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

2.6.4 薬物動態試験の概要文

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　分析法 11
2.1　研究用の分析方法 11
2.1.1　総抗体（hRS7 + hRS7-SN-38） 11
2.1.2　遊離 SN-38、遊離 SN-38G 及び総 SN-38 11
2.1.3　SN-38 と複合体を形成した未変化 hRS7 抗体 12
2.1.4　放射性標識体の組織分布 12
2.1.5　非標識体の組織分布 12
2.1.6　免疫原性（抗 SG 抗体） 12
2.2　GLP 適合下でバリデートされた分析法 13
2.2.1　総抗体（hRS7 + hRS7-SN-38） 13
2.2.2　遊離 SN-38、遊離 SN-38G 13
2.2.3　総 SN-38 13
2.2.4　免疫原性（抗 SG 抗体） 14
3　吸収 15
3.1　SG の in vitro 血清中安定性 15
3.1.1　ヒト血清及びサル血清中における hRS7-CL2A-SN-38 の in vitro 安定性（RD-CH-[redacted]-01） 15
3.2　マウスにおける SG の薬物動態 16
3.3　ウサギにおける hRS7 IgG の薬物動態 17
3.4　カニクイザルにおける TK 18
3.5　カニクイザルにおける薬物動態／TK 20
4　分布 23
4.1　^{111}In-SG のマウスにおける生体内分布及びクリアランス 23
5　代謝（動物種間の比較） 27
6　排泄 28
7　薬物動態学的薬物相互作用 29
8　その他の薬物動態試験 30
8.1　担癌マウスにおける薬物動態 30
8.2　新規添加剤 MES の特性評価 37
8.2.1　ヒト肝ミクロソームにおける CYP 阻害剤としての MES の in vitro 特性評価（BBIA-0002-DV-TB） 38
8.2.2　ヒト肝細胞における MES の CYP1A2、2B6 及び 3A4 誘導能に関する in vitro 特性評価（BBIA-0003-DV-DA） 38
8.2.3　MES のヒト CYP に対する反応表現型解析（BBIA-0004-DV-CB、BBIA-0005-DV-CB） 38
8.2.4　[^{14}C]MES 一水和物を単回静脈内投与した雄ラットにおける放射能の薬物動

態及びマスバランス（3277-002）..... 39
9　考察及び結論 40
10　参考文献 41

表目次

頁

表 1　生体試料中薬物濃度分析法の概要 7
表 2　SG の薬物動態試験の概要 8
表 3　薬物動態／TK 試験に用いた被験物質の概要 8
表 4　[redacted].160.24 試験における薬物動態パラメータ 18
表 5　カニクイザルにおける SG の hRS7 IgG 部分の TK パラメータ 19
表 6　総 SN-38 及び遊離 SN-38 の主要な TK パラメータ 20
表 7　カニクイザルに SG を 1 時間持続注入で単回及び複数回静脈内投与した際の 全分析対象物質の平均 TK パラメータ 21
表 8　SK-MES-1 担癌 NCr 無胸腺（*nu/nu*）ヌードマウス（雌）の 生体内分布試験における群構成 23
表 9　SK-MES-1 担癌マウスにおける静脈内持続注入後の SG（hRS7-CL2A-SN-38）及び hRS7 IgG の血液中薬物動態 23
表 10　ヒト癌異種移植担癌ヌードマウスにおける組織中 SN-38 濃度 30
表 11　イリノテカン又は SG を投与したヌードマウスの血清中生成物の AUC 31
表 12　Capan-1 腫瘍又は NCI-N87 腫瘍の担癌マウスにイリノテカン又は SG を投与したときの経時的な生成物の濃度（AUC）[a] 33
表 13　AUC の腫瘍／血清比 35
表 14　イリノテカン又は SG を投与した動物の大腸内生成物の分析（試験 2） 37

図目次

頁

図 1　ヒト及びサル血清中における SG からの SN-38 の放出キネティクス 16
図 2　マウスにおける SG の薬物動態 17
図 3　60 mg/kg（左）又は 120 mg/kg（右）を静脈内持続注入後のカニクイザルにおける hRS7 IgG 及び IgG 結合型 SN-38 の平均濃度 19
図 4　SG 60 mg/kg（SN-38 換算値 0.96 mg/kg×2）を 3 日間隔で 2 回静脈内持続注入した サル 4 匹の IgG 結合型 SN-38 濃度と遊離 SN-38 濃度の比較 20
図 5　hRS7-CL2A-SN-38 及び hRS7 IgG の血液中クリアランス及び腫瘍への取り込み量 24
図 6　hRS7-CL2A-SN-38 及び hRS7 IgG の組織取り込み量 25
図 7　SG（hRS7-CL2A-SN-38）前投与による腫瘍取り込みと その後の血液中クリアランスへの影響 26
図 8　担癌ヌードマウスにイリノテカン又は SG を投与した際の各種生成物の濃度-時間曲線 ... 31
図 9　マウスにおける SG の薬物動態 32
図 10　イリノテカン又は SG 投与動物から摘出した Capan-1 腫瘍及び NCI-N87 腫瘍における抽出生成物の濃度 34
図 11　イリノテカン又は SG を投与したマウス（N = 3）の肝臓における生成物の濃度 （2 つの別々の試験で測定） 36
図 12　イリノテカン又は SG を投与したマウスの上部小腸における各生成物の含有量 （試験 1 及び試験 2 の合計、N = 3～6） 37

略号一覧表

略号	英語	日本語
10-OH-CPT	10-hydroxycamptothecin	10-ヒドロキシカンプトテシン
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADC	antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
AUC	area under the concentration versus time curve	濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-168}	area under the concentration versus time curve from time zero to time 168 hours	0 時間から 168 時間までの濃度-時間曲線下面積
BSA	bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
CL	clearance	クリアランス
C_{max}	maximum observed concentration of drug	最高薬物濃度
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DTPA	diethylenetriamine pentaacetic acid	ジエチレントリアミン五酢酸
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
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
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HRP	horseradish peroxidase	西洋わさびペルオキシダーゼ
hRS7	humanized anti-Trop-2 monoclonal antibody	ヒト化抗 Trop-2 モノクローナル抗体
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
NEM	N-ethylmaleimide	N-エチルマレイミド
MRT	mean residence time	平均滞留時間
PK	pharmacokinetics	薬物動態
SG	sacituzumab govitecan	サシツズマブ　ゴビテカン
SN-38G	SN-38 glucuronide	SN-38 グルクロン酸抱合体
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	time of maximum observed concentration	最高薬物濃度到達時間
TMB	3,3’,5,5’-tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン
Trop-2	trophoblast cell surface antigen 2	-
UGT1A1	uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1a1	UDP グルクロン酸転移酵素 1A1
ULOQ	upper limit of quantification	定量上限
USP	United States Pharmacopeia	米国薬局方

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性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。

ADC である SG の非臨床薬物動態（PK）は、オフターゲット（Trop-2 交差反応性なし）効果についてマウスで、Trop-2 標的介在性効果についてカニクイザルを用いて評価した。ADC の PK を明らかにするために 4 種類の成分について測定を行った。すなわち、1）総抗体（hRS7 + hRS7-SN-38）、2）遊離 SN-38（細胞傷害性ペイロード）、3）SN-38 グルクロン酸抱合体（SN-38G、SN-38 の不活性代謝物）、及び 4）総 SN-38（遊離 SN-38 + hRS7-SN-38）の 4 成分である。また、サルの試験では、抗 hRS7-SN-38 抗体を指標として免疫原性についても評価した。サルにおける重要な反復投与毒性試験（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適合、CTD 4.2.3.2.4、[redacted].160.25）では、トキシコキネティクス（TK）及び免疫原性の評価にバリデートされた分析法（GLP適合）を用いた。その他の試験には、研究用の分析方法を用いた。製法 A/B 剤（第 1/2 相臨床試験用製剤）と製法 C 剤（第 3 相臨床試験用製剤[市販予定製剤]）の PK を 2 種の動物種で比較評価した。すなわち、オフターゲット効果（抗体による影響のみ）については Trop-2 交差反応種ではないウサギを、Trop-2 標的介在性の効果（ADC による影響）についてはサルを用いて評価した。生体試料中薬物濃度分析法、PK 試験及び被験物質の概要は、それぞれ表 1、表 2 及び表 3 に記載した。それ以外の情報は、参考文献の項に挙げた文献から得たものであり、該当する文献については本文中に引用した。

さらに、SG 製剤に含まれる新規添加剤である 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸（MES、分子量 195.233）については、一連の肝代謝試験並びにラットにおける排泄及びマスバランス試験を実施し、その特性を明らかにした。

なお、本モジュールでは、hRS7 については hRS7 抗体又は hRS7 IgG、SN-38 については SN38 とも表記した。

表 1　生体試料中薬物濃度分析法の概要

分析法	GLP 適合性	試験施設	アッセイ番号
ELISAによる生体試料中のhRS7 IgG/hRS7-SN-38の定量	非適合	Immunomedics	Q931
ELISA による SN-38 と複合体を形成した hRS7 の定量	非適合	Immunomedics	Q779
インライン蛍光検出による逆相高速液体クロマトグラフィーを用いたヒト血清中の遊離及び総SN-38、並びにSN-38Gの定量分析	非適合	Immunomedics	Q973

分析法	GLP 適合性	試験施設	アッセイ番号
ELISAによる生体試料中の抗hRS7/hRS7-SN-38抗体の定量	非適合	Immunomedics	Q933A
電気化学発光法によるカニクイザル血清中のhRS7　IgG及びhRS7-SN-38の定量	適合	[redacted]	VIMME1707E1
LC-MS/MSによるサル血清中の遊離SN-38及びSN-38グルクロン酸抱合体の測定	適合	[redacted]	VIMME1702E1
LC-MS/MSによるサル血清中の総SN-38の測定	適合	[redacted]	VIMME1703E1
電気化学発光（ECL）法によるサル血清中の抗hRS7-SN-38抗体の検出	適合	[redacted]	VIMME1713E1

表 2　SG の薬物動態試験の概要

試験の種類	試験系	投与方法	試験番号
吸収			
ヒト血清及びサル血清中における hRS7-CL2A-SN-38 の in vitro 安定性	カニクイザル及びヒト	Ex vivo	RD-CH-[redacted]-01
ニュージーランドホワイトウサギにおける hRS7-[redacted]、hRS7-[redacted]（IMMU）及び hRS7-[redacted]（[redacted]）の単回静脈内投与後の薬物動態試験	ニュージーランドホワイトウサギ	静脈内持続注入	[redacted].160.24
カニクイザルにおけるhRS7-SN-38（IMMU-132）の反復投与毒性試験及び4週間回復性試験	カニクイザル	静脈内持続注入	[redacted].160.03
カニクイザルにおけるIMMU-132の毒性試験	カニクイザル	静脈内持続注入	[redacted].160.25
分布			
ヒト肺扁平上皮癌細胞（SK-MES-1）を異種移植した担癌無胸腺ヌードマウスにおけるIMMU-132及びhRS7 IgGの生体内分布	マウス	急速静脈内投与、腹腔内投与	031210-156
その他の薬物動態試験			
Capan-1担癌マウスにおけるhRS7-CL2A-SN-38及びイリノテカンの薬物動態	マウス	急速静脈内投与	012014-275
NCI-N87ヒト胃癌担癌マウスにおけるhRS7-CL2A-SN-38及びイリノテカンの薬物動態	マウス	急速静脈内投与	062714-291

表 3　薬物動態／TK 試験に用いた被験物質の概要

試験の種類	被験物質のロット	特記事項	試験番号
吸収			
ヒト血清及びサル血清中における hRS7-CL2A-SN-38 の in vitro 安定性	hRS7-CL2A-SN-38; ロット番号 [redacted]	抗体クローン [redacted]（製法 C） MES 緩衝液（新規添加剤）を使用	RD-CH-[redacted]-01
ニュージーランドホワイトウサギにおける hRS7-[redacted]、hRS7-[redacted]（IMMU）及び hRS7-[redacted]（[redacted]）の単回静脈内投与後の薬物動態試験	hRS7-[redacted] (hRS7 IgG バルク; hRS7 IgG [クローン [redacted]]); ロット [redacted] hRS7-[redacted] (IMMU; hRS7 IgG バルク; hRS7 IgG, [クローン [redacted]]): ロット [redacted] hRS7-[redacted] ([redacted]; hRS7 IgG [[redacted], クローン [redacted]]); ロット [redacted]	Immunomedics と [redacted] でのクローン [redacted] の製造工程を比較 クローン [redacted]（製法 A/B）とクローン [redacted]（製法 C）を比較	[redacted].160.24
カニクイザルにおけるhRS7-SN-38（IMMU-132）の反復投与毒性試験及び4週間回復性試験	IMMU-132 ロット番号 [redacted]	hRS7 抗体クローン [redacted]（製法 A/B）を使用 MES 緩衝液（新規添加剤）を使用	[redacted].160.03

試験の種類	被験物質のロット	特記事項	試験番号
カニクイザルにおけるIMMU-132の毒性試験	IMMU-132（抗体クローン[redacted]）（第3相臨床試験用製剤; hRS7-SN-38; 製法C）; P/N (Part number): [redacted]; C/N (Control number): [redacted] IMMU-132（抗体クローン[redacted]）（第1/2相臨床試験用製剤; hRS7-SN-38; 製法A/B）; P/N (Part number): [redacted]; C/N (Control number): [redacted]	抗体クローン[redacted]（製法A/B）と抗体クローン[redacted]（製法C）を比較 MES緩衝液（新規添加剤）を使用	[redacted].160.25
分布			
ヒト肺扁平上皮癌細胞（SK-MES-1）を異種移植した担癌無胸腺ヌードマウスにおけるIMMU-132及びhRS7 IgGの生体内分布	hRS7‐CL2A‐SN-38; ロット番号[redacted] hRS7‐(DTPA)‐CL2A‐SN-38; ロット番号[redacted] hRS7‐(DTPA); ロット番号[redacted] hRS7 IgG; ロット番号[redacted]	抗体クローン[redacted]（製法A/B） MESは含有せず	031210-156
その他の薬物動態試験			
Capan-1担癌マウスにおけるhRS7-CL2A-SN-38及びイリノテカンの薬物動態	[redacted]	抗体クローン[redacted]（製法A/B） MESは含有せず	012014-275
NCI-N87ヒト胃癌担癌マウスにおけるhRS7-CL2A-SN-38及びイリノテカンの薬物動態	hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132); ロット番号[redacted]	抗体クローン[redacted]（製法A/B） MESは含有せず	062714-291
ヒト肝ミクロソームを用いたシトクロムP450酵素の潜在的阻害剤としての2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)のin vitro特性評価	[redacted]	MESの代謝試験	BBIA-0002-DV-TB
ヒト肝細胞を用いたCYP1A2、CYP2B6及びCYP3A4の誘導能に関する2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)のin vitro特性評価	[redacted]	MESの代謝試験	BBIA-0003-DV-DA
2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸（MES）ヒトシトクロムP450酵素反応表現型解析	[redacted]	MESの代謝試験	BBIA-0004-DV-CB, BBIA-0005-DV-CB
[^{14}C]MES一水和物を単回静脈内投与した雄ラットにおける放射能の薬物動態及びマスバランス	[redacted]及び[redacted]（^{14}C物質）	MESのマスバランス及び排泄試験	3277-002

SN-38と複合体を形成したhRS7、hRS7抗体、遊離SN-38、総SN-38及びSN-38Gの分析法が確立されている。これらの分析対象物のPKに関しては、血清／血液中及び担癌マウスの腫瘍組織を含む様々な組織においてその特性が明らかにされている。また、SG由来のSN-38のPK及び分布を、イリノテカン投与によるものと比較した。

さらに、カニクイザルのSG反復投与毒性試験における免疫原性の評価をサポートするため、抗SG抗体の検出方法が確立されている。TK測定の結果については、毒性試験の概要文（CTD 2.6.6項）に要約した。なお、カニクイザルのTKデータは、SGのPKについて重要な情報であることから、本モジュールにも記載した。

全体として、SGのPKは良好なプロファイルを示し、イリノテカンの直接投与と比較すると、SN-38の全身への低い曝露量でより高い腫瘍組織への曝露量をもたらした。

カニクイザルを用いた短期反復投与毒性試験におけるTK測定の結果、用量依存的な曝露量の

増加が認められたが、性差はみられなかった。また、サルにおける終末相の消失半減期は約 5 日であり、試験 1 日及び 4 日の投与により若干の累積が認められた。なお、本試験では抗 SG 抗体は検出されなかった。

カニクイザルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験における TK 測定では、総抗体、総 SN-38 及び遊離 SN-38 の用量依存的な曝露量の増加が認められた。初回投与時の最高薬物濃度（C_{max}）及び 0 時間から 168 時間までの濃度-時間曲線下面積（AUC_{0-168}）は、ほぼ用量に比例して増加した。最終投与日である試験 71 日の C_{max} 及び AUC_{0-168} は、用量比を上回って増加した。概して、曝露量の雌雄間の差は 2 倍未満であった。AUC_{0-168} 及び C_{max} の値に基づくと、遊離 SN-38 の曝露量は、総 SN-38 の曝露量のそれぞれ平均 2.26%及び 1.52%であった。このデータは、SG として投与された SN-38 の大部分が、血清中では ADC として結合したままであり、細胞傷害性ペイロードである遊離 SN-38 としては循環していないことを裏付けている。代謝物である SN-38G は、血清中に容易に出現し、雌雄とも最高薬物濃度到達時間（T_{max}）の平均値は試験 1 日では 4.0～12 時間、試験 71 日では 2.0～11 時間であった。また、初回及び最終投与時における SN-38G の C_{max} 及び AUC_{0-168} の増加は、厳密には用量に比例していなかった。概して、雌雄間の曝露量の差は 2 倍未満であった。総抗体、総 SN-38、遊離 SN-38 及び SN-38G の曝露量は、25 mg/kg 投与時の 3 群（製法 C；第 3 相試験用製剤）及び 5 群（製法 A/B；第 1/2 相臨床試験用製剤）で、特に試験 1 日の初回投与後は同程度であった。抗薬物抗体（ADA）は SG を投与したすべての動物で検出されたが、総抗体、総 SN-38 及び遊離 SN-38 の血清中曝露量に対する ADA の影響は用量依存的であると考えられ、低用量では変動が大きく、試験 71 日の曝露量は試験 1 日より概して低く、高用量の試験 71 日の曝露量は ADA 形成による影響はほとんどみられなかった。

SG の代謝又は排泄に関する詳細な試験は実施していない。ADC の抗体部分の代謝は、他の免疫グロブリン G（IgG）抗体と同様の様式で異化されると推定される。SG から一度放出された SN-38 は、イリノテカン由来の SN-38 と同様の様式で代謝・排泄されると考えられる（SN-38 の代謝に関する詳細については、Mathijssen らの報告 [1] を参照）。SN-38 の主な代謝経路は、UDP グルクロン酸転移酵素 1A1（UGT1A1）を介した不活性代謝物である SN-38G への肝代謝である。ヒトとカニクイザルにおける UGT1A1 代謝は類似しており、毒性がみられる動物種における SN-38 及び SN-38G の PK プロファイルを裏付けている [2]。

SG 製剤に使用されている新規添加剤である MES の代謝、マスバランス及び排泄について、ヒト肝代謝試験（CTD 4.2.2.7.3、BBIA-0002-DV-TB、CTD 4.2.2.7.4、BBIA-0003-DV-DA、CTD 4.2.2.7.5、BBIA-0004-DV-CB、BBIA-0005-DV-CB）及びラット静脈内投与時の放射性標識体のマスバランス及び排泄試験（CTD 4.2.2.7.6、3277-002）でその特性を明らかにした。臨床相当の投与量では、MES はヒトの肝シトクロム P450（CYP）酵素を阻害又は誘導せず、ヒト CYP 酵素によって代謝されることもなかった。また、MES は尿中に速やかに排泄され、尿中に回収された総量の 98.87%は投与後 24 時間までに排泄された。

ADC 未変化体による薬物相互作用の可能性は低いと考えられる。肝 UGT1A1 酵素を変動させる薬剤と SN-38 の薬物相互作用は十分に検討されていることから [1]、改めて検討することはしなかった。

以上のように、SG の非臨床 PK は、進行癌患者を対象とした本薬の製造承認申請をサポートするために、適切に特性が明らかにされていると言える。

2　分析法

生体試料中薬物濃度分析法はImmunomedics社GMP施設において開発した。これらの方法は、SN-38と複合体を形成したhRS7、総hRS7抗体（遊離hRS7とSG未変化体の両方）、SN-38及び抗SG抗体の定量に適切であることが確認された。これらの方法は、正式にはGLPに適合していないが、コントロールされた実験環境下で実施され、マウスのPK及び分布試験、カニクイザルの短期毒性試験（CTD 4.2.3.2.3、[redacted].160.03）及びウサギでのクローン比較試験（CTD 4.2.2.2.1、[redacted].160.24）で得られた試料の分析に用いた。詳細を以下（2.1項）に示す。

サル血漿中の総hRS7抗体（遊離hRS7及びSG未変化体）、遊離SN-38、SN-38G、総SN-38（遊離SN-38 + 結合型SN-38）及び抗SG抗体の分析法はGLP適合下でバリデートされている（2.2項）。これらの方法は、重要な反復投与試験であるカニクイザルの毒性試験（CTD 4.2.3.2.4、[redacted].160.25）で得られた試料の分析に用いた。

2.1　研究用の分析方法

2.1.1　総抗体（hRS7 + hRS7-SN-38）

研究用の分析方法（CTD 4.2.2.1.1、Q931）：hRS7 IgGに特異的なラット抗イディオタイプ抗体（WUと定義）をマイクロタイタープレートに2～8ºCで一晩コートし、1%ウシ血清アルブミン（BSA）でブロックした。hRS7 IgG-西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）を、適切に希釈した血清及び標準（hRS7 IgG）試料と混合し、WUコートしたマイクロタイタープレートに3連で分注した。プレートに結合した抗体は3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を基質として検出した。検量線の範囲はhRS7 IgGとして0.25～7.5 µg/mLであった。試料の最小希釈倍率は1：2であったことから、血清中の定量下限（LLOQ）は0.5 µg/mLであった。

2.1.2　遊離SN-38、遊離SN-38G及び総SN-38

研究用の分析方法（CTD 4.2.2.1.3、Q973）：血清試料に10-ヒドロキシカンプトテシン（10-OH-CPT）を内部標準として添加し、アセトニトリルと混合してタンパク質を沈殿させた後、過塩素酸で酸性化してクロロホルムで抽出した。クロロホルム相を分離して蒸発させ、残渣を希過塩素酸／アセトニトリルに再溶解させた。この試料について、インライン蛍光検出器（励起波長380 nm／蛍光波長556 nm）を備えた逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いてde Bruijnらの方法[3]により遊離SN-38及びSN-38Gを分析した（CTD 4.2.2.1.3、Q973）。本分析法によるSN-38のLLOQ及び定量上限（ULOQ）はそれぞれ5及び10000 ng/mL、SN-38GのLLOQ及びULOQはそれぞれ10及び10000 ng/mLであった。

試料中の総SN-38を測定するために、塩酸（3規定）存在下、試料を50°Cで15～17時間加熱し、その後水酸化ナトリウム溶液（6規定）を加えて部分的に中和することにより、SN-38をADCから放出させた。10-OH-CPTを内部標準として添加し、試料を抽出した後、上記と同様にSN-38の分析を行った。本分析法による総SN-38のLLOQ及びULOQはそれぞれ5及び10000 ng/mLであった。

2.1.3　SN-38 と複合体を形成した未変化 hRS7 抗体

研究用の分析方法（CTD 4.2.2.1.8、Q779）：サンドイッチ酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を用いて、SN-38 と複合体を形成した hRS7 抗体の濃度を測定した[4]。マウス抗 SN-38 モノクローナル抗体である SG2 を高結合性の平底 96 ウェルプレート（Nunc No 442404 又は同等品）にコートし、2～8°C で一晩インキュベートした。その後、プレートを洗浄し、1%BSA でブロックした。標準試料及び検体を WU-HRP（HRP を結合させた抗 hRS7 抗体）と混合し、3 連でプレートに添加した後、室温暗所で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、TMB 基質溶液を各ウェルに添加し、室温暗所で 10 分間インキュベートした。反応停止試液（Fisher No. NC9141468）を添加して反応を停止させ、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm における吸光度を測定した。検量線を用いて hRS7-SN-38 濃度を算出した。

2.1.4　放射性標識体の組織分布

研究用の分析方法（組織分布試験 CTD 4.2.2.3.1、031210-156 において使用）：各群のマウスに ^{111}In-hRS7-CL2A-SN-38（1 及び 3 群）又は ^{111}In-hRS7 IgG（2 群）を投与した。試験終了時に、組織及び血液を採取し、重量を測定後、ガンマカウンターで計数するために容器に入れた。^{111}In-hRS7-CL2A-SN-38（1 及び 3 群）及び ^{111}In-hRS7 IgG の濃度は、^{111}In 用の校正済みガンマカウンター［Minaxi γ Auto Gamma® 5000 シリーズガンマカウンター：製造番号 86445（Packard Instrument Company; Downers Grove, IL)］を用いて測定した（チャンネル 120-480)。組織及び血液の重量、投与総放射能（計数標準に基づく）及び検出された放射能に基づいて、各マウスのすべての組織及び血液について、組織又は血液 1 グラム当たりの投与量に対するパーセンテージ(% ID/g)を算出した。

2.1.5　非標識体の組織分布

研究用の分析方法（CTD 4.2.2.7.1、012014-275、CTD 4.2.2.7.2、062714-291 及び Sharkey らの試験[5]で使用）：組織（腫瘍、肝臓、並びに小腸及び大腸の内容物）を水中でホモジナイズした（組織 1 に対して水 10 の割合)。血清は等量の水で希釈した。希釈した血清又はホモジネートに内部標準（10-OH-CPT）を添加後抽出し、イリノテカン、遊離 SN-38 又は SN-38G を測定した。ホモジネート又は希釈血清の 2 つ目の試料は、内部標準を添加し、酸で加水分解した後、抽出し、総 SN-38 含有量を求めた。この抽出物を逆相 HPLC で分析し、イリノテカン、SN-38 及び SN-38G を定量した。血清中の検出感度は 20 ng/mL、組織ホモジネート中の検出感度は 110 ng/mL であった。

2.1.6　免疫原性（抗 SG 抗体）

研究用の分析方法（CTD 4.2.2.1.2、Q933A）：ヒト及びサルにおける免疫原性を評価するために、SG に対する抗体に特異的な ELISA を開発した。この方法については、ヒト試料を用いて適格性を確認した。同じ方法を用いて、カニクイザルの短期試験（CTD 4.2.3.2.3、[redacted].160.03）における免疫原性を評価した。

2.2　GLP 適合下でバリデートされた分析法

バリデートされた分析法の概要を以下に示す。バリデーション結果の詳細は、各バリデーションレポート（CTD モジュール 4）に記載した。

2.2.1　総抗体（hRS7 + hRS7-SN-38）

バリデートされた分析方法（CTD 4.2.2.1.6、VIMME1707E1）：WU-Anti-hRS7-IgG 抗体を標準結合 MSD プレートにコートし、2～8°C で一晩インキュベートした。プレートは洗浄、ブロッキング後、再度洗浄した。標準試料、Quality Control 試料（100%カニクイザル血清で作成）及び未知試料を 0.25%ヤギ及びウサギ血清バッファー含有 3% BSA + 0.5 mmol/L 塩化ナトリウム溶液を含む 1×PBST で 1：50（最小必要希釈倍率［MRD］）に希釈し、室温でインキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、一次検出抗体を所定のウェルに加え、1 時間インキュベートした後、洗浄を行った。二次検出抗体は、1%BSA 含有 1×PBST で希釈後、所定のウェルに添加し、インキュベート、洗浄後、2×MSD リードバッファーT で検出した（MSD Sector Imager S600 で読み取り）。本分析法による総抗体の LLOQ 及び ULOQ はそれぞれ 368 及び 3000 ng/mL である。

2.2.2　遊離 SN-38、遊離 SN-38G

バリデートされた分析方法（CTD 4.2.2.1.4、VIMME1702E1）：サル血清に、遊離 SN-38、SN-38G、並びに内部標準である SN-38-d_3 及び SN-38G-$^{13}C_6$ を添加した。固相 96 ウェル法を用いて血清から測定対象物質を抽出し、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法（LC-MS/MS）を用いて各測定対象物質のプリカーサーイオンとプロダクトイオンを特異的に検出した。本分析法による LLOQ 及び ULOQ は、SN-38 及び SN-38G ともに、それぞれ 5.00 及び 2500 ng/mL であった。

2.2.3　総 SN-38

バリデートされた分析方法（CTD 4.2.2.1.5、VIMME1703E1）：ADC（hRS7-SN-38）に結合した SN-38 を、酸加水分解により抗体から解離させた。次いで、（未結合の）遊離 SN-38 及び酸で解離させた SN-38 を定量し、「総」SN-38 とした。カニクイザル血清から、総 SN-38 及び添加した内部標準（SN-38-d_3）をタンパク質沈殿及び塩析により抽出し、塩酸を用いて 50ºC、15～17 時間、黄色灯下で加水分解を行った。抽出後、C18 (50 × 2.0 mm, 5 μ) 分析カラムを用いた逆相 HPLC で残渣をクロマトグラフィーにかけた。SN-38 及び SN-38-d_3 は、Applied Biosystems Sciex API5000 又は API5500 LC-MS/MS を用いて、プレカーサーイオン及びプロダクトイオン（SN-38 は m/z 393→349.4、SN-38-d_3 は m/z 396.2→352.4）をモニターすることにより、検出した。SN-38 濃度は、内部標準を用いた検量線から算出した。本分析法による LLOQ 及び ULOQ は、それぞれ 50.0 及び 25000 ng/mL であった。

2.2.4　　免疫原性（抗 SG 抗体）

バリデートされた分析方法（CTD 4.2.2.1.7、VIMME1713E1）：抗 hRS7-SN-38 抗体の二価の結合能を利用して、ビオチン化 hRS7-SN-38 及びルテニル化 hRS7-SN-38 と架橋複合体を形成し、電気化学発光免疫測定法により相対発光単位（RLU）に基づいて血清中の抗 hRS7-SN-38 抗体を測定した。ADA の検出は、抗体の存在を検出するスクリーニングアッセイ、抗体の特異性を決定する確認アッセイ、及び抗体反応の半定量的測定を行う滴定アッセイの 3 段階アプローチで実施した。

3　吸収

SGのPK試験として、in vitroにおけるヒト及びカニクイザル血清中安定性評価（Goldenbergらの報告[6]及びCTD 4.2.2.2.2、RD-CH-[redacted]-01）、マウスにおけるSG及びhRS7 IgG（修飾及び非修飾）のPK試験[4]、ウサギにおける非結合抗体hRS7の異なるバッチの評価（CTD 4.2.2.2.1、[redacted].160.24）、並びにカニクイザルにおける2つの反復投与毒性試験におけるTK評価（CTD 4.2.3.2.3、[redacted].160.03及びCTD 4.2.3.2.4、[redacted].160.25）を実施した。SGは、マウス及びウサギのTrop-2と交差反応せず、カニクイザルのTrop-2には交差反応性がある。TK測定の結果については、毒性試験の概要文（CTD 2.6.6項）に要約した。カニクイザルのTKデータは、SGのPKについて重要な情報であることから、本モジュールにも記載した。

3.1　SGのin vitro血清中安定性

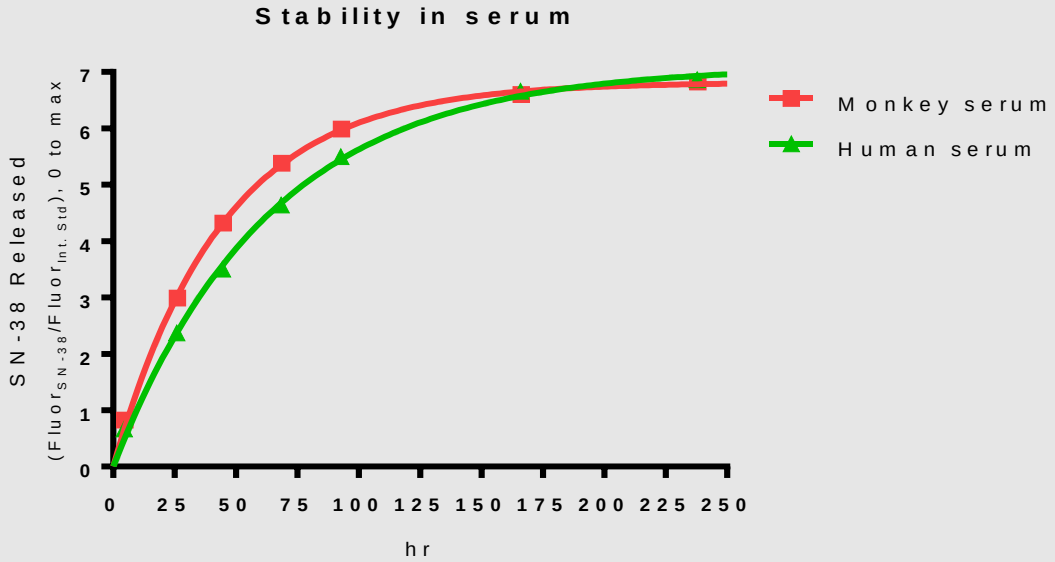
3.1.1　ヒト血清及びサル血清中におけるhRS7-CL2A-SN-38のin vitro安定性（RD-CH-[redacted]-01）

SGの37℃における最大240時間までの血清中安定性をin vitroで測定した。ヒト及びカニクイザルの血清は、冷凍保存された市販品を購入した。血清試料は、0.3 mg/mL SG及び1 µg/mL内部標準（10-OH-CPT）と共に、5% CO_2インキュベーター内で37℃、最大240時間インキュベートし、細胞毒性ペイロード（SN-38）の放出速度を測定した。所定の時間に、インキュベートした血清試料の一部を1：1：1の1M硫酸亜鉛／エチレングリコール／メタノールと混合し、タンパク質を沈殿させた。その上清を、インライン蛍光検出器を備えた逆相HPLCにより分析した。HPLCピーク面積比（SN-38／内部標準）を時間の関数としてプロットした。標準[redacted]ソフトウェアを用いてキネティックプロットを作成した。インキュベーション時間ゼロから開始し、速度定数KでY_{max}まで上昇する1相性の指数関数の式を用い、半減期を$0.69/K$として算出した。

In vitro試験の結果、SN-38はサル及びヒト血清中で、それぞれ31時間及び44時間の半減期でSGから放出されることが明らかになった（図1）。これらの値は、サル及びヒト血清中の半減期が約1日であったGoldenbergの報告[6]と同様であった。腫瘍では、SN-38は、SGが細胞表面のTrop-2に結合した後、未変化のSGが直接内在化することによって細胞内に取り込まれる可能性がある。あるいは、SN-38は腫瘍の微小環境下で局所的に遊離されることもある。その場合、SN-38は細胞膜を容易に透過できることから、未変化のSG複合体の一部として内在化されることなく、腫瘍細胞内に送達されることが期待される。したがって、SGは、複合体の内在化又は酸性腫瘍微小環境内での局所的な放出によって、SN-38を腫瘍細胞に選択的に送達することができる。

図 1　ヒト及びサル血清中における SG からの SN-38 の放出キネティクス

	Monkey serum	Human serum
Ymax	6.816	7.099
K	0.02249	0.01572
HalfLife	30.82	44.1



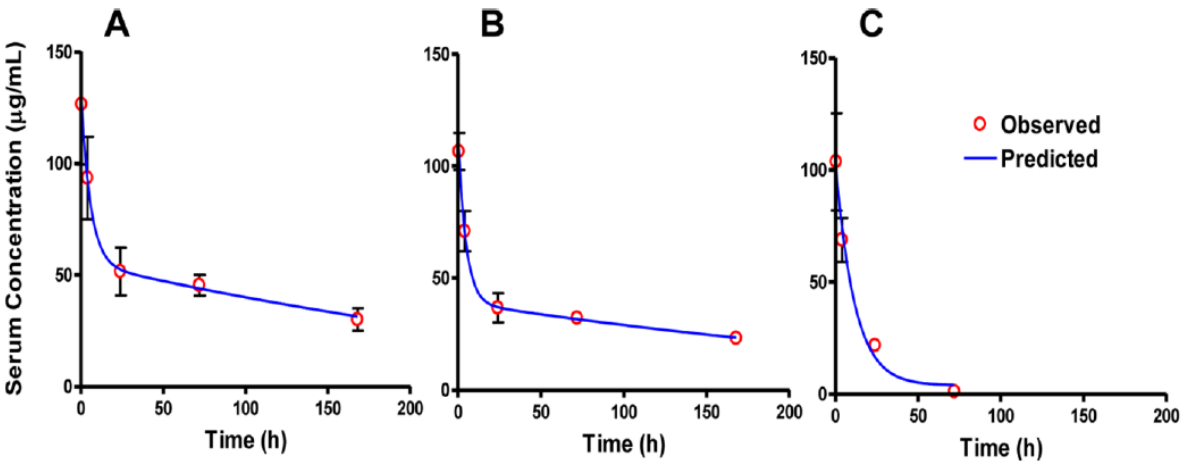
	Monkey serum			Human serum		
X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
4.50				0.6862	0.6491	0.6718
4.78	0.8299	0.8324	0.8193			
25.88				2.3723	2.3644	2.3810
26.17	2.9780	3.0020	2.9882			
44.58				3.5033	3.5053	3.4920
44.85	4.3143	4.3221	4.3146			
68.43				4.6477	4.6303	4.6476
68.70	5.3769	5.3781	5.3834			
92.65				5.5129	5.4832	5.4893
92.92	6.0053	5.9873	5.9748			
165.88				6.6594	6.6812	6.6291
166.15	6.6110	6.6024	6.5901			
237.82				6.8946	6.8478	6.8437
238.08	6.8446	6.8130	6.8053			

3.2　マウスにおける SG の薬物動態

マウスを用いて、ADC の hRS7 IgG 部分と SG のクリアランスを、親抗体である hRS7 IgG のクリアランスと比較した[4]。SG はマウスの Trop-2 に結合しないことから、SG のクリアランス値は Trop-2 に依存しないクリアランスを表す。親抗体である hRS7 IgG を投与した動物の推移（図 2A）は、SG の hRS7 標的部分で観測された推移（図 2B）と同様の二相性のクリアランスパターンを示し、α及びβ相の半減期はそれぞれ約 3 時間及び約 200 時間であった。一方、SG 未変化体の半

減期は 11 時間、平均滞留時間（MRT）は 15.4 時間であり、迅速なクリアランスが認められた（図 2C）。鎖間ジスルフィド結合の開裂が標的抗体の PK を変化させないことをさらに確認するために、親抗体である hRS7 の PK を修飾 hRS7（TCEP で処理し、N-エチルマレイミド［NEM］を結合した hRS7；hRS7-NEM）の PK と比較した。半減期、血清中 C_{max}、濃度-時間曲線下面積（AUC）、クリアランス（CL）、及び MRT に有意差は認められなかった（データ未掲載）。

図 2　マウスにおける SG の薬物動態



Pharmacokinetic parameters estimated from the above referenced clearance curves

Drug	$T_{½\alpha}$ (h)	$T_{½\beta}$ (h)	AUC (h*µg/mL)	CL (mL/h)	C_{Max} (µg/mL)	MRT (h)
Unconjugated hRS7	**3.9**	**195**	**16239**	**0.012**	**133.3**	**273.6**
hRS7 Moiety of IMMU-132	**3.2**	**224**	**13112**	**0.015**	**115.0**	**314.2**
IMMU-132 (intact)	**11**	**N.A.**	**1516**	**0.133**	**103.6**	**15.4**

N.A., not applicable

Naïve nude mice (N = 5) were injected i.v. with 200 µg of sacituzumab govitecan. At various time points, these mice were bled, and serum was obtained and analyzed for intact conjugate and carrier hRS7 antibody. For comparison, another group of mice was injected with 200 µg of parental hRS7. (A) Serum concentration and clearance of hRS7 from parental control injected mice. Concentration and clearance of (B) hRS7 carrier antibody *versus* (C) intact conjugate from IMMU-132-injected mice. Graphed data shown as mean ± SD. N.A., not applicable.

3.3　　ウサギにおける hRS7 IgG の薬物動態

第 1/2 相臨床試験用の SG の製造に用いられた hRS7 IgG（hRS7-[redacted]）（製法 A/B）と第 3 相臨床試験用に新しいクローンから製造された hRS7 IgG（hRS7-[redacted]）（製法 C）を比較するために、ウサギを用いた PK 試験（CTD 4.2.2.2.1、[redacted].160.24）を実施した。第 3 相臨床試験用の hRS7 IgG（製法 C）は、Immunomedics 社と [redacted] 社の 2 箇所の異なる製造元で精製された hRS7 IgG について評価した。各種 PK パラメータを測定し、計 3 種類の試験物質について総合的に比較評価した。SG はウサギの Trop-2 には結合しないことから、この試験では Trop-2 非依存性の PK が評

価されたことになる。なお、3.4 項では、Trop-2 依存性の PK を評価するためにサルを用いた。

ニュージーランドホワイトウサギ 6 匹（雌雄各 3 匹／群）に、由来の異なる 3 種類の hRS7 IgG を 15 mg/kg の用量で急速静脈内注射により単回投与した。すなわち、第 3 相臨床試験で使用された Immunomedics 社のオリジナルクローン（hRS7-[redacted]）（1 群；製法 A/B）、第 3 相臨床試験で使用するために Immunomedics 社で製造された新規 hRS7 クローン（[redacted]）（2 群；製法 C）、及び同じ新規 hRS7 クローンであるが、IgG は [redacted] 社製（hRS7 [redacted]）（3 群；製法 C）の 3 種である。血清試料を試験 1 日の 0.083、1、4、8、24、48、120、168、240、及び 336 時間に採取し、hRS7 IgG を研究用の ELISA（CTD 4.2.2.1.1、Q931）で分析した。試験 15 日に最終血清試料を採取し、研究用の分析方法（CTD 4.2.2.1.2、Q933A）を用いてウサギ抗 hRS7 IgG 抗体反応を評価した。

PK 解析ソフトウェア [redacted] を用いて、各個体別のウサギの血清中 hRS7 IgG 濃度を用いて PK パラメータを算出した。PK 比較のため、P 値 0.05 未満（両側 t 検定）、又は一般的なガイドラインとして最大 30%の差を、バッチ間の比較可能性を定義するための許容閾値とした。本試験で得られた主な PK パラメータを表 4 にまとめた。

表 4　[redacted].160.24 試験における薬物動態パラメータ

Group	N	C_{max} (µg/mL)	$t_{½}\alpha$ (h)	$t_{½}\beta$ (h)	$AUC_{0.08\rightarrow\infty}$ (h*µg/mL)	CL (mL/h)
hRS7-[redacted]	6	480.2 ± 27.8	3.70 ± 1.29	178.5 ± 78.7	60,006 ± 20,290	0.77 ± 0.23
hRS7-[redacted]	6	439.7 ± 43.7	3.26 ± 1.30	177.2 ± 76.8	57,877± 18,669	0.79 ± 0.22
hRS7-[redacted] ([redacted])	5*	474.4 ± 43.0	4.19 ± 1.41	253.6 ± 34.8	75,002± 6,710	0.56 ± 0.06

* Rabbit 14 was identified as an outlier by a Grubbs' test and censored from all data analysis.

いずれの PK パラメータに関しても、hRS7-[redacted] と hRS7-[redacted]（いずれかの由来）の間で有意差は認められなかった。さらに、由来が異なる 2 種類の hRS7-[redacted] の間にも有意差はみられなかった。

各群の 1 例で検出可能な濃度（すなわち、50 ng/mL を超える濃度）の抗 hRS7 抗体産生が認められた。抗 hRS7 抗体が PK に影響を及ぼしたと考えられたのは 1 例のみであり（3 群の動物番号 14）、この動物は最終的なデータ解析の対象から除いた。

以上のように、新規クローン（[redacted]）から得られた hRS7 IgG は、オリジナルクローンからの IgG と薬物動態学的には差がないこと、Immunomedics 社と [redacted] 社製の IgG についても同様に薬物動態学的には同等の特性を有していることが明らかとなった。

3.4　カニクイザルにおける TK

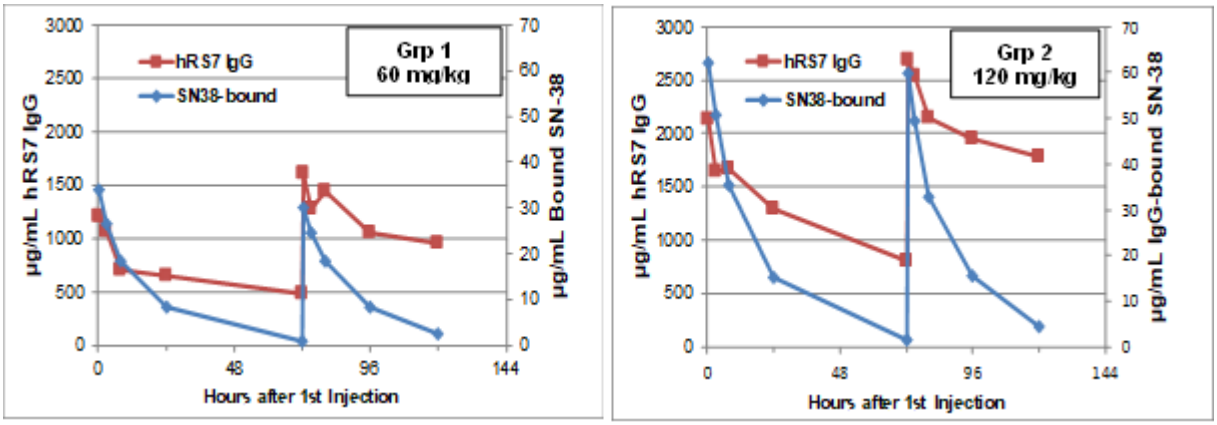
カニクイザルにおける反復投与試験（GLP 適合、CTD 4.2.3.2.3、[redacted].160.03）の目的は、SG の毒性及び TK を評価することであった。SG はサル Trop-2 に結合することができることから、サルにおける PK は、オンターゲットとオフターゲットの両方の機序を反映している。雌雄各 3 匹のカニクイザルに溶媒対照、60 mg/kg 又は 120 mg/kg の SG を試験 1 日及び 4 日に 1 時間の静脈内持続注入により投与し、以下のパラメータを評価した。すなわち、一般状態、摂餌量、体重、直腸温、心拍数、呼吸数、心電図及び血圧の観察・測定、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、

凝固検査、血清生化学的検査、剖検、内臓重量測定、病理組織学的検査及び TK 測定を実施した。TK 測定のため、各動物について、次の時点に TK 測定用の血液試料（約 1　mL）を血清分離管に採取した。すなわち、1 回目投与前日、試験 1 日：1 回目の静脈内持続注入後 30 分、3、8 及び 24 時間、試験 4 日：投与前、2 回目の静脈内持続注入後 30 分、3 及び 8 時間、並びに試験 5、6、10、11（回復動物）、14、21 及び 28 日に 1 回、採血した。血液を血清に処理し、血清試料中の総抗体（SG + 遊離 hRS7）、総 SN-38、遊離 SN-38 及び抗 SG 抗体の各濃度を研究用の分析方法を用いて測定した。

SG は 60 mg/kg では忍容性が良好であったが、120 mg/kg では忍容性がみられず、試験 7 日に雄 1 例の死亡が確認された。死因は骨髄抑制及び消化管毒性と考えられた。

SG と遊離 hRS7 の平均血清中濃度-時間曲線を図 3 に示した。図には、SN-38 濃度が十分に高い期間における、各静脈内持続注入後の血清中の平均 hRS7 IgG 濃度（左軸；赤四角）及び IgG-結合型 SN-38 濃度（右軸；青菱形）を示した。

図 3　60 mg/kg（左）又は 120 mg/kg（右）を静脈内持続注入後のカニクイザルにおける hRS7 IgG 及び IgG 結合型 SN-38 の平均濃度



SG の hRS7 IgG 部分についての TK パラメータを表 5 に示す。総 SN-38 及び遊離 SN-38 の主要な TK パラメータを表 6 に示す。

表 5　カニクイザルにおける SG の hRS7 IgG 部分の TK パラメータ

		T_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	$T_{1/2}$ (h)	AUC $_{(0-\infty)}$ (h*µg/mL)	MRT (h)
2 x 60 mg/kg	N	6	6	6	6	6
	Mean	75.2	1605.7	124.8	243,315	203.3
	SD	3.03	56.7	33.5	62,334	46.3
	Geometric Mean	75.1	1604.8	121.3	236,543	199.1
2 x 120 mg/kg	N	6	6	6	6	6
	Mean	76.0	2904.7	125.6	487,732	208.3
	SD	2.7	295.8	52.6	158,186	73.2
	Geometric Mean	76.0	2892.5	117.5	468,221	198.9

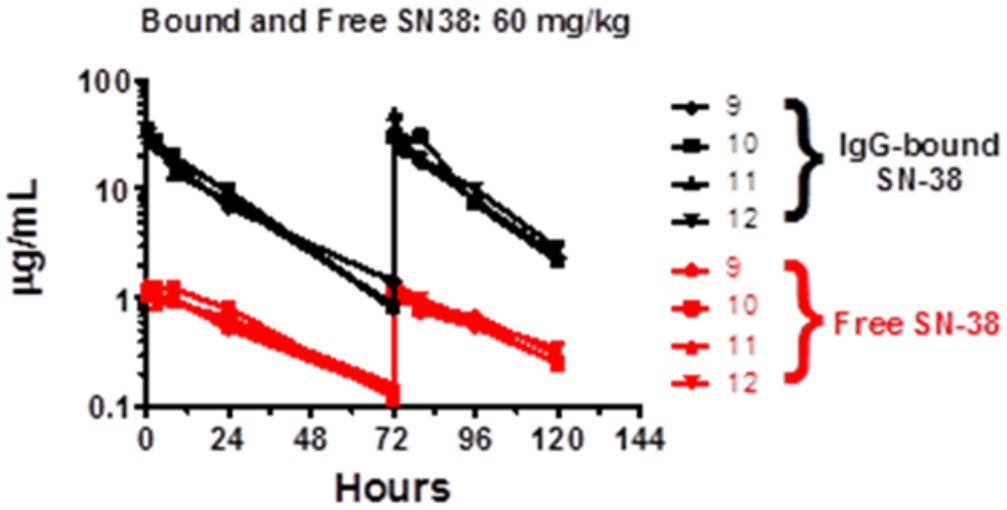
SN-38 の分析

表 6　総 SN-38 及び遊離 SN-38 の主要な TK パラメータ

Dose IMMU-132 (mg/kg)	$t_{1/2}$ SN-38 (h)		C_{max} SN-38 (µg/mL)		AUC_{inf} SN-38 (µg*h/mL)	
	Total	Free	Total	Free	Total	Free
2 x 60	13.5	25.6	41.6	1.3	1276	80.2
2 x 120	13.3	27.0	72.9	3.7	2493	225.2

総 SN-38 と IgG 結合型 SN-38 の TK パラメータは極めて類似しており、SN-38 が IgG と結合していることが示された。重要なことは、IgG 結合型 SN-38 又は総 SN-38 の AUC は、遊離 SN-38 の AUC の約 15 倍であり、この複合体が血清中でゆっくりと持続的に SN-38 を放出することを示していることである（図 4）。

図 4　SG 60 mg/kg（SN-38 換算値 0.96 mg/kg×2）を 3 日間隔で 2 回静脈内持続注入したサル 4 匹の IgG 結合型 SN-38 濃度と遊離 SN-38 濃度の比較



3.5　カニクイザルにおける薬物動態／TK

[redacted].160.25 試験（CTD 4.2.3.2.4）の目的は、SG をカニクイザルに 4 サイクル投与した際の毒性及び TK プロファイルを評価することであった。また、投与期間中に認められた変化の可逆性について、6 週間の回復性試験で評価した。

被験物質の SG（[redacted]）及び SG（[redacted]）、並びに MES 緩衝液（対照）を 1 日 1 回、試験 1、8、22、29、43、50、64 及び 71 日に 1 時間かけてカニクイザルに静脈内持続注入した。SG（[redacted]：製法 C）の用量は 12.5、25 及び 50 mg/kg、SG（[redacted]：製法 A/B）の用量は 25 mg/kg とした。TK 及び ADA（免疫原性）の測定のため、所定の時点で血液試料を採取した。投与期間終了時及び回復期間終了時の剖検はそれぞれ試験 78 日及び 113 日に実施した。

SG はサル Trop-2 に結合することができることから、サルの PK はオンターゲットとオフターゲットの両方の機序を反映している。SG の PK の特徴を明らかにするために、1）総抗体（非結合 hRS7 + 結合型 hRS7-SN-38）、2）遊離 SN-38（細胞傷害性ペイロード）、3）SN-38G（SN-38 の代謝物）、4）総 SN-38（遊離 SN-38 + 結合型 hRS7-SN-38）の 4 種類の測定対象物質について測定

した。また、第3相臨床試験用の製法（製法C；SG（[redacted]））及び第1/2相臨床試験用の製法（製法A/B；SG（[redacted]））で製造したSGのTK測定を行った。TK測定用の血清試料は、バリデートされた分析法（GLP適合）（表 1参照）に測定し、[redacted]ソフトウェアを用いてTK解析した。4種類の分析対象物質すべてに関する結果を、以下の表 7に要約した。

表 7　カニクイザルにSGを1時間持続注入で単回及び複数回静脈内投与した際の全分析対象物質の平均TKパラメータ

			Total Antibody (TAb)			Total SN-38			Free SN-38		SN-38G	
Day	Group	Sex	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-168} (hr*µg/mL)	HL (hr)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-168} (hr*ng/mL)	HL (hr)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-168} (hr*ng/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-168} (hr*ng/mL)
1	G2	F	357000	22700	NC	6350	115000	13.5	103	2910	8.04	135
		M	406000	26000	NC	6300	122000	13.9	95.0	2360	5.75	NC
1	G3	F	713000	50100	NC	13500	255000	19.0	201	6030	11.7	297
		M	669000	47100	NC	13300	243000	19.5	231	5670	9.84	288
1	G4	F	1440000	109000	NC	24900	488000	24.6	313	8140	22.6	777
		M	1510000	124000	NC	26600	533000	26.8	337	8860	27.5	864
1	G5	F	681000	49400	NC	12200	224000	17.7	157	4260	10.1	328
		M	674000	50600	NC	12700	240000	18.2	145	3650	10.0	327
71	G2	F	137000	8880	NC	4430	42200	16.9	64.6	1300	19.4	342
		M	146000	17400	NC	4930	46700	7.83	85.2	1260	44.9	1630
71	G3	F	957000	73600	74.3	13400	266000	21.2	251	8200	14.0	406
		M	952000	77000	69.0	13100	254000	24.6	238	5870	14.5	463
71	G4	F	1850000	155000	89.7	25100	495000	27.8	331	8550	27.3	1000
		M	2160000	202000	152	28000	571000	31.6	341	10000	51.7	2560
71	G5	F	615000	36400	67.3	11300	177000	16.6	190	4280	31.4	717
		M	779000	73400	73.0	12700	221000	19.1	163	3900	16.4	402

NC Not calculable; HL Half life

SGを投与したすべての動物において、単回又は複数回の静脈内投与後に、総抗体の全身へ曝露が確認された。SGの静脈内持続注入後の総抗体の血清中曝露量は、用量依存的に増加した。試験1日の初回投与後のC_{max}及びAUC_{0-168}は、ほぼ用量に比例して増加した。最終投与日である試験71日のC_{max}及びAUC_{0-168}の増加は、用量比を上回った。初回投与時と最終投与時を比較すると、ほとんどの場合、曝露量は2倍以内の差であった。概して、雌雄間の曝露量の差は2倍未満であった。

血清中の総SN-38及び遊離SN-38の曝露量は用量に依存して増加し、初回投与時と最終投与時を比較すると2倍以内の差であった。試験1日の初回投与後のC_{max}及びAUC_{0-168}は、ほぼ用量に比例して増加した。また、最終投与日である試験71日のC_{max}及びAUC_{0-168}の増加は、概して用量比を上回った。概して、雌雄間の曝露量の差は2倍未満であった。

SN-38Gは血清中に容易に出現し、サルにおける平均T_{max}は雌雄ともに試験 1日で4.0～12時間、試験71日で2.0～11時間であった。また、C_{max}及びAUC_{0-168}の増加は、初回投与時及び最終投与時ともに概ね用量に比例しなかった。概して、雌雄間の曝露量の差は2倍未満であった。

雌雄とも平均値では、初回及び最終のSG投与時の総SN-38のAUC_{0-168}及びC_{max}は、遊離SN-38の曝露量と比較してそれぞれ約32～60倍及び53～82倍高かった。同様に、初回及び最終のSG投与時の総SN-38のAUC_{0-168}及びC_{max}は、SN-38Gの曝露量に比べ、それぞれ約29～859

倍及び 110～1352 倍高かった。また、$AUC_{0\text{-}168}$ 及び C_{max} の平均値に基づくと、遊離 SN-38 の曝露量は総 SN-38 の曝露量のそれぞれ 2.26%及び 1.52%であった。このことから、SG として投与された SN-38 の大部分は、血清中で ADC と結合したままであり、細胞傷害性ペイロードである遊離 SN-38 として循環していないことが示唆された。

概して、25 mg/kg 投与時の総抗体、総 SN-38、遊離 SN-38 及び SN-38G の曝露量は、3 群（製法 C、第 3 相臨床試験用製剤）及び 5 群（製法 A/B、第 1/2 相臨床試験用製剤）で、特に試験 1 日の初回投与後は同程度であった。複数回投与後、曝露量に変動がみられたが、これは ADA 形成の影響によるものと思われ、その結果、3 群の雌では 5 群の雌より、曝露量が明らかに高かった。

すべての SG 投与動物で ADA が検出されたが、総抗体、総 SN-38 及び遊離 SN-38 の血清中曝露量に対する ADA の影響は用量依存的であると考えられ、低用量では変動が大きく、試験 71 日の曝露量は試験 1 日より概して低く、高用量の試験 71 日の曝露量は ADA 形成による影響はほとんどみられなかった。

4　分布

4.1　^{111}In-SG のマウスにおける生体内分布及びクリアランス

放射性標識（^{111}In）した SG（ADC）と放射性標識（^{111}In）した非結合 hRS7 IgG（抗体）の腫瘍標的能及び生体分布を、雌の担癌無胸腺 NCr ヌードマウス（*nu/nu*）を用いて比較検討した（CTD 4.2.2.3.1、031210-156 試験）。SG はマウスの Trop-2 に結合しないことから、これらの試験における標的介在性の分布は Trop-2 を発現している腫瘍に限定される。Trop-2 を発現している腫瘍での累積取り込み量をより正確に推定することが可能で、マウス組織自体は hRS7 抗体と交差反応を起こさないことから、放射性金属標識複合体を用いた。放射性標識は SN-38 ではなく、抗体に結合していることから、データは IgG の取り込みを反映している。Trop-2 の発現が比較的少ないヒト扁平上皮肺癌細胞株 SK-MES-1 を標的腫瘍として用いた。

腫瘍が約 0.3 cm^3 大になった時点で、マウスを ^{111}In-DTPA-hRS7-CL2A-SN-38（20 µCi、250 µg）又は ^{111}In-DTPA-hRS7 IgG（20 µCi、250 µg）の各投与群に振り分けた。3 群のマウスには、^{111}In-DTPA-hRS7-CL2A-SN-38（20 µCi、250 µg）投与の 3 日前に、まず非標識の hRS7-CL2A-SN-38 を 250 µg 腹腔内（i.p.）投与した。群構成と剖検時期を表 8 にまとめた。

表 8　SK-MES-1 担癌 NCr 無胸腺（*nu/nu*）ヌードマウス（雌）の生体内分布試験における群構成

Group	(N)	Test or Control Article	Dose	Necropsy Schedule
1	35	^{111}In-hRS7-CL2A-SN38	20 µCi, 250 µg i.v.	5-min, 2-, 6-, 24-, 48-, 72-, and 168-h
2	35	^{111}In-hRS7 IgG	20 µCi, 250 µg i.v.	5-min, 2-, 6-, 24-, 48-, 72-, and 168-h
3	20	Day 0: hRS7-CL2A-SN38, Day 3: ^{111}In-hRS7-CL2A-SN38	250 µg i.p., 20 µCi, 250 µg i.v.	6-, 24-, 48-, and 72-h

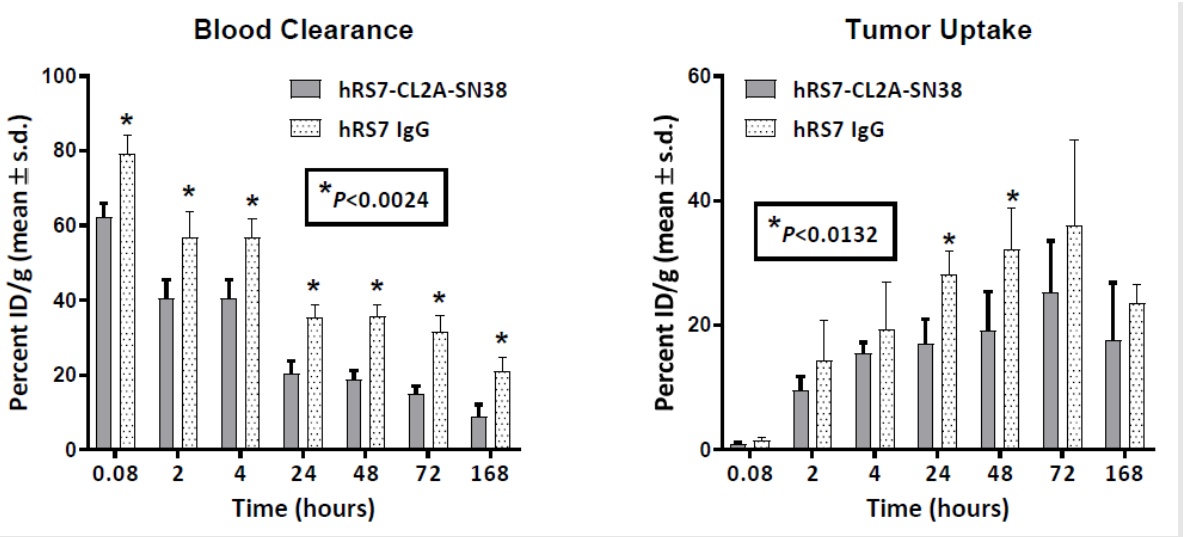
SG 及び非結合 hRS7 IgG の PK パラメータを表 9 に示す。

表 9　SK-MES-1 担癌マウスにおける静脈内持続注入後の SG（hRS7-CL2A-SN-38）及び hRS7 IgG の血液中薬物動態

Agent	Injected Dose (µg)	C_{max} (µg/mL)	t½ (h)	$AUC_{0.08\rightarrow\infty}$ (Day*mg/L)	Clearance (mL/h)	$MRT_{0.08\rightarrow\infty}$ (h)
hRS7 IgG	250	197.9	161	1064	0.01	230
hRS7-CL2A-SN-38	250	155.7	117	447	0.02	161

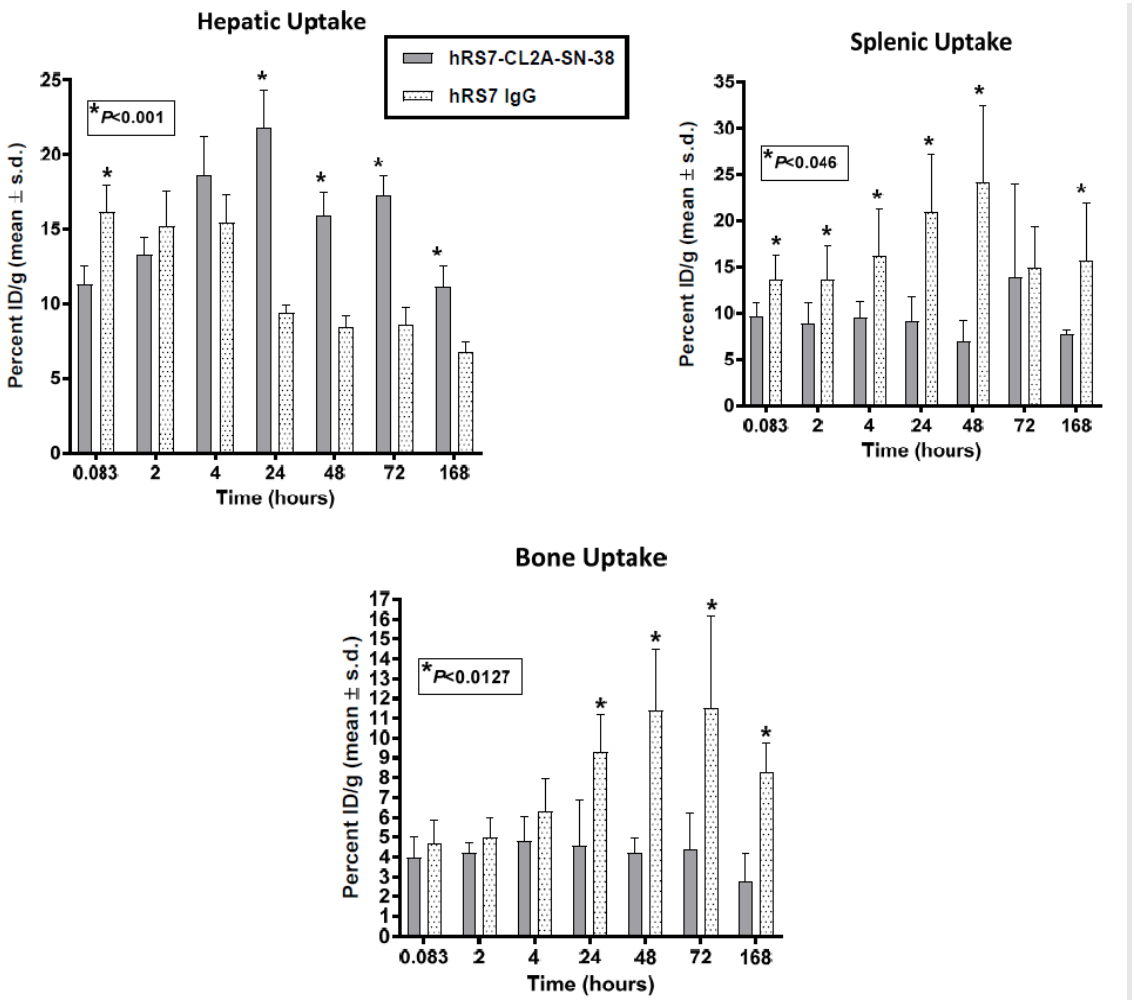
SG は、同量の非結合 hRS7 IgG よりも速く消失し、半減期及び MRT は約 40%短かった。それにもかかわらず、このことは腫瘍への取り込み量にほとんど影響を及ぼさなかった（図 5）。投与後 24 時間及び 48 時間の時点では有意差がみられたが、72 時間（取り込みのピーク）までの腫瘍内取り込み量は同程度であった。正常組織では、hRS7-CL2A-SN-38 と hRS7 IgG の取り込み量の差は肝臓と脾臓で最も大きかった（図 6）。肝臓では、投与後 24 時間に SG は hRS7 IgG の 2 倍を超える量に達した。逆に脾臓では、取り込みのピーク時（48 時間後）に存在する hRS7 IgG は SG の 3 倍以上であった。その他の組織における取り込み量とクリアランスは、概ね血液中濃度の違いを反映していた。

図 5　hRS7-CL2A-SN-38 及び hRS7 IgG の血液中クリアランス及び腫瘍への取り込み量



Mice bearing SK-MES-1 tumor xenografts were injected with 250 µg of either ^{111}In-DTPA-hRS7-CL2A-SN-38 or ^{111}In-DTPA-, animals were euthanized after being bled (N = 5/time-point). Blood and tumor were counted in a gamma hRS7 IgG. At various time-points -counter and % ID/g determined for each (mean ± s.d).

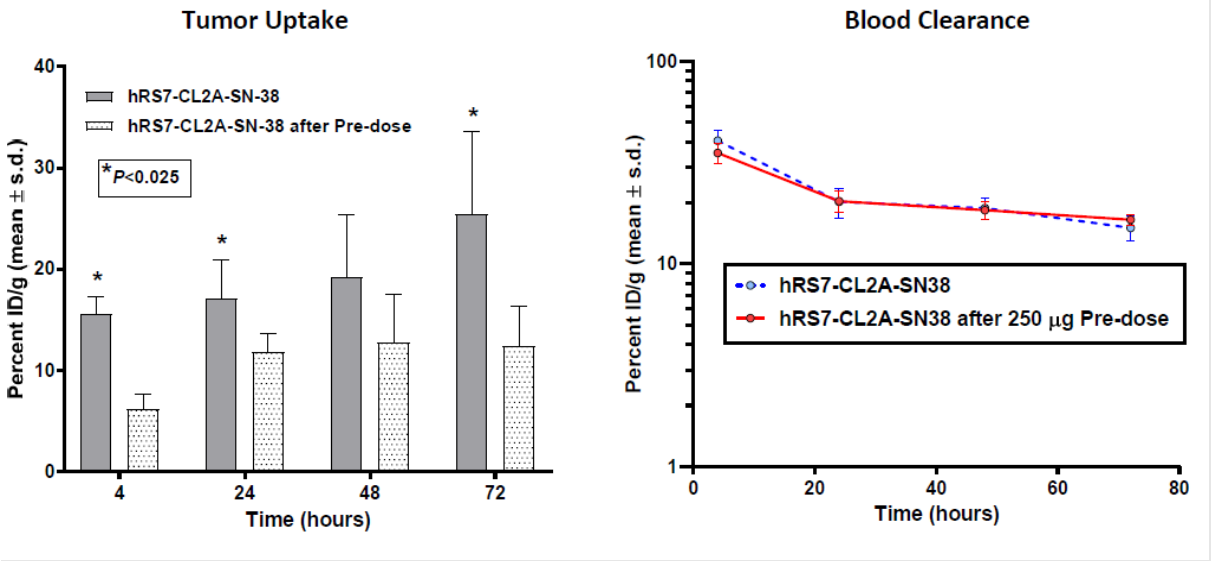
図 6　hRS7-CL2A-SN-38 及び hRS7 IgG の組織取り込み量



Uptake of ^{111}In-DTPA-hRS7-CL2A-SN-38 or ^{111}In-DTPA-hRS7 IgG in liver, spleen, and bone. Data shown as % ID/g determined for each (mean ± s.d).

生体内分布と腫瘍標的についても、SK-MES-1 担癌マウス（2 群構成）で試験を行った。1 つの群は、^{111}In 標識 SG 投与の 3 日前に SG 0.2 mg/kg（250 µg protein）を前投与した。もう一方の群には生理食塩水を投与した。図 7 に示すように、前投与したマウスにおける ^{111}In 標識 SG の腫瘍取り込み量は、前投与しなかった動物よりすべての時点において低値を示した（例えば、投与後 72 時間の腫瘍取り込み量は、前投与動物で 12.5 ± 3.8% ID/g に対し、前投与しなかった動物では 25.4 ± 8.1% ID/g であった；P=0.0123）。前投与による、血液クリアランスや組織取り込みへの顕著な影響は認められなかった。

図 7　SG（hRS7-CL2A-SN-38）前投与による腫瘍取り込みと
その後の血液中クリアランスへの影響



Mice bearing SK-MES-1 xenografts were pre-dosed with 250 μg of hRS7-CL2A-SN-38 three days before receiving ^{111}In-DTPA-hRS7-CL2A-SN-38. Bar graph shows differences in tumor uptake over time. Clearance of ^{111}In-DTPA-hRS7-CL2A-SN-38 from the blood of mice that were pre-dosed with the ADC versus mice that only received one dose. Data shown as % ID/g determined for each (mean ± s.d).

5　代謝（動物種間の比較）

SG の代謝は、抗体の異化と放出されたペイロードである SN-38 の代謝の両方が関係する。SG は生体内で個々のアミノ酸に異化されると推察されることから、抗体部分についての代謝試験は実施しなかった。SG の抗体部分の分布及びクリアランスは、他の IgG1 抗体と同様に、生体内では標的（Trop-2）を介した抗原発現細胞への取り込み、ピノサイトーシス及び新生児 Fc 受容体（FcRn）を介した取り込み及びクリアランス機構に影響されるものと考えられる。

SN-38 は、SG として結合している間は、カルボン酸塩形成及びグルクロン酸抱合の両方から保護されている。SN-38 は pH 感受性の炭酸結合により ADC 中に結合しており、SG として結合している間は、SN-38 のラクトン環構造が保護される [7]。また、in vitro 及び in vivo の両方で、SN-38 は、SG に結合した状態ではグルクロン酸抱合されないことが報告されている [5]。したがって、IgG に結合した SN-38 は、血清又は組織中において、その最も活性の高い構造（すなわち、ラクトン環が開環せず、グルクロン酸抱合されていない状態）をとっていると推察されるが、薬理活性を発揮するためには、SG から放出される必要がある。SG から放出された遊離 SN-38 は、イリノテカンから遊離した SN-38 と同様のクリアランス及び代謝を受けると考えられる。SN-38 の代謝は広く研究されており [1]、以下、要約すると、SN-38 は血漿中では 99%が結合型として存在し、主にアルブミン及びリンパ球に結合している。SN-38 は血漿中ではラクトン及びカルボン酸塩として存在する。ラクトン構造は、対応するカルボン酸塩構造と比較して、アルブミンとの結合が著しく強い。SN-38 は、それ自身が遊離した腫瘍細胞内から隣接する細胞へ自由に拡散することができ、その結果、近傍の腫瘍細胞の細胞死を誘発する可能性がある（バイスタンダー効果）。SN-38 自体は、ヒト及びサルの肝臓で UGT1A1 により不活性な SN-38G に代謝される [2]。UGT1A1 の遺伝子多型（*38/*38 など）は、ヒトにおける SN-38 から SN-38G への変換を変化させる可能性がある。

6　　排泄

SG については、独立した in vivo 排泄試験は実施していない。しかしながら、マウスにおける SG の生体内分布試験（CTD 4.2.2.3.1、031210-156）において、既に報告されている SN-38 の主要な肝胆汁排泄経路と一致する腸内容物が確認された [1]。

7　　薬物動態学的薬物相互作用

他の抗体薬と同様に、ADC である SG 未変化体は、その代謝が標準的な代謝酵素（例えば CYP）に依存しないため、典型的な薬物相互作用は起こらないと予想される。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 と同様の相互作用を引き起こす可能性が考えられる。

SN-38 の主な代謝経路は、UGT1A1 によるグルクロン酸抱合である。したがって、UGT1A1 の阻害剤は遊離 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[1]。

8　その他の薬物動態試験

8.1　担癌マウスにおける薬物動態

イリノテカン又は SG を投与した動物組織における SN-38 及び SN-38G の生体内分布の違いを評価するために、2 種類のヒト腫瘍異種移植担癌ヌードマウスを用いて計 3 試験を実施した（CTD 4.2.2.7.1、012014-275、CTD 4.2.2.7.2、062714-291 及び Sharkey らの報告 [5]）。これらの各試験の詳細を、表 10 に示した。動物には、SG 又はイリノテカンを単回静脈内投与した。組織抽出物中のイリノテカン、SN-38 及び SN-38G の含有量を逆相 HPLC により測定した。すなわち、SG 投与動物の SN-38 及び SN-38G の濃度については、抽出物中の単体のみとして（すなわち、遊離 SN-38 及び遊離 SN-38G）、又は、組織抽出物の酸加水分解試料により測定した総 SN-38 として、含有量を算出した。血清中の hRS7 IgG 及び SG 未変化体の検出には、ELISA を用いた。

表 10　ヒト癌異種移植担癌ヌードマウスにおける組織中 SN-38 濃度

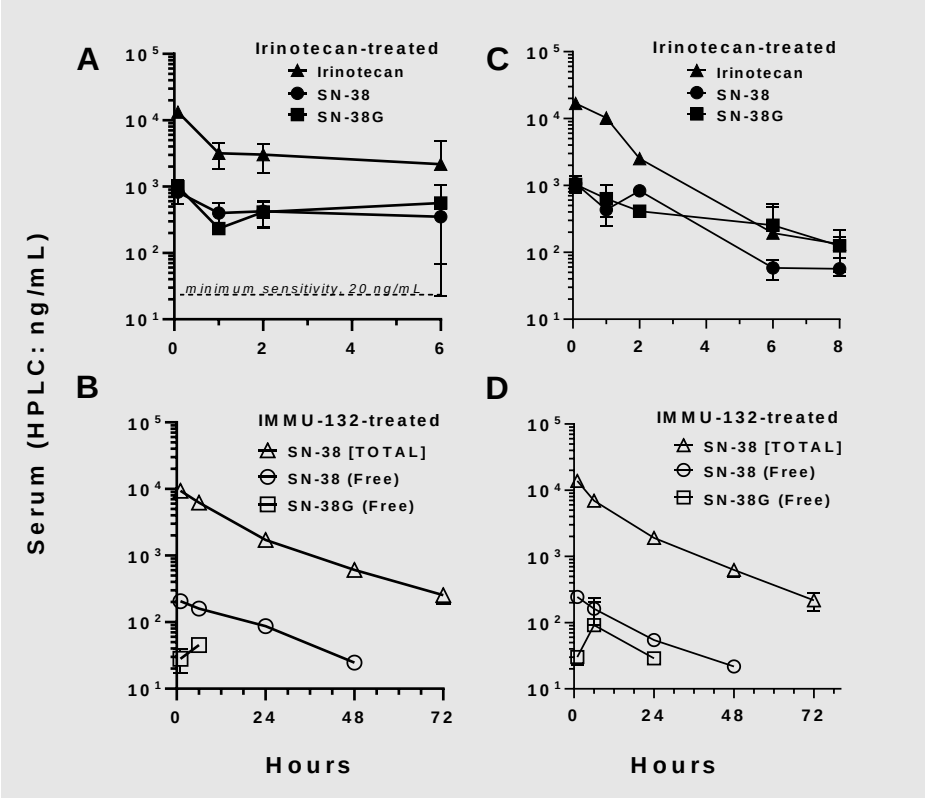
Study	Tumor	Intervals *(N=3 animals/interval)*	Tissues examined	IMMU-132 (SN-38 equivalents)[a]	Irinotecan (SN-38 equivalents)[a]
012014-275 (‘Study 1’)	Capan-1	**Irinotecan** 5 min, 1, 2, 6, and 24 h **IMMU-132** 1, 6, 24, 48, 72 h	Tumor, serum, liver, small intestine contents	1.0 mg (16 µg)	773 µg (448 µg)
Sharkey, 2015 (‘Study 2’)	Capan-1	**Irinotecan** 1 and 6 h **IMMU-132** 1, 6, and 24 h	Tumor, serum, liver, small and large intestine contents	1.0 mg (16 µg)	808 µg (468 µg)
062714-291 (‘Study 3’)	NCI-N87	**Irinotecan** 5 min, 1, 2, 6, and 8 h **IMMU-132** 1, 6, 24, 48, 72 h	Tumor, serum	1.0 mg (16 µg)	840 µg (486 µg)

[a] SN-38 equivalents for IMMU-132 based on spectrophotometric determinations of protein and SN-38 concentrations. SN-38 equivalents for irinotecan based on mass, with SN-38 representing approximately 58% of irinotecan’s mass.

血清中濃度

試験 1 及び 3 における遊離 SN-38、SN-38G、総 SN-38 及びイリノテカンの濃度-時間曲線を図 8 に示した。イリノテカン投与後、SN-38 及び SN-38G は静脈内注入後の短時間（最大 8 時間）のみ検出可能であった。一方、SG 投与後では、SN-38 は投与後 48 時間、SN-38G は投与後 6 時間（試験 1）又は 24 時間（試験 3）検出可能であった。SG 投与後の各測定時点で、血清中において遊離 SN-38 濃度は、総 SN-38 の 5%未満であった（図 8B）。SG 投与後の遊離 SN-38 及び遊離 SN-38G の C_{max} は、イリノテカン投与後と比較して顕著に低かった。一方、遊離 SN-38 の群平均 AUC は、イリノテカン投与マウスと比較して、SG 投与マウスでは約 2 倍（試験 1）又は同程度（試験 3）であった（表 11）。SG 投与後の SN-38G の曝露量は、イリノテカン投与後と比較してわずかに低かった。

図 8　担癌ヌードマウスにイリノテカン又は SG を投与した際の各種生成物の濃度-時間曲線



(A) Study 1, Capan-1-bearing mice; irinotecan. (B) Study 1; IMMU-132. (C) Study 3, NCI-N87-bearing mice; irinotecan. (D) Study 3; IMMU-132. Area-under-the-curve (AUC) estimates are provided in the table for products with 3 or more samples.

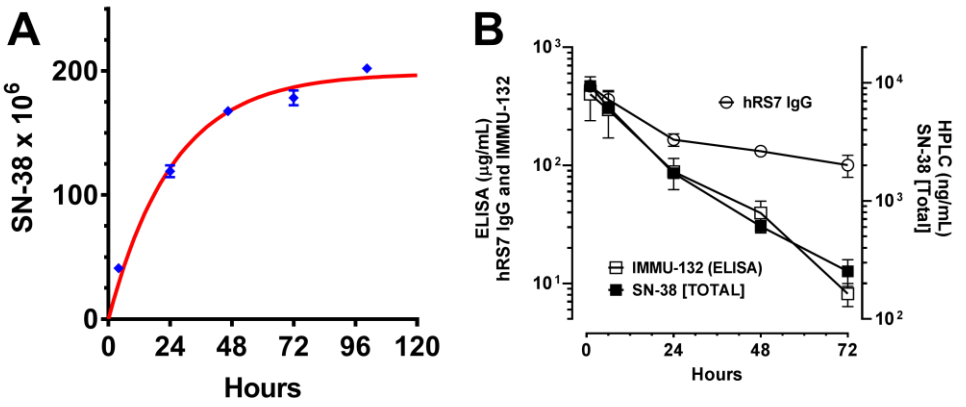
表 11　イリノテカン又は SG を投与したヌードマウスの血清中生成物の AUC

	Irinotecan-treated			IMMU-132-treated		
	Irinotecan	SN-38	SN-38G	SN-38 (TOTAL)	SN-38 (Free)	SN-38G (Free)
Study 1 (Capan-1)	21.04	2.52	2.84	145.34	5.04	ND
Study 3 (NCI-N87)	24.51	3.21	3.00	171.72	3.88	1.39

ND, not determined (<3 samples)

投与後 1 時間の試料中遊離 SN-38 濃度は、イリノテカン投与動物における同時点での SN-38 濃度の約 1/2 と低かった（図 8B 及び図 8D）。ELISA データにおいてもこれらの所見が確認され、IgG 濃度は高値が持続したのに対し、SG は総 SN-38 と同程度のクリアランス速度を示した（図 9B）。ELISAデータから算出された PKパラメータでは、SGの半減期は 14 時間となり（図 9C）、これは SN-38 が複合体から放出される速度（すなわち 17.5 時間）と血液からの IgG 除去速度が反映されている。

図 9　マウスにおける SG の薬物動態



C

Pharmacokinetic parameters after IV bolus dosing of IMMU-132 (1.0 mg), monitoring the clearance of IMMU-132 and hRS7 IgG detected by ELISA

Drug	T_{max} (h)	$T_{½}$ (h)	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{(0\text{-last})}$ (h*µg/mL)	V (mL)	Cl (mL/h)	MRT (h)
IMMU-132	1	14.0	400.7	7,163	2.75	0.136	19.0
hRS7 IgG	1	67.1	468.2	13,368	4.19	0.043	86.7

Parameters estimated using a non-compartmental analysis (linear-log trapezoidal method).

(A) Measurement of SN-38 release from IMMU-132 held in mouse serum *in vitro* (37°C). (B) Determination of IMMU-132 clearance rate in mice based on ELISA measurements of IMMU-132 (SN-38 capture/anti-hRS7 IgG idiotype antibody probe) or hRS7 IgG, as well as measurement of SN-38 (TOTAL) in acid-hydrolyzed samples assayed by reversed-phase HPLC

イリノテカン投与動物と SG 投与動物での重要な違いは、SG 投与動物の血清中には遊離 SN-38G は微量しか存在せず、1 時間及び 6 時間の試料中の濃度は遊離 SN-38 よりも 1/5～1/10 と低く、それ以降の試料中には遊離 SN-38G は検出されなかったことである。さらに重要なことは、酸加水分解した試料には検出可能な量の SN-38G が存在しなかったことである。このことは、10 位の水酸基がグルクロン酸抱合される可能性があるにもかかわらず、複合体に結合した SN-38 はグルクロン酸抱合されないことから、すべての SN-38G は放出された SN-38 から生成した可能性が高いことを示唆している。後に、SN-38 は ADC として複合体を形成すると、グルクロン酸抱合から保護されることが確認されている [7]。

試験 2 では、より大きなサイズの Capan-1 腫瘍担癌ヌードマウスにイリノテカン及び SG を投与し、イリノテカンは 2 時点（1 及び 6 時間）、SG は 3 時点（1、6 及び 24 時間）で採血した。いずれの血清中生成物の濃度も、これら 2 つの試験で概ね類似していたが、SG 群の 3 例中 2 例の 24 時間後の血清試料で遊離 SN-38G が検出された（21.1 及び 56.5 ng/mL）。この場合も、酸加水分解した血清試料からは、いかなる時点においても SN-38G は検出されなかった。

イリノテカンを投与した NCI-N87 ヒト胃癌担癌マウスでは、そのクリアランス動態に違いがみられ、062714-291 試験（試験 3；CTD 4.2.2.7.2）での 3 成分は 5 分から 6 時間で約 90%減少したことに対し、試験 1 ではこの同じ期間に 25%以上の減少はなかった。ただし、3 成分とも、AUC は両試験で類似していた（図 8A 及び図 8C）。試験 1 及び試験 3 の SG 投与動物における生成物の濃度及びクリアランスは類似していた。以上のように、これら 3 試験のすべてにおいて、イリノテカン投与後の各生成物の血清中クリアランスは、SG 及びその生成物のクリアランスに

類似していたが、両者における各生成物の濃度には大きな違いがみられた。

腫瘍中生成物の濃度

試験 1 では、イリノテカン投与群（15 匹）の Capan-1 腫瘍は平均 0.113 ± 0.035 g、SG 投与群（15 匹）では 0.149 ± 0.064 g であった。試験 2 では、最初の試験の約 2 倍のサイズの Capan-1 腫瘍を使用し、これが腫瘍の局所化に影響を及ぼすかどうかを調べた（イリノテカン投与群：6 匹、0.365 ± 0.085 g、SG 投与群：9 匹、0.342 ± 0.125 g）。

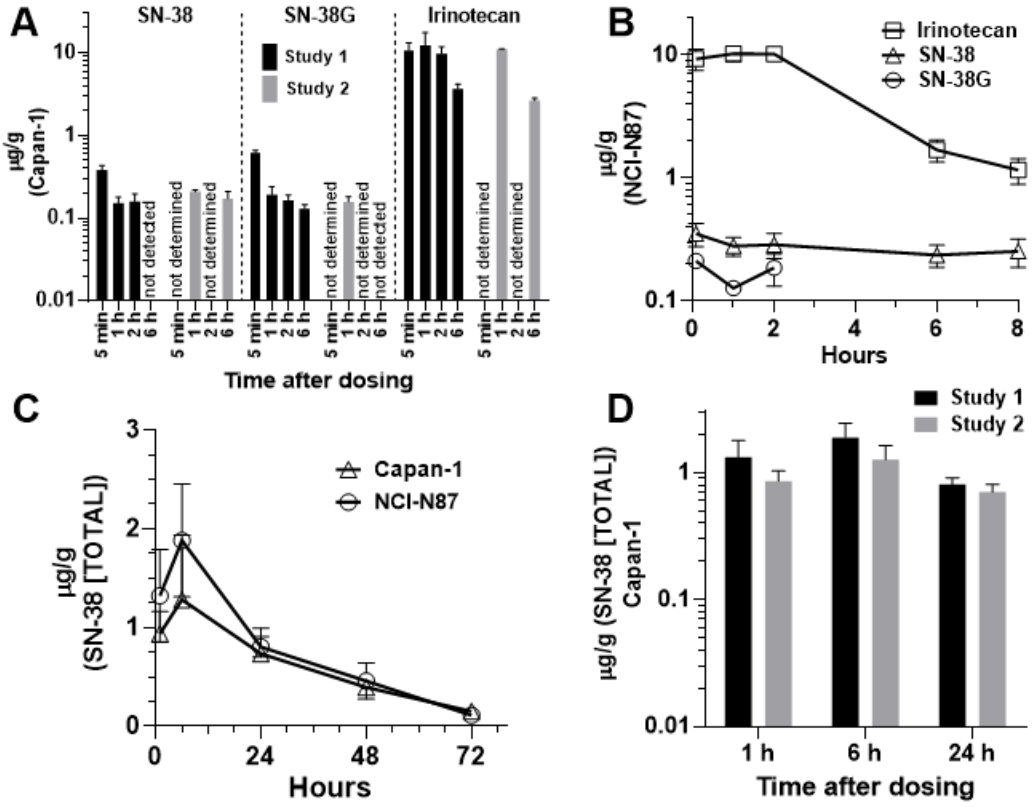
イリノテカンを投与した動物の Capan-1 腫瘍中のすべての生成物濃度は、2 つの試験でほぼ同様であった（図 10A）。例えば、試験 1 及び試験 2 における 1 時間後のイリノテカン濃度はそれぞれ平均 12.34 ± 5.23 μg/g（1.6 ± 0.7% ID/g）及び 11.08 ± 0.14 μg/g（1.4 ± 0.02% ID/g）であり、SN-38 濃度はそれぞれ 0.19 ± 0.05 μg/g 及び 0.21 ± 0.01 μg/g であった。試験 1 では、SN-38 は 2 時間しか腫瘍中に検出されなかったのに対し、試験 2 では、6 時間の腫瘍試料の一部で SN-38 又は SN-38G が検出された。試験 1 単独での AUC 評価と、SN-38 の AUC を 6 時間にわたって外挿できる両試験のデータを組み合わせた AUC 評価では、腫瘍中のイリノテカンの約 5%しか SN-38 + SN-38G に変換されておらず（図 10）、その約半分は SN-38G であるのに対し、血清中ではイリノテカン及び SN-38 の濃度変換率は約 25%と推定された。イリノテカン投与動物から採取した NCI-N87 腫瘍（平均重量 = 0.31 ± 0.08 g、N = 15）では、イリノテカンのピーク濃度は最初の 2 時間まで約 10 μg/g（約 1.2% ID/g）に維持されたが、6 時間後には 1.69 ± 0.34 μg/g に減少した（図 10B）。SN-38 濃度は 5 分後に最高値となり（0.35 ± 0.08 μg/g：投与されたイリノテカンを総 SN-38 相当量に換算して、0.07 ± 0.02% ID/g に相当）、8 時間までの採取期間中は比較的一定で約 0.25 μg/g の濃度であった。SN-38G は、初期の時間では SN-38 含有量より 40%低く、6 時間及び 8 時間では検出されなかった。NCI-N87 腫瘍全体における SN-38 の濃度自体には Capan-1 腫瘍と大きな違いはなかったが、8 時間にわたって SN-38 が持続的に検出されたことにより AUC は約 2 倍に改善された。

表 12　Capan-1 腫瘍又は NCI-N87 腫瘍の担癌マウスにイリノテカン又は SG を投与したときの経時的な生成物の濃度（AUC）[a]

	Irinotecan-treated			IMMU-132-treated	SN-38 delivery ratio
Tissue	SN-38	SN-38G	Irinotecan	SN-38 (TOTAL)	IMMU-132/Irinotecan
Capan-1					
Study 1 only	0.40	1.08	48.37	54.25	135.6
[Study 1+2]	[1.09]	[1.04]	[46.73]	[49.02]	[45.0]
NCI-N87	2.11	0.31	45.69	43.88	20.8

[a] AUC are expressed as (μg/g·h). In Study 1, SN-38 AUC derived from 5 min – 2 h; SN-38G and irinotecan from 5 min to 6 h. AUC from 5 min to 6 h for irinotecan-treated mice combining Studies 1 and 2. For IMMU-132-treated animals SN-38 (TOTAL) AUC are derived from 1 h to 72 h.

図 10　イリノテカン又は SG 投与動物から摘出した Capan-1 腫瘍及び NCI-N87 腫瘍における抽出生成物の濃度



(A) Concentrations of SN-38, SN-38G and irinotecan in Capan-1 tumors from mice given irinotecan in Study 1 and Study 2. In Study 1, SN-38 was below the threshold of detection in the 6-h sample, whereas SN-38G and irinotecan was detected in all samples. Study 2 only examined samples taken at 1 and 6 h. (B) Concentrations of products in NCI-N87 tumors from animals given irinotecan (Study 3). (C) Uptake and clearance of SN-38 (TOTAL) in mice bearing Capan-1 (Studies 1 and 2 combined) and NCI-N87 (Study 3). No other products were detected in the tumors. (D) Comparison of SN-38 [TOTAL] concentrations in Capan-1 xenografts from mice in Study 1 and Study 2.

SG 投与動物では、どの時間帯でも腫瘍から検出された生成物は総 SN-38 のみであり、腫瘍に存在する SN-38 のすべてが複合体に結合していることを示している（図 10C 及び図 10D）。Capan-1 腫瘍中の濃度は両試験とも 6 時間でピークに達し、試験 1 及び試験 2 でそれぞれ平均 1.88 ± 0.57 µg/g 及び 1.26 ± 0.36 µg/g（11.8 ± 3.6 及び 7.9 ± 2.3% ID/g）であった。以上のように、両試験における Capan-1 腫瘍への取り込みを比較すると、概ね同様の値となったが、腫瘍が小さい試験 1 の方が、グラム当たりの濃度がわずかに高くなる傾向があった（図 10D）。イリノテカン投与動物と SG 投与動物における最初の試験における腫瘍中の SN-38 含有量を AUC で比較すると、SG を使用することにより 136 倍も高い濃度の SN-38 を腫瘍に送達できることがデータから示唆された（表 12）。しかし、両試験のデータを合わせると、SG 投与動物の送達濃度は、イリノテカン投与動物の約 45 倍高かった。SG 投与動物の NCI-N87 異種移植片（0.32 ± 0.16 g）においても、投与後 6 時間に SN-38（総 SN-38）のピークがみられ、平均 1.28 ± 0.65 µg/g（8.0 ±4.9% ID/g）であった。NCI-N87 腫瘍における SN-38（総 SN-38）の AUC は Capan-1 腫瘍のそれと同程度であったが、イリノテカン投与動物の NCI-N87 腫瘍における SN-38 の AUC が Capan-1 腫瘍での AUC

より高かったことから SG の標的化率は低くなったが、それでもなお、約 21：1 という非常に優れた標的化率を示した。イリノテカン又は SG 投与による SN-38 のクリアランスは 3 試験のすべてにおいて同程度であったことから、血清中のすべての生成物の平均 AUC を表 13 に示した。試験 1 及び試験 2 における Capan-1 腫瘍の AUC の合算値を使用すると、イリノテカン由来の SN-38 の腫瘍／血清比は 0.33 であり、NCI-N87 腫瘍における腫瘍／血清比は 0.65 であった。一方、SG として投与したときの SN-38 の腫瘍／血清比は、Capan-1 腫瘍では 12.7、NCI-N87 腫瘍では 11.3 であり、イリノテカン投与より高かった。

表 13　AUC の腫瘍／血清比

Tissue	Serum	Capan-1 (study 1 + 2)	NCI-N87	Tumor/serum AUC ratio	
				Capan-1	NCI-N87
Irinotecan-treated					
SN-38	3.27	1.09	2.11	0.33	0.65
SN-38G	4.02				
Irinotecan	27.48				
IMMU-132-treated					
Free SN-38	3.87	49.02	43.88	12.7	11.3
Free SN-38G	1.00				
SN-38 (Total)	157.21				

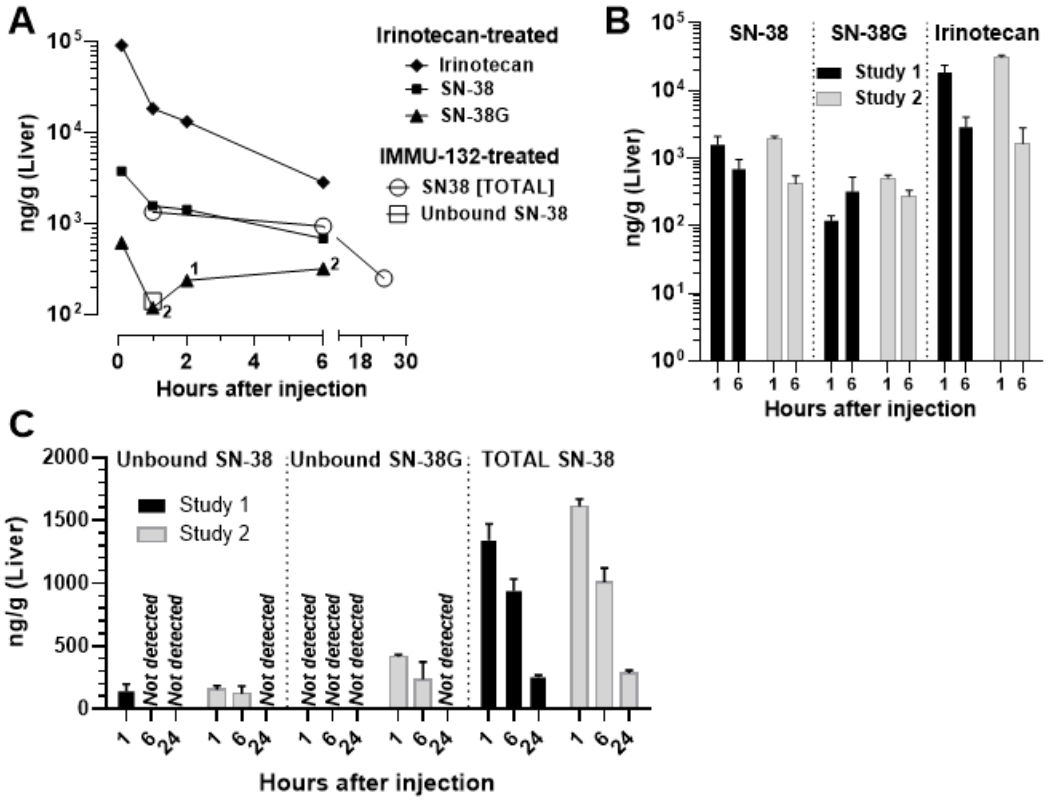
NOTE: AUCs, expressed as mg/g*h were averaged from all 3 studies, with values derived from 5 minutes to 8 hours for irinotecan-treated animals or from 1 to 72 hours for IMMU-132–treated animals.

肝臓及び腸内容物中の生成物濃度

イリノテカン投与動物の肝臓ホモジネート試料では、投与後 5 分のイリノテカン濃度は 91.72 ± 11.55 μg/g（11.8 ± 1.5% ID/g）であり、SN-38 及び SN-38G の濃度はそれぞれ 3.79 ± 0.51 及び 0.62 ± 0.05 μg/g であった。これらの生成物はすべて最初の 6 時間で速やかに消失し、24 時間には検出されなかった（図 11A 及び図 11B）。

SG 投与動物の肝臓ホモジネート試料では、総 SN-38 が肝臓で検出された主な成分であり、投与後 1 時間の濃度は 1.34 ± 0.13 μg/g（6.7 ± 0.7% ID/g）であったが、24 時間後までしか検出されなかった（図 11A）。遊離 SN-38 は、投与後 1 時間の試料でのみ検出された（140.7 ± 56.2 ng/g；SN-38 投与量換算で 0.7 ± 0.3% ID/g）。この値をイリノテカン投与の動物と比較すると、投与後 1 時間の肝臓試料で検出された SN-38 は 1.57 ± 0.51 μg/g（SN-38 投与量換算で 0.4 ± 0.1% ID/g）であった。SG 投与動物の肝臓のホモジネートからは、酸加水分解の処理の有無によらず SN-38G は検出されなかった。試験 2 では、各生成物の濃度はやや高かったが、イリノテカン投与動物と SG 投与動物の両方において、それぞれの生成物の取り込みとクリアランスのパターンは類似していた（図 11C）。

図 11　イリノテカン又は SG を投与したマウス（N = 3）の肝臓における生成物の濃度
（2 つの別々の試験で測定）

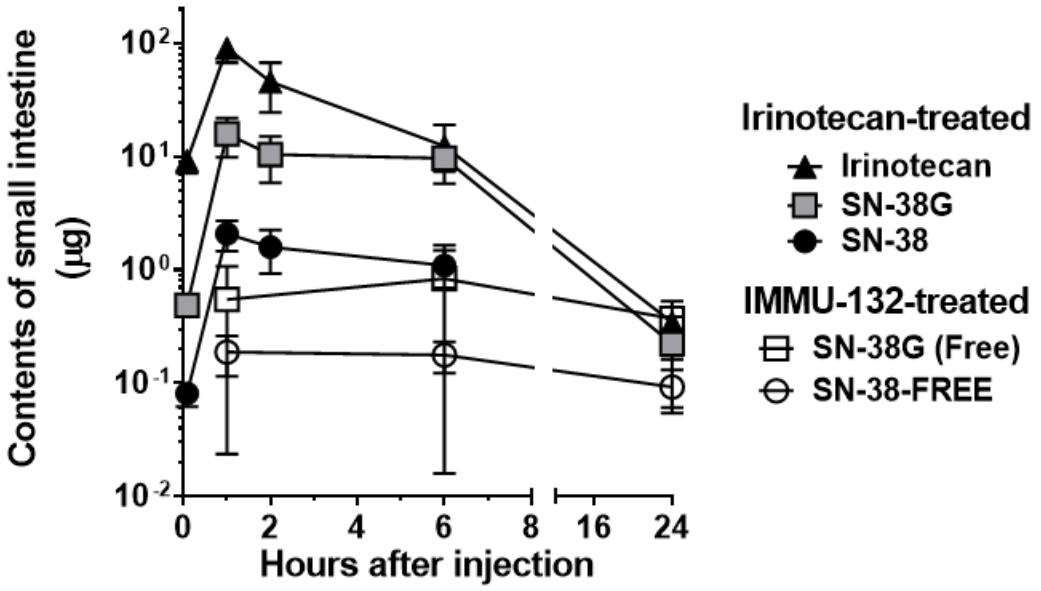


(A) Data derived from Study 1. SN-38G levels were detectable only 1 or 2 mice of the irinotecan-treated group at 1, 2, and 6 h. Study 2 only examined select intervals (1 and 6 h for irinotecan and 1, 6, and 24 h for IMMU-132. (B) and (C) provide the data from Study 2 with comparison to the data at the same intervals from Study 1, illustrating the similarities or differences in the 2 data sets.

イリノテカン投与動物では、注入投与後 5 分には小腸内に生成物が検出され、1 時間後にはピークに達した（図 12）。試験 1 及び試験 2 のデータを合わせると、1 時間後のイリノテカン含有量は 90.630 ± 23.18 µg（約 11% ID; AUC ＝345.7 µg·h）であった。小腸内容物における SN-38G の AUC（149.9 µg·h）は、SN-38 の AUC（8.2 µg·h）を約 18 倍上回っていた。

SG では、酸加水分解試料中の SN-38 濃度と非加水分解試料中の SN-38 濃度は同程度であり、未変化の複合体が肝臓から腸に輸送されることはないことを示していた。例えば、投与後 6 時間の糞試料において、非加水分解試料及び加水分解試料中の遊離 SN-38 含有量は、それぞれ 0.14 ± 0.04 及び 0.23 ± 0.07 µg であった（対応のある両側 t 検定; *P*= 0.053）。SN-38G の AUC（14.3 µg·h）は SN-38（3.3 µg·h）の約 4 倍であった。しかしながら、SG 投与群における SN-38 及び SN-38G の AUC の合計値は、イリノテカン投与群における AUC の合計値の 1/9 と低かった。腸内の生成物の総量にイリノテカンの AUC が加算されると、イリノテカンの一部が SN-38 に変換されて毒性を生じる可能性があるため、この差はさらに大きくなる。

図 12　イリノテカン又は SG を投与したマウスの上部小腸における各生成物の含有量
（試験 1 及び試験 2 の合計、N = 3～6）



Irinotecan animals were examined from 5 min to 24 h, while IMMU-132-treated animals were examined 1 to 72 h, but no products were found at detectable levels after 24 h

大腸においても、イリノテカン投与動物では、イリノテカン及び SN-38 含有量が高く、6 時間後の SN-38 含有量は SG 投与動物の約 20 倍高かった。イリノテカン投与動物の SN-38G レベルは小腸での測定値よりはるかに低かったが、これはおそらく細菌酵素による既知の分解反応を反映していると思われる（表 14）。

表 14　イリノテカン又は SG を投与した動物の大腸内生成物の分析（試験 2）

Administered agent	SN-38 (µg)		SN-38G (µg)		Irinotecan (µg)	
	1 h	6 h	1 h	6 h	1 h	6 h
Irinotecan	0.723 ± 0.184	20.74 ± 3.72	Not detected	0.0361 ± 0.002	22.45 ± 3.13	136.9 ± 40.76
IMMU-132	0.195 ± 0.052	1.135 ± 0.302 (0.663 ± 0.157)	0.042 ± 0.012	0.036 ± 0.007 (0.064 ± 0.017)	NA	NA

[a] Values in parentheses after the 6-h data for the IMMU-132 animals are the concentrations found in the 24-h feces samples
Values represent the mean ± SD (N = 3) and are expressed in µg
NA, not applicable.

8.2　新規添加剤 MES の特性評価

MES（分子量 195.233）は、SG 製剤中に新規添加剤として含有される。SG の単回投与バイアルには、79.6 mg の MES が含有されている。20 mL の 0.9%塩化ナトリウム注射液（米国薬局方（USP））で再溶解すると、MES については 3.98 mg/mL、SG については 10 mg/mL の濃度となる。したがって、SG の予定臨床用量である 10 mg/kg では、患者 1 人あたり 3.98 mg/kg の MES が投与されることになる。体重 70 kg、血液量 5 L の場合、MES の最大濃度は 0.056 mg/mL

（0.285 mmol/L）となり、その後低下していくものと推察される。新規添加剤としての MES の特性を明らかにするため、一連の肝代謝試験並びラットにおける排泄及びマスバランス試験を実施した。

計算上の C_{max} である 0.056 mg/mL、すなわち 0.285 mmol/L の濃度において、MES は CYP アイソザイム（1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4）に対する阻害作用を示さず、検討した測定条件下では CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19 及び 3A4（基質：ミダゾラム及びテストステロン）に対する時間依存的阻害もみられなかった。また、MES は 3 つの単一ドナーロットのヒト肝細胞において、ヒト CYP1A2、2B6 及び 3A4 を誘導しなかった。さらに、ヒトの主要な CYP 酵素による MES の代謝は認められなかった。MES は尿中に速やかに排泄され、尿中に回収された総量の 98.87%は投与後 24 時間までに排泄されたものであった。

試験の詳細について以下に記載する。

8.2.1　ヒト肝ミクロソームにおける CYP 阻害剤としての MES の in vitro 特性評価（BBIA-0002-DV-TB）

プールしたヒト肝ミクロソームを用い、濃度応答 IC_{50} 法により、ヒトの CYP アイソザイム（1A2、2B6、2C8、2C9、2C19 及び 3A4）活性に対する MES の時間依存的阻害能を検討した。MES は臨床的に妥当な濃度において、CYP アイソザイム（1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4）活性を阻害することはなかった。MES による CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19 及び 3A4 に対する時間依存的阻害は、検討した測定条件下では認められなかった。

8.2.2　ヒト肝細胞における MES の CYP1A2、2B6 及び 3A4 誘導能に関する in vitro 特性評価（BBIA-0003-DV-DA）

ヒト CYP アイソザイム（1A2、2B6 及び 3A4）活性に対する MES の誘導能を、誘導可能な凍結保存ヒト肝細胞（単一ドナーからの 3 ロット）を用いて評価した。

3 mmol/L の MES は、単一ドナーからの 3 ロットのヒト肝細胞において、ヒト CYP1A2、2B6 及び 3A4 を誘導しなかった。しかしながら、患者において予想される濃度を超える濃度（30 mmol/L）においては、MES はこれらの CYP アイソザイムを誘導し、3 ロットの肝細胞のうち少なくとも 2 ロットで mRNA 発現の増加が溶媒対照の 2 倍を超えた。なお、平均増加倍率は CYP2B6 が最も高く、6.33 倍であった。

8.2.3　MES のヒト CYP に対する反応表現型解析（BBIA-0004-DV-CB、BBIA-0005-DV-CB）

CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4 の組換えヒト CYP 酵素（0.025 µmol/L の Supersomes）存在下で、MES（5 µmol/L）を 37°C、120 分間インキュベートしたところ、代謝はみられなかった。プールしたヒト肝ミクロソーム（0.5 mg/mL）存在下で MES（5 µmol/L）を 37°C、120 分間インキュベートしても、代謝はみられなかった。ヒト肝ミクロソーム存在下での MES の半減期（$t_{1/2}$）は 120 分を超えると推定された。以上のように、これらのアッセイ条件下では、主要なヒト CYP による MES の代謝の兆候はみられなかった。

8.2.4 [^{14}C]MES一水和物を単回静脈内投与した雄ラットにおける放射能の薬物動態及びマスバランス（3277-002）

本試験の目的は、雄の Sprague Dawley ラットに[^{14}C]MES 一水和物を単回静脈内投与した際の血中濃度の時間経過、並びにマスバランスによる排泄経路及び排泄率を明らかにすることであった。雄ラット（13 匹）に 0.09%注射用塩化ナトリウム（USP）で調製した[^{14}C]MES 一水和物を 250 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。6匹（血液採取コホートあたり 3匹）に頸静脈カニューレを挿入して血清採取に、4 匹を尿、糞及び屍体の評価に、残りの 3 匹に頸静脈カニューレ及び胆管カニューレを挿入して胆汁採取に用いた。投与前及び投与後 120 時間までの試料を採取し、各試料の所定量を放射能分析に供した。

静脈内注入後、MES の血清中濃度は、最初の採血時点で C_{max} に達し、その後 2 時間まで急減し、投与後 24 時間（測定可能な放射能が検出された最後の採血時点）までより緩やかに減少した。MES はほぼ全量が尿中に排泄され、投与後 120 時間（5 日間）の平均尿中回収率は投与量の 93.23 ± 4.02%であり、そのうちの 98.87%は投与後 24 時間までに尿中から回収された。

9　考察及び結論

SG の薬物動態を、マウス及びカニクイザルを用いて評価した。また、製造工程で使用される2種類の異なるクローンに由来する抗体（hRS7 IgG）の PK を、非 Trop-2 交差反応種であるウサギ及び Trop-2 交差反応種であるサルで評価した。薬物動態の検討は、血清中 PK、生体内分布、腫瘍への取り込み、及び間接的な排泄評価により行った。また、製剤に使用される新規添加剤の MES に関しては、肝代謝試験並びにラットにおける排泄及びマスバランス試験によっても適性を確認した。

多くの試験においては、完全にはバリデートされていない GLP 非適合の分析法を用いた。したがって、カニクイザルを用いた短期毒性試験の TK データ及び生体内分布の全結果を含む一部のデータは探索的データとみなし、これらの試験で得られた結論はそれに応じた評価をする必要がある。

これらの試験結果は、イリノテカン投与に由来する SN-38 と比較して、SG 投与による PK プロファイルが非常に良好であることを示唆するものであった。担癌マウスでは、SG 投与による腫瘍組織の SN-38 曝露量は、より高用量でイリノテカンを直接投与した際に得られる SN-38 曝露量よりも高い傾向が認められた。同時に、イリノテカンの投与と比較して、SG を投与した動物では SN-38 の血清中濃度が顕著に低く、ADC としての安全性及び有効性のプロファイルが改善されていることを示すものと言える。

SG、SN-38 及び抗 SG 抗体に関して、GLP 適合下でバリデートされた生体試料中薬物濃度分析法が、カニクイザルの重要な長期反復投与毒性試験における TK 及び免疫原性の評価に用いられた。したがって、SG の PK データは、進行癌患者に対する本剤の製造販売承認申請を支持するのに十分に信頼性の高いデータとして得られている。MES の in vitro 肝代謝試験において、以下のことが示された。(1) MES による CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19 及び 3A4 の時間依存的阻害はないこと、(2) 臨床的に妥当な濃度において、MES による CYP1A2、2B6 及び 3A4 の誘導は認められないこと、(3) ヒト CYP に対する反応表現型解析において、検討した条件下では MES の代謝は認められないこと、(4) 投与後 120 時間までに投与量の 93.23 ± 4.02%が尿中に排泄され、そのうちの 98.87%は投与後 24 時間までに排泄されたこと。

10　参考文献

1 Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). Clin Cancer Res 2001;7 (8):2182-94.

2 Hanioka N, Tanabe N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Nagaoka K, Naito S, et al. Functional characterization of human and cynomolgus monkey UDP-glucuronosyltransferase 1A1 enzymes. Life Sci 2010;87 (7-8):261-8.

3 de Bruijn P, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997;698 (1-2):277-85.

4 Cardillo TM, Govindan SV, Sharkey RM, Trisal P, Arrojo R, Liu D, et al. Sacituzumab Govitecan (IMMU-132), an Anti-Trop-2/SN-38 Antibody-Drug Conjugate: Characterization and Efficacy in Pancreatic, Gastric, and Other Cancers. Bioconjug Chem 2015;26 (5):919-31.

5 Sharkey RM, McBride WJ, Cardillo TM, Govindan SV, Wang Y, Rossi EA, et al. Enhanced Delivery of SN-38 to Human Tumor Xenografts with an Anti-Trop-2-SN-38 Antibody Conjugate (Sacituzumab Govitecan). Clin Cancer Res 2015;21 (22):5131-8.

6 Goldenberg DM, Cardillo TM, Govindan SV, Rossi EA, Sharkey RM. Trop-2 is a novel target for solid cancer therapy with sacituzumab govitecan (IMMU-132), an antibody-drug conjugate (ADC). Oncotarget 2015;6 (26):22496-512.

7 Sharkey RM, Govindan SV, Cardillo TM, Donnell J, Xia J, Rossi EA, et al. Selective and Concentrated Accretion of SN-38 with a CEACAM5-Targeting Antibody-Drug Conjugate (ADC), Labetuzumab Govitecan (IMMU-130). Mol Cancer Ther 2018;17 (1):196-203.

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

2.6.5 薬物動態試験概要表

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁

1　薬物動態試験：一覧表 3
2　分析方法及びバリデーション試験 6
3　Ex vivo 血清安定性試験 7
4　薬物動態試験：単回投与後の吸収 8
5　薬物動態試験：反復投与後の吸収 9
6　薬物動態試験：分布 14
7　薬物動態試験：蛋白結合 16
8　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 17
9　薬物動態試験：代謝：In Vivo 18
10　薬物動態試験：代謝：In Vitro 19
11　薬物動態試験：推定代謝経路 20
12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 21
13　薬物動態試験：排泄 22
14　薬物動態試験：排泄：胆汁中 23
15　薬物動態試験：薬物相互作用 24
16　薬物動態試験：その他 25

1　薬物動態試験：一覧表

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Analytical Methods and Validation Reports				
ELISA to quantify hRS7/hRS7-SN38 in biological samples	Serum	Not applicable	Immunomedics, Inc, NJ, USA.	Q931
ELISA to quantify hRS7 conjugated to SN-38	Serum	Not applicable	Immunomedics, Inc, NJ, USA.	Q779
Quantitative analysis of free and total SN-38 and SN-38G in human serum using Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography with inline fluorescence detection	Serum	Not applicable	Immunomedics, Inc., NJ, USA	Q973
ELISA to quantify anti-hRS7/hRS7-SN38 antibodies in biological samples	Serum	Not applicable	Immunomedics, Inc., NJ, USA	Q933A
The Quantification of hRS7 IgG and HRS7-SN38 in Cynomolgus Monkey serum by Electrochemiluminescence	Cynomolgus monkey Serum	Not applicable	[redacted] USA	VIMME1707E1
The Determination of Free SN-38 and SN-38 Glucuronide in Monkey Serum, by LC-MS/MS	Cynomolgus monkey Serum	Not applicable	[redacted] USA	VIMME1702E1
The Determination of Total SN-38 in Monkey Serum, by LC-MS/MS	Cynomolgus monkey Serum	Not applicable	[redacted] USA	VIMME1703E1
Detection of anti-hRS7-SN38 antibodies in Monkey Serum by Electrochemiluminescence (ECL)	Cynomolgus monkey Serum	Not applicable	[redacted] USA	VIMME1713E1

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Absorption				
Stability of hRS7-CL2A-SN-38 in human serum and monkey serum in vitro	Cynomolgus monkey and human serum	Not applicable	Immunomedics, Inc., NJ, USA	RD-CH-[redacted]-01
A pharmacokinetic assessment study of hRS7-[redacted], hRS7-[redacted] (IMMU), and hRS7-[redacted] ([redacted]) in New Zealand white rabbits following a single intravenous dose administration	New Zealand white rabbits	Intravenous	[redacted] USA	[redacted].160.24
Repeat dose toxicity study of IMMU-132 in Cynomolgus monkeys followed by a 4-week recovery period. PK samples drawn out to 120 h post-first injection (i.e., 48 h post-second injection)	Cynomolgus monkeys	Intravenous	[redacted] USA	[redacted].160.03
A 3 month repeat dose toxicity study of IMMU-132 in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkeys	Intravenous	[redacted] USA	[redacted].160.25
Distribution				
Biodistribution of IMMU-132 vs. hRS7 IgG in athymic nude mice bearing human squamous cell lung carcinoma tumor xenografts (SK-MES-1)	Athymic nude mice	Intravenous	Immunomedics Inc., NJ, USA	031210-156
Metabolism				
Studies examining the metabolism of IMMU-132 were not performed.				
Excretion				
Studies examining the excretion of IMMU-132 were not performed.				
Pharmacokinetic Drug Interactions				
Studies examining pharmacokinetic drug interactions of IMMU-132 were not performed.				

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Other				
Pharmacokinetics of hRS7-CL2A-SN-38 and Irinotecan in Capan-1 Tumor-Bearing Mice	Athymic nude mice	Intravenous	Immunomedics Inc., NJ, USA	012014-275
Pharmacokinetics of hRS7-CL2A-SN-38 and Irinotecan in NCI-N87 Human Gastric Tumor-Bearing Mice	Athymic nude mice	Intravenous	Immunomedics Inc., NJ, USA	062714-291
Studies with the Novel Excipient MES				
In vitro characterization of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) as a potential inhibitor of cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes	Human liver microsomes	Not applicable	[redacted] USA	BBIA-0002-DV-TB
In vitro characterization of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) for induction potential of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 using human hepatocytes	Human hepatocytes	Not applicable	[redacted] USA	BBIA-0003-DV-DA
2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) human cytochrome P450 enzyme reaction phenotyping	Human hepatocytes	Not applicable	[redacted] USA	BBIA-0004-DV-CB, (Same report two different study numbers) BBIA-0005-DV-CB
Pharmacokinetics and mass balance of radioactivity in male rats administered a single Intravenous dose of [^{14}C]MES, monohydrate	Sprague Dawley rat	Intravenous slow bolus	[redacted] USA	3277-002

2　　分析方法及びバリデーション試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Analytical methods of IMMU-132 are described in module 2.6.4 Pharmacokinetics Written Summary. The method validation reports and addendums are provided in Module 4. Links are provided below for each report.
The Quantification of hRS7 IgG and HRS7-SN38 in Cynomolgus Monkey serum by Electrochemiluminescence VIMME1707E1 and Addendum 1
The Determination of Free SN-38 and SN-38 Glucuronide in Monkey Serum, by LC-MS/MS VIMME1702E1 and Addendum 1
The Determination of Total SN-38 in Monkey Serum, by LC-MS/MS VIMME1703E1 and Addendum 1
Detection of anti-hRS7-SN38 antibodies in Monkey Serum by Electrochemiluminescence (ECL) VIMME1713E1

3　Ex vivo 血清安定性試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Study Number: RD-CH-[redacted]-01	**Study Title:** Stability of hRS7-CL2A-SN-38 in human serum and monkey serum in vitro
Species	Cynomolgus monkey and human serum
Gender (M) / Number of samples	3 replicates
Feeding condition	Not Applicable
Vehicle / Formulation	Filtered deionized water for injection was used to reconstitute sacituzumab govitecan prior to admixing with serum samples
Method of Administration	Ex vivo
Dose (mg/kg)	0.3 mg/mL
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Serum
Analyte	Sacituzumab govitecan (IMMU-132)
Assay	HPLC for SN-38 or 10-OH-CPT internal standard

Results:

SN-38 was released from sacituzumab govitecan in monkey and human serum when incubated at 37ºC ex vivo with respective half-lives of 30.82 and 44.10 hours.

4　薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Study Number: [redacted].160.24	**Study Title:** A pharmacokinetic assessment study of hRS7-[redacted], hRS7-[redacted] (IMMU), and hRS7-[redacted] ([redacted]) in New Zealand white rabbits following a single intravenous dose administration		
Species	New Zealand white rabbits		
Gender (M/F) / Number of animals	3M/3F per group		
Feeding condition	fed		
Vehicle / Formulation	0.9% Sodium Chloride for Injection		
Method of Administration	Intravenous bolus injection		
Dose (mg/kg)	15 mg/kg		
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Serum		
Analyte	hRS7 IgG		
Assay	ELISA		
PK parameters:	**hRS7-[redacted]**	**hRS7-[redacted] (IMMU)**	**hRS7-[redacted] ([redacted])**
$T_{1/2\beta}$	178.5±78.7 h	177.2±76.8 h	253.6±34.8 h
C_{max}	480.2±27.8 µg/mL	439.7±43.7 µg/mL	474.4±43.0 µg/mL
AUC_{inf}	60006±20290 µgh/mL	57877±18669 µgh/mL	75002±6710 µgh/mL
Clearance	0.77±0.23 mL/h	0.79±0.22 mL/h	0.56±0.06 mL/h

Additional Information:

The pharmacokinetics of three different batches of hRS7 IgG were compared. Pharmacokinetic analysis demonstrated that there were no significant differences between hRS7 from two different clones ([redacted] and [redacted]) and from two different sources (Immunomedics and [redacted]).

5　薬物動態試験：反復投与後の吸収

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Study Number: [redacted].160.03	**Study Title:** Pharmacokinetics of hRS7-SN-38 (IMMU-132) in Cynomolgus monkeys (included in final study report of [redacted] repeat-dose toxicity study [redacted].160.03)		
Species	Cynomolgus monkey		
Gender (M/F) / Number of animals	3M+3F per group (1M+1F per group for samples obtained on Days 14, 21 and 28)		
Feeding condition	fed		
Vehicle / Formulation	MES Buffer ([redacted] mM MES buffer, [redacted] mM Trehalose, [redacted]% v/v Polysorbate 80) in 0.9% sodium chloride		
Method of Administration	Intravenous infusion over a period of 1h (± 10 min) on Days 1 and 4		
Dose (mg/kg)	60 or 120 mg/kg on Days 1 and 4, each		
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	serum		
Analyte	hRS7 antibody, free SN-38 and total SN-38		
Assay	ELISA (for HRS7), reversed phase HPLC with fluorescence detection (for SN-38)		
PK parameters: 2 x 60 mg/kg IMMU-132	**hRS7**	**Free SN-38**	**Total SN-38**
Mean $T_{1/2}$	124.82 h	25.57 h	13.54 h
Median T_{max}	73.50 h	Not calculated	Not calculated
Mean C_{max}	1605.67 µg/mL	1.27 µg/mL	41.58 µg/mL
Mean AUC_{inf}	243315.32 µg*h/mL	80.23 µg*h/mL‡	1276.17 µg*h/mL‡
PK parameters: 2 x 120 mg/kg IMMU-132	**hRS7**	**Free SN-38**	**Total SN-38**
Mean $T_{1/2}$	125.60 h	26.96 h	13.29 h
Median T_{max}	76.00 h	Not calculated	Not calculated
Mean C_{max}	2904.67 µg/mL	3.70 µg/mL	72.92 µg/mL
Mean AUC_{inf}	487731.51 µg*h/mL	225.17 µg*h/mL‡	2493.32 µg*h/mL‡

Study Number: [redacted].160.03	**Study Title:** Pharmacokinetics of hRS7-SN-38 (IMMU-132) in Cynomolgus monkeys (included in final study report of [redacted] repeat-dose toxicity study [redacted].160.03)

Additional Information:

$T_{1/2}$ was calculated after the second dose.

T_{max}, C_{max} and AUC_{inf} are given across the two doses. T_{max} after the second dose is the given T_{max} – 72h.

‡AUC for free and total SN-38 is adjusted by [redacted] program to account for differences in animal weights.

2.6.5.4A Pharmacokinetics: Absorption After Repeated Doses

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Study Number: [redacted].160.25	**Study Title:** A Toxicity Study of IMMU-132 in Cynomolgus Monkeys
Species	Cynomolgus monkey
Gender (M/F) / Number of animals	2M/3F MES Buffer control and 5M+5F per IMMU-132 group
Feeding condition	fed
Vehicle / Formulation	MES Buffer Solution ([redacted] mM MES buffer, [redacted] mM Trehalose, [redacted]% v/v Polysorbate 80)
Method of Administration	Intravenous infusion over a period of 1h (± 10 min) on Days 1, 8, 22, 29, 43, 50, 64 and 71
Dose (mg/kg)	12.5, 25 or 50 mg/kg
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	serum
Analyte	Total hRS7 antibody, free SN-38, SN-38G, and total SN-38
Assay	• Total SN-38 (sum of free and bound) – acid hydrolysis and LC-MS/MS (Liquid Chromatograhy Tandem Mass Spectrometry) • Free SN-38 and free SN-38G – LC-MS/MS • Total Antibody (TAb): free hRS7 (unconjugated/free antibody) + IMMU-132 (conjugated antibody/ADC) – ECL (Electrochemiluminescence) assay.

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Study Number: [redacted].160.25	**Study Title:** A Toxicity Study of IMMU-132 in Cynomolgus Monkeys
Special Features:	Comparison of two batches, IMMU-132 ([redacted], main batch; Process C) and IMMU-132 ([redacted]: Process B). Evaluation of MES Buffer

Day	Dose (mg/kg)	Sex	Total Antibody (TAb)			Total SN-38			Free SN-38		SN-38G	
			C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-168} (hr*µg/mL)	HL (hr)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-168} (hr*ng/mL)	HL (hr)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-168} (hr*ng/mL)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-168} (hr*ng/mL)
1	12.5	F	357000	22700	NC	6350	115000	13.5	103	2910	8.04	135
		M	406000	26000	NC	6300	122000	13.9	95.0	2360	5.75	NC
1	12.5	F	713000	50100	NC	13500	255000	19.0	201	6030	11.7	297
		M	669000	47100	NC	13300	243000	19.5	231	5670	9.84	288
1	25	F	1440000	109000	NC	24900	488000	24.6	313	8140	22.6	777
		M	1510000	124000	NC	26600	533000	26.8	337	8860	27.5	864
1	25	F	681000	49400	NC	12200	224000	17.7	157	4260	10.1	328
		M	674000	50600	NC	12700	240000	18.2	145	3650	10.0	327
71	50	F	137000	8880	NC	4430	42200	16.9	64.6	1300	19.4	342
		M	146000	17400	NC	4930	46700	7.83	85.2	1260	44.9	1630
71	50	F	957000	73600	74.3	13400	266000	21.2	251	8200	14.0	406
		M	952000	77000	69.0	13100	254000	24.6	238	5870	14.5	463
71	25 ([redacted])	F	1850000	155000	89.7	25100	495000	27.8	331	8550	27.3	1000
		M	2160000	202000	152	28000	571000	31.6	341	10000	51.7	2560
71	25 ([redacted])	F	615000	36400	67.3	11300	177000	16.6	190	4280	31.4	717
		M	779000	73400	73.0	12700	221000	19.1	163	3900	16.4	402

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Study Number: [redacted].160.25	**Study Title:** A Toxicity Study of IMMU-132 in Cynomolgus Monkeys

Additional Information:

NC Not calculable

6　薬物動態試験：分布

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Study Number: 031210-156	**Study Title:** Biodistribution of IMMU-132 vs. hRS7 IgG in athymic nude mice bearing human squamous cell lung carcinoma tumor xenografts (SK-MES-1)
Species	Athymic nude mice mice bearing human squamous cell lung carcinoma (SK-MES-1) tumor xenografts of approximately 0.3cm^3
Gender (M/F) / Number of animals	35 females per group
Feeding condition	Not specified
Vehicle / Formulation	0.9% Sodium Chloride for Injection
Method of Administration	Single intravenous injection
Dose	250 µg/animal (20 µCi) ^{111}In-DTPA-hRS7-CL2A-SN-38
Radionuclide	^{111}In
Specific Activity	80 µCi/mg (final product)
Sampling Time(s)	5 min, 2-, 6-, 24-, 48-, 72-, and 168-h

	Concentration of hRS7-SN38 (% Injected dose per gram)						
Tissues/Organs	After 5 min	After 2 h	After 4 h	After 24 h	After 48 h	After 72 h	After 168 h
SK-MES-1 tumor	1.00 ± 0.11	9.69 ± 2.06	15.62 ± 1.61	17.09 ± 3.84	19.15 ± 6.25	25.41 ± 8.14	17.57 ± 9.25
Liver	11.28 ± 1.24	13.34 ± 1.12	18.65 ± 2.60	21.84 ± 2.52	15.93 ± 1.57	17.29 ± 1.31	11.16 ± 1.37
Spleen	9.66 ± 1.43	8.86 ± 2.28	9.53 ± 1.71	9.17 ± 2.67	6.97 ± 2.29	13.94 ± 10.10	7.73 ± 0.50
Kidney	14.34 ± 1.75	13.44 ± 1.03	13.99 ± 2.22	8.69 ± 0.69	8.98 ± 0.84	8.21 ± 1.05	5.67 ± 0.80
Lungs	17.08 ± 3.79	11.01 ± 3.91	13.87 ± 6.41	7.76 ± 2.98	6.37 ± 0.97	5.70 ± 1.38	3.37 ± 1.05
Blood	62.28 ± 3.71	40.54 ± 5.06	40.53 ± 5.03	20.28 ± 3.39	18.88 ± 2.22	15.07 ± 2.09	8.98 ± 3.12
Stomach	1.23 ± 0.41	2.18 ± 0.57	2.02 ± 0.89	1.31 ± 0.39	1.08 ± 0.18	1.33 ± 0.22	0.91 ± 0.16
Small Intestine	2.11 ± 0.29	3.86 ± 0.60	3.77 ± 0.44	2.28 ± 0.10	2.19 ± 0.66	3.01 ± 0.52	1.99 ± 0.20
Large Intestine	1.12 ± 0.18	1.94 ± 0.46	2.56 ± 0.38	1.76 ± 0.19	1.58 ± 0.26	1.90 ± 0.25	1.24 ± 0.03
Bone	4.90 ± 1.41	4.57 ± 1.23	5.12 ± 1.77	3.55 ± 0.79	3.83 ± 1.05	5.93 ± 1.49	3.09 ± 0.70
W. Bone	3.99 ± 1.00	4.22 ± 0.47	4.79 ± 1.22	4.55 ± 2.34	4.23 ± 0.71	4.40 ± 1.84	2.80 ± 1.37

Study Number: 031210-156	**Study Title:** Biodistribution of IMMU-132 vs. hRS7 IgG in athymic nude mice bearing human squamous cell lung carcinoma tumor xenografts (SK-MES-1)						
Muscle	1.24 ± 0.16	1.13 ± 0.26	1.40 ± 0.23	1.62 ± 0.16	1.39 ± 0.06	1.23 ± 0.14	0.72 ± 0.15
Tail	7.35 ± 2.49	4.34 ± 0.54	4.65 ± 0.73	8.27 ± 7.36	7.98 ± 11.85	2.40 ± 0.35	1.68 ± 0.42
Tumor weight (g)	0.16 ± 0.06	0.15 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.05	0.12 ± 0.04	0.16 ± 0.07	0.14 ± 0.09

Additional Information: Tumor uptake of ^{111}In-hRS7-CL2A-SN-38 in pre-dosed mice was substantially reduced at every time-point in comparison to animals that did not receive the pre-dose of unlabeled hRS7-SN-38 three days in advance.

7　　薬物動態試験：蛋白結合

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Plasma protein binding of IMMU-132 was not examined.

8　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Pharmacokinetics studies of IMMU-132 in pregnant or nursing animals were not performed.

9　薬物動態試験：代謝：In Vivo

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Studies examining the metabolism of IMMU-132 were not performed.

10　薬物動態試験：代謝：In Vitro

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Studies examining the metabolism of IMMU-132 were not performed.

11　薬物動態試験：推定代謝経路

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Studies examining the metabolism of IMMU-132 were not performed.

12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

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

13　薬物動態試験：排泄

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Studies examining the excretion of IMMU-132 were not performed.

14　薬物動態試験：排泄：胆汁中

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Studies examining the excretion of IMMU-132 were not performed.

15　薬物動態試験：薬物相互作用

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

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

16　薬物動態試験：その他

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Study Number: 012014-275	**Study Title:** Pharmacokinetics of hRS7-CL2A-SN-38 and Irinotecan in Capan-1 Tumor-Bearing Mice
Type of Study	Determination of the amount of SN-38 present in the serum, tumor, and various normal tissues of nude mice bearing Capan-1 tumors (~0.25cm^3) after injection of hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132) or irinotecan (IRI)
Method	20 female nude mice per group received either 40 mg/kg irinotecan or 1 mg hRS7-CL2A-SN-38 by single intravenous injection. Animals were sacrificed at various time points and SN-38, the active metabolite of irinotecan, as well as its glucuronide SN-38G was quantified in serum and tissues.
	Sacrifice time points (40 mg/kg irinotecan): 5-min, 1, 2, 6, and 24 h post-injection Sacrifice time points (1 mg/animal hRS7-CL2A-SN-38): 1, 6, 24, 48, and 72 h post-injection

Tabulated Results

	Irinotecan			**hRS7-CL2A-SN-38**		
	Irinotecan	SN-38	SN-38G	Total SN-38	Free SN-38	Free SN-38G
AUC in serum [µg/mL*h]	21.04	2.52	2.84	148.8	4.47	*0.18 (data not reliable)*
AUC in tumor [µg/mL*h]	48.37	0.40	1.08	54.25	Not detected	Not detected
AUC in liver [µg/mL*h]	98.7	8.2	2.0	16.4	Not quantifiable	Not detected

Additional Information: Total SN-38 levels (i.e. free and intact IMMU-132) demonstrated clearance patterns consistent with *in vitro* studies that indicated 50% of the SN-38 is released from the conjugate in mouse serum every 17.5 hours. Within the liver of these animals, again the majority of SN-38 detected was in the intact form, and this only through the first 24 h. Conversely, only free SN-38 was detected in the intestine indicating that intact conjugate was not transported from the liver to the intestine.

Study Number: 062714-291	**Study Title:** Pharmacokinetics of hRS7-CL2A-SN-38 and Irinotecan in NCI-N87 Human Gastric Tumor-Bearing Mice
Type of Study	Determination of the amount of SN-38 present in the serum and tumor of nude mice bearing NCI-N87 tumors (~0.50cm^3) after injection of hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132) or irinotecan (IRI)
Method	15 female nude mice per group received either 40 mg/kg irinotecan or 1 mg hRS7-CL2A-SN-38 by single intravenous injection. Animals were sacrificed at various time points and SN-38, the active metabolite of irinotecan, as well as its glucuronide SN-38G was quantified in serum and tumor.
	Sacrifice time points (40 mg/kg irinotecan): 5-min, 1, 2, 6, and 8 h post-injection (3 animals per time point) Sacrifice time points (1 mg/animal hRS7-CL2A-SN-38): 1, 6, 24, 48, and 72 h post-injection (3 animals per time point)

Tabulated Results

	Irinotecan			**hRS7-CL2A-SN-38**		
	Irinotecan	SN-38	SN-38G	Total SN-38	Free SN-38	Free SN-38G
AUC in serum [µg/mL*h]	24.51	3.21	3.00	171.72	3.88	1.39
AUC in tumor [µg/mL*h]	45.69	2.11	0.31	43.88	Not detected	Not detected

Additional Information: not applicable

Study Number: BBIA-0002-DV-TB	**Study Title:** In vitro characterization of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) as a potential inhibitor of cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes
Type of Study	Metabolism
Method	
Test Article:	MES
Concentrations:	300, 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03 and 0 (water control) mM
Control Articles:	Fluvoxamine (1A2 inhibitor), Ticlopidine (2B6 inhibitor) Quercetin (2C8 inhibitor), Sulfaphenazole (2C9 inhibitor) Omeprazole (2C19 inhibitor), Paroxetine (2D6 inhibitor) and Mifepristone (3A4 inhibitor)
Concentrations:	50, 33.3, 22.2, 5.55, 1.39, 0.348, 0.0870, 0.0218, 0.00545 and 0.0 (DMSO control) µM
Matrix:	Pooled human liver microsomes, mixed gender, at 0.1 mg/mL
Assay Buffer:	100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4
CYP450 Substrates:	Phenacetin (1A2), Bupropion (2B6), Amodiaquine (2C8) Diclofenac (2C9), Mephenytoin (2C19), Dextromethorphan (2D6), Testosterone (3A4) and Midazolam (3A4)
Concentrations:	Approximate K_m concentration for each respective isozyme (within the linear range of CYP-mediated metabolism)
Cofactor:	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)
Replicates:	Two
Pre-Incubation:	0 and 30 minutes at 37°C with and without NADPH (2 mM)
Incubation:	30 minutes at 37°C
Bioanalysis:	LC-MS/MS

Results-

MES at the highest test concentration (300 mM) in pooled human liver microsomes (0.1 mg/mL) showed significant inhibition of cytochrome P450 (CYP) isoenzyme (1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4) activity. For CYPs 1A2, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 and 3A4 (midazolam and testosterone substrates), inhibition by 300 mM MES under all assay conditions ranged from 93.9% to 104.9%. For CYP2C9, inhibition by 300 mM MES under all assay conditions ranged from 62.9% to 100.9%.

Study Number: BBIA-0002-DV-TB	**Study Title:** In vitro characterization of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) as a potential inhibitor of cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes

MES inhibited CYP isozyme activity with IC50 values ranging from 21.6 to 26.4 mM for CYP1A2, from 21.1 to 36.0 mM for CYP2B6, from 8.45 to 16.2 mM for CYP2C8, from 80.9 to 221 mM for CYP2C9, from 22.2 to 37.5 mM for CYP2C19, from 23.9 to 53.4 mM for CYP2D6 and from 30.2 to 50.9 mM for CYP3A4 (testosterone substrate). For CYP3A4 (midazolam substrate), the IC50 value for three of the four assay conditions is an approximate value (90.1 to 96.8 mM) because an ideal sigmoidal curve could not be achieved for the inhibition curve. The IC50 value for no preincubation + NADPH is 59.0 mM.

Time-dependent inhibition of CYP2D6 by MES was observed with preincubation in presence of NADPH. Under the assay conditions, IC50 shift values range from 1.85 to 2.23.

No time-dependent inhibition of CYPs 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, and 3A4 (midazolam and testosterone substrates) by MES was observed under the assay conditions. For each CYP isoenzyme, at least one IC50 shift value is <1.5.

Additional Information: none

Study Number: BBIA-0003-DV-DA	**Study Title:** In vitro characterization of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) for induction potential of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 using human hepatocytes
Type of Study	Metabolism

Method

Test Article: 2-(n-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES)
Concentrations: 3, 30, and 300 mM
Control Articles: Omeprazole (1A2 inducer)
Phenobarbital (2B6 inducer)
Rifampicin (3A4 inducer)
Concentrations: 0.0500 mM (omeprazole)
1.00 mM (phenobarbital)
0.0200 mM (rifampicin)
Test System: Inducible cryopreserved human hepatocytes
Three single-donor lots
Assay Medium: InVitroGRO KHB (BioIVT Catalog No. Z99074)
Substrates: Phenacetin (1A2)
Bupropion (2B6)
Testosterone (3A4)
Concentrations: 100 µM (phenacetin)
150 µM (bupropion)
125 µM (testosterone)
Replicates: Three
Assay conditions: 48 hours at 37°C in humidified 5% carbon dioxide incubator
Analysis: LC-MS/MS (enzyme activity) and mRNA analysis

Study Number: BBIA-0003-DV-DA	**Study Title:** In vitro characterization of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) for induction potential of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 using human hepatocytes

Results- MES at 3 mM had no significant effect on hepatocyte viability for the three single-donor lots (86.7% to 95.3% viability) under these assay conditions. There is a concentration effect on hepatocyte viability at higher concentrations. At 30 mM and 300 mM MES, viability across the hepatocyte lots ranged from 56.8% to 69.4% and 0.0% to 0.1%, respectively. Due to measured cytotoxicity >50% at 300 mM MES, induction data (enzyme activity and mRNA expression) is inconclusive.

MES at 3 mM did not induce human CYPs 1A2, 2B6 and 3A4 in three single-donor lots of human hepatocytes. Increases in enzyme activity or mRNA expression in at least two of the three single-donor lots of hepatocytes were <2 fold the vehicle control and <20% of the response of the positive control.

MES at 30 mM induced human CYPs 1A2, 2B6 and 3A4 in three single-donor lots of human hepatocytes. Increase in mRNA expression in at least two of the three single-donor lots of hepatocytes were >2 fold the vehicle control. The mean fold-increase was highest for CYP2B6 (6.33-fold).

MES at 3, 30 and 300 mM was stable over 24 hours with hepatocytes for both days of incubation. Across concentrations and the three single-donor lots of hepatocytes, the observed average stability is at least 92.8%.

Results for the positive control articles (inducers) are within the expected ranges, indicating acceptable performance of the assays.

Additional Information: none

Study Number: BBIA-0004-DV-CB, BBIA-0005-DV-CB	**Study Title:** 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) human cytochrome P450 enzyme reaction phenotyping
Type of Study	Metabolism

Method:

Test System 1: Supersomes (recombinantly expressed drug metabolizing enzyme reagents, consisting of microsomes prepared from insect cells infected with a virus engineered to express a CYP isoform).

Supersome stocks are at 0.5 nmol per 0.5 mL, 1 µM.

Test Article: MES at 5 µM

Control Articles: Phenacetin (CYP1A2), Bupropion (CYP2B6), Amodiaquine (CYP2C8), Diclofenac (CYP2C9), Mephenytoin (CYP2C19), Dextromethorphan (CYP2D6), Midazolam (CYP3A4) at 1 µM

Test System 2: Pooled human liver microsomes, mixed gender, 0.5 mg/mL with and without CYP isozyme specific inhibitors

Test Article: MES at 5 µM

Control Articles: Dextromethorphan (CYP2D6), Midazolam (CYP3A4) at 1 µM

CYP Inhibitors: Furafylline (CYP1A2 inhibitor), 2-Phenyl-2-(1-piperidinyl)propane (CYP2B6 inhibitor), Quercetin (CYP2C8 inhibitor), Sulfaphenazole (CYP2C9 inhibitor), Omeprazole (CYP2C19 inhibitor), Quinidine (CYP2D6 inhibitor), Ketoconazole (CYP3A4 inhibitor)

Concentrations: Ranging from 1 to 20 µM

Assay conditions: Time zero, 15, 30, 60, 90 and 120 minutes at 37°C

Analysis: LC-MS/MS

Results- Overall, there was no indication of metabolism of MES by the major human cytochrome P450 enzymes under these assay conditions.

The results for the control articles (with and without inhibitors) are within the expected ranges, indicating acceptable performance of the assays.

Additional Information: none

Study Number: 3277-002	**Study Title:** Pharmacokinetics and mass balance of radioactivity in male rats administered a single Intravenous dose of [^{14}C]MES, monohydrate
Type of Study	Pharmacokinetics and excretion
Method	Thirteen male rats were administered a single intravenous dose of 250 mg/kg [^{14}C]MES, monohydrate in 0.09% Sodium Chloride for Injection, USP. Six (6) Jugular-Vein Cannulated [JUGVEIN] rats (3/per blood collection cohort) were used for serum collection; 4 rats were dedicated for urine, feces and carcass evaluations and the remaining 3 Jugular-Vein Cannulated [JUGVEIN] and Bile-Duct Cannulated [BILECANN] rats were used for bile collection. Samples were collected from predose up to 120 hours post dose and an aliquot of each sample was submitted for radioanalysis.
Results-	After intravenous administration, MES reaches Cmax at the first timepoint post infusion followed steep decline in serum concentration through 2 hours postdose, and a more gradual decline through 24 hours postdose – the last timepoint analyzed with measurable radioactivity. MES is excreted almost entirely in the urine with a mean urine recovery of the radioactive dose through 120 hours (5 days) postdose of 93.23 ± 4.02%.
Additional Information: none	

Study Number: 3277-002	**Study Title:** Pharmacokinetics and mass balance of radioactivity in male rats administered a single Intravenous dose of [^{14}C]MES, monohydrate
Type of Study	Pharmacokinetics and excretion
Method	Thirteen male rats were administered a single intravenous dose of 250 mg/kg [^{14}C]MES, monohydrate in 0.09% Sodium Chloride for Injection, USP. Six (6) Jugular-Vein Cannulated [JUGVEIN] rats (3/per blood collection cohort) were used for serum collection; 4 rats were dedicated for urine, feces and carcass evaluations and the remaining 3 Jugular-Vein Cannulated [JUGVEIN] and Bile-Duct Cannulated [BILECANN] rats were used for bile collection. Samples were collected from predose up to 120 hours post dose and an aliquot of each sample was submitted for radioanalysis.
Results-	After intravenous administration, MES reaches Cmax at the first timepoint post infusion followed steep decline in serum concentration through 2 hours postdose, and a more gradual decline through 24 hours postdose – the last timepoint analyzed with measurable radioactivity. MES is excreted almost entirely in the urine with a mean urine recovery of the radioactive dose through 120 hours (5 days) postdose of 93.23 ± 4.02%.
Additional Information: none	