目次

1.　まとめ....6
2.　分析法....8
2.1　測定対象物質....8
2.2　バリデートされた分析法....8
2.2.1　チソツマブ　ベドチン分析法....9
2.2.2　TAb 分析法....9
2.2.3　MMAE 分析法....10
2.2.4　ADA 分析法....10
2.3　バリデートされていない分析法....10
2.3.1　TAb 分析法....10
2.3.2　ADA 分析法....11
3.　吸収....11
3.1　マウスにおけるチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの PK....11
3.2　カニクイザルにおけるチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの TK....12
3.2.1　カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの 10 週間投与用量設定試験及び 6 週間回復性試験....12
3.2.2　カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの 13 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験....12
3.2.3　カニクイザルを用いたチソツマブの反復投与毒性探索的試験....15
3.3　ラット及びカニクイザルにおける MMAE の TK....16
3.3.1　ラットにおける MMAE の TK....16
3.3.2　カニクイザルにおける MMAE の TK....17
4.　分布....17
4.1　異種移植マウスにおける ^{89}Zr-チソツマブ　ベドチン及び ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布....18
4.2　カニクイザルにおける ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布....18
4.3　ラットにおける MMAE の生体内分布....19
4.4　MMAE の血漿タンパク結合....19
4.5　MMAE の血球移行性....20
5.　代謝....20
5.1　In vitro 代謝....20
5.1.1　ラット、サル及びヒト肝細胞を用いた ^{3}H-MMAE 代謝物の評価....20
5.1.2　^{3}H-MMAE の代謝に関与するヒト CYP 酵素の同定....20
5.2　In vivo 代謝....22
5.2.1　ラットに ^{3}H-MMAE を単回静脈内投与したときの尿糞中代謝物....22
5.2.2　ヒト尿糞中代謝物の同定....23
5.2.3　MMAE 代謝の種差....25

6.　排泄 25
6.1　Sprague Dawley ラットに ^{3}H-MMAE を単回静脈内投与したときの排泄 26
7.　薬物動態学的薬物相互作用 26
7.1　ヒト培養肝細胞を用いた MMAE の CYP 誘導作用 26
7.2　MMAE の CYP 阻害作用 27
7.3　トランスポーターによる相互作用 27
8.　その他の薬物動態試験 29
8.1　血漿中安定性 29
9.　考察及び結論 30
10.　参考文献一覧 33

表目次

Table 1　非臨床薬物動態試験で使用した被験物質の化合物コード 6
Table 2　バリデートされたチソツマブ　ベドチン、TAb、MMAE 及び ADA 分析法の要約 9
Table 3　カニクイザルにチソツマブ　ベドチン及びチソツマブを初回投与後のチソツマブ ベドチン及び TAb の TK パラメーター（平均値 ± SD）[a] 14
Table 4　カニクイザルにチソツマブ　ベドチン又はチソツマブを 3 週間に 1 回、5 回投与したときの ADA 発現の割合 15
Table 5　チソツマブの PK パラメーター 16
Table 6　マウス、ラット、カニクイザル及びヒトにおける ^{3}H-MMAE の血漿タンパク結合率 19
Table 7　ヒトにブレンツキシマブ　ベドチンを投与、及びラットに MMAE を投与したときの in vivo 代謝物プロファイル 24
Table 8　ラットに ^{3}H-MMAE を単回静脈内投与したときの放射能排泄率 26
Table 9　PK 及び TK パラメーターの動物種間比較 31

図目次

Figure 1　カニクイザルにチソツマブ　ベドチンの 1、3 又は 5 mg/kg を初回静脈内投与したときのチソツマブ　ベドチン及び TAb の平均血漿中濃度 13
Figure 2　ヒト肝ミクロソームにおける MMAE の in vitro 推定代謝経路 22
Figure 3　ラット糞中に同定された MMAE 代謝物 23
Figure 4　ヒトにおける MMAE の in vivo 代謝物の推定構造及び推定代謝経路 25
Figure 5　PBS/1% BSA における安定性と比較した、ヒト、カニクイザル及びマウスの血漿でのチソツマブ　ベドチンの安定性 29

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）
%ID/g	percentage of injected dose per gram	グラム当たりの投与量に対する放射能集積率
%ID	percentage of injected dose	投与量に対する割合
^{3}H-MMAE	tritium labeled MMAE	トリチウム標識 MMAE
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADC	antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
AUC	area under the concentration-time curve	薬物濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24}$	area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours	0 時間から 24 時間までの薬物濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}inf}$	area under the concentration time-curve from time zero to infinity	0 時間から無限大時間までの薬物濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration	0 時間から最終定量可能時点までの薬物濃度－時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	－
BSA	bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
BSEP	bile salt export pump	－
Caco-2	－	ヒト結腸癌由来細胞
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CL	clearance	クリアランス
C_{max}	maximum drug concentration	最高血中濃度
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DAR	drug to antibody ratio	薬物抗体比
ECL	electrochemiluminescence	電気化学発光
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
ER	efflux ratio	排出比
FITC	fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
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
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー法
HRP	horseradish peroxidase	西洋わさびペルオキシダーゼ

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）
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgG1	immunoglobulin G1	免疫グロブリン G1
K_I	concentration of an inactivator that supports half the maximal rate of enzyme inactivation	阻害物質の飽和濃度での酵素不活化の 50%阻害濃度
K_{inact}	maximal rate of enzyme inactivation	不活性化速度定数
Km	Michaelis-Menten constant	ミカエリスメンテン定数
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
LOD	limit of detection	検出限界
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MMAE	monomethyl auristatin E	モノメチルアウリスタチン E
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2	－
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型
OAT	organic anion transporter	－
OATP	organic anion transporting polypeptide	－
OCT	organic cation transporter	－
PANC-I and HPAF-II	human pancreatic derived cell lines	ヒト由来膵臓腫瘍細胞株
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PET-CT	positron emission tomography-computed tomography	ポジトロン断層撮影-コンピュータ断層撮影
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
PK	pharmacokinetics	薬物動態
ROI	region of interest	関心領域
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合型免疫不全
SD	standard deviation	標準偏差
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期

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）
TAb	total antibody	総抗体
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
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	time to reach maximum concentration	最高血中濃度到達時間
vc	valine-citrulline	バリン―シトルリン
V_{cen}	central volume of distribution, [calculated as V_{cen} = Dose/C_{max} (mL/kg)]	中央コンパートメントの分布容積
Vd	volume of distribution	分布容積
Zr	zirconium	ジルコニウム

被験物質の名称

チソツマブ　ベドチンの開発過程では、異なる名称及び化合物コードが使用されている。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。本項では、米国、欧州及び日本でのアドセトリス®（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 MMAE に関連する試験結果を要約及び引用する。

Table 1　非臨床薬物動態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
MMAE	SGD-1010
放射能標識した MMAE（Radiolabeled MMAE）	^{3}H-MMAE

ADC: 抗体薬物複合体; 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; TF: 組織因子

1. まとめ

チソツマブ　ベドチン（HuMax-TF-ADC）は、抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate、ADC）であり、ヒト組織因子（tissue factor、TF）特異的ヒトモノクローナル免疫グロブリン G1（immunoglobulin G1、IgG1）抗体（HuMax-TF、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 MMAE に化学的に結合させたものである。チソツマブ　ベドチンは TF 陽性細胞に結合した後、細胞内に取り込まれてリソソームに輸送され、そこで MMAE が放出される。細胞死は、MMAE による微小管重合阻害と腫瘍細胞に隣接するバイスタンダー効果による細胞毒性により生じる。

チソツマブ　ベドチン、チソツマブ又は MMAE を予定される臨床投与経路である静脈内投与したときの薬物動態（pharmacokinetics、PK）及びトキシコキネティクス（toxicokinetics、TK）をマウス、ラット及びカニクイザルを用いて評価した。In vivo 及び in vitro 試験で実施した非臨床 PK 試験の一覧を薬物動態試験概要表（[2.6.5-1 項]）に示す。チソツマブ　ベドチンは市販製品であるアドセトリス®（ブレンツキシマブ　ベドチン）と同じリンカー薬物結合を持つことから、ブレンツキシマブ　ベドチンの製造販売承認申請時に実施された MMAE の血漿タンパク結合、血球移行性、代謝、排泄及び in vitro 薬物相互作用に関するデータを用いて考察する。

カニクイザルに静脈内投与したとき、チソツマブ　ベドチンの分布容積（volume of distribution、Vd）は小さく、$t_{1/2}$ は 1～2 日であった。チソツマブ　ベドチンを初回投与後の曝露量は 1～6 mg/kg でほぼ用量比例性を示した。MMAE の曝露量はモル濃度換算でチソツマブ　ベドチンの C_{max} の約 0.01%であり、全身循環中でのチソツマブ　ベドチンの高い安定性が確認さ

れた。MMAE を投与した試験では、ラットでの MMAE の曝露量は用量依存的に増加し、PK はほぼ線形であった。ラットに MMAE を投与したとき、高いクリアランス（clearance、CL）及び大きな Vd が認められた。

サルにおけるチソツマブ　ベドチンの免疫原性を、試験前、投与前、試験期間中及び回復期間中（該当する場合）に採取した血清試料中の抗薬物抗体（anti-drug antibody、ADA）を測定して評価した。チソツマブ　ベドチンを投与した多くの動物で ADA が認められた。ADA 抗体価が高かった一部の動物では、その後の投与でチソツマブ　ベドチン曝露量の減少及び循環血中の遊離型 MMAE の増加が認められた。しかし、ADA が認められた場合でも、特に高投与量（5 mg/kg 群）を投与した場合にはチソツマブ　ベドチンの曝露量は十分に維持された。

膵臓腫瘍の担癌マウスにおける ^{89}Zr-チソツマブ　ベドチン及び ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布をポジトロン断層撮影-コンピュータ断層撮影（positron emission tomography-computed tomography、PET-CT）スキャンで評価した結果、TF 発現腫瘍では ^{89}Zr の強いシグナルが、TF 陰性腫瘍では弱いシグナルが示された。検討した正常組織では、チソツマブはマウス TF に結合しないが、脾臓、肝臓、腎臓、心臓、肺、胃、筋肉及び骨への取り込みが認められた。したがって、この取り込みは非特異的な分布及び CL を反映している可能性が高い。TF とチソツマブが交差反応を示すカニクイザルを用いて、^{89}Zr-チソツマブの生体内分布を評価した。投与量に対する割合（percentage of injected dose、%ID）が最も高かった臓器は肝臓及び骨髄であった。しかし、線量で評価した場合には腎臓及び下部大腸壁が最も高い線量当量の曝露を受けていた。MMAE の血漿タンパク結合率は、種依存的であり、マウス及びカニクイザルと比較してヒト及びラットで高かった。MMAE の血球移行性も種依存的であり、血液／血漿中濃度比はマウス、ラット及びサルでは 0.954～11.8 であったが、ヒトでは 1 未満であった。Long-Evans ラットにおいて、トリチウム標識 MMAE（tritium labeled MMAE、^{3}H-MMAE）由来放射能は各組織に広く分布したが、投与後 96 時間にはほとんどの組織から放射能が消失した。

チソツマブは免疫グロブリン分子であり、低分子ペプチド及びアミノ酸に異化された後、排泄又は生体内で再利用されると考えられる。したがって、抗体部分については従来の代謝試験は実施しなかった。しかし、MMAE は、シトクロム P450（cytochrome P450、CYP）による代謝を受ける合成ペンタペプチドである。ラット、カニクイザル及びヒト肝細胞での MMAE の代謝は類似していた。すなわち、ヒト肝細胞とのインキュベートで生成した代謝物は、ラット又はカニクイザルの肝細胞とのインキュベートでも生成した。ヒト CYP 酵素発現系を用いた in vitro 試験により、MMAE は主に CYP3A4 により代謝されることが示された。

^{3}H-MMAE をラットに単回静脈内投与し、排泄試験を実施した。ラットでの主な排泄経路は糞中であり、尿中放射能排泄率は投与量の約 15%以下であった。尿糞中に排泄された放射能の大部分は未変化体であった。

In vitro 試験で MMAE の薬物相互作用を検討した。その結果、MMAE は準不可逆的な CYP3A4/5 阻害作用を示したが、CYP1A2、2B6 及び 3A4/5 に対する誘導作用を示さなかった。MMAE は P-糖タンパク質（P-glycoprotein、P-gp）の基質であったが、breast cancer resistance protein（BCRP）、multidrug resistance-associated protein 2（MRP2）、organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 及び 1B3、organic cation transporter（OCT）2 及び organic anion transporter（OAT）1 及び 3 の基質ではなかった。MMAE は臨床的に意義のある濃度で bile salt

export pump（BSEP）、P-gp、BCRP、MRP2、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1 及び OATP1B3 を阻害しなかった［チソツマブ　ベドチンを 2.0 mg/kg 投与したときの C_{max} は 5.91 ng/mL すなわち 8.23 nmol/L であった］。

2.　分析法

PK/TK 評価をサポートするため、生体試料中チソツマブ　ベドチンの抗体及び低分子成分をそれぞれの分析法を用いて測定した（[2.6.5-2 項]）。抗体については免疫学的測定法、MMAE については液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（liquid chromatography tandem mass spectrometry、LC-MS/MS）で分析した。

2.1　測定対象物質

チソツマブ　ベドチンの PK/TK の特性を明らかにするため、高分子及び低分子部分に対する分析法を用いた。チソツマブ　ベドチンに対する免疫原性を測定するために免疫学的測定法を開発した。LC-MS/MS を用いて、チソツマブ　ベドチンから遊離した循環血中の MMAE 濃度を測定した。測定対象物質はチソツマブ　ベドチン、TAb（total antibody、総抗体）、MMAE 及び ADA であった。

2.2　バリデートされた分析法

全ての生体試料を、それぞれのマトリックスで安定性の確認された期間内に分析した。市販の試験試薬は全て使用期限前に使用した。バリデートされた分析法を Table 2 に要約する。

Table 2　バリデートされたチソツマブ　ベドチン、TAb、MMAE 及び ADA 分析法の要約

Assay	Analyte	Method	Validation Report Number	Matrix	LLOQ	ULOQ	PK/TK Studies
ADC	tisotumab vedotin	ELISA	[redacted]315274	Cynomolgus monkey plasma	0.4 µg/mL	4 µg/mL	[redacted]521988 [redacted]522531
TAb	tisotumab vedotin plus tisotumab	ELISA	[redacted]315274	Cynomolgus monkey plasma	0.5 µg/mL	6 µg/mL	[redacted]521988 [redacted]522531
TAb	tisotumab	ELISA	[redacted]316168	Cynomolgus monkey plasma	0.2 µg/mL	3 µg/mL	[redacted]522531
MMAE	MMAE	LC-MS/MS	[redacted]7646-119	Rat serum	10 pg/mL	10 ng/mL	[redacted]7646-118 [redacted]8204397
MMAE	MMAE	LC-MS/MS	[redacted]8212326	Rat amniotic fluid	10 pg/mL	10 ng/mL	[redacted]8204397
MMAE	MMAE	LC-MS/MS	[redacted]8263943	Cynomolgus monkey plasma	10 pg/mL	10 ng/mL	[redacted]521988 [redacted]522531
MMAE	MMAE	LC-MS/MS	[redacted]7646-115	Cynomolgus monkey serum	10 pg/mL	10 ng/mL	[redacted].163.16
ADA	ADA against tisotumab vedotin	ECLIA	[redacted]315253	Cynomolgus monkey serum	NA	NA	[redacted]521988 [redacted]522531

ADA: anti-drug antibody; ADC: antibody-drug conjugate; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ECLIA: electrochemiluminescence immunoassay; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; LLOQ: lower limit of quantification; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; TAb: total antibody; ULOQ: upper limit of quantification

2.2.1　チソツマブ　ベドチン分析法

報告書番号[redacted]315274、添付資料番号[4.2.2.1-1 項]

カニクイザル血漿中チソツマブ　ベドチン濃度を酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA）を用いて測定した。本分析法では、ヒスチジン標識したヒト組織因子細胞外ドメイン（histidine-tagged extracellular domain of human tissue factor、TFECDHis）でチソツマブ　ベドチンを捕捉した後、マウス抗 MMAE モノクローナル抗体を添加し、西洋わさびペルオキシダーゼ（horseradish peroxidase、HRP）標識抗マウス免疫グロブリン G（immunoglobulin G、IgG）抗体結合体とインキュベートし検出する。検出限界（limit of detection、LOD）は 60 ng/mL、定量下限（lower limit of quantification、LLOQ）は 400 ng/mL であった。チソツマブ　ベドチンはサル血漿中において室温で少なくとも 4 時間、−80°C 設定の冷凍庫で 8 週間安定であった。

2.2.2　TAb 分析法

報告書番号[redacted]315274、添付資料番号[4.2.2.1-1 項]

報告書番号[redacted]316168、添付資料番号[4.2.2.1-2 項]

カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを投与したときの血漿中 TAb 濃度は、比色検出法を用いた ELISA により測定した（報告書番号[redacted]315274）。本分析法では、遺伝子組換えヒト TF を

用いて、チソツマブ　ベドチン及びチソツマブを捕捉する。その後、HRP 標識抗ヒト IgG1 複合体を用いて検出する。LOD は 78 ng/mL、LLOQ は 500 ng/mL であった。TAb はサル血漿中において室温で少なくとも 24 時間、−80°C 設定の冷凍庫で 14 週間安定であった。

カニクイザルにチソツマブを投与したときの血漿中チソツマブ濃度は、比色検出法を採用した ELISA（報告書番号[redacted]316168）を用いて測定した。本分析法では、チソツマブをコーティングした遺伝子組換えヒト TF（細胞外ドメイン）で捕捉する。その後、HRP 標識抗ヒト IgG1 結合体を用いて検出する。LOD は 78 ng/mL、LLOQ は 200 ng/mL であった。サル血漿中のチソツマブは室温で少なくとも 4 時間、−80°C 設定の冷凍庫で 14 週間安定であった。

2.2.3　MMAE 分析法

報告書番号[redacted]7646-119、添付資料番号[4.2.2.1-5 項]
報告書番号[redacted]8212326、添付資料番号[4.2.2.1-6 項]
報告書番号[redacted]8263943、添付資料番号[4.2.2.1-3 項]
報告書番号[redacted]7646-115、添付資料番号[4.2.2.1-4 項]

ラット血清、羊水及びカニクイザル血清／血漿中 MMAE 濃度を LC-MS/MS（報告書番号[redacted]7646-119、報告書番号[redacted]8212326、報告書番号[redacted]8263943、報告書番号[redacted]7646-115）により測定した。通常、本測定法では、内標準物質 D8-MMAE を添加したサル又はラット試料から遊離型 MMAE を固相抽出により抽出した。溶出後、抽出残留物を再溶解し、LC-MS/MS により測定した。MMAE は 718.7→686.7 amu、内標準物質は 726.7→694.7 amu の遷移をモニターした。ピーク面積比を用い、重み付け（$1/x^2$）の線形最小二乗法を用いて検量線を作成して濃度を算出した。LLOQ は 10 pg/mL であった。MMAE は室温で少なくとも 24 時間、−60°C～−80°C 設定の冷凍庫で少なくとも 96 日間安定であった。

2.2.4　ADA 分析法

報告書番号[redacted]315253、添付資料番号[4.2.2.1-7 項]

カニクイザル血清試料中のチソツマブ　ベドチンに対する ADA を評価するため、電気化学発光（electrochemiluminescence、ECL）ブリッジングアッセイを開発した。本分析法でのスクリーニング試験では、一定量の血清試料をビオチン標識チソツマブ　ベドチン及び Sulfo-Tag 標識チソツマブ　ベドチンの混合物と共にインキュベートした。続いて ADA とチソツマブ　ベドチン複合体の形成を検出するため、混合物をストレプトアビジンでコーティングした ECL プレートに移した。結合複合体は ECL イメージャーを用いて可視化した。測定感度は 3.55 ng/mL、ADA 500 ng/mL での薬物耐性は 0.74 µg/mL であった。スクリーニングアッセイの陰性カットオフポイントは、未処理サル血清サンプルでの値の 99 パーセンタイルとした。

2.3　バリデートされていない分析法

2.3.1　TAb 分析法

報告書番号[redacted]514850、添付資料番号[4.2.3.2-1 項]

ヒト IgG に特異的な ELISA を用いてカニクイザル血清中のチソツマブ濃度を測定した。本試験では、ヒト IgG 分子をコーティングしたフルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate、FITC）標識ヒツジ抗ヒト IgG（サル血清事前吸着処理）で捕捉した。その後、HRP 標識マウス抗ヒト IgG 結合体を用いて検出した。LOD は 300 ng/mL、LLOQ は 600 ng/mL であった。

2.3.2　ADA 分析法

報告書番号■1015-002、添付資料番号[4.2.2.1-8 項]

カニクイザル血清中のチソツマブに対する ADA を評価するため、ブリッジング ELISA を開発した。本分析法では、チソツマブをコーティングした ELISA プレートで希釈したサル血清試料とビオチン化チソツマブとインキュベートした。結合した ADA は HRP 標識ストレプトアビジンを用いて検出した。マウス抗ヒト IgG-κ 抗体を添加したカニクイザル血清を陽性対照として用いた。

3.　吸収

マウス、ラット及びカニクイザルにチソツマブ　ベドチン、チソツマブ又は MMAE を単回又は反復静脈内投与したときの PK/TK を検討するために、多くの試験を実施した。これらの試験の詳細な一覧を[2.6.5-1 項]に示し、概要を以下に記載する。

3.1　マウスにおけるチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの PK

報告書番号 MR1015-143-33、添付資料番号[4.2.2.2-1 項]

重症複合型免疫不全（severe combined immunodeficiency、SCID）BALB/c 雌マウスにチソツマブ　ベドチン又はチソツマブ単回投与後の PK を検討した（[2.6.5-3.1 項]）。雌性マウス 12 匹に、チソツマブ　ベドチン又はチソツマブを 1 mg/kg 又は 5 mg/kg で単回静脈内投与した。投与後 10 分、4 時間、1、2、7、14 及び 21 日に頬静脈穿刺により血液試料を採取した。

チソツマブ　ベドチン又はチソツマブ投与後の TAb の C_{max} はいずれも用量比例的に増加した。中央コンパートメントの分布容積（central volume of distribution, [calculated as V_{cen} = Dose/C_{max} (mL/kg)]、V_{cen}）は投与量に依存せず、血漿コンパートメントへの初期の分布と対応して 33～43 mL/kg であった。AUC もほぼ用量比例性を示し、それに一致して CL は用量非依存性を示した。CL は、チソツマブ　ベドチン群では 0.259～0.371 mL/h/kg、チソツマブ群では 0.137～0.141 mL/h/kg であった。チソツマブ　ベドチン及びチソツマブの $t_{1/2}$ はそれぞれ約 10 日及び 14 日超であった。チソツマブ　ベドチン投与後のチソツマブ　ベドチン及び TAb の PK パラメーターを比較すると、チソツマブ　ベドチンでは TAb と比較して、AUC が小さく、CL が高く、$t_{1/2}$ が短かった。このチソツマブ　ベドチンと TAb との差は、チソツマブ　ベドチンから MMAE が放出されたことによる薬物抗体比（drug to antibody ratio、DAR）の経時的な変化を示していると考えられる。結論として、SCID マウスにチソツマブ　ベドチン投与後の PK は、初期 Vd（Vcen）が小さく、SCID マウスにおけるヒト IgG に典型的である緩徐な CL を特徴として

いた。チソツマブ　ベドチンと TAb との差は、MMAE がチソツマブ　ベドチンから放出されることにより、DAR が経時的に減少することを示唆している。

3.2　カニクイザルにおけるチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの TK

3.2.1　カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの 10 週間投与用量設定試験及び 6 週間回復性試験

報告書番号[redacted]521988、添付資料番号[4.2.3.2-3 項]

カニクイザルを用いた 10 週間用量設定試験及び 6 週間回復性試験でチソツマブ　ベドチン投与後の TK を評価した（[2.6.5-4.1 項]）。雌性カニクイザル 10 匹を 3 つの異なる投与量群に割り付けた：1 mg/kg（n = 2）、3 mg/kg（n = 4）及び 6　mg/kg（n = 4）（Day43 以降、投与量を 5 mg/kg に減量した）。1 及び 3 mg/kg では Day1、22、43 及び 64 に、6/5 mg/kg では Day1、43、64 及び 85 に 10 mL/kg の容量で 30 分間の単回持続静脈内投与を行った。3 及び 6 mg/kg 群の各 2 匹は、最終投与終了後 6 週間の観察期間（回復動物）での評価動物とした。チソツマブ　ベドチン、TAb 及び MMAE の血漿中濃度測定用の血液試料を初回及び 4 回目の投与前、投与後 0.5、24、72 及び 144 時間に採取した。また、2 回目及び 3 回目の持続投与終了後、投与終了後 0.5 及び 144 時間に採血した。ADA 測定用の血漿試料は、試験前、Day1、22、43 及び 64（投与前）、並びに回復群の動物から Day86、93、100（以上 3 mg/kg）、107 及び 121（以上 6/5 mg/kg）に採取した。

初回投与後、チソツマブ　ベドチン及び TAb の C_{max} はいずれも投与量に比例して増加し、C_{max} は同程度であった。概して、AUC は用量比例性をわずかに上回り、TAb の AUC はチソツマブ　ベドチンの AUC を上回った。持続投与終了時の血漿中に MMAE が検出された。初回投与後の MMAE は 1～3 日後に C_{max} に達し、投与量にほぼ比例した。MMAE 濃度は、モル濃度換算でチソツマブ　ベドチンの C_{max} の約 0.01%に相当した。多くの動物で反復投与後のチソツマブ　ベドチン及び TAb の全身曝露量が顕著に減少した。4 回目投与では、全投与量群の 10 匹中 5 匹で曝露が認められなかったが、その他の動物では初回投与時と比較して C_{max} が同程度又はわずかに低下した。その後の投与では、特に ADA 反応を示した動物では、MMAE の C_{max} が投与後速やかに現れる傾向がみられた。

全ての動物でチソツマブ　ベドチンに対する ADA 反応が認められたが、反応の程度は様々であり、投与量に依存しなかった。生成した ADA は Day107 まで循環血中に残存した。解析可能な 9 匹の大部分の動物では、チソツマブ　ベドチンの曝露量の減少と ADA 反応の増加との間に関係性が認められた。

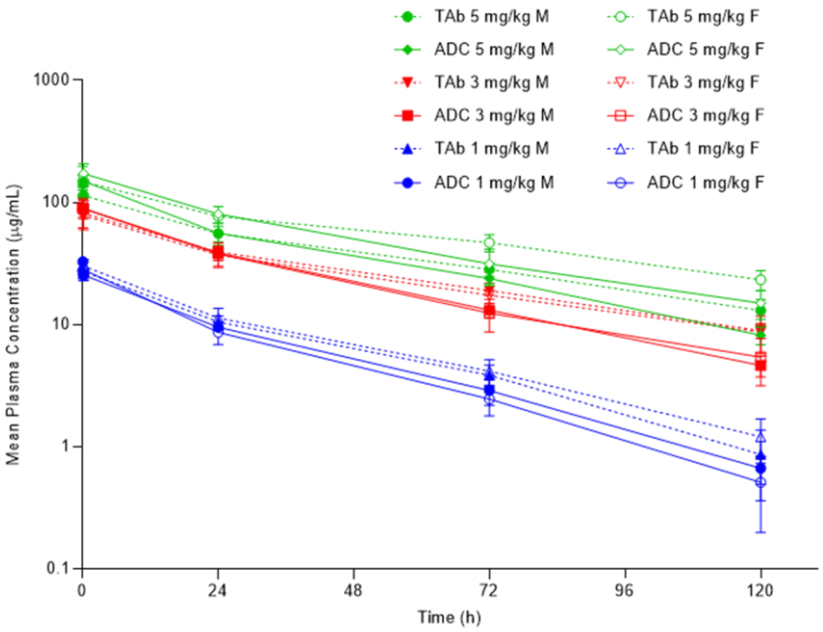
3.2.2　カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの 13 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

報告書番号[redacted]522531、添付資料番号[4.2.3.2-4 項]

カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験でチソツマブ　ベドチンの TK を評価した（[2.6.5-4.2 項]及び[2.6.5-4.3 項]）。本試験にはチソツマブ投与後の評価も含めた。雌雄 5 匹/投与群とし、1、3 及び 5 mg/kg のチソツマブ　ベドチン及び 25 mg/kg のチソツマブを投与した。

Day1、22、43、64 及び 85 に 10 mL/kg の容量で 30 分間かけて単回持続静脈内投与した。投与前、持続投与終了直後、投与終了後 10 分、24、72 及び 120 時間に、チソツマブ　ベドチン、TAb 及び MMAE の血漿中濃度測定用の血液試料を採取した。さらに、各投与前及び回復期間（Day97 及び 127）にも血漿試料を採取し、ADA を測定した。

Figure 1　カニクイザルにチソツマブ　ベドチンの 1、3 又は 5 mg/kg を初回静脈内投与したときのチソツマブ　ベドチン及び TAb の平均血漿中濃度



ADC: antibody-drug conjugate; TAb: total antibody
Data are mean from 5 animals per group per sex. Error bar denotes standard deviation.
Source: Study [redacted]522531, modified from Figures 1 and 3 in Appendix 19

チソツマブ　ベドチン初回投与後のチソツマブ　ベドチン及び TAb の曝露量は同程度であった（Table 3 及び Figure 1）。チソツマブ　ベドチン及び TAb の全身曝露量は、雌雄ともおおむね投与量に比例して増加したが、雌のチソツマブ　ベドチンでは用量比をわずかに上回る増加が認められた。$t_{1/2}$ に投与量の増加に伴う明らかな変化は認められなかった。チソツマブの用量補正した $AUC_{0\text{-}t}$ は、チソツマブ　ベドチンの 1.3~2.3 倍であった。しかし、C_{max} はチソツマブとチソツマブ　ベドチンは同程度であった。チソツマブ　ベドチン及び TAb の TK パラメーターを Table 3 に要約する。

Table 3　カニクイザルにチソツマブ　ベドチン及びチソツマブを初回投与後のチソツマブ　ベドチン及び TAb の TK パラメーター（平均値 ± SD）[a]

Test Article	Dose (mg/kg)	Sex	Analyte	C_{max} (µg/mL)	t_{max}[b] (h)	AUC_{0-t} (µg·h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	CL (mL/h/kg)	Vd (mL/kg)
Tisotumab vedotin	1	M	ADC	32.7 ± 2.54	0.500	813 ± 61.8	25.0 ± 2.54	1.20 ± 0.103	43.1 ± 3.60
			TAb	28.4 ± 1.44	0.500	895 ± 63.0	29.7 ± 1.33	1.04 ± 0.108	44.5 ± 5.10
	3	M	ADC	93.2 ± 3.71	0.500	3230 ± 300	31.4 ± 2.29	0.879 ± 0.0855	39.7 ± 3.98
			TAb	82.9 ± 6.32	0.500	3540 ± 306	44.8 ± 1.54	0.733 ± 0.0703	47.3 ± 3.48
	5	M	ADC	150 ± 13.6	0.667	5030 ± 696	33.0 ± 2.11[c]	0.882 ± 0.0685[c]	41.9 ± 1.99[c]
			TAb	114 ± 7.95	0.667	4670 ± 696	46.6 ± 2.98[d]	0.866 ± 0.142[d]	57.9 ± 5.98[d]
Tisotumab	25	M	TAb	729 ± 88.6	0.667	50700 ± 4790	NR	NR	NR
Tisotumab vedotin	1	F	ADC	28.5 ± 4.36	0.667	781 ± 167	23.9 ± 2.67	1.27 ± 0.249	43.5 ± 6.87
			TAb	30.9 ± 3.42	0.500	1010 ± 182	29.5 ± 3.99	0.971 ± 0.188	40.7 ± 5.57
	3	F	ADC	93.8 ± 15.5	0.500	3190 ± 598	33.9 ± 4.82	0.894 ± 0.166	43.0 ± 6.14
			TAb	79.3 ± 17.2	0.500	3340 ± 707	45.6 ± 6.13	0.791 ± 0.150	51.4 ± 9.05
	5	F	ADC	174 ± 31.9	0.667	6970 ± 1160	39.4 ± 3.42	0.658 ± 0.142	37.0 ± 5.70
			TAb	152 ± 17.0	0.667	7400 ± 592	49.7[e]	0.589[e]	41.6[e]
Tisotumab	25	F	TAb	721 ± 68.2	0.667	50100 ± 4260	NR	NR	NR

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration; CL: clearance; C_{max}: maximum drug concentration; F: female; M: male; $t_{1/2}$: elimination half-life; t_{max}: time to reach maximum concentration; Vd: volume of distribution

NR: not reported, coefficient of determination was <0.800 and/or the extrapolation of the AUC to infinity represents more than 20% of the total area.

a) Values determined from n=5, unless otherwise stated.

b) Median value presented.

c) n=4

d) n=3

e) n=2

Source: Study [redacted]522531, Table 1 to Table 16 in Appendix 19

MMAE の全身曝露量（AUC_{0-t}）は、いずれの投与群の雌雄とも Day1 におおむね用量比例性を示したが、雌では反復投与後に用量比例性をやや上回った。MMAE の全身曝露量はチソツマブ　ベドチンよりも数桁低かった。MMAE の t_{max} の中央値はチソツマブ　ベドチンよりも遅かった。

チソツマブ　ベドチンの反復投与後、大部分の動物で少なくとも 1 時点でチソツマブ　ベドチンに対する ADA が検出された（Table 4）。ADA 陽性動物では、反復投与後の曝露量は初回投与後よりも概して低かった。しかし、投与量の増加と共に ADA の曝露量への影響が減少する傾向が認められ、5 mg/kg で認められた影響はごくわずかであった。

チソツマブを反復投与したとき、Day1 及び 85 のチソツマブの全身曝露量にわずかな性差が認められた。

MMAE の全身曝露量は、いずれの投与群の雄でも、全試料採取日でほぼ同程度であった。雌では、3 及び 5 mg/kg 群を除き、反復投与後の $AUC_{0\text{-}t}$ に意義のある変化は認められなかったが、3 及び 5 mg/kg 群では、$AUC_{0\text{-}t}$ が Day1 と比較して Day64 及び 85 で増加した。

Table 4　カニクイザルにチソツマブ　ベドチン又はチソツマブを 3 週間に 1 回、5 回投与したときの ADA 発現の割合

Test Article	Tisotumab vedotin						Tisotumab	
Dose (mg/kg)	1		3		5		25	
Gender	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Pretrial	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Predose Day 22	2/5	5/5	5/5	5/5	3/4	5/5	0/5	0/5
Predose Day 43	4/5	5/5	5/5	5/5	2/4	3/3	0/5	0/5
Predose Day 64	4/5	5/5	5/5	5/5	1/4	3/3	0/5	0/5
Predose Day 85	5/5	5/5	5/5	5/5	3/4	3/3	0/5	0/5
Day 97	4/5	5/5	5/5	5/5	1/4	2/3	0/5	0/5
Day 127	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	0/2	1/2

Source: Study [redacted]522531, Table 6 to Table 13 in Appendix 20

結論として、チソツマブ　ベドチン投与後のチソツマブ　ベドチン及び TAb の曝露量は同程度であった。雌におけるチソツマブ　ベドチンの全身曝露量の増加は用量比をわずかに上回っていたものの、初回投与後のチソツマブ　ベドチンの全身曝露量はおおむね投与量に比例して増加した。チソツマブ　ベドチン、TAb 及び MMAE の全身曝露量は、投与群間及び試料採取日間で概して雌雄で同程度であった。概して、ADA が認められた場合でも、投与期間中チソツマブ　ベドチンの曝露量は十分に維持された。

3.2.3　カニクイザルを用いたチソツマブの反復投与毒性探索的試験

報告書番号[redacted]514850、添付資料番号[4.2.3.2-1 項]

カニクイザルを用いた用量漸増予備試験でチソツマブの TK を評価した（Table 5 及び[2.6.5-3.2 項]））。4 匹（雌雄各 2 匹）のカニクイザルに、溶媒（リン酸緩衝生理食塩水）を Day1 に投与し、チソツマブの 1、10 及び 100 mg/kg をそれぞれ Day8、15 及び 22 に漸増投与した。10 mL/kg の容量で 30 分間かけて持続静脈内投与した。Day8、15 及び 22 の投与前、持続投与終了後 1、6、24、72 及び 120 時間に、チソツマブの血清中濃度測定用の血液試料を大腿静脈から採取した。ADA 評価用の血清試料は試験前、各投与前及び剖検前に採取した。

C_{max} は投与量にほぼ比例して増加したが、全身曝露量（平均 AUC）は用量比を上回って増加したことから、10 mg/kg を超える投与量では消失過程での飽和が示唆された。このことは、1 及び 10 mg/kg 群で $t_{1/2}$ が約 5 倍に増加したことによって裏付けられた。CL は 0.537～1.053 mL/h/kg と比較的低く、生体高分子の既知の CL のメカニズムを反映していた。投与量を 1 mg/kg から 10 mg/kg に増量すると CL が低下することから、10 mg/kg 以上の投与量ではチソツマブの CL のメカニズムが飽和する可能性が考えられる。Vd の平均値は 41.24～131.4 mL/kg であり、サルの

細胞外液量よりも少なかった。これは、体循環以外への抗体の分布が限定的であることと一致している。

チソツマブに対する ADA は検出されなかった。ADA 評価用の投与後試料は、比較的高濃度のチソツマブが存在する時点で採取したため、チソツマブが ADA の検出に影響を及ぼした可能性がある。

Table 5　チソツマブの PK パラメーター

Sex	Dose (mg/kg) [Ratio]*	n	$AUC_{0\text{-}inf}$ (ng·h/mL)	$AUC_{0\text{-}t}$ (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	CL (mL/h/kg)	Vd (mL/kg)
Male	1 [1.0]	2	1155000 1254000	1073000 1139000	22200 25800	1.50 1.50	33.34 35.50	0.8654 0.7977	41.63 40.85
	10 [10.0]	2	32800000 40350000	16090000 13700000	248000 209000	1.50 1.50	127.53 207.10	0.5035 0.5697	92.64 170.2
	100 [100.0]	2	145200000 422300000	135400000 157900000	2410000 2120000	1.50 1.50	32.49 189.88	0.7034 0.4980	32.98 136.4
Female	1 [1.0]	2	1031000 879800	975500 836400	25500 20400	1.50 1.50	29.40 28.37	0.9698 1.137	41.14 46.52
	10 [10.0]	2	20270000 22910000	11650000 12570000	202000 194000	1.50 1.50	102.79 104.21	0.7125 0.6517	105.7 97.98
	100 [100.0]	2	163800000 331400000	121300000 137600000	2350000 2140000	1.50 1.50	62.63 148.55	0.7211 0.5707	65.16 122.3

$AUC_{0\text{-}t}$: area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration; $AUC_{0\text{-}inf}$: area under the concentration time-curve from time zero to infinity; CL: clearance; C_{max}: maximum drug concentration; $t_{1/2}$: elimination half-life; t_{max}: time to reach maximum concentration; Vd: volume of distribution
Data are individual data (n=2).
Source: Study [redacted]514850, Table 1 to 6, Appendix 6

3.3　ラット及びカニクイザルにおける MMAE の TK

3.3.1　ラットにおける MMAE の TK

報告書番号[redacted]7646-118、添付資料番号[4.2.3.2-6 項]
報告書番号[redacted]8204397、添付資料番号[4.2.3.5.2-1 項]

GLP 適用毒性試験で、ラットに MMAE を反復投与したときの TK を評価した（[redacted]7646-118 試験、[2.6.5-4.4 項]）。雌雄ラット（計 20 匹／投与群）に MMAE の 0.0097、0.097 及び 0.194 mg/kg を週 1 回 4 週間静脈内投与した。TK 用の血液試料を馴化期間中に 1 回、並びに Day1、2、8、15、22 及び 23 に採取した。投与前、投与後 15 及び 30 分、並びに投与 2、8 及び 24 時間に血液試料を採取した。

C_{max} の増加は概して用量比例性を下回ったが、$AUC_{0\text{-}24}$ の増加はほぼ用量比例性を示した。顕著な性差は認められなかった。低投与量である 0.0097 mg/kg を投与したとき、MMAE の血清中濃度は二相性の消失を示した。0.0097 mg/kg で投与したときの $t_{1/2}$ は 4.68～5.76 時間であった。反復投与による $t_{1/2}$ の延長はみられなかった。中投与量群及び高投与量群では明確な消失相が認められなかったため、これらの群での $t_{1/2}$ の算出は実施しなかったが、中投与量群の雄では Day1 の $t_{1/2}$ が 10.9 時間であった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ を用いて MMAE の蓄積性を評価した結果、反復投与後にラット血清中 MMAE の体内動態が変化する可能性が示唆され、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ は反

復投与により増加する傾向が認められた。Vd の値から、MMAE は血管外に広く分布することが示された。

また、ラットを用いた胚・胎児発生試験で MMAE の TK を評価した（[redacted]8204397 試験、[2.6.5-4.5 項]）。交配した雌性ラット 9 匹に MMAE の 0.2 mg/kg を週に 1 回 2 週間、妊娠 6 及び 13 日に静脈内投与した。血液試料（3 匹/時点）を妊娠 6（投与前）、13 及び 18 日に頸静脈から採取した。さらに、妊娠 18 日に全妊娠動物から羊水を採取し、胎児を子宮から取り出し、心臓穿刺により胎児血液試料を各胎児から採取した。試料は同腹児ごとにプールした。

妊娠ラットに MMAE の 0.2 mg/kg を静脈内投与したとき、妊娠 6 及び 13 日での母動物の血清中 C_{max} の平均値はそれぞれ 29.7 及び 50.2 ng/mL であった。AUC_{0-t} はそれぞれ 16.2 及び 25.6 ng·day/mL であった。サンプリング数が少なく、消失相が明確でなかったため、$t_{1/2}$ は算出しなかった。血清中 MMAE は速やかに消失した。妊娠 18 日の羊水及び胎児血清中の MMAE 濃度は、母動物血清中の濃度よりも高値であったことから、MMAE は母動物血清から胎児へ移行することが示唆された。妊娠 18 日の母動物の血清中 MMAE 濃度は、0.2 mg/kg の MMAE を投与した全ての動物で LLOQ 未満であった。

3.3.2　カニクイザルにおける MMAE の TK

報告書番号[redacted].163.16、添付資料番号[4.2.3.2-8 項]

カニクイザルに MMAE の 0.058 mg/kg を 3 週間隔で 4 サイクル投与したときの TK を評価した。投与群は雌雄各 5 匹とし、そのうち雌雄各 2 匹を回復群とした。馴化中に 1 回、Day1（投与後 20 分以内）、8、15、22（投与前及び投与後 20 分以内）、25、29、43（投与前及び投与後 20 分以内）、46、50、64（投与前及び投与後 20 分以内）、67 及び 71 に血液試料を採取した。回復期間 Day7、14 及び 28（試験最終日）に回復群の動物から採血した。

C_{max} は 1872～4626 pg/mL（Day1 及び Day22 の持続投与終了時平均濃度）であり、各投与直後に得られた。C_{max} は 2 回目から 4 回目の投与後で同程度であり、初回投与後の濃度の約 2 倍であった。血清中 MMAE 濃度は投与後 3 日以内に 1/40～1/80 に低下し（52～120 pg/mL の範囲）、投与後一週間で低値又は検出不能となった。MMAE 濃度は概して静脈内投与直後にピークに達した。データ数が限られていたため、詳細な PK/TK 評価は実施しなかった。

4.　分布

マウスにおける ^{89}Zr-チソツマブ及び ^{89}Zr-チソツマブ　ベドチンの TF 発現腫瘍への in vivo での分布並びにカニクイザルにおける ^{89}Zr-チソツマブの分布を評価した。ラットにおける in vitro 血漿タンパク結合率、血球移行性、及び ^{3}H-MMAE の分布を測定し、MMAE の分布を評価した。

4.1　異種移植マウスにおける ^{89}Zr-チソツマブ　ベドチン及び ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布

報告書番号[redacted]001、添付資料番号[4.2.2.3-2 項]

本試験の目的は、^{89}Zr-チソツマブ　ベドチンと ^{89}Zr-チソツマブの 1 mg/kg を膵臓腫瘍異種移植雌マウスに投与した後、PET-CT 法を用いて評価し、比較することであった。それぞれ TF の発現がないか低いか、TF の発現が高い（> 3.5×10^5 molecules/cell）二種類のヒト由来膵臓腫瘍細胞株（human pancreatic derived cell lines、PANC-I and HPAF-II）を C.B.-17/lcrPrkdc-SCID マウスに移植した。HPAF-II 腫瘍を有するマウス 6 匹及び PANC-I を有するマウス 3 匹に、1 mg/kg の ^{89}Zr-チソツマブ　ベドチン又は ^{89}Zr-チソツマブ（同程度の放射活性）を静脈内投与した。

全身 PET-CT スキャンの結果から、HPAF-II 腫瘍での放射能の蓄積は経時的に増加し、^{89}Zr-チソツマブ　ベドチン及び ^{89}Zr-チソツマブともに遅い消失（$t_{1/2}$ = 約 150 時間）が示された。HPAF-II 腫瘍に対する強い取り込みが投与後 24 時間以内に両トレーサーで観察され、これはイメージング時間経過と共に増加したが、PANC-I 腫瘍では有意な取り込みはみられなかった。最終スキャン時点である投与後 144 時間後にマウスを屠殺し、種々の組織への放射能取り込みを測定した。腫瘍中のグラム当たりの投与量に対する放射能集積率（percentage of injected dose per gram、%ID/g）は、^{89}Zr-チソツマブと ^{89}Zr-チソツマブ　ベドチンでそれぞれ HPAF-II で 124.7% ± 31.8% ID/g 及び 216.7% ± 37.7% ID/g、PANC-I で 24.5% ± 2.6% ID/g 及び 9.2% ± 0.7% ID/g（平均値 ± SD）であった（[2.6.5-5.2 項]）。検討した正常組織のうち、^{89}Zr-チソツマブ　ベドチン及び ^{89}Zr-チソツマブともに、脾臓で最も高い放射活性が認められた。^{89}Zr-チソツマブを投与したマウスと比較して ^{89}Zr-チソツマブ　ベドチンを投与したマウス肝臓への取り込みはほぼ 4 倍高く、腎臓への放射能取り込みは約 2 倍高かった。残りの組織（血液、脾臓、心臓、肺、胃、筋肉、骨）では、両トレーサーとも同様の取り込みを示した。マウス組織への取り込みは、チソツマブ又はチソツマブ　ベドチンがマウス TF に結合しない場合でも認められたことから、この取り込みは通常の抗体の分布及び CL を反映している可能性が高いと考えられる。

4.2　カニクイザルにおける ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布

報告書番号[redacted]0001、添付資料番号[4.2.2.3-1 項]

^{89}Zr-チソツマブを単回静脈内投与したときの生体内分布、CL 及び放射能濃度を、非侵襲的 PET-CT を用いて投与後 168 時間までの時点で検討した（[2.6.5-5.3 項]）。線量推定値は、カニクイザルでの ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布［投与量に対する割合（percentage of injected dose、%ID）］に基づき計算した。各群 2 匹（雌雄各 1 匹）からなるカニクイザル 6 匹に 0.4、1.0 及び 3.0 mg/kg の ^{89}Zr-チソツマブを投与し、投与後 0～3 時間又は 3～6 時間（Day0）、72 時間（Day3）及び 168 時間（Day7）に撮影した。得られた画像から、関心領域（region of interest、ROI）を特定の臓器及び組織上に設定して%ID を算出した。画像定量化の結果は対象組織全体で一貫しており、投与群で有意差は認められなかった。最も高い%ID が認められた臓器は肝臓及び骨髄であった。しかし、線量計算からは腎臓及び下部大腸壁が最も高い線量当量を受けていた。本試験で報告された推定等価線量は、毒性が認められると考えられる放射線量を十分に下回っていた。

4.3　ラットにおける MMAE の生体内分布

報告書番号[redacted]-1201、添付資料番号[4.2.2.3-3 項]

雄 Long-Evans ラットに ^{3}H-MMAE の 0.056 mg/kg を静脈内投与し、定量的全身オートラジオグラフィーにより生体内分布を検討した（[2.6.5-5.1 項]）。^{3}H-MMAE 由来放射能は組織に広く分布し、投与後 0.17 時間から 24 時間まで、ほとんどの組織で血液よりも高い放射能が認められた。放射能が最も高かったのは胆汁（1.476 µg eq./g、0.17 時間後）、消化管内容物［C_{max} は、0.019 µg eq./g（24 時間後の胃内容物）から 0.975 µg eq./g（12 時間後の大腸内容物）］、及び膀胱（0.369 µg eq./g、4 時間後）であった。下垂体前葉、肺、腎皮質及び腎髄質では、C_{max} が 0.20 µg eq./g 超であった。投与後 96 時間では、胸腺、下垂体前葉及び下垂体後葉、並びにぶどう膜（それぞれ 0.013、0.006、0.005 及び 0.009 µg eq./g）を除く大部分の組織で放射能の消失が認められた。ぶどう膜（0.005 µg eq./g）を除く全ての組織で、投与 672 時間後に LLOQ 未満となった。

血漿中で認められた ^{3}H の同位体置換は、特に投与後 4 時間以降の組織分布データの結果に影響を及ぼしている可能性が高いと考える。血漿中の ^{3}H の同位体置換は 0.17 時間後に約 10%認められ、更に 4 時間後に約 36%、12 時間後に 49%、24 時間後に 73%、96 時間後に 96%に増加した。

4.4　MMAE の血漿タンパク結合

報告書番号[redacted]-0025、添付資料番号[4.2.2.3-4 項]

マウス、ラット、カニクイザル及びヒトの MMAE の血漿タンパク結合率を、in vitro 試験により評価した。

血漿に 1、10 及び 100 nmol/L になるように ^{3}H-MMAE を添加し、超遠心分離によりタンパク結合画分を分取した。血漿及び上清中の放射能を液体シンチレーションにより測定し、血漿タンパク結合率を算出した。

Table 6　マウス、ラット、カニクイザル及びヒトにおける ^{3}H-MMAE の血漿タンパク結合率

Species	Concentration of ^{3}H-MMAE		
	1 nmol/L	10 nmol/L	100 nmol/L
Mouse	18.8 (1.4)	19.6 (1.2)	28.5 (0.9)
Rat	72.9 (0.6)	73.5 (0.4)	72.0 (0.4)
Cynomolgus Monkey	17.1 (4.8)	17.8 (4.3)	18.9 (4.2)
Human	67.9 (5.7)	77.5 (3.1)	82.2 (1.5)

^{3}H-MMAE: tritium labeled monomethyl auristatin E
Mean (± SD), n = 3
Source: Study [redacted]-0025, Table3

ヒトでの ^{3}H-MMAE の血漿タンパク結合率は 67.9%～82.2%であった（Table 6）。タンパク結合の濃度依存性は動物種間で異なり、ラット及びカニクイザルの血漿では 1～100 nmol/L で濃度依

存性は認められなかったが、マウス及びヒトの血漿では同一濃度範囲でわずかな差が認められた。

4.5　MMAE の血球移行性

報告書番号[redacted]-0271、添付資料番号[4.2.2.3-5 項]

マウス、ラット、カニクイザル及びヒトでの MMAE の血球移行性を評価するため、in vitro 試験を実施した。^{3}H-MMAE を 2～5000 nmol/L で 5 濃度になるように血液試料に添加し、37°C で 1 時間インキュベートしたときの血液中放射能濃度の血漿中放射能濃度に対する比を算出した（[2.6.5-8.1 項]）。MMAE は種依存的な血液／血漿比を示し、2 及び 20 nmol/L（臨床に関連する濃度）においてマウスで 9.47～11.8、ラットで 1.86～2.36、カニクイザルで 1.40～1.57、ヒトで 0.926～0.976 であった。ヒトでは意義のある濃度依存性は認められなかったが、マウス、ラット及びカニクイザルでの赤血球移行性は濃度依存的であると考えられ、MMAE の低濃度（200 nmol/L 以下）では赤血球への移行性が高く、高濃度（1000 nmol/L 以上）では赤血球への移行性はわずかであった。

5.　代謝

チソツマブは in vivo で個々のアミノ酸に異化されると考えられるため、チソツマブ　ベドチンの抗体部分についての代謝試験は実施しなかった。

一方、MMAE の代謝を、ラット、カニクイザル及びヒトの培養肝細胞並びにヒト肝ミクロソームを用いて広範に検討した。また、ラットに ^{3}H-MMAE を、ヒトにブレンツキシマブ　ベドチンを投与したときの MMAE の代謝物プロファイルを尿中及び糞中で検討した。MMAE の代謝に関与する主要な CYP の同定も実施した。

5.1　In vitro 代謝

5.1.1　ラット、サル及びヒト肝細胞を用いた ^{3}H-MMAE 代謝物の評価

報告書番号[redacted]084007、添付資料番号[4.2.2.4-2 項]

^{3}H-MMAE の 10 µmol/L を Sprague Dawley ラット、カニクイザル及びヒト凍結肝細胞とインキュベートし、in vitro での代謝プロファイルを検討した（[2.6.5-10.3 項]）。基質の減少を評価した結果、肝細胞による ^{3}H-MMAE 代謝の初速度及び全体的な代謝の程度はいずれの動物種でも同程度であることが示唆された。ラット、カニクイザル及びヒト肝細胞を用いた 240 分間のインキュベーションで、それぞれ 32%、18%及び 32%の基質の減少が認められた。

インキュベート後の試料を質量分析した結果、主要な代謝物は水酸化、脱メチル化、酸化又は加水分解により生成されることが示唆された。ヒト肝細胞で検出された全ての代謝物は、ラット又はカニクイザルの肝細胞でも検出された。

5.1.2　^{3}H-MMAE の代謝に関与するヒト CYP 酵素の同定

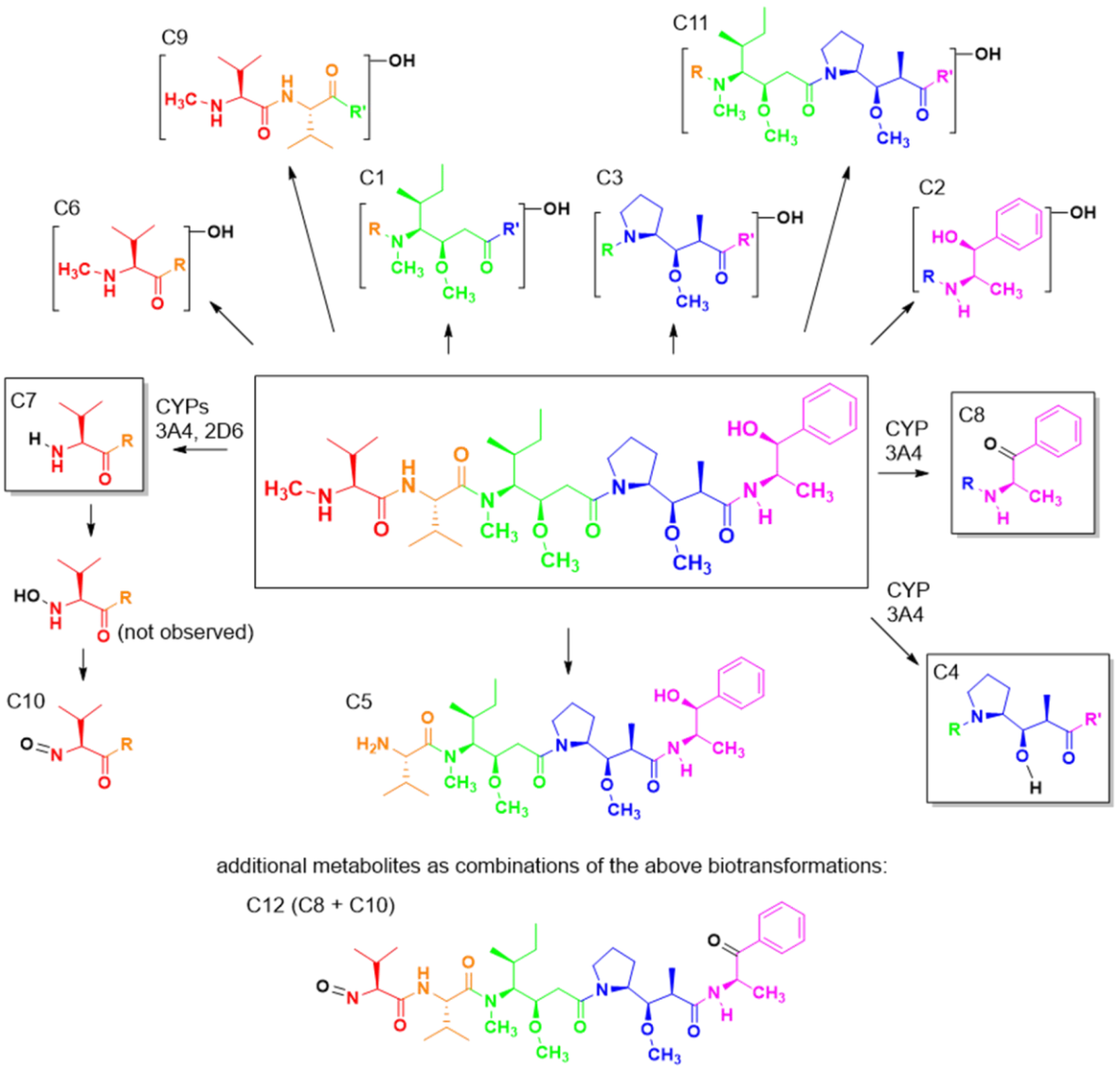
報告書番号[redacted]084006、添付資料番号[4.2.2.4-1 項]

^{3}H-MMAE の代謝に関与する CYP 分子種を検討するため、放射能検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー法（high performance liquid chromatography、HPLC）を用いて代謝物生成量を定量した。^{3}H-MMAE（0.9、10 及び 100 µmol/L）はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen、NADPH）を添加したヒト肝ミクロソームとのインキュベートで 8 種類の代謝物に代謝され、HPLC の溶出時間に基づいて番号が付けられた。8 種類の代謝物のうち 3 種類が主な代謝物であると考えられ、質量分析の結果、代謝物 C4、C7 及び C8 であることが明らかになった（[2.6.5-10.1 項]）。

^{3}H-MMAE（6 及び 16 µmol/L）とヒト CYP 酵素発現系とのインキュベーションにより、^{3}H-MMAE は CYP3A4 により C4、C7 及び C8 に代謝することが示された（[2.6.5-10.2 項]）。また、C7 への代謝には CYP2D6 も関与していた。さらに、16 個体のヒト肝ミクロソームによる CYP3A4 の活性（ミダゾラム及びテストステロン）と C4、C7 及び C8 の生成との間には、強い相関が認められた。ケトコナゾール及び CYP3A4 モノクローナル抗体（monoclonal antibody、mAb）により、C4、C7 及び C8 の生成が強く阻害されたことから、これら代謝物の生成には CYP3A4 の関与が示唆された。要約すると、ヒト肝ミクロソームで MMAE は主に CYP3A4 により代謝され、CYP2D6 の寄与はわずかであった。

In vitro データに基づく MMAE の推定代謝経路を Figure 2 に示す。

Figure 2　ヒト肝ミクロソームにおける MMAE の in vitro 推定代謝経路



Metabolic profile of MMAE in vitro in rat, cynomolgus monkey, and human hepatocytes. Reaction phenotyping was performed for C4, C7, and C8 (boxed) and the CYP enzymes involved in producing these metabolites are indicated.
Source: Study [redacted]-084006, Study [redacted]-84007, and Study [redacted]-[redacted]35-001

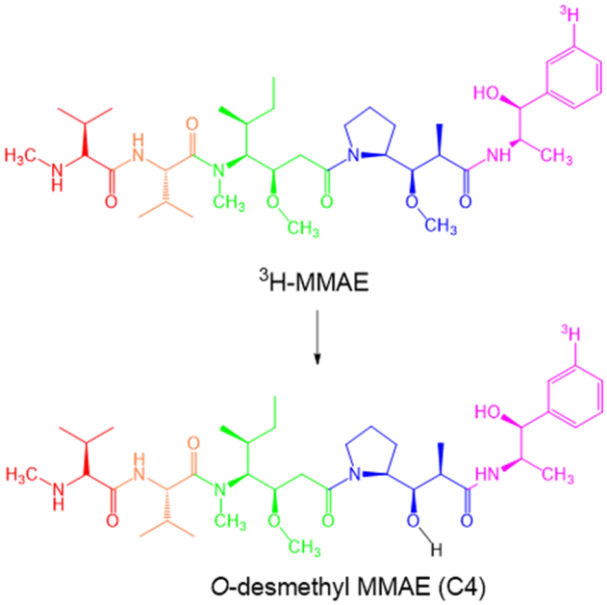
5.2　In vivo 代謝

5.2.1　　ラットに ^{3}H-MMAE を単回静脈内投与したときの尿糞中代謝物

報告書番号[redacted]420501、添付資料番号[4.2.2.5-1 項]

ラットに ^{3}H-MMAE を 0.056 mg/kg で静脈内投与したときの尿中及び糞中代謝物を検討した。尿糞中放射能は放射能検出／紫外検出を備えた HPLC を用いて測定し、代謝物を LC-MS/MS により同定した。尿糞中に排泄された主な放射能は未変化体である ^{3}H-MMAE と同定された。糞中には ^{3}H-MMAE の他に *O*-desmethyl-MMAE が排泄された（Figure 3）。尿中にはその他の代謝物も認められたが、量が少ないため、LC-MS/MS による同定は実施しなかった。

Figure 3　ラット糞中に同定された MMAE 代謝物



Structure of MMAE and metabolite identified in rat feces following dosing with ^{3}H-MMAE.
Source: Study [redacted]420501

5.2.2　ヒト尿糞中代謝物の同定

報告書番号[redacted]-[redacted]35-001、添付資料番号[4.2.2.4-3 項]

ヒトにブレンツキシマブ　ベドチンを単回静脈内投与したときの MMAE の尿中及び糞中代謝物を評価した。CD30 陽性血液悪性腫瘍患者にブレンツキシマブ　ベドチン 1.8 mg/kg を投与した。投与後 7 日間、毎日尿及び糞を採取した。尿糞中の MMAE 代謝物（Table 7）を LC-MS/MS で測定した。尿中では複数の微量代謝物が同定された：アミド加水分解生成物（C5）；水酸化体（C6）；脱メチル化体（C7）；脱水素化生成物（C8）であった。尿中には複数の副次的代謝物も同定された：脱メチル化体及び酸化体（C10）；脱水素化・脱メチル化・酸化生成物（C12）；脱メチル化及び脱水素化生成物（C13）。

糞中に検出された代謝物は、脱メチル化体（C4）並びに前述の C5、C8 及び C13 であった。C13 を除く全ての代謝物は既に in vitro で認められていた。C13 は C4 と C8 の代謝経路により生成された。これらの代謝物の構造及び推定代謝経路を Figure 4 に示す。

Table 7　ヒトにブレンツキシマブ　ベドチンを投与、及びラットに MMAE を投与したときの in vivo 代謝物プロファイル

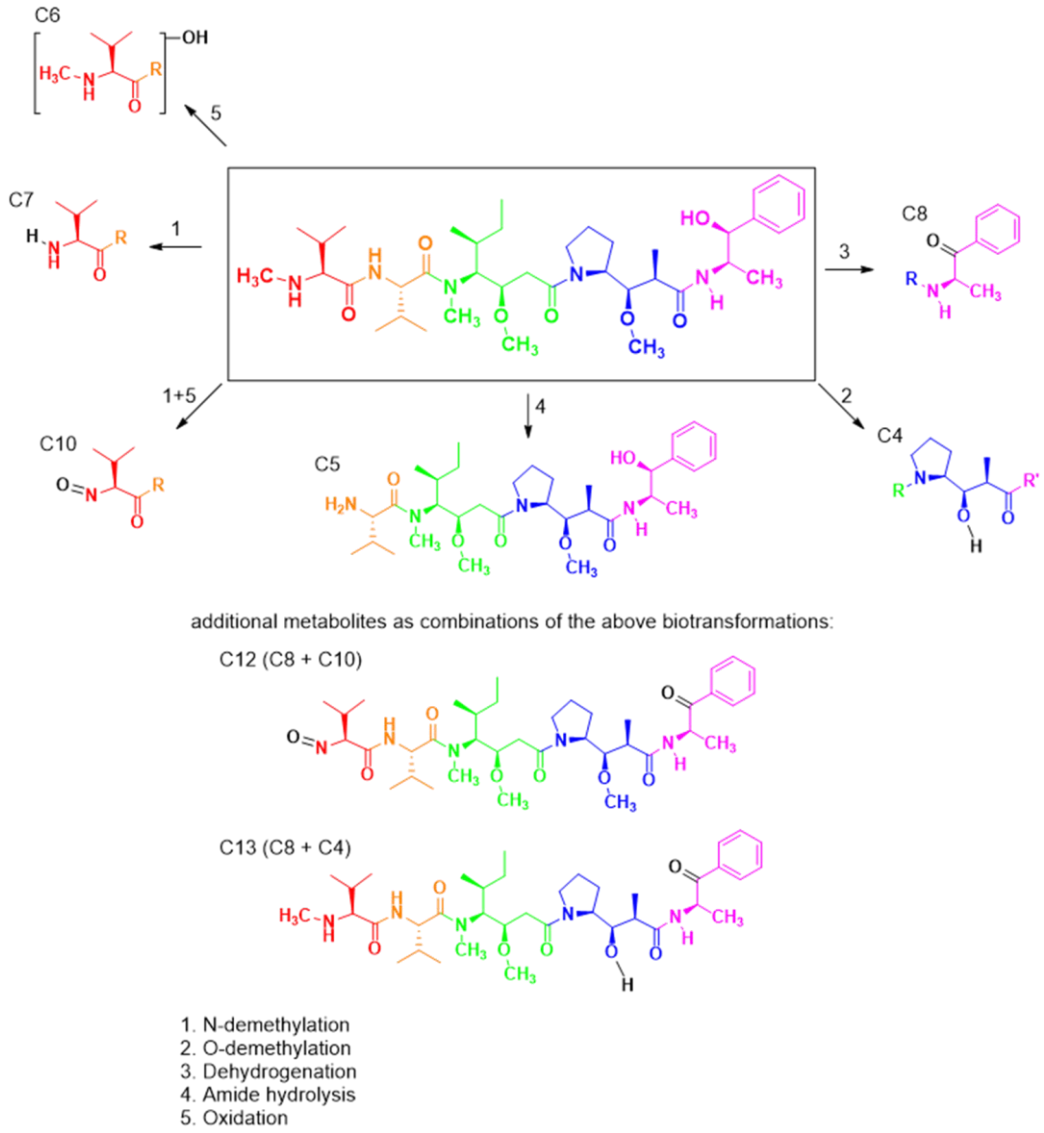
Metabolite Designation	m/z	Change in mass (amu) from Parent	Proposed Transformation From MMAE	Human Urine	Human Feces	Rat Feces
C1	734	+16	Hydroxylation	ND	ND	ND
C2	734	+16	Hydroxylation	ND	ND	ND
C3	734	+16	Hydroxylation	ND	ND	ND
C4	704	−14	*O*-Demethylation	ND	+	+
C5	605	−113	Amide hydrolysis	+	+	ND
C6	734	+16	Hydroxylation	+	ND	ND
C7	704	−14	*N*-Demethylation	+	ND	ND
C8	716	−2	Oxidation of alcohol to form a ketone	+	+	ND
C9	734	+16	Hydroxylation	ND	ND	ND
C10	718	+0	*N*-demethylation + oxidation to form a nitroso compound	+	ND	ND
C11	734	+16	Hydroxylation	ND	ND	ND
C12	716	−2	Oxidation of alcohol to form a carbonyl (following formation of the nitroso compound)	+	ND	ND
C13	702	−16	*O*-demethylation and oxidation of alcohol to form a carbonyl	+	+	ND
Parent	718	−	−	+	+	+

amu: atomic mass units; m/z: mass to charge ratio; ND: not detected

In rat urine, additional metabolites were observed, but no attempt was made to identify them by LC-MS/MS because of their low abundance.

Source: Study [redacted]-[redacted]35-001, Table 1 and Study [redacted]420501, Table 6

Figure 4　ヒトにおける MMAE の in vivo 代謝物の推定構造及び推定代謝経路



Source: [redacted]-[redacted]35-001

5.2.3　MMAE 代謝の種差

報告書番号[redacted]084007、添付資料番号[4.2.2.4-2 項]

ラット及びヒトのいずれでも、MMAE の主要な消失経路は未変化体の胆汁／糞中排泄であると考えられる。ラット、カニクイザル及びヒトで検出された主要代謝物は類似していた。ラット、カニクイザル及びヒトの肝細胞を用いた MMAE の代謝に関する in vitro 試験では、12 種類の代謝物が認められた。ヒト肝細胞で検出された全ての代謝物は、ラット又はカニクイザルの肝細胞でも検出された。

6.　排泄

チソツマブ　ベドチンの排泄試験は、抗体薬には適さないと考えられるため実施しなかった。分子の大きさから、未変化体であるチソツマブ　ベドチンの尿中排泄は無いと考えられる

（Keizer et al., 2010）。ラットに ^{3}H-MMAE を単回静脈内投与し、排泄試験を実施した。その他の非臨床排泄試験は実施しなかった。^{3}H-MMAE を投与したラットでの主な排泄経路は糞中であった。

6.1　Sprague Dawley ラットに ^{3}H-MMAE を単回静脈内投与したときの排泄

報告書番号[redacted]420501、添付資料番号[4.2.2.5-1 項]

ラットで MMAE のマスバランス試験を実施した。血液、血漿、尿、糞及び屍体中放射能濃度を液体シンチレーションにより測定した（[2.6.5-13 項]）。ラットに ^{3}H-MMAE の 0.06 mg/kg を単回静脈内投与したときの主な排泄経路は糞中であった。放射能回収率は雌雄ラットで約 112%であった（Table 8）。雌雄共に放射能の大部分は糞中に回収された（96.7%～101.8%）。残りの放射能は尿中に回収された（9.4%～15.1%）。

Table 8　ラットに ^{3}H-MMAE を単回静脈内投与したときの放射能排泄率

Sex	Route	Percentage (SD) of Administered Dose[a,b]			
		Urine	Feces	Carcass	Total[c]
Male	i.v.	15.1 (1.2)	96.7 (1.8)	0.0 (0.0)	112.1 (1.2)
Female	i.v.	9.4 (0.6)	101.8 (1.9)	0.0 (0.0)	111.5 (1.5)

^{3}H-MMAE: tritium labeled monomethyl auristatin E
a) Values represent mean percentage (SD) (n = 4 animals per timepoint).
b) Excretion was determined over 672 hours in Sprague Dawley rats.
c) Total includes radioactivity in cage wash.
Source: Study [redacted]420501, Table 8

7.　薬物動態学的薬物相互作用

MMAE の代謝を介した薬物相互作用の可能性について in vitro で評価した。ヒト肝細胞では、MMAE は CYP1A2、2B6 及び 3A4/5 の誘導薬ではなかった。MMAE は中程度の時間依存的阻害薬であり、CYP3A の比較的弱い可逆的阻害薬であった。ヒトでは、チソツマブ　ベドチンを 2.0 mg/kg 投与したときの MMAE の平均 C_{max} は 5.91 ng/mL すなわち 8.23 nmol/L（母集団 PK 解析報告書[redacted]1015-248：[5.3.3.5-1 項]）であり、これは CYP3A4/5 の 50%阻害濃度（50% inhibitory concentration、IC_{50}）よりも約 3 桁低かった。MMAE は P-gp の基質であるが、検討した他のトランスポーターの基質ではない。MMAE は、臨床的に意義のある濃度で検討したいずれのトランスポーターに対しても阻害作用を示さなかった。

In vitro 及び in vivo 代謝試験の結果から、MMAE は CYP3A4 の基質であることが確認されたが、ヒトでの MMAE の主要な消失経路は未変化体の胆汁/糞中排泄によるものと考えられ、CYP3A4/5 を介した代謝はわずかであった。

7.1　ヒト培養肝細胞を用いた MMAE の CYP 誘導作用

報告書番号[redacted]133043、添付資料番号[4.2.2.6-1 項]

3 例のドナーから採取した培養ヒト肝細胞を用いて、MMAE の CYP 誘導能を評価する in vitro 試験を実施した（[2.6.5-12 項]）。肝細胞を 3 日間連続で 4 濃度（1、10、100、又は

1000 nmol/L）の MMAE で処理した。本試験の条件下では、培養ヒト肝細胞を 10 nmol/L までの MMAE で処理しても、CYP1A2、2B6 及び 3A4/5 の代謝活性はほとんど又は全く増加しなかった。また、MMAE は CYP1A2、2B6 及び 3A4 の mRNA 量又はウェスタンブロット法によるタンパク質量を増加させなかった。しかし、高濃度（100 及び 1000 nmol/L）の MMAE では、検討した 3 つの肝細胞全てで CYP1A2、2B6 及び 3A4/5 の代謝活性、mRNA 濃度又はタンパク質濃度が低下した。これらの結果に基づき、MMAE は CYP1A2、2B6 及び 3A4/5 の誘導薬ではないと考えられる。

7.2　MMAE の CYP 阻害作用

報告書番号[redacted]085021、添付資料番号[4.2.2.6-2 項]

ヒト肝ミクロソームを用いて、主要な CYP 分子種（CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5）に対する MMAE の阻害能を評価する in vitro 試験を実施した（[2.6.5-12 項]）。CYP 活性の直接的阻害薬としての MMAE を評価するために、16 例のプールドヒト肝ミクロソームを、0.1～100 µmol/L の濃度の MMAE の存在下又は非存在下で、ミカエリスメンテン定数（Michaelis-Menten constant、K_m）にほぼ等しい濃度の典型的基質と共にインキュベートした。

MMAE による CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19 及び 2D6 に対する直接阻害はほとんど又は全く認められなかった。CYP3A4/5 については、MMAE はミダゾラム 1'水酸化活性を指標としたとき直接的な阻害を示し、IC_{50} は 10 µmol/L であったが、テストステロン 6β 水酸化活性を指標としたときに CYP3A4/5 に対する阻害作用は認められなかった。テストステロン 6β 水酸化及びミダゾラム 1'水酸化の結果より、MMAE による CYP3A4/5 に対する時間依存的阻害が認められた。さらに検討した結果、CYP3A4/5 の時間依存的阻害の増大には NADPH を必要とすることが示され、観察された阻害は CYP が介する代謝物生成の結果であることが示唆された。さらに、この阻害作用の増加は MMAE とのプレインキュベーション後にミクロソーム分離、及びフェリシアン化カリウム添加後にミクロソーム分離することで部分的及び完全に回復したことから、MMAE は CYP3A4/5 の準不可逆的な阻害薬であることが示唆された。この時間依存的阻害を更に検討したところ、不活性化速度定数（maximal rate of enzyme inactivation、K_{inact}）は 0.10 min^{-1}、阻害物質の飽和濃度での酵素不活化の 50%阻害濃度（concentration of an inactivator that supports half the maximal rate of enzyme inactivation、K_I）は 1.12 µmol/L であり、K_{inact}/K_I 比は 90 min^{-1} $(mmol/L)^{-1}$ と中程度であった。

7.3　トランスポーターによる相互作用

報告書番号[redacted]108004、添付資料番号[4.2.2.6-3 項]
報告書番号[redacted]-01709、添付資料番号[4.2.2.6-4 項]
報告書番号[redacted]-3234、添付資料番号[4.2.2.6-5 項]
報告書番号[redacted]-0008、添付資料番号[4.2.2.6-6 項]
報告書番号[redacted]-0009、添付資料番号[4.2.2.6-7 項]
報告書番号[redacted]-0010、添付資料番号[4.2.2.6-8 項]
報告書番号[redacted]-0011、添付資料番号[4.2.2.6-9 項]

報告書番号[redacted]-0012、添付資料番号[4.2.2.6-10 項]

MMAE が排出及び取り込みトランスポーターである P-gp、BCRP、BSEP、MRP2、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1 又は OATP1B3 の基質又は阻害薬であるか評価するため、いくつかの in vitro 試験を実施した（[2.6.5-15 項]）。これらの試験から得られた主な結果は以下のとおりである。

- MMAE は P-gp の基質である。
- MMAE は BCRP、MRP2、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではない。
- MMAE は、臨床的に意義のある濃度で P-gp、BCRP、BSEP、MRP2、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1 又は OATP1B3 の阻害薬ではない。

MMAE とヒト排出トランスポーターである P-gp、BCRP 及び MRP2 との相互作用を評価する in vitro 試験を実施した（報告書番号[redacted]108004、 報告書番号[redacted]-01709）。MMAE は、Caco-2 単層膜細胞を用いた 1、10 及び 100 µmol/L での排出試験で、検討した全ての濃度で A-B（頂端膜側から基底膜側）の低い透過性< 1×10^{-6} cm/sec を示した。MMAE の基底膜側から頂端膜側への（B-A）透過性は A-B よりも高く、試験した全ての濃度で排出比（efflux ratio、ER）> 8.8 を示した。ER は P-gp 阻害薬 PSC833（10 µmol/L）、LY335979（10 µmol/L）又はベラパミル（60 µmol/L）の存在下で約 2 に減少し、MMAE は P-gp の基質であることが示唆された。しかし、MMAE の B-A 透過性は、BCRP 阻害薬である Ko143（5 µmol/L）又は MRP2 阻害薬であるインドメタシン（100 µmol/L）の存在下で変化しなかったことから、MMAE は BCRP 又は MRP2 の基質ではないことが示唆された。MMAE は P-gp の基質であるジゴキシンの能動輸送をわずかに阻害し、IC_{50} は 50 µmol/L 超であったことから、MMAE は臨床的に意義のある P-gp 阻害薬ではないことが示された。

MMAE（10 又は 100 nmol/L）が取り込みトランスポーターである OATP1B1、OATP1B3、OCT2、OAT1 及び OAT3 の基質であるかどうかを評価するために、各取り込みトランスポーターを発現させたチャイニーズハムスター卵巣（Chinese hamster ovary、CHO）細胞又はヒト胎児腎（human embryonic kidney、HEK）293 細胞を用いた一連の試験（報告書番号[redacted]-0008、報告書番号[redacted]-0009、報告書番号[redacted]-0010、報告書番号[redacted]-0011、報告書番号[redacted]-0012）で、各トランスポーターを発現させた対照細胞及び CHO 細胞又は HEK 細胞での ^{3}H-MMAE の取り込みは、10 分間インキュベート後、同程度であった（[2.6.5-15 項]）。いずれの細胞株でも、^{3}H-MMAE の取り込みは各阻害薬の非存在下と同様に阻害薬濃度（OATP1B1 及び OATP1B3：シクロスポリン A 0.05～50 µmol/L、OCT2：シメチジン 0.2～200 µmol/L、OAT1 及び OAT3：プロベネシド 0.4～400 µmol/L）に依存しなかった。能動的取り込みは、細胞膜を介する ^{3}H-MMAE 透過に対して有意に寄与せず、^{3}H-MMAE は検討したいずれのトランスポーターの基質でもないと考えられた。

In vitro 試験（報告書番号[redacted]-3234）において、MMAE とヒト排出トランスポーターである BCRP、BSEP 及び MRP2 との相互作用を小胞輸送系で検討し、ヒト取り込みトランスポーターである OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 との相互作用を CHO 細胞又は HEK293 細胞を用いて検討した（[2.6.5-15 項]）。MMAE は、BCRP、BSEP 及び MRP2 のトランスポーターを介したプローブ基質の取り込みについて検討した濃度（0.008～5 µmol/L）で、影

響を及ぼさなかった。MMAE は OCT1 及び OCT2 を介したメトホルミン輸送を、5 µmol/L（試験した最高濃度）でそれぞれ 29%及び 23%阻害した。しかし、MMAE は、検討した最高濃度の 5 µmol/L まで、OAT1、OAT3、OATP1B1 又は OATP1B3 を介したプローブ基質の取り込みに影響を及ぼさなかった。

8.　その他の薬物動態試験

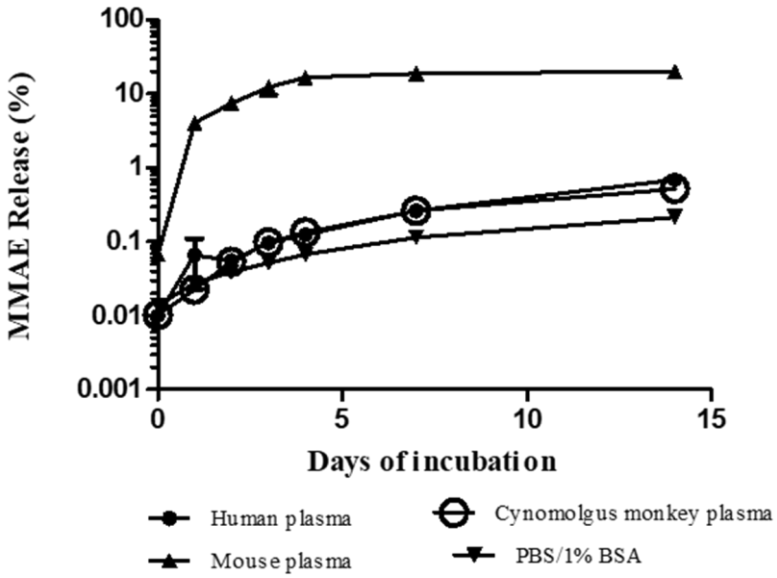
8.1　血漿中安定性

報告書番号[redacted]1015-109-01、添付資料番号[4.2.2.7-1 項]

ヒト、カニクイザル及びマウスの血漿中でのチソツマブ　ベドチンの安定性を検討した（[2.6.5-16.1 項]）。

チソツマブ　ベドチン（50 µg/mL）を 37°C の血漿中で 14 日間インキュベートした。Figure 5 に示すように、チソツマブ　ベドチンは 37°C のヒト及びカニクイザルの血漿中で 14 日間インキュベートしたとき高い安定性を示した。ヒト及びカニクイザルの血漿中での遊離型 MMAE は、それぞれ 0.7%及び 0.5%であった。マウス血漿では、チソツマブ　ベドチンに結合した MMAE の約 20%が 2 週間で遊離した。ヒト及びカニクイザルの血漿中での MMAE の遊離は、1%ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin、BSA）を含むリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline、PBS）での 0.2%の遊離と比較して、わずかに高いことが認められた。Figure 5 にチソツマブ　ベドチンに含まれる初期総量に対する MMAE の遊離の割合を示す。

Figure 5　PBS/1% BSA における安定性と比較した、ヒト、カニクイザル及びマウスの血漿でのチソツマブ　ベドチンの安定性



Source: Study [redacted]1015-109-01, Figure 1

9. 考察及び結論

チソツマブ　ベドチン及びチソツマブの PK/TK を、in vivo での有効性評価に適したモデルと考えられる SCID マウスを用いた PK 試験、ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験で検討した（Table 9）。投与は、予定される臨床投与経路（静脈内）を用いて単回投与、週 1 回投与、又は 3 週間に 1 回投与とした。チソツマブ　ベドチン及びチソツマブの投与量はそれぞれ 6 及び 100 mg/kg までとした。

マウスでのチソツマブの PK プロファイルは、初期 Vd（Vcen）が約 40 mL/kg と小さく、$t_{1/2}$ が 2 週間以上と消失が緩徐であるという特徴を示し、これは SCID マウスでのヒト IgG 抗体に典型的な結果であった（Lin et al., 1999）。チソツマブ　ベドチン投与後の TAb の $t_{1/2}$ は約 10 日であり、チソツマブ投与後よりも短かった。チソツマブ　ベドチン投与後のチソツマブ　ベドチン及び TAb の PK パラメーターを比較したところ、チソツマブ　ベドチンでは TAb と比較して AUC が小さく、CL が高く、$t_{1/2}$ が短かった。CL がより速やかで曝露量がより低いことは、MMAE がチソツマブ　ベドチンから放出されるため、DAR が経時的に変化することを示唆している。

カニクイザルでは、チソツマブを 1 mg/kg で投与後の初期 Vd が約 40 mL/kg と小さいことも特徴であった。しかし、特に最低投与量である 1 mg/kg での $t_{1/2}$ は、カニクイザルにおける他のヒト抗体で報告されている $t_{1/2}$ よりも比較的短かった（Lin et al, 1999）。チソツマブはカニクイザルの TF には結合するがマウスの TF には結合しないことから、カニクイザルでは標的（TF）を介した体内動態が生じている可能性があるが、これは膜タンパク質を標的とする多くの抗体で認められている（Keizer et al., 2010）。ほとんどのサルからチソツマブ　ベドチンに対する抗体が検出され、ADA 陽性動物での全身曝露量は、初回投与時と比較してその後の投与でおおむね低かった。投与量が高くなるにつれ、ADA による影響は減少し、5 mg/kg では曝露量に対する影響はわずかであった。最も適切な PK データが得られると考えられる初回投与後のデータを用いて、動物間の比較に用いた。チソツマブ　ベドチンの初回投与後のチソツマブ　ベドチン及び TAb 濃度は同程度であった。チソツマブ　ベドチン及び TAb での全身曝露量は、雌雄ともおおむね投与量に比例して増加した。$t_{1/2}$ に投与量の増加に伴う明らかな変化は認められなかった。カニクイザルへの初回投与後、MMAE の t_{max} は 1～3 日後と遅かったことから、チソツマブ　ベドチン投与後の MMAE の TK は MMAE の生成が律速であることが示唆された。遊離型 MMAE の全身曝露量（AUC_{0-t}）は、全投与群の雌雄で Day1 ではおおむね用量比例性を示したが、雌では反復投与後に用量比例性をわずかに上回った。放出された MMAE のモル換算濃度はチソツマブ　ベドチンでの C_{max} の約 0.01%に相当し、チソツマブ　ベドチンの全身循環での高い安定性が確認された。

チソツマブ　ベドチンの PK プロファイルはチソツマブと類似しており、$t_{1/2}$ は 1～2 日であり、検討した 1～6 mg/kg では用量依存性は認められなかった。用量補正した AUC_{0-t} で計算すると、チソツマブの曝露量はチソツマブ　ベドチンの 1.3～2.3 倍であった。しかし、平均 C_{max} はチソツマブ　ベドチンとチソツマブで同程度であった。カニクイザルでのチソツマブ　ベドチンの CL はチソツマブよりわずかに高かったが、これは結合した MMAE により疎水性が増大したことに関連している可能性があると考える。

Table 9　PK 及び TK パラメーターの動物種間比較

Species	Test Article	Dose Association	Dose Level (mg/kg)	Tisotumab vedotin		Free MMAE		Associated Study No.
				C_{max}[a] (μg/mL)	AUC[a] (μg·h/mL)	C_{max}[b] (pg/mL)	AUC[b] (pg·h/mL)	
Mouse	tisotumab vedotin	HNSTD	5	172 (159)	21414 (8910)	ND	ND	MR1015-143-33
Rat	MMAE	NOAEL	0.097	NA	NA	3640	27145	[redacted] 7646-118
Rat	MMAE	HNSTD/ MTD	0.194	NA	NA	9173	70212	[redacted] 7646-118
Cynomolgus monkey	MMAE	HNSTD	0.058	NA	NA	2020	ND	[redacted].163.16
Cynomolgus monkey	tisotumab vedotin	NOAEL	1	22 (22)	529 (507)	42	ND	[redacted]521988
Cynomolgus monkey	tisotumab vedotin	HNSTD	3	64 (77)	3085 (2457)	118	ND	[redacted]521988
Cynomolgus monkey	tisotumab vedotin	-	6/5	129 (173)	7875 (6573)	185	ND	[redacted]521988
Cynomolgus monkey	tisotumab vedotin	NOAEL	1	30 (31)	953 (797)	48	4430	[redacted]522531
Cynomolgus monkey	tisotumab vedotin	HNSTD	3	81 (94)	3440 (3210)	127	12550	[redacted]522531
Cynomolgus monkey	tisotumab vedotin	-	5	133 (162)	6035 (6000)	225	21900	[redacted]522531
Human	tisotumab vedotin	-	2.0	(40.8)	(1382)	5910	1200000	[redacted]1015-248[c]

Data are mean values as reported in Module 2.6.5.

HNSTD: highest non-severely toxic dose; MTD: maximum tolerated dose; NA: not applicable; ND: not determined; NOAEL: no observable adverse effect level

a) Data are based on TAb measurements. The results obtained from the ADC are indicated in parentheses.

b) C_{max} and AUC values of free MMAE relate to the 1st dose administration.

c) Cycle 1 plasma PK parameters for tisotumab vedotin from study GEN701 – 2.0 mg/kg dose cohort.

チソツマブ　ベドチンの抗体部分は、in vivo で個々のアミノ酸に異化されると考えられるため、代謝については評価しなかった。チソツマブ　ベドチンは、薬理活性を有する MMAE がマレイミドカプロイル vc リンカーを介して平均 DAR4 で結合しているアドセトリス®（ブレンツキシマブ　ベドチン）と同じリンカー薬物結合をもっている。ブレンツキシマブ　ベドチンを 1.8 mg/kg で投与後の MMAE の C_{max} は約 7 nmol/L であったが（Han et al., 2013）、チソツマブ　ベドチン投与後の MMAE の C_{max} は約 8.23 nmol/L であった。以上のように、ブレンツキシマブ　ベドチン及びチソツマブ　ベドチン投与後の ADC の構造的類似性及び遊離型 MMAE の PK の類似性から、チソツマブ　ベドチン投与後の MMAE の代謝及び体内動態の特徴づけに、ブレンツキシマブ　ベドチン及び MMAE を用いた非臨床試験結果を含めることは科学的に妥当であると考えられる。

MMAE の血漿タンパク結合率は低度から中等度で、種依存的であり、ラット及びヒト（67.9%～82.2%）の方がマウス及びカニクイザル（17.1%～28.5%）よりも高かった。MMAE は、マウス、ラット及びカニクイザルの血液では血液／血漿比は 0.954～11.8、ヒトの血液では 1 未満であり、種依存的な血球移行性を示した。膵臓腫瘍を有するマウスでの ^{89}Zr-チソツマブ　ベドチ

ン及び ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布は、TF 発現腫瘍では PET-CT スキャンによる ^{89}Zr の強いシグナル及び TF 陰性腫瘍では弱いシグナルを示した。検討した正常組織のうち、脾臓、肝臓、腎臓、心臓、肺、胃、筋肉及び骨に分布が認められ、非特異的な分布を反映していると考えられた。カニクイザルに ^{89}Zr-チソツマブを静脈内投与したとき、%ID が最も高かった組織は肝臓及び骨髄であった。Long-Evans ラットでの ^{3}H-MMAE の生体内分布試験で、^{3}H-MMAE 由来放射能は組織に広く分布し、投与 96 時間後にはほとんどの組織で放射能の消失が認められた。血漿中で認められた ^{3}H の同位体交換は、特に投与後 4 時間以降の組織分布データの解釈に影響を及ぼしている可能性がある。

MMAE の in vitro での代謝では、ヒト肝細胞とラット又はカニクイザルで検出された代謝物は同様であった。ヒト CYP 酵素発現系を用いた試験で、MMAE が in vitro で CYP3A4 の基質となることが確認された。ブレンツキシマブ　ベドチンの臨床試験では強力な CYP3A4/5 阻害薬（ケトコナゾール）の併用投与により MMAE の曝露量が 34%増加し、CYP3A4/5 誘導薬（リファンピシン）の併用投与により MMAE の曝露量が 46%減少した（Han et al., 2013）。

チソツマブ　ベドチンの排泄を評価する試験は、抗体薬には適さないと考えられるため実施しなかった。分子の大きさからから考えて（Keizer et al., 2010）、未変化体であるチソツマブ　ベドチンの尿中排泄は無いと考えられる。^{3}H-MMAE 投与後のラットでは、ほとんどが未変化体のまま糞中に排泄され、代謝物はわずかであった。これらの結果は、ヒトにブレンツキシマブ　ベドチンを単回静脈内投与したときの結果と一致しており、MMAE の代謝経路はラットとヒトで類似していることが示唆された。ラットでの尿中排泄率は約 15%以下であった。循環血中の代謝物は検討しなかった。

MMAE は CYP3A4/5 の強力な可逆的阻害薬又は誘導薬ではなく、準不可逆的な阻害薬である。しかし、ヒトで MMAE の血漿中 C_{max} が低いこと（約 8.23 nmol/L 又は 5.91 ng/mL）及び K_I がより大きいこと（1.12 µmol/L 以上）を考慮すると、MMAE は他の CYP3A 基質の PK を顕著に変化させることはないと考えられる。ヒトで、ブレンツキシマブ　ベドチンとの併用投与は CYP3A の基質であるミダゾラムの曝露量に影響を及ぼさなかった（Han et al., 2013）。In vitro 試験の結果から、MMAE は P-gp の基質であるが、BCRP、MRP2、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1 又は OATP1B3 の基質ではないことが示唆された。さらに、臨床的に意義のある濃度では、MMAE は P-gp、BCRP、BSEP、MRP2、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1 又は OATP1B3 の阻害薬ではない。

10. 参考文献一覧

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

Keizer RJ, Huitema AD, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. Clin Pharmacokinet. 2010;49(8):493-507.

Lin YS, Nguyen C, Mendoza JL, Escandon E, Fei D, Meng YG, et al. Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor. J Pharmacol Exp Ther. 1999;288(1):371-8.

目次

1. 薬物動態試験：一覧表 3
1.1 分析法の概要 3
1.2 非臨床薬物動態試験の概要 4
2. 分析方法及びバリデーション試験 7
2.1 抗体薬物複合体及び総抗体の分析法 7
2.2 抗薬物抗体の分析法 8
2.3 MMAE の分析法 9
3. 薬物動態試験：吸収：単回投与 10
3.1 マウスにチソツマブ　ベドチン又はチソツマブを単回投与したときの薬物動態 10
3.2 カニクイザルにチソツマブを単回投与したときのトキシコキネティクス 11
4. 薬物動態試験：吸収：反復投与 12
4.1 カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを 3 週間に 1 回、4 回反復投与したときのトキシコキネティクス 12
4.2 カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを 3 週間に 1 回、5 回反復投与したときのトキシコキネティクス 14
4.3 カニクイザルにチソツマブを 3 週間に 1 回、5 回反復投与したときのトキシコキネティクス 17
4.4 ラットに MMAE を週 1 回 4 週間反復投与したときのトキシコキネティクス 18
4.5 ラットに MMAE を週 1 回 2 週間投与したときのトキシコキネティクス 19
5. 薬物動態試験：分布 20
5.1 組織内分布 20
5.2 異種移植マウスにおける ^{89}Zr-チソツマブ　ベドチン及び ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布 23
5.3 カニクイザルにおける ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布 24
6. 薬物動態試験：タンパク結合 26
7. 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 27
8. 薬物動態試験：その他の分布試験 28
8.1 血液／血漿中濃度比 28
9. 薬物動態試験：代謝：In Vivo 29
10. 薬物動態試験：代謝：In Vitro 30
10.1 ヒト肝ミクロソームにおける ^{3}H-MMAE の in vitro 代謝 30
10.2 ^{3}H-MMAE の in vitro 代謝に関与するヒト CYP 酵素の同定 32
10.3 肝細胞における代謝物の特性評価 33
11. 薬物動態試験：推定代謝径路 35
11.1 In vitro におけるヒト肝ミクロソームによる MMAE の代謝経路 35

11.2　In vivo におけるヒトによる MMAE の代謝経路 36
12.　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 37
12.1　薬物代謝酵素の誘導 37
12.2　薬物代謝酵素の阻害 39
13.　薬物動態試験：排泄 41
14.　薬物動態試験：排泄：胆汁中 43
15.　薬物動態試験：薬物相互作用 44
15.1　MMAE を用いた Caco-2 での試験 44
15.2　MMAE を用いた排出トランスポーターP-gp、BCRP 及び MRP2 での試験 45
15.3　MMAE を用いた排出トランスポーターBCRP、BSEP 及び MRP2、並びに取り込みトランスポーターOAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 での試験 46
15.4　MMAE を用いた取り込みトランスポーターOATP1B1、OATP1B3、OCT2、OAT1 及び OAT3 での試験 50
16.　薬物動態試験：その他 51
16.1　チソツマブ　ベドチンの in vitro 血漿中安定性 51

1.　薬物動態試験：一覧表

1.1　分析法の概要

Test Articles: Tisotumab vedotin, Tisotumab, MMAE

Assay	Analyte	Method	Matrix	Testing Facility	Validation Report Number/Location in CTD	Used in study
ADC	Tisotumab vedotin	ELISA	Monkey plasma	[redacted], [redacted], UK	[redacted]315274/ [4.2.2.1-1]	[redacted]521988
				[redacted], [redacted], UK		[redacted]522531
			Mouse plasma	Genmab, NL	-	MR1015-143-33
Human IgG PK	human IgG	ELISA	Monkey serum	[redacted], [redacted], UK	-	[redacted]514850
TAb	Tisotumab	ELISA	Monkey plasma	[redacted], [redacted], UK	[redacted]316168/ [4.2.2.1-2]	[redacted]522531
TAb	Tisotumab vedotin plus tisotumab	ELISA	Monkey plasma	[redacted], [redacted], UK	[redacted]315274/ [4.2.2.1-1]	[redacted]521988
				[redacted], [redacted], UK		[redacted]522531
			Mouse plasma	Genmab, NL	-	MR1015-143-33
Free MMAE in monkey plasma	MMAE	LC-MS/MS	Monkey plasma	[redacted], [redacted], UK	[redacted]8263943/ [4.2.2.1-3]	[redacted]521988
						[redacted]522531
Free MMAE in monkey serum	MMAE	LC-MS/MS	Monkey Serum	[redacted] [redacted], [redacted], [redacted]	[redacted]7646-115/ [4.2.2.1-4]	[redacted].163.16
Free MMAE in rat serum	MMAE	LC-MS/MS	Rat serum	[redacted], [redacted], [redacted]	[redacted]7646-119/ [4.2.2.1-5]	[redacted]7646-118,
				[redacted], [redacted], [redacted]		[redacted]8204397
Free MMAE in rat amniotic fluid	MMAE	LC-MS/MS	Rat amniotic fluid	[redacted], [redacted], [redacted]	[redacted]8212326 /[4.2.2.1-6]	[redacted]8204397
ADA	ADA against tisotumab	ELISA	Monkey serum	[redacted], [redacted], UK	[redacted]1015-002/ [4.2.2.1-8]	[redacted]514850
ADA	ADA against tisotumab vedotin	ECLIA	Monkey serum	[redacted], [redacted], UK	[redacted]315253/ [4.2.2.1-7]	[redacted]521988
				[redacted], [redacted], UK		[redacted]522531

ADA: anti-drug antibody; ADC: antibody-drug conjugate; [redacted]: [redacted]; CTD: Common Technical Document; ECLIA: electrochemiluminescence immunoassay; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; IgG: immunoglobulin G; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; PK: pharmacokinetics; TAb: total antibody

1.2　非臨床薬物動態試験の概要

Test Articles: Tisotumab Vedotin, Tisotumab, MMAE, Brentuximab vedotin

Study Type/Title	Testing Facility	Study No.	Species	ROA	Test Article	Location in CTD
Absorption						
3-week single dose pharmacokinetic study of HuMax-TF and HuMax-TF-ADC in SCID mice	Genmab, NL	MR1015-143-33	Mouse	i.v.	Tisotumab, Tisotumab Vedotin	[4.2.2.2-1]
Tissue factor antibody drug conjugates (IgG1-1015-098-vcMMAE and IgG1-1015-011-vcMMAE): 10 week dose range finding study in cynomolgus monkeys with a 6-week recovery period	[redacted], UK	[redacted]521988	Monkey	i.v.	Tisotumab Vedotin	[4.2.3.2-3]
13 week repeat dose toxicity study in cynomolgus monkeys with a 6 week recovery period	[redacted], UK	[redacted]522531	Monkey	i.v.	Tisotumab Vedotin, Tisotumab	[4.2.3.2-4]
HuMab-TF (IgG1-1015-011): Pilot repeat dose toxicology study in cynomolgus monkeys	[redacted], UK	[redacted]514850	Monkey	i.v.	Tisotumab	[4.2.3.2-1]
A 4-week intravenous injection toxicity and toxicokinetic study of SGN-35, SGD-1010, and SGN-30 in rats with a 4-week recovery	[redacted]., USA	[redacted]7646-118	Rat	i.v.	MMAE	[4.2.3.2-6]
Intravenous injection study for effects on embryo-fetal developmental and toxicokinetics with SGN-35 and SGD-1010 in rats	[redacted]., USA	[redacted]8204397	Rat	i.v.	MMAE	[4.2.3.5.2-1]
An 11-week repeat-dose intravenous infusion toxicity study of SGN-35 and SGD-1010 in cynomolgus monkeys with a five-week recovery period	[redacted]., USA	[redacted].163.16	Monkey	i.v.	MMAE	[4.2.3.2-8]
Distribution						
Biodistribution in cynomolgus monkey	[redacted]., USA	[redacted]0001	Monkey	i.v.	^{89}Zr-tisotumab	[4.2.2.3-1]
Biodistribution of ^{89}Zr-Df-IAb37_FLA and ^{89}Zr-Df-IAb37_FL in a high TF-expressing pancreas cancer xenograft model	[redacted]., USA	[redacted]001	Mouse	i.v.	^{89}Zr-tisotumab vedotin and ^{89}Zr-tisotumab	[4.2.2.3-2]

Study Type/Title	Testing Facility	Study No.	Species	ROA	Test Article	Location in CTD
Tissue distribution via quantitative whole-body autoradiography in male long-evans rats following a single intravenous bolus administration of ^{3}H-MMAE	[redacted], USA	[redacted]-1201	Long-Evans rat	i.v.	^{3}H-MMAE	[4.2.2.3-3]
Plasma protein binding assay of MMAE by ultracentrifugation	[redacted], Japan	[redacted]-0025	Mouse, rat, cynomolgus monkey and human plasma	In vitro	^{3}H-MMAE	[4.2.2.3-4]
Evaluation of in vitro MMAE red blood cell partitioning potential in mouse, rat, cynomolgus monkey, and human	[redacted], USA	[redacted]-0271	Mouse, rat, cynomolgus monkey and human blood	In vitro	^{3}H-MMAE	[4.2.2.3-5]
Metabolism						
Reaction phenotyping: identification of human CYP enzymes involved in the in vitro metabolism of [^{3}H]-MMAE	[redacted], USA	[redacted]084006	Human microsomes and human recombinant enzymes	In vitro	^{3}H-MMAE	[4.2.2.4-1]
Metabolite characterization of [^{3}H]-MMAE in rat, monkey and human hepatocytes	[redacted], USA	[redacted]084007	Rat, monkey and human hepatocytes	In vitro	^{3}H-MMAE	[4.2.2.4-2]
Cross-species comparison of MMAE metabolism and excretion	[redacted], USA	[redacted]-[redacted]35-001	Human	i.v.	Brentuximab vedotin	[4.2.2.4-3]
Excretion						
Excretion, mass balance and pharmacokinetics of radioactivity in Sprague-Dawley rats following a single intravenous bolus dose of cAC10-vc-^{3}H-MMAE or ^{3}H-MMAE	[redacted], Canada	[redacted]420501	Rat	i.v.	^{3}H-MMAE	[4.2.2.5-1]
Pharmacokinetic Drug Interactions						
In vitro evaluation of MMAE as an inducer of cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes	[redacted], USA	[redacted]133043	Human hepatocytes	In vitro	MMAE	[4.2.2.6-1]
In vitro evaluation of MMAE as an inhibitor of human cytochrome P450 enzymes	[redacted], USA	[redacted]085021	Human liver microsomes	In vitro	MMAE	[4.2.2.6-2]

Study Type/Title	Testing Facility	Study No.	Species	ROA	Test Article	Location in CTD
In vitro interaction studies of MMAE with human MDR1 (ABCB1/P-gp) ABC (efflux) transporter	[redacted], USA	[redacted]108004	Caco-2 cell monolayer	In vitro	MMAE	[4.2.2.6-3]
Caco-2 permeability and efflux transporter interactions of MMAE	[redacted], USA	[redacted] 01709	Caco-2 cell monolayer	In vitro	MMAE	[4.2.2.6-4]
In vitro interaction studies of MMAE with human BCRP, BSEP and MRP2 efflux (ABC) transporters, and with human OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2 uptake transporters	[redacted], Hungary	[redacted]-3234	Membrane vesicles, CHO cells, HEK 293 cells, MDCKII cell monolayer	In vitro	MMAE	[4.2.2.6-5]
In vitro interaction of MMAE with human OATP1B1	[redacted], USA	[redacted]-0008	CHO cells	In vitro	^{3}H-MMAE	[4.2.2.6-6]
In vitro interaction of MMAE with human OATP1B3	[redacted] , USA	[redacted]-0009	CHO cells	In vitro	^{3}H-MMAE	[4.2.2.6-7]
In vitro interaction of MMAE with human OCT2	[redacted] , USA	[redacted]-0010	CHO cells	In vitro	^{3}H-MMAE	[4.2.2.6-8]
In vitro interaction of MMAE with human OAT1	[redacted] , USA	[redacted]-0011	CHO cells	In vitro	^{3}H-MMAE	[4.2.2.6-9]
In vitro interaction of MMAE with human OAT3	[redacted] , USA	[redacted]-0012	HEK cells	In vitro	^{3}H-MMAE	[4.2.2.6-10]
Other						
In vitro plasma stability of HuMax-TF-ADC	[redacted], UK	[redacted]1015-109-01	Human, monkey and mouse plasma	In vitro	Tisotumab vedotin	[4.2.2.7-1]

ABC: ATP binding cassette; ADC: antibody drug conjugate; BCRP: breast cancer resistance protein; BSEP: bile salt export pump; CHO: Chinese hamster ovary; CTD: Common Technical Document; CYP: cytochrome P450; ^{3}H-MMAE: tritium labeled monomethyl auristatin E; HEK: human embryonic kidney; IgG1: immunoglobulin G1; i.v.: intravenous; MDCKII: Madin Darby canine kidney II cell line; MDR: multiple drug resistance; MMAE: monomethyl auristatin E; MRP2: multidrug resistance associated protein 2; OAT: organic anion transporter; OATP: organic anion transporting polypeptide; OCT: organic cation transporter; P-gp: P-glycoprotein; ROA: route of administration; TF: tissue factor; vcMMAE: valine-citrulline monomethyl auristatin E; Zr: Zirconium

2.　分析方法及びバリデーション試験

2.1　抗体薬物複合体及び総抗体の分析法

Test Article: Tisotumab vedotin, Tisotumab

Study number	[redacted]315274	[redacted]315274	[redacted]316168
Location in CTD	[4.2.2.1-1]	[4.2.2.1-1]	[4.2.2.1-2]
Species	Cynomolgus Monkey	Cynomolgus Monkey	Cynomolgus Monkey
Sample (matrix)	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	ADC (Tisotumab vedotin)	TAb (Tisotumab vedotin plus Tisotumab)	TAb (Tisotumab)
Assay platform	ELISA	ELISA	ELISA
Format			
Capture	Recombinant human tissue factor	Recombinant human tissue factor	Recombinant human tissue factor
Detection	Mouse anti-MMAE mAb followed by a HRP-labeled anti-mouse IgG	HRP-labeled anti-human IgG1	HPR-labeled anti-human IgG1
Validation data			
Lower limit of quantitation (µg/mL)	0.4	0.5	0.2
Upper limit of quantitation (µg/mL)	4	6	3
Dilution integrity	218700-fold (including 100-fold MRD)	984150-fold (including 50-fold MRD)	328050-fold (including 50-fold MRD)
Plasma stability			
Ambient room temperature	4 hours	24 hours	4 hours
Refrigerator at 4°C	24 hours	24 hours	24 hours
Freezer at −80°C	8 weeks	14 weeks	14 weeks
Freeze/thaw stability	5 cycles in a freezer at −80°C	5 cycles in a freezer at −80°C	5 cycles in a freezer at −80°C

ADC: antibody-drug conjugate; CTD: Common Technical Document; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; HRP: horseradish peroxidase; IgG: immunoglobulin G; mAb: monoclonal antibody; MRD: minimum required dilution; TAb: total antibody

2.2　抗薬物抗体の分析法

Test Article: Tisotumab vedotin

Study number	[redacted]315253
Location in CTD	[4.2.2.1-7]
Species	Cynomolgus Monkey
Sample (matrix)	Serum
Control antibody	[redacted]
Assay platform	ECLIA
Validation data	
Sensitivity	3.55 ng/mL in whole serum
Sensitivity in presence of 500 ng/mL tisotumab vedotin	442 ng/mL in whole serum
Selectivity	No matrix interference detected
Drug tolerance limit (at 500 ng/mL ADA)	0.74 µg/mL
Serum stability	
Ambient room temperature	4 hours
Refrigerator at 4°C	1 week
Freezer at −80°C	29 weeks
Freeze/thaw stability	6 cycles in a freezer at −80°C

ADA: anti-drug antibody; CTD: Common Technical Document; ECLIA: electrochemiluminescence immunoassay; IgG: immunoglobulin G

2.3　MMAE の分析法

Test Article: MMAE

Study number	[redacted]7646-119	[redacted]8212326	[redacted]8263943	[redacted]7646-115
Location in CTD	[4.2.2.1-5]	[4.2.2.1-6]	[4.2.2.1-3]	[4.2.2.1-4]
Species	Rat	Rat	Cynomolgus Monkey	Cynomolgus Monkey
Sample (matrix)	Serum	Amniotic fluid	K_2EDTA plasma	Serum
Analyte	MMAE	MMAE	MMAE	MMAE
Assay platform	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Validation data				
Lower limit of quantitation (pg/mL)	10	10	10	10
Upper limit of quantitation (pg/mL)	10000	10000	10000	10000
Matrix stability				
Room temperature	24 hours	42 hours	25 hours	24 hours
Freezer at −60 to −80°C	324 days	202 days	96 days	341 days
Freeze/thaw stability	4 cycles	5 cycles	4 cycles	3 cycles

CTD: Common Technical Document; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; K_2EDTA: dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid

3.　薬物動態試験：吸収：単回投与

3.1　マウスにチソツマブ　ベドチン又はチソツマブを単回投与したときの薬物動態

Test Article: Tisotumab vedotin, Tisotumab

Study Number	MR1015-143-33		Location in CTD		[4.2.2.2-1]	
Species	Mouse (SCID)					
Gender (M/F)/Number of animals	F/12					
Vehicle/Formulation	PBS					
Method of Administration	i.v. (bolus)					
Sample	Plasma					
Test Article	Tisotumab vedotin		Tisotumab vedotin		Tisotumab	
Dose level (mg/kg)	1		5		1	5
Analyte	ADC	TAb	ADC	TAb	TAb	TAb
Assay	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
PK parameters						
C_{max} (µg/mL)	23, 27	21, 30	149, 170	193, 152	33 (4)	137 (18)
V_{cen} (mL/kg)	45, 43	49, 38	41, 31	31, 35	33 (4)	38 (7)
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	1450, 1598	3086, 2876	8910 (1057)	21414 (931)	7893 (602)	36823 (551)
$t_{1/2}$ (h)	97, 91	234, 175	95 (12)	244 (36)	465 (57)	454 (40)
CL (mL/h/kg)	0.718, 0.727	0.338, 0.404	0.628 (0.086)	0.259 (0.010)	0.137 (0.012)	0.141 (0.008)
Additional information: Data are means (SD) for n = 3. Individual values are represented for n = 2.						

ADC: antibody-drug conjugate; $AUC_{0\text{-}inf}$: area under the concentration-time curve from time zero to time to infinity; CTD: Common Technical Document; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; CL: clearance; C_{max}: maximum drug concentration; F: female; i.v.: intravenous; PBS: phosphate-buffered saline; PK: pharmacokinetics; SCID: severe combined immunodeficiency; SD: standard deviation; $t_{1/2}$: elimination half-life; TAb: total antibody; V_{cen}: central volume of distribution, [calculated as V_{cen} = Dose/C_{max} (mL/kg)]

3.2　カニクイザルにチソツマブを単回投与したときのトキシコキネティクス

Test Article: Tisotumab

Study Number	[redacted]514850		Location in CTD		[4.2.3.2-1]	
Species	Cynomolgus Monkey					
Vehicle/Formulation	Phosphate buffered saline (PBS)					
Method of Administration	i.v. infusion over 30 min					
Sample	Serum					
Gender	Male			Female		
Dose Level (mg/kg)	1	10	100	1	10	100
C_{max} (µg/mL)	24	229	2270	23	198	2250
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	1106	14900	146700	906	12110	129500
$t_{1/2}$ (h)	34.4	167	111	28.9	104	106
CL (mL/h/kg)	0.832	0.537	0.601	1.053	0.682	0.646
Vd (mL/kg)	41.2	131	84.7	43.8	102	93.7
Additional Information: Data are mean (n = 2).						

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration; CL: clearance; C_{max}: maximum drug concentration; CTD: Common Technical Document; i.v.: intravenous; $t_{1/2}$: elimination half-life; Vd: volume of distribution

4.　薬物動態試験：吸収：反復投与

4.1　カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを 3 週間に 1 回、4 回反復投与したときのトキシコキネティクス

Test Article: Tisotumab vedotin

Study Number		[redacted]521988		Location in CTD		[4.2.3.2-3]				
Species		Cynomolgus Monkey								
Gender (M/F)/Number of animals		F/10								
Vehicle/Formulation		PBS								
Method of Administration		i.v. infusion over 30 min								
Dose (mg/kg)		3 dose groups: 1, 3 or 6/5 mg/kg, 4 dose administrations at 3-week intervals on Days 1, 22, 43 and 64 (1 and 3 mg/kg), on Days 1, 43, 64 and 85 (6/5 mg/kg)								
Sample		Plasma (K_2EDTA)								
Dose Level (mg/kg)		1		3				6/5		
Animal Number		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Analyte (Assay)		ADC (ELISA)								
C_{max} (µg/mL)	1st dose	25.1	19.4	75.6	80.1	81.5	69.8	0.0	161.2	214.8	141.6
	4th dose	0.0	23.5	0.0	80.7	0.0	43.7	15.5	0.0	0.0	99.1
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	1st dose	578	436	2615	2448	2599	2167	0	6864	7358	5497
	4th dose	0	559	0	1952	0	657	275	0	0	3636
V_{cen} (mL/kg)	1st dose	40	52	40	37	37	43	ND	37	28	42
	4th dose	ND	43	ND	37	ND	69	387	ND	ND	61
CL (mL/h/kg)	1st dose	1.7	2.3	1.1	1.2	1.2	1.4	ND	0.9	0.8	1.1
	4th dose	ND	1.8	ND	1.5	ND	4.6	21.8	ND	ND	1.7

Study [redacted]521988, *continued*											
Dose Level (mg/kg)		1		3				6/5			
Animal Number		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Analyte (Assay)		TAb (ELISA)									
C_{max} (µg/mL)	1st dose	23.8	20.8	67.4	67.8	63.7	58.5	0.0	137.0	111.5	137.0
	4th dose	0.0	22.9	0.0	60.7	0.0	48.3	78.0	0.0	0.0	100.6
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	1st dose	649	408	3286	3379	2904	2770	0	9715	6760	7149
	4th dose	0	692	0	1980	0	819	1642	0	0	4852
V_{cen} (mL/kg)	1st dose	42	48	45	44	47	51	ND	44	54	44
	4th dose	ND	44	ND	49	ND	62	77	ND	ND	60
CL (mL/h/kg)	1st dose	1.5	2.5	0.9	0.9	1.0	1.1	ND	0.6	0.9	0.8
	4th dose	ND	1.4	ND	1.5	ND	3.7	3.7	ND	ND	1.2
Analyte (Assay)		MMAE (LC-MS/MS)									
C_{max} (pg/mL)	1st dose	27.2	57.0	93.9	155	95.4	128	<BLQ	172	182	200
	4th dose	53.7	44.6	1290	116	865	185	316	3520	ND	219
Additional Information: Data are individual values.											

ADC: antibody-drug conjugate; AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration; BLQ: below the lower limit of quantitation; CL: clearance; C_{max}: maximum drug concentration; CTD: Common Technical Document; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; i.v.: intravenous; K_2EDTA: dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; ND: not determined; PBS: phosphate-buffered saline; TAb: total antibody; V_{cen}: central volume of distribution, [calculated as V_{cen} = Dose/C_{max} (mL/kg)]

4.2　カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを 3 週間に 1 回、5 回反復投与したときのトキシコキネティクス

Test Article: Tisotumab vedotin

Study Number		[redacted]522531		Location in CTD		[4.2.3.2-4]	
Species		Cynomolgus Monkey					
Vehicle/Formulation		Sodium chloride 0.9% w/w intravenous infusion BP					
Method of Administration		i.v. infusion over 30 min					
Sample		Plasma					
Dose (mg/kg)		1		3		5	
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F
Analyte (Assay)		ADC (ELISA)					
C_{max} (µg/mL)	Day 1	32.7 (2.54; 5)	28.5 (4.36; 5)	93.2 (3.71; 5)	93.8 (15.5; 5)	150 (13.6; 5)	174 (31.9; 5)
	Day 85[a]	14.3 (13.5; 4)	9.09 (12.4; 4)	55.3 (42.3; 5)	70.0 (47.3; 4)	144 (22.8; 4)	161 (-; 2)
	Day 85[b]	14.3 (13.5; 4)	9.09 (12.4; 4)	55.3 (42.3; 5)	70.0 (47.3; 4)	146 (27.6; 3)	161 (-; 2)
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	139 (-; 1)	NA
t_{max} (h)	Day 1	0.500	0.667	0.500	0.500	0.667	0.667
	Day 85[a]	0.500	0.500	0.500	0.583	0.583	0.625
	Day 85[b]	0.500	0.500	0.500	0.583	0.500	0.625
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	0.667	NA
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	Day 1	813 (61.8; 5)	781 (167; 5)	3230 (300; 5)	3190 (598; 5)	5030 (696; 5)	6970 (1160; 5)
	Day 85[a]	662 (-; 2)	659 (-; 1)	2200 (947; 3)	3150 (138; 3)	4730 (906; 4)	5450 (-; 2)
	Day 85[b]	662 (-; 2)	659 (-; 1)	2200 (947; 3)	3150 (138; 3)	4470 (910; 3)	5450 (-; 2)
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	5510 (-; 1)	NA
$t_{1/2}$ (h)	Day 1	25.0 (2.54; 5)	23.9 (2.67; 5)	31.4 (2.29; 5)	33.9 (4.82; 5)	33.0 (2.11; 4)	39.4 (3.42; 5)
	Day 85[a]	21.6 (-; 2)	19.3 (-; 1)	20.3 (9.09; 3)	30.7 (3.16; 3)	40.6 (8.35; 4)	40.0 (-; 2)
	Day 85[b]	21.6 (-; 2)	19.3 (-; 1)	20.3 (9.09; 3)	30.7 (3.16; 3)	36.7 (3.72; 3)	40.0 (-; 2)
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	52.3 (-; 1)	NA
CL (mL/h/kg)	Day 1	1.20 (0.103; 5)	1.27 (0.249; 5)	0.879 (0.0855; 5)	0.894 (0.166; 5)	0.882 (0.0685; 4)	0.658 (0.142; 5)
	Day 85[a]	1.44 (-; 2)	1.41 (-; 1)	1.46 (0.522; 3)	0.912 (0.0638; 3)	1.02 (0.190; 4)	0.880 (-; 2)
	Day 85[b]	1.44 (-; 2)	1.41 (-; 1)	1.46 (0.522; 3)	0.912 (0.0638; 3)	1.07 (0.202; 3)	0.880 (-; 2)
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	0.883 (-; 1)	NA
Vd (mL/kg)	Day 1	43.1 (3.60; 5)	43.5 (6.87; 5)	39.7 (3.98; 5)	43.0 (6.14; 5)	41.9 (1.99; 4)	37.0 (5.70; 5)
	Day 85[a]	44.8 (-; 2)	39.1 (-; 1)	38.2 (1.54; 3)	40.3 (3.28; 3)	59.5 (13.1; 4)	50.9 (-; 2)
	Day 85[b]	44.8 (-; 2)	39.1 (-; 1)	38.2 (1.54; 3)	40.3 (3.28; 3)	57.2 (15.0; 3)	50.9 (-; 2)
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	66.5 (-; 1)	NA

Study [redacted]522531, *continued*							
Analyte (Assay)		TAb (ELISA)					
C_{max} (µg/mL)	Day 1	28.4 (1.44; 5)	30.9 (3.42; 5)	82.9 (6.32; 5)	79.3 (17.2; 5)	114 (7.95; 5)	152 (17.0; 5)
	Day 85[a]	14.5 (13.7; 4)	10.8 (15.1; 4)	55.2 (45.0; 5)	62.0 (41.7; 4)	124 (17.0; 4)	149 (-; 2)
	Day 85[b]	14.5 (13.7; 4)	10.8 (15.1; 4)	55.2 (45.0; 5)	62.0 (41.7; 4)	122 (20.0; 3)	149 (-; 2)
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	131 (-; 1)	NA
t_{max} (h)	Day 1	0.500	0.500	0.500	0.500	0.667	0.667
	Day 85[a]	0.500	0.500	0.667	0.583	0.583	0.625
	Day 85[b]	0.500	0.500	0.667	0.583	0.500	0.625
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	0.667	NA
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	Day 1	895 (63.0; 5)	1010 (182; 5)	3540 (306; 5)	3340 (707; 5)	4670 (696; 5)	7400 (592; 5)
	Day 85[a]	822 (-; 2)	835 (-; 1)	2470 (1220; 3)	3540 (126; 3)	5130 (660; 4)	6580 (-; 2)
	Day 85[b]	822 (-; 2)	835 (-; 1)	2470 (1220; 3)	3540 (126; 3)	5060 (792; 3)	6580 (-; 2)
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	5330 (-; 1)	NA
$t_{1/2}$ (h)	Day 1	29.7 (1.33; 5)	29.5 (3.99; 5)	44.8 (1.54; 5)	45.6 (6.13; 5)	46.6 (2.98; 3)	49.7 (-; 2)
	Day 85[a]	28.5 (-; 2)	22.1 (-; 1)	23.7 (13.2; 3)	40.5 (6.14; 3)	49.5 (3.33; 4)	53.1 (-; 1)
	Day 85[b]	28.5 (-; 2)	22.1 (-; 1)	23.7 (13.2; 3)	40.5 (6.14; 3)	48.2 (2.57; 3)	53.1 (-; 1)
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	53.4 (-; 1)	NA
CL (mL/h/kg)	Day 1	1.04 (0.108; 5)	0.971 (0.188; 5)	0.733 (0.0703; 5)	0.791 (0.150; 5)	0.866 (0.142; 3)	0.589 (-; 2)
	Day 85[a]	1.16 (-; 2)	1.07 (-; 1)	1.32 (0.540; 3)	0.752 (0.0287; 3)	0.824 (0.128; 4)	0.659 (-; 1)
	Day 85[b]	1.16 (-; 2)	1.07 (-; 1)	1.32 (0.540; 3)	0.752 (0.0287; 3)	0.842 (0.150; 3)	0.659 (-; 1)
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	0.767 (-; 1)	NA
Vd (mL/kg)	Day 1	44.5 (5.10; 5)	40.7 (5.57; 5)	47.3 (3.48; 5)	51.4 (9.05; 5)	57.9 (5.98; 3)	41.6 (-; 2)
	Day 85[a]	47.9 (-; 2)	34.1 (-; 1)	38.3 (2.29; 3)	43.8 (5.99; 3)	58.4 (6.32; 4)	50.5 (-; 1)
	Day 85[b]	47.9 (-; 2)	34.1 (-; 1)	38.3 (2.29; 3)	43.8 (5.99; 3)	58.2 (7.73; 3)	50.5 (-; 1)
	Day 85[c]	NA	NA	NA	NA	59.0 (-; 1)	NA

Study [redacted]522531, *continued*							
Analyte (Assay)		MMAE (LC-MS/MS)					
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0.0537 (0.00531;5)	0.0432 (0.0149; 5)	0.123 (0.0220; 5)	0.131 (0.0291; 5)	0.241 (0.0136; 4)	0.208 (0.0437; 5)
	Day 85	0.0969 (0.0649; 5)	0.144 (0.0800; 5)	0.217 (0.0883; 5)	1.37 (2.36; 5)	0.248 (0.0326; 4)	31.0 (53.3; 3)
t_{max} (h)	Day 1	24.5	24.5	72.5	72.5	72.5	72.5
	Day 85	0.667	0.667	24.5	24.5	48.5	24.5
AUC_{0-t} (μg·h/mL)	Day 1	5.10 (0.584; 5)	3.76 (1.14; 5)	12.3 (1.83; 5)	12.8 (2.40; 5)	23.0 (1.33; 4)	20.8 (4.75; 5)
	Day 85	4.38 (1.99; 5)	4.51 (3.69; 5)	20.1 (9.01; 5)	71.6 (116; 5)	34.6 (11.7; 4)	1590 (2690; 3)
Additional information: Toxicokinetic parameters are mean (standard deviation; number of animals used in calculation), except for t_{max} (median). Standard deviation was not calculated if data from two or less animals were used. For ADC and TAb, Day 85[a] is calculated from all animals, Day 85[b] is from ADA positive animals, and Day 85[c] is from ADA negative animals.							

ADC: antibody-drug conjugate; AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration; CL: clearance; C_{max}: maximum drug concentration; CTD: Common Technical Document; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; i.v.: intravenous; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; M: male; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; $t_{1/2}$: elimination half-life; TAb: total antibody; t_{max}: time to reach maximum concentration; Vd: volume of distribution

4.3　カニクイザルにチソツマブを 3 週間に 1 回、5 回反復投与したときのトキシコキネティクス

Test Article: Tisotumab

Study Number	[redacted]522531		Location in CTD	[4.2.3.2-4]
Species	Cynomolgus Monkey			
Vehicle/Formulation	Sodium chloride 0.9% w/w intravenous infusion BP			
Method of Administration	i.v. infusion over 30 min			
Sample	Plasma			
Dose (mg/kg)	25			
Analyte (Assay)	TAb (ELISA)			
Gender (M/F)	M		F	
Study Day	1	85	1	85
C_{max} (µg/mL)	729 (88.6; 5)	829 (83.6; 5)	721 (68.2; 5)	826 (97.2; 5)
t_{max} (h)*	0.667	0.667	0.667	0.667
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	50700 (4790; 5)	68500 (5420; 5)	50100 (4260; 5)	63200 (7040; 5)
Additional information: Toxicokinetic parameters are mean (standard deviation; number of animals used in calculation), except for t_{max} (median).				

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration; C_{max}: maximum drug concentration; CTD: Common Technical Document; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; TAb: total antibody; t_{max}: time to reach maximum concentration

4.4　ラットに MMAE を週 1 回 4 週間反復投与したときのトキシコキネティクス

Test Article: MMAE

Study Number		[redacted]7646-118		Location in CTD		[4.2.3.2-6]
Species/Strain		Rat/Sprague Dawley				
Vehicle/Formulation		Formulation Buffer				
Method of Administration		i.v. injection				
Sample		Serum				
Analyte (Assay)		MMAE (LC-MS/MS)				
Dose Level (mg/kg)	Sex	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	Vd (mL/kg)	CL (mL/h/kg)
Day 1						
0.0097	M	0.59	2.61	5.76	29327	3531
	F	0.50	2.57	5.65	29425	3612
0.097[a]	M	3.53	25.70	10.9	47223	3004
	F	3.75	28.59	NC	NC	NC
0.194[a]	M	5.80	49.41	NC	NC	NC
	F	12.55	91.01	NC	NC	NC
Day 22						
0.0097	M	0.70	3.98	5.17	17559	2353
	F	0.84	3.07	4.68	20848	3089
0.097[a]	M	5.49	52.45	NC	NC	NC
	F	4.84	28.60	NC	NC	NC
0.194[a]	M	11.05	70.99	NC	NC	NC
	F	7.01	49.18	NC	NC	NC

AUC_{0-24}: area under the concentration versus time curve from time zero to 24 hours; CL: clearance; C_{max}: maximum drug concentration; CTD: Common Technical Document; F: female; i.v.: intravenous; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; M: male; MMAE: monomethyl auristatin E; NC: not calculated; $t_{1/2}$: elimination half-life; Vd: volume of distribution

a　Due to the absence of district elimination phase in the mid/high dose groups, estimation of $t_{1/2}$ (and consequently AUC_{inf}, Vd and CL) was not attempted with the exception of the male animals that received 0.097 mg/kg MMAE.

4.5　ラットに MMAE を週 1 回 2 週間投与したときのトキシコキネティクス

Test Article: MMAE

Study Number	[redacted]8204397	Location in CTD	[4.2.3.5.2-1]		
Species/Strain	Rat/Sprague Dawley				
Vehicle/Formulation	3.9% 0.01N hydrochloric acid/96.1% 0.9% sodium chloride for injection				
Method of Administration	i.v. injection				
Sample	Serum				
Analyte (Assay)	MMAE (LC-MS/MS)				
Mean Toxicokinetic Parameters for MMAE in Maternal Rat Serum Following Two Weekly Doses of MMAE					
Dose (mg/kg/dose)	Number of Animals	Gestational Day	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (Day)	$AUC_{0\text{-}last}$ (ng·day/mL)
0.2	9	6	29.7	0.00347	16.2
		13	50.2	0.00347	25.6
Ratio of MMAE Concentration in Amniotic Fluid and Fetal Serum to Maternal Serum on GD 18					
Dose (mg/kg/dose)	Animal Number	Ratio Amniotic Fluid : Maternal Serum		Ratio Fetal Serum : Maternal Serum	
0.2	B57515	NA		NA	
	B57516	NA		0.0137 : BLQ	
	B57517	NA		0.0180 : BLQ	
	B57518	0.0151 : BLQ		0.0141 : BLQ	
	B57519	0.0205 : BLQ		NA	
	B57520	NA		NA	
	B57521	0.0192 : BLQ		0.0132 : BLQ	
	B57522	NA		NA	
	B57523	NA		NA	
Additional Information: NA: Not applicable, it was not possible to calculate ratios when the observed concentrations were below the lower limit of quantitation (BLQ).					

$AUC_{0\text{-}last}$: area under the concentration-time curve from zero to the last measurable concentration; BLQ: below lower limit of quantitation; C_{max}: maximum drug concentration; CTD: Common Technical Document; GD: gestational day; i.v.: intravenous; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; t_{max}: time to reach maximum concentration

5.　薬物動態試験：分布

5.1　組織内分布

Test Article: ^{3}H-MMAE

Study number	[redacted]-1201			Location in CTD	[4.2.2.3-3]		
Species	Long-Evans rat						
Sex (M/F)/Number of animals	M/8						
Feeding condition	Nonfasted						
Vehicle/Formulation	6% ethyl alcohol in 0.9% (w/v) sodium chloride for injection						
Method of administration	i.v.						
Dose (mg/kg)	0.056						
Radionuclide	^{3}H						
Specific Activity	28369.920 µCi/mg MMAE						
Analyte/Assay	^{3}H/Quantitative Whole-Body Autoradiography						
Sampling time (h)	0.17, 4, 12, 24, 96, 336, and 672						
	Concentration (µg eq./mL or µg eq./g)						
Tissue/organs	0.17 h	4 h	12 h	24 h	96 h	336 h	672 h
Plasma (wet plasma by LSC)	0.004	0.001	0.001	0.001	BLQ	BLQ	BLQ
Blood (cardiac)	0.008	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Bone marrow	0.074	0.042	0.069	0.032	BLQ	BLQ	BLQ
Lymph node	0.032	0.049	0.036	0.025	BLQ	BLQ	BLQ
Spleen	0.101	0.096	0.065	0.023	BLQ	BLQ	BLQ
Thymus	0.027	0.021	0.033	0.024	0.013	BLQ	BLQ
Bile (in duct)	1.476†	0.279	0.085	0.052	BLQ	BLQ	BLQ
Kidney cortex	0.232	0.049	0.022	0.008	BLQ	BLQ	BLQ
Kidney medulla	0.217	0.044	0.024	0.007	BLQ	BLQ	BLQ
Liver	0.158	0.018	0.015	0.006	BLQ	BLQ	BLQ
Urinary bladder	0.018	0.036	0.015	0.011	BLQ	BLQ	BLQ
Urinary bladder (contents)	0.325	0.369	0.039	0.017	BLQ	BLQ	BLQ
Brain (cerebellum)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Brain (cerebrum)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Brain (medulla)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Choroid plexus	0.134	0.041	0.038	0.010	BLQ	BLQ	BLQ
Table continued on next page							

Tissue/organs	0.17 h	4 h	12 h	24 h	96 h	336 h	672 h
Spinal cord	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Adrenal gland	0.165	0.051	0.024	0.007	BLQ	BLQ	BLQ
Anterior pituitary gland	0.520	0.316	0.167	0.032	0.006	BLQ	BLQ
Posterior pituitary gland	0.055	0.073	0.064	0.033	0.005	BLQ	BLQ
Thyroid	0.172	0.128	0.078	0.018	BLQ	BLQ	BLQ
Harderian gland	0.031	0.021	0.020	0.010	BLQ	BLQ	BLQ
Mammary gland region	0.005	0.003	0.006	0.005	BLQ	BLQ	BLQ
Pancreas	0.083	0.043	0.017	0.003	BLQ	BLQ	BLQ
Salivary gland	0.115	0.053	0.038	0.010	BLQ	BLQ	BLQ
Adipose (brown)	0.053	0.045	0.032	0.004	BLQ	BLQ	BLQ
Adipose (white)	0.004	0.004	0.005	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Skin (nonpigmented)	0.016	0.010	0.012	0.006	BLQ	BLQ	BLQ
Skin (pigmented)	0.016	0.014	0.013	0.006	BLQ	BLQ	BLQ
Epididymis	0.007	0.007	0.011	0.006	BLQ	BLQ	BLQ
Prostate gland	0.015	0.018	0.011	0.006	BLQ	BLQ	BLQ
Seminal vesicles	0.007	0.005	0.005	0.003	BLQ	BLQ	BLQ
Testis	0.003	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Bone	0.003	0.003	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Heart (myocardium)	0.131	0.065	0.022	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Skeletal muscle	0.034	0.016	0.032	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Lung	0.242	0.095	0.062	0.009	BLQ	BLQ	BLQ
Cecum	0.103	0.062	0.044	0.018	BLQ	BLQ	BLQ
Cecum (contents)	0.009	0.708	0.761	0.127	BLQ	BLQ	BLQ
Esophagus	0.027	0.019	0.017	0.005	BLQ	BLQ	BLQ
Large intestine	0.097	0.030	0.030	0.014	BLQ	BLQ	BLQ
Large intestine (contents)	0.008	0.035	0.975	0.138	BLQ	BLQ	BLQ
Oral mucosa	0.028	0.020	0.013	0.006	BLQ	BLQ	BLQ
Small intestine	0.071	0.025	0.045	0.022	BLQ	BLQ	BLQ
Small intestine (contents)	0.603	0.224	0.264	0.150	BLQ	BLQ	BLQ
Stomach (gastric mucosa)	0.080	0.036	0.021	0.005	BLQ	BLQ	BLQ
Stomach (contents)	BLQ	0.003	0.011	0.019	BLQ	BLQ	BLQ
Eye (uveal tract)	0.044	0.021	0.025	0.012	0.009	0.009	0.005
Eye (lens)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

Table continued on next page

Additional information: There was approximately 10% in vivo ^{3}H-exchange in plasma observed at 0.17 hours, and the extent of ^{3}H-exchange increased to approximately 36% at 4 hours, 49% at 12 hours, 73% at 24 hours, and 96% at 96 hours. The observed ^{3}H-exchange in the plasma may have an effect on the interpretation of the tissue distribution data, especially after 4 hours postdose.

BLQ: below the lower limit of quantitation; CTD: Common Technical Document; F: female; h: hour; i.v.: intravenous; LLOQ: lower limit of quantification; LSC: liquid scintillation counting; ^{3}H-MMAE: tritium labeled MMAE; M: male; MMAE: monomethyl auristatin E; ULOQ: upper limit of quantification

†: Value is above the ULOQ; LLOQ for plasma assayed by LSC was 2 × background dpm (lower limit of quantitation = 0.003 µg equivalent/g tissue; upper limit of quantitation = 1.210 µg equivalent/g tissue)

5.2　異種移植マウスにおける ^{89}Zr-チソツマブ　ベドチン及び ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布

Test Articles: ^{89}Zr-Tisotumab vedotin, ^{89}Zr-Tisotumab

Study Number	[redacted]001		Location in CTD	[4.2.2.3-2]
Animals	Female severe combined immunodeficiency (SCID) mice (N=18)			
Vehicle/Formulation	Normal saline containing 1% human serum albumin			
Method of Administration	i.v.			
Dose (mg/kg)	1			
Specific Activity	6.03 µCi/µg (^{89}Zr-Tisotumab vedotin), 6.19 µCi/µg (^{89}Zr-Tisotumab)			
% Injected Dose / gram (SD) at 144 hours				
	^{89}Zr-Tisotumab vedotin		^{89}Zr-Tisotumab	
	HPAF-II (n = 6)	PANC-I (n = 3)	HPAF-II (n = 6)	PANC-I (n = 3)
Blood	8.4 (3.4)	14.3 (1.1)	11.4 (1.4)	15.7 (0.8)
Liver	15.6 (2.2)	16.0 (2.0)	4.2 (0.8)	4.8 (0.1)
Right Kidney	10.0 (1.9)	10.6 (1.0)	4.4 (0.6)	5.5 (0.4)
Left Kidney	9.8 (1.8)	10.3 (1.4)	4.4 (0.7)	5.5 (0.3)
Spleen	18.9 (3.1)	25.7 (3.4)	18.2 (4.1)	20.1 (1.7)
Heart	4.2 (1.4)	5.6 (2.0)	4.2 (1.1)	4.8 (0.3)
Lungs	4.9 (1.8)	7.2 (1.7)	6.5 (1.4)	8.2 (0.6)
Stomach	1.9 (0.5)	2.0 (0.6)	1.6 (0.3)	1.8 (0.4)
Muscle	0.7 (0.2)	1.1 (0.1)	0.9 (0.1)	1.0 (0.2)
Bone	6.9 (3.1)	8.0 (1.9)	6.3 (1.3)	7.6 (0.6)
Tumor	216.7 (37.7)	9.2 (0.7)	124.7 (31.8)	24.5 (2.6)
Carcass	2.3 (0.4)	2.9 (0.2)	2.6 (0.3)	2.9 (0.1)
Additional Information: HPAF-II is a pancreatic cell line with high tissue factor expression (>3.5^5 copies/cell), and PANC-I is a pancreatic cell line with no/low tissue factor expression.				

Mean values are given with their respective SD in parentheses.

CTD: Common Technical Document; i.v.: intravenous; SCID: severe combined immunodeficiency; SD: standard deviation; Zr: Zirconium

5.3　カニクイザルにおける ^{89}Zr-チソツマブの生体内分布

Test Article: ^{89}Zr-Tisotumab

Study Number			[redacted]0001		Location in CTD		[4.2.2.3-1]	
Animals			Cynomolgus monkeys, three male and three female					
Vehicle/Formulation			0.9% sterile saline					
Method of Administration			Slow i.v. bolus					
Dose (mg/kg)			0.4, 1.0 and 3.0					
Specific Activity			1 mCi/mg of ^{89}Zr-tisotumab					
Mean % Administered Dose								
Nominal Time (hour)	0	1	2	3	4	5	72	168
Whole Body	100%	98%	97%	97%	96%	96%	71%	60%
GB Content	1.7%	4.7%	5.6%	2.4%	2.8%	3.1%	n/v	n/v
GI SI Content	5.9%	5.2%	6.1%	15%	14%	15%	15%	14%
Heart Content	11%	11%	10%	7.9%	7.8%	7.6%	2.8%	1.5%
Kidneys	4.2%	4.2%	4.7%	3.8%	3.9%	4.1%	4.7%	5.0%
Liver	20%	20%	21%	18%	17%	19%	13%	12%
Lungs	9.5%	8.9%	8.4%	7.3%	7.5%	7.8%	4.1%	2.8%
Red Marrow	19%	18%	18%	13%	14%	14%	6.0%	4.9%
Salivary	0.68%	0.65%	0.64%	0.62%	0.59%	0.50%	0.27%	0.23%
Spleen	1.2%	1.2%	1.2%	1.1%	1.1%	1.1%	0.78%	0.74%
Testes	0.23%	0.23%	0.26%	n/a	n/a	n/a	0.48%	0.57%
Total Urine	0.18%	0.34%	0.53%	0.77%	0.77%	0.76%	n/m	5.0%†
Table continued on next page								

Dose Equivalent Estimates Summary Statistics (rem/mCi)				
	Mean	SD	Min	Max
Adrenals	2.0	0.13	1.8	2.2
Brain	0.42	0.08	0.33	0.52
Breasts	0.72	0.09	0.57	0.80
Gallbladder Wall	5.3	1.1	4.2	7.0
LLI Wall	7.7	1.0	6.2	9.2
Small Intestine	2.4	0.16	2.1	2.6
Stomach Wall	1.3	0.06	1.2	1.4
ULI Wall	4.6	0.49	3.8	5.3
Heart Wall	2.9	0.57	2.2	3.5
Kidneys	7.8	1.63	5.4	9.9
Liver	5.6	0.60	5.1	6.6
Lungs	2.4	0.48	1.7	3.2
Muscle	0.87	0.07	0.77	1.0
Ovaries	2.0	0.19	1.8	2.2
Pancreas	1.8	0.10	1.7	1.9
Red Marrow	2.1	0.14	1.9	2.3
Osteogenic Cells	1.5	0.14	1.4	1.7
Salivary	2.6	0.60	1.8	3.3
Skin	0.52	0.055	0.44	0.59
Spleen	3.0	0.78	2.1	4.1
Testes	4.9	1.4	3.7	6.4
Thymus	1.0	0.16	0.79	1.2
Thyroid	0.55	0.10	0.43	0.67
Urinary Bladder Wall	1.0	0.08	0.87	1.1
Uterus	1.3	0.05	1.2	1.3
Total Body	1.1	0.06	1.0	1.2
EDE (ICRP 26)	3.4	0.57	2.8	4.3
ED (ICRP 60)	2.9	0.45	2.5	3.6
ED (ICRP 103)	2.6	0.21	2.3	2.9
Additional Information: 0.5 mg of ^{89}Zr-tisotumab at 1 mCi/mg was mixed with 0.4 mg at 0.2 mg/mL, 2.5 mg at 1 mg/mL, or 8.5 mg at 5 mg/mL for a 3 kg animal to dose same amount of radioactivity to all animals.				

CTD: Common Technical Document; ED: effective dose; EDE: effective dose equivalent; GB: gallbladder; GI: gastrointestinal; ICRP: international commission on radiation protection; i.v.: intravenous; LLI: lower large intestine; Max: maximum; Min: minimum; SD: standard deviation; SI: small intestine; ULI: upper large intestine; Zr: Zirconium

n/a: not available; n/v: not visualized; †: modeled; n/m: not modeled

6.　薬物動態試験：タンパク結合

Test Article: ^{3}H-MMAE

Study Number	[redacted]-0025	Location in CTD	[4.2.2.3-4]
Study System:	In vitro plasma		
Target entity, test system and method:	Ultracentrifugation of plasma containing ^{3}H-MMAE at three concentrations (n=3)		
Species	Conc. Tested (nmol/L)	% Bound (SD)	
Mouse	1 10 100	18.8 (1.4) 19.6 (1.2) 28.5 (0.9)	
Rat	1 10 100	72.9 (0.6) 73.5 (0.4) 72.0 (0.4)	
Cynomolgus monkey	1 10 100	17.1 (4.8) 17.8 (4.3) 18.9 (4.2)	
Human	1 10 100	67.9 (5.7) 77.5 (3.1) 82.2 (1.5)	
Additional information: Plasma was collected from male animals/volunteers.　All plasma samples of the same species were combined.　Plasma was stored on an ice bath prior to use and was used within 9 hours on the same day as collection.			

^{3}H-MMAE: tritium labeled monomethyl auristatin E; Conc.: concentration; CTD: Common Technical Document; SD: standard deviation

7. 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

妊娠又は授乳動物における試験は実施していない。

8.　薬物動態試験：その他の分布試験

8.1　血液／血漿中濃度比

Test Article: ^{3}H-MMAE

Study number	■-0271	Location in CTD	[4.2.2.3-5]

Study system: In vitro blood

Study design: ^{3}H-MMAE was spiked into the appropriate matrix along with unlabeled MMAE at final concentrations of 2, 20, 200, 1000, and 5000 nmol/L. After incubation at 37°C with gentle rotation for 1 h, each sample was split into two equal aliquots, with one processed for plasma by centrifugation at 11,000 × *g* for 5 min at 4°C and the other aliquot taken as whole blood. Plasma samples were analyzed by a liquid scintillation counter for radioactivity. Blood samples were decolorized by treating with H_2O_2 before being analyzed by a liquid scintillation counter for radioactivity. The blood to plasma radioactivity ratio was calculated by comparing the radioactivity of blood to plasma. In addition, the radioactivity was converted into concentration based on specific activity with adjustment based on the blood hematocrit percentage. Then the blood to plasma concentration ratio was calculated. Incubation was conducted in triplicate for each concentration.

Test compound	Nominal concentration (nmol/L)	Mean (SD) Blood to plasma ratio			
		Mouse	Rat	Monkey	Human
H^{3}-MMAE	2	11.8 (0.291)	2.36 (0.0825)	1.57 (0.0250)	0.976 (0.0620)
	20	9.47 (0.156)	1.86 (0.00808)	1.40 (0.0359)	0.926 (0.0102)
	200	2.28 (0.0991)	1.33 (0.0555)	1.14 (0.00169)	0.794 (0.0366)
	1000	1.18 (0.0249)	1.02 (0.0540)	1.10 (0.00537)	0.792 (0.0207)
	5000	1.07 (0.0341)	0.954 (0.0194)	1.22 (0.176)	0.804 (0.0272)

Additional information: ^{3}H-verapamil and ^{3}H-chloroquine were used as control. Verapamil is known to have low red blood cell partitioning, and chloroquine is known to have high red blood cell partitioning [Yu S, Li S, Yang H, Lee F, Wu JT, Qian MG. A novel liquid chromatography/tandem mass spectrometry based depletion method for measuring red blood cell partitioning of pharmaceutical compounds in drug discovery. Rapid Commun Mass Spectrom 2005;19:250-4].

CTD: Common Technical Document; h: hour; H_2O_2: hydrogen peroxide; ^{3}H-MMAE: tritium labeled monomethyl auristatin E; min: minute; MMAE: monomethyl auristatin E; SD: standard deviation

9.　薬物動態試験：代謝：In Vivo

[2.6.4-5.2 項]を参照。

10. 薬物動態試験：代謝：In Vitro

10.1　ヒト肝ミクロソームにおける ^{3}H-MMAE の in vitro 代謝

Test Article: ^{3}H-MMAE

Study Number	[redacted]084006	Location in CTD	[4.2.2.4-1]
Study System	Human liver microsomes		

Methods: Human liver microsomes were incubated with ^{3}H-MMAE.　Samples were analyzed for metabolite profiling and characterization by HPLC with radiometric detection or LC-MS/MS.

^{3}H-MMAE†	Time (min)	[Protein] (mg/mL)	Cofactor (NADPH)	Radioactive component (pmol/incubation)‡							
				7.0 min	8.6 min	11.1 min	12.3 min	15.7 min	17.4 min	18.2 min	19.2 min
0	10	1	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
0.9 µmol/L (10.5 Ci/mmol)	10	1	−	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10	0	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		0.5		5.21	5.51	12.1	NC	NC	3.78	NC	NC
		1		11.2	8.91	26.5	NC	6.84	5.50	3.56	3.43
		2		12.8	12.2	29.0	4.53	12.0	8.18	4.90	3.18
	0	1		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	5			5.47	6.58	18.8	NC	3.67	4.15	NC	NC
	20			14.4	15.5	31.3	4.79	8.99	9.38	5.07	3.65
	40			13.0	17.6	27.6	5.93	12.6	12.1	6.42	5.76
10 µmol/L (0.871 Ci/mmol)	10	1	−	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10	0	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		0.5		NC	NC	46.2	NC	NC	NC	NC	NC
		1		38.7	33.3	139	NC	NC	NC	NC	NC
		2		87.5	70.8	214	NC	33.5	36.7	NC	NC
	0	1		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	5			24.9	29.4	105	NC	NC	NC	NC	NC
	20			53.9	59.1	157	NC	NC	32.6	NC	NC
	40			66.2	89.5	186	NC	NC	49.8	NC	NC

Table continued on next page

[^{3}H-MMAE]†	Time (min)	[Protein] (mg/mL)	Cofactor (NADPH)	Radioactive component (pmol/incubation)‡							
				7.0 min	8.6 min	11.1 min	12.3 min	15.7 min	17.4 min	18.2 min	19.2 min
100 µmol/L (0.0861 Ci/mmol)	10	1	−	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10	0	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		0.5		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		1		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		2		NC	210	373	NC	NC	NC	NC	NC
	0	1		NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	5			NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	20			NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	40			NC	NC	380	NC	NC	NC	NC	NC

^{3}H-MMAE: tritium labeled monomethyl auristatin E; CTD: Common Technical Document; HPLC: high performance liquid chromatography; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; NADPH: nicotinomide adenine dinucleotide phosphate hydrogen; NC: not calculated (peak was not detected or was below the lowest standard [1 ng/mL]); pmol: picomolar

† Determined by liquid scintillation counting.

‡ Component names are based on retention time (minutes).

(+) = NADPH present.

(−) = NADPH absent.

10.2　^{3}H-MMAE の in vitro 代謝に関与するヒト CYP 酵素の同定

Test Article: ^{3}H-MMAE

Study Number	[redacted]084006	Location in CTD	[4.2.2.4-1]
Study System	Human CYP enzymes		

Additional information: Recombinant human CYP enzymes rCYP2B6, 2C8, 2C9, 2C19, and 3A4 were expressed with cytochrome b_5. Recombinant CYP enzymes rCYP1A2 and 2D6 were not expressed with cytochrome b_5. Reactions were started by addition of the NADPH-generating system and terminated by addition of stop reagent (2% v/v formic acid in acetonitrile). Recombinant CYP enzymes were normalized with control microsomes. For loss of ^{3}H-MMAE, the zero-time incubation with human liver microsomes served as the 100% value (not shown).

[^{3}H-MMAE]†	Test system	Radioactive component (pmol/incubation)‡			Substrate Loss %
		7.0 min	8.6 min	11.1 min	
6 µmol/L (24.1 Ci/mmol)	Control bactosomes	NC	NC	NC	No Loss
	Reductase control	NC	NC	0.105	No Loss
	Insect cell control + b_5	NC	NC	0.152	No Loss
	CYP1A2	NC	NC	0.130	0.6
	CYP2B6 + b_5	NC	NC	0.00190	No Loss
	CYP2C8 + b_5	NC	NC	0.0669	No Loss
	CYP2C9 + b_5	NC	NC	0.361	No Loss
	CYP2C19 + b_5	NC	NC	0.278	No Loss
	CYP2D6	NC	1.28	0.226	No Loss
	CYP3A4 + b_5	1.77	1.66	2.26	2.7
16 µmol/L (10.9 Ci/mmol)	Control bactosomes	NC	NC	NC	No Loss
	Reductase control	NC	NC	0.192	No Loss
	Insect cell control + b_5	NC	NC	0.0877	No Loss
	CYP1A2	NC	NC	0.109	No Loss
	CYP2B6 + b_5	NC	NC	0.195	No Loss
	CYP2C8 + b_5	NC	NC	0.148	1.8
	CYP2C9 + b_5	NC	NC	0.265	No Loss
	CYP2C19 + b_5	NC	NC	0.303	No Loss
	CYP2D6	NC	1.11	0.169	No Loss
	CYP3A4 + b_5	1.31	1.18	1.44	2.1

CTD: Common Technical Document; CYP: cytochrome P450; ^{3}H-MMAE: tritium labeled monomethyl auristatin E; NADPH: nicotinomide adenine dinucleotide phosphate; NC: not calculated (represents a zero or negative value after blank correction); No loss: substrate loss was zero or negative.

† Determined by liquid scintillation counting.

‡ Component names are based on retention time (minutes). Values are the mean of duplicate determinations.

+ b5 = Expressed with cytochrome b5.

10.3　肝細胞における代謝物の特性評価

Test Article: ^{3}H-MMAE

Study Number	[redacted]084007	Location in CTD	[4.2.2.4-2]
Study System	Rat, cynomolgus monkey, and human hepatocytes		
Additional information: Hepatocytes were incubated with 10 µmol/L ^{3}H-MMAE for up to 4 h, with appropriate controls. Samples were analyzed for changes in substrate concentration over the incubation time course and for qualitative metabolite profiling and characterization by LC-MS/MS.			

Species†	Incubation Time (min)	Cell Concentration (million/mL)	Peak Area Counts of Parent Compound‡	Percent Loss of Substrate ^{3}H-MMAE
Rat (Sprague-Dawley)	0	1	1780	NA
	60	1	1450	18.3%
	120	1	1280	27.9%
	240	1	1200	32.4%
	0	1 (boiled)	1530	NA
	240	1 (boiled)	1350	11.5%
Cynomolgus monkey	0	1	1580	NA
	60	1	1310	17.1%
	120	1	1320	16.8%
	240	1	1300	18.0%
	0	1 (boiled)	1500	NA
	240	1 (boiled)	1420	5.7%
Human	0	1	1520	NA
	60	1	1320	13.2%
	120	1	1330	12.5%
	240	1	1040	31.5%
	0	1 (boiled)	1530	NA
	240	1 (boiled)	1410	8.2%

^{3}H-MMAE: tritium labeled monomethyl auristatin E; CTD: Common Technical Document; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; NA: not applicable

† Hepatocytes from three individuals were used to create pooled samples for each species.

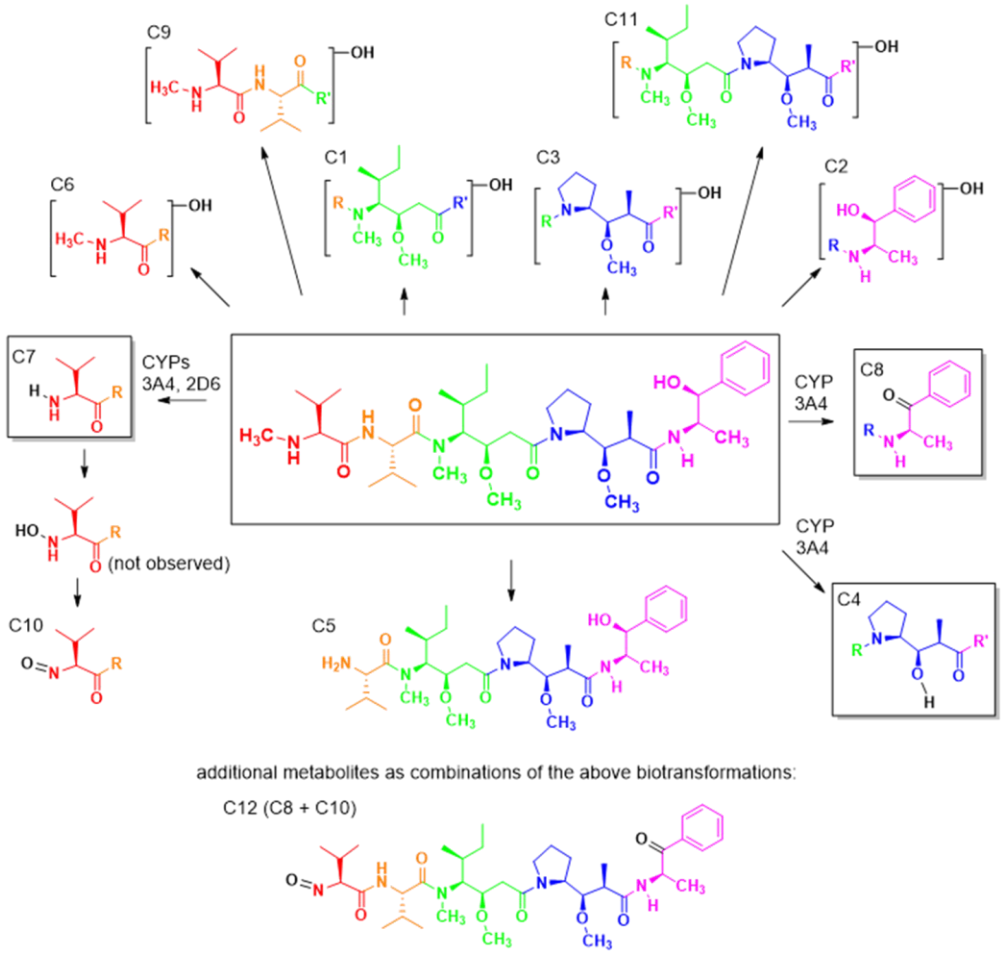
‡ Peak area counts of the parent compound are the mean of duplicate determinations and are rounded to three significant figures.

Study [redacted]084007, *continued*						
Metabolite	m/z	Change in mass (amu) from parent	Proposed transformation from MMAE	Rat	Monkey	Human
C1	734	+16	Hydroxylation	+	+	ND
C2	734	+16	Hydroxylation	ND	+	ND
C3	734	+16	Hydroxylation	+	+	+
C4	704	−14	*O*-Demethylation	+	+	+
C5	605	−113	Amide hydrolysis	+	+	+
C6	734	+16	Hydroxylation	+	+	+
C7	704	−14	*N*-Demethylation	+	+	+
C8	716	−2	Oxidation of alcohol to form a ketone	+	+	+
C9	734	+16	Hydroxylation	+	+	+
C10	718	+0	*N*-demethylation + hydroxylation to form a nitroso compound	+	+	+
C11	734	+16	Hydroxylation	ND	+	ND
C12	716	−2	Oxidation of alcohol to form a carbonyl (following formation of the nitroso compound)	ND	+	+
Parent	718	+0	-	+	+	+

(+): Peak detected; amu: atomic mass unit; MMAE: monomethyl auristatin E; m/z: mass over charge ratio; ND: not detected

11. 薬物動態試験：推定代謝径路

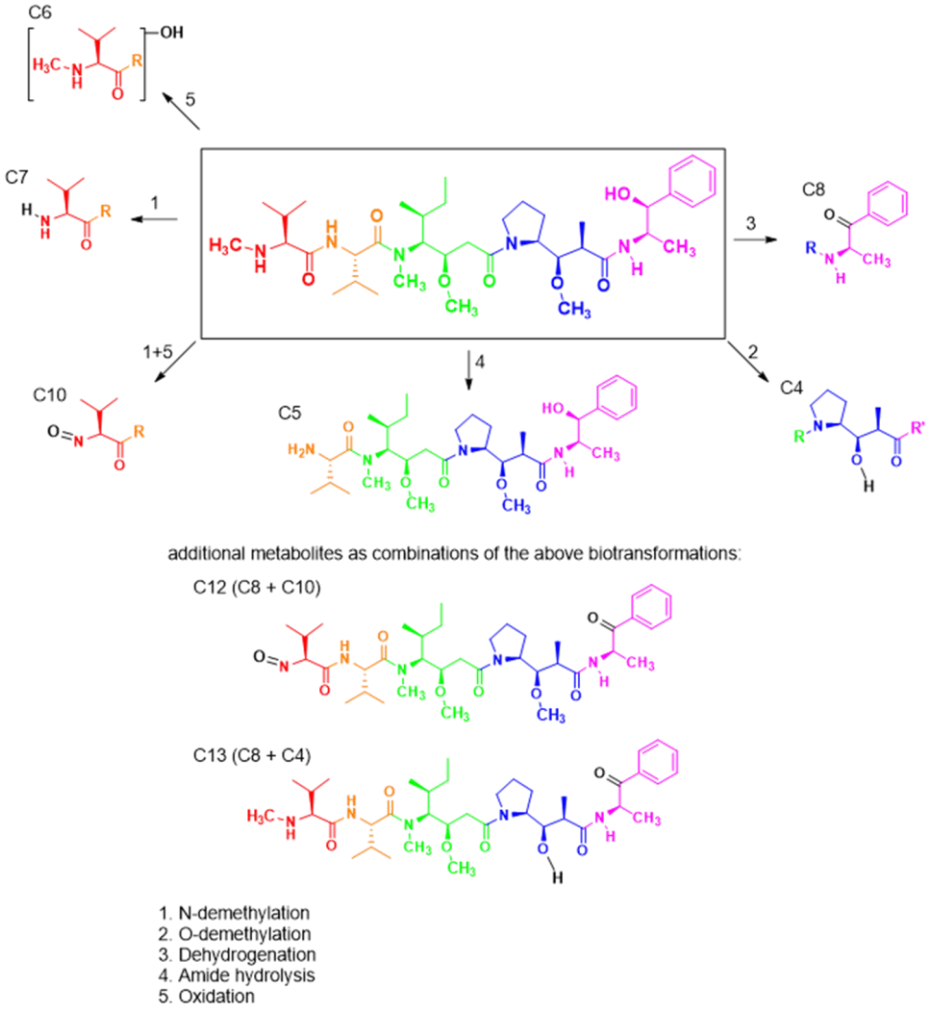
11.1　In vitro におけるヒト肝ミクロソームによる MMAE の代謝経路



Metabolic profile of MMAE in vitro in rat, monkey, and human hepatocytes [[redacted] Report [[redacted]084007] and [redacted] Report [[redacted]-[redacted]35-001]]. Reaction phenotyping was performed for C4, C7, and C8 (boxed) and the CYP enzymes involved in producing these metabolites are indicated [[redacted] Report [[redacted]084006]].

CYP: cytochrome P450; MMAE: monomethyl auristatin E

11.2　In vivo におけるヒトによる MMAE の代謝経路



Pathways involved in the metabolism of MMAE in humans following dosing with brentuximab vedotin and proposed structures of metabolites are presented [[redacted] Report [[redacted]-[redacted]35-001]].

MMAE: monomethyl auristatin E

12. 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

12.1　薬物代謝酵素の誘導

Test Article: MMAE

Study Number	[redacted]133043		Location in CTD		[4.2.2.6-1]		
Type of study	In vitro evaluation of MMAE as an inducer of cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes						
Method	Three preparations of cultured human hepatocytes from three separate livers were treated once daily for three consecutive days with dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.1% v/v, vehicle control), flumazenil (25 µmol/L, negative control), one of four concentrations of MMAE (1, 10, 100 or 1000 nmol/L) or one of three known human CYP inducers, namely, omeprazole (50 µmol/L), phenobarbital (750 µmol/L) and rifampin (10 µmol/L). After treatment, the cells were harvested to isolate microsomes for the analysis of phenacetin *O*-dealkylation (marker for CYP1A2), bupropion hydroxylation (marker for CYP2B6), and midazolam 1′-hydroxylation (marker for CYP3A4/5) by LC-MS/MS, as well as immunoreactive protein levels for CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4.　Additional hepatocytes from the same treatment groups were harvested with TRIzol to isolate RNA, which was analyzed by qRT-PCR to assess the effect of MMAE on CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 mRNA levels.						
Tabulated results							
	CYP1A2						
Treatment	Concentration	Activity fold change†			mRNA fold change‡		
		H1165	H1167	H1169	H1165	H1167	H1169
DMSO	0.1% (v/v)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
MMAE	1 nmol/L	1.51	1.51	0.882	0.941	1.47	0.964
MMAE	10 nmol/L	1.75	0.984	0.996	1.17	1.57	0.695
MMAE	100 nmol/L	0.435	0.601	0.366	0.197	0.130	0.0940
MMAE	1000 nmol/L	0.229	0.660	0.292	0.0280	0.0280	0.0210
Flumazenil	25 µmol/L	1.46	1.05	0.899	0.898	1.29	1.06
Omeprazole	50 µmol/L	26.4	34.9	27.7	23.1	160	70.9
	CYP2B6						
Treatment	Concentration	Activity fold change†			mRNA fold change‡		
		H1165	H1167	H1169	H1165	H1167	H1169
DMSO	0.1% (v/v)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
MMAE	1 nmol/L	1.31	0.915	0.999	0.982	1.39	0.859
MMAE	10 nmol/L	1.13	0.853	0.925	1.09	1.19	0.783
MMAE	100 nmol/L	0.186	0.484	0.256	0.110	0.108	0.0800
MMAE	1000 nmol/L	0.117	0.512	0.225	0.0200	0.0390	0.0320
Flumazenil	25 µmol/L	1.52	0.909	1.03	0.832	1.57	1.16
Phenobarbital	750 µmol/L	19.8	7.38	12.6	6.38	7.45	8.43
Table continued on next page							

	CYP3A4						
Treatment	Concentration	Activity fold change†			mRNA fold change‡		
		H1165	H1167	H1169	H1165	H1167	H1169
DMSO	0.1% (v/v)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
MMAE	1 nmol/L	1.48	1.01	1.07	1.32	1.56	1.34
MMAE	10 nmol/L	1.90	0.827	1.17	1.94	1.66	1.21
MMAE	100 nmol/L	0.804	0.225	0.452	0.697	0.280	0.188
MMAE	1000 nmol/L	0.517	0.213	0.400	0.0780	0.0390	0.0380
Flumazenil	25 µmol/L	1.44	0.995	1.08	0.631	1.57	1.24
Rifampin	10 µmol/L	6.48	4.84	5.57	6.97	10.0	15.7
Additional information: Under the conditions of this study, where the positive controls caused anticipated and appropriate increases in CYP enzyme expression, treatment of cultured human hepatocytes with up to 1000 nmol/L MMAE caused little or no increase in CYP1A2, 2B6 and 3A4/5 activity, mRNA levels or western immunoblot protein levels. However, treatment of MMAE at the higher treatment concentrations (100 and 1000 nmol/L) caused decreases in CYP1A2, 2B6 and 3A4 activity, mRNA levels or western immunoblot protein levels from all three hepatocyte preparations tested.							

CTD: Common Technical Document; CYP: cytochrome P450; DMSO: dimethyl sulfoxide; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; mRNA: messenger RNA; qRT-PCR; quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

† Fold change = activity of test article treated cells/activity of vehicle control and rounded to three significant figures.

‡ Fold change values are relative to vehicle control, normalized to GAPDH. All values are the mean of triplicate determinations, and rounded to three significant figures.

12.2　薬物代謝酵素の阻害

Test Article: MMAE

Study number	[redacted]085021	Location in CTD		[4.2.2.6-2]		
Method	Human liver microsomes from a pool of 16 individuals were incubated with marker substrates, at concentrations approximately equal to their apparent K_m, in the presence or absence of MMAE. The target concentrations of MMAE ranged from 0.1 to 100 µmol/L. In addition, MMAE was evaluated for its ability to function as a time-dependent inhibitor at the same concentrations mentioned above, in which case MMAE was preincubated with human liver microsomes and an NADPH-generating system for 30 minutes to allow for the generation of metabolites that might inhibit CYP activity.					
Enzyme	CYP Reaction	Direct Inhibition		Time-Dependent Inhibition		
		Zero-Minute Preincubation		30-Minute Preincubation		Potential for Time-Dependent Inhibition[c]
		IC_{50} (µmol/L)[a]	Maximum inhibition at 100 µmol/L (%)[b]	IC_{50} (µmol/L)[a]	Maximum Inhibition at 100 µmol/L (%)[b]	
CYP1A2	Phenacetin *O*-deethylation	> 100	17	> 100	19	Little or no
CYP2B6	Bupropion hydroxylation	> 100	2.6	> 100	NA	Little or no
CYP2C8	Amodiaquine *N*-dealkylation	> 100	NA	> 100	NA	Little or no
CYP2C9	Diclofenac 4′-hydroxylation	> 100	NA	> 100	2	Little or no
CYP2C19	*S*-Mephenytoin 4′-hydroxylation	> 100	17	> 100	18	Little or no
CYP2D6	Dextromethorphan *O*-demethylation	> 100	10	> 100	10	Little or no
CYP3A4/5	Testosterone 6β-hydroxylation	> 100	27	0.6	92	Yes†
CYP3A4/5	Midazolam 1′-hydroxylation	10	89	0.4	97	Yes

Additional Information:
MMAE caused direct inhibition of CYP3A4/5 as measured by midazolam 1′-hydryoxylation with an IC_{50} value of 10 µmol/L. There was little or no direct inhibition of CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, or 3A4/5 as measured by testosterone 6β-hydroxylation. The IC_{50} values for these enzymes were reported as greater than 100 µmol/L, the highest concentration of MMAE examined.
MMAE caused time-dependent inhibition of CYP3A4/5 (as measured by testosterone 6β-hydroxylation and midazolam 1′-hydroxylation) as an increase in inhibition was observed with preincubation. There was no evidence of time-dependent inhibition of CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, or 2D6 by MMAE as no distinct increase in inhibition was observed upon preincubation. Further characterization of this time-dependent inhibition shows that MMAE is a mechanism-based inhibitor of CYP3A4/5 as measured by testosterone 6β-hydroxylation with a K_{inact} value of 0.10 (min^{-1}) and a K_I of 1.12 µmol/L.

CTD: Common Technical Document; CYP: cytochrome P450; IC_{50}: 50% inhibitory concentration; K_I: concentration of an inactivator that supports half the maximal rate of enzyme inactivation; K_{inact} : maximal rate of enzyme inactivation; K_m: Michaelis-Menten constant; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable (no value was obtained as the rates at the highest concentration of MMAE evaluated [100 µmol/L] were higher than the control rates.)

a Average data (i.e., percent of control activity) obtained from duplicate samples for each test article concentration were used to calculate IC_{50} values. IC_{50} values were calculated with XLFit.

b Indicates Maximum inhibition (%) is calculated with the following formula and data for the highest concentration of test article evaluated (results are rounded to two significant figures): Maximum inhibition (%) = 100% − Percent solvent control.

c Time-dependent inhibition was determined by comparison of IC_{50} values with and without preincubation, by comparison of the maximum inhibition (%) with and without preincubation and by visual inspection of the IC_{50} plot.

† Time dependent inhibition of CYP3A4/5 as measured by testosterone 6β-hydroxylation was found to be partially reversed with microsomal re-isolation and fully reversed with treatment by potassium ferricyanide prior to re-isolation. MMAE was found to form a metabolite inhibitory complex with CYP3A4/5.

13. 薬物動態試験：排泄

Test Article: ^{3}H-MMAE

Study number	[redacted]420501		Location in CTD	[4.2.2.5-1]		
Species	Rat			Rat		
Sex (M/F)/Number of Animals	M/4			F/4[a]		
Feeding Condition	Fed			Fed		
Vehicle/Formulation	6% ethyl alcohol in 0.9% (w/v) sodium chloride for injection			6% ethyl alcohol in 0.9% (w/v) sodium chloride for injection		
Method of Administration	i.v.			i.v.		
Dose (mg/kg)	0.056			0.056		
Analyte	Total radioactivity			Total radioactivity		
Assay	LSC with ^{3}H-labeled compound			LSC with ^{3}H-labeled compound		
Excretion route	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
Time (h)	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id
0-12	9.633 (0.451)	1.520 (2.674)	11.153 (2.457)	6.816 (0.759)	20.903[b]	20.752 (23.876)
12-24	2.861 (0.581)	45.760 (9.822)	48.620 (10.268)	1.275 (0.112)	47.792 (29.552)	49.067 (29.614)
24-48	1.659 (0.277)	39.237 (10.161)	40.896 (10.264)	0.782 (0.076)	34.944 (9.156)	35.726 (9.102)
48-72	0.567 (0.075)	7.453 (1.454)	8.313 (1.316)	0.237 (0.079)	3.477 (0.890)	4.016 (1.223)
72-96	0.151 (0.015)	1.749 (0.104)	1.900 (0.096)	0.080 (0.003)	1.055 (0.269)	1.135 (0.267)
96-120	0.074 (0.008)	0.552 (0.113)	0.627 (0.108)	0.045 (0.015)	0.320 (0.061)	0.366 (0.064)
120-144	0.048 (0.006)	0.244 (0.034)	0.292 (0.031)	0.038 (0.008)	0.125 (0.002)	0.163 (0.010)
144-168	0.035 (0.009)	0.116 (0.013)	0.183 (0.018)	0.025 (0.001)	0.080 (0.019)	0.150 (0.049)
168-192	0.019 (0.003)	0.046 (0.006)	0.065 (0.009)	0.017 (0.002)	0.033 (0.004)	0.050 (0.002)
192-216	0.013 (0.001)	0.031 (0.002)	0.044 (0.003)	0.015 (0.004)	0.007 (0.013)	0.022 (0.010)
216-240	0.011 (0.002)	0	0.011 (0.002)	0.015 (0.002)	0	0.015 (0.002)
240-264	0.007 (0.005)	0	0.007 (0.005)	0.004 (0.006)	0	0.004 (0.006)
264-288	0.006 (0.004)	0	0.006 (0.004)	0	0	0
288-312	0.001 (0.003)	0	0.001 (0.003)	0	0	0
312-336	0.002 (0.004)	0	0.002 (0.004)	0.003 (0.005)	0	0.003 (0.005)
336-360	0	0	0	0	0	0
360-384	0	0	0	0	0	0
384-408	0	0	0	0	0	0

Table continued on next page

Excretion route	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
Time (h)	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id	mean % id
408-432	0	0	0	0	0	0
432-456	0	0	0	0	0	0
456-480	0	0	0	0	0	0
480-504	0	0	0	0	0	0
504-528	0	0	0	0	0	0
528-552	0	0	0	0	0	0
552-576	0	0	0	0	0	0
576-600	0	0	0	0	0	0
600-624	0	0	0	0	0	0
624-648	0	0	0	0	0	0
648-672	0	0	0	0	0	0

Total radioactivity includes cage wash, which is not included in either urine or feces.

^{3}H-MMAE: tritium labeled monomethyl auristatin E; % id: percent intravenous dose; CTD: Common Technical Document; F: female; i.v.: intravenous; LSC: liquid scintillation counting; M: male; SD: standard deviation

Mean (SD), n =3- 4,

a) Animal 4503 was excluded from Mean and SD due to anomalous value.

b) SD was not calculated when n < 3.

14. 薬物動態試験：排泄：胆汁中

胆汁排泄試験は実施しなかった。

15. 薬物動態試験：薬物相互作用

15.1　MMAE を用いた Caco-2 での試験

Test Article: MMAE

Study Number	[redacted]108004	Location in CTD	[4.2.2.6-3]
Study System	Caco-2 monolayer assay		
Study Description	Efflux ratio and apparent permeability of MMAE in the Caco-2 monolayer assay system in the apical to basolateral (P_{app} A-B) and basolateral to apical (P_{app} B-A) directions in the presence and absence of specific P-gp (MDR1) inhibitors		
Tabulated Results			
Test condition	P_{app} A-B (10^{-6} cm/sec)	P_{app} B-A (10^{-6} cm/sec)	Efflux Ratio
Efflux ratio and apparent permeability of MMAE at varying MMAE concentrations			
1 µmol/L MMAE	0.5 (0.0)	8.1 (1.1)	15 (0.8)
10 µmol/L MMAE	0.2 (0.0)	6.8 (1.6)	34 (1.1)
100 µmol/L MMAE	0.1 (0.0)	6.7 (0.4)	49 (0.3)
Efflux ratio and apparent permeability of MMAE in the presence and absence of specific P-gp inhibitors			
10 µmol/L MMAE	0.3 (0.0)	8.4 (2.1)	28 (0.3)
10 µmol/L MMAE + 10 µmol/L PSC833	1.7 (0.2)	2.3 (0.6)	1.3 (0.3)
10 µmol/L MMAE + 60 µmol/L verapamil	1.9 (0.4)	5.5 (0.3)	2.9 (0.2)
Efflux ratio and apparent permeability of digoxin in the presence and absence of MMAE and verapamil			
10 µmol/L digoxin	1.3 (0.1)	19 (1.4)	14 (0.1)
10 µmol/L digoxin + 60 µmol/L verapamil	4.2 (1.2)	6.3 (0.4)	1.5 (0.3)
10 µmol/L digoxin + 50 µmol/L MMAE	1.5 (0.1)	17 (1.4)	11 (0.1)

CTD: Common Technical Document; MDR1: multidrug resistance 1; MMAE: monomethyl auristatin E; P_{app} A-B: apparent permeability from apical to basolateral; P_{app} B-A: apparent permeability from basolateral to apical; P-gp: P-glycoprotein; SD: standard deviation

Note: Data are mean (±SD).

15.2　MMAE を用いた排出トランスポーターP-gp、BCRP 及び MRP2 での試験

Test Article: MMAE

Study Number	[redacted] 01709	Location in CTD	[4.2.2.6-4]
Study System	Caco-2 monolayer assay		
Study Design	This study evaluated the transport mechanisms of MMAE in both the A-to-B and B-to-A directions using the Caco-2 cell monolayer system in the absence or presence of the efflux pump inhibitors LY335979 (for P-gp), Ko143 (for BCRP), and indomethacin (for MRP2).		
Tabulated Results			
Test Compounds	$P_{app,}$A-to-B × 10^{-6} (cm/sec) †	$P_{app,}$B-to-A × 10^{-6} (cm/sec) †	Efflux Ratio (B:A)
MMAE (10 µmol/L)	0.10 ± 0.02	0.91 ± 0.04	8.8
MMAE (10 µmol/L) + LY335979‡ (10 µmol/L)	0.13 ± 0.03	0.20 ± 0.01	1.6
MMAE (10 µmol/L) + Ko143‡ (5 µmol/L)	0.15 ± 0.05	0.93 ± 0.06	6.0
MMAE (10 µmol/L) + Indomethacin‡ (100 µmol/L)	0.25 ± 0.10	1.10 ± 0.02	4.3
Propranolol§ (10 µmol/L)	17.60 ± 2.90	27.02 ± 0.27	1.5
Nadolol§ (10 µmol/L)	0.37 ± 0.02	0.90 ± 0.07	2.4
Additional Information: Low permeability, ≤ 1 × 10^{-6} cm/second; medium permeability, 1 × 10^{-6} cm/second to 10 × 10^{-6} cm/second; and high permeability, ≥ 10 × 10^{-6} cm/second.　An efflux ratio ($P_{app,}$ B-to-A/$P_{app,}$ A-to-B) > 2 indicates that the test compound is an efflux pump substrate.			

A-to-B: apical to basolateral; B-to-A: basolateral to apical; BCRP: breast cancer resistance protein; CTD: Common Technical Document; MMAE: monomethyl auristatin E; MRP2: multidrug resistance-associated protein 2; P_{app}: apparent permeability coefficient; P-gp: P-glycoprotein; SEM: standard error of the mean

† Data expressed as mean ± SEM (n = 3).

‡ LY335979 is an inhibitor of P-glycoprotein (P-gp), Ko143 is an inhibitor of BCRP and indomethacin is an inhibitor of MRP2.

§ Propranolol: transcellular control; nadolol: paracellular control

15.3　MMAE を用いた排出トランスポーターBCRP、BSEP 及び MRP2、並びに取り込みトランスポーターOAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 での試験

Test Article: MMAE

Study Number	■-3234	Location in CTD	[4.2.2.6-5]	
Study System	Vesicular transport assays were performed with inside-out membrane vesicles prepared from cells overexpressing human ABC transporters BCRP, BSEP, and MRP2.　Uptake experiments were performed using CHO or HEK293 cells stably expressing the respective human uptake transporters OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, and OCT2.			
Study Design	Vesicular transport inhibition assay: MMAE was incubated with membrane vesicle preparations and the probe substrate.　Incubations were carried out in the presence of 4 mmol/L ATP or AMP to distinguish between transporter-mediated uptake and passive diffusion into the vesicles.　Reaction mixtures were preincubated for 10 min at 37°C for BSEP and MRP2, and 32°C for BCRP.　Reactions were quenched by ice-cold washing buffer and immediate filtration.　The filters were washed, dried, and the mount of substrate inside the filtered vesicles was determined by liquid scintillation counting. Uptake transporter inhibition assay: Cells were plated onto standard 96-well tissue culture plates.　Uptake experiments were carried out at 37°C in 50 µL of HK buffer (pH 7.4) containing the probe substrate, MMAE, reference inhibitor and/or vehicle control solvent.　After the experiment, cells were washed and lysed with 50 µL of 0.1 mol/L NaOH.　Radiolabeled probe substrate transport was determined by measuring an aliquot (35 µL) from each well for liquid scintillation counting.			
Vesicular Transport Inhibition Assay				
BCRP-mediated transport of estrone-3-sulfate (1 µmol/L)				
Compound	Nominal Concentration (µmol/L)	ATP dependent transport (pmol/mg/min)	Relative ATP dependent transport (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	326.33 (9.22)	103.91 (3.25)	-4
	1.00	332.76 (5.17)	105.96 (2.17)	-6
	0.20	319.67 (18.54)	101.79 (6.06)	-2
	0.04	316.81 (10.17)	100.88 (3.51)	-1
	0.008	319.31 (34.16)	101.68 (10.96)	-2
DMSO	1 (%, v/v)	314.05 (4.21)	100.00 (1.90)	0
BSEP-mediated transport of taurocholate (0.2 µmol/L)				
Compound	Nominal Concentration (µmol/L)	ATP dependent transport (pmol/mg/min)	Relative ATP dependent transport (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	10.61 (0.33)	97.83 (3.26)	2
	1.00	10.93 (0.56)	100.77 (5.30)	-1
	0.20	10.25 (0.45)	94.51 (4.32)	5
	0.04	10.16 (0.71)	93.72 (6.64)	6
	0.008	11.28 (1.24)	104.08 (11.55)	-4
DMSO	1 (%, v/v)	10.84 (0.14)	100.00 (1.78)	0

Table continued on next page

Vesicular Transport Inhibition Assay *(continued)*				
MRP2-mediated transport of estradiol-17-β-glucuronide (50 µmol/L)				
Compound	Nominal Concentration (µmol/L)	ATP dependent transport (pmol/mg/min)	Relative ATP dependent transport (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	486.30 (19.90)	101.71 (5.38)	-2
	1.00	491.92 (33.33)	102.89 (7.78)	-3
	0.20	478.98 (14.44)	100.18 (4.52)	0
	0.04	464.73 (32.90)	97.20 (7.61)	3
	0.008	486.51 (23.15)	101.76 (5.92)	-2
DMSO	1 (%, v/v)	478.11 (16.02)	100.00 (4.74)	0
Uptake Transporter Inhibition Assay				
OAT1-mediated transport of tenofovir (5 µmol/L)				
Compound	Nominal Concentration (µmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	940.33 (66.15)	95.14 (7.78)	5
	1.00	983.67 (30.60)	99.53 (5.18)	0
	0.20	954.33 (25.97)	96.56 (4.81)	3
	0.04	1039.33 (15.34)	105.16 (4.66)	-5
	0.008	1015.67 (51.89)	102.77 (6.78)	-3
DMSO	1 (%, v/v)	988.33 (41.25)	100.00 (5.90)	0
OAT3-mediated transport of estrone-3-sulfate (1 µmol/L)				
Compound	Nominal Concentration (µmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	3046.00 (84.89)	87.42 (9.19)	13
	1.00	3251.33 (198.37)	93.31 (11.04)	7
	0.20	3355.67 (182.08)	96.31 (11.07)	4
	0.04	3343.33 (174.93)	95.95 (10.94)	4
	0.008	3421.67 (399.37)	98.20 (15.18)	2
DMSO	1 (%, v/v)	3484.33 (353.07)	100.00 (14.33)	0

Table continued on next page

Uptake Transporter Inhibition Assay *(continued)*				
OATP1B1-mediated transport of estradiol-17-β-glucuronide (1 µmol/L)				
Compound	Nominal Concentration (µmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	2826.67 (16.08)	88.45 (1.16)	12
	1.00	3264.33 (71.64)	102.15 (2.55)	-2
	0.20	3276.00 (42.39)	102.51 (1.80)	-3
	0.04	3373.33 (82.59)	105.56 (2.87)	-6
	0.008	3413.33 (54.81)	106.81 (2.13)	-7
DMSO	1 (%, v/v)	3195.67 (37.73)	100.00 (1.67)	0
OATP1B3-mediated transport of cholecystokinin octapeptide (0.1 µmol/L)				
Compound	Nominal Concentration (µmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	520.33 (33.61)	90.49 (6.62)	10
	1.00	599.33 (61.05)	104.23 (11.21)	-4
	0.20	572.33 (10.55)	99.54 (3.89)	0
	0.04	610.67 (16.86)	106.20 (4.69)	-6
	0.008	666.67 (25.27)	115.94 (5.94)	-16
DMSO	1 (%, v/v)	575.00 (19.80)	100.00 (4.87)	0
OCT1-mediated transport of metformin (10 µmol/L)				
Compound	Nominal Concentration (µmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	109.00 (14.62)	71.24 (9.80)	29
	1.00	139.33 (7.30)	91.07 (5.53)	9
	0.20	150.67 (12.36)	98.47 (8.62)	2
	0.04	161.33 (14.74)	105.45 (10.16)	-5
	0.008	164.33 (7.70)	107.41 (6.02)	-7
DMSO	1 (%, v/v)	153.00 (4.69)	100.00 (4.34)	0

Table continued on next page

OCT2-mediated transport of metformin (10 µmol/L)				
Compound	Nominal Concentration (µmol/L)	Transporter specific accumulation (cpm)	Relative transporter specific accumulation (% of control)	Relative inhibition (%)
MMAE	5.00	231.33 (12.06)	76.52 (5.10)	23
	1.00	269.67 (9.13)	89.20 (4.78)	11
	0.20	309.67 (17.94)	102.43 (7.30)	-2
	0.04	280.00 (3.56)	92.61 (4.02)	7
	0.008	318.33 (13.03)	105.29 (6.14)	-5
DMSO	1 (%, v/v)	302.33 (12.54)	100.00 (5.87)	0

ABC: ATP binding cassette; ATP: adenosine triphosphate; AMP: adenosine monophosphate; BCRP: breast cancer resistance protein; BSEP; bile salt export pump; CHO: Chinese hamster ovary; cpm: counts per minute; CTD: Common Technical Document; DMSO: dimethyl sulfoxide; HEK293: human embryonic kidney 293; HK: Henseleit Krebs; min: minute; MMAE: monomethyl auristatin E; MRP2: multidrug resistance-associated protein 2; NaOH; sodium hydroxide; OAT: organic anion transporter; OATP: organic anion transporting polypeptide; OCT: organic cation transporter; SD: standard deviation

Data expressed as mean (± SD), n = 3.

15.4　MMAE を用いた取り込みトランスポーターOATP1B1、OATP1B3、OCT2、OAT1 及び OAT3 での試験

Test Article: ^{3}H-MMAE

Study Number	[redacted]-0008, [redacted]-0009, [redacted]-0010, [redacted]-0011, [redacted]-0012		Location in CTD	[4.2.2.6-6], [4.2.2.6-7], [4.2.2.6-8], [4.2.2.6-9], [4.2.2.6-10]	
Study System	CHO control cells and CHO cells over-expressing each transporter (OATP1B1, OATP1B3, OCT2 and OAT1) HEK293 control cells and HEK293 cells over-expressing OAT3				
Study Design	Transporter over-expressing and respective control cells were incubated with ^{3}H-MMAE (10 and 100 nmol/L for OATP1B1 and OATP1B3; 100 nmol/L for OCT2, OAT1, and OAT3) or each positive control (^{3}H-oestrone-3-sulfate at 1 µmol/L for OATP1B1; Fluo-3 at 100 nmol/L for OATP1B3; ^{14}C-metformin at 1 µmol/L for OCT2; ^{3}H-methotrexate at 1 µmol/L for OAT1; ^{3}H-oestrone-3-sulfate at 1 µmol/L for OAT3) for 10 min in the absence and presence of seven increasing concentrations of each inhibitor (cyclosporine A for OATP1B1 and OATP1B3; cimetidine for OCT2; probenecid for OAT1 and OAT3). The cells were washed, lysed and added to scintillation fluid for liquid scintillation counting of the radioactivity. For Fluo-3 uptake experiments, 50 mmol/L $CaCl_2$ in 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) was added to rinsed wells and the plate was incubated at 37°C for 15 min. The plate was then analyzed on the fluorescent reader with following wavelengths: excitation 495 nm and emission 530 nm.				
Tabulated Results					
Transporter	OATP1B1	OATP1B3	OCT2	OAT1	OAT3
Test Article	^{3}H-MMAE	^{3}H-MMAE	^{3}H-MMAE	^{3}H-MMAE	^{3}H-MMAE
Substrate or not substrate	No	No	No	No	No
Study Number	[redacted]-0008	[redacted]-0009	[redacted]-0010	[redacted]-0011	[redacted]-0012
Additional Information: In each study, the accumulation of ^{3}H-MMAE was similar in control cells and CHO or HEK cells over-expressing each transporter after 10 min incubations. The accumulation of MMAE in either cell line was independent of each inhibitor concentration. Active uptake was not a significant contributor to MMAE movement across cell membranes, suggesting a primarily diffusion mediated process. In contrast, uptake of each positive control was greater in transporter expressing cells than control cells and was inhibited by each inhibitor (IC_{50} values of 0.54, 0.29, 6.33, 83.28, and 3.77 µmol/L for OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1, and OAT3, respectively).					

$CaCl_2$: calcium chloride; CHO: Chinese hamster ovary; CTD: Common Technical Document; IC_{50}: 50% inhibitory concentration; ^{3}H-MMAE: tritium labeled monomethyl auristatin E; HEK: human embryonic kidney; MMAE: monomethyl auristatin E; OAT: organic anion transporter; OATP: organic anion transporting polypeptide; OCT: organic cation transporter

16. 薬物動態試験：その他

16.1　チソツマブ　ベドチンの in vitro 血漿中安定性

Test Article: Tisotumab vedotin

Study Number	[redacted]1015-109-01		Location in CTD	[4.2.2.7-1]
Study System	Concentration of free MMAE measured by LC-MS/MS in human, cynomolgus monkey and mouse plasma samples spiked with 50 µg/mL Tisotumab vedotin. Duplicate samples were removed multiple time points following incubation at 37°C.			
Species	Conc. Tested (µg/mL)	Time (days)	MMAE (pg/mL) [a]	% MMAE released
Human	50	0	98.1 90.9	0.01
		1	1040 215	0.07
		2	535 505	0.06
		3	919 893	0.10
		4	1380 987	0.13
		7	2470 2480	0.26
		14	6240 6790	0.69
Cynomolgus monkey	50	0	99.2 92.9	0.01
		1	220 223	0.02
		2	493 513	0.05
		3	871 958	0.10
		4	1210 1310	0.13
		7	2460 2680	0.26
		14	4340 5370	0.52
Mouse	50	0	633 641	0.07
		1	37200 38800	4.04
		2	NR 70100	3.73
		3	91300 139000	12.24
		4	159000 156000	16.75
		7	181000 172000	18.77
		14	191000 186000	20.04
NA (PBS/1% BSA incubation)	50	0	132 129	0.01
		1	263 258	0.03
		2	374 367	0.04
		3	486 490	0.05
		4	619 653	0.07
		7	1140 1020	0.11
		14	2270 1780	0.22

ADC: antibody drug conjugate; BSA: bovine serum albumin; Conc.: concentration; CTD: Common Technical Document; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; NR: not reported since initial measurement was above upper limit of quantitation; PBS: phosphate buffered saline

a) Duplicate determinations