目次

1.　非臨床試験の概要 6
1.1　非臨床試験計画の概略 6
1.2　被験物質の名称 8
2.　薬理試験 9
2.1　効力を裏付ける試験 9
2.1.1　TF を標的とした ADC を用いたがん治療 9
2.1.2　チソツマブ　ベドチンの TF 結合活性及び細胞内取込み 10
2.1.3　チソツマブ　ベドチンの MMAE を介した細胞傷害活性 10
2.1.4　チソツマブ　ベドチンによる免疫応答を介した細胞傷害活性 12
2.1.5　チソツマブ　ベドチンの単剤又は他剤との併用投与による in vivo 抗腫瘍活性 12
2.2　副次的薬理試験 14
2.2.1　血液凝固に対する TF の関与 14
2.2.2　正常な生理機能に対する TF 依存性 PAR シグナル伝達の関与 20
2.2.3　癌に対する TF の関与 21
2.2.4　他の疾患に対する TF の関与 22
2.2.5　成人での TF 発現 22
2.3　安全性薬理試験 23
2.4　薬力学的薬物相互作用試験 23
3.　薬物動態 24
3.1　分析法 24
3.2　吸収 24
3.3　分布 24
3.4　代謝 25
3.5　排泄 25
3.6　薬物動態学的薬物相互作用 25
4.　毒性試験 26
4.1　単回投与毒性試験 26
4.2　反復投与毒性試験 26
4.2.1　死亡例 26
4.2.2　皮膚毒性 26
4.2.3　眼毒性 27
4.2.4　骨髄、リンパ系及び血液学的所見 27
4.2.5　雄性生殖器官の所見 28
4.2.6　末梢神経障害 28
4.2.7　その他の所見 28
4.3　遺伝毒性試験 29

4.4　がん原性試験 29
4.5　生殖発生毒性試験 29
4.5.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 29
4.5.2　胚・胎児発生に関する試験 29
4.6　局所刺激性試験 30
4.7　その他の毒性試験 30
4.7.1　組織交差反応性 30
4.7.2　光毒性 30
5.　総括及び結論 30
6.　参考文献一覧 33

表目次

Table 1　非臨床試験で使用した被験物質の化合物コード 8
Table 2　カニクイザル及びヒトにおけるチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの全身曝露量 ... 32

図目次

Figure 1　腫瘍細胞に対するチソツマブ　ベドチンの多様なメカニズムを介した細胞傷害活性及び抗腫瘍活性 10
Figure 2　腫瘍細胞の TF 発現レベル及びチソツマブ　ベドチンによる細胞傷害活性の相関 11
Figure 3　子宮頸癌 PDX マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性 13
Figure 4　TF:FVIIa 複合体の血液凝固及び PAR シグナル伝達に対する関与 14
Figure 5　血管損傷後の TF による外因性血液凝固反応 15

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
^{3}H-MMAE	tritium labeled MMAE	トリチウム標識 MMAE
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADC	antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	antibody-dependent cell-mediated phagocytosis	抗体依存性細胞貪食
A/G	albumin/globulin ratio	アルブミン／グロブリン比
AKT	protein kinase B	プロテインキナーゼ B
asTF	alternatively spliced tissue factor	オルタナティブ・スプライス型 TF
AUC	area under the concentration-time curve	薬物濃度－時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	–
BSEP	bile salt export pump	–
CD	cluster of differentiation	–
CDX	cell line-derived xenograft	細胞株由来異種移植
C_{max}	maximum drug concentration	最高血中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
CXCL1	chemokine ligand 1	ケモカインリガンド 1
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DAR	drug to antibody ratio	薬物抗体比
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
ECL	electrochemiluminescence	電気化学発光
EGFR	epidermal growth factor receptor	上皮成長因子受容体
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
EPCR	endothelial protein C receptor	内皮細胞プロテイン C 受容体
ERK1/2	extracellular signal regulated kinase 1/2	細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2
Fab	antigen-binding fragment	–
Fc	fragment crystallizable	–
FcγR	Fc gamma receptor	Fcγ 受容体
FGF2	fibroblast growth factor 2	線維芽細胞増殖因子 2
FVII	coagulation factor VII	血液凝固第 VII 因子
FVIIa	activated coagulation factor VII	活性型血液凝固第 VII 因子
FX	coagulation factor X	血液凝固第 X 因子
FXa	activated coagulation factor X	活性型血液凝固第 X 因子
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
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
HNSTD	highest non-severely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICD	immunogenic cell death	免疫原性細胞死

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IFN	interferon	インターフェロン
IgG1	immunoglobulin G1	免疫グロブリン G1
IL	interleukin	インターロイキン
JAK/STAT5	janus kinase/signal transducer and activator of transcription 5	ヤヌスキナーゼ／シグナル伝達兼転写活性化因子 5
K_I	concentration of an inactivator that supports half the maximal rate of enzyme inactivation	阻害物質の飽和濃度での酵素不活化の 50%阻害濃度
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
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
MAPK	mitogen activated protein kinase	分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
MMAE	monomethyl auristatin E	モノメチルアウリスタチン E
MP	microparticle	マイクロパーティクル
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2	–
nAMD	neovascular age-related macular degeneration	新生血管を伴う加齢黄斑変性症
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小細胞肺癌
OAT	organic anion transporter	–
OATP	organic anion transporting polypeptide	–
OCT	organic cation transporter	–
PAR	protease-activated receptor	プロテアーゼ活性化受容体
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PD-1	programmed cell death-1	プログラム細胞死-1
PDX	patient-derived xenograft	患者由来異種移植
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
PI3K	phosphoinositide 3 kinase	ホスホイノシチド 3 キナーゼ
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
PYK2	proline-rich tyrosine kinase 2	プロリンリッチチロシンキナーゼ 2
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
SHP-2	Src homology region 2 domain containing phosphatase 2	Src 相同領域 2 ドメイン含有ホスファターゼ 2
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
TAb	total antibody	総抗体
TAMRA	carboxytetramethylrhodamine	カルボキシテトラメチルローダミン
TEG	thromboelastography	トロンボエラストグラフィ
TF	tissue factor	組織因子
TGA	thrombin generation assay	トロンビン生成アッセイ

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
TLR	toll-like receptor	Toll 様受容体
t_{max}	time to reach maximum concentration	最高血中濃度到達時間
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
vc	valine-citrulline	バリンーシトルリン
vcMMAE	valine-citrulline monomethyl auristatin E	バリンーシトルリンモノメチルアウリスタチン E
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
Zr	zirconium	ジルコニウム

1.　非臨床試験の概要

1.1　非臨床試験計画の概略

チソツマブ　ベドチンは、ヒト組織因子（tissue factor、TF）特異的ヒト免疫グロブリン G1（immunoglobulin G1、IgG1）κ モノクローナル抗体（チソツマブ）から構成される抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate、ADC）であり、プロテアーゼで切断可能なバリン―シトルリン（valine-citrulline、vc）リンカーを介して微小管阻害剤であるモノメチルアウリスタチン E（monomethyl auristatin E、MMAE）が化学結合している。TF［別名：トロンボプラスチン、cluster of differentiation（CD）142 又は血液凝固第 III 因子］は血管周囲の細胞で典型的に発現する膜貫通型糖タンパク質であり、主に血管損傷後の血液凝固反応の開始因子としての生理的役割を担う。正常な組織と比較して広範囲の固形癌で TF 発現の増加が明らかとなっている（Rondon et al., 2019）。各種の研究から、腫瘍細胞は TF の凝固促進活性及び TF 依存性細胞内シグナル伝達の両方を利用している可能性が示唆されている（Versteeg, 2015）。腫瘍での TF の発現は、予後不良及び腫瘍転移の頻度増加と関連している（Nitori et al., 2005; Regina et al., 2009）。TF を発現する腫瘍としては、婦人科腫瘍、泌尿生殖器腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、肺癌、消化管腫瘍及び神経膠腫等が知られている（Ohta et al., 2002; Akashi et al., 2003; Nitori et al., 2005; Khorana et al., 2007; Patry et al., 2008; Cocco et al., 2011a; Cocco et al., 2011b）。

チソツマブ　ベドチン及び非結合型抗体であるチソツマブの非臨床有効性及び安全性は、以下の薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験により評価した。

- ヒト TF に対するチソツマブ　ベドチンの結合特性を in vitro で評価した。
- 細胞膜上の TF に結合したチソツマブ　ベドチンの細胞内取込みを in vitro で評価した。
- TF とその主な生理的リガンドである活性化血液凝固第 VII 因子（activated coagulation factor VII、FVIIa）の結合及び下流のシグナル伝達［細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2（extracellular signal regulated kinase 1/2、ERK1/2）リン酸化及びインターロイキン（interleukin、IL）−8 産生］に対するチソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの作用を in vitro で評価した。
- チソツマブ　ベドチンの多様な抗腫瘍効果を、以下の in vitro 試験で評価した。
  - 様々な TF 発現レベルの腫瘍細胞株に対する直接的な細胞傷害活性
  - TF 高発現腫瘍細胞と TF 低発現腫瘍細胞の共培養で誘導されるバイスタンダー効果
  - Fragment crystallizable（Fc）を介した細胞傷害活性：抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity、ADCC）及び抗体依存性細胞貪食（antibody-dependent cell-mediated phagocytosis、ADCP）
  - 免疫原性細胞死（immunogenic cell death、ICD）の誘導
- 各種細胞株由来異種移植（cell line-derived xenograft、CDX）及び患者由来異種移植（patient-derived xenograft、PDX）マウスモデルを用いて、チソツマブ　ベドチン及びチソツマブの in vivo 抗腫瘍活性を評価した。単剤投与に加えて、チソツマブ　ベドチン及び既承認の抗悪性腫瘍剤との併用投与についても検討した。
- 血液凝固パラメーターに対するチソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの影響を 5 つの in vitro 試験［活性型血液凝固第 X 因子（activated coagulation factor X、FXa）生成試験、標準

的なプロトロンビン時間（prothrombin time、PT）測定、非標準的な凝固試験、トロンボエラストグラフィ（thromboelastography、TEG）及びトロンビン生成アッセイ（thrombin generation assay、TGA）］で検討した。

- 安全性薬理試験では、MMAE の in vitro での心血管系に対する影響を、GLP 適用ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（human ether-à-go-go-related gene、hERG）試験で評価した。In vivo では、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験の一部として、チソツマブ　ベドチンの心電図、心拍数、血圧、呼吸系及び中枢神経系（central nervous system、CNS）に対する安全性薬理パラメーターを評価した。
- マウス、ラット及びカニクイザルを用いた探索的試験及び GLP 適用試験で、臨床投与経路である静脈内投与後のチソツマブ　ベドチン、TAb（Total antibody、総抗体）及び MMAE の薬物動態（pharmacokinetics、PK）及びトキシコキネティクス（toxicokinetics、TK）を評価した。分析法には、生体マトリックス中の測定対象物質である抗体の免疫測定法及び MMAE 用の液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（liquid chromatography tandem mass spectrometry、LC-MS/MS）法を用いた。カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを反復投与したときの免疫原性を明らかにするため、抗薬物抗体（anti-drug antibody、ADA）も分析した。
- チソツマブ　ベドチンの細胞毒性低分子部分である MMAE の分布、代謝及び排泄を評価した。ラットでのトリチウム標識 MMAE（tritium labeled MMAE、^{3}H-MMAE）のマスバランス試験により分布を評価した。肝ミクロソーム、肝細胞又はヒトシトクロム P450（cytochrome P450、CYP）酵素発現系を代謝プロファイリング、代謝物同定、並びに CYP 阻害及び誘導試験に用いた。また、排出及び取り込みトランスポーター試験を実施し、in vitro で MMAE が基質又は阻害薬であるか否かを検討した。
- マウス及びカニクイザルでの ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布を評価した。
- チソツマブ　ベドチン、チソツマブ、標的非結合性対照 ADC 及び MMAE の毒性を、カニクイザル及びラット（MMAE のみ）を用いた GLP 適用の反復投与毒性試験で評価した。チソツマブのカニクイザル及びヒトの TF に対する結合性を免疫組織化学検査及びフローサイトメトリーを用いて評価した。チソツマブ　ベドチンの胚・胎児発生に関する試験は実施しなかったが、MMAE の胚・胎児発生に関する試験を、ラットを用いて実施した。
- MMAE の遺伝毒性を、標準的組合せの遺伝毒性試験で検討した（細菌及び哺乳類細胞を用いる in vitro 試験並びにげっ歯類を用いる in vivo 小核試験）。

チソツマブ　ベドチンは進行がん患者の治療を目的としているため、がん原性試験、受胎能試験、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、幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかった（ICH S9）。MMAE 及びバリン－シトルリンモノメチルアウリスタチン E（valine-citrulline monomethyl auristatin E、vcMMAE）は波長 290～700 nm の範囲の光を吸収しないことから、光毒性試験は実施しなかった。

非臨床薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の詳細な一覧を[2.6.3-1 項]、[2.6.5-1 項]、[2.6.7-1 項]に示す。

この包括的な非臨床プログラムは、がん化学療法後に増悪した進行又は再発の子宮頸癌患者の治療を目的としたチソツマブ　ベドチンの申請を支持するものであった。

1.2　被験物質の名称

チソツマブ　ベドチンの開発過程では、異なる名称及び化合物コードが使用されている（Table 1）。

Table 1　非臨床試験で使用した被験物質の化合物コード

被験物質	化合物コード
チソツマブ（Tisotumab）	HuMax-TF IgG1-1015-011
チソツマブ　ベドチン （Tisotumab vedotin）	HuMax-TF-ADC IgG1-1015-011-vcMMAE
アイソタイプ対照抗体 （Isotype control antibody）	IgG1-b12[a]
アイソタイプ対照 ADC （Isotype control ADC）	IgG1-b12-vcMMAE
チソツマブ-FITC（Tisotumab-FITC）	IgG1-1015-011-FITC
チソツマブ　ベドチン-FITC （Tisotumab vedotin-FITC）	IgG1-1015-011-vcMMAE-FITC
MMAE, vcMMAE, NAC-vcMMAE	SGD-1010, SGD-1006, SGD-1427
放射能標識した MMAE（Radiolabeled MMAE）	^{3}H-MMAE
ブレンツキシマブ　ベドチン （Brentuximab vedotin）	SGN-35
その他の抗ヒト TF ADC	IgG1-1015-098-vcMMAE IgG1-1015-098-1006 IgG1-1015-098-1269 IgG1-1015-111-1006 IgG1-1015-111-1269
標的非結合性対照 ADC （Non-binding control ADC）	h00-1006(4)

ADC：抗体薬物複合体；FITC：フルオレセインイソチオシアネート；MMAE：モノメチルアウリスタチン E；vcMMAE：バリンーシトルリンモノメチルアウリスタチン E；NAC：N-アセチル-L-システイン；TF：組織因子

a　抗 HIV 抗体 IgG1-b12 をベースに作製（Barbas et al, 1993）

2.　薬理試験

TF は血管周囲の内皮細胞で広範に発現する膜貫通型糖タンパク質である。正常な生理的条件下での TF の主な役割は、血管損傷後の凝固開始並びに細胞シグナル伝達及びインテグリン結合への関与であるが、腫瘍組織に対しては増殖促進作用を持つ。チソツマブ　ベドチンは TF を標的とする ADC であり、腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を有し、主作用である抗腫瘍効果をもたらす。一方、チソツマブ　ベドチンは、内因性 TF 活性の阻害や TF を発現している非腫瘍細胞への局所的な MMAE の送達により、副作用を生じる可能性がある。

2.1　効力を裏付ける試験

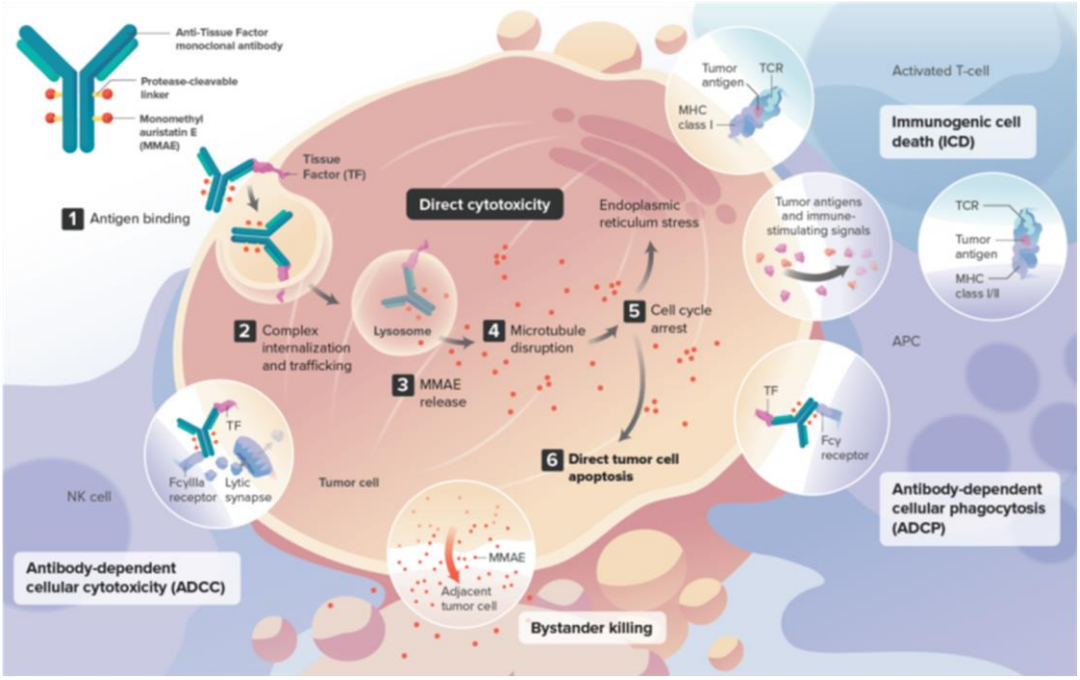
薬効薬理の包括的な評価は、in vitro 及び in vivo 試験並びに文献調査により実施した。実施した薬効を裏付ける試験の一覧を[2.6.3 項]：薬理試験の概要表に示す。

2.1.1　TF を標的とした ADC を用いたがん治療

TF は腫瘍増殖、血管新生、転移及び疾患の進行と関連している（Mueller et al., 1992; Kakkar et al., 1995; Rickles et al., 1995; Seto et al., 2000; Chanakira et al., 2017）。様々な腫瘍で、正常組織よりも腫瘍細胞で TF タンパク質の発現が高く（Rondon et al., 2019）、TF 発現は予後不良因子となる（Mueller et al., 1992; Kakkar et al.,1995; Sawada et al., 1999; Seto et al., 2000）。12 種類の腫瘍組織での TF 発現を検討した結果、全ての腫瘍組織で TF が発現しており、TF 陽性（TF 陽性の腫瘍細胞が 10%を超える場合と定義）腫瘍のうち、特に子宮頸癌（77%）、非小細胞肺癌（non-small-cell lung cancer、NSCLC）（77%）、大腸癌（76%）、膵癌（86%）、膠芽腫（93%）で高発現していた（[2.6.2-1.1 項] Table 2）。TF の腫瘍での発現増加及びその効率的な細胞内取込み（Hansen et al., 2001; de Goeij et al., 2015）により、TF は ADC を用いたがん治療の標的として期待される。

チソツマブ　ベドチンは TF を標的とする ADC であり、TF に結合して細胞傷害活性を惹起し、抗腫瘍活性を示す（Figure 1）（2.1.2、2.1.3 及び 2.1.4 項）。チソツマブ　ベドチンは腫瘍細胞の TF 発現レベル増加を利用して、MMAE を局所的に送達し、腫瘍細胞に対する免疫介在性応答を誘導する。これは子宮頸癌に対するチソツマブ　ベドチンの使用を支持するものである。

Figure 1　腫瘍細胞に対するチソツマブ　ベドチンの多様なメカニズムを介した細胞傷害活性及び抗腫瘍活性



APC: antigen-presenting cell, Fcγ: fragment crystallizable gamma; MHC: major histocompatibility complex, NK: natural killer, TCR: T-cell receptor

2.1.2　チソツマブ　ベドチンの TF 結合活性及び細胞内取込み

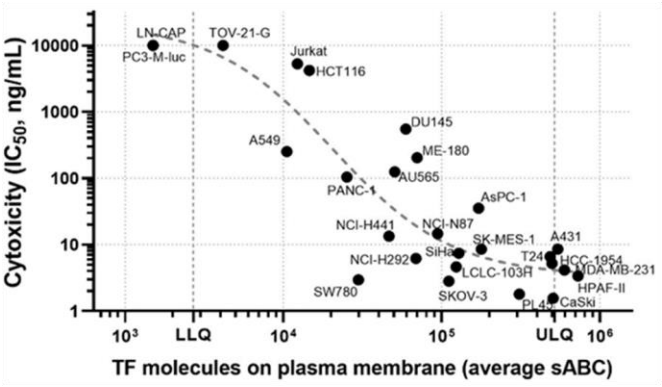
チソツマブ　ベドチンの抗体部分であるチソツマブは、HuMAb Mice®（再配列されていないヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖導入遺伝子をマウス染色体に導入したヒト抗体産生マウス）を用いて産生した。TF に対する結合特性解析で、チソツマブは TF に対して高い親和性を示し（3.2 nmol/L、BIAcore 分析）、腫瘍細胞表面に発現する TF に対して効率的に結合することが示された（[2.6.2-2.2 項]）。酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA）及びフローサイトメトリーによる解析で、チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンは同程度の結合特性を示した。チソツマブは TF 発現細胞に結合すると、速やかに TF と複合体を形成して細胞内に取り込まれ（de Goeij et al., 2015）、リソソームに輸送されることが antigen-binding fragment（Fab）-カルボキシテトラメチルローダミン（carboxytetramethylrhodamine、TAMRA）アッセイ及び共焦点顕微鏡法で確認された（[2.6.2-2.4 項]）。リソソームは MMAE を放出させるのに必要な細胞内小器官であるため、チソツマブ　ベドチンのリソソームへの輸送は重要なプロセスである。

2.1.3　チソツマブ　ベドチンの MMAE を介した細胞傷害活性

TF とチソツマブ　ベドチンの複合体が細胞内に取り込まれると、タンパク質分解によりリンカーが切断され細胞内に MMAE が放出される（Breij et al., 2014）。放出された MMAE が微小管に結合することにより、細胞内の微小管ネットワーク形成が阻害され、活発に分裂している細胞

の細胞周期停止及びアポトーシスが誘導される（Francisco et al., 2003）。様々な TF 発現レベルの 26 種類の腫瘍細胞株に対して、チソツマブ　ベドチンによる直接的な細胞傷害活性が認められた（[2.6.2-2.5]項）。このうち 13 種の細胞株で、50%阻害濃度（50% inhibitory concentration、IC_{50}）は 10 ng/mL 未満を示した（Figure 2）。顕著なばらつきで TF 発現以外の因子がチソツマブ　ベドチンの細胞傷害活性に影響している可能性が示唆されたが、腫瘍細胞膜の TF 発現レベルとチソツマブ　ベドチンによる細胞傷害活性との間に正の相関が認められた。

Figure 2　腫瘍細胞の TF 発現レベル及びチソツマブ　ベドチンによる細胞傷害活性の相関



IC_{50}: 50% inhibitory concentration; LLQ: lower limit of quantification; sABC: specific antibody binding capacity; TF: tissue factor

TF expression (sABC per cell) on the indicated cell lines were determined by quantitative flow cytometry. When average TF expression was below the LLQ (2700 sABC) of the assay, it was arbitrarily set at 1500 for this graph. The cytotoxic activity of tisotumab vedotin in human tumor cell lines was assessed by quantifying viable tumor cells in cultures that had been exposed to tisotumab vedotin for 3-5 days. IC_{50} values for tisotumab vedotin mediated tumor cell kill in relation to TF expression levels. For experiments where the IC_{50} could not be calculated due to lack of response to treatment, the IC_{50} value was arbitrarily set at 10000 ng/mL. The dotted line represents the dose-response relationship as estimated by non-linear regression analysis.

Source: Study GMB1015-087

TF 発現腫瘍細胞に対する直接的な細胞傷害活性に加えて、チソツマブ　ベドチンはバイスタンダー効果により近傍腫瘍細胞に対する殺細胞作用を示す。チソツマブ　ベドチンは TF 発現腫瘍細胞に選択的に結合し、TF と複合体を形成してリソソームに輸送され、MMAE が放出される。放出された MMAE は細胞から腫瘍微小環境に拡散し、受動拡散によって近傍の細胞内に取り込まれる（Okeley et al., 2010）。近傍細胞が活発に分裂している場合、近傍細胞の TF 発現レベルに関係なく、MMAE は細胞周期停止及びアポトーシスによる細胞死を誘導することができる。このプロセスはバイスタンダー効果（[2.6.2-2.5.3 項]）と呼ばれる。さらに、MMAE 含有 ADC の Fc 領域が腫瘍随伴マクロファージ上の Fcγ 受容体（Fc gamma receptor、FcγR）と結合して取り込まれた後、腫瘍随伴マクロファージからの MMAE 放出により、腫瘍微小環境でバイスタンダー効果が促進されることが示されている（Li et al., 2017）。

以上より、チソツマブ　ベドチンは腫瘍細胞に対して MMAE を介した直接的な細胞傷害活性及びバイスタンダー効果により殺細胞作用を示すことが示唆された。

2.1.4　チソツマブ　ベドチンによる免疫応答を介した細胞傷害活性

チソツマブ　ベドチンは、MMAE を介した細胞傷害活性に加えて、Fc を介した ADCC 及び ADCP 並びに MMAE を介した ICD の誘導など、腫瘍細胞に対する殺細胞作用や抗腫瘍免疫応答を増強する多様な免疫介在性作用を示している。

FcγR 結合能を有する抗体療法では、ADCC 及び ADCP による殺細胞作用を誘導することができる（de Taeye et al., 2019）。チソツマブは 3 種類の腫瘍細胞株に対して、ADCC によるナチュラルキラー（natural killer、NK）細胞介在性の細胞傷害活性を示し、MMAE を介した直接的な細胞傷害活性を評価した細胞株のうち、約半数での IC_{50} 値と同程度であった。また、マクロファージではチソツマブ　ベドチンによる用量依存的な ADCP 活性も認められ、染色により総マクロファージの最大 45%で腫瘍細胞の取り込みが確認された（[2.6.2-2.7.1 項]及び[2.6.2-2.7.2 項]）。チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンはいずれも ADCC 及び ADCP 活性を示したことから、これらの Fc を介したエフェクター機能は MMAE の結合後も消失しないことが示された。In vivo 試験で、ADCC 及び ADCP がチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性に寄与している可能性が示されたが、これはチソツマブの予防的投与により CDX モデルの腫瘍増殖が抑制されたことからも明らかである（[2.6.2-2.8.1 項]）。

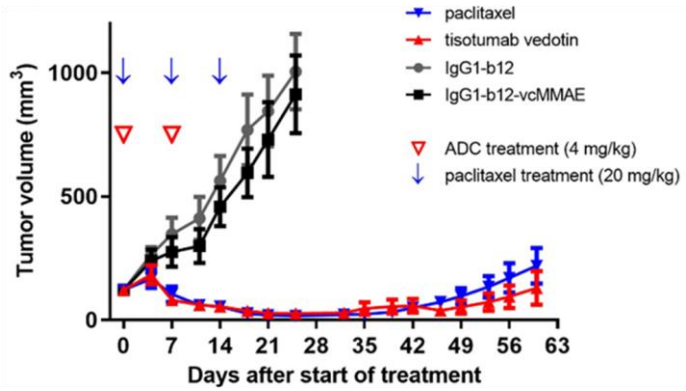
ICD は細胞死の一形態であり、細胞死の近いがん細胞が細胞損傷シグナルを放出することで、腫瘍細胞に対する自然免疫応答及び獲得免疫応答を活性化することができる（Kroemer et al., 2013; Galluzzi et al., 2017）。MMAE を含む ADC は ICD を誘導することが示されている（Muller et al., 2014; Gerber et al., 2016）。In vitro 試験で、チソツマブ　ベドチンは、その ICD 誘導作用と一致して、腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を示し、自然免疫細胞を活性化し、それに続いて T 細胞応答を誘導することが示された。チソツマブ　ベドチンと抗プログラム細胞死タンパク質 1（programmed cell death 1、PD-1）抗体との併用投与により、in vitro での T 細胞応答が増強したことから、チソツマブ　ベドチンと免疫チェックポイント阻害剤の併用による相乗効果の可能性が示された（[2.6.2-2.6 項]）。In vitro 試験結果と一致して、チソツマブ　ベドチンは in vivo でも腫瘍細胞での免疫関連遺伝子［ケモカイン、I 型インターフェロン（interferon、IFN）応答及び主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex、MHC）クラス I 遺伝子］の発現増加及び異種移植腫瘍へのマウス自然免疫細胞（F4/80 陽性マクロファージ及び CD11c 陽性樹状細胞）の動員による免疫調節活性を誘導した。以上の in vitro 及び in vivo 試験結果から、チソツマブ　ベドチンはその ICD 誘導作用と一致して腫瘍細胞を死滅させ、これが抗腫瘍活性に寄与していると考えられる。

2.1.5　チソツマブ　ベドチンの単剤又は他剤との併用投与による in vivo 抗腫瘍活性

7 種の固形腫瘍［膀胱癌（1 種）、子宮頸癌（6 種）、食道癌（1 種）、肺癌（7 種）、卵巣癌（3 種）、膵癌（2 種）及び前立腺癌（1 種）］由来の 21 種類の PDX モデルを用いてチソツマブ　ベドチンの in vivo 抗腫瘍活性を検討した。腫瘍の生着を確認後、チソツマブ　ベドチンを様々な用量（0.5～4 mg/kg）で主に Day 0 及び Day 7 に静脈内投与した。チソツマブ　ベドチンは、21 種中 16 種の PDX モデル（7 種の腫瘍全て）に対して抗腫瘍活性を示し、最高用量（4 mg/kg）

で最も強い活性が認められた（[2.6.2-2.8.2 項]）。子宮頸癌 PDX モデルに対するチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性を Figure 3 に示す。

Figure 3　子宮頸癌 PDX マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性



ADC: antibody-drug conjugate; IgG1-b12: isotype control antibody; IgG1-b12-vcMMAE: isotype control ADC; PDX: patient-derived xenograft; s.c.: subcutaneous
A cervical cancer PDX model (CEXF 773) was established by s.c. implantation of tumor fragments. After tumors had reached a size of ~110 mm3, mice were randomized, and treatment was initiated. Mice received either two doses of tisotumab vedotin, IgG1-b12-vcMMAE or IgG1-b12, or three doses of paclitaxel, as indicated.
Source: Study GMB1015-149

さらに、7 種の腫瘍［乳癌（2 種）、結腸直腸癌（1 種）、胃癌（1 種）、肺癌（1 種）、卵巣癌（1 種）、膵癌（3 種）及び皮膚癌（1 種）］由来の CDX モデル 10 種を用いてチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性を評価した。腫瘍の生着を確認後、チソツマブ　ベドチンを各用量（0.3～4.5 mg/kg）で腹腔内投与（MDA-MB-231 モデルでは静脈内投与）した。チソツマブ　ベドチンは 10 種中 6 種の CDX モデル（5 種の腫瘍全て）に対して抗腫瘍活性を示し、最高用量（4～4.5 mg/kg）で最も強い活性が認められた。腫瘍の種類によっては、中用量（0.3～3 mg/kg）でも腫瘍の退縮や増殖抑制が認められた。

PDX 及び CDX モデルでは、腫瘍細胞の TF 発現レベルとチソツマブ　ベドチンに対する反応との間に正の相関が認められたが（[2.6.2-2.8.3 項]）、チソツマブ　ベドチンによる抗腫瘍活性は TF 低発現の異種移植モデルでも認められたため、TF 発現だけが抗腫瘍活性の唯一の因子ではないと考えられる。

チソツマブ　ベドチンと、異なる作用機序を有する他剤［ペムブロリズマブ（免疫チェックポイント阻害薬）、ベバシズマブ（血管新生阻害薬）及び化学療法］との併用効果を、マウス異種移植モデルを用いて評価した（[2.6.2-2.9 項]）。チソツマブ　ベドチンとペムブロリズマブとの併用投与による抗腫瘍活性は、チソツマブ　ベドチン単剤投与と同程度であった。しかし、ヒト化マウスモデルは正常な免疫系を完全に再現しているわけではない。チソツマブ　ベドチンとベバシズマブ又は化学療法との併用投与では、各単剤投与と比較してより強い抗腫瘍活性を示した。

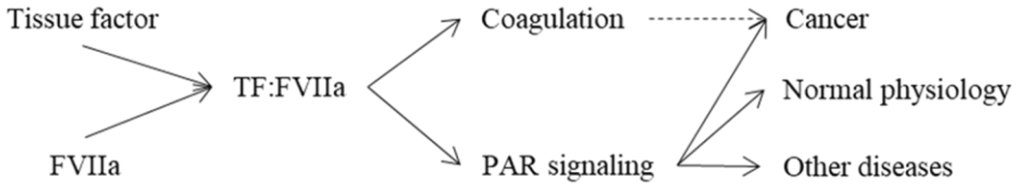
以上より、TF を標的とした ADC であるチソツマブ　ベドチンは、MMAE を介した細胞傷害活性（直接的及びバイスタンダー効果）及び免疫介在性応答（ADCC、ADCP 及び ICD）等、複

数の細胞傷害作用機序を有し、抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。また、チソツマブ　ベドチンは多様な腫瘍由来の異種移植モデルに対して in vivo 抗腫瘍活性を示し、チソツマブ　ベドチンに対する反応は広範な TF 発現レベルの異種移植モデルで認められた。

2.2　副次的薬理試験

TF は正常な生理機能及び疾患の複数のプロセスに関与している。概してこれらのプロセスのほとんどは、機能的に 1）凝固又は 2）プロテアーゼ活性化受容体（protease-activated receptor、PAR）を介したシグナル伝達経路のどちらかに分類できる（Figure 4）。チソツマブ　ベドチンが TF へ結合することによる副作用について、文献調査結果並びに非臨床試験及び臨床試験で得られた試験結果を参照し、以下に考察した。副次的薬理試験としては、チソツマブ　ベドチン及びチソツマブを用いた in vitro 凝固試験のみ実施した。

Figure 4　TF:FVIIa 複合体の血液凝固及び PAR シグナル伝達に対する関与

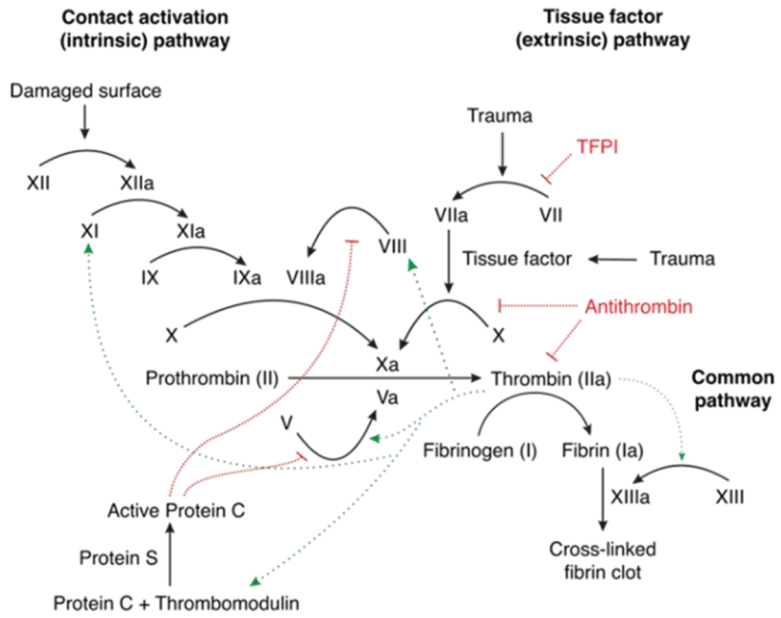


FVIIa: activated coagulation factor VII; PAR: protease-activated receptor; TF: tissue factor

2.2.1　血液凝固に対する TF の関与

TF は血管損傷後の血液凝固の主要な外因性開始因子である（Figure 5）。TF は血管周囲の内皮細胞（血管壁や血管周囲の周皮細胞、血管平滑筋細胞、外膜線維芽細胞）の膜上に構成的に発現している（Drake et al., 1989; Fleck et al., 1990）。血管損傷時に、膜に結合した TF は血流に曝露され、内因性の血中リガンドである血液凝固第 VII 因子（coagulation factor VII、FVII）に結合し、FVII は活性化されて FVIIa となる。TF:FVIIa 複合体は、血液凝固第 X 因子（coagulation factor X、FX）を活性化し、FXa はプロトロンビンをトロンビンに変換する。最初に生成されるトロンビン量は少ないが、これが増幅ループの原動力となり、トロンビン生成が約 1000 倍促進される（Monroe et al., 2007; Madhusudhan et al., 2016）。フィブリン生成及び血小板活性化はトロンビンによって触媒され、最終的に血栓形成に必要なフィブリンと血小板の複合体が形成される（Mackman, 2004）。重要な点は、TF:FVIIa 複合体依存的な凝固反応開始後は、凝固反応の拡大に TF が継続的に存在する必要はない可能性があり（Orfeo et al., 2005）、サイトカインで刺激していない健康被験者の血液では、活性型 TF 濃度が 20 fmol/L 程度の低値でも血液凝固が開始しうることである（Butenas et al., 2005）。

Figure 5　血管損傷後の TF による外因性血液凝固反応



TF: tissue factor; TFPI: tissue factor pathway inhibitor

TF は通常血液中の凝固成分から隔てられているため、TF により開始される凝固反応は外因系経路（又は TF 経路）と呼ばれる。その他の凝固経路である内因系経路は、TF に依存せず、血管系内損傷が開始因子となる。外因系及び内因系経路は共通の凝固経路に収束し、この経路にはフィブリン血栓形成に最終的に必要な分子及び細胞成分が含まれる（Figure 5）。

TF の一般的な生物学的特性に基づけば、理論上、チソツマブ　ベドチンは TF の FVIIa への結合を阻害し、凝固開始への副次的な影響をもたらし、出血性イベントを引き起こす可能性がある。この影響を検討するため、チソツマブ　ベドチン及びチソツマブを用いた in vitro 及び in vivo 試験を実施し、分子間相互作用の開始から下流の生理的プロセスまでの一連の止血機構の特性を明らかにした。

チソツマブ　ベドチンが凝固開始時の分子間相互作用に及ぼす影響を明らかにするため、in vitro 結合試験及び標的活性試験を実施した。チソツマブは TF に対して高い親和性［50%効果濃度（50% effective concentration、EC_{50}）= 3.2 nmol/L、BIAcore 分析］で強力に結合した。膜結合型 TF は FVIIa に対して同程度の親和性（2～25 nmol/L）を有することが報告されている（Sen et al., 2010）。チソツマブ　ベドチンを用いたフローサイトメトリー及びチソツマブを用いた ELISA により結合活性を検討した結果、いずれも TF の FVIIa への結合を競合的に阻害し、IC_{50} 値は 3.3 nmol/L（0.5 µg/mL）未満であった。チソツマブ（約 6.6 nmol/L、約 1 µg/mL）は、FXa 生成量を 19%減少させ、TF:FVIIa 複合体の in vitro 活性を変化させた。一方、低濃度の抗 TF 抗体 ALT-836（IC_{50} 値 = 0.02 nmol/L）は、FXa 生成量を約 95%減少させる（Jiao et al., 2010）。以上の in vitro 試験の結果、TF を介した凝固反応開始の初期の分子間相互作用はチソツマブ　ベドチン及びチソツマブによって影響され得ることが示された。

2.2.1.1　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの in vitro 凝固活性

凝固反応はカスケード増幅により進行し、血栓形成に至る（Orfeo et al., 2005）。血液凝固パラメーター及び血栓形成に対するチソツマブの影響を 5 つの in vitro 試験［FXa 生成試験、標準的な PT 測定、変法 PT 測定（非標準的な凝固試験）、TEG 及び TGA）］で検討した。チソツマブ　ベドチンは、標準 PT 測定のみ実施した。これらのアッセイでは、抗凝固処理した血漿又は全血を用いて、凝固促進剤（遺伝子組換え TF 及びリン脂質）及びカルシウムを添加して凝固反応を開始する。凝固時間は、時間依存的な血栓生成や代替シグナル（例えば、試料又は蛍光基質の蛍光強度）の測定によって示される。その結果、希釈した TF 試薬を使用した場合、チソツマブは血栓形成及び代替基質生成までの時間を延長したが、標準濃度の TF 試薬を用いた場合は影響しなかった（[2.6.2-3.1 項]）。各試験の概要を以下に示す。

- FXa 生成試験：最高濃度（900 ng/mL）でのチソツマブによる FXa 生成阻害率は約 19%であり、チソツマブは TF 誘導性 FXa 生成に大きく影響しないことが示唆された。
- 標準的な PT 測定：チソツマブ及びチソツマブ　ベドチン（20 µg/mL）は凝固時間に影響を及ぼさなかった。PT 測定は、臨床現場で一般的に使用されており、出血異常の診断及び抗凝固剤療法（例：ワルファリン）の治療モニタリングに役立つ。本測定は、（過剰な TF 濃度による）強力な凝固開始及び（内因性抗凝固物質を中和するリン脂質を介した）非特異的な阻害シグナルの抑制を同時に促進することにより、凝固因子の欠乏や血栓形成に対して高い感度が得られるように設計されている。チソツマブ　ベドチン及びチソツマブが PT に影響しなかったのは、TF 濃度が過剰であったためである可能性がある。
- 変法 PT 測定（非標準的な凝固試験）：標準的な PT 測定条件を変更し、TF 試薬を 1:1000 で希釈して使用したとき、チソツマブはクエン酸加ヒト血漿中で濃度依存的に凝固時間を延長させた。凝固時間は最高濃度（10 µg/mL）のチソツマブで 2.3 倍延長した（チソツマブ　ベドチンは評価しなかった）。通常、市販の PT 測定法では TF 及びリン脂質濃度が表記されていないため、この変更 PT 測定法での実際の TF 濃度は不明であった。変更 PT 測定法を用いた結果の生理的妥当性をどのように示すかは不明であるが、TF 試薬を希釈した場合、チソツマブは in vitro 血栓形成の評価に影響する可能性があることを示している。
- TEG：ヒト全血を用いた TEG で、チソツマブは凝固時間を延長させた（チソツマブ　ベドチンは評価しなかった）。TEG では、血中で振動するピンの回転変化により凝固時間及び血餅強度を測定する。比較的簡便で定量的な TEG は、凝固・線溶能の全体的な欠如を機能的に評価できる（Wikkelsoe et al., 2011）。凝固反応を開始するため、異なる 2 つの凝固促進因子：TF 発現単核球を誘導するリポ多糖（lipopolysaccharide、LPS）刺激全血（van der Logt et al., 1994）又は遺伝子組換え TF を使用した。LPS 刺激全血では、チソツマブ（20 µg/mL）により凝固時間が 1.4～2.6 倍（n=3）に延長した。遺伝子組換え TF（1:17000 倍希釈）では、チソツマブ（20 µg/mL）により全血の凝固時間が 2.0 倍に延長した。チソツマブは凝固時間を延長させたが、血栓強度には影響しなかった。PT 測定と同様に、市販の TEG は TF の供給源及び濃度が異なる。さらに、ばらつきが非常に大きく、アッセイの標準化は進んでいない（Wikkelsoe et al., 2011）。

- TGA：チソツマブはトロンビン生成開始時間を延長させた（チソツマブ　ベドチンは評価しなかった）。TGA は、血漿の凝固能の亢進又は低下を測定するように設計されているが、臨床での応用はまだ広く確立されておらず、検証されていない。TF の下流の重要な凝固因子であるトロンビンにより、蛍光発色基質が変換される。外因性 TF 添加後の蛍光強度増加をトロンビン生成の指標とした。TGA の試験法は標準化されていない（Tripodi, 2016）。遺伝子組換え TF（1:6000、1 pmol/L）を用いてトロンビン生成を開始した結果、チソツマブ（20 µg/mL）によりトロンビン生成開始時間が 15 倍延長した。LPS 刺激全血から得たヒト血漿でトロンビン生成を開始した結果、チソツマブ（20 µg/mL）によりトロンビン生成開始時間が 1.7～2.5 倍に延長した（n=3）。In vitro 試験の結果から、血栓形成での上流での重要な分子イベント（すなわち、トロンビン生成）がチソツマブによって影響を受ける可能性が示された。

上述のように、in vitro 凝固試験でのチソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの影響を解釈する上で、考慮すべき重要な項目がある。これらの試験法（PT 測定、TEG 及び TGA）は、in vitro での凝固開始時間及び凝固時間に対する TF の機能阻害の影響を検討するために設計されたものではなく、検証もされていない。臨床的に妥当な TF 阻害作用を有することが知られている in vitro 凝固試験の陽性対照は存在しない。外因性 TF の供給源及び濃度は、凝固時間やトロンビン生成の程度に影響する可能性があり、これらを理解することは試験結果の解釈に重要である。さらに、TF 濃度は必ずしも凝固促進能を示しているわけではない。In vitro 試験でのチソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの最高濃度は臨床推奨用量の C_{max} の 50%未満であったが、チソツマブ　ベドチンは、in vitro で凝固を開始させるのに必要な微量（約 20 fmol/L）の活性型 TF を完全には抑制せず、凝固反応の増幅も減弱しなかった。

以上の in vitro 試験結果全体から、チソツマブ　ベドチンが凝固開始を妨げる可能性があるとの結論が得られた。

2.2.1.2　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの in vivo 凝固活性

チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの TF を介した凝固カスケードに対する副作用を評価するため、in vitro 試験に追加して in vivo 試験を実施した。カニクイザルを用いた非臨床安全性試験の一部として、凝固パラメーター及び潜在的出血性イベントを観察した。カニクイザルを用いた GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験で、薬理作用を上回る用量のチソツマブ（25 mg/kg、3 週間に 1 回計 5 回）を投与したとき、投与期間及び回復期間を通じて PT は延長し（20%未満）、時に統計学的有意差が認められた。この PT 測定で外因性 TF 供給源として用いたウサギ TF にチソツマブ　ベドチンはほとんど結合しないため、この PT 測定結果の妥当性は不明である。わずかに PT が延長した原因は不明であるが、この変化がカニクイザルでの高用量のチソツマブ曝露に起因する可能性は否定できない。チソツマブ　ベドチンのカニクイザルでの曝露量比は、臨床推奨用量を投与したときの曝露量と比較して、C_{max} で 18 倍、AUC で 36 倍であった。全体として、チソツマブの忍容性は良好であり、PT の変化は、出血性イベントや凝固又は止血の変化を示唆する病理所見を含め、毒性の徴候とは関連していなかった。

さらに、カニクイザルを用いた GLP 非適用の反復投与用量漸増試験を実施し、チソツマブを 0［リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline、PBS）］、1、10 及び 100 mg/kg の用量でそれぞれ 1、8、15 及び 22 日目に週 1 回投与したときの凝固及び出血に対する潜在的な影響を検討した。Surgicutt®を用いた皮膚切開試験で、最高用量であるチソツマブ 100 mg/kg 群では、投与 1 時間後に溶媒対照群と比較して出血時間の延長が認められた。この結果は、投与 1 日目の溶媒対照群の投与 1 時間後と比較して統計学的に有意であったが、その出血時間は投与前値の範囲内であり、本試験の全体的なばらつきの範囲内であると考えられた。さらに、投与量（1～100 mg/kg）と出血時間に関連性は認められなかった。チソツマブによる凝固系パラメーターへの影響は認められず、薬理作用を上回る曝露量では毒性学的に意味のある影響は認められなかった。

概して、カニクイザルを用いたチソツマブの反復投与毒性試験結果から、チソツマブによる凝固開始の上流の分子レベル又は細胞レベルのイベントの変化を in vivo で確認することはできないが、薬理作用を示す高用量のチソツマブ（臨床推奨用量での曝露量と比較して 18 倍超の曝露量）で毒性学的に意味のある影響が認められなかったことから、凝固及び止血に関連する下流の生理学的過程は影響を受けないことが示唆される。

カニクイザルを用いた GLP 適応反復投与毒性試験で、チソツマブ　ベドチン（1、3 及び 5 mg/kg、3 週間に 1 回計 5 回投与）による凝固及び出血に対する毒性学的に意義のある影響は認められなかった。PT 値は影響を受けなかったが、本測定法では、チソツマブ　ベドチンとほとんど結合しないウサギ TF を使用した。チソツマブの GLP 非適用用量漸増試験で使用した Surgicutt®を用いた皮膚切開試験など、出血に関する特別な試験は実施しなかった。しかし、明らかな出血の徴候は認められず、臓器出血を示唆する臨床病理学的又は病理組織学的異常も認められなかった。これに対して、TF レベルの持続的な低下は、止血に悪影響を及ぼす可能性がある。TF の発現が非常に低くなるように（野生型の約 1%）操作した遺伝子改変マウスでは、致死的な分娩後出血、胎盤うっ血、心出血と線維化及び急性肺出血が認められた（Erlich et al., 1999; Pawlinski et al., 2002; Pedersen et al., 2005）。このような心臓及び肺の出血は、チソツマブ　ベドチン（5 mg/kg まで）及びチソツマブ（25 mg/kg）を投与したカニクイザルでは認められなかったことから、TF 活性が変化しても、遺伝子改変マウスで認められた程度には達しないことが示された。

以上のカニクイザルの反復毒性試験結果から、臨床用量のチソツマブ　ベドチンを投与したカニクイザルでは、毒性学的に意義のある出血の問題は認められないとの結論が得られた。この in vivo 試験結果からは、チソツマブ　ベドチンが分子レベルで初期の凝固イベントに影響を及ぼすという生物学的妥当性を否定することはできないが、チソツマブ　ベドチン（5 mg/kg）及びチソツマブ（25 mg/kg）を投与したカニクイザルでは、生理的プロセスで出血に関する問題が認められなかったことから、臨床推奨用量でチソツマブ　ベドチンの血液凝固開始に及ぼす影響は軽微である可能性が示唆される。

2.2.1.3　非臨床試験結果から推察される臨床での潜在的出血リスク

臨床的に、出血（特に鼻出血）はチソツマブ　ベドチンの潜在的リスクである（2.7.4　臨床的安全性）。出血リスクの潜在的機序の 1 つとして考えられるのは、チソツマブ　ベドチンの局所的な殺細胞作用による局所組織損傷である。チソツマブ　ベドチンが TF と複合体を形成して TF 発現細胞に取り込まれた後、MMAE が細胞内へ放出されて活発に分裂している細胞に細胞死をもたらす。また、細胞膜上のチソツマブ　ベドチンと TF の複合体は、TF 発現細胞に対して ADCC 及び ADCP を誘導する。局所組織損傷により内皮細胞の TF への血液曝露が増加し、チソツマブ　ベドチンによる局所組織損傷をさらに進行させる可能性がある。また、MMAE は細胞の修復及び増殖を阻害し、局所組織損傷を長引かせる可能性がある。そのため、循環血中の遊離型 MMAE は、理論的には出血性イベントの要因となる組織損傷を引き起こす可能性がある。

出血性イベント発症の可能性を説明するもう 1 つの機序は、血管損傷後の TF 依存性凝固開始をチソツマブ　ベドチンが妨げることである。In vitro 試験結果から、チソツマブ　ベドチンが凝固時間に影響することは生物学的に妥当であるが、これが患者の出血リスクにどのように反映されるかは不明である。毒性学的に意味のある出血に関連した所見はカニクイザルで認められなかったことから、チソツマブ　ベドチンが TF 活性を阻害する生物学的妥当性は、in vivo では認められないことが示唆される。出血の問題は、先天的な血液凝固異常を有する患者など、凝固阻害が有害である場合にのみ顕在化する可能性がある。これらの患者では、多発性の出血が一般的であり、より重度である（Acharya et al., 2004; Peyvandi et al., 2012; Broze et al., 2013）。

鼻出血はチソツマブ　ベドチンの臨床試験で最も高頻度に認められた出血性イベントであり、リスクとして認識されている（2.7.4　臨床的安全性）。鼻腔には、チソツマブ　ベドチンによる出血に対する感受性を悪化させる素因がある。TF はその広範な血管新生のため鼻腔で発現している可能性が高く、これは罹患状態での mRNA 及びタンパク質の検出によって裏付けられている（Ando et al., 2011; Shimizu et al., 2015; Wang et al., 2015）。鼻粘膜では機械的変動に対して物理的に敏感であるため血管損傷の可能性が高く、その結果チソツマブ　ベドチンが TF に結合する可能性がさらに高くなると考えられる。上述した 2 つの潜在的な機序（局所組織損傷及び TF 阻害）は、チソツマブ　ベドチンによる鼻出血の機序として妥当であり、発症までの時間は、これらが相対的に寄与している可能性を示す 1 つの所見である。急性の鼻出血（例：投与後 1～2 日以内）は、チソツマブ　ベドチンの速やかな効果を示唆している可能性があり、投与後のチソツマブ　ベドチン濃度が高く、凝固開始を阻害する可能性が高い。遅発性の鼻出血（例：投与後 2 日以降）は、チソツマブ　ベドチンの遅発性効果を示唆している可能性があり、これはチソツマブ　ベドチンによって MMAE が局所的に送達され、局所組織損傷の累積に起因する可能性が高い。

一連の非臨床試験結果及び文献調査から、チソツマブ　ベドチン投与による出血リスクの潜在的機序として、局所組織損傷及び血液凝固阻害の両方が生物学的に妥当であることが支持される。カニクイザル又はヒトいずれの場合でも、出血リスクとして想定される機序について、それぞれの寄与の割合を決定することは困難である。しかし、1 つの推論として、出血発症までの時間とチソツマブ　ベドチンの PK 特性との関連が考えられる。チソツマブ　ベドチンは凝固開始

を変化させる生物学的な妥当性があるものの、カニクイザルでは毒性学的に意義のある出血に関連した所見は認められなかった。

2.2.2　正常な生理機能に対する TF 依存性 PAR シグナル伝達の関与

凝固開始に加えて、TF への FVIIa の結合は G タンパク質共役受容体である PAR を介して細胞シグナル伝達を増強する（Ossovskaya et al., 2004; Coughlin, 2005）。正常な生理状態では、TF 依存性 PAR シグナル伝達は、炎症性メディエーター（Disse et al., 2011; Liang et al., 2015）、細胞生存／増殖、血管新生及び自然免疫と関係している。

PAR は IL−1、IL−6（McLean et al., 2001）及び腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor、TNF）α（Naldini et al., 1998）等の炎症性サイトカインの生成に影響を及ぼし、TF:FVIIa 複合体は炎症反応での PAR2 シグナル伝達を誘導する可能性がある。マウスで TF の発現レベルが低いことは、炎症性サイトカイン（Parry et al., 1998; Pawlinski et al., 2002）のレベル低下と相関がある。チソツマブ　ベドチンは TF:FVIIa 複合体依存性の細胞内シグナル伝達を阻害し、in vitro で下流の IL−8 産生を減少させる（2.6.2　薬理試験の概要文）。

ERK1/2 は細胞の生存と増殖に重要なシグナル伝達物質であり、細胞の恒常性維持に関与している（Roskoski, 2012）。PAR1/2 シグナル伝達は ERK1/2 のリン酸化に影響を及ぼすため、理論的には、チソツマブ　ベドチンによる TF:FVIIa 複合体依存性 PAR2 シグナル伝達の阻害は ERK1/2 リン酸化に影響する可能性がある。実際に、TF は PAR シグナル伝達を介して、ERK1/2 リン酸化を誘導すると考えられ（Bluff et al., 2008）、非癌性平滑筋細胞の増殖促進と関連している（Cirillo et al., 2004）。さらに、生存経路又はアポトーシス経路のいずれかへの誘導は、TF:FVIIa 複合体の比により影響される可能性がある（Madkhali et al., 2019）。チソツマブ（非結合抗体）は in vitro で TF:FVIIa 複合体依存性 ERK1/2 リン酸化を阻害したことから（[2.6.2-2.3 項]）、チソツマブ　ベドチンが TF:FVIIa 複合体依存性 PAR2 シグナル伝達を介して ERK1/2 リン酸化の正常な生理状態を変化させる可能性が示唆される。

発育中のマウス胚で TF を不活性化すると血管新生が阻害されることから、TF は正常な生理条件下でも血管新生に関与している可能性が示唆される（Carmeliet et al., 1996; Griffin et al., 2001）。PAR2 は上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor、EGFR）のリン酸化に関与しており、TF は EGFR 依存的に血管新生に関与するシグナル伝達分子［プロリンリッチチロシンキナーゼ 2（proline-rich tyrosine kinase 2、PYK2）、Src 相同領域 2 ドメイン含有ホスファターゼ 2（Src homology region 2 domain containing phosphatase 2、SHP-2）、マトリプターゼ、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（mitogen activated protein kinase、MAPK）及びホスホイノシチド 3 キナーゼ（phosphoinositide 3 kinase、PI3K）］のリン酸化を促進することが示された。このような下流分子への影響には TF 依存性 PAR シグナル伝達が関与していると推定され、理論的には、チソツマブ　ベドチンが上流の血管新生を阻害する可能性がある。

TF 及び TF:FVIIa 複合体がウイルス及び細菌の感染に関与している可能性が in vivo で報告されている。例えば、LPS を投与したマウスでは、感染に関与するタンパク質［Toll 様受容体（toll-like receptor、TLR）3/4 シグナル伝達のアダプタータンパク質であるペリノ 1 及び転写因子 IFN 制御因子 8］が PAR 依存的及び内皮細胞プロテイン C 受容体（endothelial protein C

receptor、EPCR）依存的に発現する（Li et al., 2005; Rallabhandi et al., 2008; Antoniak et al., 2014; Liang et al., 2015）。しかし、TF 及び TF:FVIIa 複合体が感染にどのように関与しているのか、またそれが防御的又は有害的に作用するのかについて、明確なコンセンサスを得るためにはさらなる検討が必要である（Antoniak et al., 2014）。興味深いことに、COVID−19 は臨床での血液凝固障害と関連しており、血液凝固経路の調節異常や過剰亢進が関与しているという新たな仮説が提唱されている（Iba et al., 2020; Levi et al., 2020; Thachil et al., 2020）。しかし、これが PAR を介した TF シグナル伝達の変化や TF 依存性血液凝固開始に関連しているかは不明である。

2.2.3　癌に対する TF の関与

癌に対する TF の関連と役割について、多くの研究が実施されてきた。様々な in vitro 及び in vivo 試験で、PAR 活性化（シグナル伝達の変化）又は凝固反応のいずれかを介した、腫瘍増殖、血管新生及び腫瘍転移での TF の役割を検討した。この研究概要を以下に示す。

複数の腫瘍型で、腫瘍増殖は PAR2 の TF:FVIIa 複合体活性化による影響を受ける可能性があり（Hjortoe et al., 2004; Versteeg et al., 2008a; Leppert et al., 2015）、そのエビデンスの多くは細胞ベースの研究に基づいている（Hjortoe et al., 2004; Liu et al., 2006; Albrektsen et al., 2007; Hu et al., 2013; Wu et al, 2013）。TF は、プロテインキナーゼ B（protein kinase B、AKT）、ヤヌスキナーゼ／シグナル伝達兼転写活性化因子 5（janus kinase/signal transducer and activator of transcription 5、JAK/STAT5）及び PI3K などの腫瘍細胞での様々な抗アポトーシス経路のシグナル伝達を変更させることにより腫瘍増殖に影響すると考えられる（Sorensen et al., 2003; Versteeg et al., 2004b; Versteeg et al., 2004a）。PDX マウスモデルを用いた in vivo 試験で、TF:FVIIa 複合体を介した PAR2 活性化が原発性腫瘍の増殖に寄与する重要な因子であることが示された（Versteeg et al., 2008a）。

TF:FVIIa 複合体を介した PAR2 活性化は、血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor、VEGF）、ケモカインリガンド 1（chemokine ligand 1、CXCL1）、IL−8 及び線維芽細胞増殖因子 2（fibroblast growth factor 2、FGF2）などの血管新生の重要なメディエーターの転写を誘導する（Hjortoe et al., 2004; Liu et al., 2006; Schaffner et al., 2010; Song et al., 2012）。PAR2 欠損マウスを用いた異種移植試験では、PAR2 を介したシグナル伝達自体が血管新生を誘導することが示されている（Versteeg et al., 2008b）。さらに、凝固機構は、細胞外マトリックスの増強を介して血管新生に補助的な役割を果たしている可能性がある（Belting et al., 2004; Hjortoe et al., 2004; Bluff et al., 2008; Gessler et al., 2010）。

腫瘍での TF 発現は、患者の転移能と正の相関を示す（Kakkar et al., 1995; Vrana et al., 1996; Poon et al., 2003）。転移性黒色腫細胞は TF を高発現し、TF を阻害すると転移数が著しく減少する（Mueller et al., 1992）。興味深いことに、TF は細胞接着及び遊走を制御するインテグリンと相互作用していることから（Dorfleutner et al., 2004; Kocaturk et al., 2013）、TF が腫瘍転移の機序に関与している可能性が示唆される。In vivo 試験で、PAR シグナル伝達及び凝固に関与する TF:FVIIa:FXa 複合体を抗体で阻害すると、腫瘍転移が抑制された（Versteeg et al., 2008a）。また、TF の血小板に対する作用によって NK 細胞の細胞傷害作用が血栓依存的に阻害され、NK

細胞の攻撃から免れた腫瘍細胞が TF 依存性転移に関与していることを示唆する報告もある（Palumbo et al., 2007）。

多数のエビデンスから、TF が腫瘍増殖、血管新生及び転移等の腫瘍促進機構に対して主要な又は補助的な役割を果たし、癌の病態生理に関与していることが示唆されている。In vitro 試験で、チソツマブは腫瘍細胞生存率に直接影響を及ぼさなかったが、本試験系は、TF:FVIIa 複合体を介したシグナル伝達阻害が腫瘍促進機構に及ぼす影響を検討するようには設計されていなかった。TF 特異的モノクローナル抗体により TF:FVIIa 複合体依存性シグナル伝達が阻害されることから、in vivo での腫瘍増殖抑制作用が示唆されていた（Versteeg et al., 2008a）。しかし、チソツマブは予防的投与で in vivo 腫瘍増殖抑制作用を示すだけであり、この作用には ADCC/ADCP が関与している可能性がある。それでもなお、仮説に基づくと、TF 発現腫瘍細胞に結合するチソツマブ　ベドチンは、TF を介した腫瘍促進機構を抑制することで、有益な二次的効果が得られる可能性がある。

2.2.4　他の疾患に対する TF の関与

新生血管を伴う加齢黄斑変性症（neovascular age-related macular degeneration、nAMD）は脈絡膜の活動性炎症部位での TF 発現の増加や誘導と関連する（Grossniklaus et al., 2002; Cho et al., 2011）。TF は nAMD の特徴である血管新生に寄与しているか、あるいは罹患時の凝固促進因子やシグナル伝達因子として利用されている可能性がある。TF 活性化／TF 発現増加は、関節リウマチ（Busso et al., 2003; Chen et al., 2013）など、単球が TF と関連した表現型の変化を示す慢性炎症性疾患に影響する可能性がある（Witkowski et al., 2016）。アテローム性動脈硬化症でも、凝固及び TF:FVIIa 依存性 PAR シグナル伝達を介した、TF の疾患への関与が示唆されている。他の疾患進行での TF の役割をよりよく理解するためには、さらに詳細な研究が必要であるが、最新のエビデンスから、TF が凝固促進作用又は PAR シグナル伝達のいずれかを介して関与していることが十分に示唆されている。チソツマブ　ベドチンがこれらのプロセスを阻害し、他の疾患状態に対して有益な二次的効果をもたらす可能性がある。

2.2.5　成人での TF 発現

健康な成人では、皮膚、腸、胎盤、子宮、心臓、脳、腎臓、脾臓、精巣、肺、肝臓及び副腎などの広範な臓器に TF タンパク質の発現が認められる（Drake et al., 1989）。一般的に TF は内皮細胞に発現し、細胞膜に局在する。さらに、上皮細胞、末梢神経及び神経節、心筋細胞、脂肪細胞並びに単核細胞等、各種細胞でも TF の発現が報告されている（Fleck et al., 1990; Moberg et al., 2002; Østerud et al., 2006; Li et al., 2007; Østerud, 2010; Edén et al., 2019）。好中球では、TF は細胞膜で構成的に発現していないと考えられるが、細胞膜に移行することができる。単球及びマクロファージでは、TF は細胞膜に構成的に発現しているが、活性化されるまで静止している。炎症により単球で TF の細胞膜局在化及び活性化が促進される。

また、TF は細胞に含まれない 2 種類の形態で血中に存在する。1 つは TF を含むマイクロパーティクル（microparticle、MP）で、内皮細胞、平滑筋細胞、単核細胞又は血小板（Muller et al., 2003）などの無傷細胞に由来する。これらは凝固過程、恐らく軽度の血管損傷に関与すると推定

される（Del Conde et al., 2005）。もう 1 つは、選択的 RNA スプライシングにより生じる可溶性タンパク質、オルタナティブ・スプライス型 TF（alternatively spliced tissue factor、asTF）である（Bogdanov et al., 2003; Lechner et al., 2008）。asTF の凝固促進能に関する明確なコンセンサスは得られていないが、asTF は凝固を開始しないとの仮説が有力である（Censarek et al., 2007）。また、asTF は FVIIa や PAR2 とは独立した内皮細胞上のインテグリンの連結を介したシグナル伝達能も有し、asTF は炎症、血管新生及び腫瘍増殖に関与する（van den Berg et al., 2009; Srinivasan et al., 2011; Kocaturk et al., 2013）。細胞に含まれない形態で血中に存在する TF は、予期しない凝固活性化を防ぐために翻訳後修飾により「暗号化」され、その「解読」により活性化されると推察される（Bach, 2006）。チソツマブ　ベドチンが asTF に結合するかは不明である。理論的には、チソツマブ　ベドチンが TF 活性の阻害や細胞内での MMAE 放出を介して、TF 発現細胞に二次的な影響を及ぼす可能性がある。

2.3　安全性薬理試験

MMAE の最高濃度（100 µmol/L、ヒトでの C_{max} の約 12000 倍）では、hERG チャネルを介したカリウム電流の限定的な阻害（50%未満）が認められたが、10 µmol/L（ヒトでの C_{max} の約 1200 倍）では、hERG チャネル活性の有意な阻害は認められなかった。したがって、チソツマブベドチン由来の MMAE が in vivo で hERG チャネルを阻害する可能性は低いと考えられた。チソツマブ　ベドチンを投与したカニクイザルでは、Fridericia 法による補正 QT 及び RR 間隔に対する影響は認められなかった（[2.6.2-4 項]）。チソツマブ　ベドチンは、抗体部分の分子量サイズから細胞膜を通過できないため、高度に保存されている hERG チャネル内孔に到達して遮断できないと考えられることから、hERG 試験は実施しなかった。

チソツマブ　ベドチン及びチソツマブのカニクイザルを用いた反復投与毒性試験の一部として評価した心電図、心拍数、血圧、呼吸系及び CNS の安全性薬理パラメーターに対する影響は認められなかった。

チソツマブ　ベドチンは、動物試験で安全性薬理評価項目に影響を及ぼさなかった。さらに、がん患者では安全性薬理評価項目の変化に関連した臨床的影響を示す兆候は認められていない。

2.4　薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。

3. 薬物動態

3.1　分析法

カニクイザル血漿中のチソツマブ　ベドチン及び TAb 濃度はバリデートされた ELISA により測定した（[2.6.4-2.2 項]）。ラット及びサルの血清／血漿中 MMAE 濃度は LC-MS/MS により測定した。カニクイザル血清中の ADA は捕捉及び検出にチソツマブ　ベドチンを用いる電気化学発光（electrochemiluminescence、ECL）ブリッジングアッセイにより検出した。各分析法について動物種ごとのバリデーションを実施した。

3.2　吸収

チソツマブ　ベドチン投与後のチソツマブ　ベドチン及び TAb の曝露量（AUC 及び C_{max}）は、マウスでは 1～5 mg/kg（[2.6.4-3.1 項]）、カニクイザルでは 1～6 mg/kg（[2.6.4-3.2 項]）でほぼ用量比例性を示した。マウス及びカニクイザルのいずれでも、特に投与後の遅い時点で血漿中 TAb 濃度が一貫して高かったため、全身曝露量（AUC）はチソツマブ　ベドチンよりも TAb で大きかった。チソツマブ　ベドチンと TAb との差は、チソツマブ　ベドチンから MMAE が放出されたことによる、薬物抗体比（drug to antibody ratio、DAR）の経時的な変化を示していると考えられる。カニクイザルでのチソツマブ　ベドチン及び TAb の $t_{1/2}$ はそれぞれ 24～39 時間及び 30～50 時間であった。チソツマブ　ベドチン投与後、チソツマブ　ベドチン、TAb 及び MMAE の蓄積性は認められなかった。

GLP 準拠の反復投与毒性試験（[2.6.4-3.2.2 項]）で、チソツマブ　ベドチンの 1、3 及び 5 mg/kg を反復投与したとき、大部分のカニクイザルで ADA が発現した。ADA 陽性動物では、反復投与後に曝露量がわずかに減少した。しかし、概して、ADA が認められた場合でも投与期間中、特に高投与量（5 mg/kg 群）を投与した場合には、チソツマブ　ベドチンの曝露量は十分に維持された。

カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを投与したときの MMAE の曝露量は、ほぼ用量比例性を示した（[2.6.4-3.2 項]）。MMAE 濃度はモル濃度換算でチソツマブ　ベドチンの C_{max} の約 0.01%であり、全身循環でのチソツマブ　ベドチンの高い安定性が確認された。チソツマブ　ベドチン投与後の MMAE の TK は、生成速度律速であると考えられた。

3.3　分布

チソツマブはカニクイザル TF に対して交差反応性を示すことから、カニクイザル（[2.6.4-4.2 項]）を用いた ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布を検討した。投与量に対して最も高い放射能が認められたのは肝臓及び骨髄であった。しかし、線量計算からは腎臓及び下部大腸壁で最も高い線量当量の曝露を受けていた。

MMAE の血漿タンパク結合率は種依存的であり、マウス及びカニクイザルと比較してヒト及びラットで高かった（[2.6.4-4.4 項]）。MMAE の血液／血漿中濃度比も種依存的であり、ヒトでは 0.792～0.976、マウス、ラット及びカニクイザルでは 0.954～11.8 であった（[2.6.4-4.5 項]）。

Long-Evans ラットに ^{3}H-MMAE 投与後の放射能はで各組織に広く分布したが、投与後 96 時間にはほとんどの組織から放射能が消失した（[2.6.4-4.3 項]）。

3.4　代謝

ラット、カニクイザル及びヒト肝細胞での MMAE の代謝は類似していた（同様の代謝物が生成）（[2.6.4-5.1.1 項]）。ヒト CYP 酵素発現系を用いた in vitro 試験により、MMAE は主に CYP3A4 により代謝されることが示された（[2.6.4-5.1.2 項]）。

3.5　排泄

ラットに ^{3}H-MMAE を単回静脈内投与し、マスバランスを検討した（[2.6.4-6.1 項]）。ラットでの主な排泄経路は糞中であり、尿中排泄は投与量の約 15%以下であった。尿及び糞中に排泄された主な代謝物は未変化体であった。

3.6　薬物動態学的薬物相互作用

MMAE の薬物相互作用を in vitro で検討した。MMAE は、CYP3A4/5 に対して準不可逆的な時間依存的阻害作用（[2.6.4-7.2 項]）を示したが、CYP1A2、2B6 及び 3A4/5 対する誘導作用は示さなかった（[2.6.4-7.1 項]）。MMAE は P-糖タンパク質（P-glycoprotein、P-gp）の基質であったが、breast cancer resistance protein（BCRP）、multidrug resistance-associated protein 2（MRP2）、organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 又は 1B3、organic cation transporter（OCT）2、又は organic anion transporter（OAT）1 又は 3 の基質ではなかった。MMAE は臨床的に意義のある濃度で bile salt export pump（BSEP）、P-gp、BCRP、MRP2、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1 及び OATP1B3 に対して阻害作用を示さなかった（[2.6.4-7.3 項]）。

4.　毒性試験

一連の包括的な非臨床安全性試験で、チソツマブ　ベドチンの毒性を評価した。毒性試験プログラムは、直近の規制ガイダンス（ICH S1A、S2(R1)、S5(R3)、S6(R1)、S9、S9 Q&A、S10 及び M3(R 2)）を十分に考慮して計画された。チソツマブ　ベドチンのカニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験は GLP 適用で実施した。

チソツマブ　ベドチンの抗体部分がヒト及びカニクイザルの TF と交差反応性を示すことから、非臨床毒性試験に適した動物種としてカニクイザルを選択した。また、MMAE をラット及びカニクイザルに投与した付加的な試験も評価に含めた。

4.1　単回投与毒性試験

チソツマブ　ベドチンの単回投与後の毒性は、反復投与毒性試験で評価されている。

4.2　反復投与毒性試験

臨床で 1 回 2 mg/kg を 3 週間間隔で投与する用法・用量を支持するために、GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験を実施し、チソツマブ　ベドチンをカニクイザルに 3 週間間隔で 5 回静脈内投与した（[2.6.6-3.2.3 項]）。本試験の投与量は 1、3 及び 5 mg/kg とした。さらに、皮膚毒性を検討するために中間剖検群を設定し、4 mg/kg を単回投与後、生存期間中及び剖検時（6 又は 8 日目及び 11 又は 12 日目）に皮膚生検を実施した。チソツマブ　ベドチンの主な標的器官は皮膚、骨髄及び雄性生殖器官であった。観察された毒性所見は、他の MMAE を含む ADC で観察された毒性変化と一致していた（Saber et al., 2015）。また、臨床試験でチソツマブ　ベドチン投与後に認められた所見並びにチソツマブ　ベドチンを投与したカニクイザルの獣医学的検査及び一般状態観察に基づき、結膜が標的器官であると考えられた。標的器官の毒性は、MMAE に高感受性の分裂の速い細胞で TF を介する又は介さない機序で発現した。反復投与毒性試験で認められた主要な毒性所見の概要を「2.6.6　毒性試験の概要文」に示す。

4.2.1　死亡例

カニクイザルを用いた GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験では、早期安楽死例が認められた（[2.6.6-3.2.3.1 項]）。これらの個体は、安楽死までに認められた皮膚反応により、動物愛護の観点から早期安楽死に至った。これら 3 匹は全て最高用量群（5 mg/kg）であった。カニクイザルに 5 mg/kg を単回投与したときの全身曝露量は、ヒトに臨床推奨用量である 2 mg/kg を 3 週間間隔で投与したときの全身曝露量の 4 倍であった。

4.2.2　皮膚毒性

カニクイザルを用いた GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験では、多くの場合、最初の皮膚反応は大腿部又は胸部の皮膚発赤として観察され、乾燥した薄片状の皮膚に進行した。これらの所見は体表の他の部位にも見られ、ほぼ 14 日以内におおむね回復した。しかし、高用量（5 mg/kg）群の 3 匹は、有害な皮膚反応が観察されたため早期に安楽死させた。中間剖検（4 mg/kg）群で

皮膚の病理組織学的検査を実施した結果、潰瘍性皮膚炎、皮下混合型炎症性細胞浸潤、表皮の水腫性変性／過形成及び病変部位（皮下組織）からの出血が認められた。4 mg/kg 群で認められた所見は、5 mg/kg 群の早期死亡例の所見よりも重症度が低いと考えられた。全般的に、3 mg/kg 群の皮膚反応（皮膚発赤から乾燥した薄片状の皮膚に進行）は重症度が低く、次回投与前に回復した。皮膚反応が認められた 3 mg/kg 群のカニクイザルの全身曝露量（AUC）は、臨床推奨用量を投与したヒトの全身曝露量の約 2.3 倍であった。

ラット及びカニクイザルに MMAE 又はチソツマブを投与しても有害な皮膚反応は認められなかったことから、皮膚所見はチソツマブ　ベドチンに起因するものと考えられる。皮膚では TF の発現量が高く、真皮の細胞分裂が速いため、チソツマブ　ベドチンに対する感受性が高いと考えられる。また、カニクイザルを用いた生体内分布試験（[2.6.5-5.3 項]）で、皮膚に放射能標識したチソツマブが検出された。

4.2.3　眼毒性

カニクイザルを用いた GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験（[2.6.6-3.2.3 項]）では、5 mg/kg のチソツマブ　ベドチンを投与した大多数の動物で、眼の充血、結膜の発赤又は腫脹（分泌物を伴う又は伴わない）、上眼瞼の腫脹、半眼、眼脂を伴う眼瞼の腫脹及び／又は結膜炎などの一般状態所見が認められ、フシジン酸（抗生物質）が点眼投与された。これらの所見は、概して試験期間を通じて観察され、一部の動物では各投与後に再発した。低用量のチソツマブ　ベドチン（1 mg/kg）及び 25 mg/kg のチソツマブ投与動物では、このような所見は認められなかった。カニクイザルでの結膜関連所見は、高用量（5 mg/kg）投与時の発現率が高かったことから、チソツマブ　ベドチンに起因するものと考えられた。5 倍用量のチソツマブ投与で結膜関連所見が認められなかったことから、カニクイザルにおける結膜関連所見の機序の 1 つに、チソツマブ　ベドチンが結膜の TF に結合することで局所送達された MMAE による可能性が考えられる。もう 1 つの機序として、カニクイザルの結膜関連所見は 5 mg/kg 投与で観察された皮膚毒性及び免疫抑制作用の二次的所見及び／又は増悪である可能性が考えられる。一部の個体では、上眼瞼の発赤及び／又は腫脹並びに眼周囲の皮膚の乾燥も認められており、これらの所見は眼周囲の局所皮膚反応を反映している可能性がある。病理組織病理学的検査及び眼科学的検査で、チソツマブ　ベドチン及びチソツマブ投与によるカニクイザルの角膜所見は認められなかった。

組織交差反応性試験（[2.6.6-8.1.2 項]）では、眼の様々な領域でチソツマブ　ベドチン及びチソツマブによる染色が見られた。ヒト及びカニクイザルの組織では、いずれも結膜及び水晶体で、チソツマブ　ベドチン及び／又はチソツマブによる染色が認められた。カニクイザルを用いた GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験で観察された眼所見は、組織交差反応性試験の染色結果と整合している。

4.2.4　骨髄、リンパ系及び血液学的所見

カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを投与したところ、骨髄に対する影響が認められた。主な所見は、末梢血赤血球量の減少を伴う骨髄細胞密度の低下であり、投与期間中継続したが、休

薬期間中に回復した。ラット及びカニクイザルに MMAE を投与した場合にも骨髄に対する同様の影響が認められ（[2.6.6-3.3 項]）、MMAE がこの変化の主な要因であることが示された。

これ以外の血液学的影響として、総白血球数及び好中球数の減少が認められたが、これらはおおむね可逆的であった。チソツマブ　ベドチンを投与したサルで認められた総白血球数及び好中球数の減少は、リンパ球数、単球数及び好酸球数の減少とも関連が見られた。MMAE 投与に関連するその他の所見として、胸腺及び脾臓で可逆的なリンパ球減少が認められた。

骨髄、リンパ系及び血液学的所見が認められたカニクイザルの 3 mg/kg での全身曝露量（AUC）は、臨床推奨用量を投与したヒトの約 2.3 倍であった。ビンクリスチンや他の MMAE を含む ADC などの微小管阻害薬では、血液学的影響が報告されている（Lin et al., 2015; Donaghy, 2016）。

4.2.5　雄性生殖器官の所見

カニクイザル GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験での生殖毒性評価では、チソツマブ　ベドチン投与による主な生殖器官の所見として、精巣の精細管萎縮、精巣の小型化と関連した精巣上体の無精子／乏精子及び上皮空胞化並びに精子数及び精子運動性の低下又は完全な欠如が認められた。精巣及び精巣上体の変化は、投与終了後 6 週間で 3 及び 5 mg/kg 投与では部分的に回復し、1 mg/kg 投与では完全に回復した（[2.6.6-3.2.3 項]）。

MMAE を含む ADC では精巣毒性がしばしば見られるが、これは分裂の速い細胞で予想される MMAE の薬理作用と一致する（Lin et al., 2015; Saber et al., 2015）。加えて、組織交差反応性試験の結果から、これらの所見は精巣での TF 発現と関連する可能性がある。

4.2.6　末梢神経障害

カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの反復投与毒性試験では、末梢神経障害を示唆する一般状態所見又は病理組織学的所見は認められなかった。非臨床モデルでは、MMAE を含む ADC の末梢神経障害リスクを十分に確認できない可能性が示唆されている（Stagg et al., 2016）。この毒性は他の MMAE を含む ADC でも臨床的に観察されており（Kågedal et al., 2019; Ramchandren et al., 2019）、MMAE 投与に伴う変化であり、標的非依存性の機序によって生じると考えられている（de Bono et al., 2019）。

4.2.7　その他の所見

カニクイザルの 13 週間反復投与毒性試験では、アルブミンの低値及びグロブリンの高値に伴うアルブミン／グロブリン（albumin/globulin ratio、A/G）比の低下が、概して投与期間を通して認められた。ハプトグロビン濃度も投与期間を通して概して高値であった。これら 3 つのパラメーターはいずれも 6 週間の回復期間中に投与前値に回復した。

4.3　遺伝毒性試験

チソツマブ　ベドチンの遺伝毒性試験は実施していないが、MMAE を用いた遺伝毒性試験を実施した。MMAE は、細菌を用いる復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ試験で遺伝毒性を示さなかった（[2.6.6-4.1 項]）。GLP 適用 in vivo ラット骨髄小核試験では、MMAE を単回投与したラットの骨髄で小核を有する多染性赤血球の形成が確認された（[2.6.6-4.2 項]）。作用機序の解析により、MMAE は異数性誘発性の小核形成により動原体陽性の小核の形成を誘発することが確認され、これは微小管阻害薬である MMAE で予想される作用機序と一致する。

4.4　がん原性試験

チソツマブ　ベドチンは進行又は再発の子宮頸癌の治療を目的としているため、ICH S9 ガイドラインに従い、がん原性試験は実施しなかった。

4.5　生殖発生毒性試験

4.5.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

チソツマブ　ベドチンは進行又は再発の子宮頸癌の治療を目的としているため、抗悪性腫瘍薬の開発に関する ICH S9 ガイドラインに従い、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。

カニクイザルを用いた GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験では、4.2.5 項に記載したように生殖能の評価で精巣毒性が認められたが、用量依存的な回復が見られた。雌では受胎能に関連する所見は認められなかった。

チソツマブ　ベドチンでは認められなかったが、標的非結合性対照 ADC の GLP 適用反復投与毒性試験においてクラスエフェクトと考えられる卵巣への影響が認められた（[2.6.6-3.4.1 項]）。3 mg/kg 以上を 1 週間間隔で 4 回投与した若齢雌カニクイザルで、軽度から中等度の二次及び三次卵胞の減少又は欠乏が観察された。これらの所見は回復期間後、数例で二次及び三次卵胞への発育が見られ、部分的な回復性が認められた。

4.5.2　胚・胎児発生に関する試験

チソツマブ　ベドチンの胚・胎児発生に関する試験は実施していないが、MMAE に関するデータが得られている。ラットに MMAE 0.2 mg/kg を投与した結果、胚・胎児毒性として総吸収胚数及び着床後胚損失率の増加、早期分娩、生存胎児の減少及び胎児の外表異常が認められた。1 匹の母動物は妊娠 21 日に早期分娩し、計画剖検前に安楽死させた。これらの所見は、胚発生時の分裂の速い細胞で MMAE が微小管を阻害することと一致する。

胚発生に関する TF の重要性が文献報告されている。TF の機能的対立遺伝子がヘテロ接合体(+/-)であるマウスを交配して作製した TF-ヌル(-/-)マウス胚は、妊娠 11 日を超えて生存しなかった（Bugge et al., 1996）。当該マウス胚では、胚及び胚体外組織内で止血障害が生じ、顕著な出血が認められた。形態学的には、浮腫を伴う成長抑制／異常が認められた。TF-ヌルマウスでは、同様の胚致死及び形態学的変化が、他の研究でも認められている（Toomey et al., 1996; Toomey et

al., 1997)。興味深いことに、他の凝固因子（FVII、プロトロンビン及びフィブリノーゲン）の遺伝子欠損マウスの胚生存率は TF 遺伝子欠損マウスと比較して高いことから、これらは TF とは異なり、胚発生に必須ではないと考えられる（Suh et al., 1995; Rosen et al., 1997; Sun et al., 1998; Xue et al., 1998)。ヒトでは、TF は胎児の生存に必須であると思われる（Tuddenham et al., 1995)。

したがって、チソツマブ　ベドチンは、理論的には TF 活性の阻害を介して胚発生に影響を及ぼす可能性がある。MMAE は胚・胎児毒性を引き起こすことが知られており、チソツマブ　ベドチンは MMAE を胚又は胎盤の TF 発現細胞に局所的に送達する可能性がある。

4.6　局所刺激性試験

ラット及びサルの注射部位の病理組織学的検査では、チソツマブ　ベドチン、チソツマブ及び MMAE の投与に関連した影響は認められなかった。

4.7　その他の毒性試験

4.7.1　組織交差反応性

チソツマブはカニクイザル及びヒトの TF に強い結合を示すことが、免疫組織化学検査及びフローサイトメトリーにより確認されている。一方、イヌ、マウス、ブタ、ラット及びウサギではチソツマブの結合は認められなかった。

ヒト及びカニクイザルの組織パネルを用いて、チソツマブとチソツマブ　ベドチンの交差反応性を更に検討した（[2.6.6-8.1.2 項])。組織パネルで観察された染色は、報告されている TF 発現部位とおおむね一致し、概して膜及び細胞質の両方で染色が認められた。しかし、骨格筋、卵巣の黄体細胞及び莢膜細胞並びに精巣の精子形成細胞及びライディッヒ細胞は染色陽性を示したが、これらの組織での TF 発現を報告している入手可能な公表文献はなかった。これらの組織の染色は TF の未報告部位での発現を意味する可能性がある。染色パターンはヒトとカニクイザルの組織でおおむね類似していた。

4.7.2　光毒性

MMAE 及び vcMMAE は波長 290～700 nm の範囲で光吸収を示さず、直接的な光毒性の懸念は生じない。

5.　総括及び結論

チソツマブ　ベドチンは、プロテアーゼで切断可能な vc リンカーを介して TF 標的抗体（チソツマブ）と MMAE が結合している。TF は一般的に血管系を囲む内皮細胞に発現している膜貫通型糖タンパク質であり、血管損傷後に凝固を開始する主要な分子である。癌組織に対して、TF は増殖、血管新生及び腫瘍転移といった腫瘍促進機構と関連している。さらに、TF は効率的に多様な腫瘍細胞内に取り込まれて、発現が増加しているため、ADC を用いた抗がん治療法の標的として期待されている。

チソツマブ　ベドチンは、複数の細胞傷害作用機序及び抗腫瘍作用機序を有する。チソツマブ ベドチンは TF 発現腫瘍細胞内に MMAE を送達し、直接的な細胞傷害活性を誘導する。放出された MMAE は腫瘍微小環境で拡散し、活発に分裂している近傍細胞に対してバイスタンダー効果を示す。さらに、チソツマブ　ベドチンは Fc を介した殺細胞作用（ADCC 及び ADCP）を有し、ICD 誘導作用と一致して、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を示す。チソツマブ　ベドチンは単剤又は他剤との併用投与により強力な in vivo 抗腫瘍活性を示す。腫瘍細胞の TF 発現レベルやチソツマブ　ベドチンの多面的な抗腫瘍作用機序など複数の要素が、その臨床効果に関与していると考えられる。

チソツマブ　ベドチンによる潜在的な副作用について、TF 活性の阻害や正常組織の TF 発現細胞への MMAE の送達を仮定して詳細に検討した。TF の主な役割である凝固開始がチソツマブ　ベドチンによって影響される可能性はあるが、weight of evidence から、この潜在的な有害性は、生理学的に関連する出血の問題に外挿されるものではないことが示唆された。また、チソツマブ　ベドチンによる TF 発現細胞に対する MMAE の局所的送達は、鼻出血及び眼毒性などの特定の有害事象に関与する可能性がある。文献調査並びに非臨床及び臨床試験での安全性所見に基づき、患者のリスクを軽減するため、これらのチソツマブ　ベドチンによる潜在的な二次的影響は十分に明らかにされたと考えられる。

ヒト及びカニクイザルの TF に対する抗原結合親和性が同程度であったことから、チソツマブ ベドチンの非臨床試験に用いる適切な動物種はカニクイザルであることが確認された。高用量を投与した動物では、MMAE の放出及び高いクリアランスのために、チソツマブ　ベドチンに比べ TAb の曝露は大きかった。カニクイザルとヒトのチソツマブ　ベドチンの相対的曝露量の概要を Table 2 に示す。ヒトでの曝露量は、予定臨床用量である 2.0 mg/kg の 3 週間に 1 回投与での母集団 PK 解析の結果を示した。カニクイザルで重篤な毒性が発現しない最大投与量（highest non-severely toxic dose、HNSTD）（3 mg/kg）でのチソツマブ　ベドチンの C_{max} 及び AUC は、ヒトの約 2.3 倍であった。カニクイザルを用いた試験で得られたチソツマブ　ベドチンの C_{max}（5 mg/kg 群）は、臨床曝露量を上回ったことから、この結果が臨床的安全性を評価する上で妥当であることが裏付けられ、用量制限毒性は薬理作用に基づくメカニズムによるものであった。チソツマブ　ベドチン投与後の MMAE の C_{max} は、モル比に基づくとカニクイザルのチソツマブ ベドチンの C_{max} の約 0.01%であった。循環血中の MMAE は生成速度律速であり、チソツマブ ベドチンと比較して t_{max} が遅くなった。チソツマブ　ベドチン及び MMAE の PK プロファイルはヒトで認められたものと類似していた。MMAE は主に未変化体として糞中に排泄された。

Table 2　カニクイザル及びヒトにおけるチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの全身曝露量

Species	Test article	Dose Association	Dose Level (mg/kg)	C_{max} (μg/mL)	AUC (μg·h/mL)	Associated Study No.
Cynomolgus monkey	Tisotumab vedotin	NOAEL	1	31	797	[redacted]522531
		HNSTD	3	94	3210	
		N/A	5	162	6000	
	Tisotumab	NOAEL	25	725	50400	
		N/A	100	2260	138100	[redacted]514850
Human	Tisotumab vedotin	Recommended clinical dose	2	40.8	1382	PopPK Report # [redacted]1015-248

AUC: area under the concentration-time curve; C_{max}: maximum drug concentration; HNSTD: highest non-severely toxic dose; N/A: not appreciable; NOAEL: no observed adverse effect level

ヒト肝細胞での MMAE の in vitro 代謝試験では、ラット又はサルの in vitro 試験で認められたものと同様の代謝物が生成した。ヒト CYP 酵素発現系を用いて、MMAE が CYP3A4 の基質であることを in vitro 試験で確認した。ヒトで、ブレンツキシマブ　ベドチンと強力な CYP3A4/5 阻害薬（ケトコナゾール）の併用投与により MMAE の曝露量が 34%増加し、CYP3A4/5 誘導薬（リファンピシン）の併用投与により MMAE の曝露量が 46%減少した（Han et al., 2013）。MMAE は CYP3A4/5 の強力な可逆的阻害薬又は誘導薬ではないが、CYP3A4/5 の準不可逆阻害薬である。ヒトで MMAE の C_{max} が低いこと（8.23 nmol/L 又は 5.91 ng/mL）及び阻害物質の飽和濃度での酵素不活化の 50%阻害濃度（concentration of an inactivator that supports half the maximal rate of enzyme inactivation、K_I）がはるかに高いこと（1.12 μmol/L 以上）を考慮すると、MMAE は他の CYP3A4/5 基質薬の PK を顕著に変化させることはないと考えられた。ヒトで、ブレンツキシマブ　ベドチンと CYP3A4/5 の基質であるミダゾラムを併用投与しても、ミダゾラムの曝露量に影響は無かった（Han et al., 2013）。In vitro 試験の結果から、MMAE は P-gp の基質であるが、BCRP、MRP2、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1 又は OATP1B3 の基質ではないことが示唆された。さらに、MMAE は臨床濃度で P-gp、BCRP、BSEP、MRP2、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1 又は OATP1B3 を阻害しないと考えられる。

In vivo 及び in vitro で評価した安全性薬理試験では、CNS、呼吸系及び心血管系パラメーターに対する影響は認められず、許容可能な安全性プロファイルが示された。

動物で認められた毒性は、標的である TF を介したチソツマブ　ベドチンの取り込み及び MMAE による一部の TF を介さない作用と一致していた。チソツマブ　ベドチンの反復投与毒性試験で確認された主な標的器官は、皮膚、骨髄及び雄性生殖器官であった。皮膚毒性は標的依存性であり、皮膚における TF 発現に関連していた。骨髄の細胞密度低下は主に TF を介さない毒性であり、チソツマブ　ベドチン及び MMAE の両方で認められた。骨髄所見は臨床で認められる有害作用と関連があり、投与中止により回復した。精巣毒性は回復期間終了時までに部分的に回復することが示され、TF 発現もこの毒性に関与した可能性がある。ヒトで認められた臨床所見並びにチソツマブ　ベドチンを投与したカニクイザルの獣医学的検査及び一般状態所見から、結膜が標的器官であると考えられた。チソツマブ　ベドチンでは認められなかったが、回復性のある卵巣への影響が標的非結合性対照 ADC で観察された。25 mg/kg 以下のチソツマブ投与では毒性が認められず、標的である TF との結合のみでは影響がないことが示唆された。

妊娠ラットに MMAE を投与したとき、ヒトの MMAE 曝露量より低い曝露量で胚・胎児毒性が認められた。チソツマブ　ベドチンの胚・胎児発生毒性試験は実施していないが、がん化学療法薬では胚・胎児毒性がしばしば見られる。

以上より、本申請を裏付ける非臨床試験で、チソツマブ　ベドチンの薬理、薬物動態及び毒性の特性は十分に明らかにされている。非臨床試験では、抗腫瘍活性が示されており、がん化学療法後に増悪した進行又は再発の子宮頸癌患者に対するチソツマブ　ベドチンの使用を妨げる所見は認められなかった。

6.　参考文献一覧

Acharya SS, Coughlin A, Dimichele DM, North American Rare Bleeding Disorder Study Group. Rare Bleeding Disorder Registry: deficiencies of factors II, V, VII, X, XIII, fibrinogen and dysfibrinogenemias. J Thromb Haemost. 2004;2(2):248-56.

Akashi T, Furuya Y, Ohta S, Fuse H. Tissue factor expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. Urology. 2003;62(6):1078-82.

Albrektsen T, Sørensen BB, Hjortø GM, Fleckner J, Rao LVM, Petersen LC. Transcriptional program induced by factor VIIa-tissue factor, PAR1 and PAR2 in MDA-MB-231 cells. J Thromb Haemost. 2007;5(8):1588-97.

Ando R, Kase S, Ohashi T, Dong Z, Fukuhara J, Kanda A, et al. Tissue factor expression in human pterygium. Mol Vis. 2011;17:63-9.

Antoniak S, Mackman N. Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection. Blood. 2014;123(17):2605-13.

Bach RR. Tissue factor encryption. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26:456-61.

Barbas 3rd CF, Collet TA, Amberg W, Roben P, Binley JM, Hoekstra D, et al. Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. J Mol Biol. 1993;230:812-23.

Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. Nat Med. 2004;10(5):502-9.

Bluff JE, Brown NJ, Reed MW, Staton CA. Tissue factor, angiogenesis and tumour progression. Breast Cancer Res. 2008;10(2):204.

Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y . Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. Nat Med. 2003;9(4):458-62.

Breij EC, de Goeij BE, Verploegen S, Schuurhuis DH, Amirkhosravi A, Francis J. An antibody-drug conjugate that targets tissue factor exhibits potent therapeutic activity against a broad range of solid tumors. Cancer Res. 2014;74(4):1214-26.

Broze GJ, Jr., Girard TJ. Factor V, tissue factor pathway inhibitor, and east Texas bleeding disorder. J Clin Invest. 2013;123(9):3710-2.

Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmbäck K, Danton MJ, et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93(13):6258-63.

Busso N, Morard C, Salvi R, Péclat V, So A. Role of the tissue factor pathway in synovial inflammation. Arthritis Rheum. 2003;48(3):651-9.

Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. Blood. 2005;105(7):2764-70.

Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Vlaenderen IV, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. Nature. 1996;383(6595):73-5.

Censarek P, Bobbe A, Grandoch M, Schrör K, Weber AA. Alternatively spliced human tissue factor (asHTF) is not pro-coagulant. Thromb Haemost. 2007;97(1):11-4.

Chanakira A, Westmark PR, Ong IM, Sheehan JP. Tissue factor-factor VIIa complex triggers protease activated receptor 2-dependent growth factor release and migration in ovarian cancer. Gynecol Oncol. 2017;145(1):167-75.

Chen L, Lu Y, Chu Y, Xie J, Ding W, Wang F. Tissue factor expression in rheumatoid synovium: a potential role in pannus invasion of rheumatoid arthritis. Acta Histochem. 2013;115(7):692-7.

Cho Y, Cao X, Shen D, Tuo J, Parver LM, Rickles FR, et al. Evidence for enhanced tissue factor expression in age-related macular degeneration. Lab Invest. 2011;91(4):519-26.

Cirillo P, Calì G, Golino P, Calabrò P, Forte L, Rosa SD, et al. Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. Circulation. 2004;109(23):2911-6.

Cocco E, Varughese J, Buza N, Bellone S, Glasgow M, Bellone M, et al. Expression of tissue factor in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix: implications for immunotherapy with hI-con1, a factor VII-IgGFc chimeric protein targeting tissue factor. BMC Cancer. 2011a;11:263.

Cocco E, Varughese J, Buza N, Bellone S, Lin KU, Bellone M, et al. Tissue factor expression in ovarian cancer: implications for immunotherapy with hI-con1, a factor VII-IgGF(c) chimeric protein targeting tissue factor. Clin Exp Metastasis. 2011b;28(7):689-700.

Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. J Thromb Haemost. 2005;3(8):1800-14.

de Bono JS, Concin N, Hong DS, Thistlethwaite FC, Machiels JP, Arkenau HT, et al. Tisotumab vedotin in patients with advanced or metastatic solid tumours (InnovaTV 201): a first-in-human, multicentre, phase 1–2 trial. Lancet Oncol. 2019;20(3):383-93.

de Goeij BE, Satijn D, Freitag CM, Wubbolts R, Bleeker WK, Khasanov A, et al. High turnover of tissue factor enables efficient intracellular delivery of antibody-drug conjugates. Mol Cancer Ther. 2015;14(5):1130-40.

de Taeye SW, Rispens T, Vidarsson G. The ligands for human IgG and their effector functions. Antibodies (Basel). 2019;8(2):30.

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. Blood. 2005;106(5):1604-11.

Disse J, Petersen HH, Larsen KS, Persson E, Esmon N, Esmon CT, et al. The endothelial protein C receptor supports tissue factor ternary coagulation initiation complex signaling through protease-activated receptors. J Biol Chem. 2011;286(7):5756-67.

Donaghy H. Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates. MAbs. 2016;8(4):659-71.

Dorfleutner A, Hintermann E, Tarui T, Takada Y, Ruf W. Cross-talk of integrin alpha3beta1 and tissue factor in cell migration. Mol Biol Cell. 2004;15(10):4416-25.

Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. Am J Pathol. 1989;134(5):1087-97.

Edén D, Panagiotou G, Mokhtari D, Eriksson JW, Åberg M, Siegbahn A, et al. Adipocytes express tissue factor and FVII and are procoagulant in a TF/FVIIa-dependent manner. Ups J Med Sci. 2019;124(3):158-67.

Erlich J, Parry GC, Fearns C, Muller M, Carmeliet P, Luther T, et al. Tissue factor is required for uterine hemostasis and maintenance of the placental labyrinth during gestation. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(14):8138-43.

Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. Thromb Res. 1990;59(2):421-37.

Francisco JA, Cerveny CG, Meyer DL, Mixan BJ, Klussman K, Chace DF, et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood. 2003;102(4):1458-65.

Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. Nat Rev Immunol. 2017;17(2):97-111.

Gerber HP, Sapra P, Loganzo F, May C. Combining antibody-drug conjugates and immune-mediated cancer therapy: what to expect? Biochem Pharmacol. 2016;102:1-6.

Gessler F, Voss V, Dutzmann S, Seifert V, Gerlach R, Kögel D, et al. Inhibition of tissue factor/protease-activated receptor-2 signaling limits proliferation, migration and invasion of malignant glioma cells. Neuroscience. 2010;165(4):1312-22.

Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. Science. 2001;293(5535):1666-70.

Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, Cohen C, et al. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. Mol Vis. 2002;8:119-26.

Han TH, Gopal AK, Ramchandren R, Goy A, Chen R, Matous JV, et al. CYP3A-mediated drug-drug interaction potential and excretion of brentuximab vedotin, an antibody-drug conjugate, in patients with CD30-positive hematologic malignancies. J Clin Pharmacol. 2013;53(8):866-77.

Hansen CB, Pyke C, Petersen LC, Rao LV. Tissue factor-mediated endocytosis, recycling, and degradation of factor VIIa by a clathrin-independent mechanism not requiring the cytoplasmic domain of tissue factor. Blood. 2001;97(6):1712-20.

Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK,et al. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. Blood. 2004;103(8):3029-37.

Hu L, Xia L, Zhou H, Wu B, Mu Y, Wu Y, et al. TF/FVIIa/PAR2 promotes cell proliferation and migration via PKCα and ERK-dependent c-Jun/AP-1 pathway in colon cancer cell line SW620. Tumour Biol. 2013;34(5):2573-81.

Iba T, Levy JH, Levi M, Connors JM, Thachil J. Coagulopathy of coronavirus disease 2019. Crit Care Med. 2020;48(9):1358-64.

Jiao JA, Kelly AB, Marzec UM, Nieves E, Acevedo J, Burkhardt M, et al. Inhibition of acute vascular thrombosis in chimpanzees by an anti-human tissue factor antibody targeting the factor X binding site. Thromb Haemost. 2010;103(1):224-33.

Kågedal M, Samineni D, Gillespie WR, Lu D, Fine BM, Girish S, et al. Time-to-event modeling of peripheral neuropathy: platform analysis of eight valine-citrulline-monomethylauristatin E antibody-drug conjugates. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol. 2019;8(8):606-15.

Kakkar AK, Lemoine NR, Scully MF, Tebbutt S, Williamson RC. Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. Br J Surg. 1995;82(8):1101-4.

Khorana AA, Ahrendt SA, Ryan CK, et al. Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(10):2870-5.

Kocaturk B, Van den Berg YW, Tieken C, Francis CW, Hruban RH, Hu YC, et al. Alternatively spliced tissue factor promotes breast cancer growth in a beta1 integrin-dependent manner. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110(28):11517-22.

Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. Annu Rev Immunol. 2013;31:51-72.

Lechner D, Weltermann A. Circulating tissue factor-exposing microparticles. Thromb Res. 2008;122(Suppl 1):S47-54.

Leppert U, Eisenreich A. The role of tissue factor isoforms in cancer biology. Int J Cancer. 2015;137(3):497-503.

Levi M, Thachil J, Iba T, Levy JH. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. Lancet Haematol. 2020;7(6):e438-40.

Li F, Ulrich M, Jonas M, Stone I, Linares G, Zhang X, et al. Tumor-associated macrophages can contribute to antitumor activity through FcgammaR-mediated processing of antibody-drug conjugates. Mol Cancer Ther. 2017;16(7):1347-54.

Li T, Ling YH, Goldman ID, Perez-Soler R. Schedule-dependent cytotoxic synergism of pemetrexed and erlotinib in human non-small cell lung cancer cells. Clin Cancer Res. 2007;13(11):3413-22.

Li W, Zheng X, Gu J, Stone IJ, Linares G, Zhang X, et al. Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin. J Thromb Haemost. 2005;3(7):1351-9.

Liang HP, Kerschen EJ, Hernandez I, Basu S, Zogg M, Botros F, et al. EPCR-dependent PAR2 activation by the blood coagulation initiation complex regulates LPS-triggered interferon responses in mice. Blood. 2015;125(18):2845-54.

Lin K, Rubinfeld B, Zhang C, Firestein R, Harstad E, Roth L, et al. Preclinical development of an anti-NaPi2b (SLC34A2) antibody-drug conjugate as a therapeutic for non-small cell lung and ovarian cancers. Clin Cancer Res. 2015;21(22):5139-50.

Liu Y, Mueller BM. Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways. Biochem Biophys Res Commun. 2006;344(4):1263-70.

Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(6):1015-22.

Madhusudhan T, Kerlin BA, Isermann B. The emerging role of coagulation proteases in kidney disease. Nat Rev Nephrol. 2016;12(2):94-109.

Madkhali Y, Featherby S, Collier ME, Maraveyas A, Greenman J, Ettelaie C, et al. The ratio of factor VIIa: tissue factor content within microvesicles determines the differential influence on endothelial cells. TH Open. 2019;3(2):e132-45.

McLean K, Schirm S, Johns A, Morser J, Light DR. FXa-induced responses in vascular wall cells are PAR-mediated and inhibited by ZK-807834. Thromb Res. 2001;103(4):281-97.

Moberg L, Johansson H, Lukinius A, Berne C, Foss A, Källen R, et al. Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. Lancet. 2002;360(9350):2039-45.

Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. J Thromb Haemost. 2007;5(6):1097-105.

Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, Ruf W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89(24):11832-6.

Muller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. FASEB J. 2003;17(3):476-8.

Muller P, Martin K, Theurich S, Schreiner J, Savic S, Terszowski G, et al. Microtubule-depolymerizing agents used in antibody-drug conjugates induce antitumor immunity by stimulation of dendritic cells. Cancer Immunol Res. 2014;2(8):741-55.

Naldini A, Sower L, Bocci V, Meyers B, Carney DH. Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation. J Cell Physiol. 1998;177(1):76-84.

Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, et al. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2005;11(7):2531-9.

Ohta S, Wada H, Nakazaki T, Maeda Y, Nobori T, Shiku H, et al. Expression of tissue factor is associated with clinical features and angiogenesis in prostate cancer. Anticancer Res. 2002;22(5):2991-6.

Okeley NM, Miyamoto JB, Zhang X, Sanderson RJ, Benjamin DR, Sievers EL, et al. Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. Clin Cancer Res. 2010;16(3):888-97.

Orfeo T, Butenas S, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. The tissue factor requirement in blood coagulation. J Biol Chem. 2005;280(52):42887-96.

Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. Physiol Rev. 2004;84(2):579-621.

Østerud B. Tissue factor expression in blood cells. Thromb Res. 2010;125(Suppl 1):S31-4.

Østerud B, Bjorklid E. Sources of tissue factor. Semin Thromb Hemost. 2006;32(1):11-23.

Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, Jeunesse CML, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. Blood. 2007;110(1):133-41.

Parry GC, Erlich JH, Carmeliet P, Luther T, Mackman N. Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. J Clin Invest. 1998;101(3):560-9.

Patry G, Hovington H, Larue H, Harel F, Fradet Y, Lacombe L, et al. Tissue factor expression correlates with disease-specific survival in patients with node-negative muscle-invasive bladder cancer. Int J Cancer. 2008;122(7):1592-7.

Pawlinski R, Fernandes A, Kehrle B, Pedersen B, Parry G, Erlich J, et al. Tissue factor deficiency causes cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(24):15333-8.

Pedersen B, Holscher T, Sato Y, Pawlinski R, Mackman N. A balance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor is required for embryonic development and hemostasis in adult mice. Blood. 2005;105(7):2777-82.

Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, Siboni SM, Halimeh S, Faeser B, et al. Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders. J Thromb Haemost. 2012;10(4):615-21.

Poon RT, Lau CP, Ho JW, Yu WC, Fan ST, Wong J, et al. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res. 2003;9(14):5339-45.

Rallabhandi P, Nhu QM, Toshchakov VY, Piao W, Medvedev AE, Hollenberg MD, et al. Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: a novel paradigm for receptor cooperativity. J Biol Chem. 2008;283(36):24314-25.

Ramchandren R, Advani RH, Ansell SM, Bartlett NL, Chen R, Connors JM, et al. Brentuximab vedotin plus chemotherapy in North American patients with newly diagnosed stage III or IV Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res. 2019;25(6):1718-26.

Regina S, Valentin JB, Lachot S, Lemarié E, Rollin J, Gruel Y, et al. Increased tissue factor expression is associated with reduced survival in non-small cell lung cancer and with mutations of TP53 and PTEN. Clin Chem. 2009;55(10):1834-42.

Rickles FR, Hair GA, Zeff RA, Lee E, Bona RD. Tissue factor expression in human leukocytes and tumor cells. Thromb Haemost. 1995;74(1):391-5.

Rondon AMR, Kroone C, Kapteijn MY, Versteeg HH, Buijs JT. Role of tissue factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. Semin Thromb Hemost. 2019;45(4):396-412.

Rosen ED, Chan JC, Idusogie E, Clotman F, Vlasuk G, Luther T, et al. Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. Nature. 1997;390(6657):290-4.

Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. Pharmacol Res. 2012;66(2):105-43.

Saber H, Leighton JK. An FDA oncology analysis of antibody-drug conjugates. Regul Toxicol Pharmacol. 2015;71(3):444-52.

Sawada M, Miyake S, Ohdama S, Matsubara O, Masuda S, Yakumaru K, et al. Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. Br J Cancer. 1999;79(3-4):472-7.

Schaffner F, Versteeg HH, Schillert A, Yokota N, Petersen LC, Mueller BM, et al. Cooperation of tissue factor cytoplasmic domain and PAR2 signaling in breast cancer development. Blood. 2010;116(26):6106-13.

Sen P, Neuenschwander PF, Pendurthi UR, Rao LV. Analysis of factor VIIa binding to relipidated tissue factor by surface plasmon resonance. Blood Coagul Fibrinolysis. 2010;21(4):376-9.

Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A, Ishigami S, Arii S, et al. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. Cancer. 2000;88(2):295-301.

Shimizu S, Ogawa T, Takezawa K, Tojima I, Kouzaki H, Shimizu T. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in nasal mucosa and nasal secretions of chronic rhinosinusitis with nasal polyp. Am J Rhinol Allergy. 2015;29(4):235-42.

Song HB, Park KD, Kim JH, Kim DH, Yu YS, Kim JH, et al. Tissue factor regulates tumor angiogenesis of retinoblastoma via the extracellular signal-regulated kinase pathway. Oncol Rep. 2012;28(6):2057-62.

Sorensen BB, Rao LV, Tornehave D, Gammeltoft S, Petersen LC. Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa. Blood. 2003;102(5):1708-15.

Srinivasan R, Ozhegov E, van den Berg YW, Aronow BJ, Franco RS, Palascak MB, et al. Splice variants of tissue factor promote monocyte-endothelial interactions by triggering the expression of cell adhesion molecules via integrin-mediated signaling. J Thromb Haemost. 2011;9(10):2087-96.

Stagg NJ, Shen BQ, Brunstein F, Li C, Kamath AV, Zhong F, et al. Peripheral neuropathy with microtubule inhibitor containing antibody drug conjugates: challenges and perspectives in translatability from nonclinical toxicology studies to the clinic. Regul Toxicol Pharmacol. 2016;82:1-13.

Suh TT, Holmbäck K, Jensen NJ, Daugherty CC, Small K, Simon DI, et al. Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. Genes Dev. 1995;9(16):2020-33.

Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmbäck K, et al. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(13):7597-602.

Thachil J, Tang N, Gando S, Falanga A, CattaneoM, Levi M, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. J Thromb Haemost. 2020;18(5):1023-6.

Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Broze GJ Jr. Effect of tissue factor deficiency on mouse and tumor development. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(13):6922-6.

Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ Jr. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. Blood. 1996;88(5):1583-7.

Tripodi A. Thrombin generation assay and its application in the clinical laboratory. Clin Chem. 2016;62(5):699-707.

Tuddenham EG, Pemberton S, Cooper DN. Inherited factor VII deficiency: genetics and molecular pathology. Thromb Haemost. 1995;74(1):313-21.

van den Berg YW, van den Hengel LG, Myers HR, Ayachi O, Jordanova E, Ruf W, et al. Alternatively spliced tissue factor induces angiogenesis through integrin ligation. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106(46):19497-502.

van der Logt CP, Dirven RJ, Reitsma PH, Bertina RM. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbolester. Blood Coagul Fibrinolysis. 1994;5(2):211-20.

Versteeg HH. Tissue factor: old and new links with cancer biology. Semin Thromb Hemost. 2015;41(7):747-55.

Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Ellies LG, Andrade-Gordon P, Mueller BM, et al. Protease-activated receptor (PAR) 2, but not PAR1, signaling promotes the development of mammary adenocarcinoma in polyoma middle T mice. Cancer Res. 2008b;68(17):7219-27.

Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Petersen HH, Ahamed J, Felding-Habermann B, et al. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. Blood. 2008a;111(1):190-9.

Versteeg HH, Spek CA, Richel DJ, Peppelenbosch MP. Coagulation factors VIIa and Xa inhibit apoptosis and anoikis. Oncogene. 2004b;23(2):410-7.

Versteeg HH, Spek CA, Slofstra SH, Diks SH, Richel DJ, Peppelenbosch MP, et al. FVIIa:TF induces cell survival via G12/G13-dependent Jak/STAT activation and BclXL production. Circ Res. 2004a;94(8):1032-40.

Vrana JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. Cancer Res. 1996;56(21):5063-70.

Wang B, Xiong S, Hua Q, Chen C, Liao H, Chen L, et al. Tissue factor is strongly expressed in pericarcinomatous tissue in patients with laryngeal carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(10):13719-24.

Wikkelsoe AJ, Afshari A, Wetterslev J, Brok J, Moeller AM. Monitoring patients at risk of massive transfusion with Thrombelastography or Thromboelastometry: a systematic review. Acta Anaesthesiol Scand. 2011;55(10):1174-89.

Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. Trends Cardiovasc Med. 2016;26(4):297-303.

Wu B, Zhou H, Hu L, Mu Y, Wu Y. Involvement of PKCα activation in TF/VIIa/PAR2-induced proliferation, migration, and survival of colon cancer cell SW620. Tumour Biol. 2013;34(2):837-46.

Xue J, Wu Q, Westfield LA, Tuley EA, Lu D, Zhang Q, et al. Incomplete embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin deficiency in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(13):7603-7.