2.6.6 毒性試験の概要文

目次

1　まとめ 5
2　単回投与毒性試験 9
3　反復投与毒性試験 9
3.1　マウス 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2740） 9
3.2　マウス 4 週間反復静脈内投与毒性試験（T16228） 11
3.3　ラット 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF3310） 11
3.4　サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2710） 12
3.5　サル 13 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（RF4990） 14
4　遺伝毒性試験 17
5　がん原性試験 17
6　生殖発生毒性試験 17
7　局所刺激性試験 18
8　その他の毒性試験 19
8.1　マウスのアナフィラキシー様反応の発現機序に関する試験（IONC-TI[redacted]-003RVT） 19
8.2　ヒト及びカニクイザルの全血及び PBMC のサイトカイン放出試験（T17985 及び T17986） 20
8.3　ヒト PBMC のサイトカイン放出試験：複数ヒトドナーの比較（[redacted]-DA471-N0） 22
8.4　カニクイザル正常組織を用いた TCR 試験（20015187） 22
8.5　ヒト正常組織を用いた TCR 試験（20015186） 24
8.6　光毒性試験 26
8.7　毒性試験に用いたアベルマブ調製液の均一性及び安定性試験（RF5050、RF5710、RF5060 及び RF5720） 26
8.8　原薬及び製剤中の不純物、添加物及び溶出物の毒性学的評価 27
9　考察及び結論 27
10　図表 29
11　参考文献 29

表目次

表 2.6.6 - 1 アベルマブの毒性試験の概要 7
表 2.6.6 - 2 サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験の TK データの概要 13
表 2.6.6 - 3 サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験で測定した血清中サイトカイン及びケモカイン 14
表 2.6.6 - 4 サル 13 週間反復静脈内投与毒性試験の TK データの概要 16
表 2.6.6 - 5 測定したヒトのサイトカイン 20
表 2.6.6 - 6 測定したカニクイザルのサイトカイン 21
表 2.6.6 - 7 サル反復投与毒性試験とヒト臨床試験のアベルマブ曝露量の比較 28

略語一覧

ADA	Anti-drug antibodies	抗薬物抗体
AUC	Area under the concentration-time curve	血中濃度－時間曲線下面積
AUC_{168}	Area under the concentration-time curve from 0 to 168 hours	0 時から 168 時間までの血中濃度－時間曲線下面積
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CRA	Cytokine release assay	サイトカイン放出試験
ECG	Electrocardiogram	心電図
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
ICH	International conference on harmonization of technical requirements and registration of pharmaceuticals for human use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IFN	Interferon	インターフェロン
IgE	Immunoglobulin E	免疫グロブリン E
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL	Interleukin	インターロイキン
IL-1RA	Interleukin-1 receptor antagonist	インターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト
IP-10	Interferon-inducible protein 10	インターフェロン誘導タンパク質 10
KD	Dissociation constant	解離定数
LPS	Lipopolysaccharides	リポポリサッカライド
M/E	Myeloid/erythroid	骨髄球/赤芽球
MAHA	Mouse anti-human antibody	マウス抗ヒト抗体
MAP	Multi analyte profiling	
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1	単球走化性タンパク-1
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
NK	Natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
PAF	Platelet activating factor	血小板活性化因子

PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核球
PDE	Permitted daily exposure	1 日許容曝露量
PD-1	Programmed death 1	プログラム細胞死 1
PD-L	Programmed death ligand	プログラム細胞死リガンド
PD-L1	Programmed death ligand 1	プログラム細胞死リガンド 1
PHA	Phytohemagglutinin	フィトヘマグルチニン
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
SEA	Staphylococcal enterotoxin A	ブドウ球菌腸管毒素 A
$t_{1/2}$	Half-life time	半減期
TCR	Tissue cross reactivity	組織交差反応性
TGF	Transforming growth factor	トランスフォーミング増殖因子
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF	Tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
UV	Ultraviolet	紫外線
UV-VIS	Ultraviolet-visible	紫外線－可視光

1　まとめ

アベルマブ（毒性試験の最終報告書では MSB0010718C 及び MSB0010718 と記載）はプログラム細胞死リガンド 1（programmed death ligand 1、PD-L1）に結合し、PD-L1 とその受容体であるプログラム細胞死 1（programmed death 1、PD-1）の相互作用を阻害することにより、癌免疫療法薬として有効性が期待される完全ヒト IgG1 抗体である。

複数の動物種の PD-L1 に対するアベルマブの結合親和性の結果に基づき、本薬の毒性試験のための適切な動物種として、最初にマウス及びカニクイザルを選択した。結合親和性はマウス、カニクイザル及びヒトの PD-L1 で類似していたが［解離定数（dissociation constant、KD）がそれぞれ 0.9 nM、1.1 nM 及び 0.7 nM］、ラット、ウサギ及びイヌの PD-L1 では明らかに前者より低かった（KD がそれぞれ 66.8 nM、105.4 nM 及び 4.5 nM）。ただし、マウスでアベルマブの反復投与後に重度のアナフィラキシー反応が認められたのに加え、ラットではアベルマブの結合親和性が低いことから（Module 2.6.2.2.1.1 参照）、アベルマブの毒性を評価する動物種としてげっ歯類は適切ではないと考えられた。そのため、カニクイザルのみでアベルマブの重要な毒性試験を実施した。

アベルマブの毒性学的プロファイルは、先ず、マウス、ラット及びカニクイザルを用いて週 1 回の急速静脈内投与又は点滴静脈内投与による 4 週間反復投与毒性試験（RF2710、RF2740、RF4990、RF3310 及び T16228）で評価した。更に、適切な動物種と考えられたカニクイザルで、アベルマブの週 1 回、13 週間の間欠点滴静脈内投与（約 90 分かけて投与）に続き 8 週間の回復期間を設けた反復投与毒性試験（RF4990）を実施し、毒性とその回復性も評価した。トキシコキネティクス（toxicokinetics、TK）データは、マウス、ラット及びサルの 4 週間反復投与毒性試験並びにサルの 4 週間及び 13 週間反復投与毒性試験から得た。アベルマブの免疫原性は、マウス（RF2740 試験）、ラット（RF3310）及びサル（4 週：RF2710 及び 13 週：RF4990）で検討した。

更に、最初のマウスの 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2710）で観察された所見を検討するため、追加のマウスの反復静脈内投与毒性試験（T16228）と、発現機序解明に関するマウスの反復静脈内投与試験（IONC-TI[redacted]-003RVT）を実施した。

アベルマブの急速及び点滴静脈内投与後の局所刺激性の検討は、反復投与毒性試験（T16228 を除く）の中で実施した。静脈内投与経路はアベルマブの臨床適用経路である。サルの反復投与毒性試験に使用されたアベルマブ調製液（280 mM マンニトール、10 mM 酢酸ナトリウム、1.4 mM メチオニン、0.05%ポリソルベート 20、pH5.5）は、[redacted]である。なお、メチオニンは市販製剤であるプロセス B 製剤には含まれない。

日米 EU 医薬品規制調和国際会議（international conference on harmonization of technical requirements and registration of pharmaceuticals for human use、ICH）S6（R1）及び S9 ガイドラインに基づき、安全性薬理に関連するパラメータの評価をカニクイザルの 4 週間及び 13 週間の反復投与毒性試験の一部として実施した（モジュール 2.6.2.4 参照）。

アベルマブのマウス及びラットの反復投与毒性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice、GLP）の非適用下で実施した。サルの 4 週間反復投与毒性試験（RF2710）は、安全性薬理学的評価、multi analyte profiling（MAP）、血液免疫表現型検査、TK 及び免疫原性の評価を除き、GLP 適用下で実施した。サルの 13 週間反復投与毒性試験（RF4990）は、血液免疫表現型検査を除き、GLP 適用下で実施した。試験の一部を GLP の非適用下実施したことは、試験全体の評価及び結果には影響を及ぼさないと考えられた。

ICH S6（R1）ガイドラインに基づき、アベルマブの単回投与毒性試験、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。アベルマブの急性毒性の評価はサルの 4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験の初回投与後にそれぞれ実施した。アベルマブの生殖発生毒性試験は実施しなかったが、本薬のカニクイザルの反復投与毒性試験の結果及び PD-1/PD-L1 に関連する既存文献から生殖発生毒性を評価した（Austin 2016）。成人の進行癌患者を対象とするアベルマブの適応を考慮し、幼若動物を用いた毒性試験も実施しなかった。

アベルマブの in vitro サイトカイン放出試験（cytokine release assay、CRA）を、ヒト及びカニクイザルの全血及び末梢血単核球（PBMC）を用いて GLP 非適用下で実施した。続いて、フィトヘマグルチニン（phytohemagglutinin、PHA）で刺激したヒト PBMC を用いて最適化した CRA も実施した（8.3 項参照）。

更に、アベルマブの組織交差反応性（tissue cross-reactivity、TCR）試験を、ヒト及びカニクイザルの正常組織を用いて GLP 適用下で実施した。また、アベルマブによる紫外線（ultra violet、UV）-可視光（visible、VIS）吸収に関するデータ（GLP 非適用）に基づき、本薬の光毒性の評価を実施した。アベルマブ製剤の容器及び栓から溶出する可能性のある不純物の毒性学的評価も実施した（8.8 項及びモジュール 3.2.P.2.4 参照）。

GLP 非適用下で実施した試験又は試験の一部は、データの質と完全性を保証するための社内手順書に従った。

アベルマブ製剤に含まれる全添加物は日本薬局方及び日本の医薬品添加物規格に適合する。

アベルマブの毒性試験の概要を GLP 適用の有無と共に、表 2.6.6 - 1 に示す。カニクイザルの 4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験並びにヒトとカニクイザルの正常組織を用いた TCR 試験は評価資料とし、その他の試験は参考資料とした。

表 2.6.6 - 1　アベルマブの毒性試験の概要

試験の種類 及び期間	試験系	投与方法	投与用量 （mg/kg）	GLP 適用	報告書番号
反復投与毒性試験					
4 週間	CD-1 マウス	静脈内、週 1 回	0、20、40、140	非適用	RF2740
4 週間	CD-1 マウス	静脈内、週 1 回	0、20	非適用	T16228
4 週間	Wistar Han ラット	静脈内、週 1 回	0、20、40、140	非適用	RF3310
4 週間	カニクイザル	静脈内、週 1 回	0、20、60、140	適用 [a]	RF2710
13 週間＋8 週間（回復）	カニクイザル	静脈内、週 1 回	0、20、60、140	適用 [b]	RF4990
その他の毒性試験					
アナフィラキシー様反応の発現機序に関する試験	CD-1 マウス	静脈内、週 1 回	5、20	非適用	IONC-TI[redacted]-003RVT
サイトカイン放出試験	ヒト及びカニクイザル全血	in vitro	0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10、100 nM	非適用	T17985
サイトカイン放出試験	ヒト及びカニクイザル PBMC	in vitro	0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10、100 nM	非適用	T17986
サイトカイン放出試験	ヒト PBMC	in vitro	13.9、69.52、131.04、695.2、1390.4、6952、13904 nM	非適用	[redacted]-DA471-N0
TCR 試験	カニクイザル組織	in vitro	1、15 µg/mL	適用	20015187
TCR 試験	ヒト組織	in vitro	1、15 µg/mL	適用	20015186
UV-VIS 吸収プロファイル	該当せず	(UV-VIS 吸収)	該当せず	非適用	モジュール 3.2.S.3.1 参照
その他					
溶液中の濃度分析法バリデーション試験	該当せず	([redacted])	該当せず	非適用	RF5050
溶液中の濃度分析法バリデーション試験	該当せず	([redacted])	該当せず	非適用	RF5710
均一性及び安定性試験	該当せず	([redacted])	該当せず	適用	RF5060
均一性及び安定性試験	該当せず	([redacted])	該当せず	適用	RF5720

GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、[redacted]、PBMC：末梢血単核球、UV：紫外線、UV-VIS：紫外線－可視光、TCR：組織交差反応性

a　安全性薬理学的評価、multi analyte profiling、血液免疫表現型検査、トキシコキネティクス及び免疫原性の評価は GLP 非適用下で実施したが、データの信頼性を担保するための社内手順に従って実施した。

b　血液免疫表現型検査は GLP 非適用下で実施したが、データの信頼性を担保するための社内手順に従って実施した。

カニクイザルの 4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験でのアベルマブの忍容性は高く、全身毒性の無毒性量（no-observed-adverse-effect-level、NOAEL）は 140 mg/kg であった。これらの試験での最高用量である 140 mg/kg は、投与容量と投与液濃度の上限に基づくアベルマブの最大投与可能量である。4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験で実施した安全性薬理学的評価では、アベルマブは最高用量まで心血管系、呼吸系、中枢神経系のいずれの機能に対しても悪影響を及ぼさなかった。

局所刺激性に関しては、サルの 13 週間反復静脈内投与毒性試験で、アベルマブ投与群の投与部位反応が、用量依存性はないものの、対照群と比べてわずかに増加した。しかしながら、最高用量の 140 mg/kg までの群で投与部位に認められた所見はいずれも毒性学的に重要な変化ではなく、休薬により完全に回復した。

TK に関しては、サルの試験で投与期間終了時に血中アベルマブ曝露の最高値が認められた。全動物で血中に各投与後 168 時間まで測定可能な濃度のアベルマブが認められたことから、動物が持続的にアベルマブに曝露されていたことが確認された。13 週間反復投与毒性試験では、いずれの群にも血中に抗薬物抗体（anti-drug-antibodies、ADA）は検出されなかった。

生殖器への影響に関しては、TCR 試験でヒト及びカニクイザル由来の雌雄生殖器へのアベルマブの結合が認められた。サルの反復投与毒性試験の雌雄生殖器の病理組織学的検査では、最高用量の 140 mg/kg まで毒性所見は認められなかった。すなわち、雌雄の生殖能にアベルマブによる直接的影響を示唆する所見は得られなかった。ただし、試験動物の一部（特に雄）は性成熟に達していなかった。

PD-1/PD-L1 の相互作用の阻害が妊娠中の流産や出生児の死亡のリスクを増加させることが報告されている。しかし、出生児の奇形を増加させるリスクを示唆するデータは得られていない。PD-L1 の役割は妊娠の成立に対して必須ではないものの、アベルマブ投与が胚・胎児発生に対して影響を及ぼす可能性は否定できない。また、IgG 抗体の乳汁中への分泌が知られていることから、アベルマブも乳汁中に分泌される可能性があると考えられる（Austin 2016）。

最適化した方法を用いた CRA 試験で、アベルマブは 16 名のドナーから得た PBMC からの複数種のサイトカインの放出を増加させた。女性ドナーから得た活性化した PBMC では、主にインターロイキン（interleukin、IL）-6 及び腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor、TNF）-α の放出が誘発され、男性ドナーから得た PBMC では、それらに加え、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（granulocyte-macrophage colony-stimulating factor、GM-CSF）及び IL-10 の放出も誘発された。更に、薬力学的マーカーである単球輸送因子（monocyte chemoattractant protein-1、MCP-1）の放出も、ほぼ全てのドナーで誘発された。男性ドナーに比べて、女性ドナーから得た PBMC では、より強い MCP-1 の放出が認められた。

TCR 試験でのヒト及びカニクイザルの正常組織のアベルマブによる染色は同等であり、このことからも、アベルマブの毒性試験に用いる適切な動物種として、カニクイザルが適切であることが示唆された。

アベルマブの光毒性を UV-VIS 吸収プロファイルに基づき評価した結果、光毒性を誘発する可能性は認められなかった。

アベルマブ製剤の容器及び栓から溶出する可能性のある毒性学的リスクのある不純物は認められなかった（モジュール 3.2.P.2.4 参照）。

2　単回投与毒性試験

アベルマブでの独立した単回投与毒性試験は実施しなかった。アベルマブの急性毒性は、カニクイザルの 4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験の初回投与後に評価した（3.4 項及び 3.5 項参照）。

カニクイザルに 0（溶媒）、20、60 及び 140 mg/kg のアベルマブを初回投与後、一般状態を観察した。その結果、いずれの用量でも死亡や毒性所見は観察されなかった。したがって、アベルマブの概略の致死量は、140 mg/kg 超と考えられた。

3　反復投与毒性試験

アベルマブの反復投与毒性試験は、マウス、ラット及びサルを用いて週 1 回の静脈内投与により実施した。

3.1　マウス 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2740）

添付資料番号：4.2.3.2.1（参考資料）

0（対照群）、20、40 及び 140 mg/kg のアベルマブを、各群雌雄各 10 匹の CD-1 マウスに週 1 回 4 週間（計 5 回）にわたり静脈内投与した（モジュール 2.6.7.6 参照）。最高用量の 140 mg/kg は、アベルマブの投与容量及び投与液濃度の上限に基づく最大投与可能量である。更に、各群雌雄各 6 匹のサテライト動物を用いて TK の測定、各群雌雄各 3 匹でリンパ球表現型の検査、各群雌雄各 6 匹で ADA と免疫グロブリン（immunoglobulin、Ig）G 及び IgE の測定を実施した。対照群の動物には、溶媒のみ（10 mM 酢酸ナトリウム、140 mM 塩化ナトリウム、0.05% Tween 20、pH6.0）を投与した。投与容量は、全群とも 14 mL/kg とした。投与は、0.05 mL/秒を超えない速度で尾静脈内に行った。

20、40 及び 140 mg/kg のアベルマブを投与した各 50 例のマウス（サテライト群を含む）のうち、それぞれ 23 例（46%）、17 例（34%）及び 7 例（14%）が、投与後 30 分以内に死亡した。死亡は主に 20 mg/kg 投与群で第 3 回投与後（15 日）、40 mg/kg 投与群及び 140 mg/kg 投与群で第 4 回（22 日）及び第 5 回（29 日）投与後に発生した。これらのマウスでは、後肢の麻痺、腹臥位、鎮静及び呼吸困難が投与直後にみられ、外来抗原の投与に対するアナフィラキシー反応の症状と一致するものであった。

20 又は 40 mg/kg のアベルマブを投与後に生存していた数例の雌は、第 2 回又は第 3 回投与後から投与後 2 時間までの間に一過性の腹臥位又は自発運動の低下を示した。140 mg/kg 投与群の生存動物に一般状態の異常は認められなかった。体重及び摂餌量には影響が認められなかった。

リンパ球数の減少傾向が全てのアベルマブ投与群で認められ、特に 140 mg/kg 投与群でその傾向が強かった。全ての被験物質投与群で、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼが対照群と比較して高値を示す動物が認められた。アルブミン/グロブリン比のわずかな低下が、雄の 40 及び 140 mg/kg 投与群と雌の全てのアベルマブ投与群で認められた。

尿検査値に被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

免疫表現型検査で、用量依存性は明確ではなかったものの、アベルマブ投与群で 9 日及び 30 日に細胞傷害性 T 細胞の顕著な減少が認められ、これに関連して総リンパ球数の減少もみられた。ヘル

パーT 細胞及びナチュラルキラー（natural killer、NK）細胞を含め、他のリンパ球サブセットには、全ての用量及び全ての試料採取時点でアベルマブ投与に関連した変化は認められなかった。

TK の結果から、アベルマブの血中半減期は、45～91 時間を範囲とした一部の例外を除き、全ての用量で概ね 60～80 時間と類似しており、性差はないことが示された。アベルマブの曝露量は、ほぼ用量に比例して増加した。アベルマブ曝露量に蓄積性は認められず、5 回投与後の曝露量は初回投与後とほぼ同程度であった。

アベルマブを投与したマウス 36 例のうち 14 例（38.9%）で、ADA が検出された。ADA 陽性動物の発現頻度は 20 mg/kg 投与群（5 例）及び 40 mg/kg 投与群（6 例）で高かった。最高用量の 140 mg/kg 投与群では ADA 発現頻度（3 例）が低かったが、その原因として、試料中のアベルマブが免疫原性の測定系に干渉した可能性が高い（モジュール 2.6.4.3.3 参照）。雌マウスでは雄マウスと比較して約 2 倍（9 対 5）ADA 陽性動物が多かったことから、雌マウスでアベルマブに対する免疫原性が高い傾向にあることが示唆された。アベルマブの TK と免疫原性の評価は異なるサテライト群を設けて実施したことから、同一個体での薬物動態と ADA 産生との間の直接的比較はできなかった。

アベルマブ投与群の血清 IgG 濃度に、対照群と比較して、アベルマブ投与に関連した変化は認められなかった。

病理学的検査では、肉眼所見及び臓器重量にアベルマブ投与に関連した変化はみられなかった。

病理組織学的検査では、アベルマブが肝臓、様々な臓器又は組織の血管及び心臓に、投与に関連した変化を引き起こすことが示された。肝臓では、類洞内皮細胞（主にクッパー細胞）の増加、小肉芽腫（炎症性単核細胞からなる）及び肝細胞壊死（単細胞又は巣状）が、全用量の一部の雄又は雌にみられた。様々な臓器又は組織に血管の肉芽腫性炎症（血管炎）及び脳にごく軽度の血管周囲への単核細胞浸潤が、20 及び 140 mg/kg 投与群の雄と雌の各 1 例で認められた。心臓の炎症性変化（新生大動脈又は心筋を含む）が 40 及び 140 mg/kg 投与群の雄 1 例及び 2 例で認められた。前述の血管炎は、血管への免疫複合体沈着による肉芽腫性炎症反応に典型的な形態学的像を呈した。

その他に、用量依存性のない変化として、ごく軽度から中等度のリンパ球減少又はリンパ組織の委縮又は線維芽細胞増殖が、全てのアベルマブ投与群の少数例に認められた。140 mg/kg 投与群の 10 例中 3 例に脾臓のリンパ球減少が認められ、それに関連して一部の動物ではごく軽度の骨髄過形成も認められた。140 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に大腿骨及び胸骨の骨髄に軽度の骨髄細胞減少又は低形成が認められ、雌では関連して線維性組織増殖の初期像がみられた。更に、骨髄球/赤芽球（myeloid/erythroid、M/E）比のごく軽度又は軽度な上昇が、20 mg/kg 群の雌 1 例及び 140 mg/kg 群の雄 2 例でみられた。投与部位（尾部）では、炎症性及び変性性の変化並びに出血が認められたが、アベルマブ投与群と対照群との間に程度の差はみられなかった。したがって、投与部位反応はアベルマブに起因する毒性とは考えられなかった。

全体として、全ての用量で死亡が認められたため（死亡率は用量に反比例）、本試験で最大耐量（maximum tolerated dose、MTD）を確認することはできなかった。死亡前の一般状態及び病理組織学的所見（血管への免疫複合体沈着）はマウスでのアナフィラキシー反応を強く示唆するものであった(発現機序に関する詳細は 8.1 項参照)。

3.2　マウス 4 週間反復静脈内投与毒性試験（T16228）

添付資料番号：4.2.3.2.2（参考資料）

先に実施した CD-1 マウスを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2740）でアベルマブ投与後に認められたアナフィラキシー様反応を更に検討するため、2 回目の試験を実施した（モジュール 2.6.7.6 参照）。

20 mg/kg のアベルマブを、雌雄各 50 匹の CD-1 マウスに週 1 回 4 週間にわたり反復静脈内投与（1、8、15、22 及び 29 日、計 5 回）した。対照群の動物には、溶媒のみ（280 mM マンニトール、10 mM 酢酸塩、1.4 mM メチオニン、pH 5.5、0.05% Tween 20）を投与した。対照群には、雄 32 匹及び雌 37 匹を用いた。アベルマブ投与群で一般状態変化がみられた動物は安楽死させ、剖検した。アベルマブ投与群の剖検に合わせて、対照群の動物も剖検した。

投与直後によろめき歩行及び自発運動の低下という一般状態変化を示した動物は、全例、採血後に剖検を行った。採取した血液試料を用いて、IgE、IgG、血小板活性化因子（platelet activating factor、PAF）、ヒスタミン、サイトカイン及び ADA の測定を予定していたが、試料の容量が非常に限られており、更に、試料中に溶血が認められたことから、測定は行わなかった。

20 mg/kg のアベルマブを週 1 回静脈内投与した CD-1 マウス（雄の 64%及び雌の 74%）は、先に実施した CD-1 マウスを用いた 4 週間反復投与毒性試験（RF2740）で観察されたものと同様の一般状態変化を示した。

結論として、本試験は一般状態変化及び死亡を含め、先に実施した CD-1 マウスを用いた 4 週間反復投与毒性試験（RF2740）の結果を再現した。本試験に続き、アベルマブ投与によるマウスでの急性反応（アナフィラキシー様反応）の機序解明のための試験を実施した（IONC-TI[redacted]-003RVT、8.1 項参照）。

3.3　ラット 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF3310）

添付資料番号：4.2.3.2.3（参考資料）

0（対照群）、20、40 及び 140 mg/kg のアベルマブを、各群雌雄各 6 匹の Wistar Han ラットに週 1 回 4 週間（計 5 回）にわたり静脈内投与した（モジュール 2.6.7.6 参照）。更に、各群雌雄各 6 匹のサテライト動物を用いて、TK 及び ADA の測定を実施した。対照群の動物には、溶媒のみ（280 mM マンニトール、10 mM 酢酸塩、1.4 mM メチオニン、0.05% Tween 20、pH 5.5）を投与した。投与容量は全群で 14 mL/kg とした。投与は、0.05 mL/秒を超えない速度で尾静脈内に行った。

全例が計画屠殺時まで生存した。一般状態、体重及び摂餌量にアベルマブ投与の影響はみられなかった。血液学的検査で、40 mg/kg 投与群の雌及び 140 mg/kg 投与群の雌雄で、投与期間終了時に統計学的に有意なプロトロンビン時間の短縮が認められた。更に、活性化部分トロンボプラスチン時間が同群の雌で短縮した。血液生化学的検査、尿検査、リンパ球免疫表現型検査、IgG 及び IgE 濃度に変化はみられなかった。

アベルマブを投与した全動物が全試験期間を通してアベルマブに曝露された。曝露量は用量にほぼ比例して増加した。終末相半減期は 94～144 時間であった。全用量で、多くの動物のアベルマブ血中濃度にピーク及びトラフでの蓄積性（200%まで）が認められた。性差は認められなかった。

アベルマブを投与したサテライト群の 36 例中 8 例（25%）、すなわち、20 mg/kg 投与群の雄 3 例、40 mg/kg 投与群の雌 2 例及び 140 mg/kg 投与群の雌 3 例が、ADA 陽性であった。高用量のアベルマブの投与とそれに基づく薬物干渉により、ADA は酸解離法によってのみ検出され、Biacor 法によっては検出されなかった。20 mg/kg 投与群の ADA 陽性動物 3 例中 2 例及び 40 mg/kg 投与群の ADA 陽性動物 2 例中 1 例で、初回投与後に比べて 5 回目の投与後にアベルマブの血中濃度の速やかな低下が認められたことから、ADA がアベルマブの薬物動態に影響を及ぼすことが示唆された。一方、140 mg/kg 投与群の雌の ADA 陽性動物 3 例では、アベルマブの薬物動態に大きな影響は認められなかった。

病理学的検査では、アベルマブ投与に関連した肉眼所見や臓器重量の変化はみられなかった。

病理組織学的検査では、対照群及び全てのアベルマブ投与群の雌雄で、肝臓に多巣性の単核細胞浸潤のわずかな増加及び類洞内皮細胞のわずかな増加（主にクッパー細胞活性化、一部小肉芽腫形成を伴う）が認められた。これらの変化は肝臓でよくみられる所見であり、用量依存性はみられなかったものの、アベルマブ投与群では対照群よりも変化の程度がわずかに強かった。したがって、本変化とアベルマブ投与との関連性は否定しきれなかった。投与部位（尾部）にアベルマブ投与に関連する変化はみられなかった。

本試験条件下では、アベルマブのラットへの週 1 回静脈内投与は、全身及び局所で 140 mg/kg まで忍容性を示した。したがって、本試験におけるアベルマブの NOAEL を 140 mg/kg と判断した。

3.4　サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2710）

添付資料番号：4.2.3.2.4

0（対照群）、20、60 及び 140 mg/kg のアベルマブを、各群雌雄各 2 匹のカニクイザルに週 1 回、4 週間（1、8、15、22 及び 29 日の計 5 回）にわたり、点滴静脈内投与した（モジュール 2.6.7.7A 参照）。投与容量は 15 mL/kg とし、全量を 10 mL/kg/h の投与速度で約 90 分かけて投与した。対照群の動物には、溶媒のみ（280 mM マンニトール、10 mM 酢酸ナトリウム、1.4 mM メチオニン、0.05% Tween 20、pH 5.5）を同じ容量で、同様に 10 mL/kg/h の速度で約 90 分かけて投与した。投与は、後肢の静脈内に行った。最高用量の 140 mg/kg は、アベルマブの投与液濃度と投与容量の上限に基づく最大投与可能量である。

試験期間中に、死亡及び一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、眼科学的検査、安全性薬理学的評価［対照群及び 140 mg/kg 投与群で心電図（electrocardiogram、ECG）、動脈圧、心拍数、呼吸数、中枢神経系（central nervous system、CNS）評価、直腸温］、臨床検査［血液学的検査（血液凝固系検査を含む）、血液生化学的検査、尿検査、免疫表現型検査］、TK、免疫原性の評価及び血清試料を用いた MAP によるケモカイン並びにサイトカインの測定を実施した。

投与期間終了時に、病理学的検査（剖検、予め定めた臓器の重量測定及び病理組織学的検査）を実施した。病理組織学的検査は、剖検時に異常の認められた組織についても実施した。

いくつかの検査項目を除き、試験は GLP 適用下で実施した。GLP 適用下で実施しなかった検査項目は、安全性薬理学的評価、血液免疫表現型検査、TK、免疫原性の評価及び MAP によるケモカイン並びにサイトカインの測定であり、これらの検査はデータの信頼性を担保するための社内手順書に従って実施した。

試験中に死亡は発生しなかった。アベルマブ投与に関連した一般状態の変化は認められず、体重及び摂餌量にも影響はみられなかった。眼科学的検査でもアベルマブ投与に関連した変化はみられなかった。心拍数、ECG、動脈圧、呼吸数、CNS（機能観察総合評価から選択したパラメータ）及び体温には、アベルマブ投与の影響はみられなかった。

血液学的検査では、140 mg/kg 投与群で試験終了時点に総リンパ球数のわずかな減少が認められた。なお、血液凝固系への影響はみられなかった。

血液生化学的検査及び尿検査値への影響も認められなかった。

アベルマブ投与群のサルでは全試験期間を通してアベルマブへの曝露が確認された。アベルマブの曝露量はいずれの採血日にも用量の増加にほぼ比例して増加し、蓄積又は性差はいずれの用量でも認められなかった。半減期（58～70 時間）は全用量で類似していた。TK データの概要を表 2.6.6 - 2 に示す。

表 2.6.6 - 2　サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験の TK データの概要

投与用量	20 mg/kg	60 mg/kg	140 mg/kg
用量比	1	3	7
動物数	4（雄 2、雌 2）	4（雄 2、雌 2）	4（雄 2、雌 2）
1 日			
AUC_{168} (μg·h/mL)	23200	87900	201000
$t_{1/2}$ (h)	62.2	62.2	58.9
CL (mL/h/kg)	0.709	0.588	0.593
C_{max} (μg/mL)	409	1710	3680
22 日			
AUC_{168} (μg·h/mL)	26400	115000	227000
$t_{1/2}$ (h)	70.2	67.3	57.6
CL (mL/h/kg)	0.764	0.439	0.555
C_{max} (μg/mL)	451	2030	4410

データは雌雄合算の平均値を示す。
AUC_{168}：0 時から 168 時間までの血中濃度－時間曲線下面積、$t_{1/2}$：半減期、CL：全身クリアランス、C_{max}：最高血中濃度

アベルマブを投与した 12 例中 3 例（25%）で、15 日又は 22 日から、ADA が検出された。そのうち 2 例は 20 mg/kg 投与群の動物で、1 例が 140 mg/kg 投与群の動物であった。14 日以降に採取した血中のアベルマブ濃度が 20 mg/kg 投与群の ADA 陽性動物 2 例でわずかに低かったことから、ADA がアベルマブの薬物動態に影響することが示唆された。更に、そのうち 1 例では、4 回投与後のアベルマブの血中濃度が初回投与後に比べて速やかに低下した。一方、140 mg/kg 投与群の ADA 陽性動物では、アベルマブの薬物動態に ADA による影響はみられなかった。

フローサイトメトリーによる末梢血の免疫表現型検査では、投与期間終了時に 140 mg/kg 投与群で、総リンパ球数及び NK 細胞数に、アベルマブに起因すると推察されるわずかな減少がみられた。

アベルマブ投与に関連する臓器重量の変化及び投与部位局所を除く全身性の形態学的変化はみられなかった。

140 mg/kg 投与群で実施した心血管系の評価、特に ECG での心拍数で補正した QT（heart rate corrected QT、QTc）間隔、呼吸数、CNS 機能及び直腸温に、アベルマブ投与による影響は認められなかった（モジュール 2.6.2.4 参照）。

投与部位局所では、140 mg/kg 投与群で、皮下、血管周囲及び血管の変化（出血、混合性炎症性細胞浸潤、線維芽細胞増殖、並びに血管内皮の肥厚及び壊死）が対照群と比較して強かった。しかし、20 及び 60 mg/kg 投与群での局所変化は対照群でみられたものと同様であり、投与手技に起因するものであると考えられた。

将来的なアベルマブ投与後の薬力学的マーカーを評価するため、予め定めた時点で得た血清試料を用いて MAP を実施し、ケモカイン及びサイトカイン濃度を測定した。測定したケモカイン及びサイトカインを表 2.6.6 - 3 に示す。

表 2.6.6 - 3　サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験で測定した血清中サイトカイン及びケモカイン

IL-1RA	IL-8	IFN-α	IP-10
MCP-1	TGF-β	IL-10	TNF-β
IL-7	IL-1β	IL-17	MIP-1α
IL-2	IL-12 (p40)	IL-15	IL-6
TNF-α	IFN-γ	IL-4	IL-5

IFN：インターフェロン、IL：インターロイキン、IL-1RA：インターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト、IP-10：インターフェロン誘導タンパク質 10、MCP-1：単球走化性タンパク-1、MIP-1α：マクロファージ炎症性タンパク質 1α、TGF：トランスフォーミング増殖因子、TNF：腫瘍壊死因子

その結果、アベルマブは上記の免疫活性化に関与するケモカイン及びサイトカインに対して、検知可能な影響を与えなかった。

結論として、投与局所での忍容性は 60 mg/kg まで良好であると考えられた。一方、全身毒性の NOAEL は 140 mg/kg であると判断した。

3.5　サル 13 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（RF4990）

添付資料番号：4.2.3.2.5

0（対照群）、20、60 及び 140 mg/kg のアベルマブを、各群雌雄各 3 匹（対照群と 140 mg/kg 投与群は雌雄各 5 匹）のカニクイザルに週 1 回、13 週間（1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78 及び 85 日）にわたり、点滴静脈内投与した（モジュール 2.6.7.7B 参照）。最終投与の 1 週間後（92 日）に 20 及び 60 mg/kg 投与群の雌雄全例と、対照群及び 140 mg/kg 投与群の雌雄各 3 例を安楽死させ、剖検した。対照群及び 140 mg/kg 投与群の残りの雌雄各 2 例は、最終投与後 8 週間の回復期間後に安楽死させ、剖検した。

2 つのアベルマブ原薬バッチ（1～8 週：S148/211007/P1/DS S148/L1、9～13 週：S148/211017/P1/DS S148/L4）を試験に使用した（モジュール 2.6.7.4 参照）。アベルマブの投与容量は 15 mL/kg とし、全量を 10 mL/kg/h の投与速度で約 90 分かけて投与した。動物を無麻酔拘束下で、左右の伏在静脈内の

どちらかに投与を行った。対照群の動物には、溶媒のみ（280 mM マンニトール、10 mM 酢酸塩、1.4 mM メチオニン、0.05% Tween 20、pH 5.5）をアベルマブ投与群と同じ容量で、同様に 10 mL/kg/h の速度で約 90 分かけて投与した。最高用量の 140 mg/kg は、アベルマブの投与液濃度と投与容量の上限に基づく最大投与可能量である。

本試験で使用したアベルマブ原薬バッチは、[redacted]を用いて製造された。[redacted]で製造されたアベルマブ原薬は、[redacted]で使用された製剤に用いられ、[redacted]が確認されている（モジュール 3.2.S.3.1 参照）。

アベルマブ投与液の濃度分析を試験期間中の定めた時点（1、4 及び 12 週）で実施した。その結果、対照群の投与液ではアベルマブは検出されず、アベルマブ 投与群の投与液ではアベルマブの濃度が許容範囲内（設定値の±15%以内）であった。

本試験は、血液免疫表現型検査を除き、GLP 適用下で実施した。血液免疫表現型検査は、データの信頼性を担保するための社内手順書に従って実施した。

試験期間中に、死亡及び一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、眼科学的検査、安全性薬理学的評価（対照群及び 140 mg/kg 投与群で ECG、動脈圧、心拍数、呼吸数、CNS 評価、直腸温）、臨床検査［血液学的検査（血液凝固系検査を含む）、血液生化学的検査、尿検査、免疫表現型検査］、TK、免疫原性の評価及び血清試料を用いた探索的バイオマーカー［インターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト（interleukin-1 receptor antagonist、IL-1RA）、単球走化性タンパク-1（monocyte chemotactic protein-1、MCP-1）、インターフェロン誘導タンパク質 10（interferon-inducible protein 10、IP-10）、トランスフォーミング増殖因子-α（transforming growth factor-α、TGF-α）、インターロイキン（interleukin、IL）-2、IL-4、IL-10、IL-6、インターフェロン（interferon、IFN）-γ、IL-1β 及び IL-17］の測定を実施した。

投与期間終了時及び回復期間終了時の検査動物全例で、病理学的検査（剖検、予め定めた臓器の重量測定及び病理組織学的検査）を実施した。病理組織学的検査は、剖検時に異常の認められた組織についても実施した。

死亡例はなかった。アベルマブは、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査及び臨床検査値に影響を及ぼさなかった。血中リンパ球免疫表現型検査にも、アベルマブ投与に関連した変化はみられなかった。

評価を実施した 140 mg/kg 投与群で、ECG での QTc 間隔を含む心血管系機能、呼吸数、CNS 機能及び直腸温に影響はみられなかった（モジュール 2.6.2.4 参照）。

アベルマブ投与群の全動物で、全試験期間を通してアベルマブへの曝露が確認された。アベルマブ曝露量（AUC_{168}）は、20～140 mg/kg の間でほぼ用量に比例して増加した。アベルマブの初回投与後と反復投与後の曝露量を比較すると、反復投与に伴う中等度の蓄積性が認められた。いずれの採血時点でも、アベルマブ曝露量に性差は認められなかった。すなわち、雄の雌に対する AUC_{168} 比は 0.8～1.2 の間であった。TK データの概要を表 2.6.6 - 4 に示す。

表 2.6.6 - 4　サル 13 週間反復静脈内投与毒性試験の TK データの概要

投与用量	20 mg/kg		60 mg/kg		140 mg/kg[a]	
用量比	1		3		7	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌
動物数	3	3	3	3	5	5
1 日（第 1 週）						
C_{max} (μg/mL)	496.0 ± 79.7	431.0 ± 52.4	1501.9 ± 247.2	1854.4 ± 854.6	4660.1 ± 89.2	4197.4 ± 586.4
AUC_{168} (h*μg/mL)	24015.1 ± 793.2	24378.8 ± 4059.9	74279.7 ± 14209.3	82476.2 ± 12377.2	274427 ± 32794.4	223285.1 ± 48174.9
29 日（第 5 週）						
C_{max} (μg/mL)	563.9 ± 91.7	595.9 ± 84.6	2446.5 ± 718.8	1940.7 ± 183.8	4444.8 ± 427.6	4349.2 ± 784.4
AUC_{168} (h*μg/mL)	30920.5 ± 7861.0	33340.8 ± 7543.6	117727.5 ± 66121.2	128030.0 ± 25940.8	315319.9 ± 77498.2	275122.0 ± 82831.1
85 日（第 13 週）						
C_{max} (μg/mL)	561.8 ± 15.4	609.5 ± 89.8	2210.0 ± 93.2	2182.5 ± 68.3	4700.0 ± 0.0	4617.7 ± 183.9
AUC_{168} (h*μg/mL)	33785.2 ± 8902.3	33980.2 ± 9274.7	110702.3 ± 26707.8	140645.1 ± 32878.2	356513.8 ± 80008.7	303661.8 ± 80271.8

データは平均値 ± 標準偏差を示す。
C_{max}：最高血中濃度、AUC_{168}：0 時から 168 時間までの血中濃度－時間曲線下面積
a　定量上限濃度以上として報告された血清試料は 4700 μg/mL として C_{max} 及び AUC_{168} を算出した。

ADA は、対照群とアベルマブ投与群のいずれの血清試料にも認められなかった。

アベルマブ投与後に各探索的バイオマーカー値の上昇は認められなかった。

臓器重量の測定で、副腎の絶対重量の減少（約 25%）が 140 mg/kg 投与群の雌で認められた。しかし、この変化は、副腎の病理組織学的変化（皮質及び髄質）を伴わず、形態学的には対照群の動物と同様であった。したがって、この変化はアベルマブ投与によるものとは考えにくく、毒性学的意義のない変化と考えられた。回復期間終了時には、臓器重量に変化は認められなかった。

投与部位の皮下に用量依存性のない限局性の赤色化が、肉眼的に認められた（20 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例、60 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例、140 mg/kg 投与群の雄 2 例）。この変化は、一部の動物で病理組織学的にごく軽度の皮下出血を伴っていたが、後肢の末梢血管への週 1 回のアベルマブ投与により誘発された外傷性変化と考えられた。採血部位（左腕）に限局した皮下の赤色化部位及び皮下組織の肥厚が対照群の 1 例に認められ、病理組織学的に限局性に広がった出血及び急性炎症像が観察された。

その他に、特記すべき肉眼所見は、投与期間終了時及び回復期間終了時のいずれの時点でも認められなかった。

病理組織学的検査では、投与期間終了時に、投与部位の皮下にごく軽度から中等度の線維増殖が、20 mg/kg 投与群の雌 2 例、60 mg/kg 投与群の雄全例及び雌 1 例、並びに 140 mg/kg 投与群の雄全例及び雌 1 例に認められた。対照群の雄 2 例及び雌 1 例にも同様の変化が認められたが、ごく軽度の変化のみであった。また、皮下組織に、線維芽細胞に混じって、リンパ球及びマクロファージから

なるごく軽度の単核細胞浸潤が時折（60 mg/kg 投与群の雄 1 例、140 mg/kg 投与群の雄 2 例及び雌 1 例）観察された。投与部位局所で観察されたその他の変化（真皮の血管周囲、毛包周囲ないし毛包への単核細胞浸潤）は、対照群で認められた変化と同様であった。投与部位の皮下にみられた線維増殖及び単核細胞浸潤は、対照群と比較してアベルマブ投与群でわずかに強かったが、用量依存性はなく、アベルマブの投与局所への漏出の結果である可能性が考えられる。しかしながら、投与部位でみられた所見はいずれも重篤ではなく、回復期間中に完全に回復した。

全ての肉眼所見及び病理組織学的所見は、8 週間の休薬後に完全に回復していた。

結論として、本試験における全身性及び局所性（投与部位）の NOAEL を 140 mg/kg と判断した。

4　遺伝毒性試験

ICH S6（R1）ガイドライン（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）に基づき、アベルマブの遺伝毒性試験は実施しなかった。

5　がん原性試験

ICH S6（R1）ガイドライン（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）、ICH S1A ガイドライン（医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス）、ICH S9 ガイドライン（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン）に基づき、アベルマブのがん原性試験は実施しなかった。

6　生殖発生毒性試験

アベルマブの生殖発生毒性試験は実施していない。アベルマブの生殖発生毒性に関する評価は、別途作成した報告書（Austin 2016）の中に詳細に記載した。以下に、その概要を記載する。

カニクイザル及びヒトの正常組織を用いた TCR 試験（20015187 及び 20015186）のデータから、アベルマブが雌雄生殖器に結合することが確認された（8.4 項及び 8.5 項参照）。カニクイザルとヒトの組織へのアベルマブの結合性は、いくつかの例外を除き、類似していた。すなわち、ヒト組織では、卵巣の顆粒膜細胞及び精巣の間質細胞にアベルマブによる染色が認められたが、カニクイザル組織では同様の細胞に染色はみられなかった。更に、カニクイザルでは、卵巣の間質細胞と卵母細胞にアベルマブによる染色が認められたが、ヒト組織では同様の細胞に染色はみられなかった。検査したヒト卵巣中には少量のみの卵母細胞が存在していた。ヒト及びカニクイザル間で染色パターンに違いが生じた理由は判明しなかったが、切片のばらつき、ドナーの年齢又は疾患状態の差、染色プロセス、あるいはその他の未確認の差異により違いが生じた可能性がある。

雌雄の生殖能に対するアベルマブの影響を、限定的ではあるが、アベルマブを用いたカニクイザルの 13 週間反復静脈内投与毒性試験（RF4990、モジュール 2.6.7.7B 参照）の結果から評価した。本試験における雌雄生殖器の病理組織学的検査により、多くの雄で精巣が未成熟であったことが確認された。雌では生殖器に組織学的な異常は認められず、正常な性周期の兆候が観察された。本試験では、最高用量の 140 mg/kg（最大投与可能量）まで毒性は認められなかった。

公表文献に基づき、細菌による性感染症、すなわち、クラミジア・トラコマチス感染症への PD-L1 阻害の関与が示唆され、結果として、不妊を含む生殖能への影響の可能性が考えられる（Fankhauser 2014）。PD-1/PD-L1 の相互作用の阻害が妊娠中の流産や新生児の死亡のリスクを著しく増加させることが報告されている。しかし、出生児の構造的な奇形を増加させるリスクを示唆するデータは得られていない。PD-L1 の役割は妊娠の成立に対して必須ではないものの、アベルマブ投与による胚・胎児発生に対する影響の可能性は否定できない。

アベルマブの乳汁分泌の評価は実施していない。IgG 抗体の乳汁中への分泌が知られていることから（Hurley 2011）、アベルマブも乳汁中に分泌され得ると考えられる。

以上のように、アベルマブ投与による生殖発生毒性のリスクは、本薬の対象とする適応症及び患者集団（進行癌患者）を考慮し、本薬のサルの反復投与毒性試験の結果及び PD-1/PD-L1 に関する公表文献から評価した。したがって、アベルマブを用いた独立した生殖発生毒性試験は実施しなかった。

7　局所刺激性試験

ICH S6（R1）及び M3（R2）ガイドラインに基づき、アベルマブの局所刺激性の評価は、反復投与毒性試験［RF2740 及び RF3310（モジュール 2.6.7.6 参照）、RF2710 並びに RF4990（モジュール 2.6.7.7 参照）］の中で行い、独立した in vivo 局所刺激性試験は実施しなかった。すなわち、アベルマブの局所刺激性は、マウス、ラット及びサルの反復静脈内投与毒性試験での一般状態観察及び病理学的検査により評価した。これらの反復投与毒性試験で投与液の調製に使用したアベルマブ製剤中の原薬は[redacted]によるものであったが、[redacted]が確認されている。毒性試験のアベルマブ投与液に含まれる添加物（マンニトール、酢酸塩、メチオニン、Tween 20）は、メチオニンを除き、臨床試験に使用された製剤及び市販予定製剤に含まれるものと同一である。

マウスの 4 週間反復静脈内投与毒性試験では、対照群及びアベルマブ投与群ともに、投与部位（尾部）に炎症性及び変性性の変化、並びに出血が認められたが、アベルマブ投与群と対照群の変化は同程度であった。したがって、投与部位反応はアベルマブに起因する毒性とは考えられなかった（RF2740 試験、モジュール 2.6.7.6 参照）。ラットの 4 週間反復静脈内投与毒性試験でも同様に、投与部位（尾部）に、アベルマブ投与に関連した変化は認められなかった（RF3310、モジュール 2.6.7.6 参照）。

サルの 4 週間反復静脈内投与毒性試験では、140 mg/kg 投与群で、投与部位局所の皮下、血管周囲及び血管の変化（出血、混合性炎症性細胞浸潤、線維芽細胞増殖及び血管内皮の肥厚並びに壊死）が、対照群と比較して強かった。しかし、20 及び 60 mg/kg 投与群での局所変化は対照群でみられたものと類似しており、投与手技に起因するものであると考えられた（RF2710、モジュール 2.6.7.7 参照）。

サルの 13 週間反復静脈内投与毒性試験では、アベルマブ投与群の投与部位の皮下に、対照群と比較してわずかに強い線維増殖及び単核細胞浸潤が認められたが、用量依存性はなく、アベルマブの投与局所への漏出の結果である可能性が考えられる。しかしながら、投与部位でみられた所見はいずれも重篤ではなく、8 週間の回復期間中に完全に回復した。（RF4990、モジュール 2.6.7.7 参照）。

8　その他の毒性試験

8.1　マウスのアナフィラキシー様反応の発現機序に関する試験（IONC-TI■-003RVT）

添付資料番号：4.2.3.7.3.1（参考資料）

先のマウスの毒性試験（RF2740 及び T16228）で認められた致死的反応の発現機序を更に検討するため、CD-1 マウスを用いてアベルマブの反復静脈内投与による追加試験を実施した（モジュール 2.6.7.17A 参照）。アベルマブは完全ヒト IgG1 抗体であり、マウスに対して異種タンパク質であるため、アナフィラキシー反応を誘発した可能性が高かった。

最初の実験で、雌の CD-1 マウス（10 匹/群）に 5 及び 20 mg/kg のアベルマブを 1 週間隔で 2 回投与した。IgG アイソタイプのマウス抗ヒト抗体（mouse anti-human antibodies、MAHA）の測定を、投与前、投与開始後 3、8、10、15、22 及び 29 日に、酵素免疫測定法（enzyme-linked-immunosorbent-assay、ELISA）を用いて実施した。その結果、アベルマブに対する MAHA が全動物で検出された。アベルマブに対して産生された MAHA の特異性を検討するため、不活性対照抗体（PD-L1 との結合能を持たず、アベルマブと 6 つのアミノ酸残基、うち 5 つは超可変部のアミノ酸残基が異なる変異体）及びアベルマブと同じ IgG アイソタイプの対照抗体［鶏卵リゾチーム（hen egg lysozyme、HEL）タンパク特異的で、アベルマブの λ 軽鎖と異なる k 軽鎖を有する抗体］に対する抗血清の反応性を評価した。その結果、抗血清は不活性対照抗体に対して検出可能な反応性を示したが、その程度はアベルマブに比較して低下し、抗 HEL-huIgG1 抗体に対してはごくわずかに検出可能な反応性を示したのみであった。このことから、アベルマブに対して産生された MAHA は、主に抗体の可変部を標的とするものであることが示唆された。

2 番目の実験で、雌 CD-1 マウス（14 匹/群）を 20 mg/kg のアベルマブで感作し、続いて同用量のアベルマブ、不活性対照抗体又は抗 HEL-huIgG1 抗体で惹起した。アベルマブでの感作及び惹起は、マウスに自発運動の重度の減少及び体温の急激な低下を含むアナフィラキシー反応を誘発し、そのうち 64%の動物に急性の死亡（惹起後 15～90 分以内）が認められた。アベルマブでの感作後、不活性対照抗体で惹起したマウスでは、自発運動の減少や体温の低下は中等度で、死亡率は 21%であった。アベルマブでの感作後、抗 HEL-huIgG1 抗体で惹起したマウスでは、毒性所見は認められなかった。

この 2 番目の実験で、更にアナフィラキシー反応の機序を明確に解明するため、マウスをアベルマブで感作した後、惹起に先立ち、IgG 又は IgE 介在経路の阻害剤である ABT-491（IgG 過敏症に関連する PAF の阻害剤）又はシプロヘプタジン（IgE 過敏症に関連するセロトニン/ヒスタミン経路の阻害剤）を投与した。その結果、両阻害剤は、アベルマブで感作及び惹起したマウスの自発運動の重度の減少及び体温の急激な低下を顕著に抑制し、死亡率が著しく低下した。このような予防効果はシプロヘプタジンに比べて ABT-491 でより顕著であったことから、IgE 介在経路に比べて IgG 介在経路のより強い関与が示唆された。

3 番目の実験で、マウスを不活性対照抗体又は抗 HEL-huIgG1 抗体で感作及び惹起した結果、アナフィラキシーの兆候は認められなかった。

以上の結果から、CD-1 マウスへのアベルマブの反復投与はアナフィラキシーを誘発することが証明された。この反応は、高濃度に産生された MAHA、主に IgG 抗体が介在し、IgG 介在経路の阻害剤により IgE 介在経路の阻害剤と比べて強い予防効果が得られた。しかしながら、IgE 介在経路の阻

害による効果も認められたことから、両経路の関与が示唆された。ADA の抗体価は、一般状態変化の重症度と密接な相関関係を示した。

8.2　ヒト及びカニクイザルの全血及び PBMC のサイトカイン放出試験（T17985 及び T17986）

添付資料番号：4.2.3.7.7.1 及び 4.2.3.7.7.2（参考資料）

アベルマブがヒト及びカニクイザルの全血（モジュール 2.6.7.17B 参照）及び PBMC（モジュール 2.6.7.17C 参照）からのサイトカイン放出を引き起こす可能性を、in vitro で評価した。ヒト全血を用いた試験では、男女各 8 名のドナーから得た新鮮な血液を使用した。ヒト PBMC を用いた試験では、男女各 8 名のドナーから採取し単離した PBMC をプールして使用した。カニクイザルの試験では、雌雄各 4 匹の動物から得た全血及び PBMC をプールして使用した。複数の Th1 及び Th2 サイトカインを種特異的な xMAP マルチプレックス Luminex アッセイを用いて測定した（表 2.6.6 - 5 及び表 2.6.6 - 6 参照）。測定は、試料をアベルマブで 6 又は 24 時間処理した後に実施した。

表 2.6.6 - 5　測定したヒトのサイトカイン

	サイトカイン名称	略号	分析法
1	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	GM-CSF	Hu Cytokine 10-Plex Panel
2	インターフェロン-γ	IFN-γ	Hu Cytokine 10-Plex Panel
3	インターロイキン-1β	IL-1β	Hu Cytokine 10-Plex Panel
4	インターロイキン-2	IL-2	Hu Cytokine 10-Plex Panel
5	インターロイキン-4	IL-4	Hu Cytokine 10-Plex Panel
6	インターロイキン-5	IL-5	Hu Cytokine 10-Plex Panel
7	インターロイキン-6	IL-6	Hu Cytokine 10-Plex Panel
8	インターロイキン-8	IL-8	Hu Cytokine 10-Plex Panel
9	インターロイキン-10	IL-10	Hu Cytokine 10-Plex Panel
10	腫瘍壊死因子-α	TNF-α	Hu Cytokine 10-Plex Panel
11	単球走化性タンパク-1	MCP-1	Hu Single Plex
12	インターフェロン誘導タンパク質 10	IP-10	Hu Single Plex

表 2.6.6 - 6　測定したカニクイザルのサイトカイン

	サイトカイン名称	略号	分析法
1	インターフェロン-γ	IFN-γ	TH1/TH2 Cytokine 5-Plex
2	インターロイキン-2	IL-2	TH1/TH2 Cytokine 5-Plex
3	インターロイキン-4	IL-4	TH1/TH2 Cytokine 5-Plex
4	インターロイキン-10	IL-10	TH1/TH2 Cytokine 5-Plex
5	腫瘍壊死因子-α	TNF-α	TH1/TH2 Cytokine 5-Plex
6	インターロイキン-8	IL-8	Monkey Single Plex
7	インターロイキン-6	IL-6	Monkey Single Plex
8	インターロイキン-1β	IL-1β	Hu Single Plex
9	単球走化性タンパク-1	MCP-1	Monkey Single Plex
10	インターフェロン誘導タンパク質 10	IP-10	Hu Single Plex

各試料は、0.014、0.144、1.438、14.383、143.836、1438.26 及び 14382.6 ng/mL の濃度のアベルマブで処理した。

ヒト全血（男女各 8 名のドナー）の陽性対照群［リポポリサッカライド（lipopolysaccharide、LPS）］では、予測された炎症性サイトカインの放出が誘発された。すなわち、LPS は男性及び女性の全ドナーの全血で、多数のサイトカイン（IL-10、IL-1β、IL-6、IL-8 及び TNF-α）にプラセボ対照（アベルマブ溶媒）と比べて 100 倍以上高い放出を誘発した。一方、アベルマブへの曝露は個々のヒトドナーの全血に弱い散発性の反応を引き起こした。6 時間後よりも 24 時間後により強い反応が認められた。IL-8 の放出が複数のドナー試料で認められ、IL-6、IL-1β 及び IFN-γ の放出も一部のドナー試料で誘発された。2 名の女性ドナー試料で強い IL-6 放出が認められた以外は、上記のサイトカイン放出作用はいずれも非常に弱いものであった。

カニクイザルの雌の全血では、6 時間後にアベルマブによる弱い影響（IL-6、IL-8 及び TNF-α 放出の約 2 倍増加）が認められた。雄の全血では、143.8 ng/mL の濃度のアベルマブへの曝露によってのみ、雌と同様のサイトカインのより強い放出増加が認められ、IL-1β の放出増加もみられた。24 時間後の雌の全血では、弱い影響しか認められなかったものの、IL-6、IL-8 及び IFN-γ に 6 時間後と比較してわずかに強い放出がみられた。雄の全血では、最高濃度（14382.6 ng/mL）のアベルマブへの曝露によって、TNF-α 及び IL-1β の放出増加が認められた。IL-6、IL-8 及び IFN-γ 放出の軽度増加も観察された。

ヒト PBMC（男女各 8 名のヒトドナー由来のプール）では、LPS は予測された多数のサイトカイン、特に IL-6 及び TNF-α の放出を誘発した。アベルマブでは、6 時間後に、男性ドナー由来の PBMC にわずかな影響［ブドウ球菌腸管毒素 A（staphylococcal enterotoxin A、SEA）で前刺激をしていない男性由来の PBMC に対して 3 倍の TNF-α 放出増加］が認められた。それに比べて、24 時間後には、男性及び女性由来の PBMC のいずれにも、14.38 ng/mL 以上の濃度のアベルマブでより強い TNF-α 放出増加が認められた。SEA で前刺激した場合、この作用は完全に消失した。

カニクイザル PBMC（雌雄各 4 匹のカニクイザルドナー由来のプール）では、アベルマブによる弱い影響しか認められなかった。アベルマブは、6 時間後に雌 PBMC の IL-6 及び MCP-1 の放出をわ

ずかに増加させた。24 時間後では、これらのサイトカインの放出が更に増加した。雄 PBMC では、6 時間後にはほとんど影響がみられなかったものの、24 時間後には IL-2、IL-6 及び IL-8 のわずかな放出増加が認められた。ヒト PBMC でみられたように、カニクイザル PBMC でも、雄よりも雌でより強い影響が認められた。

以上のように、ヒト及びカニクイザルの全血及び PBMC では、アベルマブ曝露によるわずかな影響のみが認められた。したがって、アベルマブへの曝露後に弱いサイトカイン反応が誘発される可能性があることが示唆された。

8.3　ヒト PBMC のサイトカイン放出試験：複数ヒトドナーの比較（[redacted]-DA471-N0）

添付資料番号：4.2.3.7.7.3（参考資料）

16 名（男女各 8 名）のヒトドナー由来の血液から単離した PBMC を PHA で前刺激して最適化した方法（Hewitt 2014）を用いて、ドナー毎のサイトカイン放出プロファイルを検討した（モジュール 2.6.7.17D 参照）。アベルマブは、PBMC への曝露 24 時間前に、ウェットプレコーティング技術を用いて 24 ウェルポリスチレンマイクロタイタープレート上に固定した（Findlay 2010、Stebbings 2007）。本試験では、16 名のヒトドナー血液から単離した PBMC を用いて、マルチプレックス Luminex アッセイにより Th1/Th2 サイトカインを測定し（表 2.6.6 - 5 参照）、2 つの異なる製造プロセスであるプロセス A 及びプロセス B で製造されたアベルマブに対する反応の比較も合わせて行った。

アベルマブは、急性相反応及びその他の免疫反応に関与する複数の重要なサイトカインの PBMC からの放出を著しく増加させた。主に、IL-6、MCP-1（抗 PD-L1 作用の薬力学的マーカー）及び TNF-α の放出が大きく増加し、最低濃度のアベルマブ（2 μg/mL）でもこれら 3 種のサイトカインの強い放出が認められた。男性ドナー由来の活性化 PBMC は、女性ドナー由来のものとは異なるサイトカイン放出プロファイルを示した。すなわち、IL-6 及び TNF-α と同時に GM-CSF 及び IL-10 の放出も誘発された。IL-10 の増加は、最初の急性相反応に対する直接的応答によるものと考えられる。男性及び女性ドナー由来のいずれの PBMC でも、IL-8 及び IL-1β の弱く散発的な増加も認められた。

プロセス A によるアベルマブとプロセス B によるアベルマブとの間で、16 名のドナー由来の単離 PBMC でのサイトカイン放出プロファイルに、ほとんど差は認められなかった。差がみられたのは、特定のサイトカイン放出の最大値がほとんどプロセス A により製造されたアベルマブでみられた点であった（モジュール 2.7.1.3 参照）。

8.4　カニクイザル正常組織を用いた TCR 試験（20015187）

添付資料番号：4.2.3.7.7.4

アベルマブのカニクイザル正常組織の凍結切片に対する交差反応性を検討した（モジュール 2.6.7.17E 参照）。2 匹のカニクイザル由来の正常組織切片を、2 濃度（1 及び 15 μg/mL）のアベルマブで処理してアベルマブの組織結合性を検討した。更に、アベルマブとは異なる抗原特異性を有するヒト IgG1κ 抗体（以下、HuIgG1）を対照抗体として用いて、同様の処理を行った。その他に、アベルマブ又は対照抗体での処理をせずにアッセイを行うアッセイ対照も設けた。

陽性対照試料［組換えヒト B7-H1/PD-L1 Fc の UV レジン染色スライド（以下、rhPD-L1）］に、両濃度のアベルマブによる強い染色が認められた。一方、陰性対照試料［ヒトの悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症関連ペプチドのアミノ酸残基 1-34 の UV レジン染色スライド（以下、PTHrP 1-34）］には、いずれの濃度のアベルマブでも染色は認められなかった。対照抗体の HuIgG1 は、陽性対照及び陰性対照のいずれの試料とも反応しなかった。アッセイ対照スライドにも染色は認められなかった。このように、アベルマブの陽性対照試料との良好な特異的反応及び陰性対照試料との特異的反応の欠如、並びに対照物質の反応の欠如により、本アッセイの感度、特異性及び再現性が良好であることが示された。

以下に記載したとおり、カニクイザル組織パネルではアベルマブによる様々な程度の染色が認められた。

- 以下の組織の細胞膜
  - 以下の組織の上皮：副腎（皮質）、膀胱（粘膜）、乳腺（乳管）、結腸（粘膜）、眼（角膜）、卵管（粘膜）、消化管［食道（粘膜）、小腸（粘膜）及び胃（粘膜）］、腎臓（壁側上皮細胞、尿細管及び腎盂）、肝臓（幹細胞及び胆管）、肺［気管支、細気管支及び肺胞（I 型及び II 型肺胞上皮細胞を含む）］、卵巣（表層）、膵臓（腺房及び導管）、副甲状腺、下垂体、胎盤（羊膜及び栄養膜）、前立腺（腺及び尿道）、唾液腺（腺房及び導管）、皮膚（上皮及び毛包）、精巣（生殖細胞）、胸腺（上皮性細網細胞）、甲状腺（濾胞）、扁桃腺（表層、陰窩及び咽頭）、尿管（粘膜）及び子宮［頸部（粘膜）及び内膜（内膜表層及び子宮腺）］
  - 膀胱、結腸、卵管、消化管（食道）及び卵巣の中皮
  - 小腸の平滑筋
  - 膵臓の島細胞
  - 甲状腺の傍濾胞（C）細胞
  - 胎盤の脱落膜細胞
- 以下の組織の細胞質
  - 眼（結膜及び毛様体）の上皮
  - 胃、膵臓及び脾臓の中皮
  - 腎臓の内皮
  - リンパ節及び卵巣の単核白血球
  - 結腸、消化管（食道及び胃）、脾臓及び子宮（内膜）の平滑筋
  - 脳（小脳及び大脳皮質）の星状細胞
  - 下垂体の下垂体細胞
  - 卵巣の間質細胞
  - 卵巣の卵母細胞
- 脊髄の白質及び灰白質並びに視神経のニューロフィラメント/神経細胞突起

PD-L1 の発現は、様々な種類の上皮細胞（Boorjian 2008、Brown 2003、Chen 2006、Dal Secco 2008、Das 2006、Tsuda 2005、Yang 2009）内皮細胞（Brown 2003、LaGier 2006、Mazanet 2002、Rodig 2003）、単核細胞（樹状細胞、リンパ球、単球及びマクロファージを含む）（Augello 2005、Freeman 2000、Koga 2004、Nakae 2006、Sachdeva 2007、Sharpe 2007）、星状細胞（Lipp 2007、Magnus 2005）、膵島

細胞（Liang 2003）及び胎盤の栄養膜及び脱落膜細胞（Brown 2003、Holets 2006、Petroff 2003）で報告されている。更に、平滑筋細胞及び神経細胞も IFN-β 又は IFN-γ 刺激により PD-L1 を発現することが知られている（Koga 2004、Lafon 2008）。下垂体細胞は星状細胞に類似しており、後者は PD-L1 を発現することが報告されている。しかしながら、中皮細胞、下垂体細胞、甲状腺の傍濾胞細胞、卵巣の間質細胞及び卵母細胞での PD-L1 発現に関する報告はない。したがって、これらの組織成分で認められた染色は、これまでに知られていなかった PD-L1 発現の存在、又は PD-L1 と構造上の類似性が高い別のエピトープに対する想定外の交差反応による可能性が考えられる。

全般的に、カニクイザル組織パネルでみられたアベルマブによる染色パターンは、対になるヒト TCR 試験のヒト組織パネルでみられた染色パターンと比べ、染色性が弱かった（20015186、8.5 項参照）。ヒト組織パネルで、アベルマブによる脂肪細胞、巨核球、卵巣顆粒膜細胞、精巣間質細胞及び血清の染色が認められたが、カニクイザル組織では、これらの組織成分の染色が認められなかった。ヒト CNS 組織の神経細胞突起の染色は、星状細胞（神経膠細胞）による可能性が最も高く、カニクイザル CNS 組織の星状細胞の染色と相関した。更に、アベルマブによって、カニクイザル組織で卵巣の間質細胞と卵母細胞は染色されたが、ヒト組織パネルではこれらの細胞は染色されなかった。なお、検査したヒト卵巣中にはごく少量の卵母細胞しか存在していなかった。ヒト及びカニクイザルの組織間で染色パターンに違いが生じた理由は明らかではないが、切片のばらつき、ドナーの年齢又は疾患状態の差、染色プロセス、あるいはその他の未確認の差異により違いが生じた可能性がある。

これらの違いを除き、ヒト組織及びカニクイザル組織におけるアベルマブによる染色は同等であった。

8.5　ヒト正常組織を用いた TCR 試験（20015186）

添付資料番号：4.2.3.7.7.5

アベルマブのヒト正常組織の凍結切片に対する交差反応性を検討した（モジュール 2.6.7.17F 参照）。3 名のヒトドナー由来の正常組織切片を、2 濃度（1 及び 15 µg/mL）のアベルマブで処理してアベルマブの組織結合性を検討した。更に、アベルマブとは異なる抗原特異性を有するヒト IgG1κ 抗体（以下、HuIgG1）を対照抗体として用いて、同様の処理を行った。その他に、アベルマブ又は対照抗体での処理をせずにアッセイを行うアッセイ対照も設けた。

陽性対照試料［組換えヒト B7-H1/PD-L1 Fc の UV レジン染色スライド（以下、rhPD-L1）］に、両濃度のアベルマブによる強い染色が認められた。一方、陰性対照試料［ヒトの悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症関連ペプチドのアミノ酸残基 1-34 の UV レジン染色スライド（以下、PTHrP 1-34）］には、いずれの濃度のアベルマブでも染色は認められなかった。対照抗体の HuIgG1 は、陽性対照及び陰性対照のいずれの試料とも反応しなかった。アッセイ対照スライドにも染色は認められなかった。このように、アベルマブの陽性対照試料との良好な特異的反応及び陰性対照試料との特異的反応の欠如、並びに対照物質の反応の欠如により、本アッセイの感度、特異性及び再現性が良好であることが示された。

以下に記載したとおり、ヒト組織パネルではアベルマブによる様々な程度の染色が認められた。

- 以下の組織の細胞膜

- 副腎、心臓、リンパ節及び卵巣の脂肪細胞

➢ 以下の組織の細胞膜及び細胞質
- 以下の組織の上皮：副腎（皮質）、膀胱（粘膜）、乳腺（乳腺及び乳管）、結腸（粘膜）、眼（角膜及び結膜）、卵管（粘膜）、消化管［食道（粘膜、腺及び管）、小腸（粘膜）及び胃（粘膜）］、腎臓（壁側上皮細胞及び尿細管）、肝臓（肝細胞及び胆管）、肺［細気管支及び肺胞（I 型及び II 型肺胞上皮細胞を含む）］、卵巣（表層）、膵臓（腺房及び導管）、副甲状腺、下垂体（ラトケ嚢を含む）、胎盤（羊膜及び栄養膜）、前立腺、唾液腺（腺房及び導管）、皮膚（表皮、毛包、汗腺及び皮脂腺）、胸腺（上皮性細網細胞）、甲状腺（濾胞）、扁桃腺（表層及び陰窩）、尿管（粘膜）及び子宮［頸部（粘膜）及び内膜（内膜表層及び子宮腺）］
- 結腸、卵管、心臓、肺、脾臓及び精巣の中皮
- 消化管（食道）、心臓及びリンパ節の単核白血球
- 肺の肺胞マクロファージ
- 膀胱、結腸、消化管（食道及び小腸）、前立腺及び尿管の平滑筋細胞
- 膵臓の島細胞
- 甲状腺の傍濾胞（C）細胞
- 胎盤の脱落膜細胞
- 卵巣の顆粒膜細胞
- 精巣の間質細胞

➢ 以下の組織の細胞質
- 眼（水晶体）及び精巣（生殖細胞）の上皮
- 膀胱、消化管（食道）、リンパ節、脾臓、胸腺、扁桃腺及び子宮（内膜）の内皮
- 皮膚及び扁桃腺の単核細胞
- 脾臓の細網内皮細胞
- 胃、胎盤、脾臓、精巣及び子宮（内膜）の平滑筋細胞
- 骨髄の巨核球

➢ 脳（小脳及び大脳皮質）及び脊髄の白質及び灰白質、結腸及び小腸の神経叢、眼の網膜、並びに神経下垂体のニューロフィラメント/神経細胞突起

➢ 脊髄の神経根の軸索

➢ 大部分のヒト組織における血管内及び漏出した血清

PD-L1 の発現は、様々な種類の上皮細胞（Boorjian 2008、Brown 2003、Chen 2006、Dal Secco 2008、Das 2006、Tsuda 2005、Yang 2009）内皮細胞（Brown 2003、LaGier 2006、Mazanet 2002、Rodig 2003）、単核細胞（樹状細胞、リンパ球、単球及びマクロファージを含む）（Augello 2005、Freeman 2000、Koga 2004、Nakae 2006、Sachdeva 2007、Sharpe 2007）、膵島細胞（Liang 2003）及び胎盤の栄養膜及び脱落膜細胞（Brown 2003、Holets 2006、Petroff 2003）で報告されている。更に、平滑筋細胞及び神経細胞も IFN-β 又は IFN-γ の刺激により PD-L1 を発現することが知られている（Koga 2004、Lafon 2008）。脂肪細胞への分化能を有する間葉系幹細胞では、IL-17 及び IFN-γ の刺激により PD-L1 の発現が誘導される（Schurgers 2010）。可溶性 PD-L1 に関する報告（Chen 2011）は、アベルマブによる血清の染色の裏付けとなる。しかしながら、中皮細胞、甲状腺の傍濾胞細胞、卵巣の顆粒膜細胞、精巣の間質細胞及び巨核球での PD-L1 発現に関する報告はない。

したがって、これらの組織成分で認められた染色は、これまでに知られていなかった PD-L1 発現の存在、又は PD-L1 と構造上の類似性が高い別のエピトープに対する想定外の交差反応による可能性が考えられる。

8.6　光毒性試験

ICH S9 ガイドラインに基づき、アベルマブによる UV-VIS 吸収スペクトル（200～750 nm）を評価した。

その結果、UV-VIS スペクトルは 227 nm 付近で最初の吸収極大を示し、その後減衰して約 278 nm で 2 番目の吸収極大を示した。278 nm 付近の吸収帯はタンパク質の芳香族残基による典型的なものであった。250 nm 以下では 227.09 nm まで吸収が徐々に増大し、その後波長が短くなるにつれ減衰した。307～750 nm の範囲での吸収は観察されなかった（詳細はモジュール 3.2.S.3.1 参照）。

結論として、光毒性を引き起こす可能性のある波長帯での吸収は認められなかったことから、アベルマブが光毒性を誘発する可能性はないと考えられた（モジュール 2.6.7.17G 参照）。

8.7　毒性試験に用いたアベルマブ調製液の均一性及び安定性試験（RF5050、RF5710、RF5060 及び RF5720）

添付資料番号：4.2.3.7.7.6、4.2.3.7.7.7、4.2.3.7.7.8 及び 4.2.3.7.7.9（参考資料）

毒性試験に用いたアベルマブ投与液の均一性及び安定性を保証して、13 週間反復静脈内投与毒性試験（RF4990）の中で実施した投与液中のアベルマブ濃度の測定を補完するため、アベルマブ調製液の均一性及び安定性試験を別途実施した。

溶媒（280 mM マンニトール、10 mM 酢酸ナトリウム、1.4 mM メチオニン、0.05% Tween 20、pH 5.5）中でのアベルマブの濃度の測定に用いた分析法は、特異性、直線性、真度及び精度の検討により予めバリデートした［RF5050（バッチ [redacted] 使用、モジュール 2.6.7.17H 参照）及び RF5710（バッチ [redacted] 使用、モジュール 2.6.7.17I 参照）］。これらのバリデーション試験でアベルマブの濃度測定に用いた分析法の特異性及び再現性は良好で、アベルマブ 4 mg/mL の濃度の分析値は理論値に対して 90～110%の許容範囲内にあった。

次に、溶媒（280 mM マンニトール、10 mM 酢酸ナトリウム、1.4 mM メチオニン、0.05% Tween 20、pH 5.5）中でのアベルマブの均一性及び安定性を検討した［RF5060（バッチ [redacted] 使用、モジュール 2.6.7.17J 参照）及び RF5720（バッチ [redacted] 使用、モジュール 2.6.7.17K 参照）］。これらの均一性及び安定性試験には、毒性試験で用いた濃度範囲を含む 1 及び 9.54 mg/mL のアベルマブ調製液を使用した。その結果、両濃度のアベルマブの溶媒中での均一性は良好（設定濃度との差が 10%以下）であった。安定性試験は、アベルマブ調製液を室温で 6 時間及び冷蔵（2～8℃）で 6 週間保存した条件下で実施した。その結果、いずれの保存条件でも、両濃度のアベルマブの溶媒中での安定性は良好（設定濃度との差が 10%以下）であった。

したがって、毒性試験で用いた調製及び保存条件下で、アベルマブ調製液は均一で、かつ安定であったと考えられる。

8.8　原薬及び製剤中の不純物、添加物及び溶出物の毒性学的評価

アベルマブは高度に精製された製剤である（モジュール3.2.S.2.2 参照）。プロセスバリデーションの中で、アベルマブの製造工程に固有の不純物（不純物 A*、不純物 B*　、　不純物 C*　及び不純物　D*　　等）は、いずれも精製工程を通して一貫して減少することが確認された。結果として、アベルマブの製造工程由来の不純物は許容濃度以下まで除去される。製剤中の[redacted]及び[redacted]の分析は、製剤の出荷時に毎回行われる。製剤中に含まれる添加物は、日本薬局方及び日本の医薬品添加物規格に適合し、静脈内投与での使用前例を有する。このことから、添加物及び製造工程由来の不純物の毒性試験を新たに実施する必要はないと考えられた。

予定している保存条件及び加速条件下で容器及び栓から製剤中に溶出する可能性のある不純物を評価するため、アベルマブ製剤を用いて溶出物試験（溶出物及び抽出物の評価）を実施した（モジュール 3.2.P.2.4 参照）。その結果、アベルマブ製剤中に 3 種の化合物（又は化合物群）、すなわち不純物1*、不純物2*　　及び不純物3*　　の溶出が検出された。 これらについて、毒性学的評価を実施した（Broschard　2016）。いずれの溶出物にも遺伝毒性を発現する可能性は認められず、製剤中の存在濃度は 1 日許容曝露量（permitted daily exposure、PDE）未満であった。結論として、アベルマブを投与された患者において、容器及び栓から製剤中に溶出した不純物の毒性学的リスクはないと考えられた。

9　考察及び結論

アベルマブの毒性学的プロファイルをマウス、ラット及びカニクイザルを用いて in vivo 試験で検討した。また、ヒト及びカニクイザルの全血及び PBMC でアベルマブの in vitro CRA 試験、並びにヒト及びカニクイザルの正常組織を用いて TCR 試験を実施した。更に、アベルマブの UV-VIS 吸収に関するデータの評価も実施した。

アベルマブの局所刺激性の評価は本薬の反復投与毒性試験の中で実施した。また、安全性薬理学的パラメータの評価はサルの反復投与毒性試験の中で実施した。

アベルマブの結合親和性データに基づき、カニクイザルとマウスを本薬の毒性試験の適切な動物種として選択した。しかし、CD-1 マウスにアベルマブを急速静脈内投与した反復投与毒性試験で、主に 3 回投与後に死亡が発生した。2 回目に実施した発現機序に関する試験で、この死亡が免疫介在性（IgE 及び IgG 介在性）のアナフィラキシー反応により引き起こされたものであるという仮説が裏付けられ、主に IgG アイソタイプ抗体によって引き起こされることが示唆された。マウスではアベルマブ反復投与後に重度のアナフィラキシー反応が発現すること、及びラットではアベルマブの結合親和性が低いことから、げっ歯類はアベルマブの毒性試験の動物種として適切ではないと考えられた。したがって、アベルマブの毒性はカニクイザルのみで評価した。

カニクイザルを用いて、アベルマブの 4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験を実施した。アベルマブの 20、60 及び 140 mg/kg の反復投与により、過敏症や注入反応を示唆する一般状態の変化は認められなかった。両試験でのアベルマブの全身での忍容性は良好で、いずれの試験も全身毒性の NOAEL は最高用量の 140 mg/kg であった。本用量は、アベルマブの投与液濃度と投与容量の上限に基づく最大投与可能量である。

アベルマブの局所刺激性は反復投与毒性試験の中で評価した。その結果、用量依存性はないものの、アベルマブ投与により投与部位局所の炎症性反応が対照群と比較してわずかに強まった。これは、アベルマブが投与局所に漏出した結果である可能性が高かった。13 週間反復静脈内投与毒性試験で認められた投与部位の所見は、最高用量の 140 mg/kg まで毒性学的に重要な変化ではなく、回復期間中に完全に回復した。

サルの TK データでは、アベルマブの終末相半減期は 58～70 時間であり、薬物動態は線形性を示した。サル反復静脈内投与毒性試験の NOAEL（140 mg/kg）でのアベルマブ曝露量とヒト臨床試験で得られたアベルマブ曝露量との比較を表 2.6.6 - 7 に示す。

表 2.6.6 - 7　サル反復投与毒性試験とヒト臨床試験のアベルマブ曝露量の比較

種	投与経路	投与用量 (mg/kg)	投与期間（週）	NOAEL (mg/kg)	サル NOAEL の C_{max} [a] (μg/mL)	サル NOAEL の AUC [a] (μg/mL x hr)	ヒト臨床用量 [b] の C_{max} (μg/mL)	ヒト臨床用量 [b] の AUC (μg/mL x hr)	サル NOAEL のヒト臨床用量 [b] に対する AUC 比 [c]
サル [d]	静脈内	20-140	4	140	4410	227000	該当せず	該当せず	10
サル [e]	静脈内	20-140	13	140	4658	330088	該当せず	該当せず	15[h]
ヒト 001 試験 [f]	静脈内	1-20	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず	294	22813	該当せず
ヒト 002 試験 [g]	静脈内	3-20	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず	179	20131	該当せず

AUC：血中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血中濃度、NOAEL：無毒性量
a　雌雄の平均値、AUC は $AUC_{0\text{-}168hr}$
b　予定している臨床用量 = 10 mg/kg
c　AUC_{NOAEL}/AUC_{avg}（ヒトの 001 試験及び 002 試験の加重平均 = 22515 μg/mL x hr）
d　サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2710）の 22 日のデータ
e　サル 13 週間反復静脈内投与毒性試験（RF4990）の 85 日のデータ
f　非盲検臨床第 I 相試験（EMR100070-001）の初回投与後のデータ
g　非盲検臨床第 I 相試験（EMR100070-002）の初回投与後の日本人データ
h　サル 13 週間反復投与毒性試験の NOAEL でのアベルマブ曝露量（AUC）は、002 試験において日本人に 10mg/kg 投与時のアベルマブ曝露量と比較して約 16 倍であった。

サルの反復投与毒性試験の NOAEL でのアベルマブ曝露量（AUC）は、ヒトの治療用量でのアベルマブ曝露量（AUC）よりはるかに高く、安全域は 10 倍以上であった。

アベルマブの生殖発生毒性試験は実施しなかった。アベルマブによる生殖発生毒性発現の可能性の評価は、本薬の対象とする適応症及び患者集団（進行癌患者）を考慮し、本薬の反復投与毒性試験の結果及び PD-1/PD-L1 に関する公表文献に基づき、適切に実施した。PD-1/PD-L1 の相互作用の阻害が妊娠中の流産のリスクを著しく増加させることが報告されていることから、アベルマブ投与による胚・胎児発生に対する影響の可能性は否定できない。したがって、アベルマブ投与時には妊娠のリスクを回避する適切な措置を取る必要がある。

最初の CRA 試験では、アベルマブはヒト及びカニクイザルの全血及び PBMC からの炎症性サイトカインの放出をほとんど誘発しなかった。しかし、続いて実施した最適化した CRA 試験では、アベルマブは PHA で前刺激したヒト PBMC からのサイトカインの放出を増加させ、アベルマブが免疫介在性の注入反応を誘発する可能性が示唆された。

アベルマブの光毒性を UV-VIS 吸収プロファイルに基づき評価した結果、光毒性を誘発する可能性は認められなかった。

アベルマブ製剤の容器及び栓から溶出する可能性のある不純物による毒性学的リスクは認められなかった。

結論として、アベルマブの毒性プロファイルは、予定している適応症でのヒトでの使用の安全性を裏付けるものである。

10 図表

表は本文中に記載した。

11 参考文献

Augello A, Tasso R, Negrini SM, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. Eur J Immunol 2005;35(5):1482-90.

Austin EW, Roesener S. Reproductive Toxicity Assessment for Avelumab. EMD Serono, Billerica MA, 2016, 1-6

Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, et al. T-Cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: Clinicopathologic correlations and association with survival. Clin Cancer Res 2008;14(15):4800-8.

Broschard T. Evaluation of Leachables Identified in MSB0010718C (Avelumab) in Drug Product. Merck KGaA, Darmstadt, 2016, 1-15

Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. J Immunol 2003;170(3):1257-66.

Chen Y, Wang Q, Shi B, et al. Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble PD-L1 (CD274) in human sera of different ages as well as supernatants of PD-L1+ cell lines. Cytokine 2011;56(2):231-8.

Chen Y, Zhang J, Li J, et al. Expression of B7-H1 in inflammatory renal tubular epithelial cells. Nephron Exp Nephrol 2006;102(3-4):e81-e92.

Dal Secco V, Riccioli A, Padula F, et al. Mouse sertoli cells display phenotypical and functional traits of antigen-presenting cells in response to interferon gamma. Biol Reprod 2008;78(2):234-42.

Das S, Suarez G, Beswick EJ, et al. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: Its potential role in regulating T cells during Helicobacter pylori infection. J Immunol 2006;176(5):3000-9.

Fankhauser S, Starnbach M PD-L1 Limits the Mucosal CD8+ T Cell Response to Chlamydia tracomatis J Immunol 2014;192:1079-1090

Findlay L, Eastwood D, Stebbings R, et al. Improved in vitro methods to predict the in vivo toxicity in man of therapeutic monoclonal antibodies including TGN1412. J Immunol Methods 2010;352:1-12.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the Pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med 2000;192(7):1027-34.

Hewitt, P. MSB0010718 (anti-PD-L1) – Study 14-DA276-N0 Induction of cytokine release in human blood: Identification of the optimum method. Merck KGaA, Merck Serono, Darmstadt Germany 2014

Holets LM, Hunt JS, Petroff MG. Trophoblast CD274 (B7-H1) Is differentially expressed across gestation: Influence of oxygen concentration. Biol Reprod 2006;74(2):352-8.

Hurley W, Theil P. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Breast Milk. Nutrients 2011;3:442-74

Koga N, Suzuki J-i, Kosuge H, et al. Blockade of the interaction between PD-1 and PD-L1 accelerates graft arterial disease in cardiac allografts. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24(11):2057-62.

Lafon M, Mégret F, Meuth SG, et al. Detrimental contribution of the immuno-inhibitor B7-H1 to rabies virus encephalitis. J Immunol 2008;180(11):7506-15.

LaGier AJ, Pober JS. Immune accessory functions of human endothelial cells are modulated by overexpression of B7-H1 (PDL1). Human Immunol 2006;67(8):568-78.

Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. Eur J Immunol 2003;33(10):2706-16.

Lipp M, Brandt C, Dehghani F, et al. PD-L1 (B7-H1) regulation in zones of axonal degeneration. Neurosci Letters 2007;425(3):156-61.

Magnus T, Schreiner B, Korn T, et al. Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: Implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. J Neurosci 2005;25(10):2537-46.

Mazanet MM, Hughes CCW. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. J Immunol 2002;169(7):3581-8.

Nakae S, Suto H, Iikura M, et al. Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. J Immunol 2006;176(4):2238-48.

Petroff MG, Chen L, Phillips TA, et al. B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. Biol Reprod 2003;68(5):1496-504.

Rodig N, Ryan T, Allen JA, et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. Eur J Immunol 2003;33(11):3117-26.

Sachdeva M, Fischl MA, Pahwa S. PD-1 and PDL-1 expression in patients with chronic HIV-1 infection: relationship to CD4%, immune activation and antiretroviral therapy (ART). J Immunol 2007;178 (Meeting abstract supplement):S65-a.

Schurgers E, Kelchtermans H, Mitera T, et al. Discrepancy between the in vitro and in vivo effects of murine mesenchymal stem cells on T-cell proliferation and collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 2010;12:R31(1-11).

Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nature Immunol 2007;8(3):239-45.

Stebbings R, Findlay L, Edwards C, et al. “Cytokine storm” in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. J Immunol 2007;179:3325-31.

Tsuda M, Matsumoto K, Inoue H, et al. Expression of B7-H1 and B7-DC on the airway epithelium is enhanced by double-stranded RNA. Biochem Biophys Res Comm 2005;330(1):263-70.

Yang W, Li H, Chen PW, et al. PD-L1 expression on human ocular cells and its possible role in regulating immune-mediated ocular inflammation. Invest Ophthal Visual Sci 2009;50(1):273-80.

2.6.7 毒性試験の概要表

目次

1　毒性試験：　一覧表 2
2　トキシコキネティクス：　トキシコキネティクス試験の一覧表 5
3　トキシコキネティクス：　トキシコキネティクス試験成績の一覧 6
4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 12
5　単回投与毒性試験 14
6　反復投与毒性試験：　重要な試験以外の試験 15
7　反復投与毒性試験：　重要な試験 17
7A　反復投与毒性試験：　重要な試験 17
7B　**反復投与毒性試験：　重要な試験** 20
8　In Vitro 遺伝毒性試験 23
9　In Vivo 遺伝毒性試験 24
10　がん原性試験 25
11　生殖発生毒性試験：　重要な試験以外の試験 26
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 27
13　生殖発生毒性試験：　胚・胎児発生に関する試験 28
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 29
15　新生児を用いた試験 30
16　局所刺激性試験 31
17　その他の毒性試験 32
17A　その他の毒性試験：　機序解明試験 32
17B　その他の毒性試験：　In Vitro サイトカイン放出 33
17C　その他の毒性試験：　In Vitro サイトカイン放出 34
17D　その他の毒性試験：　In Vitro サイトカイン放出 35
17E　その他の毒性試験：　組織交差性試験 36
17F　その他の毒性試験：　組織交差性試験 37
17G　その他の毒性試験：　光毒性（UV-VIS 吸収プロファイル） 38
17H　その他の毒性試験：　その他（分析法バリデーション） 39
17I　その他の毒性試験：　その他（分析法バリデーション） 40
17J　その他の毒性試験：　その他（均一性及び安定性の分析） 41
17K　その他の毒性試験：　その他（均一性及び安定性の分析） 42

1 毒性試験： 一覧表

Test Article: avelumab

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses[a] (mg/kg)	GLP compliance	Testing facility	Study number	LocationSection	Evaluation/ Reference
Single-dose toxicity	None								
Repeat-dose toxicity	Mouse, CD-1	iv bolus (once weekly)	4 weeks	0, 20, 40, 140	No	Istituto di Ricerche Biomediche RBM, Italy	RF2740	4.2.3.2.1	Reference
	Mouse, CD-1	iv bolus (once weekly)	4 weeks	0, 20	No	Merck KGaA, Germany	T16228	4.2.3.2.2	Reference
	Rat, Wistar Han	iv bolus (once weekly)	4 weeks	0, 20, 40, 140	No	Istituto di Ricerche Biomediche RBM, Italy	RF3310	4.2.3.2.3	Reference
	Monkey, Cynomolgus	iv infusion (once weekly)	4 weeks	0, 20, 60, 140	Yes	Istituto di Ricerche Biomediche RBM, Italy	RF2710[b]	4.2.3.2.4	Evaluation
	Monkey, Cynomolgus	iv infusion (once weekly)	13 weeks	0, 20, 60, 140	Yes	Istituto di Ricerche Biomediche RBM, Italy	RF4990[c]	4.2.3.2.5	Evaluation
Genotoxicity	None								
Carcinogenicity	None								
Reproductive and developmental toxicity	No dedicated studies; Avelumab reproductive and developmental toxicity assessment available, based on bibliographic data and results of repeat-dose studies (refer to Austin and Roesener 2016)							4.3	Reference
Juvenile animals	None								
Local tolerance	Evaluated within repeat-dose toxicity studies								

1 毒性試験： 一覧表（つづき）

Test Article: avelumab

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses[a] (mg/kg)	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location Section	Evaluation/ Reference
Other toxicity studies									
Mechanistic studies									
Repeat-dose study for characterization of anaphylaxis-like reactions	Mouse CD-1	iv bolus (once weekly)	2 weeks	5, 20	No	EMD Serono, USA	IONC-TI[redacted]-003RVT	4.2.3.7.3.1	Reference
Other studies									
Cytokine release in human and cynomolgus whole blood	Human and cynomolgus whole blood	in vitro	24 hours	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 nM	No	Merck KGaA, Germany	T17985	4.2.3.7.7.1	Reference
Cytokine release in human and cynomolgus PBMCs	Human and cynomolgus PBMCs	in vitro	24 hours	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 nM	No	Merck KGaA, Germany	T17986	4.2.3.7.7.2	Reference
Cytokine release in human PBMCs	Human PBMCs	in vitro	6, 24 hours	13.9, 69.52, 131.04, 695.2, 1390.4, 6952, 13904 nM	No	Merck KGaA, Germany	[redacted]-DA471-N0	4.2.3.7.7.3	Reference
Cynomolgus monkey TCR study	Monkey tissues	in vitro	n.a.	1, 15 µg/mL	Yes	[redacted] USA	20015187	4.2.3.7.7.4	Evaluation
Human TCR study	Human tissues	in vitro	n.a.	1, 15 µg/mL	Yes	[redacted] USA	20015186	4.2.3.7.7.5	Evaluation
UV Absorption profile	n.a.	(UV absorption)	n.a.	n.a.	No	Merck Serono S.p.A Guidonia, Italy	n.a.	Module 3, 3.2.S.3.1	Reference

1 毒性試験： 一覧表（つづき）

Test Article: avelumab

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses[a] (mg/kg)	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location Section	Evaluation/ Reference
Other toxicity studies Other studies (continued)									
Analytical method validation	n.a	[redacted]	n.a	n.a	No	Istituto di Ricerche Biomediche RBM, Italy	RF5050	4.2.3.7.7.6	Reference
Analytical method validation	n.a.	[redacted]	n.a.	n.a.	No	Istituto di Ricerche Biomediche RBM, Italy	RF5710	4.2.3.7.7.7	Reference
Homogeneity and Stability	n.a.	[redacted]	n.a.	n.a.	Yes	Istituto di Ricerche Biomediche RBM, Italy	RF5060	4.2.3.7.7.8	Reference
Homogeneity and Stability	n.a.	[redacted]	n.a.	n.a.	Yes	Istituto di Ricerche Biomediche RBM, Italy	RF5720	4.2.3.7.7.9	Reference

a For repeat-dose toxicity, the highest systemic no observed adverse effect level (NOAEL) is underlined.

b The safety pharmacology assessment, multi analyte profiling, blood immunophenotyping, toxicokinetics and immunogenicity data analysis were not conducted in GLP compliance, but in accordance to the internal quality management system.

c The blood immunophenotyping was not conducted in GLP compliance, but in accordance to the internal quality management system.

GLP: Good laboratory practice; n.a.: not applicable; iv: intravenous; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; UV: Ultraviolet; TCR: Tissue cross reactivity; [redacted]

2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: avelumab

Type of study	Test system	Method of administration	Doses (mg/kg)	GLP compliance	Study number	Location CTD
Repeat-dose toxicity study (4 weeks)	Mouse, CD-1	iv bolus (once weekly)	0, 20, 40, 140	No	RF2740	4.2.3.2.1
Repeat-dose toxicity study (4 weeks)	Rat, Wistar Han	iv bolus (once weekly)	0, 20, 40, 140	No	RF3310	4.2.3.2.3
Repeat-dose toxicity (4 weeks)	Monkey, Cynomolgus	iv infusion (once weekly)	0, 20, 60, 140	Yes[a]	RF2710	4.2.3.2.4
Repeated dose-toxicity (13 weeks)	Monkey, Cynomolgus	iv infusion (once weekly)	0 20, 60, 140	Yes[b]	RF4990	4.2.3.2.5

a The safety pharmacology assessment, multi analyte profiling, blood immunophenotyping, toxicokinetics and immunogenicity data analysis were not conducted in GLP compliance, but in accordance to the internal quality management system.

b The blood immunophenotyping was not conducted in GLP compliance, but in accordance to the internal quality management system

GLP: Good laboratory practice; iv: intravenous

3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧

Toxicokinetics in Mice (Study RF2740) Test Article: avelumab

Group - Dose	2 – 20 mg/kg		3 – 40 mg/kg		4 – 140 mg/kg	
Dose Ratio	1		2		7	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Week 1						
AUC_{168} (h·µg/mL)	20100	21800	33800	38900	124000	120000
$t_{1/2}$ (h)	78.5	71.4	66.4	91.2	59.1	64.5
CL (mL/h/kg)	0.771	0.755	0.976	0.734	0.965	0.946
V_{ss} (mL/kg)	87.6	76.2	94.4	98.0	83.1	91.1
AUC_{168} ratio	1.0	1.0	1.7	1.8	6.2	5.5
Week 4						
AUC_{168} (h·µg/mL)	20700	22600	30000	38600	111000	117000
$t_{1/2}$ (h)	73.7	45.3	48.7	59.3	59.3	75.9
CL (mL/h/kg)	0.763	0.841	1.20	0.857	1.07	0.883
V_{ss} (mL/kg)	81.9	57	84.4	76.2	92.9	103
AUC_{168} ratio	1.0	1.0	1.4	1.7	5.4	5.2
Rac AUC_{168}	1.03	1.04	0.886	0.992	0.892	0.973

AUC_{168}: area under the concentration-time curve until 168 hours; $t_{1/2}$: terminal half-life; CL: clearance; V_{ss}: volume of distribution at steady state; AUC_{168} ratio: AUC_{168} 40 or 140 mg/kg / AUC_{168} 20 mg/kg; Rac AUC_{168}: accumulation ratio

3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧（つづき）

Toxicokinetics in Rats (Study RF3310) Test Article: avelumab

Group - Dose	6 – 20 mg/kg		7 – 40 mg/kg		8 – 140 mg/kg	
Dose Ratio	1		2		7	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Day 1						
AUC_{168} (h·µg/mL)	31605	25284	48376	40953	252210	169579
$t_{1/2}$ (h)	144	116	107	112	132	92.9
CL (mL/h/kg)	0.375	0.517	0.593	0.668	0.346	0.578
V_{ss} (mL/kg)	71.6	82.4	80.7	99.3	61.0	79.3
AUC_{168} ratio	1.0	1.0	1.5	1.6	8.0	6.7
Day 29						
AUC_{168} (h·µg/mL)	39236	52209	100600	89748	333865	274237
$t_{1/2}$ (h)	111	144	94.1	112	102	137
CL_{ss} (mL/h/kg)	0.510	0.383	0.398	0.446	0.419	0.511
V_{ss} (mL/kg)	72.1	73.4	51.7	71.5	66.4	95.3
AUC_{168} ratio	1.0	1.0	2.6	1.7	8.5	5.3
Rac AUC_{168}	1.2	2.1	2.1	2.2	1.3	1.6

AUC_{168}: area under the concentration-time curve until 168 hours; $t_{1/2}$: terminal half-life; CL: clearance; CL_{ss}: clearance at steady state; V_{ss}: volume of distribution at steady state; AUC_{168} ratio: AUC_{168} 40 or 140 mg/kg / AUC_{168} 20 mg/kg; Rac AUC_{168}: accumulation ratio

3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧（つづき）

Toxicokinetics in Non-Human Primates (Study RF2710) Test Article: avelumab

Group-Dose	Group 2 – 20 mg/kg	Group 3 – 60 mg/kg	Group 4 – 140 mg/kg
Dose Ratio	1	3	7
Day 1			
AUC_{168} (h·µg/mL)	23200	87900	201000
$t_{1/2}$ (h)	62.2	62.2	58.9
CL (mL/h/kg)	0.709	0.588	0.593
V_{ss} (mL/kg)	67.2	50.4	50.9
AUC_{168} ratio	1.0	3.8	8.7
Day 22			
AUC_{168} (h·µg/mL)	26400	115000	227000
$t_{1/2}$ (h)	70.2	67.3	57.6
CL (mL/h/kg)	0.764	0.439	0.555
V_{ss} (mL/kg)	58.6	40.8	47.7
AUC_{168} ratio	1.0	4.4	8.6
Rac AUC_{168}	1.1	1.3	1.1

Data show mean values calculated for both sexes (n=4).

AUC_{168}: area under the concentration-time curve until 168 hours; $t_{1/2}$: terminal half-life; CL: clearance; V_{ss}: volume of distribution at steady state; AUC_{168} ratio: AUC_{168} 60 or 140 mg/kg / AUC_{168} 20 mg/kg; Rac AUC_{168}: accumulation ratio.

3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧（つづき）

Toxicokinetics in Non-Human Primates (Study RF4990) Test Article: avelumab

Group-Dose	Group 2 – 20 mg/kg		Group 3 – 60 mg/kg		Group 4 - 140 mg/kg[a]	
Dose ratio	1		3		7	
Sex	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Day 1-Week 1						
C_{max} (µg/mL)	496.0 ± 79.7	431.0 ± 52.4	1501.9 ± 247.2	1854.4 ± 854.6	4660.1 ± 89.2	4197.4 ± 586.4
AUC_{168} (h*µg/mL)	24015.1 ± 793.2	24378.8 ± 4059.9	74279.7 ± 14209.3	82476.2 ± 12377.2	274427 ± 32794.4	223285.1 ± 48174.9
AUC_{168} ratio	1	1	3.1	3.4	11.4	9.2
Male/female AUC_{168} ratio	1.0	-	0.9	-	1.2	-
Day 29-Week 5						
C_{max} (µg/mL)	563.9 ± 91.7	595.9 ± 84.6	2446.5 ± 718.8	1940.7 ± 183.8	4444.8 ± 427.6	4349.2 ± 784.4
AUC_{168} (h*µg/mL)	30920.5 ± 7861.0	33340.8 ± 7543.6	117727.5 ± 66121.2	128030.0 ± 25940.8	315319.9 ± 77498.2	275122.0 ± 82831.1
AUC_{168} ratio	1	1	3.8	3.8	10.2	8.3
Rac AUC_{168}	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.6	1.6 ± 0.4	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.5
Male/female AUC_{168} ratio	0.9	-	0.9	-	1.1	-
Day 85-Week 13						
C_{max} (µg/mL)	561.8 ± 15.4	609.5 ± 89.8	2210.0 ± 93.2	2182.5 ± 68.3	4700.0 ± 0.0	4617.7 ± 183.9
AUC_{168} (h*µg/mL)	33785.2 ± 8902.3	33980.2 ± 9274.7	110702.3 ± 26707.8	140645.1 ± 32878.2	356513.8 ± 80008.7	303661.8 ± 80271.8
AUC_{168} ratio	1	1	3.3	4.1	10.6	8.9
Rac AUC_{168}	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.5	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.5
Male/female AUC_{168} ratio	1.0	-	0.8	-	1.2	-

Data show mean ± SD (Groups 2 and 3: n=3, Group 4: n=5).

a Serum samples reported as AEULOQ were set to 4700 µg/mL for Cmax and AUC168 calculation

C_{max}: maximum concentration; AUC_{168}: area under the concentration-time curve till 168 hours; AUC_{168} ratio: AUC_{168} 60 or 140 mg/kg / AUC_{168} 20 mg/kg; Rac AUC_{168}: accumulation ratio

3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧（つづき）

Overview of Toxicokinetics Data, Comparison with Human Studies Test Article: avelumab

Study	Dose (mg/kg)	Cynomolgus Monkey (male and female combined)	Study	Dose (mg/kg)	Human (male and female combined)[a]
Mean C_{max} (μg/mL)					
RF2710 (Day 22)	20	451	EMR100070-001	1	17
RF2710 (Day 22)	60	2030	EMR100070-001	3	82
RF2710 (Day 22)	140	4410	EMR100070-001	10	301
			EMR100070-001	20	489
RF4990 (Day 85)	20	586			
RF4990 (Day 85)	60	2196	EMR100070-002	3	65
RF4990 (Day 85)	140	4659	EMR100070-002	10	182
			EMR100070-002	20	462
Mean C_{min} (μg/mL)					
RF2710 (Day 22)	20	68	EMR100070-001	1	0.23
RF2710 (Day 22)	60	257	EMR100070-001	3	3.5
RF2710 (Day 22)	140	552	EMR100070-001	10	22
			EMR100070-001	20	50
RF4990 (Day 85)	20	91			
RF4990 (Day 85)	60	364	EMR100070-002	3	3.4
RF4990 (Day 85)	140	817	EMR100070-002	10	24
			EMR100070-002	20	44

3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧（つづき）

Overview of Toxicokinetics Data, Comparison with Human Studies Test Article: avelumab

Study	Dose (mg/kg)	Cynomolgus Monkey (male and female combined)	Study	Dose (mg/kg)	Human (male and female combined) [a]
Mean AUC (µg/mL x h)					
RF2710 (Day 22)	20	26400	EMR100070-001	1	976
RF2710 (Day 22)	60	115000	EMR100070-001	3	5743
RF2710 (Day 22)	140	227000	EMR100070-001	10	22813
			EMR100070-001	20	42218
RF4990 (Day 85)	20	33883			
RF4990 (Day 85)	60	125674	EMR100070-002	3	5120
RF4990 (Day 85)	140	330088	EMR100070-002	10	20131
			EMR100070-002	20	46770

RF2710: 4 week toxicity study, weekly dosing
RF4990: 13 week pivotal toxicity study, weekly dosing
EMR100070-001: Open label clinical Phase I study
EMR100070-002: Open label clinical Phase I study (Japan only)
a weighted average from clinical studies EMR100070-001 and EMR100070-002
AUC: Area under the curve; C_{max}: maximum concentration; C_{min}: minimum concentration

4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: avelumab

Batch No. [a]	Purity (%)	Specified Impurities	Study number	Type of study
Proposed specification	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	RF2740	4 week repeat-dose toxicity, mouse
[redacted]	[redacted]	[redacted]	T16228	4 week repeat-dose toxicity, mouse
			RF3310	4 week repeat-dose toxicity, rat
			RF2710	4 week repeat-dose toxicity, monkey (GLP)
			IONC-TI[redacted]-003RVT	Repeat-dose study, mouse
			T17985	Cytokine release whole blood, human and monkey
			T17986	Cytokine release PBMCs, human and monkey
[redacted]	[redacted]	[redacted]	RF4990	13 week repeat-dose toxicity, monkey (GLP, from week 1 to week 8);

4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（つづき）

Test Article: avelumab

Batch No. [a]	Purity (%)	Specified Impurities	Study number	Type of study
[redacted]	[redacted]	[redacted]	RF4990	13 week repeat-dose toxicity, monkey (from week 9 to week 13)
			20015186	Human TCR study (GLP)
			20015187	Cynomolgus monkey TCR study
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]-DA471-N0	Cytokine release PBMCs, human
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]-DA471-N0	Cytokine release PBMCs, human

[redacted]

n.a.: not applicable; n.d: not determined; [redacted]; NMT: Not more than; DP: Drug product; ppm: parts per million; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; TCR: Tissue cross reactivity; [redacted]

5 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は実施していない（詳細はモジュール 2.6.6.2 参照）。

6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験

Test Article: avelumab

Species/ strain	Method of administration (vehicle/formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy findings	Study number
Mouse, CD-1	iv bolus, MSB0010718C 10.53 mg/mL – vehicle: 10 mM sodium acetate, 140 mM sodium chloride, 0.05% polysorbate 20, pH 6.0 – administration volume 14 mL/kg	4 weeks (once weekly)	Vehicle control, 20, 40, 140	10m+10f and 3m+3f for lymphocyte phenotyping 6m+6f for kinetics, 6m+6f for antibody determination	Not established	Mortality was observed at all dose levels. The mortality rate was higher in the low dose group and death occurred within 30 minutes of dosing, mainly after the 3rd weekly injection. The observed clinical symptoms before their death as well as the histopathological findings (immunocomplex deposition) suggest hypersensitivity reactions in mice. Histopathological evaluation of the tail injection sites revealed, mainly inflammatory and degenerative changes and hemorrhages which were comparable in control and high dose treated animals.	RF2740
Mouse, CD-1	iv bolus, MSB0010718C 9.67 mg/mL - vehicle: 280 mM mannitol, 10 mM sodium acetate, 1.4 mM methionine, 0.05% polysorbate 20, pH 5.5 – administration volume 2 mL/kg	4 weeks (once weekly)	Vehicle control, 20	82m/87f	Not established	Clinical findings and mortality observed in study RF2740 were confirmed. Due to very limited and hemolytic blood volumes, the planned investigations of clinical chemistry, immunogenicity, and cytokine parameters could not be performed.	T16228

6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験（つづき）

Test Article: avelumab

Species/ strain	Method of administration (vehicle/formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy findings	Study number
Rat, Wistar Han	iv bolus, MSB0010718C 10 mg/mL – vehicle: 280 mM mannitol, 10 mM sodium acetate, 1.4 mM methionine, 0.05% polysorbate 20, pH 5.5 – administration volume 14 mL/kg	4 weeks (once weekly)	Vehicle control, 20, 40, 140	6m+6f and 6m+6f for kinetics and antibody determi-nation	140	Slight and multifocal increase in the grade of severity of mononuclear cell infiltrates and of sinusoidal lining cells in the liver in both genders of the control group and all dose groups. These changes represent well-known background findings in the liver, with the dose groups being slightly more affected compared to the control. Although no dose-dependency was visible, a relation to treatment cannot be excluded. Under the conditions of the present study, MSB0010718C was systemically and locally tolerated up to 140 mg/kg.	RF3310

m: male; f: female; iv: intravenous; TK: Toxicokinetics; NOAEL: No observed adverse effect level

7 反復投与毒性試験： 重要な試験

7A 反復投与毒性試験： 重要な試験

Title: MSB0010718C (anti-PD-L1): 4-week repeated-dose exploratory toxicity/tolerance study in cynomolgus monkeys by intravenous infusion

Test Article: avelumab

Species/strain: Monkey, cynomolgus

Initial age: 4-5 years

Date of first dose: [redacted] (males)
[redacted] (females)

Duration of dosing: 4 weeks, once weekly

Duration of postdose: n.a.

Method of administration: intravenous infusion (1.5 hours), infusion rate: 10 mL/kg/h

Vehicle/formulation: 280 mM Mannitol, 10 mM Sodium Acetate, 1.4 mM Methionine, 0.05% Polysorbate 20, pH 5.5

Study no. RF2710

Location in CTD: Section 4.2.3.2.4

GLP compliance: yes [f]

Special features: Immunophenotyping, Toxicokinetics, Anti-Drug-Antibody levels, Multi Analyte Profiling

No observed adverse-effect level: 140 mg/kg (for systemic effects)

Daily dose (mg/kg)		0 (Control)		20		60		140 [e]	
Number of animals [a]		M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Toxicokinetics [b]									
C_{max} (µg/mL)	Day 1	-		409		1710		3680	
	Day 22	-		451		2030		4410	
AUC_{168} (h*µg/mL)	Day 1	-		23200		87900		201000	
	Day 22	-		26400		115000		227000	
Anti-drug antibodies [c]		-	-	-	-	-	-	-	-
Multi analyte profiling [d]		-	-	-	-	-	-	-	-
Noteworthy findings									
Died or sacrificed moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Body weight		-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption		-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical observations		-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy		-	-	-	-	-	-	-	-

7A 反復投与毒性試験： 重要な試験（つづき）

Study No. RF2710 Test Article: avelumab

Daily dose (mg/kg)	0 (Control)		20		60		140	
Number of animals [a]	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Safety Pharmacology								
Electrocardiography	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Blood Pressure	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Respiratory Rate	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
CNS Evaluation	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Rectal temperature	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Clinical Pathology								
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphocyte Immunophenotyping	-	-	-	-	-	-	-	-
Post Mortem Observations								
Terminal Sacrifice								
No. animals evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2
Organ weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic pathology (No. affected)								
Injection site: reddish area	1	2	2	2	2	1	2	2
Histopathology (No. affected)								
Injection site: hemorrhage	2	2	2	2	2	1	2	2
Injection site: mixed inflammatory cell infiltration	2	2	1	2	2	1	2	2
Injection site: fibroblast proliferation	0	2	2	0	0	2	2	1

7A 反復投与毒性試験： 重要な試験（つづき）

Study No. RF2710 Test Article: avelumab

Daily dose (mg/kg)	0 (Control)		20		60		140	
Number of animals [a]	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Post Mortem Observations (continued)								
Terminal Sacrifice								
No. animals evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2
Histopathology (No. affected)								
Injection site: vessel intima thickening	2	2	2	2	2	2	2	2
Injection site: vessel necrosis	0	0	0	0	0	1	1	1
Injection site: epidermis, ulcer	0	1	1	1	0	0	0	0
Postdose evaluation:	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

- No noteworthy findings.

a All animals were sacrificed at the end of treatment period.

b Serum levels of MSB0010718C. Blood was collected from all animals on Days 1 and 22. The following time points from the start of infusion were analyzed: 0 (predose), 1.5 (end-infusion), 6, 24, 96 and 168 hours. Each toxicokinetics parameter was shown as a combined mean of males and females.

c Serum levels of anti-MSB0010718C antibodies.

d Serum samples for analysis of 20 selected chemokines and cytokines were taken from all control and 140 mg/kg group animals once pre-study and then at 6, 24, 168, 336, 504 and 672 hours after the first dose. The samples 168, 336, 504 and 672 hours were taken pre-dose for the subsequent doses. The following markers were analyzed: IL-1Ra, MCP-1, IL-7, IL-2, TNF-alpha, IL-8, TGF-beta, IL-1beta, IL-12 (p40), IFN-gamma, IFN-alpha, IL-10, IL-17, IL-15, IL-4, IP-10, TNF-beta, MIP-1alpha, IL-6 and IL-5.

e The dose of 140 mg/kg was considered the maximum feasible dose based on the test item concentration and infusion volume

f The safety pharmacology assessment, multi analyte profiling, blood immunophenotyping, toxicokinetics and immunogenicity data analysis, were not conducted in GLP compliance but in accordance to the internal quality management system.

CNS: Central nervous system; CTD: Common technical document; IL: Interleukin; C_{max}: Maximum concentration; M: Males; F: Females; AUC_{168}: Area under the concentration-time curve till 168 hours; MCP: Monocyte chemotactic protein; n.a: Not applicable; TGF: Transforming growth factor; IFN: Interferon; IP-10: Interferon gamma-induced protein 10; MIP-1alpha: Macrophage inframmatory protein-1 alpha

7B 反復投与毒性試験： 重要な試験

Title: MSB0010718C (anti-PD-L1): 13-week toxicity study in cynomolgus monkeys by intravenous infusion followed by an 8-week recovery period

Test Article: avelumab

Species/strain: Monkey, cynomolgus

Initial age: 3-4 years

Date of first dose: [redacted] (males)
[redacted] (females)

Duration of dosing: 13 weeks, once weekly

Duration of postdose: 8 weeks

Method of administration: intravenous infusion (1.5 hours), infusion rate: 10 mL/kg/h

Vehicle/formulation: 280 mM Mannitol, 10 mM Sodium Acetate, 1.4 mM Methionine, 0.05% Polysorbate 20, pH 5.5 [h]

Study no. RF4990

Location in CTD: Section 4.2.3.2.5

GLP compliance: yes [g]

Special features: Immunophenotyping, Toxicokinetics, Anti-Drug-Antibody levels, Exploratory Biomarkers

No observed adverse-effect level: 140 mg/kg

Daily dose (mg/kg)		0 (Control)		20		60		140[f]	
Number of animals [a]		M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Toxicokinetics [b]									
Cmax (µg/mL)	Day 1	-	-	496.0	431.0	1501.9	1854.4	4660.1	4197.4
	Day 29	-	-	563.9	595.9	2446.5	1940.7	4444.8	4349.2
	Day 85	-	-	561.8	609.5	2210.0	2182.5	4700.0	4617.7
AUC_{168} (h*µg/mL)	Day 1	-	-	24015.1	24378.8	74279.7	82476.2	274427.1	223285.1
	Day 29	-	-	30920.5	33340.8	117727.5	128030.0	315139.9	275122.0
	Day 85	-	-	33785.2	33980.2	110702.3	140645.1	356513.8	303661.8
Anti-drug antibodies [c]		-	-	-	-	-	-	-	-
Exploratory Biomarkers [d]		-	-	-	-	-	-	-	-
Noteworthy findings									
Died or sacrificed moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Body weight		-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption		-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical observations		-	-	-	-	-	-	-	-

7B 反復投与毒性試験： 重要な試験（つづき）

Study No. RF4990 Test Article: avelumab

Daily dose (mg/kg)	0 (Control)		20		60		140	
Number of animals [a]	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Safety Pharmacology								
Electrocardiography	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Blood Pressure	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Respiratory Rate	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
CNS Evaluation	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Rectal temperature	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Clinical Pathology								
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphocyte Immunophenotyping	-	-	-	-	-	-	-	-
Post Mortem Observations								
Terminal Sacrifice								
No. animals evaluated	3	3	3	3	3	3	3	3
Organ weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic pathology (No. affected)								
Injection site: reddish area	0	0	1	1	0	1	2	1
Histopathology (No. affected)[e]								
Injection site: fibroplasia	2	1	0	2	3	1	3	1
Injection site: mononuclear cell infiltrate	0	0	0	0	1	0	2	1
Injection site: hemorrhage	0	0	1	1	1	0	0	0

7B 反復投与毒性試験： 重要な試験（つづき）

Study No. RF4990 Test Article: avelumab

Daily dose (mg/kg)	0 (Control)		20		60		140	
Number of animals [a]	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Postdose evaluation:								
Number evaluated	2	2	0	0	0	0	2	2
Noteworthy findings								
Died or sacrificed moribund	0	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0	0
Body weight	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Food consumption	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Clinical observations	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Clinical Pathology	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Post Mortem Observations	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-

- No noteworthy findings, n.a.: Not applicable

a Control and Group 4 (140 mg/kg): 3 monkeys/sex/dose sacrificed at the end of treatment period, 2 monkeys/sex/dose sacrificed at the end of recovery period. Groups 2 (20 mg/kg) and 3 (60 mg/kg); all animals sacrificed at the end of treatment period.

b Serum levels of MSB0010718C. Blood was collected from all animals on Days 1, 29 and 85. The following time points from the start of infusion were analyzed: 0 (predose), 1.5 (end-infusion), 6, 24, 96 and 168 hours.

c Serum levels of anti-MSB0010718C antibodies.

d Serum samples for cytokine levels determination were collected from all animals once pre-study and then on Days 1, 29 and 85 pre-dose, at 1.5 (end-infusion), 6 and 24 hours from the start of infusion. The following markers were analyzed: IL-1RA, MCP-1, IP-10, TGF-alpha, IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IFN-gamma, IL-1 beta and IL-17.

e Other findings in treated animals, of doubtful if any toxicological relevance: slight increase versus controls in the distribution and the amount of hyalinization in the germinal centers of splenic follicles (from 60 mg/kg) and minimal to slight foci of perivascular cuffing in brain parenchyma (≥ 20 mg/kg).

f The dose of 140 mg/kg was considered the maximum feasible dose based on the test item concentration and infusion volume.

g The blood immunophenotyping, was not conducted in GLP compliance but in accordance to the internal Quality Management System.

h For batch S148/211007/P1/DS S148/L1 used from study week 1 to study week 8 the vehicle was 280 mM Mannitol, 10 mM Acetate, 1.4 mM Methionine, 0.00**25**% Polysorbate 20, pH 5.5; for batch S148/211017/P1/DS S148/L4 used from study week 9 to study week 13 the vehicle was 280 mM Mannitol, 10 mM Acetate, 1.4 mM Methionine, 0.0**5**% Polysorbate 20, pH 5.5.

CNS: Central nervous system, CTD: Common technical document, C_{max}: Maximum concentration, IFN: Interferon, IL: Interleukin, IP-10: Interferon gamma-induced protein 10, F: Females, M: Males, AUC_{168}: Area under the concentration-time curve till 168 hours, MCP: Monocyte chemotactic protein, TGF: Transforming growth factor

8 In Vitro 遺伝毒性試験

ICH S6（R1）ガイドラインに則って、In vitro 遺伝毒性試験は実施していない（詳細はモジュール 2.6.6.4 参照）。

9 In Vivo 遺伝毒性試験

ICH S6（R1）ガイドラインに則って、In vivo 遺伝毒性試験は実施していない（詳細はモジュール 2.6.6.4 参照）。

10 がん原性試験

ICH S6（R1）及び S9 ガイドラインに則って、がん原性試験は実施していない（詳細はモジュール 2.6.6.5 参照）。

11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験

生殖発生毒性試験は実施していない（詳細はモジュール 2.6.6.6 参照）。

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

生殖発生毒性試験は実施していない。

アベルマブの生殖発生毒性の評価は、本薬の反復投与毒性試験の及び PD-1/PD-L1 に関する公表文献に基づき実施した。アベルマブの生殖発生毒性の評価の概要は、モジュール 2.6.6.6 に示した。

13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

生殖発生毒性試験は実施していない。

アベルマブの生殖発生毒性の評価は、本薬の反復投与毒性試験の及び PD-1/PD-L1 に関する公表文献に基づき実施した。アベルマブの生殖発生毒性の評価の概要は、モジュール 2.6.6.6 に示した。

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

生殖発生毒性試験は実施していない。

アベルマブの生殖発生毒性の評価は、本薬の反復投与毒性試験の及び PD-1/PD-L1 に関する公表文献に基づき実施した。アベルマブの生殖発生毒性の評価の概要は、モジュール 2.6.6.6 に示した。

15 新生児を用いた試験

新生児を用いた試験は実施していない（詳細はモジュール 2.6.6.1 参照）。

16 局所刺激性試験

局所刺激性試験は実施していない。アベルマブの局所刺激性の評価は、本薬の反復投与毒性試験の中で実施した。

17 その他の毒性試験

17A その他の毒性試験： 機序解明試験

Report title: Characterization of anaphylaxis-like reactions in CD-1 mice following repeated administration of MSB0010718C

Test Article: avelumab

Species/ strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy findings	Study number
Mouse, CD-1	iv	ADA:group 2 weekly doses (days 0, 7);challenge:3 weekly doses (days 0, 7, 14)	5, 20	10f (ADA) 14f (challenge)	Not established	Sensitization and challenge with MSB0010718C induced an anaphylaxis-like reaction including severely reduced activity levels and severe drops in body temperature as well as acute lethality within 15-90 minutes after the treatment in 64% of the mice. Sensitization with MSB0010781C and challenge with the inactive control antibody showed comparable effects on activity levels and body temperature, and death occurred in 21% of the mice. Pre-treatment with PAF inhibitor or serotonin/histamine inhibitors revealed significant protection from decreases in activity levels and body temperature and the number of lethal events was also reduced. Inhibition of PAF was considerably more effective than of serotonin/histamine, suggesting that the IgG pathway is more strongly involved than the IgE pathway.	IONC-TI[redacted]-003RVT

iv: intravenous; PAF: Platelet activating factor; ADA: Anti-drug antibody; Ig: Immunoglobulin; f: females; NOAEL: No observed adverse effect level

17B その他の毒性試験： In Vitro サイトカイン放出

Report title: MSB0010718 (anti PD-L1). Induction of cytokine release in male and female whole blood

Test Article: avelumab

Species/strain	Method	Concentration	Noteworthy findings	Study number
Human and cynomolgus monkey	In vitro cytokine release in human (8 donors per sex) and cynomolgus (one pooled sample per sex) whole blood after 6 and 24 hours	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 nM	Weak and sporadic response seen in individual human donor whole blood suggests that MSB0010718C has little potential to induce an inflammatory reaction: After 6 hours, IL8 was slightly increased in both male and female whole blood. After 24hours IL8 was still increased in multiple donors, but IL6, IL1 beta and IFN gamma were also increased in several donors. These effects were very mild, with the exception of 2 female donors who showed a severe induction of IL6 release. In cynomolgus, there are hints that an immune response can be triggered, but only at higher concentrations: After 6 hours in female cynomolgus whole blood pool only around 2-fold increases in IL6, IL8 and TNF alpha release were seen. Larger increases in the release of these same cytokines (plus IL1 beta) were seen in male cynomolgus whole blood – but only at one concentration (1 nM). Again, after 24hours, only small effects were seen in female cynomolgus whole blood, although a slightly increased release was seen compared to 6 hours (IFN gamma, IL8 and IL6). In male cynomolgus whole blood the highest concentration of MSB0010718C caused a large increase in TNF alpha and IL1beta. Smaller increases in IL6, IL8 and IFN gamma were also observed.	T17985

IL: Interleukin; IFN: Interferon; TNF: Tumor necrosis factor

17C その他の毒性試験： In Vitro サイトカイン放出

Report Title: MSB0010718 (anti PDL-1) – Induction of cytokine release in human and cynomolgus PBMCs

TestArticle: avelumab

Species/strain	Method	Concentration	Noteworthy findings	Study number
Human and cynomolgus monkey	In vitro cytokine release in pooled human (8 donors per sex) and cynomolgus (4 donors per sex) PBMCs after 6 and 24 hours	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 nM	Only minor effects of MSB0010718C were seen in human and cynomolgus PBMCs: In pooled human PBMCs only a minimal effect was seen after 6 hours exposure to MSB0010718C (3 fold increase in TNF alpha in male non pre-stimulated cells). However, after 24 hours a more significant and robust increase in TNF alpha release was observed in both male and female derived PBMCs (at concentrations at and above 0.1 nM). Pre-stimulation with SEA caused a complete loss of this effect. After 6 hours female cynomolgus PBMCs showed small increases in IL6 and MCP-1. The release of these cytokines was increased after 24 hours. In male cynomolgus PBMCs little was observed after 6 hours, but after 24 hours small increases in IL2, IL6 and IL8 were observed. In both sexes the pre-stimulation with SEA caused a small increase in IFN gamma, in addition to those seen with no pre-stimulation.	T17986

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; SEA: Staphylococcal enterotoxin A; IL: Interleukin; IFN: Interferon; MCP: Monocyte chemotactic protein; TNF: Tumor necrosis factor

17D その他の毒性試験： In Vitro サイトカイン放出

Report title: MSB0010718 (anti PDL-1) – Induction of cytokine release in human PBMCs

TestArticle: avelumab

Species/strain	Method	Concentration	Noteworthy findings	Study number
Human	In vitro cytokine release in PHA pre-stimulated pooled human (8 donors per sex) PBMCs after 6 and 24 hours	13.9, 69.52, 131.04, 695.2, 1390.4, 6952, 13904 nM	In this optimized cytokine release assay, using PHA pre-stimulated human isolated PBMCs, MSB0010718C caused a strong increase in multiple cytokines (e.g. IL6, MCP-1 and TNF-alpha) in PBMCs derived from all 16 human donors tested. In activated PBMCs from female donors the major response was observed in IL6 and TNF-alpha and in male donors a different profile was obtained in that alongside the IL6/ TNF-alpha response, both GM-CSF and IL10 were induced. In addition, the pharmacodynamic marker, MCP-1, was also induced in most, but not all donors. A stronger MCP-1 release was observed in PBMCs obtained from female donors when compared to male donors. Weaker and sporadic increases in IL8 and IL1-beta were also observed in both sexes. There were very few differences in the cytokine release profile between MSB0010718C manufactured using processes A or B. When differences were observed the greatest induced release of specific cytokines was mostly seen for MSB0010718C manufactured using process A.	[redacted]-DA471-N0

IL: Interleukin; MCP: Monocyte chemotactic protein; PHA: Phyto-hemagglutinin; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; TNF: Tumor necrosis factor; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

17E その他の毒性試験： 組織交差性試験

Report Title: A tissue cross-reactivity study of MSB0010718C in normal cynomolgus monkey tissues

Test Article: avelumab

Species/strain	Method	Concentration	Noteworthy findings	Study number
Normal cynomolgus monkey tissues (2 donors per tissue[a])	In vitro (Immunohistochemistry)	1, 15 µg/mL	Overall, less staining was observed with MSB0010718C in the cynomolgus monkey tissue panel compared to the staining patterns observed in the human tissue panel in the companion human tissue cross-reactivity study (Study 20015186). In human tissue panel, staining of adipocytes, megakaryoytes, ovarian granulosa cells, testicular interstitial cells, and serum was present with MSB0010718C; however, staining of these tissue elements was not observed in the cynomolgus monkey tissues. There was staining of neural cell processes in human CNS tissues which were most likely of astocytic (glial) origin, which correlates with staining of astrocytes in cynomolgus monkey CNS tissues. Additionally, MSB0010718C stained ovarian stromal cells and oocytes in the cynomolgus monkey tissues, but not in the human tissue panel. However, minimal oocytes were present in the human ovaries examined. The reasons for the observed differences in staining between the human and cynomolgus monkey were not determined but might include section to section variation, differences in donor age and/or disease status, dying processes, or other unidentified differences. Except for these differences, MSB0010718C staining of human and cynomolgus tissues was comparable supporting the selection of the cynomolgus monkey as a relevant animal species in non-clinical safety studies.	20015187

a Two donors per tissue where available

CNS: Central nervous system

17F その他の毒性試験： 組織交差性試験

Report Title: A tissue cross-reactivity study of MSB0010718C in normal human tissues

Test Article: avelumab

Species/strain	Method	Concentration	Noteworthy findings	Study number
Normal human tissues (3 separate donors per tissue)	In vitro (immunohistochemistry)	1, 15 µg/mL	Specific staining was observed in the following tissues: Plasma membrane only in adipocytes in the adrenal, heart, lymph node, and ovary. Plasma membrane and cytoplasm in epithelium in the adrenal (cortex), bladder (mucosa), breast (ducts, glands), colon (mucosa), eye (cornea, conjunctiva), Fallopian tube (mucosa), gastrointestinal (GI) tract (esophagus [mucosa, glands, ducts], small intestine [mucosa], and stomach [mucosa]), kidney (parietal cells, tubules), liver (hepatocytes, bile ducts), lung (bronchioles, alveoli [including type I and type II pneumocytes]), ovary (surface), pancreas (acini, ducts), parathyroid, pituitary (including Rathke's pouch), placenta (amnion, trophoblasts), prostate, salivary gland (ducts, acini), skin (epidermis, hair follicles, sweat glands, sebaceous glands), thymus (epithelial-reticular cells), thyroid (follicles), tonsil (surface, crypts), ureter (mucosa), and uterus (cervix [mucosa] and endometrium [endometrial surface, glands]), mesothelium in the colon, Fallopian tube, heart, lung, spleen, and testis. Mononuclear leucocytes in the GI tract (esophagus), heart, and lymph node. Alveolar macrophages in the lung and smooth myocytes in the bladder, colon, GI tract (esophagus and small intestine), prostate, and ureter. Islet cells in the pancreas, parafollicular cells in the thyroid, decidual cells in the placenta, granulosa cells in the ovary, interstitial cells in the testis. Cytoplasm only in the epithelium in the eye (lens) and testis (germinal), endothelium in the bladder, GI tract (esophagus), lymph node, spleen, thymus, tonsil, and uterus (endometrium). Mononuclear leukocytes in the skin and tonsil. Reticulo-endothelial cells in the spleen, smooth myocytes in the stomach, placenta, spleen, testis, and uterus (endometrium) and megakaryocytes in the bone marrow. Neurofilaments/neural cell processes in the gray and white matter of the brain (cerebellum and cerebral cortex) and spinal cord, plexi of the colon and small intestine, retina of the eye, and neurohypophysis of the pituitary. Axons of spinal nerve roots in the spinal cord and intravascular and/or leaked serum in the majority of human tissues.	20015186

17G その他の毒性試験： 光毒性（UV-VIS 吸収プロファイル）

Title: Anti-PD-L1 - Preparation and characterization of the candidate Interim Reference Standard coded [redacted][a]

Test Article: avelumab

Species/strain	Method	Concentration	Noteworthy findings	Study number
n.a.	UV-VIS Analysis UV-VIS spectrum range 190 – 750 nm Selected data interval: 0.5 nm	0.5 mg/mL	The UV-VIS spectrum has a maximum of absorbance around 280 nm that decreases to reach zero at 307.4 nm. No absorption was observed in the range from 307 to 700 nm. The maximum of the peak is at 278.09 nm (A=0.75), this band is due to the aromatic residues of the protein, and has a weak shoulder around 282 nm. Below 250 nm the absorption increases steadily up to 227.09 nm and then decreases towards shorter wavelengths. The extinction coefficient was: 1.48 mL mg^{-1} cm^{-1}	See Module 3, 3.2.S.3.1

a The UV–VIS analysis is integrated in section 6.10 of the report

A: Absorption; n.a.: Not applicable; UV-VIS: Ultraviolet visible

17H その他の毒性試験： その他（分析法バリデーション）

Report title: MSB0010718C (Anti-PD-L1): validation of an analytical method in 280 mM Mannitol, 10 mM Acetate, 1.4 mM Methionine, 0.05% Tween 20 pH 5.5

Test Article: avelumab

Species/strain	Method	Concentration	Noteworthy findings	Study number
n.a.	[redacted]	4 mg/mL	The analytical method was validated by testing specificity, linearity, accuracy and precision. Analyses performed on MSB0010718C in the vehicle showed good reproducibility and acceptance limits within the range 90 – 110% of theoretical concentration.	RF5050

[redacted]; n.a.: Not applicable

17I その他の毒性試験： その他（分析法バリデーション）

Title: MSB0010718 (Anti-PD-L1): validation of an analytical method in 280 mM Mannitol, 10 mM Acetate, 1.4 mM Methionine, 0.05% Tween 20 pH 5.5

Test Article: avelumab

Species/strain	Method	Concentration	Noteworthy findings	Study number
n.a.	[redacted]	4 mg/mL	Analyses performed on MSB0010718C in the vehicle showed good reproducibility and acceptance limits within the range 90 – 110% of theoretical concentration.	RF5710

[redacted] n.a.: Not applicable

17J その他の毒性試験： その他（均一性及び安定性の分析）

Title: MSB0010718 (Anti-PD-L1): Homogeneity and stability in 280 mM Mannitol, 10 mM Acetate, 1.4 mM methionine, 0.05% Tween 20 pH 5.5

Test Article: avelumab

Species/strain	Method	Concentration	Noteworthy findings	Study number
n.a.	[redacted]	1 and 9.5 mg/mL	MSB0010718 was considered to be homogeneously distributed in the formulations tested. Formulations were stable for 6 hours at room temperature and for 6 weeks when kept at +2-8°C.	RF5060

[redacted]: n.a.: Not applicable

17K その他の毒性試験： その他（均一性及び安定性の分析）

Report title: MSB0010718 (Anti-PD-L1): Homogeneity and stability in 280 mM Mannitol, 10 mM Acetate, 1.4 mM methionine, 0.05% Tween 20 pH 5.5

Test Article: avelumab

Species/strain	Method	Concentration	Noteworthy findings	Study number
n.a.	[redacted]	1 and 9.5 mg/mL	MSB0010718 was considered to be homogeneously distributed in the formulations tested. Formulations were stable for 6 hours at room temperature and for 6 weeks when kept at +2-8°C.	RF5720

[redacted]: n.a.: Not applicable