ガザイバ点滴静注1000 mg
（オビヌツズマブ（遺伝子組換え））

［CD20陽性の B 細胞性濾胞性リンパ腫］

第2部　（モジュール2）：CTD の概要（サマリー）

2.6.6 毒性試験の概要文

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
AUC	area under the serum concentration-time curve	血清中薬物濃度-時間曲線下面積
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
C_{max}	maximum observed serum concentration	最高血清中濃度
ePPND	enhanced pre- and post-natal development	拡充型出生前及び出生後の発生
FcγR	Fc gamma receptor	Fc ガンマ受容体
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
ICH	international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
IFN-γ	interferon gamma	インターフェロンガンマ
IL	interleukin	インターロイキン
IRR	infusion-related reaction	ー
KLH	keyhole limpet hemocyanin	スカシ貝ヘモシアニン
NHL	non-Hodgkin’s lymphoma	非ホジキンリンパ腫
NK	natural killer	ナチュラルキラー
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha	腫瘍壊死因子アルファ

目次

頁

2.6.6 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.2 急性毒性試験 6
2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 6
2.6.6.3.1 カニクイザル 2 週間静脈内投与試験（4 週間又は 8 週間回復試験） 7
2.6.6.3.2 カニクイザル 13 週間静脈内投与試験（37 週間回復試験） 7
2.6.6.3.3 カニクイザル 26 週間静脈内投与試験（37 週間回復試験） 8
2.6.6.3.4 カニクイザル 4 週間皮下投与試験（28 週間回復試験） 10
2.6.6.4 遺伝毒性試験 11
2.6.6.5 がん原性試験 11
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 11
2.6.6.6.1 カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）毒性試験 11
2.6.6.7 局所刺激性試験 13
2.6.6.8 その他の毒性試験 13
2.6.6.8.1 組織交差反応性試験 13
2.6.6.8.2 *In vitro* サイトカイン放出試験 13
2.6.6.8.3 溶血性及び血液適合性試験 14
2.6.6.9 考察及び結論 14
2.6.6.10 図表 17
2.6.6.11 参考文献 17

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

オビヌツズマブ（遺伝子組換え）は，マウス抗ヒト CD20モノクローナル抗体 B-Ly1をヒト化して作製したヒト化抗 CD20モノクローナル抗体（IgG1）である。本抗体は，タイプ II 抗CD20抗体であり，タイプ I 抗 CD20抗体であるリツキシマブよりも，直接的な細胞死の誘導活性が強く，補体依存性細胞傷害（CDC）作用が低下している。また，Fc 領域に結合している糖鎖とエルボーヒンジ部に改変を施すことにより，免疫エフェクター細胞による細胞傷害活性及び直接的な細胞死の誘導活性が強化されている。

主要な毒性試験はそれぞれ ICH ガイドライン及び GLP 規制に準拠して実施した。また，GLP 非適合の *in vivo* 及び *in vitro* 毒性試験についても十分な科学性をもって実施した。

オビヌツズマブの毒性試験は，臨床投与経路である静脈内投与の安全性を評価するよう計画された。また，皮下投与での開発可能性について，薬物動態及び毒性試験において検討しているため，本申請資料概要中にも試験結果を記載した。カニクイザルを用いた最長26週間の反復投与試験においてオビヌツズマブの毒性を評価した。オビヌツズマブ結合エピトープ相当領域の配列相同性，Fc 受容体を介するエフェクター機能及び CD20との結合親和性（2.6.3.2.4）がヒトと同様であることに基づき，安全性評価における唯一の適切な動物種としてカニクイザルを選択した。オビヌツズマブはカニクイザルの NK 細胞をエフェクター細胞として用いた *in vitro* 試験において抗体依存性細胞傷害（ADCC）作用を示した。更に，*in vivo* 試験ではカニクイザルリンパ組織において，リツキシマブと比べて顕著な B リンパ球の減少が認められた（2.6.2.2.4.2）。CD20結合エピトープ相当領域のヒトとの相同性が低いため，オビヌツズマブはげっ歯類の CD20分子を認識しないと考えられた（2.6.3.2.4）。

オビヌツズマブの毒性試験一覧を表 2.6.6.1-1に，また，毒性試験の概要を以下に示した。

急性毒性

オビヌツズマブの急性毒性試験は実施していないが，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験における初回投与後に顕著な毒性は認められなかった。

反復投与毒性

- 静脈内投与の1 mg/kg/週又は皮下投与の30 mg/body/週以上の用量において，100%に近い末梢血 B 細胞の減少とそれに伴うリンパ組織の B 細胞枯渇が認められた。37週間回復期間終了時までの末梢血 B 細胞減少の回復には個体差がみられたが，リンパ組織の B 細胞枯渇は回復又は回復傾向を示した。これらの所見はオビヌツズマブの想定される薬理作用と一致するものである。
- 静脈内投与の5 mg/kg/週又は皮下投与の30 mg/body/週以上の用量において，NK 細胞の減少が認められた。この所見は，オビヌツズマブの薬理作用機序である FcγRIIIa への結合性及びADCC に関連したものと考えられた。
- 26週間静脈内投与試験の全投薬群（5 mg/kg/週以上）において過敏反応が認められ，カニクイザルにおいてヒト化 IgG であるオビヌツズマブが異種蛋白と認識されることに起因するものと考えられた。過敏反応として，血中の抗薬物抗体（ADA）産生に続く急性のアナフィラキシー反応／アナフィラキシー様反応（過剰な流涎，痒みを伴う腕にまで及ぶ顔面の紅斑など）がみられた。更に，免疫複合体を介した過敏反応に一致した全身性の炎症反応及び細胞浸潤，動脈炎／動脈周囲炎，糸球体腎炎及び漿膜／外膜炎症の出現率，若しくは重篤度の増加が認められた。これらの過敏反応により，投与期間中及び回復期間中に6例の動物が安楽死処置となった。
- 3例の安楽死例（4週間皮下投与試験での1例及び13週間静脈内投与試験での2例）において日

和見感染が疑われ，B 細胞枯渇の二次的結果である可能性が考えられた。

- 100 mg/kg/週まで実施したカニクイザル静脈内投与試験において，血中サイトカインの増加は認められなかった。

遺伝毒性及びがん原性

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）及び 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）に従い，オビヌツズマブの遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施していない。

生殖発生毒性

オビヌツズマブは，カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）毒性試験において，胚・胎児発生，出産，出生後の生存，出生児の成長及び発達に影響を及ぼさなかった。この試験において，母動物6例及び出生児3例が安楽死処置又は死亡となり，二次的な日和見感染又は被験物質に対する免疫反応，若しくはその両方に起因すると考えられた。また，妊娠期間のオビヌツズマブ投与により，出生児で B リンパ球の枯渇がみられたが，出産後112日目～168日目までに溶媒群と比較してほぼ正常のレベルまで回復した。

また，26週間静脈内投与試験において，雌雄の生殖パラメータに影響は認められなかった。

局所刺激性

オビヌツズマブの局所刺激性については，臨床製剤と同じ処方の製剤を用いて実施した静脈内投与（25 mg/mL まで）又は皮下投与（10 mg/mL）による反復投与毒性試験により評価しており，局所忍容性は良好であった。

組織交差反応性

カニクイザル及びヒトの組織パネルを用いた免疫組織化学では，リンパ組織等に交差反応性が認められ，これまでに報告されている CD20の発現[1)]と一致するものであった。

サイトカイン放出に関する *in vitro* でのリスク評価

ヒト全血を用いた検討において，オビヌツズマブ（0.1～100 μg/mL）はサイトカイン放出（IL-6，IL-8，TNF-α）を増加させた。また，抗 CD20抗体であるリツキシマブ及びオファツムマブに比べて，より強いサイトカイン放出，好中球の活性化並びに B 細胞の枯渇を誘導した。これらの結果は，オビヌツズマブにはヒト初回投与に関連してサイトカイン放出を誘導する性質があることを示唆している。

溶血性・血液適合性

オビヌツズマブは5 mg/mL までの濃度において，ヒト全血に対して溶血作用を示さず，ヒト血漿に対して凝集作用を示さなかった。

表 2.6.6.1-1　オビヌツズマブの毒性試験一覧表

試験項目	動物種	投与経路，期間 又は試験方法	投与量（mg/kg/週） 又は処理濃度	試験成績 （mg/kg）	GLP 適合性
反復投与毒性					
	カニクイザル	静脈内，2週間(回復4又は8週間)，1回/週	1, 10	末梢血及びリンパ組織で B 細胞の枯渇	非
	カニクイザル	静脈内，13週間(回復37週間)，1回/週	0[a], 10, 30, 100	無毒性量： 30 mg/kg/週	適
	カニクイザル	静脈内，26週間(回復37週間)，1回/週	0[b], 5, 25, 50	無毒性量： < 5 mg/kg/週	適
	カニクイザル	皮下，4週間(回復28週間)，1回/週	0[a], 30, 120 mg/body/週	無毒性量： 30 mg/body/週	適
生殖発生毒性					
拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）毒性	カニクイザル	静脈内，週1回 雌：妊娠20日目～出産 剖検：出産後240日目	0[b], 25, 50	無毒性量： < 25 mg/kg/週	適
その他の毒性					
組織交差反応性	ヒト組織	*In vitro*	5, 30 µg/mL	リンパ組織等に交差反応	適
組織交差反応性	カニクイザル組織	*In vitro*	5, 30 µg/mL	リンパ組織等に交差反応	適
組織交差反応性	ヒト及びカニクイザル組織	*In vitro*	5, 30 µg/mL	内皮細胞の細胞膜に染色なし	適
In vitro サイトカイン放出	ヒト血液	*In vitro*, 2時間	0.01-200 µg/mL	TNF-α の放出	非
In vitro サイトカイン放出	ヒト血液	*In vitro*, 24時間	0.1-100 µg/mL	IL-6, IL-8, TNF-α の放出	非
In vitro サイトカイン放出	ヒト血液	*In vitro*, 24時間	0.1-100 µg/mL	リツキシマブ及びオファツムマブに比べて，より強いサイトカイン放出を誘導	非
溶血性及び血液適合性	ヒト血液	*In vitro*	5 mg/mL まで	溶血性，凝集作用なし	非

a) 溶媒：20 mM L-ヒスチジン，240 mM トレハロース，[redacted]%[redacted](pH 6.0)
b) 溶媒：20 mM L-ヒスチジン，240 mM トレハロース，0.02%ポロキサマー188 (pH 6.0)

2.6.6.2　急性毒性試験

オビヌツズマブでは独立した急性毒性試験は実施していない。オビヌツズマブの急性毒性に関しては，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験（2週間静脈内投与試験，13週間静脈内投与試験，26週間静脈内投与試験，4週間皮下投与試験）における初回投与後の一般状態，臨床検査，サイトカイン測定，イムノフェノタイピング及び心血管系の検査結果を詳細に評価したところ，初回投与後に顕著な毒性は認められなかった。

2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

反復投与毒性試験として，カニクイザルを用いた2週間静脈内投与試験，13週間静脈内投与試験，26週間静脈内投与試験及び4週間皮下投与試験を実施した。また，*in vivo* の心血管系，中枢神経系，呼吸器系への影響を反復投与毒性試験において評価した。結果は2.6.2.4に示した。

2.6.6.3.1　カニクイザル2週間静脈内投与試験（4週間又は8週間回復試験）

（資料番号4.2.3.2-1）

カニクイザルにオビヌツズマブを1 mg/kg（雄1例及び雌2例），10 mg/kg （雄2例及び雌1例）で週1回，計2回静脈内投与（ボーラス）した。また，別途リツキシマブを1群雌雄各1例のカニクイザルに1 mg/kg，10 mg/kg で週1回，計2回静脈内投与（ボーラス）した。両薬物について，1 mg/kg 群は最終投与後8週間，10 mg/kg 群は最終投与後4週間の回復試験に供し，回復期間終了後に剖検を行った。

オビヌツズマブ投与の結果のみを以下に要約する。一般状態，体重，血液学的検査，血液化学的検査，イムノフェノタイピング（末梢血，脾臓，腸間膜リンパ節），血中のサイトカインレベル（IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α, IFN-γ），器官重量，剖検所見及び病理組織学的検査に基づいて毒性評価を実施した。本試験では溶媒対照群を設定しなかったため，被験物質に関連すると考えられたすべての作用について，投与前値及び背景値との比較により評価した。

オビヌツズマブによる主要な作用として，両用量において末梢血，脾臓及びリンパ節の B 細胞のほぼ完全な枯渇が認められた。回復期間において，1 mg/kg 群の末梢血及び脾臓の B 細胞には回復又は回復傾向がみられたが，1 mg/kg 群のリンパ節及び10 mg/kg 群では回復は認められなかった。

オビヌツズマブによって末梢血 T 細胞の絶対数に明らかな影響は認められなかったが，脾臓及びリンパ節では背景値範囲と比較して T 細胞数の増加が認められた。本試験では溶媒群を設定していないが，GLP 適合の26週間静脈内投与試験の高用量群（50 mg/kg，雌雄各6例／群）では脾臓及びリンパ節において T 細胞数の上昇が認められなかったことから，GLP 非適合の2週間静脈内投与試験（各3例／群）で認められたこの初期の所見については，薬物関連性は低いと考えられた。初回投与4時間後において，サイトカインの放出は認められなかった。

2.6.6.3.2　カニクイザル13週間静脈内投与試験（37週間回復試験）

（資料番号4.2.3.2-2）

1群雌雄各3～5例の成熟カニクイザルにオビヌツズマブ 0（溶媒），10，30及び100 mg/kg を週1回13週間にわたって，持続静脈内投与（30分間）した（10, 30 mg/kg 群：雌雄各3例，0, 100 mg/kg 群：雌雄各5例）。最高用量は，非ホジキンリンパ腫（NHL）患者で有効性が確認されているリツキシマブ投与用量における C_{max} より8～10倍高い C_{max} が得られると推定される100 mg/kg とし，公比約3で計3用量を設定した。最終投与後に1群雌雄各3例の剖検を実施し，溶媒群と高用量群の残り雌雄各2例は続けて37週間の回復試験に供した。一般状態，体重，血液学的検査，血液化学的検査，血液及び組織のイムノフェノタイピング，血中のサイトカインレベル（IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, IFN-γ），尿検査，精巣容積，眼科学的検査，心血管系検査（心電図及び血圧），器官重量，剖検所見及び病理組織学的検査に基づいて毒性評価を実施した。また，トキシコキネティクス評価を実施した。

一般状態，体重，血液学的検査，血液化学的検査，血中サイトカインレベル，尿検査，精巣容積，眼科学的パラメータ，心血管機能，器官重量及び剖検所見に，オビヌツズマブに直接関連した変化は認められなかった。

高用量（100 mg/kg）の回復群2例は，瀕死状態のため安楽死処置を行った。瀕死状態の原因は不明であるが，薬理作用である B 細胞の枯渇の二次的影響である可能性が疑われた。両動物では B 細胞の枯渇の結果，日和見感染及び状態悪化がもたらされたと推察された。しかし，本試験の安楽死2例と26週間静脈内投与試験において過敏反応を示した動物にはいくつかの病理組織学的な類似点（様々な組織における炎症／細胞浸潤等）があり，本試験の2例で過敏反応に関連した一般症状や免疫原性の兆候（曝露の低下，ADA の産生）は認められなかったものの，過敏反応が起こった可能性を完全に否定することはできないと考えられる。

1例目（100 mg/kg の雌1例）は，重度の月経出血及び貧血を伴う，一般状態の悪化（低体温，

脱水症状，鼻分泌物）がみられたことから，回復期間の7日目に安楽死処置を行った。重篤で不規則な出血は，この試験に割り付けられる前から認められていたため，薬物関連性は低いと考えられた。この個体の瀕死状態の原因は，重度の月経出血及び，原因病原菌は同定されなかったものの免疫抑制による日和見感染の可能性が考えられた。

2例目（100 mg/kg の雄1例）は歯肉に重篤な感染がみられたため，回復期間の97日目に安楽死処置を行った。口腔スワブ培養では多量の常在細菌叢が検出された。病理組織学的検査では歯肉炎，漿膜を含む様々な組織での炎症細胞巣及び多巣性小葉中心性の肝細胞の壊死が認められた。瀕死状態の原因は，被験物質による免疫抑制に起因した，通常は良好に制御されている常在細菌への抵抗性の低下と考えられた。しかし，26週間静脈内投与試験でみられた病理組織学的所見（様々な組織における漿膜の炎症）との類似を考慮すると，過敏反応様の反応が起こった可能性を否定することはできないと考えられる。

ADA を産生し（投与22日目より検出）曝露量が低下した低用量群（10 mg/kg）の2例を除き，オビヌツズマブの主要な作用である B 細胞の枯渇が投薬群の全例において認められた。初回投与後，末梢血 B 細胞のほぼ完全な枯渇が用量非依存的に観察され，回復期間にも持続した。リンパ節（下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節）及び脾臓において CD20陽性細胞の減少及び胚中心の消失が認められたことにより，末梢血 B 細胞の枯渇に伴うリンパ組織 B 細胞の減少が確認された。更に，初回投与後に末梢血 NK 細胞の一過性の減少もみられ，オビヌツズマブの薬理作用機序（FcγRIIIa への結合を介した ADCC 誘導）に関連するものと考えられた。胸腺，腸間膜／下顎リンパ節，脾臓における CD3, CD4, CD8の免疫組織化学により，リンパ組織 T 細胞は影響を受けないことが確認された。

37週間回復期間の終了時までに，末梢血 B 細胞は回復傾向を示した。脾臓又はリンパ節において，免疫組織化学による CD20陽性細胞の頻度と分布は投薬群と溶媒群で差がみられず，これらの臓器で B 細胞の減少が完全に回復したことが示された。

10, 30, 100 mg/kg 群の定常状態（投与78日目）における C_{max} と $AUC_{0\text{-}168h}$ の平均値はそれぞれ 469, 1540, 5160 μg/mL 及び35400, 147000, 466000 μg•h/mL であった。低用量群（10 mg/kg）の6例中3例において ADA の産生が認められた。ADA の産生により，これらの動物では血中からの薬物の消失が加速された。血中薬物濃度が高い場合に ADA 検出が妨げられる可能性を考慮し，中用量群（30 mg/kg）では ADA 測定を実施せず，高用量群（100 mg/kg）においては回復期間内のみにおいて実施した。しかし，両群で少なくとも1例に血中薬物濃度の顕著な低下がみられており，これらの投薬群においても ADA 産生の可能性が示唆された。

以上のように，100 mg/kg 投与群において，薬理作用である B 細胞枯渇の二次的影響が原因と推察される安楽死例がみられたことから，本試験条件下における無毒性量は30 mg/kg/週と判断された。

2.6.6.3.3　カニクイザル26週間静脈内投与試験（37週間回復試験）

（資料番号4.2.3.2-3）

1群雌雄各6例の成熟カニクイザルにオビヌツズマブの0（溶媒），5，25及び50 mg/kg を週1回26週間にわたって，静脈内投与（低・中用量は静脈内ボーラス投与，高用量は30分間の持続静脈内投与）を実施した。用量は，13週間静脈内投与試験の結果を基に設定した。最終投与後に1群雌雄各4例の剖検を実施し，各投与群の残り雌雄各2例は続けて37週間の回復試験に供した。一般状態，体重，身体検査，神経行動学的検査，血液学的検査，血液化学的検査，血液及び組織のイムノフェノタイピング，血中のサイトカインレベル，尿検査，眼科学的検査，心血管系検査（心電図，血圧，心拍数），呼吸数，器官重量，剖検所見及び病理組織学的検査に基づいて毒性評価を行った。更に，雌雄の受胎能について，雄の精巣容積，精子形成，精子数，精子運動性及び形態，雌の月経周期，プロラクチン，黄体形成ホルモン，卵胞刺激ホルモン及びエストラジオール又はプロゲステロンを評価した。また，トキシコキネティクス評価を実施した。

一般状態，体重，血液凝固作用，サイトカインレベル及び器官重量について，オビヌツズマブ投与に直接関連した変化は認められなかった。生殖パラメータ，呼吸数，血圧，神経行動学的検査及び眼科学的検査において，投与及び回復期間中にオビヌツズマブに関連した変化は認められなかった。オビヌツズマブによる心律動の異常又は定性的・定量的な心電図変化は認められなかった。

試験期間を通じて，投与期間中に2例（5 mg/kg の雄1例及び50 mg/kg の雌1例），回復期間中に4例（25 mg/kg 雄2例，雌1例及び50 mg/kg の雌1例）の計6例が瀕死状態となり安楽死処置を行った。5 mg/kg 雄1例は，6回目投与後の投与36日目に，アナフィラキシー反応／アナフィラキシー様反応（過剰な流涎，痒みを伴う腕にまで及ぶ顔面の紅斑）が認められ，ジフェンヒドラミン投与を行ったが，9回目投与（投与57日目）後にもアナフィラキシー反応／アナフィラキシー様反応が認められたことから，投与63日目に安楽死処置を行った。この個体では，ADA の産生，末梢血中の免疫複合体，B 細胞数の正常化が認められ，免疫反応に続くアナフィラキシー反応／アナフィラキシー様反応と整合する所見と考えられた。オビヌツズマブ投与に関連した残り5例の安楽死例は，慢性過敏反応がもたらした免疫複合体性糸球体腎炎又は他の組織の炎症，若しくはその両方に起因した状態悪化によるものと考えられた。

25 mg/kg 以上の用量群の安楽死例では，体重減少，摂餌量の減少，削痩が認められた。これらの変化は糸球体腎炎，複数の組織における漿膜／外膜炎症，動脈炎／動脈周囲炎などの病理組織学的所見に付随するものであった。更に，投与92日目に25 mg/kg の雌1例が明白なアナフィラキシー反応／アナフィラキシー様反応（不規則な呼吸及び運動失調）を示した。その後の大部分の投与期間において，注入速度の低速化及びジフェンヒドラミン前投与を行ったことにより，これらの過敏反応を改善させることができた。この個体では，ADA の産生，末梢血中の免疫複合体，B 細胞数の正常化が認められ，免疫反応に続くアナフィラキシー反応／アナフィラキシー様反応と整合する所見と考えられた。

オビヌツズマブ投与群の雄で，投与178日目に歯肉炎の発現率上昇がみられ，被験物質による二次的な免疫抑制作用を反映している可能性が示唆された。この所見は13週間静脈内投与試験の100 mg/kg の雄1例でも認められた。回復期間の検査では，オビヌツズマブに関連した異常は認められなかった。

オビヌツズマブの主要な作用である B 細胞の枯渇が投薬群の全例で認められた。初回投与後，全動物で末梢血 B 細胞のほぼ完全な枯渇が観察された。ADA を産生し薬物曝露が低下した個体を除き，投与期間及び回復期間途中まで，B 細胞は検出不可能なレベル又はほぼ0の値を示した。リンパ節及び脾臓における CD20陽性細胞の減少並びに胚中心の消失により，リンパ組織の B 細胞の枯渇が確認された。更に，初回投与後に NK 細胞の減少も認められ，薬理作用機序（FcγRIIIa への結合を介した ADCC 誘導）に関連するものと考えられた。

5 mg/kg の1例を除き，37週間回復期間の終了時までに，投薬群生存例における末梢血 B 細胞のレベルは回復又は回復傾向を示した。更に，リンパ組織における CD20陽性 B 細胞の枯渇も回復又は回復傾向を示した。

その他の血液学的検査，血液化学的検査及び尿検査で認められた変化は，オビヌツズマブ投与に関連した二次的影響と考えられた。貧血，総タンパク質・アルブミンの減少，血中尿素窒素（BUN）及びクレアチニンの増加並びに尿タンパクの排泄が25 mg/kg 以上において主に安楽死例（25 mg/kg の雄2例，雌1例及び50 mg/kg の雌2例）で認められ，過敏反応に関連した炎症又は状態悪化，若しくはその両方と一致する所見と考えられた。

病理組織学的検査で認められた変化（免疫複合体性糸球体腎炎，動脈炎／動脈周囲炎，複数の組織における単核細胞の浸潤／炎症の発現及び／若しくは重篤度の増加）は過敏反応と一致していた。炎症性変化は多数の臓器で認められ，標的組織特異的ではなく，全身性の変化と考えられた。変化は全投薬群において認められたが，炎症性変化の発現頻度及び重篤度は5 mg/kg と比較して25, 50 mg/kg で増大していた。糸球体腎炎と付随する変化は回復期間終了時にも認められたものの，これらの動物の炎症性変化は投与期間終了時と比較して軽減する傾向

にあった。糸球体腎炎を発症した数例の糸球体において免疫複合体が検出され（電子顕微鏡検査による高電子密度沈着物及び，免疫組織化学又は免疫蛍光染色によるサル IgG, IgM 及び／若しくは補体蛋白質 C3の陽性反応），これらの変化が免疫を介した反応であることが確認された。免疫組織化学では糸球体腎炎が認められた動物の糸球体においてオビヌツズマブを検出することはできなかったが，原因としてアッセイの感度の不足若しくは回復期間におけるオビヌツズマブエピトープの変質／変性の可能性が推察された。

5, 25, 50 mg/kg 週1回投与群の定常状態（投与176日目）における C_{max} と $AUC_{0\text{-}168h}$ の平均値はそれぞれ377, 1530, 2920 μg/mL 及び39800, 183000, 344000 μg•h/mL であった。試験期間を通して，36例中7例において ADA の産生が認められた。高用量群（50 mg/kg）ではオビヌツズマブの曝露は試験終了時まで維持されたが，低用量群（5 mg/kg）の12例中4例及び中用量群（25 mg/kg）の12例中1例で血中における薬物の消失の加速と B 細胞の回復が認められ，ADA 産生によるものであることが示唆された。

投与及び回復期間を通して，組織の炎症が認められた動物の血中で ADA は検出されなかった。過敏反応と免疫複合体の相関性を検討するため，オビヌツズマブを投与した個体16例について血中の免疫複合体を解析した。その結果，血中の免疫複合体は16例中7例に検出された（低用量群2例，中用量群3例，高用量群2例）。その内2例はアナフィラキシー反応／アナフィラキシー様反応を示し，2例（その内1例は軽度）では糸球体腎炎，1例では軽度な組織の炎症が認められた。血中の免疫複合体が検出された残りの2例では同様の病理組織学的変化はみられなかった。

以上のように，5 mg/kg 以上の用量において，本薬投与に伴う過敏反応が原因と考えられる安楽死例がみられたことから，本試験条件下における無毒性量は5 mg/kg/週未満と判断された。

2.6.6.3.4　カニクイザル4週間皮下投与試験（28週間回復試験）

（資料番号4.2.3.2-4）

1群雌雄各5例の成熟カニクイザルにオビヌツズマブの0（溶媒），30 mg/body（体重あたりの投与量としておよそ4～10 mg/kg）及び120 mg/body（体重あたりの投与量としておよそ17～41 mg/kg）を週1回4週間にわたって皮下投与した。投与量は，薬理学的作用が得られる曝露レベルと想定される用量として30 mg/body，本試験における投与可能な最大用量として120 mg/body を設定した。最終投与3日後に1群雌雄各3例の剖検を実施し，残り雌雄各2例は続けて28週間の回復試験に供した。一般状態，体重，血液学的検査，血液化学的検査，尿検査，血液及び組織のイムノフェノタイピング，器官重量，剖検所見及び病理組織学的検査に基づいて毒性評価を実施した。また，トキシコキネティクス評価を実施した。

一般状態，血液凝固作用，尿検査，器官重量及び剖検所見について，オビヌツズマブに直接起因した一貫性のある変化は認められなかった。

高用量（120 mg/body）回復群の雄1例は，回復期間89日目に瀕死状態のため安楽死処置を行った。食道及び腸を含む種々の組織の炎症性変化とそれに伴う血液学的及び血液化学的変化（白血球数・血小板数の増加，ヘモグロビン・ヘマトクリットの減少，C 反応性タンパクのわずかな増加等）が認められ，状態悪化の原因と推測される日和見感染に一致する所見と考えられた。しかし， 26週間静脈内投与試験において過敏反応を示した動物といくつかの病理組織学的な類似点（様々な組織における炎症／細胞浸潤等）があり，過敏反応が起こった可能性を完全に否定することはできないと考えられる。

オビヌツズマブの主要な作用である B 細胞の枯渇が投薬群の全例で認められた。初回投与後に，末梢血 B 細胞の100%に近い減少がみられ，回復期間においても持続した。投与期間終了時に，リンパ節（腋窩，腸間膜及び下顎）及び脾臓において CD20陽性細胞の減少が認められたこと及びこれらの組織の多くで胚中心の消失が認められたことより，末梢血 B 細胞の減少に伴うリンパ組織 B 細胞の枯渇が確認された。更に，初回投与後に30 mg/body 以上で末梢血 NK 細胞の減少が認められ，オビヌツズマブの薬理作用機序（FcγRIIIa への結合を介した

ADCC 誘導）に関連するものと考えられた。胸腺，リンパ節（腋窩，腸間膜及び下顎），脾臓における CD3, CD4, CD8の免疫組織化学では，リンパ組織の T 細胞に影響はみられなかった。

末梢血 B 細胞は，30 mg/body 投与の回復期間28日目又は120 mg/body 投与の回復期間126日目に回復し始めた。両群とも28週間回復期間終了時には末梢血 B 細胞枯渇の回復傾向が認められた。投与期間終了時に認められたリンパ組織 B 細胞の枯渇（リンパ節及び脾臓）も回復期間終了時までに完全に回復し，末梢血 B 細胞の回復と相関していた。

血液学的検査又は血液化学的検査において，高用量群（120 mg/body）でフィブリノーゲン及びクレアチニンなどの増加が散見され，感染あるいは炎症に関連した所見の可能性が推察された。

30, 120 mg/body 投与群の投与22日目における C_{max} と $AUC_{0\text{-}168h}$ の平均値はそれぞれ42.4, 331 μg/mL 及び5540, 43100 μg•h/mL であった。オビヌツズマブ投与群の6例（30 mg/body 群の5例, 120 mg/body 群の1例）に ADA の産生が認められた（血中薬物濃度が高い場合に ADA 検出が妨げられる可能性を考慮し，回復群を中心とした9例で ADA の測定を実施した）。このうち 30 mg/body 群の4/5例において，曝露量の低下が認められた。

以上のように，120 mg/body 投与群において，薬理作用である B 細胞枯渇の二次的影響が原因と推察される安楽死例がみられたことから，本試験条件下における無毒性量は30 mg/body/週と判断された。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

ICH S6(R1)ガイドラインに準拠し，オビヌツズマブの遺伝毒性試験は実施していない。低分子医薬品で通常実施される遺伝毒性試験は，オビヌツズマブのようなバイオテクノロジー応用医薬品においては適切なものではない。

2.6.6.5　がん原性試験

オビヌツズマブのがん原性試験は実施していない。バイオテクノロジー応用医薬品には，標準的ながん原性試験は一般的に不適切である（ICH S6(R1)ガイドライン）。また，がん原性試験は通常，進行がん患者の治療を目的とした医薬品の製造販売承認申請には必要とされない（ICH S9ガイドライン）。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

オビヌツズマブの雌雄の受胎能への影響は，カニクイザルを用いた26週間静脈内投与試験で評価した。胚・胎児発生並びに出生前及び出生後の発生への影響については，ePPND 試験を実施して評価した。

26週間静脈内投与試験では，雌雄生殖器の器官重量，病理組織学的検査，雄の精巣容積，精子形成，精子数，精子運動性及び形態に薬物に関連した影響は認められなかった。また，雌の月経周期，プロラクチン，黄体形成ホルモン，卵胞刺激ホルモン，エストラジオール及びプロゲステロンについても，薬物に関連した影響は認められなかった。

2.6.6.6.1　カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）毒性試験

（資料番号4.2.3.5.3-1）

1群18～19例の妊娠雌カニクイザルに， オビヌツズマブ 0（溶媒），25及び50 mg/kg を週1回妊娠20日目から出産まで持続静脈内投与し，オビヌツズマブの胚・胎児発生，出産，出生後の生存，出産後240日目までの出生児の成長及び発達に及ぼす潜在的な影響を評価した。投与量は，13週間及び26週間静脈内投与試験の成績を基に高用量を50 mg/kg に設定し，用量反応性の評価のため低用量に25 mg/kg を設定した。最高用量である50 mg/kg は臨床推奨用量の約2倍

の曝露量を示すと推察された。

母動物の生存期間中に，一般状態，体重及び月経出血を観察した。妊娠の状態は超音波検査と膣塗抹標本によって判定した。胚・胎児発生は超音波検査によってモニターを行った。

出生児は，出生後の発達期間に一般状態及び体重を検査した。更に，神経行動学的検査，筋力検査，外観の一般・形態学的検査及び X 線を用いた骨格発達検査を実施した。出産後240日目の剖検時に，母動物及び出生児の臓器の肉眼的観察及び病理組織学的検査を行った。

母動物及び出生児のトキシコキネティクス評価を実施した。更に，出生児の血液サンプルを採取し，血液学的検査，イムノフェノタイピング，免疫機能の評価（スカシ貝ヘモシアニン（KLH））を用いた T 細胞依存性抗体産生能検査）を行った。出産後28日目に母動物の乳汁を採取し，薬物濃度の測定を実施した。

溶媒群，25，50 mg/kg 群で，それぞれ13，9，12例の生存出生児が得られ，最終剖検時における生存例はそれぞれ12, 8, 10例であった。雌カニクイザルへの妊娠20日目から出産までのオビヌツズマブの投与によって，胚・胎児毒性又は催奇形性は認められなかった。出生前の胎児損失／死亡あるいは死産の出現率は公表論文に示された試験実施施設における背景値の範囲内であった[2)-4)]。母動物の体重に影響はみられなかった。50 mg/kg 群の出生児の体重増加には軽度の抑制が認められたが，正常の変動の範囲内であった。出生児では出生後の成長及び発達にその他の薬物に関連した影響は観察されなかった。出生児の神経行動学的検査及び血液学的パラメータに薬物の影響は認められなかった。妊娠期間中の母動物へのオビヌツズマブ投与により，出生児で B リンパ球が完全に枯渇した。しかし，B リンパ球数は出産後112日目（25 mg/kg）又は168日目（50 mg/kg）には溶媒群の動物と比較してほぼ正常のレベルまで回復し，免疫系に対する影響は長期間持続しないことが示された。出生児に対する KLH 感作（出産後181日目及び212日目に実施）による評価において，薬物に関連した T 細胞依存性抗体産生への影響は認められなかった。

母動物及び出生児に薬物に直接起因した一般状態変化は観察されなかった。母動物1例では自然発生性の条虫感染による全身状態の悪化のため安楽死処置を実施した。その他の母動物（低用量群3例及び高用量群3例）又は出生児（低用量群1例及び高用量群2例）の安楽死処置又は死亡は，二次的な日和見感染又は被験物質に対する免疫反応，若しくはその両方に起因すると考えられた。本 ePPND 試験では漿膜の炎症（消化管，心臓等）及び間質性炎症（腎臓，肝臓，胆管等），また糸球体腎炎の部分的な特徴のみを示す所見として糸球体症が認められた。安楽死処置の時期（最終投与から約3カ月後にピーク）及び瀕死状態に関連した病理組織学的所見は26週間静脈内投与試験で認められた所見と類似点があり，免疫複合体を介した過敏反応の可能性が示唆された。試験終了時の病理組織学的検査では，全動物で薬物投与に関連した変化は認められなかった。

母動物における妊娠139日目の平均 $AUC_{0\text{-}168h}$ は25, 50 mg/kg 群でそれぞれ125000, 250000 μg•h/mL，平均 C_{max} はそれぞれ1220, 2470 μg/mL であった。

母動物における出産後28日目の血清中薬物濃度（1時点のみ測定）は25, 50 mg/kg 群でそれぞれ32～955, 43～265 μg/mL であり，乳汁中濃度は血清中濃度のそれぞれ約0.04%, 0.1%であった。出生児における出産後28日目の血清中薬物濃度は，25, 50 mg/kg 群でそれぞれ16～173, 81～659 μg/mL であった。

母動物では5例（低用量群で1例及び高用量群で4例）に，投与後の1回以上の測定時点で ADA が検出されたが，いずれの動物においても最終剖検時の病理組織学的検査で薬物投与に関連した変化は認められなかった。出生児においても3例（低用量群で1例及び高用量群で2例）に ADA が検出されたが，いずれの個体においても本薬に起因した明らかな炎症性変化はみられなかった。ADA が検出された出生児3例中1例では，母動物も剖検時に ADA 陽性であったが，薬物に関連した組織変化はみられなかった。一方，別の ADA 陽性出生児1例の母動物（ADA 陰性）では，剖検時に組織及び漿膜の炎症，糸球体症が認められた。このように，総じて，母動物と出生児の ADA 陽性例，曝露量，過敏反応の間で一貫した相関はみられなかっ

た。

以上のように，オビヌツズマブは胚・胎児発生，出産，出生後の生存，出生児の成長及び発達に影響を及ぼさなかったが，25 mg/kg 以上の用量において母動物又は出生児で，B 細胞枯渇の二次的な影響又は免疫反応，若しくはその両方に起因すると考えられる安楽死例及び死亡がみられたことから，本試験条件下における無毒性量は25 mg/kg/週未満と判断された。

2.6.6.7 局所刺激性試験

臨床用製剤と同じ処方の製剤を用いて実施したカニクイザルの13及び26週間静脈内投与試験（25 mg/mL まで）において，オビヌツズマブの局所忍容性は良好であった。また，4週間皮下投与試験から更なる情報が得られており，皮下投与（10 mg/mL）においても同製剤の局所忍容性は良好であり，局所刺激性は認められなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

その他の毒性試験として，組織交差反応性試験，*in vitro* サイトカイン放出試験，並びに溶血性及び血液適合性試験を実施した。

2.6.6.8.1 組織交差反応性試験

（資料番号4.2.3.7.7-1，4.2.3.7.7-2，4.2.3.7.7-3）

オビヌツズマブの *in vitro* 組織交差反応性をヒト（4.2.3.7.7-1）及びカニクイザル（4.2.3.7.7-2）の組織パネルを用いて評価した。ヒト組織では，リンパ組織（胃と小腸の腸管関連リンパ組織，リンパ節，脾臓，胸腺及び扁桃腺）の常在性リンパ球，乳腺のリンパ球，骨髄中のリンパ球又は造血細胞，及び他組織（甲状腺）の遊走リンパ球において，予想されたオビヌツズマブの特異的反応性がみられた。また，ヒトの胆管上皮，唾液腺及び肺の内皮細胞にも交差反応性がみられた。これらの組織では，陽性染色されたほとんどすべての細胞で，細胞膜以外に細胞質も染色された。カニクイザルの組織においても，ヒト組織同様，リンパ組織に特異的な染色が認められ，これまでに報告されている CD20の発現[1)]と一致するものであった。また，小腸，心臓，腎臓，肺，卵巣，膵臓，下垂体，前立腺，唾液腺，精巣及び子宮内膜の内皮細胞に交差反応性がみられた。

上述したヒト及びカニクイザル組織を用いた組織交差反応性試験では，予想されなかった細胞膜の染色が内皮細胞で観察され，オビヌツズマブが直接，内皮細胞に結合した結果，カニクイザルで血管炎が誘発された可能性が疑われた（2.6.6.3.3）。この可能性を除外するため，追加試験を実施した（4.2.3.7.7-3）。追加の組織交差反応性試験は，上述の試験と同様の手順で行われたが，由来（ドナー）が異なるヒト及びサル組織，並びに異なる標識二次抗体を用いた。予想されたように，単核白血球（B リンパ球）の細胞膜及び細胞質に，オビヌツズマブ特異的な染色がみられた。加えて，ヒト組織では，内皮細胞，上皮／筋上皮細胞及び血小板において，カニクイザル組織では，内皮細胞，上皮細胞，小脳顆粒層細胞及び神経突起，及び皮膚毛包根鞘において，細胞質の染色がみられた。しかし，いずれの動物種においても，内皮細胞を含むこれらの組織で細胞膜の染色は認められなかった。モノクローナル抗体は *in vivo* で細胞質に到達しないと考えられることから，*in vitro* 試験でのモノクローナル抗体による細胞質の染色は毒性学的意義が低いと考えられている（ICH S6(R1)ガイドライン，5)）。この追加試験の結果から，最初に実施した試験でみられた想定外の細胞膜の染色は，組織交差反応性試験のような実験に特有の変動によるものであること，及び *in vivo* においてオビヌツズマブが直接，内皮細胞に作用する可能性は低いことが確認された。

2.6.6.8.2 *In vitro* サイトカイン放出試験

（資料番号4.2.3.7.7-4，4.2.3.7.7-5．4.2.3.7.7-6）

ヒトの初回投与におけるサイトカイン放出のリスクを評価するため，オビヌツズマブ によるサイトカイン放出とそれに伴う好中球活性化に関する *in vitro* 試験を実施した。健康な供血者計41例から得た新鮮ヒト血液（未希釈）に0.01～200 μg/mL のオビヌツズマブを添加して2時間培養し，炎症性サイトカインである IL-6，IFN-γ 及び TNF-α，並びに好中球活性化の指標であるインテグリン CD11b の発現を測定した。10 μg/mL のオビヌツズマブによって，供血者の5%で TNF-α の中程度の増加とそれに伴う好中球の活性化が生じた。陽性対照抗体のアレムツズマブでは，供血者の93%でオビヌツズマブより3～30倍高い TNF-α レベルを示した。

更に，アッセイの感受性及び予測性を高めるため，培養時間を24時間に延長し，0.1～100 μg/mL の濃度で試験を行った。これらの濃度は *in vitro* 試験において著しい細胞毒性が認められない濃度範囲として設定したが，臨床用量投与時のヒトにおける C_{max}（925 μg/mL）を下回るものであった。健康な供血者計10例の新鮮血液を用いた24時間培養アッセイにおいて，陽性対照のアレムツズマブは，100%の供血者で，陰性対照のセツキシマブの中央値のおよそ50～200倍の IL-6, IL-8，TNF-α を産生した。オビヌツズマブは0.1～100 μg/mL の濃度範囲において，IL-6では100%，IL-8では90%，TNF-α では100%の供血者で顕著なサイトカインの放出を誘導し，これは陰性対照であるセツキシマブと比較して最大で IL-6は63.7倍，IL-8は27.5倍，TNF-α は13.4倍であった。

また，追加試験を実施してオビヌツズマブを含む3つの抗 CD20抗体でサイトカイン放出を比較した。健康な供血者計13例から得たヒト血液にオビヌツズマブ, CD20に対する抗体であるリツキシマブ及びオファツムマブ，また比較対照としてアレムツズマブ及びセツキシマブを添加し，0.1～100 μg/mL の濃度で培養した。24時間後に，IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-12p70, IL-1β, IL-1α, IL-10の血漿中への放出を測定した。加えて，イムノフェノタイピングを実施して B 細胞，T 細胞及び NK 細胞数の変化を調べ，好中球活性化マーカーとして CD11b の発現をモニターした。その結果，本アッセイにおいて，オビヌツズマブはリツキシマブ及びオファツムマブに比べて，より強いサイトカイン放出，好中球の活性化，並びに B 細胞の枯渇を誘導した。

これらの結果からは，ヒトにおいてオビヌツズマブが初回投与に関連したサイトカイン放出を誘導する可能性があることが示唆された。

2.6.6.8.3　溶血性及び血液適合性試験

（資料番号4.2.3.7.7-7）

ヒト全血に最終濃度5 mg/mL までオビヌツズマブを添加し，37℃ で10分間培養後にヘモグロビン濃度を測定した。また，ヒト血漿に最終濃度5 mg/mL までオビヌツズマブを添加し，37度で10分間培養後に沈澱を目視にて観察した。ヒト全血において，オビヌツズマブは5 mg/mL まで溶血作用を示さなかった。更に，オビヌツズマブをヒト血漿と培養したところ，5 mg/mL まで凝集作用を示さなかった。

2.6.6.9　考察及び結論

毒性試験はオビヌツズマブの臨床投与経路である静脈内反復投与での安全性を評価するよう計画された。CD20のオビヌツズマブ結合エピトープ相当領域の配列相同性，オビヌツズマブと CD20との親和性及び Fc 受容体を介するエフェクター機能がヒトとカニクイザルにおいて同様であること（2.6.3.2.4）を基に，オビヌツズマブの安全性試験の動物種としてカニクイザルを選択した。反復投与試験では，カニクイザルにオビヌツズマブを週1回26週間まで静脈内投与（ボーラス又は30分間の持続静脈内投与）及び週1回4週間皮下投与した。臨床製剤と同じ処方の製剤の静脈内投与及び皮下投与の局所忍容性はともに良好であった。

反復静脈内投与毒性試験において，100 mg/kg/週の用量で13週間投与（週1回）又は50 mg/kg/週の用量で26週間投与（週1回）したときの曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}168h}$）は，臨床用量（1000

mg）投与時の曝露量と比較して，C_{max} ではおよそ3～6倍，AUC ではおよそ3～4倍であった（表 2.6.6.9-1）。これらの試験で認められた所見は，薬理作用に起因した可逆的な B 細胞の枯渇及びその二次的影響である日和見感染，ヒト蛋白質を投与したことによる免疫原性に関連すると考えられる所見であった。

表 2.6.6.9-1　カニクイザル反復静脈内投与毒性試験の曝露量及び曝露量比（動物/ヒト）

動物種	投与量 (mg/kg，週1回)	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}168h}$ (μg•h/mL)	曝露量比 [a]	
				C_{max}	AUC
13週間静脈内投与試験 (投与78日目)	10	469	35400	0.50	0.31
	30	1540	147000	1.7	1.3
	100	5160	466000	5.6	4.1
26週間静脈内投与試験 (投与176日目)	5	377	39800	0.41	0.35
	25	1530	183000	1.7	1.6
	50	2920	344000	3.2	3.0

a　JO29737試験で，1000 mg を3週間ごとに投与したときのヒト曝露量（cycle 2の Day1に投与し，Day 8までの血清中オビヌツズマブ濃度で算出した C_{max}（925 μg/mL）及び AUC_{last} (114480 μg•h/mL)）　を基に計算。

(1)　B 細胞の枯渇

オビヌツズマブの反復投与により認められた主要な変化は薬理作用に基づくものであり，初回投与後，投薬群の全例で末梢血 B 細胞の顕著な減少が観察された。また，リンパ節及び脾臓のイムノフェノタイピング／免疫組織化学では CD20陽性細胞の減少が観察され，リンパ組織においても末梢血 B 細胞減少に一致した B 細胞枯渇が確認された。ADA を産生して曝露量が低下した動物を除き，末梢血の B 細胞枯渇は投与期間及び回復期間途中まで持続した。更に，初回投与後に NK 細胞の減少が認められた。NK 活性発現時あるいは ADCC 時に標的細胞との相互作用の結果，NK 細胞の顕著な減少がみられることが報告されており[6)]，薬理作用機序（FcγRIIIa への結合を介した ADCC 誘導）に関連した所見と考えられた。

末梢血の B 細胞が回復し始めるまでには数カ月間を要した。このような緩徐な B 細胞の回復性の一因として，公表されている IgG タイプの治療抗体同様，オビヌツズマブの血中からの消失が緩徐であることが考えられる。37週間の回復期間後に脾臓及びリンパ節 B 細胞は回復し，末梢血 B 細胞にも回復傾向がみられた。

カニクイザルでは B 細胞枯渇の結果，日和見感染及び安楽死例が発生したと考えられる。4週間皮下投与試験及び13週間静脈内投与試験の3例（4週間皮下投与試験の回復期間に1例，13週間静脈内投与試験の回復期間に2例）は，二次的感染／日和見感染を示唆する一般状態の悪化及び炎症性変化が認められ安楽死処置された。しかし，これらの3例と26週間静脈内投与試験で過敏反応がみられた動物には病理組織学的所見にいくつかの類似点（種々の組織での炎症/細胞浸潤像など）があることから，これらの3例においても過敏反応が起こっていた可能性は否定できない。

(2)　免疫原性

オビヌツズマブ（5 mg/kg/週以上の投与）はカニクイザルにおいて免疫原性を示した。数例の動物では ADA の産生により曝露量が低下して薬理作用（B 細胞枯渇）が減弱し，過敏反応もみられた。26週間静脈内投与試験で観察されたアナフィラキシー反応／アナフィラキシー様反応，全身性の炎症及び細胞浸潤，動脈炎／動脈周囲炎，糸球体腎炎，漿膜／外膜炎症の出現率の増加は，免疫複合体の形成/沈着と一致する所見であった。このような過敏反応により26週間静脈内投与試験では6例が安楽死処置されたが，その多くは回復期間中であった。

全身性炎症に関連して貧血，総タンパク質・アルブミン減少などが認められた。また，BUN・クレアチニンの増加が散見され，腎臓の電子顕微鏡検査で免疫複合体の沈着が，免疫蛍光染色又は免疫組織化学でサル IgG, IgM, 補体蛋白質 C3が検出されたことから，免疫複合体を介した糸球体腎炎であることが確認された。ePPND 試験における安楽死例の発生時期（ピークは投与終了後3カ月目）及び病理組織学的所見は，26週間静脈内投与試験と類似しており，死因が免疫原性に関連していることが示唆された。

カニクイザルにおいてはヒト化 IgG である本薬が異種蛋白として認識されることから，カニクイザルで認められた免疫原性はヒトにおける免疫原性を予測するものではないと考えられる。

(3) サイトカインの放出

カニクイザルの反復投与毒性試験では100 mg/kg/週までの投与で血中サイトカインの上昇を示唆する所見は得られなかった。健康な供血者の未希釈全血を用いた *in vitro* アッセイでは，標的細胞の存在下でオビヌツズマブによる顕著なサイトカイン放出の増加及び好中球の活性化がみられた。これは，オビヌツズマブが標的細胞に結合してエフェクター細胞の FcγRIII が活性化された結果であり，オビヌツズマブでは FcγRIII への親和性が増していることに関連している。サイトカイン放出及びそれに付随する好中球の活性化を0.01～200 µg/mL 又は0.1～100 µg/mL の濃度範囲で2又は24時間培養して評価した。オビヌツズマブは炎症性サイトカインである IL-6，IL-8及び TNF-α を陰性対照であるセツキシマブより，各々，最大63.7倍，27.5倍及び13.4倍高く放出した。また，抗 CD20抗体であるリツキシマブ及びオファツムマブより強いサイトカイン放出を誘導した。これらの結果は，オビヌツズマブが患者において初回投与に関連したサイトカイン放出を誘発する可能性を示唆しており，臨床試験で観察された一過性のサイトカインの変化（IRR）と一致すると考えられた。（2.5.5.6.1）

(4) まとめ

想定される薬理作用に一致して，オビヌツズマブは末梢血及びリンパ組織（リンパ節及び脾臓）で B 細胞の顕著な減少を誘発した。末梢血 B 細胞の枯渇は数カ月間の休薬後，血清中薬物濃度が低下すると回復し始め，個体差はあるものの37週間後までには回復又は回復傾向を示した。4週間皮下投与試験の1例及び13週間静脈内投与試験の2例が瀕死状態から安楽死処置され，B 細胞枯渇の二次的影響である日和見感染によるものと推察された。オビヌツズマブはカニクイザルで免疫原性を示し，数例の動物で ADA 産生に伴う曝露量の低下及びその結果としての薬理作用の減弱がみられた。また，26週間静脈内投与試験の6例では過敏反応に起因した症状が認められ安楽死処置を行った。全身性炎症／細胞浸潤，動脈炎／動脈周囲炎，糸球体腎炎，種々の組織における漿膜／外膜の炎症などの出現率の増加は，オビヌツズマブの免疫原性に関連したものと考えられた。オビヌツズマブは雌雄の受胎能パラメータ，胚・胎児の発生，出産，出生後の生存並びに出生児の発達及び成長に影響を及ぼさなかったが，出生児で B 細胞が完全に枯渇した。B 細胞の枯渇は出生後6カ月以内に対照群レベルまで回復した。

未希釈のヒト全血を用いた *in vitro* アッセイではオビヌツズマブによってサイトカイン放出が増加し，ヒトにおいて初回投与に関連したサイトカイン放出を誘導する可能性が示唆された。*In vitro* 組織交差性反応試験では，ヒト及びカニクイザル組織で類似した交差反応性が観察された。

このように，オビヌツズマブの毒性試験において認められた変化は，薬理作用又は異種蛋白投与による免疫原性に関連したものであった。これらの所見は休薬により回復する可逆的な変化であり，管理可能であることを考慮すると，オビヌツズマブの安全性プロファイルは CD20陽性の血液腫瘍患者において許容可能であると考えられた。

2.6.6.10 図表

図表は本文中に挿入した。

2.6.6.11 参考文献

1) Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. Curr Dir Autoimmun 2005;8:140-74.
2) Jarvis P, Srivastav S, Vogelwedde E, Stewart J, Mitchard T, Weinbauer GF. The cynomolgus monkey as a model for developmental toxicity studies: variability of pregnancy losses, statistical power estimates, and group size considerations. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2010;89:175-87.
3) Weinbauer GF, Jarvis P, Srivastav S, Mitchard T, Vogelwedde E, Stewart J. Objective group size determination for developmental toxicity studies in a nonhuman primate model (*Macaca fascicularis*). In: Weinbauer GF, Vogel F(eds.): Future trends in primate toxicology and biotechnology. Waxmann Münster; 2010. p. 81-93.
4) Weinbauer GF, Fuchs A, Niehaus M, Luetjens CM. The enhanced pre- and postnatal study for nonhuman primates: update and perspectives. Birth Defects Res C Embryo Today 2011;93:324-33.
5) Leach MW, Halpern WG, Johnson CW, Rojko JL, MacLachlan TK, Chan CM, et al. Use of tissue cross-reactivity studies in the development of antibody-based biopharmaceuticals: history, experience, methodology, and future directions. Toxicol Pathol 2010; 38:1138-66.
6) Warren HS. Target-induced natural killer cell loss as a measure of NK cell responses. J Immunol Methods 2011;370:86-92.

ガザイバ点滴静注1000 mg
（オビヌツズマブ（遺伝子組換え））

［CD20陽性の B 細胞性濾胞性リンパ腫］

第2部　（モジュール2）：CTD の概要（サマリー）

2.6.7 毒性試験概要表

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
AUC	area under the serum concentration-time curve	血清中薬物濃度-時間曲線下面積
C_{max}	maximum observed serum concentration	最高血清中濃度
ePPND	enhanced pre- and post-natal development	拡充型出生前及び出生後の発生
F	female	雌
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
[redacted]	[redacted]	[redacted]
IC	immune complex	免疫複合体
IFN-γ	interferon gamma	インターフェロンガンマ
IL	interleukin	インターロイキン
IRR	infusion-related reactions	ー
IV	intravenous	静脈内
LN	lymph node	リンパ節
M	male	雄
NA	not applicable	適用なし
NC	not calculated	計算なし
ND	not determined	測定なし
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PB	peripheral blood	末梢血
pc	post-coitum	交尾後
pp	post-partum	出産後
SC	subcutaneous	皮下
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha	腫瘍壊死因子アルファ

目次

頁

2.6.7 毒性試験概要表 4
2.6.7.1 毒性試験一覧表 4
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 6
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 7
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 8
2.6.7.5 急性毒性試験 9
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 10
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 11
2.6.7.7.1 カニクイザル 13 週間静脈内投与試験（37 週間回復試験） 11
2.6.7.7.2 カニクイザル 26 週間静脈内投与試験（37 週間回復試験） 14
2.6.7.7.3 カニクイザル 4 週間皮下投与試験（28 週間回復試験） 18
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 20
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 20
2.6.7.10 がん原性試験 20
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 20
2.6.7.12 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 20
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 20
2.6.7.14 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 21
2.6.7.15 新生児を用いた試験 24
2.6.7.16 局所刺激性試験 25
2.6.7.17 その他の毒性試験 26
2.6.7.17.1 組織交差反応性試験 26
2.6.7.17.2 *In vitro* サイトカイン放出試験 27
2.6.7.17.3 溶血性及び血液適合性試験 29

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表

Test Article: obinutuzumab

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/week) [a]	GLP Compliance	Testing Facility	Report No. Location in CTD
Repeat Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	IV	2 weeks	1, 10	Non-GLP	[redacted] ([redacted], England)	1024829 4.2.3.2-1
Repeat Dose Toxicity [b, d]	Cynomolgus monkey	IV	13 weeks	0, 10, 30, 100	GLP	[redacted] ([redacted], Germany)	1024830 4.2.3.2-2
Repeat Dose Toxicity [b, c, d]	Cynomolgus monkey	IV	26 weeks	0, 5, 25, 50	GLP	[redacted] ([redacted], USA)	1036190 4.2.3.2-3
Repeat Dose Toxicity [d]	Cynomolgus monkey	SC	4 weeks	0, 30, 120 mg/body/week	GLP	[redacted] ([redacted], Germany)	1024838 4.2.3.2-4
Reproductive and Developmental Toxicity (ePPND)	Cynomolgus monkey	IV	Day 20 pc to birth	0, 25, 50	GLP	[redacted] ([redacted], Germany)	1045612 4.2.3.5.3-1

[a] Unless otherwise specified for repeat-dose toxicity, NOAEL is underlined.
[b] Safety pharmacology endpoints were assessed as part of this study.
[c] Fertility aspects were assessed as part of this study.
[d] Local tolerance aspects were assessed as part of this study.

表 2.6.7.1-1　毒性試験一覧表（続）

Test Article: obinutuzumab

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Report No. Location in CTD
Other Toxicity Studies							
Tissue Cross-Reactivity	Human tissues	*In vitro*	NA	5, 30 µg/mL	GLP	[redacted] ([redacted] USA)	1024159 4.2.3.7.7-1
Tissue Cross-Reactivity	Cynomolgus monkey tissues	*In vitro*	NA	5, 30 µg/mL	GLP	[redacted] ([redacted], USA)	1024158 4.2.3.7.7-2
Tissue Cross-Reactivity	Human and Cynomolgus monkey tissues	*In vitro*	NA	5, 30 µg/mL	GLP	[redacted] ([redacted], USA)	1061540 4.2.3.7.7-3
Cytokine Release	Human blood	*In vitro*	2 hours	0.01−200 µg/mL	Non-GLP	Pharma Research Basel F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland)	1025124 4.2.3.7.7-4
Cytokine Release	Human blood	*In vitro*	24 hours	0.1−100 µg/mL	Non-GLP	Pharma Research Basel F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland)	1045703 4.2.3.7.7-5
Cytokine Release	Human blood	*In vitro*	24 hours	0.1−100 µg/mL	Non-GLP	Pharma Research Basel F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland)	1062523 4.2.3.7.7-6
Hemolytic Potential and Blood Compatibility	Human whole blood Human plasma	*In vitro*	10 min	0.07−5 mg/mL 0.625−5 mg/mL	Non-GLP	Pharma Research Basel F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland)	1025140 4.2.3.7.7-7

2.6.7.2　トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2-1　トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article:　obinutuzumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/week)	GLP Compliance	Report No. Location in CTD
Repeat Dose Toxicity:　13-Week Study	Cynomolgus monkey	IV	0, 10, 30, 100	GLP	1024830 4.2.3.2-2
Repeat Dose Toxicity:　26-Week Study	Cynomolgus monkey	IV	0, 5, 25, 50	GLP	1036190 4.2.3.2-3
Reproductive and Developmental Toxicity	Cynomolgus monkey	IV	0, 25, 50	GLP	1045612 4.2.3.5.3-1

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧表

Test Article: obinutuzumab

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Sex	Time of Toxicokinetics	Dose Group (mg/kg/week)	Mean C_{max} (µg/mL)	Mean $AUC_{0\text{-}168h}$ (µg•h/mL)
Repeat Dose Toxicity: 13-Week Study	Cynomolgus monkey	IV	Pooled	Day 78	10	469	35400
					30	1540	147000
					100	5160	466000
Repeat Dose Toxicity: 26-Week Study	Cynomolgus monkey	IV	Pooled	Day 176	5	377	39800
					25	1530	183000
					50	2920	344000
Reproductive and Developmental Toxicity (ePPND)	Cynomolgus monkey	IV	Female	Day 139 pc	25	1220	125000
					50	2470	250000
Clinical Study [a]	Human, Japanese	IV			1000 mg, Every 3-week	925	114480

$AUC_{0-168\ h}$ = AUC from Time 0 to 168 hours post-dose.

[a] JO29737 Study: Obinutuzumab 1000 mg was dosed on Day 1 of cycle 2. C_{max} and AUC_{last} were calculated based on the blood concentrations by Day 8.

2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 2.6.7.4-1　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article:　obinutuzumab

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities	Report No.	Type of Study
[redacted]	[redacted]%	None specified	1024830	13-Week IV Toxicity Study in Cynomolgus Monkey [a]
[redacted]	[redacted]%	Sum of *Impurity A [redacted] area%	1036190	26-Week IV Toxicity Study in Cynomolgus Monkey [c]
[redacted]	[redacted]%	None specified	1024838	4-Week SC Toxicity Study in Cynomolgus Monkey [b]
[redacted]	[redacted]%	Sum of *Impurity A [redacted] area%	1045612	Reproductive and Developmental Toxicity (ePPND study)
[redacted]	[redacted]%	None specified	1024159	Tissue Cross-Reactivity in Human Tissues
[redacted]	[redacted]%	None specified	1024158	Tissue Cross-Reactivity in Cynomolgus Monkey Tissues
[redacted]	[redacted]%	Sum of *Impurity A [redacted] area%	1061540	Tissue Cross-Reactivity in Human and Cynomolgus Monkey Tissues

[a] This study included local tolerance and safety pharmacology.
[b] This study included local tolerance.
[c] This study included local tolerance, safety pharmacology and reproductive parameters.

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.5 急性毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7.6-1　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article:　obinutuzumab

Species/ Strain	Method of Administration (Treatment)	Duration of Dosing	Doses [a] (mg/kg)	Sex/No. Per Group [a]	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Report No. Location in CTD
Cynomolgus monkey	IV bolus (Obinutuzumab) IV bolus (Rituximab)	2 weeks	1, 10 (Obinutuzumab) 1, 10 (Rituximab)	Group 1: M/1, F/2 Group 2: M/2, F/1 Group 3: M/1, F/1 Group 4: M/1, F/1	Not stated	No effects of treatment seen other than those associated with reduction in B cells and consequent effects on the cellularity of the spleen and lymph nodes. B-cell depletion was similar with both substances.	1024829 4.2.3.3.2-1

[a] The study was divided into two phases. In Phase I, 1 male and 2 females (Group 1) received 1 mg/kg of obinutuzumab on Days 1 and 8. Group 3 received 1 mg/kg of rituximab on Days 1 and 8. In Phase II, 2 males and 1 female (Group 2) received 10 mg/kg of obinutuzumab on Days 1 and 8. Group 4 received 10 mg/kg of rituximab on Days 1 and 8.

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1　カニクイザル13週間静脈内投与試験（37週間回復試験）

表 2.6.7.7.1-1　カニクイザル13週間静脈内投与試験（37週間回復試験 Study No.2136-020）

Test Article:　obinutuzumab

Species/Strain: Cynomolgus monkey Initial Age: 3 to 6 years Initial Weight: 3.2 to 7.2 kg Date of First Dose: [redacted] NOAEL: 30 mg/kg with this study design (at 100 mg/kg/week exaggerated pharmacologic effects [immunosuppression] lead to the death of 2 animals during the recovery phase; no recovery animals were available at 30 mg/kg/week).	Duration of Dosing: 13 weeks Duration of Post-dose: 37 weeks Method of Administration: IV Vehicle/Formulation: 20 mM L-Histidine, 240 mM Trehalose, and [redacted]% [redacted], pH 6.0				Location in CTD: 4.2.3.2-2 Report No.: 1024830 Study No.: 2136-020 Study Title: RO5072759 13-Week Intravenous Administration Toxicity Study in the Cynomolgus Monkey with a 37-Week Recovery Phase GLP Compliance: Yes			
Dose (mg/kg/week):	0 (Control)		10		30		100	
Number of Animals (Terminal/Recovery):	M:　3/2	F:　3/2	M:　3	F:　3	M:　3	F:　3	M:　3/2	F:　3/2
Toxicokinetics:								
Mean $AUC_{(Day78,0-168h)}$ (μg•h/mL)	NA	NA	59900	10900	154000	139000	470000	462000
Mean C_{max} (μg/mL)	NA	NA	606	332	1610	1470	5110	5210
Number of Animals with ADA Positive	ND	ND	1	2	ND	ND	ND/0 [a]	ND/0 [a]
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	—/— [a]	—/— [a]	—	—	—	—	—/1 [a]	—/1 [a]
Clinical Observations	—/— [a]	—/— [a]	—	—	—	—	—/— [a]	—/— [a]
Mean Body Weight (kg) (Pre-dose)	5.4	4.1	5.3	4.0	5.2	3.8	6.3	4.1
Mean Body Weight (kg) (End of the dosing/recovery period)	5.5/6.7 [a]	4.0/5.2 [a]	5.3	3.7	5.2	3.9	6.3/ 6.1(n=1) [a]	4.0/ 3.6 (n=1)[a]
Blood Pressure	—/— [a]	—/— [a]	—	—	—	—	—/— [a]	—/— [a]
Ophthalmoscopy	—	—	—	—	—	—	—	—
Electrocardiography	—/— [a]	—/— [a]	—	—	—	—	—/— [a]	—/— [a]
Hematology	—/— [a]	—/— [a]	—	—	—	—	—/— [a]	—/— [a]

— No noteworthy findings.

Note:　There were 5 animals/sex/group for the 0 and 100 mg/kg/week dose groups. Three animals/sex/group were necropsied after 13 weeks. Two animals/sex/group underwent a recovery period and were necropsied after 50 weeks.

[a]　Post-dose recovery period

表 2.6.7.7.1-1 カニクイザル13週間静脈内投与試験（37週間回復試験 Study No.2136-020）（続）

Test Article: obinutuzumab

Dose (mg/kg/week):	0 (Control)		10		30		100	
Number of Animals (Terminal/Recovery):	M: 3/2	F: 3/2	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3/2	F: 3/2
Noteworthy Findings: (cont'd)								
Immunophenotyping								
Mean Number of PB B cells Day 3 (10^9/L)	0.78	0.84	0.02*	0.03*	0.01**	0.01**	0.01***	0.01***
Mean Number of PB B cells Day 87/89 (10^9/L)	0.85	0.54	0.00*	0.12*	0.00*	0.00*	0.00**	0.00**
Mean Number of PB B cells Recovery Day 232 (10^9/L)	0.48	0.83	NA	NA	NA	NA	0.26(n=1)	0.17(n=1)
Mean Number of PB NK cells Day 3 (10^9/L)	1.06	0.97	0.27	0.44	0.47	0.24*	0.49	0.55
Mean Number of PB NK cells Day 87/89 (10^9/L)	1.35	1.16	0.80	1.54	0.96	1.03	0.77	1.48
Mean Number of PB NK cells Recovery Day 246 (10^9/L)	1.23	0.92	NA	NA	NA	NA	0.25(n=1)	0.96(n=1)
Cytokine Analysis	—/— [a]	—/— [a]	—	—	—	—	—/— [a]	—/— [a]
Serum Chemistry	—/— [a]	—/— [a]	—	—	—	—	—/— [a]	—/— [a]
Urinalysis	—/— [a]	—/— [a]	—	—	—	—	—/— [a]	—/— [a]
Organ Weights	—/— [a]	—/— [a]	—	—	—	—	—/— [a]	—/— [a]
Gross Pathology	—/— [a]	—/— [a]	—	—	—	—	—/— [a]	—/— [a]
Number Evaluated	3/2 [a]	3/2 [a]	3	3	3	3	3/2 [a]	3/2 [a]

— No noteworthy findings; *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001

Note: There were 5 animals/sex/group for the 0 and 100 mg/kg/week dose groups. Three animals/sex/group were necropsied after 13 weeks. Two animals/sex/group underwent a recovery period and were necropsied after 50 weeks.

[a] Post-dose recovery period.

表 2.6.7.7.1-1　カニクイザル13週間静脈内投与試験（37週間回復試験 Study No.2136-020）（続）

Test Article:　obinutuzumab

Dose (mg/kg/week):	0 (Control)		10		30		100	
Number of Animals (Terminal/Recovery):	M: 3/2	F: 3/2	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3/2	F: 3/2
Noteworthy Findings: (cont'd)								
Histopathology								
Number Evaluated	3/2 [a]	3/2 [a]	3	3	3	3	3/2 [a]	3/2 [a]
Lack of germinal centers, mandibular LN	0/0 [a]	0/0 [a]	1	2	3	2	3/1 [a]	1/1 [a]
Lack of germinal centers, mesenteric LN	0/0 [a]	0/0 [a]	3	1	3	2	3/1 [a]	3/1 [a]
Lack of germinal centers, spleen	0/0 [a]	0/0 [a]	2	2	3	3	3/1 [a]	3/1 [a]
Immunostaining								
Number of CD20+animals, mandibular LN	3/2 [a]	3/2 [a]	0/NA	2/NA	0/NA	1/NA	0/2 [a]	3/1 [a]
Number of CD20+animals, mesenteric LN	3/2 [a]	3/2 [a]	0/NA	2/NA	0/NA	1/NA	0/2 [a]	3/1 [a]
Number of CD20+animals, spleen	3/2 [a]	3/2 [a]	0/NA	2/NA	0/NA	0/NA	0/2 [a]	1/1 [a]

— No noteworthy findings

Note: There were 5 animals/sex/group for the 0 and 100 mg/kg/week dose groups. Three animals/sex/group were necropsied after 13 weeks. Two animals/sex/group underwent a recovery period and were necropsied after 50 weeks.

[a] Post-dose recovery period.

2.6.7.7.2　カニクイザル26週間静脈内投与試験（37週間回復試験）

表 2.6.7.7.2-1　カニクイザル26週間静脈内投与試験（37週間回復試験 Study No.8210512）

Test Article:　obinutuzumab

Species/Strain: Cynomolgus monkey Initial Age: 3 to 8 years Initial Weight: 2.9 - 10.2 kg Date of First Dose: [redacted] NOAEL: not defined due to hypersensitivity reactions at all dose levels and subsequent early sacrifice	Duration of Dosing: 26 weeks Duration of Post-dose: 37 weeks Method of Administration: IV Vehicle/Formulation: 20 mM L-Histidine, 240 mM Trehalose, and 0.02% (w/v) Poloxamer 188, pH 6.0				Location in CTD: 4.2.3.2-3 Report No.: 1036190 Study No.: 8210512 Study Title: 6-Month Infusion Toxicity and Toxicokinetic Study with RO5072759 in Cynomolgus Monkeys with a 37-Week Recovery Period GLP Compliance: Yes			
Dose (mg/kg/week):	0 (Control)		5		25		50	
Number of Animals (Terminal/Recovery):	M:　4/2	F:　4/2	M:　4/2	F:　4/2	M:　4/2	F:　4/2	M:　4/2	F:　4/2
Toxicokinetics:								
Mean $AUC_{(Day176,0-168h)}$ (μg•h/mL)	NA	NA	33400	44500	220000	128000	379000	303000
Mean C_{max} (μg/mL)	NA	NA	309	427	1770	1170	3170	2670
Number of Animals with ADA Positive	NA	NA	3	3 [c]	0	1	0	0
Number of Animals with serum IC Positive	NA	NA	2	0	1	2	2	0
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	—/— [a]	—/— [a]	1/— [a]	—/— [a]	—/2 [a]	1 [b]/1 [a]	—/— [a]	1/1 [a]
Anaphylactic/oid reaction	—/— [a]	—/— [a]	1/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	1/— [a]	—/— [a]	—/— [a]
Mean Body Weight (kg) (Pre-dose)	7.8	4.6	7.5	4.5	7.5	4.6	7.6	4.5
Mean Body Weight (kg) (End of the dosing/recovery period)	8.3/9.3 [a]	4.8/4.0 [a]	7.1/8.2 [a]	4.5/5.8 [a]	8.0/NA [a]	3.9/ 2.9(n=1) [a]	7.3/9.8 [a]	4.7/ 3.4(n=1) [a]
Physical Examination								
Gingivitis (Number of animals)	0/0 [a]	0/0 [a]	2/0 [a]	0/0 [a]	2/0 [a]	0/0 [a]	2/0 [a]	0/0 [a]

— No noteworthy findings.

[a] Post-dose recovery period.　[b] Death unrelated to treatment (fatal fasting syndrome).

[c] One female was ADA-positive only at recovery phase.

表 2.6.7.7.2-1 カニクイザル26週間静脈内投与試験（37週間回復試験 Study No.8210512）（続）

Test Article: obinutuzumab

Dose (mg/kg/week):	0 (Control)		5		25		50	
Number of Animals (Terminal/Recovery):	M: 4/2	F: 4/2	M: 4/2	F: 4/2	M: 4/2	F: 4/2	M: 4/2	F: 4/2
Ophthalmoscopy	—	—	—	—	—	—	—	—
Electrocardiography	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/ NA	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]
Blood Pressure	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/ NA	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]
Neurobehavioral Observations	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/ NA	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]
Respiration Rate	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/ NA	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]
Clinical Pathology	There were no primary test article-related changes observed. - Hematology: Anemia (decreased red blood cells and hemoglobin) at 25 mg/kg and above. - Clinical Chemistry: Lower total protein, albumin, increased creatinine and blood urea nitrogen at 25 mg/kg and above. - Urinalysis: Urinary protein excretion at 25 mg/kg and above. These changes were sporadically observed mainly in the unscheduled sacrifice animals (2 males and 1 female at 25 mg/kg, and 2 females at 50 mg/kg). Anemia, lower total protein and albumin were also sporadically observed in the scheduled sacrifice animals at 25 mg/kg and above (1 female at 25 mg/kg and 2 males at 50 me/kg). They were considered secondary effects related to test article administration.							
Immunophenotyping								
Mean Number of PB B cells Day 3 (10^3/μL)	0.94	0.62	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
Mean Number of PB B cells Day 184 (10^3/μL)	0.67	0.40	0.44	0.31	0.00*	0.15	0.00*	0.00
Mean Number of PB B cells Recovery Day 245 (10^3/μL)	0.49	0.71	0.74	0.38	NA	0.99(n=1)	0.50	0.41(n=1)
Mean Number of PB NK cells Day 3 (10^3/μL)	0.86	0.74	0.48	0.48	0.48	0.54	0.5	0.28
Mean Number of PB NK cells Day 92 (10^3/μL)	0.93	0.89	0.93	1.09	1.00	1.34	0.79	0.70
Mean Number of PB NK cells Recovery Day 245 (10^3/μL)	0.67	0.51	0.26	0.40	NA	0.40(n=1)	0.44	0.30(n=1)

— No noteworthy findings; *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001

[a] Post-dose recovery period.

表 2.6.7.7.2-1 カニクイザル26週間静脈内投与試験（37週間回復試験 Study No.8210512）（続）

Test Article: obinutuzumab

Dose (mg/kg/week):	0 (Control)		5		25		50	
Number of Animals (Terminal/Recovery):	M: 4/2	F: 4/2	M: 4/2	F: 4/2	M: 4/2	F: 4/2	M: 4/2	F: 4/2
Noteworthy Findings: (cont'd)								
Immunophenotyping								
CD20 positive cells, mandibular LN, Day 184 (Mean%)	1.71	2.37	0.60	0.93	0.00*	0.06*	0.01	0.01*
CD20 positive cells, mandibular LN, Recovery Day 260 (Mean%)	14.87	14.69	10.24	13.84	NA	21.68(n=1)	11.59	7.67(n=1)
CD20 positive cells, spleen, Day 184 (Mean%)	4.30	6.33	1.62	4.23	0.02*	0.01*	0.02*	0.00*
CD20 positive cells, spleen, Recovery Day 260 (Mean%)	17.50	15.52	20.12	19.35	NA	25.19(n=1)	19.74	12.75(n=1)
Cytokine Analysis	—	—	—	—	—	—	—	—
Organ Weight	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]	—/— [a]
Sperm Motility	—/— [a]	NA	—/— [a]	NA	—/ NA	NA	—/— [a]	NA
Sperm Density	—/— [a]	NA	—/— [a]	NA	—/ NA	NA	—/— [a]	NA
Sperm Morphology	—/— [a]	NA	—/— [a]	NA	—/ NA	NA	—/— [a]	NA
Spermatogenic Staging	—/— [a]	NA	—/— [a]	NA	—/ NA	NA	—/— [a]	NA
Testicular Volume	—/— [a]	NA	—/— [a]	NA	—/ NA	NA	—/— [a]	NA
Menstrual Cycle	NA	—/— [a]	NA	—/— [a]	NA	—/— [a]	NA	—/— [a]
Hormone Evaluation[b]	NA	—/— [a]	NA	—/— [a]	NA	—/— [a]	NA	—/— [a]

— No noteworthy findings; *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001

[a] Post-dose recovery period.

[b] prolactin, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol, or progesterone

表 2.6.7.7.2-1 カニクイザル26週間静脈内投与試験（37週間回復試験 Study No.8210512）（続）

Test Article: obinutuzumab

Dose (mg/kg/week):	0 (Control)		5		25		50	
Number of Animals (Terminal/Recovery):	M: 4/2	F: 4/2	M: 4/2	F: 4/2	M: 4/2	F: 4/2	M: 4/2	F: 4/2
Noteworthy Findings: (cont'd)								
Histopathology								
Number Evaluated	4/2 [a]	4/2 [a]	4/2 [a]	4/2 [a]	4/2 [a]	4/2 [a]	4/2 [a]	4/2 [a]
Lack of germinal centers, mandibular LN	1/0 [a]	0/0 [a]	2/0 [a]	2/0 [a]	3/1 [a]	4/0 [a]	2/0 [a]	4/1 [a]
Lack of germinal centers, mesenteric LN	0/0 [a]	0/0 [a]	2/1 [a]	0/0 [a]	4/1 [a]	3/1 [a]	4/0 [a]	3/1 [a]
Lack of germinal centers, spleen	0/0 [a]	0/0 [a]	1/0 [a]	1/0 [a]	4/1 [a]	4/1 [a]	3/0 [a]	3/1 [a]
Sciatic nerve, mononuclear infiltrate perivascular	0/0 [a]	1/0 [a]	1/0 [a]	0/0 [a]	1/0 [a]	3/0 [a]	2/0 [a]	1/0 [a]
Pituitary, mononuclear infiltrate perivascular	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/1 [a]	0/0 [a]	1/1 [a]	1/0 [a]
Pituitary, inflammation	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	1/1 [a]	0/1 [a]	1/1 [a]
Kidney, glomerulonephritis	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/2 [a]	1/1 [a]	0/1 [a]	0/2 [a]
Kidney, mononuclear infiltrate	2/1 [a]	3/1 [a]	3/2 [a]	2/2 [a]	3/1 [a]	4/1 [a]	3/2 [a]	2/1 [a]
Kidney, inflammation, interstitial, mononuclear	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/1 [a]	0/1 [a]	1/0 [a]	0/1 [a]
Epididymides, inflammation, interstitial	0/0 [a]	NA	1/0 [a]	NA	0/1 [a]	NA	3/0 [a]	NA
Epididymides, mononuclear infiltrate	3/2 [a]	NA	2/2 [a]	NA	3/0 [a]	NA	2/2 [a]	NA
Choroid plexus (brain), mononuclear infiltrate	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	1/0 [a]	0/1 [a]	0/0 [a]
Urinary bladder, mononuclear infiltration	2/0 [a]	0/2 [a]	2/1 [a]	0/1 [a]	1/0 [a]	1/1 [a]	2/0 [a]	0/1 [a]
Prostate, inflammation	0/0 [a]	NA	0/0 [a]	NA	1/0 [a]	NA	1/0 [a]	NA
Thyroid gland, inflammation	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/1 [a]	0/0 [a]	0/1 [a]
Intestine, inflammation	0/0 [a]	1/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/1 [a]	0/0 [a]	1/0 [a]	0/1 [a]
Serosa/adventitial surface, mononuclear infiltrate/ inflammation	0/0 [a]	0/0 [a]	0/1 [a]	0/0 [a]	0/2 [a]	0/1 [a]	3/0 [a]	1/1 [a]
Arteritis/periarteritis	0/0 [a]	1/0 [a]	1/0 [a]	0/0 [a]	0/1 [a]	2/0 [a]	0/1 [a]	0/0 [a]
Gall bladder, inflammation	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]	0/1 [a]	0/0 [a]	0/0 [a]

[a] Post-dose recovery period.

2.6.7.7.3　カニクイザル4週間皮下投与試験（28週間回復試験）

表 2.6.7.7.3-1　カニクイザル4週間皮下投与試験（28週間回復試験 Study No.2136-023）

Test Article:　obinutuzumab

Species/Strain: Cynomolgus monkey Initial Age: Approximately 4.5 to 6 years Initial Weight: 2.9 to 7.2 kg Date of First Dose: [redacted] NOAEL: 30 mg/body/week	Duration of Dosing: 4 weeks Duration of Post-dose: 28 weeks Method of Administration: SC Vehicle/Formulation: 20 mM L-Histidine, 240 mM Trehalose, and [redacted]% [redacted], pH 6.0	Location in CTD: 4.2.3.2-4 Report No.: 1024838 Study No.: 2136-023 Study Title: RO5072759 4-Week Subcutaneous Administration Toxicity Study in the Cynomolgus Monkey with a Recovery Phase GLP Compliance: Yes

Dose (mg/body/week):	0 (Control)		30		120	
Number of Animals (Terminal/Recovery):	M:　3/2	F:　3/2	M:　3/2	F:　3/2	M:　3/2	F:　3/2
Toxicokinetics:						
Mean $AUC_{(Day22,0-168h)}$ (μg•h/mL)	NA	NA	5380	5700	39700	46500
Mean C_{max} (μg/mL)	NA	NA	40.9	43.9	291	371
Number of Animals with ADA Positive	ND	ND	2	3	0	1
Noteworthy Findings:						
Died or Sacrificed Moribund	—/—[a]	—/—[a]	—/—[a]	—/—[a]	—/1[a]	—/—[a]
Mean Body Weight (kg) (Pre-dose)	5.9	4.0	5.8	3.8	5.5	3.9
Mean Body Weight (kg) [b,c] (End of the dosing/recovery period)	5.7/6.6[a]	4.3/4.3[a]	6.2/5.8[a]	4.1/3.6[a]	5.1/5.7(n=1)[a]	3.5**/4.3[a]
Hematology, Fibrinogen Dosing Day 26 (Mean, g/L)	2.0	2.1	1.9	2.0	2.5**[d]	2.3[d]
Serum Chemistry, Creatinine Day 26 (Mean, μmol/L)	85.48	77.65	83.97	68.95	154.65[e]	111.17[e]

— No noteworthy findings; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

Note:　There were 5 animals/sex/group. Three animals/sex/group were necropsied after 4 weeks. Two animals/sex/group underwent a recovery period and were necropsied after 28 weeks.

[a] Post-dose recovery period.

[b] One Group 3 male (Animal 23559 M) lost 0.6 kg during Week 4 of dosing period; reason for this was unclear.

[c] One Group 3 male (Animal 23649 M) lost 1.7 kg during recovery days 62−87 due to continuous diarrhea.　Animal was euthanized on Day 89 of recovery phase.　The remaining recovery male had no noteworthy findings.

[d] Increase in a single male and female animal on Day 26 of the dosing phase.

[e] Increase in three male animals and one female on Day 26 of the dosing phase

表 2.6.7.7.3-1　カニクイザル4週間皮下投与試験（28週間回復試験 Study No.2136-023）（続）

Test Article: obinutuzumab

Dose (mg/animal/week):	0 (Control)		30		120	
Number of Animals (Terminal/Recovery):	M: 3/2	F: 3/2	M: 3/2	F: 3/2	M: 3/2	F: 3/2
Noteworthy Findings: (cont'd)						
Immunophenotyping						
Mean Number of B cells Dosing Day 3 (10^9/L)	0.96	0.48	0.02***	0.02**	0.02***	0.01**
Mean Number of B cells Dosing Day 29 (10^9/L)	0.57	0.39	0.01***	0.01**	0.00***	0.00***
Mean Number of B cells Recovery Day 196 (10^9/L)	0.52	0.42	0.56	0.19	0.36(n=1)	0.34
Mean Number of NK cells Dosing Day 3 (10^9/L)	1.18	1.25	0.56	0.29***	0.37	0.48**
Mean Number of NK cells Dosing Day 29 (10^9/L)	0.91	1.05	0.95	0.48*	0.68	0.47*
Mean Number of NK cells Recovery Day 196 (10^9/L)	1.27	1.10	1.22	0.64	0.31(n=1)	0.68
Histopathology						
Number Evaluated	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]
Lack of germinal centers, axillary LN	0/0 [a]	0/0 [a]	3/0 [a]	3/0 [a]	3/1 [a]	3/0 [a]
Lack of germinal centers, mandibular LN	0/0 [a]	0/0 [a]	3/0 [a]	2/0 [a]	3/1 [a]	3/0 [a]
Lack of germinal centers, mesenteric LN	0/0 [a]	0/0 [a]	3/0 [a]	1/0 [a]	3/1 [a]	3/0 [a]
Lack of germinal centers, spleen	0/0 [a]	0/0 [a]	3/0 [a]	3/0 [a]	3/1 [a]	3/0 [a]
Immunostaining						
Number of CD20+animals, axillary LN	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]	1/1 [a]	3/2 [a]
Number of CD20+animals, mandibular LN	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]	1/1 [a]	2/2 [a]
Number of CD20+animals, mesenteric LN	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]	3/1 [a]	3/2 [a]
Number of CD20+animals, spleen	3/2 [a]	3/2 [a]	3/2 [a]	1/2 [a]	0/1 [a]	1/2 [a]

— No noteworthy findings; *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001

Note: There were 5 animals/sex/group. Three animals/sex/group were necropsied after 4 weeks. Two animals/sex/group underwent a recovery period and were necropsied after 28 weeks.

[a] Post-dose recovery period.

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

該当試験なし。

2.6.7.10 がん原性試験

該当試験なし。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当試験なし。

2.6.7.12 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

該当試験なし。

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当試験なし。

2.6.7.14　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

表 2.6.7.14-1　カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）毒性試験

Test Article:　obinutuzumab

Species/Strain: Cynomolgus monkey Initial Age: at least 4.1 years Initial Weight: at least 2.7 kg Date of first pregnancy: [redacted] NOAEL: not defined due to hypersensitivity reactions/infections at all dose levels	Duration of Dosing:　Day 20 pc until birth Duration of Post-dose: 8 months (Necropsy: Day 240 pp) Method of Administration:　IV Vehicle/Formulation:　20 mM Histidine, 240 mM Trehalose, and 0.02% (w/v) Poloxamer 188, pH 6.0	Location in CTD: 4.2.3.5.3-1 Report No.: 1045612 Study No.: 1528-030 Study Title: RO5072759 (huMAb anti-CD20) An Intravenous Administration Study for Effects on Embryo-Fetal and Pre- and Postnatal Development in Cynomolgus Monkeys (enhanced design) GLP Compliance: Yes

Dose (mg/kg/week):	0 (Control)	25	50
Number of Dams:	18	19	18
Dams Toxicokinetics: Mean AUC $_{(0-168\ h)}$ (μg•h/mL) Day 20 pc Day 139 pc	 NC NC	 66900 125000	 122000 250000
Dams Toxicokinetics: Mean C_{max} (μg/mL) Day 20 pc Day 139 pc	 NC NC	 709 1220	 1460 2470
Dams Mean Concentration (range) in Serum (μg/mL) Day 28 pp	NC	394 (31.5-955)	144 (43.1-265)
Dams Mean Concentration in Milk (μg/mL) Day 28 pp	NC	0.0557	0.188
Dams Mean Concentration Ratio (Milk/Serum)	NC	0.000447	0.00125
Dams Number of Animals with ADA Positive	0	1	4

表 2.6.7.14-1　カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）毒性試験（続）

Test Article:　obinutuzumab

Dose (mg/kg/week):	0 (Control)	25	50
Number of Dams:	18	19	18
Dams Noteworthy Findings:			
Died or Sacrificed Moribund (dosing phase)	0	1[a]	1[b]
Died or Sacrificed Moribund (post-partum)	0	2 [c,d]	2[e,f]+1 [g]
No. of Abortion	1	6	4
No of Stillbirth	3	3	1
Mean Body Weight (kg) (Day 20 pc, during gestation)	3.6	3.3	3.5
Mean Body Weight (kg) (Day 146 pc, during gestation)	4.8	4.5	4.8
Mean Body Weight (kg) (Day 1 pp, during lactation)	4.2	3.8	4.1
Mean Body Weight (kg) (Day 238 pp, during lactation)	4.4	4.1	4.5
Dams Histopathology			
Number Evaluated	16	16	16
Lack of germinal centers, mandibular LN	0	3	4
Lack of germinal centers, mesenteric LN	0	2	4
Lack of germinal centers, spleen	0	3	4

[a] Day 176 pc, interstitial inflammation in kidney with glomerulopathy, liver, biliary tract.

[b] Day 113 pc, necrotizing gingivitis.

[c] Day 93 pp, serosal & subserosal inflammation in heart, gastro-intestinal tract, urinary bladder, intestines.

[d] Day 96 pp, interstitial inflammation in liver, biliary tract, kidney; serosal & subserosal inflammation in intestines; nasal cavity inflammation.

[e] Day 88 pp, interstitial inflammation in kidney and gallbladder; upper alimentary tract mycosis; laryngeal inflammation/ulcer and hyperkeratosis.

[f] Day 133 pp, interstitial inflammation in liver, biliary tract, kidney, urinary bladder; kidney with glomerulopathy; serosal & subserosal inflammation in intestine; laryngeal inflammation/ulcer.

[g] Day 91 pp, unrelated to treatment, cestode infestation associated with severe acute inflammation and necrosis of the liver.

[a-f] Lack of germinal centers and/or lymphoid depletion in lymphoid tissues and thymus atrophy were noted in these unscheduled sacrifices or deaths.

表 2.6.7.14-1　カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）毒性試験（続）

Test Article:　obinutuzumab

Dose (mg/kg/week):	0 (Control)	25	50
Infants Toxicokinetics: Mean Concentration (range) in Serum (μg/mL)			
Day 28 pp	NC	86.6 (16.1-173)	241 (80.7-659)
Day 168 pp	NC	0.00158	0.00179
Infants Number of Animals with ADA Positive	ND	1	2
Infant Noteworthy Findings:			
No. of Live Infants	13	9	12
No. of Infants Found Dead or Sacrificed	1	1[h]	2[i, j]
No. of Infants Survived to Terminal Kill	12	8	10
Mean Body Weight (kg) Day 1 pp (g)	333	334	316
Mean Body Weight (kg) Day 238 pp (g)	1296	1267	1133**
Morphological Examinations and External Observations	—	—	—
Skeletal Development	—	—	—
Hematology	—	—	—
Immunophenotyping			
Number of B cells Day 28 pp (10^9/L)	1.49	0.00***	0.00***
Number of B cells Day 84 pp (10^9/L)	3.49	1.55*	0.15***
Number of B cells Day 112 pp (10^9/L)	3.63	3.21	2.39
Number of B cells Day 168 pp (10^9/L)	3.82	5.11	4.57
T-cell Dependent Antibody Response (Antigenic Challenge: Day 181 pp, Day 212 pp)	—	—	—

— No noteworthy findings; *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001

[h] Day 182 pp, interstitial inflammation in kidney; serosal inflammation in lung, heart-pericardium/epicardium, gastro-intestinal tract, etc.

[i] Day 88 pp, laryngeal ulcer; pulmonary edema; multiple foci of inflammation centered in airways.

[j] Day 93 pp, serosal inflammation in lung, heart-pericardium/epicardium, gastro-intestinal tract, liver; inflammation/ulcer skin mammary region.

2.6.7.15　新生児を用いた試験

該当試験なし。

2.6.7.16　局所刺激性試験

表 2.6.7.16-1　局所刺激性試験

Test Article:　obinutuzumab

Species/ Strain	Duration of Dosing	Method of Administration	Doses [Concentration (mg/mL)]	Sex/No. Per Group	Noteworthy Findings	Report No. Location in CTD
Cynomolgus monkey	13 weeks	IV	0, 10, 30, 100 mg/kg/week [0, 10, 10, 10]	0: M/5, F/5 10: M/3, F/3 30: M/3, F/3 100: M/5, F/5	Locally well-tolerated	1024830 4.2.3.2-2
Cynomolgus monkey	26 weeks	IV	0, 5, 25, 50 mg/kg/week [0, 25, 25, 25]	M/6, F/6	Locally well-tolerated	1036190 4.2.3.2-3
Cynomolgus monkey	4 weeks	SC	0, 30, 120 mg/body/week [0, 10, 10]	M/5, F/5	Locally well-tolerated	1024838 4.2.3.2-4

2.6.7.17　その他の毒性試験

2.6.7.17.1　組織交差反応性試験

表 2.6.7.17.1-1　組織交差反応性試験

Test Article:　obinutuzumab

Species/ Strain	Method of Administration	Concentration (μg/mL)	Noteworthy Findings	Report No. Location in CTD
Tissue Cross-Reactivity Human Tissues	*In vitro*	5, 30	Expected specific staining of resident lymphocytes in lymphoid tissues (gastrointestinal tract gut-associated lymphoid tissue in the small intestine and stomach, lymph node, spleen, thymus, tonsil), lymphocytes in mammary gland, and in trafficking interstitial lymphocytes in other tissues (thyroid). In the bone marrow, staining of hematopoietic cells and/or lymphocytes. Staining of obinutuzumab to bile duct epithelia, salivary glands, and endothelium of the lung.	1024159 4.2.3.7.7-1
Tissue Cross-Reactivity Cynomolgus Monkey Tissues	*In vitro*	5, 30	Expected specific staining of resident lymphocytes in lymphoid tissues (colon, eye, small intestine, stomach, lung, lymph node, spleen, thymus, and tonsil) and in trafficking lymphocytes in other tissues (prostate and salivary gland). Staining of endothelia of small intestine, heart, kidney, lung, ovary, pancreas, pituitary, prostate, salivary gland, testis, and endometrium.	1024158 4.2.3.7.7-2
Tissue Cross-Reactivity Human and Cynomolgus Monkey Tissues	*In vitro*	5, 30	Staining of membrane and cytoplasmic elements in mononuclear leukocytes in B cell regions of lymphoid tissues, in hematopoietic cells and in individual mononuclear leukocytes in multiple tissues in both human and cynomolgus monkey tissue panels. Cytoplasmic staining in endothelium, epithelium/myoepithelium, and platelets in the human tissue panel; in cynomolgus monkey tissues, cytoplasmic staining in endothelium, epithelium, cerebellar granular layer cells and neural processes, and skin follicular root sheaths.	1061540 4.2.3.7.7-3

2.6.7.17.2　*In vitro* サイトカイン放出試験

表 2.6.7.17.2-1　*In vitro* サイトカイン放出試験

Test Article: obinutuzumab

Species/ Strain	Method of Administration	Incubation Time	Concentration (μg/mL)	No. Per Group	Noteworthy Findings	Report No. Location in CTD
Human Whole Blood	*In vitro*	2 hours	0.01−200	22 donors	In 16 of 22 donors (73%), obinutuzumab was similar to palivizumab in that cytokines and CD11b were not increased significantly above baseline levels, whereas cytokine secretion and neutrophil activation were triggered by alemtuzumab and muromonab-CD3 in > 80% and > 50%, of tested donors. In 5 of 22 cases (23%), minor elevations in TNF-α (58−76 pg/mL) and CD11b-positive neutrophils were found in the concentration range 1−10 μg/mL. Only in 1 of 22 donors (5%), at 10 μg/mL, there was a moderate increase in TNF-α (150 pg/mL) followed by neutrophil activation. Alemtuzumab was positive in 22 of 22 cases, triggering 3- to 30-fold higher cytokine levels than obinutuzumab. At the two highest concentrations (100−200 μg/mL), cytotoxicity of the antibodies may have impaired cytokine secretion and CD11b up-regulation.	1025124 4.2.3.7.7-4
			0.01−200	19 donors	In 4 of 19 cases (21%), minor elevations in TNF-α (49−65 pg/mL) and CD11b-positive neutrophils were found with obinutuzumab in the concentration range 1−10 μg/mL. Only in 1 of 19 donors (5%) there was a moderate increase of TNF-α (81 pg/mL) followed by neutrophil activation at 10 μg/mL. Alemtuzumab triggered a positive signal in 16 of 19 cases and 3- to 20-fold higher cytokine levels than obinutuzumab.	

表 2.6.7.17.2-1 *In vitro*サイトカイン放出試験（続）

Test Article: obinutuzumab

Species/ Strain	Method of Administration	Incubation Time	Concentration (μg/mL)	No. Per Group	Noteworthy Findings	Report No. Location in CTD
Human Whole Blood	*In vitro*	24 hours	0.1−100	10 donors	Obinutuzumab triggered significant cytokine release in up to 100%, 90%, and 100% of individual samples for IL-6, IL-8, and TNF-α, respectively, which corresponded to median fold increases of up to 63.7-, 27.5-, and 13.4-fold above the response observed with the negative control cetuximab in the concentration range 0.1−100 μg/mL. Alemtuzumab increased IL-6, IL-8, and TNF-α, respectively, up to 195.8, 47.3- 59.0-fold above cetuximab.	1045703 4.2.3.7.7-5
Human Whole Blood	*In vitro*	24 hours	0.1−100	13 donors	Overall significantly higher magnitude of cytokine release upon incubation with obinutuzumab than with rituximab or ofatumumab. At 0.1 μg /mL obinutuzumab treatment, IRR-related cytokines (i.e. IL-6, IL-8, TNF-α and IFN-γ) were already at least 11-fold above rituximab- or ofatumumab-induced levels. Obinutuzumab induced robust upregulation of CD11b on neutrophils even at 0.1 μg/mL. CD11 expression of rituximab and ofatumumab were comparable to the negative comparator cetuximab. Treatment of obinutuzumab resulted in a maximum 3-fold (mean) reduction of B cells at 1-10 μg/mL. By comparison, the maximum B cell depletion induced by was 2.4-fold for rituximab and 1.8-fold for ofatumumab with maximum depletion observed at 100 μg/mL.	1062523 4.2.3.7.7-6

2.6.7.17.3　溶血性及び血液適合性試験

表 2.6.7.17.3-1　溶血性及び血液適合性試験

Test Article:　obinutuzumab

Species/ Strain	Method of Administration	Incubation Time	Concentration (mg/mL)	No. Per Group	Noteworthy Findings	Report No. Location in CTD
Human Whole Blood	*In vitro*	10 min	0.07−5	1 donor	No hemolytic effect.	1025140 4.2.3.7.7-7
Human Plasma	*In vitro*	10 min	0.625−5	1 donor	No visible plasma turbidity or precipitation.	