Table of Contents

1 まとめ 5
2 単回投与毒性試験 6
2.1 アカゲザルを用いた HuLuc63（elotuzumab）の単回持続静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験 6
3 反復投与毒性試験 7
4 遺伝毒性試験 7
5 がん原性試験 7
6 生殖発生毒性試験 7
7 局所刺激性試験 10
7.1 HuLuc63（elotuzumab）の静脈内投与ウサギ局所刺激性試験 10
8 その他の毒性試験 10
8.1 動物種選択のための試験 10
8.1.1 免疫組織化学法を用いた HuLuc63（elotuzumab）のヒト及び非ヒト組織交差反応性試験 10
8.1.2 HuLuc63（elotuzumab）の非ヒト霊長類由来遺伝子組換え CS1（SLAMF7）蛋白を用いた交差反応性試験 12
8.1.3 HuLuc63（elotuzumab）の非ヒト霊長類全血免疫サブセット結合性試験 13
8.1.4 正常ヒト組織並びにチンパンジー及びアカゲザル組織を用いた HuLuc63（elotuzumab）の交差反応性試験法検証試験 13
8.1.5 HuLuc63（elotuzumab）の正常ヒト組織を用いた交差反応性試験 14
8.2 免疫毒性 14
8.2.1 HuLuc63（elotuzumab）の健康ヒト全血における白血球サブセットへの影響に関する *in vitro* 試験 14
8.3 骨髄幹細胞の分化能試験 15
8.3.1 HuLuc63（elotuzumab）の骨髄幹細胞分化能への影響に関する試験 15
8.4 ヒト全血を用いた溶血性試験 15
8.4.1 ヒト全血を用いた HuLuc63（elotuzumab）の溶血性試験 15
8.5 免疫原性 16
9 考察及び結論 16
10 参考文献 18

List of in-text Tables

Table 1-1: 毒性試験一覧 6
Table 2.1-1: 単回持続静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験の TK 結果概要 7
Table 8.1.1-1: 組織交差反応性 11

用語及び略号一覧

略号	英語	日本語
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
AUC	area under the curve	血中濃度時間曲線下面積
AUC(0-INF)	area under the curve versus time curve to infinity	無限時間までの血中濃度時間曲線下面積
AUC(TAU)	area under the curve versus time curve to next dose	次回投与までの血中濃度時間曲線下面積
BFU-E	burst forming unit - erythrocyte	赤芽球バースト形成単位
BMS	Bristol-Myers Squibb Company	ブリストル・マイヤーズ スクイブ社
CFU-E	colony forming unit - erythrocyte	赤芽球コロニー形成単位
CFU-GM	colony forming unit - granulocyte, monocyte	顆粒球マクロファージコロニー形成単位
CFU-GEMM	colony forming unit - granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte	顆粒球赤血球単球巨核球コロニー形成単位
Cmax	maximum drug concentration	最高血中濃度
CS1	cell surface receptor 1	細胞表面受容体 1
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
Fc	fragment crystallizable	結晶化可能フラグメント
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
HA	hemagglutinin	血球凝集素
HRP	horseradish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
HuLuc63	human anti-human SLAMF7	抗ヒト SLAMF7 ヒト抗体
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MuLuc63	mouse anti-human SLAMF7	抗ヒト SLAMF7 マウス抗体
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NKT	natural killer-like T	ナチュラルキラーT
Q2W	once every 2 weeks	2 週毎に 1 回
SLAMF7	signaling lymphocyte activation molecule family member 7	－

略号	英語	日本語
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス

1 まとめ

Elotuzumab（BMS-901608、HuLuc63）は、ヒト signaling lymphocyte activation molecule family member 7［SLAMF7、別名：CS1（CD2-subset-1）、CRACC、CD319］を標的としたヒト化免疫グロブリン（Ig）G1 モノクローナル抗体（mAb）である。SLAMF7 は、多発性骨髄腫細胞に細胞遺伝学的異常に関わらず、病期を通して発現する細胞表面糖蛋白質である。また、SLAMF7 はヒト血液中の白血球サブセット及び健康成人の多くの組織の浸潤白血球にも発現する。Elotuzumab は親抗体であるマウス抗ヒト SLAMF7 抗体（MuLuc63）の相補性決定領域がヒト IgG1 の重鎖及びκ型軽鎖のフレームワーク領域と結合した構造を有している。Elotuzumab は遺伝子組換え技術により NS0 細胞中で生産され、精製後の elotuzumab のヒト SLAMF7 に対する親和性は 30～45 nM であった。

SLAMF7 を介して骨髄腫細胞に結合した elotuzumab は、CD16 を介した経路によりナチュラルキラー（NK）細胞と相互作用し、抗体依存性細胞傷害（ADCC）により骨髄腫細胞を死滅させる。また、SLAMF7 は NK 細胞の機能調節因子としての作用も有する。*In vitro* 試験において、elotuzumab は NK 細胞に発現する SLAMF7 との結合により NK 細胞を直接活性化して抗骨髄腫細胞効果を示した。非臨床モデルにおいて、elotuzumab は単剤で抗骨髄腫細胞効果を示し、レナリドミドを併用した場合、単剤使用時よりも高い抗骨髄腫細胞効果を示した（モジュール 2.6.2 及び 2.6.3 参照）。Elotuzumab はナチュラルキラーT（NKT）細胞及び CD8+T 細胞にも結合したが、CD4+T 細胞、静止期単球、CD20+HLA−DR+B 細胞及び顆粒球に有意な結合は検出されなかった。

その抗腫瘍効果に基づき、elotuzumab をレナリドミドとデキサメタゾン、ボルテゾミブとデキサメタゾン又はその他の治療との併用による多発性骨髄腫治療薬として開発中である。Elotuzumab の臨床用量及び用法は、10 mg/kg の週 1 回静脈内投与 2 サイクル後、2 週毎に 1 回の静脈内投与［Q2W、Cmax：430 μg/mL 及び AUC (TAU)：100800 μg•h/mL］である【モジュール 2.6.7 Table 2.6.7.3A 及び 2.6.7.3B】。

非臨床評価の結果、elotuzumab はヒトの SLAMF7 蛋白のみに結合し、他の動物種（チンパンジー、カニクイザル、アカゲザル、イヌ、ミニブタ、ウサギ、ラット及びマウス）の SLAMF7 には結合しなかった。Elotuzumab の非臨床安全性評価に用いる代替動物として C57BL/6 マウスにヒト SLAMF7 遺伝子を導入したトランスジェニック動物モデルを作製した[1]。しかし、トランスジェニックマウスにおけるヒト SLAMF7 の発現を検討した結果、休止 T 細胞及び活性化 T 細胞のいずれにもヒト SLAMF7 のヒトと同様の発現は認められなかった。この発現パターンの相違により、トランスジェニック動物モデルは、非臨床安全性評価に用いる代替動物として適切でないと考えられた。Elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、毒性試験に適した動物種が存在しないことから、非臨床安全性評価として主に *in vitro* 安全性評価及び *in vivo* 生物学的活性評価を実施し、本薬の選択性及び潜在的な毒性を検討した。多発性骨髄腫患者における elotuzumab 投与の安全性を担保するために実施した毒性試験を Table 1-1 に示す。ウサギの局所刺激性試験、ヒト全血の溶血性試験及びヒト正常組織の交差反応性試験を医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適合下で実施した。また、elotuzumab のヒト全血における白血球サブセット枯渇及びヒト骨髄幹細胞分化能への影響を検討するための非 GLP 試験を実施した。更に、アカゲザルを用いた単回静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験を実施し、elotuzumab の標的外作用について検討した。

Table 1-1:　　毒性試験一覧

試験種類	投与経路	動物種	GLP 適合性
単回投与毒性試験	静脈内	アカゲザル	非 GLP
局所刺激性試験	静脈内	ウサギ	GLP
免疫組織化学法を用いた交差反応性試験	*In vitro*	カニクイザル、アカゲザル、ミニブタ、ラット、マウス、ウサギ、イヌ及びヒト	非 GLP
ELISA 法及び遺伝子組換え培養細胞を用いた組換え SLAMF7 の結合性試験	*In vitro*	チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル	非 GLP
全血結合性試験	*In vitro*	チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル	非 GLP
組織交差反応性試験	*In vitro*	チンパンジー、アカゲザル及びヒト	GLP
免疫毒性試験	*In vitro*	ヒト	非 GLP
骨髄分化能試験	*In vitro*	ヒト	非 GLP
溶血性試験	*In vitro*	ヒト	GLP

2　　単回投与毒性試験

サルの探索的単回静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験は、アカゲザルの末梢血 B 細胞に elotuzumab が結合するという予備データに基づき実施された。しかし、この結合に再現性はなく、アカゲザルは毒性試験に適さない動物種であることが示唆された。したがって、本試験ではサルにおける elotuzumab の標的外毒性のみを評価した。

2.1　　アカゲザルを用いた HuLuc63（elotuzumab）の単回持続静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験

（試験番号：TR[redacted]50【モジュール 2.6.7 表 2.6.7.5】、【モジュール 4.2.3.1-1】）

アカゲザル（1 群雌雄各 1 匹）に elotuzumab を 0、30 及び 100 mg/kg の用量で 30 分間以上持続静脈内投与した。Elotuzumab は溶媒［0.05% Tween 80 及び 20 mM クエン酸ナトリウムを含有する 120 mM 塩化ナトリウム水溶液（pH 6）］に溶解し、10 mL/kg の容量で投与した。生死、摂餌量及び一般状態観察、体重測定、トキシコキネティクス（TK）、末梢血のイムノフェノタイピング（リンパ球数測定）、臨床病理検査、剖検、器官重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。投与後の観察期間は 44 日間とし、計画剖検は Day 45 に実施した。

用量比に応じた全身曝露量［血中濃度時間曲線下面積（AUC）及び最高血中濃度（Cmax）］の増加が認められ、性差はなかった。TK の結果概要を Table 2.1-1 に示す。

Table 2.1-1: **単回持続静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験の TK 結果概要**

パラメーター	採血日	Elotuzumab 投与量（mg/kg）			
		30		100	
		雄	雌	雄	雌
Cmax (mg/mL)	Day 1	0.64	0.64	1.66	2.07
AUC(0-INF)[a] (mg•h/mL)	Day 1	194	118	335	447

[a] 30 及び 100 mg/kg 群の雌雄合算 AUC 値はそれぞれ 156 及び 391 mg•h/mL

Elotuzumab の消失半減期は 8～14.8 日であった。投与直後の分布容積は 46.3～61.5 mL/kg であり、投与直後の elotuzumab は主に血管内のみに分布することが示唆された。全例が計画剖検時まで生存し、いずれの検査にも投与に関連した影響は認められなかった。

以上より、アカゲザルに elotuzumab を最高用量 100 mg/kg［AUC(0-INF)：335～447 mg•h/mL］で投与しても標的外作用は認められなかった。

3 反復投与毒性試験

毒性試験に適した動物種が存在せず、「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」ガイドライン［日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S6(R1)］に記載されている適切なトランスジェニック動物も存在しないことから、elotuzumab の反復投与毒性試験は実施していない。

4 遺伝毒性試験

ICH S6(R1)に記載されているとおり、従来の医薬品について通常実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類は、バイオ医薬品に対しては適切なものでなく、このような成分が DNA や他の染色体成分に直接相互作用するとは考えにくいため必要とされない。したがって、elotuzumab の遺伝毒性試験は実施しなかった。

5 がん原性試験

Elotuzumab が薬理学的活性を示す動物モデルは存在せず、elotuzumab の特異性は高く、標的外作用を発現する可能性は低い。また、elotuzumab が細胞周期及び DNA に影響を及ぼすことを示唆する知見はない。更に、「医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス」（ICH S1A）、ICH S6(R1)及び「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」（ICH S9）に示されている通り、モノクローナル抗体などのバイオ医薬品においては標準的ながん原性試験は一般的に不適当であり、更に、進行した全身性疾患の治療を目的とした抗腫瘍剤では必要とされない。したがって、elotuzumab のがん原性試験は実施しなかった。

6 生殖発生毒性試験

ICH S6(R1)及び S9 に示されているとおり、バイオ医薬品の生殖発生毒性試験は 1 種の薬理学的に適切な動物種を用いて実施すべきである。しかし、elotuzumab はヒト SLAMF7 蛋白のみに結合するヒ

ト化 IgG1 mAb であり、他の動物種（チンパンジー、カニクイザル、アカゲザル、イヌ、ミニブタ、ウサギ、ラット及びマウス）の SLAMF7 には結合しなかった。更に、トランスジェニックマウスにおいて休止 T 細胞及び活性化 T 細胞のいずれにもヒトと同様のヒト SLAMF7 の発現は認められなかったことから、トランスジェニック動物モデルは、非臨床安全性評価に用いる代替動物として適切でないと考えられた。したがって、毒性試験に適した動物種が存在しないため、生殖発生毒性試験は実施していない。Elotuzumab の生殖発生毒性については、組織における標的の局在、薬理学的作用機序及び公表論文により評価した。

以下に示すように、SLAMF7 発現は、ヒト血液中の白血球サブセット及び健康ヒトの器官に浸潤した白血球にのみ低レベルに認められる [2]。Elotuzumab 及び MuLuc63（elotuzumab の相同マウス抗体）は NK 細胞及び NKT 細胞並びに CD8+T 細胞サブセットに結合したが、CD4+T 細胞、静止期単球、循環血中 CD20+HLA−DR+B 細胞及び顆粒球に結合しなかった。ヒト組織パネルを用いた組織交差反応性試験（GLP 適合）では、elotuzumab の反応が複数の組織における形質細胞及び免疫芽細胞（形質細胞へ分化途中の B 系列細胞）の細胞膜及び細胞質にみられた。形質細胞及び免疫芽細胞にみられた染色は、これらの細胞に発現することが知られている SLAMF7 が elotuzumab によって認識されたものと考えられた。子宮［体部（子宮内膜）及び頸部］及び卵管の形質細胞及び免疫芽細胞を除き、生殖器官に elotuzumab の結合はみられなかった。子宮における形質細胞及び免疫芽細胞への elotuzumab の結合が *in vivo* で生殖に影響を及ぼす可能性は明らかでない。しかし、形質細胞を含む B 細胞は生殖機能、胚胎児発生並びに出生前及び出生後の発達に有意な影響を及ぼさないことが、リツキシマブ（CD20 を発現する骨髄中の B 細胞前駆細胞並びに血中及びリンパ組織中の未熟及び成熟 B 細胞を選択的に枯渇させる抗 CD20 モノクローナル IgG1 抗体）を用いた試験のデータより示されている [3]。また、胎児及び出生児には、毒性所見としてリツキシマブの薬理作用に一致する回復性の B 細胞の減少が認められた。同様に、臨床における妊娠第 1、2 及び 3 三半期のリツキシマブ投与では、出生児に一時的な B 細胞減少がみられたのみであった [4,5,6,7]。Elotuzumab は循環血中 CD20+HLA−DR+B 細胞に結合せず、elotuzumab を全血と 100 及び 200 µg/mL の濃度で反応させた試験において B 細胞の減少が認められなかったことから、elotuzumab は胎児及び出生児において B 細胞を減少させないと考えられる。

SLAMF7 欠損マウスは正常に誕生することから、正常な発生及び発達周期の繁殖能を有すると考えられる [8]。更に、SLAMF7 は主に NK 細胞上に発現しているが、*in vivo* 及び *in vitro* どちらの系においても NK 細胞の発達に影響を及ぼすことを示す結果は得られていない。これらの結果より、SLAMF7 は発生及び胚胎児の発達における重要な役割をもたないことが示唆される。しかし、SLAMF7 欠損マウスにおいて脾臓の $CD44^{hi}$CD122+自然免疫 CD8+T 細胞及び胸腺の $CD44^{hi}$ 成熟 NKT 細胞の有意な増加が認められており、内因性の SLAMF7 発現が自然免疫 CD8+T 細胞及び NKT 細胞に対して負の影響を及ぼしていることを示している [9]。

ヒト全血を用いた *in vitro* アッセイにおいて、Elotuzumab は 100 及び 200 µg/mL の濃度で T 細胞（CD3+、CD4+及び CD8+）及び B 細胞の減少を惹起しなかった。しかし、NK 細胞数は平均 20%（ドナー間のばらつき：0〜45%）減少し、これは elotuzumab の薬理作用による影響と考えられた。NK 細胞は生

殖及び胎児の母性寛容に重要な役割をもつと考えられている。しかし、子宮の NK（uNK）細胞は、主に細胞傷害性を有する $CD56^{dim}CD16+$細胞である血中の NK 細胞とは異なり、主に細胞傷害性を持たず血管形成因子の産生により血管形成作用を有する $CD56^{bright}CD16-$細胞である [10]。Elotuzumab によるリンパ球減少症及び uNK 細胞への作用が妊娠に及ぼす影響については明らかでない。

Elotuzumab は IgG1mAb である。本サブタイプの IgG は、FcRn 受容体を介してヒト胎盤関門を通過することが知られており、胎児は特に妊娠の後期に elotuzumab に直接的に曝露される可能性がある [11]。Elotuzumab が胎児の発生に及ぼす影響の評価は行っていないが、SLAMF7 欠損マウスにおいて発生への影響が特に認められていないことは、elotuzumab 投与による SLAMF7 の阻害が発生毒性を誘導しないことを示唆していると考えられる。また、本薬の乳汁移行に関しては、ヒトにおいて母乳中の抗体は出生児の血中に実質的に移行しないことが知られており、母乳中に分泌される免疫グロブリンの大部分は主に腸内の感染を予防する IgA である [12]。したがって、IgG である elotuzumab が母乳由来で出生児の血中に移行する量は著しく低く、リンパ球減少症を引き起こすことはないと考えられる。

Elotuzumab は多発性骨髄腫の治療を目的とし、レナリドミドとデキサメタゾン、ボルテゾミブとデキサメタゾン又はその他の治療法との併用療法のみの開発を実施している。したがって、elotuzumab と併用する際にこれらの薬剤の生殖発生毒性を考慮する必要がある。例として、レナリドミドは、免疫調節作用、抗血管形成作用及び抗新生物作用をもつサリドマイドの誘導体であり、妊婦への投与は禁忌とされている。レナリドミドの添付文書には、サルの生殖発生毒性試験で認められた催奇形性に関する胚胎児毒性の警告欄が設けられている [13]。ボルテゾミブは、哺乳類細胞の 26S プロテアソーム低分子のキモトリシン様活性を可逆的に阻害する低分子化合物であり、胚胎児発生に対する警告が、器官形成期に臨床用量（1.3 mg/m^2）の約半分の用量を曝露したウサギで着床後死亡の増加及び生存胎児数の減少がみられたことに基づいて示されている [14]。これらの所見より、妊娠の可能性のある女性では、elotuzumab とこれらの薬剤を併用投与する期間に妊娠を回避する措置を講じることが強く推奨される。

以上より、elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、生殖発生毒性試験の実施に適切なトランスジェニックマウスモデルも存在しないことから、elotuzumab の生殖発生毒性は *in vitro* 及び作用機序のデータ並びに elotuzumab に限定しない関連公表論文に基づき評価した。SLAMF7（ヒトにおける elotuzumab の標的分子）欠損マウスが正常に誕生することは、SLAMF7 を標的とすることにより生殖発生毒性が発現するリスクは低いことを示していると考えられる。しかし、ヒトにおける妊娠中の elotuzumab によるリンパ球減少症並びに elotuzumab の生殖器官における形質細胞及び免疫芽細胞への結合の影響は不明であり、発生毒性物質として知られている薬剤との併用投与であることから、妊娠の可能性のある女性では、elotuzumab とレナリドミド及びボルテゾミブを併用投与する期間に妊娠を回避する措置を講じることが必要である。公表論文より、ヒト母乳中の抗体は出生児の血中に実質的に移行しないことが示唆されているが、授乳婦への投与は避けることが望ましく、やむを得ず投与する場合は授乳を避けさせることが望ましい。

7 局所刺激性試験

7.1 HuLuc63（elotuzumab）の静脈内投与ウサギ局所刺激性試験

（試験番号：TR[redacted]50【モジュール 2.6.7 表 2.6.7.16】、【モジュール 4.2.3.6-1】）

New Zealand White ウサギ（雌 6 匹）の右耳介辺縁静脈に濃度 5 mg/mL の elotuzumab 1 mL を 1 mL/分の投与速度で急速単回投与した。左耳介には溶媒［0.05% Tween 80 及び 20 mM クエン酸ナトリウムを含有する 120 mM 塩化ナトリウム水溶液（pH 6.05）］を同量投与した。生死及び一般状態観察、投与部位の皮膚及び局所炎症反応評価、体重及び摂餌量測定並びに投与部位の病理組織学的検査を実施した。投与後約 30 分、3 時間及び 24 時間に各 2 匹を剖検し、投与部位の変化（変色、腫脹及び潰瘍など）を肉眼的に観察した。紅斑及び浮腫の所見は Draize 法に従って記録した。

全例が計画剖検日まで生存し、いずれの観察時点でも投与に関連した一般状態の変化はみられなかった。ウサギに elotuzumab を初回臨床投与（最高濃度 6.6 mg/mL、投与速度 2 mL/分以下）と同程度の濃度（5 mg/mL）及び投与速度（1 mL/分）で単回静脈内投与し、投与部位観察、体重及び摂餌量測定、剖検及び病理組織学的検査結果を実施した結果、elotuzumab の投与に関連した影響は認められなかった。

8 その他の毒性試験

8.1 動物種選択のための試験

以下の動物種選択のための試験の結果から、elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、毒性試験に適した動物種が存在しないことが示された。

8.1.1 免疫組織化学法を用いた HuLuc63（elotuzumab）のヒト及び非ヒト組織交差反応性試験

（試験番号：RTR12【モジュール 2.6.7 表 2.6.7.17】、【モジュール 4.2.3.7.7-1】）

正常ヒト及び各動物種（カニクイザル、アカゲザル、ミニブタ、イヌ、ウサギ、ラット及びマウス）の新鮮凍結組織における elotuzumab の交差反応性を評価し、毒性試験に用いる動物種を検討した。

組織の凍結切片を 1.5 µg/mL の elotuzumab 及びビオチン結合抗ヒト IgG ヤギ抗体と反応させ、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）法を用いて結合を検出した。Elotuzumab の特異的結合を評価するための陰性対照抗体として 2 µg/mL のヒト IgG1 を用いた。

概して、本試験で評価した非ヒト組織に elotuzumab の結合を示唆する染色はみられなかった。Elotuzumab 特異的な細胞表面の染色は、ヒトの扁桃腺、脾臓、リンパ節、結腸及び三叉神経節の単核細胞にみられ、ヒトの大脳、小脳、脊髄及び後根神経節にはみられなかった。染色結果を Table 8.1.1-1 に示す。

Table 8.1.1-1: 組織交差反応性

動物種	組織	Elotuzumab の結合	ヒト IgG1 の結合	備考
カニクイザル	扁桃腺	−	−	
	脾臓	−	−	
	結腸	−	−	
アカゲザル	リンパ節	−	−	
	脾臓	−	−	
	結腸	−	−	
マウス	リンパ節	−	−	
	脾臓	−	−	
	結腸	−	−	
ラット	リンパ節	−	−	
	脾臓	−	−	
	結腸	−	−	
ウサギ	扁桃腺	−	−	
	脾臓	−	−	
	結腸	−	−	
イヌ	脾臓	−	−	
	扁桃腺	−	−	
ミニブタ	扁桃腺	−	−	
	脾臓	−	−	
ヒト	結腸	+++	−	粘膜固有層の単核細胞
	扁桃腺	++	−	粘膜下及び毛包境界部の単核細胞
	脾臓	++	−	染色陽性の単核細胞が巣状に散在
	リンパ節	++	−	染色陽性の単核細胞が巣状に散在
	小脳	−	−	
	大脳	−	−	
	脊髄	−	−	
	三叉神経節	+	−	単核細胞に弱い陽性
	後根神経節	−	−	

以上より、ヒト組織の免疫組織化学（IHC）分析により elotuzumab の結合を示す染色が扁桃腺、脾臓、リンパ節、結腸及び三叉神経節の単核細胞に認められた。これらの単核細胞は、elotuzumab の親抗体である抗ヒト SLAMF7 マウス抗体（MuLuc63）を用いた IHC 試験で得られた結果と同様に SLAMF7 を発現している形質細胞と考えられた。評価したヒト器官の上皮、平滑筋及び血管には elotuzumab の結合はみられなかった。また、ヒト組織で陽性の染色結果が得られたことと対照的に、非ヒト（カニクイザル、アカゲザル、ミニブタ、イヌ、ウサギ、ラット及びマウス）組織には elotuzumab の結合を示す染色はみられなかった。

8.1.2 HuLuc63（elotuzumab）の非ヒト霊長類由来遺伝子組換え CS1（SLAMF7）蛋白を用いた交差反応性試験

（試験番号：RTR18【モジュール 2.6.7 表 2.6.7.17】、【モジュール 4.2.3.7.7-2】）

Elotuzumab 及びその親抗体であるマウスモノクローナル抗体 MuLuc63 の交差反応性について、非ヒト霊長類（チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル）由来の精製遺伝子組換え SLAMF7 の Fc 融合蛋白を用いた酵素結合免疫吸着（ELISA）法及び完全長 SLAMF7 を表面に発現させた改変培養細胞を用いたフローサイトメトリー法により評価した。

ELISA プレートのウェルに直接固定したチンパンジー、カニクイザル、アカゲザル及びマウス由来 SLAMF7 の Fc 融合蛋白と、最終濃度を 0.1 µg/mL として添加したビオチン結合 elotuzumab、MuLuc63 及びアイソタイプ対照抗体との結合を HRP 結合ストレプトアビジン法により検出した。その結果、MuLuc63 はヒト由来 SLAMF7 の Fc 融合蛋白にのみ結合を示し、カニクイザル、アカゲザル、チンパンジー及びマウス由来 SLAMF7 の Fc 融合蛋白には結合しなかった。試験に用いたすべての SLAMF7 の Fc 融合蛋白について、SLAMF7 の細胞外ドメインとヒト Fc ドメインが完全に保存されていることをウェスタンブロッティング法により確認した。本実験において、elotuzumab 及び MuLuc63 はヒト SLAMF7 のみを認識し、非ヒト霊長類 SLAMF7 を認識しなかった。

フローサイトメトリーを用いた測定法では、マウス、アカゲザル及びヒト SLAMF7 の cDNA を安定導入したヒト胎児由来腎臓 293 改変培養細胞を用いて評価した。これらの改変培養細胞では、非ヒト霊長類 SLAMF7 の cDNA を発現ベクターに導入し、マウス CD4 細胞表面マーカーと同時に発現させた。最高 100 µg/mL の濃度で添加した elotuzumab のマウス CD4 及びマウス、アカゲザル又はヒト SLAMF7 を同時に発現した改変培養細胞への結合をフローサイトメトリー法で測定した。改変培養細胞の蛋白発現は、細胞表面への抗 CD4 抗体の結合及び SLAMF7 を標識する細胞内の血球凝集素（HA）エピトープを検出する抗 HA 抗体の結合により確認した。その結果、elotuzumab はチンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル SLAMF7 蛋白を発現する細胞への結合を示さなかった。これらは、SLAMF7 の Fc 融合蛋白を用いた ELISA 法の結果と一致した。

以上より、elotuzumab はヒト SLAMF7 のみに特異的に結合し、SLAMF7 の精製 Fc 融合蛋白を用いた ELISA 法及び完全長 SLAMF7 を表面に発現させた改変培養細胞を用いたフローサイトメトリー法による測定の結果、評価したいずれの動物種（チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル）由来の遺伝子組換え SLAMF7 にも結合しなかった。

8.1.3 HuLuc63（elotuzumab）の非ヒト霊長類全血免疫サブセット結合性試験

（試験番号：RTR21【モジュール 2.6.7 表 2.6.7.17】、【モジュール 4.2.3.7.7-3】）

FITC 標識 elotuzumab（20 μg/mL）又は対応するアイソタイプ対照抗体と正常なチンパンジー、カニクイザル及びアカゲザルの全血中白血球サブセット［NK 細胞（CD3−CD(16+56)+）、NKT 細胞（CD3+CD(16V56)+）、CD8 細胞（CD3+CD8+）、CD4 細胞（CD3+CD8−又は CD3+CD4+）、B 細胞（CD20+HLA−DR+）及び単球（CD14+HLA−DR+）］との結合をフローサイトメトリーで測定し、elotuzumab と免疫サブセットとの結合性を評価した。

FITC 標識 elotuzumab のカニクイザル及びアカゲザル血液中 CD8+T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞及び単球への結合は認められず、B 細胞への結合はアカゲザルの全例及びカニクイザルの 5 例中 1 例の血液で認められた。Elotuzumab の B 細胞への結合には個体間で大きなばらつきがあり、ヒト全血で認められる結合パターンとは異なる結果であった。ヒト全血では、elotuzumab の結合は主に NK 細胞、NKT 細胞及び CD8+T 細胞サブセットにみられ、B 細胞、単球及び顆粒球にはみられなかった。また、elotuzumab は異種細胞に発現させたカニクイザル及びアカゲザル由来の遺伝子組換え SLAMF7 蛋白に結合しなかった。したがって、カニクイザル及びアカゲザルの B 細胞にみられた elotuzumab の結合は、SLAMF7 に特異的な結合ではないと考えられた。

チンパンジーの全血を用いて実施した同様の試験では、FITC 標識 elotuzumab（20 μg/mL）はいずれの白血球（CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞及び B 細胞）に対しても結合しないかわずかな結合を示すのみであった。更に、高用量（80 μg/mL）においても、FITC 標識 elotuzumab のこれらの白血球への結合は認められなかった。

以上より、elotuzumab はチンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル血液中の NK 細胞、NKT 細胞、CD8+T 細胞及び単球並びにチンパンジーの CD4+T 細胞への結合を示さなかった。血液中 B 細胞への elotuzumab の結合がカニクイザル及びアカゲザルで認められたが、チンパンジーでは認められなかった。しかし、elotuzumab の B 細胞への結合には個体間で大きなばらつきがあり、elotuzumab は異種細胞に発現させたカニクイザル及びアカゲザル由来の遺伝子組換え SLAMF7 蛋白に結合しなかったため、カニクイザル及びアカゲザルの血液中 B 細胞への elotuzumab の結合は、SLAMF7 に特異的な結合ではないと考えられた。これらの結果は、*in vitro* において非ヒト霊長類血液に対する elotuzumab 結合パターンがヒト血液に対する結合パターンと異なることを示していた。

8.1.4 正常ヒト組織並びにチンパンジー及びアカゲザル組織を用いた HuLuc63（elotuzumab）の交差反応性試験法検証試験

（試験番号：TR[redacted]52【モジュール 2.6.7 表 2.7.6.17】、【モジュール 4.2.3.7.7-6】）

ヒト、チンパンジー及びアカゲザルの凍結切片｛脳（小脳）、腎臓（糸球体及び尿細管）、脾臓、扁桃腺及び胃腸管［結腸及び小腸（ヒト及びチンパンジーのみ）］｝に elotuzumab を 0.5～20 μg/mL の濃度範囲で反応させ、elotuzumab の結合性及び交差反応性試験の条件を検討した。また、1 次抗体と 2 次抗体を複合体として用いる染色法に様々な変更を加え、染色の特異性と感度を評価した。

評価結果より、ヒト扁桃腺の凍結切片を陽性対照組織とした。ヒト扁桃腺では、elotuzumab の反応がリンパ上皮（粘膜下層）下の濾胞辺縁部で形質細胞及び免疫芽細胞にみられ、稀に散在性細胞又は遊走細胞にもみられた。免疫芽細胞は大型の偏在性の核を持ち、概して細胞質内免疫グロブリンを認める IgM 又は IgG 陽性の大型のリンパ球として定義される。ヒト胃腸管（結腸）は副次的な陽性対照組織とし、ヒト小脳（実質）及びヒト腎臓（実質）の凍結切片はいずれの濃度の elotuzumab でも染色されなかったため、陰性対照組織とした。

チンパンジー及びアカゲザルのいずれの組織にも特異的染色が認められなかったため、これらの動物種の組織についてはより詳細な検討は行わなかった。

これらの試験法開発試験において、elotuzumab（HuLuc63）のヒト組織交差反応性試験で用いる IHC 染色では、複合体を用いる手法が特異的かつ高感度で再現性も良好であることが示された。また、陽性対照組織及び陰性対照組織の適切性を確認した。更に、3 及び 10 µg/mL を以降のヒト組織パネルを用いるヒト組織交差反応性試験の elotuzumab 濃度とした。

8.1.5 HuLuc63（elotuzumab）の正常ヒト組織を用いた交差反応性試験

（試験番号：TR[redacted]51【モジュール 2.6.7 表 2.6.7.17】、【モジュール 4.2.3.7.7-5】）

各 3 例の提供者から得たヒト組織パネル（約 36 組織）の組織を elotuzumab（3 及び 10 µg/mL）と反応させ、間接酵素抗体法（8.1.4 項）を用いて elotuzumab の組織結合性を比較した。Elotuzumab の特異的結合を評価するための陰性対照抗体として huIgG1 を用いた。ヒト扁桃腺（形質細胞及び免疫芽細胞）及び大腸（粘膜固有層の形質細胞及び免疫芽細胞）の凍結切片を陽性対照組織とし、ヒト小脳及び腎臓の凍結切片を陰性対照組織とした。

Elotuzumab の結合は、骨髄、乳房、胃腸管［結腸（大腸）、食道、小腸、胃］、肝臓、リンパ節、卵管、膵臓、唾液腺、脾臓、胸腺、甲状腺、扁桃腺、尿管及び子宮［体部（子宮内膜）及び頸部］に様々な数で存在する形質細胞及び免疫芽細胞の細胞膜及び細胞質にみられた。形質細胞及び免疫芽細胞の染色は、elotuzumab のエピトープ（SLAMF7）が形質細胞及び免疫芽細胞上に発現していることを示唆した。評価したその他のヒト組織では、特異的な交差反応性はみられなかった。

8.2 免疫毒性

8.2.1 HuLuc63（elotuzumab）の健康ヒト全血における白血球サブセットへの影響に関する *in vitro* 試験

（試験番号：RTR19【モジュール 2.6.7 表 2.6.7.17】、【モジュール 4.2.3.7.2-1】）

SLAMF7 発現はヒト血液中の白血球サブセット及び浸潤形質細胞に限定していることから、ヒト全血における elotuzumab の影響による主要な白血球サブセットの細胞数減少の可能性を検討するための *in vitro* 試験を実施した。8 名の健康成人から得た全血を 100 及び 200 µg/mL の elotuzumab 存在下で 24 時間、37ºC で培養した。陰性対照抗体として MSL109（血球細胞に結合しないヒト化 IgG1 抗体）を、陽性対照抗体として *in vitro* 及び *in vivo* で B 細胞を枯渇させるリツキシマブ（抗 CD20 抗体）及び *in vivo* で各種リンパ球を枯渇させる alemtuzumab（抗 CD52 抗体）を用いた。細胞毒性については、全血中の白血球サブセット（CD3+T 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、NK 細胞、B 細胞及びメモリ

ーB 細胞）の絶対数をフローサイトメトリーにより測定し、無処置の試料と比較した細胞の絶対数の減少を枯渇の指標とした。

100 及び 200 μg/mL の elotuzumab 存在下で全血を培養した結果、すべての健康成人（8 例）の総リンパ球、CD3+T 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、B 細胞及びメモリーB 細胞数に影響はみられなかった。8 例中 5 例で NK 細胞数の減少が elotuzumab の両濃度で観察された（4 例：約 20～30%、1 例：44%）。対照抗体では予測された結果が得られ、リツキシマブでは alemtuzumab と同様に B 細胞の総数が平均 70%減少し、陰性対照抗体では無処置の試料と同程度の値を示した。

以上より、elotuzumab 存在下の全血培養において総リンパ球、CD3+T 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、B 細胞及びメモリーB 細胞数に影響はみられなかった。評価した両濃度の elotuzumab 存在下において 8 例中 5 例の試料で NK 細胞数の減少（平均約 20%）がみられ、その範囲は 0～45%であった。Elotuzumab による主要な白血球サブセットの枯渇はみられなかった。

8.3 骨髄幹細胞の分化能試験

8.3.1 HuLuc63（elotuzumab）の骨髄幹細胞分化能への影響に関する試験

（試験番号：RTR20【モジュール 2.6.7 表 2.6.7.17】、【モジュール 4.2.3.7.2-2】）

ヒト骨髄幹細胞［赤芽球コロニー形成単位（CFU-E）、赤芽球バースト形成単位（BFU-E）、顆粒球マクロファージコロニー形成単位（CFU-GM）及び顆粒球赤血球単球巨核球コロニー形成単位（CFU-GEMM）のクローン性前駆細胞］の分化能に対する elotuzumab の影響を検討した。3 名の健康成人から採取したヒト骨髄細胞を 5、20、100 及び 500 μg/mL の elotuzumab 又は陰性対照抗体 IgG1 の存在下で 2 週間培養し、幹細胞（SLAMF7+及び CD56+、CD34+、CD8+、CD45+又は CD138+）に対する影響を試験終了までに形成された赤芽球系及び骨髄系コロニーの状態及び数により評価した。培養には幹細胞因子（50 ng/mL）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（10 ng/mL）、インターロイキン 3（10 ng/mL）及びエリスロポエチン（3 U/mL）を添加したメチルセルロース培地を用いた。

Elotuzumab は、評価した最高用量（500 μg/mL）まで造血前駆細胞の増殖並びに赤芽球系（CFU-E 及び BFU-E）及び骨髄系（CFU-GM 及び CFU-GEMM）コロニーの形成に対照培養と比較して有意な影響を及ぼさなかった。

8.4 ヒト全血を用いた溶血性試験

8.4.1 ヒト全血を用いた HuLuc63（elotuzumab）の溶血性試験

（試験番号：TR[redacted]47【モジュール 2.6.7 表 2.6.7.17】、【モジュール 4.2.3.7.7-4】）

Elotuzumabのヒト全血に対する適合性を溶血性試験により検討した。希釈したヒト全血を、各濃度（2、5 及び 10 mg/mL）の elotuzumab 希釈液 5.0 mL に対して 0.1 mL の割合で加えた。混合液を 37 ± 2ºC で約 60 分間培養し、遠心分離して得た上清の吸光度（545 nm）で溶血性を評価した。各上清から 3 試料を採取し、吸光度測定により溶血度（%）を算出した。

対照として、5 mL の 0.1%炭酸ナトリウム溶液（陽性対照）又は 5 mL の 0.9%塩化ナトリウム溶液（陰性対照）に、それぞれ 0.1 mL の希釈血液を加えた。本試験条件下では、5%以上の溶血率を溶血反応陽性（全血不適合）と判定した。

濃度 2、5 及び 10 mg/mL の elotuzumab を加えて 60 分間培養した全血から得たいずれの上清にも溶血はみられなかった。また、陰性対照（0.9%塩化ナトリウム溶液）では溶血はみられず、陽性対照（0.1%炭酸ナトリウム溶液）では 100%溶血がみられた。したがって、elotuzumab はヒト全血に対して溶血性を示さず、ヒト血液適合性が認められると判定した。

8.5 免疫原性

サルの探索的単回持続静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験では、免疫原性の評価は実施していないが、各検査項目に免疫原性に関連すると考えられる所見（変化）はみられなかった。Elotuzumab はヒト化抗体であるため、ヒトで免疫関連の有害な反応が発現する可能性は低いと考えられる。

9 考察及び結論

Elotuzumab は骨髄腫細胞及び正常な白血球サブセットのみに発現するヒト SLAMF7 に結合する。Elotuzumab の非臨床安全性試験では、毒性試験に使用可能な動物種選択のための結合性試験として、①カニクイザル、アカゲザル、ミニブタ、イヌ、ウサギ、ラット及びマウス組織の IHC 分析、②ELISA 法によるチンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル由来の精製遺伝子組換え SLAMF7 Fc 融合蛋白の分析、③チンパンジー、カニクイザル、アカゲザル及びマウスの完全長 SLAMF7 を表面に発現させた異種培養細胞を用いたフローサイトメトリー測定による分析、④正常チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル全血を用いたフローサイトメトリー測定による分析を実施した。霊長類の間で SLAMF7 蛋白のアミノ酸配列は高度に保存されているが（ヒト SLAMF7 蛋白との相同性はチンパンジーで 98%、カニクイザルで 90%、アカゲザルで 89%）、結合性試験結果の総合的な評価から elotuzumab は非ヒト霊長類の SLAMF7 には結合せず、毒性試験で一般的に用いるイヌ、ミニブタ、ウサギ、ラット及びマウスの SLAMF7 にも結合しないことが示された。

上記の結果から、elotuzumab はヒト SLAMF7 蛋白のみに結合し、また、ヒト SLAMF7 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの使用については、休止 T 細胞及び活性化 T 細胞のいずれにもヒトと同様のヒト SLAMF7 の発現が認められなかったことから、毒性評価に用いる代替動物として適切でないと考えられた。elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、毒性試験に適した動物種及びトランスジェニック動物モデルが存在しないことが示唆された。したがって、非臨床安全性評価として主に *in vitro* 安全性評価及びアカゲザルの探索的単回投与試験を実施し、本薬の選択性及び潜在的な毒性を検討した。すなわち、GLP 適合下でウサギの局所刺激性試験、ヒト全血の溶血性試験及びヒト組織パネルを用いたヒト正常組織の交差反応性試験を実施し、更に、アカゲザルを用いた探索的単回静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験で elotuzumab の標的外作用について検討した。また、その他の探索的免疫毒性試験として、elotuzumab のヒト全血における白血球サブセット枯渇及びヒト骨髄幹細胞分化能への影響を検討するための *in vitro* 試験を実施した。

ヒト組織パネルを用いた組織交差反応性試験（GLP 適合）では、elotuzumab の反応が複数の組織における形質細胞及び免疫芽細胞の細胞膜及び細胞質にみられた。形質細胞及び免疫芽細胞にみられた染色は、正常ヒト形質細胞及び免疫芽細胞（形質細胞へ分化途中の B 系列細胞）に発現することが知られている SLAMF7 が elotuzumab によって認識されたものと考えられた。評価したヒト組織において、上記の形質細胞及び免疫芽細胞以外には elotuzumab の特異的な交差反応性はみられなかった。Elotuzumab を 0、30 及び 100 mg/kg の用量でアカゲザルに投与した探索的単回静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験では、最高用量の 100 mg/kg（AUC：335～447 mg•h/mL）まで elozutumab 投与に関連した影響はみられなかった。これらの結果より、elotuzumab が標的外作用を発現する可能性は低いと考えられた。

ウサギを用いた局所刺激性試験では、5 mg/mL の elotuzumab を単回静脈内投与しても刺激性は認められず、elotuzumab の局所刺激性は低いことが示唆された。

ヒト全血を用いた溶血性試験では、elotuzumab は評価した最高濃度（10 mg/mL）まで溶血を起こさなかった。ヒト全血における elotuzumab の影響による白血球サブセットの細胞数減少の可能性を検討した *in vitro* 試験では、elotuzumab を 100 及び 200 µg/mL の濃度で反応させても T 細胞（CD3+、CD4+、CD8+）及び B 細胞を減少させなかったが、NK 細胞数を平均 20%（0～45%）まで減少させた。更に、造血幹細胞の赤芽球系及び骨髄系細胞への分化に関し、評価した elotuzumab の最高用量 500 µg/mL まで影響はみられなかった。したがって、ヒト全血及び骨髄を用いた試験結果より、elotuzumab は、その薬理作用に関連すると考えられる NK 細胞の減少を除き、全血及び骨髄の白血球を減少させる可能性は低いことが示された。

以上より、elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、毒性試験に適した動物種が存在しないことから、非臨床安全性評価として主に *in vitro* 安全性評価（組織交差反応性試験並びにヒト全血及び骨髄を用いた試験）及び限定的な *in vivo* 試験を実施し、本薬の選択性及び潜在的な毒性を検討した。これらの非臨床毒性試験の結果から、臨床における進行期悪性腫瘍患者を対象とした elotuzumab 投与の安全性が懸念される所見はみられなかった。

10 参考文献

1 Generation of hCS1 transgenic mice (Study [redacted]940). Bristol-Myers Squibb Company; 20[redacted]. Document Control No. 930084495.

2 Zonder JA, Mohrbacher AF, Singhal S, et al. A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. Blood. 2012; 120:552-559.

3 Vaidyanathan A, Mckeever K, Anand B, et al. Developmental immunotoxicology assessment of rituximab in cynomolgus monkeys. Toxicol. Sci. 2011; 119:116-125.

4 Decker M, Rothermundt C, Hollander G, et al. Rituximab plus CHOP for treatment of diffuse large B-cell lymphoma during second trimester of pregnancy. Lancet Oncol. 2006; 7:693-694.

5 Friedrichs B, Tiemann M, Salwender H, et al. The effects of rituximab treatment during pregnancy on a neonate. Haematologica. 2006; 91:1426-1427.

6 Klink DT, van Elburg RM, Schreurs MW, et al. Rituximab administration in third trimester of pregnancy suppresses neonatal B-cell development. Clin Dev Immunol. 2008; 271363:1-6.

7 Kimby E, Sverrisdottir A, and Elinder G. Safety of rituximab therapy during the first trimester of pregnancy: a case history. Eur J Haematol. 2004; 72:292-295.

8 Cruz-Munoz ME, Dong Z, Shi X, et al. Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function. Nat Immunol. 2009; 10:297-305.

9 De Calisto J, Wang N, Wang G, et al. SAP-dependent and -independent regulation of innate T cell development involving SLAMF receptors. Fron Immunol. 2014; 5:1-14.

10 Sharma S. Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss. Int J Dev Biol. 2014; 58:219-229.

11 Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. Vaccine. 2003; 21: 3365-3369.

12 van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. Vaccine. 2003; 21: 3374-3376.

13 レブラミド®カプセル 5mg（レナリドミド） 添付文書, 第 9 版. 2015.

14 ベルケイド®注射用 3mg（ボルテゾミブ） 添付文書, 第 8 版. 2013.

Table 2.6.7.1: Toxicology: Overview

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses/ Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Study No./ Document Control No.	Location in Dossier
Single-Dose Toxicity								
	Monkey/ rhesus	IV	1 day	0, 30, 100 mg/kg	nonGLP[a]	[redacted]	TR[redacted]50/ 930046731; Report and Amendment 1	4.2.3.1
Local Tolerance								
	Rabbit/ NZW	IV	1 day	5 mg	GLP	[redacted]	TR[redacted]50/ 930046306	4.2.3.6
Other Toxicity Studies								
Cross-reactivity	Normal human and nonhuman tissues	In vitro	NA	1.5 µg/mL	nonGLP	PDL BioPharma	RTR12/ 930046207	4.2.3.7.7
Cross-reactivity	nonhuman primate SLAMF7	In vitro	NA	0.1-100 µg/mL	nonGLP	PDL BioPharma	RTR18/ 930046216	4.2.3.7.7
Cross-reactivity	nonhuman primate blood	In vitro	NA	20 µg/mL	nonGLP	PDL BioPharma	RTR21/ 930046209	4.2.3.7.7
Cross-reactivity	Normal human/ Chimpanzee and Rhesus Monkey	In vitro	NA	0.5-20 µg/mL	GLP	[redacted]	TR[redacted]52/ 930046277	4.2.3.7.7
Cross-reactivity	Normal human tissues	In vitro	NA	3, 10 µg/mL	GLP	[redacted]	TR[redacted]51/ 930046278	4.2.3.7.7

Table 2.6.7.1: Toxicology: Overview (Continued)

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses/ Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Document No./ Document Control No.	Location in Dossier
Other Toxicity Studies (Continued)								
Hemolysis Assay	Human whole blood	In vitro	NA	2, 5, 10 mg/mL	GLP	[redacted]	TR[redacted]47/ 930046381	4.2.3.7.7
Effects on Lymphocyte Subsets	Human whole blood	In vitro	NA	100 or 200 µg/mL	nonGLP	PDL BioPharma	RTR19/ 930046386	4.2.3.7.2
Bone Marrow Assay	Bone marrow	In vitro	NA	5, 20, 100, 500 µg/mL	nonGLP	[redacted]	RTR20/ 930046483	4.2.3.7.2

[a] This study was an exploratory study and was conducted in accordance with Covance Standard Operating Procedures and generally recognized good laboratory practices. Although conducted as nonGLP, the protocol, histopathology processing, raw data, and final report were reviewed for quality control purposes by the Covance Quality Assurance Unit.

Abbreviations: Covance = Covance, Vienna, Virginia; CRL PAI = Charles River Laboratories - Pathology Associates, Frederick, Maryland; IV = Intravenous; NA = Not applicable; NZW = New Zealand White; PDL BioPharma = PDL BioPharma, Inc., Fremont, California; Stem Cell Tech = Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.2: Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study No./ Document Control No.	Location in Dossier
Single-dose IV infusion toxicity and toxicokinetic	Monkey	IV	0, 30, 100	nonGLP[a]	TR[redacted]50/930046731; Report and Amendment 1	4.2.3.1

[a] This study was an exploratory study and was conducted in accordance with Covance Standard Operating Procedures and generally recognized good laboratory practices. Although conducted as nonGLP, the protocol, histopathology processing, raw data, and final report were reviewed for quality control purposes by the Covance Quality Assurance Unit.

Abbreviation: IV = Intravenous

Table 2.6.7.3A: Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data

Dose (mg/kg)	Method of Administration	Study Duration	Steady-State Cmax(mg/mL)							
			Mice		Rats		Rabbits	Monkeys		Humans
			M	F	M	F	F	M	F	
10	IV	NA[a]	-	-	-	-	-	-	-	0.430
30	IV	1 day[b]	-	-	-	-	-	0.64	0.64	-
100	IV	1 day[b]	-	-	-	-	-	1.66	2.07	-

Source Data: Document Control No. 930046731, 930090266

[a] The recommended human dose of elotuzumab is 10 mg/kg administered IV every week for 2 initial cycles (28 days per cycle) and every 2 weeks thereafter. The value reflects systemic exposure (steady-state) for elotuzumab when given at 10 mg/kg every other week.

[b] Six adult Rhesus monkeys were randomly assigned to 3 dose groups: control (N = 2), 30 mg/kg (N = 2), and 100 mg/kg (N = 2). Each dose group was assigned with 1 male and 1 female monkey. Elotuzumab toxicokinetics was described by a two-compartmental modeling of concentration-time data collected after the dose administration up to Day 22. Although the ADA measurement was not conducted in the study, elotuzumab appeared to be immunogenic in the study, therefore concentration results for samples collected on Days 36 and 43 were excluded from the toxicokinetic analysis to minimize the potential impact of the ADA.

Abbreviations: - = Not evaluated in this species; ADA = Anti-drug antibody; Cmax = Maximum drug concentration; IV = Intravenous; NA = Not applicable

Table 2.6.7.3B: Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data

Dose (mg/kg)	Method of Administration	Study Duration	Steady-State AUC(INF)(mg•h/mL)							
			Mice		Rats		Rabbits	Monkeys		Humans
			M	F	M	F	F	M	F	
10	IV	NA[a]	-	-	-	-	-	-	-	100.8
30	IV	1 day[b]	-	-	-	-	-	194	118	-
100	IV	1 day[b]	-	-	-	-	-	335	447	-

Source Data: Document Control No. 930046731, 930090266

[a] The recommended human dose of elotuzumab is 10 mg/kg administered IV every week for 2 initial cycles (28 days per cycle) and every 2 weeks thereafter. The value reflects systemic exposure (steady-state) for elotuzumab when given at 10 mg/kg every other week.

[b] Six adult Rhesus monkeys were randomly assigned to 3 dose groups: control (N = 2); 30 mg/kg (N = 2), and 100 mg/kg (N = 2). Each dose group was assigned with 1 male and 1 female monkey. Elotuzumab toxicokinetics was described by a two-compartmental modeling of concentration-time data collected after the dose administration up to Day 22. Although the ADA measurement was not conducted in the study, elotuzumab appeared to be immunogenic in the study, therefore concentration results for samples collected on Days 36 and 43 were excluded from the toxicokinetic analysis to minimize the potential impact of the ADA.

Abbreviations: - = Not evaluated in this species; ADA = Anti-drug antibody; AUC(INF) = Area under the curve versus time curve to infinity; IV = Intravenous

Table 2.6.7.4: Toxicology: Drug Substance

Batch No.	Protein Concentration (mg/mL)	Purity/ Potency (%)	SE-HPLC Aggregate (%)	Type of Study	Study No./ Document Control No.
[redacted]02	-	-	-	Human bone marrow assay	RTR20/930046483
[redacted]01[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Hemolysis assay	TR[redacted]47/930046381
				Cross-reactivity with normal human, chimpanzee, and rhesus monkey tissues	TR[redacted]52/930046277
				Cross-reactivity with normal human tissues	TR[redacted]51/930046278
				Local tolerance in rabbit	TR[redacted]50/930046306
[redacted]76[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Single-dose toxicity and toxicokinetics in rhesus monkey	TR[redacted]50/930046731; Report and Amendment 1
[redacted]78[redacted]	[redacted]	-	[redacted]	Cross-reactivity with normal human, chimpanzee, and rhesus monkey tissues	TR[redacted]52/930046277
[redacted]20[redacted]	[redacted]	-	-	Cross-reactivity with immune subsets in nonhuman primate whole blood	RTR21/930046209
				Cross-reactivity with normal human and nonhuman tissues	RTR12/930046207
	-	-	-	Effects on lymphocyte subsets in human whole blood	RTR19/930046386
[redacted]88	-	-	-	Cross-reactivity with nonhuman primate rSLAMF7 proteins	RTR18/930046216

Abbreviations: - = Not specified; HPLC = High performance liquid chromatography; SE = Size exclusion, rSLAMF7 = Recombinant signaling lymphocyte activation molecule F7

Table 2.6.7.5: Single-Dose Toxicity

Species/Strain (GLP Compliance)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	No. per Group and Sex	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control No.
Monkey/Rhesus (Macaca mulatta) (nonGLP)	IV (20 mM sodium citrate, 120 mM sodium chloride, 0.05% Tween 80, pH 6)	0, 30, 100	1 M, 1 F	100	NA	Elotuzumab at 30 or 100 mg/kg was well tolerated. There were no elotuzumab-related findings in clinical observation, food consumption, body weight, hematology, coagulation, clinical chemistry, urinalysis, immunophenotyping, organ weight, or microscopic pathology. 30 mg/kg: AUC(INF) M and F 194 and 118 mg•h/mL, respectively. Cmax M and F 644 and 644 µg/mL, respectively. 100 mg/kg: AUC(INF) M and F 335 and 447 mg•h/mL, respectively. Cmax M and F 1,657 and 2,065 µg/mL, respectively.	TR[redacted]50/ 930046731; Report and Amendment 1

Abbreviations: AUC(INF) = Area under the concentration versus time curve to infinity; Cmax = Maximum drug concentration; IV = Intravenous; NA = Not applicable, M = Male, F = Female

Table 2.6.7.16: Local Tolerance

Species/Strain (GLP Compliance)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses	No. per Group and Sex	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control No.
Rabbit/NZW (GLP)	IV (20 mM sodium citrate, 120 mM sodium chloride, 0.05% Tween 80, pH 6.05)	5 mg/site (marginal ear vein)	6 F	Elotuzumab did not cause erythema or edema at 30 minutes, 3 hours, or 24 hours post dose. There were no elotuzumab-related macroscopic or microscopic findings. The occurrence of hemorrhage, vessel wall disruption, heterophil infiltrate and collagen degeneration likely resulted from the mechanical injury created by the intravenous injection procedure. These findings were primarily minimal and present at only the deposition sites of both ears. They were more prevalent and slightly more severe in the ears of the animals that received the vehicle.	TR[redacted]50/ 930046306

Abbreviations: IV = Intravenous; NZW = New Zealand White, F = Female

Table 2.6.7.17: Other Toxicity Studies

Species/Strain (GLP Compliance)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Dose or Concentration	No. Donors	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control No.
Cross-reactivity Studies						
nonhuman primate rSLAMF7 (nonGLP)	In vitro	NA	0.1-100 µg/mL	NA	Elotuzumab did not bind to SLAMF7-Fc fusion proteins from cynomogus or rhesus monkey, chimpanzee, or mouse as measured by ELISA. Elotuzumab did not bind to mouse, rhesus or cynomolgus monkey, or chimpanzee SLAMF7 expressing transfected cells as measured by flow cytometry. Positive control staining was detected between elotuzumab and human SLAMF7.	RTR18/ 930046216
nonhuman primate whole blood (nonGLP)	In vitro	NA	20 µg/mL	5 - 7	Elotuzumab exhibited no binding to NK, NKT, CD8+ T cells, or monocytes from cynomolgus or rhesus monkey, or chimpanzee; and no binding was observed to CD4+ Tcells from chimpanzee. Elotuzumab binding to cynomolgus and rhesus monkey B cells was highly variable and nonspecific.	RTR21/ 930046209
Normal human and non-human tissues (nonGLP)	In vitro	NA	1.5 µg/mL	NS	Elotuzumab did not bind to tissues from cynomolgus or rhesus monkey, pig, rat, mouse, rabbit, or dog using immunohistochemistry. Positive staining was observed in human tissue (tonsil, spleen, lymph node, colon, trigeminal ganglion).	RTR12/ 930046207
Normal human, chimpanzee and Rhesus monkey (GLP)	In vitro	NA	0.5-20 µg/mL	NS	Elotuzumab did not bind to chimpanzee or rhesus monkey tissues evaluated using immunohistochemistry. Positive control staining was observed for human tonsil.	TR[redacted]52/ 930046277

Table 2.6.7.17: Other Toxicity Studies (Continued)

Species/Strain (GLP Compliance)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Dose or Concentration	No. Donors	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control No.
Cross-reactivity Studies (Continued)						
Normal human tissues (GLP)	In vitro	NA	3, 10 µg/mL	3	Using a comprehensive panel of approximately 36 normal human tissues from at least 3 donors, elotuzumab demonstrated reactivity using immunohistochemistry with cell membranes and/or cytoplasm of variable numbers of plasma cells and/or immunoblasts in multiple tissues including bone marrow, breast, gastrointestinal tract (colon [large intestine], esophagus, small intestine, stomach), liver, lymph node, Fallopian tube (oviduct), pancreas, salivary gland, spleen, thymus, thyroid, tonsil, ureter, uterus (body [endometrium], cervix). Staining of the plasma cells and immunoblasts was expected as the epitope (SLAMF7) recognized by elotuzumab is expressed on plasma cells and immunoblasts (B-lineage cells in the process of differentiating into plasma cells). There was no specific cross-reactivity with any other tissue element in any of the human tissues examined.	TR[redacted]51/ 930046278
Bone Marrow Colony Assay						
Bone marrow (nonGLP)	In vitro	NA	5, 20, 100, 500 µg/mL	3	In a bone marrow differentiation assay, there was no significant effect of elotuzumab (≤ 500 µg/mL) on hematopoietic progenitor proliferation and the formation of erythroid (CFU-E, BFU-E) or myeloid (CFU-GM, CFU-GEMM) colonies when compared to control cultures.	RTR20/ 930046483

Table 2.6.7.17: Other Toxicity Studies (Continued)

Species/Strain (GLP Compliance)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Dose or Concentration	No. Donors	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control No.
Effects on Human Whole Blood						
Human whole blood (nonGLP)	In vitro	NA	100 or 200 µg/mL	8	Elotuzumab did not result in a substantial depletion of leukocyte subsets in human whole blood. No effect was observed on total lymphocytes, CD3, CD4, CD8, and B- and memory B cell counts in all donors (N = 8). In samples from 5 of 8 donors, some reduction in NK cell numbers was observed at both doses of elotuzumab: in 4 samples, a decrease of 20% to 30% and in 1 sample a decrease of 45% in the NK cells numbers was observed. The controls performed as expected; in rituximab-treated whole blood cultures, the total B cell counts decreased by an average of 70%, in alemtuzumab-treated cultures all lymphocytes were depleted, and in MSL109-treated cultures (negative/isotype control) values were comparable to cultures treated with buffer alone.	RTR19/ 930046386

Table 2.6.7.17: Other Toxicity Studies (Continued)

Species/Strain (GLP Compliance)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Dose or Concentration	No. Donors	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control No.
Hemolysis Assay						
Human whole blood (GLP)	In vitro	NA	2, 5, 10 mg/mL	1	No evidence of hemolysis was present in the supernatants prepared from whole blood mixtures containing elotuzumab at concentrations of 2, 5, and 10 mg/mL for 60 minutes. The negative control (0.9% sodium chloride) caused no hemolysis and the positive control (0.1% sodium carbonate) caused 100% hemolysis. Elotuzumab did not cause hemolysis of human whole blood and was thus considered to be compatible with human blood.	TR[redacted]47/ 930046381

Abbreviations: BFU-E = Burst forming unit - erythrocyte; CFU-E = Colony forming unit - erythrocyte; CFU-GM = Colony forming unit - granulocyte/monocyte; CFU-GEMM = Colony forming unit - granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte; ELISA = Enzyme-linked immunosorbant assay; Fc = Fragment crystalizable region; IV = Intravenous; NA = Not applicable; NK = Natural killer; NKT = Natural killer T; NS = Not specified; SLAMF7 = Signaling lymphocyte activation molecule F7; rSLAMF7 = recombinant Signaling lymphocyte activation molecule F7