.4 ± 10.1 日から 0.25 mg 投与群の 31.7 ± 14.5 日の間で、群間に有意差はみられなかった（無処置対照群の TTP＝5.0 ± 2.3 日）。

NCI-N87 ヒト胃癌細胞を異種移植した担癌マウスで、同様の投与スケジュールの試験を行った（図 7B）。3 種類の投与スケジュールはいずれも無処置の対照マウスと比較した場合、有意な抗腫瘍効果を示したが、投与スケジュール間で差はみられなかった（AUC；$P<0.0001$）。同様に、全生存期間についても、無処置対照と比較した場合、3 種類の投与スケジュールはいずれも有意な生存期間の延長が認められたが（$P<0.0001$）、投与スケジュール間で差はみられなかった。

NCI-N87 細胞を移植した担癌マウスに、現臨床投与スキームと同様に、SG を週 1 回、2 週間投与し、1 週間休薬した後に次のサイクルに入る長期間投与を行った（図 7C）。計 4 回の投与サイ

クルを実施した。この投与スケジュールでの TTP は 15.7 ± 11.1 日であり、対照 ADC 投与群の 4.7 ± 2.2 日と比較して腫瘍増殖の遅延が認められた（*P*=0.0122）。全体的には、長期間投与により、生存期間中央値は、SG 投与群で 63 日となり、対照 ADC 投与群の 21 日と比較して 3 倍に延長した（*P*=0.0001）。

図 7　膵癌及び胃癌細胞を異種移植した担癌マウスにおける IMMU-132 の種々の投与スキーム



Nude mice (N=8-10) bearing SC BxPC-3 or NCI-N87 xenografts were treated as described below. (A) BxPC-3-bearing mice were treated (arrows) with two cycles of IMMU-132 at 1 mg every 14 d, 0.5 mg weekly for two weeks, or 0.25 mg twice weekly for two weeks, totaling 2 mg IMMU-132 to all the mice. (B) Similar dosing of NCI-N87-bearing mice (arrows), with mice in the 1-mg treatment group receiving one additional cycle. (C) Chronic dosing of IMMU-132 in mice bearing NCI-N87, using 0.5-mg once weekly for 2 weeks in a 3-week treatment cycle for a total of 4 cycles. Corresponding survival curves (end-point: tumor progression >1.0 cm^3) to right of each tumor growth curve

重要なことは、これらすべての異なる投与スキームでの評価において、有意な体重減少がみられなかったことが示すように、マウスに SG 投与に関連した毒性変化が認められなかったことである（データは未記載）。

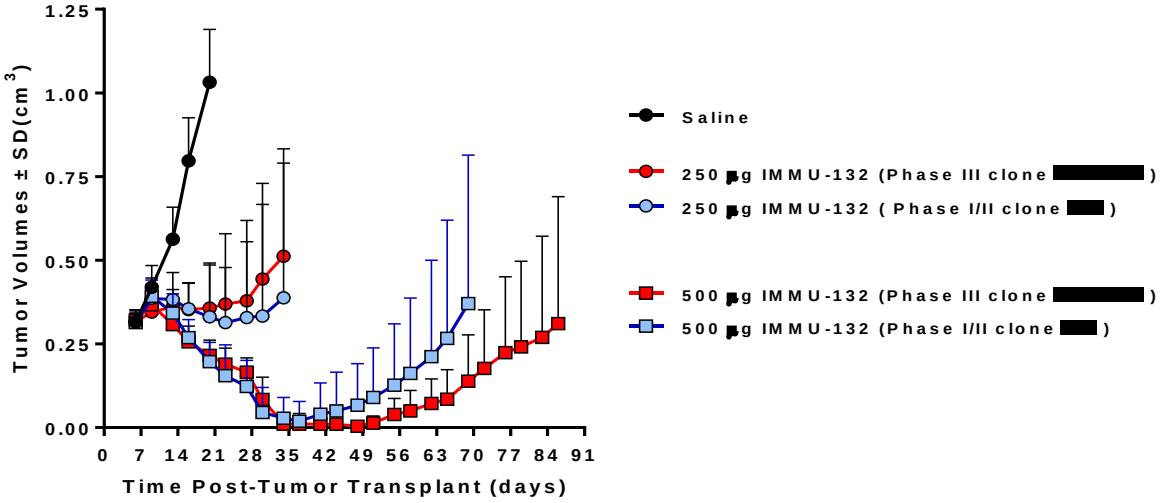
2.6.3　TNBC モデルにおける第 1/2 相臨床試験用製剤と第 3 相臨床試験用製剤の有効性の比較（120415-337）

オリジナルクローン（クローン [redacted]）と新規クローン（[redacted]）から作製した hRS7 の治療効果を、ヒト TNBC 腫瘍異種移植モデルにより比較した（CTD 4.2.1.1.2、120415-337）。IMMU-132-[redacted] は [redacted] により作製された活性化 CL2A-SN-38 を用いて製造された（すなわち、第 3 相臨床試験用製剤）のに対し、IMMU-132-[redacted] は Immunomedics 社により作製された活性化 CL2A-SN-38 を用いて製造された（すなわち、第 1/2 相臨床試験用製剤）。複合体の作製はいずれも Immunomedics 社で、最終充填と凍結乾燥は [redacted] 社（[redacted]）で行われた。

HCC1806 ヒト TNBC 細胞を標的腫瘍とし、SG の 250 又は 500 µg の 2 種類の用量（体重 20 g マウスの場合、それぞれ 12.5 及び 25 mg/kg）を週 2 回、4 週間腹腔内投与した。また、生理食塩液のみを投与する無処置対照群を設けた。投与容量は 100 µL とした。被験薬は、投与日当日に溶解し、希釈して用いた。投与は、被験薬を溶解してから 1 時間以内に行った。腫瘍のサイズ及びマウスの体重を週 2 回測定した。

各クローンから作製した SG はいずれの用量（250 又は 500 µg）でも、無処置対照動物と比較して、腫瘍増殖に関して、有意な抗腫瘍効果を示した（図 8）（P <0.0001, AUC）。さらに、両者とも同様の用量反応を示し、500 µg 投与では腫瘍の退縮がみられ、250 µg 投与では投与期間中、腫瘍の形状に変化はみられなかった。作製した SG がどちらのクローンに由来するかに関係なく、500 µg 投与では 250 µg 投与と比較して有意な抗腫瘍効果が認められた（P<0.0001, AUC）。重要なことは、同一用量における有効性は、SG の第 1/2 相臨床試験用製剤と第 3 相臨床試験用製剤（すなわち、250 µg[redacted] 対 [redacted] 又は 500 µg[redacted] 対 [redacted]）を投与したマウスの間で有意差がみられなかったということである。

図 8　ヒト TNBC 細胞（HCC1806）を異種移植した担癌マウスにおける
サシツマブゴビテカン（IMMU-132）の同等性／同質性（N ＝9～10）

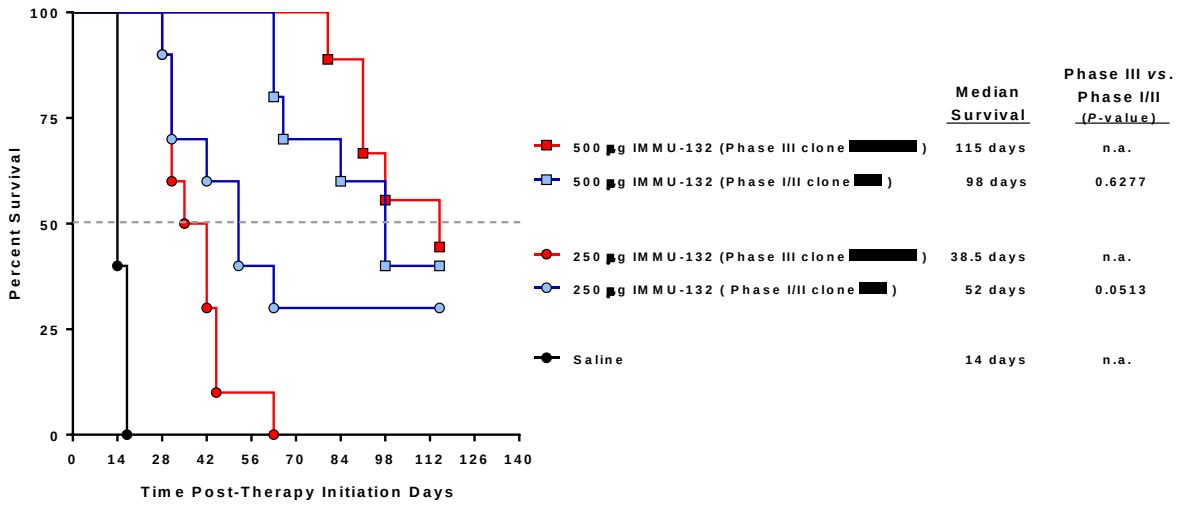


Mean tumor growth curves of mice bearing HCC1806 human TNBC tumor xenografts treated with either Phase 1/2 or Phase 3 IMMU-132, at the indicated doses, twice weekly for 4 weeks.

生存率（図 9）においても、SG（クローン[redacted]由来）500 µg を投与したマウスと SG（クローン[redacted]由来）500 µg を投与したマウスの間、又はそれぞれのクローン由来の SG 250 µg を投与したマウスの間に有意差はみられなかった。

以上のように、両クローンに由来する SG は、この腫瘍モデルにおいて同等の抗腫瘍効果を示し、同一用量で比較した場合、抗腫瘍効果及び生存率のいずれにも有意差は認められなかった。以上のデータは、両製剤の有効性は同等であり、明らかな差がないことを示すものである。

図 9　SG（IMMU-132）の第 1/2 相臨床試験用製剤又は第 3 相臨床試験用製剤を投与した担癌マウスにおける生存曲線



Survival was defined as the time from start of therapy to tumor progression >1.0 cm^3. Log-rank comparisons were made to determine significance.

2.7　組織交差反応性

2.7.1　マウス、ラット及びカニクイザル Trop-2 に対する hRS7 の交差反応性（RR [redacted], RR [redacted]-20[redacted], and RR [redacted]-20[redacted]）

hRS7 抗体に対するマウス、ラット及びカニクイザルのヒト組換え Trop-2 への結合能を酵素結合免疫吸着法（ELISA）で比較評価した（CTD 4.2.1.1.7、RR[redacted]、CTD 4.2.1.1.11、RR-[redacted]-20[redacted] 及び CTD 4.2.1.1.10、RR-[redacted]-20[redacted]）。4 種の組換え Trop-2 にはヒスチジン（His-tag）が含まれており、ニッケルコートされた Ni-NTA HisSorb Strips にタンパク質を吸着させることができる。各タンパク質を PBS で希釈し、適切なウェルにピペットで移して、4℃で一晩ウェルをコーティングした。hRS7 IgG 抗体を、最終濃度が 1 µg/mL～0.064 ng/mL の範囲となるようトリプリケートでウェルに添加した。陽性対照としてポリクローナルヤギ抗ヒト Trop-2 抗体、陰性対照として非特異的な h679 IgG 抗体を使用した。データは[redacted] Software を使用して解析し、グラフ化した。

ヒト Trop-2 とマウス又はラット Trop-2 の間のアミノ酸配列の相同性はいずれも 81%であるのに対し、マウスとラット Trop-2 の間の相同性は 94%である。2 回の実験で、hRS7 IgG のヒト Trop-2 への結合が確認された（それぞれ、K_D=40 ng/mL 及び 56 ng/mL）。一方、hRS7 はこれらの実験でマウス Trop-2 及びラット Trop-2 に結合しなかったが、ポリクローナル抗ヒト Trop-2 抗体はヒト、マウス及びラットの 3 種類の組換え Trop-2 すべてに結合した。

マウスやラットの Trop-2 とは異なり、カニクイザルの Trop-2 とヒトの Trop-2 との相同性は 98.3%である。hRS7 IgG 及び SG の両方との結合性を ELISA 法で評価した。想定されたとおり、hRS7 はヒト Trop-2 にもサル Trop-2 にもほぼ同様に結合した（いずれも K_D = 0.6 ng/mL）。同様に、SG はいずれの Trop-2 にも結合し、両者の結合曲線に有意差はなかった（ヒト及びサルそれぞれの Trop-2 に対する K_D 値は 2.4 ng/mL 及び 2.7 ng/mL）。これらのデータは、SG のオンターゲット

毒性を評価するための動物種として、カニクイザルが適することを示すものである。

2.7.2　hRS7 IgG-ビオチンの正常カニクイザル組織との交差反応性試験（IM1735）

凍結カニクイザル組織に対するビオチン化 hRS7 IgG の結合性を検討する GLP 試験を実施した（CTD 4.2.1.1.4、IM1735；[redacted] USA）。ビオチン化した hRS7 を、2 種類の濃度（2 及び 40 µg/mL）で正常カニクイザル組織（可能であれば、1 組織当たりドナー3 匹）の凍結切片に適用し、結合性を検出した。hRS7 IgG-ビオチンは陽性対照物質（正常ヒト皮膚［上皮細胞］の凍結切片）に中等度から強度の染色性を示した。hRS7 IgG-ビオチンは陰性対照物質（正常ヒト皮膚［皮膚コラーゲン］の凍結切片）に特異的に反応することはなかった。陰性対照抗体 hIgG1-ビオチンは、陽性対照物質及び陰性対照物質のいずれとも特異的に反応しなかった。また、アッセイ対照スライドの染色もみられなかった。hRS7 IgG-ビオチンは、陽性対照物質に対して優れた特異的反応を示し、陰性対照物質には特異的反応を示さず、陰性対照抗体にも反応しないことから、本測定法は感度、特異性及び再現性に優れていることが示唆された。

Trop-2 の存在は、以下の組織で確認された。

- 上皮細胞：hRS7 IgG-ビオチンにより、以下の各種上皮細胞において、細胞質、細胞質顆粒及び／又は細胞膜が種々の程度に染色された。乳房／乳腺（3/3 ドナー）、眼（2/4 ドナー）、消化管-食道（4/4 ドナー）、胃（3/3 ドナー）、腎臓（3/3 ドナー）、肺（3/3 ドナー）、卵巣（1/3 ドナー）、卵管（3/3 ドナー）、膵臓（3/3 ドナー）、副甲状腺（2/3 ドナー）、胎盤（3/3 ドナー）、前立腺（3/3 ドナー）、唾液腺（3/3 ドナー）、皮膚（3/3 ドナー）、胸腺（3/3 ドナー）。甲状腺（2/3 ドナー）、扁桃（5/5 ドナー）、尿管（3/3 ドナー）、膀胱（3/3 ドナー）、子宮体部（子宮内膜）（3/3 ドナー）、子宮頸部（2/4 ドナー）

染色強度は擬陽性から強度の範囲にあり、両染色濃度とも概ね同様の強度と頻度、あるいは低濃度ではわずかに低下し、高度から中等度の親和性が認められた。

- 筋上皮：hRS7 IgG-ビオチンにより、以下の筋上皮の細胞質及び細胞質顆粒が染色された。乳房-乳腺（1/3 ドナー）、唾液腺（3/3 ドナー）

染色強度は弱～中程度で、両染色濃度とも概ね同等か、低濃度ではわずかに低下し、高度から中等度の親和性が認められた。

- 中皮：hRS7 IgG-ビオチンにより、以下の中皮の細胞質、細胞質顆粒及び/又は細胞膜が種々の程度に染色された。消化管-食道（1/4 ドナー）及び胃（1/3 ドナー）、腎臓（1/3 ドナー）、卵巣（1/3 ドナー）、前立腺（2/3 ドナー）、尿管（1/3 ドナー）

染色強度は弱～強度で、低濃度ではわずかに低下することが多く、中間的な親和性が認められた。

- 脱落膜細胞：hRS7 IgG-ビオチンにより、胎盤（2/3 ドナー）の脱落膜細胞の細胞質及び細胞膜が種々の程度に染色された。

染色強度は弱～中程度であった。染色親和性は、被染色細胞が少なかったため、判断できなかった。

以上のように、上皮、中皮及び脱落膜細胞における細胞膜染色を除き、すべての組織において染色パターンは細胞質及び／又は細胞質構造に局在しており、ADC が生体内の細胞質構造に到達する可能性は極めて低いと考えられた。

2.7.3　　hRS7 の正常ヒト組織との交差反応性試験（DMP 04_11）

ビオチン化 hRS7 IgG の凍結ヒト組織に対する結合性について GLP 試験で検討した（CTD 4.2.1.1.3、DMP 04_11）（[redacted] Switzerland）。アビジン-ビオチン複合体を用いた免疫染色法(ABC Elite; Vector)を利用して、組織への hRS7 の結合を可視化した。試験プロトコルは、扁桃腺表面上皮を最大限に染色するように最適化した。0.625 g/mL(1:6272)の濃度で染色性が飽和に達し、さらに抗体濃度を 3 倍の 1.875 g/mL(1:2091)としても染色性の明らかな増強はみられなかった。

上記の条件の hRS7 染色では、上皮細胞の表面は強く染色されたが、リンパ系細胞は染色されなかった。アイソタイプ特異的 IgG 抗体を用いた陰性対照の切片や、抗体を含まないアッセイ対照では、染色は観察されなかった。Trop-2 の存在は、以下の組織で確認された。

- 乳房：乳管細胞［+2］(5 検体：低濃度ですべて陰性、高濃度で 4/5 例が陽性；2 例が 2+で 2 例が 1+；3 例は散見で 1 例は高頻度；乳管上皮細胞；細胞質や細胞膜の染色性はみられず)
- 卵管：上皮細胞層［+3］(粘膜 5 検体：3 例が 2+で細胞質に高頻度、1 例が 3+で細胞質に高頻度、1 例が 1+で細胞質に散見)
- 腎臓：集合管［+3］(皮質 5 検体：1 例が陰性、2 例が 1+、1 例が 2+、1 例が 3+；3+の標本は細胞質に高頻度)；(髄質 5 検体：2 例が 1+、2 例が 2+、1 例が 3+；いずれも細胞質)
- 肝臓：胆管［+3］(5 検体：4 例が 3+、1 例が 2+、細胞質より細胞膜に高頻度)
- 肺：気管支上皮［+1～+2］(肺気管支 5 検体：2+及び 3+、いずれも細胞膜と細胞質に高頻度)。肺実質は陰性。
- 膵臓：腺房中心細胞［+3］、腺房細胞［+1］、膵管細胞［+3］(10 検体：全例が陽性、9 例の腺房細胞が 1+（1 例は腺房細胞の所見なし，8/9 例で細胞質に散見）；10 例では腺房中心細胞が陽性、2+～3+、2/10 例で散見、残りは高頻度、9/10 例で細胞膜と細胞質が染色、1 例は細胞質のみ染色；膵管細胞が 7/10 例で評価でき、全例が陽性、ほとんどが 2+及び 3+、細胞膜と細胞質に高頻度
- 下垂体：中葉［+2］(2/5 例で前葉が陽性、1+及び 2+、いずれも細胞質に散見；1/5 例で後葉が陽性、2+、細胞質に散見)
- 前立腺：腺房上皮細胞［+3］(5 検体、1 例が陰性、1 例が上皮細胞欠損の可能性、3 例が陽性、1+～3+、細胞質に高頻度)
- 尿路上皮：尿管及び膀胱［+3］(膀胱 8 検体、2 例が 3+、1 例が 1+、その他は間質陰性；染色部位は 1 例が細胞質、他が細胞膜と細胞質)（尿管 5 検体、2+及び 3+、高頻度で細胞質より細胞膜が多い例もあり）
- 子宮：子宮内膜と子宮内膜腺［+3］(子宮内膜 5 検体：3 例が 2+、2 例が 3+；いずれも細胞質に高頻度)（子宮内膜腺 7/9 検体：4/7 例が陰性、3 例が陽性：1 例は 1+で細胞質に散見、1 例は 2+で細胞質に散見、3 例は 3+で細胞質に高頻度）

これらの組織では、多くの場合染色部位は細胞質であったが、膀胱、膵臓、肺気管支、乳房では細胞膜が染色された例もあった。脳、血液細胞、血管、間葉系細胞での染色は認められなかった。

以上のように、カニクイザルとヒトは、同様の組織交差反応性を示した。

3　副次的薬理試験

本項では、非結合 hRS7 抗体の直接的な細胞毒性効果を、リンカーを添加した場合と添加しない場合とで評価した結果について記載する。

hRS7 IgG は多数の癌細胞株と結合するが、その結合は単独でもリンカーの存在下でも細胞毒性を誘発することはない（図 10 ; CTD 4.2.1.2.1、RR-[redacted]）。ヒト腎細胞癌（RCC）、ヒト結腸癌及びヒト乳癌の細胞株について検討した結果、試験したすべての細胞株は、CEACAM6、Trop-2 のいずれか、あるいは両方を発現していることが明らかになった。

hMN15（図示せず）及び hRS7 のいずれも、in vitro で試験したいずれの細胞株に対しても、増殖阻害兆候を示すことはなかった。リンカーの添加も、同様にこれらの細胞株において増殖阻害を誘発しなかった。

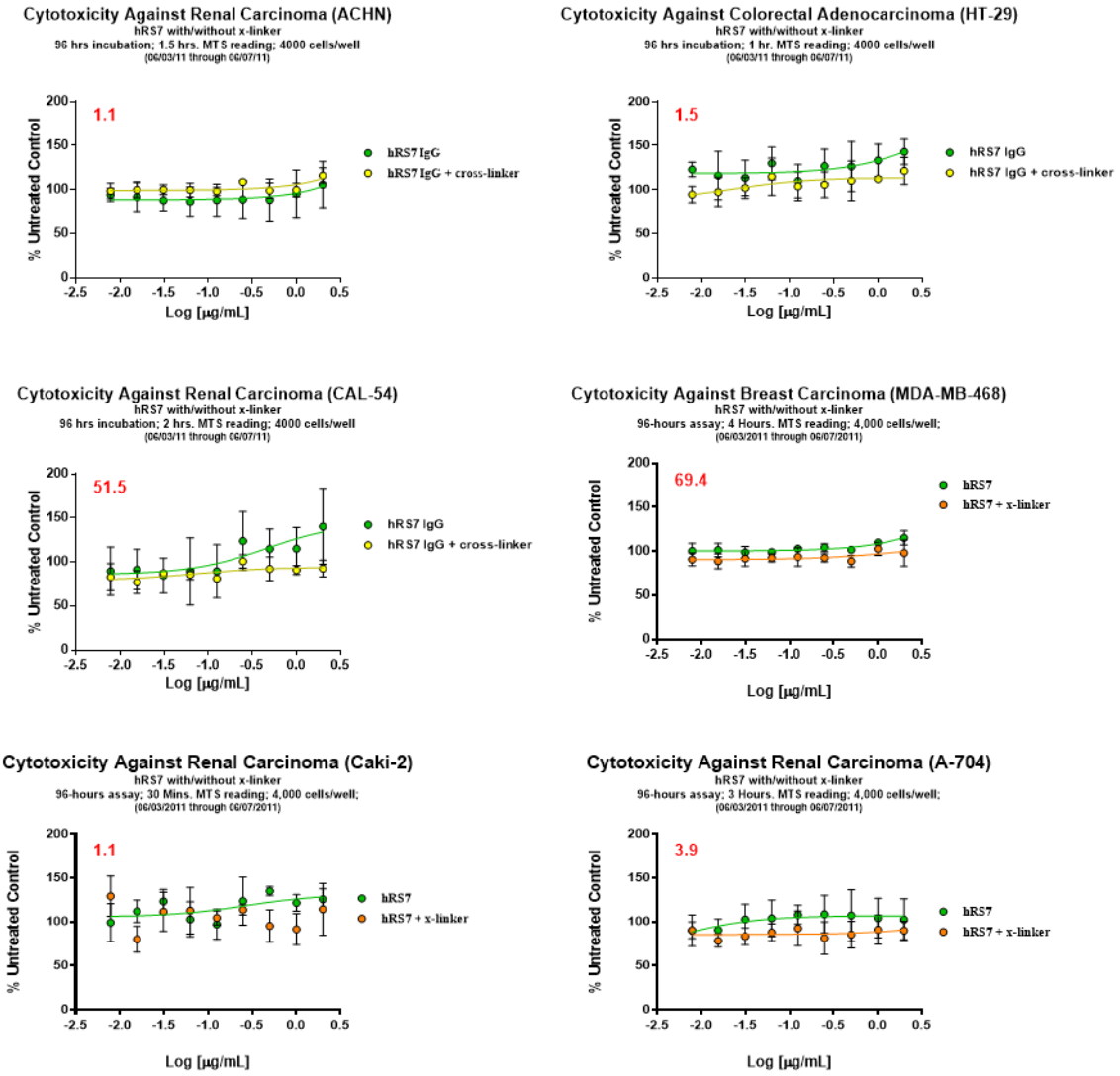
さらに、Chang らは、ME-180（子宮頸癌）、T-47D（乳癌）及び DU-145（前立腺癌）の細胞株を用いた in vitro 細胞毒性試験において、非結合 hRS7 IgG は、腫瘍増殖阻害を示さなかったとしている [18]。また、in vivo では hRS7 IgG は Calu-3 細胞株に対して治療効果がないことが報告されている。

非結合 hRS7 IgG の細胞毒性（RR-[redacted]）

非結合 hRS7 IgG（すなわち、SG の Trop-2 結合分子）の細胞毒性の可能性について、Trop-2 の発現レベルが異なる 6 種類の細胞株を用いて in vitro で検討した。6 種類の細胞株はすべて、4×10^3 細胞/50 µL/ウェルで播種した。最終抗体濃度が 2～0.0078 µg/mL となるように、hRS7 IgG を 1:2 で段階希釈した。一部のウェルには、F(ab')2 ヤギ抗ヒト IgG、Fcy フラグメント特異的架橋抗体を 10 µg/mL の最終濃度で添加した。無処理の対照ウェル（細胞のみ）には、培地のみを入れた。プレートは、37℃、加湿した 5% CO_2 インキュベーター内で 96 時間インキュベートした。インキュベーション後、すべてのプレートに MTS 基質を添加し、無処理の対照ウェルの吸光度が 1.0 に達するまで、又は 4 時間経過するまで、30 分間隔で、発色を読み取った。増殖阻害は、[redacted] 及び [redacted] ソフトウェアを用いて、無処理細胞に対する増殖率として算出した（X=log (X); 非線形回帰[シグモイド用量反応 EC_{50} 値]）。

以上の副次的薬理試験で、リンカーの存在下／非存在下にかかわらず、SG の非結合 hRS7 抗体には Trop-2 発現細胞株に対する直接的な細胞毒性がないことが明らかになった（図 10）。

図 10　hRS7 IgG とインキュベートした種々の細胞株の増殖阻害曲線
（リンカーを添加した場合と添加しない場合の比較）



Expression of Trop-2 is shown on the various graphs is based on previous results of our cell-based binding assay. The number in red represent expression as fold-signal above background. Any number greater than two is considered positive for Trop-2 surface expression.

4　　安全性薬理試験

いわゆる安全性薬理試験は実施していないが、SG のカニクイザルにおける反復投与毒性試験（CTD 4.2.3.2.3、[redacted]160.03 及び CTD 4.2.3.2.4、[redacted]160.25）で一般状態、体温、呼吸数、心電図、心拍数及び血圧の評価を行った。中枢神経系への影響を示唆する一般状態の変化はみられなかった。また、呼吸数、心電図、血圧及び心拍数にも変化は認められなかった。カニクイザルを用いた 2 つの毒性試験で測定した心電図のデータは、定性的にも定量的にも、霊長類として正常範囲内にあると考えられた。さらに、QT 及び QTc 間隔に SG 投与による影響は認められなかった。

5　薬力学的薬物相互作用

SG の薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

他の抗体医薬品と同様に、インタクトな ADC である SG は、その代謝が標準的な代謝酵素（例えば CYP）によるものではないことから、典型的な薬物相互作用を起こすとは考えにくい。しかしながら、SN-38 は、SG から放出されると、イリノテカンから放出された SN-38 と同様の薬物相互作用を生じやすいと考えられる。

SN-38 の主な代謝経路は、UDP グルクロン酸転移酵素 1A1（UGT1A1）によるグルクロン酸抱合である。したがって、UGT1A1 の阻害剤は、非複合体 SN-38 の半減期を延長させ、その毒性を増強させる可能性がある。

同様に、CYP3A4 の阻害剤は、SN-38 の曝露量を増加させる可能性がある。一方、CYP3A4 の誘導剤は、SN-38 の曝露量を減少させる可能性がある[19]。

6　考察及び結論

SG の薬力学的作用の特性を、種々の側面から検討した。まず、表面プラズモン共鳴法を用いて、hRS7 IgG 及び SG のヒト新生児受容体 FcRn 及び標的 Trop-2 への結合特性を明らかにした。Trop-2 結合ドメインの発現を種々の癌細胞株で調べ、SG に対する潜在的な感受性を確認した。次に、Trop-2 発現細胞に対する SG の細胞毒性を評価した。これらのアッセイにより、Trop-2 発現癌細胞株に対する SG の顕著な細胞毒性作用が明らかになった。この作用は、通常、比較対照として使用される遊離 SN-38 の活性よりもわずかに弱かった。

SG は Trop-2 発現細胞に対して弱い ADCC 活性を誘発したのみで、CDC 活性は示さなかった。

SG の in vivo での有効性の特性を明らかにするために、種々のマウス異種移植モデルでの試験を実施した。実施した試験の 1 つは、2 つの異なる製剤の SG の同等性／同質性を調べたものである。ほぼすべての異種移植試験において、有意な抗腫瘍効果が認められた。現在、予定している臨床適応にとって最も重要なことは、SG が TNBC のモデルで高い有効性を示し、腫瘍の増殖を著しく抑制し、動物の生存期間を延長させたことである。

1 事例を除いて、すべての in vivo 異種移植試験において、SG は、対照抗体と結合した SN-38 やイリノテカンよりも有意に強い作用を示した。

SG の第 1/2 相臨床試験用製剤と第 3 相臨床試験用製剤の比較試験では、両製剤の in vivo での同等性／同質性が確認された。

最後に、ヒト及びカニクイザルの組織の標準パネルで、SG の組織交差反応性を調べた。試験した 2 動物種で同等の組織交差反応性が認められたことから、毒性試験に用いる動物種としてカニクイザルを選択したことの妥当性が裏付けられた。

副次的薬理試験では、リンカーの存在下／非存在下における非結合 hRS7 抗体の直接的な細胞毒性及び ADCC 誘導能を評価した。SG の非結合体 hRS7 抗体部分に関するこれらの試験では、CL2A リンカーの有無にかかわらず、Trop-2 発現細胞株に対する直接的な細胞毒性はみられなかったが、軽度な ADCC 活性は認められた。なお、親抗体である hRS7 抗体と比較して ADC では細胞毒性の低下がみられた。

いわゆる安全性薬理試験は実施していないが、SG のカニクイザルにおける反復投与毒性試験において、一般状態、体温、呼吸数、心電図、心拍数及び血圧の評価を行った。これらの評価項目において、ヒトにおける SG の使用に懸念を抱かせるような SG に関連した所見は認められなかった。

以上のように、非臨床薬理試験において、in vivo で強い抗腫瘍効果が確認されたことから、Trop-2 発現癌患者への SG の使用が支持された。また、副次的薬理試験及び安全性薬理試験において、SG の臨床開発及び販売承認が懸念されるような所見は認められなかった。

7　参考文献

1 Whitacre, C. M., et al. 1999. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in response to treatment with topoisomerase I inhibitors: a potential surrogate end point to assess treatment effectiveness. Clin Cancer Res 5(3):665-72.

2 Cusack, J. C., Jr., et al. 2001. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. Cancer Res 61(9):3535-40.

3 Lagadec, P., et al. 2008. Pharmacological targeting of NF-kappaB potentiates the effect of the topoisomerase inhibitor CPT-11 on colon cancer cells. Br J Cancer 98(2):335-44.

4 Liu, Y., et al. 2009. Inhibition of Akt signaling by SN-38 induces apoptosis in cervical cancer. Cancer Lett 274(1):47-53.

5 Cardillo, T. M., et al. 2011. Humanized anti-Trop-2 IgG-SN-38 conjugate for effective treatment of diverse epithelial cancers: Preclinical studies in human cancer xenograft models and monkeys. Clin Cancer Res 17(10):3157-69.

6 Cardillo, T. M., et al. 2015. Sacituzumab Govitecan (IMMU-132), an Anti-Trop-2/SN-38 Antibody-Drug Conjugate: Characterization and Efficacy in Pancreatic, Gastric, and Other Cancers. Bioconjug Chem 26(5):919-31.

7 Goldenberg, D. M., et al. 2015. Trop-2 is a novel target for solid cancer therapy with sacituzumab govitecan (IMMU-132), an antibody-drug conjugate (ADC). Oncotarget 6(26):22496-512.

8 Wang W et al. 2011. Monoclonal antibodies with identical Fc sequences can bind to FcRn differentially with pharmacokinetic consequences. Drug Metab. Dispos. 39(9): 1469-1477.

9 Suzuki T et al. 2010. Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. J. Immunol. 184(4): 1968-1976.

10 Goldenberg, D. M., et al. 2009. Properties and structure-function relationships of veltuzumab (hA20), a humanized anti-CD20 monoclonal antibody. Blood 113(5):1062-70.

11 Fishelson Z., et al. 2003. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. Mol Immunol. 40(2-4):109-123.

12 Govindan, S. V., et al. 2009. CEACAM5-targeted therapy of human colonic and pancreatic cancer xenografts with potent labetuzumab-SN-38 immunoconjugates. Clin Cancer Res 15(19):6052-61.

13 Moon, S. J., et al. 2008. Antibody conjugates of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) for targeted cancer chemotherapy. J Med Chem 51(21):6916-26.

14 Furman, W. L., et al. 1999. Direct translation of a protracted irinotecan schedule from a xenograft model to a phase I trial in children. J Clin Oncol 17(6):1815-24.

15 Morton, C. L., et al. 2000. Activation of CPT-11 in mice: identification and analysis of a highly effective plasma esterase. Cancer Res 60(15):4206-10.

16 Thompson, J., et al. 1997. Efficacy of systemic administration of irinotecan against neuroblastoma xenografts. Clin Cancer Res 3(3):423-31.

17 Zamboni, W. C., et al. 1998. Altered irinotecan and SN-38 disposition after intravenous and oral administration of irinotecan in mice bearing human neuroblastoma xenografts. Clin Cancer Res 4(2):455-62.

18 Chang, C. H., et al. 2010. Ranpirnase (frog RNase) targeted with a humanized, internalizing, anti-Trop-2 antibody has potent cytotoxicity against diverse epithelial cancer cells. Mol Cancer Ther 9(8):2276-86.

19 Mathijssen, R. H., et al. 2001. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). Clin Cancer Res 7(8):2182-94.

サシツズマブ　ゴビテカン（遺伝子組換え）

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁

1　薬理試験：一覧表 3
2　効力を裏付ける試験 5
3　副次的薬理試験 8
4　安全性薬理試験 9
5　薬力学的薬物相互作用試験 10

1　薬理試験：一覧表

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics				
In Vitro Potency Assay Development for hRS7-CL2A-SN38: Binding and Cytotoxicity	PC-3 Cells	*In vitro*	Immunomedics Inc., NJ, USA	RR [redacted]
Comparison of hRS7 IgG and hRS7-CL2A-SN-38 Binding to the Recombinant Human TROP2/TACSTD2 (rhTrop2/TSCSTD2) via Surface Plasmon Resonance (BIACORE) Analysis	Recombinant Human TROP2/TACSTD2 (rhTrop2/TSCSTD2)	*In vitro*	Immunomedics Inc., NJ, USA	RR [redacted]
Comparison of hRS7 IgG and hRS7-CL2A-SN-38 Binding to the Human Neonatal Receptor (FcRn) via Surface Plasmon Resonance (BIACORE) Analysis	Human Neonatal Receptor (FcRn)	*In vitro*	Immunomedics Inc., NJ, USA	RR [redacted]
Comparability of hRS7 Antibodies Derived From Two Different Clones and Their Corresponding Antibody-Drug Conjugates via Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC)	MDA-MB-468 cells	*In vitro*	Immunomedics Inc., NJ, USA	TR-PD-IMMU-132-[redacted]-017
Comparability of hRS7 Antibodies Derived from Two Different Source Clones and Their Corresponding Antibody-Drug Conjugates via Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC)	MDA-MB-468 and PC-3 cells	*In vitro*	Immunomedics Inc., NJ, USA	TR-PD-IMMU-132-[redacted]-018
Efficacy in athymic nude mice bearing human TNBC tumor xenografts (MDA-MB-468)	Female NCr athymic (*nu*/*nu*) nude mice	intravenous	Immunomedics Inc., NJ, USA	[redacted]-281
Comparability of efficacy of IMMU-132 made from original clone hRS7 ([redacted]) vs. new clone ([redacted]) in athymic nude mice bearing human TNBC tumor xenografts (HCC1806)	Female NCr athymic (*nu*/*nu*) nude mice	intraperitoneal	Immunomedics Inc., NJ, USA	120415-337
Cross Reactivity of hRS7 IgG for Murine TROP-2	Murine TROP-2 ELISA	*In vitro*	Immunomedics Inc., NJ, USA	RR [redacted]

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Cross Reactivity of hRS7 IgG for Rat TROP-2	Rat TROP-2 ELISA	*In vitro*	Immunomedics Inc., NJ, USA	RR [redacted]-20[redacted]
Cross Reactivity of hRS7 IgG and Sacituzumab Govitecan for Cynomolgus Monkey TROP-2	Rhesus monkey TROP-2 ELISA	*In vitro*	Immunomedics Inc., NJ, USA	RR [redacted]-20[redacted]
Cross-Reactivity Study of hRS7 IgG-biotin with Normal Cynomolgus Monkey Tissues	Male and female Cynomolgus monkey frozen tissues	*In vitro*	[redacted] USA	IM1735
Cross-Reactivity Study of hRS7 with Normal Human Tissue	Male and female human frozen tissues	*Invitro*	[redacted] Switzerland	DMP 04_11
Secondary Pharmacodynamics				
In Vitro Growth Inhibition of Anti-CEACAM6 (hMN15) and Anti-Trop-2 (hRS7) Monoclonal Antibodies Against Renal Cell Carcinoma, Colorectal Adenocarcinoma, and Breast Adenocarcinoma	ACHN, CAL-54, Caki-2, A-704, HT-29 and MDA-MB-468 cells	*In vitro*	Immunomedics Inc., NJ, USA	RR [redacted]
Safety Pharmacology				
Safety pharmacology assessments of IMMU-132 were included into repeat-dose toxicity studies.				
Pharmacodynamic Drug Interactions				
Studies examining pharmacodynamic drug interactions of IMMU-132 were not performed.				

2　効力を裏付ける試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Admin Method	Concentration/ Doses [mg/kg]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
PC-3 cells	Human	*In vitro*	Not applicable	Not applicable	EC_{50} (IMMU-132) = 4.3 ± 0.07nM EC_{50} (free SN-38) = 1.9 ± 0.7 nM	No	RR [redacted]
Recombinant Human TROP2/TACSTD2	Human	*In vitro*	Not applicable	Not applicable	K_D (IMMU-132) = 0.26 ±0.14 nM K_D (hRS7) = 0.51 ±0.04 nM	No	RR [redacted]
Human Neonatal Receptor	Human	*In vitro*	Not applicable	Not applicable	K_D (IMMU-132) = 191.9 ±47.6 nM K_D (hRS7) = 92.4 ±5.7 nM	No	RR [redacted]
MDA-MB-468 cells	Human	*In vitro*	Not applicable	Not applicable	ADCC activity of both the antibodies and ADCs were found to be comparable, with no appreciable differences between the hRS7source	No	TR-PD-IMMU-132-[redacted]-017
MDA-MB-468 and PC-3 cells	Human	*In vitro*	Not applicable	Not applicable	The CDC assay was found not to be a relevant potency assay for determination of hRS7 or IMMU-132 activity	No	TR-PD-IMMU-132-[redacted]-018
human TNBC tumor xenografts (MDA-MB-468)	NCr athymic (*nu*/*nu*) nude mice	intravenous	Controls, Saline, 150 or 250 µg per animal in 100 µL (~7.5 or 12.5 mg/kg), twice weekly x 2 wks	8 females per group	Both the 250 and 150 µg doses of IMMU‐132 resulted in significant tumor regressions in comparison to all the treatment controls (P<0.0017, AUC).	No	[redacted]-281

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Admin Method	Concentration/ Doses [mg/kg]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
human TNBC tumor xenografts (HCC1806)	NCr athymic (*nu*/*nu*) nude mice	intra-peritoneal	Saline, 250 or 500 µg/animal in 100 µL (~12.5 or 25 mg/kg), twice weekly x 4 wks	9-10 females per group	Both sources of IMMU-132 produced significant antitumor effects when compared to saline control animals (P<0.0001, AUC) and, when administered at equivalent doses, were indistinguishable from each other in terms of therapeutic efficacy.	No	120415-337
Recombinant TROP-2	Mouse	*In vitro*	Not applicable	Not applicable	The Trop-2 binding moiety of IMMU-132 (hRS7 IgG) did not bind to murine TROP-2.	No	RR [redacted]
Recombinant TROP-2	Rat	*In vitro*	Not applicable	Not applicable	The Trop-2 binding moiety of IMMU-132 (hRS7 IgG) did not bind to rat TROP-2.	No	RR [redacted]-20[redacted]
Recombinant TROP-2	Human Rhesus monkey	*In vitro*	Not applicable	Not applicable	hRS7 IgG K_D (Human) = 0.6 ng/mL K_D (Rhesus) = 0.6 ng/mL Sacituzumab govitecan K_D (Human) = 2.4 ng/mL K_D (Rhesus) = 2.7 ng/mL	No	RR [redacted] 20[redacted]
Normal Cynomolgus Monkey Frozen Tissues	Cynomolgus monkey	*In vitro*	2 or 40 µg/mL	Male and female, ≥3 donors per tissue	Most of the IMMU-132 staining patterns observed in Cynomolgus monkey tissues were judged expected, based on the reported distribution of Trop-2 expression in human tissues.	Yes	IM1735

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Admin Method	Concentration/ Doses [mg/kg]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Normal Human Tissue (32 FDA Panel Tissues, frozen)	Human	*In vitro*	0.625 or 1.875 µg/mL	Male and female, ≥5 donors per tissue	As expected, IMMU-132 bound to selected epithelial cells. hRS7 staining was mostly cytoplasmic. No antibody binding was observed in the brain, hema-tologic cells, blood vessels or mesenchymal cells.	No	DMP 04_11

3　副次的薬理試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Admin Method	Concentration/ Doses [mg/kg]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
ACHN, CAL-54, Caki-2, A-704, HT-29 and MDA-MB-468 cells	Human	*In vitro*	Not applicable	Not applicable	hRS7 did not elicit growth inhibition against any of the cell lines tested *in vitro*. The addition of a cross-linking antibody did not cause any observable growth inhibition in these cell lines as well.	No	RR [redacted]

4　安全性薬理試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Safety pharmacology assessments of IMMU-132 were included into repeat-dose toxicity studies.

5　薬力学的薬物相互作用試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Studies examining pharmacodynamic drug interactions of IMMU-132 were not performed.