2.6.6　毒性試験の概要文の目次

2.6.6.1　まとめ..... 2
2.6.6.2　単回投与毒性試験..... 4
2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）..... 4
2.6.6.3.1　カニクイザルにおける3種類の高濃度製剤を用いた3ヵ月間の休薬期間を含む9週間又は6ヵ月間反復硝子体内投与毒性及びトキシコキネティクス試験..... 4
2.6.6.3.2　カニクイザルにおける高濃度高分子量分子種を含む高濃度製剤の3ヵ月間反復硝子体内投与毒性及びトキシコキネティクス試験..... 7
2.6.6.4　遺伝毒性試験..... 9
2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）..... 9
2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）..... 9
2.6.6.7　局所刺激性試験..... 9
2.6.6.8　その他の毒性試験..... 10
2.6.6.8.1　新添加物の安全性評価..... 10
2.6.6.9　考察及び結論..... 12
2.6.6.10　図表..... 17
引用文献一覧..... 17

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

アフリベルセプト（VEGF Trap）〔一般名 aflibercept（INN）／アフリベルセプト（遺伝子組換え）（JAN）〕は、血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor）阻害薬（抗VEGF 薬）であり、ヒト免疫グロブリン G1 の Fc ドメインにヒト VEGF 受容体の細胞外ドメインを結合した組換え融合糖タンパク質である。本邦では 2011 年 6 月 24 日に「アイリーア硝子体内注射液 40mg/mL」「アイリーア硝子体内注射用キット 40mg/mL」の製造販売承認申請を行い、2012 年 9 月 28 日に「中心窩下脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性（AMD）」を効能・効果として承認された。その後、「糖尿病黄斑浮腫（DME）」の追加効能・効果が 2014 年 11 月に承認された。いずれの効能・効果についても 1 回用量は 2mg（容量 0.05mL）である。今回の一部変更承認申請は、アフリベルセプトの高濃度製剤（114.3mg/mL：以下、本剤）を 8mg の用量（容量 0.07mL）で滲出型 AMD（nAMD）及び DME の患者に硝子体内投与した臨床試験成績に基づき行うものであり、申請区分は「新剤形医薬品」である。

有効成分アフリベルセプトの毒性は初回承認申請時に提出したカニクイザル（最長 8 ヵ月までの反復硝子体内投与試験）及びウサギ（静脈内又は皮下投与による胚・胎児発生に関する試験）を用いた一連の毒性試験より明らかにされている。本承認申請にあたっては、高濃度製剤を用い、新添加物を含む高濃度製剤の高用量投与時の安全性を担保するためのカニクイザル 6 ヵ月間反復硝子体内投与試験（4.2.3.2.1 R-13513）及び高濃度製剤中の高分子量分子種（凝集体）の安全性を担保するためのカニクイザル 3 ヵ月間反復硝子体内投与試験（4.2.3.2.2 R-14270）を追加実施した（表 2.6.6.1- 1）。

表 2.6.6.1- 1　高濃度製剤・高用量用に実施されたカニクイザル反復硝子体内投与試験一覧

Study Title	Duration of Treatment	Dosing Schedule	Dose (bilateral injection)	Location & Report No.	GLP
9-Week or 6-Month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study with Three Different Aflibercept (VEGF Trap) Formulations in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase	3 or 6 months with a 3 months recovery	Every 4 weeks for 3 or 7 doses, respectively	0, 4, 7 mg/eye	Module 4.2.3.2.1, Report No. R-13513 (VGFT-TX-18169)	Yes
3-month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study of VEGF-Trap, Administered to Cynomolgus Monkeys Followed by a 12-week Recovery Period	3 Months with a 3 months recovery	Every 4 weeks for 4 doses	0, 5.6, 5.6 mg/eye, aflibercept with ■ or ■% high molecular weight species	Module 4.2.3.2.2, Report No. R-14270 (VGFT-TX-20170)	Yes

これら追加試験の結果、アフリベルセプト高濃度・高用量をカニクイザルへ 3 又は 6 ヵ月間反復硝子体内投与後に眼局所に問題となる毒性及び局所刺激性は認められなかった。また、眼以外の標的は、初回申請時に提出したサル 8 ヵ月間反復硝子体内投与毒性試験（AMD CTD 4.2.3.2-11 VGFT-TX-05011）で報告された可逆性の鼻甲介上皮の所見（びらん・潰瘍など）のみであり、新たな毒性所見は認められなかった。また、高分子量分子種を■%含む高濃度製剤のサル 3 ヵ月間反復硝子体内投与後に毒性所見は認められず、その安全性に問題はないことが確認された。更に、8mg の高用量投与により臨床での全身曝露量が増加することから、既承認用量（2mg）の添付文書で記載している、サル 8 ヵ月間反復硝子体内投与毒性試験の無毒性量での全身曝露量との曝露比（安全域）はやや小さくなったが、鼻甲介上皮の病変が 8mg 投与時の臨床曝露量より依然として高い曝露量でみられることを確認した。

生殖発生毒性に関しては、既提出のウサギ胚・胎児発生に関する試験（AMD CTD 4.2.3.5.2-5 PH-36888）の結果、最低用量から催奇形性が認められ、安全域が得られていない。したがって、既承認用量（2mg）での添付文書において、「妊婦又は妊娠している可能性のある女性は投与禁忌、妊娠可能な女性には投与中、適切な避妊法を用いるよう指導すること」と規定しているが、全身曝露量増加によっても妊婦へ投与された場合には胎児にリスクを及ぼす可能性が否定できないことから、この注意喚起を踏襲すべきと考えられた。

本剤中の L-アルギニン塩酸塩、L-ヒスチジン塩酸塩水和物、精製白糖及びポリソルベート 20 は医薬品添加剤としての硝子体内投与による使用前例がないか、その 1 日最大投与量が使用前例を超える。これらの添加物については、静脈内投与における使用前例より全身投与時の安全性評価を、また、追加実施された高濃度製剤を用いたサル 6 ヵ月間反復硝子体内投与試験（4.2.3.2.1 R-13513）におけるこれら添加物を含む溶媒対照群の成績に基づき、眼（硝子体）投与部位局所の安全性評価を実施した。その結果、本剤の用法・用量に従った臨床適用において、本剤中に配合される上記 4 つの添加物に安全性上の懸念はないと考えられた。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

新たな試験は実施されていない。

2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

新添加物を含む高濃度製剤 8mg/eye 投与の安全性を担保する目的で、カニクイザルの 6 ヵ月間反復硝子体内投与試験（4.2.3.2.1　R-13513）を、高濃度製剤中の高分子量分子種の安全性を担保する目的で、カニクイザルの 3 ヵ月間反復硝子体内投与試験（4.2.3.2.2　R-14270）を各々追加実施した。各々の試験デザイン及び成績を以下に記載する。

2.6.6.3.1　カニクイザルにおける 3 種類の高濃度製剤を用いた 3 ヵ月間の休薬期間を含む 9 週間又は 6 ヵ月間反復硝子体内投与毒性及びトキシコキネティクス試験

参照項目：4.2.3.2.1　R-13513

アフリベルセプト 8mg の臨床開発を支持する目的で、高濃度アフリベルセプト製剤を用いたカニクイザルの 9 週間又は 6 ヵ月間（25 週間）反復硝子体内投与毒性試験（GLP 準拠）を実施した。本試験では開発候補処方 3 種類を用いたが、うち 1 処方（formulation　2）が添加物として L-アルギニン、L-ヒスチジン、精製白糖及びポリソルベート 20 を含む本剤を支持する処方（申請用処方）、他の 2 処方（formulation　1 及び 3）は臨床開発へは移行しなかった研究用処方である（各処方中の添加物濃度は表 2.6.6.3- 1 注釈参照）。

本試験では各群雌雄各 5 頭のカニクイザルに、申請用処方を含む 3 種類の処方について各々アフリベルセプト 80 及び 140mg/mL の 2 種類の高濃度処方投与群（計 6 群）及び各溶媒対照群（計 3 群）を加えた 9 群を設定した。各群の各動物に溶媒又は各処方を 0、4 又は 7mg/eye の用量で 50 μL/眼の投与容量にて両眼に、1 回/4 週間の投与頻度にて反復硝子体内投与した。申請用処方及びその溶媒投与群（第 2、6 及び 7 群）には 6 ヵ月間（合計 7 回）、その他の研究用処方及びそれらの溶媒投与群（第1、3、4、5、8及び9群）には3ヵ月間（合計3回）反復硝子体内投与し、雌雄各 3 頭を投与期間終了後に剖検した。残りの各群雌雄各 2 頭は最終投与後 12 週間の休薬期間終了後に剖検した。本試験の試験デザインを表 2.6.6.3- 1 に示す。アフリベルセプトのカニクイザルへの 4 及び 7mg/eye 投与は、ヒトとサルの硝子体容積比（約 2:1）を考慮すると、ヒトへ各々8mg/eye（予定臨床用量）及び 14mg/eye（予定臨床用量の約 2 倍）投与時と同程度の硝子体内薬剤濃度が得られると予想された。

表 2.6.6.3- 1　3 種類の高濃度製剤を用いた 3 ヵ月間の回復性評価を含む 9 週間又は 6 ヵ月間反復硝子体内投与試験の試験デザイン

Group	No. of animals[a]		Formulation	Aflibercept Dose (mg/eye)		Dose Concentration (mg/mL)	
	Male	Female		Left Eye	Right Eye	Left Eye	Right Eye
1	5	5	Formulation 1	0	0	0	0
2	5	5	Formulation 2	0	0	0	0
3	5	5	Formulation 3	0	0	0	0
4	5	5	Formulation 1	4	4	80	80
5	5	5	Formulation 1	7	7	140	140
6	5	5	Formulation 2	4	4	80	80
7	5	5	Formulation 2	7	7	140	140
8	5	5	Formulation 3	4	4	80	80
9	5	5	Formulation 3	7	7	140	140

Formulation 1: [redacted] mM L-histidine, [redacted]% sucrose, [redacted]% polysorbate 20, pH [redacted]
Formulation 2: 20 mM L-histidine, 50 mM L-arginine, 5% sucrose, 0.03% polysorbate 20, pH [redacted]
Formulation 3: [redacted] mM L-histidine, [redacted] mM [redacted], [redacted]% [redacted], [redacted]% polysorbate 20, pH [redacted]
[a] Three animals/sex/dose were designated as terminal animals (sacrificed one week after the last dose), the remaining 2 animals/sex/dose were designated as recovery animals (sacrificed at the end of the 12 week recovery period)

アフリベルセプト投与後の毒性は、生死を含む一般状態、体重、定性的摂餌量、神経学的検査、脈拍数、呼吸数、体温、パルスオキシメトリー評価、血圧測定、ジャケット付き外部テレメトリー心電図（JET ECG）、眼科学的一般検査、眼圧（IOP）測定、眼底写真、デジタル蛍光眼底造影（FA）、フルフィールド網膜電図（ERG）、視覚誘発電位（VEP）、臨床病理及び病理学的検査所見に基づいて評価した。トキシコキネティクス（TK）及び抗薬物抗体（ADA）分析のために血液を採取した。

試験デザイン概略及び詳細な成績を 2.6.7.7.1 に示す。

3 処方間で遊離型及び結合型アフリベルセプトの血漿中濃度及び薬物動態に顕著な差異は認められなかった。したがって、申請用処方（formulation 2）投与群（第 6 及び 7 群）におけるアフリベルセプトの TK 評価を中心に以下にまとめる。アフリベルセプト 4 及び 7mg/eye を両眼に反復硝子体内投与したとき、血漿中遊離型アフリベルセプト濃度の C_{max} 及び AUC は投与量に比例して増加した。

遊離型アフリベルセプトの曝露は、概して投与後 3 週間観察され、4 週間の投与期間終了時（投与 4 週間後）の遊離型アフリベルセプトの血漿中濃度は定量下限未満又はそれをわずかに上回る程度であった。アフリベルセプト 4 及び 7mg/eye の反復硝子体内投与後には、7mg/eye 投与群での ADA 陽性動物 2 頭を除き、結合型アフリベルセプトの持続的な全身曝露が観察された。アフリベルセプト 4 及び 7mg/eye の反復硝子体内投与後の結合型アフリベルセプトの全身曝露量は、アフリベルセプトを投与した 2 群間で同等であり（他の 4 群でも同等）、いずれの用量群においても反復硝子体内投与の 2 回目以降に C_{max}、C_{trough} 及び AUC の顕著な増加は認められなかった。以上の成績から、全身循環における結合型アフリベルセプト濃度は、両投与用量で飽和している可能性が高いと考えられた。遊離型及び結合型アフリベルセプト共に反復硝子体内投与による蓄積性は認められなかった。硝子体液中では、formulation 2 でアフリベルセプトを投与した動物の最終屠殺時（7 回投与の 1 週間後）の遊離型アフリベルセプト濃度の平均値は血漿中濃度の約 30 倍であり、眼における薬物曝露が確認された。硝子体液中の遊離型アフリベルセプト濃度は休薬期間終了後（7 回投与の 13 週間後）には定量下限未満であった。

Formulation 2 溶媒を投与した 1 頭及びアフリベルセプトの 4 又は 7mg/eye を投与した各群（formulation 1、2 又は 3）10 頭中 1～2 頭に ADA 陽性反応が観察された。遊離型及び結合型アフリベルセプト濃度に対する ADA の明らかな影響は、formulation 1 の 7mg/eye を投与した 1 頭及び formulation 2 の 7mg/eye を投与した 2 頭のみで観察された。これら 3 頭の ADA 計数比（ADA associated count ratio；ADA の投与前値と投与後値の比）は、他の ADA 陽性動物よりも高かった。これら 3 頭の薬物濃度データは平均濃度及び TK 解析対象から除外した。

一般状態、体重、摂餌量、神経学的検査、脈拍数、呼吸数、体温、パルスオキシメトリー評価、血圧、IOP、眼写真、FA、ERG、VEP 及び心電図にアフリベルセプト投与による影響は認められなかった。臨床病理学的パラメータ、肉眼所見及び臓器重量にも、アフリベルセプト投与に関連した明らかな影響は認められなかった。なお、formulation 1 の雌動物及び formulation 2 の雄動物高用量群において軽微な赤血球系パラメータの増加又は増加傾向が観察されたが、骨髄検査で関連する変化は認められず、毒性学的意義は低いと考えられた。

眼科学的検査に関して、溶媒対照の 3 種類すべての硝子体内投与は忍容性が良好であったが、formulation 1 及び 3 では軽度(0.5～1+房水細胞)ながら、一過性の前眼部炎症徴候が認められた。Formulation 1、2 又は 3 すべてのアフリベルセプト 4 又は 7mg/eye の硝子体内投与も忍容性は良好であったが、全体として軽度かつ一過性の前眼部炎症徴候が観察された。Formulation 1 でアフリベルセプトそれぞれを投与した眼の細胞スコアは最大 0.5+であり、formulation 2 又は 3 でアフリベルセプト 4mg/eye を投与した眼では最大 1+であった。Formulation 2 のアフリベルセプト 4mg/eye 群の片眼においても、軽度（0.5+）の房水フレアが認められた。アフリベルセ

プト 7mg/eye を投与した眼の細胞スコアは軽度（0.5～1+）であることが多く、formulation 1 のアフリベルセプト 7mg/eye では最大 3+及び 2+（各 1 例）、formulation 2 又は 3 のアフリベルセプト投与眼では最大 2+（各群 1 例）であった。Formulation 1、2 及び 3 のアフリベルセプト 7mg/eye 投与眼（各々2 例、4 例及び 1 例）にも、軽度（0.5+）の房水フレアが認められた。後眼部の所見は全体として軽度（0.5～1+）の硝子体細胞に限られ、投与手技に関連したものと考えられ、溶媒を投与した対照動物の所見と同程度であった。前房の炎症反応は大部分の例では次回の検査時あるいは次回投与前までにおおむね消失し、ERG、眼の画像診察及び病理組織学的検査所見に関連した変化は認められなかった。全体として眼の炎症徴候は軽度で一過性であったことから、毒性所見とはみなさなかった。

投与期間終了後剖検時の病理組織学的所見において、アフリベルセプト 4 又は 7mg/eye を投与した動物では、3 処方すべてで鼻甲介呼吸上皮のびらん及び/又は潰瘍形成、扁平上皮化生及び軽微な出血が認められた。これら所見の発現率及び程度は formulation 2 投与群で高い頻度及び強い傾向がみられたが、formulation 1 及び 3（3 回投与）と比較して formulation 2（7 回投与）の投与回数が多く、投与期間が長かった影響と考えられた。いずれの処方についても用量-反応関係は明らかではなかった。対照群 1 頭（formulation 1 投与期間終了後剖検）においても呼吸上皮の軽微なびらんが観察された。休薬期間終了時屠殺群では、3 種類すべての処方でアフリベルセプト投与動物に、鼻甲介の潰瘍形成は認められなかった。休薬期間終了時の病変の発現頻度及び程度は投与終了時屠殺時と比較して低い頻度で程度も弱く、休薬による可逆性が確認された。なお、formulation 2 の投与期間終了時雌動物で脾臓重量の減少が、formulation 3 の休薬期間終了時雌動物で子宮重量の減少がみられたが、組織学的検査で関連する異常は認められなかったことから毒性学的意義は低いと考えられた。

初回承認申請時に提出したサル 8 ヵ月間反復硝子体内投与試験（AMD CTD:4.2.3.2-11 VGFT-TX-05011）において、2～4mg/eye の反復硝子体内（両眼）投与により鼻甲介の呼吸上皮にびらん・潰瘍などの病理組織学的所見が認められること、無毒性量は 0.5mg/eye であることが既に判明している。本試験では 4 及び 7mg/eye の用量で高濃度製剤を反復硝子体内投与したところ、8 ヵ月間反復投与試験と同じく鼻甲介の呼吸上皮の変化がみられたが、新たな毒性が生じることはなかった。

2.6.6.3.2　カニクイザルにおける高濃度高分子量分子種を含む高濃度製剤の3ヵ月間反復硝子体内投与毒性及びトキシコキネティクス試験

参照項目：4.2.3.2.2　R-14270

本試験はアフリベルセプト高濃度製剤中の高濃度の高分子量分子種[a)]の安全性を担保するために実施した（GLP準拠）。当該サル3ヵ月間硝子体内投与毒性試験では、高分子量分子種を約[redacted]%及び[redacted]%含む高濃度製剤を用い、臨床開発における高濃度・高用量8mg投与を支持することを目的とした。

本試験では、各群5頭の雄性カニクイザルに、約[redacted]%（formulation 1）又は[redacted]%（formulation 2）の高分子量分子種を含むアフリベルセプト5.6mg/eyeを、4週間毎（投与期間の第1、29、57及び85日目）に両眼へ反復硝子体内投与した（計4回投与）。5.6mg/eyeの用量は、臨床曝露量を越えることが予測される用量として設定した。被験物質は、[redacted]mM L-ヒスチジン、[redacted]mM L-アルギニン、[redacted]%精製白糖及び[redacted]%ポリソルベート20の溶媒から成るアフリベルセプト8mg製剤を支持する処方とした。対照群には溶媒のみを同様に反復硝子体内投与した（投与容量40μL/眼）。各群3頭を3ヵ月の投与期間終了時に剖検し、残りの各群2頭を最終投与後3ヵ月の休薬期間終了後に剖検した。試験デザインを表2.6.6.3- 2に示す。

表2.6.6.3- 2　カニクイザルにおける高濃度高分子種を含む高濃度製剤の3ヵ月間反復硝子体内投与試験の試験デザイン

Group [a]	No. of Animals [b] Males	Dosing Regimen		Nominal Dose Level (mg/eye/dose)[c]	Nominal Dose Concentration (mg/mL)
		Left Eye	Right Eye		
1	5	Control Article	Control Article	0	0
2	5	Test Article Formulation 1 (approx. [redacted] % HMWs)	Test Article Formulation 1 (approx. [redacted] % HMWs)	5.6	140
3	5	Test Article Formulation 2 (approx. [redacted] % HMWs)	Test Article Formulation 2 approx. [redacted] % HMWs)	5.6	140

HMWs: high molecular weight species
a　Group 1 were administered control article only
b　Three animals/sex/dose were designated as terminal animals (Day 92), and 2 animals/sex/dose were designated as recovery animals (based on survival; Day 85 of the recovery period)
c　Dose levels were based on a dose volume of 40 µL/eye/dose

本試験の毒性は、生死、一般状態、体重、（定性的）摂餌量、眼科観察、眼圧（IOP）測定、眼底写真（OP）、蛍光眼底造影（FA）、網膜電図（ERG）測定、及び病理学的検査に基づいて評価した。これらには眼球及び（サルにアフリベルセプトを反復硝子体内投与後に認められた唯一の全身標的臓器として）鼻甲介と隣接組織（眼瞼、涙腺、視神経、下顎及び耳下腺のリンパ節、鼻

---

a）高分子量分子種（純度試験で高分子量領域に溶出する凝集体）は、既承認の2mg製剤中にも含有されている不純物（2mg製剤中の規格[redacted]%以下；既承認の2mg製剤承認書 参照）であり、本剤（8mg製剤）中ではより高濃度が含有されることから、[redacted]%及び[redacted]%の高濃度製剤を用いて反復投与毒性試験（4.2.3.2.2　R-14270）を実施した。最終的に本剤中規格は[redacted]%以下と規定された（2.3.P.5.1参照）。規格上限[redacted]%高分子量分子種を含む本剤8mgをヒト片側硝子体内へ投与したときの高分子量分子種のヒト最大投与量は[redacted]mgであり、カニクイザルへ[redacted]%及び[redacted]%高分子量分子種を含む高濃度製剤の5.6mg/eye（両眼への11.2mg）硝子体内投与時の高分子量分子種の投与量は[redacted]mg/eye及び[redacted]mg/eye（両眼への[redacted]mg及び[redacted]mg）に相当し、硝子体容積比（ヒト2：サル1）を考慮すると、いずれの濃度もヒト最大投与量に比して高いと考えられる。

咽頭）の剖検時肉眼的検査のほか、病理組織学的検査を含めた。更に、採血して TK 評価及び抗薬物抗体分析を実施し、硝子体液を採取してアフリベルセプト濃度を分析した。

試験デザイン概略及び詳細な成績を 2.6.7.7.2 に示す。

ほとんどの動物（アフリベルセプト formulation 1 又は 2 投与群の各々4/5 又は 5/5 頭）は、5.6mg/eye の両眼硝子体内投与後少なくとも 3 週間、血漿中遊離型アフリベルセプトに継続的に曝露された。4 週間の投与間隔の終了時には、休薬期間終了時の全動物と同様に、血漿中濃度はごくわずか又は検出不能であった。血漿中の結合型アフリベルセプトの継続曝露は、投与期間及び休薬期間を通して全動物で観察された。C_{max} に関しても、また AUC_{tau} に関しても、遊離型又は結合型アフリベルセプトの明らかな蓄積傾向は認められなかった。遊離型及び結合型アフリベルセプト濃度及び TK について、2 種類の異なるアフリベルセプト formulation 群間で顕著な差異は認められなかった。

アフリベルセプトのサルに対する免疫原性はごくわずかであった。Formulation 1 投与群では全例が ADA 陰性であった。Formulation 2 投与群では 5 頭中 1 頭のみが弱い ADA 陽性反応を示した（試験前の 1.2 倍程度までの軽度な反応）が、遊離型及び結合型アフリベルセプト濃度に対する ADA の影響は認められなかった。したがって、いずれの測定値も TK 解析から除外しなかった。

試験期間中に死亡例は認められず、全動物が予定屠殺時まで生存した。更に、formulation 1 又は 2 投与に関連した一般状態及び摂餌量の変化、体重への影響は認められなかった。眼（硝子体）局所反応に関しては、硝子体内投与後に投与群間で明らかな、又は一貫した眼圧の差は認められなかった。OP 及び FA において formulation 1 及び 2 投与に関連した眼底異常は認められず、ERG 及び VEP 波形（ERG 検査で確認される visual-evoked potential waveforms）にも有意な変化は認められなかった。

最終屠殺時又は休薬期間終了後屠殺時に、formulation 1 又は 2 投与に関連した病理組織学的所見、剖検所見、臓器重量の変化は認められなかった。

溶媒対照又は formulation 1 又は 2 のアフリベルセプト 5.6mg/eye の反復硝子体内投与は忍容性が良好であり、軽度 (0.5～1+) の房水細胞又はフレアが散発的にみられ、アフリベルセプト投与群では軽度 (0.5～1+) の硝子体細胞が軽度な炎症の徴候として溶媒対照投与群よりやや高頻度に認められた。この硝子体細胞は休薬 85 日目までに消失した。Formulation 1 又は 2 を投与した動物で認められた所見の程度は同等であり、対照溶媒を投与した眼で認められた所見と比較してわずかに出現頻度が高かったのみであった。

以上をまとめると、約[redacted]%（formulation 1）又は[redacted]%（formulation 2）の高分子量分子種を含む 5.6mg/eye のアフリベルセプトを、カニクイザルに 4 週間に 1 回両眼へ、13 週間（計 4 回）反復硝子体内投与したところ、軽度で可逆的な眼の炎症徴候が認められたが、対照溶媒投与群でも認められた所見と同程度であり、その頻度がわずかに高かったのみであった。本試験では 5.6mg/eye、投与容量 40μL/眼の反復硝子体内投与により、鼻粘膜病変は認められなかった。したがって、サルに約[redacted]又は[redacted]%の高分子量分子種を含むアフリベルセプト 5.6mg/eye を反復硝子体内投与したときの忍容性は良好であり、本試験の無毒性量は 5.6mg/eye であった。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

試験は実施されていない。

2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

試験は実施されていない。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

新たな試験は実施されていない。

2.6.6.7　局所刺激性試験

独立した局所刺激性試験は実施していないが、高濃度 8mg/eye 投与時の眼球（硝子体）局所への影響はカニクイザルの 6 ヵ月間反復硝子体内投与試験（2.6.6.3.1）で評価した。アフリベルセプト高濃度申請用処方の反復硝子体内投与により、前眼部に炎症徴候（硝子体細胞及び房水フレア）がみられたが、軽度及び一過性の変化で IOP 及び ERG その他の眼科学的検査及び眼の組織学的検査で関連する変化は認められなかった。したがって、毒性所見とは考えられず、問題となる局所刺激性は認められなかった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　新添加物の安全性評価

本剤（8mg 製剤）中に配合されている L-アルギニン塩酸塩、L-ヒスチジン塩酸塩水和物、精製白糖及びポリソルベート 20 は医薬品添加剤としての硝子体内投与による使用前例がないか、その 1 日最大投与量が使用前例を超える（表 2.6.6.8- 1）。したがって、これらの添加物を硝子体内投与したときの安全性について以下のとおり評価した。

表 2.6.6.8- 1　本剤（8mg 製剤）に配合されている添加物の 1 日最大投与量及び使用前例

添加物名	投与経路	本製剤投与時の 1 日最大投与量(0.07mL)	使用前例
L-アルギニン塩酸塩 [MW210.66]	硝子体内	0.737mg（L-アルギニン[MW174.2]として 0.61mg 又は 0.0102mg/kg [a]）	N/A
	静脈内	-	120mg [b]
L-ヒスチジン塩酸塩水和物 [MW209.63]	硝子体内	0.093mg（L-ヒスチジン[MW155.15]として 0.069mg*又は 0.00115mg/kg [a]）	0.083mg [c]
	静脈内	-	50mg [b]
L-ヒスチジン	硝子体内	0.04mg*（0.00067mg/kg [a]）	0.155mg [d]
	静脈内	-	624mg [b]
精製白糖	硝子体内	3.50mg（0.05833mg/kg [a]）	2.91mg [e]
	静脈内	-	39,840mg [b]
ポリソルベート 20	硝子体内	0.021mg（0.00035mg/kg [a]）	0.020mg [d]
	静脈内	-	40mg [b]

a:　体重 60kg のヒトへの投与量, N/A: not applicable, b:　医薬品添加物辞典（2021）,
c:　ルセンティス硝子体内注射液 10mg/mL；2019 年 11 月改訂添付文書（ノバルティスファーマ）
d:　バビースモ硝子体内注射液 120mg/mL；2022 年 5 月改訂添付文書（中外製薬）,
e:　ベオビュ硝子体内注射用キット 120mg/mL；2022 年 6 月改訂添付文書（ノバルティスファーマ）
*:　L-ヒスチジン塩酸塩水和物 0.093mg(L-ヒスチジンとして 0.069mg)と L-ヒスチジン 0.04mg を足した、総 L-ヒスチジンとしての 1 日最大投与量は 0.109mg と考えられる。

全身毒性及び遺伝毒性については、L-アルギニン塩酸塩、L-ヒスチジン塩酸塩水和物、精製白糖及びポリソルベート 20　のいずれも静脈内投与の使用前例があり、本剤硝子体内投与時の 1 日最大投与量をそれぞれ約 160 倍、540 倍、11,400 倍及び 1,900 倍上回っていることから、安全性が確認されているものと判断した。また、L-ヒスチジン塩酸塩水和物は投与溶液中では L-ヒスチジンとして存在し、総 L-ヒスチジンの 1 日最大投与量（0.109mg）として、バビースモ硝子体内注射液での使用前例（0.155mg）範囲内であり、硝子体内投与時の安全性も確認されていると考えられる。

硝子体内投与による眼（硝子体）局所の安全性については、8mg 製剤の臨床開発を支持するために実施した、L-アルギニン、L-ヒスチジン、精製白糖及びポリソルベート 20 を含有する媒体（formulation 2）対照群を含む、カニクイザルの 6 ヵ月間反復硝子体内投与試験（4 週間毎計 7 回投与）成績（2.6.6.3.1 及び 2.6.7.7.1：4.2.3.2.1 R-13513）より、これら添加物の安全性を検討・確認し、臨床試験を開始した。すなわち、L-アルギニン、L-ヒスチジン、精製白糖及びポリソルベート 20 を含有する媒体（formulation 2）投与対照群において、投与部位局所（眼球硝子体）を含めて毒性所見は認められなかった。したがって、これら添加物の硝子体内投与時のそ

れぞれの安全域は、硝子体容積当たりの投与量比から約 1.4 倍、2.9 倍、1.4 倍及び 1.4 倍、体重当たりの投与量比から 29 倍、57 倍、29 倍及び 29 倍と算定された（表 2.6.6.8- 2）。以上のように、これらの添加物の硝子体内投与時の安全性に問題はないと判断した。

表 2.6.6.8- 2　本剤に配合されている添加物の 1 日最大投与量と安全域

添加剤名	ヒト片眼 1 日最大投与量[a]	サル 6 ヶ月間反復硝子体内投与試験における溶媒対照群[c]における 1 日投与量[b]	安全域	
			硝子体容積当たり[d]	体重当たり
L-アルギニン塩酸塩 (MW210.66)	L-アルギニン(MW174.2)として 0.61mg/eye 又は 0.0102mg/kg [a]	L-アルギニンとして 0.871mg/both eye (0.4355mg/eye) 又は 0.29mg/kg	×1.4	×29
L-ヒスチジン塩酸塩水和物 (MW209.63)	L-ヒスチジンとして 0.069 mg/eye 又は 0.00115mg/kg [a]			
L-ヒスチジン (MW155.15)	0.04mg/eye 又は 0.000667mg/kg [a]			
	総 L-ヒスチジンとして 0.109mg/eye 又は 0.0018mg/kg [a]	L-ヒスチジンとして 0.31mg/both eye (0.155mg/eye) 又は 0.103mg/kg	×2.9	×57
精製白糖	3.5mg/eye 又は 0.05833mg/kg [a]	5.0mg/both eye (2.5mg/eye) 又は 1.7mg/kg	×1.4	×29
ポリソルベート 20	0.021mg/eye 又は 0.00035mg/kg [a]	0.03mg/both eye (0.015mg/eye) 又は 0.01mg/kg	×1.4	×29

a:　体重 60kg のヒトへの投与量
b:　投与開始時のサル体重：2.0～3.0kg より、3kg として算定
c:　L-アルギニン(50 mM)、L-ヒスチジン(20mM)、5%精製白糖及び 0.03%ポリソルベート 20 より構成された溶媒 (formulation 2) をカニクイザルの片眼当たり 50μL/日を両眼に 4 週間毎計 7 回硝子体内反復投与
d:　サルの硝子体容積はヒトの 1/2 として算定

2.6.6.9 考察及び結論

40mg/mL 製剤を用いた既承認のアフリベルセプト 2mg/eye の臨床投与を支持する既提出の毒性試験に加えて、2 つのカニクイザル反復硝子体内投与毒性試験を追加実施した。安全性プロファイルが既承認のアフリベルセプト 2mg/eye 製剤で確立されているものと異ならないことを確認するため、高濃度製剤を用いた 6 ヵ月間の反復硝子体内投与試験を実施した（2.6.6.3.1）。また、アフリベルセプト 8mg/eye 製剤中の高濃度高分子量分子種の安全性を担保するため、約 [redacted] 及び [redacted]%の高分子量分子種を含む処方を用いて、3 ヵ月間反復硝子体内投与試験を実施した(2.6.6.3.2)。

カニクイザルの 6 ヵ月間反復硝子体内投与試験（2.6.6.3.1）における眼（硝子体）局所への影響は、一過性の前眼部炎症兆候に限定されていた。高濃度製剤（80mg/mL 及び 140mg/mL）を 4mg/eye 及び 7mg/eye の用量で両眼へ反復硝子体内投与時の忍容性は良好であり、硝子体内投与後に軽度かつ一過性の前眼部炎症徴候（1 例 1 回片側でのスコア+2、他は+1 までの房水細胞及びスコア 0.5 の房水フレア）が観察されたが、次回の観察時までにおおむね消失し、2 回目以降の投与後には初回投与後より軽減した。また、この炎症徴候は網膜電位図、眼底写真及び眼の病理組織学的検査で関連する変化が認められなかったことから、毒性所見とは判断しなかった。

初回申請時に既提出のカニクイザル 8 ヵ月間反復硝子体内投与試験（AMD CTD 4.2.3.2-11 VGFT-TX-05011）では最高 4mg/eye までの用量を両側に 4 週間に 1 回ずつ計 9 回反復硝子体内投与したところ、眼局所以外の毒性標的は鼻甲介の呼吸上皮（びらん・潰瘍など）に限定されていた。臨床 8mg/eye 投与を支持するために今回新たに実施したサル 6 ヵ月間反復硝子体内投与試験では、高濃度製剤（80mg/mL 及び 140mg/mL）を用い、4mg/eye 及び 7mg/eye の高用量（サルとヒトの硝子体容積比を考慮すると、ヒトへ各々8mg/eye 及び 14mg/eye 投与に相当）を 4 週間に 1 回ずつ両側に計 7 回反復硝子体内投与した。その結果、毒性標的は先のサル 8 ヵ月間反復硝子体内投与試験結果と同じく、鼻甲介の呼吸上皮のみであり（表 2.6.6.9- 1）、高用量投与による新たな毒性は生じなかった。また、当該所見は先の 8 ヵ月間反復硝子体内投与試験と同様に、休薬により回復又は軽減する可逆性変化であった。

表 2.6.6.9- 1 高濃度製剤を用いたカニクイザルにおける 3 ヵ月間の回復性評価を含む 6 ヵ月間反復硝子体内投与毒性及び TK 試験における鼻甲介の病理組織学的所見

	6-month IVT study + 12 weeks Recovery, VGFT-TX-18169		
Formulation	20 mM L-histidine, 50 mM L-arginine, 5 % sucrose, 0.03 % polysorbate 20		
Dosing phase	Control (group 2)	4 mg / eye	7 mg / eye
Erosion, resp. epithelium	0/6	4/6 (min, slight, 2x mod)	5/6 (min, 2x slight, 2x marked)
Ulcer, resp. epithelium	0/6	1/6 (mod)	3/6 (slight, 2x marked)
Hemorrhage	0/6	2/6 (2x min)	2/6 (2x min)
Squamous cell metaplasia	0/6	4/6 (min, 3x slight)	4/6 (min, 2x slight, mod)
Recovery phase	Control group 2	4 mg / eye	7 mg / eye
Erosion, resp. epithelium	0/4	1/4 (slight)	3/4 (2 x min, slight)
Ulcer, resp. epithelium	0/4	0/4	0/4
Hemorrhage	0/4	0/4	0/4
Squamous cell metaplasia	0/4	1/4 (mod)	1/4 (mod)

resp. epithelium = respiratory epithelium; min = minimal; mod = moderate

既提出のサル 8 ヵ月間反復硝子体内投与試験（AMD CTD 4.2.3.2-11 VGFT-TX-05011；投与量 0.5、2 及び 4mg/eye を 9 回投与）と十数年経過して今回実施した高濃度製剤を用いたサル 6 ヵ月

間反復硝子体内投与試験（4.2.3.2.1　R-13513；投与量 4 及び 7mg/eye を 7 回投与）の成績を厳密に比較することは難しいが、発生した鼻甲介の組織所見（びらん・潰瘍・出血・扁平上皮化生）の程度は同様であり、高濃度／高用量を投与した今回の試験において病変発生率が高い傾向がみられた。

既提出のサル 8 ヵ月間反復硝子体内投与試験（AMD CTD 4.2.3.2-11 VGFT-TX-05011）において、鼻甲介への影響を認めなかった無毒性量（0.5mg/eye）での全身曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}28days}$）は、本剤 8mg/eye を nAMD 又は DME 患者の片眼へ反復硝子体内投与したとき（国外第Ⅱ相 CANDELA 試験、国際共同第Ⅲ相 PHOTON 及び PULSAR 試験の母集団薬物動態解析：5.3.3.5.2 Table 21）の全身曝露量（$C_{max\ week8\text{-}12}$：0.154μg/mL 及び $AUC_{week8\text{-}12}$：48.72μg·h/mL）と比較して、各々5.2 倍及び 3.3 倍高かった（表 2.6.6.9- 3）。

高分子量分子種を約[redacted]%及び[redacted]%含む高濃度製剤を用いたサル 3 ヵ月間反復硝子体内投与試験（2.6.6.3.2；4.2.3.2.2　R-14270）では、5.6mg/eye の用量を両眼に 4 週間隔で計 4 回反復硝子体内投与した。その結果、前眼部に軽度かつ可逆的な炎症兆候が観察されたものの、鼻甲介上皮に病理組織学的異常所見は認められなかった。鼻甲介上皮に病変が観察された先の 6 ヵ月間サル反復硝子体内投与試験（4.2.3.2.1　R-13513；高濃度研究用処方 4mg/eye の 9 週間反復硝子体内投与群）に比べて、血漿中遊離型アフリベルセプト曝露量は高かった（C_{max}:10.2 及び 12.9μg/mL vs 20.1 及び 21.7μg/mL、$AUC_{0\text{-}28days}$: 2832 及び 2952μg·h/mL vs 5136 及び 5448μg·h/mL）にもかかわらず、本試験で鼻甲介に病変は生じなかった（表 2.6.6.9- 2）。その成因として先の試験（50μL/eye）と比較して本試験ではより少ない投与容量（40μL/eye）としたことによる差異が一因と推察された。硝子体内投与時の 1 回投与容量が異なった場合、硝子体への投与液が涙液とともに鼻涙管へ逆流して漏出する薬剤量に差異が生じ、容量がより少なかった場合には鼻甲介上皮への影響が出現しなかった可能性、すなわち、鼻甲介上皮への影響は全身血流を介した薬剤曝露よりも鼻涙管からの漏出薬剤の曝露の寄与が大きい可能性が示唆される。

前述のように、既提出のサル 8 ヵ月間反復硝子体内投与試験（AMD CTD 4.2.3.2-11 VGFT-TX-05011）において鼻甲介への影響を認めなかった無毒性量（0.5mg/eye）での反復（両側計 9 回）硝子体内投与時の全身曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}28days}$）は、本剤 8mg/eye を nAMD 又は DME 患者の片眼へ反復硝子体内投与したときの全身曝露量の各々5.2 倍及び 3.3 倍高いに過ぎなかった。しかしながら、高濃度高分子量分子種を含む高濃度製剤のサル 3 ヵ月間反復硝子体内投与試験（2.6.6.3.2；4.2.3.2.2　R-14270）において、鼻甲介上皮にびらん・潰瘍等の病変を認めなかった無毒性量（5.6mg/eye）投与時の全身曝露量は C_{max} として 20.1 及び 21.7μg/mL、$AUC_{0\text{-}28days}$ として 5136 及び 5448μg·h/mL であり、本剤 8mg/eye を nAMD 又は DME 患者の片眼へ反復硝子体内投与したとき（国外第Ⅱ相 CANDELA 試験、国際共同第Ⅲ相 PHOTON 及び PULSAR 試験の母集団薬物動態解析：5.3.3.5.2 Table 21）の全身曝露量より C_{max} で 131 及び 141 倍、$AUC_{0\text{-}28days}$ で 105 及び 112 倍高かった。すなわち、ヒトとサルの硝子体容積の差を考慮すると、先のサル 8 ヵ月間反復硝子体内投与試験（AMD CTD 4.2.3.2-11 VGFT-TX-05011）での投与容量（50μL/eye）は、ヒトへの 100μL/眼投与に相当し、今回実施したサル 3 ヵ月間反復硝子体内（両眼）投与試験（2.6.6.3.2）の投与容量（40μL/eye）でもヒトへの 80μL/eye 投与に相当することを考慮すると、nAMD/DME 患者への 8mg/eye 投与（70μL/eye の片側投与）後に鼻粘膜に悪影響がみられる可能性は低いと考えられた。

追加実施した 2 つのサル反復硝子体内投与毒性試験を含む一連のサルを用いた主要な硝子体内反復投与毒性試験及びウサギを用いた生殖発生毒性試験（初回申請時に既提出）における無毒性量及び LOAEL における血漿中遊離型曝露量（C_{max} 及び AUC）と nAMD 又は DME 患者への 8mg/eye の硝子体内片眼投与後の全身曝露量（国外第Ⅱ相 CANDELA 試験、国際共同第Ⅲ相 PHOTON 及び PULSAR 試験の母集団薬物動態解析：5.3.3.5.2 Table 21）の比を表 2.6.6.9- 3 に示す。

生殖発生毒性に関しては、既提出のウサギ胚・胎児発生に関する試験（AMD CTD 4.2.3.5.2-5 PH-36888）において、最低用量（LOAEL：0.1mg/kg を妊娠 1,7 及び 13 日目に皮下投与）から催奇形性が認められ、安全域が得られていない。更に、この LOAEL での全身曝露量は、本剤 8mg/eye を nAMD 又は DME 患者の片眼へ反復硝子体内投与したとき（国外第Ⅱ相 CANDELA 試験、国際共同第Ⅲ相 PHOTON 及び PULSAR 試験の母集団薬物動態解析：5.3.3.5.2 Table 21）の全身曝露量と同程度であった。したがって、アフリベルセプト 8mg は妊娠中に使用すべきではない。この点は、既に市販中のアフリベルセプト（40mg/mL）の承認用量（2mg）での添付文書において、「妊婦又は妊娠している可能性のある女性は投与禁忌、妊娠可能な女性には投与中、適切な避妊法を用いるよう指導すること」と規定している注意喚起を踏襲すべきである。避妊期間に関しては、既承認用量（2mg）では AMD 及び DME を対象とした国際共同第 3 相試験（VIEW2 試験及び GALILEO 試験）などから、血漿中遊離型アフリベルセプト濃度が定量下限値（15.6ng/mL）以下になるのは投与後 8 週であった。安全を期するために、8 週に 1 ヵ月を加えて、「最終投与後少なくとも 3 ヵ月間」は適切な避妊法を用いることとされている。今般の 8mg を nAMD 又は DME 患者へ投与後に血漿中遊離型アフリベルセプト濃度が定量下限値（15.6ng/mL）以下になるのは投与後約 10 週であったこと（国外第Ⅱ相 CANDELA 試験、国際共同第Ⅲ相 PHOTON 及び PULSAR 試験の母集団薬物動態解析：5.3.3.5.2 Table 7：中央値の 99%信頼区間上限）から、同様に 1 ヵ月を加えて「最終投与後少なくとも 4 ヵ月間」の避妊期間が必要と考えられた。

本剤中の L-アルギニン塩酸塩、L-ヒスチジン塩酸塩水和物、精製白糖及びポリソルベート 20 は医薬品添加剤としての硝子体内投与による使用前例がないか、その 1 日最大投与量が使用前例を超える。これらの添加物については、本剤の一日最大投与量を上回る量の静脈内投与における使用前例があることから、全身に対する安全性は既に確認されていると考えられる。硝子体内投与による局所に対する影響については、追加実施されたサル 6 ヵ月間反復硝子体内投与試験（2.6.6.3.1 及び 2.6.7.7.1）におけるこれら添加物を含む溶媒対照（formulation 2）群の成績に基づき評価した。当該対照溶媒を反復硝子体内投与すると、稀に前眼房に軽微で一過性かつ可逆性の細胞反応がみられたが、眼圧検査、網膜電図検査、眼底検査、眼底蛍光造影及び病理組織検査では異常は認められず、問題となるような毒性及び局所刺激性は認められなかった。したがって、本剤の用法・用量に従った臨床適用において、本剤中に配合される上記 4 つの添加物に安全性上の懸念はないと考えられる。

結論

一連の毒性試験結果から、アフリベルセプトの高濃度製剤（114.3mg/mL）を 8mg の用量（容量 0.07mL）で nAMD 及び DME の患者に硝子体内投与するときの安全性に問題はないと考えられる。

表 2.6.6.9- 2 アフリベルセプト（0.5～5.6mg/eye）の長期反復硝子体内投与後のサルにおける鼻甲介組織所見一覧

Study	3-month IVT study + Recovery VGFT-TX-20170			8-month IVT study + Recovery VGFT-TX-05011						6-month / 9-week IVT study + Recovery VGFT-TX-18169					
Formulation	A (8 mg formulation*)			B		C (2 mg formulation)				D		E		A (8 mg formulation**)	
Injection volume	40 µL/eye bilaterally			50 µL/eye bilaterally						50 µL/eye bilaterally					
Treatment duration	3 months			8 months						3 months		3 months		6 months	
Dose (mg/eye)	0	5.6	5.6	0	2	0	0.5	2	4	0	4	0	4	0	4
C_{max} (µg/mL)	NA	21.7	20.1	NA	4.46	NA	0.802	6.49	8.97	NA	12.9	NA	10.2	NA	11.4
$AUC_{(0\text{-}28\ days)}$ (µg·h/mL)	NA	5448 (post 2nd dose)	5136 (post 2nd dose)	NA	2023 (post 7th dose)	NA	160 (post 7th dose)	1393 (post 7th dose)	3360 (post 7th dose)	NA	2952 (post 3rd dose)	NA	2832 (post 3rd dose)	NA	3432 (post 7th dose)
Nasal Turbinate Findings - Dosing Phase															
Inflammation, chronic, active				0/8	8/8 (min-slight)	1/8 (slight)	3/8 (min-slight)	5/8 (mini-mod)	3/7 (slight)						
Resp. epithelium: Erosion/Ulceration				0/8	6/8 (slight-mod)	0/8	0/8	2/8 (slight-mod)	1/7 (slight)						
Erosion	0/3	0/3	0/3							1/6 (min)	3/6 (slight-mod)	0/6	4/6 (min-mod)	0/6	4/6 (min-mod)
Ulceration	0/3	0/3	0/3							0/6	2/6 (min-mod)	0/6	1/6 (mod)	0/6	1/6 (mod)
Hemorrhage	0/3	0/3	0/3	0/8	1/8 (slight)	0/8	0/8	0/8	0/7	0/6	1/6 (min)	0/6	0/6	0/6	2/6 (min)
Squamous metaplasia#	0/3	0/3	0/3	0/8	1/8 (slight)	0/8	0/8	0/8	0/7	0/6	1/6 (slight)	0/6	3/6 (min-slight)	0/6	4/6 (min-slight)
Nasal Turbinate Findings - Recovery Phase															
Inflammation, chronic, active				1/4 (mini)	1/4 (mini)	1/4 (mini)	3/4 (mini)	2/4 (mini)	1/4 (mini)						
Resp. epithelium: Erosion/Ulceration				0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4						
Erosion	0/2	0/2	0/2							0/4	1/4 (mod)	0/4	1/4 (min)	0/4	1/4 (slight)
Ulceration	0/2	0/2	0/2							0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Hemorrhage	0/2	0/2	0/2	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Squamous metaplasia#	0/2	0/2	0/2	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4 (slight)	0/4	0/4	0/4	1/4 (mod)

#: conversion from respiratory to squamous epithelium; min.: minimal; mod: moderate, NA: not applicable
Formulation A: aflibercept 8 mg formulation (*: [redacted] mM L-histidine or **: 20 mM L-histidine, 50 mM L-arginine, 5% sucrose, 0.03% polysorbate 20), similar to clinical aflibercept 8 mg formulation (10 mM L-histidine, 50 mM L-arginine, 5% sucrose, 0.03% polysorbate 20) ;0, 80**, 140* mg/mL
Formulation B: research formulation aflibercept 2 mg ([redacted] mM [redacted], no sucrose, [redacted]% polysorbate 20) ; 0 & 40 mg/mL
Formulation C: commercial aflibercept 2 mg formulation (40 mM NaCl, 5% sucrose, 0.03% polysorbate 20); 0, 10, 40 & 80 mg/mL
Formulation D: research formulation aflibercept 8 mg ([redacted] mM L-histidine, [redacted]% sucrose, [redacted]% polysorbate 20); 0, 80 mg/mL
Formulation E: research formulation aflibercept 8 mg ([redacted] mM L-histidine, [redacted] mM [redacted], [redacted]% sucrose, [redacted]% polysorbate 20);0, 80 mg/mL

表 2.6.6.9- 3 サル反復硝子体内（両側）投与及びウサギ生殖発生毒性試験の遊離型曝露量と本剤 8mg/eye を nAMD 又は DME 患者へ硝子体内（片側）投与後の遊離型曝露量との比

Study Type / Report No.	Dose	Exposure of Free Aflibercept in Plasma		Safety Margins / Exposure Ratios[a]	
		Mean C_{max} (µg/mL)	Mean $AUC_{0\text{-}28\ days}$ (µg·h/mL)	Based on C_{max}	Based on AUC
Human	*Unilateral IVT treatment*				
Model-prediction exposures (C_{max} and AUC in weeks 8-12) after intravitreal injections of 8 mg aflibercept in study eye on Weeks 0, 4, and 8 in Patients with nAMD or DME [a] Module 5.3.3.5.2, R-14327, Quantitative Pharmacology Simulation PK Report,VGFT-PK-22159-SR-01V1, Table 21	8 mg/eye (unilateral)	0.154 (week8-12)	48.72 (week8-12)	NA	NA
Cynomolgus monkeys	*Bilateral IVT treatment (every 4 weeks)*				
8-Month IVT Toxicity AMD CTD M4.2.3.2-11, Report VGFT-TX-05011	NOAEL: 0.5 mg/eye[b] LOAEL: 2 mg/eye[b]	0.802 4.46	160 2023	5.2 29	3.3 42
6-month IVT Toxicity (high concentration bridging study) Module 4.2.3.2.1, R-13513	NOAEL: ND LOAEL: 4 mg/eye[c]	12.3	3264	80	67
3-month IVT Toxicity (high concentration bridging study with [redacted] and [redacted]% HMWs) Module 4.2.3.2.2, R-14270	NOAEL: 5.6 mg/eye ([redacted]%)[d] 5.6 mg/eye ([redacted]%)[d]	21.7 20.1	5448 5136	141 131	112 105
	IV treatment (IV infusion for 30 min., weekly up to week 15, then every other week)				
6-month IV Toxicity (Including Investigation of Fertility) AMD CTD M4.2.3.2-15, Report VFGT-TX-05009	LOAEL: 3 mg/kg[b]	94.6	4416	614	90
Rabbits	*IV administration (GD 6, 9, 12, 15, 18) / SC administration (GD 1, 7, 13)*				
Reproductive IV Toxicity (EFD study) AMD CTD M4.2.3.5.2-3, Report VGFT-TX-06002	LOAEL EFD: 3 mg/kg[b]	56.1	1935	364	40
Reproductive SC Toxicity (EFD study) AMD CTD M4.2.3.5.2-5, Report PH-36888	LOAEL EFD: 0.1 mg/kg[b]	0.259	28.8	1.7	0.6

AUC = Area under the concentration time curve; C_{max} = Maximal concentration; GD = Gestation day; IVT = intravitreal; IV = intravenous; SC = subcutaneous; EFD = embryofetal development; NA = not applicable; ND: not determined; NOAEL = No observed adverse effect level; LOAEL = Lowest observed adverse effect level

a: In the Phase 2b study CANDELA and the two Phase 3 studies PHOTON and PULSAR the initial three IVT doses were given at an interval of 4 weeks as a loading dose, while longer treatment intervals were applied later. As a conservative approach, the PopPK model-predicted exposures for free aflibercept following three initial IVT doses of aflibercept in participants with nAMD or DME after the third dose was used for the calculation of exposure multiples. For details see: Module 5.3.3.5.2, R-15327, Quantitative Pharmacology Simulation PK Report, VGFT-PK-22159-SR-01V1, Table 21

b: C_{max} and $AUC_{0\text{-}28days}$ in already submitted toxicology studies were copied from AMD CTD M2.6.6 (page 47 of 53). AUCs for 6-month IV study in monkeys and reproductive IV study in rabbits were $AUC_{0\text{-}168hrs}$, AUC for reproductive SC study in rabbits was $AUC_{0.5\text{-}72hrs}$.

c: The mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}28days}$ (AUC from 136 µg·day/mL reported value) at 4 mg/eye in M4.2.3.2.1, R-13513, Appendix 9.5 Toxicokinetic Report, Table 1; after the 2nd dose (the C_{max} and $AUC_{0\text{-}28days}$ values after the 2nd dose were selected, since after the 7th dose the dosing interval extended into the recovery period and there was no 28 days sample taken. Therefore, AUC_{tau} was an extrapolated $AUC_{0\text{-}28days}$).

d: The mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}28days}$ (AUCs from 227 and 214 µg·day/mL reported values for material with [redacted] and [redacted]% impurities (high molecular weight species) at 5.6 mg/eye in M4.2.3.2.2, R-14270, Appendix 9.5 Toxicokinetic Report, Table 1; after the 2nd dose (the 2nd dose was chosen, since TK was measured up to 28 days post dose, while after the 3rd and 4th dose it was only measured up to 21 or 7 days post dose, respectively).

2.6.6.10　　図表

図表は適切に配置した。

引用文献一覧

引用文献なし

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

Test Article: VEGF Trap (aflibercept)

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/eye/adm.)	GLP Compliance	Testing Facility	Report No. [Study Identifier]	Location
Single Dose Toxicity - NA							
Repeat Dose Toxicity							
Monkey (cynomolgus)	Intravitreal	9 weeks or 6 months	0, 4, 7	Yes	[redacted], USA	R-13513 [VGFT-TX-18169]	4.2.3.2.1
Monkey (cynomolgus)	Intravitreal	13 weeks	0, 5.6 ([redacted]% HMWs), 5.6 ([redacted]% HMWs)	Yes	[redacted], USA	R-14270 [VGFT-TX-20170]	4.2.3.2.2
Genotoxicity - NA							
Carcinogenicity - NA							
Reproductive and Development Toxicity - NA							
Local Tolerance - NA							
Other Studies - NA							

Abbreviations: NA = not applicable, HMWs = High Molecular Weight Species, NOAELs were underlined.

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: VEGF Trap (aflibercept)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/eye/adm.)	GLP Compliance	Report No. [Study Identifier]	Location
Single-Dose Toxicity – NA						
Repeat-Dose Toxicity						
9-week or 6-month study	Cynomolgus Monkey	Intravitreal	0, 4, 7	Yes	R-13513 [VGFT-TX-18169]	4.2.3.2.1
13-week study	Cynomolgus Monkey	Intravitreal	0, 5.6, 5.6	Yes	R-14270 [VGFT-TX-20170]	4.2.3.2.2
Genotoxicity – NA						
Carcinogenicity – NA						
Reproductive and Developmental Toxicity– NA						
Local Tolerance – NA						
Studies in juvenile animals – NA						

Abbreviations: **NA** = not applicable

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: VEGF Trap (aflibercept)

Species/Strain	Cynomolgus monkey															
Report No. [Study Identifier]	R- 13513 [VGFT-TX-18169]															
Location	4.2.3.2.1															
	Free VEGF Trap (Plasma) mean C_{max}[a] (μg/mL) and mean t_{max} (days)												Free VEGF Trap (Vitreous humor) mean Concentration [b] (μg/mL)			
IVT	After 1st dose				After 3rd dose				After 7th dose				After 3rd dose		After 7th dose	
Gender	Male		Female		Male		Female		Male		Female		Male	Female	Male	Female
Number of animals	5		5		5		5		5		5		3	3	3	3
	C_{max}	t_{max}	C_{max}	t_{max}	C_{max}	t_{max}	C_{max}	t_{max}	C_{max}	t_{max}	C_{max}	t_{max}	C_{day64}	C_{day64}	C_{day176}	C_{day176}
Dose (mg/eye/adm)																
4 (Group 4: Formulation 1) [c]	13.0	1.67	14.0	2.40	11.7	2.38	14.2	3.60					274	433		
7 (Group 5: Formulation 1) [c]	26.9	1.47	31.5	1.40	21.8	1.77	25.6	2.40					292	694		
4 (Group 6: Formulation 2) [c]	17.1	1.40	14.6	4.20	12.1	1.98	13.5	3.60	9.40	4.60	13.5	4.60			283	331
7 (Group 7: Formulation 2) [c]	29.0	1.87	23.7	1.47	21.2	1.97	23.0	2.17	20.2	3.60	18.8	3.00			568	499
4 (Group 8: Formulation 3) [c]	13.0	1.80	16.5	1.87	8.77	2.40	11.6	4.40					316	409		
7 (Group 9: Formulation 3) [c]	24.4	1.63	24.2	2.40	17.5	2.05	20.2	3.80					428	608		

a: maximum concentration observed, b: concentration on the day of scheduled necropsy (Day 64 in case of formulation 1 and 3, Day 176 in case of formulation 2), 1 week after the last treatment,
c: See 2.6.7.7.1 for those composition of three formulations. adm: administration, IVT: intravitreal

Test Article: VEGF Trap (aflibercept)

Species/Strain	Cynomolgus monkey									
Report No. [Study Identifier]	R- 14270 [VGFT-TX-20170]									
Location	4.2.3.2.2									
	Free VEGF Trap (Plasma) mean C_{max} (μg/mL) and mean t_{max} (days)								Free VEGF Trap (Vitreous humor) mean Concentration [a] (μg/mL)	
IVT	After 1st dose		After 2nd dose		After 3rd dose		After 4th dose		After 4th dose	
Gender (Number of animals)	Male (5)		Male (5)		Male (5)		Male (5)		M (3)	
	C_{max}	t_{max}	C_{max}	t_{max}	C_{max}	t_{max}	C_{max}	t_{max}	C_{day92}	
Dose (mg/eye/administration)										
5.6 (Test article formulation 1 with approx. [redacted]% HMWs) [b]	19.9	1.80	21.7	1.80	23.5	3.00	21.8	2.80	460	
5.6 (Test article formulation 2 with approx. [redacted]% HMWs) [b]	20.2	2.00	20.1	2.20	18.6	2.20	16.9	2.60	560	

HMW: High Molecular Weight Species, a: concentration on the day of necropsy (Day 92), 1 week after the last treatment, b: See 2.6.7.7.2 for their composition in two formulations. IVT: intravitreal

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: VEGF Trap (aflibercept)

Batch No.	Total Protein Content (mg/mL)	Purity (%) By size exclusion HPLC	Report No. [Study Identifier]	Type of Study	Location
VEGF Trap 140 mg/mL Labeled Drug Product/ VEGF Trap 80 mg/mL Labeled Drug Product VEGF Trap Drug Product, in an aqueous buffered vehicle, containing 20 mM L-Histidine, 50 mM L-Arginine, 5% Sucrose, 0.03% Polysorbate 20, pH [redacted]			R- 13513 [VGFT-TX-18169]	9-week or 6 month intravitreal toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys	4.2.3.2.1
9040100002	[redacted]	[redacted]			
9040100003	[redacted]	[redacted]			
9040400001	[redacted]	[redacted]			
9040400002	[redacted]	[redacted]			
VEGF Trap / Aflibercept (with high concentration of high molecular weight species) containing [redacted] mM L-Histidine, [redacted] mM L-Arginine, [redacted]% Sucrose, [redacted]% Polysorbate 20, pH [redacted]			R- 14270 [VGFT-TX-20170]	13-week IVT & TK study in cynomolgus monkeys	4.2.3.2.2
9049300001[a]	[redacted]	[redacted]			
9049300002[b]	[redacted]	[redacted]			

Abbreviations:
HPLC: High-Performance Liquid Chromatography,
a: Formulation 1 containing approx. [redacted]% high molecular weight species, b: Formulation 2 containing approx. [redacted]% high molecular weight species

2.6.7.5　　単回投与毒性試験

該当なし

2.6.7.6　　反復投与毒性試験：　重要な試験以外の試験

該当なし

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

2.6.7.7.1 カニクイザルの3種類の高濃度製剤を用いた9週間又は6ヵ月間反復硝子体内投与毒性及びトキシコキネティクス試験

Test Article: VEGF Trap (Aflibercept)

Report Title:	**A 9-Week or 6-Month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study with Three Different Aflibercept (VEGF-Trap) Formulations in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase**	
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus	**Duration of Dosing**: 6 months (Formulation 2-treated group) and 9 weeks (Formulation 1 & 3-treated groups)	**Formulation 1**: Aflibercept in [redacted] mM L-histidine, [redacted]% sucrose, [redacted]% polysorbate 20, pH [redacted] (Group 1, 4 & 5) **Formulation 2**: Aflibercept in 20 mM L-histidine, 50 mM L-arginine, 5% sucrose, 0.03% polysorbate 20, pH [redacted](Group 2, 6 & 7) **Formulation 3**: Aflibercept in [redacted]mM L-histidine, [redacted]mM [redacted], [redacted]% sucrose, [redacted]% polysorbate 20, pH [redacted] (Group 3, 8 & 9)
Initial Age: 26 to 38 months	**Duration of Recovery**: 12 weeks	**Report No. [Study Identifier]:** R-13513 [VGFT-TX-18169]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration**: Intravitreal (IVT) injection	**Location**: 4.2.3.2.1 **GLP Compliance**: Yes
Special Features: Intraocular pressure measurements, ocular photography, full-field electroretinography, vital signs, neurological examinations, blood pressure measurements, electrocardiography using jacketed external telemetry, vitreous fluid collection		
No Observed Adverse Effect Level: Not established (< 4 mg/eye)		

Dose of Formulation 1 (mg/eye)[a]	0 (Control, Group 1)		4 (Low, Group 4)		7 (High, Group 5)	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of Animals at Study Start	5	5	5	5	5	5
Dosing Phase						
Toxicokinetics (Free VEGF-Trap):						
Day 1						
AUC_{tau} (day•µg/mL)	NA	NA	127	146	296	358
C_{max} (µg/mL)	NA	NA	13.0	14.0	26.9	31.5
Day 29						
AUC_{tau} (day•µg/mL)	NA	NA	106	144	179	346
C_{max} (µg/mL)	NA	NA	10.8	13.2	20.1	28.4
Day 57						
AUC_{tau} (day•µg/mL)	NA	NA	100	147	215	240
C_{max} (µg/mL)	NA	NA	11.7	14.2	21.8	25.6

Report Title:	**A 9-Week or 6-Month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study with Three Different Aflibercept (VEGF-Trap) Formulations in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase (continued)**					
Dose of Formulation 1 (mg/eye)[a]	0 (Control, Group 1)		4 (Low, Group 4)		7 (High, Group 5)	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of Animals at Study Start	5	5	5	5	5	5
Vitreus Fluid Analysis (µg/mL)						
Free VEGF concentration at post 3rd administrations (n=3)	NA	NA	274	433	292	694
ADA response						
Number of apparent ADA positive animals	0	0	0	0	1	0
Noteworthy Findings:						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-	-	-
Vital Signs	-	-	-	-	-	-
Neurological Observations	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure Measurements	-	-	-	-	-	-
Electrocardiographic Examinations	-	-	-	-	-	-
Ophthalmic Examinations	b	b	c	c	c	c
Intraocular Pressure Measurements	-	-	-	-	-	-
Electroretinographic Examinations	d	d	d	d	d	d
Ocular Imaging	-	-	-	-	-	-
Hematology						
Day 64/65						
Red blood cell count (E^6/uL)	5.50	5.12	5.57	5.89*	5.88	5.92*
Hemoglobin concentration (g/dL)	13.2	12.3	13.1	13.6*	13.7	14.2*
Hematocrit (%)	44.3	40.8	43.9	44.5	47.1	46.2*
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-
Histopathology						
Number of Animals Examined	3	3	3	3	3	3
Nasal Turbinates						
Erosion, respiratory epithelium						
Minimal	1	0	0	0	0	1
Slight	0	0	1	0	1	0
Moderate	0	0	1	1	1	0
Ulcer, respiratory epithelium						
Minimal	0	0	1	0	0	0
Moderate	0	0	0	1	0	0

Report Title:	**A 9-Week or 6-Month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study with Three Different Aflibercept (VEGF-Trap) Formulations in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase (continued)**					
Dose of Formulation 1 (mg/eye)[a]	0 (Control, Group 1)		4 (Low, Group 4)		7 (High, Group 5)	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of Animals at Study Start	5	5	5	5	5	5
Metaplasia, squamous cell						
Minimal	0	0	0	0	1	0
Slight	0	0	1	0	0	0
Hemorrhage						
Minimal	0	0	1	0	1	0
Recovery Phase						
Number of Animals in Recovery	2	2	2	2	2	2
Ophthalmic Examinations	e	e	e	e	e	e
Organ Weights	-	-	-	-	-	-
Histopathology						
Number of Animals Examined	2	2	2	2	2	2
Nasal Turbinates						
Erosion, respiratory epithelium, Moderate	0	0	1	0	0	0
Metaplasia, squamous cell, Slight	0	0	1	0	0	0

Report Title:	**A 9-Week or 6-Month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study with Three Different Aflibercept (VEGF-Trap) Formulations in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase (continued)**					
Dose of Formulation 2 (mg/eye)[a]	0 (Control, Group 2)		4 (Low, Group 6)		7 (High, Group 7)	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of Animals at Study Start	5	5	5	5	5	5
Dosing Phase						
Toxicokinetics (Free VEGF-Trap):						
Day 1						
AUC_{tau} (day•µg/mL)	NA	NA	157	171	317	247
C_{max} (µg/mL)	NA	NA	17.1	14.6	29.0	23.7
Day 29						
AUC_{tau} (day•µg/mL)	NA	NA	107	165	243	232
C_{max} (µg/mL)	NA	NA	10.4	14.2	20.3	21.0
Day 57						
AUC_{tau} (day•µg/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C_{max} (µg/mL)	NA	NA	12.1	13.5	21.2	23.0
Day 169						
AUC_{tau} (day•µg/mL)	NA	NA	127	159	331	242
C_{max} (µg/mL)	NA	NA	9.40	13.5	20.2	18.8
Vitreus Fluid Analysis (µg/mL)						
Free VEGF concentration at post 7^{th} administrations (n=3)	NA	NA	283	331	568	499
ADA response						
Number of apparent ADA positive animals	0	0	0	0	0	2
Noteworthy Findings:						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-	-	-
Vital Signs	-	-	-	-	-	-
Neurological Observations	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure Measurements	-	-	-	-	-	-
Electrocardiographic Examinations	-	-	-	-	-	-
Ophthalmic Examinations	b	b	c	c	c	c

Report Title:	**A 9-Week or 6-Month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study with Three Different Aflibercept (VEGF-Trap) Formulations in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase (continued)**					
Dose of Formulation 2 (mg/eye)[a]	0 (Control, Group 2)		4 (Low, Group 6)		7 (High, Group 7)	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of Animals at Study Start	5	5	5	5	5	5
Intraocular Pressure Measurements	-	-	-	-	-	-
Electroretinographic Examinations	d	d	d	d	d	d
Ocular Imaging	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-
Day 176						
Red blood cell count (E^6/uL)	5.56	5.22	5.89	5.48	5.89	5.46
Hemoglobin concentration (g/dL)	13.2	12.8	13.9	13.3	14.1	13.2
Hematocrit (%)	42.9	41.9	45.7	44.8	46.7*	43.6
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-
Organ Weights						
Spleen						
Absolute Organ Weight (%)[f]	3.069 g	3.156 g	+43.7	-45.9*	+26.6	-32.9*
Organ to Body Weight (%)	0.1251	0.1142	0.1407	0.0709*	0.1320	0.0827*
Organ to Brain Weight (%)	4.3747	4.6212	6.1274	2.5769*	4.9056	3.0594*
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-
Histopathology						
Number of Animals Examined	3	3	3	3	3	3
Nasal Turbinates						
Erosion, respiratory epithelium						
Minimal	0	0	0	1	0	1
Slight	0	0	1	0	2	0
Moderate	0	0	1	1	0	0
Marked	0	0	0	0	1	1
Ulcer, respiratory epithelium						
Slight	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	1	0	0
Marked	0	0	0	0	1	1
Metaplasia, squamous cell						
Minimal	0	0	0	1	1	0
Slight	0	0	3	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	1	0
Hemorrhage						
Minimal	0	0	1	1	2	0

Report Title:	**A 9-Week or 6-Month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study with Three Different Aflibercept (VEGF-Trap) Formulations in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase (continued)**					
Dose of Formulation 2 (mg/eye)[a]	0 (Control, Group 2)		4 (Low, Group 6)		7 (High, Group 7)	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of Animals at Study Start	5	5	5	5	5	5
Recovery Phase						
Number of Animals in Recovery	2	2	2	2	2	2
Ophthalmic Examinations	e	e	e	e	e	e
Histopathology						
Number of Animals Examined	2	2	2	2	2	2
Nasal Turbinates						
Erosion, respiratory epithelium						
Minimal	0	0	0	0	2	0
Slight	0	0	1	0	0	1
Metaplasia, squamous cell						
Moderate	0	0	1	0	0	1

Report Title:	**A 9-Week or 6-Month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study with Three Different Aflibercept (VEGF-Trap) Formulations in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase (continued)**					
Dose of formulation 3 (mg/eye)[a]	0 (Control, Group 3)		4 (Low, Group 8)		7 (High, Group 9)	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of Animals at Study Start	5	5	5	5	5	5
Dosing Phase						
Toxicokinetics (Free VEGF-Trap):						
Day 1						
AUC_{tau} (day•µg/mL)	BLQ	BLQ	125	155	221	267
C_{max} (µg/mL)	BLQ	BLQ	13.0	16.5	24.4	24.2
Day 29						
AUC_{tau} (day•µg/mL)	BLQ	BLQ	81.4	118	197	249
C_{max} (µg/mL)	BLQ	BLQ	8.80	10.1	18.3	21.9
Day 57						
AUC_{tau} (day•µg/mL)	BLQ	BLQ	93.1	144	200	255
C_{max} (µg/mL)	BLQ	BLQ	8.77	11.6	17.5	20.2
Vitreus Fluid Analysis (µg/mL)						
Free VEGF concentration at post 3rd administrations (n=3)	NA	NA	316	409	428	608
ADA response						
Number of apparent ADA positive animals	0	0	0	0	0	0
Noteworthy Findings:						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-	-	-
Vital Signs	-	-	-	-	-	-
Neurological Observations	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure Measurements	-	-	-	-	-	-
Electrocardiographic Examinations	-	-	-	-	-	-
Ophthalmic Examinations	b	b	c	c	c	c
Intraocular Pressure Measurements	-	-	-	-	-	-
Electroretinographic Examinations	d	d	d	d	d	d
Ocular Imaging	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-

Report Title:	**A 9-Week or 6-Month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study with Three Different Aflibercept (VEGF-Trap) Formulations in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase (continued)**					
Dose of formulation 3 (mg/eye)[a]	0 (Control, Group 3)		4 (Low, Group 8)		7 (High, Group 9)	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of Animals at Study Start	5	5	5	5	5	5
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-
Histopathology						
Number of Animals Examined	3	3	3	3	3	3
Nasal Turbinates						
Erosion, respiratory epithelium						
Minimal	0	0	1	1	2	1
Slight	0	0	1	0	0	0
Moderate	0	0	0	1	0	1
Ulcer, respiratory epithelium						
Minimal	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	1	0	1
Metaplasia, squamous cell						
Minimal	0	0	1	1	1	2
Slight	0	0	1	0	0	0
Hemorrhage						
Slight	0	0	0	0	0	1
Recovery Phase						
Number of Animals in Recovery	2	2	2	2	2	2
Ophthalmic Examinations	e	e	e	e	e	e

Report Title:	**A 9-Week or 6-Month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study with Three Different Aflibercept (VEGF-Trap) Formulations in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase (continued)**					
Dose of formulation 3 (mg/eye)[a]	0 (Control, Group 3)		4 (Low, Group 8)		7 (High, Group 9)	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Organ Weights						
Uterus/Cervix						
Absolute Organ Weight (%)[f]	NA	7.568 g	NA	-49.9	NA	-54.6
Organ to Body Weight (%)	NA	0.2894	NA	0.1732	NA	0.1408
Organ to Brain Weight (%)	NA	11.8849	NA	5.8013	NA	5.5877
Histopathology						
Number of Animals Examined	2	2	2	2	2	2
Nasal Turbinates						
Erosion, respiratory epithelium, Minimal	0	0	1	0	0	0

Abbreviations: - = No noteworthy findings; AUC_{tau} = Area under concentration-time curve calculated during the dosing interval; C_{max} = Peak concentration; GLP = Good Laboratory Practices; NA = Not applicable.

* = Statistically significant based on actual data (not on percent difference).

a Doses were administered to animals in Groups 1, 3, 4, 5, 8, and 9 on Days 1, 29, and 57 of the dosing phase.

b Intravitreous administration of all three vehicle control articles was well tolerated, although anterior segment inflammation manifested by mild (0.5 to 1+) aqueous cell was observed in eyes administered Vehicle Control Article 3 (11 instances) or Vehicle Control Article 1 (one instance) or Vehicle Control Article 2 (one instance). However, this inflammatory response resolved without complication by the next examination in all eyes, except for one eye administered Vehicle Control Article 3, in which it resolved without complication by 3 weeks postdose. Posterior segment findings were limited to mild (0.5 to 1+) vitreous cell, which was considered procedure related in all three groups administered a vehicle control article.

c Intravitreous administration of 4 or 7 mg/eye of Aflibercept Formulations 1, 2 or 3 also was well tolerated but associated with a transient dose-related anterior segment inflammatory response was generally mild in nature. In eyes administered 4 mg/eye/dose aqueous cell scores were up to 0.5+ in eyes administered Aflibercept Formulation 1 and up to 1+ in eyes administered Aflibercept Formulations 2 or 3. Mild (0.5+) aqueous flare was also observed in one eye administered 4 mg/eye/dose of Aflibercept Formulation 2. In eyes administered 7 mg/eye/dose aqueous cell scores were often mild (0.5 to 1+) but ranged up to 3+ (one instance and one instance of 2+) in eyes administered Aflibercept Formulation 1 and up to 2+ (one instance in each group) in eyes administered Aflibercept Formulations 2 or 3. Mild (0.5+) aqueous flare was also observed in one or more eyes administered 7 mg/eye/dose of Aflibercept Formulations 1 (two eyes), 2 (four eyes), and 3 (one eye). However, the anterior segment inflammatory response rapidly resolved by the next examination in all eyes (with one exception in an eye administered 4 mg/eye/dose of either Aflibercept Formulation 2 or Aflibercept Formulation 3 where aqueous cell resolved by Day 22 of the dosing phase) and was less frequent after the second (and subsequent doses) than after the first dose. Posterior segment findings were limited to mild (0.5 to 1+) vitreous cell (which was considered procedure-related) with the exception of a single instance of moderate (2+) vitreous cell in an eye administered 7 mg/eye/dose of Aflibercept Formulation 1 or Aflibercept Formulation 2. Posterior segment findings in animals administered test article formulations were comparable to findings in animals administered control vehicle.

d Several statistically significant effects were found in the analyses of covariance (ANCOVAs) performed on data recorded during Week 9 of the dosing phase (using the predose responses as the covariate) for all three subsets. The set of ANCOVAs performed on data recorded during Week 25 of the dosing phase also detected several statistically significant comparisons with controls. The statistically significant effects were considered isolated, of small magnitude, not reproduced in the fellow eye, and/or inconsistent with reduced ocular function. Therefore, statistically significant differences in ERGs were considered within the assay variation and unlikely related to test article administration for test article-treated groups, as compared with the respective three vehicle control groups.

e Mild (usually 0.5+ but rarely 1+) vitreous cell persisted through the last examination of the recovery phase (Days 85/86) in all groups except for Group 2 in which vitreous cell was last observed on Day 78 of the recovery phase.

f For control, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

2.6.7.7.2 カニクイザルにおける高濃度高分子量分子種を含む高濃度製剤の 3 ヵ月間反復硝子体内投与毒性及びトキシコキネティクス試験

Test Article: VEGF Trap

Report Title: A 3-month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study of VEGF-Trap, Administered to Cynomolgus Monkeys Followed by a 12-week Recovery Period

Species/Strain: Monkeys/Cynomolgus | **Duration of Dosing**:13 weeks | **Test Article Formulation 1**: VEGF-Trap with approx. [redacted]% High Molecular Weight Species. **Test Article Formulation 2**: VEGF-Trap with approx. [redacted]% High Molecular Weight Species.

Initial Age: 26 to 42 months | **Duration of Recovery**: 12 weeks | **Study Identifier**: R-14270 [VGFT-TX-20170]

Date of First Dose: [redacted] 20[redacted] | **Method of Administration**: Intravitreal injection | **Location**: 4.2.3.2.2

Vehicle Composition: [redacted] mM L-Histidine, [redacted]mM L-Arginine, [redacted]% Sucrose, [redacted]% Polysorbate 20, pH [redacted] | **GLP Compliance**: Yes

Special Features: Intraocular pressures, electroretinography, fundus ocular photography, and fluorescein angiography, anti-drug antibody analysis, vitreous fluid analysis

No Observed Adverse Effect Level: 5.6 mg/eye/dose (both Formulation 1 & 2)

Dose (mg/eye/dose)[a]		0 (Control)	5.6 (Test Article Formulation 1)	5.6 (Test Article Formulation 2)
Sex		Male	Male	Male
Number of Animals at Study Start		5	5	5
Dosing Phase				
Toxicokinetics (Adjusted Bound VEGF-Trap):				
Day 1				
	AUC_{tau} (day*[µg/mL])	NA	110	113
	C_{max} (µg/mL)	NA	5.42	5.59
Day 29				
	AUC_{tau} (day*[µg/mL])	NA	173	177
	C_{max} (µg/mL)	NA	7.28	7.37
Day 57				
	AUC_{tau} (day*[µg/mL])	NA	151	144
	C_{max} (µg/mL)	NA	8.00	7.69
Day 85				
	AUC_{tau} (day*[µg/mL])	NA	50.3	46.5
	C_{max} (µg/mL)	NA	7.83	7.47
Toxicokinetics (Free VEGF-Trap):				
Day 1				
	AUC_{tau} (day*[µg/mL])	NA	186	194
	C_{max} (µg/mL)	NA	19.9	20.2

Report Title:	**A 3-month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study of VEGF-Trap, Administered to Cynomolgus Monkeys Followed by a 12-week Recovery Period (continued)**			
Dose (mg/eye/dose)[a]		0 (Control)	5.6 (Test Article Formulation 1)	5.6 (Test Article Formulation 2)
Sex		Male	Male	Male
Number of Animals at Study Start		5	5	5
Day 29				
	AUC_{tau} (day*[µg/mL])	NA	227	214
	C_{max} (µg/mL)	NA	21.7	20.1
Day 57				
	AUC_{tau} (day*[µg/mL])	NA	254	209
	C_{max} (µg/mL)	NA	23.5	18.6
Day 85				
	AUC_{tau} (day*[µg/mL])	NA	126	101
	C_{max} (µg/mL)	NA	21.8	16.9
Anti-Drug Antibody	Number of ADA positive animals			
	Day 1	-	-	-
	Day 15	-	-	-
	Day 29	-	-	-
	Day 43	-	-	-
	Day 57	1	0	1
	Day 85	-	-	-
	Day 92	-	-	-
	Day 120	-	-	-
	Day 148	-	-	-
	Day 176	-	-	-
Vitreous Fluid Analysis		b	b	b
Noteworthy Findings:				
Number of Died or Sacrificed Moribund Animals		0	0	0
Clinical Observations		-	-	-
Body Weight		-	-	-
Food Consumption		-	-	-
Ophthalmic Examinations		c	c	c
Intraocular Pressure		-	-	-
Electroretinography		-	-	-

Report Title:	**A 3-month Intravitreal Toxicology and Toxicokinetic Study of VEGF-Trap, Administered to Cynomolgus Monkeys Followed by a 12-week Recovery Period (continued)**		
Dose (mg/eye/dose)[a]	0 (Control)	5.6 (Test Article Formulation 1)	5.6 (Test Article Formulation 2)
Sex	Male	Male	Male
Number of Animals at Study Start	5	5	5
Fundus Ocular Photography	-	-	-
Fluorescein Angiography	-	-	-
Organ Weights	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-
Histopathology	-	-	-
Recovery Phase			
Number of Animals in Recovery	2	2	2
No abnormal findings			

- = No noteworthy findings; AUC(tau) = Area under concentration-time curve calculated during the dosing interval; C_{max} = Maximum (peak) observed drug concentration; GLP = Good Laboratory Practices; NA = Not applicable.

a Dose formulations were administered once on Days 1, 29, 57, and 85 of the dosing phase.

b Free VEGF-trap was not measurable in any vitreous humor sample collected from control animals. Free VEGF-trap was quantifiable in vitreous humor samples collected on Day 92 of the dosing phase from animals administered VEGF-Trap Formulation 1 or 2, but it was not quantifiable on Day 85 of the recovery phase.

c Intravitreal administrations of control article or 5.6 mg/eye/dose VEGF-Trap Formulation 1 or Formulation 2 were well tolerated, and only sporadic instances of mild (0.5 to 1+) aqueous cell or flare and more frequent instances of mild (0.5 to 1+) vitreous cell were noted. Vitreous cell resolved without sequelae by Day 85 of the recovery phase. Findings noted for animals administered VEGF-Trap Formulation 1 or 2 were comparable and were only slightly greater in frequency than those observed in eyes administered control article.

2.6.7.8　　In Vitro 遺伝毒性試験

該当なし

2.6.7.9　　In Vivo 遺伝毒性試験

該当なし

2.6.7.10　がん原性試験

該当なし

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：　重要な試験以外の試験

該当なし

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

該当なし

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

該当なし

2.6.7.15　　新生児を用いた試験

該当なし

2.6.7.16　　局所刺激性試験

該当なし

2.6.7.17　その他の毒性試験

該当なし