

目次

2.6.6	毒性試験の概要文	3
2.6.6.1	まとめ.....	3
2.6.6.2	急性毒性試験.....	6
2.6.6.2.1	MMAE のラット単回投与試験.....	6
2.6.6.2.2	MMAE のカニクイザル単回投与試験.....	6
2.6.6.3	反復投与毒性試験.....	7
2.6.6.3.1	MMAE のラット 4 週間 (週 1 回, 計 4 回) 投与試験 (4 週間回復性試験)	7
2.6.6.3.2	ポラツズマブ ベドチンのラット 4 週間 (週 1 回, 計 4 回) 投与試験 (6 週間回復性試験)	8
2.6.6.3.3	MMAE のカニクイザル反復投与試験.....	9
2.6.6.3.4	ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル 10 週間 (3 週に 1 回, 計 4 回) 投与試験 (9 週間回復性試験)	10
2.6.6.4	遺伝毒性試験.....	11
2.6.6.4.1	MMAE の細菌を用いる復帰突然変異試験.....	12
2.6.6.4.2	MMAE のマウスリンフォーマ細胞を用いる突然変異試験.....	12
2.6.6.4.3	MMAE のラット小核試験.....	12
2.6.6.5	がん原性試験.....	13
2.6.6.6	生殖発生毒性試験.....	13
2.6.6.6.1	MMAE のラット胚・胎児発生に関する試験.....	13
2.6.6.7	局所刺激性試験.....	14
2.6.6.8	その他の毒性試験.....	14
2.6.6.8.1	ポラツズマブ ベドチンのヒト組織交差反応性試験.....	14
2.6.6.8.2	光安全性に関する評価.....	14
2.6.6.8.3	ポラツズマブ ベドチンの製造副生成物の評価.....	14
2.6.6.9	考察及び結論.....	14
2.6.6.9.1	抗原非依存的作用.....	15
2.6.6.9.2	抗原依存的作用.....	17
2.6.6.9.3	薬物乱用に関する評価.....	17
2.6.6.9.4	結論.....	17
2.6.6.10	図表.....	17
2.6.6.11	参考文献.....	18

表一覧

表 2.6.6.1-1	ポラツズマブ ベドチンの毒性試験一覧	4
-------------	--------------------------	---

略語一覧

略語	英名	和名
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADC	antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
ALP	alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
C _{max}	maximum observed concentration	最高血清中（血漿中）濃度
DAR	drug-to-antibody ratio	薬物抗体比
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GALT	gut-associated lymphoid tissue	腸関連リンパ組織
GGT	gamma-glutamyltransferase	ガンマグルタミルトランスフェラーゼ
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
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャンネル遺伝子
HNSTD	highest non-severely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
mc-vc-PAB	maleimidocaproyl-valine-citrulline- <i>p</i> -aminobenzoyloxycarbonyl	maleimidocaproyl-valine-citrulline- <i>p</i> -aminobenzoyloxycarbonyl
MMAE	monomethyl auristatin E	モノメチルアウリスタチン E
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PD	pharmacodynamic	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
STD ₁₀	severely toxic dose in 10% of the animals	供試動物の10%に重篤な毒性が発現する投与量
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
vcMMAE	mc-vc-PAB-MMAE	mc-vc-PAB-MMAE
WOE	weight of evidence	エビデンスの重み付け

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

ポラツズマブ ベドチン（遺伝子組換え）（以下、本薬又はポラツズマブ ベドチン）は CD79b を標的とする抗体薬物複合体（ADC）であり、強力な有糸分裂阻害剤（モノメチルアウリスタチン E : MMAE）を B 細胞に選択的に送達し、B 細胞性悪性腫瘍に対する抗がん作用を誘導する。ポラツズマブ ベドチン分子は、CD79b を標的とするヒト化免疫グロブリン（IgG1）モノクローナル抗体に、プロテアーゼ切断性リンカーである maleimidocaproyl-valine-citrulline-*p*-aminobenzyloxycarbonyl（mc-vc-PAB）を介して共有結合した MMAE から構成される。ポラツズマブ ベドチンは、抗体1分子当たり平均3.5分子の MMAE が導入される [薬物抗体比（DAR）= 3.5] よう設計されている（2.3.S.1.3 [ポラツズマブ ベドチン原薬]）。

ポラツズマブ ベドチンはヒト B 細胞上の CD79b を特異的に認識するが、マウス、ラット及びカニクイザルの CD79b を認識しない。そのため、毒性試験に用いる被験物質として、カニクイザル CD79b に結合するサロゲート ADC を作製した。サロゲート ADC は、サロゲート抗体（カニクイザル CD79b に対するヒト-マウスキメラ IgG1モノクローナル抗体）及び mc-vc-PAB を介して結合した MMAE から構成される。サロゲート ADC は、ポラツズマブ ベドチンと同程度の親和性で類似するエピトープに結合する。また、抗体1分子当たりの mc-vc-PAB-MMAE（vcMMAE）分子の平均数も、ポラツズマブ ベドチンとサロゲート ADC とでは同程度である。非臨床試験で使用されたポラツズマブ ベドチンのロット及びサロゲート ADC のロットの DAR は、それぞれ平均3.7及び3.5であった。

サロゲート ADC について、カニクイザルにおける抗原依存的な薬理的及び薬物動態学的／薬力学的（PK/PD）特性の詳細な評価を行い、その適性を確認した（2.6.2.2）。その結果、サロゲート ADC はポラツズマブ ベドチンと比較して同程度の結合親和性を示し、*in vitro* 血漿中安定性、*in vivo* 抗腫瘍活性、及びマウスにおける薬物動態の類似性が確認された。更に、PK/PD 試験において、サロゲート ADC はカニクイザル B 細胞を枯渇させ、B 細胞を介した薬物動態を示すことも明らかになった（2.6.2.2.3, 2.6.4.3.1.2）。これらの結果から、カニクイザルを用いた毒性試験においてサロゲート ADC を使用することは適切と判断し、当該被験物質を用いて抗原依存的な毒性及び抗原非依存的な毒性の両方を評価した。また、ポラツズマブ ベドチンのラット及びカニクイザルを用いた試験において、本薬の抗原非依存的毒性を評価した。

毒性試験における投与は臨床適用経路に準じて静脈内とし、主要な試験であるカニクイザルを用いた反復投与試験は、臨床での投与レジメンに準じて3週に1回の反復投与により実施した。

ポラツズマブ ベドチンの毒性試験一覧を表 2.6.6.1-1に示した。本薬の毒性試験プログラムには、主要な試験としてポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回、計4回）投与試験、ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル10週間（3週に1回、計4回）投与試験（安全性薬理評価を含む）、並びにポラツズマブ ベドチンのヒト組織交差反応性試験が含まれる。また、ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の毒性プロファイルへの MMAE の寄与を明らかにするため、MMAE のラット単回及び反復（週1回、計4回）投与試験、並びにカニクイザル単回及び反復（3週に1回、計4回）投与試験を実施した。その他、MMAE に関する試験として、遺伝毒性試験（細菌を用いる復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ細胞を用いる遺伝子突然変異試験及びラット小核試験）、生殖発生毒性試験（ラット胚・胎児発生に関する試験）、及び *in vitro* hERG（ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャンネル遺伝子）試験（2.6.2.4.1）も実施した。なお、MMAE 及び vcMMAE は自然光の範囲内（290～700 nm）の光を吸収しないため、光安全性に関する試験は実施しなかった。

ヒトを対象とする臨床試験の実施をサポートするための主要な毒性試験及び安全性薬理試験は、米国食品医薬品局（FDA）の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）規則（21 CFR Part 58）又は経済協力開発機構（OECD）の GLP 原則 [C(97)186/Final] を遵守し

て実施し、OECD のデータ相互受入 (MAD) プログラムの参加国で実施した。その他の追加の毒性試験については、科学的かつ綿密な非 GLP 試験として実施した。

毒性試験におけるポラツズマブ ベドチン又はサロゲート ADC の用量は体重に基づいて表記 (mg/kg) し、トキシコキネティクス (TK) については、ADC (総抗体として測定) 及び遊離型 MMAE 曝露量として評価した。これらの試験において、抗薬物抗体 (ADA) の生成がみられたが、いずれにおいてもポラツズマブ ベドチン又はサロゲート ADC の曝露量に明らかな影響を及ぼさず、ADA 又は免疫複合体形成に起因する毒性は確認されなかった。

表 2.6.6.1-1 ポラツズマブ ベドチンの毒性試験一覧

試験の種類及び投与期間	動物種	投与経路	被験物質：投与量 (mg/kg) 又は処理濃度	GLP 適合性
急性毒性				
単回投与	ラット	静脈内	MMAE : 0, 0.206	非
単回投与	ラット	静脈内	MMAE : 0, 0.516	非
単回投与	カニクイザル	静脈内	MMAE : 0.116	非
単回投与	カニクイザル	静脈内	MMAE : 0, 0.030, 0.063	適
反復投与毒性				
週1回, 4回投与	ラット	静脈内	MMAE : 0, 0.0097, 0.097, 0.194	適
週1回, 4回投与	ラット	静脈内	ポラツズマブ ベドチン : 0 ^a , 2, 6, 10	適
3週に1回, 2回投与	カニクイザル	静脈内	MMAE : 0.058	非
3週に1回, 4回投与	カニクイザル	静脈内	MMAE : 0, 0.058	適
3週に1回, 4回投与	カニクイザル	静脈内	ポラツズマブ ベドチン : 0 ^a , 1, 3, 5 サロゲート ADC : 3, 5	適
遺伝毒性				
復帰突然変異 (細菌)	ネズミチフス菌, 大腸菌	<i>In vitro</i>	MMAE : 0.25~5000 µg/plate	適
前進突然変異 (哺乳類培養細胞)	マウスリンフオーマ細胞	<i>In vitro</i>	MMAE : 0.005~100 ng/mL	適
小核	ラット	静脈内	MMAE : 0, 0.01, 0.1, 0.2	適
生殖発生毒性				
胚・胎児発生	ラット	静脈内	MMAE : 0, 0.2	適
その他の毒性				
組織交差反応性	ヒト	<i>In vitro</i>	ポラツズマブ ベドチン : 2.5, 12.5 µg/mL	適

a : ポラツズマブ ベドチン溶媒 (20 mM histidine acetate, pH 5.5, 240 mM sucrose, and 0.02% polysorbate 20)

単回及び反復投与毒性

- MMAE のラット単回及び反復投与試験において、骨髄毒性 (血小板, 赤血球及び白血球パラメータの低下, 並びに骨髄細胞減少), 肝毒性 (血清肝パラメータ上昇, 並びに肝細胞のアポトーシス, 壊死及び有糸分裂増加), リンパ器官毒性 (胸腺及び脾臓のリンパ球減少) が一貫して認められた。骨髄毒性は用量に依存して認められ, 雌ラットを用いた単回投与試験の最高用量 (0.516 mg/kg) では, 骨髄毒性に関連した全身状態悪化が認められた。反復投与試験でのさらなる所見として, 用量に依存した体重減少及び摂餌量の減少に関連した体重増加量の低値がみられた。また, 高用量 (0.194 mg/kg) では精巣毒性 (精細管変性及び精子形成減少) が認められた。精巣毒性以外の所見は, いずれも 4 週間の休薬期間終了時までには回復した。

- MMAE のカニクイザル単回及び反復投与試験では、骨髄及びリンパ器官で、ラットへの MMAE 投与時と類似した可逆的な毒性が認められた。骨髄毒性は、0.063 mg/kg 以上を投与した雄における死亡及び日和見感染症（肺膿瘍）と関連していた。同用量でのさらなる所見として、摂餌量減少に関連した体重減少がみられた。MMAE のカニクイザル単回投与による重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）は、0.030 mg/kg であった。
- ラット反復投与試験において、ポラツズマブ ベドチンを週 1 回、計 4 回投与したとき、MMAE 投与時と類似した骨髄、肝臓、胸腺及び精巣毒性が用量依存的に認められた。雄への高用量（10 mg/kg）投与で認められた赤血球量の減少による全身状態悪化、並びに眼、耳、及び皮膚の蒼白化は骨髄毒性と関連していた。雄でのさらなる所見として、摂餌量減少に関連した用量依存的な体重増加量の低値、及び全身状態悪化に関連した自発運動低下がみられた。精巣毒性以外の所見はいずれも 6 週間の休薬期間終了時まで概ね回復した。以上の結果から、ラットにおけるポラツズマブ ベドチンの供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量（STD₁₀）は、10 mg/kg と判断された。
- カニクイザル反復投与試験において、ポラツズマブ ベドチンを 3 週に 1 回、計 4 回投与したとき、5 mg/kg までの用量で良好な忍容性が認められ、MMAE 投与時と類似した可逆的な骨髄毒性が認められた。また、サロゲート ADC の 3 週に 1 回、計 4 回投与においても同様の可逆的な骨髄毒性が認められ、高用量（5 mg/kg）では、サロゲート ADC による骨髄抑制に起因した細菌性心内膜炎による死亡が認められた。また、予想された薬理学的作用として、可逆的な末梢血 B リンパ球の減少及び脾臓のリンパ濾胞性胚中心の消失が認められた。以上の結果から、カニクイザルにおけるポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の HNSTD は、それぞれ 5 mg/kg 及び 3 mg/kg と判断された。
- 異なる動物種（ラット、カニクイザル）及び異なる被験物質（MMAE、ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC）において同様の骨髄毒性が認められたことから、この変化は MMAE の薬理活性に直接関係していると考えられた。

遺伝毒性

- MMAE は細菌及び哺乳類培養細胞を用いた *in vitro* 試験において遺伝子突然変異誘発性を示さなかったが、ラットを用いた試験において小核を有する多染性赤血球を増加させた。特異的抗体を用いた動原体解析の結果から、MMAE 投与による小核誘発の機序は、主に異数性誘発性に関連したものと考えられた。

生殖発生毒性

- MMAE のラット胚・胎児発生試験において、0.2 mg/kg を妊娠 6 及び 13 日目に静脈内投与したとき、総胎児吸収、後期吸収胚及び生存胎児を有さない母動物数の有意な増加が認められた。また、胎児検査では、外表異常（舌突出、四肢回転異常、腹壁破裂及び無顎症）が認められたことから、MMAE は胚・胎児毒性及び催奇形性を惹起すると考えられた。

その他の毒性

- 正常なヒト組織において、ポラツズマブ ベドチンによる特異的染色が主にリンパ球（特に B 細胞領域）で認められ、B 細胞上の CD79b の既知の発現パターンと一致していた。

2.6.6.2 急性毒性試験

ポラツズマブ ベドチンの独立した急性毒性試験は実施していない。MMAE に関連した毒性について検討するため、ラット及びカニクイザルを用いた単回投与試験を実施した。

2.6.6.2.1 MMAE のラット単回投与試験

(資料番号：4.2.3.1-1及び4.2.3.1-2)

2つの別々の非 GLP 毒性試験において、Sprague-Dawley ラット（各群雌6例）に MMAE を 0.206又は0.516 mg/kg の用量で単回投与（Day 1）した。対照群には溶媒（リン酸緩衝生理食塩液〔PBS〕）を投与した。

試験結果を表2.6.7.5-1に示した。

0.206 mg/kg では剖検日の Day 5まで一般状態及び体重の異常はみられなかったが、0.516 mg/kg では全例が Day 3に全身状態悪化（重度の活動性低下及び泌尿生殖器周囲の黄色排泄物による汚れ）を示したことから、同日に剖検を行った。

0.516 mg/kg では、血液検査において血清肝酵素（アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、ガンマグルタミルトランスフェラーゼ (GGT)）の高値、並びに血小板及び白血球の低値が認められた。病理組織学的検査では、骨髄の細胞数減少、アポトーシス増加を伴う胸腺の萎縮、種々の程度の粘膜変性及び萎縮を伴う消化管粘膜の有糸分裂及びアポトーシス細胞増加、肝細胞及び胆管上皮における有糸分裂及びアポトーシス細胞増加がみられ、肝細胞脱落及び限局性の肝細胞壊死も認められた。0.206 mg/kg においても白血球低値、一過性の ALT 及び AST 高値、胸腺、脾臓及び骨髄の病理組織学的変化が認められたが、変化の程度は0.516 mg/kg と比較して軽度であった。

以上の結果から、ラットにおける MMAE の単回静脈内投与による概略の致死量は、0.516 mg/kg と判断された。

2.6.6.2.2 MMAE のカニクイザル単回投与試験

(資料番号：4.2.3.1-3及び4.2.3.1-4)

最初に実施した非 GLP 試験では、カニクイザル（雌雄各1例）に MMAE を0.116 mg/kg の用量で単回静脈内投与（Day 1）し、投与後63日間観察した。溶媒は0.01N 塩酸/0.9%生理食塩液を用いた。

また、引き続き実施した GLP 試験ではカニクイザル（各群雌雄各5例）に MMAE を0（溶媒）、0.030又は0.063 mg/kg の用量で単回静脈内投与（Day 1）し、Day 8に各群雌雄各3例を剖検し、残りの各群雌雄各2例を Day 22に剖検した。溶媒は20 mM histidine acetate, 240 mM (9.08%) trehalose dihydrate, 0.02% polysorbate 20, pH 5.5を用いた。

試験結果を表2.6.7.5-1に示した。

最初の試験では、0.116 mg/kg の投与により、雄が Day 28に死亡した。剖検において右肺に膿瘍が認められ、日和見感染症との関連が示唆された。また、その他の所見として、摂餌の減少、体重減少、一般状態異常（円背位、乾燥した又は硬い便）、血液学的変化（すべての白血球分画、赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット及び網状赤血球の減少）、血液化学的変化（アルブミン低値及び軽度の AST 高値）が認められた。

引き続き実施した GLP 試験では、0.063 mg/kg の雄1例が Day 9に死亡発見された。同個体では Day 8に一般状態所見として円背位が認められ、血液学的検査では好中球、リンパ球及び単球の減少が認められた。剖検時に死後変化が認められたことから、多くの器官についての組織学的評価はできなかったが、大腿骨及び胸骨において中等度～重度の骨髄細胞減少が認められたことから、この変化が MMAE 投与に関連した死因と考えられた。

その他の動物については計画剖検時まで生存し、MMAE 投与に関連した一般状態、摂餌量、体重、神経学的及び身体検査、体温、呼吸数、パルスオキシメトリー及び眼科学的検査の異常は認められなかった。

MMAE 投与に関連した変化として、0.030及び0.063 mg/kg で血液学的検査における中等度～重度の白血球減少（中等度～重度の好中球（絶対数）減少及び軽微なリンパ球（絶対数）減少による）が認められた。また、Day 8に用量依存的な軽度～中等度の網状赤血球（絶対数）減少も認められ、これに伴い軽微～軽度の赤血球容積（赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット）の減少が生じたと考えられた。白血球及び網状赤血球は、概ね Day 8に最低値を示したが、網状赤血球の減少は Day 3にも認められた。血液化学的検査では、0.063 mg/kg でフィブリノゲンの軽度高値及びアルブミンの軽度低値が Day 8に認められた。Day 8の骨髄検査では、0.063 mg/kg で成熟骨髄細胞の枯渇を伴う顕著な未成熟骨髄前駆細胞へのシフト（左方移動）が認められ、0.030 mg/kg においても軽度のシフトがみられた。骨髄塗抹標本検査においては赤血球前駆細胞に対する明らかな変化は認められなかった。血液学的検査所見と合わせて、骨髄におけるこれらの変化は、MMAE 投与による骨髄抑制及び骨髄毒性を示唆するものと考えられた。血液学的検査における白血球及び網状赤血球は、一部の個体で Day 15に投与前値を上回るリバウンドが認められ、Day 22には対照群と同程度まで回復した。骨髄塗抹標本検査においても、Day 22に同様の回復性が確認された。

生存例の Day 8又は Day 22の剖検において異常所見は認められなかった。MMAE 投与に関連した病理組織学的変化として、0.030及び0.063 mg/kg の雌雄で胸骨骨髄における骨髄系及び赤血球系細胞の減少が認められた。0.063 mg/kg の雄、並びに0.030及び0.063 mg/kg の雌では同様の変化が大腿骨骨髄でも認められた。Day 22の剖検では、いずれの個体においても骨髄系及び赤血球系細胞の枯渇は認められなかった。0.063 mg/kg の雌雄では骨髄系及び赤血球系細胞の過形成が認められ、Day 8の剖検時に認められた変化は完全に回復すると考えられた。

血漿中 MMAE 濃度は0.030～0.063 mg/kg の範囲で用量依存的な増加を示し、曝露量に性差は認められなかった。

以上のとおり、高用量の0.063 mg/kg では死亡例が認められたことから、本試験条件下における MMAE の単回静脈内投与による HNSTD は、0.030 mg/kg と判断した。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 MMAE のラット4週間（週1回、計4回）投与試験（4週間回復性試験）

（資料番号：4.2.3.2-1）

Sprague-Dawley ラット（各群雌雄各10又は15例）に MMAE を0（溶媒）、0.0097、0.097又は0.194 mg/kg の用量で週1回、計4回静脈内投与した。溶媒は0.01N 塩酸(3.9%)/0.9%生理食塩液(96.1%)を用いた。最終投与後4日（Day 26）に各群雌雄各10例を剖検し、最終投与後29日（Day 51）に残りの動物（溶媒対照群、0.097及び0.194 mg/kg 群の雌雄各5例）を剖検した。また、TK サテライト群として各群雌雄各10例を別途設定し、血漿中薬物濃度測定のための血液採取に供した。

試験結果を表2.6.7.6-1に示した。

0.097 mg/kg の雌1例が投与期間終了時の頸静脈からの血液サンプル採取後に死亡したが、偶発的所見と考えられた。他の動物はいずれも計画剖検時まで生存し、特記すべき一般状態及び眼科学的所見は認められなかった。

0.194 mg/kg では体重、体重増加量及び摂餌量の低値がみられたが、いずれも4週間の休薬により回復した。

0.097 及び0.194 mg/kg では血液検査における種々の変化がみられ、0.194 mg/kg での明らかな所見として、赤血球造血の減少（網状赤血球、赤血球、ヘモグロビン及びヘマトクリットの

低値)及び肝傷害(総ビリルビン, AST, ALT 及び GGT の高値)を示唆する変化が認められた。その他, 白血球, 血小板及び血清蛋白などへの弱い変化が認められた。血液検査値への影響の一部は, 4週間の休薬後も完全には回復しなかった。

投与期間終了時の剖検において, 被験物質投与に関連した胸腺(0.097及び0.194 mg/kg の雌雄)及び精巣(0.194 mg/kg の雄)重量の低値が認められた。4週間の休薬期間終了時においては, 0.194 mg/kg の雄で精巣に加えて精巣上体重量の低値も認められた。病理組織学的検査では, 高用量の雌雄で胸腺におけるリンパ球枯渇, 並びに胸骨及び大腿骨骨髓における細胞数減少(軽微~重度)が認められた。また, 精細管における精母細胞の減少又は欠如も認められた。更に, 0.194 mg/kg の雄では肝臓における凝固壊死巣の軽度な増加が認められた。休薬期間終了時剖検例では, 胸腺, 骨髓及び肝臓の変化はみられず, 完全な回復性が確認されたが, 0.194 mg/kg の精巣では依然として変化が認められ(びまん性の精細管変性, セルトリ細胞の空胞化), 更に精巣上体における無精子症も認められた。なお, 投与部位において刺激性を示唆する変化は認められなかった。

血清中 MMAE 濃度は0.0097~0.194 mg/kg の範囲において用量に応じた増加を示した。 C_{max} は概して用量比を下回る増加を示したが, AUC_{0-24h} は用量比例性の増加を示した。概して曝露量に明らかな性差は認められなかった。

以上のとおり, 0.194 mg/kg で骨髓, 胸腺, 肝臓, 精巣及び精巣上体への影響が認められたことから, 本試験条件下における MMAE の無毒性量 (NOAEL) は, 0.097 mg/kg と判断した。

2.6.6.3.2 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間(週1回, 計4回)投与試験 (6週間回復性試験)

(資料番号: 4.2.3.2-2)

Sprague-Dawley ラット(各群雌雄各15例)にポラツズマブ ベドチンを0(溶媒), 2, 6又は10 mg/kg の用量で週1回, 計4回静脈内投与した。Day 26(最終投与後4日)に各群雌雄各10例を剖検し, Day 64(回復39日)に残りの動物を剖検した。TK サテライト群として各群雌雄各3例(溶媒対照群)又は各9例(被験物質投与群)を別途設定し, 血中薬物濃度測定のための血液採取に供した。

試験結果を表2.6.7.7.1-1及び表2.6.7.7.2-1に示した。

10 mg/kg の雄1例を全身状態悪化のため, Day 31(回復6日)に安楽死処置した。同個体は, 一般状態所見として, 円背位, 体幹及び眼の蒼白化, 粗毛及び体重減少が認められた。血液学的検査では著しい赤血球量(ヘマトクリット: 6.2%), 網状赤血球(絶対数), 血小板及び好中球の減少がみられ, 病理組織学的検査における骨髓細胞減少と一致していた。血液化学的検査では, 中等度の AST, ALT, アルカリフォスファターゼ(ALP), GGT 及び総ビリルビンの高値が認められた。病理組織学的検査では, 重度の貧血による酸素欠乏に一致した肝細胞の小葉中心性変性が認められ, AST 及び ALT の高値と関連する所見と考えられた。

その他の10 mg/kg の雄においても, 体幹及び眼の蒼白化が認められた。6 mg/kg 以上の雄では, 投与期間中に摂餌量の低値に一致した体重増加量の低値がみられた。投与期間中の機能観察総合評価法(FOB)評価では, 10 mg/kg の雄でオープンフィールドでの自発運動低下, 2 mg/kg 以上の雄でフォトセルにより測定した自発運動の低下が認められた。これらの所見は本薬による特異的な神経行動学的作用ではなく, 全身状態悪化に関連して生じたものと考えられた。すべての一般状態所見, 体重変化及び神経学的/運動機能に対する作用は, Day 64(回復39日)までに回復した。眼科学的検査では異常は認められなかった。

血液学的検査では, 6 mg/kg 以上で認められた骨髓毒性, 造血抑制及び病理組織学的所見(胸骨及び大腿骨骨髓における細胞数減少)に一致した変化が認められ, 雄で雌よりも強い変化がみられた。すべての血液学的検査の変化は, 休薬期間終了時に回復した。血液化学的検査では, AST, ALT, ALP, GGT 及び総ビリルビンの高値のうちいくつかは, 6 mg/kg 以上の

雄で、雌と比較して高頻度に認められた。

本薬投与による病理学的変化は、投与期間終了時において、2 mg/kg 以上の雌雄のさまざまな器官において認められた。この変化は、骨髄（細胞数減少）、胸腺（皮質の細胞数減少、アポトーシス/有糸分裂の増加；6 mg/kg 以上の剖検で認められた胸腺の小型化及び胸腺重量低値と一致）、精巣（精細管上皮変性及び精母細胞のアポトーシス増加；2 mg/kg 以上の剖検で認められた精巣の小型化及び軟化、並びに精巣重量低値に一致）、及び精巣上体（精巣上体管の異常内容物及び上皮のアポトーシス/有糸分裂増加；6 mg/kg 以上の剖検で認められた精巣上体の大型化及び重量高値に一致）において、主として細胞数減少、アポトーシス/有糸分裂又は変性に関連した変化として認められた。その他、本薬に関連した病理組織学的変化が肝臓、肺及び皮膚で認められた。肝臓では6 mg/kg 以上の雌雄で肝細胞（軽微～軽度）、類洞細胞（内皮及びクッパー細胞）及び胆管上皮のアポトーシス/有糸分裂の増加が投与期間終了時に認められた。また、炎症性細胞及び出血の存在を特徴とする散在性の巣状壊死が10 mg/kg の雌雄及び6 mg/kg の雌2例で投与期間終了時に認められた。これらの変化は、血液化学的検査における肝酵素上昇と関連していると考えられた。肺においては、2 mg/kg 以上の雌雄で肺泡マクロファージ浸潤、10 mg/kg の雄でII型肺胞上皮細胞の過形成/肥大がみられた。皮膚では、付属器（脂腺及び毛包）上皮細胞のアポトーシス/萎縮の増加（軽微）及び表皮の有糸分裂増加（軽微）が6 mg/kg 以上の雌雄で認められた。また、10 mg/kg の雌雄各1例及び6 mg/kg の雌1例では皮膚のびらん/潰瘍も認められた。投与部位の尾の皮膚においても同様の変化がみられ、病理組織学的検査における変化の程度は、概して投与部位の方が、他の皮膚の箇所よりも重度であった。その他、本薬投与に関連した病理組織学的変化（アポトーシス/有糸分裂の増加）が顎下リンパ節、脾臓、眼、小腸及び大腸、心臓、脾臓、ハーダー腺、下垂体、子宮及び雄の乳腺で認められた。休薬期間終了時において、本薬投与に関連した病理組織学的変化は精巣（萎縮；2 mg/kg 以上の剖検で認められた小型化及び/又は軟化、並びに重量低値に一致）及び精巣上体（精巣上体管の異常内容物；6 mg/kg 以上の剖検で認められた重量低値に一致）のみで認められた。また、10 mg/kg の雄1例では軽微な肺泡マクロファージ集簇、雌1例では肝臓における散在性の巣状壊死が認められた。

本薬投与による総抗体及びMMAEの曝露量は2～10 mg/kgの範囲で概ね用量比例的に増加し、概して明らかな性差は認められなかった、反復投与による総抗体曝露量の蓄積が示唆されたが、MMAEの蓄積は認められなかった。

以上のとおり、ポラツズマブ ベドチンは雄で6 mg/kg、雌で10 mg/kgの用量まで良好な忍容性を示した。投与期間中の主な所見として、造血及び骨髄への影響が認められ、6週間の休薬による回復性を示した。雄においては、精巣及び精巣上体の変化が休薬期間終了時においても認められた。本薬投与に関連した死亡例の発現状況に基づき、本試験条件下におけるポラツズマブ ベドチンのSTD₁₀は、10 mg/kg（4回目投与後の総抗体のAUC₂₁₋₂₈ [雄/雌]：923/923 µg•day/mL、遊離型MMAEのAUC₂₁₋₂₅ [雄/雌]：1.33/0.979 ng•day/mL）と判断した。

2.6.6.3.3 MMAEのカニクイザル反復投与試験

（資料番号：4.2.3.1-3及び4.2.3.2-3）

カニクイザルを用いたMMAEの反復投与試験を2回実施した。最初の試験（非GLP）では、カニクイザル（雌雄各1例）にMMAEを0.058 mg/kgの用量で3週に1回、計2回静脈内投与し、2回目投与後28日まで観察した。溶媒は0.01N塩酸/0.9%生理食塩液を用いた。また、引き続いて実施したGLP試験では、カニクイザル（各群雌雄各5又は6例）にMMAEを0（溶媒）又は0.058 mg/kgの用量で3週に1回、計4回静脈内投与し、最終投与後1週（Day 71）及び5週（Day 100）に各群雌雄各4又は3例、及び各群雌雄2例を剖検した。溶媒は2 mL 0.01N塩酸/198 mL注射用水/0.9%生理食塩液を用いた。

試験結果を表2.6.7.6-1に示した。

最初の試験では、0.058 mg/kg を3週に1回、計2回投与した結果、良好な忍容性が認められ、軽度の一般状態所見及び血液検査値の変化（赤血球及び白血球パラメータ、アルブミン及びAST）が認められた。

2回目の試験では、0.058 mg/kg を3週に1回、計4回投与した結果、MMAE の投与による体重、血圧、心拍数、呼吸数、体温、眼科学的検査、心電図、血液凝固検査及び尿検査への影響は認められなかった。血液学的検査では重度の好中球減少がみられ、投与期間終了時剖検例では造血系及びリンパ器官の変化（骨髄及びリンパ系細胞の減少）が認められた。また、血液化学的検査値（軽微～軽度のアルブミン及びALP 低値、並びに軽微～軽度のALT 及び無機リンの低値）の変化もみられたが、すべての変化は5週間の休薬により完全に回復した。

血清中 MMAE の投与直後のピーク濃度は1.872～4.626 ng/mL の範囲であり、平均ピーク濃度は初回投与と比較して2回目投与以降はほぼ倍の値を示した。血清中 MMAE 濃度は投与後3日以内に1/40～1/80に減少し、投与後1週間でほぼ検出限界未満となった。

2.6.6.3.4 ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル10週間（3週に1回、計4回）投与試験（9週間回復性試験）

（資料番号：4.2.3.2-4）

カニクイザル（各群雌雄各5例）にポラツズマブ ベドチンの0（溶媒）、1, 3, 5 mg/kg、又はサロゲート ADC の3, 5 mg/kg を3週に1回、計4回静脈内投与した。最終投与後7日（Day 71）に各群雌雄各2又は3例を剖検し、最終投与後9週（Day 128）に残りの動物を剖検した。本試験では通常毒性評価項目に加えて安全性薬理に関する評価（心血管系、呼吸系及び中枢神経系）も行った。なお、非拘束覚醒下での心血管系評価のため、休薬期間終了時剖検例（各群雌雄各2例）については、試験開始前にテレメトリーシステムを外科的に埋植した。

試験結果を表2.6.7.7.1-1及び表2.6.7.7.3-1に示した。

サロゲート ADC 5 mg/kg の雄1例で Day 53 に全身状態悪化が認められ、安楽死処置の直前に死亡した。この個体の死因は細菌性心内膜炎であり、サロゲート ADC の投与による骨髄抑制に起因したものと考えられた。また、ポラツズマブ ベドチン 3 mg/kg の雌1例に裂傷が認められたため Day 55 に安楽死処置したが、この裂傷は投薬に関連したものではないと判断した。

ポラツズマブ ベドチン又はサロゲート ADC の投与による摂餌量、体重、安全性薬理評価項目（心血管系：血圧、心拍数及び心電図、呼吸系：呼吸数及びパルスオキシメトリー、中枢神経系：神経学的パラメータ）、及び眼科学的検査における異常は認められなかった。一般状態観察で認められた唯一の所見は、Day 53 に安楽死処置したサロゲート ADC 5 mg/kg の雄1例での活動性低下及び円背位であった。

ポラツズマブ ベドチン 3及び5 mg/kg の雌雄において、骨髄毒性（軽度～中等度の骨髄細胞減少又は軽度の再生性骨髄細胞増加）及び末梢血における網状赤血球の減少が認められた。5 mg/kg では Day 8 に平均リンパ球数の一過性減少がみられた。血液化学的検査、血液凝固検査及び尿検査では異常は認められなかった。また、投与期間終了時の末梢血免疫フェノタイプ検査における総リンパ球（CD3⁺）、ヘルパーT細胞（CD3⁺/CD4⁺）、細胞傷害性/サブレッサーT細胞（CD3⁺/CD8⁺）、Bリンパ球（CD20⁺）及びNK細胞（CD3⁻/CD20⁻）の変化も認められなかった。

サロゲート ADC 3及び5 mg/kg においても、骨髄毒性（軽度の骨髄細胞減少及び軽度の再生性骨髄細胞増加）が認められ、更に雌雄全例において脾臓のリンパ濾胞性胚中心の消失が認められた。また、骨髄毒性に関連した追加所見として、末梢血における網状赤血球の減少及び赤血球分布幅の増加がみられた。平均リンパ球数は、3及び5 mg/kg で Day 8 に一過性の減少がみられ、5 mg/kg では投与期間終了時（Day 71）にも対照群と比較して低値を示した。5 mg/kg

では好中球及び単球の減少も認められた。更に、血液化学的検査における変化として血清グロブリンの低値及びアルブミン/グロブリン比の高値が3及び5 mg/kg の7/10例に認められた。グロブリン濃度低下は、末梢血 B 細胞分画の減少に関連した変化と考えられた。血液凝固検査及び尿検査では異常は認められなかった。末梢血免疫フェノタイプ検査では、総リンパ球 (CD3⁺)、ヘルパーT 細胞 (CD3⁺/CD4⁺)、細胞傷害性/サブレッサーT 細胞 (CD3⁺/CD8⁺) 及びNK 細胞 (CD3⁻/CD20⁻) の変化は認められなかったが、B リンパ球 (CD20⁺) は Day 2 において用量非依存的な減少が認められた (3及び5 mg/kg でのベースラインに対する平均値は、それぞれ49及び63%)。末梢血におけるこの変化は、3及び5 mg/kg の投与期間終了時剖検の雌雄全例で認められた脾臓のリンパ濾胞性胚中心の消失に一致した。

末梢血 B 細胞の減少及び脾臓のリンパ濾胞性胚中心の消失は、サロゲート ADC がカニクイザルの B 細胞に発現する CD79b との交差反応性を有することから、予想された薬理学的作用と考えられた。本試験ではポラツズマブ ベドチンの投与において上記の作用は認められなかったが、これはポラツズマブ ベドチンがカニクイザル B 細胞への結合活性を有さないためと考えられた。また、血液学的検査値に対する影響はポラツズマブ ベドチンよりもサロゲート ADC でわずかに強く、最も強い作用はサロゲート ADC の5 mg/kg を投与した動物で認められた。この違いの原因については明らかではないが、動物への投与に用いた被験物質の安定性、薬物動態及び組織分布がポラツズマブ ベドチンとサロゲート ADC で異なっていることによる可能性が考えられた。

ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の投与により認められた血液検査及び病理組織学的検査所見は休薬期間において持続せず、これらの変化の可逆性が確認された。

ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の両方で、総抗体の曝露量は用量に応じて増加し、概して曝露量に性差は認められなかった。雌雄合算の総抗体曝露量は、ポラツズマブ ベドチンがサロゲート ADC よりも1.2~1.4倍高かった。血漿中の遊離 MMAE 濃度はポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC 投与群で類似しており、雌雄とも用量に依存し、反復投与による蓄積は認められなかった。ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC を投与した動物の数例で ADA の産生がみられたが、全体として、いずれの用量においても ADA の存在が薬物の曝露量に影響することはなく、TK プロファイルは ADA 陽性例と陰性例で類似していた。

以上のとおり、ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC は、それぞれ5及び3 mg/kg までの用量を3週に1回、計4回投与したとき、良好な忍容性を示した。サロゲート ADC は5 mg/kg の用量で死亡例が認められ、忍容性がないことが明らかとなった。ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の投与により、骨髄毒性に関連した共通の血液学的検査値の変化がみられた。カニクイザル CD79b に対する結合活性を有するサロゲート ADC では、予想された抗原依存的な薬理作用 (末梢血の CD20陽性 B 細胞の減少及び脾臓のリンパ濾胞性胚中心の消失) が認められた。また、予想通り、ポラツズマブ ベドチンを投与した動物では、B 細胞に対する作用は認められなかった。ポラツズマブ ベドチン又はサロゲート ADC の投与により認められた所見のすべては、9週間の休薬により完全に回復した。したがって、カニクイザルにおけるポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の3週に1回投与による HNSTD は、それぞれ5 mg/kg (4回目投与後の総抗体の AUC₆₃₋₈₄ [雌雄合算]: 796 µg•day/mL, 遊離型 MMAE の AUC₀₋₃ [雌雄合算]: 0.253 ng•day/mL) 及び3 mg/kg (4回目投与後の総抗体の AUC₆₃₋₈₄ [雌雄合算]: 295 µg•day/mL, 遊離型 MMAE の AUC₀₋₃ [雌雄合算]: 0.178 ng•day/mL) と判断された。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

ポラツズマブ ベドチンは ADC であることから、ICH S6(R1) (平成24年3月23日 薬食審査発0323第1号 バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価) に準拠し、遺伝毒性試験は実施しなかった。本薬の潜在的な遺伝毒性については、MMAE を用いた一連の *in*

vitro 及び *in vivo* 試験で評価した。

2.6.6.4.1 MMAE の細菌を用いる復帰突然変異試験

(資料番号：4.2.3.3.1-1)

MMAE の遺伝子突然変異誘発性について、ネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535 及び TA1537 株、並びに大腸菌 WP2*uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験により評価した。試験はプレート法により、代謝活性化系（ラット肝 S9）の存在下又は非存在下の条件で実施した。最初に用量設定のための予備試験を実施し、本試験は 75～5000 µg/plate の濃度範囲で実施した。MMAE の溶媒はジメチルスルホキシド（DMSO）を用いた。

試験結果を表 2.6.7.8.1-1 に示した。

本試験において、濃度 5000 µg/plate まで復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。また、被験物質の析出や試験菌株に対する毒性もみられなかった。これらの結果から、MMAE の細菌に対する復帰突然変異誘発性は陰性と判断した。

2.6.6.4.2 MMAE のマウスリンフォーマ細胞を用いる突然変異試験

(資料番号：4.2.3.3.1-2)

MMAE の遺伝子突然変異誘発性について、マウスリンフォーマ細胞株 L5178 TK⁺ 株を用いたチミジンキナーゼ遺伝子の前進突然変異試験により評価した。試験は、代謝活性化系（ラット肝 S9）の存在下又は非存在下の条件で実施した。用量設定のための予備試験に引き続き、本試験を実施した。MMAE の溶媒は 0.01N 塩酸/0.9% 生理食塩液を用いた。

試験結果を表 2.6.7.8.1-2 に示した。

いずれの処置（S9 存在下又は非存在下、4 時間処置、並びに S9 非存在下、24 時間処置）においても、MMAE は、過剰な細胞毒性を示さない濃度範囲において、用量依存的、又は溶媒対照群と比較して明らかな変異細胞数の増加（10⁶ 細胞当たりの変異細胞数が 90 以上）を示さなかった。これらの結果から、MMAE のマウスリンフォーマ細胞に対する前進突然変異誘発性は陰性と判断した。

2.6.6.4.3 MMAE のラット小核試験

(資料番号：4.2.3.3.2-1)

Sprague-Dawley ラット（各群雄 5 又は 10 例）に MMAE を 0（溶媒）、0.01、0.1 又は 0.2 mg/kg の用量で単回投与し、投与後 24 又は 48 時間に各群 5 例を剖検し、骨髄を採取した。陽性対照群にはシクロフォスファミドを投与した。MMAE の溶媒は 0.01N 塩酸(3.9%)/0.9% 生理食塩液(96.1%)を用いた。先に実施した一般毒性試験において、MMAE の最大耐量は約 0.2 mg/kg と考えられたことから、本試験の最高用量を 0.2 mg/kg とした。また、毒性変化に性差は認められなかったことから、本試験は雄のみを用いて実施した。

試験結果を表 2.6.7.9.1-1 に示した。

MMAE の投与による一般状態の異常は認められなかった。0.1 及び 0.2 mg/kg で、小核を有する多染性赤血球の統計学的に有意な増加が認められた。0.2 mg/kg では正染性赤血球に対する多染性赤血球の比率の有意な低下が認められ、骨髄毒性が示唆された。

MMAE による小核誘発の機序について明らかにするため、本試験と同様の小核試験（各群雄 3 例、単回投与 24 時間後剖検）に特異的抗体を用いた動原体解析を組み入れて検討した。この試験における動原体陽性の小核発現率は、シクロフォスファミド（染色体の構造異常を誘発する陽性対照物質）で 16～28%、カルベンダジム（染色体の数的異常を誘発する陽性対照物質）

で68%, MMAE で60~76%であった。これらの結果から, MMAE 投与による小核誘発の機序は, 主に異数性誘発性に関連したものと考えられた。

以上の結果から, MMAE のラット骨髄に対する小核誘発性は陽性であり, その機序は, MMAE の異数性誘発作用によるものと考えられた。

2.6.6.5 がん原性試験

ポラツズマブ ベドチンは再発又は難治性の B 細胞性悪性腫瘍患者の治療を目的とした薬剤であることから, ICH S9 (平成22年6月4日 薬食審査発0604第1号 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, がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

ポラツズマブ ベドチンを用いた独立した生殖発生毒性試験は実施していないが, 本薬の胚・胎児発生に及ぼす影響については, MMAE のラット胚・胎児発生に関する試験において評価した。また, 本薬の雌雄生殖器に及ぼす影響については, ラット及びカニクイザルを用いた反復投与試験において評価した。ラットにおいてポラツズマブ ベドチンを週1回, 計4回投与したとき, 2 mg/kg 以上の用量で精巣への影響(精細管上皮変性及び精母細胞のアポトーシス増加)が認められた。一方, カニクイザルにおいてポラツズマブ ベドチン又はサロゲート ADC を3週に1回, 計4回投与したとき, 5 mg/kg までの用量で雌雄生殖器に対する影響は認められなかった。

なお, ICH S9に従い, 本薬の出生前及び出生後の発生並び母体の機能に関する試験は実施しなかった。

2.6.6.6.1 MMAE のラット胚・胎児発生に関する試験

(資料番号: 4.2.3.5.2-1)

妊娠雌ラット (Sprague-Dawley, 各群25例) に MMAE を0 (溶媒) 又は0.2 mg/kg の用量で妊娠6及び13日目に静脈内投与し, 妊娠21日目に帝王切開した。溶媒は0.01N 塩酸(3.9%)/0.9%生理食塩液(96.1%)を用いた。また, TK サテライト群として各群9例を設定し, 投与期間中の血漿中薬物濃度測定のための血液採取に供した。

試験結果を表2.6.7.11.1-1に示した。

試験期間中に母動物の死亡は認められなかった。MMAE 投与により, 膺からの赤色/黒色排泄物, 外貌の蒼白化, ケージトレイの赤色液を含む一般状態異常, 並びに体重, 体重増加量及び摂餌量の低値が認められた。妊娠20日目の血液学的検査では, 赤血球, ヘモグロビン及びヘマトクリットの低値が認められた。

帝王切開において妊娠子宮重量に対する影響は認められなかった。母動物の剖検所見は, 2例で認められた脾臓の大型化のみであった。病理組織学的検査において, 子宮の着床状態は正常であり, 妊娠に関連した膺粘膜の粘液分泌も正常であった。その他の所見として, 脾臓の髄外造血亢進(軽度~重度), 胸腺のリンパ球枯渇(軽度)及び胸骨の骨髓細胞数増加(軽度)が認められた。

子宮内胎児観察において死亡胎児は認められなかったが, 総胎児吸収(27.4%), 後期吸収胚(5.2%)及び生存胎児を有さない母動物数(4.2%)の有意な増加が認められた。胎児検査では, 外表異常(舌突出, 四肢回転異常, 腹壁破裂及び無顎症)が認められた。また, 軟組織及び骨格の形態異常も認められたが, 発生頻度が低かったことから, これらの変化は MMAE に関連したものではないと考えられた。

MMAE の血中濃度は, 妊娠6日目と比較して妊娠13日目では60%高かった。

以上の結果から, MMAE を0.2 mg/kg の用量で妊娠ラットに静脈内投与(妊娠6及び13日目)

したとき、胚・胎児毒性及び催奇形性を惹起することが明らかとなった。

2.6.6.7 局所刺激性試験

ポラツズマブ ベドチンの独立した局所刺激性試験は実施していないが、ポラツズマブ ベドチン、サロゲート ADC 及び MMAE の反復投与毒性試験において、注射部位の評価を実施した。いずれの被験物質においても、肉眼的及び病理組織学的評価で静脈内投与による刺激性を示唆する変化は認められず、局所忍容性は良好であった。なお、ラットへのポラツズマブ ベドチンの高用量投与で認められた投与部位を含む皮膚の変化 (2.6.6.3.2) は、MMAE の有糸分裂阻害作用に関連した変化と考えられ、ポラツズマブ ベドチンの組織刺激性を示唆するものではないと考えられた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 ポラツズマブ ベドチンのヒト組織交差反応性試験

(資料番号：4.2.3.7.7-1)

ポラツズマブ ベドチンのヒト正常組織に対する交差反応性を、各種組織の凍結切片を用いた免疫組織化学により検討した。2.5及び12.5 µg/mL の濃度のポラツズマブ ベドチンを各組織に適用し、引き続き、ビオチン化マウス抗 MMAE 二次抗体を適用した。その後、形成された免疫複合体を、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン及びジアミノベンチジンをを用いて可視化し、光学顕微鏡下での観察により評価した。

ポラツズマブ ベドチンによる特異的染色が、リンパ球、並びにリンパ節、脾臓、扁桃、胃及び結腸を含む消化管の腸関連リンパ組織 (GALT) の特に B 細胞領域の細胞質で認められた。また、膀胱、骨髄、乳房、卵管及び前立腺を含む他組織のいくつかの切片で、散発的なリンパ球の染色が認められた。その他、本薬の標的分子 (CD79b) に関連しないと考えられる特異的な染色が胎盤及び中枢神経系に認められた。胎盤の絨毛間質ではホフバウア細胞 (卵巣好酸性組織球) と考えられる伸長細胞の染色が両方の濃度でみられた。中枢神経系では、脊髄の白質、小脳、大脳皮質及び下垂体神経葉におけるグリア細胞の細胞質突起に染色が認められた (12.5 µg/mL のみ)。大脳皮質における染色は、12.5 µg/mL の3例中1例の標本で認められた弱い染色強度の非常にまれなグリア細胞の線維性染色のみであったことから、これは非特異的なバックグラウンド染色と考えられた。

2.6.6.8.2 光安全性に関する評価

ポラツズマブ ベドチンの構成成分である MMAE 及び vcMMAE は自然光の範囲内 (290～700 nm) の光を吸収しなかった¹⁾ ことから、ICH S10 (平成26年5月21日 薬食審査発0521第1号 医薬品の光安全性評価ガイドライン) に従い、本薬の光安全性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.3 ポラツズマブ ベドチンの製造副生成物の評価

ヒト化抗 CD79b 抗体への vcMMAE の化学的導入の際に生じる vcMMAE の結合型及び非結合型不純物、及びそれに続くポラツズマブ ベドチン製剤の製造中に生じる製造関連不純物、並びに分解物、溶媒、及びその他の溶出物などの製造関連不純物についての安全性リスク評価を実施しており、詳細は2.3.S.3.2 [ポラツズマブ ベドチン原薬] 及び2.3.P.5.5に記載している。

2.6.6.9 考察及び結論

ポラツズマブ ベドチンの非臨床安全性プロファイルを明らかにするための毒性試験プログラムを計画した。ポラツズマブ ベドチンはヒト CD79b に対してのみ交差反応性を示すため、カニクイザル CD79b に交差反応性を有するサロゲート ADC をカニクイザルの毒性試験に使用し、薬理作用である B 細胞枯渇に関連した毒性などの抗原依存的作用及び抗原非依存的作用

の両方を評価した。また、ポラツズマブ ベドチンのラット及びカニクイザルを用いた毒性試験において、抗原非依存的作用を評価した。更に、ラット及びカニクイザルを用いた MMAE の単回及び反復投与毒性試験も実施し、ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の全体的な毒性プロファイルに対する細胞毒性成分の寄与について評価した。

非臨床毒性試験プログラム及び第 I 相及び第 II 相臨床試験で得られた安全性/忍容性データから、ポラツズマブ ベドチンの再発又は難治性のびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) を含む進行がんを適応とした承認申請が可能と考えられた。以下にその根拠を記載する。

- 主要な試験であるカニクイザル 10 週間 (3 週に 1 回, 計 4 回) 投与試験において、投与期間終了時剖検を最終投与後 7 日 (Day 71) に実施したが、回復性評価のための休薬期間終了時剖検は最終投与後 9 週 (Day 128) に実施しており、休薬群の動物においては、概ね 3 カ月間にわたってポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の一定の曝露量が維持された (2.6.6.3.4 及び 2.6.7.7.3 参照)。このことから、本試験の投与期間は、進行がん患者の治療に用いる抗悪性腫瘍薬の製造販売承認申請のための反復投与毒性試験の投与期間として、3 カ月間を推奨する現行の ICH S9 の趣旨を満たしている。
- これらの動物における総抗体の曝露量は、第 I 相及び第 II 相臨床試験で確認された曝露量 (2.7.2.2.3) を上回っていた。カニクイザルにおいては、これらの曝露量において、サロゲート ADC の薬理作用である長期間の B 細胞枯渇が認められたが、MMAE によって生じる骨髄及び血液毒性は、ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の両方で認められた。
- 上記の毒性変化は、経時的あるいは投与サイクル数の増加により悪化することはなかった。また、これらの所見は臨床においてモニタリング可能、管理可能、かつ可逆的であり、MMAE を含有する ADC で予想されるものと一致しており、これまでの臨床試験で認められた毒性を予測するものであった。

全体として、ポラツズマブ ベドチンは、カニクイザルで 5 mg/kg、ラットで 6 mg/kg (STD₁₀ は 10 mg/kg) までの用量で良好な忍容性を示し、サロゲート ADC はカニクイザルで 3 mg/kg までの用量で良好な忍容性を示した。毒性所見は、ラット及びカニクイザルにおける MMAE 及びポラツズマブ ベドチン、並びにカニクイザルにおけるポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC でそれぞれ類似していたことから、これらの変化は主に MMAE に起因したものであり²⁾、標的抗原結合にほとんど依存していないことが示唆された。

2.6.6.9.1 抗原非依存的作用

1) 骨髄毒性

ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の投与に関連した主な所見として、ラット及びカニクイザルの両方で可逆的な骨髄毒性及び関連する末梢血細胞への影響が認められた。これらの変化は、MMAE を単回又は反復投与したラット及びカニクイザルで認められた所見と一致していた。したがって、骨髄毒性は、MMAE に関連した標的抗原非依存的な変化と考えられた。カニクイザルで認められたように、白血球パラメータの減少は感染症の素因となる可能性がある。ポラツズマブ ベドチンを投与した患者において、好中球減少、血小板減少及び貧血は、投与期間中に比較的好くみられる有害事象として特定されており (2.7.4.2.1.1)、非臨床試験成績から予想された血液毒性に一致し、臨床的にモニタリング可能かつ管理可能である³⁾。

2) リンパ器官の毒性

ポラツズマブ ベドチンを反復投与したラット及び MMAE を単回又は反復投与したラットにおいて、用量依存的かつ可逆的な胸腺に対する変化が認められた。MMAE を単回投与した

ラットでは、脾臓に対する変化も認められた。

MMAE を反復投与したカニクイザルでは、胸腺及び脾臓での類似した可逆的な毒性変化がみられ、直腸 GALT においても変化が認められた。リンパ器官の毒性は、病理組織学的にリンパ球の細胞密度低下を特徴とし、胸腺及び脾臓の器官重量減少を伴っており、胸腺では辺縁部のリンパ球減少も認められた。動物種を問わず、ポラツズマブ ベドチン及び MMAE の両方で発現し、曝露量に関連した可逆的な変化であったことから、これらのリンパ器官の毒性は MMAE に関連したものであることが示唆された。

3) 肝臓及びその他の器官の毒性

ポラツズマブ ベドチンを反復投与したラット及び MMAE を単回又は反復投与したラットにおいて肝毒性が認められ、予想された MMAE の作用と一致した。肝酵素の高値及び時折の総ビリルビンの高値は、肝壊死並びに肝細胞のアポトーシス及び有糸分裂増加を伴っており、ポラツズマブ ベドチンの投与では胆管上皮及び類洞細胞への影響も認められた。同様に、予想された MMAE による作用が、ポラツズマブ ベドチンを投与したラットの肺及び他の組織で認められた。肺の所見は肺泡マクロファージ浸潤を特徴とし、雄の最高用量 (10 mg/kg) では II 型肺泡上皮細胞の過形成及び肥大も認められた。皮膚及び付属器を含む複数の組織ではアポトーシス及び有糸分裂の軽微～軽度の増加が認められた。MMAE の薬理作用に関連したこれらの予想された毒性所見は、概して用量依存的、かつ軽微な変化であり、少数の例外を除いて可逆的であった。これらの変化はラットのみで発現し、被験物質間でばらつきがみられたが、動物種間の感受性及び/又は曝露量の差に起因していた可能性が考えられた。

4) 遺伝毒性

ポラツズマブ ベドチンの独立した遺伝毒性試験は実施していないが、MMAE についての一連の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験の結果から、本薬の潜在的な遺伝毒性リスクを評価した。MMAE は細菌を用いた復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ細胞を用いた遺伝子突然変異試験において陰性であり、遺伝子突然変異誘発性はないことが確認された。一方、ラット骨髄小核試験では、0.1 mg/kg 以上の用量で小核を有する多染性赤血球の有意な増加が認められた。小核誘発の機序を明らかにするため、特異的抗体を用いた動原体解析を実施した結果、MMAE の異数性誘発作用が確認された。MMAE は急速に分裂する細胞を標的とする微小管阻害剤であり、異数性誘発作用は予想された変化と考えられた。

5) 生殖発生毒性

ポラツズマブ ベドチンを用いた独立した生殖発生毒性試験は実施していないが、本薬の胚・胎児発生に及ぼす影響については、MMAE のラット胚・胎児発生に関する試験において評価した。MMAE の 0.2 mg/kg を妊娠 6 及び 13 日目に静脈内投与したとき、総胎児吸収、後期吸収胚及び生存胎児を有さない母動物数の有意な増加が認められた。また胎児検査では、外表異常 (舌突出、四肢回転異常、腹壁破裂及び無顎症) が認められたことから、MMAE は胚・胎児毒性及び催奇形性を惹起すると考えられた。催奇形性及び胚・胎児毒性の所見は、急速に分裂する細胞を標的とする微小管阻害剤としての MMAE の作用機序に基づく所見として一貫しており、ポラツズマブ ベドチンを投与したヒトにおいても外挿性のある変化と考えられた。

雌雄受胎能については、ポラツズマブ ベドチン及び MMAE のラット反復投与試験の結果から、ポラツズマブ ベドチンが雄の生殖機能及び受精能に影響を及ぼす可能性が示唆された。具体的には、用量に依存した非可逆的な精巣の精細管変性が認められ、この変化に伴い、精巣上体では異常な管腔内容物が認められた。一方、カニクイザルでは、ポラツズマブ ベドチン又はサロゲート ADC を 3 週に 1 回、計 4 回投与したとき、5 mg/kg までの用量で雌雄生殖器に対する影響は認められなかった。

2.6.6.9.2 抗原依存的作用

1) B 細胞枯渇

カニクイザルへのサロゲート ADC の投与により、予想された薬理作用である末梢血 B リンパ球の減少及び病理学的組織学的な脾臓のリンパ濾胞性胚中心の消失が認められた。また、予想された通り、これらの作用は、ポラツズマブ ベドチンを投与したカニクイザルでは認められなかった。なぜなら、ポラツズマブ ベドチンはカニクイザル CD79b に結合せず、薬理学的活性を示さないためである。

CD79b は B 細胞受容体複合体のシグナル伝達における構成要素の一つであることから、抗体の結合がシグナル伝達の引き金となり、サイトカインの放出を誘発する可能性がある^{4) - 6)}。しかし、*in vitro* 試験 (2.6.2.2.1) 及び *in vivo* 試験いずれにおいても、ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のサイトカイン放出症候群との関連性を示唆する変化は認められなかった。*In vitro* サイトカイン試験のヒトでの予測性は限定的であるものの、臨床においてサイトカイン放出に関連した有害事象はこれまでに認められていない (2.7.4.2)。

2) 組織交差反応性

正常なヒト組織において、ポラツズマブ ベドチンによる特異的染色は主がリンパ球（特に B 細胞領域）で認められ、B 細胞上の CD79b の既知の発現パターンと一致していた⁷⁾。

2.6.6.9.3 薬物乱用に関する評価

ポラツズマブ ベドチンによる薬物乱用傾向のリスクについて、エビデンスの重み付け (weight of evidence : WOE) の手法により評価した。放射性標識した MMAE 及びポラツズマブ ベドチンのラットを用いた吸収、分布、代謝及び排泄試験において、細胞毒性成分及び抗体成分の脳への移行はほとんど認められなかった (2.6.4.4.1)。また、ヒト凍結組織切片を用いたポラツズマブ ベドチンの組織交差反応性試験では、ヒトにおける B 細胞分布の既知のパターンと一致した特異的結合が確認された。更に、MMAE 及び/又はポラツズマブ ベドチンの毒性試験の投与期間中及び休薬期間中に、動物の行動及び活動性に関連した異常所見は認められなかった。臨床試験においては、治療用量のポラツズマブ ベドチンによる多幸感、幻覚、鎮静、又は刺激などの薬物乱用に関連する有害事象は確認されていない (2.7.4.5.6)。したがって、WOE 評価に基づき、ポラツズマブ ベドチンによる中枢神経系作用はほとんどないと考えられ、製造販売承認申請のための薬物乱用に関する追加の非臨床試験は必要ないと判断した。

2.6.6.9.4 結論

ポラツズマブ ベドチンは、カニクイザルで 5 mg/kg (HNSTD)、ラットで 6 mg/kg (STD₁₀ は 10 mg/kg) までの用量で良好な忍容性を示し、サロゲート ADC は、カニクイザルで 3 mg/kg (HNSTD) までの用量で良好な忍容性を示した。ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC の両方において、MMAE に関連した骨髄毒性が認められたが、サロゲート ADC では更に、CD79b を標的とする本薬の薬理作用と一致する可逆的な末梢血 B 細胞の減少及び脾臓のリンパ濾胞性胚中心の消失が認められた。

以上の毒性試験プログラムで得られた安全性に関する成績から、申請する臨床適応症でのポラツズマブ ベドチンの製造販売承認申請が支持されると考えられる。

2.6.6.10 図表

本文中に挿入した。

2.6.6.11 参考文献

- 1) Henry S. SGD-1006, SGD-1427 and SGD-1010 photosafety evaluation. Seattle Genetics 社報告書, 2018.
- 2) Saber H, Leighton JK. An FDA oncology analysis of antibody-drug conjugates. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015;71:444-52.
- 3) Palanca-Wessels MCA, Czuczman M, Salles G, Assouline S, Sehn LH, Flinn I, et al. Safety and activity of the anti-CD79B antibody-drug conjugate polatuzumab vedotin in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2015;16:704-15.
- 4) Burdin N, Van Kooten C, Galibert L, Abrams JS, Wijdenes J, Banchereau J, et al. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol* 1995;154:2533-44.
- 5) Krzysiek R, Lefèvre EA, Zou W, Foussat A, Bernard J, Portier A, et al. Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and MIP-1 β chemokine production in human B cells. *J Immunol* 1999;162:4455-63.
- 6) Lund FE, Garvy BA, Randall TD, Harris DP. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. *Curr Dir Autoimmun* 2005;8:25-54.
- 7) Mason DY, Cordell JL, Tse AGD, van Dongen JJM, van Noesel CJM, Micklem K, et al. The IgM-associated protein mb-1 as a marker of normal and neoplastic B cells. *J Immunol* 1991;147:2474-82.

目次

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.....	9
2.6.7.5	単回投与毒性試験.....	10
2.6.7.6	反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験.....	11
2.6.7.7	反復投与毒性試験：重要な試験.....	12
2.6.7.7.1	反復投与毒性試験：重要な試験（要約）	12
2.6.7.7.2	ポラツズマブ ベドチンのラット 4 週間（週 1 回，計 4 回）投与試験（6 週間回復性試験）	14
2.6.7.7.3	ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル 10 週間（3 週に 1 回，計 4 回）投与試験（9 週間回復性試験）	23
2.6.7.8	<i>In Vitro</i> 遺伝毒性試験	29
2.6.7.8.1	MMAE の細菌を用いる復帰突然変異試験.....	29
2.6.7.8.2	MMAE のマウスリンフォーマ細胞株を用いる突然変異試験.....	32
2.6.7.9	<i>In Vivo</i> 遺伝毒性試験.....	35
2.6.7.9.1	MMAE のラット小核試験.....	35
2.6.7.10	がん原性試験.....	36
2.6.7.11	生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験.....	36
2.6.7.11.1	MMAE のラット胚・胎児発生に関する試験.....	36
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.....	36
2.6.7.13	生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験.....	36
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.....	37
2.6.7.15	新生児を用いた試験.....	37
2.6.7.16	局所刺激性試験.....	37
2.6.7.17	その他の毒性試験.....	37
2.6.7.17.1	ポラツズマブ ベドチンのヒト組織交差反応性試験.....	37

表一覧

表 2.6.7.1-1	毒性試験一覧表	4
表 2.6.7.2-1	トキシコキネティクス試験の一覧表	6
表 2.6.7.3-1	トキシコキネティクス成績の一覧	7
表 2.6.7.4-1	毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧	9
表 2.6.7.5-1	単回投与毒性試験	10

表 2.6.7.6-1	反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験	11
表 2.6.7.7-1	反復投与毒性試験：重要な試験（要約）	12
表 2.6.7.7.2-1	ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）	14
表 2.6.7.7.3-1	ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル10週間（3週に1回，計4回）投与試験（9週間回復性試験）	23
表 2.6.7.8.1-1	MMAE の細菌を用いる復帰突然変異試験	29
表 2.6.7.8.2-1	MMAE のマウスリンフォーマ細胞株を用いる突然変異試験	32
表 2.6.7.9.1-1	MMAE のラット小核試験	35
表 2.6.7.11.1-1	MMAE のラット胚・胎児発生に関する試験	36
表 2.6.7.17.1-1	ポラツズマブ ベドチンのヒト組織交差反応性試験	37

略語一覧

略語	英名	和名
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADC	antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
CFU	colony forming unit	コロニー形成単位
C _{max}	maximum observed concentration	最高血清中（血漿中）濃度
EU	endotoxin unit	エンドトキシン単位
GD	gestational day	妊娠日
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
HCL	hydrochloric acid	塩酸
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャンネル遺伝子
HNSTD	highest non-severely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
IV	intravenous	静脈内
LTR	less than reportable	報告可能な値未満
MCA	methylcholanthrene	メチルコラントレン
MMAE	monomethyl auristatin E	モノメチルアウリスタチンE
MMS	methyl methanesulfonate	メチルメタンスルホン酸
NA	not applicable	該当なし
NCE	normochromatic erythrocyte	正染性赤血球
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PCE	polychromatic erythrocyte	多染性赤血球
QW	weekly	週1回
Q3W	once every 3 weeks	3週に1回
Q7D	once every 7 days	7日間に1回
SD	standard deviation	標準偏差
STD ₁₀	severely toxic dose in 10% of the animals	供試動物の10%に重篤な毒性が発現する投与量
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス

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: Polatuzumab vedotin, Surrogate ADC, MMAE

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Day of Dosing	Test Article	Dose (mg/kg)	Testing Facility	Location in CTD (GLP Compliance) <評価/参考>
Single-Dose Toxicity	Sprague Dawley Rat	IV	1	MMAE	0, 0.206	Genentech, Inc.	4.2.3.1-1 (Non-GLP) <参考>
	Sprague Dawley Rat	IV	1	MMAE	0, 0.516	Genentech, Inc.	4.2.3.1-2 (Non-GLP) <参考>
	Cynomolgus Monkey	IV	1	MMAE	0.116	██████████	4.2.3.1-3 (Non-GLP) <参考>
	Cynomolgus Monkey	IV	1	MMAE	0, 0.030, 0.063	██████████	4.2.3.1-4 (GLP) <評価>
Repeat-Dose Toxicity	Sprague Dawley Rat	IV	QW×4 doses: 1, 8, 15, 22	MMAE	0, 0.0097, 0.097, 0.194	██████████	4.2.3.2-1 (GLP) <参考>
	Sprague Dawley Rat	IV	QW×4 doses: 1, 8, 15, 22	Polatuzumab vedotin	0, 2, 6, 10	██████████	4.2.3.2-2 (GLP) <評価>
	Cynomolgus Monkey	IV	Q3W×2 doses: 1, 22	MMAE	0.058	██████████	4.2.3.1-3 (Non-GLP) <参考>
	Cynomolgus Monkey	IV	Q3W×4 doses: 1, 22, 43, 64	MMAE	0, 0.058	██████████	4.2.3.2-3 (GLP) <参考>
	Cynomolgus Monkey	IV	Q3W×4 doses: 1, 22, 43, 64	Polatuzumab vedotin/ Surrogate ADC	0, 1, 3, 5/ 3, 5	██████████	4.2.3.2-4 (GLP) <評価>

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: Polatuzumab vedotin, Surrogate ADC, MMAE

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Test Article	Dose (mg/kg)	GLP Compliance	Location in CTD
Single-Dose Toxicity	Cynomolgus Monkey	IV	MMAE	0, 0.030, 0.063	GLP	4.2.3.1-4
Repeat-Dose Toxicity	Sprague-Dawley Rat	IV	MMAE	0, 0.0097, 0.097, 0.194	GLP	4.2.3.2-1
	Sprague-Dawley Rat	IV	Polatuzumab vedotin	0, 2, 6, 10	GLP	4.2.3.2-2
	Cynomolgus Monkey	IV	Polatuzumab vedotin/ Surrogate ADC	0, 1, 3, 5/ 3, 5	GLP	4.2.3.2-4
Reproductive and Developmental Toxicity	Sprague-Dawley Rat	IV	MMAE	0, 0.2	GLP	4.2.3.5.2-1

ADC = antibody-drug conjugate; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; MMAE = monomethyl auristatin E.

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成績の一覧

Test Article: Polatuzumab vedotin

Daily Dose (mg/kg)	Rat ^a				Cynomolgus Monkey ^b	
	Total antibody AUC ^c ($\mu\text{g}\cdot\text{day}/\text{mL}$)		MMAE AUC ^d ($\text{ng}\cdot\text{day}/\text{mL}$)		Total Antibody AUC ^e ($\mu\text{g}\cdot\text{day}/\text{mL}$)	MMAE AUC ^f ($\text{ng}\cdot\text{day}/\text{mL}$)
	Male	Female	Male	Female	M/F combined	M/F combined
1	NA	NA	NA	NA	138 [1st dose] 138 [4th dose]	NA
2	132 [1st dose] 177 [4th dose]	97.8 [1st dose] 122 [4th dose]	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA	440 [1st dose] 485 [4th dose]	0.171 [1st dose] 0.181 [4th dose]
6	534 [1st dose] 586 [4th dose]	293 [1st dose] 500 [4th dose]	0.498 [1st dose] 0.703 [4th dose]	0.382 [1st dose] 0.450 [4th dose]	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA	744 [1st dose] 796 [4th dose]	0.233 [1st dose] 0.253 [4th dose]
10	658 [1st dose] 923 [4th dose]	594 [1st dose] 923 [4th dose]	0.976 [1st dose] 1.33 [4th dose]	0.717 [1st dose] 0.979 [4th dose]	NA	NA

NA = Not applicable.

a: Rat 4-week study (4.2.3.2-2), b: Monkey 10-week study (4.2.3.2-4), c: AUC from TK Day 0 to TK Day 7 [1st dose] and AUC from TK Day 21 to TK Day 28 [4th dose], d: AUC from TK Day 0 to TK Day 4 [1st dose] and AUC from TK Day 21 to TK Day 25 [4th dose], e: AUC from TK Day 0 to TK Day 21 [1st dose] and AUC from TK Day 63 to TK Day 84 [4th dose], f: AUC from time zero to 3 days post dose [1st or 4th dose].

Test Article: Surrogate ADC

Daily Dose (mg/kg)	Cynomolgus Monkey ^a	
	Total Antibody AUC ^b ($\mu\text{g}\cdot\text{day}/\text{mL}$) (M/F combined)	MMAE AUC ^c ($\text{ng}\cdot\text{day}/\text{mL}$) (M/F combined)
3	216 [1st dose] 295 [4th dose]	0.204 [1st dose] 0.178 [4th dose]
5	404 [1st dose] 523 [4th dose]	0.291 [1st dose] 0.263 [4th dose]

a: Monkey 10-week study (4.2.3.2-4), b: AUC from TK Day 0 to TK Day 21 [1st dose] and AUC from TK Day 63 to TK Day 84 [4th dose], c: AUC from time zero to 3 days post dose [1st or 4th dose]

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス成績の一覧 (続)

Test Article: MMAE

Daily Dose (mg/kg)	Rat AUC ^a		Pregnant Rat AUC ^b	Cynomolgus Monkey AUC ^c
	Male	Female		M/F combined
0.0097	2.61 [1st dose]	2.57 [1st dose]		
	3.98 [4th dose]	3.07 [4th dose]		
0.030				1170
0.063				2460
0.097	25.7 [1st dose]	28.6 [1st dose]		
	52.4 [4th dose]	28.6 [4th dose]		
0.194	49.4 [1st dose]	91.0 [1st dose]		
	71.0 [4th dose]	49.2 [4th dose]		
0.2			16.2 [1st dose: GD 6]	
			25.6 [2nd dose: GD 13]	

GD: Gestational Day

a: Rat 4-week study (4.2.3.2-1), AUC_{0-24h} (ng•hr/mL), b: Rat embryo-fetal study (4.2.3.5.2-1), AUC_{0-1d} (ng•day/mL), c: Monkey single-dose study (4.2.3.1-4), AUC_{last} (ng•min/mL)

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: MMAE, Polatuzumab vedotin, Surrogate ADC

Test Article	Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities		Type of Study	Location in CTD
MMAE	NA	NA	NA	NA	Single-Dose Toxicity	4.2.3.1-2
			NA	NA	Single-Dose Toxicity	4.2.3.1-4
			NA	NA	Genotoxicity: <i>In vitro</i>	4.2.3.3.1-2
			NA	NA	Genotoxicity: <i>In vivo</i>	4.2.3.3.2-1
			NA	NA	Reproductive and Development Toxicity	4.2.3.5.2-1
			NA	NA	hERG assay	4.2.1.3-1
			NA	NA	Single-Dose Toxicity and Repeat-Dose Toxicity	4.2.3.1-3
					Repeat-Dose Toxicity	4.2.3.2-1
					Repeat-Dose Toxicity	4.2.3.2-3
				NA	NA	Genotoxicity: <i>In vitro</i>
Polatuzumab vedotin					Repeat-Dose Toxicity	4.2.3.2-2
					Repeat-Dose Toxicity	4.2.3.2-4
					Tissue Cross-Reactivity	4.2.3.7.7-1
Surrogate ADC					Repeat-Dose Toxicity	4.2.3.2-4

ADC = antibody-drug conjugate; ; hERG = human ether-à-go-go related gene; ; MMAE = monomethyl auristatin E; NA = not applicable.

2.6.7.5 単回投与毒性試験

表 2.6.7.5-1 単回投与毒性試験

Test Article: MMAE

Species/Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	No./Sex/Group	Maximum Tolerated Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
Sprague-Dawley Rat	IV	0 ^a , 0.206	6F	0.206	<ul style="list-style-type: none"> Bone marrow toxicity Lymphoid organ toxicity 	4.2.3.1-1 [REDACTED]-0202-1345] (Non-GLP)
Sprague-Dawley Rat	IV	0 ^a , 0.516	6F	ND	<ul style="list-style-type: none"> Moribundity in all animals on Study Day 3. Bone marrow toxicity Liver toxicity Lymphoid organ toxicity 	4.2.3.1-2 [REDACTED]-0315-1345] (Non-GLP)
Cynomolgus Monkey	IV	0.116 ^b	1M/1F	ND	<ul style="list-style-type: none"> Mortality on Day 28 in 1 male due to localized opportunistic infection in the lung Bone marrow toxicity, reversible in 1 female 	4.2.3.1-3 [REDACTED].163.19] (Non-GLP)
Cynomolgus Monkey	IV	0 ^c , 0.030, 0.063	5M/5F	0.030	<ul style="list-style-type: none"> Mortality on Study Day 9 in 1 male given 0.063 mg/kg; attributed to bone marrow toxicity. Bone marrow toxicity, reversible Lymphoid organ toxicity, reversible 	4.2.3.1-4 [REDACTED]-0609] (GLP)

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; MMAE = monomethyl auristatin E; ND = not determined.

a: Vehicle; Phosphate Buffered Saline, b: Vehicle; 0.01 N hydrochloric acid/0.9% sodium chloride for injection, c: Vehicle; 20 mM histidine acetate, 240 mM (9.08%) trehalose dihydrate, 0.02% polysorbate 20, pH 5.5

Notes: For all studies, bone marrow toxicity was characterized by contributions of decreased peripheral platelet, red and/or white blood cell parameters, and decreased bone marrow cellularity.

In rats, liver toxicity was characterized by elevated peripheral liver indices and hepatocellular apoptosis, necrosis, and increased mitosis.

Lymphoid organ toxicity was characterized by decreased lymphoid cellularity in the thymus and/or spleen.

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: MMAE

Species/ Strain	Method of Administration	Day of Dosing	Dose (mg/kg)	No./Sex/Group	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
Sprague Dawley Rat	IV	QW × 4 doses: 1, 8, 15, 22	0 ^a , 0.0097, 0.097, 0.194	Toxicity (Control, Mid, High): 15M/15F Toxicity (Low): 10M/10F TK: 10M/10F	<ul style="list-style-type: none"> Bone marrow toxicity, dose-dependent and reversible Testes toxicity, dose-dependent and non-reversible NOAEL = 0.097 mg/kg 	4.2.3.2-1 [7646-118] (GLP)
Cynomolgus Monkey	IV	Q3W × 2 doses: 1, 22	0.058 ^b	1M/1F	<ul style="list-style-type: none"> Bone marrow toxicity, reversible 	4.2.3.1-3 [██████.163.19] (Non-GLP)
Cynomolgus Monkey	IV	Q3W × 4 doses: 1, 22, 43, 64	0 ^c , 0.058	Control: 6M/6F Toxicity: 5M/5F	<ul style="list-style-type: none"> Bone marrow toxicity, reversible Lymphoid organ toxicity, reversible 	4.2.3.2-3 [██████.163.16] (GLP)

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; MMAE = monomethyl auristatin E; NOAEL = no observed adverse effect level; Q3W = once every 3 weeks; QW = weekly; TK = toxicokinetic.

a: Vehicle: 3.9% 0.01 N hydrochloric acid/96.1% 0.9% sodium chloride for injection, b: Vehicle; 0.01 N hydrochloric acid/0.9% sodium chloride for injection,

c: Vehicle; 2mL 0.01N hydrochloric acid and 198mL water for injection/0.9% sodium chloride for injection

Notes: For all studies, bone marrow toxicity was characterized by contributions of decreased peripheral platelet, red and/or white blood cell parameters, and decreased bone marrow cellularity.

In rats, liver toxicity was characterized by elevated peripheral liver indices and hepatocellular necrosis.

Lymphoid organ toxicity was characterized by decreased lymphoid cellularity in the thymus and/or spleen.

In rats, testicular toxicity was characterized by seminiferous tubule degeneration and decreased spermatogenesis.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 反復投与毒性試験：重要な試験（要約）

表 2.6.7.7-1 反復投与毒性試験：重要な試験（要約）

Test Article: Polatuzumab vedotin, Surrogate ADC

Species/ Strain	Method of Administration	Day of Dosing	Test Article	Dose (mg/kg)	No./Sex/ Group	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
Sprague Dawley Rat	IV	QW × 4 doses: 1, 8, 15, 22	Polatuzumab vedotin	0, 2, 6, 10	Toxicity: 15M/15F TK (Control): 3M/3F TK: 9M/9F	<ul style="list-style-type: none"> • Moribundity in 1 male given 10 mg/kg on Study Day 31 due to bone marrow toxicity • Bone marrow toxicity, dose-dependent and reversible • Liver toxicity, dose-dependent and reversible • Lymphoid organ toxicity, dose-dependent and reversible • Testes toxicity, dose-dependent and non-reversible • STD₁₀ was 10 mg/kg 	4.2.3.2-2 [■]-0898 (GLP)

表 2.6.7.7-1 反復投与毒性試験：重要な試験（要約）（続）

Species/ Strain	Method of Administration	Day of Dosing	Test Article	Dose (mg/kg)	No./Sex/ Group	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
Cynomolgus Monkey	IV	Q3W × 4 doses: 1, 22, 43, 64	Polatuzumab vedotin/ Surrogate ADC	0, 1, 3, 5/ 3, 5	5M/5F	Polatuzumab vedotin: <ul style="list-style-type: none"> • Bone marrow toxicity, dose-dependent and reversible • HNSTD = 5 mg/kg Surrogate ADC: <ul style="list-style-type: none"> • Moribundity in 1 male on Study Day 53 due to bone marrow toxicity with systemic opportunistic infection • Bone marrow toxicity, dose-dependent and reversible • Pharmacologically-mediated B-cell depletion in periphery and lymphoid tissue • HNSTD = 3 mg/kg 	4.2.3.2-4 [■-0044] (GLP)

ADC = antibody-drug conjugate; GLP = Good Laboratory Practice; HNSTD = highest non-severely toxic dose; IV = intravenous; Q3W = once every 3 weeks; QW = weekly; STD₁₀ = severely toxic dose in 10% of the animals; TK = toxicokinetic.

Notes: For all studies, bone marrow toxicity was characterized by contributions of decreased peripheral platelet, red and/or white blood cell parameters, and decreased bone marrow cellularity.

In rats, liver toxicity was characterized by elevated peripheral liver indices and hepatocellular apoptosis, necrosis, and increased mitosis.

For all studies, lymphoid organ toxicity was characterized by decreased lymphoid cellularity in the thymus and/or spleen.

In rats, testicular toxicity was characterized by seminiferous tubule degeneration and decreased spermatogenesis.

2.6.7.7.2 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）

表 2.6.7.7.2-1 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）

Test Article: Polatuzumab vedotin

Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	Duration of Dosing: Once weekly for four doses (26-day dosing phase)				Location in CTD: 4.2.3.2-2			
Initial Age: 11-13 weeks	Duration of Post-Dose: 6 weeks				Report No.: ■-0898			
Date of First Dose: ■■■■ 20■■■ ^a	Method of Administration: Intravenous injection into tail vein				GLP Compliance: GLP			
Special Features: Functional observation battery and motor activity assessments	Vehicle/Formulation: 20 mM histidine acetate, pH 5.5; 240 mM sucrose; 0.02% polysorbate 20							
STD₁₀: 10 mg/kg								
Dose (mg/kg):	0 (Control)		2		6		10	
No. of Toxicity Animals:	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
No. of Toxicokinetic Animals:	M: 3	F: 3	M: 9	F: 9	M: 9	F: 9	M: 9	F: 9
Toxicokinetics: Total Antibody								
AUC (μg•day/mL)								
1st dose (Day 1): AUC ₀₋₇	NA	NA	132	97.8	534	293	658	594
4th dose (Day 22): AUC ₂₁₋₂₈	NA	NA	177	122	586	500	923	923
4th dose (Day 22): AUC _{21-last}	NA	NA	418	257	1050	945	1690	1510
C _{max} (μg/mL)								
1st dose (Day 1)	NA	NA	67.8	58.1	260	216	406	298
4th dose (Day 22)	NA	NA	81.3	80.6	258	174	392	393
Toxicokinetics: MMAE								
AUC (ng•day/mL)								
1st dose (Day 1): AUC ₀₋₄	NA	NA	NA ^b	NA ^b	0.498	0.382	0.976	0.717
4th dose (Day 22): AUC ₂₁₋₂₅	NA	NA	NA ^b	NA ^b	0.703	0.450	1.33	0.979
C _{max} (ng/mL)								
1st dose (Day 1)	NA	NA	NA ^b	NA ^b	0.169	0.136	0.367	0.253
4th dose (Day 22)	NA	NA	NA ^b	NA ^b	0.216	0.157	0.457	0.323

表 2.6.7.7.2-1 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin

Dose (mg/kg):	0 (Control)		2		6		10			
	No. of Toxicity Animals:		M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
<u>Noteworthy Findings – Dosing Phase</u>										
Died or Sacrificed Moribund: Toxicity Animals	0	0	1 ^c	0	0	0	0	1 ^c	0	
Body Weight (%) ^d										
Day 26	452 g	—	1.1	—	-2.9	—	-4.9	—		
Body Weight Change (%) ^d										
Day 1 – 26	39 g	—	20.5	—	-30.8	—	-53.8*	—		
Food Consumption (%) ^d										
Day 24 – 25	32 g	—	3.1	—	0.0	—	-6.3	—		
Clinical Observations										
Pale, Eyes	0	—	0	—	0	—	4	—		
Pale, Entire Body	0	—	0	—	0	—	4	—		
Sore/Scab (at least one location)	0	—	0	—	0	—	2	—		
Functional Observation Battery										
Locomotor Activity – Arena, Low	1	—	0	—	1	—	4	—		
Forelimb Grip Strength 1 (%) ^d	2054 g	—	-1.3	—	1.7	—	7.5	—		
Forelimb Grip Strength 2 (%) ^d	1952 g	—	4.6	—	1.5	—	14.1	—		
Motor Activity (%) ^d										
0 to 40 minutes	2008	—	-31.3*	—	-23.1*	—	-32.0*	—		

表 2.6.7.7.2-1 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin

Dose (mg/kg):	0 (Control)		2		6		10			
	No. of Toxicity Animals:		M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
<u>Noteworthy Findings – Dosing Phase (cont'd)</u>										
Hematology (%) ^d – Day 5										
Neutrophil Count (×10 ³ /μL)	1.80	1.16	-14.4	-12.1	-31.1*	-21.6	-34.4*	-34.5*		
Hematology (%) ^d – Day 26										
Red Blood Cell Count (×10 ⁶ /μL)	8.90	8.34	-4.6*	-2.4	-17.6*	-11.8*	-42.7*	-24.0*		
Hematocrit (%)	50.3	49.3	-4.0*	-0.4	-12.3*	-8.3*	-37.0*	-17.8*		
Hemoglobin (g/dL)	16.0	15.2	-3.1*	0.0	-10.6*	-8.6*	-35.0*	-17.1*		
Reticulocyte Count (×10 ³ /μL)	190.9	192.8	-5.0	-6.0	-38.4*	-48.9*	-69.0*	-49.6*		
Mean Corpuscular Volume (fL)	56.5	59.2	0.9	1.9	6.7*	3.7*	9.6*	8.3*		
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	18.0	18.2	1.1	2.7	8.3*	3.8*	12.8*	9.9*		
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (g/dL)	31.9	—	0.3	—	1.6*	—	3.1*	—		
Anisocytosis	—	—	—	—	1++	—	8++, 4+++	10++		
Poikilocytosis	—	—	—	—	—	—	7++, 1+++	—		
Platelet Count (×10 ³ /μL)	1044	992	-3.5	5.8	-16.5*	0.4	-26.9*	-25.9*		
Mean Platelet Volume (fL)	9.5	—	-2.1	—	2.1*	—	12.6*	—		
White Blood Cell Count (×10 ³ /μL)	8.64	6.55	-4.4	-13.0	-33.1*	-12.5	-42.5*	-31.1*		
Lymphocyte Count (×10 ³ /μL)	6.73	5.25	-4.3	-12.4	-36.6*	-12.6	-44.6*	-33.3*		
Neutrophil Count (×10 ³ /μL)	1.46	1.01	-4.8	-17.8	-11.6	-8.9	-28.1	-14.9		
Monocyte Count (×10 ³ /μL)	0.24	0.14	-16.7	-7.1	-50.0*	-7.1	-70.8*	-42.9		
Eosinophil Count (×10 ³ /μL)	0.10	0.09	-10.0	0.0	-90.0*	-66.7*	-80.0*	-88.9*		
Basophil Count (×10 ³ /μL)	0.03	—	0.0	—	-33.3*	—	-66.7*	—		
Activated Partial Thromboplastin Time (seconds)	19.5	—	-1.0	—	-10.8*	—	-21.0*	—		

表 2.6.7.7.2-1 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin

Dose (mg/kg):	0 (Control)		2		6		10			
	No. of Toxicity Animals:		M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
<u>Noteworthy Findings – Dosing Phase (cont'd)</u>										
Serum Chemistry (%) ^d – Day 26										
Aspartate Aminotransferase (U/L)	109	116	-0.9	-12.9	64.2*	114.7*	172.5*	300.9*		
Alanine Aminotransferase (U/L)	36	43	0.0	-37.2	108.3*	107.0	186.1*	325.6*		
Alkaline Phosphatase (U/L)	107	52	-5.6	9.6	18.7	17.3	45.8*	38.5		
Gamma Glutamyltransferase (U/L)	4	3 ^e	0.0	0.0 ^e	25.0	0.0 ^e	200.0*	66.7 ^e		
Total Bilirubin (mg/dL)	0.1	0.1	0.0	0.0	200.0*	100.0	700.0*	200.0*		
Creatinine (mg/dL)	0.7	—	0.0	—	0.0	—	0.0*	—		
Total Protein (g/dL)	7.1	7.8	-2.8	-3.8	-4.2*	-2.6	-5.6*	-6.4		
Albumin (g/dL)	4.3	5.0	-2.3	-2.0	-4.7*	-6.0	-9.3*	-10.0*		
Cholesterol (mg/dL)	58	96	15.5	-4.2	44.8*	12.5	106.9*	35.4*		
Organ Weights (%) ^f										
No. Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10		
Thymus (g)	0.3225	0.3110	-12.2	14.2	-43.8*	-54.2*	-76.7*	-66.0*		
Testis (g)	3.5795	NA	-16.9*	NA	-32.6*	NA	-46.9*	NA		
Epididymis (g)	1.4394	NA	-1.9	NA	10.8	NA	24.7*	NA		
Gross Pathology										
No. Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10		
Thymus, Small	0	0	0	0	2	3	9	5		
Testis, Small	0	NA	1	NA	2	NA	8	NA		
Testis, Soft	0	NA	4	NA	10	NA	10	NA		
Epididymis, Large	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA		
Histopathology										
No. Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10		
Marrow, Femur										
Cellularity, Decreased	—	—	—	—	1+, 4++, 5+++	3+	10++++	7+, 1++, 2+++		
Marrow, Sternum										
Cellularity, Decreased	—	—	—	—	5+, 3++, 1+++	3+, 1++	1+++, 9++++	4+, 3++, 2+++		

表 2.6.7.7.2-1 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin

Dose (mg/kg):	0 (Control)		2		6		10			
	No. of Toxicity Animals:		M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
<u>Noteworthy Findings – Dosing Phase (cont'd)</u>										
Histopathology (cont'd)										
Mandibular Lymph Node										
	Mitoses, Increased, Medulla/Paracortex	—	—	3+	2+	7+	9+	9+	8+	
Pancreas										
	Apoptosis/Mitoses, Increased, Acinar Cells	3+	2+	2+	1+	5+, 1++	4+	4+, 2++	2+, 2++	
Eye										
	Mitoses, Increased, Cornea	—	—	—	—	2+	1+	4+	5+	
Heart										
	Apoptosis/Mitoses, Atrium	—	—	—	—	—	—	4+	2+	
Thymus										
	Cellularity, Decreased, Cortex	—	—	—	—	7+, 2++	4+, 4++, 2+++	2++, 1+++, 7++++	1+, 2++, 1+++, 6++++	
	Apoptosis/Mitoses, Increased	—	—	—	—	5+, 5++	5+, 5++	1+, 6++, 3+++	8++, 2+++	
Duodenum										
	Apoptosis/Mitoses, Increased	—	—	—	—	6+	4+	10+	6+	
Jejunum										
	Apoptosis/Mitoses, Increased	—	—	—	—	9+	6+	10+	8+	
Ileum										
	Apoptosis/Mitoses, Increased	—	—	—	—	7+	5+	9+	6+	
Cecum										
	Apoptosis/Mitoses, Increased	—	—	—	—	1+	—	4+	3+	
Rectum										
	Apoptosis/Mitoses, Increased	—	—	—	—	3+	4+	5+	7+	
Pituitary										
	Apoptosis/Mitoses, Increased	—	—	2+	2+	3+ (9) ^g	3+	5+, 3++	8+, 1++	

表 2.6.7.7.2-1 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin

Dose (mg/kg):	0 (Control)		2		6		10			
	No. of Toxicity Animals:		M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
<u>Noteworthy Findings – Dosing Phase (cont'd)</u>										
Histopathology (cont'd)										
Mammary, Male										
Atrophy, Duct/Alveolus, Present	0 (9) ^g	NA	1	NA	9	NA	9 (9) ^g	NA		
Mitoses, Increased, Duct Epithelium	— (9) ^g	NA	—	NA	7+, 1++	NA	7+ (9) ^g	NA		
Skin/Subcutis										
Apoptosis/Atrophy, Epithelium, Adnexa	—	—	—	—	7+	10+	10+	9+, 1++		
Mitoses, Increased, Epidermis	—	—	—	—	3+	6+	10+	7+		
Erosion, Ulcer	—	—	—	—	—	1+	1+++	1+		
Intravenous Site										
Apoptosis/Mitoses/Atrophy, Epithelium, Adnexa	—	—	6+ (9) ^g	5+	7+, 3++	6+, 3++	6+, 4++	6+, 4++		
Apoptosis/Mitoses, Increased, Epidermis	—	—	2+ (9) ^g	1+	6+, 1++	6+, 1++, 1+++	6+, 3++, 1+++	5+, 5++		
Spleen										
Mitoses, Increased, Red Pulp	—	—	—	—	—	—	6+	3+		
Liver										
Necrosis, Random, Focal	—	1++	—	—	—	1+, 1++	1+, 1++, 1+++	1+, 1++, 1+++		
Apoptosis/Mitoses, Increased	—	—	—	—	4+	6+	6+	6+, 1++		
Harderian Gland										
Apoptosis, Increased, Acinar Cells	0	—	—	0	1+	1+	1+	2+		

表 2.6.7.7.2-1 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin

Dose (mg/kg):		0 (Control)		2		6		10	
No. of Toxicity Animals:		M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
<u>Noteworthy Findings – Dosing Phase (cont'd)</u>									
Histopathology (cont'd)									
Lung									
	Infiltrates, Macrophages, Alveolus	—	—	1++	2+	1+	1+	7+	2+
	Hyperplasia/Hypertrophy, Type 2 Pneumocyte	—	—	—	—	—	—	1+, 1++	—
Uterus									
	Mitoses, Increased	NA	—	NA	—	NA	—	NA	3+
Testis									
	Degeneration, Seminiferous Tubules	—	NA	7+, 1++	NA	4++, 6+++	NA	8++++, 2+++++	NA
	Apoptosis, Increased, Spermatoocytes	—	NA	5+, 5++	NA	10+	NA	5+, 5++	NA
Epididymis									
	Abnormal Contents, Lumen	—	NA	6+, 2++	NA	2++, 8+++	NA	10++++	NA
	Apoptosis/Mitoses, Increased, Duct Epithelium	—	NA	—	NA	10+	NA	6+, 4++	NA
	Infiltrate, Lymphocytes	—	NA	2+	NA	9+, 1++	NA	6+, 4++	NA

表 2.6.7.7.2-1 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin

Dose (mg/kg):	0 (Control)		2		6		10			
	No. of Toxicity Animals:		M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
<u>Noteworthy Findings – Recovery</u>										
No. Evaluated	5	5	4	5	5	5	4 ^h	5		
Clinical Observations										
Pale Eyes	0	—	0	—	0	—	2	—		
Pale, Entire Body	0	—	0	—	0	—	2	—		
Functional Observation Battery (%) ^d										
Forelimb Grip Strength 1 (g)	1857	—	10.6	—	7.9	—	20.0	—		
Forelimb Grip Strength 2 (g)	1660	—	21.0	—	9.1	—	43.7	—		
Organ Weights (%) ^f										
Thymus (g)	0.2073	0.2224	6.2	-8.9	50.4*	37.5*	48.1	-1.9		
Testis (g)	3.6356	NA	-39.1*	NA	-55.9*	NA	-59.1*	NA		
Epididymis (g)	1.4926	NA	-10.1	NA	-30.3*	NA	-23.9	NA		
Gross Pathology										
Testis, Small	0	NA	0	NA	2	NA	2	NA		
Testis, Soft	0	NA	4	NA	5	NA	4	NA		
Histopathology										
Testis										
Atrophy	—	NA	1+, 1++, 2+++	NA	2++++, 3+++++	NA	4+++++	NA		
Epididymis										
Abnormal Contents, Lumen	—	NA	1+, 2+++	NA	5++++	NA	4++++	NA		
Lung										
Infiltrates, Macrophages, Alveolus	—	—	—	—	—	—	1+	—		
Liver										
Necrosis, Random, Focal	—	—	—	—	—	—	—	1++		

表 2.6.7.7.2-1 ポラツズマブ ベドチンのラット4週間（週1回，計4回）投与試験（6週間回復性試験）（続）

* $p < 0.05$ (Dunnett's t test); — = no noteworthy findings; + = minimal; ++ = slight; +++ = moderate; ++++ = marked; +++++ = severe; AUC = area under the concentration-time curve; AUC₀₋₄ = AUC from TK Day 0 to TK Day 4; AUC₀₋₇ = AUC from TK Day 0 to TK Day 7; AUC₂₁₋₂₅ = AUC from TK Day 21 to TK Day 25; AUC₂₁₋₂₈ = AUC from TK Day 21 to TK Day 28; AUC_{21-last} = AUC from TK Day 21 to the last measurable concentration; C_{max} = maximum observed concentration; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NA = not applicable; STD₁₀ = severely toxic dose in 10% of the animals; TK = toxicokinetic.

^a The initiation of dosing was staggered over the following 3 days: toxicity males on [REDACTED] 20 [REDACTED], TK animals on [REDACTED] 20 [REDACTED], and toxicity females on [REDACTED] 20 [REDACTED].

^b TK parameters were not reported for animals given 2 mg/kg due to the majority of the concentration data observed below the limit of quantitation.

^c One male given 10 mg/kg (Animal No. B82062) was euthanized on Study Day 31 (Recovery Day 6), having been noted with hunched posture, pale body and eyes, rough haircoat, and body weight loss; this early euthanasia was considered test article-related. One male given 2 mg/kg was found dead on Study Day 2 with no abnormal clinical signs; this death was not attributed to the test article.

^d For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percentage of differences).

^e Excluded from statistical analysis due to a high number of female controls with values below the detectable limit.

^f Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. For controls, group mean absolute weights are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percentage of differences).

^g Protocol-required tissues were noted as missing or unreadable in some groups; the number in () indicates the number of organs/tissues examined microscopically.

^h Five males were assigned to the recovery phase; however, 1 male given 10 mg/kg was euthanized on Study Day 31 (Recovery Day 6); therefore, only 4 males were evaluated for parameters after Study Day 31 (Recovery Day 6).

2.6.7.7.3 ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル10週間（3週に1回，計4回）投与試験 （9週間回復性試験）

表 2.6.7.7.3-1 ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル10週間（3週に1回，計4回）投与試験（9週間回復性試験）

Test Article: Polatuzumab vedotin, Surrogate ADC

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		Duration of Dosing: Once every 3 weeks for four total doses			Location in CTD: 4.2.3.2-4	
Initial Age: Males: 3.0-3.7 years, Females: 2.8-3.8 years		Duration of Post Dose: 9 Weeks			Report No.: ■-0044	
Date of First Dose: ■■■■■ 20■■■		Method of Administration: Intravenous injection			GLP Compliance: GLP	
Special Features: ADA analysis, flow cytometry, cardiovascular and body temperature measurements via telemetry ^a		Vehicle/Formulation: Polatuzumab vedotin vehicle (20 mM histidine acetate, pH 5.5, 240 mM sucrose, 0.02% polysorbate 20)				
HNSTD for Polatuzumab Vedotin: 5 mg/kg						
HNSTD for Surrogate ADC: 3 mg/kg						
Test Material:	Control	Polatuzumab vedotin			Surrogate ADC	
Dose (mg/kg):	0	1	3	5	3	5
No. of Animals:	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5 ^b	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5	M: 5 ^b , F: 5
Toxicokinetics: Polatuzumab Vedotin						
Total Antibody AUC (µg•day/mL)						
1st dose (Day 1): AUC ₀₋₂₁	LTR	138	440	744	NA	NA
4th dose (Day 64): AUC ₆₃₋₈₄	LTR	138	485	796	NA	NA
Overall: AUC _{0-t}	LTR	973	3213	5837	NA	NA
Total Antibody C _{max} (µg/mL)						
1st dose (Day 1)	LTR	34.0	90.6	157	NA	NA
4th dose (Day 64)	LTR	27.6	101	177	NA	NA
Total Antibody Concentration (µg/mL)						
Day 85	LTR	1.86	1.95	8.78	NA	NA
Day 127	LTR	0.282	LTR	0.503	NA	NA

表 2.6.7.7.3-1 ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル10週間（3週に1回，計4回）投与試験（9週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin, Surrogate ADC

Test Material:	Control	Polatuzumab vedotin			Surrogate ADC	
Dose (mg/kg):	0	1	3	5	3	5
No. of Animals:	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5 ^b	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5	M: 5 ^b , F: 5
<u>Toxicokinetics: Surrogate ADC</u>						
Total Antibody AUC (μg•day/mL)						
1st dose (Day 1): AUC ₀₋₂₁	LTR	NA	NA	NA	216	404
4th dose (Day 64): AUC ₆₃₋₈₄	LTR	NA	NA	NA	295	523
Overall: AUC _{0-t}	LTR	NA	NA	NA	2334	4138
Total Antibody C _{max} (μg/mL)						
1st dose (Day 1)	LTR	NA	NA	NA	76.7	140
4th dose (Day 64)	LTR	NA	NA	NA	89.4	147
Total Antibody Concentration (μg/mL)						
Day 85	LTR	NA	NA	NA	0.770	4.87
Day 127	LTR	NA	NA	NA	LTR	LTR
<u>Toxicokinetics: MMAE</u>						
MMAE AUC (ng•day/mL)						
1st dose (Day 1): AUC ₀₋₃	NA ^c	NA ^d	0.171	0.233	0.204	0.291
4th dose (Day 64): AUC ₀₋₃	NA ^c	NA ^d	0.181	0.253	0.178	0.263
MMAE C _{max} (ng/mL)						
1st dose (Day 1)	NA ^c	NA ^d	0.0726	0.0968	0.0832	0.115
4th dose (Day 64)	NA ^c	NA ^d	0.0726	0.104	0.0729	0.107
MMAE Concentration (ng/mL)						
Day 71	LLOQ	LLOQ	0.0336	0.0553	0.0321	0.0616
Day 78	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ	LLOQ
ADA ^e	2/10 ^f	5/10	5/10	3/10	3/10	1/10
<u>Noteworthy Findings, Week 1 through 10/11</u>						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	1 ^b	0	0	1 ^b
Body Weight (%), Week 10 ^g	2.96 kg	-4	+1	-6	-9	-2
Clinical Signs and Food Consumption	—	—	—	—	—	—

表 2.6.7.7.3-1 ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル10週間（3週に1回，計4回）投与試験（9週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin, Surrogate ADC

Test Material:	Control	Polatuzumab vedotin			Surrogate ADC	
Dose (mg/kg):	0	1	3	5	3	5
No. of Animals:	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5 ^b	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5	M: 5 ^b , F: 5
Noteworthy Findings, Week 1 through 10/11 (cont'd)						
Respiration Rates	—	—	—	—	—	—
Physical Examinations	—	—	—	—	—	—
Pulse Oximetry	—	—	—	—	—	—
Physiological Parameters (telemetered and non-telemetered)	—	—	—	—	—	—
Electrocardiograms (telemetered and non-telemetered)	—	—	—	—	—	—
Ophthalmic Examinations (Indirect and Slit-Lamp)	—	—	—	—	—	—
Neurological Evaluation	—	—	—	—	—	—
Serum Chemistry ^{h, i}						
Globulin (g/dL), Day 22, Predose	3.16	—	—	—	2.78*	2.73*
Globulin (g/dL), Day 29	3.14	—	—	—	2.78	2.46*
Globulin (g/dL), Day 43, Predose	3.03	—	—	—	2.61	2.39*
Globulin (g/dL), Day 50	2.94	—	—	—	2.41*	2.50*
Globulin (g/dL), Day 64, Predose	2.92	—	—	—	2.36*	2.50*
Globulin (g/dL), Day 71	2.79	—	—	—	2.19*	2.32*
Hematology ^{h, j, k}						
Reticulocyte Count (10 ⁵ /μL), Day 8	1.242	—	0.787*	0.621*	0.831*	0.358*
Reticulocyte Count (10 ⁵ /μL), Day 29	1.204	—	0.675*	0.363*	0.786*	0.468*
Reticulocyte Count (10 ⁵ /μL), Day 50	0.929	—	0.634	0.398*	0.484*	0.266*
Reticulocyte Count (10 ⁵ /μL), Day 71	1.195	—	0.661*	0.610*	0.572*	0.618*
Lymphocyte Count (10 ³ /μL), Day 8	7584	—	—	3495*	2668*	3867*
Lymphocyte Count (10 ³ /μL), Day 71	9080	—	—	—	—	3898*
Segmented Neutrophil Count (/μL), Day 8	7027	—	—	—	3453*	1564*
Monocyte Count (/μL), Day 8	446.7	—	—	—	—	162*

表 2.6.7.7.3-1 ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル10週間（3週に1回，計4回）投与試験（9週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin, Surrogate ADC

Test Material:	Control	Polatuzumab vedotin			Surrogate ADC	
Dose (mg/kg):	0	1	3	5	3	5
No. of Animals:	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5 ^b	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5	M: 5 ^b , F: 5
<u>Noteworthy Findings, Week 1 through 10/11 (cont'd)</u>						
Flow Cytometry						
Absolute CD20 ⁺ (B-lymphocytes) per µL, Day 2	2791	—	—	—	637*	839*
Absolute CD20 ⁺ (B-lymphocytes) per µL, Day 8	2039	—	—	—	379*	465*
Absolute CD20 ⁺ (B-lymphocytes) per µL, Day 22	1782	—	—	—	529*	493*
Absolute CD20 ⁺ (B-lymphocytes) per µL, Day 29	1891	—	—	—	331*	337*
Absolute CD20 ⁺ (B-lymphocytes) per µL, Day 43	1684	—	—	—	429*	303*
Absolute CD20 ⁺ (B-lymphocytes) per µL, Day 50	1781	—	—	—	270*	216*
Absolute CD20 ⁺ (B-lymphocytes) per µL, Day 64	1909	—	—	—	437*	260*
Absolute CD20 ⁺ (B-lymphocytes) per µL, Day 71	1840	—	—	—	381*	247*
Coagulation	—	—	—	—	—	—
No. Evaluated:	M: 3, F: 3	M: 3, F: 3	M: 3, F: 3	M: 3, F: 3	M: 3, F: 3	M: 2 ^b , F: 3
Urinalysis	—	—	—	—	—	—
Gross Pathology	—	—	—	—	—	—
Organ Weights	—	—	—	—	—	—

表 2.6.7.7.3-1 ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル10週間（3週に1回，計4回）投与試験（9週間回復性試験）（続）

Test Article: Polatuzumab vedotin, Surrogate ADC

Test Material:	Control	Polatuzumab vedotin				Surrogate ADC	
Dose (mg/kg):	0	1	3	5	3	5	
No. of Animals:	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5 ^b	M: 5, F: 5	M: 5, F: 5	M: 5 ^b , F: 5	
Noteworthy Findings, Week 1 through 10/11 (cont'd)							
No. Evaluated:	M: 3, F: 3	M: 3, F: 3	M: 3, F: 3	M: 3, F: 3	M: 3, F: 3	M: 2 ^b , F: 3	
Histopathology, Day 71 ^l							
Bone Marrow, Sternum, Hypocellularity	—	—	2/6+	3/6++	3/6+	2/5+	
Bone Marrow, Sternum, Hypercellular, Myeloid	—	—	4/6+	3/6+	3/6+	3/5+ ^m	
Spleen, Absence of Germinal Centers	—	—	—	—	6/6	5/5	
Recovery Evaluation, Week 11 through 19							
No. Evaluated:	M: 2, F: 2	M: 2, F: 2	M: 2, F: 1 ^b	M: 2, F: 2	M: 2, F: 2	M: 2, F: 2	
Serum Chemistry ^{h, i}							
Globulin (g/dL), Day 127	2.88	—	—	—	2.40*	2.25*	
Flow Cytometry							
Absolute CD20 ⁺ (B-lymphocytes) per μ L, Day 85	1561	—	—	—	489*	222*	
Absolute CD20 ⁺ (B-lymphocytes) per μ L, Day 99	1693	—	—	—	—	577	

表 2.6.7.7.3-1 ポラツズマブ ベドチン及びサロゲート ADC のカニクイザル10週間（3週に1回，計4回）投与試験（9週間回復性試験）（続）

* = ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($p \leq 0.05$); — = no noteworthy findings; + = mild; ++ = moderate; +++ = marked; ADA = anti-drug antibody; ADC = antibody-drug conjugate; AUC = area under the concentration-time curve; AUC_{0-3} = area under the MMAE concentration-time curve from time zero to 3 days post dose; AUC_{0-21} = area under the total antibody concentration-time curve from time zero to 21 days post dose.; AUC_{63-84} = area under the total antibody concentration-time curve from time zero of the last (4th) dose to 21 days post last dose; AUC_{0-t} = area under the total antibody, or MMAE concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} = maximum observed concentration; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; HNSTD = highest non severely toxic dose; LTR = less than reportable ($< 0.150 \mu\text{g/mL}$ for polatuzumab vedotin and $< 0.060 \mu\text{g/mL}$ for surrogate antibody); M = male; NA = not applicable.

^a Cardiovascular and body temperature data recorded by telemetry for 2 animals/sex for all groups. These animals were also designated for the recovery phase of the study.

^b One 5 mg/kg surrogate ADC male was found dead on Day 53 (Week 8). The cause of death was determined to be bacterial endocarditis which may have been secondary to a test article-related decreased peripheral blood neutrophil count noted 1 week after the first dose administration. One 3 mg/kg polatuzumab vedotin female was humanely euthanized on Day 55 (Week 8) for reasons not related to administration of the test article.

^c Control group samples were not assayed for free MMAE.

^d Free MMAE was for the most part not quantifiable ($< 0.0359 \text{ ng/mL}$) at any time point at 1 mg/kg.

^e Number of animals with antibodies to polatuzumab vedotin (Groups 2-4) and surrogate ADC (Groups 5 and 6) from prestudy through terminal or recovery necropsy per number of animals evaluated.

^f Control animal samples were tested in both antibody assays (clinical and surrogate). Signals above the assay cutpoint were detected in 2 of 10 animals at different timepoints. It was confirmed that these animals did not receive either drug because there were no detectable levels of polatuzumab vedotin or surrogate ADC in these animals at any timepoint collected.

^g At the end of the dosing period for all animals (Week 10). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

^h Other statistically significant timepoints (not shown) were within the range of normal biologic variability or were sporadic, transient, or of a magnitude of change commonly observed in laboratory animals undergoing similar study procedures and were not considered related to the administration of the test articles.

ⁱ Globulin decreases resulted in corresponding increases in albumin/globulin ratios (not shown). Globulin changes most likely related to a decrease in the B lymphocyte population (see flow cytometry results).

^j Decreased reticulocyte counts resulted in minimal decreases in indicators of red blood cell mass (hemoglobin, hematocrit, and red blood cell count) that exceeded procedural effects from blood sampling. Red cell distribution width was minimally increased in animals given 5 mg/kg surrogate ADC.

^k Lower lymphocyte counts resulted in lower white blood cell counts.

^l Number of animals with this finding/number of animals evaluated. Greatest severity noted is indicated.

^m Bone marrow evaluation of the sternum for the 5 mg/kg surrogate ADC male found dead on Day 53 also indicated mild hypercellular myeloid cells.

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.8.1 MMAE の細菌を用いる復帰突然変異試験

表 2.6.7.8.1-1 MMAE の細菌を用いる復帰突然変異試験

Test Article: MMAE

Test for Induction of: Bacterial Reverse Mutation Strains: <i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535 and TA1537) and <i>Escherichia coli</i> (WP2uvrA) Metabolizing System: Aroclor 1254–induced rat liver S9 Vehicles: For test article: DMSO For positive controls: Water (sodium azide), DMSO (except for sodium azide) Treatment: Plate incorporation method Cytotoxic Effects: None Genotoxic Effects: None			No. of Independent Assays: 2 No. of Replicate Cultures: 2 (initial trial), 3 (confirmatory trial) No. of Cells Analyzed/Cultures: The number of revertant colonies was counted Positive controls: 2-nitrofluorene, sodium azide, 9-aminoacridine, MMS, 2-aminoanthracene			Location in CTD: 4.2.3.3.1-1 Report No.: ██████████.503.██████████ GLP Compliance: GLP Dates of Treatment: ██████████ 20██████████		
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	No. of revertant colonies (Mean ± SD)					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA	
Without Activation (Initial assay)	DMSO	50 µL/plate	17±4	178±11	11±1	18±1	11±1	
	MMAE	0.25	21±1	194±11	12±1	13±4	15±5	
		0.75	20±1	202±5	18±5	15±8	11±4	
		2.5	19±3	213±16	15±3	19±1	18±0	
		7.5	17±4	199±27	19±6	17±3	17±8	
		25	15±2	219±8	16±0	15±8	10±0	
		75	20±3	227±3	22±11	17±6	16±1	
		200	19±1	220±6	19±0	16±4	19±8	
		600	26±1	249±19	12±4	12±6	13±3	
		1800	21±4	181±6	18±4	13±0	17±4	
		5000	20±2	210±19	20±5	18±3	17±1	
2-nitrofluorene	1	134±35						
Sodium azide	1		574±74	398±48				
9-aminoacridine	75				62±1			
MMS	1000					124±6		

表 2.6.7.8.1-1 MMAE の細菌を用いる復帰突然変異試験 (続)

Test Article: MMAE

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	No. of revertant colonies (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA
With Activation (Initial assay)	DMSO	50 µL/plate	29±8	209±16	15±1	11±3	12±1
	MMAE	0.25	29±10	207±28	14±4	13±4	15±1
		0.75	25±1	192±6	13±3	13±0	17±2
		2.5	27±1	212±20	10±1	14±4	11±4
		7.5	21±5	190±22	14±1	10±0	14±1
		25	18±4	210±3	11±0	9±1	10±1
		75	28±8	201±8	12±2	13±1	17±1
		200	30±2	180±25	12±1	12±4	15±6
		600	26±1	217±9	15±1	16±1	14±3
		1800	32±1	239±24	15±2	15±6	16±6
		5000	19±1	197±17	17±4	10±3	13±2
	2-aminoanthracene	1	2117±203	1545±792	272±28	222±59	
		10					86±3

表 2.6.7.8.1-1 MMAE の細菌を用いる復帰突然変異試験 (続)

Test Article: MMAE

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	No. of revertant colonies (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA
Without Activation (Confirmation assay)	DMSO	50 µL/plate	13±2	125±11	13±1	12±2	11±1
	MMAE	75	11±1	133±26	13±1	11±1	13±2
		200	11±1	132±21	12±1	11±1	11±2
		600	11±1	133±13	13±4	11±1	11±1
		1800	12±1	140±11	12±1	11±1	11±2
		5000	12±2	129±14	12±1	10±1	10±1
	2-nitrofluorene	1	152±19				
	Sodium azide	1	549±22		506±61		
	9-aminoacridine	75					1087±122
	MMS	1000					208±21
With Activation (Confirmation assay)	DMSO	50 µL/plate	16±4	136±14	11±1	8±3	10±1
	MMAE	75	15±1	146±7	10±2	5±2	12±2
		200	11±2	130±6	8±3	10±1	12±1
		600	13±2	138±17	10±3	8±1	11±1
		1800	13±2	141±17	10±2	10±2	11±1
		5000	11±1	129±9	11±2	10±2	11±1
	2-aminoanthracene	1	890±85	828±90	171±54	1471±114	
		10					376±56

DMSO = dimethyl sulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; MMAE = monomethyl auristatin E; MMS: methyl methanesulfonate; SD: standard deviation.

2.6.7.8.2 MMAE のマウスリンフォーマ細胞株を用いる突然変異試験

表 2.6.7.8.2-1 MMAE のマウスリンフォーマ細胞株を用いる突然変異試験

Test Article: MMAE

Test for Induction of: Mouse lymphoma forward mutation assay		No. of Independent Assays: 2	Location in CTD: 4.2.3.3.1-2
Strains: Mouse lymphoma L5178Y cell line		No. of Replicate Cultures: 1 (initial), 1 (confirmatory), 1 (re-test)	Report No.: 8204155
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9		No. of Cells Analyzed/Culture: 3 x 10 ⁶ cells	GLP Compliance: GLP
Vehicles: For test article: 0.01 N HCl/0.9% saline For positive controls: NA		Positive Controls: MCA, MMS	Dates of Treatment: [REDACTED] [REDACTED] 20 [REDACTED]
Treatment: 4 hour with S9; 24 hour without S9			
Cytotoxic Effects: Cytotoxicity			
Genotoxic Effects: Negative			
Metabolic Activation	Test Article	Concentration	Total Mutant Frequency (× 10 ⁻⁶)
With Activation (Initial)	Vehicle Control	10%	47.2
		10%	39.1
		10%	48.3
	MCA (μg/mL)	1.50	382.6
		2.00	336.7
	MMAE (ng/mL)	20.0	69.2
		30.0	67.7
		40.0	80.7
		50.0	63.6
Without Activation (Initial)	Vehicle Control	10%	38.1
		10%	54.9
		10%	42.7
	MMS (μg/mL)	15	375.9
		20	471.9
	MMAE (ng/mL)	0.0500	59.8
		0.100	44.1
		0.500	45.4
		1.00	43.0
		2.50	39.8
5.00		59.2	
7.50		69.3	

表 2.6.7.8.2-1 MMAE のマウスリンフォーマ細胞株を用いる突然変異試験 (続)

Test Article: MMAE

Metabolic Activation	Test Article	Concentration	Total Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)
With Activation (Confirmatory)	Vehicle Control	10%	49.9
		10%	45.9
		10%	48.4
	MCA ($\mu\text{g/mL}$)	1.50	419.3
		2.00	341.5
	MMAE (ng/mL)	0.050	31.3
		0.250	50.6
		0.500	57.0
		2.50	46.3
		5.00	45.6
		10.0	39.6
		20.0	60.8
		30.0	74.4
Without Activation (Confirmatory)	Vehicle Control	10%	44.9
		10%	29.3
		10%	31.3
	MMS ($\mu\text{g/mL}$)	6.50	204.1
		10.0	321.7
	MMAE (ng/mL)	0.00500	44.6
		0.0100	35.7
		0.100	27.4
		0.500	33.3
		0.750	34.4
		1.00	27.2
		1.50	44.9
		2.00	66.7
2.50	92.5		

表 2.6.7.8.2-1 MMAE のマウスリンフォーマ細胞株を用いる突然変異試験 (続)

Test Article: MMAE

Metabolic Activation	Test Article	Concentration	Total Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)
With Activation (Re-test)	Vehicle Control	10%	35.2
		10%	53.9
		10%	48.5
	MCA ($\mu\text{g/mL}$)	1.50	352.3
		2.00	395.8
	MMAE (ng/mL)	0.250	49.2
		0.500	50.3
		1.00	27.9
		5.00	49.9
		10.0	45.5
		20.0	38.9
		30.0	56.9
		40.0	51.7
	50.0	100.0	
Without Activation (Re-test)	Vehicle Control	10%	42.7
		10%	36.4
		10%	28.7
	MMS ($\mu\text{g/mL}$)	15.0	357.9
		20.0	523.5
	MMAE (ng/mL)	0.0100	34.5
		0.0500	25.9
		0.100	24.7
		0.250	35.2
		0.500	30.5
		0.750	37.4
2.50		47.9	
5.00		69.6	

GLP = Good Laboratory Practice; MCA = methylcholanthrene; MMAE = monomethyl auristatin E; MMS = methyl methanesulfonate.

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.9.1 MMAE のラット小核試験

表 2.6.7.9.1-1 MMAE のラット小核試験

Test Article: MMAE

Test for Induction of: Bone-marrow micronuclei Species/Strain: Rat (Sprague Dawley) Age: 8 weeks Cell Evaluated: PCE No. of Cells Analyzed/Animal: At least 2000 PCE Special Features: None Toxic/Cytotoxic Effects and Evidence of Exposure: MMAE induced increases in micronucleated PCEs at 0.1 and 0.2 mg/kg. MMAE was cytotoxic to the bone marrow (i.e., decrease in the PCE:NCE ratios) at 0.2 mg/kg.		Treatment Schedule: Single dose Sampling Time: 24 or 48 hours after dosing Method of Administration: Intravenous injection Vehicle/Formulation: 3.9% 0.01 N hydrochloric acid/ 96.1% 0.9% sodium chloride for injection Positive Controls: Cyclophosphamide, Carbendazim		Location in CTD: 4.2.3.3.2-1 Report No.: 8204151 GLP Compliance: GLP Dates of Dosing: [REDACTED] 20 [REDACTED]	
Antikinetochose Analysis in Confirmatory Assay: MMAE induced predominantly the formation of micronuclei with centromere+, which indicated an aneugenic mode of action.					
Test Article	Dose (mg/kg)	No. of Animals/Sex	Harvest Time (hour)	% Micronucleated PCEs (Mean±Standard Deviation)	Ratio PCE:NCE (Mean±Standard Deviation)
<u>Micronucleus Assay</u>					
Vehicle Control (HCL/Saline)	0	5M	24	0.07±0.07	0.70±0.11
		5M	48	0.08±0.09	0.82±0.21
MMAE	0.01	5M	24	0.12±0.15	0.70±0.18
	0.1	5M	24	1.18±0.33 ^a	0.66±0.16
	0.2	5M	24	1.34±0.46 ^a	0.55±0.07
		5M	48	1.59±0.33 ^a	0.38±0.07 ^b
Positive Control (Cyclophosphamide)	60	5M	24	1.77±0.99 ^a	0.69±0.10
<u>Confirmatory Micronucleus Assay</u>					
Vehicle Control (HCL/Saline)	0	5M	24	0.16±0.10	0.72±0.12
MMAE	0.1	5M	24	1.23±0.53	0.48±0.15
	0.2	5M	24	0.93±0.46	0.23±0.10
Positive Control (Cyclophosphamide)	60	5M	24	2.13±0.33	0.46±0.05
Positive Control (Carbendazim)	1250	5M	24	0.48±0.39	0.19±0.04
	1500	5M	24	0.51±0.46	0.43±0.08

GLP = Good Laboratory Practice; HCL = hydrochloric acid; NCE = normochromatic erythrocyte; PCE = polychromatic erythrocyte.

a Significantly greater than the corresponding vehicle control, p ≤ 0.01.

b Significantly less than the corresponding vehicle control, p ≤ 0.01.

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

2.6.7.11.1 MMAE のラット胚・胎児発生に関する試験

表 2.6.7.11.1-1 MMAE のラット胚・胎児発生に関する試験

Test Article: MMAE

Species/ Strain	Method of Administration	Dosing Period	Dose (mg/kg)	No./Sex/ Group	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
Sprague-Dawley Rat	Intravenous	Q7D × 2: GD 6 and 13	0.2	25F	<ul style="list-style-type: none"> • IV injection MMAE on GD 6 and GD 13 resulted in teratogenic and embryo-fetal adverse toxicity • Maternal bone marrow toxicity • No toxicity related to mean corpora lutea, mean implantation sites, pre-implantation loss, and no dead fetus • Fetal toxicities related to external malformations including protruding tongue, malrotated limbs, gastroschisis, and agnathia 	4.2.3.5.2-1 [8204397] (GLP)

GD = Gestational Day; GLP = Good Laboratory Practice; Q7D = once every 7 days.

Vehicle: 3.9% 0.01 N hydrochloric acid/96.1% 0.9% sodium chloride for injection

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

該当試験なし。

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

該当試験なし。

2.6.7.17 その他の毒性試験

2.6.7.17.1 ポラツズマブ ベドチンのヒト組織交差反応性試験

表 2.6.7.17.1-1 ポラツズマブ ベドチンのヒト組織交差反応性試験

Test Article: Polatuzumab vedotin

Species/ Strain	Method of Administration	Test Article	Duration of Dosing	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Noteworthy Findings	Location in CTD [Report No.] (GLP Compliance)
Human tissues	<i>In vitro</i>	Polatuzumab vedotin	NA	2.5 or 12.5	<ul style="list-style-type: none"> Polatuzumab vedotin tissue distribution is consistent with the reported expression pattern of CD79b 	4.2.3.7.7-1 [■-0711] (GLP)

GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable.