目次

1. 緒言 3
2. 申請する効能又は効果 3
3. 申請する用法及び用量 3
4. 参考文献 4

図目次

Figure 1　チソツマブ　ベドチンの構造 3

略語・略号一覧

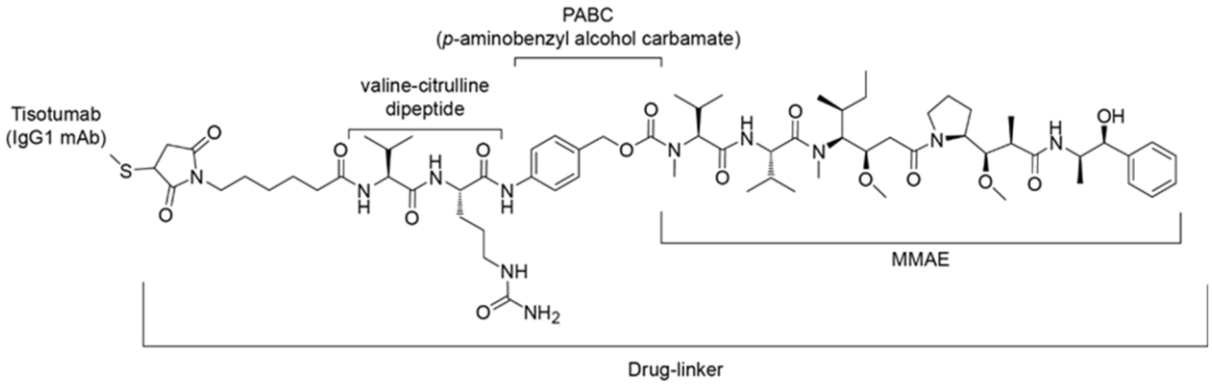
略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ADC	antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
IgG1	immunoglobulin G1	免疫グロブリン G1
MMAE	monomethyl auristatin E	モノメチルアウリスタチン E
TF	tissue factor	組織因子
vc	valine-citrulline	バリンーシトルリン

1.　緒言

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）を、プロテアーゼで切断可能なバリンーシトルリン（valine-citrulline、vc）リンカーを介して微小管阻害薬であるモノメチルアウリスタチン E（monomethyl auristatin E、MMAE）と共有結合させた抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate、ADC）である。チソツマブ　ベドチンの構造を Figure 1 に示す。薬物対抗体比は平均 4 である。TF は一般的に血管周囲の内皮細胞に発現する膜貫通型糖タンパク質であり、血管損傷後の主要な凝固開始分子である。癌組織に対して、TF は腫瘍増殖、血管新生及び転移等の複数の腫瘍促進作用に関与している。さらに、TF は複数のタイプの腫瘍で発現が増加しており、ADC を用いたがん治療の有望な標的となっている。

チソツマブ　ベドチンは様々な癌種に対して in vitro 細胞傷害活性及び in vivo 抗腫瘍活性を示している。チソツマブ　ベドチン、チソツマブ及び遊離型 MMAE の薬物動態学的特性は、有効性及び安全性に関する非臨床試験の計画及び結果の解釈に役立つよう、十分明らかにされている。チソツマブ　ベドチンの投与に関連した非臨床毒性は、MMAE を含む ADC で予測される作用と概して、一致していた（Saber et al., 2015）。非臨床試験の結果から、再発又は転移性子宮頸癌患者に対して、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。

Figure 1　チソツマブ　ベドチンの構造



IgG: immunoglobulin G1; mAb: monoclonal antibody; MMAE: monomethyl auristatin E
Note: The average drug-antibody ratio is 4.

2.　申請する効能又は効果

がん化学療法後に増悪した進行又は再発の子宮頸癌

3.　申請する用法及び用量

通常、成人にはチソツマブ　ベドチン（遺伝子組換え）として 1 回 2 mg/kg（体重）を 30 分以上かけて、3 週間間隔で点滴静注する。ただし、1 回量として 200 mg を超えないこと。

4.　参考文献

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

目次

1.　まとめ 8
1.1　各種ヒト腫瘍組織での TF 発現 9
2.　効力を裏付ける試験 12
2.1　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの作製 12
2.2　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの標的結合特性 12
2.2.1　TF に対する結合活性（ELISA） 13
2.2.2　細胞表面に発現する TF に対する結合活性（フローサイトメトリー） 13
2.2.3　TF に対する親和性及び結合性（BIAcore 分析） 14
2.2.4　TF 結合ドメインの同定 14
2.2.5　TF:Fab 複合体の X 線結晶構造解析 15
2.3　チソツマブ　ベドチンによる FVIIa の TF 結合及び TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達に対する阻害作用 15
2.3.1　FVIIa の TF 結合に対するチソツマブ　ベドチンの阻害作用 16
2.3.2　TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達に対する作用 16
2.4　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの細胞内取込み 18
2.4.1　細胞表面 TF 発現及び総 TF タンパク質の減少（定量的フローサイトメトリー） 18
2.4.2　リソソーム局在性（共焦点顕微鏡法） 19
2.4.3　リソソーム局在性（CypHer5E アッセイ） 20
2.4.4　リソソーム局在性（Fab-TAMRA アッセイ） 21
2.5　チソツマブ　ベドチンの MMAE を介した細胞傷害活性 22
2.5.1　直接的細胞傷害活性 22
2.5.2　細胞傷害活性に対する P-糖タンパク質の影響 24
2.5.3　MMAE 拡散によるバイスタンダー効果 25
2.6　チソツマブ　ベドチンによる ICD の誘導 26
2.7　チソツマブ　ベドチンの Fc を介したエフェクター機能 29
2.7.1　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンによる ADCC 活性 29
2.7.2　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンによる ADCP 活性 29
2.7.3　チソツマブによる CDC 活性 30
2.8　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの in vivo 抗腫瘍活性 30
2.8.1　CDX マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの抗腫瘍活性 31
2.8.2　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 35
2.8.3　CDX 及び PDX モデルでの in situ TF 発現レベル及びチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性の相関性 39
2.9　異種移植マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチン及び他の抗体又は化学療法の併用効果 40
3.　副次的薬理試験 48

3.1　血液凝固に対するチソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの影響 48
3.1.1　TF 誘導性 FXa 生成に対するチソツマブの影響 48
3.1.2　TF 誘導性凝固に対するチソツマブの影響 49
3.1.3　PT に対するチソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの影響 49
3.1.4　内因性 TF 活性に対するチソツマブの影響（TEG） 49
3.1.5　内因性 TF 活性に対するチソツマブの影響（TGA） 51

4.　安全性薬理試験 52
4.1　hERG K^+チャネルに対する MMAE の阻害作用 52
4.2　カニクイザルの心血管系、呼吸器系及び中枢神経系に対するチソツマブ　ベドチンの影響 53

5.　薬力学的薬物相互作用試験 54

6.　考察及び結論 54
6.1　考察 54
6.2　結論 56

7.　参考文献 56

表目次

Table 1　非臨床薬理試験で使用した被験物質の化合物コード 7
Table 2　各種ヒト腫瘍組織での TF 発現 11
Table 3　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの標的に対する in vitro 結合活性 14
Table 4　TF の FVIIa 結合及び TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達に対する in vitro 阻害作用 18
Table 5　CDX 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 33
Table 6　CDX マウスモデルに対するチソツマブの抗腫瘍活性 35
Table 7　PDX モデルに対するチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性 37
Table 8　異種移植マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチン及び他の抗体療法の併用投与による抗腫瘍活性 46
Table 9　異種移植マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチン及び化学療法の併用投与による抗腫瘍活性 47
Table 10　TEG 及び TGA で評価した凝固時間に対するチソツマブの影響（個体値） 51

図目次

Figure 1　BxPC-3 細胞での TF:FVIIa 複合体による ERK リン酸化に対するチソツマブの阻害作用 17
Figure 2　チソツマブとリソソームマーカーLAMP-1 の共局在 20
Figure 3　チソツマブのリソソームへの輸送 21

Figure 4　チソツマブ　ベドチンの子宮頸癌細胞株（2 種）に対する細胞傷害活性.....23
Figure 5　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.....24
Figure 6　TF 高発現接着細胞及び TF 低発現浮遊細胞の共培養に対するチソツマブ　ベドチンの細胞傷害活性.....26
Figure 7　子宮頸癌 PDX モデル（CEXF 773）に対するチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性 39
Figure 8　CDX 及び PDX モデルでの in situ TF 発現レベル（H スコア）及びチソツマブ　ベドチンによる in vivo 抗腫瘍活性の相関.....40
Figure 9　乳癌 CDX マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチン及びペムブロリズマブ併用投与による抗腫瘍活性.....41
Figure 10　子宮頸癌 PDX モデル（CV1248）に対するチソツマブ　ベドチン及びベバシズマブ併用投与による抗腫瘍活性 42
Figure 11　子宮頸癌 PDX モデル（CV1802）に対するチソツマブ　ベドチン及びベバシズマブ併用投与による抗腫瘍活性 43
Figure 12　子宮頸癌 PDX モデル（CV1248）に対するチソツマブ　ベドチン及びシスプラチン併用投与による抗腫瘍活性 44
Figure 13　子宮頸癌 PDX モデル（CV1248）に対するチソツマブ　ベドチン及びカルボプラチン併用投与による抗腫瘍活性 44

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）
7-AAD	7 aminoactinomycin D	7–アミノアクチノマイシン D
ABCB	adenosine triphosphate binding cassette subfamily B member	アデノシン三リン酸結合カセットサブファミリーB メンバー
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
APC	allophycocyanin	アロフィコシアニン
ATF	activating transcription factor	–
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
CD	cluster of differentiation	–
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CDX	cell line-derived xenograft	細胞株由来異種移植
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester	カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル
^{51}Cr	chromium-51	クロム 51
CTD	Common Technical Documant	コモン・テクニカル・ドキュメント
CTI	corn trypsin inhibitor	トウモロコシ由来トリプシン阻害剤
DAR	drug to antibody ratio	薬物抗体比
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
ER	endoplasmic reticulum	小胞体
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	–
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded	ホルマリン固定パラフィン包埋
FITC	fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
FMAT	fluorometric microvolume assay technology	蛍光微量アッセイ技術
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
FIX	coagulation factor IX	血液凝固第 IX 因子
FIXa	activated coagulation factor IX	活性型血液凝固第 IX 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
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
HER2	human epidermal growth factor receptor	ヒト上皮成長因子受容体 2

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）
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
HMGB1	high-mobility group box 1	−
HRP	horseradish peroxidase	西洋わさびペルオキシダーゼ
H-score	histo score	ヒストスコア（H スコア）
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICD	immunogenic cell death	免疫原性細胞死
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
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学的検査
IL	interleukin	インターロイキン
INN	international nonproprietary name	国際一般名称
IRE1	inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease 1	−
JAK/STAT	janus kinase/signal transducer and activator of transcription	ヤヌスキナーゼ／シグナル伝達兼転写活性化因子
JAN	Japanese Accepted Names for Pharmaceuticals	日本医薬品一般的名称
JNK	Jun N-terminal kinase	Jun N 末端キナーゼ
LAMP-1	lysosome-associated membrane protein 1	リソソーム関連膜タンパク質 1
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
LT	the time to initial thrombin generation	トロンビン生成開始時間
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MAPK	mitogen activated protein kinase	分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ
mcMMAF	maleimidocaproyl monomethyl auristatin F	マレイミドカプロイルモノメチルアウリスタチン F
MFI	mean fluorescence intensity	平均蛍光強度
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
MIP-1β	macrophage inflammatory protein 1 beta	マクロファージ炎症性タンパク質 1β
MMAE	monomethyl auristatin E	モノメチルアウリスタチン E
MMAF	monomethyl auristatin F	モノメチルアウリスタチン F
MP	microparticle	マイクロパーティクル
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
NSCLC	non-small-cell lung cancer	非小細胞肺癌
NSG	NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ	−
PAR	protease-activated receptor	プロテアーゼ活性化受容体
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
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
PE	phycoerythrin	フィコエリスリン
p-ERK1/2	phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2	リン酸化 ERK1/2

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）
PERK	protein kinase R-like ER kinase	−
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
PI	propidium iodide	ヨウ化プロピジウム
PPP	platelet-poor plasma	乏血小板血漿
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RNA-seq	RNA-sequencing	RNA シーケンス
sABC	specific antibody-binding capacity	特異的抗体結合能
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合免疫不全
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
TFECDHis	histidine-tagged extracellular domain of human tissue factor	ヒスチジン標識したヒト組織因子細胞外ドメイン
TGA	thrombin generation assay	トロンビン生成アッセイ
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

被験物質の名称

チソツマブ　ベドチンの開発過程では、種々の名称及び化合物コードが使用されている。非臨床に関する CTD モジュール、報告書及び要約のレビューを容易にするために Table 1 にまとめた。

チソツマブ　ベドチンのモノメチルアウリスタチン E（monomethyl auristatin E、MMAE）部位は低分子化合物である。MMAE を用いた試験は、米国（BLA 125388）、EU（EMEA/H/C/002455）及び日本（JNDA 22600AMX00031）でのアドセトリス®（ブレンツキシマブ　ベドチン）の製造販売承認申請のために実施された。本資料では、当該承認申請資料に記載された MMAE の試験結果を要約し、相互参照した。

Table 1　非臨床薬理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
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－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）

1. まとめ

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（monoclonal antibody、mAb）（チソツマブ）を、プロテアーゼで切断可能なバリンーシトルリン（valine-citrulline、vc）リンカーを介して微小管重合阻害作用を有する MMAE と共有結合させた抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate、ADC）である。抗体 1 分子当たり平均 4 分子の MMAE と結合する。Genmab 社及び Seagen Inc. は、TF を発現する子宮頸癌及びその他の固形癌治療薬として、チソツマブ　ベドチンを共同開発している。

TF タンパク質は幅広い固形癌種で発現し、子宮頸癌は TF 発現率が最も高い癌種の 1 つである。効力を裏付ける試験では、チソツマブ　ベドチンがヒト TF 発現細胞に効率的に結合することが示された。チソツマブ　ベドチンは標的 TF に結合すると、TF と複合体を形成し、速やかに細胞内に取り込まれリソソームに輸送される。リソソームで vc リンカーが切断された後、MMAE が放出される（Doronina et al., 2003）。放出された MMAE は拡散し、微小管に結合して微小管重合を阻害し、その結果、細胞周期の停止及びアポトーシスを誘導する（FDA, 2011; Francisco et al., 2003）。これと一致して、チソツマブ　ベドチンは、TF 発現腫瘍細胞に対して MMAE を介した細胞傷害活性を効果的に誘導した（Breij et al., 2014）。In vivo 試験では、チソツマブ　ベドチンは TF 陽性の各種固形癌（子宮頸癌を含む）細胞株由来異種移植（cell line-derived xenograft、CDX）又は患者由来異種移植（patient-derived xenograft、PDX）マウスモデル（Breij et al., 2014）に対して強力な抗腫瘍活性を示した。チソツマブ　ベドチンの in vivo 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が、細胞傷害活性は細胞表面の TF 発現レベル（in vitro 及び in vivo）と相関していた。また、MMAE をペイロードとする ADC に対して薬物耐性を高める P-糖タンパク質（P-glycoprotein、P-gp）過剰発現細胞では、チソツマブ　ベドチンによる細胞傷害活性が非導入細胞と比較して低下した（Liu Kreyche et al., 2019）。

チソツマブ　ベドチンは、受容体を介した細胞内取込み及び直接的な細胞傷害作用に加えて、殺細胞作用の他の機序も有している。チソツマブ　ベドチンは、細胞膜を透過する放出型 MMAE の受動拡散を介して TF 低発現の隣接腫瘍細胞に対しても細胞傷害作用を発揮する、バイスタンダー効果を示した。また、チソツマブ　ベドチンは、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）活性等の fragment crystallizable（Fc）を介したエフェクター機能により細胞傷害活性を誘導した。さらに、チソツマブ　ベドチンは TF 結合に対して活性型血液凝固第 VII 因子（activated coagulation factor VII、FVIIa）と競合し、TF:FVIIa 複合体依存的な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］を in vitro で濃度依存的に阻害した。

MMAE による細胞傷害活性を介して免疫原性細胞死（immunogenic cell death、ICD）が誘導されることから、チソツマブ　ベドチンの MMAE による抗腫瘍活性はより増強される可能性がある。また、MMAE による ICD は in vitro で免疫細胞を活性化し、チソツマブ　ベドチンは対照群と比較して腫瘍に対する免疫応答を誘導することが in vivo で確認された。

以上をまとめると、チソツマブ　ベドチンは腫瘍細胞に対して、MMAE の直接的細胞傷害作用及びバイスタンダー効果、ICD 活性、ADCC 活性、ADCP 活性並びに TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達阻害を含む複数の細胞傷害作用機序を有することが示された。

副次的薬理試験では、チソツマブ又はチソツマブ　ベドチンの凝固系パラメーターに対する in vitro での影響を、TF に対する結合試験及び凝固検査により評価した。活性化血液凝固第 X 因子（FXa）生成試験及び一連の凝固検査［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、チソツマブ又はチソツマブ　ベドチンにより in vitro 血栓形成が遅延する可能性が示されたが、血栓強度は影響を受けなかった。以上の非臨床試験結果に基づくと、チソツマブ　ベドチンが血液凝固及び止血に影響を及ぼす可能性は否定できなかった。チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンはカニクイザル TF 及びヒト TF に対して同程度の結合活性を示すが、チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンを用いたカニクイザルの反復投与毒性試験では、出血時間及び凝固系パラメーターに対してそれぞれ 100 mg/kg 及び 5～6 mg/kg までの用量を投与しても明らかな影響は認められなかった。

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験で実施した安全性薬理検査では、6 mg/kg までの用量のチソツマブ　ベドチンを 3 週間間隔で 4 サイクル又は 5 サイクル投与しても、心電図、呼吸器系及び中枢神経系の機能に異常は認められなかった。

1.1　各種ヒト腫瘍組織での TF 発現

報告書番号 [redacted]1015-091、添付資料番号[4.2.1.1-1 項]
報告書番号 [redacted]1015-178、添付資料番号[4.2.1.1-2 項]
報告書番号 GMB1015-254、添付資料番号[4.2.1.1-3 項]
報告書番号 GMB1015-257、添付資料番号[4.2.1.1-4 項]

ヒト TF［別名：血液凝固第 III 因子、トロンボプラスチン又は cluster of differentiation（CD）142］は、263 アミノ酸残基からなる 43～47 kDa の 1 回膜貫通型糖タンパク質であり、サイトカイン受容体スーパーファミリーに分類される。正常な生理的条件下では、TF は止血及び血栓形成に関与し、血管損傷時の血液凝固反応の主要な開始因子であり、胚発生で重要な役割を果たす（Pedersen et al., 2005）。TF は血管内皮細胞に発現し、血管損傷により血中の可溶性凝固因子へ露出されると、血液凝固第 VII 因子（coagulation factor VII、FVII）又は FVIIa が TF の細胞外ドメインに結合して凝固反応が開始される（Versteeg et al., 2013）。TF:FVIIa 複合体は下流のシグナル伝達カスケードを惹起し、その結果、プロテアーゼ活性化受容体（protease-activated receptor、PAR）2 を介した細胞内シグナル伝達経路により血管新生が促進され、ヤヌスキナーゼ／シグナル伝達兼転写活性化因子（janus kinase/signal transducer and activator of transcription、JAK/STAT）経路を介してアポトーシスが阻害される（Versteeg et al., 2004a）。

腫瘍形成時は、TF 発現の厳密な調節が失われる。TF タンパク質の発現は、多様な種類の腫瘍の腫瘍細胞及び間質細胞で増加しており（Rondon et al., 2019）、TF 発現は転移頻度と相関し、予後不良因子となる場合が多い（Kakkar et al., 1995; Mueller et al., 1992; Rickles et al., 1995; Seto et al., 2000; Zhou et al., 1998）。TF:FVIIa 複合体による腫瘍細胞上の PAR2 活性化は腫瘍増殖を促進

する（Kasthuri et al., 2009; Ruf, 2007; Ruf et al., 1996）。加えて、腫瘍細胞は環境特異的に TF を利用する：例えば、TF:FVIIa 複合体によるシグナル伝達は血管新生に寄与し、TF による血液凝固は腫瘍細胞の転移部位へのホーミングに寄与する（Kasthuri et al., 2009; Mueller et al., 1992; Palumbo et al., 2000）。また、腫瘍細胞上での TF 依存的なトロンビン生成及び PAR1 の活性化により、腫瘍増殖が促進される可能性がある（Bluff et al., 2008）。

多様な種類の固形癌での TF 異常発現が報告されている（Rondon et al., 2019）。各種固形癌での TF 発現を体系的に検討するために、原発性ヒト腫瘍生検から採取したホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded、FFPE）組織を用いた腫瘍マイクロアレイを実施し、ヒト TF を認識するマウス mAb（クローン HTF-1）を用いた免疫組織化学的検査（immunohistochemistry、IHC）によって発現を評価したところ、FFPE 組織の染色パターンは凍結切片でのチソツマブと同様であったが、TF の検出感度はより高くなった（報告書番号 [redacted]1015-091）。各腫瘍検体から組織コアを作製した。

IHC 分析では、幅広い癌種での TF 発現も示され、この結果は、[redacted]との共同研究（胃癌：報告書番号 GMB1015-254 及び GMB1015-257）又は[redacted]（その他の癌：報告書番号[redacted]1015-178 及び GMB1015-257）で実施された別の試験でも確認された（de Bono et al., 2022）。結果を Table 2 に示す。TF は、検討した全ての腫瘍組織で発現が確認されたが、発現頻度及び染色強度は、癌種によって異なっていた。TF 陽性腫瘍（TF 陽性腫瘍細胞が 10%を超える場合と定義）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%）及び頭頸部扁平上皮癌（75%）で高発現していた。大部分の腫瘍組織では主に細胞膜の染色（頭頸部扁平上皮癌、食道癌、子宮頸癌、大腸癌、子宮内膜癌）又は細胞質及び細胞膜で同程度の染色［NSCLC、卵巣癌、前立腺癌、乳癌、膵癌］が認められた。膠芽腫と膀胱癌では、主に細胞質の染色が認められた。社内データ（77%）及び文献（94%～100%）の IHC 分析で、子宮頸癌は TF 発現率が最も高い癌種の 1 つであった（Cocco et al., 2011a; Srinivasan et al., 2011）。

結論として、IHC 分析結果から、TF は幅広い固形癌種で発現し、子宮頸癌は細胞膜上の TF 発現率が最も高い癌種の 1 つであることが示された。

Table 2　各種ヒト腫瘍組織での TF 発現

Indication	Median TF H-Score[a] (Q1, Q3)[b]		Median Percentage TF-Expressing Cells per Core[c] (Q1, Q3)[b]		Prevalence of Tumor Samples with TF Expression		
	Cytoplasm	Membrane	Cytoplasm	Membrane	Genmab Data[d, e]	Reported in Literature	References
Glioblastoma	128 (70, 167)	5 (0, 15)	95 (63, 100)	4 (0, 10)	93% (56 of 60)	90%-95%	(Guan et al., 2002; Hamada et al., 1996; Takano et al., 2000; Takeshima et al., 2000)
Pancreatic cancer	87 (41, 150)	102 (30, 175)	65 (27, 95)	50 (20, 90)	86% (51 of 59)	61%-100%	(Chen et al., 2014; Haas et al., 2006; Khorana et al., 2007; Nitori et al., 2005; Wojtukiewicz et al., 2001)
Cervical cancer	25 (3, 103)	80 (11, 181)	20 (3, 65)	55 (8, 100)	77% (47 of 61)	94%-100%	(Cocco et al., 2011a; Srinivasan et al., 2011; Zhao et al., 2018)
NSCLC	24 (4, 78)	23 (1, 70)	20 (4, 64)	19 (1, 65)	77% (46 of 60)	34%-88%	(Goldin-Lang et al., 2008; Koomagi et al., 1998; Regina et al., 2008; Sawada et al., 1999; Wang et al., 2005)
SCCHN	37 (6, 106)	77 (13, 149)	29 (5, 65)	51 (9, 90)	75% (45 of 60)	63%-100%	(Kaido et al., 2005; Poon et al., 2003)
Endometrial cancer	12 (3, 68)	44 (6, 104)	11 (2, 60)	29 (5, 60)	70% (42 of 60)	14%-100%	(Cocco et al., 2010; Fadare et al., 2011)
Prostate cancer	30 (1, 94)	25 (1, 128)	22 (1, 64)	20 (1, 60)	68% (41 of 60)	47%-78%	(Abdulkadir et al., 2000; Akashi et al., 2003; Kaushal et al., 2008; Ohta et al., 2002; Yao et al., 2009)
Esophageal cancer	3 (0, 20)	27 (3, 120)	2 (0, 16)	20 (2, 65)	63% (39 of 62)	43%-91%	(Chen et al., 2010; Motoori et al., 2014)
Ovarian cancer	5 (1, 50)	5 (0, 50)	5 (1, 30)	4 (0, 38)	47% (28 of 60)	75%-100%	(Abu Saadeh et al., 2013; Cocco et al., 2011b; Uno et al., 2007; Yokota et al., 2009)
Bladder cancer	3 (0, 31)	0 (0, 4)	3 (0, 20)	0 (0, 3)	38% (22 of 58)	78%	(Patry et al., 2008)
Breast cancer	0 (0, 5)	0 (0, 3)	0 (0, 4)	0 (0, 2)	24%[f] (20 of 85)	31%-100%	(Kocaturk et al., 2015; Kocaturk et al., 2013; Ryden et al., 2010; Stampfli et al., 2017; Sturm et al., 1992; Ueno et al., 2000; Vrana et al., 1996; Wojtukiewicz et al., 2016)
Colorectal cancer[e]	40 (4, 100)	53 (10, 133)	28 (2, 63)	40 (5, 66)	76% (22 of 29)	41%-100%	(Nakasaki et al., 2002; Seto et al., 2000; Shigemori et al., 1998; Wan et al., 2002)

IHC: immunohistochemistry;;NSCLC: non-small-cell lung cancer; SCCHN: squamous cell carcinoma of the head and neck; TF: tissue factor; TNBC: triple-negative breast cancer

a　H-score (histo score) was calculated from staining intensity (0, 1, 2, 3) determined via IHC, as follows: [1 × (% cells with intensity 1) + 2 × (% cells with intensity 2) + 3 × (% cells with intensity 3)].

b　25, 75 percentiles (Q1, Q3)

c　TF-expression: cells staining for TF with intensity 1, 2, or 3, as determined via IHC

d　Tumor tissues were scored positive if ≥ 10% of tumor cells were found to express TF in membrane or cytoplasm.

e　Data for all indications were obtained by [redacted] ([redacted]1015-178), except for colorectal cancer, these were scored at Genmab US, Inc. (GMB1015-254)

f　Genmab data, prevalence was determined separately for TNBC (36%, 16 of 45) and non-TNBC (10%, 4 of 40)

Source: Study [redacted]1015-178, GMB1015-254, and GMB1015-257

2.　効力を裏付ける試験

チソツマブ　ベドチンの効力を裏付ける in vitro 試験では、各種ヒト腫瘍組織での TF 発現解析、チソツマブ　ベドチンの作製、標的結合特性、TF 結合に対する FVIIa との競合、TF:FVIIa 複合体を介した細胞内シグナル伝達の阻害、細胞内取込み、MMAE を介した細胞傷害作用、ICD 活性、Fc を介したエフェクター機能［ADCC、ADCP 及び補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity、CDC）活性を含む］を評価した。In vivo 試験では、CDX マウスモデルを用いたチソツマブの抗腫瘍活性、並びに CDX 及び PDX マウスモデルを用いたチソツマブ　ベドチンの単独投与及び併用投与による抗腫瘍活性を検討した。

一部の in vitro 試験では、チソツマブ　ベドチンの代替としてチソツマブ（HuMax-TF、チソツマブ　ベドチンの抗体部分）を用いて実施した。各試験で使用した被験物質（チソツマブ又はチソツマブ　ベドチン）ついては以下の各項で記載した。

2.1　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの作製

報告書番号 GMB1015-055、添付資料番号[4.2.1.1-5 項]

チソツマブ　ベドチンの抗体部分であるチソツマブは、TF 特異的 IgG1κ mAb であり、HuMAb マウス（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（Lonberg et al., 1995）。

ADC に使用するチソツマブを産生するハイブリドーマリード候補及びトランスフェクトーマの作製手順については、報告書番号 GMB1015-055 及び[3.2.S-2.3 項]に記載した。チソツマブ及びバリンーシトルリンモノメチルアウリスタチン E（valine-citrulline monomethyl auristatin E、vcMMAE）の結合によるチソツマブ　ベドチンの作製については[3.2.S-2.2 項]に記載した。

vcMMAE と結合した IgG1-1015-011（HuMax-TF 又はチソツマブ）を治験薬候補として選択し、HuMax-TF-ADC［国際一般名称（international nonproprietary name、INN）：Tisotumab vedotin、日本医薬品一般的名称（Japanese Accepted Names for Pharmaceuticals、JAN）：チソツマブ　ベドチン（遺伝子組換え）］と命名した。異種移植マウスモデルでの強力な抗腫瘍活性（2.8.1 項）及びカニクイザルでの許容できる安全性プロファイル（「2.6.6　毒性試験の概要文」参照）に基づき、チソツマブ　ベドチンを選択した。

チソツマブ　ベドチンとチソツマブの直接比較により、標的結合性、細胞内取込み及び Fc 介在性エフェクター機能は同程度であることが明らかとなった。このことから、チソツマブの機能特性、すなわち Fc 領域に依存する特性並びに antigen-binding fragment（Fab）領域に依存する特性は、vcMMAE との結合後も維持されていることが示された。したがって、MMAE との結合により追加の抗腫瘍活性（腫瘍細胞に対する直接的な細胞傷害作用、隣接腫瘍細胞に対するバイスタンダー効果及び ICD 活性等）が得られるものの、チソツマブを用いた非臨床薬理試験結果は、チソツマブ　ベドチンにも同様に適用できると考えられる。

2.2　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの標的結合特性

チソツマブ　ベドチンの標的結合特性を評価するため、3 種類の異なる分析法：酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA）、フローサイトメトリー及び BIAcore

分析を用いた。ヒト TF とマウス TF の DNA シャッフリングにより作製した遺伝子組換えタンパク質を用いたフローサイトメトリー及び遺伝子組換えヒト TF とチソツマブ Fab の複合体（TF:Fab 複合体）の結晶構造解析により結合領域を決定した。一部の試験では、チソツマブ　ベドチンの代替として非結合型抗体であるチソツマブを用いた。代替（サロゲート）分子の使用は以下の項で明記する。

以下の項に示すように、チソツマブ　ベドチンはヒト TF 発現細胞に効率的に結合し、ナノモル濃度（3.2 nmol/L；0.47 µg/mL）で強い結合親和性を示した。チソツマブとチソツマブ　ベドチンの結合特性は同様であり、標的結合は vcMMAE との結合による影響を受けないことが示された。ヒトとマウスのキメラ TF コンストラクトを用いた試験結果から、チソツマブの結合には TF タンパク質の 42～84 番目のアミノ酸残基が関与していることが示唆された。また、X 線結晶構造解析で TF:Fab 複合体に TF と FVIIa の複合体（TF:FVII 複合体）を重ね合わせた結果、これらのアミノ酸残基が TF と FVIIa の間の相互作用に重要であることが予測された。

2.2.1　TF に対する結合活性（ELISA）

報告書番号 GMB1015-083、添付資料番号[4.2.1.1-6 項]

TF の細胞外ドメインに対するチソツマブ　ベドチンの結合活性を測定するために、ヒスチジン標識ヒト TF 細胞外ドメイン（histidine-tagged extracellular domain of human tissue factor、TFECDHis）を固定した ELISA プレートでチソツマブ　ベドチンを測定した。

TFECDHis（1.25 µg/mL）を 96 ウェルプレートに固定化し、段階希釈したチソツマブ　ベドチン（0.078～5.0 µg/mL）と室温で 90 分間インキュベートした。チソツマブ　ベドチンの結合は、西洋わさびペルオキシダーゼ（horseradish peroxidase、HRP）標識マウス抗ヒト IgG1 抗体を用いて検出した。チソツマブ　ベドチンは TFECDHis に特異的かつ濃度依存的に結合した。

チソツマブとチソツマブ　ベドチンを直接比較したところ、TFECDHis への結合に対する 50%効果濃度（50% effective concentration、EC_{50}）は同程度であることが示された（それぞれ 0.37 及び 0.47 µg/mL）（Table 3）。

2.2.2　細胞表面に発現する TF に対する結合活性（フローサイトメトリー）

報告書番号 GMB1015-083、添付資料番号[4.2.1.1-6 項]

ヒト腫瘍細胞に発現する TF に対するチソツマブの結合活性を明らかにするため、TF 陽性の乳癌細胞株 MDA-MB-231、類表皮癌細胞株 A431 及び膵癌細胞株 BxPC-3 を用いてフローサイトメトリーを実施した。チソツマブとチソツマブ　ベドチンの結合活性の比較には膵癌細胞株 HPAF-II を用いた。MDA-MB-231、A431、BxPC-3 及び HPAF-II の TF 発現は、市販のマウス抗ヒト TF 抗体を用い、取扱説明書に従って定量的フローサイトメトリー（QIFIKIT®）により確認及び定量した。検討した全ての細胞株は、TF を高発現していることが示された［特異的抗体結合能（specific antibody-binding capacity、sABC）＞300000/cells；2.5.1 項参照］。

腫瘍細胞（100000 cells/well）と段階希釈したチソツマブ（0.0005～30 µg/mL）を氷上で 30 分間インキュベートした。チソツマブの結合は、フィコエリスリン（phycoerythrin、PE）標識ヤギ抗ヒト IgG（Fc 特異的）ポリクローナル抗体を用いて検出した。チソツマブは、A431、BxPC-

3、MDA-MB-231 及び HPAF-II の全てに効率的に結合し、EC_{50} 値はそれぞれ 0.03、0.15、0.07 及び 0.31 μg/mL であった。

HPAF-II に対するチソツマブとチソツマブ　ベドチンの結合活性は極めて類似しており（EC_{50} 値はそれぞれ 0.31 及び 0.35 μg/mL）、チソツマブの結合活性は vcMMAE との結合後も変化しないことが示された（Table 3）。

2.2.3　TF に対する親和性及び結合性（BIAcore 分析）

報告書番号 GMB1015-083、添付資料番号[4.2.1.1-6 項]

ヒト TF に対するチソツマブ　ベドチンの親和性は、チソツマブ　ベドチンの代替分子としてチソツマブを用いて BIAcore により測定した。

チソツマブ（固定化量：500 レゾナンスユニット）をセンサーチップに固定化し、TFECDHis［濃度範囲 3.1～197 nmol/L（約 80 ng/mL～5 μg/mL）］に曝露して TF に対する親和性を測定した。チソツマブの結合性は、TFECDHis（固定化量：300 レゾナンスユニット）をセンサーチップに固定化し、チソツマブ［0.42～6.67 nmol/L（63 ng/mL～1.0 μg/mL）］に曝露して測定した。親和性及び結合性の測定では、いずれもダブルレファレンスサブトラクション及び 1：1 ラングミュア結合モデルを用いて速度論的解析を行った。

チソツマブは TF に対して、親和性 3.2 nmol/L（約 0.5 μg/mL）、結合性 0.47 nmol/L（約 0.07 μg/mL）で結合した（Table 3）。

Table 3　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの標的に対する in vitro 結合活性

Assay	Source of TF	Tisotumab		Tisotumab Vedotin	
		μg/mL	nmol/L	μg/mL	nmol/L
ELISA	TFECDHis	0.37	2.5	0.47	3.1
Flow cytometry	A431 cells	0.03	0.19	NC	NC
	BxPC-3 cells	0.15	1.01	NC	NC
	MDA-MB-231 cells	0.07	0.46	NC	NC
	HPAF-II cells	0.31	2.1	0.35	2.3
BIAcore	TFECDHis (affinity)	0.47	3.2	NC	NC
	TFECDHis (avidity)	0.07	0.47	NC	NC

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; NC: not conducted; TF: tissue factor; TFECDHis: histidine-tagged extracellular domain of human tissue factor
Source: Study GMB1015-083

2.2.4　TF 結合ドメインの同定

報告書番号 GMB1015-083、添付資料番号[4.2.1.1-6 項]

ヒト TF の細胞外ドメインのうち、どのドメインがチソツマブ　ベドチンの結合に重要であるかを明らかにするために、ヒト TF とマウス TF の DNA シャッフリングにより、マウスとヒトのキメラ TF コンストラクトを作成した。ヒトとマウスの TF の相同性はタンパク質レベルで 56%であり、チソツマブ　ベドチンはマウスの TF を認識しない（[2.6.6-8.1.1 項]；報告書番号 GMB1015-088）。したがって、ヒト TF ドメインがチソツマブ　ベドチンの結合に重要である場合、そのドメインをマウスドメインで置換すると結合しなくなる。

シャッフルコンストラクトは、ヒトドメインをマウスドメインで置換したヒト TF をコードする DNA 及びマウスドメインをヒトドメインで置換したマウス TF をコードする DNA から作製した。シャッフルコンストラクトをヒト胎児腎（human embryonic kidney、HEK）293F 細胞に発現させ、チソツマブ（30 μg/mL）（チソツマブ　ベドチンの代替として）のキメラ TF 分子に対する結合をフローサイトメトリーにより測定した。チソツマブは、ヒト TF タンパク質の 42～84 番目のアミノ酸残基をコードするヒト配列をマウス配列で置換したコンストラクトから発現させた TF に対して結合の低下を示したことから、このドメイン内のアミノ酸がチソツマブの結合に関与していることが示唆された。このドメインのアミノ酸残基は TF と FVIIa の間の相互作用に重要であることが報告されている（Chu, 2011; Muller et al., 1996）。

2.2.5　TF:Fab 複合体の X 線結晶構造解析

報告書番号 [redacted]1015-191、添付資料番号[4.2.1.1-7 項]

X 線結晶構造解析のため、TF:Fab を結晶化した（[3.2.S-3.1.2.3.2 項]）。

分子構造可視化ソフト（PyMOL）（Banner et al., 1996）を用いた構造アラインメントにより、タンパク質の立体構造データベースから選択した TF:FVIIa 複合体（ID：1DAN）に TF:Fab 複合体を重ね合わせた。その結果、チソツマブ Fab と FVII/FVIIa の重鎖との間に立体障害が広範囲で認められたことから、チソツマブの結合により FVII/FVIIa と TF の結合が阻害されることが示唆され、結合活性試験の結果と一致した（2.3.1 項）。

2.3　チソツマブ　ベドチンによる FVIIa の TF 結合及び TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達に対する阻害作用

TF 特異的抗体は、TF とその生理的リガンド FVII/FVIIa との相互作用を阻害する可能性がある。FVII/FVIIa はセリンプロテアーゼであり、一旦活性化されて TF に結合すると、生理的及び病理的条件下（例：がん）で止血及び止血以外の反応を開始する。止血反応では、TF:FVIIa 複合体が血液凝固第 X 因子（coagulation factor X、FX）及び血液凝固第 IX 因子（coagulation factor IX、FIX）の活性化［FXa 及び活性型血液凝固第 IX 因子（activated coagulation factor IX、FIXa）への変換］を触媒し、それに続くトロンビン及びフィブリン生成（McVey, 2016）や、損傷部位での血小板活性化及び血液凝固又はがん関連血栓症（Poon et al., 2003; Sawada et al., 1999）を誘導する。止血以外の反応として、がん細胞による TF 発現は、PAR2 活性化とその後の下流シグナル伝達との相互作用を介した腫瘍増殖、血管新生、転移等の発がん過程にも関与している（van den Hengel et al., 2011）。

TF 結合に対するチソツマブ　ベドチンと FVII/FVIIa の競合は、TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達及び TF 依存性血液凝固に影響を及ぼす可能性がある。本項では、チソツマブ　ベドチンと FVII/FVIIa の競合及びチソツマブによる TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達に対する阻害作用を検討した in vitro 試験について記述し、副次的薬理試験（3.1 項）では、チソツマブが TF 依存性血液凝固に及ぼす影響を検討した試験について記述する。競合結合試験はチソツマブ及びチソツマブ　ベドチンを用いて実施したが、細胞内シグナル伝達に対する阻害作用を検討した試験ではチソツマブのみを用いて実施した。

以下の項に示すように、TF 結合に対してチソツマブ　ベドチンは FVIIa と競合し、TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達を阻害することが明らかとなった。

2.3.1　FVIIa の TF 結合に対するチソツマブ　ベドチンの阻害作用

報告書番号 GMB1015-085、添付資料番号[4.2.1.1-8 項]

FVIIa の TF 結合に対するチソツマブの阻害作用を ELISA ベースアッセイで検討した。段階希釈したチソツマブ（0.0073～30 µg/mL）の存在下で、固相化した TFECDHis（0.5 µg/mL）と FVIIa（100 nmol/L）を室温で 1 時間インキュベートした。ポリクローナルウサギ抗 FVIIa 抗体を添加後、HRP 標識ブタ抗ウサギ抗体を用いて、結合した FVIIa を検出した。チソツマブは FVIIa の TF との結合を効率的に阻害し、50%阻害濃度（50% inhibitory concentration、IC_{50}）は 0.45 µg/mL であった。検討した最高濃度である 30 µg/mL で、チソツマブは FVIIa の TF 結合を 91%阻害した。同様に、チソツマブ　ベドチンは、フローサイトメトリーベースアッセイで、FVIIa の膜結合型 TF への結合を阻害した。HPAF-II 又は MDA-MB-231 細胞（100000 cells/well）を段階希釈したチソツマブ　ベドチン（0.0015～30 µg/mL）と 4°C で 15 分間インキュベートした後、FVIIa 50 nmol/L を添加し、4°C で 30 分間インキュベートした。ポリクローナルウサギ抗 FVIIa 抗体を添加後、PE 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて結合した FVIIa を検出した。フローサイトメトリーを用いて蛍光分析を実施した。チソツマブ　ベドチンは、FVIIa の HPAF-II 及び MDA-MB-231 細胞への結合をいずれも阻害した（IC_{50} 値はそれぞれ 0.39 及び 0.33 µg/mL）。チソツマブ　ベドチン（30 µg/mL）での結合阻害率は 61%（HPAF-II 細胞）及び 66%（MDA-MB-231 細胞）であった（Table 4）。チソツマブ　ベドチンと FVIIa を 37°C でインキュベートした場合も同様の結果が得られたことから、TF 結合に対するチソツマブ　ベドチンと FVIIa の競合は生理的に適切な温度でも生じることが示された。遺伝子組換えヒト TF 及び腫瘍細胞に発現する TF のいずれに対しても、チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの結合は同程度であったことから（2.2 項、報告書番号 GMB1015-083）、ELISA と比較してセルベースアッセイで FVIIa の TF 結合に対する阻害作用が多少低下したのは、チソツマブとチソツマブ　ベドチンとの差異ではなく、実験上の設定の違いに関連している可能性が高いと考えられる。

2.3.2　TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達に対する作用

報告書番号 GMB1015-085、添付資料番号[4.2.1.1-8 項]

TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達に対するチソツマブの in vitro 阻害作用を評価するため、TF:FVIIa 複合体による ERK1/2 のリン酸化及びその下流の IL-8 産生をチソツマブ存在下で測定した。

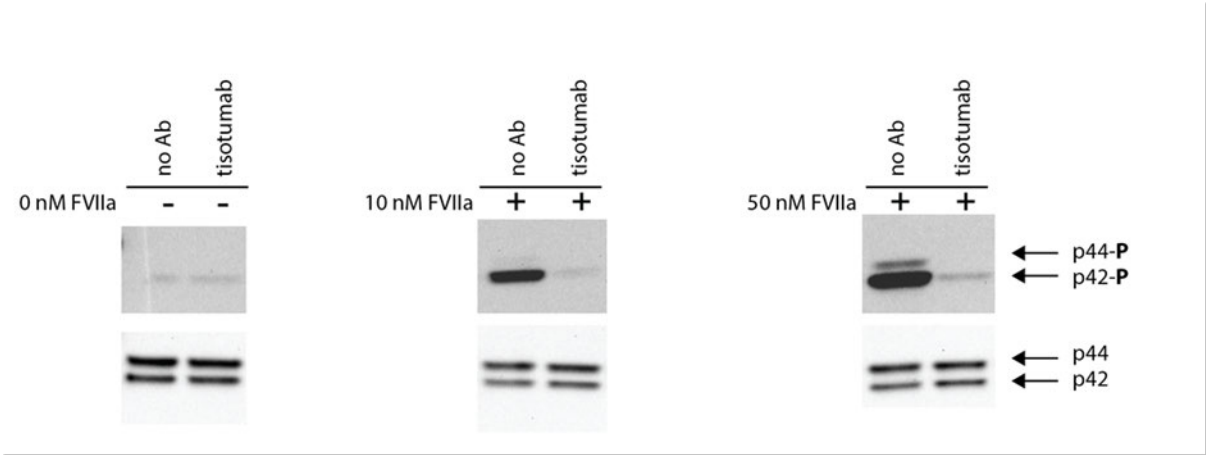
分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ（mitogen activated protein kinase、MAPK）p42/44 としても知られる ERK1/2 のリン酸化は、TF:FVIIa 複合体を介した PAR2 の活性化の下流で起こることが報告されている（Bluff et al., 2008）。同様に、IL-8 産生は、FVIIa が TF 陽性腫瘍細胞に結合した後に増加することが示されている（Hjortoe et al., 2004）。TF:FVII 依存性 ERK1/2 リン酸化及び IL-8 産生は、腫瘍細胞の増殖、遊走及び転移能に寄与することが示唆されている（Gessler et al., 2010; Hjortoe et al., 2004）。また、TF 特異的 mAb による TF:FVIIa 複合体を介したシグナル伝

達の阻害により、in vivo での腫瘍増殖が抑制されることが示唆されている（Versteeg et al., 2008a）。

チソツマブによる ERK1/2 リン酸化阻害作用

チソツマブによる ERK1/2 リン酸化阻害作用を、BxPC-3、HPAF-II 及び HaCaT（ヒトケラチノサイト）を用いて評価した（GMB1015-085）。細胞は 30 µg/mL のチソツマブと 37°C で 30 分間インキュベートした後、0、10 又は 50 nmol/L の FVIIa で、37°C で 10（HaCaT）又は 30 分間（BxPC-3 及び HPAF-II）刺激した。細胞を溶解し、ウェスタンブロット分析を用いて細胞溶解物中のリン酸化 ERK1/2（phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2、p-ERK1/2）を検出した。HaCaT、BxPC-3 及び HPAF-II で、チソツマブは FVIIa を介した ERK1/2 のリン酸化を 10 及び 50 nmol/L のいずれの濃度でも阻害した（BxPC-3 の結果を Figure 1 に示す）。

Figure 1　BxPC-3 細胞での TF:FVIIa 複合体による ERK リン酸化に対するチソツマブの阻害作用



Ab: antibody; ERK: extracellular signal regulated kinase; FVIIa: activated coagulation factor VII; p-ERK: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2; TF: tissue factor
BxPC-3 cells that had been pre-incubated with 30 µg/mL tisotumab were stimulated with FVIIa to induce phosphorylation of ERK1/2. Cells were lysed and p-ERK1/2 (p42-P/p44-P) and total ERK1/2 (p42/p44) were visualized using Western Blot.
Source: Study GMB1015-085

同様の結果は、チソツマブ存在下での ERK1/2 のリン酸化をより定量的に解析できる AlphaScreen［PerkinElmer 社製 AlphaScreen Surefire（Eglen et al., 2008）］を用いて、類表皮癌細胞株 A431 でも確認された。A431（30000 cells/well）を 0.014～10 µg/mL のチソツマブと 37°C で 30 分間インキュベートした後、ERK1/2 リン酸化を誘導するために 50 nmol/L の FVIIa を添加した。37°C で 10 分間インキュベートした後、細胞を溶解し、AlphaScreen アッセイを用いて細胞溶解物中の p-ERK1/2 を検出した。

TF:FVII 複合体を介した ERK1/2 リン酸化に対するチソツマブの IC_{50} 値は 0.12 µg/mL であり、10 µg/mL での最大阻害率は 69%であった（Table 4）。

チソツマブを介した IL-8 産生阻害作用

TF:FVII 複合体による IL-8 産生阻害作用を ELISA で測定した。MDA-MB-231 細胞（60000 cells/well）を段階希釈したチソツマブ（0.014～120 µg/mL）と 37°C で 15 分間インキュベートした。IL-8 産生を誘導するため、25 nmol/L の FVIIa（37°C で 2 時間）で刺激した。別のアッセイ条件では、細胞に 25 nmol/L の FVIIa を添加して 37°C で 30 分間インキュベートした後、チソツマブ（0.014～120 µg/mL）を添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。上清を採取し、IL-8 特異的 ELISA キットを用いて IL-8 濃度を測定した。FVIIa 刺激前に細胞をチソツマブとインキュベートした場合、チソツマブは TF:FVIIa 複合体による IL-8 産生を効果的に阻害し（IC_{50} 値は 0.78 µg/mL）、検討した最高濃度である 120 µg/mL での阻害率は 76%であった（Table 4）。一方、チソツマブ添加前に FVIIa と細胞をインキュベートした場合、IL-8 産生阻害作用は減弱した（IC_{50} 値は 10.0 µg/mL；最大阻害率は 67%；データ省略）。

Table 4　TF の FVIIa 結合及び TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達に対する in vitro 阻害作用

Assay		IC_{50} (µg/mL)	Maximum Inhibition[a]
Inhibition of FVIIa binding	ELISA	0.45	91%
	Flow cytometry (HPAF-II cells)	0.39	61%
	Flow cytometry (MDA-MB-231 cells)	0.33	66%
Inhibition of intracellular signaling	p-ERK1/2 AlphaScreen	0.12	69%
	Inhibition of IL-8 release	0.78	76%

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FVIIa: activated coagulation factor VII; IC_{50}: 50% inhibitory concentration; IL: interleukin; p-ERK1/2: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2; TF: tissue factor

a　Maximum inhibition was determined at 30 µg/mL (binding assays), 10 µg/mL (ERK phosphorylation assay), and 120 µg/mL (IL-8 release assay), respectively.

Source: Study GMB1015-085

2.4　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの細胞内取込み

TF 発現の卵巣癌細胞株 SK-OV-3 及び類表皮癌細胞株 A431 を用いた複数の異なる in vitro 試験で、標的結合及びリソソーム輸送時のチソツマブ　ベドチンの TF 発現減少作用及び細胞内取込みを評価した。細胞内取込み試験では、チソツマブをチソツマブ　ベドチンの代替として用いた。例外として、カルボキシテトラメチルローダミン（carboxytetramethylrhodamine、TAMRA）/QSY7 アッセイでは、同等性を示すためにチソツマブ　ベドチンとチソツマブの両方を評価した。

以下の項に示すように、これらの試験結果から、チソツマブ　ベドチンは TF 陽性細胞に結合すると効率的に取り込まれ、速やかに TF と複合体を形成してリソソームに輸送されることが示唆された。

2.4.1　細胞表面 TF 発現及び総 TF タンパク質の減少（定量的フローサイトメトリー）

報告書番号 GMB1015-087、添付資料番号[4.2.1.1-9 項]

抗体結合に伴う細胞表面タンパク質発現減少は、抗体の細胞内取込みを介している可能性がある（Sorkin et al., 2009）。チソツマブ結合に伴う細胞表面 TF 発現の減少は、チソツマブの結合とは競合しないマウス TF 特異的 mAb を用いた定量的フローサイトメトリー（QIFIKIT®）により評価した。

SK-OV-3 又は A431（10^5 cells）を 10 µg/mL のチソツマブと 37°C で 3 時間インキュベートした。モネンシンは、細胞内小胞のリサイクリングを阻害し、取り込まれたタンパク質を細胞内に捕捉する目的で用いた（Levkowitz et al., 1998）。チソツマブは、SK-OV-3 及び A431 の細胞表面 TF 発現をそれぞれ 40%及び 28%減少させることが定量的フローサイトメトリーで示された。

チソツマブによる総 TF タンパク質レベルの減少作用を評価するため、ELISA により TF タンパク質レベルを測定した。クロロキン又はロイペプチンの存在又は非存在下で、SK-OV-3 又は A431 をチソツマブ（10 µg/mL）と 48 時間インキュベートした。クロロキンは、エンドソーム／リソソームの酸性化阻害により後期エンドソームとリソソームの融合を阻害し（Vincent et al., 2005）、取り込まれた抗体をエンドソーム区画に捕捉する。ロイペプチンは、リソソームプロテアーゼの阻害剤である（Hausott et al., 2012）。細胞を溶解し、ELISA により総 TF タンパク質レベルを測定した。チソツマブは総 TF タンパク質レベルをある程度減少させたが（SK-OV-3 で 22%、A431 で 17%）、無処置群との統計学的有意差はみられなかった。

以上より、チソツマブはヒト腫瘍細胞株の細胞表面 TF 発現を減少させたが、総 TF タンパク質量の有意な減少作用はなかった。

2.4.2　リソソーム局在性（共焦点顕微鏡法）

報告書番号 GMB1015-087、添付資料番号[4.2.1.1-9 項]

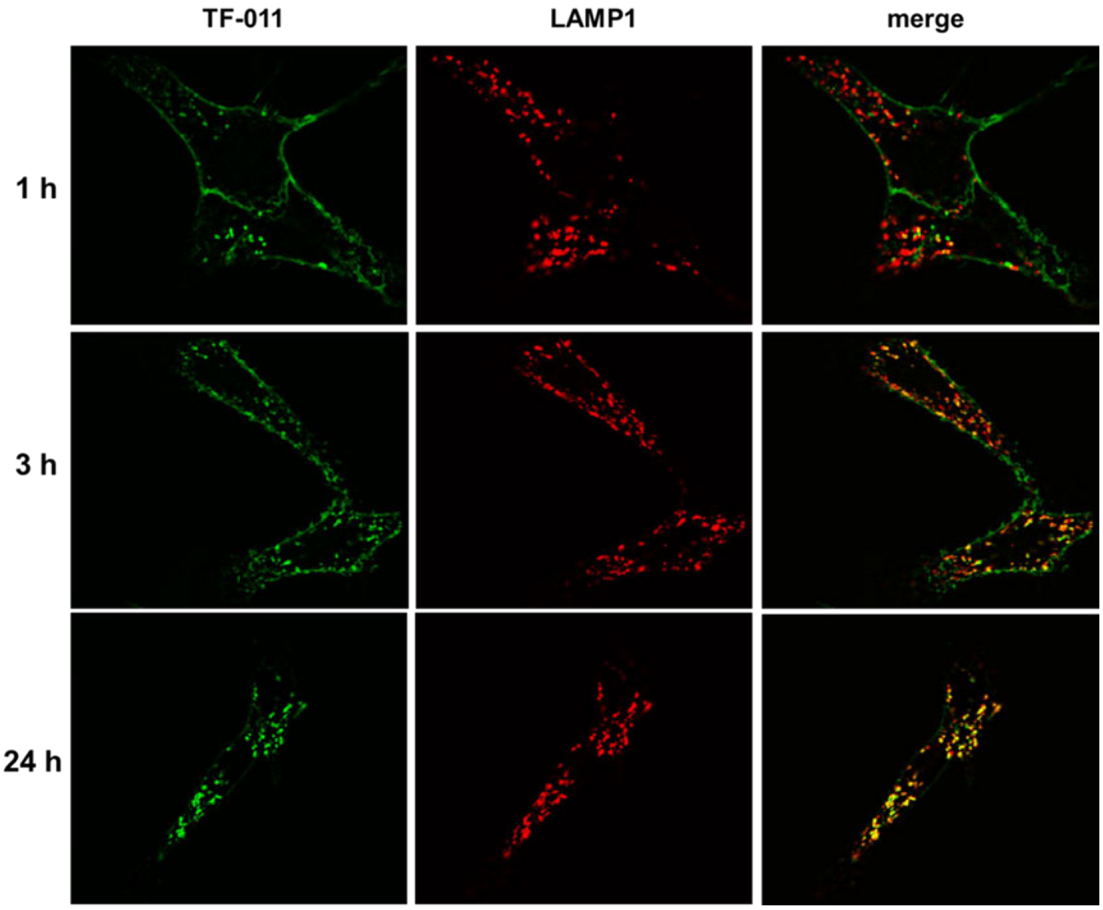
TF 及びチソツマブのリソソーム輸送を評価するため、共焦点顕微鏡を用いてリソソームマーカーであるリソソーム関連膜タンパク質 1（lysosome-associated membrane protein 1、LAMP-1、別名 CD107a）との共局在を検討した。

24 ウェルプレートのウェルにガラスカバースリップを置き、その上に SK-OV-3 又は A431（2×10^4 cells）を播種した。細胞は直ちに染色又はロイペプチン存在下で 1 µg/mL のチソツマブと 37°C で 1 又は 16 時間インキュベートした。細胞を 4%ホルムアルデヒドで固定し、マウス抗ヒト TF 抗体で染色後、フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate、FITC）標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いて TF を可視化又は FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG F(ab')$_2$ 抗体を用いてチソツマブを可視化し、アロフィコシアニン（allophycocyanin、APC）標識マウス抗ヒト LAMP-1 抗体を用いてリソソームを可視化した。細胞は、63 × 1.32～0.6 油浸対物レンズ及び LAS-AF ソフトウェアを装備した Leica SPE-II 共焦点顕微鏡を用いて画像化した。

共焦点顕微鏡で認められたリソソームマーカーの LAMP-1 との共局在により、TF（データ省略）及びチソツマブのリソソーム区画への輸送が SK-OV-3 及び A431 で確認された（SK-OV-3 細胞の結果を Figure 2 に示す）。チソツマブの取込み及び LAMP-1 との共局在化は、インキュベーション 1 時間後には既に認められ、16 時間後にはより増大していた。TF 及びチソツマブの取込み及びリソソームへの局在化は、例えば上皮成長因子受容体やヒト上皮成長因子受容体 2

（human epidermal growth factor receptor、HER2）タンパク質又はこれらタンパク質を標的とするADC と比較して迅速であった（de Goeij et al., 2015）。

Figure 2　チソツマブとリソソームマーカーLAMP-1 の共局在



APC: allophycocyanin; FITC: fluorescein isothiocyanate; LAMP: lysosome-associated membrane protein
Co-localization of tisotumab and LAMP-1 was assessed by confocal microscopy. SK-OV-3 cells were incubated with tisotumab (TF-011) for 1, 3, or 24 hours. Cells were permeabilized and incubated with goat anti-human IgG F(ab')$_2$-FITC to visualize tisotumab and with anti-LAMP-1-APC as a lysosomal marker. Data shown are FITC (left panels) and APC (middle panels) fluorescence and the merge of these images (right panels) after 1, 3, and 24 hours incubation with tisotumab. Representative pictures of one experiment (in which five images were taken per condition), out of at least three experiments performed, are shown. Source: Breij et al., 2014

2.4.3　リソソーム局在性（CypHer5E アッセイ）

報告書番号 GMB1015-087、添付資料番号[4.2.1.1-9 項]

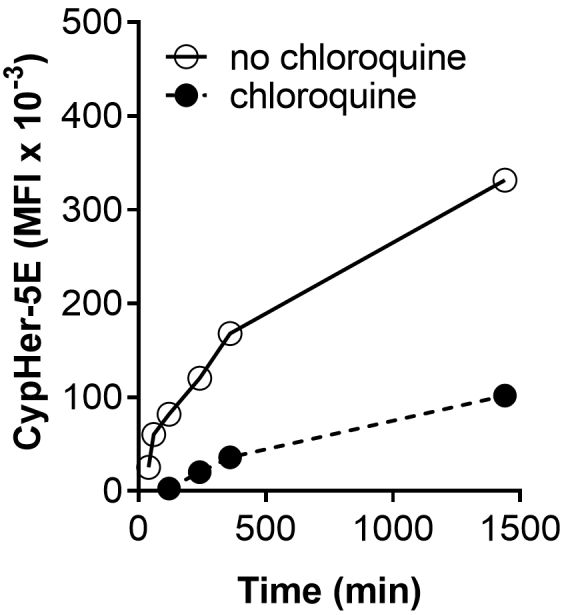
pH 感受性蛍光色素 CypHer5E を用いて、TF 発現腫瘍細胞のリソソーム区画へのチソツマブの取込みを更に検討した。同色素は pH7.4 では非蛍光性であり、pH5.5 で蛍光強度が最大となる。したがって、CypHer5E がエンドソーム及びリソソームの酸性環境へ取り込まれると高い蛍光シグナルを発する。

CypHer5E で標識したチソツマブ（1 µg/mL）を SK-OV-3 細胞（2 × 10^4 cells）とクロロキン存在又は非存在下で 4°C で 30 分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、37°C で 0、10、

40 及び 60 分並びに 2、4、6 及び 24 時間インキュベートした。取り込まれた CypHer5E の平均蛍光強度（mean fluorescence intensity、MFI）は、蛍光微量アッセイ技術（fluorometric microvolume assay technology、FMAT）を用いて測定した。

CypHer5E 蛍光はインキュベート開始 1 時間後から検出され、経時的に増強したことから（Figure 3）、チソツマブは細胞内に取り込まれて、酸性コンパートメントへ輸送されたことが示された。エンドソームとリソソームでの局在による蛍光を区別するために、細胞をクロロキンで前処理した。クロロキンによる CypHer5E 蛍光の阻害は、リソソーム局在化の阻害を意味する。CypHer5E で標識したチソツマブの蛍光は、クロロキン処理の 1 時間以内に明確に阻害されたことから、チソツマブは速やかにリソソームに輸送されることが示唆された。

Figure 3　チソツマブのリソソームへの輸送



FMAT: fluorometric microvolume assay technology; MFI: mean fluorescence intensity
SK-OV-3 cells, pre-incubated with (closed circles) or without (open circles) 100 µmol/L chloroquine, were incubated with CypHer5E-conjugated tisotumab. At the indicated time points, MFI of CypHer5E was measured per well by FMAT. Data shown are single measurements of one experiment performed.
Source: Study GMB1015-087

2.4.4　リソソーム局在性（Fab-TAMRA アッセイ）

報告書番号 GMB1015-087、添付資料番号[4.2.1.1-9 項]

TAMRA-QSY7 アッセイを用いて、チソツマブ　ベドチンの細胞内取込み及びリソソームへの局在性を評価した。本アッセイでは、蛍光体（TAMRA）及び消光剤（QSY7）のペアと抗ヒト IgG Fab フラグメントを結合し、チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンと複合体を形成させた。結合時の近接した状態では、QSY7 は TAMRA からのエネルギーを吸収し、蛍光は検出されない。エンドソーム及びリソソームの還元環境へ輸送後、TAMRA と QSY7 は解離し、結果として

TAMRA の脱消光（de-quenching）をもたらし、フローサイトメトリーを用いた測定が可能になる。

Fab-TAMRA-QSY7（66.7 ng/mL）とプレインキュベートしたチソツマブ及びチソツマブ　ベドチン（200 ng/mL）を、SK-OV-3 又は A431（1×10^5 cells）とインキュベートした。

インキュベート開始 6 時間後に蛍光シグナルが検出され、チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンは細胞内に取り込まれ、エンドソーム／リソソームに輸送されたことが示された。Fab-TAMRA/QSY7 アッセイでのチソツマブとチソツマブ　ベドチンとの直接比較により、チソツマブ　ベドチンとチソツマブによる TAMRA 蛍光は同程度であることが示された。このことから、vcMMAE 結合は内在化細胞内取込み及び内部輸送に影響しないことが示された。チソツマブの Fab フラグメントは効率的に細胞内に取り込まれなかったことから、二価抗体の結合が必要であることが示唆された。

2.5　チソツマブ　ベドチンの MMAE を介した細胞傷害活性

チソツマブ　ベドチンの 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を評価するため、in vitro 細胞生存率を測定した。MMAE がチューブリンに結合することにより、細胞内の微小管重合が阻害され、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（FDA, 2011; Francisco et al., 2003）。MMAE は疎水性であり、細胞内でリンカーが切断された後、標的細胞以外にも拡散し、活発に分裂している隣接した細胞にバイスタンダー効果を誘導することが報告されている（Okeley et al., 2010）。

以下の項に示すように、チソツマブ　ベドチンは TF 陽性腫瘍細胞に対して MMAE を介した強力な細胞傷害活性を示し、その効力は細胞膜上の TF 発現レベルと関連していた。また、チソツマブ　ベドチンの TF 高発現腫瘍細胞内取込み及び細胞内プロセシングにより遊離型 MMAE が拡散され、TF 低発現又は非発現の近傍細胞に対しても細胞傷害作用を発揮するバイスタンダー効果を誘導することが示された。

2.5.1　直接的細胞傷害活性

報告書番号 GMB1015-087、添付資料番号[4.2.1.1-9 項]

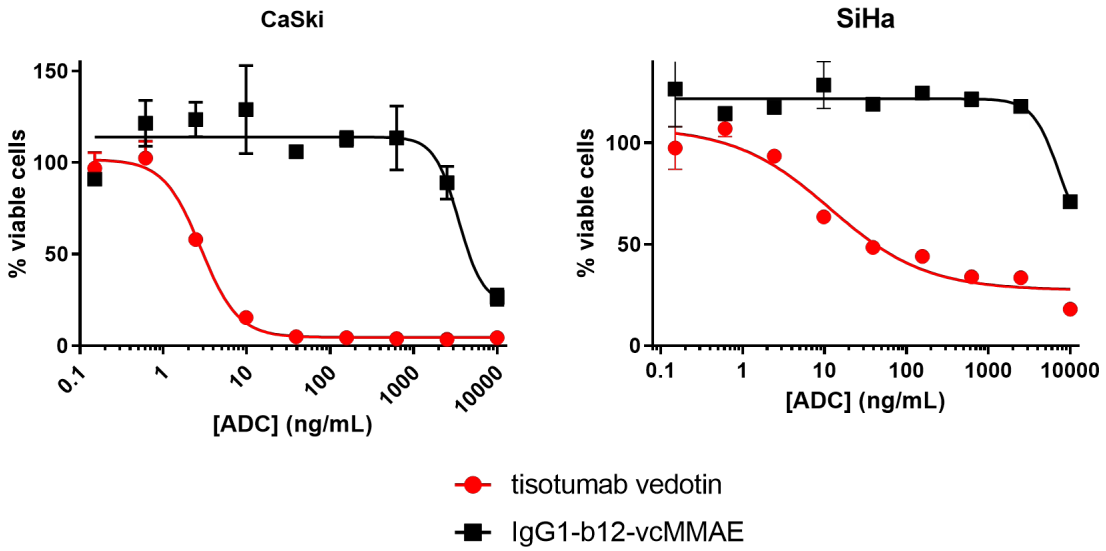
チソツマブ　ベドチンによる MMAE を介した細胞傷害活性について、様々な TF 発現レベルのヒト腫瘍細胞株（26 種）を用いて評価した（Figure 5）。これらの腫瘍細胞株は固形癌 10 種（膀胱癌：2 種、乳癌：3 種、子宮頸癌：3 種、結腸直腸癌：1 種、胃癌：1 種、NSCLC：5 種、卵巣癌：2 種、膵癌：4 種、前立腺癌：3 種、及び皮膚癌：1 種）及び造血器腫瘍 1 種（急性 T 細胞白血病：1 種）由来であった。

腫瘍細胞（$0.5 \sim 20 \times 10^3$ cells）を段階希釈したチソツマブ　ベドチン（0.1 pg/mL～10 µg/mL）と 37°C で 3～5 日間インキュベートした。細胞生存率は、培養液中の代謝活性を測定する 2 種類のアッセイ（alamarBlue®又は CellTiter-Glo®）を用いて、取扱説明書に従い測定した。殺細胞作用を誘導する陽性対照としてスタウロスポリンを用い、未処置細胞を陰性対照とした。チソツマブ　ベドチン処置後の腫瘍細胞生存率を、陽性及び陰性対照群との比較により算出した。本試験で使用した唯一の非接着性細胞株である Jurkat 細胞については、フローサイトメトリーを用い

た生細胞数の定量化により細胞生存率を評価した。alamarBlue®、CellTiter-Glo®及びフローサイトメトリーによる結果を比較したブリッジング実験で高い同等性が示されたことから、これらのアッセイ法を用いて得られた結果を比較することは可能であると考えた。

チソツマブ　ベドチンは、TF 発現細胞株に対して用量依存的な細胞傷害活性を示した。例として、2 種類の子宮頸癌細胞株で得られた結果を Figure 4 に示す。アイソタイプ対照 ADC（IgG1-b12-vcMMAE）は細胞傷害作用を誘導しなかったことから（1000 ng/mL 未満）、チソツマブ　ベドチンの細胞傷害活性は標的結合に依存していることが示唆された。さらに、MMAE と結合していないチソツマブは腫瘍細胞に対して in vitro 傷害活性を示さなかったことから（2.7.3 項、報告書番号 GMB1015-084）、チソツマブ　ベドチンの細胞傷害活性は MMAE を介していることが示された。

Figure 4　チソツマブ　ベドチンの子宮頸癌細胞株（2 種）に対する細胞傷害活性



ADC: antibody-drug conjugate; IC_{50}: 50% inhibitory concentration; IgG1-b12-vcMMAE: isotype control ADC; SD: standard deviation; vcMMAE: valine-citrulline monomethyl auristatin E

CaSki and SiHa cells were incubated with serial dilutions of tisotumab vedotin for five days. Remaining viable cells were detected using alamarBlue. Staurosporine was used as positive control for cell kill. Each data point represents the mean ± SD of duplicate wells from one representative experiment. IC_{50}: 1.63 and 7.86 ng/mL for cytotoxicity of CaSki and SiHa cells, respectively (average from three experiments for each cell line).

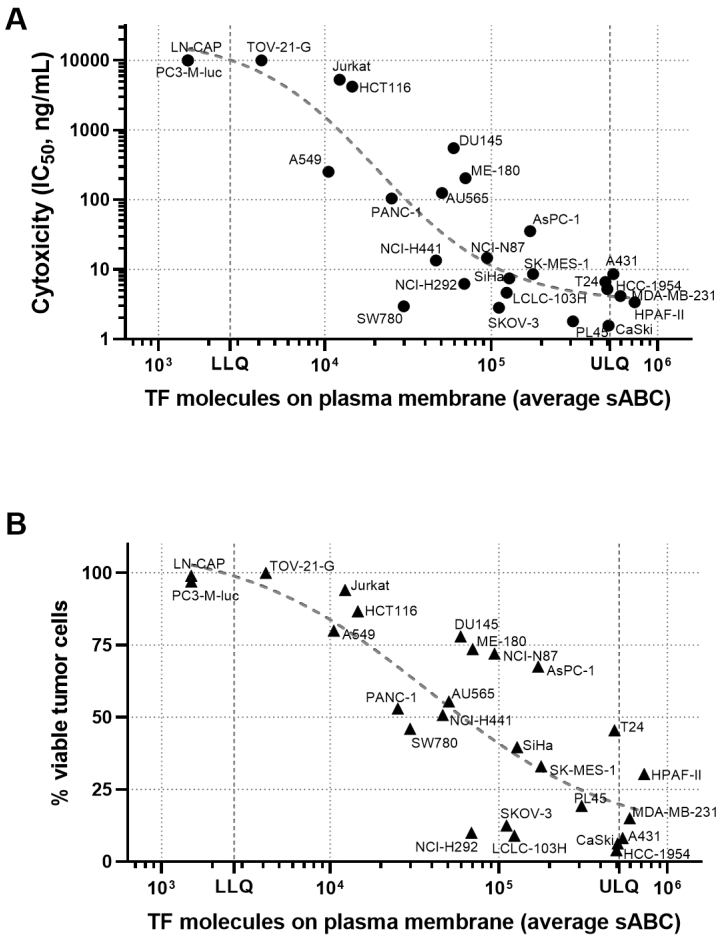
Source: Study GMB1015-087

TF 発現レベルとチソツマブ　ベドチンの細胞傷害活性の相関を検討するため、フローサイトメトリーによる定量化分析システム（QIFIKIT）を用いて、細胞膜上の TF 発現レベルを測定した。このアッセイでは、細胞表面に結合した TF 特異的抗体数を定量し、sABC を標的発現レベルの指標とした。

チソツマブ　ベドチン 100 ng/mL 曝露後の IC_{50} 値又は腫瘍細胞生存率を指標としたチソツマブ　ベドチンの効力は、細胞膜上の TF 発現レベルと相関していた（Figure 5）。チソツマブ　ベドチンは、TF 高発現（> 300000 sABC/cells）の細胞株に対して強力な細胞傷害活性（IC_{50}

値＜10 ng/mL）を示したが、TF 発現が定量下限以下（＜2700 sABC/cells）の細胞株に対する細胞傷害活性は認められなかった（IC_{50} 値＞10000 ng/mL）。

Figure 5　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; ULQ: upper limit of quantitation

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. (A) 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. (B) Percentage of viable tumor cells after exposure to 100 ng/mL tisotumab vedotin in relation to TF expression levels. In A and B, the dotted line represents the dose-response relationship as estimated by non-linear regression analysis. Source: Study GMB1015-087

2.5.2　細胞傷害活性に対する P-糖タンパク質の影響

報告書番号 GMB1015-229、添付資料番号[4.2.1.1-10 項]

異物の細胞外排出を担う細胞膜上のタンパク質である P-gp［アデノシン三リン酸結合カセットサブファミリーB メンバー（adenosine triphosphate binding cassette subfamily B member、ABCB）1 遺伝子によってコードされる］の過剰発現は、ブレンツキシマブ ベドチンに対する耐

性発現の機序である可能性が示唆されている（Chen et al., 2015）。チソツマブ　ベドチンによる細胞傷害活性に対する細胞の感受性における P-gp の影響を、P-gp 遺伝子導入又は非導入の類表皮癌細胞株 A431（TF を発現する株）を用いて検討した。

P-gp 遺伝子導入及び非導入の A431 をチソツマブ　ベドチン（0.00015～10 µg/mL、4 倍段階希釈）と 37°C で 5 日間培養した。細胞生存率は CellTiter-Glo®を用いて測定した。その結果、P-gp を過剰発現した A431 は、非導入細胞と比較して、チソツマブ　ベドチンによる細胞傷害活性に対する感受性が低いことが示された。同様に、P-gp を過剰発現した細胞では、遊離型 MMAE による細胞傷害活性に対する感受性も著しく低下した。

2.5.3　MMAE 拡散によるバイスタンダー効果

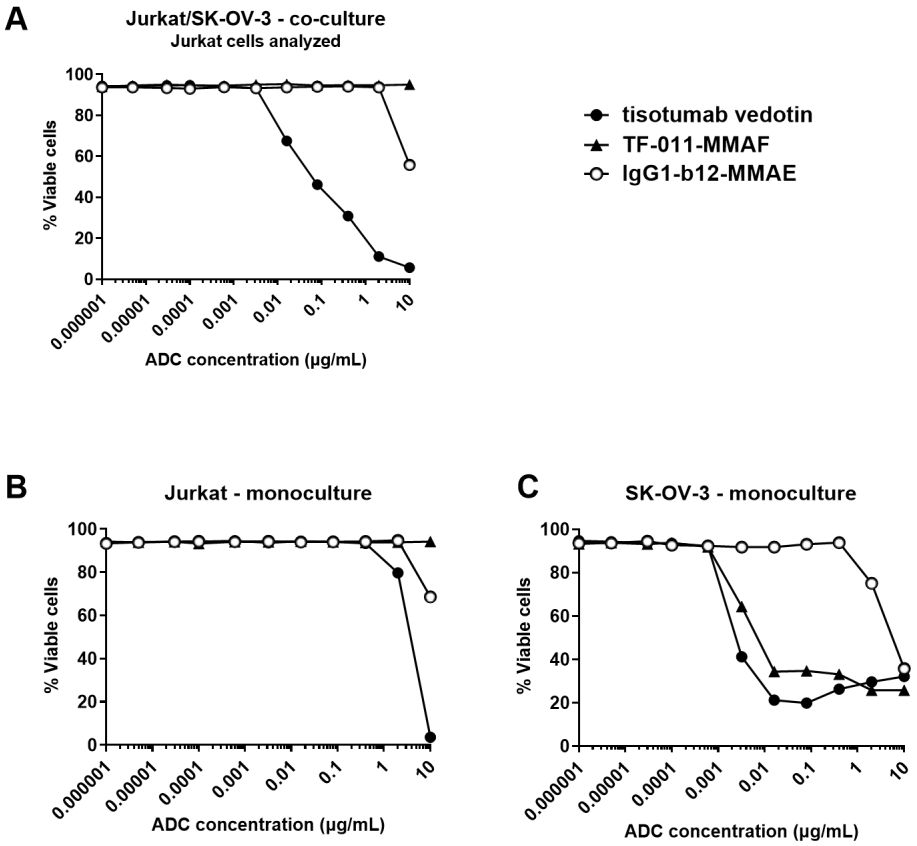
報告書番号 GMB1015-179、添付資料番号[4.2.1.1-11 項]

チソツマブ　ベドチンから放出された MMAE の拡散による in vitro バイスタンダー効果（遊離型 MMAE の近傍細胞への拡散）を、TF 高発現及び低発現の腫瘍細胞と共培養した 2 種類の試験系を用いて評価した。

TF 高発現接着細胞（MDA-MB-231、HPAF-II）及び TF 低発現接着細胞（A549）の共培養、又は TF 高発現接着細胞（SK-OV-3、A431）及び TF 低発現浮遊細胞（Jurkat）の共培養のいずれの試験系を利用した。いずれの実験でも、共培養細胞をチソツマブ　ベドチン（1 pg/mL～10 µg/mL）とインキュベートし、4～6 日後にフローサイトメトリーにより細胞生存率［TO-PRO-3 又は 7−アミノアクチノマイシン D（7 aminoactinomycin D、7-AAD）染色により死細胞を除去］を評価した。

2.5.1 項の結果と一致して、チソツマブ　ベドチンは TF 高発現細胞株に対する細胞傷害活性を示したが、TF 低発現細胞株に対しては示さなかった。バイスタンダー効果は、TF 低発現細胞を TF 高発現細胞と共培養した場合にのみ誘導された（Figure 6 に例を示す）。さらに、チソツマブ（TF-011）にマレイミドカプロイルリンカーを介してマレイミドカプロイルモノメチルアウリスタチン F（maleimidocaproyl monomethyl auristatin F、mcMMAF）を結合させた ADC（TF-011-MMAF）を陰性対照とし、バイスタンダー効果を確認した。モノメチルアウリスタチン F（monomethyl auristatin F、MMAF）は C 末端に細胞膜不透過性のフェニルアラニン残基を有するため、バイスタンダー効果を誘導しないことが報告されている（Doronina et al., 2006; Li et al., 2016）。TF-011-MMAF はバイスタンダー効果を誘導しなかった。

Figure 6　TF 高発現接着細胞及び TF 低発現浮遊細胞の共培養に対するチソツマブ　ベドチンの細胞傷害活性



ADC: antibody-drug conjugate; CFSE: carboxyfluorescein succinimidyl ester; IgG1-b12-MMAE: isotype control ADC; MMAE: monomethyl auristatin E; MMAF: monomethyl auristatin F; TF: tissue factor; TF-011: TF-targeting antibody (i.e., tisotumab); TF-011-MMAF: TF-011 conjugated to MMAF

TF-low, CFSE-labeled, Jurkat suspension cells were co cultured with adherent TF-high SK-OV-3 (A) cells (ratio 4:1), or in monocultures (B) for 4 days in the presence of tisotumab vedotin. Monocultures of SK-OV-3 (C) cells were incubated with tisotumab vedotin for 4 days. Cell viability was measured by TO-PRO-3 negativity. CFSE staining was used to discriminate TF-low Jurkat cells from the TF-high cells in the co-cultures. Data shown are single measurements and are from one experiment as an example. Tisotumab vedotin induced cytotoxicity in TF-low Jurkat cells in co-culture with TF-high SK-OV-3 cells (A), but not in monoculture (B). Tisotumab vedotin induced cytotoxicity in TF-high SK-OV-3 cells in monoculture (C). TF-011-MMAF did not induce cytotoxicity in TF-low cells (in co-culture [A] or in monoculture [B]), but induced cytotoxicity of TF-high cells (C). IgG1-b12-MMAE did not induce cytotoxicity in TF-high or TF-low cells (A, B, C).

Source: Study GMB1015-179

2.6　チソツマブ　ベドチンによる ICD の誘導

報告書番号[redacted]-5666、添付資料番号[4.2.1.1-12 項]

報告書番号[redacted]-000451、添付資料番号[4.2.1.1-13 項]

ICD とは、アポトーシスを起こした腫瘍細胞に対して免疫応答を惹起することにより腫瘍細胞を細胞死に至らせることである（Galluzzi et al., 2017; Kroemer et al., 2013）。MMAE を含む ADC による ICD の誘導は、以前から報告されている（Gerber et al., 2016; Muller et al., 2014）。ICD を誘導する薬剤は腫瘍内へ T 細胞を浸潤させ、チェックポイント阻害作用に対する腫瘍の感受性を高めることができる。プログラム細胞死-1（programmed cell death-1、PD-1）は、T 細胞上に発

現する抑制性免疫チェックポイント受容体の一つであり、腫瘍細胞に対する免疫応答の活性化を抑制する（Brown et al., 2018; Muller et al., 2015; Pfirschke et al., 2016）。

ICD は、その特徴的な in vitro マーカーであるアデノシン三リン酸（adenosine triphosphate、ATP）及び high-mobility group box 1（HMGB1）の放出、小胞体（endoplasmic reticulum、ER）ストレス応答の惹起、自然免疫細胞の活性化及びそれに伴う二次的 T 細胞応答、並びに抗 PD-1 抗体との併用による T 細胞応答の増加を測定することにより評価した（報告書番号[redacted]-5666）。

各腫瘍細胞をチソツマブ　ベドチンと 16 時間インキュベート後、上清を分取し、細胞外 ATP 及び HMGB1 レベルをそれぞれ CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability assay 及び ELISA により、取扱説明書に従って測定した。ER ストレス応答測定のため、インキュベート 16 時間後に細胞を採取し、ストレスセンサータンパク質 inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease 1（IRE1）及びそのリン酸化、IRE1 下流エフェクターの Jun N 末端キナーゼ（Jun N-terminal kinase、JNK）及びそのリン酸化、並びに別のストレスセンサータンパク質である protein kinase R-like ER kinase（PERK）の活性化指標 activating transcription factor 4（ATF4）に対するそれぞれの特異的な抗体を用いて、ウェスタンブロットを実施した。ヒト末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell、PBMC）及び腫瘍細胞をチソツマブ　ベドチンと 16 時間共培養して ICD を誘導後、自然免疫細胞の活性化（CD14 陽性細胞での CD86 発現）及び T 細胞の増殖［カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（carboxyfluorescein succinimidyl ester、CFSE）標識細胞の蛍光強度減弱度］の誘導をフローサイトメトリーにより測定した。一部の共培養細胞には抗 PD-1 抗体（ペムブロリズマブ又はニボルマブ；5 μg/mL）を添加し、24 及び 48 時間後に細胞を分析し、上清を分取して Luminex マルチプレックスアッセイキット（Millipore）を用いたサイトカイン解析を実施した。

チソツマブ　ベドチン（1 μg/mL）及び遊離型 MMAE（0.1 μg/mL）は、A431、MDA-MB-231 及び HPAF-II で主要な ICD マーカーを誘導し、抗腫瘍免疫を促進する ATP 及び HMGB1 の放出並びに ER ストレス応答（Galluzzi et al., 2017）を誘導したが、アイソタイプ対照 ADC（IgG1-MMAE 抗体；1 μg/mL）はいずれも誘導しなかった。

さらに、チソツマブ　ベドチン又は遊離型 MMAE によって死滅した MDA-MB-231 は、マクロファージ上の CD86 発現を上昇させ、単球／マクロファージの強力な走化因子及び炎症メディエーターであるマクロファージ炎症性タンパク質 1β（macrophage inflammatory protein 1 beta、MIP-1β）の放出を誘導した。

MDA-MB-231 をチソツマブ　ベドチン又は遊離型 MMAE で処理し、CFSE 標識ヒト PBMC と 48 時間共培養した後、CD3 陽性細胞での CFSE 蛍光強度減弱並びに IL-12p70 及びインターフェロン（interferon、IFN）γ 等の T 細胞特異的サイトカイン産生を指標とした T 細胞増殖が観察された。これらの T 細胞応答は、抗 PD-1 抗体（ニボルマブ又はペムブロリズマブ）の添加により増強した。チソツマブ及びアイソタイプ対照 ADC は T 細胞応答を誘導しなかった。

これらの in vitro 試験結果から、チソツマブ　ベドチンの細胞傷害活性により ICD マーカーの誘導が認められ、その結果、自然免疫細胞の活性化及び抗 PD-1 抗体の併用で増強される T 細胞応答が誘導されることが裏付けられた。

また、チソツマブ　ベドチンの in vivo 免疫応答活性化作用を、異種移植マウスモデルを用いて評価した（報告書番号[redacted]-000451）。本モデルは、T 細胞が欠如しているが正常な自然免

疫系を有する免疫不全ヌードマウスにヒト腫瘍細胞を移植して作製しているため、ヒト腫瘍細胞での免疫関連遺伝子の変化並びにマウス自然免疫細胞の遊走及び活性化を評価することが可能である。

雌ヌードマウスの側腹部に TF 発現の膵癌細胞株 HPAF-II（1×10^6 個）を皮下投与して CDX モデルを作製した。腫瘍を測定し、以下の計算式で体積（mm^3）を算出した。

腫瘍体積 = 0.5 ×（長さ）×（幅）^{2}

腫瘍体積が約 200 mm^3 に達した時点で、チソツマブ　ベドチン（3 mg/kg）を腹腔内投与した。対照として、溶媒（0.01% Tween 20 含有リン酸緩衝生理食塩水）、チソツマブ（3 mg/kg）又はアイソタイプ対照 ADC（3 mg/kg）を投与した。投与 3 及び 5 日後に腫瘍を摘出して半分に分け、半分を−80°C で瞬間凍結し、次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンス（RNA-sequencing、RNA-seq）解析（イルミナ HiSeq プラットフォーム）に供した。メッセンジャーRNA（messenger RNA、mRNA）の断片配列をヒト及びマウスゲノムにマッピングし、チソツマブ　ベドチンにより誘導される異種移植腫瘍細胞 HPAF-II 及びマウス免疫細胞又は間質細胞での遺伝子発現変化を解析した。摘出した腫瘍のもう半分はホルマリン固定してパラフィンで包埋し、IHC 染色に供した。マウス F4/80 陽性マクロファージ及び CD11c 陽性抗原提示細胞の浸潤を定量するために、腫瘍をそれぞれマウス F4/80 及び CD11c で染色した。Halo 画像解析を用いて免疫細胞を定量した。

チソツマブ　ベドチン投与群の異種移植腫瘍細胞 HPAF-II では、3 種の対照群と比較して、様々な免疫関連遺伝子の発現が投与 3 及び 5 日後に誘導された。チソツマブ　ベドチン投与群では、腫瘍内のケモカイン（*CXCL10*、*CCL20*、*CXCL1* 及び *CXCL8*）及び I 型 IFN 遺伝子（*IFIT1*、*IFIT3*、*MX1* 及び *OAS2*）をコードするヒト転写産物の発現が対照と比較して統計学的に有意に増加しており（それぞれ約 4 倍及び約 2 倍、$p < 0.001$、一元配置分散分析後 Sidak 多重比較検定）、免疫細胞の活性化と腫瘍への遊走が促進されている可能性が示唆された。また、チソツマブ　ベドチン投与群では、腫瘍内の主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex、MHC）クラス I 遺伝子（*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*、*B2M*、*TAP1* 及び *TAP2*）の発現も対照と比較して統計学的に有意に増加し（約 1.5 倍、$p < 0.05$）腫瘍細胞が CD8 陽性 T 細胞に抗原提示して抗腫瘍作用を発揮する可能性が示唆された。

チソツマブ　ベドチンによりマウス自然免疫細胞が腫瘍部位へ動員されるかを検討するため、腫瘍組織を IHC 及び RNA-seq を用いて解析した。画像解析による定量化により、チソツマブ　ベドチン投与群の腫瘍組織で F4/80 陽性マクロファージ及び CD11c 陽性樹状細胞割合の増加が確認された。これらの in vivo 試験結果から、チソツマブ　ベドチンはマウス自然免疫細胞を異種移植腫瘍部位へ動員できる可能性が示された。

チソツマブ　ベドチンは、その ICD 誘導作用と一致して、TF 発現腫瘍細胞に対する細胞傷害作用を示した（報告書番号[redacted]-5666）。また、in vitro ICD マーカーの誘導と一致して、チソツマブ　ベドチンは TF 発現腫瘍細胞株由来 CDX モデルのヒト腫瘍細胞及びマウス免疫細胞で免疫調節作用を誘導した。これらの作用はチソツマブ　ベドチンに特異的であり、アイソタイプ対照 ADC 及びチソツマブではいずれも認められなかった。以上の結果から、チソツマブ　ベドチンが in vivo で免疫反応を促進し、部分的には ICD の誘導を介して抗腫瘍作用を発揮していることが示唆された。ICD は、長期的な免疫監視及び免疫防御に重要な腫瘍抗原に対する自然及び適

応免疫細胞の活性化の結果もたらされる特殊な細胞死である（Galluzzi et al., 2017; Kroemer et al., 2013）。

2.7　チソツマブ　ベドチンの Fc を介したエフェクター機能

IgG1κ アイソタイプヒト抗体は、ADCC、ADCP 及び CDC などの Fc を介したエフェクター機能により細胞傷害活性を誘導する可能性がある。チソツマブ　ベドチン及びチソツマブを用いて、チソツマブ　ベドチンの ADCC 及び ADCP 活性を評価した。補体経路の活性化はチソツマブを用いて評価した。

以下の項に示すように、チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンは ADCC 及び ADCP を効果的に誘導した。チソツマブは CDC を介した細胞傷害活性を誘導しなかった。

2.7.1　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンによる ADCC 活性

報告書番号 GMB1015-084、添付資料番号[4.2.1.1-14 項]

チソツマブによる ADCC 活性を、標的細胞として TF 発現ヒト腫瘍細胞株 A431、MDA-MB-231 及び BxPC-3、エフェクター細胞としてヒト PBMC を用いて評価した。

クロム 51（chromium-51、^{51}Cr）で標識した標的細胞（5000 cells/well）を、段階希釈したチソツマブ（0.00064～10 µg/mL）と室温で 15 分間インキュベートした。健康ドナーから採取した PBMC（500000 cells/well）を標的細胞に添加し（PBMC と標的細胞の比は約 100：1）、37°C で一晩インキュベートした。細胞溶解液の上清中 ^{51}Cr をガンマカウンターで測定した。抗体非依存性の腫瘍細胞溶解を測定するため、チソツマブ非存在下で標的細胞を PBMC とインキュベートし、最大の細胞溶解作用を測定するために標的細胞をトリトン X-100 とインキュベートした。

チソツマブは、3 種類の細胞株全てに対して ADCC を介した殺細胞作用を効果的に誘導した。A431（n=6）、MDA-MB-231（n=3）及び BxPC-3（n=3）の EC_{50}（中央値）は、それぞれ 15.4、8.7 及び 4.7 ng/mL であった。A431 を用いたアッセイでは、ドナー6 例のうち 2 例でチソツマブ　ベドチン及びチソツマブを直接比較した。チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンが同程度の ADCC 活性を示したことから、ADCC 活性は vcMMAE との結合後も保持されていることが示された。

2.7.2　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンによる ADCP 活性

報告書番号 [redacted]-5631、添付資料番号[4.2.1.1-15 項]

チソツマブ　ベドチン存在下で腫瘍細胞及び単球由来マクロファージを共培養して、チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンによる ADCP 活性を評価した。

PKH26（Sigma-Aldrich）で標識した TF 発現細胞株 BxPC-3 又は A431 をチソツマブ及びチソツマブ　ベドチンでオプソニン化後、マクロファージと 4 時間インキュベートして ADCP 活性を評価した。健康ドナー由来のヒト初代 CD14 陽性単球を顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）（500 U/mL）と 10～14 日間インキュベートし、マクロファージを得た。PKH26 及び抗 CD11c 抗体で二重染色したマクロファージ分画をフローサイトメトリーで分析し、ADCP 活性を評価した。

複数のドナー由来のマクロファージで、チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンによる用量依存的な ADCP 活性が認められた。チソツマブ及びチソツマブ　ベドチン（2 μg/mL）により、A431 細胞での二重染色陽性マクロファージの割合は、総マクロファージのそれぞれ最大 67%及び 45%であった。蛍光顕微鏡法により貪食作用を確認した。チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンでオプソニン化した CellTracker Green 標識 TF 発現細胞株 BxPC-3 は、PE 標識 CD11b 抗体で染色されたマクロファージと共局在することが示された。

2.7.3　チソツマブによる CDC 活性

報告書番号 GMB1015-084、添付資料番号[4.2.1.1-14 項]

IgG1mAb は、細胞表面に結合すると補体活性化の古典経路を活性化し、その結果 CDC を誘導すると考えられる（Glennie et al., 2007）。MDA-MB-231 及び BxPC-3 を用いて、チソツマブにより細胞表面に沈着する補体 C4c 及び C3c を測定し、補体活性化能を評価した。C4c は古典経路で C1 を介して活性化された C4 の分解により生じる中間体である（Merle et al., 2015）。これに対して、C3c はより一般的な補体活性化指標であり、古典経路、代替経路及びレクチン経路の活性化によって生じる（Merle et al., 2015）。

MDA-MB-231 及び BxPC-3（100000 cells/well）をチソツマブ又はアイソタイプ対照抗体（いずれも 30 μg/mL）と室温で 15 分間インキュベートした。補体源としてプールしたヒト血清（25 μL）を添加し、細胞を 37°C で 45 分間インキュベートした。C4c 及び C3c の沈着はヒト C4c 又は C3c に特異的な FITC 標識抗体を用いて検出し、フローサイトメトリーを用いて蛍光強度を測定した。

チソツマブによる C4c 沈着が MDA-MB-231（チソツマブ及びアイソタイプ対照抗体の MFI：それぞれ 25872 及び 1754）及び BxPC-3（それぞれ 33989 及び 4604）で誘導された。同様に、チソツマブによる C3c 沈着も MDA-MB-231（それぞれ 19647 及び 4347）及び BxPC-3（それぞれ 37339 及び 15354）で検出された。

ヒト血清非存在下で標的細胞（100000 cells/well）をチソツマブ又はアイソタイプ対照抗体（30 μg/mL）とインキュベートし、CDC を評価した。室温でインキュベート 15 分後、プールしたヒト血清（最終血清濃度 0、5、10 又は 20%）を添加し、細胞を 37°C で 45 分間インキュベートした。次にヨウ化プロピジウム（propidium iodide、PI）とインキュベートして死細胞を同定し、PI 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した。

チソツマブは、腫瘍細胞に C3c 及び C4c 沈着を誘導したものの、A431、BxPC-3 又は MDA-MB-231 に対して CDC を介した細胞傷害活性を示さなかった。

2.8　チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの in vivo 抗腫瘍活性

チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの in vivo 抗腫瘍活性を、CDX（2.8.1 項）及び PDX マウスモデル（2.8.2 項）を用いて検討した。チソツマブ　ベドチンは、子宮頸癌を含む広範な TF 陽性固形癌由来のマウスモデルに対して強力な抗腫瘍活性を示した。各異種移植モデルに対する in vivo 抗腫瘍活性と in situ TF 発現レベルには相関が認められ、チソツマブ　ベドチンの in vivo 抗腫瘍活性は腫瘍細胞の TF 発現レベルに依存していることが示された（2.8.3 項）。チソツマブ

は予防的投与により腫瘍増殖をある程度阻害したが、生着した腫瘍に対する治療的投与は有効性を示さなかった。

2.8.1　CDX マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの抗腫瘍活性

報告書番号 GMB1015-082、添付資料番号[4.2.1.1-16 項]
報告書番号 GMB1015-213、添付資料番号[4.2.1.1-17 項]
報告書番号 GMB1015-081、添付資料番号[4.2.1.1-18 項]
報告書番号 GMB1015-102、添付資料番号[4.2.1.1-19 項]

様々な TF 発現レベルを示す 7 種の腫瘍（Figure 5）［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）及び類表皮癌（1 種）］由来の CDX モデル 10 種を用いて抗腫瘍活性を評価した（報告書番号 GMB1015-082 及び報告書番号 GMB1015-213）。In vivo 試験と並行して、in situ 腫瘍内 TF 発現を IHC で評価した。CDX モデルの in situ TF 発現のヒストスコア（H スコア）及びチソツマブ　ベドチンによる抗腫瘍活性等の情報を Table 5 にまとめた。

乳癌細胞株 MDA-MB-231（2.9 項）以外の CDX モデルは、雌の重症複合免疫不全（severe combined immunodeficiency、SCID）マウス（0 日目）の脇腹に腫瘍細胞（25×10^6 個）を皮下投与して作製した。腫瘍はデジタルキャリパー（PLEXX®）を用いて少なくとも週 2 回測定した。腫瘍体積（mm^3）は以下の計算式で算出した。

腫瘍体積 = 0.52 ×（長さ）×（幅）^{2}（Tomayko et al., 1989）

腫瘍の生着を確認後（投与開始時の腫瘍体積を Table 5 に示す）、チソツマブ　ベドチンの腹腔内投与（MDA-MB-231 モデルでは静脈内投与）を開始した。対照として、アイソタイプ対照抗体（IgG1-b12）又はアイソタイプ対照 ADC［IgG1-b12-vcMMAE：薬物抗体比（drug to antibody ratio、DAR）がチソツマブ　ベドチンと同程度の平均 4）投与群を設定した。各モデルでの投与量及び投与スケジュールを Table 5 に示した（各群 n=6～8）。マウスの状態悪化を示唆する一般症状を少なくとも週 2 回観察した。投与群間の平均腫瘍体積の差異を、一元配置分散分析を用いて統計学的に解析した。統計解析は、全ての群の投与が完了した最終日（すなわち、IgG1-b12 又は IgG1-b12-vcMMAE 投与群のマウスを腫瘍増殖のため安楽死させる前）に実施した。各 CDX モデルで得られた試験結果を Table 5 に示す。

チソツマブ　ベドチンは、10 種中 6 種の CDX モデルで抗腫瘍活性を示した。活性を示さなかった 4 種中 3 種の CDX モデルの TF 発現レベルは低く、その H スコアは平均 H スコア 97（CDX 及び PDX モデル 20 種の平均値、PDX モデルは 2.8.2 項参照）を大きく下回った。膵癌細胞株 AsPC-1 モデルは平均的な in situ TF 発現レベルを示したが、チソツマブ　ベドチンによる抗腫瘍活性は認められなかった。CDX（及び PDX）モデルでの in situ TF 発現レベルとチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性に相関が認められた（Figure 8）。

肺癌細胞株 NCI-H441 モデルでは、IgG1-b12-vcMMAE 投与群でも抗腫瘍活性が認められたが、投与 62 日目のチソツマブ　ベドチン投与群の腫瘍サイズは、IgG1-b12-vcMMAE 投与群と比較して統計学的に有意に小さかった（$p < 0.05$）。

別の試験では、非結合型チソツマブの CDX モデルに対する in vivo 抗腫瘍活性を評価した（報告書番号 GMB1015-081）。CDX モデル一覧及び結果の要約を Table 6 に示す。一部のモデルでは、チソツマブの予防的投与（腫瘍移植後 1 時間以内に投与開始）により抗腫瘍活性を示したが、生着した腫瘍細胞株 AsPC-1、HPAF-II 及び BxPC-3（100～200 mm^3）に対するチソツマブの治療的投与は、高用量でも限定的な効果しか示さなかった（Table 6）。生着した腫瘍に対して、チソツマブ（1 mg/kg）がアイソタイプ対照抗体よりも統計学的に有意な抗腫瘍活性を示したのは、MDA-MB-231 細胞株同所性異種移植モデルのみであった（$p = 0.003$、Mann-Whitney 検定）（Table 6）。

要約すると、腫瘍移植時のチソツマブの予防的投与により、CDX マウス 5 種中 4 種（80%）で抗腫瘍活性が認められた。しかし、生着した腫瘍に対するチソツマブの治療的投与による効果は、CDX マウスモデル 5 種中 1 種でのみ（20%）認められた。

いずれの CDX マウスモデルを用いた試験でも、チソツマブ又はチソツマブ　ベドチンの投与に関連した状態悪化を示唆する一般症状の変化は認められなかった。しかし、チソツマブを投与した CDX モデル 5 種中 1 種（BxPC-3 モデル）で、高用量群（50 mg/kg）で腫瘍内出血と関連する所見が認められた（報告書番号 GMB1015-102）。20 mg/kg 以下の投与群では出血は認められなかった。このことから、高用量のチソツマブ投与群では TF の阻害作用が腫瘍内出血と関連している可能性が示唆された。チソツマブはヒト TF と相互作用するが、マウス TF とは相互作用しないことから（[2.6.6-8.1.1 項]、報告書番号 GMB1015-088）、腫瘍内出血はチソツマブ及び腫瘍に発現するヒト TF との相互作用に関連している可能性が示唆された。チソツマブ　ベドチンを投与した CDX（本項）及び PDX（2.8.2 項）モデルでは、31 種中 1 種（肺癌細胞株 NCI-H441 モデル）で腫瘍内出血が認められた（報告書番号 GMB1015-102）。出血は非投与群でも認められたが、チソツマブ　ベドチン 4.5 mg/kg 又はアイソタイプ対照 ADC 投与群でその頻度が高くなった。しかし、同用量の非結合型チソツマブ投与群で出血頻度は上昇しなかった。このことから、腫瘍内出血は TF 機能活性の阻害ではなく、特定の腫瘍モデルの特性に関連していることが示唆される。全てのマウスで、出血は腫瘍部位に限局しており、自然に回復し、疾病を示唆する一般症状や体重減少との関連は認められなかった。

以上より、チソツマブ　ベドチンは 10 種中 6 種の CDX モデルに対して強い抗腫瘍活性を示した。チソツマブ　ベドチンによる抗腫瘍活性は TF 低発現の CDX モデルでも観察されたが、チソツマブ　ベドチンに反応性を示した CDX モデルの TF 発現レベル（H スコア）は、反応性を示さなかった CDX モデルのそれよりも高かった。以上の結果から、チソツマブ　ベドチンは強力な in vivo 抗腫瘍活性を示すことが確認された。

Table 5　CDX 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

Xenograft	Cell Line Origin	TF Expression (H-Score, in Situ)[a]	Tumor Volume at Which Treatment Was Initiated	Dose[f] (mg/kg)	Dosing Schedule	Cumulative Dose	Effect on Tumor Growth[b]
A431	Epidermoid carcinoma	125	~200 mm^3	1	Day 15	1 mg/kg	Growth inhibition[c,d]
				4	Day 15	4 mg/kg	Tumor regression[c,d]
			~250 mm^3	3	Day 11, 14, 18, 21	12 mg/kg	Tumor regression[c,d]
AsPC-1	Pancreatic adenocarcinoma	103	~600 mm^3	1	Day 11	1 mg/kg	No effect
				4	Day 11	4 mg/kg	No effect
HCC1954	Breast carcinoma	62	~400 mm^3	1	Day 5	1 mg/kg	Tumor regression[c,d]
				4	Day 5	4 mg/kg	Tumor regression[c,d]
HCT 116	Colorectal carcinoma	19	~200 mm^3	3	Day 7, 11, 14, 18	12 mg/kg	No effect
HPAF-II	Pancreatic adenocarcinoma	128	~100-150 mm^3	0.3	Day 10, 13, 17, 21	1.2 mg/kg	Growth inhibition[c,e]
				1	Day 10, 13, 17, 21	4 mg/kg	Tumor regression[c,e]
			~100 mm^3	3	Day 13, 16, 20, 23	12 mg/kg	Tumor regression[c,d]
			~200 mm^3	0.5	Day 13	0.5 mg/kg	No effect
				0.5	Day 13, 20	1 mg/kg	No effect
				1	Day 13	1 mg/kg	Growth inhibition[c,e]
				1	Day 13, 20, 27, 34	4 mg/kg	Tumor regression[c,e]
				2	Day 13, 41	4 mg/kg	Tumor regression[c,e]
				2	Day 13, 20, 27, 34	8 mg/kg	Tumor regression[c,e]
				4	Day 13, 41	8 mg/kg	Tumor regression[c,e]
				4	Day 13, 20, 27, 34	16 mg/kg	Tumor regression[c,e]
MDA-MB-231	Breast carcinoma	NC	~133 mm^3	0.5	Day 17, 24, 31, 40	2 mg/kg	No effect
				1	Day 17, 24, 31, 40	4 mg/kg	Growth inhibition[d]
NCI-H441	Lung papillary adenocarcinoma	9	~425 mm^3	0.5	Day 27	0.5 mg/kg	No effect
				1.5	Day 27	1.5 mg/kg	Growth inhibition[c,d]
				4.5	Day 27	4.5 mg/kg	Tumor regression[c,d]
			~250 mm^3	3	Day 7, 11, 14, 18	12 mg/kg	Tumor regression[d]
NCI-N87	Gastric carcinoma	32	~200 mm^3	3	Day 10, 14, 18, 21, 28, 32	18 mg/kg	No effect

Xenograft	Cell Line Origin	TF Expression (H-Score, in Situ)[a]	Tumor Volume at Which Treatment Was Initiated	Dose[f] (mg/kg, i.v.)	Dosing Schedule	Cumulative Dose	Effect on Tumor Growth[b)]
PANC-1	Pancreatic epithelioid carcinoma	0	~214 mm^3	1	Day 6	1 mg/kg	No effect
				4	Day 6	4 mg/kg	No effect
SK-OV-3	Ovarian carcinoma	58	~200 mm^3	1	Day 36, 43	2 mg/kg	No effect
				4	Day 36, 43	8 mg/kg	Growth inhibition[d]

ADC: antibody-drug conjugate; ANOVA: analysis of variance; CDX: cell line derived xenograft; H-Score: histo score; IgG1-b12: isotype control antibody; IgG1-b12-vcMMAE: isotype control ADC; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenous; NC: not conducted; TF: tissue factor

a TF expression determined by quantitative flow cytometry (QIFIKIT) in vitro is shown in Figure 5.

b Tumor growth inhibition: statistically significant difference in average tumor volume between mice treated with tisotumab vedotin and control mice (treated with IgG1-b12 or IgG1-b12-vcMMAE as indicated) at the last day that all treatment groups were complete, as analyzed by one way ANOVA. Tumor regression: idem, and average tumor volume in treatment group smaller than at onset of treatment, at any time during follow-up

c Average tumor size significantly smaller than IgG1-b12 treatment group ($P < 0.05$)

d Average tumor size significantly smaller than IgG1-b12-vcMMAE treatment group ($P < 0.05$)

e IgG1-b12-vcMMAE not included in the study

f Treatment with tisotumab vedotin was given i.p. (i.v. in model MDA-MB-231)

Source: Study GMB1015-082 (all CDX models, except for MDA-MB-231); GMB1015-213 (MDA-MB-231 model)

Table 6　CDX マウスモデルに対するチソツマブの抗腫瘍活性

Treatment	Model	Dose, i.p. (Dosing Schedule)[a]	Inhibition of Tumor Growth[b]
Preventive	A431	20 mg/kg (Day 0)	++
	AsPC-1	10 mg/kg (Day 0)	+
	BxPC-3	20 mg/kg (Day 0)	+
	HPAF-II	25 mg/kg (Day 0)	++
	MDA-MB-231-luc-D3H2LN	25 mg/kg (Day 0, 21)	−
Therapeutic	A431	NC	NC
	AsPC-1	50 mg/kg (day 10) + 25 mg/kg (Day 17)	−
	BxPC-3	13 mg/kg (Day 9) + 6.5 mg/kg (Day 16, 22)	−
		15 mg/kg (Day 8) + 7.5 mg/kg (Day 15, 21, 28, 35, 42)	−
		50 mg/kg (Day 7) + 25 mg/kg (Day 14, 21, 28)	−
	HPAF-II	50 mg/kg (Day 10) + 25 mg/kg (Day 17)	−
	MDA-MB-231	13 mg/kg (Day 13) + 6.5 mg/kg (Day 21, 41)	+

ANOVA: analysis of variance; CDX: cell line-derived xenograft; IgG: immunoglobulin G; i.p.: intraperitoneal; NC: not conducted

a　Highest dose tested. Day indicates the number of days after tumor inoculation.

b　Statistically significant difference in average tumor size between mice treated with tisotumab and the isotype control IgG, at the last day that all treatment groups were complete ($P < 0.05$). ++ indicates ~ 50% difference in tumor size, + indicates a < 50% difference in tumor size, − indicates no significant difference between treatment groups. Significance of differences between treatment groups was determined using one-way ANOVA at the last time point that all groups were still complete.

Source: Study GMB1015-081

2.8.2　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

報告書番号 GMB1015-149、添付資料番号[4.2.1.1-20 項]
報告書番号 GMB1015-223、添付資料番号[4.2.1.1-21 項]
報告書番号 GMB1015-211、添付資料番号[4.2.1.1-22 項]
報告書番号 GMB1015-210、添付資料番号[4.2.1.1-23 項]
報告書番号 GMB1015-148、添付資料番号[4.2.1.1-24 項]
報告書番号 GMB1015-212、添付資料番号[4.2.1.1-25 項]
報告書番号 GMB1015-224、添付資料番号[4.2.1.1-26 項]
報告書番号 GMB1015-225、添付資料番号[4.2.1.1-27 項]
報告書番号 GMB1015-226、添付資料番号[4.2.1.1-28 項]
報告書番号 GMB1015-227、添付資料番号[4.2.1.1-29 項]

腫瘍での TF 発現は、患者間及び患者体内だけではなく、腫瘍内でさえも不均一である（Cocco et al., 2010; Kaushal et al., 2008; Patry et al., 2008; Sawada et al., 1999; Uno et al., 2007; Wojtukiewicz et al., 1999）。TF 発現が不均一な腫瘍に対するチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性を、PDX モデルを用いて検討した。本モデルは、患者腫瘍組織を免疫不全マウスに直接移植することにより作製され、CDX モデルと比較して、ヒト腫瘍で認められる遺伝的及び組織学的不均一性が再現できると考えられる（Moro et al., 2012; Tentler et al., 2012）。

7 種の腫瘍［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 PDX モデルを用いて、チソツマブ　ベドチン単剤による抗腫瘍活性を評価した。一部のモデルでは、チソツマブ　ベドチンと他の抗体又は化学療法との併用効果を検討した（2.9 項）。併用試験では、併用投与による抗腫瘍活性の相乗効果を評価するため、単剤の用量は至適用量未満を選択した。

雌マウス（マウス系統は Table 7 参照）の側腹部に患者由来腫瘍組織を皮下投与して、PDX モデルを作製した。腫瘍が一定の体積（各試験での投与開始時の腫瘍体積を Table 7 に示す）に達した時点でマウスを無作為に群分けし（Day 0）、チソツマブ　ベドチンの静脈内投与を開始した。チソツマブ　ベドチンの有効性を、アイソタイプ対照抗体 IgG1-b12 及びアイソタイプ対照 ADCIgG1-b12-vcMMAE の有効性と比較した。各被験物質に対する忍容性を観察するため、マウスの体重を週 2 回測定した。

チソツマブ　ベドチンは、21 種中 16 種の PDX モデルに対して抗腫瘍活性を示した。例として、子宮頸癌モデル（CEXF 773）に対するチソツマブ　ベドチンの効果を示す（Figure 7A）。アイソタイプ対照 ADC は、21 種中 19 種の PDX モデルに対して明らかな抗腫瘍活性を示さなかったが、21 種中 2 種のモデル（LXFL 1674 及び LU0395）では、腫瘍増殖の抑制が認められた。しかし、これらのモデルに対するチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性はアイソタイプ対照 ADC と比較して統計学的に有意に強く、完全な腫瘍退縮を示した（$p < 0.001$、一元配置分散分析後 Mann-Whitney 検定）。これらの試験結果から、チソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性は、腫瘍細胞表面の TF への結合に依存することが示された。このことは、チソツマブ　ベドチンに反応性を示した又は示さなかった CDX（2.8.1 項）及び PDX モデルの TF 発現レベルを比較することにより確認されており（Figure 8）、チソツマブ　ベドチンは TF 低発現の異種移植モデルに対しても有効性を示したものの、概して異種移植マウスモデルでの TF 発現レベルとチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性には相関が認められた。

試験期間中、いずれの投与群でも体重減少は認められなかった又は軽微（< 2.5%）であった。また、腫瘍内出血はいずれの PDX モデルでも観察されなかった。

Table 7　PDX モデルに対するチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性

Indication	PDX Model (Type)	TF Expression (H-score)	Mouse Strain	Tumor Volume at Initiation Treatment (mm^3)	Dose (mg/kg, i.v.)	Dosing Schedule[a]	Anti-Tumor Activity of Tisotumab Vedotin Treatment[b]	Study Number	Report Number
Cervical cancer	CEXF 773 (squamous cell carcinoma)	126	NMRI nu/nu	80-200	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-003	GMB1015-149
	CEXF 633 (squamous cell carcinoma/poorly differentiated)	NC	NMRI nu/nu	120	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1021-020	GMB1015-223
			NMRI nu/nu	120	2	Day 0, 7, 14, 21	Tumor growth inhibition	TE1015-018	GMB1015-211
	CV1664 (cervical cancer)	NC	BALB/c nu/nu	140	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1021-021	GMB1015-223
	CV1248 (cervical cancer)	NC	BALB/c nu/nu	200	0.5, 1, 2, 4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-010	GMB1015-211
			BALB/c nu/nu	140	2, 4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-013	GMB1015-210
			BALB/c nu/nu	150	2	Day 0, 7, 14	Tumor growth inhibition	TE1015-017	GMB1015-211
	CV1802 (cervical carcinoma)	NC	BALB/c nu/nu	170	0.5, 1	Day 0, 7, 14, 21	Tumor growth inhibition	TE1015-016	GMB1015-210
	CV2320 (cervical carcinoma)	NC	BALB/c nu/nu	154	2, 4	Day 0, 7, 14, 21	No effect	TE1015-015	GMB1015-210
Bladder cancer	BXF 1036 (bladder [urothelial] carcinoma)	204	NMRI nu/nu	80-200	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-002	GMB1015-148
			NMRI nu/nu	50-135	0.5, 1, 2, 4	Day 0	Tumor regression	TE1015-008	GMB1015-212
			NMRI nu/nu	50-135	0.5	Day 0	Tumor growth inhibition	TE1015-009	GMB1015-212
			NMRI nu/nu	50-135	0.5	Day 0	Tumor growth inhibition	TE1015-012	GMB1015-212
Esophageal cancer	ES0195 (esophageal cancer)	NC	BALB/c nu/nu	143	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1021-011	GMB1015-224
NSCLC	LXFA 289 (lung adenocarcinoma)	148	NMRI nu/nu	80-200	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-003	GMB1015-149
	LXFE 690 (lung squamous cell carcinoma)	167	NMRI nu/nu	80-200	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-003	GMB1015-149
	LXFA 1041 (lung adenocarcinoma)	184	NMRI nu/nu	130	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-005	GMB1015-225
	LXFL 1674 (large cell lung cancer)	135	NMRI nu/nu	50-250	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-006	GMB1015-225
	LXFE 1066 (squamous cell carcinoma)	16	NMRI nu/nu	50-250	4	Day 0, 7	No effect	TE1015-006	GMB1015-225
	LU0395 (lung cancer)	NC	BALB/c nu/nu	142	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1021-012	GMB1015-225
	LXFE 772 (lung cancer)	NC	NMRI nu/nu	116	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1021-016	GMB1015-225

Indication	PDX Model (Type)	TF Expression (H-score)	Mouse Strain	Tumor Volume at Initiation Treatment (mm^3)	Dose (mg/kg, i.v.)	Dosing Schedule[a]	Anti-Tumor Activity of Tisotumab Vedotin Treatment[b]	Study Number	Report Number
Ovarian cancer	OVXF 1993 (ovarian adenocarcinoma)	50	NMRI nu/nu	80-200	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-003	GMB1015-149
	OVXF 899 (ovarian cancer)	NC	NMRI nu/nu	120	4	Day 0, 7	No effect	TE1021-014	GMB1015-226
	OVXF 550 (ovarian cancer)	NC	NMRI nu/nu	120	4	Day 0, 7	No effect	TE1021-015	GMB1015-226
Pancreatic cancer	PAXF 1657 (pancreatic adenocarcinoma)	153	NMRI nu/nu	80-200	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-002	GMB1015-148
	PA5415 (pancreatic cancer)	NC	NOD/SCID	210-235	0.5, 1, 2	Day 0, 7, 14, 21,28	No effect	TE1015-011	GMB1015-227
Prostate cancer	PRXF MRI-H 1579 (prostate carcinoma)	128	NMRI nu/nu	80-200	4	Day 0, 7	Tumor regression	TE1015-002	GMB1015-148

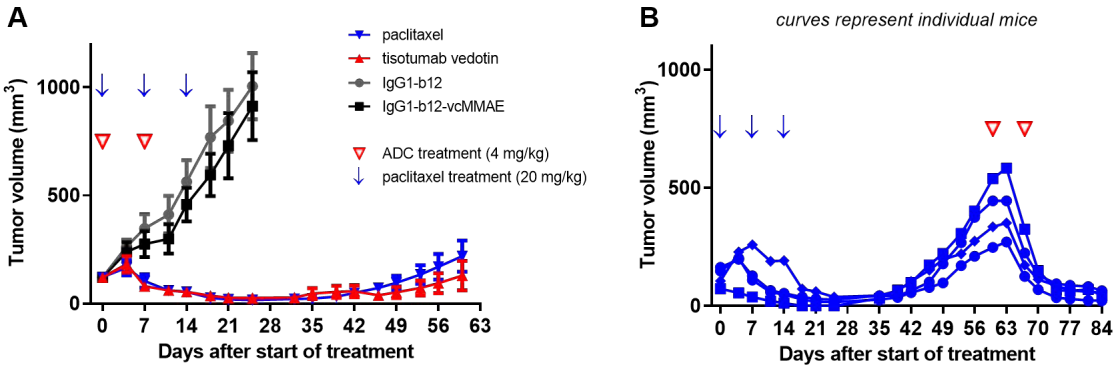
ADC: antibody-drug conjugate; ANOVA: analysis of variance; H-score: histo score; IgG1-b12: isotype control antibody; IgG1-b12-vcMMAE: isotype control ADC; i.v.; intravenous; NC: not conducted; NMRI nu/nu: spontaneous mutant T-cell deficient mice; NOD/SCID: nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice; NSCLC: non-small-cell lung cancer; PDX: patient-derived xenograft; TF: tissue factor;

a Day indicates day after treatment initiation

b At highest dose tested in the study. Tumor growth inhibition: average tumor volume was statistically significant smaller than IgG1-b12 and IgG1-b12-vcMMAE treated groups (one-way ANOVA/Mann-Whitney, $P < 0.05$; details can be found in the individual reports). IgG1-b12 was not tested in all experiments. Statistical analysis was performed on the last day that all treatment groups were complete. Tumor regression: average tumor volume smaller than at the initiation of treatment

パクリタキセル投与群を含む試験（報告書番号 GMB1015-148 及び報告書番号 GMB1015-149）では、パクリタキセルにより（部分的な）腫瘍退縮が認められた。チューブリン阻害薬使用歴のある腫瘍に対するチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍作用を検討するため、投与完了後もパクリタキセル投与群の試験を継続した。腫瘍が再増殖し始めた時点で、チソツマブ　ベドチン（4 mg/kg）を週 1 回計 2 回投与した。パクリタキセル処置群へのチソツマブ　ベドチン投与により、5 種のうち 4 種の PDX モデル［BXF 1036、CEXF 773（Figure 7B）、LXFA 289、LXFE 690］で抗腫瘍活性が認められたが、OVXF 1993 モデルに対する効果は弱かった。

Figure 7　子宮頸癌 PDX モデル（CEXF 773）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) 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. (B) Mice that showed tumor outgrowth after discontinuation of paclitaxel treatment were treated with two doses of tisotumab vedotin, resulting in tumor regression in 4/4 mice.

Source: Study GMB1015-149

以上より、チソツマブ　ベドチンは検討した 21 種中 16 種の PDX モデルで強力な抗腫瘍活性を示した。これらの PDX モデルは、TF 発現レベルが異なる各種固形腫瘍組織から作製した。さらに、パクリタキセル処置が奏功し、その後再発した動物に対してもチソツマブ　ベドチンは抗腫瘍活性を示した。

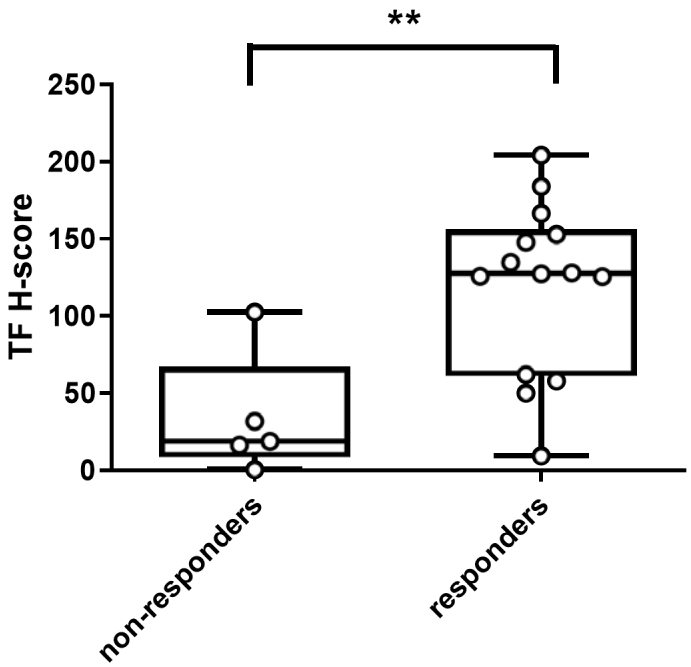
2.8.3　CDX 及び PDX モデルでの in situ TF 発現レベル及びチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性の相関性

報告書番号 GMB1015-228、添付資料番号[4.2.1.1-30 項]

CDX 及び PDX マウスモデルから得た組織で TF 発現レベルを測定した。PDX モデルでは移植した腫瘍組織片が増殖し、個々の腫瘍細胞膜上の TF 発現レベルをフローサイトメトリーで評価できないため（各腫瘍細胞株での TF 発現レベルは 2.5.1 項を参照）、TF 発現レベルは IHC で評価した。簡潔に説明すると、CDX 及び PDX マウスモデルから得た組織切片をヒトサイトケラチン特異的抗体で染色してヒト腫瘍細胞を同定し、チソツマブで染色して TF 陽性細胞を同定し

た。TF 染色強度を 0（陰性）～3（高度）でスコア化し、陽性染色腫瘍細胞の割合を評価した。IHC 法の詳細は 1.1 項に示す。CDX 及び PDX マウスモデルの IHC による TF 発現レベル（H スコア）をそれぞれ Table 5 及び Table 7 に示す。また、CDX 及び PDX マウスモデルでの TF 発現レベル及びチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性（それぞれ 2.8.1 及び 2.8.2 項）の相関を Figure 8 に示す。各モデルで検討した最高用量でチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性が認められた場合（チソツマブ　ベドチン投与群の平均腫瘍体積がアイソタイプ対照 ADC 投与群よりも統計学的に有意に低い場合、$p < 0.05$、一元分散分析）、そのモデルをレスポンダーとみなした。

Figure 8　CDX 及び PDX モデルでの in situ TF 発現レベル（H スコア）及びチソツマブ　ベドチンによる in vivo 抗腫瘍活性の相関



ADC: antibody-drug conjugate; CDX: cell line derived xenograft; H-score: histo score; IHC: immunohistochemistry; IgG1-b12-vcMMAE: isotype control ADC; PDX: patient derived xenograft; MMAE: monomethyl auristatin E; TF: tissue factor.
TF expression levels in CDX and PDX models in situ were determined via IHC. Anti-tumor activity of tisotumab vedotin was determined as described in Sections 2.8.1 (CDX) and 2.8.2 (PDX) and is shown in Table 5and Table 7. A model was designated as 'responding' if there was anti-tumor activity of tisotumab vedotin at the highest dose tested in that model (generally 4 mg/kg), 'non-responding' if there was no anti-tumor activity of tisotumab vedotin for any of the doses tested. Anti-tumor activity was defined as 'statistically significant lower mean tumor volume in the tisotumab vedotin-treated group compared to that in IgG1-b12-vcMMAE-treated group', using statistical analysis as reported. Whiskers show minimum and maximum H-scores for responders and non-responders. Boxes indicate 25 and 75 percentiles. Median H-scores are indicated. Statistical analysis (Mann-Whitney test) showed that the TF H-score in the responding models was significantly higher ($P < 0.01$, **) compared with that in the non-responding models, although responses were also observed in low TF-expressing models.
Source: Study GMB1015-228

2.9　異種移植マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチン及び他の抗体又は化学療法の併用効果

報告書番号 GMB1015-213、添付資料番号[4.2.1.1-17 項]

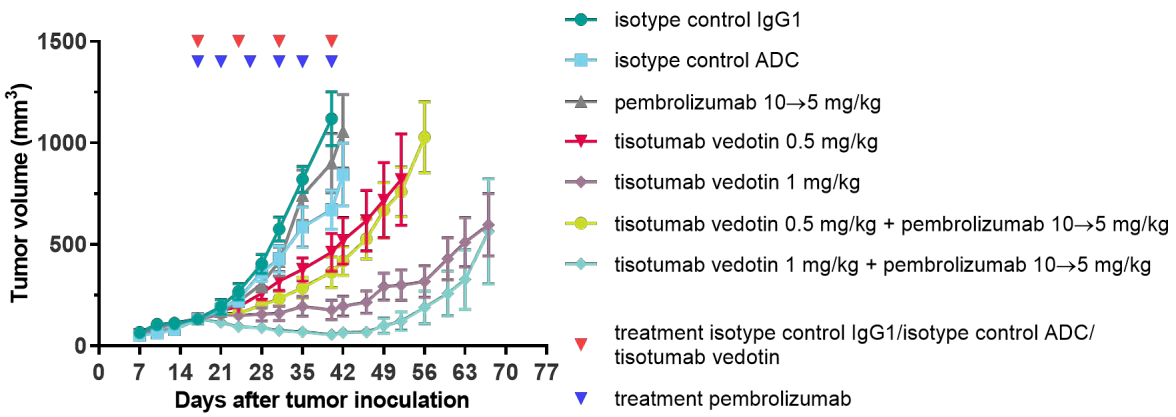
報告書番号 GMB1015-210、添付資料番号[4.2.1.1-23 項]
報告書番号 GMB1015-211、添付資料番号[4.2.1.1-22 項]
報告書番号 GMB1015-212、添付資料番号[4.2.1.1-25 項]

チソツマブ　ベドチンと他の抗体又は化学療法との併用療法の可能性を検討するため、異種移植マウスモデルを用いた併用投与試験を実施した。結果を Table 8 及び Table 9 に要約し、以下に示す。

チソツマブ　ベドチンとペムブロリズマブの併用投与による抗腫瘍活性を、NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ（NSG）マウス（免疫不全マウスに CD34 陽性ヒト造血幹細胞を移植したヒト化マウス）に乳癌細胞株 MDA-MB-231 を皮下投与した CDX モデルを用いて評価した（GMB1015-213）。マウスにチソツマブ　ベドチン単剤（1 mg/kg 又は 0.5 mg/kg を週 1 回計 4 回静脈内投与）、チソツマブ　ベドチン及びペムブロリズマブ（初回 10 mg/kg 投与後、5 mg/kg を 5 日ごとに最大 6 回腹腔内投与）の併用又はペムブロリズマブ単剤を投与した。腫瘍体積は 2.8.1 項に示す方法で測定した。

ペムブロリズマブ単剤投与群では抗腫瘍活性が認められず、チソツマブ　ベドチン（0.5 mg/kg）単剤投与群でも統計学的に有意な効果は認められなかったが、ペムブロリズマブ及びチソツマブ　ベドチン（0.5 mg/kg）併用投与群では、アイソタイプ対照 ADC 投与群と比較して統計学的に有意な抗腫瘍活性が認められた（$p = 0.02$、Mann-Whitney 検定）（Figure 9）。また、チソツマブ　ベドチン（1 mg/kg）単剤投与群（$p = 0.003$）又はペムブロリズマブとの併用投与群（$p < 0.001$）ではアイソタイプ対照 ADC 投与群と比較していずれも統計学的に有意な抗腫瘍活性が認められた。

Figure 9　乳癌 CDX マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチン及びペムブロリズマブ併用投与による抗腫瘍活性



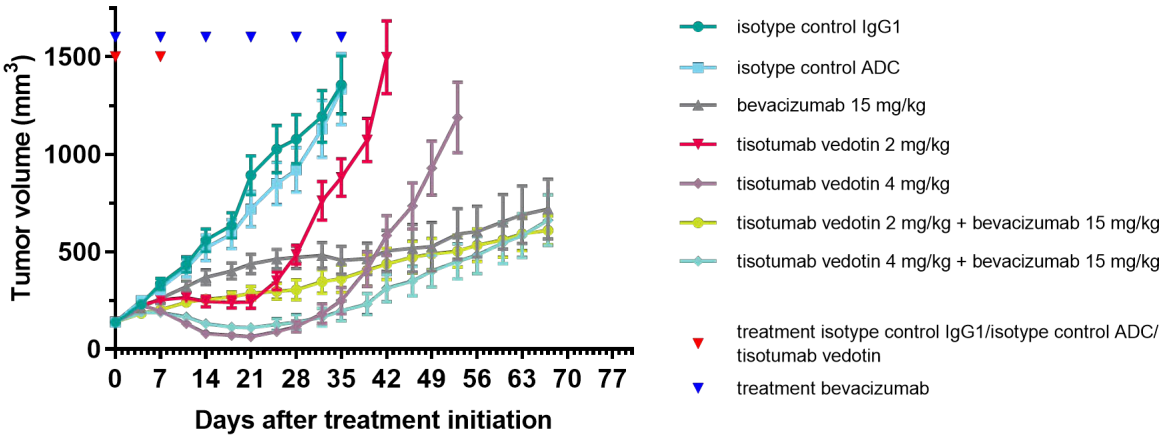
ADC: antibody-drug conjugate; CDX: cell line-derived xenograft; IgG1: immunoglobulin G1; NSG: NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ; SEM: standard error of the mean.

MDA-MB-231 breast cancer CDX model was established in NSG immunodeficient mice humanized with CD34-positive hematopoietic stem cells. Treatment was initiated when tumors reached a volume of ~130 mm^3. Mean tumor volume ± SEM of each group is shown.

Source: Study GMB1015-213

チソツマブ　ベドチン及びベバシズマブの併用投与による抗腫瘍活性を、3 種類の子宮頸癌 PDX マウスモデルを用いて検討した（報告書番号 GMB1015-210）。子宮頸癌患者由来腫瘍（HuPrime®CV1248、CV2320 又は CV1802）の腫瘍片を雌 BALB/c ヌードマウスに皮下投与して PDX モデルを作製した。CV1248 モデルでは、チソツマブ　ベドチン（4 mg/kg）単剤投与群では腫瘍増殖が遅延し、ベバシズマブ（15 mg/kg）単剤投与群では腫瘍増殖が抑制され、チソツマブ　ベドチン及びベバシズマブの併用投与群では持続した腫瘍増殖抑制作用が認められた（Figure 10）。CV2320 モデルでは、チソツマブ　ベドチン（2 又は 4 mg/kg）単剤投与群での抗腫瘍活性は認められなかったが、ベバシズマブ（15 mg/kg）単剤投与群では腫瘍増殖が抑制された。チソツマブ　ベドチン（4 mg/kg）及びベバシズマブ（15 mg/kg）併用投与群では単剤投与群よりも抗腫瘍活性が高く、全てのマウスで持続した腫瘍増殖抑制作用が認められた。CV1802 モデルでは、チソツマブ　ベドチン（0.5 又は 1 mg/kg）単剤又はベバシズマブ（15 mg/kg）単剤投与群で腫瘍増殖が抑制された（Figure 11）。チソツマブ　ベドチン及びベバシズマブの併用投与群では、ベバシズマブ単剤投与群よりも統計学的に有意な抗腫瘍活性が認められ、チソツマブ　ベドチン 1 mg/kg との併用投与で最も高い有効性を示した（$p < 0.001$、Mann-Whitney 検定）。

Figure 10　子宮頸癌 PDX モデル（CV1248）に対するチソツマブ　ベドチン及びベバシズマブ併用投与による抗腫瘍活性

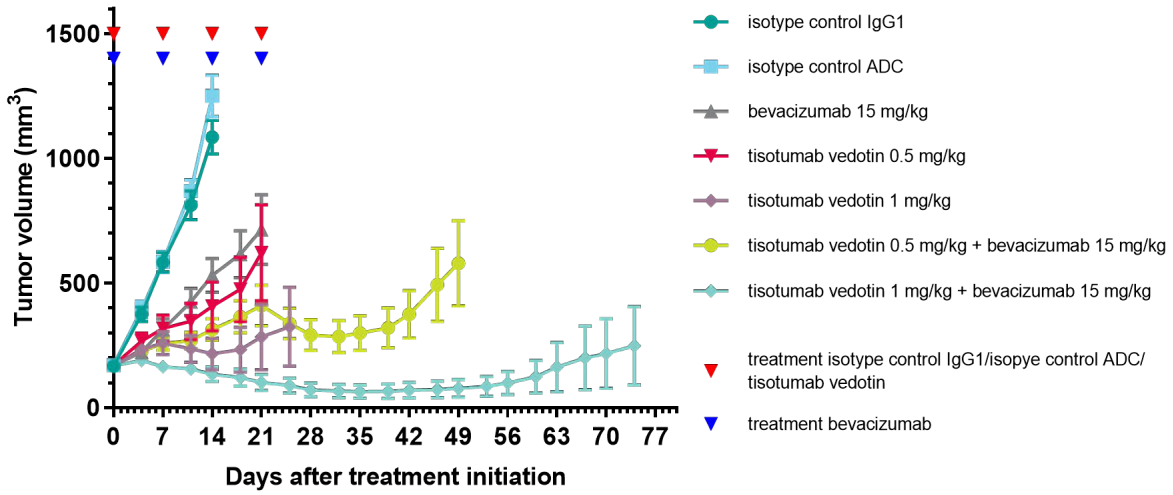


ADC: antibody-drug conjugate; IgG1: immunoglobulin G1; PDX: patient-derived xenograft; s.c.: subcutaneous; SEM: standard error of the mean

The cervical cancer PDX model CV1248 was established by s.c. implantation of tumor blocks. When tumors had reached an average volume of ~140 mm^3, treatment was initiated. Mean tumor volume ± SEM of each group is shown.

Source: Study GMB1015-210

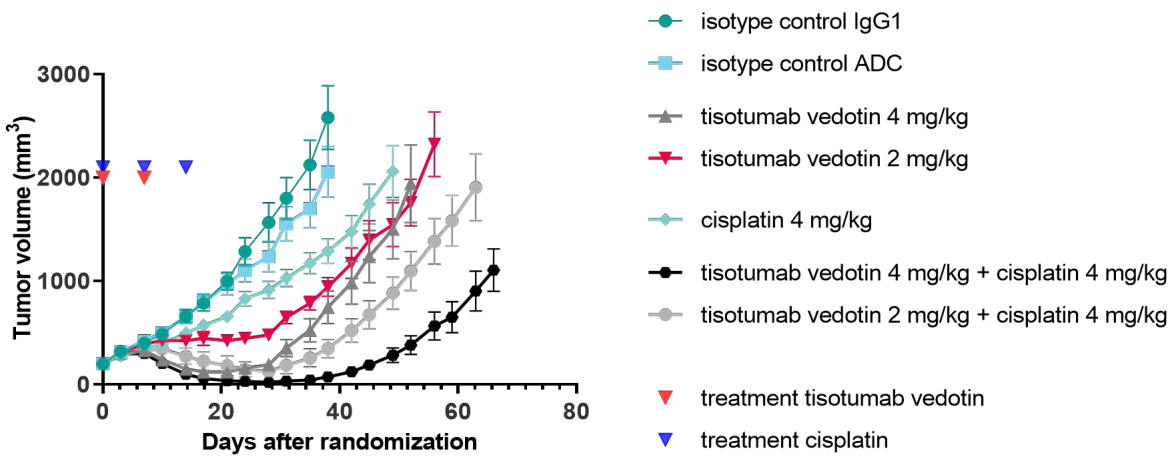
Figure 11　子宮頸癌 PDX モデル（CV1802）に対するチソツマブ　ベドチン及びベバシズマブ併用投与による抗腫瘍活性



ADC: antibody-drug conjugate; IgG1: immunoglobulin G1; PDX: patient-derived xenograft; s.c.: subcutaneous; SEM: standard error of the mean
The cervical cancer PDX model CV1802 was established by s.c. implantation of tumor blocks. When tumors had reached an average volume of ~170 mm^3, treatment was initiated. Mean tumor volume ± SEM of each group is shown.
Source: Study GMB1015-210

チソツマブ　ベドチン及び白金製剤（シスプラチン又はカルボプラチン）の併用投与による抗腫瘍活性を、子宮頸癌 PDX マウスモデルを用いて評価した（報告書番号 GMB1015-211；CV1248 及び CEXF633 モデル）。また、チソツマブ　ベドチン及びシスプラチン又はゲムシタビンとの併用投与による抗腫瘍活性を、膀胱癌 PDX モデルを用いて評価した（報告書番号 GMB1015-212；BXF1036 モデル）。子宮頸癌 PDX モデルで、チソツマブ　ベドチン単剤投与群では腫瘍増殖が効果的に抑制された（Figure 12 及び Figure 13 は CV1248 モデルの結果を示す）。シスプラチン単剤投与群でも、抗腫瘍活性が認められた。カルボプラチン単剤投与群では、CEXF633 モデルの腫瘍増殖を抑制したが、CV1248 モデルでは抑制しなかった。チソツマブ　ベドチン及びシスプラチン又はカルボプラチンの併用投与群は、各単剤投与群と比較してより強い抗腫瘍活性を示した。膀胱癌 PDX モデルでは、チソツマブ　ベドチン、シスプラチン及びゲムシタビンの単剤投与群で腫瘍増殖が効果的に抑制された。チソツマブ　ベドチン、ゲムシタビン及びシスプラチンの 3 剤併用投与群では、各単剤又は他の併用投与群と比較してより高い抗腫瘍活性を示した。さらに、シスプラチン及びゲムシタビン処置が奏功し、その後再発した動物に対しても、チソツマブ　ベドチンは抗腫瘍活性を示した。

Figure 12　子宮頸癌 PDX モデル（CV1248）に対するチソツマブ　ベドチン及びシスプラチン併用投与による抗腫瘍活性

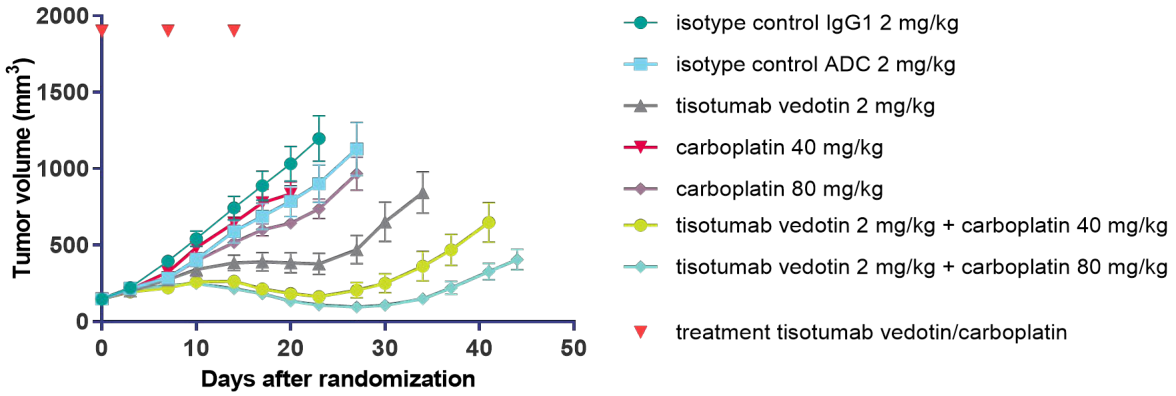


ADC: antibody-drug conjugate; IgG1: immunoglobulin G1; PDX: patient−derived xenograft; s.c.: subcutaneous; SEM: standard error of the mean

The cervical cancer PDX model CV1248 was established by s.c. implantation of tumor fragments. After tumors had reached a volume of ~ 200 mm^3, mice were randomized, and treatment was initiated as indicated. Mean tumor volume ± SEM of each group is shown.

Source: Study GMB1015-211

Figure 13　子宮頸癌 PDX モデル（CV1248）に対するチソツマブ　ベドチン及びカルボプラチン併用投与による抗腫瘍活性



ADC: antibody-drug conjugate; IgG1: immunoglobulin G1; PDX: patient-derived xenograft; s.c.: subcutaneous; SEM: standard error of the mean.

The cervical cancer PDX model CV1248 was established by s.c. implantation of tumor fragments. After tumors had reached a size of ~150 mm^3, mice were randomized, and treatment was initiated as indicated. Mean tumor volume ± SEM of each group is shown.

Source: Study GMB1015-211

全ての併用投与試験で、マウスの体重を測定した。チソツマブ　ベドチン単剤及びペムブロリズマブ、ベバシズマブ又はシスプラチンとの併用投与群で、体重の有意な減少は認められなかった（投与開始時と比較して 3%以下）。最高用量（80 mg/kg）のカルボプラチン（単剤又はチソツ

マブ　ベドチンとの併用）投与群では、軽度の体重減少（投与開始時と比較して 10%以下）が認められたが、投与中止後に回復した（少なくとも投与開始時の 90%まで）。これらの所見は、チソツマブ　ベドチン、ペムブロリズマブ及びベバシズマブは、マウス組織内で内在的に発現するマウス相同抗原には結合せず、ヒト標的抗原にのみ結合することを前提として解釈する必要がある。

Table 8　異種移植マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチン及び他の抗体療法の併用投与による抗腫瘍活性

Xenograft	Origin	Treatment	Dose	Dosing Schedule[a]	Effect	Report Number (Study Number)
MDA-MB-231 (CDX)	Breast adenocarcinoma	Tisotumab vedotin	0.5 mg/kg	Day 0, 7, 14, 23	No effect	GMB1015-213 (ME1015-039)
			1 mg/kg	Day 0, 7, 14, 23	Growth inhibition	
		Pembrolizumab	10-5 mg/kg	Day 0 10 mg/kg, followed by 5 mg/kg on Day 4, 9, 14, 18, 23	No effect	
		Tisotumab vedotin plus pembrolizumab	0.5 mg/kg plus 10-5 mg/kg	As above for single agents	Growth inhibition	
		Tisotumab vedotin plus pembrolizumab	1 mg/kg plus 10-5 mg/kg	As above for single agents	Growth inhibition	
CV1248 (PDX)	Cervical cancer	Tisotumab vedotin	2 mg/kg	Day 0 and 7	No effect	GMB1015-210 (TE1015-013)
			4 mg/kg	Day 0 and 7	Growth inhibition	
		Bevacizumab	15 mg/kg	Day 0, 7 ,14 ,21, 28, 35	Growth inhibition	
		Tisotumab vedotin plus bevacizumab	2 mg/kg plus 15 mg/kg	As above for single agents	Growth inhibition	
			4 mg/kg plus 15 mg/kg	As above for single agents	Growth inhibition	
CV2320 (PDX)	Cervical cancer	Tisotumab vedotin	2 mg/kg	Day 0, 7, 14, 21	No Effect	GMB1015-210 (TE1015-015)
			4 mg/kg		No effect	
		Bevacizumab	15 mg/kg		Growth inhibition	
		Tisotumab vedotin plus bevacizumab	2 mg/kg plus 15 mg/kg		Growth inhibition[b]	
			4 mg/kg plus 15 mg/kg		Growth inhibition/ tumor regression[b, c]	
CV1802 (PDX)	Cervical cancer	Tisotumab vedotin	0.5 mg/kg	Day 0, 7, 14, 21	Growth inhibition	GMB1015-210 (TE1015-016)
			1 mg/kg		Growth inhibition	
		Bevacizumab	15 mg/kg		Growth inhibition	
		Tisotumab vedotin plus bevacizumab	0.5 mg/kg plus 15 mg/kg		Growth inhibition/ tumor regression[c]	
			1 mg/kg plus 15 mg/kg		Tumor regression[c]	

CDX: cell line-derived xenograft; PDX: patient-derived xenograft

a Day indicates time after treatment initiation.

b, c Significantly better (Mann-Whitney test) than treatment with the same dose tisotumab vedotin or the combination agent alone, respectively

Table 9　異種移植マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチン及び化学療法の併用投与による抗腫瘍活性

Xenograft	Origin	Treatment	Dose	Dosing Schedule[a]	Effect	Report Number (Study Number)
CV1248 (PDX)	Cervical cancer	Tisotumab vedotin	0.5 mg/kg	Day 0 and 7	No effect	GMB1015-211 (TE1015-010)
			1 mg/kg		No effect	
			2 mg/kg		Growth inhibition	
			4 mg/kg		Growth inhibition	
		Cisplatin	4 mg/kg	Day 0, 7 and 14	Growth inhibition/tumor regression	
		Tisotumab vedotin plus cisplatin	0.5 mg/kg plus 4 mg/kg	As above for single agents	Growth inhibition	
			1 mg/kg plus 4 mg/kg		Tumor regression	
			2 mg/kg plus 4 mg/kg		Tumor regression[b, c]	
			4 mg/kg plus 4 mg/kg		Tumor regression[b, c]	
BXF1036 (PDX)	Bladder cancer	Tisotumab vedotin	0.5 mg/kg	Day 0	Growth inhibition	GMB1015-212 (TE1015-012)
		Cisplatin	2 mg/kg	Day 0 and 7	Growth inhibition	
		Gemcitabine	25 mg/kg	Day 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21	Growth inhibition	
		Tisotumab vedotin plus cisplatin	0.5 mg/kg plus 2 mg/kg	As above for single agents	Growth inhibition[b, c]	
		Tisotumab vedotin plus gemcitabine	0.5 mg/kg plus 25 mg/kg	As above for single agents	Growth inhibition/Tumor regression[c]	
		tisotumab vedotin plus gemcitabine plus cisplatin	0.5 mg/kg plus 25 mg/kg plus 2 mg/kg	As above for single agents	Tumor regression[b, c]	
BXF1036 (PDX)	Bladder cancer	Tisotumab vedotin	0.5 mg/kg	Day 0	Tumor regression	GMB1015-212 (TE1015-009)
		Gemcitabine-cisplatin	25 mg/kg-2 mg/kg	Day 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21-Day 0, 7	Growth inhibition	
		Gemcitabine-cisplatin	200 mg/kg-3 mg/kg	Day 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21-Day 0, 7, 14, 21	Tumor regression	
		Tisotumab vedotin plus gemcitabine-cisplatin	0.5 mg/kg plus 25 mg/kg-2 mg/kg	As above for single agents	Tumor regression[c]	
		Tisotumab vedotin plus gemcitabine-cisplatin	0.5 mg/kg plus 200 mg/kg-3 mg/kg	As above for single agents	Tumor regression[b]	
CV1248 (PDX)	Cervical cancer	Tisotumab vedotin	2 mg/kg	Day 0, 7, 14	Growth inhibition	GMB1015-211 (TE1015-017)
		Carboplatin	40 mg/kg		No effect	
			80 mg/kg		No effect	
		Tisotumab vedotin plus carboplatin	2 mg/kg plus 40 mg/kg		Tumor regression[c]	
			2 mg/kg plus 80 mg/kg		Tumor regression[b, c]	

Xenograft	Origin	Treatment	Dose	Dosing Schedule[a]	Effect	Report Number (Study Number)
CEXF633 (PDX)	Cervical cancer	Tisotumab vedotin	2 mg/kg	Day 0, 7, 14, 21	Growth inhibition	GMB1015-211 (TE1015-018)
		Carboplatin	40 mg/kg		Tumor regression	
			80 mg/kg		Tumor regression	
		Tisotumab vedotin plus carboplatin	2 mg/kg plus 40 mg/kg		Tumor regression[b, c]	
			2 mg/kg plus 80 mg/kg		Tumor regression[b]	

PDX: patient-derived xenograft

a Day indicates time after treatment initiation.

b, c Significantly better (Mann-Whitney test) than treatment with the same dose tisotumab vedotin or the combination agent alone, respectively

以上の異種移植マウスモデルを用いた試験結果から、チソツマブ　ベドチン及び他の抗体療法（ペムブロリズマブ、ベバシズマブ）又は化学療法（シスプラチン、カルボプラチン、ゲムシタビン）の併用により、各単剤投与と比較して抗腫瘍活性が増強される可能性が示唆された。また、ゲムシタビン及びシスプラチン処置が奏功し、その後再発した動物に対してもチソツマブ ベドチンは抗腫瘍活性を示した。

3.　副次的薬理試験

3.1　血液凝固に対するチソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの影響

血管損傷後の外因性凝固経路では、TF の FVII への曝露後に生じる FVIIa への変換が最初のステップである。チソツマブ　ベドチンは TF と FVIIa の結合に競合し（2.3.1 項）、TF:FVIIa 複合体を介した下流シグナル伝達に影響を及ぼすため（2.3.2 項）、TF に対するチソツマブ　ベドチンの結合は血管損傷後の血液凝固に影響する可能性がある。

凝固に対するチソツマブ　ベドチンの影響を評価するため、複数の in vitro 試験を実施した。ほとんどの試験では、チソツマブ　ベドチンの代替としてチソツマブを使用した。チソツマブの外因性凝固経路に対する影響は、FXa 生成試験及び一連の凝固検査（標準的な PT 測定、非標準的な凝固試験、TEG 及び TGA）により評価した。チソツマブ　ベドチンについては、標準的な PT 測定は実施したが、他の試験系では評価しなかった。

以下の項に示すように、全ての in vitro 血液凝固試験で、対照群と比較してチソツマブによる変化が認められた。

3.1.1　TF 誘導性 FXa 生成に対するチソツマブの影響

報告書番号 GMB1015-086、添付資料番号[4.2.1.2-1 項]

TF:FVIIa 複合体はタンパク質分解作用により FX を活性化して FXa を生成するため、チソツマブ　ベドチンによる TF:FVIIa 複合体の形成阻害により FXa 生成が低下する可能性がある。

TF 誘導性 FXa 生成に対するチソツマブの影響を評価するため、遺伝子組換え TF を FVIIa 及び FX とインキュベートし、比色分析法を用いて FXa 生成を測定した。脂質化した遺伝子組換え TF（デイド　イノビン、最終希釈倍率 1:1000）をチソツマブ（最終濃度 1.2～900 ng/mL）の存

在又は非存在下、30 分間室温であらかじめインキュベーションした。ヒト FVIIa（最終濃度 1 nmol/L）及び遺伝子組換え FX（最終濃度 200 nmol/L）を添加し、37°C で 30 分間インキュベーションした。反応を停止させ、発色性基質を用いて FXa 生成量を測定した。

最高濃度（900 ng/mL）での 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。

3.1.2　TF 誘導性凝固に対するチソツマブの影響

（報告書番号 GMB1015-086、添付資料番号[4.2.1.2-1 項]）

TF 誘導性血液凝固に及ぼすチソツマブの影響を検討するため、TF が律速因子となる凝固アッセイを確立した。このアッセイでは、ヒト血漿に外因性 TF を添加して凝固反応を開始し、血栓形成時間を測定した。

チソツマブ（0.0046～10 µg/mL）を脂質化した遺伝子組換え TF（デイド　イノビン、最終希釈倍率 1:1000）及び $CaCl_2$（最終濃度 17 mmol/L）に添加し、その混合液をクエン酸塩添加ヒト血漿に添加した。カルシウム再沈着により凝固反応を開始し、試料の 405 nm での吸光度（$OD_{405\ nm}$）を凝固開始直後から 15 秒ごとに 15 分間測定した。試験は室温で実施した。

チソツマブ（10 µg/mL）により血栓形成時間はアイソタイプ対照と比較して 2.3 倍延長した。

3.1.3　PT に対するチソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの影響

報告書番号[redacted]264005、添付資料番号[4.2.1.2-2 項]

チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの血液凝固に対する影響を、標準的な PT 測定法により評価した。ヒト及びカニクイザルの血漿にチソツマブ　ベドチン、チソツマブ又はアイソタイプ対照 IgG1（濃度範囲 0.01～20 µg/mL）を添加した。

全血をクエン酸三ナトリウム（3.8%、w/v）で抗凝固処理（血液とクエン酸三ナトリウムを 9：1 の比率で混合）した。血漿を脂質化した遺伝子組換え TF（デイド　イノビン）及びカルシウムとインキュベートし、凝固反応を開始した。PT は ACL Advance Coagulometer（Instrumentation Laboratory B.V.、オランダ）を用いて測定した。

チソツマブ　ベドチン及びチソツマブはいずれの濃度でもヒト及びカニクイザル血漿の PT に影響を及ぼさなかった。

3.1.4　内因性 TF 活性に対するチソツマブの影響（TEG）

報告書番号[redacted]-Study-Report-0364、添付資料番号[4.2.1.2-3 項]

報告書番号[redacted]-Study-Report-0361、添付資料番号[4.2.1.2-4 項]

凝固反応に対するチソツマブの影響を検討するために、TEG 試験を 2 試験実施した。凝固反応を開始するため、最初の試験ではリポ多糖（lipopolysaccharide、LPS）で刺激した単球を TF 供給源として使用し、次の試験では低濃度の遺伝子組換え TF を使用した。

ヒト及びカニクイザル全血での LPS 誘発単球 TF 活性に対するチソツマブの影響を、TEG を用いて評価した（報告書番号[redacted]-StudyReport-0364）。

チソツマブはヒト及びカニクイザル TF に対して同程度の EC_{50} 値で結合した（[2.6.6-8.1.1 項]、報告書番号 GMB1015-088）。チソツマブがカニクイザル TF と機能的に相互作用するかを評価するため、カニクイザル全血も用いた。単球の TF 発現を誘導し、単球由来の TF 陽性マイクロパーティクル（microparticle、MP）を遊離させるために、新鮮分離したヒト（n=3）又はカニクイザル（n=3）の全血を 3.2%（w/v）クエン酸三ナトリウムで抗凝固処理（血液とクエン酸三ナトリウムを 9 : 1 の比率で混合）し、LPS（10 µg/mL）と 4 時間インキュベートした（Amirkhosravi et al., 1996; Egorina et al., 2008; van der Logt et al., 1994）。その後、LPS で刺激した全血をチソツマブ（1、10、20 又は 50 µg/mL）と 10 分間インキュベートし、TF に結合させた。カルシウム再沈着により TEG アッセイカップ内の血液試料の凝固反応を開始させ、TEG®5000 トロンボエラストグラフ®止血分析装置（ヘモネティクス社、マサチューセッツ州、米国）を用いて血栓形成過程を分析した。

LPS 刺激により凝固時間（凝固活性化から初期フィブリン形成までの時間、R 値）がドナーA では 21 分から 7 分に、ドナーB では 19 分から 5 分に、ドナーC では 39 分から 6 分に短縮した。この LPS 誘発 TF 依存性の凝固時間短縮はチソツマブにより阻害され、その阻害率は 20 µg/mL（ドナーA の最高濃度）で 15%～30%（n=3）、50 µg/mL（ドナーB 及び C の最高濃度）で 15%～30%（n=2）であった。チソツマブは、波形の最大振幅で示される最大血栓強度には影響しなかった。ドナー（n=3）の個体値を Table 10 に示す。

LPS 刺激によりカニクイザル全血の凝固時間も短縮したが、非刺激全血との差はヒト全血の場合と比較して小さかった（サル 1 では 4 分から 2 分、サル 2 では 6 分から 2 分、サル 3 では 7 分から 3 分に短縮）。非刺激のカニクイザル全血で凝固時間が短縮したのは、採血から分析までの時間が比較的長く（4～5 時間）、この間に血液が活性化されたためと考えられた。それにも関わらず、凝固反応開始前のカニクイザル全血とチソツマブとのインキュベーションにより、TF 依存性の血栓形成が遅延した。検討した最高濃度である 20 µg/mL のチソツマブによる阻害率は、61%～100%（カニクイザル、n=3）であった。チソツマブ存在下／非存在下でのカニクイザル全血（n=3）の凝固時間を Table 10 に示す。ヒト及びカニクイザル全血で得られたデータの比較は困難であるが、本試験結果から、in vitro TEG アッセイでの TF 依存的なヒト全血凝固反応に対してチソツマブは何らかの影響を及ぼす可能性があること、チソツマブはカニクイザル TF と機能的に相互作用すること及び凝固時間の延長はカニクイザル全血でより顕著である可能性が示唆された。

次の試験では、LPS 刺激単球の内因性 TF ではなく、低濃度の遺伝子組換え TF により凝固反応を開始した（報告書番号[redacted]-Study-Report-0361）。新鮮クエン酸加ヒト全血（n=2）に、内因性凝固経路を阻害するためトウモロコシ由来トリプシン阻害剤（corn trypsin inhibitor、CTI）18.3 µg/mL を添加し、遺伝子組換え TF（デイド　イノビン、0.35 pmol/L、最終希釈倍率 1:17000）と静かに混合し、カルシウム再沈着により凝固反応を開始した。回転式トロンボエラストメトリー（roTEM、ペンタファーム社、ミュンヘン、ドイツ）を用いて動的な凝固機能を評価し、約 60 分間測定した。

抗体非存在下での凝固時間は 12 分（n=2 の平均値）であった。チソツマブ（20 µg/mL）存在下での凝固時間は 23 分であった（Table 10）。本測定法を用いたこれらの結果から、チソツマブは in vitro で TF 依存性の凝固反応を阻害することが示された。

Table 10　TEG 及び TGA で評価した凝固時間に対するチソツマブの影響（個体値）

Assay	Source of TF	Highest Dose Tested (μg/mL)	Donor	Clotting Lag Time (minutes)	
				Tisotumab	Isotype Control IgG
TEG	LPS-stimulated whole blood[a]	20[d]	Human donor A	9.5	6.6
			Human donor B	6.8	4.8
			Human donor C	16.1	6.2
			Cynomolgus monkey donor 1	5.1	1.8
			Cynomolgus monkey donor 2	5.0	1.8
			Cynomolgus monkey donor 3	5.4	2.8
	Innovin (1:17000; 0.35 pmol/L)[b, c]	20	n.a.	23.3	11.8[e]
TGA	Innovin (1:6,000; 1 pmol/L)[b, c]	20	n.a.	34.4	2.3[e]
	MP-associated TF (plasma obtained from LPS-stimulated whole blood)[a]	20	Human donor A	42.0	17.0
			Human donor B	40.0	18.5
			Human donor C	33.0	20.0
			Cynomolgus monkey donor 1	15.5	3.0
			Cynomolgus monkey donor 2	21.0	6.0
			Cynomolgus monkey donor 3	20.0	9.0
	MP-associated TF (plasma from xenograft-bearing mice)[a]	20	n.a.	21.0	19.5

IgG: immunoglobulin G; LPS: lipopolysaccharide; MP: microparticle; n.a.: not applicable; TEG: thromboelastography; TF: tissue factor; TGA: thrombin generation assay

a　Study report: [redacted]Study-Report-0364

b　Study report: [redacted]Study-Report-0361

c　Innovin is prepared from purified recombinant human TF, combined with synthetic phospholipids, calcium, buffers, and stabilizers; different batches of Innovin cannot be compared directly due to batch-to-batch variation in coagulant activity.

d　For two out of three human donors, the highest dose tested was 50 μg/mL. Results at this concentration were comparable to results at 20 μg/mL.

e　Isotype control IgG was not included; lag time in the absence of antibody (buffer control) is presented instead.

3.1.5　内因性 TF 活性に対するチソツマブの影響（TGA）

報告書番号[redacted]-Study-Report-0364、添付資料番号[4.2.1.2-3 項]

報告書番号[redacted]-Study-Report-0361、添付資料番号[4.2.1.2-4 項]

トロンビン生成開始に対するチソツマブの影響を評価するために、遺伝子組換え TF を用いた TGA を 2 試験実施した。さらに、LPS 刺激全血（Nieuwland et al., 2000; Wang et al., 2009）又は異種移植マウスモデル由来の TF 陽性 MP を TF の供給源として用いた TGA も実施した。

最初の試験では、トロンビン生成開始時間（the time to initial thrombin generation、LT）を指標として TF 活性を評価した（[redacted]-Study-Report-0364）。血漿中の TF 活性により LT は短縮する（Ollivier et al., 2010）。次の試験では、蛍光発色トロンビン基質を用いて、Hemker ら（Hemker et al., 2000）の報告に基づき蛍光強度からトロンビン濃度を算出した（報告書番号[redacted]-Study-Report-0361）。

遺伝子組換え TF で惹起したトロンビン生成に対するチソツマブの阻害作用を検討した。全血（3.1.4 項）から遠心分離した血漿に遺伝子組換え脂質化 TF（デイド　イノビン、5 pmol/L）を

添加し、カルシウム再沈着によりトロンビン生成を開始させ、蛍光発色基質を用いてトロンビン生成を測定した（報告書番号[redacted]-Study-Report-0364）。チソツマブ（20 µg/mL）によりLT は 14%延長し、トロンビン生成はわずかに阻害された。

次の試験では、全血（3.1.4 項）を高速遠心分離（毎分 13400 回転、3 分間、2 回）して得られた血漿に遺伝子組換え脂質化 TF（デイド　イノビン、1 pmol/L）を少量添加し、カルシウム再沈着によりトロンビン生成を開始させ、蛍光発色基質を用いてトロンビン生成を測定した（[redacted]-Study-Report-0361）。チソツマブ（20 µg/mL）により LT は 2.3 分（溶媒対照）から 34.4 分に延長した（Table 10）。

これらの試験結果から、チソツマブは LT を延長させることが示された。2 回目の試験では LT 延長がより顕著であったが、低濃度の遺伝子組換え TF を使用したためと考えられる。

ヒト及びカニクイザルの TF 陽性 MP に対するチソツマブの作用を評価するため、LPS で刺激した全血（ヒト及びカニクイザル各 n=3）を遠心分離して乏血小板血漿（platelet-poor plasma、PPP）を得た。TF 供給源として単球由来の TF 陽性 MP を使用した。内因性凝固経路を阻害し、トロンビン生成を誘導する開始因子が TF 活性化のみするために、PPP に CTI（25 µg/mL）を添加した。カルシウム再沈着及び蛍光発色基質の添加前に PPP をチソツマブとインキュベートし、トロンビン生成を測定した。

LPS によりヒト血漿（n=3）の LT は著しく短縮され（それぞれ 84 分から 17 分、88 分から 19 分及び 90 分から 20 分）、検討した最高濃度である 20 µg/mL のチソツマブにより延長し（それぞれ 42、40 及び 33 分）（Table 10）、アイソタイプ対照抗体と比較して平均 2.4 倍延長した。また、LPS によりカニクイザル血漿（n=3）の LT も短縮され（それぞれ 5 分から 3 分、12 分から 6 分及び 13 分から 9 分）、検討した最高濃度である 20 µg/mL のチソツマブにより延長し（それぞれ 16、21 及び 20 分）（Table 10）、アイソタイプ対照抗体と比較して平均 3.7 倍延長した。

血中のヒト腫瘍由来 TF 陽性 MP により誘導されるトロンビン生成に対するチソツマブの阻害作用を評価するため、ヒト異種移植マウスの血漿を TGA により分析した。

ヒト担癌マウスの血漿中に活性型ヒト TF が含まれることが示されている（Davila et al., 2008）。ヒト膵癌細胞を胸腺欠損ヌードマウス（nu/nu）に同所移植し、移植 3～4 週間後に血漿を採取した。超遠心分離により腫瘍由来 MP を回収し、TF 陽性 MP を TGA により測定した。アッセイは粒子を含まないヒト血漿を用いて実施した。マウス TF はヒト血漿中で凝固反応を活性化できないため、測定された全ての TF 活性は血中の腫瘍由来 TF 陽性 MP に起因する。上述した方法（[redacted]-Study-Report-0364）で TGA を実施した結果、チソツマブ（20 µg/mL）は LT を延長しないことが示された（Table 10）。

4.　安全性薬理試験

4.1　hERG K^+チャネルに対する MMAE の阻害作用

報告書番号[redacted]129-09-001、添付資料番号[4.2.1.3-1 項]

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）発現 HEK293 細胞を用いて、ホールセル電位クランプ法によりカリウムチャネルに対する

MMAE の作用を評価した。被験物質及び対照物質の曝露前及び曝露中（35°C）に、hERG 発現 HEK293 細胞からの hERG テール電流のピークを測定した。

MMAE 溶液は均一かつ目標濃度で調製され、陰性対照（生理食塩水）には被験物質が含まれていないことが確認された。10 及び 100 µmol/L（n = 4）での MMAE の作用を陰性対照（n = 4）と比較した。シサプリド水和物（25 nmol/L、n = 2）を陽性対照として用いた。

MMAE 10 及び 100 µmol/L での fractional block（平均 ± 標準誤差、hERG 電流阻害の程度を示す）は、それぞれ 0.103 ± 0.030 及び 0.237 ± 0.056 であり、100 µmol/L で陰性対照との有意差が認められた（$P < 0.05$）。検討した最高濃度（100 µmol/L）で、fractional block が 0.50 を超える hERG テール電流のピークが認められなかったことから、IC_{50} 値は 100 µmol/L 以上と判断された。

陰性対照（生理食塩水）及び陽性対照（シサプリド水和物 25 nmol/L）の fractional block は、それぞれ 0.063 ± 0.023 及び 0.743 ± 0.007 であった。

以上より、チソツマブ　ベドチン由来の MMAE が in vitro で hERG カリウムチャネルを阻害する可能性は低いと考えられた。

4.2　カニクイザルの心血管系、呼吸器系及び中枢神経系に対するチソツマブ　ベドチンの影響

チソツマブ　ベドチンの安全性薬理を目的とした独立した試験は実施していない。規制ガイドライン（ICH S9）に従い、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験内で安全性薬理を評価した（[2.6.6-3.2.2 項]及び[2.6.6-3.2.3 項]）。チソツマブ　ベドチンの単回投与（初回投与後）及び 6 mg/kg までの投与量の反復投与では、心血管系、呼吸器系及び中枢神経系に対する影響は認められなかった。

両試験（[redacted]521988 及び[redacted]522531）では、想定臨床投与間隔（3 週間に 1 回）で最大 6 mg/kg までの投与量のチソツマブ　ベドチンを反復投与し、心血管系、呼吸系及び中枢神経系の機能を評価した。

GLP 適用試験（[redacted]522531）では、試験期間中の複数の時点（投与開始第 1、22、43、64 及び 85 日の投与前及び投与約 24 時間後）で心電図、血圧、体温、脈拍数及び呼吸数を測定した。心電図では I、II、III、aVR、aVL 及び aVF 誘導を記録した。

[redacted]522531 では各投与前及び投与約 24 時間後に呼吸数を評価し、2 週目及び 6 週目では回復期間中に 2 回評価した。15 秒間の呼吸数に 4 を乗じて 1 分間の値を得た。

中枢神経系に対する影響は行動観察により評価し、活動性（多動、嗜眠、不活発）、歩行（規則性、筋緊張、振戦、バランス、姿勢）、気質（無関心、神経過敏）及び発声を、投与前に 1 回、投与期間及び回復期間に週 1 回観察した。

遊離型 MMAE の適切な血漿中濃度に基づき（[2.6.5-4.2 項]）、安全性薬理試験の測定時点を投与 24 時間後とした。

以上より、カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを投与した後、心血管系、呼吸器系又は中枢神経系に異常は認められなかった。

5.　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6.　考察及び結論

6.1　考察

広範な固形癌で TF の異常発現が報告されており（Cocco et al., 2010; Cocco et al., 2011a; Cocco et al., 2011b; Kaushal et al., 2008; Patry et al., 2008; Sawada et al., 1999; Uno et al., 2007; Wojtukiewicz et al., 1999; reviewed in Rondon et al., 2019）、申請者が実施した IHC 試験でも系統的に解析され、確認された（1.1 項）。子宮頸癌は TF 発現率が最も高い癌種の 1 つであった。

In vitro 及び in vivo の非臨床モデルを用いて、チソツマブ　ベドチンの効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験を実施した。一部の in vitro 薬理試験は、チソツマブ　ベドチンの抗体部分であるチソツマブを用いて実施した。チソツマブ　ベドチンとチソツマブとの直接比較により、標的結合、細胞内取込み及び Fc を介したエフェクター機能は同程度であることが明らかとなった。このことから、チソツマブの機能特性、すなわち Fc 領域及び Fab 領域に依存する特性は、vcMMAE との結合後も維持されていることが示された。したがって、MMAE との結合により追加の抗腫瘍活性（腫瘍細胞に対する直接的な細胞傷害作用、隣接腫瘍細胞に対するバイスタンダー効果及び ICD 活性等）が得られるものの、チソツマブを用いた非臨床薬理試験結果は、チソツマブ　ベドチンにも同様に適用できると考えられる。

チソツマブ　ベドチンは、腫瘍細胞膜上に発現する TF に効果的に結合することが示された。チソツマブ　ベドチンは TF に結合すると速やかに細胞内に取り込まれ、リソソームに輸送された。これは vcMMAE を用いた ADC による効率的な殺細胞作用に必要な条件である（Doronina et al., 2003）。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を示した。チソツマブ　ベドチンは TF 高発現（> 300000 sABC/cells）腫瘍細胞株に対して強力な細胞傷害活性（IC_{50} 値 < 10 ng/mL）を示し、腫瘍細胞株に対する感受性と TF 発現との間に相関が認められたことから、MMAE を介した直接的な細胞傷害活性は TF 発現に依存していることが示唆された。さらに、TF 高発現細胞株と TF 低発現細胞株の共培養で、チソツマブ　ベドチンは TF 低発現細胞株に対して、バイスタンダー効果による細胞傷害活性を示した。この結果から、腫瘍中の TF 発現細胞の割合が低い場合でも、チソツマブ　ベドチンは強力な細胞傷害活性を誘導する可能性が十分あり、均一な TF 発現が抗腫瘍活性の必須条件ではないことを示している。

チソツマブ　ベドチンの強力な細胞傷害活性は、効果的な in vivo 抗腫瘍活性によって更に裏付けられた。TF 発現レベルが異なる各種腫瘍細胞株由来の CDX マウスモデルに対して、チソツマブ　ベドチンはいずれも抗腫瘍活性を示した。チソツマブ　ベドチンによる抗腫瘍活性は TF 低発現の CTD モデルでも観察されたが、試験結果から、概して CDX マウスモデルに対するチソツマブ　ベドチンの in vivo 抗腫瘍活性は、TF 発現レベルと相関していることが示唆された。

重要な点は、ヒトの腫瘍間及び腫瘍内に存在する遺伝的及び組織学的な不均一性を再現していると考えられる PDX モデルで（Moro et al., 2012; Tentler et al., 2012）、チソツマブ　ベドチンによ

る強力な in vitro 抗腫瘍活性が確認されたことである。NSCLC、子宮頸癌、膀胱癌、食道癌、卵巣癌、膵癌及び前立腺癌由来の PDX モデルなど、様々な TF 発現レベルの広範な固形癌に対して、チソツマブ　ベドチンは有効性を示した。PDX モデルでの TF 発現レベルは不均一であり、H スコアは 16～204 であった。TF の H スコアが 50 と低く、腫瘍細胞の 40%程度にしか TF 発現が認められなかったモデルでも、チソツマブ　ベドチンは腫瘍退縮を誘導したことから、TF 発現が一部の腫瘍細胞であっても、強力な抗腫瘍活性を誘導するのに十分であることが示された。TF 発現細胞の割合が比較的低い PDX モデルでもチソツマブ　ベドチンは高い有効性を示したが、これはチソツマブ　ベドチンから放出された MMAE が細胞膜を通過し拡散することにより生じる近傍細胞に対するバイスタンダー効果に関連している可能性がある（Okeley et al., 2010）。これらの試験で用いた免疫不全マウスでは、ICD などチソツマブ　ベドチンの他の作用機序の寄与は少ないと考えられるが、後述するように、Fc を介した作用機序が寄与している可能性がある（Overdijk et al., 2011）。

さらに、CDX 及び PDX モデルを用いた試験結果から、チソツマブ　ベドチンはベバシズマブ等の進行した子宮頸癌の治療に用いられる他の抗体療法又は白金製剤と効果的に併用投与できる可能性が示された。

腫瘍細胞に結合できないアイソタイプ対照 ADC は、31 種中 28 種の異種移植モデルで有効性を示さなかったことから、チソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性は腫瘍細胞表面の TF への結合に依存することが確認された。例外として、肺癌細胞株 NCI-H441 モデルでは、アイソタイプ対照 ADC はある程度の抗腫瘍活性を示したが、非結合型のチソツマブは抗腫瘍活性を示さなかった。また、2 種の肺癌 PDX モデルでもアイソタイプ対照 ADC がある程度の抗腫瘍活性を示したが、これらのモデルに対するチソツマブ ベドチンの抗腫瘍活性はアイソタイプ対照 ADC と比較して有意に強く、完全な腫瘍退縮を示した。一部のモデルで認められたアイソタイプ対照 ADC による抗腫瘍活性は、腫瘍微小環境での細胞外カテプシン活性と関連しており、腫瘍細胞に結合していない血中の ADC から放出された MMAE が腫瘍微小環境に拡散した結果である可能性が考えられる。

チソツマブは in vitro で ADCC 活性（IC_{50} 値 4.7～15.4 ng/mL）、ADCP 活性及び TF:FVIIa 複合体の下流シグナル伝達の阻害を効率的に誘導し（Table 4）、これらは全て TF 特異的抗体の in vivo 抗腫瘍活性に寄与している可能性が示された（Ngo et al., 2004; Versteeg et al., 2008a）。確立された異種移植モデルに対する非結合型チソツマブの有効性は限定的であった。ヒト腫瘍細胞及びヒト抗体を用いた CDX モデルで、Fc を介したエフェクター機能がマウスのエフェクター細胞で誘導されることが示されている（Overdijk et al., 2011）。vcMMAE 結合の重要性は、膵癌細胞株 HPAF-II モデルで得られた結果でも明らかであり、チソツマブ　ベドチンは低用量（0.3 mg/kg を 10、13、17 及び 21 日目に投与）で抗腫瘍活性を示したのに対して、チソツマブは高用量（50 mg/kg を 10 日目に投与後、25 mg/kg を 17 日目に投与）でも腫瘍増殖に影響を及ぼさなかった。この結果から、異種移植モデルに対するチソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性には、MMAE を介した腫瘍細胞に対する殺細胞作用が重要であることを示唆している。

チソツマブの予防的投与により、異種移植モデルに対してある程度の抗腫瘍活性が認められたことから、ADCC 活性、ADCP 活性及び TF:FVIIa 複合体シグナル伝達の阻害により新たな腫瘍

のリンパ節転移又は遠隔転移を阻害する可能性が示唆された。しかし、これらの試験でのチソツマブの抗腫瘍活性は高用量（> 10 mg/kg）でも限定的であった。

効力を裏付ける試験の結果から、チソツマブ　ベドチンは、TF 発現腫瘍細胞に対して強力な細胞傷害活性及び in vivo 抗腫瘍活性を示した。チソツマブ　ベドチンは in vitro 及び in vivo で MMAE を介した直接的な殺細胞作用及びバイスタンダー効果による間接的な殺細胞作用を誘導した。MMAE による殺細胞作用は、in vitro ICD マーカーを誘導し、in vivo で免疫応答を促進した。さらに、チソツマブ　ベドチンは TF:FVIIa 複合体下流シグナル伝達を阻害し、Fc を介して ADCC 及び ADCP 活性を誘導することが示された。

副次的薬理試験では、チソツマブ　ベドチンの凝固系パラメーターに対する潜在的な影響を in vitro で評価したが、TF の凝固促進活性を阻害する可能性を評価するための、臨床的に検証されたアッセイは存在しない。凝固は、膜結合型 TF が血中の FVIIa に曝露されたときに開始される。チソツマブは in vitro で FXa 生成をわずかに阻害したが、標準的な PT 測定法では、チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンのいずれも PT に影響を及ぼさなかった。標準的な PT 測定法では、凝固開始のために大幅に過剰の遺伝子組換え TF を使用するため、TF 特異的抗体など TF を直接標的とする化合物の抗凝固特性の測定には適していない可能性がある（Morris et al., 2012）。TF が律速因子となるように設計した高感度の凝固試験では、チソツマブは検討した最高濃度（10 µg/mL）で血栓形成時間を 2.3 倍延長した。独立した 2 つの TEG 試験で、チソツマブによる凝固時間の遅延が確認されたが、出血リスクを同定するための TEG 試験の予測性については議論されている（Wikkelsoe et al., 2011）。

副次的薬理試験の結果から、チソツマブ　ベドチンは TF 依存性凝固の開始に影響し、様々な in vitro 凝固機能測定で凝固時間に影響を及ぼすことが示された。

6.2　結論

チソツマブ　ベドチンは、TF 陽性腫瘍細胞に対して強力な細胞傷害活性及び in vivo 抗腫瘍活性を示した。チソツマブ　ベドチンの抗腫瘍活性は TF 発現レベルと相関していたが、TF 発現レベルの低い異種移植モデルでも有効性が認められた。チソツマブ　ベドチンは、MMAE を介した細胞傷害活性、Fc を介したエフェクター機能、ICD の誘導及び TF:FVIIa 複合体細胞内シグナル伝達の阻害等、多面的な作用機序を有する。さらに生物学的妥当性から、チソツマブ　ベドチンは凝固時間に影響を及ぼす可能性がある。全ての非臨床薬理試験結果及び各種固形癌での TF 発現レベルから、チソツマブ　ベドチンが子宮頸癌を含む TF 発現腫瘍に対して有効な治療薬となる可能性が裏付けられた。

7.　参考文献

Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. Hum Pathol. 2000;31(4):443-7.

Abu Saadeh F, Norris L, O'Toole S, Mohamed BM, Langhe R, O'Leary J, et al. Tumour expresion of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in ovarian cancer- relationship with venous thrombosis risk. Thromb Res. 2013;132(5):627-34.

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.

Amirkhosravi A, Alexander M, May K, Francis DA, Warnes G, Biggerstaff J, et al. The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay. Thromb Haemost. 1996;75(1):87-95.

Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, et al. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. Nature. 1996;380(6569):41-6.

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(3):812-23.

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

Breij EC, de Goeij BE, Verploegen S, Schuurhuis DH, Amirkhosravi A, Francis J, et al. 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.

Brown JS, Sundar R, Lopez J. Combining DNA damaging therapeutics with immunotherapy: more haste, less speed. Br J Cancer. 2018;118(3):312-24.

Chen K, Li Z, Jiang P, Zhang X, Zhang Y, Jiang Y, et al. Co-expression of CD133, CD44v6 and human tissue factor is associated with metastasis and poor prognosis in pancreatic carcinoma. Oncol Rep. 2014;32(2):755-63.

Chen L, Luo G, Tan Y, Wei J, Wu C, Zheng L, et al. Immunolocalisation of tissue factor in esophageal cancer is correlated with intratumoral angiogenesis and prognosis of the patient. Acta Histochem. 2010;112(3):233-9.

Chen R, Hou J, Newman E, Kim Y, Donohue C, Liu X, et al. CD30 Downregulation, MMAE Resistance, and MDR1 Upregulation Are All Associated with Resistance to Brentuximab Vedotin. Mol Cancer Ther. 2015;14(6):1376-84.

Chu AJ. Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview. Int J Inflam. 2011; 367284.

Cocco E, Hu Z, Richter CE, Bellone S, Casagrande F, Bellone M, et al. hI-con1, a factor VII-IgGFc chimeric protein targeting tissue factor for immunotherapy of uterine serous papillary carcinoma. Br J Cancer. 2010;103(6):812-819.

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 KY, 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.

Davila M, Amirkhosravi A, Coll E, Desai H, Robles L, Colon J, et al. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. J Thromb Haemost. 2008;6(9):1517-24.

de Bono JS, Harris JR, Burm SM, Vanderstichele A, Houtkamp MA, Aarass S, et al. Systematic study of tissue factor expression in solid tumors. Cancer Rep (Hoboken). 2023;6(2):e1699.

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.

Doronina SO, Mendelsohn BA, Bovee TD, Cerveny CG, Alley SC, Meyer DL, et al. Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. Bioconjug Chem. 2006;17(1):114-24.

Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, Mendelsohn BA, Cerveny CG, Chace DF, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nat Biotechnol. 2003;21(7):778-84.

Eglen RM, Reisine T, Roby P, Rouleau N, Illy C, Bosse R, et al. The use of AlphaScreen technology in HTS: current status. Curr Chem Genomics. 2008;1:2-10.

Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Østerud B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. Blood. 2008;111(3):1208-16.

Fadare O, Renshaw IL, Liang SX. Expression of tissue factor and heparanase in endometrial clear cell carcinoma: possible role for tissue factor in thromboembolic events. Int J Gynecol Pathol. 2011;30(3):252-61.

FDA. ADCETRIS (brentuximab vedotin). Application No.: 125388. 2011.https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/125388_adcetris_toc.cfm, accessed 12-May-2018.

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, Kogel D. Inhibition of tissue factor/protease-activated receptor-2 signaling limits proliferation, migration and invasion of malignant glioma cells. Neuroscience. 2010;165(4):1312-22.

Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. Mol Immunol. 2007;44(16):3823-37.

Goldin-Lang P, Tran QV, Fichtner I, Eisenreich A, Antoniak S, Schulze K, et al. Tissue factor expression pattern in human non-small cell lung cancer tissues indicate increased blood thrombogenicity and tumor metastasis. Oncol Rep. 2008;20(1):123-8.

Guan M, Jin J, Su B, Liu WW, Lu Y. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. Clin Biochem. 2002;35(4):321-5.

Haas SL, Jesnowski R, Steiner M, Hummel F, Ringel J, Burstein C, et al. Expression of tissue factor in pancreatic adenocarcinoma is associated with activation of coagulation. World J Gastroenterol. 2006;12(30):4843-9.

Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. Cancer. 1996;77(9):1877-83.

Hausott B, Vallant N, Hochfilzer M, Mangger S, Irschick R, Haugsten EM, et al. Leupeptin enhances cell surface localization of fibroblast growth factor receptor 1 in adult sensory neurons by increased recycling. Eur J Cell Biol. 2012;91(2):129-38.

Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Béguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. Thromb Haemost. 2000;83(4):589-91.

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.

Kaido T, Oe H, Yoshikawa A, Mori A, Arii S, Imamura M. Tissue factor is a useful prognostic factor of recurrence in hepatocellular carcinoma in 5-year survivors. Hepatogastroenterology. 2005;52(65):1383-7.

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.

Kasthuri RS, Taubman MB, Mackman N. Role of tissue factor in cancer. J Clin Oncol. 2009;27(29):4834-8.

Kaushal V, Mukunyadzi P, Siegel ER, Dennis RA, Johnson DE, Kohli M. Expression of tissue factor in prostate cancer correlates with malignant phenotype. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2008;16(1):1-6.

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

Kocaturk B, Tieken C, Vreeken D, Unlu B, Engels CC, de Kruijf EM, et al. Alternatively spliced tissue factor synergizes with the estrogen receptor pathway in promoting breast cancer progression. J Thromb Haemost. 2015;13(9):1683-93.

Kocaturk B, Van den Berg YW, Tieken C, Mieog JS, de Kruijf EM, Engels CC, 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.

Koomagi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. Int J Cancer. 1998;79(1):19-22.

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

Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, et al. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. Genes Dev. 1998;12(23):3663-74.

Li F, Emmerton KK, Jonas M, Zhang X, Miyamoto JB, Setter JR, et al. Intracellular Released Payload Influences Potency and Bystander-Killing Effects of Antibody-Drug Conjugates in Preclinical Models. Cancer Res. 2016;76(9):2710-9.

Liu-Kreyche P, Shen H, Marino AM, Iyer RA, Humphreys WG, Lai Y. Lysosomal P-gp-MDR1 Confers Drug Resistance of Brentuximab Vedotin and Its Cytotoxic Payload Monomethyl Auristatin E in Tumor Cells. Front Pharmacol. 2019;10:749.

Lonberg N, Huszar D. Human antibodies from transgenic mice. Int Rev Immunol. 1995;13(1):65-93.

McVey JH. The role of the tissue factor pathway in haemostasis and beyond. Curr Opin Hematol. 2016;23(5):453-61.

Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. Front Immunol. 2015;6:262.

Moro M, Bertolini G, Tortoreto M, Pastorino U, Sozzi G, Roz L. Patient-derived xenografts of non small cell lung cancer: resurgence of an old model for investigation of modern concepts of tailored therapy and cancer stem cells. J Biomed Biotechnol. 2012; 568567.

Morris PE, Steingrub JS, Huang BY, Tang S, Liu PM, Rhode PR, et al. A phase I study evaluating the pharmacokinetics, safety and tolerability of an antibody-based tissue factor antagonist in subjects with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. BMC Pulm Med. 2012;12:5.

Motoori M, Yano M, Tomita Y, Takahashi H, Tanaka K, Sugimura K, et al. Tissue factor predicts response to chemotherapy in esophageal cancer. J Surg Res. 2014;191(1):99-105.

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 P, Kreuzaler M, Khan T, Thommen DS, Martin K, Glatz K, et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1) renders HER2+ breast cancer highly susceptible to CTLA-4/PD-1 blockade. Sci Transl Med. 2015;7(315):315ra188.

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.

Muller YA, Ultsch MH, de Vos AM. The crystal structure of the extracellular domain of human tissue factor refined to 1.7 A resolution. J Mol Biol. 1996;256(1):144-59.

Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. Am J Hematol. 2002;69(4):247-54.

Ngo C, Scallon B, Tawadros R, McCabe F, Millar H, Nakada MT, et al. Enhanced Tumor Inhibition of MDA-MB-231 Breast Carcinoma by the Anti-Tissue Factor Antibody, CNTO 860, Is Mediated by Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity. J Immunother. 2004;27(6):S10.

Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. Blood. 2000;95(3):930-5.

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.

Ollivier V, Wang J, Manly D, Machlus KR, Wolberg AS, Jandrot-Perrus M, et al. Detection of endogenous tissue factor levels in plasma using the calibrated automated thrombogram assay. Thromb Res. 2010;125(1):90-6.

Overdijk MB, Verploegen S, van den Brakel JH, Lammerts van Bueren JJ, Vink T, van de Winkel JG, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity plays a prominent role in inhibiting tumorigenesis, even of tumor cells insensitive to EGFR signaling inhibition. J Immunol. 2011;187(6):3383-90.

Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL, et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. Blood. 2000;96(10):3302-9.

Patry G, Hovington H, Larue H, Harel F, Fradet Y, Lacombe L. 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.

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.

Pfirschke C, Engblom C, Rickelt S, Cortez-Retamozo V, Garris C, Pucci F, et al. Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. Immunity. 2016;44(2):343-54.

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

Regina S, Rollin J, Bléchet C, Iochmann S, Reverdiau P, Gruel Y. Tissue factor expression in non-small cell lung cancer: relationship with vascular endothelial growth factor expression, microvascular density, and K-ras mutation. J Thorac Oncol. 2008;3(7):689-97.

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.

Ruf W. Tissue factor and PAR signaling in tumor progression [published correction appears in Thromb Res. 2008;123(1):187-90]. Thromb Res. 2007;120 Suppl 2:S7-12.

Ruf W, Mueller BM. Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis. Curr Opin Hematol. 1996;3(5):379-84.

Ryden L, Grabau D, Schaffner F, Jönsson PE, Ruf W, Belting M. Evidence for tissue factor phosphorylation and its correlation with protease-activated receptor expression and the prognosis of primary breast cancer. Int J Cancer. 2010;126(10):2330-40.

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.

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.

Shigemori C, Wada H, Matsumoto K, Shiku H, Nakamura S, Suzuki H. Tissue factor expression and metastatic potential of colorectal cancer. Thromb Haemost. 1998;80(6):894-8.

Sorkin A, Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. Exp Cell Res. 2009;315(4):683-96.

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.

Stampfli SF, Akhmedov A, Hausladen S, Varga Z, Dedes KJ, Hellermann J, et al. Tissue Factor Expression Does Not Predict Mortality in Breast Cancer Patients. Anticancer Res. 2017;37(6):3259-64.

Sturm U, Luther T, Albrecht S, Flössel C, Grossmann H, Müller M. Immunohistological detection of tissue factor in normal and abnormal human mammary glands using monoclonal antibodies. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1992;421(2):79-86.

Takano S, Tsuboi K, Tomono Y, Mitsui Y, Nose T. Tissue factor, osteopontin, αvβ3 integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression. Br J Cancer. 2000;82(12):1967-73.

Takeshima H, Nishi T, Kuratsu J, Kamikubo Y, Kochi M, Ushio Y. Suppression of the tissue factor-dependent coagulation cascade: a contributing factor for the development of intratumoral hemorrhage in glioblastoma. Int J Mol Med. 2000;6(3):271-6.

Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. Nat Rev Clin Oncol. 2012;9(6):338-50.

Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. Cancer Chemother Pharmacol. 1989;24(3):148-54.

Ueno T, Toi M, Koike M, Nakamura S, Tominaga T. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. Br J Cancer. 2000;83(2):164-70.

Uno K, Homma S, Satoh T, Nakanishi K, Abe D, Matsumoto K, et al. Tissue factor expression as a possible determinant of thromboembolism in ovarian cancer. Br J Cancer. 2007;96(2):290-5.

van den Hengel LG, Versteeg HH. Tissue factor signaling: a multi-faceted function in biological processes. Front Biosci (Schol Ed). 2011;3(4):1500-10.

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, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. Physiol Rev. 2013;93(1):327-58.

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

Vincent MJ, Bergeron E, Benjannet S, Erickson BR, Rollin PE, Ksiazek TG, et al. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. Virol J. 2005;2:69.

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 βfamily. Cancer Res. 1996;56(21):5063-70.

Wan Y, Wu N, Wang Z, Ju X, Zhu J, Liu Y, et al. Relationship between tissue factor expression and hepatic metastasis and prognosis in rectal cancer. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2002;24(4):378-80.

Wang B, Berger M, Masters G, Albone E, Yang Q, Sheedy J, et al. Radiotherapy of human xenograft NSCLC tumors in nude mice with a 90Y-labeled anti-tissue factor antibody. Cancer Biother Radiopharm. 2005;20(3):300-9.

Wang JG, Manly D, Kirchhofer D, Pawlinski R, Mackman N. Levels of microparticle tissue factor activity correlate with coagulation activation in endotoxemic mice. J Thromb Haemost. 2009;7(7):1092-8.

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.

Wojtukiewicz MZ, Rucinska M, Zacharski LR, Kozlowski L, Zimnoch L, Piotrowski Z, et al. Localization of blood coagulation factors in situ in pancreatic carcinoma. Thromb Haemost. 2001;86(6):1416-20.

Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Skalij P, Kaminska M, Zimnoch L, Brekken RA, et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor, Tissue Factor, and VEGF-R Bound VEGF in Human Breast Cancer In Loco. Adv Clin Exp Med. 2016;25(3):505-11.

Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Rucinska M, Zimnoch L, Jaromin J, Rozanska-Kudelska M, et al. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in situ in laryngeal carcinoma. Thromb Haemost. 1999;82(6):1659-62.

Yao JL, Ryan CK, Francis CW, Kohli M, Taubman MB, Khorana AA. Tissue factor and VEGF expression in prostate carcinoma: a tissue microarray study. Cancer Invest. 2009;27(4):430-4.

Yokota N, Koizume S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Kikuchi K, et al. Self-production of tissue factor-coagulation factor VII complex by ovarian cancer cells. Br J Cancer. 2009;101(12):2023-9.

Zhao X, Cheng C, Gou J, Yi T, Qian Y, Du X, et al. Expression of tissue factor in human cervical carcinoma tissue. Exp Ther Med. 2018;16(5):4075-81.

Zhou JN, Ljungdahl S, Shoshan MC, Swedenborg J, Linder S. Activation of tissue-factor gene expression in breast carcinoma cells by stimulation of the RAF-ERK signaling pathway. Mol Carcinog. 1998;21(4):234-43.

目次

1. 薬理試験：一覧表 2
2. 効力を裏付ける試験 5
3. 副次的薬理試験 20
4. 安全性薬理試験 22
5. 薬力学的薬物相互作用試験 23

1.　薬理試験：一覧表

Table 1 はチソツマブ ベドチンの製造販売承認申請を裏付けるために実施した非臨床薬理試験の一覧表である。

Table 1　非臨床薬理試験一覧

Study Title	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
TF expression and incidence in multiple tumor indications	In vitro	NA	Genmab B.V.	[redacted]1015-091	[4.2.1.1-1]
The development and analytical validation of an immunohistochemistry assay to detect tissue factor	In vitro	NA	[redacted]	[redacted]1015-178	[4.2.1.1-2]
Tissue factor expression in colon cancer	In vitro	NA	[redacted], Genmab US, Inc.	GMB1015-254	[4.2.1.1-3]
Tissue factor expression in human tumor biopsies	In vitro	NA	[redacted], Genmab US, [redacted]	GMB1015-257	[4.2.1.1-4]
Hybridoma and transfectoma generation	Mouse In vitro	i.p., s.c., and i.v. NA	Genmab B.V.	GMB1015-055	[4.2.1.1-5]
Binding characteristics of TF-specific HuMabs and antibody-drug conjugates	In vitro	NA	Genmab B.V.	GMB1015-083	[4.2.1.1-6]
X-ray structure analysis of human Fab antibody fragment in complex with tissue factor	In vitro	NA	[redacted]	[redacted]1015-191	[4.2.1.1-7]
Evaluation of lysosomal trafficking of TF-specific HuMabs and induction of cell kill in vitro by TF-specific antibody-drug conjugates	In vitro	NA	Genmab B.V.	GMB1015-087	[4.2.1.1-9]
Effect of P-glycoprotein expression on tisotumab vedotin-induced cytotoxicity in vitro	In vitro	NA	Genmab B.V.	GMB1015-229	[4.2.1.1-10]
Induction of bystander cytotoxicity by tisotumab vedotin in vitro	In vitro	NA	Genmab B.V.	GMB1015-179	[4.2.1.1-11]
Induction of immunogenic cell death by tisotumab vedotin	In vitro	NA	[redacted]	[redacted]-5666	[4.2.1.1-12]
Tisotumab vedotin has immunomodulatory activity in vivo in a xenograft tumor model	Mouse	i.p.	[redacted]	[redacted]-000451	[4.2.1.1-13]
Evaluation of the induction of ADCC, CDC and apoptosis and inhibition of proliferation by TF-specific HuMabs and antibody-drug conjugates	In vitro	NA	Genmab B.V.	GMB1015-084	[4.2.1.1-14]
Antibody-dependent cellular phagocytosis of tisotumab and tisotumab vedotin	In vitro	NA	[redacted]	[redacted]-5631	[4.2.1.1-15]
Effect of TF-specific HuMabs on binding of factor VIIa	In vitro	NA	Genmab B.V.	GMB1015-085	[4.2.1.1-8]

Study Title	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
(FVIIa) to tissue factor (TF) and on TF:FVIIa-dependent intracellular signaling in vitro					
Evaluation of the efficacy of auristatin-conjugated TF-specific antibodies in vivo	Mouse	i.p.	Genmab B.V.	GMB1015-082	[4.2.1.1-16]
Anti-tumor activity of the combination of tisotumab vedotin and pembrolizumab in a breast cancer xenograft model in vivo	Mouse	i.v.	Genmab B.V.	GMB1015-213	[4.2.1.4-17]
Incidental observation of intra-tumoral hemorrhages in mouse xenograft studies performed to evaluate the anti-tumor activity of HuMax-TF and HuMax-TF-ADC in vivo[a]	Mouse[a]	NA[a]	Genmab B.V.	GMB1015-102[a]	[4.2.1.1-19]
Therapeutic evaluation of tisotumab vedotin in four patient derived xenograft models of different indications	Mouse	i.v.	[redacted]	GMB1015-149	[4.2.1.1-20]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin monotherapy in two patient-derived cervical cancer xenograft models in vivo	Mouse	i.v.	[redacted], Genmab B.V.	GMB1015-223	[4.2.1.1-21]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in combination with chemotherapy in patient-derived cervical cancer xenograft models in vivo	Mouse	i.v.	[redacted], Genmab B.V.	GMB1015-211	[4.2.1.1-22]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in combination with bevacizumab in cervical cancer xenograft models in vivo	Mouse	i.v.	[redacted], Genmab B.V.	GMB1015-210	[4.2.1.1-23]
Therapeutic evaluation of tisotumab vedotin in three patient derived tumor xenograft models of different indications	Mouse	i.v.	[redacted]	GMB1015-148	[4.2.1.1-24]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in combination with chemotherapy in a bladder cancer xenograft model in vivo	Mouse	i.v.	[redacted], Genmab B.V.	GMB1015-212	[4.2.1.1-25]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in an esophageal cancer xenograft model in vivo	Mouse	i.v.	[redacted], Genmab B.V.	GMB1015-224	[4.2.1.1-26]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in non-small cell lung cancer xenograft models in vivo	Mouse	i.v.	[redacted], Genmab B.V.	GMB1015-225	[4.2.1.1-27]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in two ovarian cancer xenograft models in vivo	Mouse	i.v.	[redacted], Genmab B.V.	GMB1015-226	[4.2.1.1-28]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin alone or in combination with gemcitabine and abraxane in a pancreatic cancer xenograft model in vivo	Mouse	i.v.	[redacted], Genmab B.V.	GMB1015-227	[4.2.1.1-29]
Analysis of tissue factor expression levels in cancer	In vitro	NA	Genmab B.V.	GMB1015-228	[4.2.1.1-30]

Study Title	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
xenograft models in situ in relation to the anti-tumor activity of tisotumab vedotin in vivo					
Evaluation of the efficacy of TF-specific HuMabs in vivo	Mouse	i.p.	Genmab B.V.	GMB1015-081	[4.2.1.1-18]
Secondary Pharmacodynamics					
Effect of TF-specific HuMabs on TF-induced FXa generation and clotting in vitro	In vitro	NA	Genmab B.V.	GMB1015-086	[4.2.1.2-1]
Effects of HuMax-TF-ADC, HuMax-TF, IgG1-1015−098, IgG1-1015-111 and HuMax-HepC on Prothrombin Time (PT)	In vitro	NA	[redacted]	[redacted]264005	[4.2.1.2-2]
Evaluation of the effect of Genmab's anti-tissue factor antibodies on endogenous tissue factor (TF) activity in blood	In vitro	NA	[redacted]	[redacted] Study-Report-0364	[4.2.1.2-3]
Functional tissue factor inhibition as estimated by dynamic hemostasis models of fibrin formation and thrombin generation	In vitro	NA	[redacted]	[redacted] Study-Report-0361	[4.2.1.2-4]
Safety Pharmacology					
Determine the dose-response relation of SGD-1010 block of hERG K^+ channels heterologously expressed in human embryonic kidney (HEK293) cells using the conventional whole-cell voltage clamp	In vitro	NA	[redacted]	[redacted]129-09-001	[4.2.1.3-1]

ADCC: antibody dependent cell mediated cytotoxicity; CDC: complement-dependent cytotoxicity; CTD: common technical document; Fab: antigen-binding fragment; FVII(a): (activated) coagulation factor VII; FXa: activated coagulation factor X; hERG: human ether-à-go-go-related gene; HuMabs: human antibodies obtained from HuMAb mice; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenous; NA: not applicable; s.c.: subcutaneous; TF: tissue factor

a Report GMB1015-102 does not describe an independent set of experiments but instead describes findings in the in vivo cell line−derived xenograft models upon treatment with tisotumab and tisotumab vedotin.

2.　効力を裏付ける試験

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
TF expression and incidence in multiple tumor indications	In vitro	NA	NA	No	Genmab B.V.	Binding of mouse-monoclonal TF antibody (clone HTF-1) to primary human tumor material (FFPE tissue)	TF expression was observed in a broad range of solid cancers.	[redacted]1015-091/ [4.2.1.1-1]
The development and analytical validation of an immunohistochemistry assay to detect tissue factor	In vitro	NA	NA	No	[redacted].	Binding of mouse-monoclonal TF antibodies (clone HTF-1, VD8 and IIID8) to primary human tumor material (FFPE tissue)	The final assay demonstrated consistent staining across a variety of assay parameters throughout the development process and met standards of specificity, accuracy, and analytical precision.	[redacted]1015-178/ [4.2.1.1-2]
Tissue factor expression in colon cancer	In vitro	NA	NA	No	[redacted], Genmab US, Inc.	Binding of mouse-monoclonal TF antibody (clone HTF-1) to primary human colon cancer tumor material (FFPE tissue)	TF expression was observed in colon cancer tissue	GMB1015-254/ [4.2.1.1-3]
Tissue factor expression in human tumor biopsies	In vitro	NA	NA	No	[redacted], Genmab US, Inc. [redacted]	Calculations for TF expression on tumor cells in human tumor biopsies [[redacted]1015-178; GMB1015-254]	TF expression was observed in a broad range of solid cancers.	GMB1015-257/ [4.2.1.1-4]
Hybridoma and transfectoma generation	Mouse In vitro	His-tagged recombinant extracellular domain of human TF (TFECDHis) (i.p., s.c., and i.v.) Serum and	20 µg (immunizations) + 10 µg (boosting injections)	No	Genmab B.V.	Development of TF-specific titer in mouse plasma Specific binding of hybridoma clones to TF in vitro Identification and cloning of the tisotumab variable heavy and light chain	Tisotumab was selected from a panel of TF-specific hybridoma clones. The sequence of the variable domains (heavy and light chain) for tisotumab was identified and tisotumab was	GMB1015-055/ [4.2.1.1-5]

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
		hybridoma supernatants (ROA NA)				domains	recombinantly expressed.	
Binding characteristics of TF-specific HuMabs and antibody-drug conjugates	In vitro	Tisotumab vedotin Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Binding of tisotumab vedotin and tisotumab to TFECDHis (ELISA)	Tisotumab vedotin: EC_{50} = 0.47 µg/mL Tisotumab: EC_{50} = 0.37 µg/mL	GMB1015-083/ [4.2.1.1-6]
		Tisotumab vedotin Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Binding of tisotumab vedotin and tisotumab to TF-positive tumor cell lines (flow cytometry)	Tisotumab vedotin: HPAF-II cells: EC_{50} = 0.35 µg/mL Tisotumab: HPAF-II cells: EC_{50} = 0.31 µg/mL A431 cells: EC_{50} = 0.03 µg/mL BxPC-3 cells: EC_{50} = 0.15 µg/mL MDA-MB-231 cells: EC_{50} = 0.07 µg/mL	
		Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Binding of tisotumab to chimeric human-mouse TF molecules to identify domains involved in binding	Expression of amino acids 42-84 of the human TF sequence was essential for binding of tisotumab.	
		Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Affinity and avidity of tisotumab (BIAcore)	Tisotumab: Affinity: 0.47 µg/mL (3.2 nmol/L) Avidity: 0.07 µg/mL (0.47 nmol/L)	
X-ray structure analysis of human Fab antibody fragment in complex with tissue	In vitro	Fab fragments of tisotumab (ROA NA)	NA	No	[redacted]	Crystal structure of tisotumab Fab fragments bound to human TF	The crystal structure contained two complexes in the asymmetric unit, which were highly	[redacted]1015-191/ [4.2.1.1-7]

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
factor							similar. Superposition of the TF:Fab structure on the complex of TF with FVIIa from protein database suggested competition between FVIIa and tisotumab for binding to TF.	
Evaluation of lysosomal trafficking of TF-specific HuMabs and induction of cell kill in vitro by TF-specific antibody-drug conjugates	In vitro	Tisotumab vedotin Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Internalization and lysosomal trafficking of tisotumab and tisotumab vedotin upon binding to TF-positive tumor cell lines	Upon target binding, tisotumab vedotin and tisotumab were rapidly internalized and trafficked to the lysosomes.	GMB1015-087/ [4.2.1.1-9]
		Tisotumab vedotin (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Direct cytotoxicity of tisotumab vedotin in human tumor cell lines that express TF	Tisotumab vedotin efficiently killed TF-positive tumor cell lines. The potency of tisotumab vedotin, expressed as IC_{50} for tumor cell viability or as the percentage viable tumor cells after exposure to 0.1 or 1 µg/mL tisotumab vedotin, associated with TF expression levels. EC_{50} = 0.004-0.010 µg/mL for cell lines with high TF expression (A431, HCC1954, HPAF-II; > 300000 TF molecules per cell as determined by quantitative flow	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
							cytometry).	
Effect of P-glycoprotein expression on tisotumab vedotin-induced cytotoxicity in vitro	In vitro	Tisotumab vedotin (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Cytotoxicity of tisotumab vedotin in TF-expressing cells with and without expression of P-glycoprotein pumps	A431 cells overexpressing the P-glycoprotein efflux pump were less sensitive to tisotumab vedotin-induced cytotoxicity compared with the non-transfected A431 cells.	GMB1015-229/ [4.2.1.1-10]
Induction of bystander cytotoxicity by tisotumab vedotin in vitro	In vitro	Tisotumab vedotin (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Induction of bystander cytotoxicity (diffusion of released MMAE into neighboring cells) by tisotumab vedotin in cells with low levels of TF expression, in which no direct cytotoxicity is induced	Tisotumab vedotin induced direct cytotoxicity in TF-high (MDA-MB-231, HPAF-II, SK-OV-3, A431), but not in TF-low (A549, Jurkat) cells. Tisotumab vedotin induced bystander cytotoxicity in TF-low cells only in the presence of TF-high cells.	GMB1015-179/ [4.2.1.1-11]
Induction of immunogenic cell death by tisotumab vedotin	In vitro	Tisotumab vedotin (ROA NA)	NA	No	[redacted].	Release of ICD markers adenosine triphosphate (ATP) and high mobility group protein B1 (HMGB1)	Tisotumab vedotin and free MMAE elicited hallmarks of ICD from dying TF-expressing cancer cell lines.	[redacted]-5666/ [4.2.1.1-12]
		Tisotumab vedotin (ROA NA)	NA	No	[redacted].	Induction of endoplasmic reticulum (ER) response	Tisotumab vedotin and free MMAE induced an ER stress response in TF-positive tumor cells.	
		Tisotumab vedotin Tisotumab (ROA NA)	NA	No	[redacted].	Activation of innate immune cells and T cells	Dying cancer cells, after exposure to tisotumab vedotin in vitro, were added to PBMCs and induced activation of	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
							innate immune cells, as shown by increased cell surface activation markers and release of inflammatory cytokines. This promoted T-cell proliferation and release of IL-12p70 and IFNγ. Addition of anti-PD-1 enhanced this effect. Exposure of cancer cells to tisotumab did not show this effect.	
Tisotumab vedotin has immunomodulatory activity in vivo in a xenograft tumor model	Mouse	Tisotumab vedotin Tisotumab non-binding (isotype control) ADC (i.p.)	3 mg/kg	No	[redacted]	Expression of human immune-related genes	Tisotumab vedotin treatment induced expression of a variety of immune-related genes by tumor cells 3 and 5 days after treatment including chemokines, type I IFN response genes, and HLA genes.	[redacted] 000451/ [4.2.1.1-13]
						Infiltration of mouse innate immune cells within tumors	Tisotumab vedotin treatment promoted recruitment of mouse innate immune cells (F4/80+ macrophages and CD11c+ dendritic cells in tumors compared to controls.	
Evaluation of the induction of ADCC, CDC and apoptosis and inhibition of proliferation by TF-specific HuMabs	In vitro	Tisotumab vedotin Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Capacity of tisotumab and tisotumab vedotin to induce ADCC in TF-positive tumor cell lines	Tisotumab induced ADCC in TF-positive tumor cells (median EC_{50} = 0.005-0.015 µg/mL for MDA-MB-231, BxPC-3, and	GMB1015-084/ [4.2.1.1-14]

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
and antibody-drug conjugates							A431). Direct comparison showed that tisotumab vedotin and tisotumab demonstrated similar capacity to induce ADCC in A431 cells.	
		Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Capacity of tisotumab to induce CDC in TF-positive tumor cell lines	Tisotumab was not able to induce CDC.	
		Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Capacity of tisotumab to induced apoptosis or inhibition of proliferation of TF-positive tumor cell lines	Tisotumab was not able to induce apoptosis or proliferation inhibition in TF-positive tumor cell lines.	
Antibody-dependent cellular phagocytosis of tisotumab and tisotumab vedotin	In vitro	Tisotumab vedotin Tisotumab (ROA NA)	NA	No	[redacted].	Capacity of tisotumab vedotin to induce phagocytosis of TF-positive tumor cell lines	Both tisotumab vedotin and tisotumab induced a dose-dependent uptake of TF-positive cells by monocyte-derived macrophages (flow cytometry; up to 67% and 45% of macrophages had phagocytosed cells opsonized with 2 µg/mL tisotumab and tisotumab vedotin, respectively). Phagocytosis was confirmed by fluorescent microscopy.	[redacted]-5631/ [4.2.1.1-15]
Effect of TF-specific HuMabs on binding of coagulation factor VIIa (FVIIa) to tissue factor (TF) and on TF:FVIIa-dependent intracellular	In vitro	Tisotumab vedotin Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Competition between tisotumab vedotin and FVIIa (flow cytometry) Competition between tisotumab and FVIIa for TF binding (ELISA)	Tisotumab vedotin: Inhibition of FVIIa binding to HPAF-II and MDA-MB-231 cells (flow cytometry; IC_{50} = 0.33-0.39 µg/mL, max	GMB1015-085/ [4.2.1.1-8]

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
signaling in vitro							inhibition 61%-66%) Tisotumab: Inhibition of FVIIa binding to TFECDHis (ELISA; IC_{50} = 0.45 µg/mL, max inhibition 91%)	
		Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Inhibition of TF:FVIIa-mediated intracellular signaling by tisotumab	Tisotumab inhibited TF:FVIIa-dependent ERK1/2 phosphorylation (IC_{50} = 0.12 µg/mL, max inhibition 69%) and IL-8 production (IC_{50} = 0.78 µg/mL, max inhibition 76%)	
Evaluation of the efficacy of auristatin-conjugated TF-specific antibodies in vivo	Mouse	Tisotumab vedotin (i.p.)	0.3-4.0 mg/kg	No	Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenograft models derived from cell lines with high TF expression	Tisotumab vedotin showed potent anti-tumor activity in A431 (2 studies, 7 or 8 mice per group), HPAF-II (3 studies, 7 or 8 mice per group) and HCC1954 (1 study, 8 mice per group) xenograft models. A single dose of 1 mg/kg was the lowest dose at which tumor regression was observed.	GMB1015-082/ [4.2.1.1-16]
			0.5-4.5 mg/kg	No	Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenograft models derived from cell lines with intermediate TF expression	Tisotumab vedotin showed good to moderate anti-tumor activity in NCI-H441 (inhibition of tumor growth at a single dose	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
							of 1.5 mg/kg; 2 studies, 6 or 7 mice per group) and SKOV-3 (inhibition of tumor growth at a single dose of 4 mg/kg; 7 mice per group) models. Tisotumab vedotin showed no anti-tumor activity in AsPC-1 (maximal dose 4 mg/kg; 8 mice per group) and NCI-N87 (maximal dose 3 mg/kg; 8 mice per group) models.	
			3 mg/kg	No	Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in a xenograft model derived from cell lines with low TF expression	No activity of tisotumab vedotin in the HCT-116 xenograft model (maximal dose 3 mg/kg; 7 mice per group) and the PANC-1 xenograft model (maximal dose 4 mg/kg; 7 mice per group).	
Anti-tumor activity of the combination of tisotumab vedotin and pembrolizumab in a breast cancer xenograft model in vivo	Mouse	Tisotumab vedotin (i.v.) Pembrolizuma (i.p.)	0.5 or 1 mg/kg 10 and 5 mg/kg	No	Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin and/or pembrolizumab to inhibit tumor growth in xenografted mice. Model: MDA-MB-231 (breast adenocarcinoma)	Combination treatment with tisotumab vedotin and pembrolizumab induced tumor growth inhibition.	GMB1015-213/ [4.2.1.1-17]
Incidental observation of intra-tumoral hemorrhages in mouse xenograft studies performed to evaluate	Mouse[a]	NA[a]	NA[a]	No	Genmab B.V.	Summary of the appearance of intratumoral hemorrhages upon treatment with tisotumab in xenograft models[a]	Intratumoral hemorrhages were observed in 1/5 xenograft models. In the BxPC-3 model	GMB1015-102/ [4.2.1.1-19]

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
the anti-tumor activity of HuMax-TF and HuMax-TF-ADC in vivo[a]							5/10 mice showed intratumoral hemorrhages upon treatment with 50 mg/kg tisotumab. No hemorrhages were observed at lower dose levels (≤20 mg/kg).	
				No	Genmab B.V.	The appearance of intratumoral hemorrhages upon treatment with tisotumab vedotin in xenograft models[a]	Intratumoral hemorrhages were observed in 1/31 xenograft models. In the NCI-H441 models, intratumoral hemorrhages were observed in absence of treatment (in 20%-25% of the mice); the frequency was enhanced upon treatment with a single dose of 4.5 mg/kg tisotumab vedotin (in 4/6 mice), but not upon treatment with a similar dose of unconjugated tisotumab.	
Therapeutic evaluation of tisotumab vedotin in 4 patient derived xenograft models of different indications	Mouse	Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg	No	[redacted]	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in LXFA 289 (lung adenocarcinoma, > 75% TF-positive tumor cells)	Tisotumab vedotin induced tumor regression.	GMB1015-149/ [4.2.1.1-20]
		Paclitaxel Tisotumab vedotin	20 mg/kg 4 mg/kg	No	[redacted]	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenografted	Post-paclitaxel treatment with tisotumab vedotin induced tumor	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
		(i.v.)				mice that received prior treatment with paclitaxel. Model: LXFA 289 (lung adenocarcinoma, > 75% TF positive tumor cells)	regression.	
		Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg	No	[redacted]	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in LXFE 690 (lung squamous cell carcinoma; 50%-75% TF positive tumor cells)	Tisotumab vedotin induced tumor regression.	
		Paclitaxel Tisotumab vedotin (i.v.)	20 mg/kg 4 mg/kg	No	[redacted]	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenografted mice that received prior treatment with paclitaxel. Model: LXFE 690 (lung squamous cell carcinoma; 50%-75% TF positive tumor cells)	Post-paclitaxel treatment with tisotumab vedotin induced tumor regression.	
		Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg	No	[redacted]	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in CEXF 773 (cervical squamous cell carcinoma; 25%-50% TF positive tumor cells)	Tisotumab vedotin induced tumor regression.	
		Paclitaxel Tisotumab vedotin (i.v.)	20 mg/kg 4 mg/kg	No	[redacted]	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenografted mice that received prior treatment with paclitaxel. Model: CEXF 773 (cervical	Post-paclitaxel treatment with tisotumab vedotin induced tumor regression.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
						squamous cell carcinoma; 25%-50% TF positive tumor cells)		
		Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg	No	[redacted]	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in OVXF 1993 (ovarian adenocarcinoma; 25%-50% TF positive tumor cells)	Tisotumab vedotin induced tumor regression.	
		Paclitaxel Tisotumab vedotin (i.v.)	20 mg/kg 4 mg/kg	No	[redacted]	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenografted mice that received prior treatment with paclitaxel. Model: OVXF 1993 (ovarian adenocarcinoma; 25%-50% TF positive tumor cells)	Post-paclitaxel treatment with tisotumab vedotin induced inhibition of tumor growth.	
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin monotherapy in two patient-derived cervical cancer xenograft models in vivo	Mouse	Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg	No	[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenografted mice. Models: CEXF 633 and CV1664 (cervical cancer)	Tisotumab vedotin induced tumor regression in the CV1664 model (6 mice/group) and the CEXF 633 model (8 mice/group).	GMB1015-223/ [4.2.1.1-21]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in combination with chemotherapy in patient-derived cervical cancer xenograft models in vivo	Mouse	Cisplatin (i.p.) Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg 0.5, 1, 2 or 4 mg/kg	No	[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin and/or cisplatin to inhibit tumor growth in xenografted mice. Model: CV1248 (cervical cancer)	Combination treatment with tisotumab vedotin and cisplatin induced tumor regression, and the combination was more potent than the single agents.	GMB1015-211/ [4.2.1.1-22]
		Carboplatin (i.p.)	40 or 80 mg/kg		[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin and/or	Combination treatment with tisotumab vedotin	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
		Tisotumab vedotin (i.v.)	2 mg/kg			carboplatin to inhibit tumor growth in xenografted mice. Model: CV1248 (cervical cancer)	and carboplatin induced tumor regression, and the combination was more potent than the single agents.	
		Carboplatin (i.p.) Tisotumab vedotin (i.v.)	40 or 80 mg/kg 2 mg/kg		[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin and/or carboplatin to inhibit tumor growth in xenografted mice. Model: CEXF 633 (cervical cancer)	Combination treatment with tisotumab vedotin and carboplatin induced tumor regression, and the combination was more potent than the single agents.	
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in combination with bevacizumab in cervical cancer xenograft models in vivo	Mouse	Tisotumab vedotin (i.v.) Bevacizumab (i.p.)	0.5, 1, 2 or 4 mg/kg 15 mg/kg	No	[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin and/or bevacizumab to inhibit tumor growth in xenografted mice. Model: CV1248, CV2320, CV1802 (cervical cancer)	Combination treatment with tisotumab vedotin and bevacizumab inhibited tumor growth, and the combination was more potent than the single agents.	GMB1015-210/ [4.2.1.1-23]
Therapeutic evaluation of tisotumab vedotin in three patient derived tumor xenograft models of different indications	Mouse	Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg	No	[redacted]	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in PAXF 1657 (pancreatic adenocarcinoma, > 75% TF-positive tumor cells)	Tisotumab vedotin induced tumor regression.	GMB1015-148/ [4.2.1.1-24]
		Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg			Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in PRXF-MRI-H-1579 (prostate carcinoma, 50%-75% TF-positive tumor cells)	Tisotumab vedotin induced tumor regression.	
		Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg			Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in BXF1036 (bladder adenocarcinoma;	Tisotumab vedotin induced tumor regression.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
						50%-75% TF-positive tumor cells)		
		Paclitaxel Tisotumab vedotin (i.v.)	20 mg/kg 4 mg/kg			Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenografted mice that received prior treatment with paclitaxel. Model: BXF1036 (bladder adenocarcinoma; 50%-75% TF-positive tumor cells)	Post-paclitaxel treatment with tisotumab vedotin induced tumor regression.	
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in combination with chemotherapy in a bladder cancer xenograft model in vivo	Mouse	Tisotumab vedotin (i.v.) Cisplatin (s.c.) Gemcitabine (i.v.)	0.5 or 2 mg/kg 2 or 3 mg/kg 25 or 200 mg/kg	No	[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin and/or cisplatin and/or gemcitabine to inhibit tumor growth in xenografted mice. Model: BXF1036 (bladder cancer)	Combination treatment with tisotumab vedotin and cisplatin, or tisotumab vedotin and gemcitabine, or tisotumab vedotin and cisplatin and gemcitabine inhibited tumor growth. Combination treatment was more potent than the single agents.	GMB1015-212/ [4.2.1.1-25]
		Gemcitabine (i.v.) Cisplatin (s.c.) Tisotumab vedotin (i.v.)	200 mg/kg 3 mg/kg 2 mg/kg	No	[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenografted mice that received prior treatment with gemcitabine and cisplatin. Model: BXF1036 (bladder cancer)	Post-gemcitabine-cisplatin treatment with tisotumab vedotin induced inhibition of tumor growth.	
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in an esophageal cancer xenograft model in vivo	Mouse	Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg	No	[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenografted mice. Model ES0195 (esophageal	Tisotumab vedotin induced tumor regression.	GMB1015-224/ [4.2.1.1-26]

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
						cancer)		
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in non-small cell lung cancer xenograft models in vivo	Mouse	Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg	No	[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenografted mice. Models LXFE 772, LXFA 1041, LXFE 1066, LXFL 1674, LUO395 (NSCLC)	Tisotumab vedotin induced tumor regression in 4 out of 5 models.	GMB1015-225/ [4.2.1.1-27]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin in two ovarian cancer xenograft models in vivo	Mouse	Tisotumab vedotin (i.v.)	4 mg/kg	No	[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin to inhibit tumor growth in xenografted mice. Models OVXF 550, OVXF 899 (ovarian cancer)	Tisotumab vedotin had no effect on tumor growth.	GMB1015-226/ [4.2.1.1-28]
Anti-tumor activity of tisotumab vedotin alone or in combination with gemcitabine and abraxane in a pancreatic cancer xenograft model in vivo	Mouse	Gemcitabine (i.v.) Abraxane (i.v.) Tisotumab vedotin (i.v.)	150 mg/kg 6 mg/kg 0.5, 1, 2 mg/kg	No	[redacted], Genmab B.V.	Capacity of tisotumab vedotin and/or gemcitabine/abraxane to inhibit tumor growth in xenografted mice. Model: PA5415 (pancreatic cancer)	Combination treatment with tisotumab vedotin, gemcitabine, and abraxane inhibited tumor growth.	GMB1015-227/ [4.2.1.1-29]
Analysis of tissue factor expression levels in cancer xenograft models in situ in relation to the anti-tumor activity of tisotumab vedotin in vivo	In vitro	NA	NA	No	Genmab B.V.	TF expression levels in different CDX and PDX models in situ. Relation between TF expression levels in situ and anti-tumor activity of tisotumab vedotin in vivo	In models responding to tisotumab vedotin treatment, the percentage of tumor cells with moderate to high TF expression in situ was higher than in non-responding models. Average TF H-score was higher in responding than in non-responding models. Response was	GMB1015-228/ [4.2.1.1-30]

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
							also observed in models with low TF expression.	
Evaluation of the efficacy of TF-specific HuMabs in vivo	Mouse	Tisotumab (i.p.)	10-25 mg/kg	No	Genmab B.V.	Capacity of tisotumab to inhibit tumor outgrowth upon preventive treatment in xenograft models (prophylactic treatment)	Prophylactic treatment inhibited tumor outgrowth in A431 (at 20 mg/kg), AsPC-1 (at 10 mg /kg), BxPC-3 (at 20 mg/kg) and HPAF-II xenografts (at 25 mg/kg). Prophylactic treatment did not inhibit tumor outgrowth in the MDA-MB-231-luc-D3H2LN model (max dose tested 25 mg/kg).	GMB1015-081/ [4.2.1.1-18]
			13-50 mg/kg			Capacity of tisotumab to inhibit tumor growth in established xenograft models (therapeutic treatment)	Therapeutic treatment with tisotumab inhibited tumor growth in the MDA-MB-231 xenograft model (at 25 mg/kg). Therapeutic treatment with tisotumab did not have impact on tumor growth in the AsPC-1, BxPC-3 and HPAF-II xenograft models (max dose tested 50 mg/kg).	

ADC: antibody-drug conjugate; ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; CD: cluster of differentiation; CDC: complement-dependent cytotoxicity; CDX: cell line-derived xenograft; CTD: common technical document; EC_{50}: 50% effective concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2; Fab: antigen-binding fragment; FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded; FVIIa: activated coagulation factor VII; GLP: Good Laboratory Practice; HLA: human leukocyte antigen; HuMabs: human antibodies obtained from HuMAb mice; IC_{50}: 50% inhibitory concentration; ICD: immunogenic cell death; IFN: interferon; IL: interleukin; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenous; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; NSCLC: non-small-cell lung cancer; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; PD-1: programmed cell death-1; PDX: patient-derived xenograft; ROA: route of administration; s.c.: subcutaneous; TF: tissue factor; TFECDHis: histidine-tagged extracellular domain of human tissue factor

a Report GMB1015-102 does not describe an independent set of experiments but instead describes findings in the in vivo cell line-derived xenograft models upon treatment with tisotumab and tisotumab vedotin.

3.　副次的薬理試験

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
Effect of TF-specific HuMabs on TF-induced FXa generation and clotting in vitro	In vitro	Tisotumab (ROA NA)	NA	No	Genmab B.V.	Capacity of tisotumab to inhibit TF-dependent FXa generation in vitro	Tisotumab inhibited FXa generation by approximately 19% (at the highest concentration tested; 900 ng/mL tisotumab).	GMB1015-086/ [4.2.1.2-1]
				No	Genmab B.V.	Capacity of tisotumab to inhibit TF-dependent clotting in vitro	Time-to-clot formation was 2.3-fold delayed in presence of tisotumab (10 µg/mL) compared to an isotype control antibody	
Effects of HuMax-TF-ADC, HuMax-TF, IgG1-1015-098, IgG1-1015-111 and HuMax-HepC on Prothrombin Time (PT)	In vitro	Tisotumab vedotin Tisotumab (ROA NA)	NA	No	[redacted]	Capacity of tisotumab vedotin to interfere with coagulation in the Standard PT assay	Tisotumab vedotin and tisotumab (0.01-20 µg/mL) displayed no impact on PT at any of the concentrations tested in either human or cynomolgus monkey plasma.	[redacted]264005/ [4.2.1.2-2]
Evaluation of the effect of Genmab's anti-tissue factor antibodies on endogenous tissue factor (TF) activity in blood	In vitro	Tisotumab (ROA NA)	NA	No	[redacted]	Capacity of tisotumab to interfere with coagulation measured using TEG, using LPS-stimulated whole blood (human and cynomolgus) as a source of TF	Tisotumab (20 µg/mL) induced a delay in clotting lag time but had no effect on clot strength. Inhibition of clotting lag time in human whole blood (3 donors): 15%-30%. Inhibition of clotting lag time in cynomolgus monkey (3 donors): 61%-100%.	[redacted]-Study-Report-0364/ [4.2.1.2-3]

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Dose Level	GLP Compliance	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
				No	[redacted]	Capacity of tisotumab to interfere with coagulation, measured in the thrombin generation assay. Source of TF: recombinant TF, monocyte-derived MPs (in human or cynomolgus plasma) or xenograft-derived MPs (from plasma of xenograft bearing mice)	Recombinant TF: 14% increase in clotting lag time in presence of tisotumab (20 µg/mL). Monocyte-derived MPs (human): 1.7-3.1-fold delay in clotting lag time in presence of tisotumab (20 µg/mL). Monocyte-derived MPs (cynomolgus): 2.4-5.2-fold delay in clotting lag time in presence of tisotumab (20 µg/mL). Xenograft-derived MPs: no delay in clotting lag time in presence of tisotumab (20 µg/mL).	
Functional tissue factor inhibition as estimated by dynamic hemostasis models of fibrin formation and thrombin generation	In vitro	Tisotumab (ROA NA)	NA	No	[redacted]	Capacity of tisotumab to interfere with coagulation measured using TEG, using low concentrations of recombinant TF	Tisotumab (20 µg/mL) induced a two-fold delay in clotting lag time but had no effect on clot strength.	[redacted] Study-Report-0361/ [4.2.1.2-4]
						Capacity of tisotumab to interfere with coagulation, measured in the thrombin generation assay, using low concentrations of recombinant TF	Tisotumab (20 µg/mL) induced a 15-fold delay in clotting lag time.	

FXa: activated coagulation factor X; GLP: Good Laboratory Practice; HuMabs: human antibodies obtained from HuMAb mice; LPS: lipopolysaccharide; MP: microparticle; NA: not applicable; PT: prothrombin time; ROA: route of administration; TEG: thromboelastography; TF: tissue factor

4.　安全性薬理試験

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Dose Level	GLP Compliance[a]	Testing Facility	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study No. /Location in CTD
Determine the dose-response relation of SGD-1010 block of hERG K^+ channels heterologously expressed in human embryonic kidney (HEK293) cells using the conventional whole-cell voltage clamp	In vitro	MMAE (ROA NA)	7.18 and 71.8 µg/mL (10 and 100 µmol/L)	Yes	[redacted]	Block of hERG K^+ channels heterologously expressed in HEK293 cells by SGD-1010 (MMAE) using the conventional whole-cell voltage clamp	In this study, MMAE produced a fractional block of peak hERG tail current at a high MMAE concentration of 71.8 µg/mL (100 µmol/L) but not at the low concentration of 7.18 µg/mL (10 µmol/L) tested.	[redacted]129-09-001/ [4.2.1.3-1]

GLP: Good Laboratory Practice; hERG: human Ether-à-go-go-related gene; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; ROA: route of administration

a　An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement

5. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。