ポートラーザ点滴静注液 800mg

2.6.6　毒性試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.6　毒性試験の概要文 1
2.6.6.1　まとめ 1
2.6.6.2　単回投与毒性試験 3
2.6.6.3　反復投与毒性試験 3
2.6.6.3.1　サルを用いた 5 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験 3
2.6.6.3.2　サルを用いた 26 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 4
2.6.6.4　遺伝毒性試験 5
2.6.6.5　がん原性試験 6
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 6
2.6.6.6.1　まとめ 6
2.6.6.6.2　EGFR シグナル伝達阻害が生殖発生に及ぼす影響（文献評価） 6
2.6.6.6.2.1　EGFR の発現部位と生理学的機能（①ヒト組織に関する文献情報） 6
2.6.6.6.2.2　EGFR の発現部位と生理学的機能（②動物に関する文献情報） 7
2.6.6.6.2.3　EGFR の発現部位と生理学的機能③（ネシツムマブの組織交差反応性試験成績） 8
2.6.6.6.2.4　EGFR シグナル伝達阻害の影響（①着床障害） 8
2.6.6.6.2.5　EGFR シグナル伝達阻害による影響（②胚・胎児及び出生児死亡） 8
2.6.6.6.2.6　EGFR シグナル伝達阻害の影響（③組織・器官における表現型の変化） 9
2.6.6.6.2.7　EGFR シグナル伝達阻害の影響（④母体における EGF 低下の影響） 9
2.6.6.6.2.8　文献評価のまとめ 10
2.6.6.6.3　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 10
2.6.6.6.4　胚・胎児発生に関する試験 11
2.6.6.6.5　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 11
2.6.6.7　局所刺激性試験 12
2.6.6.8　その他の毒性試験 12
2.6.6.8.1　ヒト及びサルの組織交差反応性試験 12
2.6.6.8.2　ヒト、サル及びラットの皮膚組織交差反応性試験 12
2.6.6.9　考察及び結論 12
2.6.6.10　図表 14
2.6.6.11　参考文献 14

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

ネシツムマブ（LY3012211 又は IMC-11F8 とも表記）は進行がんの治療を目的とした抗体医薬品であることから、毒性試験は日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S6(R1)、S9 及び M3 ガイドラインに準じて実施した（表 2.6.6-1）。

サルを用いた 5 週間及び 26 週間反復投与毒性試験並びに組織交差反応性試験を実施した。ネシツムマブはヒト及びサルの上皮成長因子受容体（EGFR）に対し同程度の結合親和性を有していること（CTD 第 2.6.2.2.1.2 項）、及びヒト及びカニクイザル（以下、サル）の組織パネルにおいて類似した組織結合パターンを示すこと（CTD 第 2.6.6.8 項）から、サルを毒性試験に用いた。投与頻度は、臨床における投与頻度（3 週サイクルの 1 日目及び 8 日目に静脈内投与）を考慮し、週 1 回静脈内投与とした。反復投与毒性試験では安全性薬理（心血管系、呼吸系及び中枢神経系）及び生殖能（生殖器官の病理組織学的検査）についての評価も実施した。遺伝毒性試験は、ネシツムマブがモノクローナル抗体であり、DNA やその他の染色体成分とは反応しないと予想されるため実施しなかった［ICH S6(R1)］。がん原性試験は、ネシツムマブが進行がんの患者の治療を目的とした医薬品であることから実施しなかった（ICH S9）。

ネシツムマブの生殖発生毒性試験は実施しなかった。ネシツムマブの生殖発生毒性の可能性に関し、ICH S9 を参考に文献に基づく科学的評価を実施し、さらに EGFR を標的とする他の医薬品の胚・胎児発生に関する試験結果に基づくと（CTD 第 2.6.6.6 項）、医療関係者及び患者がネシツムマブを適正使用するために必要な情報は既に得られていると考えることから、ネシツムマブの生殖発生毒性試験を実施する必要はないと判断した。

サルを用いた 5 週間及び 26 週間反復投与毒性試験（CR0878 及び [redacted]023.07）並びに全身の組織パネルを用いた組織交差反応性試験（報告書 IM993、CTD 第 2.6.6.8.1 項）は Good Laboratory Practice（GLP）を適用して実施した。反復投与毒性試験の一部（TK 及び免疫原性評価）は GLP 非適用で実施したが、試験施設の標準操作手順書に従って行い、信頼性保証部門が報告書の査察（5 週間及び 26 週間反復投与毒性試験）及び信頼性保証陳述書の作成（26 週間反復投与毒性試験）を実施している。したがって、試験の信頼性や安全性の評価に影響はないと判断した。このほか、試験の信頼性及び結果に影響を及ぼす GLP 逸脱は認められなかった。皮膚組織交差反応性試験（報告書 0409、CTD 第 2.6.6.8.2 項）は GLP 非適用で実施した。

表 2.6.6-1 ネシツムマブの毒性試験一覧

試験の種類及び期間（報告書番号）	投与経路	動物種	被験物質
反復投与毒性試験			
5 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（CR0878） ［TK（SSR04010-01）及び免疫原性評価は GLP 非適用］	静脈内	サル	ネシツムマブ
26 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 ［TK 及び免疫原性評価は GLP 非適用］ ([redacted]023.07)	静脈内	サル	ネシツムマブ
その他の毒性試験			
組織交差反応性試験（IM993）	in vitro	ヒト及びサル組織	ネシツムマブ
皮膚組織交差反応性試験（0409、GLP 非適用）	該当なし in vitro	ヒト、サル及びラット皮膚組織	ネシツムマブ

略語：GLP = Good Laboratory Practice、TK = トキシコキネティクス

ネシツムマブの毒性試験における主要な成績を以下に要約する。

- 全身の組織パネルを用いた組織交差反応性試験において、ヒトとサルの組織におけるネシツムマブの分布パターンは類似していた。ネシツムマブはヒト及びサルの皮膚に結合したが、ラットの皮膚には結合しなかった。
- サル 5 週間反復投与毒性試験においてネシツムマブを 4～40 mg/kg の用量で週 1 回（初回投与後のみ 2 週間の投与間隔）、合計 4 回投与した結果、毒性変化は認められなかった。本試験の無毒性量（NOAEL）は最高用量の 40 mg/kg であった。
- サル 26 週間反復投与毒性試験においてネシツムマブを 6～60 mg/kg の用量で週 1 回投与したとき、発現時期及び重症度に用量依存的な皮膚毒性が全用量群で認められた。肉眼所見として紅斑及び落屑が、病理組織学的検査において過形成性皮膚炎が観察された。NOAEL は得られなかったが、8 週間の休薬期間により、低用量群における皮膚の変化は完全に回復し、より高い用量でも部分的又は完全な回復が見られた。
- サルを用いた反復投与毒性試験において、心血管系、呼吸系及び中枢神経系の変化は認められなかった。
- サルを用いた 5 週間及び 26 週間反復投与毒性試験において抗ネシツムマブ抗体を測定したが、試料中ネシツムマブによる分析の妨害の可能性があり正確な評価はできなかった。しかしながら、血清中ネシツムマブは試験を通して測定可能な濃度で検出されていたこと、サル 26 週間反復投与毒性試験で EGFR 阻害に関連すると考えられる皮膚毒性が見られたことから、抗体産生による毒性評価への明らかな影響はないと考えられた。

以上、サル 26 週間反復投与毒性試験では皮膚毒性が、また、組織交差反応性試験では上皮組織へのネシツムマブの結合が見られた。これらの結果は、EGFR の生物学的作用及び発現分布に関する報告と一致する結果である。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

ネシツムマブの単回投与毒性試験は実施しなかった。サルを用いた単回投与薬物動態試験（[redacted]023.01: 4.2.2.2.3）において、ネシツムマブを 20.5 mg/kg の用量で静脈内投与した結果、死亡はなく、投与 42 日後まで一般状態及び体重に被験物質関連の変化は見られなかった。また、サルを用いた 5 週間及び 26 週間反復投与毒性試験において、それぞれ 40 及び 60 mg/kg までの用量を初回投与したときに、死亡はなく、特記すべき一般状態の変化も見られなかった（CTD 第 2.6.6.3 項）。以上より、ネシツムマブをサルに単回静脈内投与時の概略の致死量は 60 mg/kg を超える用量と考えられた。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

ネシツムマブの反復投与毒性試験として、サルを用いた 5 週間及び 26 週間反復投与毒性試験の 2 試験を実施した。

2.6.6.3.1 サルを用いた 5 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

報告書 CR0878 (4.2.3.2.1), 概要表 2.6.7.6A

ネシツムマブを雌雄サルに、0（溶媒対照）、4、12 及び 40 mg/kg の用量で、5 週間（試験 1、15、22 及び 29 日目、計 4 回）静脈内投与したときの毒性、TK 及び免疫原性を評価した。投与量は、臨床推奨用量よりも高曝露が得られる設定であった。TK 及び免疫原性報告書（SSR04010-01: 4.2.2.2.5）は、毒性試験報告書（CR0878）とは別途作成した。最終投与後約 6 週間休薬する回復性試験群も設定し、回復期間最終日（試験 70 日目）に剖検せずに試験から除外した。試験デザインを表 2.6.6-2 に要約する。

初回投与後は投与後 144 時間まで経時的に血清中ネシツムマブ濃度を測定し、詳細な TK 評価を行った。2 回目の投与以降は各投与の直前、直後及び 24 時間後に血清中ネシツムマブ濃度を測定した。

表 2.6.6-2 サルを用いた 5 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験の試験デザイン

群	用量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数/群 主試験	動物数/群 回復性試験	評価パラメータ
1	0[a]	0	4	3/性	0	一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、トキシコキネティクス、免疫原性検査、器官重量、剖検、病理組織学的検査
2	4	10.2	0.4	3/性	雄 3	
3	12	10.2	1.2	3/性	雄 3	
4	40	10.2	3.9	3/性	雄 3	

[a] 溶媒対照群：リン酸緩衝生理食塩液
3～6 mL/分の速度で投与

試験期間中、死亡はなかった。一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、臨床検査値（血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査及び尿検査）、剖検及び病理組織学的検査において、ネシツムマブ投与に関連する変化は見られなかった。

投与終了時の器官重量測定において、40 mg/kg 群の雄及び全用量群の雌で顎下腺の絶対及び相対重量の増加（40 mg/kg 群の相対重量は対照群と比較して約 30%～40%の高値）が見られた。統

計学的に有意な差はなく、病理組織学的検査では重量増加に関連する顎下腺の異常は見られなかったことから、これらの重量変化は毒性変化ではないと考えられた。

試験を通してすべての用量群（4、12 及び 40 mg/kg）でネシツムマブへの曝露が示され、曝露量は用量の増加に伴い用量比を上回って増加した。12 及び 40 mg/kg 群では初回投与後 336 時間（14 日後）においても血清中ネシツムマブ濃度は定量可能であった。初回投与後に得られた血清中濃度推移及び最終投与 24 時間後の血清中濃度から、すべての動物で投与期間を通して曝露が持続していたことが示唆された（報告書 SSR04010-01、CTD 第 2.6.4.3.3 項）。

免疫原性については、試料中ネシツムマブによる分析の妨害の可能性があるため正確な評価はできないものの、抗ネシツムマブ抗体陽性と判定されたのは中用量群の 1 例のみであった。中和抗体の測定は行わなかったが、ネシツムマブの血清中濃度に反復投与による明らかな低下はなかったことから、抗体産生による毒性評価への明らかな影響はないと考えられた。

以上、ネシツムマブをサルに 4、12 及び 40 mg/kg の用量で 5 週間にわたり静脈内投与したとき、ネシツムマブ投与に関連する明らかな変化は認められなかった。本試験の NOAEL は最高用量の 40 mg/kg であった（臨床推奨用量での曝露量の約 1.2 倍の曝露量）。

2.6.6.3.2 サルを用いた 26 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験

報告書[redacted]023.07 (4.2.3.2.2), 概要表 2.6.7.6B

ネシツムマブを雌雄サルに、0（溶媒対照）、6、19 及び 60 mg/kg の用量で週 1 回、26 週間（計 26 回）静脈内投与したときの毒性、TK 及び免疫原性を評価した。投与量は、臨床推奨用量よりも高曝露が得られる設定であった。最終投与後 8 週間休薬する回復性試験群も設定した。試験デザインを表 2.6.6-3 に要約する。

初回投与及び最終投与時には投与後 168 時間まで経時的に血清中ネシツムマブ濃度を測定し詳細な TK 評価を行った。このほか、投与 5、9、14、18 及び 22 回目には、各投与の投与前及び投与直後に血清中ネシツムマブ濃度を測定した。

表 2.6.6-3 サルを用いた 26 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験の試験デザイン

群	用量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数/群 主試験	動物数/群 回復性試験	評価パラメータ
1	0[a]	0	5	3/性	2/性	一般状態観察（皮膚観察スコアを含む）、体重、摂餌量、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、免疫表現型検査、眼科学的検査、心電図、心拍数、血圧、トキシコキネティクス、免疫原性検査、器官重量、剖検、病理組織学的検査
2	6	1.2	5	3/性	2/性	
3	19	3.8	5	3/性	2/性	
4	60	12	5	3/性	3/性	

[a] 溶媒対照群：10 mM クエン酸、40 mM 塩化ナトリウム、50 mM マンニトール、133 mM グリシン、0.01% Tween®-80、pH 6.0
約 10 分間かけて投与

ネシツムマブに関連すると考えられる死亡はなかった。試験中に 2 例が死亡又は安楽殺に至った。このうち 1 例（6 mg/kg 群の雌）は試験 4 日目に死亡が発見され、剖検時に胃の穿孔が見られた。本病変は投与後に生じた可能性は低く、既存の潰瘍に起因した可能性が考えられたこと、同様の所見は他の動物には認められず、低用量群の 1 例のみで見られた所見であったことから、

この死亡はネシツムマブ関連ではないと考えられた。別の 1 例（60 mg/kg 群の雌）は、瀕死状態のため試験 120 日目（18 回投与後）に安楽殺を行った。安楽殺の前日まで、明らかな一般状態の変化は認められなかった。剖検時の臨床検査値、剖検及び病理組織学的検査において血液凝固異常が認められ、その機序は不明であるものの、敗血症の可能性が考えられた。同様の所見は他のいずれの動物にも見られなかったことから、この死亡にネシツムマブ投与との関連はないと考えられた。

体重、摂餌量、眼科学的検査、心拍数、血圧、呼吸数、心電図、血液凝固検査、尿検査及び器官重量には、いずれの用量においても投与関連の変化は認められなかった。

主要な毒性標的器官は皮膚であった。一般状態の変化として、皮膚の変化（紅斑及び落屑）が、用量依存的な重症度で認められ、皮膚観察スコアも増加した。投与終了時剖検例では、剖検及び病理組織学的検査のいずれにおいても、全用量群でネシツムマブ投与による一連の皮膚病変が腹部、鼠径部、口、鼻、耳あるいは四肢に認められ、過形成性皮膚炎と診断された。過形成性皮膚炎の特徴は表皮過形成、過角化及びリンパ球性表皮真皮境界部炎症であった。皮膚以外の組織に病理組織学的変化は認められなかった。皮膚の変化に対する二次的反応として、一般状態所見（掻く動作、円背位）及び炎症を示唆する臨床検査値の変化（血小板数の軽微な増加、グロブリン濃度の軽微な増加及びアルブミン濃度の軽微な低下）が見られたが、休薬期間中に全例で回復した。皮膚の変化については、6 mg/kg 群では休薬により完全に回復した。19 及び 60 mg/kg 群では、休薬期間終了時においても、紅斑、皮膚乾燥、皮膚観察スコアの増加及び過形成性皮膚炎が認められ、完全な回復は確認されなかったものの発現頻度及び重症度は大幅に低下した。

すべての用量群（6、19 及び 60 mg/kg）でネシツムマブへの曝露が示され、曝露量は用量の増加に伴い用量比例的又は用量比を上回って増加した。すべての用量群で試験 26 週の投与 168 時間後にも血清中にネシツムマブが検出されたことから、試験期間を通して曝露が持続していたことが示唆された。8 週間の休薬期間後には、血清中にネシツムマブは検出されなかった（CTD 第 2.6.4.3.3 項）。

免疫原性については、試料中ネシツムマブによる分析の妨害の可能性があり正確な評価はできなかった。しかし、ネシツムマブの曝露量に反復投与による明らかな低下は見られず、また、全用量群でネシツムマブの薬理作用（EGFR 阻害）が投与期間終了時剖検まで維持されていたことを示唆する皮膚毒性が見られた。

以上、ネシツムマブをサルに 6、19 及び 60 mg/kg の用量で週 1 回、26 週にわたり静脈内投与したところ、最高用量の 60 mg/kg まで忍容性が認められた（臨床推奨用量での曝露量の約 5.4 倍）。主要な毒性標的器官は皮膚であり、全用量群で皮膚毒性が見られたため、NOAEL は得られなかった。皮膚毒性は EGFR 阻害に関連すると考えられ、他の EGFR 阻害剤でも報告されている。作用機序から予想されないような毒性所見は見られなかった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

ネシツムマブはモノクローナル抗体であり、DNA やその他の染色体成分とは反応しないと予想されるため、遺伝毒性を評価する試験は実施しなかった［ICH S6(R1)］。

2.6.6.5 がん原性試験

ネシツムマブが進行がんの患者の治療を目的とした医薬品であることから、がん原性試験は実施しなかった（ICH S9）。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 まとめ

抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9）によると、科学的正当性がある場合、文献的評価など、通常の生殖発生毒性試験実施とは別のアプローチを考慮してもよいとされている。ネシツムマブの生殖発生毒性試験は実施せず、以下に示すアプローチにより生殖発生毒性に関する評価を行った。

- 雌雄の生殖能：サルを用いた 26 週間反復投与毒性試験におけるネシツムマブの生殖器官に対する影響の評価（CTD 第 2.6.6.6.3 項）
- 胚・胎児発生：EGFR の生物学的作用に関する文献（CTD 第 2.6.6.6.2 項）、及び EGFR を標的とする他の医薬品の生殖発生毒性試験成績に基づく評価（CTD 第 2.6.6.6.4 項）
- 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能：実施せず（CTD 第 2.6.6.6.5 項：ICH S9 において不要とされていること、及び胚・胎児発生に関する文献的評価に基づき、不要と判断）

ネシツムマブの標的分子である EGFR の生物学的作用に関する文献評価において、EGF（上皮成長因子）/EGFR シグナル伝達経路が阻害されると胚・胎児発生及び生後発達に悪影響が生じることが示されている。すなわち、EGFR は胚の着床、胎盤発生及び胚・胎児発生に関与しており、EGF/EGFR ノックアウトマウスや唾液腺除去マウスなどの、EGF/EGFR シグナル伝達経路が遮断されたモデル動物において、胚・胎児の発生に関連する組織の機能障害、胚・胎児死亡及び奇形が生じることが示されている（Wong 2003; Dackor et al. 2009）。また、EGFR を標的とする他の医薬品において、生殖発生毒性が報告されている。このように、ネシツムマブの妊婦及び胎児に対する重大なリスクが示唆されていることから、ネシツムマブを用いた動物試験を実施することなく、医療関係者及び患者がネシツムマブを適正使用するために必要な情報は十分得られたものと考える。

CTD 第 2.6.6.6.2～2.6.6.6.5 項に、これらの評価の詳細を記載する。

2.6.6.6.2 EGFR シグナル伝達阻害が生殖発生に及ぼす影響（文献評価）

EGFR は I 型受容体チロシンキナーゼの EGFR サブファミリーの一員であり、様々な上皮組織及び中枢神経系に発現する。EGFR により活性化される主なシグナル伝達経路には、Ras/MAPK、PLC-γ、PI-3 キナーゼ/AKT 及び STAT3 経路があり、これらの経路で活性化される遺伝子が、EGFR 発現細胞の細胞周期、増殖、アポトーシス、細胞分化、遊走及び代謝に関与する（Carpenter 2000; Bogdan and Klämbt 2001; Yarden 2001）。

2.6.6.6.2.1 EGFR の発現部位と生理学的機能（①ヒト組織に関する文献情報）

ヒト組織において、EGFR は主として皮膚、消化管、眼、肺、乳腺、前立腺及び尿路といった多くの上皮組織に発現し（Yano et al. 2003）、生体防御及び傷害修復に関与している。

皮膚における EGFR の発現は表皮基底層のケラチノサイトに見られ、皮膚細胞の周期、分化、遊走及び生存を制御する（Green and Couchman 1984; Jost et al. 2000）。消化管における EGFR の発現は主に上皮基底細胞層に見られ、胃酸分泌抑制による胃粘膜保護、傷害修復の開始及び細胞周期の調節に関与する（Tarnawski and Jones 1998）。眼の角膜上皮及び角膜縁上皮にも EGFR が発現し、EGF/EGFR シグナル伝達経路が阻害されると、上皮移動速度の低下（Zieske et al. 2000）並びに角膜上皮創傷治癒における上皮細胞増殖及び層状化の抑制（Nakamura et al. 2001）が生じる。肺において、EGFR 並びにそのリガンドである EGF 及び形質転換増殖因子α（TGFα）は気道損傷の修復に関与すると考えられる（Polosa et al. 1999; Puddicombe et al. 2000）。乳腺において、EGFR の発現（Gompel et al. 1996）及び乳管形態形成の調節への関与（Coleman and Daniel 1990）が報告されている。子宮において、EGFR 発現は内膜及び腺扁平上皮細胞の増殖の調節に関与し（Yano et al. 2003）、原因不明の不妊症を有する女性では、子宮内膜における EGF の発現低下が報告されている（Aghajanova et al. 2008）。前立腺組織（Leav et al. 1998）及びヒト腎臓の基底細胞層にも EGFR が発現している（Chow et al. 1997）。

ヒト胎児の消化器系組織にも EGFR が発現している（Ménard and Pothier 1991; Hormi and Lehy 1994）。ヒト胎児の皮膚組織では、増殖中あるいは未分化の細胞に EGFR の発現が報告されている（Zambruno et al. 1990）。さらに、ヒト胎盤には EGFR が高発現する（Carson et al. 1983; Chen et al. 1988）。

以上、EGFR はヒトにおいて広範に発現し、細胞増殖、機能及び組織形態を調節している可能性が報告されている。

2.6.6.6.2.2 EGFR の発現部位と生理学的機能（②動物に関する文献情報）

EGFR はヒト以外の哺乳動物の組織においても遍在性に発現し、その役割はおおむねヒトと同様であることが報告されている。マウスでは、肺、脳、胎盤、眼、歯、乳腺及び消化管組織に EGFR が発現する（Adamson 1990a; Adamson 1990b; Miettinen et al. 1995; Sibilia et al. 1998; Duh et al. 2000; Wong 2003; Dackor et al. 2009）。EGFR の遺伝子変異（*egfr*^{wa2}）をホモで有するマウスでは EGFR シグナル伝達活性が低下し、春機発動の遅延、排卵異常、大動脈弁拡大、心肥大、体格小型化、乳腺発達障害及び大腸炎への感受性増加を示す（Dackor et al. 2009）。

また、皮膚、腸、腎臓、脳及び胎盤の発生における EGF/EGFR シグナル伝達経路の重要性が示されている。ラットにおいて、皮膚及び毛包組織の発生に EGF/EGFR シグナル伝達経路の関与が示されている（Green and Couchman 1984）。ラット腸の上皮側底膜（Scheving et al. 1989）並びに仔ブタ空腸の上皮頂端膜及び側底膜表面（Kelly et al. 1992）に EGFR が発現している。マウス胚中腸の器官培養系を用いた報告では、腸の成長並びに腸陰窩、絨毛及び結腸杯細胞の成熟が EGFR シグナル伝達により調節されており、EGFR シグナル伝達阻害剤で処理すると、小腸の間質及び平滑筋細胞の一部並びに結腸杯細胞の消失が認められたとされる（Duh et al. 2000）。ラット周生期胎児腎臓において、EGF は糸球体細胞の増殖並びに近位尿細管及び集合管の細胞の増殖及び成熟に重要な役割を果たすことが示唆されている（Okada et al. 2001）。マウスの胚及び成獣の脳では、特に前頭葉皮質、線条体、海馬及び小脳に EGFR が発現すること（Sibilia et al. 1998）、in vitro において EGF 応答性の神経幹細胞が増殖能及び神経細胞、星状膠細胞及び希突起膠細胞への分化能を有すること（Weiss et al. 1996）が報告されている。

2.6.6.6.2.3　EGFR の発現部位と生理学的機能③（ネシツムマブの組織交差反応性試験成績）

ヒト及びカニクイザルの正常組織パネルを用いて、蛍光標識ネシツムマブの組織交差反応性を評価した（CTD 第 2.6.6.8.1 項、報告書 IM993）。本試験系におけるネシツムマブの特異的結合部位は、生体内での EGFR の発現分布を反映する可能性がある。本試験では、陽性対照として用いたヒト胎盤栄養芽細胞上皮に強度のネシツムマブ染色が認められ、さらにサル及びヒトのいずれにおいても、乳腺、乳管、前立腺及び子宮の上皮、卵巣の顆粒膜細胞及び莢膜細胞並びに精巣のライディッヒ細胞に特異的な染色が認められた。以上の結果より、これらの生殖及び発生過程に重要な組織においてネシツムマブが EGFR に結合し、そのシグナル伝達を阻害する可能性が示された。

2.6.6.6.2.4　EGFR シグナル伝達阻害の影響（①着床障害）

マウスにおいて着床及び初期胚発生に EGF/EGFR シグナル伝達経路が重要であると報告されている（Wiley et al. 1995）。妊娠成立の際には、組織において内膜間質細胞の脱落膜化や絨毛外栄養芽細胞の分化が生じるが、ヒト初代培養内膜間質細胞において EGF が内膜間質細胞の脱落膜化に関与すること（Chobotova et al. 2005）、EGFR が絨毛外栄養芽細胞の分化に関与すること（Wright et al. 2010）が示されている。着床前のマウス胚盤胞あるいはヒトを含むその他の哺乳類の胚（Adamson 1990a; Adamson 1993; Chia et al. 1995）、さらには未受精卵においても EGFR が発現している（Wiley et al. 1992）。胚における EGFR の発現分布は発生ステージにより変化し、発生開始時点では細胞の頂端膜及び側底膜表面の全体に発現するのに対し、胚盤胞では外側に比べ内側の細胞表面上で高発現する（Dardik et al. 1992）。さらにマウス初期胚において EGFR が機能していることが報告されている（Adamson 1990a）。

マウスの子宮では EGF が発現し（Huet-Hudson et al. 1990）、*egfr* 遺伝子ノックアウトマウス（Threadgill et al. 1995）及び子宮特異的 *egfr* 遺伝子ノックアウトマウス（Large et al. 2014）では着床前及び着床後胚損失率が高いことから、EGFR は胚盤胞の子宮への付着プロセスに関与することが示唆される。EGFR の生体活性にエストロゲンの関与が示唆されており（Das et al. 1994）、卵巣摘出によりエストロゲンレベルを低下させると胚盤胞栄養外胚葉における EGFR レベルが低下し着床が遅延するが、エストロゲン補充により EGFR 発現が回復し着床が生じる（Paria et al. 1993）。このように、胚盤胞の着床において EGFR シグナル伝達が関与することが示されている。したがって、ネシツムマブなどの抗 EGFR 抗体を投与すると、このシグナル伝達が阻害されることにより着床障害が起こる可能性がある。

2.6.6.6.2.5　EGFR シグナル伝達阻害による影響（②胚・胎児及び出生児死亡）

哺乳類の初期発生、特に胎盤の正常な発生において、EGF/EGFR シグナル伝達経路が重要であることが複数の文献から示唆されている。*Egfr* 遺伝子ノックアウトマウスは胎生期及び出生後の生存率が極めて低く、出生後の生存期間は最長で 3 週間である（Miettinen at al. 1995; Sibilia and Wagner 1995; Threadgill et al. 1995）。系統ごとに見ると CF1 マウスは着床前後に、129/SV マウスは妊娠中期に、CD1 マウスは周生期に死亡が多く、生存した場合でも表現型の変化を伴う（Threadgill et al. 1995）。胎生期の死亡には、胎盤の障害が関与している可能性がある。*Egfr* 変

異型の胎児では、胎盤が小型化しており、胎盤の海綿状栄養芽細胞層（母体と胎児の組織が接する部位）に変化が見られた（Sibilia and Wagner 1995）。妊娠初期に生じる子宮内膜間質細胞の脱落膜化には、EGFR が重要な役割を果たすことが、ヒト（Chobotova et al. 2005; Wright et al. 2010）及び子宮特異的に *egfr* 遺伝子をノックアウトしたマウスの報告（Large et al. 2014）から示唆されている。さらに、*egfr* 遺伝子変異の違いにより EGFR シグナル伝達の低下に差異を示す 2 種のマウス間で、胎盤発生に及ぼす影響に差異が見られた（Dackor et al. 2009）。すなわち、EGFR シグナル伝達の低下がより顕著な *egfr*^{wa2} ホモ接合マウスでは胚及び胎盤の発育が抑制され、海綿状栄養芽細胞層が減少又は欠損していたが、*egfr*^{Wa5} ヘテロ接合マウスでは胎盤のわずかな小型化が見られたのみであり胚の成長に影響はなかった（Dackor et al. 2009）。また、*egfr* 変異型マウスは出生時の肺が未成熟なため（Sibilia and Wagner 1995）、呼吸を開始及び維持できずに出生後死亡に至っている可能性がある。

2.6.6.6.2.6　EGFR シグナル伝達阻害の影響（③組織・器官における表現型の変化）

Egfr 遺伝子ノックアウトマウスでは、皮膚、眼、肺、消化管、歯、心臓及び脳の上皮細胞に重大な影響が認められる。皮膚の変化として、波状頬ひげ、被毛毛包配列の乱れ、乾燥した鱗状皮膚及び皮膚潰瘍形成を伴う皮膚炎が、眼の変化として、眼瞼開裂（水晶体の脱出及び角膜との癒着を伴う）が、肺の変化として、肺胞虚脱又は終末細気管支拡張といった未成熟なヒト肺に類似の変化及び呼吸窮迫症候群が、消化管において壊死性小腸結腸炎、幹細胞帯減少及び粘膜構造の乱れを伴う腸増殖障害が、さらに心拍数増加、耳介展開の遅延及び口蓋裂も報告されている（Miettinen et al. 1995; Sibilia and Wagner 1995; Wong 2003）。また、脳組織には神経変性及び海馬における異所性細胞の小巣が見られ、脳における星状膠細胞の増殖及び分化並びに有糸分裂後ニューロンの生存に EGF/EGFR シグナル伝達が関与することも示唆されている（Sibilia et al. 1998）。ケラチノサイトにおける *egfr* をコンディショナルノックアウトしたマウスでは炎症性皮膚疾患が発現し（Lee and Threadgill 2009; Franzke et al. 2012）、EGFR 阻害剤を投与したヒトで見られる所見（Lichtenberger et al. 2013; Mascia et al. 2013）と類似していた。乳腺に変異型 EGFR を発現するトランスジェニックマウスでは、春機発動時の乳管発達、乳管分岐及び乳腺の成長が抑制された（Xie et al. 1997）。

2.6.6.6.2.7　EGFR シグナル伝達阻害の影響（④母体における EGF 低下の影響）

マウス母体の EGF を人為的に低下させると様々な毒性変化が生じることが報告されている。EGF 及び EGFR は、いずれもマウス胎児組織に発現し（Nexø et al. 1980; Adamson et al. 1981）、EGFR の別のリガンドである TGFαは胎生期初期に発現する（Fisher 1990）。妊娠中期のマウスの唾液腺を切除して母体血漿中 EGF を低下させると、胚・胎児の死亡及び発育遅滞が生じるが、TGFαの投与により生存児率が改善し、EGF の投与では生存児率及び胚・胎児発育のいずれも改善した（Kamei et al. 1993）。さらに、唾液腺切除マウスでは胎盤におけるグルコース輸送体（GLUT）3 の発現が有意に減少し、この変化は抗 EGF 血清の投与により増強した一方で、EGF の投与により消失した（Kamei et al. 1999）ことから、EGF は GLUT3 を介したグルコースの経胎盤供給を調節することで胎児の発育に関与することが示唆される。したがって、母体の EGF 濃

度低下や EGF/EGFR シグナル伝達阻害が生じると、胎児の発育及び生存に悪影響が生じることが予想される。

2.6.6.6.2.8 文献評価のまとめ

EGFR はヒトの生殖組織、胎児の組織及び胎盤に発現し、着床、胎盤及び胚・胎児発生並びに出生児の生存・発育・発達といった生殖発生過程への EGF/EGFR シグナル伝達経路の関与が報告されていること、*egfr* 遺伝子ノックアウトモデル動物において生殖発生の過程に有害な作用が報告されていることから（Sibilia et al. 1998; Wong 2003; Dackor et al. 2009）、ネシツムマブなどの抗 EGFR 抗体投与により EGF/EGFR シグナル伝達経路を阻害すると、ヒトの生殖、胚・胎児発生並びに生後の発達に悪影響が生じることが予想される。

2.6.6.6.3 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

サル 26 週間反復投与毒性試験における生殖器官の評価により判断した結果、雌雄の生殖能への影響は認められなかった。以下に詳細を述べる。

5 週間反復投与毒性試験は、試験開始時に 2～3 歳、体重が 2.2～3.4 kg のサルを用いて実施した。一般に雄の場合、90%の動物が性成熟に達する年齢及び体重は、それぞれ 5 歳 5 ヵ月及び 5.3 kg とされ（Smedley et al. 2002）、5 週間反復投与毒性試験で用いた動物は性成熟していなかった可能性が高い。さらに、本試験では精巣の成熟度の評価及び子宮の性周期ステージの評価を行わなかった。したがって、5 週間反復投与毒性試験における生殖器官の評価結果に基づき受胎能への影響を評価することはできないと考えられた。

26 週間反復投与毒性試験では、試験開始時に 3～5 歳、体重が 2.4～4.7 kg のサルを使用した。雄については精巣の病理組織像及び精巣重量、雌では性周期ステージを評価した結果（表 2.6.6-4）、雌雄ともにすべての群において十分な数の性成熟したサルを用いたことが確認された。26 週間反復投与毒性試験において生殖器官における毒性所見は認められなかった。

雄生殖器におけるネシツムマブの交差反応性に関しては、組織交差反応性試験（報告書 IM993）において、ヒト及びサルの精巣組織（ライディッヒ細胞及び筋線維芽細胞の細胞膜）でネシツムマブの結合が見られ、EGFR の発現部位に関する公表情報（Radhakrishnan et al. 1992）と一致する結果であった。一方で、他の EGFR 阻害剤において雄生殖能への影響は示されておらず、上述のサル 26 週間反復投与毒性試験においても精巣に病理組織学的変化は認められなかったことから、ネシツムマブの雄生殖能へのリスクは示唆されなかった。雌生殖能に関しては、組織交差反応性試験（報告書 IM993）でヒト及びサルの雌生殖器の組織（卵巣の顆粒膜細胞、卵管及び胎盤の上皮細胞及び子宮上皮）にネシツムマブの結合が見られ、EGFR が雌生殖組織に発現するとの公表情報（CTD 第 2.6.6.6.2.1 項）と一致する結果であった。さらに、文献において着床（CTD 第 2.6.6.6.2.4 項）及び胎盤の発生（CTD 第 2.6.6.6.2.5 項）に EGFR が重要であること、他の EGFR 阻害剤では動物を用いた胚・胎児発生試験において妊娠率の低下、流産など（パニツムマブ添付文書；セツキシマブ添付文書）が報告されている。したがって、ネシツムマブなどの EGFR 阻害剤の投与により雌の受胎能及び初期胚発生に悪影響が生じることが予想される。一方で、ネシツムマブのサル 26 週間反復投与毒性試験において、雌生殖器（卵巣、卵管及び子宮）に病理組織

学的変化は認められなかったことから、ネシツムマブにより雌生殖器の器質的変化やそれに伴う永続的な雌生殖能への悪影響が生じるリスクは示唆されなかった。

表 2.6.6-4 26 週間反復投与毒性試験で使用した動物の性成熟度評価

群		雄の性成熟度指標		雌の性成熟度指標
		精巣の病理組織学的検査 (匹)	両側の精巣重量合計* (g)	子宮の病理組織学的検査 (性周期ステージ) (匹)
対照	主試験 n=3	成熟：3	27、20、16	増殖期：1 分泌期：2
	回復性試験 n=2	成熟：2	20、16	なし：1 月経期：1
低用量	主試験 n=3	成熟：2 未成熟：1	20、14、3	増殖期：2 分泌期：1
	回復性試験 n=2	成熟：2	37、26	なし：1 増殖期：1
中用量	主試験 n=3	成熟：2 春機発動期：1	31、16、15	増殖期：3
	回復性試験 n=2	成熟：2	21、18	なし：1 月経期：1
高用量	主試験 n=3	成熟：1 春機発動期：2	27、10、6	増殖期：3
	回復性試験 n=3	成熟：2 春機発動期：1	24、15、13	増殖期：2

* 片側の精巣重量が 10 g 以上（両側で 20 g 以上）の場合、性成熟に達していると考えられる（Ku et al. 2010）

2.6.6.6.4 胚・胎児発生に関する試験

ネシツムマブの胚・胎児発生に関する試験は実施していない。CTD 第 2.6.6.6.1 項で示した文献評価により、医療関係者及び患者がネシツムマブを適正に使用するために必要な情報、すなわち胚・胎児発生に関する潜在的なリスクを示唆する情報は、十分得られていると考える。さらに、EGFR を標的とする他の医薬品[1]において、上述の文献的評価を裏付ける生殖発生への影響が報告されている。特に、セツキシマブは、エピトープがネシツムマブのエピトープと類似し、両者の薬理作用には類似点が多い（CTD 第 2.6.2.2.1 及び 2.6.2.2.2 項）。セツキシマブのサルを用いた胚・胎児発生に関する試験において、明らかな催奇形性を示唆する所見は報告されていないが、投与に関連した胚死亡及び流産の増加が認められている（セツキシマブ申請資料概要）。同様の生殖発生への影響はネシツムマブの投与によっても生じる可能性が高いと考えられることから、ネシツムマブのサルを用いた胚・胎児発生に関する試験を実施しても新たに有用な情報は得られないと考えられる。

2.6.6.6.5 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施していない。ネシツムマブなどの抗 EGFR 抗体により EGF/EGFR シグナル伝達経路を阻害すると、ヒトにおいても生殖・発生への影響が生じる可能性があることは明らかであり（CTD 第 2.6.6.6.2 項）、また、一般に進行がん

[1] エルロチニブ塩酸塩、ゲフィチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ、バンデタニブ、ラパチニブトシル酸塩水和物

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、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は通常必要ないとされる（ICH S9）。

2.6.6.7 局所刺激性試験

サルを用いた 5 週間及び 26 週間反復投与毒性試験における一般状態観察及び病理組織学的検査により、局所刺激性について評価した（CR0878: 4.2.3.2.1、[redacted]023.07: 4.2.3.2.2）。いずれの試験においてもネシツムマブの静脈内投与による忍容性は良好で、注射部位には投与関連の毒性変化は認められなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 ヒト及びサルの組織交差反応性試験

報告書 IM993 (4.2.3.7.7.1), 概要表 2.6.7.12

ヒト（n=3）及びカニクイザル（n=2）から採取した 38 種類からなる正常組織パネルを用いて、fluorescein isotiocyanate（FITC）標識ネシツムマブの組織交差反応性を検討した。陰性対照として FITC 標識ヒト IgG を使用した。陽性対照組織としてヒト胎盤栄養芽細胞上皮を、陰性対照組織としてヒト胎盤線維芽細胞を用いた。

評価に用いたヒト及びサルの組織のほとんどにおいて、ネシツムマブの結合が認められた。その結合部位は上皮細胞、内分泌細胞、筋上皮細胞、神経組織、間質細胞、単核食細胞系細胞、平滑筋細胞及び中皮細胞などであり、EGFR の発現や生物学的作用に関する報告と一致し、予想外の組織交差反応性は認められなかった。サルとヒト組織では、結合の局在にわずかな違いが見られる場合もあったものの、ほとんどの組織において両種の組織交差反応性は概して類似しており、サルがネシツムマブの毒性評価において適切な動物種であることを裏付ける結果であった。

2.6.6.8.2 ヒト、サル及びラットの皮膚組織交差反応性試験

報告書 0409 (4.2.3.7.7.2), 概要表 2.6.7.12

ヒト（n=1）、カニクイザル（n=2）及びラット（n=2）から採取した皮膚組織を用いて、FITC 標識ネシツムマブの組織交差反応性を評価した（GLP 非適用）。陽性対照としてウサギ抗ヒト EGFR 抗体を使用した。陰性対照として、ネシツムマブとの比較には FITC 標識ヒト IgG を、ウサギ抗ヒト EGFR 抗体との比較にはウサギ IgG を使用した。

ヒト及びサルの皮膚において、ネシツムマブは基底細胞の細胞膜に結合した。ラット皮膚においては、ネシツムマブの特異的結合は認められなかった。したがって、サルがネシツムマブの毒性評価において適切な動物種であることが裏付けられた。

2.6.6.9 考察及び結論

ネシツムマブの毒性試験として、サルを用いた 5 週間及び 26 週間の反復投与毒性試験を実施した。EGFR に対するネシツムマブの結合親和性及び組織交差反応性試験の結果から、サルは適切な動物種であることが示された。サル 5 週間反復投与毒性試験（4～40 mg/kg）において毒性変化は認められなかった。サル 26 週間反復投与毒性試験（6～60 mg/kg）では、全用量群で皮膚毒性が見られたため NOAEL は得られなかった。皮膚毒性は、一般状態の変化として紅斑及び落

層が、また、病理組織学的検査では過形成性皮膚炎が観察された。8 週間の回復期間により、低用量（6 mg/kg）の皮膚所見は完全に回復し、より高い用量では完全な回復は確認されなかったものの皮膚所見の発現頻度及び重症度は大幅に低下した。皮膚毒性以外に特記すべき毒性は認められず、最高用量まで忍容性が認められた。皮膚の変化は、ネシツムマブの臨床における皮膚反応関連事象（CTD 第 2.5.5 項）及び他の EGFR 阻害剤[2]でも皮膚症状等として報告されている。

反復投与毒性試験では、試料中のネシツムマブによる分析の妨害の可能性があり抗ネシツムマブ抗体の正確な評価はできなかった。しかし、26 週間反復投与毒性試験では、全用量群でネシツムマブの薬理作用（EGFR 阻害）が投与期間終了時剖検まで維持されていたことを示唆する皮膚毒性が見られたことから、抗体産生による毒性評価への明らかな影響はないと考えられた。

遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった［ICH S6(R1)、ICH S9］。ネシツムマブの生殖発生毒性の評価は、その標的分子である EGFR の生物学的作用に関する文献評価、並びに EGFR を標的とする他の医薬品の生殖発生毒性情報に基づき実施した。その結果から、医療関係者及び患者がネシツムマブを適正使用するために必要な情報、すなわち胚・胎児発生へのリスクを示唆する情報は十分に得られており、添付文書において対象患者に対する注意喚起を行っている。

サルの反復投与毒性試験の全用量群で投与期間を通して測定可能な濃度でネシツムマブが検出された（CTD 第 2.6.4.3.3 項）。サルにおける曝露量を臨床推奨用量での曝露量と比較した場合、5 週間反復投与毒性試験の NOAEL（40 mg/kg）における曝露量は約 1.2 倍、26 週間反復投与毒性試験で忍容性が認められた最高用量（60 mg/kg）における曝露量は約 5.4 倍に相当する（表 2.6.6-5）。患者においては、臨床推奨用量において臨床上管理可能な安全性プロファイルが示された（CTD 第 2.5.5 項）。

[2] エルロチニブ塩酸塩、ゲフィチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ、バンデタニブ、ラパチニブトシル酸塩水和物

表 2.6.6-5　動物及びヒトのネシツムマブ曝露量比

	曝露量 (AUC, μg·hr/mL)	Cave, ss [a] (μg/mL)	曝露量比 [b] (Cave, ss に基づく)
ヒトの用量			
800 mg、3 週間を 1 コースとして、1 日目及び 8 日目に投与、3 週目は休薬	130000[c](0-504 hours)	259	—
サルの用量			
5 週間反復投与毒性試験の NOAEL[d] 40 mg/kg Q7D	103552[f](0-336 hours)	308	1.2
26 週間反復投与毒性試験で忍容性が認められた最高用量 [e] 60 mg/kg Q7D	233431[g](0-168 hours)	1389	5.4

略語：AUC = 濃度－時間曲線下面積、hr = 時間、NOAEL = 無毒性量、Q7D = 週 1 回。

[a] Cave, ss = AUC÷投与間隔（ヒト：504 時間、サル 5 週間反復投与毒性試験：336 時間、サル 26 週間反復投与毒性試験：168 時間）

[b] 曝露量比は、動物における Cave, ss をヒトにおける Cave, ss で除した値である。

[c] 800 mg の週 1 回投与を 2 週連続し 3 週目は休薬し、これを 1 コース（3 週間）として投与を繰り返した。6 コース目の 1 及び 8 日目に 800 mg を静脈内投与したときの AUC の予測値の中央値（90%信頼区間：77300～213000 μg·hr/mL）。母集団薬物動態解析における最終モデルを用いたシミュレーションより算出した JFCM 試験の日本人患者のデータ（JFCM PopPK 解析：第 5.3.3.5.2 項）

[d] 5 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験（報告書 CR0878）における NOAEL。ネシツムマブを 40 mg/kg までの用量で週 1 回投与した。

[e] 26 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（報告書[redacted]023.07）で忍容性が認められた最高用量。ネシツムマブを 60 mg/kg までの用量で週 1 回投与した。

[f] 初回投与後の雌雄平均の曝露量

[g] 週 1 回、26 週間投与後の雌雄平均の曝露量

要約すると、臨床推奨用量での曝露量を上回る用量（表 2.6.6-5）のネシツムマブをサルに反復投与し、毒性を評価した。ネシツムマブによる主な変化は皮膚毒性であり、サル 26 週間反復投与毒性試験では、最低用量で皮膚毒性が発現したため NOAEL は得られなかった。皮膚毒性は EGFR 阻害に関連すると考えられ、他の EGFR を標的とする医薬品でも報告されている。ネシツムマブによる治療を受けた患者においても皮膚反応関連事象の発現が予想されるが、適切な処置により管理可能と考えられる。サルにおいて、作用機序から予想されないような毒性所見は見られなかった。以上より、進行・再発の肺癌（扁平上皮癌）（扁平上皮非小細胞肺癌、Sq CLC）患者へのネシツムマブの臨床推奨用量での投与は可能と考える。

2.6.6.10　図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.6.11　参考文献

Adamson ED, Deller MJ, Warshaw JB. Functional EGF receptors are present on mouse embryo tissues. Nature. 1981;291:656-659.

Adamson ED. EGF receptor activities in mammalian development. Mol Reprod Dev. 1990a;27:16-22.

Adamson ED. Developmental activities of the epidermal growth factor receptor. Curr Top Dev Biol. 1990b;24:1-29.

Adamson ED. Activities of growth factors in preimplantation embryos. J Cell Biochem. 1993;53:280-287.

Aghajanova L, Bjuresten K, Altmäe S, Landgren BM, Stavreus-Evers A. HB-EGF but not amphiregulin or their receptors HER1 and HER4 is altered in endometrium of women with unexplained infertility. Reprod Sci. 2008;15:484-492.

Bogdan S, Klämbt C. Epidermal growth factor receptor signaling. Curr Biol. 2001;10:R292-R295.

Carpenter G. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. Bioessays. 2000;22:697-707.

Carson SA, Chase R, Ulep E, Scommegna A, Benveniste R. Ontogenesis and characteristics of epidermal growth factor receptors in human placenta. Am J Obstet Gynecol. 1983;147:932-939.

Chen CF, Kurachi H, Fujita Y, Terakawa N, Miyake A, Tanizawa O. Changes in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels in human placenta and isolated trophoblast cells during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 1988;67:1171-1177.

Chia CM, Winston RML, Handyside AH. EGF, TGF-alpha and EGFR expression in human preimplantation embryos. Development. 1995;121:299-307.

Chobotova K, Karpovich N, Carver J, Manek S, Gullick WJ, Barlow DH, et al. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:913-919.

Chow NH, Liu HS, Yang HB, Chan SH, Su IJ. Expression patterns of erbB receptor family in normal urothelium and transitional cell carcinoma. An immunohistochemical study. Virchows Arch. 1997;430:461-466.

Coleman S, Daniel CW. Inhibition of mouse mammary ductal morphogenesis and down-regulation of the EGF receptor by epidermal growth factor. Dev Biol. 1990;137:425-433.

Dackor J, Caron KM, Threadgill DW. Placental and embryonic growth restriction in mice with reduced function epidermal growth factor receptor alleles. Genetics. 2009;183:207-218.

Dardik A, Smith RM, Schultz RM. Colocalization of transforming growth factor-alpha and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst. Dev Biol. 1992;154:396-409.

Das SK, Tsukamura H, Paria BC, Andrews GK, Dey SK. Differential expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult mouse uterus. Endocrinology. 1994;134:971-981.

Duh G, Mouri N, Warburton D, Thomas DW. EGF regulates early embryonic mouse gut development in chemically defined organ culture. Pediatr Res. 2000;48:794-802.

Fisher DA. Hormone epidermal growth factor interactions in development. Horm Res. 1990;33:69-75.

Franzke CW, Cobzaru C, Triantafyllopoulou A, Löffek S, Horiuchi K, Threadgill DW, et al. Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. J Exp Med. 2012;209:1105-1119.

Gompel A, Martin A, Simon P, Schöevaert D, Plu-Bureau G, Hugol D, et al. Epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 expression in normal breast tissue during the menstrual cycle. Breast Cancer Res Treat. 1996;38:227-235.

Green MR, Couchman JR. Distribution of epidermal growth factor receptors in rat tissues during embryonic skin development, hair formation, and the adult hair growth cycle. J Invest Dermatol. 1984;83:118-123.

Hormi K, Lehy T. Developmental expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor proteins in the human pancreas and digestive tract. Cell Tissue Res. 1994;278:439-450.

Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK, Dey SK. Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. Mol Endocrinol. 1990;4:510-523.

Jost M, Kari C, Rodeck U. The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions. Eur J Dermatol. 2000;10:505-510.

Kamei Y, Tsutsumi O, Kuwabara Y, Taketani Y. Intrauterine growth retardation and fetal losses are caused by epidermal growth factor deficiency in mice. Am J Physiol. 1993;264(3 Pt 2):R597-R600.

Kamei Y, Tsutsumi O, Yamakawa A, Oka Y, Taketani Y, Imaki J. Maternal epidermal growth factor deficiency causes fetal hypoglycemia and intrauterine growth retardation in mice: possible involvement of placental glucose transporter GLUT3 expression. Endocrinology. 1999;140:4236-4243.

Kelly D, McFadyen M, King TP, Morgan PJ. Characterization and autoradiographic localization of the

epidermal growth factor receptor in the jejunum of neonatal and weaned pigs. Reprod Fertil Dev. 1992;4:183-191.

Ku WW, Pagliusi F, Foley G, Roesler A, Zimmerman T. A simple orchidometric method for the preliminary assessment of maturity status in male cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) used for nonclinical safety studies. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010;61:32-37.

Large MJ, Wetendorf M, Lanz RB, Hartig SM, Creighton CJ, Mancini MA, et al. The epidermal growth factor receptor critically regulates endometrial function during early pregnancy. PLoS Genet. 2014;10:e1004451.

Leav I, McNeal JE, Ziar J, Alroy J. The localization of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in stromal and epithelial compartments of developing human prostate and hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions. Hum Pathol. 1998;29:668-675.

Lee TC, Threadgill DW. Generation and validation of mice carrying a conditional allele of the epidermal growth factor receptor. Genesis. 2009;47:85-92.

Lichtenberger BM, Gerber PA, Holcmann M, Buhren BA, Amberg N, Smolle V, et al. Epidermal EGFR controls cutaneous host defense and prevents inflammation. Sci Transl Med. 2013;5:199ra111.

Mascia F, Lam G, Keith C, Garber C, Steinberg SM, Kohn E, et al. Genetic ablation of epidermal EGFR reveals the dynamic origin of adverse effects of anti-EGFR therapy. Sci Transl Med. 2013;5(199):199ra110.

Ménard D, Pothier P. Radioautographic localization of epidermal growth factor receptors in human fetal gut. Gastroenterology. 1991;101:640-649.

Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. Nature. 1995;376:337-341.

Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis. Exp Eye Res. 2001;72:511-517.

Nexø E, Hollenberg MD, Figueroa A, Pratt RM. Detection of epidermal growth factor-urogastrone and its receptor during fetal mouse development. Proc Natl Acad Sci USA. 1980;77:2782-2785.

Okada T, Iwamoto A, Kusakabe K, Mukamoto M, Kiso Y, Morioka H, et al. Perinatal development of the rat kidney: proliferative activity and epidermal growth factor. Biol Neonate. 2001;79:46-53.

Paria BC, Das SK, Andrews GK, Dey SK. Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:55-59.

Polosa R, Prosperini G, Leir SH, Holgate ST, Lackie PM, Davies DE. Expression of c-erbB receptors and ligands in human bronchial mucosa. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999;20:914-923.

Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST, et al. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. FASEB J. 2000;14:1362-1374.

Radhakrishnan B, Suarez-Quian CA. Characterization of epidermal growth factor receptor in testis, epididymis and vas deferens of non-human primates. *J Reprod Fertil.* 1992;96(1):13-23.

Scheving LA, Shiurba RA, Nguyen TD, Gray GM. Epidermal growth factor receptor of the intestinal enterocyte. Localization to laterobasal but not brush border membrane. J Biol Chem. 1989;264:1735-1741.

Sibilia M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. Science. 1995;269:234-238.

Sibilia M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. EMBO J. 1998;17:719-731.

Smedley JV, Bailey SA, Perry RW, O' Rourke CM. Methods for predicting sexual maturity in male cynomolgus macaques on the basis of age, body weight, and histologic evaluation of the testes. Contemp Top Lab Anim Sci. 2002;41:18-20.

Tarnawski AS, Jones MK. The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways.

J Clin Gastroenterol. 1998;27 Suppl 1:S12-S20.

Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. Science. 1995;269:230-234.

Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig CG, van der Kooy D. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? Trends Neurosci. 1996;19:387-393.

Wiley LM, Wu JX, Harari I, Adamson ED. Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. Dev Biol. 1992;149:247-260.

Wiley LM, Adamson ED, Tsark EC. Epidermal growth factor receptor function in early mammalian development. Bioessays. 1995;17:839-846.

Wong RW. Transgenic and knock-out mice for deciphering the roles of EGFR ligands. Cell Mol Life Sci. 2003;60:113-118.

Wright JK, Dunk CE, Amsalem H, Maxwell C, Keating S, Lye SJ. HER1 signaling mediates extravillous trophoblast differentiation in humans. Biol Reprod. 2010;83:1036-1045.

Xie W, Paterson AJ, Chin E, Nabell LM, Kudlow JE. Targeted expression of a dominant negative epidermal growth factor receptor in the mammary gland of transgenic mice inhibits pubertal mammary duct development. Mol Endocrinol. 1997;11:1766-1781.

Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, Wakeling A, et al. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. Anticancer Res. 2003;23(5A):3639-3650.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. Eur J Cancer. 2001;37 Suppl 4:S3-S8.

Zambruno G, Girolomoni G, Manca V, Segre A, Giannetti A. Epidermal growth factor and transferrin receptor expression in human embryonic and fetal epidermal cells. Arch Dermatol Res. 1990;282:544-548.

Zieske JD, Takahashi H, Hutcheon AE, Dalbone AC. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41:1346-1355.

エルロチニブ塩酸塩［添付文書］中外製薬株式会社，2015 年 7 月改訂（第 12 版）Available at: http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/450045_4291016F1020_1_14#3. Accessed Dec. 12, 2017.

ゲフィチニブ［添付文書］アストラゼネカ株式会社，2015 年 1 月改訂（第 24 版）Available at: http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/670227_4291013F1027_1_30#4.

セツキシマブ（遺伝子組換え）［申請資料概要］メルク株式会社，2008 年 7 月 16 日．Available at: http://www.pmda.go.jp/drugs/2008/P200800039/index.html. Accessed Dec. 12, 2017.

セツキシマブ（遺伝子組換え）［添付文書］メルクセローノ株式会社，2015 年 7 月改訂（第 9 版）Available at: http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/380079_4291415A1021_1_10#528. Accessed Dec. 12, 2017.

パニツムマブ（遺伝子組換え）［添付文書］武田薬品工業株式会社，2015 年 8 月改訂（第 13 版）Available at: http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/400256_4291417A1020_1_12#634. Accessed Dec. 12, 2017.

バンデタニブ［添付文書］サノフィ株式会社，2016 年 12 月改訂（第 6 版）Available at: http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/780069_4291041F1029_2_02#550. Accessed Dec. 12, 2017.

ラパチニブトシル酸塩水和物［添付文書］ノバルティス ファーマ株式会社，2017 年 5 月改訂（第 9 版）Available at: http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/300242_4291022F1026_2_03#31. Accessed Dec. 12, 2017.

ポートラーザ点滴静注液 800mg

2.6.7　毒性試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.7 Toxicology Tabulated Summary 1
2.6.7.1 Toxicology: Necitumumab Overview 1
2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies with Necitumumab 2
2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data for Necitumumab 3
2.6.7.4 Toxicology: Necitumumab Drug Substance 4
2.6.7.5 Single-Dose Toxicity (No studies performed) 5
2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity 6
2.6.7.6A Repeat-Dose Toxicity: 5-Week Study in Monkey with Necitumumab 6
2.6.7.6B Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Study in Monkey with Necitumumab 8
2.6.7.7 Genotoxicity (No studies performed) 15
2.6.7.8 Carcinogenicity (No studies performed) 15
2.6.7.9 Reproductive and Developmental Toxicity (No studies performed) 15
2.6.7.10 Studies in Juvenile Animals (No studies performed) 15
2.6.7.11 Local Tolerance (Not Applicable) 15
2.6.7.12 Other Toxicity Studies: Cross Reactivity 16

2.6.7 Toxicology Tabulated Summary

2.6.7.1 Toxicology: Necitumumab Overview

Type of Study	Species/Strain	Route	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP	Testing Facility	Document ID (Location in CTD)
Single-dose toxicity – No studies performed							
Repeat-dose toxicity							
	Monkey/Cynomolgus	iv	5 weeks (4-dose) with 6-week recovery	0, 4, 12, <u>40</u>	Yes	[redacted]	CR0878 (4.2.3.2.1)
	Monkey/Cynomolgus	iv	1x/wk; 26 weeks with 8-week recovery	<u>0</u>, 6, 19, 60	Yes	[redacted]	[redacted]023.07 (4.2.3.2.2)
Genotoxicity – No studies performed							
Carcinogenicity – No studies performed							
Reproductive and Developmental Toxicity – No studies performed							
Local tolerance – No studies performed							
Other toxicity studies							
Cross Reactivity							
	Monkey/ Cynomolgus and Human	In vitro	Not applicable	1 and 40 µg/mL	Yes	[redacted]	IM993 (4.2.3.7.7.1)
	Monkey/ Cynomologus, Rat/Norway Brown and Human	In vitro	Not applicable	1 and 5 µg/mL	No	ImClone Systems, Inc.	0409 (4.2.3.7.7.2)

Abbreviations: GLP = good laboratory practices, iv = intravenous, wk = week.

[a] Unless otherwise specified. For Repeat-Dose Toxicity, the highest NOAEL (No Observed Adverse-Effect Level) is underlined.

Differences in numerical data between study reports and data in this document are due to rounding. Rounding as described below was done to simplify the presentation of the data. The convention is as follows:

- Numeric data values ≥100 are rounded to nearest integer
- Numeric data values <100 are represented as in the report, but with no more than 3 significant figures

2.6.7.2　Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies with Necitumumab

Type of Study	Species	Route	Doses (mg/kg)	Document ID	Location in CTD
Repeat dose	Monkey	iv	4, 12, 40	SSR04010-01 (Toxicokinetics and Immunogenicity) CR0878 (Toxicology)	4.2.2.2.5 4.2.3.2.1
Repeat dose	Monkey	iv	6, 19, 60	[redacted]023.07 (Toxicology)	4.2.3.2.2

Abbreviation: iv = intravenous.

2.6.7.3　Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data for Necitumumab

Monkey[a,b]			Human[c]		
Dose (mg/kg)	C_{max} (μg/mL) M+F	$AUC_{0\text{-}last}$ (μg•hr/mL) M+F	Dose (mg)	C_{max}[d] (μg/mL)	$AUC_{(0\text{-}21d)}$[e] (μg•hr/mL)
4	67[a]	1751[a]	800	570 (371-872)	130000 (77300– 213000)
6	267[b]	19020[b]			
12	242[a]	11753[a]			
19	626[b]	53859[b]			
40	1093[a]	103552[a]			
60	2826[b]	233431[b]			

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}last}$ = area under the concentration-time curve from 0 to the last quantifiable time point, C_{max} = maximal observed concentration, CI = confidence interval, d = day, hr = hour, M+F = male + female combined mean.

[a] C_{max} and $AUC_{0\text{-}last}$ after Dose 1, (SSR04010-01 / CR0878) (serum).

[b] C_{max} and $AUC_{0\text{-}last}$ after Dose 26, ([redacted]023.07) (serum).

[c] Human data simulated using the population pharmacokinetic model (I4X-IE-JFCM Population PKPD Report). 800-mg necitumumab doses (1-h IV infusion) administered on Day 1 and Day 8 of each 3 week cycle.

[d] C_{max} is the maximum of the reported simulated concentrations for the Cycle 6, Day 8 profile. Median (90% CI) reported.

[e] AUC is the total AUC in Cycle 6 over the 3-week cycle with 800 mg administered on Day 1 and Day 8. Median (90% CI) reported.

2.6.7.4 Toxicology: Necitumumab Drug Substance

	Purity			Specified Impurities (%)						
Lot Number	Size Exclusion HPLC[a]	SDS PAGE-Reduced[b]	SDS PAGE-Non-reduced[c]	Res. Hydrocortisone[d]	Res. BSA[d]	Res. DNA[e]	Res. rProt A[d]	Res. HCP	Document ID	Type of Study
[f]:									N/A	N/A
[g]									CR0878	Repeat iv dose, monkey, 5 weeks (4-dose) with 6-week recovery
									023.07	Repeat iv dose, monkey, 26 weeks with 8-week recovery
									IM993	Tissue cross reactivity

Abbreviations: BSA = bovine serum albumin, HCP = host cell protein, HPLC = high-performance liquid chromatography, iv = intravenous, N/A = not applicable, NT = not tested, Prot = Protein, Ref Std = reference standard, Res = residual, Spec = specification.

a .

b .

c .

d .

e .

f .

g Process A drug substance; Derived from parent lot . Specified impurities data listed from parent lot .

2.6.7.5　Single-Dose Toxicity (No studies performed)

2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity

2.6.7.6A Repeat-Dose Toxicity: 5-Week Study in Monkey with Necitumumab

Report Title: A Five-Week Subchronic Intravenous Toxicity Study of IMC-11F8 in Cynomolgus Monkeys, with a Terminal Sacrifice and a Six-Week Recovery Phase

Species / Strain: Monkey / Cynomolgus	Duration of dosing: 5 weeks (4 doses)	Report: SSR04010-01 (Toxicokinetics and Immunogenicity) CR0878 (Toxicology)
Initial age: 2-3 years	Duration of reversibility: 6 weeks	Location in CTD: 4.2.2.2.5, 4.2.3.2.1
Date of first dose: [redacted], 20[redacted]	Route: 3-6 mL/min iv; infusion	GLP compliance: Yes
NOAEL: 40 mg/kg	Vehicle/Formulation: Phosphate-buffered saline, pH 7.1	Test Article: Necitumumab
Special features: None		

Toxicokinetics

Feeding condition: Fasted	Dose: 4, 12, 40 mg/kg dosed 1x/day on Days 1, 15, 22 and 29
Sex / Number of animals: 18 males / 9 females (total = 27)	Assay / Method: Biacore / VR0880 (4.2.2.1.1)
Sample: Serum	

Combined Male + Female Mean parameters after Dosing Day 1

Dose	4 mg/kg	12 mg/kg	40 mg/kg
N	6 males + 3 females	6 males + 3 females	6 males + 3 females
C_{max} (μg/mL)	67	242	1093
(SE)	(6)	(21)	(68)
$AUC_{0\text{-last}}$ (μg•hr/mL)	1751	11753	103552
(SE)	(460)	(1539)	(6451)
T_{max} (hr)	0.03[a]	0.03[a]	0.05[a]
$T_{½}$ (hr)	40.1	82.2	118
(SE)	(7.5)	(8.5)	(9.4)
Cl obs (mL/hr/kg)	1.64	0.73	0.34
(SE)	(0.22)	(0.07)	0.02
Vz obs (mL/kg)	80.2	81.7	57.9
(SE)	(5.9)	(5.8)	(5.9)

(Continued)

2.6.7.6A Repeat-Dose Toxicity: 5-Week Study in Monkey with Necitumumab (Concluded)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		4		12		40	
Sex:Number of Animals	M:3	F:3	M:6	F:3	M:6	F:3	M:6	F:3
(Number of animals designated for recovery)	(0)	(0)	(3)	(0)	(3)	(0)	(3)	(0)

Experimental Parameters: survival, food consumption, clinical observations, body weight, hematology, coagulation, clinical chemistry, urinalysis, immunogenicity*, macroscopic, organ weight, and microscopic parameters.

Noteworthy Findings – terminal necropsy[b]								
Organ weight (% change[c])								
Submandibular gland (L/R)								
Absolute weight (g)	2.11	1.59	↑17	↑24	↑5	↑28	↑35	↑29
Relative organ weight to body weight (%)	0.07	0.063	↑14	↑27	↑4	↑38	↑33	↑32
Relative organ weight to brain weight (%)	3.24	2.50	↑10	↑27	↑3	↑33	↑39	↑37
Immunogenicity* – recovery period (Day 70)								
Positive for anti-IMC-11F8 antibodies	-	-	-	-	1 animal	-	-	-

Abbreviations: - = no noteworthy findings, $AUC_{0\text{-last}}$ = area under the concentration-time curve from 0 to the last quantifiable time point, Cl = clearance, C_{max} = maximum observed concentration, F = female, GLP = good laboratory practice, iv = intravenous, L/R = left and right, min = minute, M = male, N = number of animals used for the combined Male + Female mean, NOAEL = no-observed-adverse-effect-level, obs = observed, SE = standard error, T_{max} = time to maximum observed concentration, $T_{½}$ = elimination half-life, Vz = volume of distribution based on the terminal phase .

* Immunogenicity could not be accurately assessed due to the presence of circulating necitumumab.

[a] Median value

[b] 3 animals/sex/group were necropsied at the end of the dosing period (Day 32). The remaining animals were returned to the stock colony at the end of the recovery period (Day 70).

[c] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from control are shown.

2.6.7.6B Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Study in Monkey with Necitumumab

Report Title: A 26-Week Toxicity, Toxicokinetic, and Immunogenicity Study of IMC-11F8 Administered Intravenously Weekly to Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period

Species / Strain: Monkey / Cynomolgus
Initial age: 3-5 years
Date of first dose: [redacted], 20[redacted]
NOAEL: <6 mg/kg

Duration of dosing: 26 weeks
Duration of reversibility: 8 weeks
Route: iv slow bolus intravenous injection (10 minute infusion)
Vehicle / Formulation: 10 mM citrate, 40 mM NaCl, 50 mM mannitol, 133 mM glycine, 0.01% Tween 80, pH 6.0

Report: [redacted]023.07
Location in CTD: 4.2.3.2.2
GLP compliance: Yes
Test Article: Necitumumab

Special features: Dermal observations, Electrocardiogram, Heart and respiration rate, Blood pressure, Respiratory clinical observations, CNS clinical observations

Toxicokinetics

Feeding condition: Fed
Sex / Number of animals: 16 males / 17 females (total = 33)
Sample: Serum

Dose: 6, 19, 60 mg/kg (dosed 1x/week for 26 consecutive doses)
Assay / Method: ELISA / VR1744 (4.2.2.1.2)

Combined Male + Female mean parameters — Dose 1 (Day 1)

Dose	6 mg/kg	19 mg/kg	60 mg/kg
N	11 (5 males + 6 females)	10 (5 males + 5 females)	12 (6 males + 6 females)
C_{max} (μg/mL)	156	585	1979
(SD)	(43.2)	(72.5)	(830)
$AUC_{0\text{-last}}$ (μg•hr/mL)	7641	35794	142440
(SD)	(2564)	(3097)	(60393)
T_{max} (hr)	2.2	1.58	3.02
(SD)	(3.72)	(1.89)	(6.72)
$T_{½}$ (hr)	87.9	139	263
(SD)	(28.6)	(82.3)	(495)
Cl obs (mL/hr/kg)	0.58	0.328	0.264
(SD)	(0.201)	(0.082)	(0.12)
Vss obs (mL/kg)	65.4	57.2	56.2
(SD)	(12.7)	(14.3)	(28.4)

(Continued)

2.6.7.6B　Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Study in Monkey with Necitumumab (Continued)

Toxicokinetics			
Combined Male + Female mean PK parameters			
	Dose 26 (Day 176)		
Dose	6 mg/kg	19 mg/kg	60 mg/kg
N	10 (5 males + 5 females)	10 (5 males + 5 females)	11 (6 males + 5 females)
C_{max} (μg/mL)	267	626	2826
(SD)	(178)	(119)	(831)
$AUC_{0\text{-last}}$ (μg•hr/mL)	19020	53859	233431
(SD)	(7569)	(15833)	(81208)
T_{max} (hr)	3.6	2.58	2.27
(SD)	(7.41)	(2.60)	(3.68)
$T_{½}$ (hr)	179	145	222
(SD)	(204)	(63.0)	(146)
Cl obs (mL/hr/kg)	0.236	0.217	0.137
(SD)	(0.155)	(0.11)	(0.064)
Vss obs (mL/kg)	38.1	40.2	36.3
(SD)	(14.0)	(9.12)	(16.0)

(Continued)

2.6.7.6B　Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Study in Monkey with Necitumumab (Continued)

Dose	0 (Control)		6 mg/kg		19 mg/kg		60 mg/kg	
Sex: Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:6	F:6
(Number designated for recovery)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(3)	(3)

Experimental Parameters: survival, food consumption, clinical observations, dermal observations, body weight, electrocardiographic and ophthalmic assessments, hematology, coagulation, clinical chemistry, urinalysis, immunogenicity*, macroscopic, organ weight, and microscopic parameters.

Noteworthy Findings								
Died or euthanized moribund	0	0	0	1[a]	0	0	0	1[b]
Clinical signs (n[c])								
Erythema (rashes)	1	1	4	5	5	5	6	6
Scratching	0	0	2	0	3	2	5	5
Dry skin (scales)	0	0	5	5	5	5	6	6
Hunched appearance	0	0	1	3	2	3	5	6
Dermal observations[d], Week 26								
Coloration	1.0		1.1		1.3		2.6	
Condition	1.0		1.0		1.0		1.3	
Epilation	1.0		1.1		1.0		1.0	
Hematology, Day182								
Platelet	409	387	428	353	497	449	566	526
Clinical chemistry, Day182								
Albumin	4.3	3.9	4.1	3.8	4.0	3.5	3.8	3.4
Globulin	2.9	2.9	3.2	3.1	3.4	3.2	3.2	3.4
Albumin/globulin ratio	1.5	1.3	1.3	1.2	1.2	1.1	1.2	1.0

(Continued)

2.6.7.6B　Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Study in Monkey with Necitumumab (Continued)

Dose	0 (Control)		6 mg/kg		19 mg/kg		60 mg/kg	
Sex: Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:6	F:6
(Number designated for recovery)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(3)	(3)
Gross observations – terminal necropsy[e]								
Epidermal lesions	0	0	1	1	2	1	1	2
Histopathology (n[c])								
Skin (abdominal)								
Hyperkeratosis	0	0	0	2	0	0	1	1
Very slight	0	0	0	1	0	0	1	1
Slight	0	0	0	1	0	0	0	0
Hyperplasia, epidermal	0	0	1	3	1	3	3	2
Very slight	0	0	1	1	0	3	2	2
Slight	0	0	0	2	1	0	1	0
Inflammation, lymphocytic, interface	0	0	0	2	1	2	1	0
Very slight	0	0	0	2	0	2	0	0
Slight	0	0	0	0	1	0	1	0

(Continued)

2.6.7.6B　Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Study in Monkey with Necitumumab (Continued)

Dose	0 (Control)		6 mg/kg		19 mg/kg		60 mg/kg	
Sex: Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:6	F:6
Histopathology (nc), continued								
Skin (ear)								
Hyperkeratosis	0	0	0	1	0	0	0	3
Very slight	0	0	0	1	0	0	0	2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Hyperplasia, epidermal	0	0	0	0	0	0	0	1
Very slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0
Inflammation, lymphocytic, interface	0	0	0	0	0	0	0	1
Very slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Skin (inguinal)								
Hyperkeratosis	0	0	0	0	0	0	2	2
Very slight	0	0	0	0	0	0	1	0
Slight	0	0	0	0	0	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Hyperplasia, epidermal	0	0	0	1	2	2	3	3
Very slight	0	0	0	1	1	2	2	1
Slight	0	0	0	0	1	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammation, lymphocytic, interface	0	0	0	0	1	0	2	2
Very slight	0	0	0	0	0	0	1	0
Slight	0	0	0	0	1	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Skin (mammary area, left)								
Hyperkeratosis	0	0	0	1	0	0	0	1
Very slight	0	0	0	1	0	0	0	0
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Hyperplasia, epidermal	0	0	1	2	0	0	2	1
Very slight	0	0	1	2	0	0	2	0
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1

(Continued)

2.6.7.6B Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Study in Monkey with Necitumumab (Continued)

Dose	0 (Control)		6 mg/kg		19 mg/kg		60 mg/kg	
Sex: Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:6	F:6
Histopathology (n[c]), continued								
Skin (mammary area, left)								
Inflammation, lymphocytic, interface	0	0	0	0	0	0	1	1
Very slight	0	0	0	0	0	0	1	0
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Skin (composite-all sites) (gross lesion)								
Hyperkeratosis	0	0	1	2	2	0	2	3
Very slight	0	0	0	1	2	0	1	1
Slight	0	0	1	1	0	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Hyperplasia, epidermal	0	0	2	3	2	3	3	3
Very slight	0	0	2	1	1	3	2	1
Slight	0	0	0	2	1	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammation, lymphocytic, interface	0	0	1	2	2	2	3	2
Very slight	0	0	1	2	1	2	2	0
Slight	0	0	0	0	1	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Recovery evaluations – recovery necropsy[e]								
Dermal observations[d], Week 34								
Coloration	1.0		1.3		1.4		1.6	
Condition	1.0		1.0		1.0		1.5	
Epilation	1.0		1.0		1.6		1.5	
Hematology, Recovery phase day 56								
Platelet	354	326	365	299	405	277	411	301
Clinical chemistry, Recovery phase day 56								
Albumin	4.2	3.7	4.3	3.9	4.0	3.6	3.8	3.7
Globulin	3.1	3.0	3.2	3.0	3.1	2.7	2.9	2.9
Albumin/globulin ratio	1.4	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.3	1.3

(Continued)

2.6.7.6B Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Study in Monkey with Necitumumab (Concluded)

Dose	0 (Control)		6 mg/kg		19 mg/kg		60 mg/kg	
Sex: Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:6	F:6
Recovery evaluations – recovery necropsy[e]								
Histopathology (n[c])								
Skin (abdominal)								
Hyperplasia, epidermal	0	0	0	0	0	0	1	2
Very slight	0	0	0	0	0	0	1	2
Inflammation, lymphocytic, interface	0	0	0	0	0	0	0	1
Very slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Skin (ear)								
Hyperkeratosis	0	0	0	0	0	0	1	0
Very slight	0	0	0	0	0	0	1	0
Hyperplasia, epidermal	0	0	0	0	1	0	2	0
Very slight	0	0	0	0	1	0	2	0
Skin (inguinal)								
Hyperplasia, epidermal	0	0	0	0	1	0	1	2
Very slight	0	0	0	0	1	0	1	2
Inflammation, lymphocytic, interface	0	0	0	0	0	0	0	2
Very slight	0	0	0	0	0	0	0	2

Abbreviations: $AUC_{0\text{-last}}$ = area under the concentration-time curve from 0 to the last quantifiable time point, Cl = clearance, C_{max} = maximum observed concentration, ELISA = enzyme linked immunosorbent assay, F = female, GLP = good laboratory practice, iv = intravenous, M = male, min = minute, N = number of animals used for the combined Male + Female mean, obs = observed, SD = standard deviation, T_{max} = time to maximum observed concentration, $T_{½}$ = elimination half-life, V_{ss} = volume of distribution at steady state.

* Immunogenicity could not be accurately assessed due to the presence of circulating necitumumab.

[a] Found dead on Day 4. Upon necropsy, a hole in the stomach was observed which likely resulted from a pre-existing ulcer.

[b] Euthanized on Day 120 (after the 18th dose) in moribund condition. There were no relevant clinical observations prior to the day of euthanasia. Analysis of clinical pathology and other postmortem data indicated that this animal had a coagulopathy, possibly related to septicemia.

[c] Number of animals

[d] Mean score

[e] 3 animals/sex/group were necropsied at the end of the dosing period (Day 183). The remaining animals were necropsied at the end of the recovery period (Day 239).

2.6.7.7　Genotoxicity (No studies performed)

2.6.7.8　Carcinogenicity (No studies performed)

2.6.7.9　Reproductive and Developmental Toxicity (No studies performed)

2.6.7.10　Studies in Juvenile Animals (No studies performed)

2.6.7.11　Local Tolerance (Not Applicable)

2.6.7.12 Other Toxicity Studies: Cross Reactivity

Species/Strain: Human and Cynomolgus monkey tissue
Report: IM993
Route: In vitro/ immunohistochemical staining
Location in CTD: 4.2.3.7.7.1
Duration of Dosing: NA
Doses: 1 and 40 μg/mL
Number of Tissues: 3 sources/tissues for human and 2 sources/tissues for monkey

Noteworthy Findings: Test article reacted with potential EGFR-expressing cells in the majority of human and cynomolgus monkey tissues evaluated including epithelium, endocrine cells, myoepithelium, neural tissues, stromal cells, cells of the mononuclear/phagocyte system, smooth muscle cells, and mesothelium.

Staining was generally similar in monkeys and humans.

Tissues that membrain staining was observed in human but not in monkey are summarized below:
Staining in the nerve endings in human heart and striated muscle tissues was not observed in the monkey tissue.
Staining occurred in the glandular epithelium of human uterus-body (endometrium) but not in monkey tissues.
Test article staining of epithelium of inclusion cysts in the ovary was observed in one human donor. This structure was not present in either of the cynomolgus monkey ovaries.
There was staining of chief cells from the parathyroid of one human donor. No parathyroid tissue was available for the cynomolgus monkey.
Remnants of the Rathke's pouch and staining of the epithelium were observed in the human pituitary tissues. This structure was not present in the monkey tissues; however, staining in other parts of the pituitary (neurohypophysis, adenohypophysis) was observed in monkey tissue.
Myoepithelium of the salivary and prostate gland were positive for staining in the human tissue, but not in the monkey tissue. However, myoepithelial staining was noted in the breast and uterus (cervix) of cynomolgus monkeys, but not in human tissues.
Ependymal staining (spinal cord) was observed in 1/3 human donors but not in cynomolgus monkey tissues.

Species/Strain: Human, Cynomolgus monkey, Norway Brown rat tissue
Report: 0409
Route: In vitro /immunohistochemical staining
Location in CTD: 4.2.3.7.7.2
Duration of Dosing: NA
Doses: 1 and 5 μg/mL
Number of Tissues: 1 source/tissue for human and 2 sources/tissues for monkey and rat

Noteworthy Findings: IMC-11F8 binds to human and monkey EGFR in skin especially basal epidermal cells, but not to rat skin.

Abbreviations: EGFR = epidermal growth factor receptor, NA = not applicable.