サノフィ株式会社

ザルトラップ点滴静注 100mg／同 200mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.6 毒性試験の概要文

Total number of pages: 64

目　　次

略号と用語の定義 5

1　まとめ 6

2　単回投与毒性試験 14

2.1　ラットを用いた探索的単回静脈内投与毒性試験 14

2.2　ラットを用いた単回静脈内投与毒性試験 14

3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 16

3.1　げっ歯類 16

3.1.1　マウス 16

3.1.1.1　CD-1 マウス 16

3.1.1.2　SCID マウス 17

3.1.2　ラット 18

3.1.2.1　探究的試験 18

3.1.2.2　3 ヵ月間反復皮下投与毒性試験 20

3.2　サル 23

3.2.1　静脈内投与 23

3.2.1.1　4 週間反復投与毒性試験 23

3.2.1.2　13 週間反復投与毒性試験 25

3.2.1.3　6 ヵ月間反復投与毒性試験 28

3.2.2　皮下投与 32

3.2.2.1　4 週間反復投与毒性試験 32

3.2.2.2　13 週間反復投与毒性試験 34

4　遺伝毒性試験 37

5　がん原性試験（サポート目的のトキシコキネティクス評価を含む）..... 38

6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びサポート目的のトキシコキネティクス評価を含む）..... 39

6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験..... 39

6.2　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験..... 40

6.2.1　非妊娠ウサギを用いた 2 週間反復投与毒性試験..... 40

6.2.2　用量設定試験..... 41

6.2.3　胚・胎児発生に関する試験..... 43

6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験..... 46

6.4　幼若動物を用いた試験..... 46

7　局所刺激性試験..... 52

8　その他の毒性試験..... 53

8.1　Aflibercept のヒト組織交差反応性試験..... 53

8.2　溶血に対する影響..... 53

8.3　免疫原性..... 54

9　考察及び結論..... 56

参 考 文 献..... 64

表　目　次

表 1 - Aflibercept の毒性試験 8
表 2 - サル 4 週間静脈内投与時の遊離形 aflibercept の最高血清中濃度 24
表 3 - サル 13 週間静脈内投与時の遊離形 aflibercept の最高血漿中濃度 27
表 4 - サル 6 ヵ月間静脈内投与時の遊離形 aflibercept の最高血漿中濃度及び曝露量 31
表 5 - サル 4 週間皮下投与時の遊離形 aflibercept の最高血清中濃度 34
表 6 - サル 13 週間皮下投与時の遊離形 aflibercept の最高血清中濃度 36
表 7 - ウサギにおける遊離形及び結合形 aflibercept の最高血漿中濃度 41
表 8 - 妊娠ウサギにおける遊離形及び結合形 aflibercept の血漿中濃度 42
表 9 - トキシコキネティクスパラメータの要約 44
表 10 - サル 3 ヵ月間静脈内投与時の遊離形 aflibercept のトキシコキネティクスパラメータ 50
表 11 - 遊離形 aflibercept 量に基づく曝露量比 58

略号と用語の定義

A/G	Albumin/Globulin（アルブミン／グロブリン）
ADA	Anti-drug antibody（抗薬物抗体）
ALP	Alkaline phosphatase（アルカリホスファターゼ）
ALT	Alanine aminotransferase（アラニンアミノトランスフェラーゼ）
AST	Aspartate aminotransferase（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）
AUC	Area under the curve（血中濃度－時間曲線下面積）
$AUC_{0.5\text{-}72h}$	Area under the curve from 0.5 h to 72 hour（0.5 時間から 72 時間までの血中濃度－時間曲線下面積）
BLQ	Below the limit of quantification（定量限界未満）
BUN	Blood urea nitrogen（血中尿素窒素）
CHO	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
C_{max}	Maximum plasma concentration（最高血漿中濃度）
CTx	C-telopeptide（C-テロペプチド）
FSH	Follicule stimulating hormone（卵胞刺激ホルモン）
GGT	Gamma glutamyl transferase（γ-グルタミルトランスフェラーゼ）
GLP	Good laboratory practices（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準）
Ig	Immunoglobulin（免疫グロブリン）
LH	Luteinizing hormone（黄体化ホルモン）
NC	Not calculated（算出せず）
NTx	N-telopeptide（N-テロペプチド）
SCID mice	Severe combined immunodeficient mice（重度複合免疫不全症マウス）
SD	Sprague Dawley
$t_{1/2}$	Elimination half-time（消失半減期）
T_{max}	First time to reach C_{max}（最高血漿中濃度到達時間）
VEGF	Vascular endothelial growth factor（血管内皮増殖因子）
VEGF Trap	Aflibercept, AVE0005（aflibercept、AVE0005）

1　まとめ

Aflibercept（血管内皮増殖因子 [VEGF] Trap）の全身投与は、癌患者の治療を目的としたものである。VEGF Trap 全身投与による臨床試験を実施するため、また VEGF Trap の高い全身曝露量における毒性に関する情報を提供するため、全身投与経路（静脈内及び皮下）を用いた毒性試験を実施した。Aflibercept は主に静脈内投与経路で患者に投与されているが、いくつかの早期臨床試験は皮下投与経路で実施した。両方の経路での患者への投与をサポートするため、サルを用いた 1 ヵ月間及び 3 ヵ月間反復投与毒性試験を、静脈内及び皮下投与で実施した。いずれの投与経路でも毒性プロファイルが類似していたこと、後期臨床試験では静脈内投与に重点をおいたことから、サルを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験は静脈内投与のみで実施した。毒性試験プログラムにおける投与頻度は、静脈内投与では週 1 回から 2 週に 1 回、皮下投与では週 2 回から週 3 回の範囲であり、これは予定している臨床投与スケジュール（2 週に 1 回又は 3 週に 1 回）を支持するものである。

本資料に要約した癌患者の治療を目的とした aflibercept の使用をサポートするための毒性試験プログラムを表 1に概説する。すべての毒性試験の概要表を、2.6.7 毒性試験の概要表 [Module 2.6.7.1]に示す。本プログラムは、ICH S6「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」及び ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」 に従って作成した。

In vitro 試験から算出した平衡解離定数に基づくと、aflibercept は、マウス、ラット及びウサギのようなヒト以外の動物種の VEGF/P1GF リガンドファミリーメンバーと高い親和性で結合する。したがって、これらの動物種は毒性試験に使用可能であると考えられた。しかしながら、免疫応答性を有するげっ歯類及び免疫不全のげっ歯類を用いて実施した探索的試験において、aflibercept は免疫応答性を有するげっ歯類で強度の免疫応答を誘発したことから、げっ歯類を用いた反復投与時の毒性評価は適切ではないと考えられた。カニクイザルはヒトとの VEGF のアミノ酸配列が同一であること（したがって aflibercept との親和性が同等であること）並びに免疫原性応答がより低いことから、aflibercept の毒性評価に適切な動物種と考えられた。ウサギにおける aflibercept のトキシコキネティクスプロファイル及び中等度の免疫原性に基づき、胎児発生に及ぼす aflibercept の影響の有無を評価するためのモデルとして、ウサギは適切であることが示された。

全身毒性を評価するための静脈内又は皮下投与による試験

包括的な単回投与毒性試験並びに静脈内及び皮下投与による反復投与毒性試験を、マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いて実施した。

マウス及びラットでは、投与開始後一週間以内に、抗薬物抗体（ADA）産生を伴う aflibercept 関連の糸球体腎炎が発現したため、全身毒性を検討するための長期反復投与毒性試験には適切でないと判断した。したがって、全身毒性性評価のための主要な動物種として、カニクイザルを使用した。

サルを用いた aflibercept の反復投与毒性試験を、1.5～30 mg/kg での週 2～3 回の 4～13 週間皮下投与（[redacted]223.4 試験及び [redacted]223.09 試験）又は 0.5～30 mg/kg での週 1 回若しくは 2 週に 1 回の 4～27 週間静脈内投与（[redacted]223.11 試験、[redacted]223.18 試験、 670145 試験及び 670144 試験）により実施した。これらの試験において、遊離形 aflibercept（循環血中における遊離形 aflibercept の標的リガンドである VEGF と結合して生成する結合形 aflibercept に加えて検出されうる）への曝露により、全身毒性（骨、腎臓、副腎、卵巣及び鼻腔などの所見）が観察された。これらはこのクラスの薬物を全身投与したときに想定されるものである。

雌雄の受胎能への影響を、長期反復投与毒性試験の一環として評価した。この試験では、aflibercept を 3.0～30 mg/kg/回でサルに 27 週間反復静脈内投与した（670145 試験）。卵巣機能及び卵胞発達の消失並びに精子運動能低下及び精子異常の増加が、aflibercept のすべての用量で認められたが、これらの変化はいずれも可逆的なものであった。Aflibercept による母動物毒性及び胚・胎児発生への影響を評価するため、妊娠ウサギに aflibercept を 3、15、60 mg/kg/回で妊娠 6、9、12、15 及び 18 日目に静脈内投与した（TER0506 試験）。Aflibercept による母動物毒性が 15 mg/kg/回以上で、流産及び被験物質関連の着床後胚損失数（早期吸収胚数）増加が 60 mg/kg/回で、外表、内臓又は骨格奇形がすべての用量で認められた。母動物の無毒性量（無毒性量）は 3 mg/kg/回と判断されたが、胎児の無毒性量は決定できなかった。

表 1 - Aflibercept の毒性試験

動物種（系統）	投与経路及び投与方法	投与期間	用量 (mg/kg/回)	GLP 適用	試験番号（表 Module）
単回投与毒性試験					
ラット（SD）	静脈内、30 分間点滴	単回投与	0、150、500	非適用	TXP0166 (2.6.7.5)
ラット（SD）	静脈内、30 分間点滴	単回投与	0、50、150、500	適用	TXA1004 (2.6.7.5)
反復投与毒性試験					
マウス（CD-1）	皮下、週 3 回	4 週間	0、10、15	非適用	PK01017 (2.6.7.6)
マウス（SCID）	皮下、週 2 回	4 又は 8 週間	0、2.5、25	非適用	VGT3 (2.6.7.6)
ラット（SD）	皮下、週 3 回	4 週間	0、10、15	非適用	PK01027 (2.6.7.6)
ラット（SD）	皮下、週 3 回	4 週間	0、2、5	非適用	PK01034 (2.6.7.6)
ラット（SD）	皮下、週 3 回	4 週間	0、0.5、1	非適用	PK01042 (2.6.7.6)
ラット（ヌード）	皮下、週 2 回	4 又は 8 週間	0、25	非適用	PK01032 (2.6.7.6)
ラット（SD）	皮下、週 3 回	4 又は 13 週間	0、0.1、0.5、1、2	適用	0470RR20-001 (2.6.7.7A)
サル（カニクイ）	静脈内、週 1 回	4 週間	0、2、10、30	適用	[redacted]223.11 (2.6.7.7B)
サル（カニクイ）	静脈内、週 1 回	4 又は 13 週間	0、3、10、30	適用	[redacted]223.18 (2.6.7.7C)
サル（カニクイ）	静脈内 最初の 15 週間は週 1 回、その後は 2 週に 1 回	27 週間	0、3、10、30	適用	670145 (2.6.7.7D)
サル（カニクイ）	皮下、週 3 回	4 週間	0、1.5、5、15	適用	[redacted]223.4 (2.6.7.7E)
サル（カニクイ）	皮下、週 2 回	13 週間	0、1.5、5、15、30	適用	[redacted]223.09 (2.6.7.7F)

表 1 - aflibercept の毒性試験（続き）

動物種（系統）	投与経路及び投与方法	投与期間	用量 (mg/kg/回)	GLP 適用	試験番号
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験					
サル（カニクイ）	静脈内 最初の 15 週間は週 1 回、その後は 2 週に 1 回	27 週間	0、3、10、30	適用	670145
胚・胎児発生に関する試験					
ウサギ（NZW）	静脈内	妊娠 1、4、7、10、13 日目	0、15、30、45	非適用	DSE 20[redacted]-0569 - DIV0953
ウサギ（NZW）	静脈内	妊娠 6、9、12、15、18 日	0、3、15、45	非適用	TEP0184
ウサギ（NZW）	静脈内	妊娠 6、9、12、15、18 日	0、3、15、60	適用	TER0506
幼若動物を用いた試験					
サル（カニクイ）	静脈内、週 1 回	13 週間	0、0.5、3、30	適用	670144
局所刺激性試験					
ウサギ（NZW）	静脈内、筋肉内、皮下	-	24.4、25、100 mg/mL	適用	DSE 20[redacted]-0387 (TOL1079)
ヒト組織交差反応性試験					
ヒト組織	In vitro	-	5.0、25.0 µg/mL	適用	[redacted]01-141
溶血性及び凝集性試験					
サル血液	In vitro	-	0.69、2.09、4.17 mg/mL	非適用	HEM-No1
ヒト血液	In vitro	-	0.5、2.0、4.0 mg/mL	非適用	HEM-No3
ヒト血液	In vitro	-	8.0 mg/mL	非適用	HEM-No5

略語：NZW：ニュージーランドホワイト、-：該当せず

静脈内又は皮下投与経路で実施した in vivo 毒性試験において使用した aflibercept の投与液は、[redacted]% 精製白糖及び[redacted]%ポリソルベート 20 又は[redacted]%精製白糖及び[redacted]%ポリソルベート 20 を含有する生理食塩液を用いた溶液であった。臨床試験用製剤も同じ添加剤を含有する。

ラットを用いた単回投与毒性試験、サル及びラットを用いた反復投与毒性試験、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験並びにウサギを用いた局所刺激性試験及びヒト組織交差反応性試験は、いずれも医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従って実施した。本資料に要約した他の試験（免疫応答性及び免疫不全のマウス及びラットにおける毒性プロファイル、ラットを用いた単

回投与毒性試験の一試験、非妊娠ウサギを用いた 14 日間投与試験、妊娠ウサギを用いた用量設定試験並びに溶血に対する aflibercept の影響）は探索的試験であり、GLP には準拠しなかったが、これらの試験の信頼性に影響を及ぼした可能性のある予期しない事態は認められなかった。

さらに、他の適応症をサポートするための毒性試験も実施しており、それらの試験では VEGF Trap の硝子体内投与を実施した。また、sanofi-aventis が開発していた抗血管剤（[redacted]）との併用投与によるラットを用いた 2 つの試験（1 つは単回投与毒性試験、1 つは単回投与安全性薬理試験）を実施した。これらの試験は本申請の目的に沿わないため、本資料には記載しなかった。

単回投与毒性試験：

Aflibercept の 0、50、150、500 mg/kg を Sprague Dawley（SD）ラットに単回静脈内投与（30 分間の点滴静脈内投与）したところ、注射部位（尾静脈）の病変及びごく軽度の摂餌量減少を伴う中等度の平均体重増加量減少が、すべての投与群の雄に認められた。死亡例は無く、致死量は決定できなかった。一般状態観察に基づく無毒性量は 150 mg/kg と判断された。

反復投与毒性試験：

Aflibercept の 10 及び 15 mg/kg/回を CD-1 マウスに週 3 回、4 週間皮下投与したところ、死亡及び腎臓の病理組織学的所見（メサンギウム係蹄の腫大、メサンギウム基質内の好酸性物質沈着、メサンギウム細胞数の増加、糸球体の毛細血管ループの肥厚及び一部置換並びに散在性の尿細管拡張を所見とする糸球体腎炎）がみられ、ADA も認められた。Aflibercept の 2.5 又は 25 mg/kg/回を週 2 回、4 又は 8 週間投与した免疫不全の SCID マウスでは、aflibercept に関連した同様の腎臓の変化は認められなかった。しかし、SCID マウスでは、いずれの用量においても、8 週間投与後に赤血球パラメータ増加、出血又はうっ血がみられた。

SD ラットに aflibercept を週 3 回、4 週間皮下投与したところ、10 mg/kg/回以上で死亡がみられ、腎糸球体及び尿細管の変化が 2 mg/kg/回以上で認められた。この所見は免疫応答の発現に関連するものと考えられ、それを裏づける変化として、aflibercept に対する抗体産生及びそれに伴う血清中 aflibercept 濃度の減少が認められた。ヌードラット（部分的免疫抑制）に aflibercept を 25 mg/kg/回で週 2 回、4 又は 8 週間投与したところ、SD ラットでみられたのと同様の腎臓の所見が発現したが、IgG 応答は検出されなかった。しかし試験期間中に aflibercept の血中濃度が減少したことから、この変化は恐らく今回用いた測定法では検出されない特異的な抗体（IgM 又は IgA）が生成されたことによるものと考えられる。これらのデータに基づくと、ADA を産生する正常な免疫応答性のげっ歯類でみられた aflibercept の腎毒性は、少なくとも部分的には、腎糸球体における免疫複合体の沈着に起因すると考えられる。

SD ラットに aflibercept の 0.1、0.5、1.0、2.0 mg/kg/回を週 3 回、4 又は 13 週間皮下投与したときの主要な被験物質関連所見は、1 及び 2 mg/kg/回における一般状態の悪化及び死亡であり、2 mg/kg/回の雄では体重及び摂餌量の減少が認められた。最も顕著な病理組織学的所見は 0.1 mg/kg/回を上回る用量でみられた腎臓の変化（尿細管の蛋白円柱、散発的な糸球体メサンギウムの分節状肥厚及び尿細管上皮細胞の好塩基性化を特徴とする腎症）であり、1 及び 2 mg/kg/回では血中尿素窒素（ BUN）及び尿蛋白の増加並びに血清アルブミンの減少も認められた。SD ラットでみられた aflibercept の腎毒性は、少なくとも部分的には腎糸球体における免疫複合体沈着によるものと考えられた。大腿骨の病理組織学的変化（骨梁及び骨幹端毛細血管の減少又は喪失、皮質骨の菲薄化）が、1 及び 2 mg/kg/回で観察された。13 週間投与による無毒性量は 0.1 mg/kg/回と考えられた。

Aflibercept の反復投与（静脈内経路では 1 回／2 週投与で最長 6 ヵ月間、皮下経路では 2～3 回／週投与で最長 3 ヵ月間）による毒性プロファイルを、成熟サルでも評価した。主要な被験物質関連の病理組織学的所見が、骨、鼻腔、腎臓、卵巣及び副腎で観察された。骨では、aflibercept に起因した主な変化として、成長板の肥厚及び骨軟骨性外骨腫が認められた。外骨腫は中軸骨格及び付属肢骨格にみられ、一般状態観察では円背位も認められた。さらに、不可逆的な脊柱後弯症、椎骨関節面の変形性関節症並びに大腿骨／腸骨の骨膜反応の頻度増加が X 線検査で観察された。鼻腔では呼吸上皮及び嗅上皮の変性／再生並びに鼻中隔又は鼻甲介の萎縮／喪失がみられ、しばしば出血及び化膿性滲出物を伴っていた。腎臓の病理組織学的所見（糸球体メサンギウム基質増加）に伴って、少数の動物で血清総蛋白及びアルブミンの減少並びに血清 BUN、尿中蛋白又はミクロアルブミンの増加が認められた。卵巣では成熟卵胞数、顆粒膜細胞数又は莢膜細胞数の減少がみられ、それに伴って雌性生殖機能が全般的に抑制された。副腎では、細胞質好酸性化を伴う束状帯の空胞形成減少が観察された。また巣状の血管増生／変性が、少数例のサルにおいて特に消化器系、膀胱、心臓及び脳を含む広範囲の器官に認められた。肝酵素の増加が少数例のサルでみられ、門脈の炎症及び壊死を伴っていた。Aflibercept の投与により、精子運動能の低下及び精子形態異常の発現頻度増加も観察された。Aflibercept 関連の所見の多くは、検討した最低用量（1.5～3 mg/kg/回）でも認められた。骨軟骨性外骨腫、変形性関節症、鼻腔の所見並びに消化器系及び脳（脈絡叢）の血管変化を除いて、aflibercept 関連の病理組織学的所見は 5 ヵ月以内に回復した。

6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験で得られた最小毒性量の 3 mg/kg/回での遊離形 aflibercept の曝露量である平均最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）と、日本人癌患者に 4 mg/kg で初回静脈内投与したとき（TCD10794 試験）の対応する値との比率は、投与スケジュールの相違を考慮して補正すると、それぞれ 1.30 及び 1.29 であった（表 11）。

遺伝毒性試験及びがん原性試験：
遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。

生殖発生毒性試験：

Aflibercept をラット及びマウスに反復投与したところ、強度の免疫原性応答がみられたことから、これらの動物種を用いた生殖発生毒性試験は実施しなかった。

雌雄の受胎能パラメータに及ぼすaflibercept の影響を、雌雄の性成熟したカニクイザルを用いて、3、10 及び 30 mg/kg/回の週 1 回、15 週間投与及びその後 27 週目までの 2 週に 1 回投与により評価した。雌では、卵巣機能及び卵胞発達の消失が、検討したすべての用量で認められた。Aflibercept 誘発性の卵巣機能抑制は、最終投与後 3～18 週間以内に回復した。雄における主要な aflibercept 誘発性の変化として、精子運動能低下及び精子形態異常の発現頻度増加が、3 mg/kg/回以上で認められた。これらの変化は、いずれも 13 週間の休薬期間後には完全に回復した。

胚・胎児発生に対するaflibercept の影響を検討するため、雌のニュージーランドホワイトウサギに3、15、60 mg/kg/回で、妊娠 6、9、12、15、18 日（計 5 回）に静脈内投与（30 分間点滴静脈内投与）した。aflibercept による流産の誘発が 60 mg/kg/回のみで、軽微から中等度の母動物毒性及び早期吸収胚増加による生存胎児数減少が 60 mg/kg/回のみで、外表、内臓又は骨格奇形が 3 mg/kg/回以上で認められた。

幼若サルを用いた反復投与毒性試験：

13 週間反復静脈内投与毒性試験において、aflibercept を若齢の骨格が未成熟のカニクイザル（開いた成長板を特徴とする）に週 1 回点滴静脈内投与したところ、VEGF シグナル伝達経路阻害作用を有する化合物での既知の所見に基づいて予測される骨格系の変化が観察された。

所見が骨（3 mg/kg/回以上における主に椎弓の骨軟骨性外骨腫、椎弓に沿った被覆する中軸筋肉系の筋線維萎縮又は外骨腫に隣接した微小血管系の増生／変性）、腎臓（糸球体係蹄の好酸性基質増加並びに皮質及び髄質の尿細管の拡張及び蛋白円柱を伴った糸球体症）、卵巣（成熟卵胞、顆粒膜細胞及び莢膜細胞の減少）及び副腎（皮質束状帯の好酸性増加を伴う空胞形成減少）にみられ、全身性の血管増生／変性が種々の組織で観察された。いずれの所見も 5 ヵ月後には完全又は部分的に回復した。部分的に可逆的な変化が、鼻腔（すべての用量で鼻粘膜上皮変性がみられ、鼻甲介の破骨細胞による吸収に進行した）、脳（すべての用量での脈絡叢における泡沫状細胞質変性を伴ったマクロファージ浸潤）及び肝臓（高用量群の 1 例における門脈周囲壊死及び炎症並びに高用量群の数例にみられた肝酵素増加）で観察された。無毒性量は決定できなかった。最小毒性量の 0.5 mg/kg/回での遊離形 aflibercept の平均 C_{max} 及び AUC に基づく曝露量と、日本人癌患者に 4 mg/kg で初回静脈内投与したとき（TCD10794 試験）の対応する値との比率は、投与スケジュールによる違いを考慮して補正すると、それぞれ 0.12 及び 0.12 であった（表 11）。

局所刺激性試験：

Aflibercept の 24.4 mg/mL 溶液（標準的臨床試験用製剤）又は 25 若しくは 100 mg/mL 溶液（凍結乾燥物）を雌ウサギに静脈内、筋肉内及び皮下投与したときの注射部位における忍容性は良好であった。また、サルを用いた静脈内及び皮下投与経路による反復投与毒性試験において、aflibercept の局所刺激性を評価した。サルに静脈内又は皮下投与したとき、注射部位における被験物質関連の変化は認められなかった。

ヒトにおける組織交差反応性：

検討した 33 のヒト組織（心臓、肝臓、肺、腎臓及び消化管を含む）のいずれにおいても、aflibercept の交差反応性は認められなかった。いずれのヒト組織との交差反応性もみられなかったことや、標的蛋白質（循環血中 VEGF）の性質に基づき、動物を用いた交差反応性試験は実施しなかった。

溶血性試験：

Afliberceptによる溶血の誘発はみられず、サル及びヒトのヘパリン処理全血、血清又は血漿と aflibercept 溶液（サルで 0.69～4.17 mg/mL の濃度、ヒトで 0.50～8.00 mg/mL の濃度）を混合しても、凝集物や蛋白沈殿物は形成されなかった。ヒトの血液、血清及び血漿を用いて評価した濃度範囲は、臨床診療で使用される製剤濃度を含むものであった。

2　単回投与毒性試験

2.1　ラットを用いた探索的単回静脈内投与毒性試験

[Module 4.2.3.1-1 : TXP0166 試験]

[Module 2.6.7.5]

SD ラット（7 週齢）に、溶媒（希釈又は未希釈）又は aflibercept の 150 又は 500 mg/kg を 30 分かけて静脈内点滴投与した。ラットを 1 群雌雄各 3 例からなる 4 群に分けた。投与日（1 日目）以降 2 週間観察した。評価項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量及び剖検であった。

本試験において死亡はみられなかった。被験物質関連の一般状態の変化として、一過性の皮膚病変及び尾の変色（注射部位）が、150 mg/kg の雄 1 例及び雌 2 例で観察された。500 mg/kg における中等度の被験物質に関連した平均体重増加量の減少が、3～14 日目に雄（8 日目に-55%）及び雌（3 日目に-43%）で認められた。150 mg/kg では、中等度の平均体重増加量減少が雄では 3～8 日目に（3 日目に-30%）、雌では 3～14 日目に（3 日目に-51%）で認められた。被験物質関連の摂餌量の変化が、500 mg/kg 群の雌で、3～8 日目（-51%）及び 8～14 日目（+90%）にみられた。150 mg/kg の雌及びすべての投与群の雄では、被験物質関連の摂餌量の変化は認められなかった。剖検では、いずれの用量においても肉眼所見は認められなかった。

本試験の条件下における致死量及び最大耐量は、500 mg/kg を上回っていた。

2.2　ラットを用いた単回静脈内投与毒性試験

[Module 4.2.3.1-2 : TXA1004 試験]

[Module 2.6.7.5]

SD ラット（7 週齢）に、aflibercept の 0（対照）、50、150、500 mg/kg を単回静脈内投与（30 分間の点滴静脈内投与）した。ラットを 1 群雌雄各 5 例からなる 4 群に分けた。投与日（1 日目）以降 2 週間観察した。評価項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量及び剖検であった。

本試験では死亡は認められなかった。50 mg/kg 群の 2 例及び 500 mg/kg 群の 2 例にみられた注射部位（尾静脈）の病変（発赤、腫脹又は痂皮）を除いて、一般状態の変化はいずれの用量においても認められなかった。中等度の被験物質及び用量に関連した平均体重増加量減少が、50、150 及び 500 mg/kg 群の雄で 1～8 日目にみられた（8 日目に対照群と比較して、それぞれ-38%、-49%及び-65%）。

8～14 日目における雄の平均体重増加量は、対照群を含むすべての群で同程度であった。いずれの用量においても、雌の体重増加量には変化が認められなかった。

ごく軽度の被験物質及び用量に関連した平均摂餌量の減少が、試験を通して 50、150 及び 500 mg/kg 群の雄のみでみられた（3～8 日目に、対照群と比較してそれぞれ-16%、-20%及び-27%）。いずれの用量においても、雌の摂餌量には変化が認められなかった。剖検では、被験物質関連の肉眼所見はみられなかった。

本試験の条件下での致死量（LD）は 500 mg/kg を上回っており、無毒性量は、体重増加量に変化がみられたものの試験終了時までに回復し、試験終了時における摂餌量の変化も軽微であった（10%未満の減少）ことから、150 mg/kg と判断された。

3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

反復投与毒性試験では、aflibercept を、CD-1 マウス（週 3 回で 4 週間投与： PK01017 試験）、重度複合免疫不全症（SCID）マウス（週 2 回で最長 8 週間投与： VGT3 試験）、SD ラット（週 3 回で 4 週間投与： PK01027、PK01034、PK01042 試験）及びヌードラット（週 2 回で最長 8 週間投与： PK01032 試験）に皮下投与した。さらに、SD ラットを用いた最長 13 週間（週 3 回投与）の反復皮下投与毒性試験を実施した（0470RR20-001 試験）。これらの試験では、腎症を伴う強い ADA 産生が発現し長期投与ができなかったことから、ラット及びマウスはいずれも aflibercept の長期反復投与毒性の評価において適切な動物種ではないことが判明した。

このため、VEGF Trap の投与による全身作用の安全性を評価するための最も適切な動物種として、カニクイザルを使用した。サルを用いた複数の aflibercept の反復投与毒性試験を、1.5～30 mg/kg/回での週 2～3 回皮下投与による最長 13 週間（[redacted]223.4 及び [redacted]223.09 試験）及び 2～30 mg/kg/回での週 1 回又は 2 週に 1 回静脈内投与による最長 27 週間（[redacted]223.11 [redacted]223.18、670145 及び 670144 試験）で実施した。血漿中曝露量及び ADA 産生の有無をすべての試験で検討した。

3.1　げっ歯類

3.1.1　マウス

CD-1 マウス及び SCID マウスを用いた探索的試験を実施し、aflibercept を種々の用量で全身投与したときの影響を評価するとともに、初期動物試験でみられた臨床所見及び病理学的所見の発現における ADA の役割を検討した。

3.1.1.1　CD-1 マウス

[Module 4.2.3.2-1 : PK01017 試験]
[Module 2.6.7.6]

CD-1 マウス（6～9 週齢）に、溶媒、ヒト IgG、aflibercept の 10 又は 15 mg/kg/回を週 3 回、4 週間皮下投与した。マウスを 4 群に分け、aflibercept 投与群及びヒト IgG 投与群は 1 群雌雄各 4 例、溶媒対照群は雌雄各 2 例とした。また、本試験には無処置雌 3 例を設定した。最終投与後、2 週間の休薬期間を設定した。評価項目は，生死確認、体重、aflibercept 血清中濃度、ADA の有無であった。また、瀕死動物については、血液学的及び血液生化学的パラメータを測定するための血液サンプルを採取した。瀕死例又は死亡例及び対照群の一部の動物について、病理組織学的検査を実施した。

被験物質関連の死亡が、aflibercept の 10 mg/kg/回群の雌 4 例中 3 例で 18～20 日目にみられ、15 mg/kg/回群の雌 4 例中 3 例では 20～31 日目に認められた。すべての死亡又は瀕死例で、体重の増加がみられた。動物数が少なかったため、血液学的及び血液生化学的データは評価不能であった。主要な病理組織学的所見は、10 及び 15 mg/kg/回にみられた糸球体腎炎（変化としてはメサンギウム係蹄の腫大、メサンギウム基質内の好酸性物質沈着、メサンギウム細胞数の増加、糸球体の毛細血管ループの肥厚及び一部置換並びに散在性の尿細管拡張）であった。また、低血圧による二次的変化の可能性が示唆される皮下組織及び消化管への液滲出を伴う血管拡張が、10 及び 15 mg/kg/回で観察された。

ADA が aflibercept 投与群の全例で 8 日目に検出された。薬物への曝露は aflibercept 投与群の全例で試験を通してみられたが、血清中 aflibercept 濃度は、投与期間延長及び投与量の増加に伴って低下した（ADA の増加も伴っていた）。

3.1.1.2　SCID マウス

[Module 4.2.3.2-2: VGT3 試験]
[Module 2.6.7.6]

T 細胞及び B 細胞が欠損した SCID マウス（7 及び 15 週齢）に、溶媒又は aflibercept の 2.5 又は 25 mg/kg/回を週 2 回、4 又は 8 週間皮下投与した。それぞれの投与期間について、マウスを 1 群 5～8 例からなる 6 群に分けた。また、2.5 及び 25 mg/kg/回では 2～3 例に 8 週間皮下投与した後、4 週間の休薬期間を設定した。評価項目は、生死確認、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、病理組織学的検査、血清中 aflibercept 濃度、ADA の有無であった。

被験物質関連の死亡は認められなかった。25 mg/kg/回の雄 2 例で 8 週目に体重減少がみられた。被験物質及び用量に関連したヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球数の増加が、2.5 及び 25 mg/kg/回の 4 週群、8 週群のいずれの動物においてもみられた。これらのパラメータは休薬期間終了時に対照値に戻った。4 週間投与後には病理組織学的所見は認められなかった。8 週間投与後には、出血又はうっ血が 2.5 又は 25 mg/kg/回の 4 週群、8 週群のいずれの動物にも主に腎臓で観察され、鼻孔並びに頭部の筋膜及び耳にも認められた。これらの変化の発現頻度には用量依存性がみられた。また、消化管のうっ血又は浮腫が 25 mg/kg/回のみで観察された。肺動脈基部の動脈周囲炎／心筋炎及び盲腸炎が、25 mg/kg/回でそれぞれ 1 例に認められた。休薬期間終了時に軽度の腎尿細管の変化（変性、拡張及び蛋白円柱）が 25 mg/kg/回の 2 例にみられ、尿細管変性を伴う軽度の腎梗塞が 2.5 mg/kg/回の 1 例で認められた。血清中 aflibercept 濃度はほぼ用量に比例しており、投与期間を通して持続的に上昇した。いずれのマウスにおいても ADA は検出されなかった。

3.1.2　ラット

3.1.2.1　探究的試験

3.1.2.1.1　SD ラット

SD ラット（8～12 週齢）に、溶媒、ヒト IgG 又は aflibercept の 10 又は 15 mg/kg/回を週 3 回、4 週間皮下投与した。ラットを 1 群雌雄各 4 例からなる 4 群に分けた。また、本試験には無処置雌 2 例を設定した。4 週間の投与後に、18 日間の休薬期間を設定した。評価項目は、生死確認、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、血清中 aflibercept 濃度、ADA の有無であった。瀕死又は死亡例及び一部の対照群の動物について、病理組織学的検査を実施した（[Module 4.2.3.2-3: PK01027 試験]、 [Module 2.6.7.6]）。

被験物質関連の死亡が 10 mg/kg/回の雄 4 例（21～43 日目）及び 15 mg/kg/回の雌雄各 2 例（19～32 日目）にみられた。死亡前にみられた主な臨床所見は、体重減少、嗜眠及び浮腫であった。血液学的及び血液生化学的データの多くはばらつきが大きかったため本剤との関連性は不明であったが、明らかな用量に依存したコレステロール、トリグリセリド、リパーゼの増加とヘモグロビン、ヘマトクリットの増加傾向がいずれの用量においても認められた。10 及び 15 mg/kg/回の瀕死例又は死亡例における被験物質に関連した腎臓の病理組織学的所見として、糸球体の腫大、好酸性物質の沈着、糸球体係蹄の肥厚及びメサンギウム基質の増加を特徴とする糸球体腎炎並びに尿細管拡張及び蛋白様物質充満を特徴とする尿細管腎症が観察された。また、血管の拡張及びうっ血が、腎臓、肝臓、肺及び消化管に認められた。血清中 aflibercept 濃度低下が、いずれの用量においても 7 日目と比較して 14 日目にみられ、多くの場合 ADA も認められた。

別の試験では、SD ラット（8～12 週齢）に、溶媒又は aflibercept の 2 又は 5 mg/kg/回を週 3 回、4 週間皮下投与した。ラットを 1 群雌雄各 4 例からなる 3 群に分けた。評価項目は、生死確認、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、尿中蛋白濃度、血清中 aflibercept 濃度、ADA の有無であった。全例について病理組織学的検査を実施した（[Module 4.2.3.2-4: PK01034 試験]、[Module 2.6.7.6]）。

被験物質関連の死亡は認められなかった。aflibercept の 5 mg/kg/回の雄 2 例で、投与期間終了時に嗜眠が観察された。5 mg/kg/回の雄 3 例で体重減少がみられた。血液学的検査、血液生化学的検査及び尿蛋白のデータの多くはばらつきが大きかったため本剤との関連性は不明であったが、明らかに用量に依存したコレステロール、トリグリセリド及びリパーゼの増加がいずれの用量においても認められた。また、BUN の増加が 5 mg/kg/回でみられた。

2 及び 5 mg/kg/回のラットにおける被験物質に関連した腎臓の病理組織学的所見として、糸球体係蹄の腫脹、ボーマン嚢上皮及び糸球体毛細血管基底膜の肥厚並びに糸球体メサンギウム基質増加を特

徴とする糸球体腎炎が観察された。腎尿細管では、基底膜肥厚並びに内腔の蛋白様物質を伴った尿細管の崩壊及び拡張を特徴とする尿細管腎症が認められた。また、5 mg/kg/回ではいくつかの組織の細動脈に血管炎が観察された。血清中 aflibercept 濃度低下がいずれの用量においても 7 日目と比較して 14 日目にみられ、多くの場合 ADA も認められた（5 mg/kg/回の雄では明確な関連性はみられなかった）。

別の試験では SD ラット（8～12 週齢）に、溶媒又は aflibercept の 0.5 又は 1 mg/kg/回を週 3 回、4 週間皮下投与した。ラットを 1 群雌雄各 4 例からなる 3 群に分けた。投与後 4 日間（雄）又は 5 日間（雌）の休薬期間を設定した。評価項目は、生死確認、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、尿中蛋白濃度、血清中 aflibercept 濃度、ADA の有無であった。全例について病理組織学的検査を実施した（[Module 4.2.3.2-5: PK01042 試験]、[Module 2.6.7.6] ）。

本試験では被験物質関連の死亡は認められなかった。体重の変化はいずれの用量においてもみられなかった。血液学的検査、血液生化学的検査及び尿蛋白のデータの多くはばらつきが大きかったため本剤との関連性は不明であったが、対照群と比較して大きな変化は認められなかった。被験物質関連の病理組織学的所見はいずれの用量においてもみられなかった。本薬への曝露は試験を通して aflibercept 投与群の全例でみられたが、7 日目と比較し血清中 aflibercept 濃度の低下がいずれの用量においても 15 日目からみられ、多くの場合、低濃度の ADA も認められた。

3.1.2.1.2　ヌードラット

[Module 4.2.3.2-6: PK01032 試験]
[Module 2.6.7.6]

ヌード（T 細胞欠損）ラット（8～12 週齢）に、溶媒又は aflibercept の 25 mg/kg/回を週 2 回、4 又は 8 週間皮下投与した。ラットを 1 群雌雄各 2 又は 3 例からなる 4 群に分けた。評価項目は、生死確認、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、血清中 aflibercept 濃度、ADA の有無であった。全例について病理組織学的検査を実施した。

25 mg/kg/回の雌雄各 3 例を、52 日目に途中安楽殺した。死亡前にみられた主な一般状態の変化は、体重減少及び嗜眠であった。体重減少が 5 週目以降に aflibercept 投与群でみられた。BUN 増加、血清アルブミン減少並びにコレステロール及びリパーゼ増加が、aflibercept 投与群で主に投与 8 週後に認められた。

Aflibercept 投与群のラットにおける被験物質に関連した腎臓の病理組織学的所見として、糸球体係蹄の腫脹、基底膜の肥厚、ボーマン嚢上皮の過形成、メサンギウム細胞腫脹、ボーマン嚢腫脹、ボーマン腔における蛋白様物質の蓄積並びに糸球体内のメサンギウム基質増加を特徴とする糸球体腎炎が観察された。腎尿細管においては、上皮の腫脹及び崩壊、拡張、菲薄化、内腔への上皮細胞の脱落並びに内腔細胞残屑及び蛋白様物質の蓄積を特徴とする尿細管腎症が認められた。これらのラットでは

検出可能な IgG 応答はみられなかったが、試験期間を通した血清中 aflibercept 濃度の低下は、恐らく今回用いた測定法では検出されない特異的抗体（IgM 又は IgA）の形成に起因するものと考えられた。

3.1.2.2　3 ヵ月間反復皮下投与毒性試験

[Module 4.2.3.2-7: 0470RR20-001 試験]

[Module 2.6.7.7A]

SD ラット（約 7-8 週齢）に、aflibercept の 0（対照）、0.1、0.5、1.0、2.0 mg/kg/回を週 3 回、4 又は 13 週間皮下投与した。ラットをそれぞれ 5 群からなる 2 つのセットに分け、1 群雌雄各 6 例には 4 週間投与を、1 群雌雄各 10 例には 13 週間投与した。対照群並びに 1.0 及び 2.0 mg/kg/回群では、別の雌雄各 5 例について 4 又は 13 週間の投与期間後に 6 週間の休薬期間を設定した。

評価項目は，生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、器官重量、剖検、病理組織学的検査、血清中 aflibercept 濃度、ADA の有無であった。

投与液を分析して aflibercept 濃度を確認したところ、特に 0.1 及び 0.5 mg/kg/回群でいくつかの名目濃度からの乖離が認められた。血清サンプルについてのトキシコキネティクス解析により、0.5 mg/kg/回群の初回投与時（1 日目）における（名目濃度からの）乖離が確認された。しかし、問題がみられたこれらの投与群におけるその後の投与では、十分な曝露量が認められた。

血清中 aflibercept 濃度は、投与開始時には用量比を上回って増加したが、試験中における ADA の出現に伴って減少した。ADA は早くも 6 日目に検出され、42 日目までに 80 例中 65 例の aflibercept 投与群で認められた。しかし、ADA の出現にも関わらず、投与期間を通して十分な被験物質曝露が確認された。

2 mg/kg/回の雄 2 例は 72 日目に瀕死状態となったため安楽殺に至り、1 mg/kg/回の雌 1 例は 89 日目に死亡状態で発見され、1 mg/kg/回の雄 1 例は 111 日目（休薬期間中）に死亡状態で発見された。これらの動物では主として膵臓及び周囲の腸間膜における多発性血管炎、大腿骨の骨粗しょう症並びに重症の腎疾患の病変がみられ、死亡又は瀕死状態の原因となったと考えられた。また、2 mg/kg/回の雌 1 例及び対照群の雄 1 例の死亡が 43 日目にみられ、2 mg/kg/回の雌 2 例は 48 日目に瀕死状態のため安楽殺に至り、2 mg/kg/回の雄 1 例の死亡が休薬 12 日目（43 日目）に認められた。これらの動物の死因は不明であった。

投与 2 ヵ月目に、特記すべき一般状態の変化として、1 及び 2 mg/kg/回において、眼又は鼻周囲の赤色汚れ、上又は下の切歯の破損並びに歯の肥厚及び白色化が、早いものでは投与 38 日目に認められた。これらの歯の所見は、6 週間の休薬期間終了時まで持続して観察された。1 及び 2 mg/kg/回、30

日間投与群では、歯の肥厚が休薬期間中にみられた。Aflibercept の 1 mg/kg/回以上における投与期間中の平均体重は、対照群と比較して全般的に雌では増加し、雄では減少した。これらの体重の最初の変化は投与 1 週後に認められた。休薬期間終了時における平均体重は、1 ヵ月間投与した雄では対照群の平均値と同程度になり、3 ヵ月間投与した雄では引き続き対照群の平均値を下回った。雌の体重は、休薬期間中も引き続き対照群より重かった。投与 1 ヵ月目及びその後の休薬期間の摂餌量には、いずれの投与群においても有意差はみられなかった。投与 2 ヵ月目に 2 mg/kg/回の雄で摂餌量減少がみられ、これが体重減少に寄与した可能性がある。雌の摂餌量においては、投与関連の変化は示唆されなかった。

被験物質関連の血液生化学的パラメータの変化として、1 及び 2 mg/kg/回で、BUN 増加、コレステロール増加、アルブミン減少、グロブリン増加及びアルブミン／グロブリン（A/G）比減少が認められた。被験物質関連の BUN 増加が、投与 30 及び 91 日目に、主として 2 mg/kg/回の雄でみられ、コレステロール増加が 1 及び 2 mg/kg/回の雄で認められた。3 ヵ月投与後の 6 週間休薬期間の終了時には、いずれのパラメータにも引き続き有意な上昇がみられた。アルブミンの有意な減少（雄）及びグロブリンの有意な増加（雌雄）が 1 及び 2 mg/kg/回で 30 日目にみられ、休薬期間後も引き続き認められた。A/G 比の有意な減少が 91 日目に 1 mg/kg/回以上でみられたが、6 週間の休薬期間後には正常値に戻った。尿蛋白は 30 日目に増加し（主に 1 mg/kg/回以上）、3 ヵ月間投与後により顕著になった。この増加は 6 週間の休薬期間後も引き続き認められた。

3 ヵ月間投与後の生存例における肉眼所見が、0.5、1、2 mg/kg/回の 1～3 例の雄又は雌のラットで、腎臓（外観における褐色、斑状、顆粒状又は腫大）、脾臓（腫大）及び子宮（拡張）に観察された。

30 日間投与群では 30 日目に、対照群と比較して、2 mg/kg/回の雄で有意な群平均空腹時体重の減少がみられ、1 mg/kg/回の雄で有意な絶対腎重量増加が認められた。2 mg/kg/回の雄では、さらに対照群と比較し有意な腎重量体重比（1 mg/kg/回の雄にも）及び肝重量体重比の増加もみられた。これらの群でみられた病理組織学的所見に基づくと、腎重量の変化は被験物質投与との関連があるものと考えられた。いずれの aflibercept 投与群においても、雌の器官重量パラメータには有意差は認められなかった。30 日目以降の 6 週間の休薬期間後において、2 mg/kg/回の雄では、肝臓及び脾臓の絶対重量の有意な増加がみられ、器官重量体重比の有意な増加が心臓、腎臓、肝臓及び脾臓に認められた。しかし、これらの器官の脳重量比には、対照群と比較して有意な変化はみられなかった。雌では、1 mg/kg/回において、対照群と比較して最も大きな平均値の有意差が認められた。この群では、平均値の有意な増加が、空腹時体重並びに副腎、肝臓、卵巣及び脾臓の重量にみられ、肝臓及び卵巣の器官重量体重比の有意な増加並びに副腎、肝臓及び卵巣の器官重量脳重量比の有意な増加も認められた。2 mg/kg/回の雌では、絶対肝重量の群平均値の有意な増加がみられた。2 mg/kg/回の雌雄及び 1 mg/kg/回の雌における肝臓の変化は、被験物質投与との関連を示唆するものと考えられる。他の器官重量の変化につ

いては、回復群の病理組織学的検査を実施しなかったため、被験物質投与との関係について最終的に判断することはできなかった。

3 ヵ月投与群では 91 日目に、2 mg/kg/回の雄で平均空腹時体重の有意な減少、平均腎重量及び肝重量の有意な増加、副腎、脳、心臓、腎臓及び肝臓の器官重量体重比の有意な増加並びに腎臓及び肝臓の器官重量脳重量比の有意な増加が認められた。腎臓及び肝臓重量には対照群と比較して最も顕著な変化がみられたことから、2 mg/kg/回でこれらの組織にみられた病理組織学的所見を考慮すると、これらの所見は被験物質投与との関連性があるものと考えられた。雌ではいずれの aflibercept 投与群においても、器官重量に有意差は認められなかった。6 週間の休薬期間後に対照群と比較して有意差がみられたのは、2 mg/kg/回の雌における脾重量体重比のみであり、回復性試験群の動物では病理組織学的検査を実施しなかったことから、被験物質との関連性を否定することはできなかった。

主要な病理組織学的所見として、用量及び期間に関連した発現頻度又は重症度を伴う進行性腎疾患の徴候が 0.5 mg/kg/回以上でみられ、その特徴は尿細管蛋白円柱、散発的な糸球体メサンギウムの分節状肥厚及び尿細管上皮細胞の好塩基性化であった。腎臓の変化に伴って、BUN、グロブリン及び尿蛋白の増加並びに血清アルブミンの減少（1 mg/kg/回以上）が認められた。ADA を産生する正常な免疫応答性のラットでみられた aflibercept の腎毒性は、少なくとも部分的には、腎糸球体における免疫複合体の沈着に起因した可能性がある。大腿骨の病理組織学的変化（骨梁及び骨幹端毛細血管の減少又は喪失、皮質骨の菲薄化）が、1 及び 2 mg/kg/回で観察された。2 mg/kg/回の雄 2 例では多発性血管炎（進行性腎症を伴う自然発生病変）及び大腿骨の骨粗しょう症が観察され、また中等度から重度の腎病変を伴っていた（72 日目に 2 mg/kg/回の雄の瀕死例 2 例にもみられた）。0.5 mg/kg/回以上の雌では、腎症の発現頻度が増加したが、その重症度は対照群と同程度であった。対照群並びに 1 及び 2 mg/kg/回における上下の切歯の病理組織学検査では、被験物質関連の所見は認められなかった。

以上のことから、3 ヵ月間投与による無毒性量は 0.1 mg/kg/回と判断された。

3.2　サル

3.2.1　静脈内投与

3.2.1.1　4 週間反復投与毒性試験

[Module 4.2.3.2-8: [redacted]223.11 試験]

[Module 2.6.7.7B]

カニクイザル（2.0～4.2 歳）に、aflibercept の 0（対照）、2、10、30 mg/kg/回を週 1 回、4 週間静脈内投与（約 30 分間の点滴静脈内投与）した。サルを 1 群雌雄各 5 例からなる 4 群に分けた。最終投与の 7 日後に剖検を実施した。対照群及び 30 mg/kg/回では、別の雌雄各 3 例について投与期間後に 6 週間の休薬期間を設定した。評価項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、体温、眼科学的検査、心電図、血圧、器官重量、剖検、病理組織学的検査、遊離形血清中 aflibercept 濃度、ADA の有無であった。

Aflibercept の臨床的忍容性は、いずれの用量においても良好であった。

投与期間中及び休薬期間中の心電図、血圧及び体温には、投与関連の変化は認められなかった。

被験物質関連の臨床検査所見（試験前値との比較）として、尿中総蛋白の増加が 10 mg/kg/回の雄 2 例及び 30 mg/kg/回の雄 2 例で 2 又は 4 週目にみられ、また血清アルブミン又は総蛋白の軽度の減少、A/G 比の減少並びに BUN の増加が、10 mg/kg/回の雄 2 例中 1 例及び 30 mg/kg/回の雄 2 例中 2 例で 4 週目に認められた。総コレステロールのごく軽度の増加も、30 mg/kg/回の雄 1 例で 4 週目にみられた。また、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットの対照値と比較した軽微な増加が、すべての用量の雌雄で 2 及び 4 週目に認められた。この変化は 10 週目に完全に回復した。

投与期間及び休薬期間の終了時には、被験物質関連の肉眼所見及び器官重量の変化はみられなかった。投与期間終了時に、被験物質関連の病理組織学的変化が、すべての用量で骨成長板及び腎糸球体にみられ、10 mg/kg/回以上で卵巣に認められた。成長板の変化の特徴は、骨幹端毛細血管侵入の減少、一次骨梁の減少、軟骨基質の変性、軟骨細胞柱の崩壊、骨端軟骨の肥厚及び横行性の軟骨下骨板形成であった。腎臓では、ごくわずか又はごく軽度（30 mg/kg/回の 1 例では中等度）の糸球体メサンギウム基質増加が、2 mg/kg/回の雄 1 例、10 mg/kg/回の雄 1 例並びに 30 mg/kg/回の雄 3 例及び雌 2 例で、投与期間終了時に観察された。腎臓の病理組織学的所見がみられた 3 例（10 mg/kg/回の 1 例及び 30 mg/kg/回の 2 例）では、尿蛋白及び BUN の増加並びに血清アルブミン又は血清総蛋白の減少も認められた。

卵巣では、成熟卵胞数、顆粒膜細胞数又は莢膜細胞数の極めてごく軽度又はごく軽度の減少が、投与期間終了時に、aflibercept の 10 及び 30 mg/kg/回の雌で観察された。骨成長板及び卵巣の所見は、被験物質の抗血管新生作用に関連する可能性が高いと考えられた。成長板の同様の変化が、血管内皮増殖因子に対する遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体（rhuMAb VEGF 又はベバシズマブ）を投与したカニクイザルで報告されている (1)。骨幹端毛細血管の減少は、被験物質の薬理作用である VEGF 枯渇に関連して生じた可能性がある(2)。同様の卵巣の変化は rhuMAb VEGF を投与したカニクイザルでも報告されており、aflibercept の生物活性に一致するものであった(1)。腎糸球体の変化は明らかに免疫関連ではなく（サル IgM、サル IgG 又はヒト C3 補体に対する抗体による糸球体の染色性の欠如）、循環血中 VEGF の欠乏に関連して生じた可能性がある(3)。

ごく軽度から顕著な投与に関連した細胞質好酸性化を伴う副腎束状帯細胞の空胞形成減少が、すべての用量で投与期間終了時のみに観察された。この所見に伴う変性性又は壊死性の変化はみられなかったことから、その生物学的意義はあっても限定的と考えられた。軽度のストレスがこれらの変化の発現に寄与した可能性が考えられた。

6 週間の休薬期間終了時には、腎臓及び骨成長板の変化の部分的な回復がみられたものの完全には回復しなかった。休薬期間終了時には、卵巣の病理組織学的変化は認められなかった。サルにおける aflibercept の半減期は長く、休薬期間中にも循環血中に薬物濃度が認められたことから、これらの病理組織学的所見の回復性を最終的に評価することはできなかった。

1、8、15、22 及び 29 日目における遊離形 aflibercept の濃度を、当該日の薬物投与直前（トラフ濃度）、投与の約 5 分後（最高濃度）及び投与 24 時間後に測定した。サルにおける遊離形 aflibercept の最高血清中濃度を表 2に示す。

表 2 - サル 4 週間静脈内投与時の遊離形 aflibercept の最高血清中濃度

用量 (mg/kg/回)	最高濃度 (µg/mL)							
	1 日目		8 日目		15 日目		22 日目	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
2	61	60	87	121	115	152	117	129
10	319	339	743	938	947	1170	980	1131
30	1083	956	6171	4267	4828	10 907	8849	3954

最高濃度は投与 5 分後に得られた。

全体として、aflibercept の濃度は、用量の増加に伴って増加した。Aflibercept の初回投与後に測定した平均最高濃度は、用量に比例して増加した。それ以降の投与後における最高濃度は、全体として用量比をわずかに上回って増加した。それぞれの被験物質投与直前に測定した aflibercept 濃度（トラフ

濃度）により、いずれの投与群においても薬物は投与期間を通して存在することが示唆された。トラフ値は全般的にほぼ用量に比例して増加した。Aflibercept はサルにおいて概ね免疫原性を示さず、36 例の aflibercept 投与動物のうち、検出可能な ADA 産生が発現したのは 30 mg/kg/回の 2 例のみであった。

本試験では無毒性量は決定できなかった。

3.2.1.2　13 週間反復投与毒性試験

[Module 4.2.3.2-9: [redacted]223.18 試験]
[Module 2.6.7.7C]

カニクイザル（2.7～7.0 歳）に、aflibercept の 0（対照）、3、10、30 mg/kg/回を週 1 回、3 ヵ月間静脈内投与（約 30 分間の点滴静脈内投与）した。サルを 1 群雌雄各 4 例からなる 4 群に分けた。対照群並びに 10 及び 30 mg/kg/回では、別の雌雄各 4 例について 3 ヵ月の投与期間後に 13 週間の休薬期間を設定した。

評価項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、体温、眼科学的検査、心電図、血圧、X 線検査、器官重量、剖検、病理組織学的検査、腎切片の免疫化学的検査、遊離形 aflibercept の血漿中濃度、ADA の有無であった。

Aflibercept 投与とは無関係と考えられる理由により、3 例（10 mg/kg/回の 1 例及び 30 mg/kg/回の 2 例）を、試験終了前（投与期間中）に安楽殺した。Aflibercept の 10 mg/kg/回の動物にみられた病理組織学的変化は、被験物質と関連のない幽門部表層粘膜の肥大及び軽度の慢性粘膜炎症に起因する胃粘膜の肥厚のみであった。30 mg/kg/回での投与後にみられた 1 例の瀕死状態に関連したと思われる病理組織学的所見は、膵臓の多巣性出血、壊死及び急性間質性炎症、腸間膜の膿瘍並びに胃粘膜の出血、慢性炎症、限局性急性腹膜炎及び多巣性壊死であった。これらの所見はいずれも偶発的と考えられた。30 mg/kg/回の第 2 の動物では、肘の組織塊（偶発的骨軟骨腫）がみられたため安楽殺した。

一般状態観察では、すべての用量で円背位又は脊柱後弯症が観察された。休薬期間終了時における胸部又は腰部の傍脊椎骨格筋切片の病理組織学的検査では、筋線維の萎縮又は変性／壊死が、脊柱後弯症のみられたすべてのサルで観察された。これらの骨格筋の変化の意義は不明であるが、これらの筋肉の変化は脊柱後弯症による二次的な変化であり、被験物質の直接の影響によるものではないと考えられる。円背位のみられる動物の発現頻度が、投与 11、12 及び 13 週目に増加した。

赤色鼻分泌物が 3、10、30 mg/kg/回の少数例でごくまれにみられ、10 mg/kg/回の雄 1 例及び 30 mg/kg/回の雄 1 例では、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットの減少も認められた。被験物質関連の体重及び摂餌量の減少が、30 mg/kg/回の雄 1 例でみられた。

心電図、血圧及び体温には、投与期間及び休薬期間中に投与関連の変化は認められなかった。

平均赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットの軽微な増加が、すべての用量で投与期間中にみられ、10 及び 30 mg/kg/回の雌で 4 又は 13 週目に統計学的有意差が認められた。投与期間中における被験物質関連の臨床検査所見（試験前値との比較）として、尿中総蛋白増加が 10 mg/kg/回の 4 例及び 30 mg/kg/回の雌 1 例に、ミクロアルブミン増加が 10 mg/kg/回の 6 例及び 30 mg/kg/回の 3 例にみられ、一部の例では血清アルブミン及び A/G 比の軽度の減少も認められた。尿中総蛋白及び尿ミクロアルブミンは、休薬期間終了時に試験前値に戻る傾向がみられた。また、30 mg/kg/回ではトリグリセリド増加（2 例）及び血清リン減少（1 例）が認められた。ごく軽度かつ一過性の C 反応性蛋白増加が、10 mg/kg/回の雄 1 例、30 mg/kg/回の雄 1 例及び雌 2 例でみられた。

剖検では、被験物質関連の卵巣重量（すべての用量）及び子宮重量（30 mg/kg/回）の減少が投与終了時にみられたが、休薬期間終了時には認められなかった。投与期間終了時における被験物質関連の肉眼所見として、ごく軽度の脊柱彎曲が 10 mg/kg/回の 2 例及び 30 mg/kg/回の 1 例にみられ、両側腎蒼白の発現頻度増加がすべての用量で観察された。休薬期間終了時には、ごく軽度の脊柱彎曲が 10 mg/kg/回の 3 例及び 30 mg/kg/回の 1 例に認められた。

サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験（2、10、30 mg/kg/回）で報告されたのと同様の被験物質関連の病理組織学的変化が、3、10、30 mg/kg/回の腎臓（メサンギウム基質増加）、骨（軟骨細胞柱の崩壊、成長板軟骨肥厚及び横行性の軟骨下骨板形成）及び卵巣（顆粒膜細胞数、莢膜細胞数又は成熟卵胞数の減少）に観察された。13 週間投与したサルにおいて、腎臓及び卵巣の病変の発現頻度又は重症度の増加が、4 週間投与したサルと比較して認められた。

電子顕微鏡検査による腎臓の微細構造的変化の特徴として、ポドサイト（上皮細胞）の終末足突起間の濾過スリット膜の減少又は喪失並びに細胞質小孔形成の不規則性を伴った内皮細胞の肥大及び腫脹が認められた。ポドサイトの変化の重症度がより高い場合（足突起癒合）には、種々の大きさのライソゾーム及び脂質胞が、内皮細胞及びポドサイトに観察された。すべての aflibercept 投与群で、IgG、IgM 及び C3 の免疫組織化学的染色性の増加が認められた。

本試験で糸球体にみられた投与関連の IgG、IgM 及び C3 の染色は、濾過バリアー損傷による IgG、IgM 及び C3 の濾過量増加並びに VEGF 阻害に関連して損傷した糸球体構成要素への IgG、IgM 及び C3 の動員増加の複合による二次的変化と考えられた。

副腎皮質における用量に関連した好酸性増加を伴う空胞形成減少も、すべての用量で雌雄に認められた。この所見に伴う変性性又は壊死性の変化はみられなかったことから、生物学的意義はあっても限定的なものと考えられた。

限局性血管炎が、すべての投与群の少数例において腸粘膜下、膀胱及び心臓に認められた。血管炎の発現頻度は極めて低く、投与群当たりの発現頻度は概ね 1 件で、サルでは自然発生的に低頻度でみられることが知られているものの、投与との関連を完全に否定することはできなかった。

休薬期間終了時に、腎臓、卵巣及び骨の病理組織学的変化が 10 及び 30 mg/kg/回でみられたが、その発現頻度は低かった。

サルにおける遊離形 aflibercept の最高血漿中濃度を表 3に示す。

表 3 - サル 13 週間静脈内投与時の遊離形 aflibercept の最高血漿中濃度

用量 (mg/kg/回)	最高濃度 (µg/mL)					
	1 日目		29 日目		85 日目	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
3	79.8	80.7	97.1	89.0	118	150
10	232	227	373	365	479	400
30	973	791	1030	1030	1370	1260

最高濃度は投与 5 分後に得られた。値は有効数字 3 桁に丸めた。

それぞれの用量において、遊離形 aflibercept 及び結合形 aflibercept が、いずれもすべての投与間隔で検出された。すべての用量で結合形 aflibercept のトラフ濃度は同程度であった。また、いずれのサンプル採取時点においても、遊離形 aflibercept の濃度は結合形 aflibercept の血漿中濃度を超えていたことから、aflibercept の標的は投与期間を通して飽和していることが示唆された。遊離形 aflibercept の平均最高血漿中濃度（C_{max}）及びトラフ濃度は、概ね用量に比例して増加した。Aflibercept の 30 mg/kg/回の 13 回目（85 日目）最終投与直前の平均投与前（トラフ）血漿中濃度は約 200 µg/mL であり、最終投与後の平均 C_{max} は約 1300 µg/mL（投与後の最初の採血時点）であった（T_{max} は 5 分）。休薬期間終了時には遊離形 aflibercept は検出できなかったが、サルにおける遊離形 aflibercept の推定消失半減期（$t_{1/2}$）が 4～5 日であることに基づくと、この期間においてもかなりの部分が存在した可能性がある。

ADA は 40 例の aflibercept 投与動物中 2 例（10 及び 30 mg/kg/回）のみで検出された。いずれの例においても特記すべき血漿中薬物濃度の低下がみられたことから、免疫応答が薬物消失の増加に寄与したことが示唆された。これら 2 例における病理組織学的所見（特に腎臓）は、同じ投与群でみられた所見とほぼ同様であった。これらのデータにより、aflibercept のサルにおける免疫原性は軽微であることが示唆される。

本試験では無毒性量は決定できなかった。

3.2.1.3　6 ヵ月間反復投与毒性試験

[Module 4.2.3.2-10: 670145 試験]

[Module 2.6.7.7D]

性成熟したカニクイザル（3～12 歳）に、aflibercept の 0（対照）、3、10、30 mg/kg/回を、最初の 15 週間は週 1 回静脈内投与（約 30 分間の点滴静脈内投与）した。すべての用量で体重減少がみられたため、その後投与レジメンを変更し、残りの 12 週間は 2 週に 1 回投与とした。サルを 1 群雌雄各 4 例からなる 4 群に分けた。すべての投与群で、別の雌雄各 2 例について 6 ヵ月間の投与期間後に 5 ヵ月間の休薬期間を設定した。評価項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、膣出血、体温、眼科学的検査、心電図、血圧、骨代謝回転の生化学的マーカー、ホルモン分析、骨密度、骨の X 線検査、雄性生殖能評価、器官重量、剖検、病理組織学的検査、遊離形及び結合形 aflibercept の血漿中濃度並びに ADA であった。

3 mg/kg/回の雄 1 例を、182 日目（投与 26 週目）に途中安楽殺した。この例における特記すべき所見として、鼻出血に関連する顕著な貧血、白血球数、網状赤血球数、好中球数の増加並びに血小板数減少が認められた。また、特記すべき血液生化学的変化として、コレステロール、総蛋白、アルブミン、グロブリン及び A/G 比の減少並びにトリグリセリド及び尿素の増加がみられた。剖検では、鼻腔内の広範な肉眼的所見として、凝血塊、鼻中隔弯曲及び右中鼻甲介の欠損が確認された。これらの所見及び対応する病理組織学的所見（壊死性炎症を伴う鼻中隔又は鼻甲介の萎縮／喪失）は、他の aflibercept 投与例でみられた所見と類似しており、被験物質関連の変化と考えられた。この動物では更なる肉眼所見として、腎臓、肝臓及び胃の蒼白化並びに消化管の暗色化内容物がみられ、病理組織学的検査では骨髄の赤芽球過形成及び髄外造血がいくつかの組織で観察され、安楽殺前に認められた顕著な再生性貧血の血液学的所見と一致していた。

すべての aflibercept 投与群でみられた主要な投与関連の一般状態の変化は、くしゃみ、被毛の赤色汚れ、皮膚乾燥、口吻又は下顎の腫脹、痂皮形成又は発赤、円背位、食欲減退、削痩又は活動性低下であった。群平均体重の減少がすべての用量で認められた。この体重減少がみられたため、投与 15 週目に投与間隔を週 1 回から 2 週に 1 回に変更して、残りの 12 週間の投与を実施した。投与期間終了

時には平均体重の減少が見られ、3、10、30 mg/kg/回での減少率（試験前値との比較）は、雌でそれぞれ 0.4%、7.8%、20.4%、雄でそれぞれ 7.6%、15.1%、8.4%であった。試験中に高頻度にみられた食欲減退が、これらの変化に関連した可能性がある。10 mg/kg/回の雄 1 例を除く投与群の全例では、休薬期間終了時までに体重が増加して開始時の値まで回復した。

眼科学的検査では、投与 13 及び 26 週目並びに休薬期間終了時に、3 mg/kg/回の雄 1 例で限局性網膜浮腫並びに乳頭周囲及び黄斑部位の網膜下色素脱失がみられ、投与 26 週目に 30 mg/kg/回の雄 1 例で、両眼の黄斑域における散在性の粒状混濁が認められた（他の被験物質関連の眼の病理組織学的所見との関連なし）。また、機能的盲目状態、瞳孔拡大及び垂直眼振が、休薬期間中に 10 mg/kg/回の雄 1 例で観察された。上記の眼の所見の原因及び意義については、不明であった。

投与期間中及び休薬期間中の心電図、血圧及び体温には、投与関連の変化は認められなかった。

全体的な投与関連の血液学的変化として、ごく軽度から軽度のフィブリノーゲン、赤血球分布幅、平均血小板容積、血小板数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、網状赤血球数の増加が、3 mg/kg/回以上の雄又は雌で投与 4、12、25 週目に認められた。上記の変化は、部分的又は完全に回復した。投与に関連したごく軽度のコレステロール増加及び C-反応性蛋白の有意な上昇（完全に可逆的）がすべての用量で雌雄にみられ、コレステロールの変化は投与 4、12、25 週目に、C-反応性蛋白の変化は投与 4、13、26 週目に認められた。投与に関連した顕著な γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アルカリホスファターゼ（ALP）又はアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の増加が、すべての用量で一部の雌雄にみられた。これらの増加は主に投与期間中にみられたが、休薬期間終了時にも散見された。

投与に関連したごく軽度から軽度の尿ミクロアルブミン及び尿たんぱくの群平均値増加も、すべての投与群の主として雄において、投与 4、12 又は 25 週目に認められた。全般的に、aflibercept 投与群の動物で観察された腎臓の病理組織学的変化（後述）は、蛋白尿及びアルブミン尿を伴っていた。これらの変化は休薬期間中には大部分の動物でみられず、また病理組織学的所見の部分的又は完全な回復が認められた。すべての aflibercept 投与群の雌において、本試験の投与期間中に定期的な月経出血の徴候が抑制された。休薬期間中には、定期的な頻度で月経が認められた。

Aflibercept の 3 mg/kg/回以上の大多数の例で、17β-エストラジオール、プロゲステロン、卵胞刺激ホルモン（FSH）及びインヒビン B の正常な周期的変動が消失した。休薬期間中は、大部分の雌で、これらのホルモン濃度の定期的な変動及びそれに伴うより正常な月経が再び認められた。すべての投与群の雄で、aflibercept 誘発性の顕著ではあるが完全に可逆的な精子運動能障害及び精子形態異常が観察された。全体として、骨吸収／回転マーカー（C-及び N-テロペプチド）は、aflibercept 投与によりご

く軽度に減少したが、休薬期間中に増加した。すべての投与群の雌雄における全身及び大腿骨の骨塩量が、投与期間中にわずかに減少したが、aflibercept 投与群では体重減少がみられたことから、投与に起因した体重への影響による二次的変化と考えられた。骨塩量の変化は休薬期間中に正常化する傾向がみられた。X 線検査により、脊柱後弯症、椎骨関節面の変形性関節症並びに大腿骨／腸骨の骨膜反応の頻度増加が、すべての投与群の雌雄に認められた。被験物質関連の子宮重量減少（完全に回復）が 10 mg/kg/回以上で認められ、卵巣重量減少（部分的に回復）が、aflibercept の 3 mg/kg/回以上でみられた。

3 mg/kg/回以上の雌雄において投与終了時にみられた aflibercept 関連の主要な肉眼所見は、鼻中隔の欠損、変位又は穿孔又は一部の鼻甲介の欠損又は小型化、脊柱後弯症、骨の蒼白で硬い腫瘤、副腎の暗色化、十二指腸の暗色部位及び胆嚢壁の肥厚であった。上記の被験物質関連の肉眼所見のうち、完全な回復がみられたのは副腎のみであった。

被験物質関連の主要な病理組織学的所見は、鼻腔、骨、腎臓及び雌性生殖器官に観察された。また、血管の変化が消化器及び脈絡叢に認められた。鼻腔における中隔又は鼻甲介の萎縮／喪失並びにそれに伴う壊死性炎症や、その他の様々な上皮、微小血管、軟骨及び骨の所見が、3 mg/kg/回以上で観察された。鼻腔の骨性及び軟骨性の変化を除いて、大部分の変化には回復がみられた。骨（脊柱全体）における最も重要な所見は、3 mg/kg/回以上の雌雄でみられた不可逆的な骨軟骨性外骨腫の発現であった。脊柱の外骨腫が最も高頻度にみられたのは胸椎及び腰椎の椎弓であり、しばしば肉眼所見として脊柱後弯症を伴っていた。これに併発して、筋線維萎縮及びより低頻度の血管増生／変性がしばしば観察された。離解骨端における軟骨細胞層の肥厚及び胸椎椎体腹側皮質骨の軟骨化生は、3 mg/kg/回以上の投与群で高頻度にみられた aflibercept 誘発性の所見であったが、ほぼ完全に可逆的でかつ軽度な変化であった。

腎臓では、過ヨウ素酸シッフ反応で陽性に染色される糸球体係蹄の好酸性基質の増加が、3 mg/kg/回以上の雌雄に認められた。また、しばしば尿細管間質性炎症又は円柱形成を伴う糸球体症が、3 mg/kg/回以上で高頻度に観察された。腎臓の変化はほぼ完全に回復した。卵巣の黄体発達及び卵胞成熟も、3 mg/kg/回以上の雌で顕著に障害された（これらの変化は可逆的であった）。完全に可逆的な子宮内膜及び子宮筋層の萎縮並びに膣上皮の萎縮が、3 mg/kg/回以上の多くの雌に認められた。

十二指腸及び胆嚢の血管変性／増生が、10 mg/kg/回以上で観察された。多くはクッパー細胞のびまん性色素沈着を伴う肝臓の門脈炎症及び門脈周囲壊死が、30 mg/kg/回の少数例に認められた。上記の所見の一部には、部分的な回復がみられた。副腎における肉眼的な暗色化に関連した細胞質好酸性化の増加を伴う完全に可逆的な細胞質空胞形成減少は、3 mg/kg/回以上の雄及び 10 mg/kg/回以上の雌でみられた被験物質関連の変化であった。少数例の雌における aflibercept 関連の変化として、脈絡叢のマクロファージ浸潤が観察された。また、30 mg/kg/回の数例では血管変性／線維化がみられた。10 及

び 30 mg/kg/回の雌雄の少数例で、心臓を含むその他のいくつかの組織において、血管増生／変性が認められた。これらの変化は休薬期間後にも aflibercept 投与群の動物で散見されたことから、被験物質関連の変化の持続性が示唆された。

サルにおける遊離形 aflibercept の最高血漿中濃度及び AUC 値を表 4に示す。

表 4 - サル 6 ヵ月間静脈内投与時の遊離形 aflibercept の最高血漿中濃度及び曝露量

用量 (mg/kg/回)	**定常状態の最高濃度及び AUC**					
投与レジメン	週 1 回			2 週に 1 回		
測定日	85 日目（13 回目の投与後）			183 日目（最終投与後）		
	最高濃度 (µg/mL)		$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg.day/mL)	最高濃度 (µg/mL)		$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg.day/mL)
	雄	雌		雄	雌	
3	94.5	116	228	57.5	62.4	159
10	279	322	793	310	228	556
30	459	815	1609	709	754	1348

略語：AUC：血漿中濃度－時間曲線下面積
サルには週 1 回、15 週間投与し、残りの 12 週間は 2 週に 1 回投与した。
最高濃度は投与 5 分後に得られた。。
$AUC_{0\text{-}168h}$ 値は全例（雌雄）について算出した。

トキシコキネティクス解析により、遊離形 aflibercept 及び総 aflibercept の平均最高血漿中濃度及びトラフ血漿中濃度は、本試験の投与期間を通して用量依存的に増加することが示唆された。週 1 回投与したときの 29、57、85 日目におけるピーク時（投与 5 分後）の平均遊離形 aflibercept 濃度の範囲は、3、10、30 mg/kg/回において、それぞれ 102～109、281～343、653～1038 µg/mL であった。同じ期間における平均トラフ濃度（投与前）の範囲は、3、10、30 mg/kg/回において、それぞれ 10.7～12.8、46.2～55.6、116～139 µg/mL であった。薬物を 2 週に 1 回投与したときのピーク時（投与 5 分後）における平均遊離形 aflibercept 濃度は、3、10、30 mg/kg/回で、141 日目にはそれぞれ 93.4、305、729 µg/mL、183 日目にはそれぞれ 60.4、269、733 µg/mL であった。この同じ期間における平均トラフ濃度（投与前）は、3、10、30 mg/kg/回で、141 日目にはそれぞれ 0.821、9.31、32.4 µg/mL、183 日目にはそれぞれ 0.974、7.27、25.1 µg/mL であった。

想定されたように、投与スケジュールの変更による最高遊離 aflibercept 濃度への影響はほとんどなかったが、遊離形 aflibercept のトラフ濃度は大幅に低下した。投与間隔をあける（投与頻度の変更）ことによるトラフ濃度への影響は低用量の方が大きかったが、これは遊離形薬物が血漿中で経時的に結合形薬物に変換されたことに起因する可能性がある。薬物の最低濃度では、結合形に変換される遊離形 aflibercept の比率がより高かった。用量を問わず、投与群の回復性試験例から採取した血漿中に

遊離形 aflibercept が検出されたのは、1 サンプル（第 3 群、動物番号 308、37 週目）のみであった。休薬期間終了時の遊離形 aflibercept 濃度は、すべての群で定量限界未満（BLQ）であった。

それぞれの用量において、すべての投与間隔で遊離形 aflibercept 及び結合形 aflibercept がいずれも検出された。結合形 aflibercept のトラフ濃度は、すべての用量で同程度であった。また、いずれのサンプル採取時点においても、遊離形 aflibercept の濃度は結合形 aflibercept の血漿中濃度を上回ったことから、aflibercept の標的は投与期間を通して飽和していた可能性が示唆された。休薬期間終了時の結合形 aflibercept の濃度は、いずれの投与群においても、すべてのサルで BLQ 又はそれに近かった（0.0315～0.0892 μg/mL）。

本試験において 14 例（3、10、30 mg/kg/回のそれぞれ 3、4、7 例）で ADA が認められた。Aflibercept 濃度の経時変化に ADA による特記すべき影響がみられたのは、3 mg/kg/回の雌 1 例及び 30 mg/kg/回の雄 1 例のみであった。すべての投与間隔を通して、ADA による曝露量の低下はいずれの動物においても認められなかった。

本試験では無毒性量は決定できなかった。最小毒性量の 3 mg/kg/回での平均 C_{max} 及び AUC（異なる投与スケジュールを考慮して補正した）に基づく曝露量比は、日本人癌患者に 4 mg/kg で初回静脈内投与したときの対応する値（TCD10794 試験）と比較すると、それぞれ 1.30 及び 1.29 であった（表 11）。

3.2.2　皮下投与

3.2.2.1　4 週間反復投与毒性試験

[Module 4.2.3.2-11: [redacted]223.4 試験]

[Module 2.6.7.7E]

カニクイザル（2.5～5.8 歳）に、aflibercept の 0（対照）、1.5、5.0、15 mg/kg/回を週 3 回、4 週間皮下投与した。サルを 1 群雌雄各 3 例からなる 4 群に分けた。対照群及び 15 mg/kg/回では、別の雌雄各 2 例について、投与期間後に 4 週間の休薬期間を設定した。評価項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、体温、眼科学的検査、心電図、血圧、器官重量、剖検、病理組織学的検査、遊離形血清中 aflibercept 濃度、ADA の有無であった。

Aflibercept の臨床的忍容性は、いずれの用量においても良好であった。

心電図、血圧及び体温に、投与期間中及び休薬期間中を通じて投与関連の変化は認められなかった。

すべての aflibercept 投与群で、投与期間終了時に 4～15%の赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット増加がみられ、15 mg/kg/回では休薬期間終了時においても引き続き認められた。

被験物質関連のコレステロール及びグルコースの増加が、aflibercept の 15 mg/kg/回の雄 1 例でみられた。

主要な被験物質関連の変化として、投与終了時に大腿骨成長板及び卵巣の病理組織学的所見が 5.0 及び 15 mg/kg/回で、腎臓の病理組織学的所見がすべての投与群で観察された。骨成長板の変化として、骨幹端毛細血管減少、骨端軟骨の肥厚、軟骨基質の変性、一次骨梁減少並びに軟骨細胞柱の崩壊及び横行性の軟骨下骨板形成が認められた。成長板の同様の変化は、血管内皮増殖因子に対する遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体（rhuMAb VEGF 又はベバシズマブ）を投与したカニクイザルでも報告されている(1)。骨幹端毛細血管減少は、被験物質の薬理作用である VEGF 枯渇に関連する可能性が考えられた(2)。卵巣の変化の特徴は、成熟卵胞数、顆粒膜細胞数又は莢膜細胞数の減少であった。同様の卵巣の変化は rhuMAb VEGF を投与したカニクイザルでも報告されており、aflibercept の生物学的活性に一致するものであった(1)。腎臓では糸球体メサンギウム基質の増加が用量に関連して発現頻度が増加し、15 mg/kg/回の雄 1 例では血清総蛋白及びアルブミンの減少並びに BUN 及び尿蛋白の増加も認められた。文献では、腎臓の変化は循環血中 VEGF の中和との関連が報告されている(3)。大腿骨の変化は休薬期間終了時にはみられなかったが、15 mg/kg/回における腎臓及び卵巣の所見は、4 週間の休薬期間後に完全な回復は認められなかった。しかし、サルにおける aflibercept の半減期は長い（約 5 日）ことから、本試験の休薬期間中においても、本薬は全身性に存在した。このため、本試験の条件下では、これらの病理組織学的所見の回復性を十分に評価することができなかった。

また投与に関連し、細胞質好酸性化を伴った副腎束状帯細胞のごく軽度から顕著な空胞形成減少が、投与期間終了時及び休薬期間終了時にすべての投与群の一部の動物で観察された。この所見に伴う変性性又は壊死性の変化はみられなかったことから、その生物学的意義はあったとしても限定的と考えられた。これらの変化の発現には軽度のストレスが寄与した可能性が考えられた。

サルにおける遊離形 aflibercept の最高血清中濃度を表 5に示す。

表 5 - サル 4 週間皮下投与時の遊離形 aflibercept の最高血清中濃度

用量（mg/kg/回）	最高濃度 (µg/mL)			
	1 日目（投与 24 時間後）		26 日目（投与 24 時間後）	
	雄	雌	雄	雌
1.5	18.5	13.5	64.7	72.3
5	55.5	74.8	268	273
15	248	164	465	533

値は有効数字 3 桁に丸めた。

本試験では、遊離形 aflibercept の高い血清中濃度（26 日目に 69～499 µg/mL）が、全例で投与期間を通して持続した。また、それぞれの投与直前に遊離形 aflibercept 濃度（トラフ濃度）を測定したところ、いずれの用量においても、本薬は投与期間中を通して存在することが示唆された。休薬期間中は 15 mg/kg/回（測定した唯一の用量）において、遊離形 aflibercept が検出された。ADA は 1 例（5 mg/kg/回）において低濃度で検出されたのみであり、この動物の遊離形 aflibercept への曝露量に悪影響を及ぼさなかった。

本試験では無毒性量は決定できなかった。

3.2.2.2　13 週間反復投与毒性試験

[Module 4.2.3.2-12: [redacted]223.09 試験]
[Module 2.6.7.7F]

カニクイザル（1.6～4.7 歳）に、aflibercept の 0（対照）、1.5、5.0、15、30 mg/kg/回を週 2 回、13 週間皮下投与した。サルを 1 群雌雄各 4 例からなる 5 群に分けた。対照群並びに 15 及び 30 mg/kg/回では、別の雌雄各 2 例について投与期間後に 6 週間の休薬期間を設定した。評価項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、体温、眼科学的検査、心電図、血圧、器官重量、剖検、病理組織学的検査、遊離形血清中 aflibercept 濃度、ADA の有無であった。

死亡はみられず、被験物質関連の一般状態の変化は認められなかった。30 mg/kg/回の雄 1 例及び 15 mg/kg/回の雌 1 例で投与期間中及び休薬期間中に恐らく薬物に関連したごく軽度の摂餌量の減少がみられ、雌では投与期間中の体重減少も認められた。

試験前値との比較において、血圧（収縮期及び拡張期）上昇が投与 13 週目に 15 mg/kg/回の雌 2 例及び 30 mg/kg/回の雌 2 例で認められた。サルの血圧にはばらつきがあることから、この所見は必ずし

も被験物質に関連したものではないと考えられた。心電図及び体温には、投与期間中及び休薬期間中ともに投与関連の変化はみられなかった。

平均ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球数のごく軽度の増加がすべての用量で投与期間中にみられ、全般的にこれらの変化は休薬期間終了時に回復が認められなかった。

5.0 mg/kg/回の雌 1 例及び 30 mg/kg/回の雄 1 例で、1 又は 3 ヵ月後に被験物質関連の尿蛋白増加が認められた。このうち雌では BUN、コレステロール及びトリグリセリドの増加、グロブリン増加並びにアルブミン及び総蛋白の減少もみられた。アルブミン又は血清総蛋白の減少が 1.5 mg/kg/回の雄 1 例及び 30 mg/kg/回の雄 2 例で、グロブリン増加が 30 mg/kg/回の雄 3 例で、30 mg/kg/回の雄 1 例で 13 週間後に血清総コレステロールの増加がみられ、休薬期間終了時には減少したものの、引き続きごく軽度の増加が認められた。肝酵素活性の増加が 30 mg/kg/回の雄 1 例（ALT、AST、GGT、ALP）及び 30 mg/kg/回の雌 1 例（GGT、ALT）にみられ、また、胆管過形成及び慢性胆管炎がそれぞれ観察された。

4 週間反復投与毒性試験で報告されたのと同様の被験物質関連の病理組織学的所見が、すべての用量で大腿骨成長板、腎臓、卵巣に認められた。腎臓の所見に伴って、少数例で尿蛋白又は血清 BUN の増加がみられた。また、2 例（5 mg/kg/回の 1 例及び 30 mg/kg/回の 1 例）で、ごくわずかから中等度の腎尿細管再生及び尿細管内蛋白円柱が観察された。被験物質関連の病理組織学的所見は、6 週間の休薬期間後にも 30 mg/kg/回で引き続き観察されたが、15 mg/kg/回では認められなかった。卵巣の所見は 15 及び 30 mg/kg/回で引き続き観察された。

サルにおける aflibercept の半減期は長い（約 5 日）ため、この休薬期間中も aflibercept が全身性に存在した。したがって、本試験ではこれらの病理組織学的所見の回復性を十分に評価することができなかった。

さらに、細胞質好酸性化を伴った副腎束状帯細胞のごく軽度から顕著な投与関連の空胞形成減少が、投与期間終了時にすべての投与群でみられ、休薬期間終了時に 30 mg/kg/回の雌で観察された。この副腎の所見の生物学的意義は、あったとしても限定的なものと考えられた。

サルにおける遊離形 aflibercept の最高血清中濃度を表 6に示す。

表 6 - サル 13 週間皮下投与時の遊離形 aflibercept の最高血清中濃度

用量 (mg/kg/回)	最高濃度 (µg/mL)			
	2 日目 (投与 24 時間後)		Day 89 (投与 24 時間後)	
	雌	雄	雌	雄
1.5	7.40	7.21	31.4	32.3
5	31.2	26.0	98.1	120
15	97.8	96.3	283	329
30	212	214	783	659

15 mg/kg/回の雄 1 例（番号 37）で得られたデータは、平均値の算出には含めなかった。それは 89 日目に抗体反応が陽性であったからである。

投与期間中の遊離形血清中 aflibercept 濃度は用量に比例して増加し、1.5、5、15、30 mg/kg/回における平均濃度は、2 日目（初回投与後）がそれぞれ 7.30、28.6、97.1、213 µg/mL、89 日目（最終投与後）がそれぞれ 31.9、109、286、721 µg/mL であった。また、それぞれの投与直前に遊離形 aflibercept の濃度（トラフ濃度）を測定したところ、いずれの投与群においても、本薬は投与期間を通して存在することが示唆された。6 週間の休薬期間終了時における遊離形血清中 aflibercept 濃度は、15 及び 30 mg/kg/回でそれぞれ 2.62 µg/mL 及び 17.7 µg/mL であった。その他の投与群については、遊離形血清中 aflibercept 濃度を測定しなかった。ADA が認められたのは 1 例（15 mg/kg/回）のみであり、この動物ではそれによって遊離形 aflibercept 濃度が顕著に低下した。

本試験では無毒性量は決定できなかった。

4　遺伝毒性試験

Aflibercept のような遺伝子組換えヒト融合タンパク質は、DNA 又はその他の染色体物質と直接相互作用することはないと考えられる。また、医薬品について通常実施される標準的な遺伝毒性試験は ICH S6 ガイドラインにおいて、バイオテクノロジー応用医薬品には適切ではないとされている。以上の事から、aflibercept についての遺伝毒性試験は実施しなかった。

5　　がん原性試験（サポート目的のトキシコキネティクス評価を含む）

Aflibercept のがん原性を評価するための試験は実施しなかった。

6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びサポート目的のトキシコキネティクス評価を含む）

6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

[Module 4.2.3.2-10: 670145 試験]

[Module 2.6.7.12A]

6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験の一環として、性成熟したカニクイザルに aflibercept の 0、3、10、30 mg/kg/回を週 1 回 15 週間投与した後、26 週目まで 2 週に 1 回投与したときの雌雄の受胎能パラメータに対する aflibercept の影響を評価した。

投与終了後 5 ヵ月間の休薬期間をおき、aflibercept の血漿中濃度が控え目に推定しても 1 µg/mL（以前の試験(4)で、卵巣機能に影響がみられないことが判明した遊離形 aflibercept の血漿中濃度）未満に低下した後、1 回以上の完全な月経周期が発現するようにした。週 1 回静脈内投与による遊離形 aflibercept の平均 C_{max} 濃度を 29、57、85 日目に平均 C_{5min} 血漿中濃度から算出したところ 3、10、30 mg/kg/回でそれぞれ約 102～109、281～343、653～1038 µg/mL であった。反復投与による血漿中濃度の経時的変化は認められなかった。15 週目の後に静脈内投与頻度を 2 週に 1 回に減らしたところ 3、10、30 mg/kg/回における平均 C_{max} の範囲は、141 日目にそれぞれ 93.4、305、729 µg/mL、183 日目にそれぞれ 60.4、269、733 µg/mL となった。それぞれの用量において、遊離形 aflibercept 及び結合形 aflibercept がいずれも投与間隔全体を通して検出されたことから、すべての投与群の動物が本試験の投与期間全体を通して遊離形 aflibercept の濃度に曝露されたことが示唆された。定常状態における結合形 aflibercept のトラフ濃度は、すべての用量で同程度であり結合形 aflibercept 血漿中濃度の飽和がすべての群でみられたことから、これらの用量における循環血中の利用可能な VEGF の多くは aflibercept に結合していたと考えられる。また、いずれの採血時点においても、遊離形 aflibercept の濃度は結合形 aflibercept の血漿中濃度を超えていたことから、aflibercept の標的はいずれの投与群においても投与期間を通して飽和していた可能性が示唆された。休薬期間終了時における遊離形 aflibercept の濃度は、いずれの投与群においても BLQ であった。

雌に aflibercept を 3 mg/kg/回以上で投与したところ、卵巣機能及び卵胞発達の消失を示唆するインヒビン B の顕著な減少、FSH の増加、卵巣重量の減少、黄体組織量の減少、成熟卵胞数の減少、子宮内膜及び子宮筋層の萎縮、膣萎縮並びにプロゲステロンピーク及び月経出血の消失が観察された。投与期間中に、aflibercept の 10 mg/kg/回以上でエストラジオールの減少も認められた。Aflibercept 誘発性の卵巣機能抑制は、最終投与後 3～18 週間以内に回復した。

いずれの用量及び時点においても、雄性生殖ホルモン濃度（FSH、LH、テストステロン）に対する被験物質関連の影響は認められなかった。主な aflibercept 関連の変化として、精子運動能低下及び精子形態異常の発現頻度増加が 3 mg/kg/回以上でみられた。5 週間投与後に形態異常の顕著な増加がすべての用量でみられ、この変化は投与期間を通して持続的に認められた。最も高頻度にみられた被験物質関連の変化は、一次的又は二次的な精子尾部の異常であった。精子頭部の二次的異常も、aflibercept 投与群の少数例で観察された。これらの異常の特徴から、影響は精子形成サイクルの後期に生じたことが示唆される。これらの変化は 13 週間の休薬期間後には完全に回復した。

受胎能に関する無毒性量は決定できなかった。この 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験で得られた最小毒性量の 3 mg/kg/回における C_{max} 及び AUC に基づく曝露量比は、ヒトに 4 mg/kg で 2 週に 1 回投与したときの対応する値と比較すると、それぞれ 1.30 及び 1.29 であった（表 11）。

6.2　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

6.2.1　非妊娠ウサギを用いた 2 週間反復投与毒性試験

[Module 4.2.3.5.2-1: DSE 20[redacted]-0569 - DIV0953 試験]

[Module 2.6.7.11A]

ウサギが胚・胎児発生に対する aflibercept の影響の有無を評価するのに適切なモデルであるか否かを検討するため、非妊娠の雌のニュージーランドホワイトウサギに、溶媒（溶媒対照群）又は aflibercept の 15、30、45 mg/kg/回を 1、4、7、10、13 日目に 1 日 1 回点滴静脈内投与（耳介静脈から約 30 分間）した。ウサギを 1 群雌 3 例からなる 4 群に分けた。

遊離形 aflibercept 及び総 aflibercept の血漿中曝露量は、試験期間を通してほぼ用量比例的に増加した。aflibercept 投与動物から採取したいずれの血清サンプルにおいても、ADA は検出されなかった。また免疫応答が発現するとしばしば薬物の消失が加速されるが、試験を通して全例で薬物濃度が持続したことから抗体は存在しないことが示唆された。ウサギにおける遊離形 aflibercept 及び結合形 aflibercept の血漿中濃度を表 7に示す。

表 7 - ウサギにおける遊離形及び結合形 aflibercept の最高血漿中濃度

用量 (mg/kg/回)	遊離形 aflibercept (μg/mL)		結合形 aflibercept (μg/mL)	
	1 日目	13 日目	1 日目	13 日目
15	374.8	662.6	26.9	11456
30	777.2	1039.6	28.6	9194
45	916.2	1389.8	31.6	9395

Aflibercept の 15、30、45 mg/kg/回の投与により、すべての用量でごく軽度の摂餌量減少を伴うごく軽度の体重減少及び糞排泄減少が認められた。45 mg/kg/回での生存期間中の変化はごく軽度であったことから、aflibercept の臨床的忍容性はこの用量まで良好と考えられた。

したがって、aflibercept の胚・胎児発生に及ぼす影響の有無を評価するための血漿中曝露量及び免疫応答の観点において、ウサギは適切なモデルと考えられた。

6.2.2　用量設定試験

[Module 4.2.3.5.2-2: TEP0184 試験]
[Module 2.6.7.11B]

妊娠ニュージーランドホワイトウサギを用いて、妊娠 6、9、12、15、18 日に aflibercept を 1 日 1 回静脈内投与したときの母動物毒性及び発生毒性の予備的徴候を評価した。交尾確認雌に、溶媒（溶媒対照群）又は aflibercept の 3、15、45 mg/kg/回を妊娠 6、9、12、15、18 日に、30 分間点滴静脈内投与した。交尾確認雌ウサギを 1 群 5～6 例からなる 4 群に分けた。妊娠 29 日にウサギを安楽殺して剖検した。評価項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、妊娠子宮重量、剖検、妊娠状況、生殖パラメータ、胎児検査（外表）、遊離形及び結合形 aflibercept の血漿中濃度並びに ADA の有無であった。

妊娠 21 日に採取したサンプル中の遊離形 aflibercept 及び総 aflibercept の平均血漿中濃度は、用量依存的に増加した。この時点で検出された結合形 aflibercept の量は、すべての投与群で同程度であった。これらの結果により、aflibercept を 3 mg/kg で 72 時間ごとに投与すると、全身で産生された大部分の VEGF に十分結合する可能性があることが示唆された。妊娠 29 日（最終投与の 11 日後）に、循環血中の遊離形、結合形及び総 aflibercept の量が大幅に減少した。遊離形 aflibercept の濃度は妊娠 21 日の値の 25%未満であったものの、引き続き結合形複合体の濃度を上回っており、この時点での循環血中総 aflibercept の 70%を上回っていた。妊娠 29 日目に 8 例の aflibercept 投与動物で ADA が妊娠 6 日と比較して増加していたが、ADA 陽性動物の半数における抗体価は背景値の 5 倍を下回っていたことから、

本アッセイにおける非特異的な干渉が示唆された。4 例の動物で 14 µg/mL を上回る ADA が認められた。これらの動物における妊娠 29 日の ADA の有無は、遊離形及び結合形（並びに総）aflibercept の濃度と逆相関していた。妊娠 29 日（最終投与の 11 日後）に採取した羊水サンプル中の遊離形 aflibercept の平均濃度には、用量依存的な増加が認められた。それぞれの投与群における aflibercept の濃度には大幅なばらつきがみられたが、羊水中及び母動物の血漿サンプル中の aflibercept 濃度の間には相関が認められた。

妊娠ウサギにおける遊離形及び結合形 aflibercept の血漿中濃度を表 8に示す。

表 8 - 妊娠ウサギにおける遊離形及び結合形 aflibercept の血漿中濃度

用量 (mg/kg/回)	遊離形 aflibercept (µg/mL)		結合形 aflibercept (µg/mL)	
	妊娠 21 日	妊娠 29 日	妊娠 21 日	妊娠 29 日
3	14.06	0.82	2.96	0.53
15	94.28	4.00	3.52	0.85
45	181.99	42.90	4.94	1.25

45 mg/kg/回の雌 1 例が妊娠 21 日に流産した。妊娠 21 日に床敷の変色、ケージ下の赤色物、ケージ下の胎盤残滓及び体重減少がみられたためこの雌を安楽殺した。この流産は aflibercept の薬理作用に関連して生じた可能性がある。15 mg/kg/回の雌 1 例が妊娠 29 日に早産した。この雌では、早産の前に摂餌量減少を伴う体重減少が認められた。被験物質投与との関連は否定できなかった。3 mg/kg/回では、試験を通して投与後の死亡及び流産はみられなかった。3 mg/kg/回の雌 1 例で、妊娠 7 日にケージ内の赤色物が観察された（この雌の帝王切開データは正常範囲内であった）。

すべての aflibercept 投与群で糞排泄減少がみられ、その頻度は対照群よりわずかに高かった。被験物質及び用量に関連した軽微な平均体重減少が、妊娠 6～9 日にすべての用量で認められた。妊娠 9～21 日における aflibercept 投与群の平均体重増加量は対照群より少なかった。妊娠 6～29 日の平均体重増加量は、3 及び 45 mg/kg/回は対照群と同程度であったが 15 mg/kg/回ではわずかに少なかった。

被験物質に関連したごく軽度の摂餌量減少（対照群との比較）が、すべての投与群で主として妊娠 12～22 日に認められた。子宮重量には被験物質関連の変化はみられず、剖検ではいずれの用量においても所見は認められなかった。黄体数、着床前胚損失率及び着床数の群平均値は、すべての群で同程度であった。統計学的有意差はなかったが、平均着床後胚損失率（早期及び後期吸収胚）は、45 mg/kg/回の雌がわずかに対照群より高かった。このため、45 mg/kg/回の雌における平均生存胎児数は、対照群よりわずかに少なかった。3 及び 15 mg/kg/回における平均着床後胚損失率及び生存胎児数には、被験物質関連の変化は認められなかった。統計学的有意差はないものの、aflibercept 投与群の母動物から

得られた同腹児の平均胎児体重は、対照群の母動物から得られた同腹児よりわずかに低かった。胎児外表異常はいずれの用量においても認められなかった。

本試験の条件下における母動物の無毒性量は、3 mg/kg/回と判断された。

6.2.3　胚・胎児発生に関する試験

[Module 4.2.3.5.2-3: TER0506 試験]

[Module 2.6.7.13A]

妊娠ニュージーランドホワイトウサギに、aflibercept を妊娠 6、9、12、15、18 日（計 5 回）に 1 日 1 回静脈内投与したときの母動物毒性及び発生毒性を評価した。交尾確認雌に、溶媒（溶媒対照群）又は aflibercept の 3、15、60 mg/kg/回を妊娠 6、9、12、15、18 日に 30 分間点滴静脈内投与した。ウサギを主試験群（1 群 22～26 例からなる 4 群）及びトキシコキネティクス解析群（溶媒対照群：3 例、aflibercept 投与群：1 群 6 例）に分けた。妊娠 29 日にウサギを安楽殺して剖検した。評価項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、妊娠子宮重量、剖検、妊娠状況、生殖パラメータ、胎児体重、胎児検査（外表、内臓及び骨格）、遊離形及び結合形 aflibercept の血漿中濃度並びに ADA の有無であった。

Aflibercept を点滴静脈内投与したときの遊離形 aflibercept の最高血漿中濃度（C_{max}）は、用量に伴い増加した（トキシコキネティクス評価を 5 回目の点滴静脈内投与後、すなわち妊娠 18 日以降に実施した；表 9）。結合形 aflibercept の血漿中濃度はすべての投与群で同程度であったことから、3 mg/kg/回でも十分な aflibercept の濃度が得られ、これらの動物に存在するほとんどすべての循環血中 VEGF に結合することが示唆された。いずれの時点においても 3 投与群のすべてで、遊離形 aflibercept の濃度は結合形 aflibercept の濃度を超えていた。遊離形 aflibercept の曝露量推定値又は 0.5 時間から 72 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0.5\text{-}72}$）も、3 mg/kg/回の $AUC_{0.5\text{-}72}$ と比較すると用量比を上回って増加した。

表 9 - トキシコキネティクスパラメータの要約

用量	投与後の時点 (mg/kg/回)	遊離形 aflibercept （µg/mL）			結合形 aflibercept （µg/mL）		
		3	15	60	3	15	60
妊娠 18 日	0.5 時間	56.1	707	2460	3.07	4.79	5.05
	6 時間	53.8	624	1640	6.85	6.83	5.53
妊娠 19 日	24 時間	19.5	332	839	4.14	5.10	4.57
妊娠 20 日	48 時間	23.8	275	807	8.13	6.78	5.15
妊娠 21 日	72 時間	14.0	121	333	2.84	4.10	5.05
$AUC_{0.5\text{-}72}$	NA	1935	24 300	67 018	NC	NC	NC

略語：AUC：血漿中濃度ー時間曲線下面積；NA：該当せず；NC：算出せず

対照群から採取したサンプル及び主試験のいずれの aflibercept 投与群から妊娠 6 日（投与前）に採取した血清サンプルにおいても、ADA は検出されなかった。妊娠 29 日には、ADA が 3、15、60 mg/kg/回において、それぞれ 2/22 例、5/22 例、14/26 例で検出された。トキシコキネティクス測定及び抗体検査は異なる動物のサブグループについて実施したため、ADA の存在が aflibercept の消失に影響を及ぼしたか否かは不明である。

60 mg/kg/回の 3/22 例で被験物質関連の流産がみられたため、妊娠 21～26 日に途中安楽殺した。安楽殺前の一般状態の変化として、ケージ下の胎児／胎盤残滓又はケージ下の赤色物並びに摂餌量減少を伴う体重減少が認められた。3 及び 15 mg/kg/回では死亡例はみられなかった。

生存例ではいずれの用量においても被験物質関連の一般状態の変化は認められなかった。15 及び 60 mg/kg/回では、妊娠 6～9 日に軽微な被験物質関連の平均体重減少がみられた。対照群と比較した中等度の平均体重増加量減少が 15 及び 60 mg/kg/回で妊娠 9～21 日に認められた。15 及び 60 mg/kg/回における妊娠 21 日以降の平均体重増加量は、対照群の雌と比較してわずかに多かった。3 mg/kg/回では、対照群と比較した被験物質関連の平均体重増加量減少が妊娠 6～21 日にみられた。最大の変化は妊娠 6～9 日にみられた（3 mg/kg/回の体重増加量は対照群と比較して-86%）。妊娠 21 日以降の 3 mg/kg/回における平均体重増加量は対照群とほぼ同程度であった。

軽微な被験物質関連の摂餌量減少が、15 及び 60 mg/kg/回の少数例で試験期間を通して散見された。3 mg/kg/回では、被験物質関連の摂餌量の変化は認められなかった。

対照群と比較した中等度の平均子宮重量減少が 60 mg/kg/回でみられたが、この用量における 1 腹当たりの平均胎児数減少によるものと考えられた。3、15 mg/kg/回では、被験物質に関連した平均子宮重量の変化は認められなかった。剖検では、いずれの用量においても被験物質関連の肉眼所見はみられなかった。

対照群と比較した被験物質関連の平均着床後胚損失数（早期吸収胚）の増加が、60 mg/kg/回で認められた。そのため、60 mg/kg/回における平均生存胎児数は、対照群と比較してわずかに少なかった。3 及び 15 mg/kg/回では、被験物質に関連した平均着床後損失数及び生存胎児数の変化はみられなかった。いずれの用量においても、被験物質に関連した平均胎児体重の変化は認められなかった。

被験物質関連の外表奇形として、全身浮腫が 3 mg/kg/回の 2 胎児（多発奇形の 1 胎児を含む）に、無指が 15 mg/kg/回の 1 胎児に、全身浮腫、腹壁破裂、鎖肛又は短尾が 60 mg/kg/回の 9 胎児（多発奇形の 6 胎児を含む）に、それぞれ認められた。

これらの所見の多くは､内臓又は骨格異常を伴う複数の多発外表奇形がみられた胎児で観察された。60 mg/kg/回の胎児において、被験物質関連の内臓奇形が主に心臓（心室中隔欠損、心室の狭小若しくは拡張又は房室弁欠損）、大血管及び動脈（肺動脈閉鎖、肺動脈狭小、大動脈騎乗、肺動脈枝減少、大動脈管の欠損又は狭小、食道後大動脈弓又は大動脈弓拡張、大動脈拡張並びに食道後鎖骨下動脈）にみられ、本薬の抗血管新生作用に関連する可能性があると考えられた。また、片側小眼球、腸閉鎖、尿管の屈曲、拡張、膀胱膨満が、60 mg/kg/回で観察された。15 mg/kg/回の胎児では、被験物質関連の内臓奇形は認められなかった。3 mg/kg/回でみられた内臓奇形は、複数の奇形がみられた 1 胎児における肺動脈及び大動脈弓の拡張のみであった。60 mg/kg/回の胎児の骨格検査では、対照群と比較して骨格奇形又は変異の発現頻度が増加し、尾椎癒合、肋骨の癒合又は過剰、胸骨分節癒合、腰椎椎弓又は椎体の過剰並びに仙椎椎弓又は椎体の欠損が観察された。60 mg/kg/回では、被験物質に関連した頭頂間骨の欠損及び小型化の発現頻度増加も認められた。3 及び 15 mg/kg/回では、被験物質関連の骨格奇形や変異はみられなかった。

また、骨化不全が舌骨、胸椎、腰椎、胸骨分節、距骨、前肢指骨及び後肢趾骨にみられ、60 mg/kg/回では、対照群と比較して顕著な発現頻度増加が認められた。肋骨及び距骨の骨化不全は、3 mg/kg/回においても対照群より高い発現頻度で観察された。本試験の 15 mg/kg/回における骨化不全の発現頻度は、対照群の値と同程度であると考えられた。いずれの用量においても、平均仙尾椎数には被験物質関連の変化は認められなかった。

妊娠雌ニュージーランドホワイトウサギに aflibercept の 60 mg/kg/回を妊娠 6、9、12、15、18 日（計 5 回）に 1 日 1 回静脈内投与（30 分間の点滴静脈内投与）したところ、流産、妊娠 6～9 日の軽微な平

均体重減少及びその後の平均体重増加量減少、軽微な摂餌量減少、中等度の平均子宮重量減少、早期吸収胚数の増加による生存胎児数減少、外表奇形（全身浮腫、腹壁破裂、鎖肛及び短尾）、主に心臓における内臓奇形（心室中隔欠損、心室狭小又は拡大及び房室弁欠損）、大血管及び動脈の奇形（肺動脈閉鎖、肺動脈狭小、大動脈騎乗、肺動脈枝減少、大動脈管の欠損又は狭小、食道後大動脈弓又は大動脈弓拡張、大動脈拡張並びに食道後鎖骨下動脈）、骨格奇形（尾椎癒合、肋骨の癒合又は過剰、胸骨分節癒合、腰椎の椎弓又は椎体過剰、仙椎の椎弓又は椎体欠損並びに頭頂間骨の欠損又は小型化）並びに舌骨、胸椎、腰椎、胸骨分節、距骨、前肢指骨及び後肢趾骨の骨化不全が認められた。15 mg/kg/回における被験物質関連の変化は、妊娠 6～9 日の軽微な平均体重減少及びその後の平均体重増加量減少、軽微な摂餌量減少並びに無指であった。

3 mg/kg/回における被験物質関連の変化は、平均体重増加量減少、全身浮腫、大血管の奇形並びに肋骨及び距骨の骨化不全のみであった。本試験の条件下における母動物の無毒性量は 3 mg/kg/回、発生に関する無毒性量は 3 mg/kg/回未満と判断された。

6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。

6.4　幼若動物を用いた試験

[Module 4.2.3.5.4-1: 670144 試験]
[Module 2.6.7.15]

性的に未成熟なカニクイザル（2～2.5 歳）を用いて 13 週間反復静脈内投与毒性試験を実施した。この齢のサルを選択した理由は、倫理上の配慮（カニクイザルを 12～14 ヵ月齢より前に離乳させることは推奨されない）及び技術的配慮（検疫・馴化期間）によるものであった。

幼若カニクイザルに aflibercept の 0（対照）、0.5、3、30 mg/kg/回を、週 1 回、3 ヵ月間静脈内投与（30 分間の点滴静脈内投与）した。サルを 1 群雌雄各 3 例からなる 4 群に分けた。対照群並びに 3 及び 30 mg/kg/回では、別の雌雄各 2 例について 3 ヵ月間の投与期間の後に 5 ヵ月間の休薬期間を設定した。この投与レジメンは、臨床試験で現在推奨されている投与レジメン（2 週又は 3 週に 1 回）をサポートするために選択した。評価項目は、健康状態悪化の徴候及び生死の確認、一般状態観察、月経の規則性、体重、食欲、眼科学的検査、心電図、血圧、体温、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、骨吸収の生化学的マーカー、C-反応性蛋白、骨密度測定、X 線検査、器官重量、剖検、病理組織学的検査、遊離形及び結合形 aflibercept の血漿中濃度並びに ADA の有無であった。

本試験において死亡はみられず、途中安楽殺は実施しなかった。30 mg/kg/回における被験物質関連の主な一般状態の変化として、活動性低下、円背位、口吻からの透明又は赤色分泌物、被毛の赤色汚れ又は皮膚発赤（口吻部位）並びにくしゃみが観察された。また、振戦、非協調運動及び横臥が 30 mg/kg/回の 1 例で散見された。3 mg/kg/回における被験物質関連の一般状態の変化は、1 又は 2 例の雌における口吻からの赤色分泌物並びに被毛の赤色汚れ又は皮膚発赤（口吻部位）のみであった。これらの一般状態の変化は主に投与 9 週目からみられたが、円背位以外は、休薬期間終了時には認められなかった。

被験物質関連の平均体重減少が、30 mg/kg/回の雌雄で投与期間中に認められた（投与期間終了時に-1 週目と比較してそれぞれ-8%及び-6%）。休薬期間中は、対照群及び投与群のいずれにおいても体重増加がみられた。

投与終了時に被験物質関連の眼科学的変化はみられなかったが、休薬期間終了時に 3 mg/kg/回の 1 例及び30 mg/kg/回の3例で、リンパ濾胞に特徴的な肉色の小結節が眼球結膜内に散在性に認められた。他の眼病変はみられなかったことから、これは眼の毒性変化を示唆するものではなく抗原刺激に対する局所性又は全身性の反応を示唆している可能性が考えられた。

投与期間中又は休薬期間中に、心電図、血圧、体温に投与関連の変化はみられなかった。

被験物質関連のフィブリノーゲン増加が、投与期間中に 30 mg/kg/回で認められた。被験物質に関連した赤血球数、ヘモグロビン又はヘマトクリットの群平均の増加が、すべての用量で投与期間中にみられた。これらのパラメータは、休薬期間終了時には正常値に戻った。

被験物質関連の総蛋白、アルブミン及びクレアチニンの増加が、3 及び 30 mg/kg/回で対照群と比較して認められた。30 mg/kg/回では、グロブリンの増加及び A/G 比の減少もみられた。3 及び 30 mg/kg/回の雄では、対照群と比較してコレステロールの増加が認められた。30 mg/kg/回ではミクロアルブミンの増加がみられ、腎臓の所見も観察された。これらの変化は、休薬期間終了時には認められなかった。休薬期間中、ALP、リン及びカリウムの増加が 30 mg/kg/回の雄 1 例でみられた。これらの ALP 及びリンの増加は投与関連と考えられ、骨の病理組織学的変化を伴っていた。

被験物質関連の下垂体相対重量の増加が、30 mg/kg/回の雌で認められた。この所見は副腎及び卵巣で観察された組織学的変化並びに既知の視床下部下垂体軸、生殖腺及び副腎の間での調節フィードバック相互作用に起因すると考えられる。30 mg/kg/回の雌では、この下垂体の変化は 5 ヵ月間の休薬期間後に回復した。

骨吸収マーカーであるC-テロペプチド（CTx）及びN-テロペプチド（NTx）の減少は、骨成長遅延及び成長板の変化と関連している可能性がある。全体としてこれらの骨吸収マーカーの増加は、個々の回復性試験例（雌雄）で、12週目のそれぞれの値と比較してみられ、30 mg/kg/回において最も顕著であった。これらの増加は、試験の34週目までに概ね正常化した。雌雄間で変化に違いが認められたが、これは一般に雌雄間でみられる骨成長の相違に関連している可能性がある。

X線検査において、規則的で軽微からごく軽度の骨端板拡大を特徴とする成長板の肥厚が、30 mg/kg/回の動物及び3 mg/kg/回の雄1例でみられ、病理組織学的検査で観察された骨端軟骨の肥厚に一致していた。大腿骨及び脛骨の成長板は、3ヵ月間の投与期間終了時に検査したすべての動物で開いていた。Afliberceptの3 mg/kg/回以上で骨端軟骨の肥厚が両長骨に観察され、また同様の変化が胸骨及び椎骨の骨端軟骨にみられたが、その変化はより軽度であり肥大した軟骨細胞の軽微な肥厚に限定されていた。成長板の変化には回復性がみられ、休薬期間の24又は34週目には成長板肥厚の発現頻度増加は認められなかった。全身骨密度の低下は3、30 mg/kg/回の雄でみられ、30 mg/kg/回の雌ではより軽度に認められ、これは体重への投与の影響に対する二次的な変化と考えられた。Aflibercept投与群及び対照群のいずれにおいても、全身骨密度は全体として休薬期間中に同程度の比率で増加した。腰椎及び大腿骨（部分及び全体）の部位における骨密度の増加率は、休薬期間の最初の12週間には対照群と比較してaflibercept投与群の雌雄で同程度又はより低かったが、休薬期間の最後の10週間では投与群の方が高かった。34週目のaflibercept投与群の雌における骨密度は、概ね対照群より高かった（腰椎、大腿骨全体及び大腿骨転子部）が、大腿骨頸部では対照群より低かった。

頸椎の肉眼的異常が、休薬期間後に30 mg/kg/回の雄1例で観察された。この動物でみられたC5、C6、C7の癒合は、aflibercept投与によるものと考えられた。投与期間終了時に3 mg/kg/回以上の雌雄でみられたafliberceptへの曝露による主要な骨の変化は、主に椎弓における骨軟骨性外骨腫であった。中等度から顕著な変化がみられたサルでは、外骨腫に伴ってしばしば被覆する軸性筋組織の筋線維萎縮及び骨膜反応に隣接した微小血管の増生／変性が観察された。骨軟骨性外骨腫は、30 mg/kg/回の雄1例において大腿骨近位部にもみられた。休薬期間後に椎骨の3分節の1つ又はすべてに及ぶ骨軟骨性外骨腫が、30 mg/kg/回の雄1例及び雌2例にみられたことから、検討した最高用量におけるこのaflibercept誘発性の変化は持続的であることが示唆された。3 mg/kg/回では、休薬期間後に椎骨の骨軟骨性外骨腫はみられなかったことからこの所見の回復性が示唆された。30 mg/kg/回の雄の少数例では、椎弓に沿った被覆する軸性筋組織の筋線維萎縮又は外骨腫に隣接する微小血管の増生／変性が休薬期間後にも持続する組織学的所見として同時に散見された。休薬期間後には、いずれの動物においても長骨の骨軟骨性外骨腫は認められなかった。

その他の発現頻度が低く軽微な被験物質関連の骨所見として、椎体腹側皮質骨の軟骨化生並びに大腿骨及び胸骨の骨膜の軟骨化生巣が観察された。全体として、これらの所見から被験物質は軟骨内骨

化のみならず膜内骨化にも影響を及ぼすことが示唆された。これらの骨格所見は、5 ヵ月間の休薬期間後には完全に回復したと考えられた。

投与終了時に鼻腔において最も高頻度にみられた aflibercept 関連の所見は呼吸上皮の変性／再生であり、検討したすべての用量で観察されその発現頻度又は重症度の増加は用量依存的であった。この所見に伴って、しばしば出血及び化膿性滲出物が認められた。少数例では被験物質関連の変化が嗅上皮にもみられ、その所見として変性／再生又は上皮下毛細血管の血栓症を伴う散発的な壊死が観察された。30 mg/kg/回でみられたその他の発現頻度が低く軽微な被験物質関連の変化として、中隔軟骨細胞の肥大及び篩骨甲介における破骨細胞性吸収の増加が認められた。軽微から中等度の呼吸上皮の変性／再生又はごく軽度から中等度の嗅上皮の変性／再生が、30 mg/kg/回の休薬群全例でみられたことから、この用量でのこれらの所見には回復性がないことが示唆された。対照的に 3 mg/kg/回では、これらの上皮の変化はほぼ完全に回復した。鼻腔内の滲出物が、休薬期間終了時に 30 mg/kg/回の両方の雄で観察された。しかし、3 mg/kg/回ではいずれの動物にもみられなかったことから、低用量のみでの回復性が示唆された。更なる所見としては、鼻腔内出血及び好酸性軟骨／活性化軟骨細胞がそれぞれ 30 mg/kg/回の雌 1 例のみにみられたことから、これらの被験物質関連の変化はほぼ完全に回復したことが示唆された。

腎臓では、過ヨウ素酸シッフ反応陽性の糸球体係蹄における好酸性基質増加が、3 mg/kg/回以上の雌雄に観察された。また、より重度の腎臓の変化として尿細管拡張及び円柱形成を伴う糸球体症が 30 mg/kg/回の雄 1 例で認められた。これらの腎臓の所見は、休薬期間後に完全に回復した。

卵巣の濾胞形成の変化が、0.5 mg/kg/回以上で用量依存的にみられた。最も高頻度にみられた所見は成熟卵胞の減少であり、同時に顆粒膜細胞及び莢膜細胞の減少がしばしば観察された。これらの所見は休薬期間後に完全に回復した。

3 mg/kg/回以上の雌雄における被験物質関連の副腎の所見として、細胞質好酸性の増加を伴う細胞質空胞形成減少がみられ、剖検時に観察された斑状化及び暗色化と関連していた。これらの所見は休薬期間後に完全に回復した。

門脈炎を伴う門脈周囲壊死が、30 mg/kg/回の雄 1 例の肝臓で認められた。この所見は、休薬期間後に完全に回復した。

脳では脈絡叢における泡沫状細胞質を伴ったマクロファージの軽微な浸潤が、3 mg/kg/回以上の雌雄に観察された。これらの動物の大部分では、この所見に伴って側脳室、第三脳室、第四脳室のいずれかにおける脈絡叢内の慢性血管変性／線維化が認められた。休薬期間後に 30 mg/kg/回の雄 1 例のみ

で脈絡叢内の軽微なマクロファージ浸潤がみられたことから、これらの所見の部分的な回復性が認められた。

全身性の微小血管変化として、血管の増生／変性が 30 mg/kg/回の 2 例で他の組織（十二指腸、胆嚢及び注射部位）に進展していた。休薬期間終了時にこの所見は 30 mg/kg/回の雌雄各 1 例で腰椎にみられたのみであったことから、部分的に回復したと考えられた。

サルにおける遊離形 aflibercept の最高血漿中濃度及び曝露量を表 10に示す。

表 10 - サル 3 ヵ月間静脈内投与時の遊離形 aflibercept のトキシコキネティクスパラメータ

用量 (mg/kg/回)	85 日目の最高濃度（µg/mL）（13 回目投与の 5 分後）		$AUC_{0\text{-}168h}$（µg.day/mL）（85 日目）
	雄	雌	
0.5	8.17	10.9	18
3	87.2	60.3	198
30	829	830	1702

略語：AUC：血漿中濃度－時間曲線下面積

遊離形及び総 aflibercept の最高及びトラフ血漿中濃度の平均値は、本試験の投与期間を通してほぼ用量に比例して増加した。0.5 mg/kg/回における最高濃度及びトラフ濃度の平均値は、それぞれ 7.90 ～ 9.71 µg/mL 及び 0 (BLQ)～0.104 µg/mL の範囲であった。Aflibercept 投与後 0～168 時間における曝露量の推定値（遊離形薬物濃度－時間曲線下面積；$AUC_{0\text{-}168h}$）は、用量に伴って増加した。休薬期間終了時に採取したサンプルでは、遊離形 aflibercept は検出されなかった。また、それぞれの投与の直前に測定した遊離形 aflibercept の濃度（トラフ濃度）では、3 及び 30 mg/kg/回において、本薬が投与期間を通して存在することが示唆された。0.5 mg/kg/回では、投与後の最初の 24 時間に、遊離形 aflibercept の濃度が結合形の濃度を上回っていた。この時点の後における結合形 aflibercept の濃度は、遊離形 aflibercept の濃度に等しいか又はそれを上回っていた。

ADA が 3 mg/kg/回の 1 例及び 30 mg/kg/回の 2 例で検出された。これらの動物の 1 例（番号 403、30 mg/kg/回）について本試験の休薬期間中に検査したところ、24 週目の時点で結合形 aflibercept の濃度は検出不能と判断された。この動物は休薬試験群の 8 例のうち、この時点で測定可能な結合形 aflibercept がみられなかった唯一の動物であったことから、ADA により消失が加速した可能性が示唆された。ADA が存在したにも関わらず、この動物では同じ投与群の他の例でみられた毒性所見が認められた。Aflibercept に対する測定可能な抗体がみられた他の 2 例は休薬試験例ではなかったが、aflibercept 濃度の減少は認められなかった。

無毒性量は決定できなかった。最小毒性量の 0.5 mg/kg/回での遊離形 aflibercept の曝露量である平均 C_{max} 及び AUC（異なる投与スケジュールを考慮して補正した）と、日本人癌患者に 4 mg/kg で初回静脈内投与したとき（TCD10794 試験）の対応する値との比率は、それぞれ 0.12 及び 0.12 であった（表 11）。

7　局所刺激性試験

[Module 4.2.3.6-1: DSE 20[redacted]-0387 (TOL1079) 試験]
[Module 2.6.7.16]

2 種の aflibercept 製剤（標準的臨床試験用製剤の F1 及び凍結乾燥製剤の F2）の局所刺激性をウサギを用いて比較検討した。

雌のニュージーランドホワイトウサギを、1 群 3 例からなる 6 群に分けた。F1 製剤投与群には aflibercept 水溶液（F1）溶媒を左の耳、大腿又は側腹部（溶媒対照部位）に、aflibercept 水溶液（F1）を 24.4 mg/mL の濃度で、右の耳、大腿又は側腹部に、それぞれ静脈内、筋肉内又は皮下注射した。F2 製剤投与群には、0.9%塩化ナトリウム溶液又は aflibercept 水溶液（F2）溶媒を左の耳、大腿又は側腹部（それぞれ絶対対照部位及び溶媒対照部位）に、aflibercept 水溶液（F2）を、25 又は 100 mg/mL の濃度で、右の耳、大腿又は側腹部に、それぞれ静脈内、筋肉内又は皮下注射した。投与容量は、静脈内投与では 1 mL、筋肉内及び皮下投与では 0.5 mL とした。投与（1 日目）の後、ウサギを無投与で 8 日間観察した。評価項目は、生死確認、一般状態観察（摂餌量の定性的評価を含む）、注射部位の反応（血腫の有無及びサイズ、紅斑並びに浮腫の採点）、体重、剖検及び注射部位の病理組織学的検査であった。

本試験において死亡は認められなかった。被験物質関連の摂餌量減少又は無摂餌が、aflibercept の 100 mg/mL 溶液（F2）を静脈内、筋肉内及び皮下投与した動物でみられた。8 日目に、軽微な体重減少又は体重増加量減少が、投与経路を問わず、aflibercept の 100 mg/mL 溶液（F2）群で、投与前データと比較して認められた。

24.4 mg/mL（F1）、25 又は 100 mg/mL（F2）の aflibercept を含有する製剤を静脈内、筋肉内及び皮下投与した部位において、被験物質関連の局所反応は観察されなかった。8 日間の観察期間終了時に、被験物質関連の肉眼的及び病理組織学的所見は認められなかった。

カニクイザルを用いて実施した 4 週間、13 週間及び 6 ヵ月間反復静脈内投与試験においても、aflibercept の局所刺激性を評価した。反復点滴静脈内投与したサルの注射部位において、被験物質関連の病理組織学的所見は認められなかった。

8　その他の毒性試験

8.1　Aflibercept のヒト組織交差反応性試験

[Module 4.2.3.7.7-4: [redacted]01-141 試験]

[Module 2.6.7.17A]

患者への初めての投与に先立ち、aflibercept のヒト組織に対する結合の有無を評価するとともに、組織又は器官毒性の有無を予測した。3 例の異なる個人から採取した 35 のヒト組織のパネル（脳、心臓、消化管、腎臓、肝臓及び肺を含む）を、対照物質（ビオチン標識ヒト IgG1）又は 5 及び 25 µg/mL の濃度のビオチン標識 aflibercept とともにインキュベートした。5 µg/mL の濃度は、先に実施した測定法開発アッセイで標的抗原への最大結合がみられた最低濃度に基づいて設定した。25 µg/mL の濃度は患者における初回投与量での推定血清中濃度に相当するものであった。ヒト VEGF を遺伝子導入したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を陽性対照として使用した。Aflibercept の結合は、アビジン・ビオチン・ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体/3-3'ジアミノベンジジン HCl 反応を用いた免疫組織化学的方法により検出した。

ヒト VEGF を遺伝子導入した CHO 細胞は、強度のビオチン標識 aflibercept 染色を示したことから、この方法は特異的な aflibercept 結合の検出に適切であることが示唆された。Aflibercept の 5 又は 25 µg/mL の濃度において、35 の代表的なヒト組織のいずれにおいても、特異的な aflibercept 染色は認められなかった。

8.2　溶血に対する影響

サルを用いた静脈内投与試験開始に先立ち、aflibercept の in vitro での全血の溶血誘発能、並びに血漿及び血清における凝集誘発能の有無を 1 又は 2 例のサルで検討した（[Module 4.2.3.7.7-1: HEM-No 1 試験]、 [Module 2.6.7.17B]）。リン酸ナトリウム（[redacted] mM）、クエン酸ナトリウム（[redacted] mM）、塩化ナトリウム（[redacted] mM）、精製白糖（[redacted]%）、ポリソルベート 20（[redacted]%）を含有する 0.69、2.09、4.17 mg/mL の濃度の aflibercept をサルから採取した等容量のヘパリン処理した血液、血清又は血漿と混合した。その結果、いずれの濃度においても溶血及び蛋白沈殿物は誘発されなかった。

患者を対象とした静脈内投与試験開始に先立ち、aflibercept の in vitro での全血における溶血誘発能並びに血漿及び血清における凝集誘発能の有無を 2 例のヒトドナーについて検討した（[Module 4.2.3.7.7-2: HEM-No3 試験]、 [Module 2.6.7.17C]及び [Module 4.2.3.7.7-3: HEM-No5 試験]、 [Module 2.6.7.17D]）。

リン酸ナトリウム（[redacted] mM）、クエン酸ナトリウム（[redacted] mM）、塩化ナトリウム（[redacted] mM）、精製白糖（[redacted]%）、ポリソルベート 20（[redacted]%）を含む水溶液中における 0.50、2.00、4.00 mg/mL の濃度の aflibercept、並びにリン酸ナトリウム（[redacted] mM）、クエン酸ナトリウム（[redacted] mM）、塩化ナトリウム（[redacted] mM）、精製白糖（[redacted]%）及びポリソルベート 20（[redacted]%）を含む水溶液中における 8.00 mg/mL の濃度の aflibercept を、ヒトから採取した等容量のヘパリン処理血液、血清又は血漿と混合した。

その結果、いずれの濃度においても溶血及び蛋白沈殿物は誘発しなかった。

8.3　免疫原性

げっ歯類、ウサギ及びサルを用いて実施したすべての毒性試験において、aflibercept に対して産生された抗体の濃度を測定することにより、aflibercept の免疫原性を評価した。

CD-1 マウスに、aflibercept の 10 及び 15 mg/kg/回を週 3 回、4 週間皮下投与したところ、ADA の産生を伴う死亡並びに糸球体及び尿細管の所見がすべての aflibercept 投与動物で早くて投与 8 日目に認められた（3.1.1.1項参照）。SCID マウスに aflibercept の 2.5 又は 25 mg/kg/回を週 2 回、4 又は 8 週間投与したときの臨床的忍容性は良好で、ADA 産生は誘発されなかった（3.1.1.2項参照）。SD ラット（3.1.2項参照）に aflibercept を週 3 回、4 週間皮下投与したところ、10 mg/kg/回以上で死亡がみられ、2 mg/kg/回以上で腎糸球体及び尿細管の変化が観察された。この所見は aflibercept に対する免疫応答の発現に関連するものと考えられ、それを示唆する変化として、aflibercept に対する抗体産生及び同時期の血清中における遊離形 aflibercept 濃度の減少が認められた。ヌードラットに aflibercept の 25 mg/kg/回を週 2 回、4 又は 8 週間投与したところ、SD ラットで認められたものと類似した腎臓の所見が発現したが、検出可能な IgG 応答は認められなかった。一方、試験を通して aflibercept 濃度の減少がみられたことから、恐らくアッセイで検出されない特異的な抗体（IgM 又は IgA）の形成に起因するものと考えられた。SD ラットを用いて皮下投与により実施した 13 週間反復投与毒性試験でみられた腎毒性は、少なくとも部分的には腎糸球体における免疫複合体の沈着によるものと考えられた。当該試験結果から、げっ歯類に aflibercept を反復投与すると強度の免疫応答が誘発されるため、反復投与毒性試験におけるげっ歯類の使用は困難であることが示唆された。

妊娠雌ウサギ（6.2.3項参照）に合計 5 回静脈内投与したところ、妊娠期間終了時に ADA 産生がみられ、それに伴って一部のウサギでは遊離形及び結合形 aflibercept の濃度が減少した。

サルに aflibercept を 4 又は 13 週間にわたり静脈内又は皮下投与すると、軽微な免疫応答が誘発されることが示された（3.2項参照）。事実、サルを用いて実施した 4 及び 13 週間反復静脈内投与試験で ADA が検出されたのは、最大で投与動物の 6%であった（3.2項参照）。しかし、試験期間を延長すると抗体反応の発現頻度が増加し、サルの 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験では投与動物の約 39%に達

した。しかしながら、この試験において遊離形 aflibercept の曝露量に明らかな影響を及ぼしたのは、2 件の抗体陽性反応のみと考えられた。いずれの場合においても、ウサギ又はサルにおける毒性と ADA 産生の関連はみられなかった。

9　考察及び結論

癌患者を対象としたaflibercept の全身投与による臨床使用を支持するため、包括的な毒性試験プログラムを実施した。

Aflibercept の広範な毒性評価に最も適切な動物種は、非ヒト霊長類と考えられた。げっ歯類では反復投与により顕著な抗アルリベルセプト抗体反応がみられ，そのためラットでは腎毒性による病的状態及び死亡が発現したことから毒性評価には不適切と考えられた。ウサギは生殖発生毒性評価に適切と判断された。

非ヒト霊長類における aflibercept の毒性プロファイルは、皮下投与と静脈内投与で類似していた。これらの試験では、静脈内投与は週 1 回又は 2 週間に 1 回の頻度で最長 6 ヵ月間、皮下投与は週 2～3 回の頻度で最長 3 ヵ月間実施した。毒性標的器官は、骨（長骨の成長板成熟障害及び椎骨の骨軟骨性外骨腫）、腎臓（30 mg/kg/回で高頻度にみられた糸球体メサンギウム基質増加、散発的な壁側上皮過形成及び糸球体周囲線維化）、精巣（精子数減少及び精子奇形）、卵巣（成熟卵胞数、顆粒膜細胞数又は莢膜細胞数の減少）、鼻甲介の呼吸上皮及び嗅上皮、並びに副腎であった。休薬期間を 13 週間以上にしたところ、活性を有する遊離形 aflibercept（サルにおける消失半減期［$t_{1/2}$］が約 5 日）が存在しない期間が十分に得られたため、腎臓の所見は回復した。骨の変化として、骨幹端毛細血管侵入減少、一次骨梁減少、骨端軟骨肥厚、軟骨細胞柱の崩壊及び軟骨基質の変性が観察された。これらの骨の変化は、より短い休薬期間で回復がみられた。骨軟骨性外骨腫及び変形性関節症もみられ、これらは 5 ヵ月の休薬期間では回復しなかった。卵巣の一貫した変化として、成熟卵胞数、顆粒膜細胞数及び莢膜細胞数の可逆的な減少が観察された。

サルを用いた皮下及び静脈内投与毒性試験において、体温、動脈血圧及び心電図に明らかな変化は認められなかった。

サルを用いた 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験（用量：3.0～30 mg/kg/回）の一環として、雌雄の受胎能に対する影響を評価した。雌性生殖ホルモン値の変化を伴う月経の消失又は不規則化、卵巣の変化並びに精子の形態及び運動能の変化がすべての用量で認められた。いずれの変化にも回復がみられた。雌雄生殖器官の発生及び機能における VEGF の重要性に関連した VEGF 阻害作用による受胎能の障害は知られている。カニクイザルでみられた所見は、aflibercept を投与したマカク類で過去に報告された所見に一致するものである(4)。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験において、aflibercept を 3 mg/kg/回以上で静脈内投与したところ、用量に関連した胎児吸収増加、妊娠中断及び多数の胎児奇形（外表、内臓及び骨格）が認められた。被験物質関連の平均着床後胚損失数（早期吸収胚数）の増加が、60 mg/kg/回で対照群と比較して認められた。これにより 60 mg/kg/回では、生存胎児数が対照群と比較してわずかに減少した。したがって、妊娠期における aflibercept の投与は、潜在的ベネフィットが胎児への潜在的リスクを上回る場合にのみ推奨される。妊娠可能な女性は、投与中に効果的な避妊法を使用しなければならない。

サル 6 ヵ月反復静脈内投与毒性試験の最小毒性量である 3 mg/kg/回における遊離形 aflibercept 曝露量の平均 C_{max} 及び AUC（異なる投与スケジュールを考慮して補正した）と、日本人癌患者に 4 mg/kg で初回静脈内投与したとき（TCD10794 試験）の対応する値との比率は、それぞれ 1.30 及び 1.29 であった（表 11）。

表 11 - 遊離形 aflibercept 量に基づく曝露量比

試験の種類/投与レジメン及び試験番号	用量	比率 [a]
ヒト		
癌患者における薬物動態 4 mg/kg での 2 週に 1 回投与　(TCD10794 試験)	**4 mg/kg**	NA
C_{max} (µg/mL) [b]	72.7	NA
AUC_{last} (µg.day/mL) [b]	269	NA
カニクイザル		
6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験 最初の 15 週間は週 1 回投与、残りの 12 週間は 2 週に 1 回投与（670145 試験 [TS 2.6.7.7D]）	**最小毒性量** [e]**:** **3 mg/kg**	NA
C_{max} [c, d] **(µg/mL)**	94.2	**1.30**
$AUC_{0\text{-}168h}$ [d] **(µg.day/mL)**	348 (174 × 2)	**1.29**
幼若動物を用いた 3 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験 週 1 回、3 ヵ月間投与（670144 試験　[TS 2.6.7.15]）	**最小毒性量** [e]**:** **0.5 mg/kg**	NA
C_{max} [c, f] **(µg/mL)**	8.8	**0.12**
$AUC_{0\text{-}168h}$ [f] **(µg.day/mL)**	33 (16.5 × 2)	**0.12**

略語：AUC：血中濃度ー時間曲線下面積；C_{max}：最高血中濃度； NA：該当せず
T_{max}：最高血中濃度到達時間

[a] 曝露量比 = 非臨床毒性試験の C_{max} 又は AUC 値を、表に示した用量及びレジメンでのヒトにおける C_{max} 又は AUC 推定値で除した値

[b] 表に記載した C_{max} 及び AUC_{last} 値は、患者への初回投与後に算出した。

[c] C_{max} は点滴静脈内投与終了 5 分後の T_{max} で認められた。

[d] 27 週間の投与期間中にサルで得られたすべての C_{max} 値を平均した。最初の 15 週間は週 1 回投与、残りの 12 週間は 2 週に 1 回投与したことを考慮にいれ、27 週間の投与期間中にサルで得られたすべての $AUC_{0\text{-}168h}$ 値を平均した。その後、算出した $AUC_{0\text{-}168h}$ 値を 2 倍し、日本人癌患者を対象に 4 mg/kg で 2 週に 1 回投与したときと比較した曝露量比の算出ができるようにした。

[e] この試験では無毒性量を設定できなかったため、用量を最小毒性量として表示した。

[f] サルに週 1 回投与を 1､5､9 及び 13 回実施したときの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}168h}$ 値を平均した。その後､算出した $AUC_{0\text{-}168h}$ 値を 2 倍し、日本人癌患者を対象に 4 mg/kg で 2 週に 1 回投与したときと比較した曝露量比の算出ができるようにした。

Aflibercept の毒性評価時に認められた標的器官及び毒性所見を以下に詳述する。

[骨の所見]

骨における aflibercept に起因した所見として、成長板成熟障害及び骨軟骨性外骨腫（円背位との関連あり）がみられた。

骨成長板の変化として、骨幹端毛細血管侵入の減少、骨端軟骨の肥厚、一次骨梁の減少、軟骨細胞柱の崩壊、横行性の軟骨下骨板形成が観察された。性的に未成熟のサルでは、この骨成長板成熟遅延が 3 mg/kg回以上での 3 ヵ月間投与後にみられ、0.5 mg/kg/回では骨成長板の変化は認められなかった。病理組織学的所見に関連して、骨吸収マーカー（CTx 及び NTx）の減少及び X 線検査所見（規則的な軽微からごく軽度の骨端板拡大を特徴とする成長板肥厚）が観察された。骨端軟骨の肥厚は、3 mg/kg/回以上で両方の長骨に認められた。Aflibercept による変化は、胸骨及び椎骨の骨端軟骨で類似していたが、3 mg/kg/回以上における変化はより軽度で、肥大した軟骨細胞の軽微な肥厚に限定されていた。成長板の変化は可逆的で、5 ヵ月間の休薬期間後に成長板肥厚は認められなかった。これらの所見は性的に未成熟のサルで予想されるものであり、性成熟したサルに aflibercept を 30 mg/kg/回までで 6 ヵ月間投与したときの変化はわずかなものであった。性成熟したサルでは、肥大した軟骨細胞層の軽微からごく軽度の肥厚が 3 mg/kg/回以上の完全又は部分的に開いた骨端軟骨を有する動物の長骨で高頻度に観察された。同様の所見が椎骨の 3 分節のすべて及び胸骨を含む他の骨格部位でも認められた。これらの骨格の変化には完全又はほぼ完全な回復がみられた。胸椎椎体における肥大した軟骨細胞層の肥厚及び胸骨椎体腹側の軟骨化生が、休薬期間終了時に 10 mg/kg/回のそれぞれ雌 1 例で観察された。骨成長板の同様の変化は、血管内皮増殖因子に対する遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体（rhuMAb VEGF）を投与したカニクイザルでも報告されている(1)。骨幹端毛細血管侵入の減少は、主として被験物質の薬理作用により誘発された可能性が考えられる(2)、(3)。血管内皮増殖因子受容体-2 チロシンキナーゼ阻害剤（AZD2171）を投与したラットにおいても同様の骨成長板の所見が報告され、完全な回復が示された(5)。

骨軟骨性外骨腫が最も高頻度にみられたのは胸椎及び腰椎の椎弓であり、それに伴う肉眼所見としてしばしば脊柱の弯曲（脊柱後弯症）が認められた。これらの所見は性的に成熟又は未成熟のサルに、aflibercept を 3 mg/kg/回以上でそれぞれ 6 ヵ月間及び 3 ヵ月間投与した時に観察され、この用量での定常状態における遊離形 aflibercept の血漿中曝露量（AUC）は、それぞれ 275 及び 215 µg.day/mL であった。若齢のサルに 0.5 mg/kg/回で 3 ヵ月間投与したときには、骨軟骨性外骨腫は認められなかった。筋線維萎縮及びより低頻度の血管増生／変性がしばしば同時に観察された。X 線検査では、不可逆的な脊柱後弯症、椎骨関節面の変形性関節症並びに大腿骨／腸骨の骨膜反応の頻度増加がすべての aflibercept 投与群の雌雄で認められた。

[鼻腔の所見]

性成熟サルの 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験において、0（対照）、3、10、30 mg/kg で 3 ヵ月間は週 1 回、その後は 2 週に 1 回投与したところ、3 mg/kg/回の雄 1 例が試験 182 日目（試験 26 週目）に途中安楽殺に至った。特記すべき所見として、鼻出血に関連する顕著な貧血、白血球数、網状赤血球数及び好中球数の増加並びにヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球数、血小板数の減少が認められた。剖検時における鼻腔の広範な肉眼的病変として、凝血塊、鼻中隔弯曲及び右中鼻甲介欠損が観察された。これらの所見及び対応する病理組織学的所見（壊死性炎症を伴う鼻中隔又は鼻甲介の萎縮／喪失）は、本試験において他の aflibercept 投与動物でみられたものと類似しており、被験物質関連の変化、かつ直接の死因と考えられた。性的に未成熟のサルを用いて実施した 3 ヵ月間反復投与毒性試験では、0.5 mg/kg/回以上で鼻腔の病理組織学的所見が観察された。鼻腔の骨性及び軟骨性組織における変化は回復しなかった。これらの所見は呼吸上皮の変性／再生並びに鼻腔の血管所見を伴い、本薬のサルを用いた過去の毒性試験でみられた鼻出血はこれらが原因と考えられる。鼻出血は aflibercept を投与した患者でも報告されており、アバスチンで高頻度にみられる有害事象でもある。少数のアバスチン投与患者では鼻中隔穿孔が報告されている(6)、(7)。これらの aflibercept 誘発性変化は、抗 VEGF 薬のクラス作用と考えられた。

[腎臓の所見]

腎臓の病理組織学的所見として糸球体メサンギウム基質の増加がみられ、少数例では血清総蛋白及びアルブミンの減少、BUN の増加並びに尿蛋白又はミクロアルブミンの増加も認められた。サルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験において、aflibercept の 2 mg/kg/回以上で腎臓の所見が観察された。しかし性的に未成熟なサルに 0.5 mg/kg/回で 3 ヵ月間投与しても、腎臓の毒性変化は認められなかった。サルの 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験における腎臓の変化は、5 ヵ月間の休薬期間後に回復した。

サルにおける腎臓の病理組織学的所見が（免疫応答性のげっ歯類を用いた毒性試験で疑われたように）免疫複合体沈着の結果であるか否かを検討するために、4 及び 13 週間静脈内投与したサルの腎臓について、IgG、IgM 及び補体の有無を検出するための免疫組織化学的染色を実施した。4 週間投与後のサルから採取した腎臓についてこの免疫組織化学的分析を行ったところ、IgG、IgM 及び補体の沈着は認められなかった。しかしサルの 13 週間反復投与毒性試験では、糸球体の用量依存的な IgG、IgM 及び C3 の免疫組織化学的染色の増加がすべての用量でみられた。IgG、IgM 及び C3 は糸球体で濾過されることから、免疫組織化学的染色の増加は濾過バリアーの損傷に反応してこれらの成分が糸球体内に蓄積した結果として生じた可能性がある。事実、aflibercept を 13 週間投与したサルから採取した腎臓の透過型電子顕微鏡検査で示された微細構造変化の特徴として、糸球体上皮細胞（ポドサイト）の終末足突起間の濾過スリット膜の減少又は喪失、並びに細胞質小孔の不規則性を伴った内皮細胞の肥大及び腫脹が認められた。これらの変化は、糸球体の濾過バリアーに影響を及ぼすものである。

また、糸球体基底膜には免疫複合体沈着の可能性を示唆する電子密度の高い沈着物は認められなかった。腎臓の微細構造変化は、正常な糸球体の機能における VEGF-A の主要な役割に一致するものである。特に臓側上皮細胞で産生される VEGF-A は、内皮細胞機能に必要なものと考えられる(8)。さらに、メサンギウム細胞の生存及び分化も VEGF-A の存在と関連しているとの報告がある(9)。いくつかの VEGF 経路阻害剤を用いて実施した非臨床試験において腎障害が報告され、蛋白尿は VEGF/VEGFR 経路阻害剤を投与した患者におけるクラス副作用と考えられている(10)。

[副腎の所見]
副腎では、細胞質好酸性化を伴う副腎束状帯の空胞形成減少が 3 mg/kg/回以上で観察された。この所見に伴う変性性又は壊死性の変化はみられなかったことから、その生物学的意義はあったとしても限定的なものと考えられた。これらの所見は、5 ヵ月間の休薬期間後には完全に回復した。

[肝臓の所見]
肝酵素活性の増加が 3 mg/kg/回以上の投与群の一部のサルにみられ、30 mg/kg/回の少数例では門脈の炎症及び壊死も観察された。これらの変化は、5 ヵ月間の休薬期間では完全には回復しなかった。

[血管の所見]
全身性の微小血管の変化として、腸粘膜下、膀胱及び心臓における血管の増生／変性又は限局性血管炎が 3 mg/kg/回以上で 13 又は 27 週間投与したサルの少数例で認められた。これらの変化は休薬期間後の aflibercept 投与群の動物にも散見されたことから、これら被験物質関連の変化の持続性が示唆された。

[雌性生殖能の評価]
雌のサルに aflibercept の 3 mg/kg/回を投与したところ、顕著なインヒビン B の減少、FSH の増加及びプロゲステロンピークの消失が誘導された。これらのホルモン変化に伴って、月経出血の消失、卵巣重量減少、黄体組織量減少、成熟卵胞数減少、子宮内膜及び筋層の萎縮、膣萎縮が観察された。エストラジオールの減少も、aflibercept の 10 mg/kg/回以上で投与期間中に認められた。

アカゲザルの後期卵胞期に VEGF 阻害抗体を投与したところ、卵胞発達が一過性に変化した(11)。rhuMAb VEGF をカニクイザルに投与した場合にも同様の卵巣の変化が報告されており、aflibercept の生物学的活性に一致するものであった(1)。Aflibercept 誘発性の卵巣機能抑制は、最終投与後 3～18 週間以内に回復した。

[雄性生殖能の評価]

Aflibercept を 6 ヵ月間投与した雄のサルでは、対照群の雄と比較して生物学的意義のある FSH、LH 及びテストステロンの変化は認められなかった。また、6 ヵ月間投与終了時において、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢の重量には投与群と対照群の間で差がみられず、雄性生殖器官の病理組織学的変化も認められなかった。主要な aflibercept 誘発性の変化は、3 mg/kg/回以上でみられた精子運動能低下及び精子形態異常の発現頻度増加であった。形態学的所見の特徴から、精子形成周期の後期に変化が生じたことが示唆された。これらの変化は雄受胎能に影響を及ぼすものと考えられた。これらの変化は 13 週間の休薬期間後には完全に回復した。

[催奇形性]

母体毒性量（60 mg/kg/回）を投与した妊娠雌ウサギにおいて、aflibercept 誘発性の流産及びごく軽度の生存胎児数減少が認められた。また、aflibercept の 3 mg/kg/回以上を投与した母動物から得られた胎児において、外表、内臓又は骨格奇形が観察された。外表奇形として 60 mg/kg/回では全身浮腫、腹壁破裂、鎖肛、短尾、15 mg/kg/回では無指、3 mg/kg/回では全身浮腫が認められた。内臓奇形は、3 及び 60 mg/kg/回の母動物から得られた胎児において、主に心臓、大血管、動脈で観察された。骨格奇形は、60 mg/kg/回の母動物から得られた胎児のみで認められた。また、舌骨、胸椎、腰椎、胸骨分節、肋骨、距骨、前肢指骨、後肢趾骨における骨化不全が 3 及び 60 mg/kg/回でみられた。

後期吸収胚数の増加は、アバスチンを投与した妊娠雌ウサギでも報告されている(12)、(13)。アバスチンを投与した母動物から得られた胎児において、いくつかの奇形、血管変異、骨化部位数減少が観察された。同様に VEGF 受容体 1、2 及び 3 に高い親和性を示すチロシンキナーゼ阻害剤であるスーテントをラット及びウサギの器官形成期に投与したところ、吸収胚、全同腹児死亡並びに胎児の外表、内臓又は骨格奇形が認められた(14)。

[免疫原性]

Aflibercept をラット及びマウスに反復投与したところ高度の免疫原性が示された。ADA の存在に伴って aflibercept 血中濃度の減少がみられた、また、ADA は少なくとも部分的には腎毒性に関与していると考えられた。

妊娠雌ウサギに合計 5 回静脈内投与したところ ADA が認められ、一部のウサギでは遊離形及び結合形 aflibercept 濃度も減少した。

Aflibercept をサルに 4 又は 13 週間にわたって皮下又は静脈内投与したところ、誘発された免疫応答は軽微であったが、6 ヵ月間静脈内投与したサルでは抗体反応の発現頻度が増加した。Aflibercept を 6

ヵ月間投与したサルでみられた 14 件の抗体陽性反応のうち、遊離形 aflibercept の曝露量及び結合形 aflibercept の濃度に明らかな影響を及ぼした可能性が示唆されたのは 2 件のみであった。

[その他の試験]

ウサギを用いて 24.4 mg/mL までの濃度での静脈内、筋肉内及び皮下投与により実施した局所刺激性試験において aflibercept に刺激性は示されず、8 mg/mL までの濃度で in vitro におけるヒトの血液、血漿及び血清との適合性が認められた。

総括すると、非臨床毒性試験でみられた aflibercept 誘発性の大部分の変化、すなわち成長板成熟抑制、鼻腔の骨及び軟骨の変化、糸球体メサンギウム基質増加、卵巣機能及び卵胞発達の消失並びに催奇形性変化は、VEGF 経路阻害剤の非臨床試験及び臨床試験で過去に報告されているものである。これらの変化は aflibercept の生物学的活性に関連するものであり、特に遊離形 aflibercept の曝露量が結合形 aflibercept の曝露量を上回ったことに起因すると考えられた。したがって、上記の非臨床試験プログラムの結果から、癌患者への aflibercept の使用には安全性上の大きな懸念はないと考えられる。

参 考 文 献

1. Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL et al. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. Toxicol Pathol. 1999;27:78-86.

2. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nat Med. 1999;5:623-8.

3. Hall AP, Westwood FR and Wadsworth PF. Review of the effects of anti-angiogenic compounds on the epiphyseal growth plate. Toxicol Pathol. 2006;34:131-47.

4. Fraser HM, Wilson H, Rudge JS, Wiegand SJ. Single injections of vascular endothelial growth factor trap block ovulation in the macaque and produce a prolonged, dose-related suppression of ovarian function. J Clin Endocrinol Metabol. 2005;90(2):1114-22.

5. Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Valentine PJ, Barry ST, Brave SR, et al. AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. Cancer Res. 2005; 65 (10):4389-400.

6. Fakih MG, Lombardo JC. Bevacizumab-induced nasal septum perforation. Oncologist. 2006; 11:85-6.

7. Traina TA, Norton L, Drucker K, Singh B. Nasal septum perforation in a bevacizumab-treated patient with metastatic breast cancer. Oncologist. 2006; 11:1070-1.

8. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, et al. Neutralization of circulating Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. J. Biol. Chem. 2003; 278 (15):12605-8.

9. Eremina V, Cui S, Gerber H, Ferrara N, Haigh J, Nagy A, et al. Vascular endothelial growth factor A signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. J Am Soc Nephrol. 2006;17:724-35.

10. Roodhart JM, Langenberg MH, Witteveen E, Voest EE. The molecular basis of class side effects due to treatment with inhibitors of the VEGF/VEGFR pathway. Current Clin Pharm. 2008; 3(2):132-43.

11. Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer MV, Lobo R, Kitajewski, et al. Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the Rhesus monkey. J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86(2):768-72.

12. Avastin BLA STN #125085: Summary basis for approval. CDER - FDA. 2004:1-501.

13. European Public Assessment Report on Avastin. EMEA. 2005:1-96.

14. Patyna S, Haznedar J, Morris D, Freshwater K, Peng G, Sukbuntherng J, et al. Evaluation of the safety and pharmacokinetics of the multi-targeted receptor tyrosine kinase inhibitor sunitinib during embryo-fetal development in rats and rabbits. Birth Defects Res. 2009 86:204-13.

サノフィ株式会社

ザルトラップ点滴静注 100mg／同 200mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.7 毒性試験概要表

Total number of pages: 165

目　　次

1 毒性試験一覧表 4
2 トキシコキネティクス試験の一覧表 7
3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 9
4 毒性試験使用ロット 16
5 単回投与毒性試験 20
6 反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験 22
7 反復投与毒性試験 29
8 In vitro 遺伝毒性試験 125
9 In vivo 遺伝毒性試験 126
10 がん原性試験 127
11 生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験 128
12 生殖発生毒性試験－受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 131
13 生殖発生毒性試験－胚･胎児発生に関する試験 137
14 生殖発生毒性試験－出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 146
15 新生児を用いた試験 147
16 局所刺激性試験 161
17 その他の毒性試験 162

表　目　次

表 2.6.7.1 - tabulated summary – overview - study program 4
表 2.6.7.2 - Overview of Toxicokinetics Studies 7
表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data 9
表 2.6.7.4 - Toxicology Drug Substance/Drug Product 16
表 2.6.7.5 - Single-Dose Toxicity 20
表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies 22
表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats 29
表 2.6.7.7.B - Repeat-Dose Toxicity - 4-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys 50
表 2.6.7.7C - Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys 57
表 2.6.7.7D - Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys 74
表 2.6.7.7E - Repeat-Dose Toxicity – 4-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys 107
表 2.6.7.7F - Repeat-Dose Toxicity – 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys 114
表 2.6.7.11A - Reproductive and Developmental Toxicity - 14-day toxicity study in nonpregnant female rabbits 128
表 2.6.7.11B - Reproductive and Developmental Toxicity - Range-finding toxicity study in pregnant female rabbits 129
表 2.6.7.11C - Reproductive and Developmental Toxicity - Intravenous range-finding toxicity study in pregnant female rabbits 130
表 2.6.7.12A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on fertility in monkeys 131
表 2.6.7.13A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on Embryofetal development in rabbits 137
表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys 147
表 2.6.7.16 - Local Tolerance 161
表 2.6.7.17A - Other Toxicity Studies - Cross-reactivity with human tissue 162
表 2.6.7.17B - Other Toxicity Studies - Evaluation of hemolysis and flocculation in monkey blood and serum 163
表 2.6.7.17C - Other Toxicity Studies - Evaluation of hemolysis and flocculation in human blood and serum 164
表 2.6.7.17D - Other Toxicity Studies - Evaluation of hemolysis and flocculation in human blood and serum 165

1　毒性試験一覧表

表 2.6.7.1 - tabulated summary – overview - study program

Test Article: aflibercept

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Single Dose Toxicity							
Rat (SD)	Intravenous	1 day	0, 150, 500	No	sanofi-aventis, France	[TXP0166]	4.2.3.1
Rat (SD)	Intravenous	1 day	0, 50, 150, 500	Yes	sanofi-aventis, France	[TXA1004] and [TXA1004 Amendment 01]	4.2.3.1
Repeat Dose Toxicity							
Mouse (CD-1)	Subcutaneous	4 weeks	0, 10, 15	No	[redacted] USA	[PK01017]	4.2.3.2
Mouse (SCID)	Subcutaneous	4 or 8 weeks	0, 2.5, 25	No	[redacted] USA	[VGT3]	4.2.3.2
Rat (SD)	Subcutaneous	4 weeks	0, 10, 15	No	[redacted] USA	[PK01027]	4.2.3.2
Rat (SD)	Subcutaneous	4 weeks	0, 2, 5	No	[redacted] USA	[PK01034]	4.2.3.2
Rat (SD)	Subcutaneous	4 weeks	0, 0.5, 1	No	[redacted] USA	[PK01042]	4.2.3.2
Rat (Nude)	Subcutaneous	4 or 8 weeks	0, 25	No	[redacted] USA	[PK01032]	4.2.3.2
Rat (SD)	Subcutaneous	4 or 13 weeks	0, 0.1, 0.5, 1, 2	Yes	[redacted] PA, USA	[0470RR20-001]	4.2.3.2

Abbreviations: adm: administration, CD-1: cesarean-derived; GLP: good laboratory practice, SCID: severe combined immunodeficiency, SD: Sprague Dawley

表 2.6.7.1 - tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: aflibercept

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Repeat Dose Toxicity							
Monkey (cynomolgus)	Intravenous	4 weeks	0, 2, 10, 30	Yes	[redacted] USA	[redacted 223.11]	4.2.3.2
Monkey (cynomolgus)	Intravenous	13 weeks	0, 3, 10, 30	Yes	[redacted] USA	[redacted 223.18]	4.2.3.2
Monkey (cynomolgus)	Intravenous	27 weeks	0, 3, 10, 30	Yes	[redacted] Canada	[670145]	4.2.3.2
Monkey (cynomolgus)	Subcutaneous	4 weeks	0, 1.5, 5, 15	Yes	[redacted] USA	[redacted 223.4]	4.2.3.2
Monkey (cynomolgus)	Subcutaneous	13 weeks	0, 1.5, 5, 15, 30	Yes	[redacted] USA	[redacted 223.09]	4.2.3.2
Fertility							
Monkey (cynomolgus)	Intravenous	27 weeks	0, 3, 10, 30	Yes	[redacted] Canada	[670145]	4.2.3.2
Embryo-Fetal Development							
Rabbit (NZW)	Intravenous	2 weeks	0, 15, 30, 45	No	sanofi-aventis, France	[DSE 20[redacted]-0569 -DIV0953]	4.2.3.5.2
Rabbit (NZW)	Intravenous	GD6, 9,12,15,18	0, 3, 15, 45	No	sanofi-aventis, France	[TEP0184]	4.2.3.5.2
Rabbit (NZW)	Intravenous	GD6, 9,12,15,18	0, 3, 15, 60	Yes	sanofi-aventis, France	[TER0506]	4.2.3.5.2
Studies in juvenile animals							
Monkey (cynomolgus)	Intravenous	13 weeks	0, 0.5, 3, 30	Yes	[redacted] Canada	[670144] and [670144 Amendment 01	4.2.3.5.4
Local Tolerance							
Rabbit (NZW)	Intravenous, intramuscular, subcutaneous	-	24.4, 25, 100 mg/ml	Yes	sanofi-aventis, France	[DSE 20[redacted]-0387 (TOL1079)]	4.2.3.6

Abbreviations: adm: administration, GD: gestation day, GLP: good laboratory practice, NZW: New Zealand White, -: not applicable

表 2.6.7.1 - tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: **aflibercept**

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Other Studies (Hemolysis and Flocculation Studies)							
Monkey Blood	-	-	0.69, 2.09, 4.17 mg/mL	No	[redacted] USA	[HEM-No1]	4.2.3.7.7
Human Blood	-	-	0.5, 2.0, 4.0 mg/mL	No	[redacted] USA	[HEM-No3]	4.2.3.7.7
Human Blood	-	-	8.0 mg/mL	No	[redacted] USA	[HEM-No5]	4.2.3.7.7
Other Studies (Human tissue cross reactivity)							
Human tissue	-	-	5.0, 25.0 µg/ml	Yes	[redacted] USA	[redacted]01-141]	4.2.3.7.7

Abbreviations: GLP: good laboratory practice -: not applicable

2　トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2 - Overview of Toxicokinetics Studies

Test Article: aflibercept

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/adm)	GLP Compliance	Study Number	Location
3.1 Single-Dose Toxicity						
NA						
3.2 Repeat-Dose Toxicity						
4-week exploratory study	Mouse (CD-1)	Subcutaneous	0, 10, 15	No	[PK01017]	4.2.3.2
4 or 8-week exploratory study	Mouse (SCID)	Subcutaneous	0, 2.5, 25	No	[VGT3]	4.2.3.2
4-week exploratory study	Rat (SD)	Subcutaneous	0, 10, 15	No	[PK01027]	4.2.3.2
4-week exploratory study	Rat (SD)	Subcutaneous	0, 2, 5	No	[PK01034]	4.2.3.2
4-week exploratory study	Rat (SD)	Subcutaneous	0, 0.5, 1	No	[PK01042]	4.2.3.2
4 or 8-week exploratory study	Rat (Nude)	Subcutaneous	0, 25	No	[PK01032]	4.2.3.2
4 or 13-week study	Rat (SD)	Subcutaneous	0, 0.1, 0.5, 1, 2	Yes	[0470RR20-001]	4.2.3.2
4-week study	Monkey (cynomolgus)	Intravenous	0, 2, 10, 30	Yes	[[redacted]223.11]	4.2.3.2
13-week study	Monkey (cynomolgus)	Intravenous	0, 3, 10, 30	Yes	[[redacted]223.18]	4.2.3.2
27-week study	Monkey (cynomolgus)	Intravenous	0, 3, 10, 30	Yes	[670145]	4.2.3.2

Abbreviations: adm: administration, CD-1: cesarean-derived, GLP: good laboratory practice, NA: not applicable, SCID: severe combined immunodeficiency, SD: Sprague Dawley

表 2.6.7.2 - Overview of Toxicokinetics Studies (continued)

Test Article: aflibercept

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/adm)	GLP Compliance	Study Number	Location
3.2 Repeat-Dose Toxicity						
4-week study	Monkey (cynomolgus)	Subcutaneous	0, 1.5, 5, 15	Yes	[[redacted]223.4]	4.2.3.2
13-week study	Monkey (cynomolgus)	Subcutaneous	0, 1.5, 5, 15, 30	Yes	[[redacted]223.09]	4.2.3.2
3.3 Genotoxicity						
NA						
3.4 Carcinogenicity						
NA						
3.5 Reproductive and Developmental Toxicity						
Rabbit (NZW)	Intravenous	2 weeks	0, 15, 30, 45	No	[DSE 20[redacted]-0569 - DIV0953]	4.2.3.5.2
Rabbit (NZW)	Intravenous	GD6, 9, 12, 15, 18	0, 3, 15, 45	No	[TEP0184]	4.2.3.5.2
Rabbit (NZW)	Intravenous	GD6, 9, 12, 15, 18	0, 3, 15, 60	Yes	[TER0506]	4.2.3.5.2
3.6 Local Tolerance						
NA						
3.7 Studies in juvenile animals						
Monkey (cynomolgus)	Intravenous	13 weeks	0, 0.5, 3, 30	Yes	[670144] and [670144 Amendment 01]	4.2.3.5.4

Abbreviations: adm: administration, GD: gestation day, GLP: good laboratory practice, NA: not applicable, NZW: New Zealand White

3　トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data

Test Article: aflibercept

Species/Strain	**Mouse/CD-1**				**Mouse (SCID)**						**Human***
Study No.	**[PK01017]**				**[VGT3]**						
Dose (mg/kg/adm)	**Day 1**		**Day 22**		**Day 8**		**Day 28**		**Day 57**		**Day 1**
	24 hours post-adm				**1 week post-adm**						**C_{max} *a***
	M	**F**	**M**	**F**	**M (7-week old)**	**M (15-week old)**	**M (7-week old)**	**M (15-week old)**	**M (7-week old)**	**M (15-week old)**	
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.336 ± 0.192
0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.522 ± 0.343
0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.03 ± 1.47
2.5	-	-	-	-	8.73 *b* 8.03 *c*	9.33 *b* 10.1 *c*	20.7 *b* -	22.4 *b* -	- 20.5 *c*	- 19.4 *c*	-
10	70.1	44.5	52.3	15.2	-	-	-	-	-	-	-
15	80.4	103	90.0	74.4	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	160 *b* 195 *c*	138 *b* 141 *c*	312 *b* -	300 *b* -	- 209 *c*	- 184 *c*	-

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, CD-1: cesarean-derived, C_{max}: maximum plasma concentration observed, SCID: severe combined immunodeficiency, -: not evaluated

a: All values have been rounded to three significant figures

b: animals were dosed for 4 weeks

c : animals were dosed for 8 weeks

*: Patients were treated once a week by subcutaneous route. CD-1 mice were treated 3 times a week and SCID mice were treated twice a week

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data (continued)

Free aflibercept peak levels (µg/mL) after subcutaneous administration to rat and human

Test Article: aflibercept

Species/Strain	**Rat/Sprague-Dawley**												**Human***
Study No.	**[PK01027]**				**[PK01034]**				**[PK01042]**				
Dose (mg/kg/adm)	**Day 1**		**Day 26**		**Day 1**		**Day 26**		**Day 1**		**Day 26**		**Day 1**
	24 hours post-adm				**24 hours post-adm**				**24 hours post-adm**				**C_{max} *a***
	M	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.336 ± 0.192
0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.522 ± 0.343
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	1.03	1.27	0.028	0.390	-
0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.03 ± 1.47
1	-	-	-	-	-	-	-	-	3.00	3.62	0.863	3.96	-
2	-	-	-	-	4.63	7.92	0.22	7.97	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	17.91	43.55	10.56	20.98	-	-	-	-	-
10	32.5	37.6	48.5	13.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	63.2	54.5	79.9	139	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, C_{max}: maximum plasma concentration observed, SD: Sprague Dawley, -: not evaluated

a: All values have been rounded to three significant figures

*: Patients were treated once a week by subcutaneous route. SD rats were treated 3 times a week

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data (continued)

Free aflibercept peak levels (µg/mL) after subcutaneous administration to rat and human

Test Article: aflibercept

Species/Strain	**Rat/Nude***						**Rat/Sprague-Dawley***				**Human***
Study No.	**[PK01032]**						**[0470RR20-001]**				
Dose (mg/kg/adm)	**Day 1**		**Day 25**		**Day 52**		**Day 1**		**Day 27**		**Day 1**
	24 hours post-adm						**24 hours post-adm**				**C_{max} *a***
	M	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	
0.1	-	-	-	-	-	-	149	164	[c]	[c]	-
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.336 ± 0.192
0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.522 ± 0.343
0.5	-	-	-	-	-	-	32	1799	[c]	[c]	-
0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.03 ± 1.47
1	-	-	-	-	-	-	3709	5185	[c]	[c]	-
2	-	-	-	-	-	-	7570	8957	[c]	[c]	-
25	46.4 *b*	85.4 *b*	84.3	168	31.4	35.7	-	-	-	-	-

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, C_{max}: maximum plasma concentration observed, SD: Sprague Dawley, -: not evaluated

a: All values have been rounded to three significant figures
b: All values (from rats dosed for 4 and 8 weeks) were taken into account for mean calculations on Day 1
c: Plasma exposure data was not considered relevant due to the presence of anti-aflibercept antibodies
* Patients were treated once a week by subcutaneous route. SD rats were treated 3 times a week, Nude rats were treated twice a week

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data (continued)

Free aflibercept peak levels ± SEM (µg/mL) after intravenous administration to monkey and human

Test Article: aflibercept

Species/Strain	Cynomolgus monkey*												Human*
Study No.	[223.11]		[223.18]						[670145]				
Dose (mg/kg/adm)	Day 1	Day 22	Day 1		Day 29		Day 85		Day 1		Day 183		Day 1 (C_{max})[a]
	5 min post-adm		5 min post-adm						5 min post-adm				
	M + F	M + F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	-
2	60	123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34.5
3	-	-	79.8 ± 12.0	80.7 ± 1.56	97.1 ± 4.70	89.0 ± 14.6	118 ± 13.6	150 ± 16.9	95.1 ± 19.8	94.1 ± 10.2	57.5± 1.75	62.4 ± 4.48	48.7
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97.4
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	159
10	329	1055	232 ± 13.8	227 ± 13.4	373 ± 28.1	365 ± 19.8	479 ± 38.0	400 ± 34.8	191 ± 23.7	263 ± 20.0	310 ± 39.7	228 ± 19.1	-
30	1020	6402	973 ± 55.1	791 ± 48.8	1032 ± 66.4	1027 ± 59.2	1368 ± 102	1258 ± 118	770 ± 219	583 ± 88.4	709± 91.8	754 ± 50.2	-

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, C_{max}: maximum plasma concentration observed, SEM: standard error of the mean, -: not evaluated

a: All values have been rounded to three significant figures

* Patients were treated once every 2 weeks by intravenous route. Cynomolgus monkeys were treated once a week, except in study 670145 where monkeys were treated once a week for the first 15 weeks and then once every 2 weeks

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data (continued)

Free aflibercept peak levels (µg/mL) after subcutaneous administration to monkey and human

Test Article: aflibercept

Species/Strain	Cynomolgus monkey						Human*
Study No.	[223.4]		[223.09]				
Dose (mg/kg/adm)	Day 1	Day 26	Day 2		Day 89		Day 1
	24 hours post-adm		24 hours post-adm				C_{max}[a]
	M + F	M + F	M	F	M	F	
0.2	-	-	-	-	-	-	0.336 ± 0.192
0.4	-	-	-	-	-	-	0.522 ± 0.343
0.8	-	-	-	-	-	-	3.03 ± 1.47
1.5	16.0	68.5	7.21	7.40	32.3	31.4	-
5	63.3	271	26.0	31.2	120	98.1	-
15	206	499	96.3	97.8	329	283[b]	-
30	-	-	214	212	659	783	-

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, C_{max}: maximum plasma concentration observed, -: not evaluated

a: All C_{max} values have been rounded to three significant figures

b: Data from 1 monkey dosed at 15 mg/kg/adm (No. 37) were not taken into account for mean calculations because of positive antibody response on Day 89

* Patients were treated once a week by subcutaneous route. Monkeys were treated 3 times a week (study 223.4) or twice a week (study 223.09)

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data (continued)

Free aflibercept levels (µg/mL) after intravenous administration to rabbit and human

Test Article: aflibercept

Species/Strain	New Zealand White rabbits							Human***
Study No.	[DSE 20[redacted]0569 - DIV0953]*			[TEP0184] **		[TER0506] **		
Dose (mg/kg/adm)	Day 1	Day 13	Day 15	GDay 21	GDay 29	GDay 18	GDay 21	Day 1 (C_{max})[a]
	F	F	F	F	F	F	F	
2	-	-	-	-	-	-	-	34.5
3	-	-	-	14.1	0.82	56.1	14.0	48.7
4	-	-	-	-	-	-	-	97.4
7	-	-	-	-	-	-	-	159
15	375	663	166	94.3	4.00	707	121	-
30	777	1040	317	-	-	-	-	-
45	916	1390	469	182	42.9	-	-	-
60	-	-	-	-	-	2460	333	-

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, C_{max}: maximum plasma concentration observed, G: gestation, -: not evaluated

a: All C_{max} values have been rounded to three significant figures
* The female rabbits were dosed on Days 1, 4, 7, 10 and 13
**The female rabbits were dosed on G Days 6, 9, 12, 15 and 18
*** Patients were treated once every 2 weeks by intravenous route

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data (continued)

Free aflibercept peak levels (µg/mL) after intravenous administration to sexually immature monkey and human

Test Article: aflibercept

Species/Strain	**Cynomolgus monkey***						**Human****
Study No.	**[670144] and [670144 Amendment 01]**						
Daily Dose (mg/kg/adm)	**Day 1**		**Day 29**		**Day 85**		**Day 1 (C_{max})[a]**
	M	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	
0.5	7.22 ± 0.40	8.57 ± 1.24	7.20 ± 0.89	12.2 ± 1.99	8.17 ± 0.60	10.9 ± 0.29	-
2	-	-	-	-	-	-	34.5
3	46.6 ± 1.76	65.7 ± 15.1	80.9 ± 8.55	76.5 ± 10.7	87.2 ± 5.33	60.3 ± 6.42	48.7
4	-	-	-	-	-	-	97.4
7	-	-	-	-	-	-	159
30	651 ± 102	516 ± 61.2	701 ± 142	956 ± 225	829 ± 103	830 ± 219	-

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, C_{max}: maximum plasma concentration observed, -: not evaluated

a: All C_{max} values have been rounded to three significant figures

*Monkeys were dosed once a week

** Patients were treated once every 2 weeks by intravenous route

4　毒性試験使用ロット

表 2.6.7.4 - Toxicology Drug Substance/Drug Product

Test Article: aflibercept

Batch No.	Total Protein Content (mg/mL)	Purity (%)			Study No.	Type of Study	Location
		By size exclusion HPLC	By SDS-PAGE ([redacted])	By SDS-PAGE ([redacted])			
[redacted] *b*	[redacted]	[redacted] *a*	[redacted] *a*	[redacted] *a*	[PK01017]	4-week subcutaneous exploratory study in CD-1 mice	4.2.3.2
					[VGT3]	4 or 8-week subcutaneous exploratory study in SCID mice	4.2.3.2
					[PK01027]	4-week subcutaneous exploratory study in SD rats	4.2.3.2
					[PK01034]	4-week subcutaneous exploratory study in SD rats	4.2.3.2
					[PK01042]	4-week subcutaneous exploratory study in SD rats	4.2.3.2
					[PK01032]	4 or 8-week subcutaneous exploratory study in Nude rats	4.2.3.2
					[0470RR20-001]	4 or 13 week subcutaneous toxicity study in SD rats	4.2.3.2
					[[redacted]223.4]	4-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys	4.2.3.2
					[HEM-No3]	Evaluation of hemolysis in human blood and flocculation in human plasma and serum	4.2.3.7.7

Abbreviations: CD-1: cesarean-derived, DP: drug product, DS: drug substance, HPLC: high-performance liquid chromatography, SCID: severe combined immunodeficiency, SD: Sprague Dawley, SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, *a*: Assay was not performed on DS. Reported results are for DP. *b*: DP prepared from DS batch [redacted]

表 2.6.7.4 - Toxicology Drug Substance/Drug Product (continued)

Test Article: aflibercept

Batch No.	Total Protein Content (mg/mL)	Purity (%)			Study No.	Type of Study	Location
		By size exclusion HPLC	By SDS-PAGE ([redacted])	By SDS-PAGE ([redacted])			
[redacted] *c*	[redacted]	[redacted] *a*	[redacted] *a*	[redacted] *a*	[redacted]01-141]	Cross-reactivity with human tissue	4.2.3.7.7
[redacted] (DP) *a*	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]223.11]	4-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys	4.2.3.2
[redacted] (DP)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]223.09]	13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys	4.2.3.2
[redacted] (DP)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[HEM-No1]	Evaluation of hemolysis in monkey blood and flocculation in monkey plasma and serum	4.2.3.7.7
[redacted] *b*	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]223.18]	13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys	4.2.3.2
[redacted] *d*	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[HEM-No5]	Evaluation of hemolysis in human blood and flocculation in human plasma and serum	4.2.3.7.7

Abbreviations: DP: drug product, DS: drug substance HPLC: high-performance liquid chromatography, SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
a: from batch No. VGTF02002 (DS). *b*: from batch No. C04003M500 (DS), *c*: (biotinylated) from batch No. VGT00003T (DS). *d*: from batch No. C04002M400 (DS)

表 2.6.7.4 - Toxicology Drug Substance/Drug Product (continued)

Test Article: aflibercept

Batch No.	Total Protein Content (mg/mL)	Purity (%)			Study No.	Type of Study	Location
		By size exclusion HPLC	By SDS-PAGE ([redacted])	By SDS-PAGE ([redacted])			
[redacted] (DP batch No. [redacted] and/or [redacted] from Batch No. [redacted] (DS)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[TXP0166]	Single-dose intravenous toxicity study in rats	4.2.3.1
					[TXA1004] and [TXA1004 Amendment 01]	Single-dose intravenous toxicity study in rats	4.2.3.1
					[DSE 20[redacted]-0569 -DIV0953]	14-day intravenous toxicity study in nonpregnant female rabbits	4.2.3.5.2
					[TEP0184]	Intravenous range-finding toxicity study in pregnant female rabbits	4.2.3.5.2
Formulation F1 : [redacted] (batch No. [redacted]) from Batch No. [redacted] (DS)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DSE 20[redacted]-0387 (TOL1079)]	Local intravenous, intramuscular and subcutaneous tolerance in rabbits	4.2.3.6
Formulation F2 ([redacted]): [redacted] from DS Batch No. [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]			

Abbreviations: DP: drug product, DS: drug substance, HPLC: high-performance liquid chromatography, SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

表 2.6.7.4 - Toxicology Drug Substance/Drug Product (continued)

Test Article: aflibercept

Batch No.	Total Protein Content (mg/mL)	Purity (%)			Study No.	Type of Study	Location
		By size exclusion HPLC	By SDS-PAGE ([redacted])	By SDS-PAGE ([redacted])			
[redacted] (DS)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[670145]	27-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys	4.2.3.2
[redacted] (DP) from Batch No. [redacted] (DS)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[TER0506]	Intravenous embryo-fetal toxicity study in rabbits	4.2.3.5.2
[redacted] (DS)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[670144] and [670144 Amendment 01]	13-week intravenous toxicity study in juvenile cynomolgus monkeys	4.2.3.5.4

Abbreviations: DP: drug product, DS: drug substance, HPLC: high-performance liquid chromatography, SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

5　単回投与毒性試験

表 2.6.7.5 - Single-Dose Toxicity

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Rat/SD	30-minute intravenous infusion (saline solution with [redacted] % sucrose and [redacted] % polysorbate 20, pH[redacted] or 0.9% sodium chloride)	0 150 500	3M 3F	500	>500	**Clinical signs:** Transient skin lesions and discoloration of tail at 150 mg/kg (1M on Days 1-3 and 2F on Days 1-6) **Body weight gain:** ≥150 mg/kg: Moderate decrease in males and females from Day 3 to 14 (-55 and -43 at 500 mg/kg and -30 and -51% at 150 mg/kg for males and females, respectively) **Food consumption:** 500 mg/kg: -51% in females on Days 3- 8 and +90% on Days 8-14 **Necropsy [a]:** No-compound related macroscopic findings	[TXP0166]	4.2.3.1

Abbreviations: M: male, F: female, SD: Sprague Dawley

[a] After a 2-week observation period

表 2.6.7.5 - Single-Dose Toxicity (continued)

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Rat/SD	30-minute intravenous infusion (saline solution with [redacted] % sucrose and [redacted] % polysorbate 20, pH[redacted])	0 50 150 500	5M 5F	500	>500	**Clinical signs:** 50 mg/kg: Lesions and/or redness at the injection site in 2F/5 500 mg/kg: Lesions, redness, swelling and/or scabs at the injection site in 1M/5 and 1F/5 **Body weight:** ≥50 mg/kg: Decreased body weight gain in M from Day 1 to 8 (-38, -49 and –65% as compared to control at 50, 150 and 500 mg/kg, respectively) **Food consumption:** ≥50 mg/kg: Slight decrease in M from Day 3 to 8 (-16, -20 and –27% as compared to control at 50, 150 and 500 mg/kg, respectively) **Necropsy [a]:** No-compound related macroscopic findings	[TXA1004] [TXA1004 Amendment 01]	4.2.3.1

Abbreviations: M: male, F: female, SD: Sprague Dawley

[a] After a 2-week observation period

6　反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/adm)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse/CD-1	Subcutaneous (saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted])	4 weeks *a*	0, 10, 15	4 M 4 F	M: 15 F: <10	**Mortality**: 10 mg/kg/adm 0M + 3F (2 dead on Day 18 and 1 sacrificed on Day 20) 15 mg/kg/adm 0M + 3F (1 dead on Day 20 and 2 sacrificed on Days 20 and 31) **Clinical signs**: Edema in dead or moribund females **Histopathology** *b*: Male: ND Female: Glomerulonephritis (1/1 at 10 mg/kg/adm, 3/3 at 15 mg/kg/adm), Vascular dilation with fluid exudation in the subcutaneous space and gastrointestinal tract and vascular congestion (2/3 at 15 mg/kg/adm) **Anti-aflibercept antibody:** Presence in all treated males and females	[PK01017]	4.2.3.2

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, CD-1: cesarean-derived, ND: not determined, NOAEL: no observed adverse effect level

a: Three times per week

b: After 2-week observation period

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies (continued)

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/adm)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse/ SCID	Subcutaneous (saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted])	4 or 8 weeks[a]	0, 2.5, 25	5 to 8 M[b]	25 for 4 weeks <2.5 for 8 weeks	**Mortality**: none **Clinical signs**: broken teeth in two animals **Body weight**: 25 mg/kg/adm after 8 weeks of treatment: weight loss (>15%) for one 7-week and one 15-week old mouse **Hematology and blood chemistry**: dose and time related increases in hematocrit, hemoglobin and RBCs in both age groups. Reversible in recovery animals. **Histopathology**: 4 weeks: NAD 8 weeks: Hemorrhage and/or vascular congestion (3/6 at 2.5 mg/kg/adm, 4/8 at 25 mg/kg/adm) mainly in kidney, in nasal passages (2/14), muscular fascia (1/14) and the ear (2/14) Congestion or edema in the gastrointestinal tract and periarteritis/myocarditis (1/8) at 25 mg/kg/adm 8 weeks and 4-week recovery period: Mild renal tubular effect (1/3 at 2.5 mg/kg/adm and 2/2 at 25 mg/kg/adm) **Anti-aflibercept antibody:** No detectable antibodies in any treated males	[VGT3]	4.2.3.2

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, NAD: no abnormality detected, NOAEL: no observed adverse effect level, RBCs: red blood cells, SCID: severe combined immunodeficiency

[a]: Twice a week and 4-week recovery period for 8-week treatment

[b]: 7 or 15 weeks of age

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies (continued)

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/adm)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Rat/SD	Subcutaneous (saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted])	4 weeks[a]	0, 10, 15	4 M 4 F	M: <10 F: 10	**Mortality:** 10 mg/kg/adm: 4M (sacrificed on Days 21, 28 and 43) + 0F 15 mg/kg/adm: 2M (sacrificed on Days 28 and 32) + 2F (sacrificed on Day 19) **Clinicals signs:** 10 mg/kg/adm: M: edema and lethargy F: NAD 15 mg/kg/adm: M: edema F: lethargy **Body weight loss:** 10 mg/kg/adm: -6 to -25% from Week 3 until the end of treatment (3M/4, 0F/4) 15 mg/kg/adm: M: ≥15% from Week 3 until the end of treatment (2/4) F: ≥8% compared to Day 0 (2/4)	[PK01027]	4.2.3.2

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, NAD: no abnormality detected , NOAEL: no observed adverse effect level, SD: SpragueDawley

[a]: Three times per week

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies (continued)

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/adm)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Rat/SD	Subcutaneous (saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted])	4 weeks [a]	0, 10, 15	4 M 4 F	M: <10 F: 10	**Hematology and blood chemistry:** Dose related increases in hematocrit and hemoglobin. Dose related increases in cholesterol (M+F: ≥10 mg/kg/adm), triglycerides and lipase (M: ≥10 mg/kg/adm, F: 15 mg/kg/adm) **Histopathology [b]:** 10 mg/kg/adm: F: NAD; M: glomerulonephritis, renal tubular nephropathy and vascular congestion and dilation in kidney, liver, lungs and gastrointestinal tract (1/4) 15 mg/kg/adm: Glomerulonephritis, renal tubular nephropathy and vascular congestion and/or dilation in kidney, liver, lungs and gastrointestinal tract (1M/4, 2F/4) **Anti-aflibercept antibody:** Presence in 9/16 treated rats on Day 14 and in almost all the rats from Day 21	[PK01027 continued]	4.2.3.2

Abbreviations: adm: administration, M: male, F: female, SD: Sprague Dawley, NOAEL: no observed adverse effect level, NAD: no abnormality detected

[a]: Three times per week

[b]: After 18-day observation period

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies (continued)

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/adm)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Rat/SD	Subcutaneous (saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted])	4 weeks [a]	0, 2, 5	4 M 4 F	M: <2 F: <2	**Mortality**: none **Clinical signs**: F: NAD M: At 5 mg/kg/adm, lethargy (2/4) **Body weight loss:** F: NAD M: -13% to -26% from 2 weeks until the end of treatment at 5 mg/kg/adm (3/4M) **Hematology and blood chemistry**: apparent dose related increases in cholesterol, triglycerides and lipase (M + F). Elevated blood urea nitrogen for 3/4M at 5 mg/kg/adm **Histopathology**: 2 mg/kg/adm: renal tubular nephropathy (1/4F and 4/4M) and glomerulonephropathy (2/4M) 5 mg/kg/adm: renal tubular nephropathy (2/4F and 3/4M), glomerulonephropathy (1/4F and 4/4M), vasculitis (2/4M) **Anti-aflibercept antibody**: presence in all treated males and females at 2 mg/kg/adm, only in females at 5 mg/kg/adm	[PK01034]	4.2.3.2

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, NAD: no abnormality detected, NOAEL: no observed adverse effect level, SD: Sprague Dawley

[a]: Three times per week

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies (continued)

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/adm)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Rat/SD	Subcutaneous (saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted])	4 weeks [a]	0, 0.5, 1	4 M 4 F	M: 1 F: 1	**Mortality**: none **Body weight**: NAD **Clinical signs**: NAD **Hematology and blood chemistry**: slight increase in triglycerides more prominent at 0.5 mg/kg/adm than 1mg/kg/adm (M + F). **Histopathology**: NAD in M and F **Anti-aflibercept antibody**: presence in most treated rats from Day 14	[PK01042]	4.2.3.2

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, NAD: no abnormality detected, NOAEL: no observed adverse effect level, SD: Sprague Dawley

[a]: Three times per week

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies (continued)

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/adm)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Rat/Nude	Subcutaneous (saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted])	4 or 8 weeks [a]	0, 25	2 or 3 M 2 or 3 F	M: <25 F: <25	**Mortality**: 4 weeks: none 8 weeks: 3M + 3F sacrificed on Day 52 **Clinical signs**: 4 weeks: NAD 8 weeks: Letargy (2/3 for M + F) **Body weight loss**: 4 weeks: NAD 8 weeks: Between Day 0 and Day 52: –5% to –11% for 3/3M and ≥–25% for 2/3F **Hematology and blood chemistry**: increase in cholesterol and lipase from Week 4. Decrease in albumin from Week 4. Increase in blood urea after 8 weeks. **Histopathology**: 4 weeks: Renal tubular nephropathy and glomerulonephritis (2M + 2F) 8 weeks: Renal tubular nephropathy and glomerulonephritis (3M + 3F), cholangitis (1F) and myocarditis (1M) **Anti-aflibercept antibody**: no detectable in all treated males and females	[PK01032]	4.2.3.2

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, NAD: no abnormality detected, NOAEL: no observed adverse effect level

[a]: Twice a week

7　反復投与毒性試験

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats										
Species/Strain: Rat / Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** 1 and 3 months, three times weekly						**Test Article:** aflibercept			
Initial Age: 7 - 8 weeks	**Duration of Post-Dose:** 6 weeks						**Study No.:** [0470RR20-001]			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Subcutaneous						**Location:** 4.2.3.2			
Vehicle/Formulation: Buffered saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted]							**GLP Compliance:** Yes			
No Observed Adverse Effect Level:	One-month treatment : 0.5 mg/kg/adm, Three-month treatment : 0.1 mg/kg/adm									
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**
Toxicokinetics										
Number of rats examined	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10
Day 1	-	-	149	164	32	1799	3709	5185	7570	8957
Day 27	Day 27 plasma exposure data were not considered relevant due to the presence of neutralizing anti-aflibercept antibodies in most animals.									
Antibodies to aflibercept [a]:										
Number of rats examined	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10
Day 6	-	-	4	0	2	0	1	0	0	0
Day 42	-	-	10	8	8	9	5	8	7	10
Day 84 (final treatment)	-	-	9/9 [b]	9	8	8	5	6//8 [b]	6/7 [b]	7/8 [b]
Day 132 (final recovery)	-	-	7/9 [b]	8	8	8	4/8 [b]	6/9 [b]	3/7 [b]	7/9 [b]

Abbreviations: M: male, F: female; adm : administration, -: not applicable

[a]: Number of animals with detectable levels, [b]: No serum sample for a few animals

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity　- 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]

Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
	Three-month	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Noteworthy Findings:											
Died or Killed Moribund	**One-month**	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (D43)	0
	Three-month	1 (D43)	0	0	0	0	0	1 (D111)	1 (D89)	2 (D72)	3 (D43, D48)
Absolute Body Weight [b]											
One-month treatment:											
Day 1		217	178	+3.2	+2.2	+6.0	+1.1	+3.2	+3.4	+1.8	+2.2
Day 29 (final treatment)		308	220	+2.6	+2.7	+6.5	+3.6	-0.97	+3.6	-6.8*	+1.4
Day 36		312	217	-	-	-	-	-0.64	+12.0	-4.8	+7.4
Day 71 (final recovery)		365	242	-	-	-	-	+0.82	+11.2*	+0.82	0.0

Abbreviations: M: male, F: female, adm : administration, D: study Day, - : data unavailable
Statistical significance: Analysis of Variance using Dunnett's procedure: * = p<0.05

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Mean values in g for control, percentage of difference from controls for treated groups. Statistical analysis was performed on means.

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]

Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**Three-month**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Noteworthy Findings:											
Absolute Body Weight (continued) [b]											
Three-month treatment:											
Day 1		224	175	+0.4	+5.7	0.0	+3.4	0.0	+4.6	-1.8	+4.6
Day 8		258	184	+0.4	+5.4	-0.4	+4.3	-2.7	+8.2**	-3.5	+7.6*
Day 36		326	217	+1.5	+6.0	+1.8	+6.5	-2.8	+9.2**	-8.0**	+6.0
Day 90 (final treatment)		404	250	+0.2	+4.4	+2.2	+5.6	-5.0	+5.2	-10.9**	+4.4
Day 92		408	239	-	-	-	-	-8.8	+14.6	-9.8	+4.2
Day 132 (final recovery)		438	257	-	-	-	-	-5.0	+11.7	-7.5	+7.4

Abbreviations: M: male, F: female, adm : administration, - : data unavailable
Statistical significance: Analysis of Variance using Dunnett's procedure: * = p<0.05, ** = p<0.01

a: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

b: Mean values in g for control, percentage of difference from controls for treated groups. Statistical analysis was performed on means

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]

Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
	Three-month	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Average Daily Body Weight Gain [b]											
One-month treatment:											
Day 1		49	18	+16.3	-5.6	+24.5**	+5.6	+12.2	+27.8	+12.2	+16.7
Day 29 (final treatment)		16	8	0.0	-37.5	0.0	+50.0	-6.3	-25.0	-31.3	-37.5
Day 36		15	8	-	-	-	-	-13.3	+50.0	-40	+37.5
Day 71 (final recovery)		7	1	-	-	-	-	0.0	-100.0	+171.4	+1100
Three-month treatment:											
Day 1		56	16	+1.8	+25.0	0.0	+37.5	+1.8	+25.0	-7.1	+25.0
Day 8		34	9	0.0	0.0	-2.9	+22.2	-20.6*	+77.8*	-14.7	+77.8*
Day 36		15	4	-6.7	+100.0	+13.3	+100.0	-13.3	+50.0	-80.0**	+25.0
Day 90 (final treatment)		3	3	-133.3	+66.7	-66.7	0.0	-100.0	-33.3	-166.7	+233.3
Day 92		1	-6	-	-	-	-	+400.0	+116.7	+400.0	+133.3
Day 132 (final recovery)		2	7	-	-	-	-	+400.0	-14.3	+300.0	+28.6

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, - : data unavailable
Statistical significance: Analysis of Variance using Dunnett's procedure: * = p<0.05, ** = p<0.01

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Mean values in g for control, percentage of difference from controls for treated groups. Statistical analysis was performed on means

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]

Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
	Three-month	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Average Daily Food Consumption [b]											
One-month treatment:											
Day 1		166	132	+1.2	-4.6	+9.6	-2.3	+5.4	+6.1	+6.0	+2.3
Day 29 (final treatment)		181	133	+1.1	-0.8	+6.1	+6.0	+3.3	+8.3	-5.0	+9.0
Day 36		179	143	-	-	-	-	-2.2	+6.3	-11.7	-4.2
Day 71 (final recovery)		167	133	-	-	-	-	+6.0	+10.5	+16.8	+3.0
Three-month treatment:											
Day 1		176	138	-1.7	+5.1	-2.3	0.0	-1.1	-1.5	-4.6	-2.9
Day 36		181	138	+1.1	+0.7	+3.9	-1.5	-0.6	0.0	-13.3**	-3.6
Day 90 (final treatment)		133	98	0.0	+6.1	+3.8	+6.1	-6.8	-1.0	-9.8*	+13.3
Day 92		53	32	-	-	-	-	-13.2	+6.3	-13.2	0.0
Day 132 (final recovery)		128	107	-	-	-	-	+6.3	-5.6	0.0	-2.8

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, - : data unavailable
Statistical significance: Analysis of Variance using Dunnett's procedure: * = p<0.05, ** = p<0.01

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Mean values in g/week for control, percentage of difference with controls for treated groups. Statistical analysis was performed on means

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
	Three-month	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Clinical Observations (Found died or Killed Moribund) [b]**:**											
Number of rats examined		**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**1**	**3** [c]	**3**
Decrease activity		0	-	-	-	-	-	0	0	0	1 (D48)
Poor grooming		0	-	-	-	-	-	0	0	2 (D59-72)	0
Thin body condition		0	-	-	-	-	-	0	0	1 (D59-72)	2 (D48)
Swollen abdomen and/or penis		0	-	-	-	-	-	0	0	2 (D64-72)	0
Labored breathing		0	-	-	-	-	-	0	0	0	1 (D48)
Red Stained nose		0	-	-	-	-	-	0	1 (D69-70)	3 (D15-72)	2 (D41-48)
Red stain right and/or left eyes		0	-	-	-	-	-	1 (D7-8)	0	1 (D10-72)	2 (D40-48)
Broken upper and/or bottom incisors		0	-	-	-	-	-	1 (D71-72)	0	0	3 (D43-48)
Thick and/or white teeth		0	-	-	-	-	-	1 (D55-110)	1 (D48-88)	2 (D55-72)	0
Ruffled hair coat		0	-	-	-	-	-	0	0	0	1 (D48)
Yellow or red stain vaginal region		-	-	-	-	-	-	-	0	-	2 (D48)
Abnormal gait and stance		0	-	-	-	-	-	0	0	0	2 (D48)
Partially closed eyes		0	-	-	-	-	-	0	0	0	1 (D48)
Red stained front paws		0	-	-	-	-	-	0	0	0	1 (D48)

Abbreviations: M: males, F: females, adm: administration, D: study Day, - : not applicable

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: 1 rat died during the recovery period following one month of treatment

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
Clinical Observations (1-month treatment) [b]**:**											
Number of rats examined		11	11	6	6	6	6	11	11	10	11
Dosing period		No treatment-related clinical signs until Day 30									
Recovery period											
Thick and/or white teeth		0	0	-	-	-	-	1 [c]	3 [c]	4 [c]	5 [c]
Broken upper and/or bottom incisors		0	0	-	-	-	-	0	1 (D49-63)	1 [c]	1 (D49-63)
Red stain right and/or left eyes		0	0	-	-	-	-	0	2 (D49-53)	0	2 (D49-53)
Thin body condition		0	0	-	-	-	-	0	0	1(D59-64)	0
Poor grooming		0	0	-	-	-	-	0	0	1 (D56-64)	0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, D: study Day, - : not applicable

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Number of animals with compound-related observations

[c]: From Day 56-58 for males and Day 49 for females of recovery and remained through the end of recovery

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**Three-month**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Clinical Observations (3-month treatment) [b]**:**											
Dosing period (number of animals)		**14**	**15**	**10**	**10**	**10**	**10**	**14**	**14**	**13**	**12**
Red stain right and/or left eyes		0	0	4 (D1-76)	1 (D24-47)	0	0	3 (D1-54)	1 (D50-53)	6 (D7-91)	7 (D40-85)
Red stain nose		1 (D6)	1 (D3)	3 (D14-40)	0	3 (D22-63)	0	3 (D24-65)	2 (D52)	10 (D36-91)	9 (D40-84)
Thick and/or white teeth		0	0	0	0	0	0	14 (D55-91)	14 (D48-91)	13 (D55-91)	12 (D48-91)
Broken upper and/or bottom incisors		0	0	0	0	0	0	3 (D50-91)	2 (D48-91)	9 (D50-91)	11 (D38-91)
Poor grooming		0	0	0	0	0	0	1 (D56-60)	0	2 (D59-70)	1 (D52-57)
Thin body condition		0	0	0	0	0	0	0	0	1 (D59-61)	1 (D52-57)
Red stained front paws		0	0	0	0	0	0	1 (D64)	0	1 (D58-59)	1 (D52)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, D: study Day

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**Three-month**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Clinical Observations (3-month treatment) (continued) [b]**:**											
Recovery period											
Red stain right and/or left eyes		0	0	-	-	-	-	0	0	1 (until D133)	0
Thick and/or white teeth		0	0	-	-	-	-	4 (until D133	3 (until D126)	5 (until D133)	5 (until D133)
Broken upper and/or bottom incisors		0	0	-	-	-	-	1 (until D126)	0	1 (until D133)	2 (until D126)
Poor grooming		0	0	-	-	-	-	0	0	1 (until D126)	0
Ophthalmology:		No treatment-related changes during the dosing and recovery periods									

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, D: study Day, - : not applicable

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]

Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
	Three-month	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Hematology (1-month treatment) [b, c] **:**											
Day 30 (final treatment)											
Mean corpuscular volume (fL)		56.3	NAD	56.7	NAD	57.4	NAD	59.4**	NAD	57.1	NAD
Mean corpuscular hemoglobin (pg)		18.8	NAD	19.2	NAD	19.2	NAD	19.8**	NAD	19.4	NAD
Day 71 (final recovery)											
Platelets (10^3/mm^3)		870	948	-	-	-	-	976	963	1050*	1066*
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dL)		NAD	35.9	-	-	-	-	NAD	36.2	NAD	34.7**
White blood cells (10^3/mm^3)		NAD	4.43	-	-	-	-	NAD	8.39**	NAD	5.96
Hematology (3-month treatment) [b, c]**:**											
Day 91 (final treatment):											
Platelets (10^3/mm^3)		821	NAD	927	NAD	974	NAD	1003	NAD	1183**	NAD

Additional Information: None.

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected, - : data unavailable
Statistical significance: Analysis of Variance using Dunnett's procedure: * = p<0.05, ** = p<0.01

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
Coagulation (1-month treatment) [b, c]**:**											
Day 91 (final recovery):											
Prothrombin time (sec)		17.1	NAD	-	-	-	-	17.0	NAD	15.5*	NAD
Serum Chemistry (1-month treatment) [b, c]**:**											
Day 30 (final treatment)											
Blood urea nitrogen (mg/dL)		17	NAD	16	NAD	16	NAD	21*	NAD	24**	NAD
Cholesterol (mg/dL)		89	NAD	80	NAD	88	NAD	153**	NAD	162**	NAD
Albumin (g/dL)		4.3	NAD	4.2	NAD	4.2	NAD	3.7**	NAD	3.5**	NAD
Globulin (g/dL)		2.0	NAD	2.0	NAD	2.0	NAD	2.3*	NAD	2.3*	NAD
Albumin/Globulin ratio		2.2	1.9	2.1	2.0	2.1	1.7	1.7**	1.7	1.5**	1.7
Day 71 (final recovery)											
Blood urea nitrogen (mg/dL)		17	18	-	-	-	-	18	19	26	23**
Cholesterol (mg/dL)		94	NAD	-	-	-	-	111	NAD	182	NAD
Albumin (g/dL)		4.0	4.5	-	-	-	-	3.8	4.2	3.6*	4.1
Globulin (g/dL)		2.4	2.2	-	-	-	-	2.6	2.3	2.9	2.7**
Albumin/Globulin ratio		1.6	2.0	-	-	-	-	1.5	1.9	1.3**	1.5**

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected, - : data unavailable
Statistical significance: Analysis of Variance using Dunnett's procedure: * = p<0.05, ** = p<0.01

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b] : Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**Three-month**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Serum Chemistry (3-month treatment) [b, c]**:**											
Day 91 (final treatment)											
Blood urea nitrogen (mg/dL)		17	NAD	16	NAD	18	NAD	22	NAD	32*	NAD
Cholesterol (mg/dL)		96	NAD	91	NAD	126	NAD	155	NAD	206*	NAD
Triglycerides (mg/dL)		25	18	24	20	38	19	52	27*	79**	26
Albumin (g/dL)		3.9	4.2	4.0	4.1	3.7	4.2	3.7	3.7**	3.4*	4.0
Globulin (g/dL)		2.4	2.4	2.5	2.3	2.7	2.3	2.8*	2.5	2.9**	2.7
Albumin/Globulin ratio		1.6	1.8	1.6	1.8	1.4	1.8	1.4	1.5*	1.2**	1.5*
Day 132 (final recovery)											
Blood urea nitrogen (mg/dL)		23	NAD	-	-	-	-	20	NAD	28	NAD
Cholesterol (mg/dL)		133	NAD	-	-	-	-	159	NAD	167	NAD
Albumin (g/dL)		NAD	NAD	-	-	-	-	NAD	NAD	NAD	NAD
Globulin (g/dL)		NAD	NAD	-	-	-	-	NAD	NAD	NAD	NAD
Albumin/Globulin ratio		NAD	NAD	-	-	-	-	NAD	NAD	NAD	NAD
Additional Information: None.											

Abbreviations: M: males, F: females**,** adm: administration, NAD: no abnormality detected, - : data unavailable
Statistical significance: Analysis of Variance using Dunnett's procedure: * = p<0.05, ** = p<0.01

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
Urinalysis (1-month treatment) [b]**:**											
Day 30 (final treatment)											
Number of rats examined		**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
Protein (semiquantitative) [c]		3 (30- 100 mg/dL)	NAD	4 (30- 300 mg/dL)	NAD	5 (30- 300 mg/dL)	3 (T- 300 mg/dL)	6 (100- 300 mg/dL)	4 (T- 30 mg/dL)	6 (100- 300 mg/dL)	5 (T- 30 mg/dL)
Leukocytes (semiquantitative) [d]		3 (T-1)	NAD	2 (T-1)	NAD	3 (T-1)	NAD	4 (1-3)	1 (1)	4 (T-3)	3 (1)
Day 71 (final recovery)											
Number of rats examined		**5**	**5**	**0**	**0**	**0**	**0**	**5**	**5**	**4**	**5**
Protein (semiquantitative) [c]		4 (T-300 mg/dL)	2 (T)	-	-	-	-	4 (30- 300 mg/dL)	4 (T-300 mg/dL)	4 (300 mg/dL)	5 (T-100 mg/dL)

Abbreviations: M: males, F: females**,** adm: administration, NAD: no abnormality detected, -: data unavailable
Grades of severity: T = Trace, 1 = Small, 2 = Moderate, 3 = Large

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[c]: Number of animals with observation (concentration range)

[d]: Number of animals with observation (grade of severity)

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**Three-month**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Urinalysis (3-month treatment) [b]**:**											
Day 91 (final treatment)											
Number of rats examined		**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**9**	**8**	**7**
Protein (semiquantitative) [c]		9 (T-300 mg/dL)	4 (T-100 mg/dL)	9 (T-300 mg/dL)	6 (T-100 mg/dL)	9 (30->2000 mg/dL)	5 (T-300 mg/dL)	8 (30->2000 mg/dL)	8 (30-300 mg/dL)	7 (30->2000 mg/dL)	5 (30-300 mg/dL)
Day 132 (final recovery)											
Number of rats examined		**4**	**5**	**0**	**0**	**0**	**0**	**4**	**5**	**5**	**5**
Protein (semiquantitative) [c]		4 (T-300 mg/dL)	1 (T)	-	-	-	-	4 (100->2000 mg/dL)	4 (30-300 mg/dL)	5 (100->2000 mg/dL)	4 (30-300 mg/dL)

Abbreviations: M: Males, F: Females**,** adm: administration, NAD: no abnormality detected, T : trace, - : data unavailable

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[c]: Number of animals with observation (concentration range)

表 2.6.7.7A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
Absolute Organ Weights (1-month treatment) [b, c]**:**											
Day 30 (final treatment)											
Number of rats examined		**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
Kidneys		2.36	1.54	-2.5	-1.3	+5.9	-3.9	+17*	+4.5	+8.9	+2.6
Liver		9.26	6.37	-0.1	-3.8	+3.9	-1.3	+11	+1.4	+7.0	+3.0
Day 71 (final recovery)											
Number of rats examined		**5**	**5**	**0**	**0**	**0**	**0**	**5**	**5**	**4**	**5**
Adrenals		0.065	0.058	-	-	-	-	NAD	+38*	NAD	+6.9
Heart		1.41	0.99	-	-	-	-	+9.2	NAD	+14	NAD
Kidneys		2.56	1.56	-	-	-	-	+6.3	NAD	+19	NAD
Liver		9.88	5.62	-	-	-	-	+7.9	+35**	+24*	+17*
Spleen		0.72	0.64	-	-	-	-	+11	+16*	+26*	+7.8
Ovaries		NA	0.107	-	-	-	-	NA	+59*	NA	+20
Additional Information: After a 6-week recovery, a definitive relationship to organ weight changes and test article administration could not be determined in the absence of histopathological evaluation. Differences in organ-to-body weight and/or organ-to-brain weight ratios compared to control were also observed for organs above.											

Abbreviations: M: males, F: females, adm: administration, NA : not applicable, NAD: no abnormality detected, - : data unavailable
Statistical significance: Analysis of Variance performed on mean values (in grams) using Dunnett's procedure: * = p<0.05, ** = p<0.01

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: For control group, mean value in grams is presented, for treated group, percent differences from controls are shown

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**Three-month**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Absolute Organ Weights (3-month treatment) [b, c]**:**											
Day 91 (final treatment) **Number of rats examined**		**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**9**	**8**	**7**
Adrenals		0.046	0.066	+26	NAD	+15	NAD	+15	NAD	+17	NAD
Brain		1.98	1.78	+0.5	NAD	+3.5	NAD	-1.5	NAD	0	NAD
Heart		1.50	0.98	+0.7	NAD	+6	NAD	+1.3	NAD	+1.3	NAD
Kidneys		2.65	1.63	+0.4	NAD	+12	NAD	+14	NAD	+29**	NAD
Liver		9.93	6.00	+3	NAD	+14	NAD	+13	NAD	+26**	NAD
Day 132 (final recovery)		After a 6-week recovery, the only value that was significantly different from the corresponding controls was the spleen-to-body ratio for the 2 mg/kg/adm female group, which cannot be ruled out as related to the test article in the absence of histopathological evaluation of recovery animals									
Additional Information: Differences in organ-to-body weight and/or organ-to-brain weight ratios compared to control were also observed for organs above.											

Abbreviations: M:males, F: females, adm: administration, NAD: no abnormality detected
Statistical significance: Analysis of Variance realized on mean values (in grams) using Dunnett's procedure: * = p<0.05, ** = p<0.01

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: For control group, mean value in grams is presented, for treated group, percent differences from controls are shown

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
	Three-month	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Gross Pathology (1-month treatment) :		No treatment- related gross findings at Day 30 and Day 71 of necropsy									
Gross Pathology (3-month treatment) [b, c]**:**											
Day 91 (final treatment)											
Number of rats examined		**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**9**	**8**	**7**
Spleen:											
Tan, mottled		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enlarged		0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Heart:											
Tan mottling		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidneys:											
Tan, mottling cortex		0	0	0	0	1	0	1	0	3	0
Granular cortex		0	0	0	0	0	0	1	0	2	0
Greater omentum:											
Edema		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Testis:											
Small, soft, bilaterally		0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Epididymides:											
Small, bilaterally		0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NA : not applicable

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**Three-month**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Gross Pathology (3-month treatment) (continued) [b, c]**:**											
Day 91 (continued)											
Number of rats examined		**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**9**	**8**	**7**
Prostate: Small		0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Mesenteric and tracheobronchial lymp nodes:											
Enlarged		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pancreatic atrophy:											
Lesions of bile/pancreatic ducts		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Uterine horns: Bilaterally, dilated		NA	0	NA	1	NA	2	NA	1	NA	1
Day 132 (final recovery)											
Number of rats examined		**4**	**5**	**0**	**0**	**0**	**0**	**4**	**5**	**5**	**5**
Kidneys:											
tan and/or pale, granular cortex, bilaterally, diffuse		1	0	-	-	-	-	1	1	1	2
Spleen: enlarged		0	0	-	-	-	-	1	1	1	2
Urinary bladder: coagulum		0	0	-	-	-	-	1	0	0	0
Liver: enlarged		0	0	-	-	-	-	0	1	0	2
Additional Information: In addition to the findings described, the animals found dead or moribund sacrificed (except of male control and female treated with 2 mg/kg/adm) showed dark stained in several organs, and/or dark or red fluid-filled in abdominal cavity, cecum, colon, duodenum, ileum, jejunum, rectum and/or urinary bladder.											

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NA: not applicable, - : data unavailable

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
	Three-month	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Histopathology (Died or Killed Moribund, LM) [b, c]											
Number of rats examined		**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**1**	**3** [d]	**3**
Kidneys:											
Tubular protein casts		1 (+)	-	-	-	-	-	1 (4+)	1 (4+)	2 (4+)	3 (+ to 3+)
Fibrosis		0	-	-	-	-	-	0	0	1 (2+)	0
Glomerulopathy		0	-	-	-	-	-	1 (4+)	1 (4+)	2 (4+)	0
Nuclear condensation of renal tublular epithelium		0	-	-	-	-	-	0	0	0	1 (P)
Femur:											
osteoporosis and/or decrease cellularity		0	-	-	-	-	-	1 (P)	1 (P)	2 (P)	1 (3+)
Liver:											
necrosis, hepatocellular vacuolisation, cholangitis and/or congestion		0	-	-	-	-	-	1 (2+)	1 (2+)	3 (2+ to 3+)	1 (3+)
Mesenteric lymph node:											
edema, cortical atrophy, lympholysis and/or hemorrhage		0	-	-	-	-	-	0	0	2 (2+)	3 (+ to 3+)
Additional Information: The severe renal disease was the cause of the death or moribund sacrifice in one two 1 mg/kg/adm (male and female) and in several two of the 2 mg/kg/adm males.											

Abbreviations: M: males, F: females, adm: administration, LM: light microscopy, - : data unavailable
Grades of side effects: P: present, +: minimal, 2+: mild, 3+: moderate, 4+: marked

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: One male died during the recovery period following one month of treatment

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**One-month**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]	**M: 11** [a]	**F: 11** [a]
Histopathology (1-month treatment, LM) [b, c]											
Day 30 (final treatment)											
Number of rats examined		**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
Kidneys:											
Tubular protein casts		4 (+)	1 (+)	5 (+)	0	4 (+)	0	6 (+ to 2+)	0	6 (+ to 2+)	1 (+)
Glomerulopathy		0	0	0	0	0	0	5 (+ to 2+)	1 (+)	5 (2+)	1 (+)
Day 71 (final recovery)		At the end of 6-week recovery, there were no histopathologic evaluation									

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy
Grades of side effects: P: present, +: minimal, 2+: mild, 3+: moderate, 4+: marked

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7.A - Repeat-Dose Toxicity - 3-month subcutaneous toxicity study in rats (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month toxicity study of VEGF Trap by subcutaneous injection in rats [0470RR20-001]											
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**0.1**		**0.5**		**1**		**2**	
Number of Animals on Study	**Three-month**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]	**M: 15** [a]	**F: 15** [a]
Histopathology (3-month treatment, LM) [b, c]											
Day 91 (final treatment)											
Number of rats examined		**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**9**	**8**	**7**
Kidneys:											
Tubular protein casts		9 (+ to 2+)	3 (+ to 2+)	9 (+ to 2+)	5 (+)	9 (+ to 2+)	10 (+ to 2+)	10 (+ to 3+)	8 (+ to 2+)	8 (+ to 4+)	6 (+)
Glomerulopathy		0	0	2 (+)	0	3 (+)	0	6 (+ to 3+)	1 (2+)	4 (+ to 4+)	1 (+)
Fibrosis		0	0	0	0	1 (+)	0	3 (+ to 2+)	0	1 (2+)	0
Tubular basophilia and/or dilatation		4 (+)	1 (+)	0	0	5 (+ to 2+)	0	4 (+ to 2+)	4 (+ to 2+)	4 (+ to 3+)	0
Tubular dilatation		0	0	0	0	0	0	0	0	1 (3+)	0
Femur: osteoporosis		0	0	0	0	0	0	0	0	2 (P)	0
Pancreas: arteritis, fibroplasia, tubular atrophy and/or cellular infiltration		0	0	0	0	0	0	0	0	2 (2+ to 3+)	0
Mesenteric lymph node: lymphoid hyperplasia, sinus histiocytosis, edema, and/or congestion		0	3 (2+)	0	0	0	0	0	0	3 (+ to 3+)	0
Day 132 (final recovery)		At the end of 6-week recovery, there was no histopathological evaluation									
Conclusion: The NOAEL was 0.1 mg/kg/adm after a 3-month dosing period											

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy, NOAEL: no observed adverse effect level
Grades of side effects: P: present, +: minimal, 2+: mild, 3+: moderate, 4+: marked

[a]: 5 animals from these groups remained on study, untreated, for a six-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7.B - Repeat-Dose Toxicity - 4-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys

Test Article: aflibercept

Report Title:	**A 4-week intravenous toxicity study of VEGF Trap with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys**								
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing:** 4 weeks, once a week				**Test Article:** aflibercept			
Initial Age: 2.0 to 4.2 years		**Duration of Post-Dose:** 6 weeks				**Study No.:** [223.11]			
Date of First Dose: 20		**Method of Administration:** 30-minute intravenous infusion				**Location:** 4.2.3.2			
Vehicle/Formulation: Saline solution with % sucrose and % polysorbate 20, pH						**GLP Compliance:** Yes			
No Observed Adverse Effect Level: <2 mg/kg/adm									
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**2**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study		**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Toxicokinetics:									
Free aflibercept at steady state [b]									
C_{max} (µg/mL)	Day 22, 5 min [c]	BLQ	BLQ	116.40	129.20	979.60	1131.00	8849.25	3953.63
Trough (µg/mL)	Day 29, 128 h [c]	BLQ	BLQ	29.20	14.60	218.40	273.80	604.00	855.38
Bound aflibercept at steady state		-	-	-	-	-	-	-	-
Additional Information: None.									

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, BLQ : below limit of quantification, C_{max}: maximum plasma concentration observed; - : data unavailable

[a]: 3 animals from the control and 30 mg/kg/adm groups were kept for a 6-week recovery period.

[b]: Mean values

[c]: Time post infusion

表 2.6.7.7B- Repeat-Dose Toxicity - 4-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week intravenous toxicity study of VEGF Trap with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys [223.11]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**2**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Antibodies to aflibercept [b]	0	1 (D2 to 70) [c]	0	0	0	0	1 (D22, 29)	1 (D16)
Noteworthy Findings:								
Died or Killed Moribund:	0	0	0	0	0	0	0	0
Absolute Body Weight [d] **:**								
Day –1 or 1 [e]	2.965	2.545	- 2.1	- 3.0	+ 2.3	- 1.6	+ 0.8	- 2.8
Day 28/29 or 28/30 (final treatment) [e]	3.063	2.606	- 4.1	- 1.8	- 2.4	- 5.4	- 3.5	- 6.0
Day 71 (final recovery)	2.953	2.440	-	-	-	-	- 9.7	+ 0.3
Average Body Weight Gain (kg) :								
Day 28/29 – Day -1 or Day 28/30 – Day 1 [e]	0.098	0.061	0.032	0.092	-0.044	-0.040	-0.035	-0.023
Average Daily Food Consumption [f]**:**								
Day -1	120.0	104.3	- 10.0	- 8.0	0.0	- 17.2	0.0	+ 2.9
Day 27 (final treatment)	120.0	108.8	- 6.0	- 16.2	0.0	- 30.5	- 1.3	- 5.5
Day 69 (final recovery)	120.0	120.0	-	-	-	-	0.0	0.0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, D: study Day , - : data unavailable

[a]: 3 animals from the control and 30 mg/kg/adm groups were kept for a 6-week recovery period.

[b]: Number of animals with detectable levels

[c]: Presence of non-specific antibodies

[d]: Mean values in kg for control; percentage of difference with controls for treated group

[e]: Body weights at Day –1 or 28/29 for males and Day 1 or 28/30 for females

[f]: Mean values in g/Day for control; percentage of difference with controls for treated group

表 2.6.7.7.B- Repeat-Dose Toxicity - 4-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week intravenous toxicity study of VEGF Trap with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys [223.11]								
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle Control)**		**2**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Clinical Observations:	No treatment-related changes during the dosing and recovery period							
Ophthalmology:	No treatment-related changes during the dosing and recovery period							
Electrocardiography:	No treatment-related changes during the dosing and recovery period							
Hematology [b, c]:								
Day 11								
Red blood cells (10^6/µL)	4.820	4.703	5.420	4.992	5.250	5.034	5.485	5.178
Hemoglobin concentration (g/dL)	11.76	11.48	13.10	12.32	12.62	12.40	13.05	12.49
Hematocrit (%)	36.94	35.79	40.78	39.08	39.30	39.12	41.44	39.15
Day 28 (final treatment)								
Red blood cells (10^6/µL)	5.046	4.879	5.600	5.156	5.690	5.322	5.773	5.459
Hemoglobin concentration (g/dL)	12.48	12.03	13.86	13.08	13.90	13.32	13.96	13.34
Hematocrit (%)	39.63	37.91	43.80	41.46	43.72	42.48	44.48	42.14
Day 67 (final recovery)								
Red blood cells (10^6/µL)	5.717	5.557	-	-	-	-	5.987	5.303
Hemoglobin concentration (g/dL)	13.80	13.60	-	-	-	-	13.97	12.93
Hematocrit (%)	44.63	43.00	-	-	-	-	45.97	42.57
Coagulations:	No treatment-related changes during the dosing and recovery period							
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, - : data unavailable

[a]: 3 animals from the control and 30 mg/kg/adm groups were kept for a 6-week recovery period.

[b] : Mean values

[c]: Only parameters considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7.B- Repeat-Dose Toxicity - 4-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week intravenous toxicity study of VEGF Trap with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys [223.11] (continued)								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**2**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Clinical Chemistry [b, c]:								
Day 28 (final treatment)								
Blood urea nitrogen (mg/dL)	20.3	NAD	23.0	NAD	29.0 [d]	NAD	27.6 [d]	NAD
Total cholesterol (mg/dL)	115.9	NAD	157.2	NAD	154.4	NAD	179.6 [e]	NAD
Triglycerides (mg/dL)	56.6	NAD	99.8	NAD	68.4	NAD	76.4 [f]	NAD
Total protein (g/dL)	6.90	NAD	6.78	NAD	7.10 [g]	NAD	6.81 [g]	NAD
Albumin (g/dL)	4.61	NAD	4.28	NAD	4.46 [g]	NAD	4.16 [g]	NAD
Albumin/Globulin ratio	2.04	NAD	1.74	NAD	1.72 [g]	NAD	1.58 [g]	NAD
Day 67 (final recovery)	No treatment-related changes parameters were observed in any animal of any group during the recovery period when compared with the pre-dose levels and/or the control group animals							

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD: no abnormality detected

[a]: 3 animals from the control and 30 mg/kg/adm groups were kept for a 6-week recovery period.

[b]: Mean values

[c]: Only parameters considered to be treatment-related are shown

[d]: Increase in one animal (No.28) from the 10 mg/kg/adm and in two animals (No.40 and 44) from 30 mg/kg/adm as compared to pre-test and/or control values

[e]: Increase essentially due to animal No.44

[f]: High triglyceride level observed in animal No.50

[g]: Decrease in one animal (No.28) from the 10 mg/kg/adm group and in two animals (No.40 and 44) from 30 mg/kg/adm group as compared to pre-test and/or control values

表 2.6.7.7B- Repeat-Dose Toxicity - 4-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week intravenous toxicity study of VEGF Trap with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys [[redacted]223.11] (continued)								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**2**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Urinalysis [b, c] **:**								
Urine total protein (mg/dL)								
Day 10/11	15.3	NAD	17.8	NAD	16.8	NAD	115.6 [d]	NAD
Day 24/25 (final treatment)	14.3	NAD	12.6	NAD	29.4	NAD	104.5 [d]	NAD
Day 65/66 (final recovery)	32.3	NAD	-	-	-	-	32.3	NAD
Organ Weights:	No treatment-related changes in the organ weights and relative organ weights to body weights at the end of the dosing and recovery period							
Gross Pathology:	No treatment-related changes at the end of the dosing and recovery period							

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected, - : data unavailable

[a]: 3 animals from the control and 30 mg/kg/adm groups were kept for a 6-week recovery period.

[b]: Mean values

[c]: Only parameters considered to be treatment-related are shown

[d]: High urine protein level observed in animal No.40 and/or No.44

表 2.6.7.7B- Repeat-Dose Toxicity - 4-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week intravenous toxicity study of VEGF Trap with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys [223.11]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**2**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Histopathology: Day 29/30 (terminal sacrifice, LM) [b, c]								
Number of animals examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Kidneys:								
Increase of mesengial matrix of glomeruli	0	0	1 (±)	0	1 (+)	0	3 (± to 2+)	2 (± to +)
Femurs:								
Decrease of metaphyseal capillary invasion	0	1 (2+)	2 (± to +)	2/4 (+) [d]	4 (± to +)	5 (± to 2+)	3 (± to +)	4/4 (+ to 2+) [d]
Decrease of primary bony trabeculae	0	2 (± to 2+)	3 (± to +)	2/4 (+ to 2+) [d]	5 (± to 2+)	5 (± to 2+)	3 (± to 2+)	4/4 (+ to 2+) [d]
Degeneration of cartilage matrix	0	0	0	0/4 [d]	0	1 (±)	2 (± to 2+)	1/4 (±) [d]
Disorganization of chondrocyte columns	0	0	0	0	0	0	2 (+)	0
Increase thickening of physeal cartilage	1 (+)	0	2 (±)	0/4 [d]	5 (± to +)	3 (±)	5 (± to 2+)	3/4 (± to +) [d]
Transverse subchondral bony plate	0	1 (2+)	2 (+)	2/4 (+) [d]	3 (+ to 2+)	4 (+ to 2+)	3 (± to 2+)	4/4 (+ to 2+) [d]
Ovaries:								
Decreased numbers of maturing follicles of granulosa cells and/or theca cells	NA	0	NA	0	NA	3 (± to +)	NA	4 (± to +)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy, NA : not applicable
Grades of side effects: ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

[a]: 3 animals from the control and 30 mg/kg/adm groups were kept for a 6-week recovery period.

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: One female of five females was unexamined

表 2.6.7.7B- Repeat-Dose Toxicity - 4-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week intravenous toxicity study of VEGF Trap with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys [223.11]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**2**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Histopathology: Day 71 (recovery sacrifice, LM) [b, c]								
Number of monkeys examined	3	3	0	0	0	0	3	3
Kidneys:								
Increase mesengial matrix of glomeruli	0	0	-	-	-	-	1 (±)	1 (±)
Femurs:								
Decrease of metaphyseal capillary invasion	0	0	-	-	-	-	1 (+)	0
Decrease of primary bony trabeculae	0	1(±)	-	-	-	-	1 (2+)	0
Degeneration of cartilage matrix	0	0	-	-	-	-	1 (±)	1 (+)
Disorganization of chondrocyte columns	0	0	-	-	-	-	1 (2+)	1 (+)
Increase thickening of physeal cartilage	0	0	-	-	-	-	1 (+)	2 (± to +)
Ovaries:	No treatment-related changes at the end of the recovery period							
Conclusions: The NOAEL was not determined								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy, NOAEL: no observed adverse effect level , - : data unavailable
Grades of side effects: ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

[a]: 3 animals from the control and 30 mg/kg/administration groups were kept for a 6-week recovery period.

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7C - Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys

Test Article: aflibercept

Report Title:	**A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period**		
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing:** 13 weeks, once a week	**Test Article:** aflibercept
Initial Age: 2.7 to 7.0 years		**Duration of Post-Dose:** 13 weeks	**Study No.:** [223.18]
Date of First Dose: 20		**Method of Administration:** 30-minute intravenous infusion	**Location:** 4.2.3.2
Vehicle/Formulation: Saline solution with % sucrose and % polysorbate 20, pH			**GLP Compliance:** Yes
No Observed Adverse Effect Level: <3 mg/kg/adm			

Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study		**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Toxicokinetics:									
Free aflibercept at steady state [b]									
$AUC_{0\text{-}7days}$ (µg.day/mL)		-	-	292	343	1270	1010	3630	3330
C_{max} (µg/mL)	Day 85/86, 5 min [c, d]	BLQ	BLQ	118	150	479	400	1368	1258
Trough (µg/mL)	Day 85/86, 0h [c, d]	BLQ	BLQ	14	19	69	51	197	212
Bound aflibercept at steady state [b]									
C (µg/mL)	Day 85/86, 24h [c, d]	BLQ	BLQ	6.97	6.65	6.78	7.63	7.55	6.97

Additional Information: None.

Abbreviations: M: males, F: females, adm: administration, $AUC_{0\text{-}t}$: area under the curve during the dosing interval, BLQ : below limit of quantification, C: concentration, C_{max}: maximum plasma concentration observed, - : data unavailable

[a]: 4 animals from control group (males and females), 4 females and 3 males from 10 mg/kg/adm group and 3 animals from 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Day of steady state

[d]: Time post injection

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Antibodies to aflibercept:	Detectable levels in one male animal (No.40) from 10 mg/kg/adm group between Day 22 and Day 183 and in one male animal (No.52) from 30 mg/kg/adm group between Day 29 and Day 58							
Noteworthy Findings:								
Moribund sacrifices	0	0	0	0	1 (D 44)	0	1 (D 57)	1 (D 77)
Unscheduled sacrifices	0	1 (D 128) [b]	0	0	0	1 (D 127) [b]	0	0
Group Mean Body Weight [c]**:**								
Day –1/1	4.092	2.755	- 1.6	- 0.2	- 3.6	- 0.5	- 1.8	- 0.2
Day 90/91 (Week 13-terminal sacrifice)	4.621	2.997	+ 0.7	- 3.4	- 23.9	- 18.1	- 29.6*	- 15.9
Day 181/182 (Week 26-recovery sacrifice)	4.557	3.182	-	-	- 12.5	- 8.8	- 9.0	- 7.2
Group Mean Body Weight Gain (kg) [d]**:**								
Day 90/91 – Day –1/1	0.529	0.242	0.627	0.144	-0.425	-0.284	-0.766	-0.229
Average Daily Food Consumption (%)	1 male (No.42) from the 10 mg/kg/adm group and 1 male (No.54) and 1 female (No.59) from the 30 mg/kg/adm group had a reduced food consumption during treatment (-69, -63 and -61%, respectively). Animal No.54 tended to return to normal value during the recovery period							
Additional Information: 3 animals were sacrificed during the dosing period: 1 male (No.42) at 10 mg/kg/adm and 1male (No.60) and 1 female (No.59) at 30 mg/kg/adm. Animal No.59 had evidence of pancreatitis and animal No.42 had gastroenteritis. Animal No.60 had bone tumor and was sacrificed for humane reasons. These findings were not considered treatment-related.								

Abbreviations: M: males, F: females,adm : administration, D: study Day, No.: animal number, - : data unavailable
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p<0.05

[a]: 4 males and 4 females from the control group, 4 females and 3 males from the 10 mg/kg/adm group and 3 males and 3 females from the 30 mg/kg/adm group were kept for a 13-week recovery period

[b]: Sacrificed during recovery period to evaluate the pathogenesis of hunched posture and kyphosis; the control female was sacrificed to compare with the treated female

[c]: Mean values in kg for control; percentage of difference with controls for treated groups. Statistical analysis was performed on means

[d]: Mean values

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Clinical Observations (Moribund sacrificed) [b, c]								
Number of animals:	0	1	0	0	1	1	1	1
Hunched posture	-	0	-	-	1	1	0	0
Anorexia	-	0	-	-	1	0	0	0
Unwillingness to move arm, elbow and/or sit upright	-	0	-	-	1	0	1	1
Unresponsive	-	0	-	-	0	0	0	1
Kyphosis	-	0	-	-	0	1	0	0
Clinical Observations (Dosing period) [b, c]								
Number of animals:	8	7	4	4	7	7	7	7
Hunched posture	0	1 (D1; 85)	2 (D78-90)	1 (D85-86)	7 (D28-90)	6 (D3-90)	6 (D61-90)	5 (D1; 29-90)
Kyphosis and/or scoliosis [d]	0	0	0	0	0	0	1 (D80)	1 (D80)
Nose swelling	0	0	1 (D72-90)	0	0	0	1 (D81-90)	0
Nasal discharge and/or bloody	0	0	1 (D79, 83, 86)	0	1 (D50, 66, 85)	2 (D64-90)	2 (D71, 76, 85)	0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, D: study Day, -: not applicable

[a]: 4 animals from control group (males and females), 4 females and 3 males from 10 mg/kg/adm group and 3 animals from 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: Diagnosis by combination of clinical evaluations and/or results of spinal X-rays

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Clinical Observations (Recovery period) [b, c]								
Number of animals:	4	3 [e]	0	0	4	3	3	3
Hunched posture	0	1 (D116, 117)	-	-	2 (D91-153)	3 (D91-162)	1 (D91-106)	1 (D91-150)
Kyphosis and/or scoliosis [d]	0	0	-	-	2 (D91-153)	2 (D122, 125)	0	1 (122)
Increased bone density of vertebrae endplates [d]	0	0	-	-	2	3	2	3
Nasal discharge and/or bloody	0	0	-	-	0	1 (D92, 112)	1 (D99)	0
Ophthalmology:	No treatment-related changes during the dosing and recovery periods							
Electrocardiography/Blood pressure:	No treatment-related changes during the dosing and recovery periods							
Body (rectal) temperature:	No treatment-related changes during the dosing and recovery periods							

Abbreviations: adm : administration, M: males, F: females, D: study Day, -: not applicable

[a]: 4 animals from control group (males and females), 4 females and 3 males from 10 mg/kg/adm group and 3 animals from 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: Diagnosis by combination of clinical evaluations and/or results of spinal X-rays

[e]: One female was moribund sacrificed prior to the scheduled recovery necropsy

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Hematology [b, c] :								
Day –7 (acclimation)								
Red blood cells (10^6/µL)	6.081	5.670	5.755	5.595	5.788	5.831	5.794	5.530
Hemoglobin concentration (g/dL)	14.35	13.43	13.75	13.63	13.84	13.65	13.86	13.08
Hematocrit (%)	46.59	43.40	43.85	43.18	44.41	44.43	45.30	42.20
Week 13 (final treatment)								
Red blood cells (10^6/µL)	5.733	5.554	5.583	6.160	5.980	6.338*	6.154 [d]	6.116*
Hemoglobin concentration (g/dL)	13.68	13.45	13.45	15.00*	14.62	15.13*	14.80 [d]	14.57*
Hematocrit (%)	41.48	40.58	40.63	44.83*	43.18	45.63*	44.81 [d]	44.39*
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, No.: animal number
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p<0.05

[a]: 4 animals from control group (males and females), 4 females and 3 males from 10 mg/kg/adm group and 3 animals from 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: Decrease in red blood cells, hemoglobin and hematocrit for one male animal (No.54) due to nose bleeding

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Hematology (Final recovery) [b, c] :								
Red blood cells (10^6/µL)	6.120	5.647	-	-	5.757	5.873	5.640	5.197
Hemoglobin concentration (g/dL)	14.40	13.87	-	-	14.47	14.10	13.57	12.83
Hematocrit (%)	45.13	42.53	-	-	43.87	44.50	42.50	40.40
Coagulation (Week 4) [b, c]:								
Activated Partial Thromboplastin Time (second)	26.81	26.33	24.28	25.35	24.15	26.36	23.58	23.64
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, - : data unavailable

[a]: 4 animals from control group (males and females), 4 females and 3 males from 10 mg/kg/adm group and 3 animals from 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Clinical Chemistry: Week 4 [b, c]								
Albumin (g/dL)	4.23	4.15	4.13	4.23	4.08	3.98	4.23	3.95
Albumin/Globulin ratio	1.38	1.41	1.33	1.30	1.29 [d]	1.24 [d]	1.69 [d]	1.18 [d] *
Triglycerides (mg/dL)	60.1	39.3	39.0	51.0	68.8	47.9	60.5 [e]	56.9
Inorganic phosphate (mg/dL)	5.36	5.19	5.68	5.08	5.75	4.90	4.98 [e]	4.68
Clinical Chemistry: Week 13 (final treatment) [b, c]								
Blood urea nitrogen (mg/dL)	18.3	17.8	20.3	18.3	25.1	22.1	22.1	19.7
Albumin (g/dL)	4.31	4.06	4.00	4.05	3.89	3.76	3.99	4.01
Albumin/Globulin ratio	1.40	1.31	1.20	1.25	1.14 [d]	1.16 [d]	1.27 [d]	1.17 [d]
Triglycerides (mg/dL)	48.4	44.0	43.0	49.0	43.7	57.9	64.3 [e]	54.7
Inorganic phosphate (mg/dL)	5.89	5.45	5.88	4.88	5.83	5.21	4.86 [e]	5.20

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, No.: animal number
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p<0.05

[a]: 4 animals from control group (males and females), 4 females and 3 males from 10 mg/kg/adm group and 3 animals from 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b] : Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: Decrease in Albumin/Globulin ratio in two male (No.34 and 38) and two female (No.33 and 39) animals from the 10 mg/kg/adm group and for two male (No.50 and 54) and two female (No.53 and 55) animals from the 30 mg/kg/adm group on weeks 4 and 13.

[e]: Increase in triglycerides and decrease in inorganic phosphate on weeks 4 and 13 essentially due to one male animal (No.54) from the 30 mg/kg/adm group. These levels returned to baseline at the end of recovery period.

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Clinical Chemistry: Week 27 (final recovery) [b, c] :								
Blood urea nitrogen (mg/dL)	14.5	17.0	-	-	17.3¤	14.7	17.3	13.7
Albumin (g/dL)	4.08	3.80	-	-	4.00	3.77	3.77	3.77
Albumin/Globulin ratio	1.53	1.33	-	-	1.60	1.40	1.60	1.40
Triglycerides (mg/dL)	67.5	67.0	-	-	34.0	34.3*	42.0	83.3
Inorganic phosphate (mg/dL)	4.68	4.70	-	-	4.90	4.53	4.67	4.67
C-reactive protein [d]:								
Week 4	4	0	2	3	7 [e]	2	5	5
Week 27 (final recovery)	1	0	-	-	0	0	2	1

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, No.: animal number , - : data unavailable
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p<0.05, Pairwise comparison using Dunn's procedure: ¤ = p<0.05

[a]: 4 animals from the control group (males and females), 4 females and 3 males from the 10 mg/kg/adm group and 3 animals from the 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: Number of animals with levels >0.50 mg/dL

[e]: High level (11.1 mg/dL) for one male (No.34) on week 4

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Urinalysis [b, c]:								
Week 4								
Total protein (mg/dL)	9.3	15.0	6.3	6.5	14.8	8.2 [d]	8.6	7.0 *
Week 8								
Microalbumin (mg/dL)	<0.5 or 1.2	1.20	<0.5 or 0.8	≤0.5	5.23 *	65.73 [d]	8.90	0.55
Week 13 (final treatment)								
Total protein (mg/dL)	8.9	8.8	10.3	6.0	34.0	54.3 [d]	14.3	7.4
Microalbumin (mg/dL)	0.95	0.73	1.20	<0.5 or 0.60	15.87 *	46.28 [d]	7.35	0.92
Week 27 (final recovery)								
Total protein (mg/dL)	8.8	17.3	-	-	66.0	43.3	15.7	15.3
Microalbumin (mg/dL)	0.55	1.20	-	-	ND	ND	<0.5 or 4.3	2.20

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, ND : no data, No.: animal number , - : data unavailable
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p<0.05

[a]: 4 animals from the control group (males and females), 4 females and 3 males from the 10 mg/kg/adm group and 3 animals from the 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: High increase in total protein (>200 mg/dL) and in microalbumin (>194 mg/dL) in one female animal (No.33) on weeks 4, 8 and/or 13

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [[redacted]223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Organ Weights [b, c]:								
Week 13 (terminal sacrifice)								
Adrenals	NAD	0.44850	NAD	-12	NAD	+0.2	NAD	-21*
Ovaries	NA	0.38278	NA	-59*	NA	-58*	NA	-71*
Uterus	NA	5.965	NA	-29*	NA	-17	NA	-50*
Week 27 (recovery sacrifice)								
Adrenals	NAD	0.36663	-	-	NAD	+18	NAD	+21
Pituitary	NAD	0.05403	-	-	NAD	+28	NAD	+25
Ovaries	NA	0.27457	-	-	NA	+48	NA	-10
Uterus	NA	6.050	-	-	NA	+15	NA	-11

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NA : not applicable, NAD : no abnormality detected, - : data unavailable
Statistical significance: Pairwise comparison realized on raw data (in grams) using Dunnett's test: * = p<0.05

[a]: 4 animals from the control group (males and females), 4 females and 3 males from the 10 mg/kg/adm group and 3 animals from the 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Mean values in grams for control animals, percent differences of control group means for treated animals

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Gross Pathology [b, c]:								
Week 13 (Terminal sacrifice)								
Number of animals examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Kyphosis	0	0	0	0	1	1	0	1
Pale bilateral kidneys	1	0	3	0	3	3	2	3
Week 27 (Recovery sacrifice)								
Number of animals examined	4	4 [d]	0	0	3	4 [d]	3	3
Kyphosis and/or scoliosis	0	0	-	-	2	2 [d]	0	1

Abbreviations: adm : administration, M: males, F: females, No.: animal number , - : data unavailable

[a]: 4 animals from the control group (males and females), 4 females and 3 males from the 10 mg/kg/adm group and 3 animals from the 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: One of which females (No.9) from control group and/or one of which females (No.47) from 10 mg/kg/adm group were sacrificed on Week 19

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Histopathology: (Moribund and unscheduled sacrificed, LM) [b, c]								
Number of animals examined	0	1	0	0	1	1	1	1
Kidneys:								
Focal/multifocal tubular nephropathy	0	0	0	0	0	1 (±)	1 (±)	0
Increased mesangial matrix of glomeruli, diffuse or multifocal	0	0	0	0	0	0	0	1 (±)
Adrenals: Decrease vacuolization with eosinophilia of cortex	0	0	0	0	1 (±)	0	1 (+)	1 (+)
Pancreas: Multifocal hemorrhage, inflammation and/or necrosis	0	0	0	0	0	0	0	1 (+ to 2+)
Gallbladder: Focal/multifocal chronic inflammation	0	0	0	0	1 (+)	0	0	1 (+)
Stomach: Mucosa chronic inflammation and/or hypertrophy	0	0	0	0	1 (+ to 2+)	0	0	1 (2+)
Femurs: Thickening of growth plate cartilage	0	0	0	0	0	0	1 (+)	0
Ovaries: Decreased maturing follicles	NA	1 (2+)	NA	0	NA	1 (±)	NA	1 (2+)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy, NA : not applicable
Grades of side effects: ±: minimal, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked

[a]: 4 animals from the control group (males and females), 4 females and 3 males from the 10 mg/kg/adm group and 3 animals from the 30 mg/kg/adm group (males and females were kept for a 13-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [[redacted]223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Histopathology: (Terminal sacrifice, LM) [b, c]								
Number of animals examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Kidneys:								
Increased mesangial matrix of glomeruli, diffuse or multifocal	0	0	1 (±)	4 (±)	4 (± to 2+)	3 (± to 2+)	3 (±)	3 (± to +)
Adrenals:								
Decreased vacuolation with eosinophilia of cortex	0	0	2 (+ to 2+)	2 (±)	2 (+)	1 (±)	4 (± to 3+)	3 (± to +)
Femurs:								
Decrease of metaphyseal capillary invasion	0	0	0	1 (2+)	0	0	0	1 (+)
Degeneration of cartilage matrix	0	0	1 (±)	1 (±)	0	0	1 (+)	0
Disorganization of chondrocyte columns	0	0	1 (+)	3 (+ to 2+)	1 (+)	2 (± to 2+)	1 (+)	3 (± to +)
Thickening of growth plate cartilage	1 (+)	0	0	0	1 (+)	0	3 (+ to 2+)	3 (± to 2+)
Thickening of transverse subchondral bony plate	0	0	0	1 (+)	0	0	0	1 (± to +)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy
Grades of side effects: ±: minimal, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked

[a]: 4 animals from control group (males and females), 4 females and 3 males from 10 mg/kg/adm group and 3 animals from 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Histopathology (Terminal sacrifice, LM) (continued)[b, c]								
Number of animals examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Ovaries:								
Decreased granulosa cells	NA	0	NA	0	NA	1 (±)	NA	4 (± to 3+)
Decreased maturing follicles	NA	1 (±)	NA	2 (+ to 2+)	NA	2 (± to +)	NA	4 (+ to 3+)
Decreased theca cells	NA	0	NA	0	NA	2 (± to 2+)	NA	4 (2+ to 3+)
Absence of corpora lutea	NA	0	NA	4	NA	2	NA	4
Another observations :	Focal vasculitis observed in submucosa of the intestines (1M dosed at 3mg/kg/adm, 2M and 1F dosed at 10 mg/kg/adm and 2M dosed at 30 mg/kg/adm), urinary bladder (1 male dosed at 30 mg/kg/adm) and heart (1 male dosed at 10 mg/kg/adm)							

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy, NA : not applicable,
Grades of side effects: ±: minimal, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked

[a]: 4 animals from control group (males and females), 4 females and 3 males from 10 mg/kg/adm group and 3 animals from 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [[redacted]223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Histopathology: (Recovery sacrifice, LM) [b, c]								
Number of animals examined	4	3 [d]	0	0	3	3 [d]	3	3
Kidneys:								
Increased mesangial matrix of glomeruli	0	0	-	-	1 (±)	0	0	0
Femurs:								
Degeneration of cartilage matrix	0	0	-	-	1 (+)	0	0	0
Disorganization of chondrocyte columns	0	1 (2+)	-	-	1 (±)	1 (+)	0	2 (+ to 2+)
Thickening of growth plate cartilage	0	0	-	-	1 (±)	0	0	0
Sternum:								
Thickening of transverse subchondral bony plate	4 (±)	3 (± to +)	-	-	3 (± to +)	3 (±)	3 (±)	3 (± to +)
Ovaries:								
Decreased maturing follicles	NA	1 (2+)	NA	-	NA	2 (±)	NA	2 (2+)
Absence of corpora lutea	NA	0	NA	-	NA	1	NA	1
Another observations :	Focal vasculitis was not observed in any tissues at the end of the reversibility period							

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy, NA : not applicable, No.: animal number, - : data unavailable
Grades of side effects: ±: minimal, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked

[a]: 4 animals/sex from the control group, 4 females and 3 males from the 10 mg/kg/adm group and 3 animals/sex from the 30 mg/kg/adm group were kept for a 13-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: 1/4 is sacrificed prior to the scheduled recovery necropsy (No.9 and 47)

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**	**M: 8 [a]**	**F: 8 [a]**
Histopathology: (Recovery sacrifice, LM) (continued)[b, c]								
Number of animals examined	4	3 [d]	0	0	3	3 [d]	3	3
Muscle, paravertebral (lumbar):								
Atrophy, muscle fiber(s)	0	0	-	-	1 (2+)	1 (+)	0	1 (±)
Muscle, paravertebral (thoracic):								
Atrophy, muscle fiber(s)	0	0	-	-	2 (± to 2+)	2 (± to +)	0	1 (+)
Degeneration/necrosis, muscle fibers, multifocal	0	0	-	-	1 (±)	2 (±)	0	0
Another observations :	Focal vasculitis was not observed in any tissues at the end of the reversibility period							

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy, No.: animal number, - : data unavailable
Grades of side effects: ±: minimal, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked

[a]: 4 animals/sex from the control group, 4 females and 3 males from the 10 mg/kg/adm group and 3 animals/sex from the 30 mg/kg/adm group were kept for a 13-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: 1/4 is sacrificed prior to the scheduled recovery necropsy (No.9 and 47)

表 2.6.7.7C- Repeat-Dose Toxicity - 13-week intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week repeat-dose intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys and a 13-week recovery period [223.18]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]	**M: 8** [a]	**F: 8** [a]
Immunohistochemical staining of glomeruli [b]**:**								
Week 13 (terminal sacrifice)								
Number of animals examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Anti-human IgG antibody	1	1	3	3	4	4	4	4
Anti-human IgM antibody	0	0	3	4	4	4	4	4
Anti-human C3 antibody	0	1	4	4	4	4	4	4
Week 27 (recovery sacrifice)	In the recovery animals, the incidence and staining intensity were comparable to that in the animals sacrificed at week 13. But the staining frequency within each glomerulus and the number of glomeruli affected were lowers.							
Transmission electron microscopy of glomeruli [c]**:**	Reduction or loss of filtration slit diaphragms between the terminal foot processes of podocytes (epithelial cells) and hypertrophy, swelling of endothelial cells with irregularity of their cytoplasmic fenestrations. The severity of alterations in podocytes was higher at the dose of 10 mg/kg/adm							
Conclusions: A NOAEL was not determined. The kyphosis was not reversible. The necrosis of paravertebral muscle fibers was probably secondary to kyphosis.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NOAEL: no observed adverse effect Level

[a]: 4 animals from control group (males and females), 4 females and 3 males from 10 mg/kg/adm group and 3 animals from 30 mg/kg/adm group (males and females) were kept for a 13-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D - Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys

Test Article: aflibercept

Report Title:	**A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period**		
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing:** 27 weeks	**Test Article:** aflibercept
Initial Age: 5-12 years for males, 3-5 years for females		**Duration of Post-Dose:** 21 weeks	**Study No.:** [670145]
Date of First Dose: [redacted]20[redacted]		**Method of Administration:** 30-minute intravenous infusion	**Location:** 4.2.3.2
Vehicle/Formulation: Saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted]			**GLP Compliance:** Yes
Special Features: Animals were dosed weekly for the initial 15 study weeks and then once every two weeks for the remaining 12 weeks			
No Observed Adverse Effect Level: < 3 mg/kg/adm			

Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study		**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Toxicokinetics:									
Free aflibercept at steady state [b]									
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg.day/mL)	Week 13 [c]	-	-	223	233	819	763	1139	2078
	Week 27 [d]	-	-	133	181	623	489	1339	1355
C_{max} (µg/mL)	Day 85, 5 min [e]	BLQ	BLQ	94.5	116	279	322	459	815
Trough (µg/mL)	Day 92, 168h [e]	BLQ	BLQ	13.4	11.3	43.4	47.5	101	77.8
Bound aflibercept at steady state:									
C (µg/mL)	Day 92, 168h [e]	BLQ	BLQ	4.18	3.44	3.91	6.72	4.09	5.42

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, $AUC_{0\text{-}t}$: area under the curve during the dosing interval, BLQ : Below limit of quantification, C : concentration, C_{max}: maximum plasma concentration observed , - : data unavailable

[a] : 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b] : Mean values

[c] : Weekly administration

[d] : Once every two week administration

[e] : Time post infusion

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Antibodies to aflibercept [b]								
Day 1 to Day 190	0	0	1 (D183-190) [c]	3 (D1-190) [c, e]	2 (D29-190) [d]	1 (D113-141) [c]	4 (D29-190) [d, e]	3 (D1-190) [d]
Recovery period (Week 37 and Week 48)	0	0	0	0	1 (W37)	0	0	0
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, D: study Day, No.: animal number , W : week

a: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

b: Number of animals with detectable levels

c: These animals were not designated as recovery animals

d: One animal was conserved for recovery period

e: One F (No.255) dosed at 3 mg/kg/adm and 1M (No.410) dosed at 30 mg/kg/adm had a decrease in free and bound aflibercept levels which correlated with the presence of anti-drug antibodies

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Noteworthy Findings:								
Died or Killed Moribund	1 (D330) [b]	0	1 (D182)	0	0	0	0	0
Group Mean Body Weight [c]								
Week 15	7.22	3.38	- 9.7	- 17.2	- 18.7	- 21.0*	- 10.7	- 21.0*
Week 27 (Final treatment)	7.43	3.68	- 15.2	- 23.4	- 21.7	- 29.3¤	- 14.3	- 34.8¤¤
Week 48 (Final recovery)	6.9	4.2	- 4.3	- 19.0	0.0	- 31.0	+ 2.9	- 14.3
Group Mean Body Weight Gain (%) [d]								
From Week –1 to Week 27	14.77	22.77	-7.65	-0.40**	-15.13*	-7.83***	-8.38	-20.42***
Average Daily Food Consumption	Only qualitative evaluation (see the item: reduced appetite in clinical observations)							
Additional Information: None.								

Abbreviations: adm : administration, M: males, F: females, D: study Day
Statistical significance: Pairwise comparison with control group using Dunnett's test: *= p≤0.05, **= p≤0.01, ***= p≤0.001, Pairwise comparison with control group using Dunn's test: ¤ = p≤0.05, ¤¤ = p≤0.01

[a] : 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b] : This control male died from an aspiration pneumonia, a rare complication of general anesthesia

[c] : Mean values in kg for control; percentage of difference with controls for treated group. Statistical significance is based on actual data (not on the percent difference)

[d] : Mean values

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Clinical Observations (Died or Killed Moribund) [b, c]								
Number of animals	1	0	*1*	0	0	0	0	0
Nasal bleeding	0	0	1 (D90, 177,181, 182)	0	0	0	0	0
Reduced apppetite	1 (D169-322)	0	1 (D89-181)	0	0	0	0	0
Pallor and signs of bleeding	0	0	1 (D181,182)	0	0	0	0	0
Breathing labored	0	0	1 (D181,182)	0	0	0	0	0
Hunched or abnormal posture	0	0	1 (D94-182)	0	0	0	0	0
Suppurative bronchoalveolar inflammation	1	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations (Dosing period) [b, c]								
Number of animals	5	6	5	6	6	6	6	6
Sneezing with or without discharge	1 (D155)	0	3 (D102-178)	1 (D109)	3 (D99-178)	0	2 (D70-140)	0
Red fur staining, scabbing and/or dry skin	5 (D5-187)	3 (D13-190)	5 (D26-190)	4 (D4-172)	6 (D35-190)	5 (D32-190)	6 (D7-190)	5 (D32-190)
Muzzle discharge, swelling and/or redness of the muzzle	1 (D155)	0	2 (D7-190)	4 (D83-190)	4 (D38-190)	2 (D97-181)	3 (D34-190)	4 (D76-190)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, D: study Day

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Clinical Observations (Dosing period) (continued) [b, c]								
Number of animals	5	6	5	6	6	6	6	6
Hunched or abnormal posture	0	0	2 (D92-187)	1 (D104-190)	4 (D91-190)	5 (D95-190)	3 (D65-190)	5 (D90-190)
Thin	0	0	2 (D103-190)	2 (D90-190)	1 (D92-187)	4 (D88-190)	2 (D68-190)	5 (D111-190)
Reduced appetite	5 (D135-190)	3 (D4-174)	5 (D24-189)	4 (D68-187)	6 (D51-190)	6 (D11-188)	6 (D24-190)	6 (D54-189)
Decrease activity	0	0	1 (D88-133)	0	1 (D91-119)	0	0	1 (D125)
Prominent backbone	0	0	1 (D89)	0	0	0	1 (D190)	0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, D: study Day

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Clinical Observations (Recovery period) [b, c]								
Number of animals	2	2	2	2	2	2	2	2
Muzzle discharge, swelling and/or redness of the muzzle	0	0	0	0	0	0	1 (D192-194)	0
Red fur staining, scrabing and/or dry skin	1 (D194-337)	0	2 (D194-337)	2 (D249-319)	2 (D194-337)	0	2 (D194-337)	1 (D263-319)
Hunched or abnormal posture	0	0	1 (D194-337)	0	2 (D194-337)	1 (D193-337)	2 (D194-337)	2 (D193-337)
Thin	0	0	1 (D194-337)	1 (D193-221)	1 (D194-337)	1 (D193-337)	1 (D194-337)	1 (D193-337)
Prominent backbone	0	0	0	0	0	0	1 (D229-337)	0
Reduced appetite	2 (D192-322)	2 (D192-321)	2 (D191-202)	2 (D191-225)	2 (D191-320)	2 (D191-323)	2 (D191-242)	2 (D192-196)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, D: study Day

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Ophthalmology [b]								
Week 13	Focal areas of retinal edema and sub-retinal depigmentation in the peripapillary and macular regions in 1M (No.210) treated at 3 mg/kg/adm							
Week 26 (Final treatment)	Focal areas of retinal edema and sub-retinal depigmentation in the peripapillary and macular regions in 1M (No.210) treated at 3 mg/kg/adm. Fine granular opacity scattered in the macular area in 1M (No.408) treated at 30 mg/kg/adm							
Recovery period	Multifocal retinal degeneration/choroid pigment changes in 1M (No.210) at 3 mg/kg/adm. Appeared functionally blind with moderately dilated pupils (before mydriatic), presence of a vertical nystagmus in 1M (No.308) at 10 mg/kg/adm							
Electrocardiography and blood pressure	There were no treatment-related changes in electrocardiography and blood pressure during the treatment and recovery periods							

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, No.: animal number

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: The ophthalmological observations were not definitively attributed to compound administration

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Hematology [b, c]								
Week 4 – Dosing period								
Platelets (10^3/µL)	433.2	483.3	466.5	NAD	546.2	NAD	545.8 [d]	NAD
White blood cells (10^3/µL)	9.382	12.562	13.063	9.103*	14.648	8.830*	14.783	7.985**
Red blood cells (10^6/µL)	5.558	4.705	5.597	5.243	5.828	5.303	6.067*	5.272
Hemoglobin concentration (g/dL)	13.17	11.33	13.85	12.83*	14.52**	12.80*	14.67**	12.77*
Hematocrit (%)	42.57	35.98	44.17	40.97*	45.92	40.50*	46.42	40.48*
Week 12 – Dosing period								
Platelets (10^3/µL)	409.3	492.5	499.5	NAD	564.0 [e]	NAD	451.8	NAD
Reticulocyte count (10^9/L)	92.73	83.52	92.32 [f]	NAD	73.57	NAD	107.05 [f]	NAD
Red blood cells (10^6/µL)	5.487	5.065	5.633	5.445	5.930	5.697	5.975	5.657
Hemoglobin concentration (g/dL)	12.92	12.20	13.87	13.23	14.62	13.32	13.98	13.75
Hematocrit (%)	42.00	38.88	43.85	42.57*	46.10	42.73*	45.07	42.78*
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected, No.: animal number
Statistical significance: Pairwise comparison with control group using Dunnett's test: *= p≤0.05, **= p≤0.01

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: Increase in platelet count in 1M (No.410) at 30 mg/kg/adm

[e]: Increase in platelet count in 1M (No.306) at 10 mg/kg/adm

[f]: Increase in reticulocyte count in 1M (No.202) at 3 mg/kg/adm and 1M (No.408) at 30 mg/kg/adm

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Hematology (Week 25 - Final treatment) [b, c] **:**								
Red cell distribution width (%)	13.60	13.90	14.67	NAD	13.88	NAD	16.22	NAD
Mean platelet volume (fL)	9.73	9.18	9.13	NAD	8.58	NAD	12.03	NAD
Platelets (10^3/µL)	415.0	431.7	484.8	NAD	499.8	NAD	561.3 [d]	NAD
Reticulocyte count (10^9/L)	80.98	74.17	148.57 [e]	84.78	104.13	96.32	172.32 [d]	126.35 [f]
Red blood cells (10^6/µL)	5.702	6.108	5.960	5.748	6.162	6.317	6.015	6.897
Hemoglobin concentration (g/dL)	13.53	14.73	14.43	13.93	15.07	14.85	13.78	16.70
Hematocrit (%)	44.25	46.30	47.70	45.10	48.00	46.67	45.83	52.35
Additional Information: None.								

Abbreviations: adm : administration, M: males, F: females, NAD : no abnormality detected, No.: animal number

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: Increase in platelet and/or reticulocyte count in 2 males (No.406 and 408) at 30 mg/kg/adm

[e]: Increase in reticulocyte count in 2M (No.201 and 202) at 3 mg/kg/adm

[f]: Increase in reticulocyte count in 1F (No.454) at 30 mg/kg/adm

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Hematology (Week 37 - Recovery period) [b, c] **:**								
Red cell distribution width (%)	13.4	13.8	13.9	NAD	14.0	NAD	15.0 [d]	NAD
Mean platelet volume (fL)	9.3	9.2	8.1	NAD	8.1	NAD	16.1 [e]	NAD
Platelets (10^3/µL)	453.5	438	474.0	NAD	529.5	NAD	387.5	NAD
Reticulocyte count (10^9/L)	61.9	50.1	49.8	66.0	38.9	48.1	54.9	65.2
Red blood cells (10^6/µL)	5.8	4.9	5.6	5.3	5.7	4.7	6.2	5.1
Hemoglobin concentration (g/dL)	13.1	12.0	13.9	12.6	14.2	11.3	13.8	12.1
Hematocrit (%)	42.6	37.1	44.9	41.1	45.4	36.1	45.9	37.9
Hematology (Week 48 – Final recovery) [b, c] **:**								
Red cell distribution width (%)	13.2	13.9	13.5	NAD	13.7	NAD	13.3	NAD
Mean platelet volume (fL)	8.6	9.1	8.7	NAD	8.5	NAD	10.4	NAD
Platelets (10^3/µL)	472	375	367.0	NAD	466.5	NAD	326.0	NAD
Reticulocyte count (10^9/L)	107.3	64.9	77.0	101.9	71.4	62.5	80.9	78.9
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected, No.: animal number

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: Increase in red cell distribution width was still evident for 1M (No.406) treated at 30 mg/kg/adm

[e]: Increase in mean platelet volume was still evident for 2M (No.405 and No.406) treated at 30 mg/kg/adm

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Coagulations [b, c]								
Fibrinogen (mg/dL)								
Week 4 – Dosing period	288.67	245.68	352.20	NAD	327.58	NAD	347.13	NAD
Week 12	231.48	217.87	397.25**	235.10	391.58**	286.13	310.02	261.27
Week 25 - Final treatment	259.60	177.37	360.13	252.78	327.63	193.60	306.07	275.98
Week 37 - Recovery period	247.3	210.4	282.0	180.2	268.8	216.1	212.3	212.4
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected
Statistical significance: Pairwise comparison with control group using Dunnett's test: **= p≤0.01

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Clinical Chemistry (Week 4 – Dosing period) [b, c] **:**								
Cholesterol (mg/dL)	114.3	138.2	132.2	175.0	154.2	174.8	161.7	161.5
Alanine aminotransferase (U/L)	26.5	57.8	35.8 [d]	65.0 [d]	37.8 [d]	55.2	39.0 [d]	39.7
Clinical Chemistry (Week 12 – Dosing period) [b, c] **:**								
Cholesterol (mg/dL)	104.8	132.0	130.2	147.3	145.8	151.2	125.8	134.0
Gamma-glutamyl transferase (U/L)	74.8	NAD	62.0 [e]	NAD	60.7	NAD	72.0 [e]	NAD
Alanine aminotransferase (U/L)	38.3	68.3	44.2 [d]	73.5 [d]	53.7 [d]	59.5	53.3 [d]	52.3
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected, No.: animal number

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: Slight increase in alanine aminotransferase levels in 1M (No.207) and 2F(No.253 and 254) treated at 3 mg/kg/adm, 1M (No.310) treated at 10 mg/kg/adm and/or 1M (No.407) treated at 30 mg/kg/adm relative to acclimation period

[e]: Marked increase in gamma-glutamyl transferase levels in 1M (No.207) treated at 3 mg/kg/adm, 1M (No.307) treated at 10 mg/kg/adm and 1M (No.405) treated at 30 mg/kg/adm relative to acclimation period

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Clinical Chemistry (Week 25 – Final treatment) [b, c] **:**								
Cholesterol (mg/dL)	113.7	142.2	120.2	151.3	133.3	153.0	118.5	138.5
Gamma-glutamyl transferase (U/L)	70.3	49.5	54.8	50.7	83.3 [d]	105.7 [d]	84.7 [d]	160.8 [d]
Aspartate aminotransferase (U/L)	47.5	42.0	NAD	43.0	NAD	76.0 [e]	NAD	101.3 [e]
Alanine aminotransferase (U/L)	25.5	63.7	26.7 [h]	66.5 [h]	36.8 [h]	91.3 [e]	42.3 [h]	143.5 [e]
Alkaline phosphatase (U/L)	203.7	356.8	468.5 [g]	369.2	351.7	647.3 [f]	374.2	895.3 [f]
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, No.: animal number

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: Marked increase in gamma-glutamyl transferase levels in 1M (No.307) and 2F (No.355 and 357) at 10 mg/kg/adm and 1M (No.405) and 2F (No.454 and 455) at 30 mg/kg/adm relative to acclimation

[e]: Marked increase in aspartate aminotransferase and in alanine aminotransferase levels in 2F (No.355 and 357) at 10 mg/kg/adm and 2F (No.454 and 455) at 30 mg/kg/adm relative to acclimation

[f]: Marked increase in alkaline phosphatase levels in 3F (No.355, 357 and 361) at 10 mg/kg/adm and 2F (No.454 and 455) at 30 mg/kg/adm

[g]: Slight increase in alkaline phosphatase levels in 1M (No.202) at 3 mg/kg/adm relative to acclimation

[h]: Slight increase in alanine aminotransferase levels in 1M (No.207) and 2F (No.253 and 254) at 3 mg/kg/adm, 1M (No.310) at 10 mg/kg/adm and/or 1M (No.407) at 30 mg/kg/adm relative to acclimation

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Clinical Chemistry (Week 37 – Recovery period) [b, c] **:**								
Cholesterol (mg/dL)	85.5	144.0	96.5	132.0	98.5	106.5	105.5	123.5
Aspartate aminotransferase (U/L)	45.0	39.0	NAD	39.5	NAD	49.5	NAD	40.5
Gamma-glutamyl transferase (U/L)	64.0	51.5	65.5	51.0	72.5 [d]	67.5 [e]	50.0	170.5
Alanine aminotransferase (U/L)	40.5	86.5	70.5	135.5	59.0	59.5 [f]	34.5	74.5 [f]
Clinical Chemistry (Week 48 – Final recovery) [b, c] **:**								
Cholesterol (mg/dL)	95 [g]	151.0	107.0	138.0	115.5	124.5	113.0	154.0
Aspartate aminotransferase (U/L)	NAD	52.5	NAD	50.0	NAD	68.5	NAD	28.0
Gamma-glutamyl transferase (U/L)	NAD	43.5	NAD	43.0	NAD	80.5 [e]	NAD	62.5
Alanine aminotransferase (U/L)	40.0 [g]	100.5	36.0	153.5 [f]	59.0	129.0 [f]	40.0	63.0 [f]
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected, No.: animal number

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: Increase in aspartate aminotransferase levels in 1F (No.357) at 10 mg/kg/adm and 1F (No.455) at 30 mg/kg/adm

[e]: Increase in gamma-glutamyl transferase levels in 1F (No.355) at 10 mg/kg/adm

[f]: Increase in alanine aminotransferase levels in 2F (No.253 and 254) at 3 mg/kg/adm and 1F (No.355) at 10 mg/kg/adm

[g]: Only one surviving animal

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]

Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
C-reactive protein (Dosing period) [b]								
Week 4	3.40	4.08	21.43 [c]	4.38	4.00	4.65	36.52 [c]	5.70
Week 13	3.83	2.68	7.58	3.30	6.17	13.15¤ [d]	7.20 [c]	15.35 [d]
Week 26 (final treatment)	5.90	6.07	38.27 [c]	12.33 [d]	17.17 [c]	31.17 [d]	20.58 [c]	26.18 [d]
C-reactive protein (Recovery period) [b]								
Week 37	2.30	2.30	5.40	5.85	4.25	3.15	6.25	5.30
Week 48	1.90 [e]	2.85	3.85	1.35	3.30	3.15	5.90	3.60

Additional Information: None.

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, No.: animal number
Statistical significance: Pairwise comparison with control group using Dunn's test: ¤ = $p<0.05$

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values in mg/L

[c]: Significantly elevated C-reactive protein levels were noted in 1M (No.202) treated at 3 mg/kg/adm, 1M (No.308) treated at 10 mg/kg/adm and/or 3M (No.405, 406 and 410) treated at 30 mg/kg/adm

[d]: Significantly elevated C-reactive protein levels were noted in 1F (No.254) treated at 3 mg/kg/adm, 1F (No.359) treated at 10 mg/kg/adm and/or 3F (No.452, 453 and 455) treated at 30 mg/kg/adm

[e]: Only one surviving animal

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Urinalysis [b]								
Week 4 (Dosing period)								
Total protein (g/L)	0.138	0.112	0.170 [c]	NAD	0.245 [c]	NAD	0.287* [c]	NAD
Microalbumin (mg/L)	5.60	4.83	39.47 [c]	NAD	49.92 [c]	NAD	35.48 [c]	NAD
Week 12 (Dosing period)								
Total protein (g/L)	0.125	0.132	0.202 [c]	NAD	0.875 [c]	NAD	0.303 [c]	NAD
Microalbumin (mg/L)	Lm	6.47	40.25 [c]	NAD	509.55 [c]	NAD	90.77 [c]	NAD
Week 25 (Final treatment)								
Total protein (g/L)	0.103	0.187	0.355 [c]	0.197	0.860 [c]	0.102	0.415 [c]	0.280
Microalbumin (mg/L)	3.30	16.44	160.23 [c]	5.00	345.04 [c]	5.05	112.93 [c]	14.38 [d]
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected, No.: animal number , Lm : lower than measurement range
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p<0.05

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Slight to mild increases in protein and microalbumin levels were noted in 3M (No.201, 208 and/or 210) treated at 3 mg/kg/adm, 4M (No.306, 307, 309 and/or 310) treated at 10 mg/kg/adm and 4M (No.406, 407, 409 and/or 410) treated at 30 mg/kg/adm

[d]: Increases in microalbumin levels were noted in 2F (No.453 and 455) treated at 30 mg/kg/adm

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Urinalysis (continued) [b]								
Week 37 (Recovery period)								
Total protein (g/L)	0.075	0.140	0.130	0.120	0.110	0.095	0.215	0.110
Microalbumin (mg/L)	Lm	5.35	4.05 [c]	Lm	Lm	Lm	Lm	Lm
Week 48 (Final recovery)								
Total protein (g/L)	0.05	0.145	0.075	0.120	0.110	0.110	0.065	0.155
Microalbumin (mg/L)	Lm	5.9	16.4 [c] or Lm	3.8 or Lm	3.75	5.95	Lm	5.50
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected, No.: animal number , Lm : lower than measurement range

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Slight increase in microalbumin level in 1M (No.210) treated at 3 mg/kg/adm

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Hormone analysis:								
Number of progesterone peaks / month [b, c]								
Acclimation period (Weeks –19 to –1)	NA	0.84	NA	0.67	NA	0.70	NA	0.81
Dosing period (Weeks 1 to 27)	NA	0.69	NA	0.05	NA	0.05	NA	0.02
Recovery period (Weeks 28 to 49)	NA	0.91	NA	0.45	NA	0.64	NA	0.36
Estradiol (pg/mL) [b]								
Week –1 (Acclimation period)	NA	55.95	NA	94.78	NA	89.08	NA	65.48
Week 27 (Final treatment)	NA	80.63	NA	78.07	NA	69.10	NA	48.08
Week 49 (Final recovery)	NA	71.55	NA	54.80	NA	89.00	NA	113.55
Inhibin B (pg/mL) [b]								
Week –1/1 (Acclimation period)	NA	247.505	NA	223.257	NA	224.665	NA	200.038
Week 27 (Final treatment)	NA	165.548	NA	43.595¤	NA	44.415¤	NA	31.547¤¤
Week 49 (Final recovery)	NA	176.58	NA	123.32	NA	79.36	NA	175.64
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NA : not applicable
Statistical significance: Pairwise comparison with control group using Dunn's test: ¤ = p≤0.05, ¤¤=p≤0.01

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Progesterone peak corresponding to progesterone level in the serum ≥ 5 ng/mL

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Hormone analysis (continued):								
Follicle stimulating hormone (ng/mL) [b]								
Week -9/-1 (Acclimation period)	0.636	1.548	NAD	1.632	NAD	1.365	NAD	1.282
Week 1 (Dosing period)	0.585	1.733	NAD	6.062*	NAD	6.528**	NAD	6.883**
Week 27 (Final treatment)	0.623	1.487	NAD	7.930**	NAD	8.205**	NAD	6.625*
Week 48/49 (Final recovery)	<0.5	<0.5 or 0.61	NAD	0.955	NAD	<0.5 or 0.70	NAD	<0.5 or 0.67
Vaginal bleeding								
Arrest of regular menstrual bleeding [c]								
Dosing period	NA	1	NA	4	NA	5 [d]	NA	5 [d]
Recovery period	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0
Protracted or frequent bleeding[c]								
Dosing period	NA	0	NA	3	NA	0	NA	1
Recovery period	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NA : not applicable, NAD : no abnormality detected, No.: animal number
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p≤0.05, ** = p≤0.01

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Number of animals with observation

[d]: Absence of menses from Weeks 1 to 3 of dosing onwards for 1F (No.357) treated at 10 mg/kg/adm and 1F (No.451) treated at 30 mg/kg/adm

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Sperm assessment [b]								
Week 5 (Dosing period)								
Sperm mobility (% of motile cells)	60.3	NA	29.6	NA	10.6**	NA	32.4	NA
Sperm morphology (% of abnormal cells)	11.13	NA	62.03	NA	69.55	NA	40.96	NA
Week 12 (Dosing period)								
Sperm mobility (% of motile cells)	66.1	NA	41.3	NA	10.7**	NA	40.0	NA
Sperm morphology (% of abnormal cells)	27.79	NA	53.24	NA	81.06*	NA	63.03	NA
Week 25 (Final treatment)								
Sperm mobility (% of motile cells)	77.8	NA	53.9	NA	28.8**	NA	34.3*	NA
Sperm morphology (% of abnormal cells)	13.00	NA	38.58	NA	63.57**	NA	76.50***	NA
Recovery period	Following ≥ 13 weeks of recovery, the sperm mobility and the spermatozoal morphology were similar between control and aflibercept-treated groups							
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NA : not applicable
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p≤0.05, ** = p≤0.01, *** = p≤0.001

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Bone resorption markers [b]**:**								
Week 4 (Dosing period)								
C-telopeptide (CTx) (µg/mmol Creatinine)	509.87	909.27	256.47	553.74	272.44	549.49	349.72	504.07*
N-telopeptide (NTx) (nM BCE/mM Creatinine)	313.19	369.91	172.16	216.07	198.44	269.38	289.74	234.76
Week 12 (Dosing period)								
C-telopeptide (CTx) (µg/mmol Creatinine)	334.63	671.80	416.60	382.97***	236.42	484.53*	322.56	366.45***
N-telopeptide (NTx) (nM BCE/mM Creatinine)	319.60	405.09	244.34	315.41	175.31	247.87	205.36	277.97
Week 25 (Final treatment)								
C-telopeptide (CTx) (µg/mmol Creatinine)	392.11	691.94	458.90	468.45	373.24	621.99	377.84	512.99
N-telopeptide (NTx) (nM BCE/mM Creatinine)	180.39	346.87	182.31	177.77	132.85	239.72	217.99	217.95
Week 37 (Recovery period) [d]								
C-telopeptide (CTx) (µg/mmol Creatinine)	255.10	417.85	736.80	1073.50	734.15	1292.70	737.35	1245.00
N-telopeptide (NTx) (nM BCE/mM Creatinine)	65.10	213.25	400.20	378.45	172.10	387.75	302.9	503.85
Week 48 (Final recovery) [d]								
C-telopeptide (CTx) (µg/mmol Creatinine)	64.8 [c]	296.80	408.20	647.00	414.90	554.70	212.75	920.20
N-telopeptide (NTx) (nM BCE/mM Creatinine)	20.5 [c]	316.30	283.35	744.55	307.30	772.00	115.80	482.20

Abbreviations: M: male, F: female, adm : administration
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p≤0.05, *** = p≤0.001
[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period
[b]: Mean values
[c]: Only one surviving animal
[d]: Calculated mean of 2 animals, no statistical analysis performed

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]									
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study		**M: 6** *a*	**F: 6** *a*	**M: 6** *a*	**F: 6** *a*	**M: 6** *a*	**F: 6** *a*	**M: 6** *a*	**F: 6** *a*
Bone Mineral Content (BMC) (% change from acclimation period- first scan) *b*									
Week 13 (Dosing period)									
Whole body		10.787	8.781	8.121	6.545	7.662	6.604	11.208	5.222
Lumbar spine		8.307	4.365	10.818	5.092	11.278	12.831	16.169	10.911
Right proximal femur :	Global	7.658	11.694	4.312	2.197	2.643	4.509	9.653	-0.843
	Neck	11.837	4.990	9.452	6.155	14.647	1.955	12.060	2.350
	Trochanter	6.130	6.075	1.320	2.241	1.263	0.570	4.947	0.611
Week 26 (Final treatment)									
Whole body		15.615	18.171	8.075	10.520	8.854	7.647*	9.115	3.297***
Lumbar spine		9.999	7.190	24.275	17.274	19.836	20.763	22.433	15.222
Right proximal femur :	Global	11.848	19.934	-2.775	8.144	6.595	-0.085*	12.081	0.670*
	Neck	17.288	7.631	14.676	14.159	14.199	-0.079	12.081	0.693
	Trochanter	8.452	5.085	2.637	-4.983	4.157	-7.490¤	7.713	7.121
Additional Information: None.									

Abbreviations: M: male, F: female, adm : administration
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p≤0.05, ** = p≤0.01, *** = p≤0.001,
Pairwise comparison with control group using Dunn's test: ¤ = p≤0.05

a: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

b: Mean values

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]									
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study		**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Bone Mineral Content (BMC) (% change from acclimation period) [b]									
Week 37 (Recovery period) [c]									
Whole body		10.513	24.836	20.995	12.755	2.669	4.014	1.705	5.221
Lumbar spine		8.275	12.336	37.323	10.557	31.601	10.619	18.173	24.406
Right proximal femur :	Global	8.794	24.331	16.417	20.565	-3.435	-8.213	13.112	-2.984
	Neck	15.700	5.535	16.804	-42.498	-2.335	-13.392	6.343	4.733
	Trochanter	7.449	18.190	24.090	5.717	-5.656	-7.205	55.898	6.852
Week 48 (Final recovery) [c]									
Whole body		13.084	32.806	27.721	17.245	9.875	9.280	10.820	18.107
Lumbar spine		No compound-related effects							
Right proximal femur		Femur BMC increased similarly in control and treated animals							
Additional Information: None.									

Abbreviations: M: male, F: female, adm : administration

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Mean values

[c]: Calculated mean of 2 animals, no statistical analysis performed

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Individual Radiographic Evaluation (Dosing period) [b]								
Kyphosis	0	0	5	1	4	5	5	4
Degenerative joint disease of articular facets (thoracic and lumbar spine)	0	0	6	1	4	5	5	4
Periosteal reaction : Ilium	0	0	0	0	2	0	1	0
Femur	0	0	3	0	2	1	1	2
Individual Radiographic Evaluation (Recovery period)	No reversibility of the incidences of kyphosis, degenerative joint disease of articular facets and periosteal reaction of the femur after withdrawal of aflibercept							
Organ Weights [c, d]								
Week 26 (Final treatment)								
Ovaries	NA	0.80883	NA	-78	NA	-83	NA	-83
Uterus	NA	6.8153	NA	-26	NA	-37*	NA	-42*
Week 48 (Final recovery)								
Ovaries	NA	0.33550	NA	+8	NA	-2	NA	-23
Uterus	NA	5.1180	NA	+62	NA	+26	NA	+61

Abbreviations: M: male, F: female, adm : administration, NA: not applicable
Statistical significance: Pairwise comparison realized on raw data (in grams) using Dunnett's test: * = p≤0.05

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Mean values in grams for control animals, percent differences of control group means for treated animals

[d]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Gross Pathology (Died or Killed Moribund) [b, c]								
Number of animals examined	1[d]	0	1[e]	0	0	0	0	0
Nasal cavities / Sinuses:								
Bent nasal septum, absence of right middle concha	0	0	1	0	0	0	0	0
Frank hemorrhage	0	0	1(2+)	0	0	0	0	0
Lung: Bronchoalveolar inflammation	1 (3+)	0	0	0	0	0	0	0
Trachea: clear dark fluid**,** frothy lumen	1	0	0	0	0	0	0	0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, No.: animal number
Grades of side effects: ±: minimal, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked, 4+: severe

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: Animal No.102

[e]: Animal No.202

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Gross Pathology (Terminal sacrifice) [b, c]								
Number of animals examined	4	4	3	4	4	4	4	4
Nasal cavities / Sinuses:								
Nasal septum: missing, perforated, displaced and/or thickened	0	0	2	0	3	0	1	2
Turbinate/Concha: absence and/or reduction in size	0	0	0	0	0	0	0	2
Dark area and/or discoloration, pale material and/or raised area	0	0	2	0	2	0	1	0
Bone Vertebra: Vertebral fusion and/or Thickening	0	0	1	0	1	1	1	1
Bone: Femur, ilium, radius and/or sternum mass	0	0	1	1	0	1	1	1
Gallbladder: thickening	0	0	0	0	0	0	0	2
Adrenal: dark discoloration	0	0	2	0	0	1	1	2
Duodenum: dark area	0	0	0	0	1	0	1	2

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** *a*	**F: 6** *a*	**M: 6** *a*	**F: 6** *a*	**M: 6** *a*	**F: 6** *a*	**M: 6** *a*	**F: 6** *a*
Gross Pathology (Recovery sacrifice) *b, c*								
Number of animals examined	1	2	2	2	2	2	2	2
Nasal cavities /Sinuses:								
Nasal septum: missing, perforated, displaced and/or thickened	0	0	1	0	1	0	1	0
Turbinate/Concha: absence and/or reduction in size	0	0	1	0	1	0	1	0
Dark area and/or discoloration, pale material and/or raised area	0	0	1	0	1	0	0	0
Kyphosis	0	0	1	0	2	1	2	1
Bone Vertebra: Vertebral fusion and/or Thickening	0	0	1	0	2	2	2	1
Gallbladder: Thickening	0	0	0	0	1	0	0	1
Stomach: dark depressed area on stomach mucosa	0	0	0	0	0	1	0	0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration

a: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

b: Number of animals with observation

c: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145] **(continued)**								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Histopathology (Died or Killed Moribund, LM) [b, c]								
Number of animals examined	1	0	1	0	0	0	0	0
Nasal cavities /Sinuses:								
Atrophy/loss of nasal septum and/or turbinates	0	0	1 (+)	0	0	0	0	0
Necrotizing inflammation	0	0	1 (3+)	0	0	0	0	0
Degeneration/regeneration of the respiratory and/or olfactory epithelium	0	0	1 (±)	0	0	0	0	0
Hemorrhage	0	0	1 (2+)	0	0	0	0	0
Exudate (suppurative)	0	0	1 (2+)	0	0	0	0	0
Vascular proliferation/regeneration and/or thrombosis	0	0	1 (+)	0	0	0	0	0
Cervical, thoracic and lumbar vertebrae:				0	0	0	0	0
Osteocartilaginous exostosis	0	0	1 (3+)	0	0	0	0	0
Cartilaginous metaplasia	0	0	1 (±)	0	0	0	0	0
Myofiber atrophy of axial musculature	0	0	1 (+)	0	0	0	0	0
Long bones (femur and tibia): Physeal closure	1 (4+)	0	1 (4+)	0	0	0	0	0
Kidneys: Increased matrix in glomerular tuft	0	0	1 (±)	0	0	0	0	0
Adrenals: Decrease vacuolation with eosinophilia of cortex	0	0	1 (+)	0	0	0	0	0
Lung: Acute suppurative bronchoalveolar inflammation	1 (3+)	0	0	0	0	0	0	0
Tracheal epithelium atrophy	1 (2+)	0	0	0	0	0	0	0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy
Grades of side effects: ± : minimal, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked, 4+: severe

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145] **(continued)**								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Histopathology (Terminal sacrifice, LM) [b, c]								
Number of animals examined	3	4	3	4	4	4	4	4
Nasal cavities /Sinuses:								
Atrophy/loss of nasal septum and/or turbinates	0	0	1 (2+)	3 (± to+)	3 (+ to3+)	1 (± to +)	1 (3+)	4 (± to 2+)
Necrotizing inflammation	0	0	1 (2+)	1 (+)	3 (2+)	1 (+)	1 (3+)	1 (2+)
Eosinophilic cartilage/activated chondrocytes	0	0	3 (± to 2+)	4 (± to 2+)	4 (± to +)	3 (± to 2+)	3 (± to 3+)	4 (± to 2+)
Degeneration/regeneration of the respiratory and/or olfactory epithelium	0	0	3 (± to2+)	4 (± to 2+)	4 (+ to3+)	4 (± to 2+)	3 (2+ to 3+)	4 (+ to 2+)
Hemorrhage	0	0	3 (± to 2+)	1 (±)	4 (± to +)	3 (±)	3 (± to 2+)	2 (±)
Exudate (suppurative)	1 (±)	2 (±)	3 (± to 2+)	3 (± to +)	4 (+ to 2+)	3 (± to +)	3 (+ to 3+)	4 (± to 2+)
Vascular proliferation/regeneration and/or thrombosis	0	0	1 (+)	1 (±)	3 (±)	2 (±)	3 (± to +)	3 (± to +)
Cervical, thoracic and lumbar vertebrae:								
Osteocartilaginous exostosis	0	0	3 (± to 3+)	1(+)	4 (± to 3+)	4 (+ to 3+)	4 (+ to 3+)	3 (± to 3+)
Myofiber atrophy of axial musculature	0	0	3 (+ to 2+)	1 (+)	2 (+)	3 (+ to 2+)	3 (± to2+)	3 (+ to 2+)
Cartilaginous metaplasia	0	0	0	3 (±)	1 (± to +)	1 (±)	1 (±)	1 (±)
Proliferation/degeneration of vasculature	0	0	1 (± to +)	0	2 (± to +)	1 (±)	1 (± to +)	1 (±)
Thickened hypertrophic chondrocyte layer (physis)	0	0	1 (±)	2 (±)	3 (±)	2 (±)	3 (± to +)	3 (±)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy
Grades of side effects: ± : minimal, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked, 4+: severe

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145] **(continued)**

Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Histopathology (Terminal sacrifice, LM) (continued) [b, c]								
Number of animals examined	4	4	3	4	4	4	4	4
Long bones (femur and tibia):								
Osteocartilaginous exostosis	0	0	1 (3+)	0	0	0	1 (4+)	1 (±)
Physeal closure	3 (± to 4+)	3 (± to 2+)	2 (4+)	1 (3+ to 4+)	3 (2+ to 4+)	1 (3+ to 4+)	2 (4+)	3 (+ to 4+)
Thickened hypertrophic chondrocyte layer (physis)	0	0	1 (±)	2 (±)	2 (± to +)	3 (± to +)	2 (± to +)	2 (± to +)
Proliferation/degeneration of vasculature	0	0	1 (±)	0	0	0	1 (2+)	1 (2+)
Kidneys:								
Tubular cast	0	0	1 (+)	1 (±)	3 (± to 2+)	0	3 (±)	1 (±)
Increased matrix in glomerular tuft	0	0	2 (± to +)	1 (±)	4 (± to +)	2 (±)	3 (± to 2+)	2 (± to +)
Glomerulopathy	0	0	2 (± to +)	0	3 (± to +)	0	2 (± to +)	1 (±)
Increased PAS+ deposits	0	0	3 (± to 2+)	1 (+)	4 (± to 2+)	4 (±)	3 (+ to 2+)	3 (± to +)
Ovaries:								
Decreased maturing follicles and/or granulosa and/or theca cells	NA	1 (+)	NA	2 (+)	NA	1 (±)	NA	3 (± to 3+)
Presence of corpus luteum	NA	4 (L to ES)	NA	3 (VS to L)	NA	2 (VS to L)	NA	3 (VS to S)
Uterus: Endometrial and myometrial atrophy	NA	0	NA	3 (± to +)	NA	3 (± to +)	NA	4 (+ to 2+)
Vagina: Epithelium atrophy	NA	0	NA	0	NA	1 (+)	NA	2 (± to 2+)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy, NA : not applicable
Grades of side effects: ±: minimal, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked, 4+: severe, PAS: periodic acid schiff, Grades of corpus luteum: ES: extensive size, L: large, S: small, VS: very small

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145] **(continued)**								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Histopathology (Terminal sacrifice, LM) (continued) [b, c]								
Number of animals examined	4	4	3	4	4	4	4	4
Digestive system:								
Vascular proliferation/degeneration (duodenum, stomach and/or rectum)	0	0	0	0	3 (± to +)	1 (±)	2 (± to 2+)	1 (± to 2+)
Ulceration or villous/mucosal atrophy of duodenum	0	0	0	0	2 (± to +)	0	2 (+ to 2+)	1 (2+)
Gallbladder:								
Vascular proliferation/degeneration	0	0	0	0	1 (+)	0	1 (+)	2 (+)
Inflammation	1 (±)	0	1 (±)	1 (±)	2 (+)	2 (± to +)	2 (± to +)	3 (± to 2+)
Liver:								
Portal inflammation and/or periportal necrosis	0	0	0	0	0	0	1 (+)	2 (± to 2+)
Black pigment deposits in Kupffer cells	0	0	1 (±)	0	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (2+)
Pancreas: Vascular proliferation/degeneration	0	0	0	0	0	0	0	2 (± to +)
Adrenals: Decrease vacuolation with eosinophilia of cortex	0	0	1 (+)	0	0	2 (+)	1 (+)	3 (± to 2+)
Brain:								
Vascular degeneration/fibrosis	0	0	0	0	0	0	1 (±)	3 (±)
Macrophage infiltration in choroid plexus	0	0	0	1 (±)	0	0	0	2 (±)
Heart: Vascular proliferation/degeneration	0	0	0	0	2 (±)	1 (±)	0	0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy
Grades of side effects: ± : minimal, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked, 4+: severe

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145] **(continued)**								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Histopathology (Recovery sacrifice, LM) [b, c]								
Number of animals examined	1	2	2	2	2	2	2	2
Nasal cavities /Sinuses:								
Atrophy/loss of nasal septum and/or turbinates	0	0	1 (+)	0	1 (+)	0	1 (4+)	0
Increase woven bone, turbinate and/or ethmoturbinate(s)	0	0	1 (±)	0	1 (±)	0	1 (+)	1 (+)
Degeneration/regeneration of the respiratory and/or olfactory epithelium	0	0	1 (±)	0	2 (± to +)	0	0	0
Hemorrhage	0	0	0	0	0	0	1 (±)	0
Exudate (suppurative)	0	1 (±)	0	1 (±)	0	0	1 (±)	0
Cervical, thoracic and lumbar vertebrae:								
Osteocartilaginous exostosis	0	0	1 (3+)	0	2 (2+ to 3+)	2 (2+ to 3+)	2 (± to 3+)	2 (2+)
Myofiber atrophy of axial musculature	0	0	1 (2+)	0	2 (+ to 2+)	1 (+ to 2+)	1 (2+)	2 (+ to 2+)
Thickened hypertrophic chondrocyte layer (physis)	0	0	0	0	0	1 (±)	0	0
Long bones (femur and tibia):								
Physeal closure	1 (4+)	2 (+ to 4+)	2 (3+ to 4+)	2 (+ to 2+)	2 (4+)	2 (± to 3+)	2 (4+)	2 (3+ to 4+)
Kidneys:								
Increased matrix in glomerular tuft and glomerulopathy	0	0	1 (±)	0	0	0	0	0
Increased PAS+ deposits	0	0	1 (±)	0	0	0	1 (±)	0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy
Grades of side effects: ±: minimal, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked, 4+: severe, PAS: periodic acid schiff

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7D- Repeat-Dose Toxicity - 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145] **(continued)**

Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Histopathology (Recovery sacrifice, LM) (continued) [b, c]								
Number of animals examined	1	2	2	2	2	2	2	2
Ovaries: Presence of corpus luteum	NA	2 (ES)	NA	2 (M to L)	NA	2 (L)	NA	2 (M to L)
Gallbladder:								
Vascular proliferation/degeneration	0	0	1 (±)	0	1 (±)	0	1 (±)	0
Inflammation	0	0	1 (±)	0	1 (+)	1 (±)	0	2 (± to 2+)
Pancreas: Vascular proliferation/degeneration	0	0	0	0	1 (±)	0	0	0
Duodenum: villous/mucosal atrophy and fibrosis	0	0	0	0	0	1 (±)	0	0
Liver: Portal inflammation and/or periportal necrosis	0	0	0	0	1 (±)	1 (+)	0	1 (+)
Brain:								
Vascular degeneration/fibrosis	0	0	0	0	1 (+)	0	0	0
Macrophage infiltration in choroid plexus	0	0	0	0	1 (±)	0	1 (±)	0
Another observations: Following recovery, 1 male (No.308) showed lesions in the optic pathways, a bilateral severe chronic perineural inflammation and a moderate nerve fiber degeneration with gliosis of cranial nerves II, II, IV and VI								

Conclusion: The NOAEL was not determined

Abbreviations: adm : administration, M: males, F: females, LM : light microscopy, NA : not applicable, NOAEL: no observed adverse effect level, No: animal number
Grades of side effects: ± : minimal, +: mild, 2+: moderate, 3+:marked, 4+: severe, Grades of corpus luteum: ES: extensive size, L: large, S: small, VS: very small

[a]: 2 animals/sex from each group were kept for a 5-month recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7E - Repeat-Dose Toxicity – 4-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys

Test Article: aflibercept

Report Title:	**A 4-week subcutaneous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys followed by a 4-week recovery period**								
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing:** 4 weeks, three times weekly,				**Test Article:** aflibercept			
Initial Age: 2.5 to 5.8 years		**Duration of Post-Dose:** 4 weeks				**Study No.:** [223.4]			
Date of First Dose: 20		**Method of Administration:** Subcutaneous injection				**Location:** 4.2.3.2			
Vehicle/Formulation: Saline solution with % sucrose and % polysorbate 20, pH						**GLP Compliance:** Yes			
No Observed Adverse Effect Level: <1.5 mg/kg/adm									
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5.0**		**15**	
Number of Animals on Study		**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Toxicokinetics:									
Free aflibercept at steady state [b]									
C_{max} (µg/mL)	Day 26 [c]	BLQ	BLQ	64.68	72.32	268.04	273.34	464.72	533.26
Trough (µg/mL)	Day 29 [c]	BLQ	BLQ	56.31	73.74	222.19	242.02	377.81	411.06
Bound aflibercept at steady state		-	-	-	-	-	-	-	-
Antibodies to aflibercept:		Detectable only in one male animal (No.22) from the 5 mg/kg/adm group at Day 5, 12, 19, 26 and 29							
Additional Information: None.									

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, BLQ : below limit of quantification, C_{max}: maximum plasma concentration observed;
NC : not calculated, No.: animal number , - : data unavailable
a: 2 animals/sex from these groups were kept for a 4-week recovery period
b: Mean values
c: Day of measure

表 2.6.7.7E- Repeat-Dose Toxicity - 4-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week subcutaneous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys followed by a 4-week recovery period [223.4]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5.0**		**15**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Noteworthy Findings:								
Died or Killed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Absolute Body Weight [b, c]								
Day -1	3.404	3.224	+ 4.0	- 10.7	+ 5.6	- 10.9	+ 6.0	- 3.6
Day 29 (final treatment)	3.600	3.244	- 2.0	- 11.4	+ 1.3	- 12.1	- 1.1	- 5.1
Day 57 (final recovery)	4.260	3.660	-	-	-	-	-4.0	- 6.8
Average Body Weight Gain (kg) [b]								
Day 29 – Day –1	0.196	0.020	- 0.013	- 0.007	0.054	- 0.020	- 0.048	- 0.028
Average Daily Food Consumption [b, d]								
Day -1	120.0	120.0	No treatment-related changes during the dosing and recovery periods					
Day 28 (final treatment)	120.0	116.4						
Day 57 (final recovery)	120.0	120.0						

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, - : data unavailable

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 4-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Mean values in kg for control; percentage of difference with controls for treated group

[d]: Mean values in g/Day for control; percentage of difference with controls for treated group

表 2.6.7.7E- Repeat-Dose Toxicity - 4-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week subcutaneous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys followed by a 4-week recovery period [223.4]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5.0**		**15**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Clinical Observations :	No treatment-related changes during the dosing and recovery period							
Ophthalmology :	No treatment-related changes during the dosing and recovery period							
Electrocardiography :	No treatment-related changes during the dosing and recovery period							
Hematology [b, c] **:**								
Day –6								
Red blood cells (10^6/µL)	5.130	4.930	5.047	4.683	5.207	5.197	5.014	4.538
Hemoglobin concentration (g/dL)	12.96	13.04	13.00	12.53	13.03	13.43	12.86	11.44
Hematocrit (%)	38.66	38.88	38.07	37.97	37.83	39.00	37.68	34.18
Day 29 (final treatment)								
Red blood cells (10^6/µL)	5.116	4.850	5.423	5.040	5.777	5.580	5.560	5.068
Hemoglobin concentration (g/dL)	12.52	12.04	13.40	12.93	13.43	13.63	13.74	12.24
Hematocrit (%)	40.14	39.50	41.93	42.23	43.37	43.17	43.72	39.24
Day 57 (final recovery)								
Red blood cells (10^6/µL)	5.225	5.300	-	-	-	-	5.38	5.165
Hemoglobin concentration (g/dL)	13.20	13.10	-	-	-	-	13.50	12.40
Hematocrit (%)	41.10	41.95	-	-	-	-	42.60	39.75
Coagulations:	No treatment-related changes during the dosing and recovery period							
Additional Information: None.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, - : data unavailable

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 4-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only parameters considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7E- Repeat-Dose Toxicity - 4-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week subcutaneous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys followed by a 4-week recovery period [[redacted] 223.4]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5.0**		**15**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Clinical Chemistry :	No treatment-related changes during the dosing and recovery period, except for one male treated with 15 mg/kg/adm (No.28) which have decrease in protein and albumin, increase in total cholesterol, glucose, blood urea nitrogen and alpha-1 and alpha-2 percentages							
Urinalysis :	No treatment-related changes during the dosing and recovery period, except for one male treated with 15 mg/kg/adm (No.28) which have increase in protein content (>300 mg/dL)							
Organ Weights (g):	No treatment-related changes in the organ weights and relative organ weights to body weights at the end of the dosing and recovery period, except for one male treated with 15 mg/kg/adm (No.28) which have an increase in absolute and relative spleen weights							
Gross Pathology :	No treatment-related changes at the end of the dosing and recovery period							

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration No.: animal number

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 4-week recovery period

表 2.6.7.7E- Repeat-Dose Toxicity - 4-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week subcutaneous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys followed by a 4-week recovery period [[redacted] 223.4]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5.0**		**15**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Histopathology: Day 29 (terminal sacrifice, LM) [b, c]								
Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Kidneys:								
Focal degeneration and/or regeneration of renal tubule	0	0	0	0	1 (±)	0	1 (±)	1 (±)
Increase mesengial matrix of glomeruli	0	0	1 (±)	0	2 (± to +)	1 (±)	3 (± to +)	3 (±)
Tubular protein casts	1 (±)	0	0	1 (±)	1 (±)	0	1 (+)	2 (±)
Femurs:								
Decrease of metaphyseal capillary invasion	0	0	0	0	2 (+)	2/2 (+ to 2+) [d]	3 (± to 2+)	1 (2+)
Decrease of primary bony trabeculae	0	0	0	0	2 (+)	2/2 (+ to 2+) [d]	3 (± to 2+)	1 (2+)
Degeneration of cartilage matrix	0	0	0	0	2 (± to +)	0/2 [d]	3 (± to +)	1 (±)
Degeneration and/or increase thickening of physeal cartilage	0	1(±)	1(±)	0	2 (± to +)	2/2 (+) [d]	3 (+ to 2+)	2 (± to 2+)
Disorganization of chondrocyte columns	0	0	0	0	2 (± to +)	2/2 (± to +) [d]	3 (± to 2+)	1 (+)
Transverse subchondral bony plate	0	0	0	0	2 (± to +)	2/2 (± to +) [d]	3 (± to +)	2 (± to 2+)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy
Grades of side effects: P: Non-graded change, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 4-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: One female of three females was unexamined

表 2.6.7.7E- Repeat-Dose Toxicity - 4-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week subcutaneous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys followed by a 4-week recovery period [223.4]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5.0**		**15**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Histopathology: Day 29 (terminal sacrifice, LM) (continued) [b, c]								
Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Adrenals:								
Decreased vacuolization with eosinophilia of zona fasciculata cells	0	0	3 (+ to 3+)	1 (2+)	1 (+)	2 (+ to 3+)	3 (+ to 3+)	0
Ovaries:								
Decreased of maturating follicles/granulosa cells/theca cells	NA	0	NA	0	NA	2 (P)	NA	1 (P)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy, NA : not applicable
Grades of side effects: P: Non-graded change, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 4-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7E- Repeat-Dose Toxicity - 4-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 4-week subcutaneous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys followed by a 4-week recovery period [223.4]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5.0**		**15**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Histopathology: Day 57 (recovery sacrifice, LM) [b, c]								
Number of animals examined	2	2	0	0	0	0	2	2
Femurs:	No treatment-related changes at the end of the recovery period							
Kidneys:								
Focal regeneration of renal tubule	0	0	-	-	-	-	1 (±)	0
Increase mesengial matrix of glomeruli	0	0	-	-	-	-	1 (±)	1 ((±)
Tubular protein casts	0	0	-	-	-	-	1 (±)	0
Adrenals:								
Decreased vacuolization with eosinophilia of zona fasciculata cells	0	0	-	-	-	-	1 (3+)	1 (+)
Ovaries:								
Decreased of maturating follicles/granulosa cells/theca cells	NA	0	-	-	-	-	NA	1 (P)
Conclusions: A NOAEL was not determined.								

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM : light microscopy, NA : not applicable, NOAEL: No Observed Adverse Effect Level, - : data unavailable
Grades of side effects: P: Non-graded change, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 4-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7F - Repeat-Dose Toxicity – 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys

Test Article: aflibercept

Report Title:	**A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period**									
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing:** 13 weeks, two times weekly				**Test Article:** aflibercept				
Initial Age: 1.6 to 4.7 years		**Duration of Post-Dose:** 6 weeks				**Study No.:** [redacted]223.09]				
Date of First Dose: [redacted]20[redacted]		**Method of Administration:** Subcutaneous				**Location:** 4.2.3.2				
Vehicle/Formulation: Saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted]						**GLP Compliance:** Yes				
No Observed Adverse Effect Level: <1.5 mg/kg/adm										
Dose (mg/kg/adm)		**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study		**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Toxicokinetics:											
Free aflibercept at steady state [b]											
C_{max} (µg/mL)	Day 89 [c]	BLQ	BLQ	32.26	31.44	120.31	98.13	328.63	244.28	658.53	782.90
Trough (µg/mL)	Day 91 [c]	BLQ	BLQ	26.05	27.37	121.73	81.14	280.65	236.23 [d]	614.55	651.44
Bound aflibercept at steady state		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antibodies to aflibercept:		Detectable levels between Day 18 and Day 91 for female No.37 from the 15 mg/kg/adm group									
Additional Information: None.											

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, AUC_{0-t} : area under the curve during the dosing interval, BLQ : below limit of quantification, C_{max}: maximum plasma concentration observed,
NC : not calculated, No.: animal number, - : data unavailable,

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Day of steady state

[d]: Value of female No.37 was not included in the mean because of presence of neutralizing antibody against aflibercept

表 2.6.7.7F- Repeat-Dose Toxicity - 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period [[redacted]223.09]										
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**
Noteworthy Findings:										
Died or Killed Moribund:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Absolute Body Weight [b, c]:										
Week -1	2.410	2.300	- 1.7	- 2.4	+ 2.9	- 2.0	+ 1.5	- 1.6	+ 1.2	- 2.2
Week 7	2.560	2.373	- 5.9	- 3.7	- 2.3	- 0.1	- 4.7	- 10.0 [e]	- 2.2	- 6.0
Week 13 (final treatment)	2.560	2.320	- 7.6	- 3.7	- 4.5	- 3.7	- 10.0	- 10.8	- 5.9	- 11.4
Recovery Week 6 (final recovery)	2.950	2.640	-	-	-	-	- 7.5	- 12.1	- 13.2	- 11.4
Average Body Weight Gain (kg) [b]:										
Week 13 – Week -1	0.15	0.02	- 0.005	- 0.01	- 0.035	- 0.02	- 0.142	- 0.193	- 0.03	- 0.195
Average Daily Food Consumption [b, d]:										
Day -2	119.0	120.0	+ 0.8	0.0	+ 0.8	0.0	- 3.4	- 9.2	+ 0.8	- 4.2
Day 90 (final treatment)	118.0	112.0	- 17.4	- 31.7	- 19.9	- 29.0	- 38.1	- 43.8 [f]	- 33.9 [f]	- 21.4
Day 132 (final recovery)	120.0	120.0	-	-	-	-	0.0	- 30.0 [f]	- 27.5 [f]	- 35.0

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, No.: animal number , - : data unavailable

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Mean values in kg for control; percentage of difference with controls for treated groups

[d]: Mean values in g/day for control; percentage of difference with controls for treated groups

[e]: Decrease in 1 animal (No.53) from the 15 mg/kg/adm group as compared to pre-dose level (maximal decrease –15% at Week 7)

[f]: Reduced food consumption was noted in male No.44 treated at 30 mg/kg/adm and female No.53 treated at 15 mg/kg/adm for several days during the dosing and recovery periods

表 2.6.7.7F- Repeat-Dose Toxicity - 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period [223.09]										
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**
Clinical Observations [c] :	No treatment-related changes during the dosing and recovery periods									
Ophthalmology (Week 13):	No treatment-related changes during the dosing period									
Electrocardiography:	No treatment-related changes during the dosing and recovery periods									
Blood pressure (Week 13) [b, c] :										
Systolic	109.0	107.0	NAD	104.8	NAD	123.8	NAD	123.0 [d]	NAD	142.3 [d]
Diastolic	58.3	56.7	NAD	54.0	NAD	64.8	NAD	84.3 [d]	NAD	84.2 [d]

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: Increase essentially due to 2F (No.39 and 53) from the 15 mg/kg/adm group and 2F (No.49 and 51) from the 30 mg/kg/adm group as compared to pre-test and/or control values

表 2.6.7.7F- Repeat-Dose Toxicity - 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period [[redacted]223.09]										
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**
Hematology [b, c]:										
Week 5										
Red blood cells (10^6/µL)	5.313	5.347	5.580	5.828	5.668	5.625	5.820	5.650	5.918	5.783
Hemoglobin concentration (g/dL)	12.52	12.68	13.75	14.03	13.95	13.50	14.35	13.55	14.23	14.18
Hematocrit (%)	38.95	40.23	43.20	43.63	43.40	43.88	43.12	41.83	44.55	43.72
Week 13 (final treatment)										
Red blood cells (10^6/µL)	5.518	5.517	5.635	6.020	5.753	5.820	6.355	5.978	6.355	6.068
Hemoglobin concentration (g/dL)	12.88	13.10	13.83	14.60	14.20	14.15	15.73	14.50	15.38	14.83
Hematocrit (%)	41.38	42.67	44.90	46.40	45.50	46.30	48.82	46.00	49.22	47.08
Recovery Week 6 (final recovery)										
Red blood cells (10^6/µL)	5.870	5.390	-	-	-	-	6.355	5.770	6.260	5.900
Hemoglobin concentration (g/dL)	12.35	13.50	-	-	-	-	15.75	14.25	15.80	14.35
Hematocrit (%)	41.55	43.00	-	-	-	-	50.15	44.45	49.80	46.05
Coagulations:	No treatment-related changes during the dosing and recovery period									
Additional Information: None.										

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, - : data unavailable

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7F- Repeat-Dose Toxicity - 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period [223.09]										
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**
Clinical Chemistry: Week 13 (final treatment) [b, c]										
Blood urea nitrogen (mg/dL)	23.8	24.7	22.3	22.3	27.3	29.0 [g]	21.2	23.3	21.0	21.0
Total protein (g/dL)	7.08	6.93	7.15	6.93	7.00	6.85 [g]	7.10	7.12	6.87 [e]	7.07
Albumin (g/dL)	4.35	4.23	3.98 [d]	4.20	4.08	3.85 [g]	4.10	4.13	3.85	4.17
Albumin/Globulin ratio	1.20	1.17	0.98 [d]	1.18	1.08	0.95 [g]	1.03	1.05	0.95	1.02
Globulin (alpha-1) (%)	4.27	4.12	4.83	4.35	5.03	5.25 [g]	4.20	4.58	5.43 [f]	4.93
Globulin (alpha-2) (%)	8.25	8.20	8.90	8.68	10.03	10.68 [g]	9.22	10.02	10.98 [f]	10.57
Globulin (beta) (%)	23.57	22.22	26.05	22.88	24.35	25.58 [g]	24.77	23.63	26.30 [f]	24.67
Total cholesterol (mg/dL)	128.5	136.7	161.8	146.0	152.3	190.0 [g]	160.0	155.5	173.7	157.0
Triglycerides (mg/dL)	52.8	57.0	39.0	41.0	42.8	76.3 [g]	43.8	67.8	50.3	47.5
GGT, ALT and/or AST (U/L)	Increased levels in 1M (No.44) and 1F (No.45) treated at 30 mg/kg/adm									

Abbreviations: M: males, f: Females, adm : administration, No.: animal number, - : data unavailable

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: Decrease in 1/4 male animals (No.20) treated at 1.5 mg/kg/adm as compared to pre-test and/or control values

[e]: Decrease in 2/6 male animals (No.42 and 46) treated at 30 mg/kg/adm as compared to pre-test and/or control values

[f]: Increase in 3/6 male animals (No.42, 44 and 46) treated at 30 mg/kg/adm as compared to pre-test and/or control values

[g]: Decrease and/or increase in 1/4 female animal (No.21) from 5 mg/kg/adm as compared to pre-test and/or control values

表 2.6.7.7F- Repeat-Dose Toxicity - 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period [223.09]										
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Clinical Chemistry: Recovery Week 6 (final recovery) [b, c]										
Albumin (g/dL)	4.50	NAD	-	-	-	-	4.10	NAD	3.50	NAD
Total cholesterol (mg/dL)	120.5	NAD	-	-	-	-	159.0	NAD	200.5	NAD
GGT, ALT, AST, ALP (U/L)	Increased levels for 1M (No.44) treated at 30 mg/kg/adm									

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NAD : no abnormality detected, No.: animal number, - : data unavailable

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Mean values

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7F- Repeat-Dose Toxicity - 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period [223.09]										
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**
C-reactive protein [b]:										
Day 87	0	0	1	0	2	0	1	0	2	0
Day 133 (final recovery)	0	0	-	-	-	-	0	0	1	0
Urinalysis:	Urinary protein value (mg/24h) increased in 1M (No.46) treated at 30 mg/kg/adm at weeks 5 and 13 and 1F (No.21) treated at 5 mg/kg/adm at week 13 of the dosing period. No compound-related effects at the end of the recovery period									
Organ Weights [c]:	No treatment-related changes in the organ weights and relative organ weights to body weights at the end of the dosing and recovery periods									
Gross Pathology:	No treatment-related changes at the end of the dosing and recovery periods									

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, No.: animal number, - : data unavailable

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Number of animals with levels >0.50 mg/dL

[c]: Decrease of absolute and relative weights of spleen in almost all males and females, and of epididymides, prostate/seminal vesicles and testes of most males from all study groups. These decreased organ weights were considered to be related to individual animal maturity.

表 2.6.7.7F- Repeat-Dose Toxicity - 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period [223.09]										
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Histopathology: Week 13 (Terminal sacrifice, LM) [b, c]:										
Number of animals examined	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Kidneys:										
Increase mesangial matrix of glomeruli	0	0	2 (±)	0	4 (± to +)	3 (± to 2+)	3 (± to +)	2 (± to +)	4 (± to +)	3 (±)
Protein casts, focal	0	0	0	0	0	1 (±)	0	0	2 (± to +)	0
Regenerating tubule, focal	0	0	2 (± to 2+)	0	1 (±)	1 (±)	0	0	1 (+)	2 (±)
Adrenals:										
Decreased vacuolization with eosinophilia, zona fasciculata cell	0	0	1 (+)	2 (+ to 2+)	4 (+ to 3+)	4 (+ to 3+)	3 (+ to 3+)	3 (+ to 3+)	2 (2+ to 3+)	3 (2+)
Ovaries:										
Decreased of maturing follicles, granulosa cells and/or theca cells	NA	0	NA	2 (P)	NA	3/3 (P) [d]	NA	3 (P)	NA	3/3 (P) [d]

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM: light microscopy, NA : not applicable
Grades of side effects: P: Non-graded change, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked,

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[d]: One female of four females was unexamined

表 2.6.7.7F- Repeat-Dose Toxicity - 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period [[redacted]223.09]										
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Histopathology: Week 13 (Terminal sacrifice, LM) (continued) [b, c]										
Number of animals examined	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Femurs:										
Decrease of metaphyseal capillary invasion	0	0	3 (± to +)	3 (±)	4 (± to 2+)	4 (± to +)	4 (+ to 3+)	2 (2+ to 3+)	4 (+ to 2+)	4 (+ to 3+)
Decrease of primary bony trabeculae	0	0	3 (± to +)	3 (±)	4 (+ to 2+)	4 (± to +)	4 (+ to 3+)	2 (2+ to 3+)	4 (+ to 3+)	4 (+ to 3+)
Degeneration of cartilage matrix	0	0	3 (±)	3 (±)	3 (+ to 2+)	4 (± to +)	4 (+ to 2+)	2 (+)	4 (+ to 2+)	4 (± to 2+)
Disorganization of chondrocyte columns	0	0	3 (±)	3 (±)	4 (± to +)	4 (± to +)	4 (± to 2+)	2 (+ to 2+)	4 (+ to 2+)	4 (± to 2+)
Increase thickening of physeal cartilage	0	0	3 (± to +)	3 (±)	4 (± to 3+)	4 (± to 2+)	4 (+ to 3+)	2 (2+)	4 (+ to 3+)	4 (+ to 3+)
Transverse subchondral bony plate	0	0	2 (±)	2 (±)	3 (± to 2+)	3 (±)	3 (+ to 3+)	2 (± to 2+)	3 (+ to 2+)	4 (± to 2+)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM: light microscopy
Grades of side effects: P: Non-graded change, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked,

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7F- Repeat-Dose Toxicity - 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period [223.09]										
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**	**M: 6 [a]**	**F: 6 [a]**
Histopathology (Recovery sacrifice, LM) [b, c]:										
Number of animals examined	2	2	0	0	0	0	2	2	2	2
Kidneys:										
Increase mesangial matrix of glomeruli	0	0	-	-	-	-	0	0	1 (2+)	1 (±)
Regenerating tubule, focal	0	0	-	-	-	-	0	0	2 (±)	0
Femurs:										
Decrease of metaphyseal capillary invasion	0	0	-	-	-	-	0	0	0	1 (3+)
Decrease of primary bony trabeculae	0	0	-	-	-	-	0	0	0	1 (3+)
Degeneration of cartilage matrix	0	0	-	-	-	-	0	0	0	1 (+)
Disorganization of chondrocyte columns	0	0	-	-	-	-	0	0	0	1 (2+)
Increase thickening of physeal cartilage	0	0	-	-	-	-	0	0	0	1 (3+)
Transverse subchondral bony plate	0	0	-	-	-	-	0	0	0	1 (+)

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, LM: light microscopy , - : data unavailable,
Grades of side effects: P: Non-graded change, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked,

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.7F- Repeat-Dose Toxicity - 13-week subcutaneous toxicity study in cynomolgus monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 13-week subcutaneous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys followed by a 6-week recovery period [223.09]										
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**1.5**		**5**		**15**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Histopathology (Recovery sacrifice, LM) (continued) [b, c]										
Number of animals examined	2	2	0	0	0	0	2	2	2	2
Ovaries: Decreased of maturing follicles, granulosa cells and/or theca cells	NA	0	-	-	-	-	NA	1 (P)	NA	1 (P)
Adrenals: Decreased vacuolization with eosinophilia, zona fasciculata cell	0	0	-	-	-	-	0	0	0	2 (2+ to 3+)
Conclusions: The NOAEL was not determined										

Abbreviations: M: Males, F: Females, adm : administration, LM : Light Microscopy, NA : Not Applicable, NOAEL: No Observed Adverse Effect Level, - : Data unavailable
Grades of side effects: P: Non-graded change, ± : very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked,

[a]: 2 animals/sex from these groups were kept for a 6-week recovery period

[b]: Number of animals with observation

[c]: Only observations considered to be treatment-related are shown

8　In vitro 遺伝毒性試験

Not applicable

9　In vivo 遺伝毒性試験

Not applicable

10　がん原性試験

Not applicable

11　生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験

表 2.6.7.11A - Reproductive and Developmental Toxicity - 14-day toxicity study in nonpregnant female rabbits

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study No.	Location
Rabbit/NZW	30-minute intravenous Infusion at a dosing volume of 10 mL/kg (saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted])	On Days 1, 4, 7, 10 and 13 Necropsy on Day 15.	0, 15, 30, 45	3 F	**Mortality**: none **Body weight**: Slight body weight loss in 1 or 2 at each dose level (between –6% and -13% at the end of study) **Food consumption:** Decrease for 1 or 2F mainly from Day 8 (between roughly –20% and -75%) at each dose level **Clinical signs**: Reduced feces in 1 or 2F in each group between Days 6 and 15 **Histopathology :** NAD **Anti-aflibercept antibody:** no detectable in all treated females **Toxicokinetics:** plasma exposure of free and total aflibercept increased approximately proportionally with the dose throughout the study	[DSE 20[redacted]- 0569 - DIV0953]	4.2.3.5.2

Abbreviations: F: females, adm: administration, NAD: no abnormality detected, NZW: new zealand white

表 2.6.7.11B - Reproductive and Developmental Toxicity - Range-finding toxicity study in pregnant female rabbits

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study No.	Location
Rabbit/NZW	30-minute intravenous Infusion at a dosing volume of 4 mL/kg (saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted])	On GD 6, 9, 12, 15 and 18. Necropsy on GD29.	0, 3, 15, 45	5 or 6F	**Mortality:** 1F at 45 mg/kg/adm euthanized on GD 21 due to abortion **Clinical signs:** Red material under the cage of 1F at 3 mg/kg/adm. Increased incidence of reduced feces at all doses **Body weight**: Mean body weight loss (-0.1 to –1.5%) between GD6 and 9 followed by reduced body weight gain up to GD21 at all doses **Food consumption:** Slight decrease in food consumption at all doses **Necropsy (on GD 29):** NAD **Pregnancy data:** 1 premature delivery at 15 mg/kg/adm at GD29. Slight not statistically significant increase in mean number of early and late resorptions associated with a reduced number of viable fetuses at 45 mg/kg/adm **Fetal observations:** reduced mean fetal weight (-9 to –14%) at all doses. No external anomalies.	[TEP0184]	4.2.3.5.2

Abbreviations: F: females, adm: administration, GD: gestation Day, NAD: no abnormality detected, NZW: new zealand white

表 2.6.7.11C - Reproductive and Developmental Toxicity - Intravenous range-finding toxicity study in pregnant female rabbits

Test Article: aflibercept

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/adm)	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study No.	Location
Rabbit/NZW	30-minute intravenous infusion (saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted])	On GD 6, 9, 12, 15 and 18	0, 3, 15 and 45	5 or 6F	**Toxicokinetic:** Dose-related increase in free and total aflibercept plasma levels on GD21 and comparable bound aflibercept levels at all doses suggesting that administration of aflibercept every 72 hours resulted in the binding of most of endogenous VEGF. Dose-related increase in free aflibercept levels in the amniotic fluid on GD29. **Anti-aflibercept antibody:** detected in 1 and 3F at 15 and 45 mg/kg/adm, respectively	[TEP0184 continued]	4.2.3.5.2
Conclusions: The maternal NOAEL was considered to be 3 mg/kg/adm							

Abbreviations: F: Females, adm: administration, GD: gestation Day, NOAEL: No Observed Adverse Effect Level, NZW: new zealand white

12　生殖発生毒性試験－受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

表 2.6.7.12A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on fertility in monkeys

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus
Initial Age: 5-12 years for males, 3-5 years for females
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Duration of Dosing: M: 27 weeks, **F:** 27 weeks
Day of Mating: NA
Day of C-Section: NA
Method of Administration: 30-minute intravenous infusion
Test Article: aflibercept
Study No.: [670145]
Location: 4.2.3.2
GLP Compliance: Yes
Vehicle/Formulation: Saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted]

Dose (mg/kg/adm)	0 (Vehicle Control)		3		10		30	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Hormone analysis:								
Number of progesterone peaks / month [b, c]								
Acclimation period (Weeks –19 to –1)	NA	0.84	NA	0.67	NA	0.70	NA	0.81
Dosing period (Weeks 1 to 27)	NA	0.69	NA	0.05	NA	0.05	NA	0.02
Recovery period (Weeks 28 to 49)	NA	0.91	NA	0.45	NA	0.64	NA	0.36
Estradiol (pg/mL) [b]								
Week –1 (Acclimation period)	NA	55.95	NA	94.78	NA	89.08	NA	65.48
Week 27 (Final treatment)	NA	80.63	NA	78.07	NA	69.10	NA	48.08
Week 49 (Final recovery)	NA	71.55	NA	54.80	NA	89.00	NA	113.55

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NA : not applicable
[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity
[b]: Mean values
[c]: Progesterone peak corresponding to progesterone level in the serum ≥5 ng/mL

表 2.6.7.12A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on fertility in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Hormone analysis (continued):								
Inhibin B (pg/mL) [b]								
Week –1/1 (Acclimation period)	NA	247.505	NA	223.257	NA	224.665	NA	200.038
Week 27 (Final treatment)	NA	165.548	NA	43.595¤	NA	44.415¤	NA	31.547¤¤
Week 49 (Final recovery)	NA	176.58	NA	123.32	NA	79.36	NA	175.64
Follicle stimulating hormone (ng/mL) [b]								
Week -9/-1 (Acclimation period)	NAD	1.548	NAD	1.632	NAD	1.365	NAD	1.282
Week 1 (Dosing period)	NAD	1.733	NAD	6.062*	NAD	6.528**	NAD	6.883**
Week 27 (Final treatment)	NAD	1.487	NAD	7.930**	NAD	8.205**	NAD	6.625*

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NA : not applicable, NAD : no abnormality detected
Statistical significance: Pairwise comparison with control group using Dunn's test: ¤: p≤0.05, ¤¤=p≤0.01 or pairwise comparison using Dunnett's test: * = p≤0.05, ** = p≤0.01

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: Mean values

表 2.6.7.12A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on fertility in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]				
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)** [a]	**3** [a]	**10** [a]	**30** [a]
FEMALES:				
Vaginal bleeding				
Arrest of regular menstrual bleeding [b]				
Dosing period	1	4	5 [c]	5 [c]
Recovery period	0	0	0	0
Protracted or frequent bleeding [b]				
Dosing period	0	3 [d]	0	1
Recovery period	0	0	0	0

Abbreviations: adm : administration, No.: animal number

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of the test article-related toxicity

[b]: Number of animals with observation

[c]: Absence of menses from Weeks 1 to 3 of dosing onwards for 1F (No.357) treated at 10 mg/kg/adm and 1F (No.451) treated at 30 mg/kg/adm

[d]: For 1F (No.254) treated at 3 mg/kg/adm, bleeding was of 23 days extending into the recovery period

表 2.6.7.12A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on fertility in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]				
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)** *a*	**3** *a*	**10** *a*	**30** *a*
MALES:				
Sperm assessment *b*				
Week 5 (Dosing period)				
Sperm mobility (% of motile cells)	60.3	29.6	10.6**	32.4
Sperm morphology (% of abnormal cells)	11.13	62.03	69.55	40.96
Week 12 (Dosing period)				
Sperm mobility (% of motile cells)	66.1	41.3	10.7**	40.0
Sperm morphology (% of abnormal cells)	27.79	53.24	81.06*	63.03
Week 25 (Final treatment)				
Sperm mobility (% of motile cells)	77.8	53.9	28.8**	34.3*
Sperm morphology (% of abnormal cells)	13.00	38.58	63.57**	76.50**
Recovery period	The aflibercept-related effects were fully reversible at the end of the recovery period: following ≥ 13 weeks of recovery, the sperm mobility and the spermatozoal morphology were similar between control and aflibercept-treated groups.			

Abbreviations: adm : administration
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p≤0.05, ** = p≤0.01
a: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity
b: Mean values

表 2.6.7.12A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on fertility in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]								
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]	**M: 6** [a]	**F: 6** [a]
Organ Weights [b, c]								
Week 26 (Final treatment)								
Ovaries	NA	0.80883	NA	-78	NA	-83	NA	-83
Uterus	NA	6.8153	NA	-26	NA	-37*	NA	-42*
Week 48 (Final recovery)								
Ovaries	NA	0.33550	NA	+8	NA	-2	NA	-23
Uterus	NA	5.1180	NA	+62	NA	+26	NA	+61

Abbreviations: M: males, F: females, adm : administration, NA : not applicable
Statistical significance: Pairwise comparison realized on raw data (in grams) using Dunnett's test: * = p≤0.05
[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity
[b]: Mean values in grams for control animals, percent differences of control group means for treated animals
[c]: Only observations with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.12A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on fertility in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 6-month intravenous toxicity study of VEGF Trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670145]				
Dose (mg/kg/adm)	**0 (Vehicle Control)**	**3**	**10**	**30**
Number of Animals on Study	**F: 6** *a*	**F: 6** *a*	**F: 6** *a*	**F: 6** *a*
Histopathology (Terminal sacrifice, LM) *b, c*				
Number of animals examined	4	4	4	4
Ovaries:				
Decreased maturing follicles	1 (+)	0	1 (±)	3 (± to 3+)
Decreased granulosa cells	0	2 (+)	0	3 (± to 2+)
Decreased theca cells	0	0	0	1 (+)
Presence of corpus luteum	4 (L to ES)	3 (VS to L)	2 (VS to L)	3 (VS to S)
Uterus: Endometrial and myometrial atrophy	0	3 (± to +)	3 (± to +)	4 (+ to 2+)
Vagina: Epithelium atrophy	0	0	1 (+)	2 (± to 2+)
Histopathology (Recovery sacrifice, LM) *b, c*				
Number of animals examined	2	2	2	2
Ovaries: Presence of corpus luteum	2 (ES)	2 (M to L)	2 (L)	2 (M to L)
Conclusions: A NOAEL was not determined				

Abbreviations: F: females, adm: administration, LM: Light Microscopy, NA: not applicable, NOAEL: No Observed Adverse Effect Level
Grades of side effects: ±: minimal, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked, 4+: severe,
Grades of corpus luteum: VS: very small, S: small, L: large, ES: extensive size

a: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

b: Number of animals with observation

c: Only observations considered to be treatment-related are shown

13　生殖発生毒性試験－胚･胎児発生に関する試験

表 2.6.7.13A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on Embryofetal development in rabbits

Test Article: aflibercept

Report Title: AVE0005: Intravenous (30-minute infusion) embryo-fetal toxicity study in rabbits

Species/Strain: Rabbit/NZW
Initial Age: 16 to 21 weeks
Date of First Dose: [redacted]
Special Features: Females were dosed every 3 days (on G6, 9, 12, 15 and 18)
Duration of Dosing: GD6, GD9, GD12, GD15 and GD18
Day of Mating: GD0
Day of C-Section: GD29
Method of Administration: 30-minute intravenous infusion
Test Article: aflibercept
Study No.: [TER0506]
Location: 4.2.3.5.2
GLP Compliance: Yes
Vehicle/Formulation: Saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH [redacted]

Dose (mg/kg/administration)		0 (Vehicle Control)	3	15	60
Females	**Toxicokinetics (Day 18):**				
	Number of animals/time	3	3	3	3
	Free aflibercept [a]				
	$AUC_{(0.5\text{-}72h)}$ (µg.h/mL)	NA	1935	24 300	67 018
	C_{max} (µg/mL) [b]	BLQ	56.1	707	2460
	Trough (µg/mL)	BLQ	14.0	121	333
	Bound aflibercept [a]				
	C_{max} (µg/mL) [b]	BLQ	8.13	6.83	5.53
	Antibodies to aflibercept				
	Number of animals	24	22	22	26
	Day 6 [c]	0	0	0	0
	Day 29 [c]	0	2	5	14

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t}$: area under the curve during the dosing interval, BLQ: below limit of quantification, C_{max}: maximum plasma concentration observed; GD: gestation day, NA : not applicale, NZW: new zealand white

[a]: Mean values

[b]: For free aflibercept Cmax were obtained at 0.5h for all doses, for bound aflibercept Cmax were obtained 48h after administration for 3 mg/kg/adm and 6h after administration for 15 and 60 mg/kg/adm

[c]: Number of animals with detectable levels

表 2.6.7.13A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on Embryofetal development in rabbits (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: AVE0005: Intravenous (30-minute infusion) embryo-fetal toxicity study in rabbits [TER0506]

Dose (mg/kg/administration)		**0 (Vehicle Control)**	**3**	**15**	**60**
Females (cont.)	**No. Inseminated**	24	22	22	26
	No. Pregnant	20	20	20	22
	No. Died or Killed Moribund	1[a] (G18)	0	0	3[b] (G21-26)
	No. with Live Fetus(es)	19	20	20	19
	No. with Total Litter Loss (resorptions only)	0	0	0	0
	No. with ≥ 1 Resorption	8	11	9	18
	No. of Abortions	0	0	0	3
	Clinical Signs of Toxicity				
	Euthanatized females	Fetal/placental remnant and/or red material under the cage, body weight loss associated with reduced food consumption were noted prior to euthanasia			
	Surviving females	No compound-related clinical signs			

Abbreviations: G: gestation day

[a]: died by accident

[b]: pre-terminally euthanized following compound-related abortion

表 2.6.7.13A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on Embryofetal development in rabbits (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: AVE0005: Intravenous (30-minute infusion) embryo-fetal toxicity study in rabbits [TER0506]					
Dose (mg/kg/administration)		**0 (Vehicle Control)**	**3**	**15**	**60**
Females (cont.)	**Absolute Body Weights (%)**[a]				
	on G6	3.523 ± 0.289	-4.7%	-2.6%	-1.5%
	on G9	3.587 ± 0.297	-6.2%	-4.8%	-3.9%
	on G21	3.792 ± 0.285	-5.3%	-5.6%	-4.9%
	on G29	3.916 ± 0.294	-4.6%	-2.8%	-2.3%
	Body Weight Gains/Losses (g) [c]				
	G6 to 9	0.065 ± 0.067	0.009 ± 0.045	-0.017 ± 0.055	-0.022 ± 0.045
	G6 to 21	0.269 ± 0.148	0.234 ± 0.122	0.149 ± 0.122	0.136 ± 0.128
	G6 to 29	0.393 ± 0.129	0.379 ± 0.169	0.377 ± 0.144	0.354 ± 0.114
	Food Consumption (%)[b]				
	G8-9	143.74 ± 29.56	-2.8	-2.1	-3.5
	G16-17	144.37 ± 27.38	-14.2	-20.0	-16.8
	G27-28	103.83 ± 37.69	-7.3	-0.4	+14.1
	Necropsy Observations				
	Uterus weight (%) [a]	423.68 ± 103.75	-0.6	-5.1	-25.0*
	No. Corpora Lutea [c]	10.1 ± 2.3	10.7 ± 2.2	9.6 ± 2.0	9.6 ± 2.9
	No. Implantations [c]	9.2 ± 2.3	9.7 ± 2.9	8.7 ± 2.4	8.9 ± 2.6
	Pre-implantation Loss (% corpora lutea) [c]	9.1 ± 12.9	9.8 ± 18.5	10.3 ± 13.3	7.3 ± 9.1

Abbreviations: G: gestation day, SD: standard deviation
Statistical significance: * = p<0.05, analysis using a 1-way ANOVA-based ordinal step-down trend test on mean values
a: For control group, mean g ± SD are shown. For treated group, percent differences from control are shown
b: For control group, mean g/G ± SD are shown. For treated group, percent differences from control are shown
c: mean values ± SD

表 2.6.7.13A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on Embryofetal development in rabbits (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: AVE0005: Intravenous (30-minute infusion) embryo-fetal toxicity study in rabbits [TER0506]					
Dose (mg/kg/administration)		**0 (Vehicle Control)**	**3**	**15**	**60**
Litters	**No. Total Fetuses examined**	160	171	159	117
	No. Live Fetuses [a]	8.4 ± 2.6	8.6 ± 3.0	8.0 ± 2.4	6.2 ± 2.4*
	No. Dead Fetuses	0	0	0	0
	Early Resorptions [a]	0.6 ± 1.2	0.9 ± 1.7	0.5 ± 0.8	2.5 ± 1.9
	Total post implantation loss [a]	0.74 ± 1.28	1.10 ± 1.83	0.70 ± 0.92	2.74 ± 1.85*
	Post Implantation Loss (% of implantations) [a]	7.9 ± 14.1	11.4 ± 15.5	8.0 ± 10.5	30.5 ± 19.5
	Average Fetal Body Weight (g)	35.46 ± 4.95	35.68 ± 4.91	35.20 ± 4.15	33.79 ± 5.51
	Average Male Fetal Body Weight (g)	35.57 ± 6.13	35.01 ± 3.95	35.28 ± 4.22	33.19 ± 6.01
	Average. Female fetal body weight (g)	35.42 ± 4.83	35.71 ± 6.40	34.43 ± 4.06	33.66 ± 5.49
	Sex ratio of fetuses (% male) [a]	49.9 ± 16.8	50.5 ± 20.3	64.2 ± 18.3	49.4 ± 24.4

Abbreviations: G: gestation day, SD: standard deviation

Statistical significance: * = p<0.05, analysis using a 1-way ANOVA-based ordinal step-down trend test

[a]: Mean values ± SD

表 2.6.7.13A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on Embryofetal development in rabbits (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: AVE0005: Intravenous (30-minute infusion) embryo-fetal toxicity study in rabbits [TER0506]						
Dose (mg/kg/administration)			**0 (Vehicle Control)**	**3**	**15**	**60**
Litters (cont.)	**Fetal Gross External Anomalies (%)**					
	Anasarca	Fetal Incidence	0.0	1.2	0.0	0.9
		Litter Incidence	0.0	10.0	0.0	5.3
	Ectrodactyly	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.6	0.0
		Litter Incidence	0.0	0.0	5.0	0.0
	Cleft palate	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	0.9
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	5.3
	Paw hyperflexion	Fetal Incidence	0.0	0.6	0.0	2.6
		Litter Incidence	0.0	5.0	0.0	15.8
	Hindlimb hyperflexion	Fetal Incidence	0.6	0.0	0.0	0.9
		Litter Incidence	5.3	0.0	0.0	5.3
	Trunk:					
	Umbilica hernia	Fetal Incidence	0.0	0.6	0.6	1.7
		Litter Incidence	0.0	5.0	5.0	10.5
	Gastroschisis	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	1.7
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	5.3
	Anal atresia	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	3.4
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	15.8
	Tail malformation	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	8.5
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	36.8
	Heart:					
	- Ventricular septum defect					
		Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	8.5
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	36.8

表 2.6.7.13A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on Embryofetal development in rabbits (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: AVE0005: Intravenous (30-minute infusion) embryo-fetal toxicity study in rabbits [TER0506]					
Dose (mg/kg/administration)		**0 (Vehicle Control)**	**3**	**15**	**60**
Litters (cont.)	**Fetal Visceral Anomalies (%)**				
	Heart:				
	- Enlarged ventricular chamber				
	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	7.7
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	36.8
	- Small ventricular chamber				
	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	8.5
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	42.1
	- Absence of atrioventricular valve				
	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	1.7
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	10.5
	Great vessels and arteries:				
	- Atresia of pulmonary trunk				
	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	6.0
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	31.6
	- Narrowed pulmonary trunk				
	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	3.4
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	21.1
	- Dilated pulmonary trunk				
	Fetal Incidence	0.0	0.6	0.0	0.0
	Litter Incidence	0.0	5.0	0.0	0.0
	- Overriding aorta				
	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	0.9
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	5.3

表 2.6.7.13A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on Embryofetal development in rabbits (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: AVE0005: Intravenous (30-minute infusion) embryo-fetal toxicity study in rabbits [TER0506]					
Dose (mg/kg/administration)		**0 (Vehicle Control)**	**3**	**15**	**60**
	Fetal Visceral Anomalies (%) (continued)				
	Great vessels and arteries (continued):				
	- Reduced pulmonary artery branch				
	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	0.9
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	5.3
	- Ductus arteriosus				
	Absent Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	1.7
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	10.5
	Narrowed Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	6.8
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	26.3
	- Dilated aortic arch				
	Fetal Incidence	0.0	0.6	0.0	13.7
Litters (cont.)	Litter Incidence	0.0	5.0	0.0	47.4
	- Retroesophageal aortic arch				
	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	1.7
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	10.5
	- Dilated aorta				
	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	4.3
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	10.5
	- Retroesophageal subclavian artery				
	Fetal Incidence	0.6	0.0	0.0	8.5
	Litter Incidence	5.3	0.0	0.0	36.8
	Eyes:				
	- Unilateral microphtalmia				
	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	0.9
	Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	5.3

表 2.6.7.13A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on Embryofetal development in rabbits (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: AVE0005: Intravenous (30-minute infusion) embryo-fetal toxicity study in rabbits [TER0506]						
Dose (mg/kg/administration)			**0 (Vehicle Control)**	**3**	**15**	**60**
Litters (cont.)	**Fetal Visceral Anomalies (%) (continued)**					
	Intestinal atresia	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	1.7
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	10.5
	Dilatation of Ureter	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	3.4
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	15.8
	Convolution of Ureter	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	3.4
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	15.8
	Distension of urinary bladder	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	1.7
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	10.5
	Fetal Skeletal Anomalies (%)					
	Malformation of caudal vertebrae					
		Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	3.4
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	10.5
	Ribs:					
	- Supernumerary	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	1.7
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	10.5
	- Malformation	Fetal Incidence	0.6	0.0	0.6	3.4
		Litter Incidence	5.3	0.0	5.0	10.5
	Malformation sternebrae	Fetal Incidence	2.5	3.5	2.5	14.5
		Litter Incidence	21.1	20.0	15.0	47.4
	Lumbar vertebrae:					
	- Supernumerary	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	1.7
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	5.3
	- Malformation	Fetal Incidence	0.6	0.0	0.0	4.3
		Litter Incidence	5.3	0.0	0.0	21.1

表 2.6.7.13A - Reproductive and Developmental Toxicity – Effect on Embryofetal development in rabbits (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: AVE0005: Intravenous (30-minute infusion) embryo-fetal toxicity study in rabbits [TER0506]

Dose (mg/kg/administration)			0 (Vehicle Control)	3	15	60
Litters (cont.)	**Fetal Skeletal Anomalies (%) (continued)**					
	Absence of arch and/or centrum of sacral vertebrae					
		Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	2.6
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	10.5
	Absent or small interparietal skull bone					
		Fetal Incidence	9.4	6.4	6.3	25.6
		Litter Incidence	42.1	40.0	30.0	68.4
	Incomplete ossification					
	- Hyoid	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.6	4.3
		Litter Incidence	0.0	0.0	5.0	15.8
	- Thoracic vertebrae	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.6	7.7
		Litter Incidence	0.0	0.0	5.0	47.4
	- Lumbar vertebrae	Fetal Incidence	0.0	0.0	0.0	3.4
		Litter Incidence	0.0	0.0	0.0	15.8
	- Rib	Fetal Incidence	0.6	1.2	0.0	0.0
		Litter Incidence	5.3	10.0	0.0	0.0
	- Sternebrae	Fetal Incidence	4.4	2.3	5.0	6.8
		Litter Incidence	21.1	10.0	10.0	26.3
	- Calcaneus/talus	Fetal Incidence	0.0	1.2	0.0	0.9
		Litter Incidence	0.0	10.0	0.0	5.3
	- Forepaw phalanx	Fetal Incidence	10.6	13.5	6.9	35.9
		Litter Incidence	42.1	40.0	35.0	73.7
	- Hindpaw phalanx	Fetal Incidence	0.6	0.6	0.6	5.1
		Litter Incidence	5.3	5.0	5.0	21.1

Conclusions: The maternal No-Observable Adverse Effect level (NOAEL) was considered to be 3 mg/kg/administration and the developmental NOAEL was considered to be below 3 mg/kg/administration

14　生殖発生毒性試験－出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Not applicable

15　新生児を用いた試験

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus
Initial Age: 2 to 2.5 years
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Duration of Dosing: 13 weeks
Duration of Post-Dose: 21 weeks
Method of Administration: 30-minute intravenous infusion, once a week
Test Article: aflibercept
Master reference/Report No.: [670144], 670144 Amendment 01]
Location: 4.2.3.5.4
Vehicle/Formulation: Saline solution with [redacted]% sucrose and [redacted]% polysorbate 20, pH[redacted]
GLP Compliance: Yes
No Observed Adverse Effect Level: < 0.5 mg/kg/adm

Dose (mg/kg/adm)		Control (placebo)		0.5		3		30	
Number of Animals on Study		**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Toxicokinetics (Dosing period)									
Free aflibercept at steady state [c]									
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg.day/mL)	Week 1	NA	NA	15	12	99	120	1016	1086
	Week 5	NA	NA	17	22	161	191	1364	2279
	Week 9	NA	NA	17	15	177	263	1856	2433
	Week 13	NA	NA	18	19	230	172	1749	1664
C_{max} (µg/mL)	Day 85, 5 min [d]	BLQ	BLQ	8.17	10.90	87.20	60.30	829	830
Trough (µg/mL)	Day 92, 168h [d]	BLQ	BLQ	0.062	0.141	8.52	8.62	101	83.4
Bound aflibercept at steady state:									
Css (µg/mL)	Day 92, 168h [d]	BLQ	BLQ	3.31	2.39	5.32	5.83	3.57	4.33
Toxicokinetics (Recovery Period)									
Free aflibercept		Not detected in any samples regardless of dose							
Bound aflibercept		Still detected at the end of recovery period in several animals							

Conclusions: $AUC_{0\text{-}168h}$ estimates of free aflibercept demonstrated linear dose dependence at all times monitored

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, NA: not applicable, $AUC_{0\text{-}t}$: area under the curve during the dosing interval, BLQ: Below limit of quantification, Css: concentration at steady state, C_{max}: maximum plasma concentration observed

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period, [c]: Mean values, [d]: Time post infusion

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]								
Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Antibodies to aflibercept:	Detectable levels in one female (No.354) from 3 mg/kg/adm group between Day 57 and Day 92 and in one male (No.403) and one female (No.454) from 30 mg/kg/adm group between Day 29 and Day 92 and up to the end of recovery period for animal No.403							
Noteworthy Findings:								
Died or Killed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Absolute Body Weight [c]								
Week 10	3.08	2.22	-3.6	+0. 5	-15.6	0.0	-19.5¤	-4.5
Week 13	3.16	2.16	-2.9	+7.9	-15.8	0.0	-24.1¤¤	-8.3
Week 34 (final recovery) [d]	4.30	2.65	-	-	-12.8	0.0	-25.6	+3.77
Body Gains (%):								
Week –1 to 13	20.474	7.878	16.899	18.630	10.023	9.105	-7.660**	-5.714**

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, SD: standard deviation, No.: animal number , -: data unavailable

Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: ** = p<0.01 - Pairwise comparison using Dunn's procedure: ¤ = p<0.05, ¤¤ = p<0.01

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

[c]: Mean values in kg ± SD for control; percentage of difference with controls for treated group

[d]: No statistical analysis for recovery period (2 animals)

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]

Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Clinical Observations: (Dosing period) [c, d]**:**								
Hunched Posture	0	0	0	0	0	0	3 (D53-92)	3 (D74-92)
Reduced Activity	0	0	0	0	0	0	3 (D63-D92)	1 (D83-92)
Trermors, uncoordinated	0	0	0	0	0	0	1 (D63-78)	0
Muzzle discharge and/or redness of the muzzle	0	0	0	0	1	1 (D65-86)	2 (D53-84)	4 (D30,D68-86)
Red fur staining and/or redness of skin	0	0	0	0	0	2 (D4, D88)	1	2 (D88-92)
Clinical Observations: (Recovery period) [c, d]**:**								
Hunched Posture	0	0	0	0	0	0	1 (D96-240)	1 (D95-239)
Reduced Activity	0	0	0	0	0	0	1 (D96-103)	1 (D95-116)
Trermors, uncoordinated	0	0	0	0	0	0	0	0

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, D: study Day

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

[c]: Number of animals with observation (interval of days with observation)

[d]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]								
Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Hematology [c, d]**:**								
Week 4								
Red blood cells (10^6/µL)	5.180	5.592	5.760	5.323	6.114***	6.190	6.262***	6.186
Hemoglobin concentration (g/dL)	12.84	13.64	13.40	13.27	14.30**	14.86*	15.14***	14.90*
Hematocrit (%)	41.22	43.84	42.57	42.90	46.84¤	46.96	46.60¤	47.40
Week 12								
Red blood cells (10^6/µL)	5.136	5.768	6.703**	5.723	6.182*	6.648	6.064*	6.158
Hemoglobin concentration (g/dL)	12.92	13.96	15.60**	14.63	14.64*	16.10**	14.60*	14.76
Hematocrit (%)	40.82	44.22	48.43**	45.90	46.68**	50.06	44.02	46.32
Coagulations								
Fibrinogen (mg/dL)								
Week 4	229.46	221.02	216.57	251.40	262.44	252.78	313.66*	315.60
Week 12	241.68	195.00	216.43	242.03	247.82	268.98	366.88**	293.34*
Additional Information: By the end of the recovery period, the hematology parameters were generally back to normal								

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, h: hours

Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001 - Pairwise comparison using Dunn's procedure: ¤ = p<0.05

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

[c]: Mean values

[d]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]

Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** *a*	**F: 5** *a*	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** *a*	**F: 5** *a, b*	**M: 5** *a*	**F: 5** *a*
Serum Chemistry (Week 4) *c, d*:								
Total protein (g/dL)	6.72	7.00	6.87	7.20	7.66*	7.44	7.56*	7.40
Albumin (g/dL)	4.18	4.58	4.47	4.40	4.66**	4.64	4.52*	4.38
Globulin (g/dL)	2.54	2.42	2.40	2.80	3.00	2.80	3.04	3.02*
Albumin/Globulin ratio	1.662	1.902	1.880	1.610	1.566	1.666	1.494	1.468*
Creatinin (mg/dL)	0.50	0.50	0.53	0.53	0.66	0.62*	0.62	0.64**
Cholesterol (mg/dL)	117.6	164.0	154.3	169.3	182.0*	186.6	193.4*	172.6

Addition information: None

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p<0.05, ** = p<0.01

a: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

b: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

c: Mean values

d: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]

Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Serum Chemistry (Week 12) [c, d]**:**								
Albumin (g/dL)	4.02	4.26	4.10	4.17	4.22	4.10	3.78	3.86**
Globulin (g/dL)	2.86	2.74	2.73	3.30	3.12	3.10	3.32**	3.30*
Albumin/Globulin ratio	1.410	1.562	1.503	1.287	1.356	1.324	1.144**	1.186**
Creatinin (mg/dL)	0.60	0.58	0.53	0.60	0.74	0.70¤	0.74	0.76
Cholesterol (mg/dL)	104.0	152.2	149.0	161.0	168.8*	165.4	181.6**	146.8

Additional Information: Slight increases in Gamma-glutamyl transferase (GGT), alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in a few animals treated with 3 and 30 mg/kg/adm. Increases were not present at the end of recovery period in any animals, except for one male dosed at 3 mg/kg/adm which continued to exhibit increased GGT at mid-recovery and at the end of recovery. Other biochemistry parameters were back to normal by the end of the recovery period.

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration

Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p<0.05, ** = p<0.01 - Pairwise comparison using Dunn's procedure: ¤ = p<0.05

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

[c]: Mean values

[d]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]								
Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
C-reactive protein [d]**:**								
Week 4	2.74	3.18	3.60	2.03	5.30	2.16	5.34	5.74
Week 12	2.78	3.02	4.40	1.77	6.40	8.40	8.58	6.28
Recovery period	At the end of recovery CRP levels were elevated for 1/2 male at 3 mg/kg/adm and 1/2 male and 1/2 female at 30 mg/kg/adm							
Urinalysis :								
Microalbumin [e]								
Week 4	0	1	0	1	0	0	1	1
Week 12	0	0	0	0	0	1	3	0
Recovery period	0	0	-	-	0	0	0	2

Abbreviations: M: male, F: female, adm : administration, CRP: C-reactive protein, -: data unavailable

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

[c]: Only parameters with statistically significant variations and/or considered to be treatment-related are shown

[d]: Mean values

[e]: Number of animals with concentration >2.8 mg/L

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]								
Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Bone resorption markers [c]**:**								
Week 12								
C-telopeptide (CTx) (µg/mmol Creatinine)	1188.46	809.29	780.66	703.73	734.79*	662.72	521.53**	607.66
N-telopeptide (NTx) (nM BCE/mM Creatinine)	1023.76	563.60	616.38	605.18	504.11*	547.53	459.60*	478.04
Recovery period	CTx and NTx were increased at week 24 for each individual animal (male and female) relative to Week 12, most notably for animals at 30 mg/kg/adm. These increases were normalized at Week 34.							
Bone mineral density (BMD) (% change from acclimation period) [d]**:**								
Week 12								
Whole body	6.5747	8.0436	6.7621	3.7841	2.9885	6.6274	2.8217	5.5721
Lumbar spine	5.3254	5.9233	5.4539	6.0951	2.6626	5.9741	5.1184	6.2658
Right proximal femur :								
Global	16.8608	10.3128	4.8970	6.1409	9.0038	8.3556	1.3666**	1.5396
Neck	10.5810	10.3767	3.6508	5.4539	4.9909	-0.7218	-4.5887*	-0.5080
Trochanter	24.9792	7.9022	9.1263	9.2675	9.1202	3.2862	1.5224*	4.2765
Recovery period	In general, over recovery period, whole body BMD increased at a similar rate for both aflibercept-treated and control animals							
Addition information: None								

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration
Statistical significance: Pairwise comparison using Dunnett's test: * = p<0.05, ** = p<0.01

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

[c]: Mean values

[d]: % change were calculated relative to the 1st scan recorded during the acclimation period

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]								
Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** *a*	**F: 5** *a*	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** *a*	**F: 5** *a, b*	**M: 5** *a*	**F: 5** *a*
Individual Radiographic Evaluation: Widening of the epiphyseal plate *c*								
Week 4	0	0	0	0	0	0	3	0
Week 12	0	0	0	0	1	0	5	4
Recovery period	The effect was reversible, no incidence on the growth plate thickness at Weeks 24 and 34.							

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration

a: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

b: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

c: Number of animals with observation

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]								
Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Organ Weights:	No treatment-related changes in the organ weights and relative organ weights to body weights at the end of the dosing and recovery period							
Gross Pathology [c, d]**: - Terminal sacrifice**								
Adrenal glands: Mottled	0	0	0	0	1	1	2	2
Dark discoloration	0	0	0	0	0	0	0	1
Bone femurs: Irregular surface	1	0	0	0	0	0	2	0
Cervical vertebrae: fusion	0	0	0	0	0	0	1 (D240) [e]	0
Gross Pathology [c, d]**: - Recovery sacrifice**								
Adrenal glands (mottled and/or dark discoloration)**:**	Complete reversibility of this finding after the 5-month recovery period							

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration
Grades of side effects: +: minimal, 2+: slight, 3+: moderate, 4+: marked, PAS: periodic acid schiff,

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

[c]: Number of animals with observation

[d]: Only observations considered to be treatment-related are shown

[e]: Fusion of cervical vertebrae C5, C6 and C7

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]

Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Histopathology: (Terminal sacrifice, LM) [c, d]**:**								
Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Bone- vertebrae								
Myofiber atrophy of axial musculature	1 (+)	0	0	0	0	0	1 (3+)	2 (2+)
Proliferation/degeneration of adjacent microvasculature	0	0	0	0	0	0	1 (2+)	2 (2+)
Cervical (C6-C7)								
Osteocartilaginous exostosis	0	0	0	0	0	0	1 (+)	1 (2+)
Physis: Thickened hypertrophic chondrocyte layer	0	0	0	0	1 (+)	2 (+)	2 (+)	0
Thoracic (T5-T6)								
Cartilaginous metaplasia: ventral body	0	0	0	0	0	0	0	1 (+)
Osteocartilaginous exostosis	0	0	0	0	0	0	1 (3+)	2 (2+)
Physis: Thickened hypertrophic chondrocyte layer	0	0	0	0	2 (+)	0	2 (+)	1 (+)
Lumbar (L1-L2)								
Cartilaginous metaplasia: ventral body	0	0	0	0	1 (2+)	0	1 (+)	1 (2+)
Osteocartilaginous exostosis	0	0	0	0	1 (+)	2 (+ to 2+)	1 (+)	2 (3+ to 4+)
Physis: Thickened hypertrophic chondrocyte layer	0	0	0	0	2 (+ to 2+)	2 (+)	3 (+ to 2+)	2 (+ to 2+)

Abbreviations: M : male, F: female, adm : administration, LM : light microscopy
Grades of side effects : +: minimal, 2+: slight, 3+: moderate, 4+: marked, PAS: periodic acid schiff

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

[c]: Number of animals with observation (interval of grades of side effects)

[d]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]								
Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Histopathology: (Terminal sacrifice, LM) (continued) [c, d]:								
Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Femur:								
Thickening of physeal cartilage	0	0	0	0	0	2 (+ to 2+)	3 (2+ to 3+)	3 (2+)
Cartilaginous metaplasia: periosteum	0	0	0	0	0	0	1 (+)	0
Osteocartilaginous exostosis	0	0	0	0	0	0	1 (3+)	0
Sternum:								
Physis: Thickened hypertrophic chondrocyte layer	0	0	0	0	0	1 (+)	0	1 (+)
Cartilaginous metaplasia: periosteum	0	0	0	0	0	0	0	1 (+)
Tibia:								
Thickening of physeal cartilage	0	0	0	0	0	2 (+)	3 (2+)	2 (2+)
Nasal cavities/ sinuses :								
Degeneration/regeneration respiratory epithelium	0	0	1 (+)	1 (2+)	3 (+ to 3+)	3 (+ to 3+)	3 (2+ to 3+)	3 (2+ to 3+)
Degeneration/regeneration olfactory epithelium and/or necrosis	0	0	1 (2+)	0	0	1 (+)	1 (2+)	0
Hemorrage	0	0	0	1 (+)	1 (+)	2 (+)	3 (+)	3 (+ to 2+)
Suppurative exudate	0	0	1 (+)	0	2 (+ to 2+)	2 (+ to 2+)	1 (+)	2 (+ to 2+)
Eosinophilic matrix/activated chondrocytes: septum to nasal cavities	0	0	0	0	1 (2+)	1 (2+)	1 (+)	2 (+ to 2+)

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, LM: light microscopy
Grades of side effects : +: minimal, 2+: slight, 3+: moderate, 4+: marked

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

[c]: Number of animals with observation (interval of grades of side effects), [d]: Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]								
Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** [a]	**F: 5** [a, b]	**M: 5** [a]	**F: 5** [a]
Histopathology: (Terminal sacrifice, LM) (continued) [c, d]								
Number of animals examined	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
Kidneys:								
Increased matrix in glomerular tuft	0	0	0	0	3 (+)	1 (+)	3 (+ to 2+)	2 (+)
Glomerulopathy	0	0	0	0	0	0	1 (2+)	0
Increased PAS+ deposits	0	1 (+)	0	1 (+)	3 (+)	2 (+ to 2+)	3 (2+ to 3+)	3 (+ to 2+)
Adrenal glands:								
Decreased vacuolisation with eosinophilia cortex	0	0	0	0	1 (2+)	2 (+ to 3+)	3 (+ to 3+)	3 (2+ to 3+)
Ovaries:								
Decreased maturating follicles and/or granulosa and/or theca cells	NA	0	NA	1 (++)	NA	3 (2+ to 3+)	NA	3 (2+ to 4+)
Gallbladder: Vascular proliferation/regeneration	0	0	0	0	0	0	1 (+)	0
Duodenum:								
Vascular proliferation/regeneration	0	0	0	0	0	0	1 (3+)	0
Hemorrhage	0	0	0	0	0	0	1 (+)	1 (2+)
Liver: periportal necrosis with portal inflammation	0	0	0	0	0	0	1 (2+)	0
Brain:								
Infiltration of macrophages in choroid plexus	0	0	0	0	1 (+)	1 (+)	2 (+)	3 (+)
Chronic vascular degeneration/fibrosis	0	0	0	0	1 (+)	0	1 (+)	3 (+)

Abbreviations: M: male, F: female, adm: administration, LM: light microscopy, NA: not applicable
Grades of side effects: + : minimal, 2+: slight, 3+: moderate, 4+: marked, PAS: Periodic Acid Schiff,

[a]: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

[b]: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

[c]: Number of animals with observation (interval of grades of side effects), [d] : Only observations considered to be treatment-related are shown

表 2.6.7.15 - Study in juvenile animals - 3-month toxicity study in monkeys (continued)

Test Article: aflibercept

Report Title: A 3-month intravenous toxicity study of VEGF trap in cynomolgus monkeys with a 5-month recovery period [670144] and [670144 Amendment 01]								
Dose (mg/kg/adm)	**Control (placebo)**		**0.5**		**3**		**30**	
Number of Animals on Study	**M: 5** *a*	**F: 5** *a*	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5** *a*	**F: 5** *a, b*	**M: 5** *a*	**F: 5** *a*
Histopathology: (Recovery sacrifice, LM) *c, d*:								
Number of animals examined	2	2	0	0	2	2	2	2
Bone- vertebrae (cervical, lumbar and/or thoracic):								
Osteocartilaginous exostosis	0	0	-	-	0	0	1 (3+)	2 (+ to 2+)
Myofiber atrophy of axial musculature	0	0	-	-	0	0	1 (+ to 2+)	0
Nasal cavities/ sinuses :								
Degeneration/regeneration respiratory and/or olfactory epithelium	0	0	-	-	0	1 (2+)	2 (2+ to 3+)	2 (+ to 3+)
Hemorrhage	0	0	-	-	0	0	0	1 (+)
Suppurative exudate	0	0	-	-	0	0	2	0 (+)
Kidneys: Increased PAS+ deposits	0	1 (+)	-	-	0	0	1 (+)	0
Brain: Infiltration of macrophages in choroid plexus	0	0	-	-	0	0	1 (+)	0
Conclusions: The NOAEL was not determined								

Abbreviations: M: male, F: female, adm : administration, LM: light microscopy; NOAEL: no observed adverse effect level, -: data unavailable
Grades of side effects: +: minimal, 2+: slight, 3+: moderate, 4+: marked, PAS: periodic acid schiff,

a: 2 animals from this group were used for evaluation of reversibility of test article-related toxicity

b: 3 females out of 5 were dosed at 2.44 mg/kg/adm for the entire duration of dosing period

c: Number of animals with observation

d: Only observations considered to be treatment-related are shown

16　局所刺激性試験

表 2.6.7.16 - Local Tolerance

Test Article: aflibercept

Report Title: Single-dose local intravenous, intramuscular and subcutaneous tolerance study in female rabbits						
Species/Strain or In Vitro Assay	**Method of Administration**	**Concentration**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**	**Location**
Rabbit / New Zealand white	Single intravenous, intramuscular and subcutaneous injection[a]	Formulation F1 [b]: 24.4 mg/mL or Formulation F2 [b]: 25 or 100 mg/mL	3F	**Food consumption**: decrease or absence of food intake at 100 mg/mL (F2) in 1/3 animals treated by intravenous and intramuscular routes on Day 4 and in 2/3 animals treated by subcutaneous route on Days 1 and/or 2 and 7 **Body weights**: minimal body weight loss or reduced body weight gain on Day 8 in animals treated with 100 mg/mL regardless of the route administration **Local reactions:** No compound-related local reactions in ears, thigh muscles and flank skins at any concentration and regardless of the route administration	[DSE 20[redacted]-0387 (TOL1079)]	4.2.3.6

Abbreviations: F: female

[a]: The dosing volume was 1 ml for intravenous route and 0.5 ml for intramuscular and subcutaneous injections

[b]: F1: Saline solution with [redacted]% (w/v) sucrose and [redacted]% (w/v) polysorbate 20, pH[redacted] F2 : [redacted] mM [redacted], [redacted]% (w/v) [redacted], [redacted]% (w/v) [redacted] and [redacted]% (w/v) [redacted], pH[redacted]

17　その他の毒性試験

表 2.6.7.17A - Other Toxicity Studies - Cross-reactivity with human tissue

Test Article: aflibercept

Report Title: Cross-reactivity of VEGF Trap with human tissue *ex vivo*							
Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Incubation**	**Concentration**	**Slide / condition**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**	**Location**
Human	Biotin-conjugated aflibercept applied to cryosections from various human tissues *a, b*	*c*	5 and 25 µg/mL	1	No specific staining observed in a panel of representative human tissues from three separate individuals	[01-141]	4.2.3.7.7

a- Biotin-conjugated aflibercept solution was formulated at mg/mL in PBS, % glycerol, pH

b- 35 different normal tissues from three separate individuals

c- defined in a separate non-GLP study to obtain optimal binding conditions

表 2.6.7.17B - Other Toxicity Studies - Evaluation of hemolysis and flocculation in monkey blood and serum

Test Article: aflibercept

Report Title: Evaluation of VEGF Trap to induce hemolysis in monkey blood and to induce flocculation in monkey plasma and serum							
Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Incubation**	**Concentration**	**Tube / condition**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**	**Location**
Monkey	Mix of 1 mL monkey blood, serum and plasma with 1 mL 0.9% NaCl or 1 mL isosmolar placebo or 1 mL aflibercept solution [a]	45 min for hemolysis assay 30 min for flocculation assay	0.69, 2.09, 4.17 mg/mL	1	**Hemolysis assay:** No hemolysis with test articles **Flocculation assay**: No flocculation with test articles in any of the blood components	[HEM-No1]	4.2.3.7.7

a- aflibercept solution was formulated in saline solution with [redacted]% (w/v) sucrose and [redacted]% (w/v) polysorbate 20, pH[redacted] The isosmolar placebo was the same solution without protein.

表 2.6.7.17C - Other Toxicity Studies - Evaluation of hemolysis and flocculation in human blood and serum

Test Article: aflibercept

Report Title: Evaluation of VEGF Trap to induce hemolysis in whole blood from humans and to induce flocculation in human plasma and serum							
Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Incubation**	**Concentration**	**Tube / condition**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**	**Location**
Human	Mix of 1 ml human blood, serum and plasma with 1 ml 0.9% NaCl or 1 ml isosmolar placebo or 1 ml aflibercept solution [a]	45 min for hemolysis assay 30 min for flocculation assay	0.5, 2.0 and 4.0 mg/mL	1	**Hemolysis assay:** No hemolysis with test articles **Flocculation assay**: No flocculation with test articles in any of the blood components	[HEM-No3]	4.2.3.7.7

a- aflibercept solution was formulated in saline solution with [redacted]% (w/v) sucrose and [redacted]% (w/v) polysorbate 20, pH[redacted] The isosmolar placebo was the same solution without protein.

表 2.6.7.17D - Other Toxicity Studies - Evaluation of hemolysis and flocculation in human blood and serum

Test Article: aflibercept

Report Title: Evaluation of VEGF Trap to induce hemolysis in whole blood from humans and to induce flocculation in human plasma and serum							
Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Incubation**	**Concentration**	**Tube / condition**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**	**Location**
Human	Mix of 1 mL human blood, serum and plasma with 1 mL 0.9% NaCl or 1 mL aflibercept solution [a]	45 min for hemolysis assay 30 min for flocculation assay	8.0 mg/mL	1	**Hemolysis assay:** No hemolysis with test articles **Flocculation assay**: No flocculation with test articles in any of the blood components	[HEM-No5]	4.2.3.7.7

a- aflibercept solution, formulated in saline solution with [redacted]% (w/v) sucrose and [redacted]% (w/v) polysorbate 20, pH[redacted], was diluted with 0.9% NaCl