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

2.6.6 毒性試験の概要文

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁

略号一覧表 4
1　まとめ 6
2　単回投与毒性試験 10
3　反復投与毒性試験 11
3.1　マウスにおける反復投与毒性試験 11
3.2　カニクイザルにおける反復投与毒性試験 11
3.2.1　カニクイザルにおける 1 時間持続注入及び 4 週間回復による SG（hRS7-SN-38）の反復投与毒性試験（[redacted].160.03） 12
3.2.2　カニクイザルにおける SG（IMMU-132）の毒性試験（[redacted].160.25） 14
4　遺伝毒性試験 16
5　がん原性試験 17
6　生殖発生毒性試験 18
7　局所刺激性試験 19
8　光毒性試験 20
9　その他の毒性試験 21
10　考察及び結論 27
11　参考文献 28

表目次

頁

表 1　SG の非臨床毒性試験一覧.....6

略号一覧表

略号	英語	日本語
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADC	antibody drug conjugate	抗体薬物複合体
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the curve	曲線下面積
C_{max}	maximum blood concentration	最大血中濃度
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
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
HNSTD	highest non-severely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
hRS7	humanized anti-Trop-2 monoclonal antibody	ヒト化抗 Trop-2 モノクローナル抗体
IARC	International Agency for Research on Cancer	国際がん研究機関
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
LD_{50}	50% lethal dose	50%致死量
MES	2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸水和物
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
MSDS	material safety data sheet	化学物質等安全データシート
NaOAc	sodium acetate	酢酸ナトリウム
NOEL	no observed effect level	無影響量
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
PCE	polychromatic erythrocytes	多染性赤血球
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
TAb	total antibody	総抗体
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	time-to-maximum blood concentration	最高血中濃度到達時間
TNBC	triple-negative breast cancer	トリプルネガティブ乳癌

略号	英語	日本語
Trop-2	trophoblast cell surface antigen 2	-
UBC	urinary bladder transitional cell carcinoma	膀胱移行細胞癌
UGT1A1	uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1	UDP グルクロン酸転移酵素 1A1
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-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。

SG は進行癌患者の治療を目的としていることから、非臨床試験は ICH S9 ガイドラインに従って実施した。カニクイザルの trophoblast cell surface antigen 2（Trop-2）が、SG の結合部位である hRS7 抗体（ヒト化抗 Trop-2 モノクローナル抗体）と交差反応性を示すことから、カニクイザルを唯一の適切な動物種として同定した。

非臨床毒性試験に用いる動物種の選択にあたっては、非臨床動物種における SN-38 の活性及び SG が Trop-2 を標的とする能力という 2 つの主な要因を考慮した。SG はマウスの Trop-2 相同遺伝子に結合しないことから[1]（CTD 4.2.1.1.7、RR-[redacted]）、オフターゲットの毒性評価のための毒性試験はマウスで、交差反応性が認められることから反復投与毒性試験はカニクイザルで実施した。また、SG の血清安定性及び細胞毒性のある SN-38 の UGT1A1 代謝は、カニクイザルとヒトで類似している（CTD 2.6.4 項）。カニクイザルにおける 3 ヵ月間毒性試験（GLP 適合）で使用した被験物質は、第 3 相臨床試験（製法 C 剤）にも用いたもので、新規添加剤である 2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸水和物（MES）が製剤中及び溶媒対照中に配合されている。独立した毒性評価を必要とするような被験物質関連の不純物は存在しない。被験物質の特性に関するその他の情報は CTD 2.6.7 項に示した。SG、放出薬物である SN-38 及び新規添加剤である MES についての毒性試験の概要を表 1 に示し、その後に詳細を記載した。

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

表 1　SG の非臨床毒性試験一覧

試験番号 GLP 適合状況	動物種／試験系 ほか	被験物質の濃度／投与量
100209-143 GLP 非適合	無処置雄 Swiss-Webster マウスにおける IMMU-132 の高用量投与による急性毒性	IMMU-132 を 2×250、2×500、2×750 mg/kg の用量で試験 0 日及び 3 日に腹腔内投与 IMMU-132 は [redacted] 緩衝液（[redacted] mmol/L [redacted]; [redacted] mmol/L トレハロース; [redacted]% ポリソルベート 80）で調製

試験番号 GLP 適合状況	動物種／試験系 ほか	被験物質の濃度／投与量
122109-151 GLP 非適合	無処置雄 Swiss-Webster マウスにおける IMMU-132 の高用量投与による急性毒性（100209-143 試験との違い：この試験では緩衝液を NaOAc から MES に変更）	IMMU-132 を 2×750 mg/kg の用量で試験 0 日及び 3 日に腹腔内投与 IMMU-132 は MES 緩衝液（[redacted] mmol/L MES; [redacted] mmol/L トレハロース; [redacted]% ポリソルベート 80）で調製
[redacted].160.03 GLP 適合	カニクイザルにおける IMMU-132 の反復投与毒性及び 4 週間回復性試験	IMMU-132 を 2×60 及び 2×120 mg/kg の用量で試験 1 日及び 4 日に静脈内投与；（[redacted] mmol/L MES 緩衝液で調製）
[redacted].160.25 GLP 適合	カニクイザルにおける IMMU-132 の反復投与毒性及び 6 週間回復性試験	MES 緩衝液（[redacted] mmol/L MES 緩衝液; [redacted] mmol/L トレハロース; [redacted]% v/v ポリソルベート 80）又は MES 緩衝液で調製した IMMU-132 を、21 日間の処置サイクル（各サイクルの試験 1 日及び 8 日に投与）で、4 サイクル投与 用量は、製法 C 剤（第 3 相臨床試験用）については 12.5、25、50 mg/kg、製法 B 剤（第 1/2 相臨床試験用）については 25 mg/kg
[redacted]1595_R1b GLP 適合	SN-38 の遺伝毒性：哺乳類細胞を用いた in vitro 小核試験（OECD 試験ガイドライン 487）	0.02、0.06、0.2、2 µg/mL の濃度の SN-38
[redacted]1595_R1a GLP 適合	SN-38 の遺伝毒性：細菌を用いた復帰突然変異試験（OECD 試験ガイドライン 471）	0.5、1.58、5、15.8、50、158 µg/プレートの濃度の SN-38
新規添加物である MES のためのその他の毒性試験		
RR-[redacted]20[redacted] GLP 非適合	2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸水和物（MES）のヒト乳癌及び膀胱癌細胞株に対する細胞毒性	1.2 から 3.07×10^{-6} mol/L の濃度の MES
RR-[redacted]20[redacted] GLP 非適合	2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸水和物（MES）のヒト乳癌及び膀胱癌細胞株に対する細胞毒性	0.6 及び 6.0 nmol/L の濃度の MES
RR-[redacted]20[redacted] GLP 非適合	MES の吸光スペクトル	25 mmol/L の濃度の MES
3277-001 GLP 適合	MES の Sprague Dawley ラットにおける 1 ヵ月間静脈内投与毒性並びに 1 及び 7 日間の回復性試験	MES を 250、500 及び 1000 mg/kg の用量で試験 1、8、22 及び 29 日に投与
01551001 GLP 適合	MES の細菌を用いた復帰突然変異試験	100、250、500、1000、2500 及び 5000 µg/プレートの濃度の MES

試験番号 GLP 適合状況	動物種／試験系 ほか	被験物質の濃度／投与量
01551002 GLP 適合	培養ヒト末梢血リンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験	0.387、0.773、1.55、3.09、6.19、12.4、24.8、49.5、99.0 及び 198 μg/mL を想定濃度とした MES
3277-003 GLP 適合	MES の Sprague Dawley ラットにおける in vivo 小核試験（静脈内投与）	MES を 250、500 及び 1000 mg/kg の用量で試験 1 日及び 2 日に投与

マウスにおける SG の腫瘍異種移植試験では、最高 0.5 mg の 8 回投与（4 週間）によっても毒性変化は認められなかった。

Swiss-Webster マウスにおける SG の急性毒性試験（CTD 4.2.3.2.1、100209-143、CTD 4.2.3.2.2、122109-151）では、最高 750 mg/kg の 2 回（累積用量として 1500 mg/kg）投与により軽微な体重減少（-10%未満）が認められた。血液学的検査及び病理組織学的検査では異常所見は認められなかった。肝トランスアミナーゼの増加が一過性にみられたが、試験終了時までに正常値に回復した。

カニクイザルでは、SG 50 mg/kg（HED＝16 mg/kg）の 4 サイクル投与（1 サイクルが 21 日間；各サイクルの試験 1 日及び 8 日に投与）が無毒性量（NOAEL）とされたが、120 mg/kg の 3 日間隔での投与は致死量であった。サルにおいては雌の生殖器官、皮膚（脱毛、色素沈着）、腎臓（動脈周囲炎）、リンパ系器官（リンパ球減少）、赤血球、白血球及び血小板の減少を伴う骨髄（細胞密度減少）及び消化管（壊死、びらん、炎症、線維化、出血、浮腫）などが標的器官であった。

局所刺激性はサルにおける GLP 適合試験で評価した。注射部位に変化がみられたが、病理担当者は、認められた所見は被験物質ではなく、実験手技による外傷に関連したものであると評価した。認められた所見は、軽度から中等度の血管周囲の出血、真皮及び皮下における中等度の出血、及び軽微から軽度の血管周囲の混合細胞浸潤であった。

放出ペイロードである SN-38 及びその不活性代謝物である SN-38 グルクロニド(SN-38G)の毒性は、これらが市販されているイリノテカンの活性代謝物でもあることから、広く知られている。SN-38 に起因する最も一般的な毒性は、イリノテカン投与患者における骨髄抑制及び下痢である[2]。SN-38 は、細菌を用いた復帰突然変異試験（CTD 4.2.3.3.1.2、[redacted]1595_R1a）において変異原性を示さなかった。しかしながら、予想どおり、またイリノテカンの遺伝毒性と符合するように、SN-38 は哺乳類細胞を用いた in vitro 小核試験（CTD 4.2.3.3.1.1、[redacted]1595_R1b）において染色体異常誘発性であることが確認された。これらの遺伝毒性試験の結果に基づき、また ICH S9 ガイドラインに基づき、予定されている本適応症における製造販売承認申請のためには胚･胎児発生毒性試験は必要ないと判断された。

新規添加剤である MES の毒性を、単剤（CTD 4.2.3.7.7.2、RR-[redacted]20[redacted]）又は SG との併用（CTD 4.2.3.7.7.1、RR-[redacted]20[redacted]）の 2 つの in vitro 細胞毒性試験で評価した。さらに、MES の毒性は、マウスにおける毒性試験（CTD 4.2.3.2.2、122109-151、GLP 非適合）、ラット 1 ヵ月間投与毒性試験（CTD 4.2.3.7.7.5、3277-001、GLP 適合）、2 つのサ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、GLP 適合）で評価した。これらの試験において、ラットにおける限界用量である 1000 mg/kg までの用量では毒性は認められなか

った。MES は、ICH S2（R1）ガイダンスに準拠した in vitro 及び in vivo の変異原性試験の結果、遺伝毒性は認められなかった。

抗体薬物複合体（ADC）には、ICH S10 ガイドラインの光毒性評価は適用されない。遊離 SN-38 は可視域（約 380 nm）における光吸収能を有するが、SN-38 は反応性代謝物には代謝されないことから、SN-38 は光毒性評価の対象とはならない。さらに、イリノテカンの添付文書には、光毒性は発症の可能性のある副作用として記載されていない [2]。したがって、進行癌患者を対象とする本薬の製造販売承認申請に際して、SG の光毒性試験は不要であると考えられる。

ICH S9 ガイドラインに基づき、SG のがん原性、生殖能、初期胚発生、出生前後の発生への影響は評価していない。しかしながら、SN-38 はカンプトテシンであることから、がん原性を有する可能性が高く、既知の発生毒性物質である [2]。

以上のように、毒性学的にヒトへの外挿性があり交差反応性動物種であるカニクイザルを用いて、ヒトに外挿し得る用量の SG を静脈内投与した非臨床毒性試験を実施したところ、毒性の標的器官、発現時期及び可逆性が明らかになった。主要な毒性所見は、ペイロードである SN-38 の既知の毒性と符合した。用量制限毒性は、用量依存的かつ可逆性で、臨床的に重要な好中球減少を伴う骨髄抑制（赤血球数、白血球数及び血小板数の減少）及び消化管障害であった。また、雌の生殖器にも毒性変化が認められた。

2　　単回投与毒性試験

SG の標準的な単回投与毒性試験は実施しておらず、当該試験は一般的に推奨されていない（ICH M3（R2）ガイダンスを参照）。

SG の急性毒性に関する情報は、カニクイザルにおける短期試験から得ることができ、SG を 2 回投与した際に最大耐量（MTD）が確認された。

3　反復投与毒性試験

3.1　マウスにおける反復投与毒性試験

マウスを用いた探索的な反復投与毒性試験（CTD 4.2.3.2.1、100209-143 及び CTD 4.2.3.2.2、122109-151、GLP 非適合）を実施した。SG はマウスの Trop-2 には結合しないことから、これらの試験は、SG 及びペイロードである SN-38 について、Trop-2 によらない（オフターゲット）毒性を評価することを目的として実施した。

100209-143 試験（CTD 4.2.3.2.1）では、Swiss-Webster マウスに 250、500 又は 750 mg/kg（10、20 又は 30 mg/マウス）を試験 0 日及び 3 日に腹腔内投与し、最終投与後 1 週間又は 2 週間（試験 10 日又は 18 日）の観察期間を設けた。一般状態及び生死の観察、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査及び病理組織学的検査（試験 18 日）を実施した。

いずれの動物においても急性毒性所見は認められなかった。軽微な体重減少（約-7%）がみられたが、試験終了時（試験 18 日）にはすべてのマウスで回復が認められた。アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の一過性の増加が 500 及び 750 mg/kg 群で試験 10 日に認められたが、試験 18 日までに正常値に回復した。血液学的検査及び病理組織学的検査では被験物質による毒性学的意義のある所見は認められなかった。本試験では、SG は 750 mg/kg（HED：61 mg/kg）の高用量でもマウスにおいて良好な忍容性を示した。

122109-151 試験（CTD 4.2.3.2.2）では、新規製剤緩衝液で調製した SG の毒性について評価した。SG の調製には、[redacted]の工程で使用していた [redacted] 緩衝液の代わりに、MES 緩衝液（2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸）を用いた。Swiss-Webster マウスに 750 mg/kg（30 mg/マウス）を試験 0 日及び 3 日に腹腔内投与し、最終投与後 1、2 又は 5 週間（それぞれ試験 10、18 又は 39 日）の観察期間を設けた。一般状態及び生死の観察、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査及び病理組織学的検査（試験 39 日）を実施した。

先の試験（CTD 4.2.3.2.1、100209-143）と同様、いずれの動物においても急性毒性所見は認められなかった。体重減少（約-9%）が試験 5～7 日に認められたが、試験 18 日には回復した。ALT 及び AST の増加が試験 10 日に一過性に認められたが（7 例中 5 例）、1 例を除き試験 39 日までに正常値に回復した。血液学的検査及び病理組織学的検査では被験物質による毒性学的意義のある所見は認められなかった。以上の成績は、先の試験成績と同様に、SG が 750 mg/kg（HED：61 mg/kg）の高用量でもマウスにおいて忍容性が良好であることを示唆するものであった。また、製剤の緩衝剤に含有される MES は忍容性に影響を及ぼさなかった。

3.2　カニクイザルにおける反復投与毒性試験

SG の抗体部分である hRS7 IgG は、カニクイザル組織においても、ヒトと同様の分布パターンで結合する。また、SG と SN-38 それぞれの血清安定性及び UGT1A1 代謝もサルとヒトで同様である（CTD 2.6.4 項）。したがって、カニクイザルは、Trop-2 及び SN-38 による毒性評価に適した動物種と考えられた。カニクイザルにおける反復投与毒性試験（GLP 適合）として、[redacted].160.03 試験（CTD 4.2.3.2.3）及び [redacted].160.25 試験（CTD 4.2.3.2.4）の 2 試験を実施した。両試験とも OECD の GLP に準拠して米国で実施したが、[redacted].160.03 試験（CTD 4.2.3.2.3）におけるトキシコキネティクス（TK）測定及びそのデータ解析は試験委託者が実施した。[redacted].160.25 試験

（CTD 4.2.3.2.4）では、製法 A/B 剤（第 1/2 相臨床試験用）と製法 C 剤（第 3 相臨床試験用）のブリッジング群が設けられている。また、新規添加剤である MES については、溶媒対照群の緩衝液として毒性評価に含めた。

[redacted].160.03 試験（CTD 4.2.3.2.3）では、試験 1 日及び 4 日に SG を投与し、試験 11 日及び 32 日に剖検した。次に実施した[redacted].160.25 試験（CTD 4.2.3.2.4）では、1 サイクル 21 日間（試験 1 日及び 8 日に投与）で SG を 4 サイクル（3 ヵ月間試験）投与した。

3.2.1　カニクイザルにおける 1 時間持続注入及び 4 週間回復による SG（hRS7-SN-38）の反復投与毒性試験（[redacted].160.03）

本試験の目的は、SG をカニクイザルに 3 日間隔で 2 回、1 時間かけて静脈内持続注入し、毒性及び TK プロファイルを評価することであった。また、投与期間中に観察された変化の可逆性について、4 週間の回復期間に評価した。

無処置カニクイザル（カンボジア産）雌雄 9 匹を 3 群に群分けした。各動物には、試験 1 日及び 4 日に、溶媒対照［MES 緩衝液（[redacted] mmol/L MES 緩衝液、[redacted] mmol/L トレハロース、[redacted]% v/v ポリソルベート 80）、0.9%塩化ナトリウム、pH [redacted]、ロット [redacted]］、又は SG［(ロット [redacted])、0.9%塩化ナトリウム注射液（USP、ロット [redacted] 及び [redacted])］を 60 又は 120 mg/kg の用量で投与した。投与は 1 時間 ±10 分かけて静脈内持続注入により行った。各群の雌雄各 2 匹を投与終了後 7 日間（試験 11 日）、各群の雌雄各 1 匹を投与終了後 28 日間（試験 32 日）の回復性試験に供した。

一般状態と摂餌量（毎日）、体重、投与前後の一般症状、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、血液生化学的検査、TK 測定、サル抗ヒト抗体測定、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

TK パラメータとして、最大血中濃度（C_{max}）、最高血中濃度到達時間（T_{max}）及び曲線下面積（AUC）を算出した。クリアランスは、SN-38 と同様に、抗体を追跡することでモニターした。SN-38 については、総 SN-38 及び遊離 SN-38 を測定し、そこから抗体に結合している SN-38 を算出した。SG の抗体部分は、結合した SN-38 よりも遅い速度で消失することから、SN-38 が抗体から放出されることが明らかになった。血中の遊離 SN-38 濃度は総 SN-38 に比べごくわずかであり、SN-38 の大部分は抗体に結合していることが示唆された。

クリアランスは、60 mg/kg 群、120 mg/kg 群とも試験 1 日と 4 日で同程度であった。SG 及びその抗体部分についてみると、AUC 及び C_{max} は投与量の増加に伴って増加し、用量比例的であった。抗体の最高濃度は 2 回目の持続注入後に高くなり、蓄積性が示唆された。抗体の T_{max} は約 75 時間、平均半減期は約 5 日間であった。遊離 SN-38 の AUC 及び C_{max} は投与量の増加に伴って用量比より大きく増加した。

本試験の詳細な TK データは、薬物動態試験概要表（CTD 2.6.5 項）に記載した。

SG を雌雄カニクイザルに 3 日間隔で 1 時間かけて静脈内持続注入を 2 回行い、60 mg/kg では忍容性が確認された。投与日の一般症状や眼科学的所見は認められず、心拍数、血圧、呼吸数及び直腸温に SG 投与による影響はみられなかった。サル抗ヒト抗体は陰性であった。

120 mg/kg 群の雄 1 例が、2 回目の投与から 3 日後の試験 7 日に死亡した。試験 6 日には、赤血球パラメータ、白血球数及び血小板数の減少、血清中のアルブミン及びカルシウム濃度の減少が認められた。剖検では回腸に腸重積が認められ、盲腸と胃は膨張し、結腸粘膜では赤色化が多発

性に認められた。骨髄では骨髄系細胞及び赤血球系細胞の細胞密度の著しい減少が認められ、胸腺では全般的な中等度の細胞密度の減少、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節及び脾臓では胚中心の中等度の低形成が認められた。消化管では、胃、十二指腸、空腸、結腸の固有層に軽度の単核細胞浸潤を含む様々な変化がみられた。また、結腸と直腸の固有層に軽微から中等度の出血がみられた。空腸、結腸、直腸の固有層の軽微から軽度の線維化もみられ、胃、空腸、結腸の腺管の一部では軽度から中等度の拡張が認められた。また、食道粘膜には重度のびらんが認められ、粘膜と固有層に中等度の多形核細胞が浸潤し、軽度の出血と粘膜下層の軽度の浮腫が混在する重度の壊死を伴っていた。腸重積及び壊死性化膿性食道炎は、消化管の変化と胃内容物の逆流に伴う二次的なものと考えられた。死因は被験物質による骨髄抑制と消化管合併症と考えられた。

投与期間終了まで生存した動物では、SG 投与による 2 種類の変化が顕著であった。すなわち、全種類の血球の減少を伴うすべての造血器官における細胞密度の減少、及び消化管における種々の構造及び部位での炎症、出血及び変性であった。これらの所見は、雌雄の動物で同程度にみられた。さらに、雌の生殖器における所見として、60 及び 120 mg/kg 群で、卵巣における閉鎖卵胞の増加及び成熟卵胞の減少、子宮内膜の軽度から中等度の出血及び子宮内膜腺の萎縮がみられた。以上のように、SG に関連する病理組織所見は、60 及び 120 mg/kg 群の両方の動物でみられ、概して用量反応関係が認められた。これらの所見は、いずれも試験 32 日までに回復又は回復傾向がみられた。

赤血球数、白血球数（全系統）及び血小板数の減少が試験 3 日に認められ、試験 15 日まで持続した。白血球数及び血小板数の減少は、120 mg/kg 群の動物の症状に影響を及ぼし、二次的な皮下出血及び液状便又は血便が認められた。剖検及び病理組織学的所見としては、胸腺及び脾臓の重量減少、胸腺におけるリンパ球の細胞密度の軽度から中等度の減少、脾臓、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節の胚中心の軽度から中等度の低形成、骨髄における赤血球系細胞及び骨髄系細胞の細胞密度減少がみられた。

円背位（120 mg/kg 群のみ）、体重の減少、摂餌量の減少（120 mg/kg 群のみ）から明らかなように、消化管障害が認められた。剖検では、ガスが充満した結腸の中等度の膨満と糞便量の減少、及び固有層の軽度出血に関連する様々な所見（十二指腸と結腸の粘膜の赤色化、十二指腸の軽度淡赤色化、胃幽門部の中等度赤色化）がみられた。病理組織学的には、軽微から中等度の出血と、固有層への単核細胞又は多形核細胞の浸潤が認められた。また、粘膜の変性、細胞浸潤による腺上皮の剥離、及び腺膿瘍がみられた。120 mg/kg 群では、十二指腸及び結腸にびらん及び潰瘍がみられ、十二指腸、空腸及び結腸では固有層の軽微から軽度の線維化が認められた。

60 及び 120 mg/kg 群で、消化管病変に関連すると思われる急性期の炎症反応を示唆する所見がみられた。すなわち、血清アルブミンの減少及びフィブリノゲンの増加（120 mg/kg 群）が認められ、変化の程度は、試験 11 日又は 15 日に最も大きかった。

血球数の減少、消化管の所見及び雌生殖器の所見はいずれも毒性変化と考えられた。したがって、本試験条件下における SG のカニクイザルに対する NOAEL を求めることはできなかった。重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）は 60 mg/kg であり、120 mg/kg では死亡例が認められた。

3.2.2　　カニクイザルにおける SG（IMMU-132）の毒性試験（[redacted].160.25）

本試験の目的は、SG をカニクイザルに 4 サイクル投与し、毒性及び TK プロファイルを評価することであった。また、投与期間中に観察された変化の可逆性について、6 週間の回復期間に評価した。

被験物質である SG（製法 C；[redacted]）及び SG（製法 B：[redacted]）並びに溶媒対照である [redacted]mmol/L MES 緩衝液を、SG（[redacted]）については 12.5、25 及び 50 mg/kg の用量で、SG（[redacted]）については 25 mg/kg の用量で、試験 1、8、22、29、43、50、64 及び 71 日に 1 回、1 時間かけて静脈内持続注入によりカニクイザルに投与した。

一般状態、体重、心電図、血圧、体温及び呼吸数の観察･測定、眼科学的検査を実施した。血液学的検査及び血清生化学的検査の試料を、馴化期間中に 1 回、加えて試験 7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、78、85、92、99、106 及び 113 日に採取した。さらに、凝固検査及び尿検査の試料を馴化期間中に 1 回、加えて試験 42、78 及び 113 日に採取した。血液サンプルは、TK 測定及び免疫原性評価（抗薬物抗体(ADA)測定）には所定の時点で採血した。投与期間及び回復期間終了時の剖検を、それぞれ試験 78 日及び 113 日に実施した。剖検では、肉眼的観察所見及び器官重量を記録し、組織を採取して病理組織学的検査に供した。

SG（[redacted] 及び [redacted]）を 12.5、25、50 mg/kg（[redacted]）及び 25 mg/kg（[redacted]）の用量で試験 1、8、22、29、43、50、64 及び 71 日に 1 時間かけて静脈内持続注入を行ったところ、忍容性は良好であった。また、試験期間中に死亡例はみられず、いずれの検査項目においても被験物質による毒性変化は認められなかった。

SG の単回又は複数回静脈内投与により、すべての動物で総抗体(TAb)の全身への曝露が確認された。一般に、SG の静脈内投与後の TAb、総 SN-38 及び遊離 SN-38 の血清中曝露量は用量依存的に増加し、最終投与後は初回投与後の 2 倍以内であった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}168}$ は、試験 1 日の初回投与後、ほぼ用量比例的に増加した。最終投与日である試験 71 日の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}168}$ の増加は、概して用量比より大きかった。曝露量の性差は概して 2 倍以内又はそれ以下であった。SN-38G は概して容易に血清中に検出され、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。初回投与後又は最終投与後における SN-38G の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}168}$ の増加は、厳密には用量比例的ではなかった。性差による曝露量の差は概して 2 倍未満であった。$AUC_{0\text{-}168}$ 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。このデータは、SG として投与された SN-38 の大部分は、血清中では ADC と結合したままであり、遊離の細胞傷害性ペイロードである SN-38 として循環していないことを裏付けるものである。

25 mg/kg 投与時の TAb、総 SN-38、遊離 SN-38 及び SN-38G の曝露量は、特に試験 1 日の初回投与後に、製法 C 剤([redacted])を投与した群（3 群）と製法 A/B 剤([redacted])を投与した群（5 群）でほぼ同等であった。複数回の投与後、曝露量の変動が認められたが、これは ADA 形成の影響によるものと思われ、その結果、3 群の雌は 5 群の雌に比べて曝露量が明らかに高値となった。

SG を投与したすべての動物で ADA が検出されたが、TAb、総 SN-38 及び遊離 SN-38 の血清中曝露に対する ADA の影響は用量依存的であった。低用量では試験 1 日より試験 71 日の方が変動が大きく、曝露量は概して低く、高用量では試験 71 日の曝露量は ADA 形成による影響をほとんど受けていないようであった。

すべての被験物質投与群で皮膚の異常な変色がみられ、その発生頻度は投与の反復により増加し、回復期間中も持続した。本試験では、全身の臓器、組織、注射部位における剖検所見、器官重量、病理組織学的所見に被験物質による明らかな影響は認められなかった。4 群及び 5 群の一部の動物で、毛幹形成の低下に関連した被験物質による皮膚への影響（毛包及び脂腺の変性）を示唆する所見が認められたが、サンプル数が少ないため、確実な関連付けはできなかった。さらに、腎臓の軽度な動脈周囲炎及び／又は胸腺のリンパ球減少が、1 例以上の被験物質投与動物で認められ、被験物質投与との関連性が示唆された。

本試験で認められた所見はいずれも毒性変化とはみなされなかったことから、本試験における SG（[redacted]）及び SG（[redacted]）の NOAEL は、それぞれ 50 mg/kg 及び 25 mg/kg と考えられた。

本試験の詳細な TK データは、薬物動態試験概要表（CTD 2.6.5 項）に記載した。

4　遺伝毒性試験

20■ 年 ■ 月 ■ 日に Immunomedics 社と ■■■ との間で行われた電話会議での合意、及び 20■ 年 ■ 月 ■ 日付の同会議の ■■■ 公式議事録に基づき、SG のペイロードである SN-38 の遺伝毒性を Ames 試験（■■■■■ 試験：CTD 4.2.3.3.1.2、■■■1595_R1a）及び CHO-K1 細胞を用いた in vitro 小核試験（■■■■■ 試験：CTD 4.2.3.3.1.1、■■■1595_R1b）により評価した。両試験は米国で実施された。試験成績は、それぞれ OECD 試験ガイドライン 471 及び OECD 試験ガイドライン 487 の試験手順に合致し、OECD の GLP に準拠したものであった。

SN-38 は、Ames 試験では代謝活性化の非存在下及び存在下のいずれでも陰性であった。しかしながら、SN-38 は、いずれの試験条件においても、CHO-K1 細胞に小核を誘発した。低二倍性の一貫した増加がみられないことから、SN-38 は異数性誘発物質ではなく構造異常誘発物質であることが示唆された。

以上のように、イリノテカンの活性代謝物である SN-38 の遺伝毒性評価の結果、変異原性は認められないものの、染色体異常誘発性が陽性であるという点でイリノテカンと変わらなかった。

5　　がん原性試験

ICH S9 ガイドラインでは、進行癌の患者の治療を目的とした医薬品の製造販売承認申請には、がん原性試験は必要とされていない。そのため、がん原性の評価は行っていない。しかしながら、SN-38 はカンプトテシンであることから、放出ペイロードである SN-38 はがん原性を有する可能性がある（イリノテカン添付文書の使用上の注意に基づく）。

6　　生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験は実施していない。GLP に準拠した遺伝毒性試験及びカニクイザルにおける一般毒性試験により、ADC から放出された SN-38 は分裂の速い細胞を標的とすることが確認されたことから、ICH S9 ガイドラインによると、本被験物質の適応症の製造販売承認申請には、胚・胎児発生に関する試験及び生殖毒性試験は必要とされていない。Trop-2 発現癌の対象患者は一般的に成人であることから、新生児を用いた毒性試験は実施していない。

7　局所刺激性試験

局所刺激性を、カニクイザルにおける反復投与毒性試験(2 試験)で評価した。短期間投与試験（CTD 4.2.3.2.3、[redacted].160.03）で、予定剖検時にみられた注射部位の変化は、投与手技に伴う機械的刺激によるものか、投与時に漏出した被験物質の刺激によるものと思われた。認められた所見は、軽度から中等度の血管周囲の出血、真皮及び皮下における中等度の出血、軽微から軽度の血管周囲の混合細胞浸潤であった。

[redacted].160.25 試験（CTD 4.2.3.2.4）では、被験物質投与群と対照群の両方の動物で、注射部位の所見が剖検又は病理組織学的検査で認められた。病理担当者は、これらの所見は投与手技に伴う機械的損傷によるものであり、被験物質によるものではないとしている。

以上のように、カニクイザルにおける SG の局所刺激性は許容される範囲内であり、進行癌患者への使用が懸念されるような所見はみられなかった。

8　光毒性試験

ADC には、ICH S10 ガイドラインの光毒性評価は適用されない。遊離 SN-38 は可視領域（約 380 nm）における光吸収能を有するが、SN-38 は反応性代謝物には代謝されないことから、SN-38 は光毒性評価の対象とはならない。さらに、イリノテカンの添付文書には、光毒性は、発症の可能性のある副作用として記載されていない [2]。したがって、進行癌患者を対象とする本薬の製造販売承認申請に際して、SG の光毒性試験は不要であると考えられる。

9　その他の毒性試験

MES は、SG 製剤に新規添加剤として使用されている緩衝液である。SG の単回投与用バイアルには、79.6 mg の MES が含まれる。20 mL の 0.9%塩化ナトリウム注射液（USP）で再溶解すると、MES の濃度は 3.98 mg/mL、SG の濃度は 10 mg/mL となる。したがって、SG の予定臨床用量である 10 mg/kg の場合、患者 1 人あたり 3.98 mg/kg の MES を投与することになる。MES の非臨床安全性評価は、進行癌患者への使用を想定し、「Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients」と題する産業界向けガイダンスを考慮の上、ICH S9 ガイドラインに従って実施した。ラット 1 ヵ月間静脈内投与試験では、投与可能な最大用量である 1000 mg/kg（HED = 161 mg/kg）を含む投与量を設けた。

MES を、ヒト癌細胞株を用いた in vitro 細胞毒性試験で評価した結果、細胞毒性の原因とはならないことが確認された（CTD 4.2.3.7.7.2、RR-[redacted]20[redacted] 及び CTD 4.2.3.7.7.1、RR-[redacted]20[redacted]）。

MES の安全性薬理試験として、神経学的評価は Sprague Dawley ラットにおける 1 ヵ月間静脈内投与試験（CTD 4.2.3.7.7.5、3277-001）で、一般状態、心電図、呼吸数、心拍数、体温及び眼科所見はカニクイザルにおける亜急性及び 3 ヵ月間反復投与毒性試験（CTD 4.2.3.2.3、[redacted].160.03 及び CTD 4.2.3.2.4、[redacted].160.25、GLP 適合）で評価した。ラット、サルともに異常所見は認められなかった。

MES の毒性は、Swiss-Webster マウスにおける毒性試験（CTD 4.2.3.2.2、122109-151、GLP 非適合）、Sprague Dawley ラットを用いた 1 ヵ月間毒性試験（CTD 4.2.3.7.7.5、3277-001、GLP 適合）、カニクイザルにおける亜急性及び 3 ヵ月間慢性毒性試験（CTD 4.2.3.2.3、[redacted].160.03 及び CTD 4.2.3.2.4、[redacted].160.25、GLP 適合）で評価した。試験の投与量は、絶対量及び HED 換算で予定臨床用量を超える用量で、ラットでは投与可能な最大用量である 1000 mg/kg を含む投与量を設けた。マウス、ラット及びサルに毒性所見は認められなかった。

MES については、ICH S2（R1）ガイダンスに準拠した方法で変異原性試験を実施した。MES は、Ames 試験（CTD 4.2.3.7.7.3、01551001）、in vitro 染色体異常試験（CTD 4.2.3.7.7.4、01551002）、in vivo ラット小核試験（CTD 4.2.3.7.7.6、3277-003）で変異原性は陰性であった。さらに、H_2O_2 依存性の Ames 試験において、MES 緩衝液はベンジジン誘導体による変異原性からネズミチフス菌を保護することができた[3]。ICH S9 ガイドラインに従い、がん原性、生殖能、初期胚発生、出生前後の発生への MES の影響については評価していない。MES は 290～700 nm の範囲では光吸収がないことから、ICH S10 ガイドラインに従い、光毒性試験は実施していない。

ヒトの最大曝露量の 10 倍で MES に in vitro 細胞毒性は認められなかった。また、マウスでは毒性所見はみられず、ラットで最長 1 ヵ月間、カニクイザルで最長 3 ヵ月間の毒性試験（GLP 適合）では、予定臨床用量（3.98 mg/kg）の 250 倍以上の用量である 1000 mg/kg まで、毒性所見は認められなかった。新規添加剤としての MES の安全性評価のために実施した毒性試験の概略を以下に記載する。

安全性薬理試験（[redacted].160.03 及び [redacted].160.25）

MES の安全性薬理については、カニクイザルにおける反復投与毒性試験（GLP 適合）の溶媒対照群で、臨床症状、体温、呼吸数、心電図、心拍数及び血圧について評価した。中枢神経系への影響を示唆する被験物質投与に関連した臨床症状は認められなかった。体温、呼吸数、心電図、血圧、心拍数に変化はみられなかった。カニクイザルにおける毒性試験（2 試験）で測定した心

電図は、いずれも波形的にも、数値的にも正常と考えられた。また、QT 及び QTc 間隔に投与による影響は認められなかった。

In vitro 細胞毒性試験（RR-[redacted]20[redacted] 及び RR-[redacted]20[redacted]）

HCC1806 細胞（トリプルネガティブ乳癌［TNBC］）及び T24 細胞（膀胱移行細胞癌［UBC］）を用いた 96 時間の in vitro 細胞毒性試験において、0.6 及び 6 mmol/L の濃度で、MES を含まない SG 製剤と SG との併用を比較評価した。0.6 及び 6 mmol/L の濃度は、予定臨床用量である 10 mg/kg の SG を静脈内投与した場合の MES の最大曝露量濃度のそれぞれ 1 倍及び 10 倍の計算値に相当する。MES は細胞毒性の原因とはならないことが確認された。

Swiss-Webster マウスにおける MES の反復投与毒性試験（122109-151）

Swiss-Webster マウスに等量の MES 緩衝液又は 750 mg/kg の SG（30 mg/マウス、HED ＝61 mg/kg）を試験 0 日及び 3 日に腹腔内投与し、1、2、5 週間（それぞれ試験 10、18、39 日）の投与後観察により MES 対照群と SG の毒性を比較評価した。一般状態の異常及び生死判定、体重、血液学的検査値、血液生化学的検査値及び病理組織学的検査所見（試験 39 日のみ）について評価した。本試験条件においては、NOAEL は 750 mg/kg と考えられた。

Sprague Dawley ラットにおける MES の 1 ヵ月間静脈内持続注入毒性試験（投与後 1 日間及び 7 日間の休薬期間を含む）（3277-001）

本試験の目的は、CD® [Crl:CD®(SD)] ラットに MES を試験 1、8、22 及び 29 日に 10 分間尾静脈内持続注入してその毒性を評価するとともに、7 日間の休薬期間における所見の可逆性を評価することであった。試験デザインを以下に示す。

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg)	Dose Volume (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Main Study		Recovery Study	
					No. of Males	No. of Females	No. of Males	No. of Females
1	Vehicle	0	20	0	10	10	5	5
2	MES	250	20	12.5	10	10	5	5
3	MES	500	20	25	10	10	5	5
4	MES	1000	20	50	10	10	5	5

No. = Number.

本試験では、生死判定、一般症状、体重、体重増加量及び摂餌量の観察・測定、眼科学的検査、神経行動評価、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）、TK 測定、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。

MES に関連する死亡例はなく、本試験で評価したいずれの検査項目にも MES に関連する影響はみられなかった。

MES の週 1 回静脈内持続注入により、試験 1 日及び 29 日の C_{max} 及び AUC_{0-8} 値は投与量にほぼ比例して増加した。MES の全身曝露量（AUC_{0-8} 値）は、週 1 回の MES の静脈内持続注入により変化しなかった。MES の全身曝露量に性差はみられなかった。

以上のように、雌雄ラットに MES の 250、500 及び 1000 mg/kg を 1 ヵ月間（試験 1、8、22 及び 29 日）反復静脈内投与したところ、いずれの用量においても忍容性は良好であった。また、無

影響量（NOEL）は 1000 mg/kg と考えられた。

カニクイザルにおける MES の反復投与毒性試験（[redacted].160.03 及び [redacted].160.25）

MES の安全性に関する直接的科学的根拠は、SG のカニクイザルにおける最長 3 ヵ月間の毒性試験（2 試験、GLP 適合）で得られた。対照群には、MES、トレハロース及びポリソルベート 80 を含む被験物質と同じ製剤（ただし、SG を含まず）を用いた。対照群の投与容量は、推奨容量（1 mL/kg）の 5 倍（5 mL/kg）とした。この投与容量では、1 回の静脈内投与で MES 24.4 mg/kg が投与されることになる。本試験では、一般毒性試験としての測定項目（一般症状、体重及び体温の観察・測定、眼科学的検査、臨床病理検査（血液学的検査、血液生化学的検査、凝固検査、尿検査）、剖検、器官重量、病理組織学的検査）及び安全性薬理試験としての測定項目（心電図検査、血圧測定、呼吸数測定）を実施した。本試験では、対照群で毒性所見は認められず、MES の安全性が確認された。

細菌を用いた復帰突然変異試験（01551001）

MES の変異原性については、in vitro の細菌を用いた復帰突然変異試験で評価した。変異原性試験にはネズミチフス菌 4 株（TA98、TA100、TA1535、TA1537）及び大腸菌 1 株（WP2 uvrA）を用いた。MES は 0.9%塩化ナトリウム注射液（USP）で最高 50 mg/mL の濃度に調製し、各試験に供した。変異原性試験は、Aroclor™ 1254 で誘導したラット肝 S9 による代謝活性化の有無にかかわらず、各濃度について 3 連制で実施した。

用量設定試験では、MES の 1.0、5.0、10、50、100、500、1000 及び 5000 µg/プレートの濃度について、TA100 株及び WP2 uvrA 株を用いてプレート法により単一プレートで試験した。また、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても析出物は認められなかった。

また、細胞毒性（背景の細菌の生育の減少及び復帰変異コロニー数の減少）は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。

変異原性試験では、MES の 100、250、500、1000、2500 及び 5000 µg/プレートの濃度についてプレート法により試験した。代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても析出物は認められなかった。また、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても細胞毒性はみられなかった。なお、TA98 株の陽性対照群では、代謝活性化の有無にかかわらず、プレートに菌が播種されていなかったことから、当該成績は無効と判断し、再試験を行った。

TA98 株については、MES の 100、250、500、1000、2500 及び 5000 µg/プレートの濃度でプレート法により復帰突然変異試験の再試験を行った。代謝活性化の有無にかかわらず、TA98 株において析出物は認められなかった。TA98 株では、代謝活性化の有無にかかわらず、細胞毒性はみられなかった。

変異原性試験では、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの試験菌株も陰性判定の基準を満たした。溶媒及び陽性対照の成績は、代謝活性化の有無にかかわらず、変異原性を検出するための試験系として、その妥当性と検出感度に問題がないことを実証するものであった。

以上の成績から、本試験条件下では、ネズミチフス菌（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 株）及び大腸菌（WP2 uvrA 株）において、代謝活性化の有無にかかわらず、MES は変異原性が陰性であると結論付けられた。

培養ヒト末梢血リンパ球における in vitro 染色体異常試験（01551002）

MES（ロット番号 [redacted]）の染色体異常誘発能を、短時間（3 時間）及び長時間（22 時間）培養したヒト末梢血リンパ球を用いて、代謝活性化を添加した場合と添加しない場合について評価した。

MES は、0.9%塩化ナトリウム注射液（USP）で作製した保存液を、各試験で目標濃度（最高 19.8 mg/mL）に調製した。培養したヒト末梢血リンパ球を、Aroclor™ 1254 で誘導したラット肝 S9 ミクロソーム画分の存在下及び非存在下で、被験物質、陽性対照物質、又は溶媒対照で処理した。培養液中の 0.9 %塩化ナトリウム注射液（USP）の濃度は 1% v/v であった。用量設定試験に用いた MES 濃度は、0.387～198 µg/mL で、現行 ICH S2(R1)ガイダンスで推奨されている最高濃度とした。用量設定試験では、析出物は認められなかった。染色体異常試験では、用量設定試験の結果に基づき、代謝活性化の存在下／非存在下での 3 時間処理及び代謝活性化の非存在下での 22 時間処理に 12.4～198 µg/mL の濃度範囲を用いた。いずれの処理条件下でも分裂指数が低かったことから、再試験を実施した。再試験では、代謝活性化の存在下／非存在下での 3 時間処理及び代謝活性化の非存在下での 22 時間処理に 12.4～198 µg/mL の濃度範囲を用いた。

試験では、細胞毒性及び析出物は認められなかったことから、高い方から 3 濃度（49.5、99.0 及び 198 µg/mL）について、各処理条件における溶媒対照及び陽性対照（1 濃度）とともに、染色体異常誘発能を評価した。染色体の構造異常は、濃度ごとに、合計 300 個の分裂中期細胞又は 50 個以上の染色体異常細胞についてスコア化した。数的異常は、濃度ごとに、400 個の分裂中期細胞について評価した。

いずれの試験条件においても、構造的な染色体異常を有する細胞の割合や、1 つ以上の染色体異常を有する細胞の割合に、統計的な有意差は認められなかった。さらに、いずれの処理条件においても、数的異常（倍数性又は核内倍加）には、溶媒対照と比較して、統計的に有意な被験物質関連の増加はみられなかった。溶媒対照及び陽性対照物質から得られたデータは、変異原性を検出するための試験系として、その妥当性と検出感度に問題がないことを実証するものであった。

MES（ロット番号 [redacted]）の本試験条件下におけるヒト末梢血リンパ球に対する構造異常誘発能は、代謝活性化の有無にかかわらず、陰性と考えられた。また、MES 処理培養においては、数的異常（倍数性又は核内倍加）の統計的に有意な増加は認められなかった。

Sprague Dawley ラットにおける MES の静脈内投与による in vivo 小核試験（3277-003）

本試験の目的は、Sprague Dawley, CD® [Crl:CD®(SD)] ラットに MES を 1 日 1 回、連続 2 日間静脈内投与した際の、MES によるラット骨髄中の多染性赤血球(PCE)における小核誘発能を評価することであった。

試験デザインを以下に示す。

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Volume[a] (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Main Study[b]	
					No. of Males	No. of Females
1	Vehicle	0	20	0	6	6
2	MES	250	20	12.5	6	6
3	MES	500	20	25	6	6
4	MES	1000	20	50	6	6
5	Positive Control[c]	60	10	6	-	-

- = Not Available/Not Applicable
Based on the most recent body weight measurement.
Five animals/sex/group in Groups 1 to 4 were euthanized approximately 24 hours post last dose for bone marrow collection and slides were prepared from the bone marrow cell suspension. The 6th animal/sex/group was euthanized and discarded without further evaluation.
The positive control slides were obtained from separate historical experiments with cyclophosphamide (CP) and were included in the slide set to verify scorer proficiency.

本試験では、生死判定、一般症状、体重、体重増加量及び摂餌量の観察･測定、小核の評価などを実施した。

In vivo ラット小核試験では、250、500 及び 1000 mg/kg/日の投与量を設けた。高用量は、被験物質の浸透圧及び静脈内投与可能な最大容量（限界量）に基づいて設定した。MES の 0（溶媒：0.9%塩化ナトリウム注射液（USP））、250、500、1000 mg/kg/日を、試験 1 日及び 2 日（約 24 時間間隔）に、10 分間の静脈内持続注入により投与した。本試験では、陽性対照物質としてシクロホスファミド（CP）を用いた。

全動物が予定剖検日まで生存した。ケージサイド観察や詳細な一般状態観察において、MES に関連した症状はみられなかった。MES に関連した体重の変化は認められなかった。概して、雌雄とも全例で、被験物質を投与した 2 日間で体重増加が認められた。

MES は、雌雄ラットのいずれの用量においても、溶媒対照と比較して、小核を有する多染性赤血球の出現頻度（%MN-PCEs）に統計的に有意な増加及び用量依存的な増加を示さなかった。骨髄細胞毒性（PCE／総赤血球比の減少）は、雌雄ラットのいずれの MES 投与量においても認められなかった。溶媒及び陽性対照の%MN-PCEs 及び PCE／総赤血球比の群平均値は、[redacted] で得られた 95%信頼区間の背景データ（[redacted]）内にあり、試験結果の妥当性を示すものであった。

以上のように、MES は、本試験条件下では、染色体異常の誘発及び／又は有糸分裂装置の損傷を引き起こすことはないと考えられた。

MES の吸光スペクトル（RR-[redacted]20[redacted]）

MES の 290～700 nm の範囲における光吸収能を評価した。この波長の範囲では吸収は認められなかった。したがって、ICH S10 ガイドラインに従い、光毒性試験は実施しなかった。

その他の試験

複数のデータベースを用いた広範な文献検索の結果、標的器官毒性という観点では、MES の遺伝毒性、がん原性、生殖毒性、感作性が懸念される文献は確認されていない。MES 緩衝液は、IARC リストには（発がん性物質として）掲載されていない。MES は Good の緩衝液であることから、

慢性毒性や亜慢性毒性は想定し難い。MES の MSDS には、眼、皮膚、又は肺に対して刺激性が懸念されることが示されている。また、ウズラにおける経口 LD_{50} 値が 310 mg/kg との報告がある [4]。L1210 白血病細胞を用いた発がん性評価において、マウスへの MES（最高 400 mg/kg）の非経口（腹腔内）投与により、試験 5 日に 6 例中 5 例の生存が確認された（DTP-NCI database, 2017）。

複数のデータベースの広範な検索により、欧州化学物質庁（ECHA）によってリストされている MES（CAS 番号 4432-31-9 及び 145224-94-8）の安全性評価に関連する以下の 2 つの試験が新たに特定された。1 つ目の、OECD 試験ガイドライン 471 準拠 GLP 適合試験において、MES は、代謝活性化（S9）の有無にかかわらず、5 菌株（TA98、TA100、TA1535、TA1537［いずれもネズミチフス菌］及び WP2 uvrA［大腸菌］）において変異原性を示さなかった。MES の遺伝毒性を検討するため、in vitro 小核試験が OECD 試験ガイドライン 487 準拠 GLP 適合下で実施された。本試験条件下では、MES は遺伝毒性を示さないと判断された。ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）遺伝子を用いた OECD 試験ガイドライン 476 準拠 GLP 適合 in vitro 哺乳類細胞遺伝子突然変異試験では、チャイニーズハムスターV79 細胞を用いて変異原性が検討された。本試験条件下では、MES は変異原性を示さないと判断された。無水物（CAS 4432-31-9）についても同じ結果が予想される。この試験結果は、ギリアド社が得た結果を裏付けている（出典：https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/24714/7/7/2）。

2 つ目の試験では、11～12 週齢の雌雄ラットを用いた MES の生殖／発生毒性の可能性が OECD 試験ガイドライン 422 準拠 GLP 適合下で検討された。MES は 1000 mg/kg/日までの用量で雌雄親動物の生殖能に毒性変化を示さなかった。具体的には、雌雄 Hsd.Han:Wistar ラットに MES を 100、300 又は 1000 mg/kg/日の用量で強制経口投与しても全身毒性の徴候は認められなかったことから、雌雄ラットの全身毒性に関する NOAEL 並びに雌雄ラットの生殖能及び F1 出生児に関する NOAEL は、いずれも 1000 mg/kg/日であった。なお、本試験は MES の水和物（CAS 1266615-59-1）を用いて実施された。水分含量（7%）で補正した無水物（CAS 4432-31-9）としての NOAEL は 930 mg/kg/日であった（出典：https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/24714/7/9/2）。

10　考察及び結論

SG は進行癌患者への使用を想定していることから、その非臨床試験は ICH S9 ガイドラインに従って実施した。SG の結合部位である hRS7 抗体の Trop-2 との交差反応性から、カニクイザルが唯一の適切な動物種として特定された。

カニクイザルの MTD は、非交差反応性であるマウスより低かったにもかかわらず、Trop-2 発現に関連した毒性標的器官は特定されなかった。毒性所見の全貌は、SN-38 のプロドラッグであるイリノテカンで既知となっているものとほぼ同様であった [2]。主な毒性発現部位は、造血及び造リンパ系、消化管及び雌生殖器であった。したがって、カニクイザルで観察された毒性は、主に SG から遊離した SN-38 によって引き起こされたと推測される。したがって、イリノテカンに適用された予防措置は、SG にも適用される必要がある。

カニクイザルを用いた短期反復投与毒性試験における被験物質の含量測定及び TK 測定には、研究用の分析法を用いた。GLP に適合した 2 回目の長期のカニクイザル試験（CTD 4.2.3.2.4、[redacted].160.25）では、バリデートされた生物分析アッセイを用いた。したがって、サルでは十分信頼できる TK データが得られている。

3 ヵ月間反復投与試験（CTD 4.2.3.2.4、[redacted].160.25）では、SG を投与したすべての動物で ADA が検出されたが、TAb、総 SN-38 及び遊離 SN-38 の血清中曝露量への ADA の影響は用量依存的で、低用量では変動が大きく、試験 71 日の曝露量は試験 1 日より概ね低く、試験 71 日の高用量の曝露量は ADA 形成による影響をほとんど受けていないようであった。

毒性試験、特に遺伝毒性試験及びカニクイザルにおける 3 ヵ月間投与試験では、被験物質として市販製剤を用いた。

添加剤である MES は、現在、欧州薬局方及び FDA の添加剤リストには収載されていない。しかしながら、SG のマウス反復投与毒性試験（GLP 非適合、CTD 4.2.3.2.2、122109-151）及びカニクイザル 3 ヵ月間反復投与毒性試験（GLP 適合、CTD 4.2.3.2.4、[redacted].160.25）の薬物投与群に用いた製剤、並びに本試験の対照群に用いた溶媒対照には MES が含有されていた。また、MES の Sprague Dawley ラットにおける 1 ヵ月間静脈内投与毒性試験（GLP 適合、CTD 4.2.3.7.7.5、3277-001）では、技術的に投与可能な最大容量にあたる 1000 mg/kg（臨床用量の 250 倍以上）を投与するとともに、ICH S2（R1）ガイダンスに準拠した遺伝毒性試験も実施した。ラットにおける MES の NOEL は 1000 mg/kg と考えられ、MES に変異原性は認められなかった。したがって、MES 緩衝液の想定されているがん患者への使用については、毒性学的に十分に安全性が確認されている。

毒性試験の試験構成は ICH S9 ガイドラインに符合するものであった。長期反復投与毒性試験で設定された投与量、試験期間、投与スケジュールは、予定されている臨床使用における安全性を裏付けるものであった。

がん原性試験、生殖発生毒性試験については、6 1 項、5 項及び 6 項で説明した。これらの試験は、予定された適応症における製造販売承認申請に際しては必要とされていない。

以上のように、SG については、2 種類以上の前治療を受けた患者における再発性／難治性の転移性 TNBC の治療のための製造販売承認申請をサポートするために、ICH S9 ガイドライン従って適切に試験が実施されている。非臨床毒性試験においては、上記がん患者への SG の使用が懸念される所見は認められなかった。

11　参考文献

1 Cardillo TM, Govindan SV, Sharkey RM, Trisal P, Goldenberg DM. 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 2011;17 (10):3157-69.

2 CAMPTOSAR, Pharmacia and Upjohn Co. CAMPTOSAR® (irinotecan) injection, for intravenous use. U.S. Prescribing Information. NY, NY. Revised January. 2020:

3 Baker MP, Jones TD. Identification and removal of immunogenicity in therapeutic proteins. Curr Opin Drug Discov Devel 2007;10 (2):219-27.

4 Schafer EW, Brunton RB, Schafer EC, Chavez G. Effects of 77 Chemicals on Reproduction in Male and Female Coturnix Quail. Ecotoxicology and Environmental Safety 1982;6 (2):149-56.

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

2.6.7 毒性試験概要表

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁

1 毒性試験：一覧表 3
2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 6
3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 7
4 毒性試験：使用ロット 8
5 単回投与毒性試験 9
6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 10
7 反復投与毒性試験：重要な試験（[redacted]160.03 試験） 11
8 反復投与毒性試験：重要な試験（[redacted]160.25 試験） 17
9 In Vitro 遺伝毒性試験（[redacted]1595_R1a 試験） 20
10 In Vitro 遺伝毒性試験（[redacted]1595_R1b 試験） 22
11 In Vivo 遺伝毒性試験 24
12 がん原性試験 25
13 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 26
14 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 27
15 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 28
16 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 29
17 新生児を用いた試験 30
18 局所刺激性試験 31
19 光毒性試験 32
20 その他の毒性試験 33
21 In Vitro 遺伝毒性試験（MES） 35

1　毒性試験：一覧表

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Concentrations/ Doses [a]	GLP	Testing Facility	Study Number
Single-Dose Toxicity							
Single-dose toxicity studies of IMMU-132 were not performed.							
Repeat-Dose Toxicity							
Toxicity of High Doses of the hRS7-CL2A-SN38 Immunoconjugate	Male Swiss-Webster Mice	Intraperitoneal injection	Two doses (Day 1 and Day 4)	Placebo, 10, 20 or 30 mg/animal in 42 g mice (240, 475, and 715 mg/kg)	No	Immunomedics, Inc., USA	100209-143
Toxicity of High Doses of the hRS7-CL2A-SN38 Immunoconjugate	Male Swiss-Webster Mice	Intraperitoneal injection	Two doses (Day 1 and Day 4)	Placebo or 30 mg/animal in 41 g mice (730 mg/kg)	No	Immunomedics, Inc., USA	122109-151
Repeat dose toxicity study of IMMU-132 followed by a 4-week recovery period	Cynomolgus monkeys	1-hour intravenous infusion	Two doses (Day 1 and Day 4)	Placebo, 60 or 120 mg/kg	Yes	[redacted] USA [redacted]	[redacted].160.03
3-Month repeat dose toxicity study of IMMU-132 followed by a 6-week recovery period	Cynomolgus monkeys	1-hour intravenous infusion	Four cycles (Treatments on Days 1, 8, 22, 29, 43, 50, 64, and 71)	Placebo or 12.5 mg/kg, 25 mg/kg, or 50 mg/kg for IMMU-132 ([redacted]); 25 mg/kg for IMMU-132 ([redacted])	Yes	[redacted] USA [redacted]	[redacted].160.25

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Concentrations/ Doses [a]	GLP	Testing Facility	Study Number
Genotoxicity (of SN-38)							
Ames test of SN-38	*S. typhimurium* and *E. coli*	*In vitro*	Not applicable	0.5-158 µg/plate	Yes	[redacted] US [redacted]	[redacted]1595_R1a
Mammalian cell micro-nucleus test of SN-38	CHO-K1 cells	*In vitro*	Not applicable	0.02-2 µg/mL	Yes	[redacted] US [redacted]	[redacted]1595_R1b
Carcinogenicity							
Carcinogenicity studies of IMMU-132 were not performed.							
Reproductive and Developmental Toxicity							
Reproductive and developmental toxicity studies of IMMU-132 were not performed.							
Local Tolerance							
The local tolerance of IMMU-132 was assessed in repeat-dose toxicity studies.							
Other Toxicity Studies (MES, Novel Excipient)							
Cytotoxic effect of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES) in human breast and urinary bladder carcinoma cell lines	HCC1806 cells and T24 cells	*In vitro*	96 hours	1.2M to 3.07 x 10-6M	No	Immunomedics, Inc., USA	RR-[redacted]-[redacted]-20[redacted]
In vitro cytotoxicity assessment of MES with and without sacituzumab govitecan	HCC1806 cells and T24 cells	*In vitro*	96 hours	0.6 mM and 6.0 mM	No	Immunomedics, Inc., USA	RR-[redacted]-[redacted]-20[redacted]
Absorbance spectrum of MES	Not applicable	*In vitro*	Not applicable	25 mM	No	Immunomedics, Inc., USA	RR-[redacted]20[redacted]
A 1-Month Study of MES by Intravenous Injection in Sprague Dawley Rats with a 1- and a 7-Day Post Dose Observation Periods	Sprague Dawley Rat	Intravenous	1-month (Days 1, 8, 22, 29)	250, 500, 1000 mg/kg/dose	Yes	[redacted] USA	3277-001

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Concentrations/ Doses [a]	GLP	Testing Facility	Study Number
MES Bacterial Reverse Mutation Assay	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	Plate incorporation for 2 days	MES at 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 µg/plate	Yes	[redacted] USA	01551001
In Vitro Chromosome Aberration Test in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes	Human peripheral blood lymphocytes	*In vitro*	3 hours with and without metabolic activation and 22 hours without activation	MES target concentrations of 0.385, 0.77, 1.54, 3.08, 6.15, 12.3, 24.6, 49.5, 99.0, 198 mg/mL	Yes	[redacted] USA	01551002
An In Vivo Micronucleus Study of MES in Sprague Dawley Rats by IV Administration	Sprague Dawley Rat	Intravenous	2 days	250, 500, 1000 mg/kg/dose	Yes	[redacted] USA	3277-003

a Unless otherwise specified. For Repeat-Dose Toxicity, the NOAEL (No Observed Adverse-Effect Level) is underlined

2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses	GLP	Study Number
Repeat dose toxicity study of IMMU-132 followed by a 4-week recovery period	Cynomolgus monkeys	1-hour intravenous infusion	Placebo, 60 or 120 mg/kg	Yes	[redacted].160.03
3-Month repeat dose toxicity study of IMMU-132 followed by a 6-week recovery period	Cynomolgus monkeys	1-hour intravenous infusion	Placebo or 12.5 mg/kg, 25 mg/kg, or 50 mg/kg for IMMU-132 ([redacted]); 25 mg/kg for IMMU-132 ([redacted])	Yes	[redacted].160.25

3　　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

	Total SN-38[e]		**Free SN-38[e]**		**SN-38G[e]**		**Total hRS7 IgG[e]**	
Dose [mg/kg]	C_{max} [ng/mL]	AUC [ngh/mL]	C_{max} [ng/mL]	AUC [ngh/mL]	C_{max} [ng/mL]	AUC [ngh/mL]	C_{max} [ng/mL]	AUC [ngh/mL]
10 [a]	NE	NE	127	3,900	NE	NE	NE	NE
12.5 [b, c]	6,325	118,000	99	3,245	6.89	54.3	381,500	24,350
25 [b, c]	13,400	249,000	216	5,500	10.77	194	691,000	48,600
50 [b, c]	25,750	513,000	325	8,500	25.05	705.5	1,475,000	116,500
60 [b, d]	41,680	1,276,170	1,270	80,230	NE	NE	1,605,670	243,315,320
120 [b,d]	72,920	2,493,320	3,700	225,170	NE	NE	2,904,670	487,731,510

[a] human, [b] cynomolgus monkey, [c] study [redacted].160.25, [d] study [redacted].160.25, [e] males and females combined, NE: not evaluated

4　毒性試験：使用ロット

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Batch No.												
	SE-HPLC		Content	SN-38/IgG Ratio	Free SN-38	Cytotoxicity PC-3 assay	PC-3 Binding assay	Endotoxin	Sterility			
Proposed Specification:	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		Study Number	Type of Study
C/N [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		[redacted].160.03	Repeat-Dose Toxicity (two doses)

	SE-HPLC			Content	SN-38/IgG Ratio	Free SN-38	Cytotoxicity PC-3 assay	PC-3 Binding assay	Endotoxin	Sterility		
Proposed Specification (selected):	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Study Number	Type of Study
C/N [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted].160.25	3-Month repeat-dose toxicity

	SE-HPLC			Content	SN-38/IgG Ratio	Free SN-38	Cytotoxicity PC-3 assay	PC-3 Binding assay	Endotoxin	Sterility		
Proposed Specification (selected):	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Study Number	Type of Study
C/N [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted].160.25	3-Month repeat-dose toxicity

SE-HPLC: size exclusion high performance liquid chromatography; [redacted]

[redacted]

5　単回投与毒性試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Single-dose toxicity studies of IMMU-132 were not performed.

6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Gender and No. per Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study Number
Swiss-Webster Mice	Intraperitoneal injection/ NaAcetate, trehalose, Polysorbate 80	Two doses, three days apart; 7 and 15 days observation	Placebo, 10, 20 or 30 mg/animal	14 Males per group	Not assessed	All animals survived to the end of the experiment with only transient changes in body weight and liver enzymes (ALT/AST).	100209-143
Swiss-Webster Mice	Intraperitoneal injection/ MES, trehalose, Polysorbate 80	Two doses, three days apart; 15 and 36 days observation	Placebo or 30 mg/animal	21 Males per group	Not assessed	All animals survived to the end of the experiment with only transient changes in body weight and liver enzymes (ALT/AST).	122109-151

MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase

7　反復投与毒性試験：重要な試験（[redacted].160.03 試験）

Study No.: [redacted].160.03 **Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)**

Report Title:	**A Repeat Dose Toxicity Study of hRS7-SN38 Administered via a 1-hour Infusion in Cynomolgus Monkeys Followed by a 4-week Recovery Period**				
Species/Strain:	Cynomolgus monkey	**Method of Administration:**	1 h ± 10 min intravenous infusion	**Date of First Dose:**	[redacted] 20[redacted]
Initial Age:	Males: 2-4 y; females: 3-5 y	**Vehicle/Formulation:**	MES, trehalose, polysorbate 80	**Duration of Dosing:**	Two doses, Day 1 and Day 4
Special Features:	Monkey anti-human antibody (MAHA) analysis; sacrifices on Day 11 and Day 32; No statistics were performed due to low animal numbers.			**Duration of Postdose:**	4 weeks
No-Observed Adverse Effect Level:	Not established			**GLP Compliance:**	Yes

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**60 mg/kg**		**120 mg/kg**	
Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics [a]						
C_{max} (hRS7 IgG) [µg/mL]	< LLOQ	< LLOQ	1612.7	1598.7	2990.7	2818.7
AUC_{inf} (hRS7 IgG) [µgh/mL]	< LLOQ	< LLOQ	226538.5	260092.1	534585.1	440877.9
C_{max} (free SN-38) [µg/mL]	Not measured	Not measured	1.22 (N=2)	1.33 (N=2)	4.01 (N=2)	3.40 (N=2)
AUC_{inf} (free SN-38) [µgh/mL]	Not measured	Not measured	82.56 (N=2)	77.90 (N=2)	233.27 (N=2)	217.06 (N=2)
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	1*	0
Body Weight mean (% [b]) in kg, Day 8	3.973	3.353	-6.7%	-12.1%	-19.1% (N=2)	-12.8%
Food and Water Consumption	No visible changes.		No visible changes.		Food consumption decreased.	
Clinical Observations [c]						
Integument- abnormal color	0/0	0/0	0/0	11/1	30/2	15/3

Study No.: [redacted].160.03					**Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)**	
Feces bloody	0/0	0/0	0/0	0/0	4/1	0/0
Feces liquid	0/0	0/0	0/0	0/0	5/1	3/1
Ophthalmoscopy	No noteworthy findings					
Electrocardiography	No noteworthy findings					
Hematology						
White blood cells [10^3/µL], Day 6	13.47	15.62	7.94 (-41%)	6.98 (-55%)	3.51 (-74%)	4.95 (-68%)
Platelets [10^3/µL], Day 6	407	362	385 (--5%)	352 (-3%)	306 (-25%)	284 (-22%)
Reticulocytes [10^6/µL], Day 6	0.127	0.096	0.021 (-83%)	0.025 (-74%)	0.007 (-94%)	0.004 (-96%)
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		60 mg/kg		120 mg/kg	
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Serum Chemistry						
Alanine aminotransferase [U/L], Day 6	41	35	72	55	71	46
Aspartate aminotransferase [U/L], Day 6	27	58	40	37	61	58
Creatine Kinase [U/L], Day 6	114	123	209 (+83%)	203 (+65%)	364 (+219%)	429 (+249%)
Urinalysis						
Organ Weights						
Thymus [g]	3.81	3.13	1.75 (-54%)	0.73 (-77%)	0.66 (-83%), N=1	0.68 (-78%)
Gross Pathology (Day 11)						
Number evaluated	**2**	**2**	**2**	**2**	**1**	**2**
No remarkable finding	2	2	1	1	--	1
Cecum, distention	--	--	--	--	--	1
Colon, discoloration	--	--	--	--	1	--

Study No.: [redacted].160.03					**Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)**	
Colon, distention	--	--	--	--	1	1
Duodenum, discoloration	--	--	1	--	1	1
Stomach, discoloration	--	--	--	--	--	1
Skin, discoloration	--	--	--	1	--	--
Histopathology (Day 11) [d]						
Number evaluated	**2**	**2**	**2**	**2**	**1**	**2**
Bone marrow, decreased cellularity	0	0	1/1.0	1/1.0	1/2.0	2/2.5
Cecum, erosion	0	0	0	0	0	1/2.0
Colon, hemorrhage	0	0	0	0	1/2.0	1/1.0
Colon, erosion	0	0	0	0	1/3.0	0
Colon, fibrosis	0	0	0	0	1/2.0	0
Colon, gland abscess	0	0	0	0	1/2.0	0
Duodenum, hemorrhage	0	0	1/2.0	0	1/2.0	2/2.0
Duodenum, gland abscess	0	0	0	0	0	2/1.0
Duodenum, degeneration	0	0	0	0	0	2/2.0
Duodenum, fibrosis	0	0	0	0	0	1/2.0
Histopathology (Day 11) [d]						
Number evaluated	**2**	**2**	**2**	**2**	**1**	**2**
Duodenum, ulceration	0	0	0	0	1/2.0	0
Injection site, perivascular necrosis	0	0	0	0	0	1/1.0
Injection site, perivascular hemorrhage	0	0	2/2.5	0	1/2.0	1/1.0
Injection site, mononuclear cell infiltration	0	0	0	0	0	1/1.0

Study No.: [redacted].160.03				**Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)**		
Injection site, mixed cell infiltration	0	0	0	0	0	1/2.0
Jejunum, vacuolation mucosa	0	0	0	0	0	1/2.0
Jejunum, gland abscess	0	0	0	0	0	1/2.0
Jejunum, mixed cell infiltration	0	0	0	0	0	1/2.0
Jejunum, hemorrhage	0	0	0	0	1/2.0	1/1.0
Jejunum, fibrosis	0	0	0	0	1/2.0	1/1.0
Jejunum, mononuclear cell infiltration	0	0	0	0	1/3.0	0
Kidneys, mononuclear cell infiltration	0	1/1.0	2/1.0	1/1.0	0	2/1.0
Kidneys, glomerulosclerosis	0	0	0	0	0	1/1.0
Kidneys, hemorrhage	0	0	0	0	1/2.0	0
Mandibular lymph nodes, hypoplasia, germinal center	0	0	0	0	1/3.0	2/3.0
Mesenteric lymph nodes, hypoplasia, germinal center	0	0	0	0	1/3.0	2/2.0
Mammary gland, atrophy	0	0	0	0	0	2/2.0
Ovaries, increased atretic follicles	0	0	0	2/2.5	0	2/3.0
Rectum, hemorrhage	0	0	0	1/1.0	0	1/1.0
Rectum, polymorphonuclear cell infiltration	0	0	0	0	0	1/2.0
Spleen, hypoplasia, germinal center	0	0	1/2.0	2/2.5	1/3.0	2/3.0
Stomach, mononuclear cell infiltration, pylorus	1/1.0	0	1/2.0	1/1.0	0	2/1.5
Stomach, hemorrhage, pylorus	0	0	0	0	0	1/3.0
Stomach, gland abscess, pylorus	0	0	0	1/1.0	0	1/2.0
Stomach, mononuclear cell infiltration, fundus	0	0	1/1.0	0	0	1/1.0

Study No.: [redacted].160.03				**Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)**		
Stomach, hemorrhage, fundus	0	0	1/2.0	0	0	1/1.0
Thymus, decreased cellularity	0	0	2/2.0	2/2.5	1/3.0	2/2.5
Uterus, hemorrhage	0	0	0	2/3.0	0	2/2.5
Histopathology (Day 11) [d]						
Number evaluated	**2**	**2**	**2**	**2**	**1**	**2**
Uterus, atrophy, endometrium	0	0	0	2/2.0	0	2/2.5
Vagina, atrophy of surface epithelial cells	0	0	0	2/1.5	0	2/1.0
Additional Examinations						
MAHA analysis	No monkey anti-human antibodies were detected.					
Postdose Evaluation						
Number Evaluated	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**
Body Weight (%[b]) in kg, Day 29	4.345	3.956	+3.5%	-10.7%	-1.9%	-19.1%
White blood cells [10^3/µL], Day 32	12.92	-- (N=0)	14.52	9.75	6.18	6.76
Platelets [10^3/µL], Day 32	346	-- (N=0)	376	375	576	524
Reticulocytes [10^6/µL], Day 32	0.083	-- (N=0)	0.089	0.077	0.115	0.113
Creatine Kinase [U/L], Day 32	685	586	891	1521	1195	233
Histopathology (Day 32) [d]						
Number evaluated	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**
Duodenum, hemorrhage	0	0	1/1.0	0	1/1.0	1/1.0
Kidneys, mononuclear cell infiltration	1/1.0	0	0	1/1.0	1/2.0	1/1.0
Kidneys, hemorrhage	0	0	0	0	1/2.0	0

Study No.: [redacted].160.03				**Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)**		
Ovaries, increased atretic follicles	0	0	0	0	0	1/1.0
Rectum, hemorrhage	0	0	0	0	0	1/1.0
Stomach, mononuclear cell infiltration, pylorus	0	0	0	0	0	1/1.0
Stomach, hemorrhage, pylorus	0	0	0	0	1/1.0	0
Thymus, decreased cellularity	0	0	1/2.0	1/1.0	1/1.0	1/2.0

MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; MAHA: monkey anti-human antibodies
* One Group 3 male (SSAN 18) dosed at 120 mg/kg/dose was found dead on day 7. The cause of the death in SSAN 18 was related to intussusception and complications involving a gastrointestinal disorder and bone marrow suppression. At necropsy, gross pathology findings in this animal included intussusception in the ileum accompanied with severe distention of the cecum and the stomach filled with gas or clear-straw-watery liquid, respectively. In the cecum and colon, the intestinal contents were decreased, and small amount of hardened feces stuck to the mucosa. There also was moderate multifocal red discoloration of the mucosa of the colon.
Microscopically, there was mild autolysis; mainly in the mucosal layer of the stomach, duodenum, jejunum, and ileum. There were marked erosions of the esophageal mucosa accompanied with marked necrosis of the mucosa and lamina propria infiltrated by moderate numbers of polymorphonuclear cells, admixed with mild hemorrhage and mild edema of the submucosa. In the colon and rectum, mild hemorrhage of the lamina propria was observed. There was also mild mononuclear cell infiltration in the lamina propria in the stomach, duodenum, jejunum, and colon.
Minimal to mild fibrosis of the lamina propria was observed in the jejunum, colon, and rectum. Some of remaining glands in the stomach, jejunum, and colon were mildly to moderately ecstatic. In addition, marked decreased cellularity of both myeloid and erythroid cells in the bone marrow, moderate generalized decreased cellularity of the thymus, moderate hypoplasia of the germinal center of the mandibular and mesenteric lymph nodes and spleen were observed. There was mild acanthosis of the skin in the injection site.
Changes observed in the gastrointestinal organs (stomach, duodenum, jejunum, cecum, colon, and rectum) and hematopoietic organs (bone marrow, thymus, spleen, and mandibular and mesenteric lymph nodes) were considered to be test article-related although stress may have contributed to the changes observed in the thymus and spleen. Changes observed in the esophagus were considered secondary changes due to reflux of gastric contents, and intussusception was considered to be a secondary change of other test article-related changes and/or debility of the animals. Acanthosis of the skin of the injection site was considered to be from mechanical stimulation at test article administration and not considered the direct effect of the test article.

a Toxicokinetics are given across the dosing interval, i.e. for both doses combined. Bioanalytical assay measures hRS7 IgG, with or without bound SN-38 (i.e., measures both naked hRS7 IgG and IMMU-132)
b At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
c Incidence/number of animals with finding
d Incidence/mean severity (grading: 1 > minimal; 2 > mild; 3 > moderate; 4 > marked)

8　反復投与毒性試験：重要な試験（[redacted].160.25 試験）

Study No.: [redacted].160.25 **Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)**

Report Title:	**A Toxicity Study of IMMU-132 in Cynomolgus Monkeys**				
Species/Strain:	Cynomolgus Monkeys	**Method of Administration:**	1 h intravenous infusion	**Date of First Dose:**	[redacted] 20[redacted]
Initial Age:	2-3 years	**Vehicle/Formulation:**	MES, trehalose, polysorbate 80	**(Duration of) Dosing:**	Days 1, 8, 22, 29, 43, 50, 64 and 71
Special Features:	Comparison of two batches, IMMU-132 ([redacted], main batch; Process C) and IMMU-132 ([redacted]; Process B). Assessment of MES Buffer.			**Duration of Postdose:**	6 weeks
No-Observed Adverse Effect Level:	50 mg/kg (batch [redacted]) and 25 mg/kg (batch [redacted])			**GLP Compliance:**	Yes

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**12.5**		**25**		**50**		**25 (batch [redacted])**	
Number of Animals	**M: 2***	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Toxicokinetics [a]										
Day 1										
C_{max} (hRS7 IgG) [ng/mL]	BLQ	BLQ	406000	357000	669000	713000	1510000	1440000	674000	681000
AUC_{0-168} (hRS7 IgG) [ngh/mL]	BLQ	BLQ	26000	22700	47100	50100	124000	109000	50600	49400
C_{max} (free SN-38) [ng/mL]	BLQ	BLQ	95.0	103	231	201	337	313	145	157
AUC_{0-168} (free SN-38) [ngh/mL]	BLQ	BLQ	2360	2910	5670	6030	8860	8140	3650	4260
C_{max} (SN-38G) [ng/mL]	BLQ	BLQ	5.75	8.04	9.84	11.7	27.5	22.6	10.0	10.1
AUC_{0-168} (SN-38G) [ngh/mL]	BLQ	BLQ	NC	135	288	297	864	777	327	328
C_{max} (Total SN-38) [ng/mL]	BLQ	BLQ	6300	6350	13300	13500	26600	24900	12700	12200
AUC_{0-168} (Total SN-38) [ngh/mL]	BLQ	BLQ	122000	115000	243000	255000	533000	488000	240000	224000

Study No.: [redacted].160.25						**Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)**				
Day 71										
C_{max} (hRS7 IgG) [ng/mL]	BLQ	BLQ	146000	137000	952000	957000	2160000	1850000	779000	615000
$AUC_{0\text{-}168}$ (hRS7 IgG) [ngh/mL]	BLQ	BLQ	17400	8880	77000	73600	202000	155000	73400	36400
C_{max} (free SN-38) [ng/mL]	BLQ	BLQ	85.2	64.6	238	251	341	331	163	190
$AUC_{0\text{-}168}$ (free SN-38) [ngh/mL]	BLQ	BLQ	1260	1300	5870	8200	10000	8550	3900	4280
C_{max} (SN-38G) [ng/mL]	BLQ	BLQ	44.9	19.4	14.5	14.0	51.7	27.3	16.4	31.4
$AUC_{0\text{-}168}$ (SN-38G) [ngh/mL]	BLQ	BLQ	463	342	463	406	2560	1000	402	717
C_{max} (Total SN-38) [ng/mL]	BLQ	BLQ	4930	4430	13100	13400	28000	25100	12700	11300
$AUC_{0\text{-}168}$ (Total SN-38) [ngh/mL]	BLQ	BLQ	46700	42200	254000	266000	571000	495000	12700	11300
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight mean (% [b]) in kg (Day 77)	3.115	3.140	+7.3%	-8.2%	+3.1%	-10.5%	+3.2%	-9.6%	+10.7%	-5.5%
Food and Water Consumption	No noteworthy findings.									
Clinical Observations (Day 72)										
Skin, abnormal color (number affected)	1	0	0	2	4	3	5	3	4	2
Bruising (number affected)	2	3	5	5	5	5	5	5	3	5
Hair loss (number affected)	1	0	0	0	1	1	2	4	3	2
Ophthalmoscopy	No noteworthy findings.									
Electrocardiography	No noteworthy findings.									
Hematology	No noteworthy findings.									
Serum Chemistry	No noteworthy findings.									
Urinalysis	No noteworthy findings.									
Organ Weights (%)	No noteworthy findings.									

Study No.: [redacted].160.25						**Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)**				
Gross Pathology (Day 78)										
Number examined	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3
Alopecia (number affected)	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		12.5		25		50		25 (batch [redacted])	
Histopathology [c]										
Number examined	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3
Skin, degeneration of hair follicles and/or sebaceous glands, multifocal	0	0	0	0	0	0	1/2.0	2/3.0	0	1/2.0
Thymus, decreased lymphoid cellularity (sum of different presentations, incidence)	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
Additional Examinations										
MAHA analysis	While ADA was generally detected in all animals administered IMMU-132, ADA influence on serum exposure to TAb, Total SN-38 and Free SN-38 appeared to be dose-dependent, with the low dose exhibiting greater variability and generally lower exposures on Day 71 compared to Day 1, and the high dose exposures on Day 71 appearing largely uninfluenced by ADA formation									
Postdose Evaluation (Day 113)										
Number Evaluated	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	No noteworthy findings									

* One control group male was removed from the study on Day 9 due to behavior-related concerns. Data was for this animal were not reported

a Bioanalytical assay measures hRS7 IgG, with or without bound SN-38 (i.e., measures both naked hRS7 IgG and IMMU-132

b At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

c Incidence/mean severity (grading: 1 > minimal; 2 > mild; 3 > moderate; 4 > marked)

MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; MAHA: monkey anti-human antibodies

Concentrations of Total SN-38 in serum from vehicle control group samples were BLQ on all collection days except in one male animal (Animal 46) at the 6-hr collection on Day 71. The reason for this measurable value is not clear, but the serum level (163 ng/mL) was approximately 10-fold lower than the mean serum level observed 6 hours post-dose in male animals at the lowest dose level.

NC: not calculated

BLQ: below quantitation limit

9　In Vitro 遺伝毒性試験（[redacted]1595_R1a 試験）

Study No.: [redacted]1595_R1a **Test Article: SN-38**

Report Title:	**Assessment of Genotoxicity of SN-38 Using the Bacterial Reverse Mutation Test (OECD 471)**				
Test for Induction of:	Reverse mutations	No. of Independent Assays:	2	Date of Treatment:	[redacted] 20[redacted]
Strain:	*S. typhymurium* and *E. coli*	No. of Replicate Cultures:	3	GLP Compliance:	Yes
Metabolizing System:	Aroclor™1254-induced rat liver S9, 0.926%	No. of Cells Analyzed/Culture:	**Not applicable**		
Vehicles:	**For Test Article:** DMSO	**For Positive Controls:**	Water (NaN_3); DMSO (ICR-191, 2-NF, ENNG, 2-AA)		
Treatment:	Plate incorporation for 48 h (experiment I) and pre-incubation for 18 minutes + 48 h (experiment II)				
Cytotoxic Effects	none	**Genotoxic Effects**	None		

Revertants per plate (means), experiments I and II

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/plate)	TA98		TA100		TA1535		TA1537		WP2 uvrA	
			I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Without	background	--	20.0	16.3	81.3	82.3	5.0	10.0	7.3	4.7	51.3	36.3
Activation	SN-38	158	17.0	12.7	85.0	86.3	10.3	9.0	5.7	3.0	50.7	38.3
		50	9.7	10.7	76.7	85.7	7.3	7.7	6.3	5.0	54.0	38.7
		15.8	12.3	12.0	88.3	78.3	10.7	8.3	4.0	5.3	61.0	34.7
		5	11.0	11.7	81.7	81.3	9.7	11.7	5.7	5.0	42.0	35.0
		1.58	17.3	11.7	86.0	66.3	8.7	7.7	9.3	3.3	50.7	45.3
		0.5	11.0	7.7	98.7	78.7	11.3	6.3	4.7	4.0	50.3	45.7
	2-NF	1	280.3	152.0	--	--	--	--	--	--	--	--
	NaN_3	5	--	--	1866.0	1876.3	--	--	--	--	--	--
	NaN_3	1	--	--	--	--	822.3	585.3	--	--	--	--
	ICR-191	1	--	--	--	--	--	--	578.0	612.0	--	--

Study No.: [redacted]1595_R1a **Test Article: SN-38**

	ENNG	1	--	--	--	--	--	--	--	--	1159.3	356.0
With	background	--	17.7	23.7	119.3	131.3	7.3	10.0	6.7	6.7	84.0	75.0
Activation	SN-38	158	16.3	30.0	97.3	105.3	11.0	9.3	8.0	3.7	77.3	78.0
		50	18.3	26.3	87.7	98.7	15.0	6.7	5.3	2.7	79.3	67.0
		15.8	18.7	22.0	104.0	104.7	7.7	8.0	11.0	3.3	72.7	65.7
		5	24.7	21.0	96.7	92.3	8.0	9.0	6.7	5.0	79.0	72.0
		1.58	22.3	25.0	97.3	97.3	7.0	12.0	8.7	3.7	85.7	74.0
		0.5	23.0	25.0	84.0	99.0	10.0	10.3	6.7	2.7	77.7	66.7
	2-AA	2.5	938.0	335.3	1197.7	456.0	86.3	107.0	107.7	42.7	1316.3	1073.7

DMSO: dimethyl sulfoxide; 2-NF: 2 -nitrofluorene; ENNG: N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine; 2-AA: 2-aminoanthracene

10　In Vitro 遺伝毒性試験（[redacted]1595_R1b 試験）

Study No.: [redacted]1595_R1b **Test Article: SN-38**

Report Title:	**Assessment of Genotoxicity of SN-38 Using the In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (OECD 487)**				
Test for Induction of:	Micronuclei	No. of Independent Assays:	1	Date of Treatment:	[redacted] 20[redacted]
Strain	CHO-K1 cells	No. of Replicate Cultures:	3	GLP Compliance:	Yes
Metabolizing System:	Aroclor™1254-induced rat liver S9, 0.5%	No. of Cells Analyzed/Culture:			
Vehicles:	**For Test Article:** DMSO	**For Positive Controls:**	DMSO		
Treatment:	3 hours (± S9 mix) or 20 hours (- S9 mix) incubation				
Cytotoxic Effects	Roughly dose-dependent reduction in the number of viable cells				
Genotoxic Effects	Statistically significant increase in the number of micronucleated cells				

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Mean Fold Change EMA	Mean Fold Change MN	Mean Fold Change Hypodiploid	Cell Viability (% of Control)	T-Test p value	Statistically Significant MN Induction?
Without	Control	--	1.00	1.00	1.00	100.00	N/A	N/A
Activation	MMC	0.2	1.17	2.38	1.07	78.08	<0.0001	YES
3h		2	3.58	6.63	1.56	55.67	<0.0001	YES
Incubation	SN-38	0.02	3.02	3.95	0.82	79.52	<0.0001	YES
		0.06	2.42	8.55	2.00	61.90	<0.0001	YES
		0.2	1.73	3.56	1.64	44.44	<0.0001	YES
		0.6	1.96	3.97	1.61	41.22	<0.0001	YES
		2	2.35	5.62	1.85	37.28	<0.0001	YES
With	Control	--	1.00	1.00	1.00	100.00	N/A	N/A
Activation	CP	2	1.00	2.60	1.00	79.57	<0.0001	YES
3h		5	1.11	5.09	1.21	72.94	<0.0001	YES

Study No.: [redacted]1595_R1b **Test Article: SN-38**

Incubation	SN-38	0.02	0.86	5.96	1.26	100.12	<0.0001	YES
		0.06	1.43	9.99	4.56	67.59	<0.0001	YES
		0.2	1.50	3.58	2.08	54.15	<0.0001	YES
		0.6	1.50	4.36	2.20	51.31	0.0019	YES
		2	1.43	5.42	2.35	52.30	<0.0001	YES
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**Mean Fold Change EMA**	**Mean Fold Change MN**	**Mean Fold Change Hypodiploid**	**Cell Viability (% of Control)**	**T-Test p value**	**Statistically Significant MN Induction?**
Without	Control	--	1.00	1.00	1.00	100.00	N/A	N/A
Activation	CBDA	0.04	0.71	1.84	1.35	85.00	0.0005	YES
20h		0.4	0.79	4.25	1.53	45.81	<0.0001	YES
Incubation	SN-38	0.02	1.03	7.58	1.72	57.49	<0.0001	YES
		0.06	1.13	7.21	1.31	42.80	<0.0001	YES
		0.2	0.84	3.38	0.96	40.93	<0.0001	YES
		0.6	0.86	3.13	0.97	39.21	0.0002	YES
		2	1.30	3.33	0.92	36.86	<0.0001	YES

DMSO: dimethyl sulfoxide; MMC: mitomycin C; CP: cyclophosphamide; CBDA: cytosine β-D-arabinofuranoside; MN micronucleus; EMA: nucleic acid dye A solution

11　In Vivo 遺伝毒性試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

No in vivo genotoxicity studies of IMMU-132 or SN-38 were performed.

12　がん原性試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

No carcinogenicity studies of IMMU-132 were performed.

13　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

No reproductive and developmental toxicity studies of IMMU-132 were performed.

14　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

No reproductive and developmental toxicity studies of IMMU-132 were performed.

15　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

No reproductive and developmental toxicity studies of IMMU-132 were performed.

16　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

No reproductive and developmental toxicity studies of IMMU-132 were performed.

17　新生児を用いた試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

No reproductive and developmental toxicity studies of IMMU-132 were performed.

18　局所刺激性試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

The local tolerance of IMMU-132 was assessed in repeat-dose toxicity studies.

19　光毒性試験

Test Article: Sacituzumab Govitecan (IMMU-132)

No phototoxicity studies were conducted with IMMU-132 or SN-38.

20　その他の毒性試験

Test Article: MES

Report Title:	**RR-[redacted]-[redacted]-20[redacted]; Cytotoxic effect of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES) in human breast and urinary bladder carcinoma cell lines**				
Test for cytotoxicity of:	Novel Excipient 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES)	No. of Independent Assays:	1	Date of Treatment:	[redacted]20[redacted] to [redacted]20[redacted]
Strain	HCC1806 and T24 cells	No. of Replicate Cultures:	3	GLP Compliance:	No
Treatment:	1.2 M through 3.07 x 10-6 M MES for 96 hours				
Cytotoxic Effects	MES was incubated with two different human tumor lines, HCC1806 (TNBC) and T24 (UBC) at a concentration range of 1.2 M through 3.07 x 10-6 M. As a positive control, these same cell lines were also incubated with SG (SN-38 equivalent range of 250 nM to 3.8x10-3 nM). MES elicited a cytotoxic dose response on both HCC1806 and T24 cell lines (IC_{50} = 4.3x10-2 M and 3.4x10-2 M, respectively). These values were greater than 107-fold higher than that mediated by SG (i.e., substantially less potent). Based on an estimated plasma Cmax for MES of 0.6 mM if SG were to be administered as a single bolus intravenous injection to an 80 kg patient, extrapolations from the generated dose/response curves suggest that this level would not be cytotoxic in either cell line tested in this assay. Even at 10-fold higher doses only modest growth inhibition would be expected for HCC1806 and T24 (9% and 19%, respectively). Importantly, this growth inhibition noted for MES was done after a 96-h continuous exposure in tissue culture, something that is not likely to happen clinically as the MES would be cleared from the plasma resulting in diminishing concentrations over time.				

Report Title:	**RR-[redacted]-[redacted]-20[redacted]; Evaluation of the possible changes to in vitro cytotoxic dose response of Sacituzumab govitecan (SG) when combined with 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES) in human breast and urinary bladder carcinoma cell lines**				
Test for cytotoxicity of:	Novel Excipient 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES)	No. of Independent Assays:	1	Date of Treatment:	[redacted]20[redacted]- [redacted]20[redacted]
Strain	HCC1806 and T24 cells	No. of Replicate Cultures:	3	GLP Compliance:	No
Treatment:	96 hours at 0.6 nM MES or 6.0 nM MES which represent the maximal feasible clinical dose of MES and a 10-fold increase over the maximal feasible human dose of this novel excipient				
Cytotoxic Effects	MES, when combined with SG, did not result in any significant changes in the cytotoxicity of SG when incubated with two different human tumor lines. By itself, at 0.6 mM, MES produced less than 3.5% cell growth inhibition whereas 6.0 mM resulted in less than 12.4% inhibition. Comparisons of calculated EC_{50}-values in HCC1806 TNBC cells between sacituzumab govitecan (SG) alone and SG combined with 0.6 mM MES (1.50x10-9 and 1.53x10-9 M, respectively) or with 6.0 mM MES (1.78x10-9 and 1.58x10-9 M, respectively) were not significantly different. Likewise, in the T24 cells, the EC_{50}-values were not significantly different between SG alone and SG plus MES at 0.6 mM (3.65x10-9 and 2.92x10-9 M, respectively) or 6.0 mM (3.29x10-9 and 3.26x10-9 M, respectively). Based on an estimated plasma Cmax for MES of 0.6 mM if SG were to be administered as a single bolus intravenous injection to an 80 kg patient, these data clearly demonstrate that this hypothetical amount of MES would not alter the cytotoxicity of SG. Even at a 10-fold higher amount of MES, when combined with SG, there are no significant changes to the SG dose/response curve.				

Test Article: MES

Report Title:	**3277-001: A 1-Month Study of MES by Intravenous Injection in Sprague Dawley Rats with a 1- and a 7-Day Post Dose Observation Periods**				
Species/Strain:	Sprague Dawley Rats	**Method of Administration:**	10 min intravenous infusion	**Date of First Dose:**	[redacted]20[redacted]
Dose Level	0, 250, 500 and 1000 mg/kg	**Vehicle/Formulation:**	MES formulated in 0.9 % Sodium Chloride Injection, USP	**Duration of Dosing:**	Once weekly Days 1, 8, 22 and 29
No-Observed Effect Level:	1000 mg/kg	**Age at initiation:**	Approximately 9 weeks old	**GLP Compliance:**	Yes

There were no MES-related mortalities and no MES-related effects on clinical signs, body weights, body weight gains, food consumption, ophthalmology examinations, neurobehavioral evaluations, clinical pathology parameters (hematology, coagulation, clinical chemistry, and urinalysis), organ weights, or macroscopic or microscopic examinations. Following once weekly IV infusion of MES, C_{max} and $AUC_{0\text{-}8hr}$ values increased with increasing dose in an approximately dose proportional manner on Days 1 and 29. Systemic exposure ($AUC_{0\text{-}8hr}$ values) to MES did not change following once weekly IV infusion of MES. Systemic exposure to MES was independent of sex. Repeat once weekly intravenous administration of MES in male and female rats for 1 month (Days 1, 8, 22, and 29) at 250, 500, and 1000 mg/kg was well tolerated at all dose levels. The no observed effect level (NOEL) was determined to be 1000 mg/kg.

21　In Vitro 遺伝毒性試験（MES）

Test Article: MES

Report Title: MES Bacterial Reverse Mutation Assay		
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**Number of Independent Assays:** 1	**Study Number:** 01551001
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	**Number of Replicate Cultures:** 3	**Sponsor Reference Number:** NA
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9 (1.4%)	**Positive Controls:** DMSO	**Lot Number:** [redacted]
Vehicles: Test Article: 0.9% Sodium Chloride Injection, USP, Filter Sterilized, pH 6.5 ± 0.1		**GLP Compliance:** Yes
Treatment: Plate incorporation for 2 days		**Date of Treatment:** [redacted]-20[redacted] and [redacted]-20[redacted]
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		

Test Article	Dose (µg/plate)	Mutagenicity Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 Plates ± SD)				
		Salmonella typhimurium				*Escherichia coli*
		TA98[a]	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA
Without Metabolic Activation						
0.9% Sodium Chloride Injection, USP, Filter Sterilized, pH 6.5 ± 0.1	0.1 mL/plate	17±4	92±6	5±2	3±2	33±3
MES	100	23±10	101±9	5±0	6±1	36±6
MES	250	17±10	105±8	7±2	5±1	39±8
MES	500	22±0	107±23	11±1	6±3	31±4
MES	1000	20±4	101±13	5±2	5±3	29±9
MES	2500	19±4	99±4	6±1	8±6	29±7
MES	5000	19±7	97±10	4±1	5±2	32±5
Positive Controls						
2-Nitrofluorene	2.5	905±230*	NT	NT	NT	NT
Sodium azide	1.0	NT	367±5*	430±13*	NT	NT
ICR-191 acridine	0.5	NT	NT	NT	166±16*	NT
4-Nitroquinoline-N-oxide	2.0	NT	NT	NT	NT	958±30*

Study Number: 01551001 (continued)

Test Article	Dose (µg/plate)	Mutagenicity Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 Plates ± SD)				
		Salmonella typhimurium				*Escherichia coli*
		TA98[a]	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA
With Metabolic Activation						
0.9% Sodium Chloride Injection, USP, Filter Sterilized, pH 6.5 ± 0.1	0.1 mL/plate	17±5	94±3	6±3	4±2	53±3
MES	100	22±6	84±6	8±3	6±4	43±9
MES	250	20±5	87±7	8±4	5±4	50±6
MES	500	23±7	88±20	9±4	4±1	37±13
MES	1000	20±3	95±8	6±2	5±2	41±3
MES	2500	23±12	112±15	5±4	4±4	34±11
MES	5000	20±2	95±19	7±2	4±0	42±8
Positive Controls						
2-Aminoanthracene	2.5	2325±425*	1397±483*	186±17*	81±20*	NT
2-Aminoanthracene	10	NT	NT	NT	NT	318±33

Criteria for significance: 2-fold (TA 100) and 3-fold (TA 98, TA 1535, TA 1537 and WP2 uvrA) over controls.

GLP = Good Laboratory Practice; NA = Not applicable; S9 = Postmitochondrial supernatant.

[a] Data from repeat assay dosed [redacted]20[redacted].

* Protocol criteria for a positive response met.

Test Article: MES

Report Title:	**MES In Vitro Chromosome Aberration Test in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes**	
Test for Induction of: Chromosome aberrations	**Number of Independent Assays:** 1	**Study Number**: 01551002
Test Cells: Human lymphocytes	**Number of Replicate Cultures:** 2	**Lot Number**: [redacted]
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9 (1.5%)	**Number of Cells Analyzed/Culture**: 150	**GLP Compliance**: Yes
Vehicles: Test Article: 0.9 % Sodium Chloride Injection, USP Positive Controls: DMSO		**Date(s) of Treatment**: [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Treatment: Continuous treatment for 22-hour without S9; pulse treatment for 3-hour with and without S9. All cultures harvested at 22-hour.		
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		

Test Article	Dose (µg/mL)	Total Cells Analyzed for Aberrations	Cytotoxicity[a] Mean %	Aberrant Cells Mean %	Polyploidy Mean %	Endoreduplication Mean %
3-Hour Treatment Without Metabolic Activation						
0.9 % Sodium Chloride Injection, USP	1.0%	300	0	1.3	0.0	0.0
MES	49.5	300	0	1.7	0.3	0.0
MES	99.0	300	0	1.3	0.0	0.0
MES	198	300	0	1.3	0.0	0.0
Mitomycin C	0.8	67	31	74.6**	0.5	0.3
3-Hour Treatment With Metabolic Activation						
0.9 % Sodium Chloride Injection, USP	1.0%	300	0	2.0	0.0	0.0
MES	49.5	300	4	1.7	0.0	0.0
MES	99.0	300	11	2.3	0.3	0.0
MES	198	300	22	1.3	0.0	0.0
Cyclophosphamide	20	66	50	75.8**	0.0	0.0
22-Hour Treatment Without Metabolic Activation						
0.9 % Sodium Chloride Injection, USP	1.0%	300	0	1.7	0.3	0.0
MES	49.5	300	17	1.0	0.3	0.0
MES	99.0	300	0	1.7	0.0	0.0
MES	198	300	22	2.0	0.3	0.0
Mitomycin C	0.4	55	57	90.9**	0.0	0.0

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, significantly different from control based on Fishers Exact Test. Cochran-Armitage conducted for Trend. A full description of the statistical decision can be found in the final report for this study.

GLP = Good Laboratory Practice; NA = Not applicable; S9 = Postmitochondrial supernatant.
a Cytotoxicity = [One minus the quotient (mean test article RPD/mean vehicle control mitotic index)] x 100; if ≤ 0, reported as 0

Test Article: MES

Report Title: An In Vivo Micronucleus Study of MES in Sprague Dawley Rats by IV Administration

Test for Induction of: Micronuclei in polychromatic erythrocytes (PCEs) in rat bone marrow	Treatment Schedule: Once daily for 2 days	Study Number: 3277-003
Species/Strain: Sprague Dawley CD® [Crl:CD®(SD)] rat	**Sampling Time:** 24 hours after last dose	Location in CTD: 4.2.3.7.7.6
Age: Approximately 7 weeks at initiation of dosing	Method of Administration: Intravenous injection	GLP Compliance: Yes
No. of Cells Analyzed/Animal: 4000	**Vehicle:** 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP	Date of Dosing: [redacted] 20[redacted]
Positive Control: Cyclophosphamide (CP)	Special Features: None	

Toxic/Cytotoxic Effects: None

Genotoxic Effects: Body Weight Gains

Evidence of Exposure: None

MALES

Test article	Dose (mg/kg)	No. of Animals	% MN-PCEs (Mean ± SD)	PCE:TE Ratio (Mean ± SD)
Vehicle	0	5	0.06 ± 0.01	0.48 ± 0.01
MES	250	5	0.07 ± 0.02	0.50 ± 0.01
	500	5	0.08 ± 0.02	0.50 ± 0.04
	1000	5	0.07 ± 0.01	0.52 ± 0.03
CP	60	5	1.99 ± 0.56 [a]	0.36 ± 0.07 [a]

FEMALES

Test article	Dose (mg/kg)	No. of Animals	% MN-PCEs (Mean ± SD)	PCE:TE Ratio (Mean ± SD)
Vehicle	0	5	0.07 ± 0.02	0.48 ± 0.01
MES	250	5	0.06 ± 0.01	0.49 ± 0.01
	500	5	0.07 ± 0.01	0.50 ± 0.03
	1000	5	0.07 ± 0.03	0.50 ± 0.03
CP	60	5	1.4 ± 0.47 [a]	0.34 ± 0.07 [a]

a Statistically different than vehicle control. $p \leq 0.01$