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 単回投与毒性試験 6
2.6.6.3 反復投与毒性試験 6
2.6.6.4 遺伝毒性試験 10
2.6.6.5 がん原性試験 10
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 10
2.6.6.7 局所刺激性試験 12
2.6.6.8 その他の毒性試験 12
2.6.6.9 考察及び結論 16
2.6.6.10 参考文献 22

表

表 2.6.6- 1 毒性試験及び各試験で使用した被験物質を製造したクローンの一覧 4
表 2.6.6- 2 動物の重要な試験における NOAEL での C_{max} 又は AUC ベースの曝露比 19
表 2.6.6- 3 胚・胎児発生に関する試験における NOAEL での C_{max} 又は AUC ベースの曝露比 20
表 2.6.6- 4 重要な試験の NOAEL におけるリン酸の量 22

略語及び用語の一覧

略語及び用語	定義
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害
AUC	area under the concentration-time curve：濃度時間曲線下面積
AUC_{168h}	AUC from the time of dosing to 168 h post dosing：投与時から 168 時間までの濃度-時間曲線下面積
AUC_{21d}	AUC from the time of dosing to 21 d post dosing：投与時から 21 日までの濃度-時間曲線下面積
CDC	complement-dependent cytotoxicity：補体依存性細胞傷害
CLDN	Claudin：クローディン
CLDN18.1	claudin-18 splice variant 1, Claudin 18.1：クローディン 18.1
CLDN18.2	claudin-18 splice variant 2, Claudin 18.2：クローディン 18.2
C_{max}	maximum concentration：最高濃度
Fc	fragment crystallizable：結晶化可能フラグメント
FITC	fluorescein isothiocyanate：フルオロセインイソチオシアナート
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
Ig	Immunoglobulin：免疫グロブリン
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
Zolbetuximab	ゾルベツキシマブ：ゾルベツキシマブ（遺伝子組換え）

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

ゾルベツキシマブ（IMAB362，iMAB362 又は claudiximab）は，CLDN18.2 に結合するキメラ（マウス／ヒト）モノクローナル IgG1 抗体である。ゾルベツキシマブは，進行がん患者の治療を目的としている。

非臨床毒性試験は，規制ガイドライン（ICH S6 及び S9）に準拠し，ゾルベツキシマブの毒性プロファイルを明らかにするために実施した。

ゾルベツキシマブがヒト，マウス及びカニクイザルの CLDN18.2 に同程度の親和性で結合することから，毒性試験にはマウス及びカニクイザルを用いた。4 週間までの反復投与試験は両動物種を用いて実施した。マウス及びカニクイザルで同様の毒性プロファイルが認められたことから，13 週間反復投与試験はマウスのみで実施した。投与経路は臨床に合わせて静脈内ボーラス投与を選択した。投与頻度は，臨床の投与頻度（3 週間に 1 回）を上回る週 1 回とした。投与量は，臨床における曝露量に対して約 10 倍の曝露比を得られるように設定した。

すべての重要な試験［25469 試験，22337 試験，8951-TX-0001 試験，8951-TX-0002 試験，00319 試験］は，OECD 及び厚生労働省の基準に適合し，GLP に従って実施した。

開発当初，ゾルベツキシマブはクローン#15 から製造された。その後，クローンをクローン F02 に変更した。1 試験を除き重要な試験はいずれも，クローン F02 から製造された被験物質を用いて実施した。例外的にクローン#15 から製造された被験物質を用いて実施したのは，カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験［22337 試験］である。クローン#15 及び F02 から製造されたゾルベツキシマブの毒性プロファイルは，マウスを用いた 13 週間反復投与試験［25469 試験］及びヒト組織交差反応性試験［00319 試験］において比較した。その結果により，2 つのクローンから製造された被験物質の非臨床安全性の観点での同等性が示された。したがって，クローン#15 から製造された被験物質を用いたカニクイザルの 4 週間反復投与試験［22337 試験］から得られた結果をゾルベツキシマブの安全性評価に用いることは，妥当であると考えられた。

毒性試験と各試験で使用した被験物質を製造したクローンの一覧を下表に示した（表 2.6.6-1）

すべての単回投与試験を非 GLP 下で実施した。マウスには最高 100 mg/kg，カニクイザルには最高 150 mg/kg を投与したが，いずれの試験でも毒性はみられなかった。

ゾルベツキシマブを，マウスに 0，100，200 及び 300 mg/kg/week の用量で 13 週間（14 回）投与した。いずれの用量でも毒性はみられなかった。

ゾルベツキシマブを，カニクイザルに 0，10，30 及び 100 mg/kg/week の用量で 4 週間（5 回）投与した。本試験では，毒性はみられなかった。この試験では嘔吐がみられたが，発現頻度は低く，用量依存性もみられなかったことから，毒性とは判断しなかった。

遺伝毒性試験は，ゾルベツキシマブは抗体であり，DNA に直接相互作用するとは考えにくいため実施しなかった。

がん原性試験は，ゾルベツキシマブが ICH S9 ガイドラインの適用範囲である進行がん患者の治療を目的としているため実施しなかった。

妊娠中又は妊娠する可能性のある患者に，胚や胎児に対する潜在的なリスクに関する情報を提供するために，マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験を 0，100 及び 300 mg/kg の用量で実施した。妊娠動物又は胎児のいずれにも毒性はみられなかった。

ゾルベツキシマブは，進行がん患者の治療を目的としている。したがって，ICH S9 ガイドラインを参考に，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。雌雄生殖器に関しては，重要な反復投与試験（マウスを用いた 13 週間反復投与試験及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験）の中で病理組織学的に検査した。いずれの試験でも生殖器に毒性はみられなかった。

局所刺激性の評価は，マウスを用いた 13 週間反復投与試験及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験の一部として行った。いずれの試験でも，肉眼的検査及び病理組織学的検査で投与部位に毒性はみられなかった。

ゾルベツキシマブを投与された患者で悪心及び嘔吐が報告されている。この機序を調べる目的で，制吐剤の薬理モデルとしてしばしば用いられるフェレットを用いて，毒性発現の機序に関する試験（非 GLP）を実施した。その結果，病理組織学的検査により，1）ゾルベツキシマブ投与後の初期病変は胃粘膜表層の傷害であること，2）この傷害がフェレットの嘔吐の発症と関連があること，が明らかになった。さらに，ゾルベツキシマブによって誘発される嘔吐及び胃粘膜表層の傷害に対する制吐剤の効果を調べた。制吐剤であるホスアプレピタント単独又は他の制吐剤との併用は，ゾルベツキシマブによって誘発される嘔吐回数を抑制する効果を示した。また，デキサメタゾン又はホスアプレピタントと他の制吐剤との併用により胃粘膜表層の傷害軽減傾向が観察された。

ヒト組織交差反応性試験では，ゾルベツキシマブが細胞膜に陽性反応を示す組織は胃粘膜のみであった。予期せぬ結合はみられなかった。

以上，ゾルベツキシマブに関する非臨床安全性評価は，製造販売承認申請の要件を満たしていると考えられた。

表 2.6.6- 1　　毒性試験及び各試験で使用した被験物質を製造したクローンの一覧

Type of Study	Study Title	GLP	Study Number	Clone
Single-dose Toxicity	Single dose toxicity study of IMAB362 by single intravenous administration to NMRI mice	No	GP_P0125	#15
	Single dose toxicity study 2 of IMAB362 compared to the reference rituximab by single intravenous administration to NMRI mice	No	GP_P0117	#15
	Dose-range-finding-study of claudiximab by repeated intravenous administration to cynomolgus monkeys	No	22336	#15

Type of Study	Study Title	GLP	Study Number	Clone
Repeat-dose Toxicity	28-day toxicity study of IMAB362 by repeated intravenous administration to NMRI mice	No	GP_P0106	#15
	Dose-range-finding study for a 13-week subchronic toxicity study of IMAB362 by repeated intravenous administration to NMRI mice	Yes†	25468	#15, F02
	13-week subchronic toxicity study of IMAB362 by repeated intravenous administration to NMRI mice	Yes	25469	#15, F02
	4-week subchronic toxicity study of iMAB362 by repeated intravenous administration to cynomolgus monkeys	Yes†	22337	#15
	A single intravenous bolus toxicokinetic study of IMAB362 in cynomolgus monkeys	Yes	8951-TX-0001	F02
Reproductive and Developmental Toxicity	A preliminary single intravenous bolus toxicokinetic study of IMAB362 in non-pregnant female NMRI mice	No	8951-TX-1001	F02
	Dose-range finding study for effects of IMAB362 on embryo-fetal development by intravenous administration in NMRI mice	No	8951-TX-1002	F02
	Study for effects of IMAB362 on embryo-fetal development by intravenous administration in NMRI mice	Yes	8951-TX-0002	F02
Local Tolerance	Evaluated as part of a 13-week study in mice (Study 25469) and a 4-week study in cynomolgus monkeys (Study 22337)	NA	NA	NA
Others	An investigational study on the emetogenic potential of IMAB362 in the ferret	No	AB10622	F02
	Analysis of CLDN18 expression in cryopreserved ferret tissues by immunohistochemistry and RT-PCR	No	GP_P0118	NA
	Dose range finder for single intravenous bolus study of IMAB362 in ferrets	No	8951-TX-1003	F02
	Effects of single intravenous bolus administration of IMAB362 on emesis and gastric mucosa in ferrets	No	8951-TX-1004	F02
	Evaluation of antiemetics effect on zolbetuximab induced-emesis	No	10844	F02
	Evaluation study about antiemetics effect on emesis induced by zolbetuximab in ferrets	No	8951-TX-1005	F02
	Immunohistochemical cross-reactivity study of muMAB362 on normal human tissues	No	GP_P0110	NA
	Immunohistochemical cross reactivity study of IMAB362 on selected normal mouse tissues	No	GP_P0123	#15
	Immunohistochemical cross-reactivity study of muMAB362 on normal cynomolgus monkey tissues	No	GP_P0121	NA
	Immunohistochemical cross reactivity study of IMAB362 and muMAB362 on normal mouse tissues	No	GP_P0105	#15, F02
	IMAB362 monoclonal antibody (anti-claudin 18.2): A cross-reactivity study with human tissues selected according to FDA and EMA guidelines	Yes	00319	#15, F02

IMAB362: zolbetuximab; NA: not applicable; RT-PCR: reverse transferase polymerase chain reaction

†: except for toxicokinetics

2.6.6.2　単回投与毒性試験

2.6.6.2.1　マウスを用いた単回投与予備試験，重要な試験以外の試験

添付資料 4.2.3.1-1（参）

ゾルベツキシマブを雌の NMRI マウスに 0，1，10，50 及び 100 mg/kg の投与量で単回静脈内投与した（GP_P0125 試験）。生死，一般症状，局所刺激性，体重及び摂水量を検査した。胃と肺を病理組織学的に検査した。

本試験では毒性所見はみられなかった。免疫組織化学により，ゾルベツキシマブを投与したマウスでは，胃粘膜におけるヒト IgG（ゾルベツキシマブ）の局在が示された。

2.6.6.2.2　マウスを用いた単回投与予備試験（2 回目），重要な試験以外の試験

添付資料 4.2.3.1-2（参）

ゾルベツキシマブを雌の NMRI マウスに 0，30 及び 100 mg/kg の投与量で単回静脈内投与した（GP_P0117 試験）。生死，一般症状，局所刺激性，体重及び摂水量を検査した。病理組織学的検査は実施しなかった。

本試験では毒性所見はみられなかった。

2.6.6.2.3　カニクイザルを用いた単回投与予備試験，重要な試験以外の試験

添付資料 4.2.3.1-3（参）

ゾルベツキシマブを雌雄のカニクイザルに 50 mg/kg の投与量で静脈内投与した。単回漸増方式で 17 日後に 150 mg/kg の投与量で同一個体に投与した（22336 試験）。生死，一般症状，局所刺激性，体重，摂餌量及び摂水量を検査した。2 回目の投与後 14 日に動物を屠殺し，肉眼的に検査した。病理組織学的検査は実施しなかった。

本試験では毒性所見はみられなかった。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

2.6.6.3.1　マウスを用いた 4 週間反復投与予備試験，重要な試験以外の試験

添付資料 4.2.3.2-1（参）

マウスを用いて 4 週間反復投与予備試験を実施した（GP_P0106 試験）。媒体又はゾルベツキシマブを雌雄の NMRI マウスに 0，30 及び 100 mg/kg の投与量で 4 週間，週 1 回の頻度で計 5 回静脈内投与した。回復群は 0 及び 100 mg/kg 群に設定した。休薬期間は 2 週間とした。

検査項目は，生死，一般症状，局所刺激性，体重，摂水量，イムノフェノタイピング及び胃を含む病理組織学的検査とした。血液学的検査及び血液生化学的検査は群当たりのサンプル数が少

なかったため，評価に使用しなかった。胃の標本に対し，抗 CLDN18 抗体及び抗ヒト IgG 抗体を用いた免疫組織化学を実施した。

本試験では毒性所見はみられなかった。

抗 CLDN18 抗体を用いた免疫組織化学の結果，CLDN18 タンパクは胃粘膜の細胞膜に発現していることが示された。

抗ヒト IgG 抗体を用いた免疫組織化学の結果，ゾルベツキシマブを投与されたマウスでは，ゾルベツキシマブが胃の粘膜表層に局在していることが示された。

2.6.6.3.2 マウスを用いた 2 週間反復投与予備試験，重要な試験以外の試験

添付資料 4.2.3.2-2（参）

マウスを用いて 2 週間反復投与予備試験を実施した（25468 試験）。本試験は 2 つのパートで構成されている。第 1 パートの目的は，初期製造に用いられたクローン#15 から製造された被験物質と，新クローン F02 から製造された被験物質を毒性とトキシコキネティクスの観点で比較することである。第 2 パートの目的は，マウスを用いた 13 週間反復投与試験の用量設定である。第 2 パートでは，新クローン F02 から製造された被験物質を使用した。

第 1 パート：

ゾルベツキシマブを雌雄の NMRI マウスに 100 mg/kg の投与量で 2 週間，週 1 回の頻度で計 3 回静脈内投与した。

検査項目は，生死，一般症状，局所刺激性，体重，摂餌量，摂水量，血液学的検査，血液生化学的検査及びトキシコキネティクスとした。

3 回目の投与翌日に動物を屠殺し，肉眼的に検査した。

本第 1 パートでは 2 つの被験物質いずれにも毒性所見はみられなかった。2 つの被験物質でトキシコキネティクパラメータに違いはなかった。

第 2 パート：

ゾルベツキシマブを雌雄の NMRI マウスに 100，200 及び 400 mg/kg の投与量で 2 週間，週 1 回の頻度で計 3 回静脈内投与した。

トキシコキネティクスは第 2 パートには含めなかった。それ以外の検査項目は第 1 パートと同一とした。

本第 2 パートでは毒性所見はみられなかった。

2.6.6.3.3 マウスを用いた 13 週間反復投与試験，重要な試験

添付資料 4.2.3.2-3

マウスを用いて 13 週間反復投与試験を GLP 下で実施した（25469 試験）。媒体又はゾルベツキシマブ（クローン F02 から製造された）を各群雌雄 15 例の NMRI マウスに 0，100，200 及び

300 mg/kg の投与量で 13 週間，週 1 回の頻度で計 14 回（投与 1，8，15，22，29，36，43，50，57，64，71，78，85 及び 92 日）静脈内投与した。動物は最終投与の約 24 時間後に屠殺した。

回復群は 0 及び 300 mg/kg 群に各群雌雄 5 例を設定した。休薬期間は 4 週間とした。

新クローン F02 から製造された被験物質と初期製造に用いられたクローン#15 から製造された被験物質の間の同等性を調べる目的で，クローン#15 から製造されたゾルベツキシマブを雌雄各 15 例の NMRI マウスに 300 mg/kg の投与量で 13 週間，週 1 回の頻度で計 14 回静脈内投与した。

さらに，マウスサロゲート IgG2a 抗体（muMAB362）300 mg/kg 群とそれに対応する媒体対照群を参照データ取得の目的で設定した。しかし，マウスにおいてもヒトと同様にゾルベツキシマブが ADCC 及び CDC を示すことが明らかになり（GP_P0137 試験），マウスは，ゾルベツキシマブの Fc 介在性エフェクター活性の観点でも適切な動物種であることが，本試験開始後に明らかになった。サロゲートを用いて評価する意義は低いと考え，muMAB362 投与群及びそれに対応する媒体対照群から得られたデータは評価に使用しなかった。

検査項目は，生死，一般症状，局所刺激性，体重，摂餌量，摂水量，眼科的検査，聴覚検査，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，病理検査（器官重量，肉眼的観察，病理組織学的検査）及び骨髄検査とした。病理組織学的検査には，投与部位も含めた。

ゾルベツキシマブの血清中濃度測定は，サテライト群の動物から，投与 1 及び 92 日（各測定ポイントでは雌雄 3 例から血液を採取）に採取した血液を用いて実施した。抗薬物抗体の測定は，初回投与の投与前，各投与での投与後 4 日，休薬終了日に採取した血液を用いて実施した。

本試験では，いずれの被験物質においても毒性所見はみられなかった。

ゾルベツキシマブの全身曝露は用量依存的に増加した。投与 92 日の曝露は，投与 1 日の曝露とほぼ同等であった。性差はみられなかった。トキシコキネティクスのパラメータに関し，クローン F02 から製造された被験物質とクローン#15 から製造された被験物質の間に違いはみられなかった。

抗薬物抗体に関しては，いずれの動物も陽性とは判断されなかった。1 個体の 1 ポイントのみにおいて，測定値が定量下限をわずかに上回った（300 mg/kg 群の雄 1 例動物番号 306 番の投与 68 日）。しかし，同個体において，投与 68 日以降の投与期間中及び休薬終了時点における抗薬物抗体測定値は検出限界未満であった。したがって，動物番号 306 番において抗薬物抗体が産生されていた可能性は低いと考えた。

本試験では毒性所見はみられなかったことから，NOAEL は 300 mg/kg/week と考えられた。この投与量での投与 1 日の血清中ゾルベツキシマブ濃度の C_{max} は，雄は 9454 µg/mL，雌は 9891 µg/mL であった。投与 1 日の AUC_{168h} は，雄は 232743 µg·h/mL，雌は 230768 µg·h/mL であった。

クローン F02 から製造された被験物質とクローン#15 から製造された被験物質の間で，毒性及びトキシコキネティクスに関して違いはみられず，両クローンから製造された被験物質の同等性が示された。

2.6.6.3.4 カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験，重要な試験

添付資料 4.2.3.2-4

カニクイザルを用いて 4 週間反復投与試験を GLP 下で実施した（22337 試験）。ただし，トキシコキネティクスは GLP 査察を受けていない施設で行ったため，非 GLP 下で実施した。

媒体又はゾルベツキシマブを各群雌雄 3 例のカニクイザルに 0，10，30 及び 100 mg/kg の投与量で 4 週間，週 1 回の頻度で計 5 回（投与 1，8，15，22 及び 29 日）静脈内投与した。動物は最終投与の約 24 時間後に屠殺した。

検査項目は，生死，一般症状，局所刺激性，体重，摂餌量，摂水量，眼科的検査，聴覚検査，心拍数を含む心電図，血圧，呼吸数，イムノフェノタイピングを含む血液学的検査，血液生化学的検査，血漿中イムノグロブリン（IgE，IgG 及び IgM），血清中サイトカイン（インターフェロン α 及び γ，腫瘍壊死因子 α 及びインターロイキン），尿検査，病理検査（器官重量，肉眼的観察，病理組織学的検査）及び骨髄検査とした。病理組織学的検査には，投与部位も含めた。

トキシコキネティクスや抗薬物抗体も測定した。ゾルベツキシマブの濃度測定用（フローサイトメトリー免疫測定法）の血液は投与 1 及び 29 日に採取した。抗薬物抗体用（酵素免疫測定法）の血液は，第 1 回投与の前，投与 13 日（第 2 回投与の 5 日後），投与 20 日（第 3 回投与の 5 日後），投与 27 日（第 4 回投与の 5 日後）及び投与 30 日（第 5 回投与の翌日）に採取した。

本試験では，毒性所見はみられなかった。

嘔吐が 10 mg/kg 群の雄 1 例の投与 8 日（第 2 回投与日），30 mg/kg 群の雄 1 例の投与 8 日（第 2 回投与日）にみられた。これら雄 2 例にみられた嘔吐は軽度であり，第 2 回投与の投与後 5 分以内にみられた。10 及び 30 mg/kg 群の雌に嘔吐はみられなかった。高用量の 100 mg/kg 群でも雌雄ともに嘔吐はみられなかった。なお，媒体対照群でも，雌雄ともに嘔吐はみられなかった。

媒体対照群で投与期間中に嘔吐がみられなかったことから，雄 2 例にみられた嘔吐は薬剤性である可能性を否定できなかった。しかし，用量相関性がないこと（高用量の 100 mg/kg 群でみられていない），低頻度であること（4 週間の投与観察期間中の 1 回の事象）から，雄 2 例にみられた嘔吐の毒性学的意義は小さいと考えた。

CLDN18 タンパクの発現局在を調べる目的で，抗 CLDN18 抗体を用いた免疫組織化学を，腎臓，肝臓，心臓，肺，膵臓，胃及び十二指腸に対して実施した。陽性反応は胃粘膜（特に表層）及びブルンネル腺にみられた。

ゾルベツキシマブの体内の局在を調べるために，ヒト抗体の L 鎖（κ 鎖）に対する抗体を用いた免疫組織化学を，腎臓，肝臓，心臓，肺，膵臓，胃及び十二指腸に対して実施した。陽性反応は胃粘膜（特に表層），心臓及び血液にみられた。

ゾルベツキシマブの全身曝露は用量依存的に増加した。投与 29 日の曝露は，投与 1 日の曝露とほぼ同等であった。性差はみられなかった。

抗薬物抗体に関しては，いずれの動物も陰性であった。

本試験では毒性所見はみられなかったことから，NOAEL は 100 mg/kg/week と考えた。この投与量での投与 1 日の血清中ゾルベツキシマブ濃度の C_{max} は，雄は 3493 μg/mL，雌は 3233 μg/mL であった。投与 1 日の AUC_{24h} は，雄は 66828 μg·h/mL，雌は 57539 μg·h/mL であった。

2.6.6.3.5 カニクイザルを用いたトキシコキネティクス試験，重要な試験

添付資料 4.2.3.2-5

カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験におけるトキシコキネティクスは非 GLP 下で実施したことから，カニクイザルを用いた補完的な単回投与トキシコキネティクス試験を GLP 下で実施した（8951-TX-0001 試験）。

ゾルベツキシマブを雌雄 3 例のカニクイザルに 10，30 及び 100 mg/kg の投与量で単回静脈内投与した。この投与量は，先に実施された 4 週間反復投与試験（22337 試験）と同一である。投与後の観察期間は 57 日とした。

検査項目は，生死，一般症状，体重，摂餌量，トキシコキネティクス（電気化学発光免疫測定法）及び抗薬物抗体（電気化学発光免疫測定法）とした。

抗薬物抗体測定用の血液は観察期間終了時に採取した。

本試験では，嘔吐も含めて毒性所見はみられなかった。

本試験で得られたゾルベツキシマブの血清中濃度は，先に実施された 4 週間反復投与試験（22337 試験）の投与 1 日の血清から得られた値と，分析方法にかかわらず，ほぼ同等であった。本試験の 100 mg/kg 群の血清中ゾルベツキシマブ濃度の C_{max} は，雄は 3010 μg/mL，雌は 2850 μg/mL であった。AUC_{168h} は，雄は 232000 μg·h/mL，雌は 202000 μg·h/mL であった。

抗薬物抗体に関しては，ゾルベツキシマブを投与された雌雄合計 18 例のうち 13 例で陽性と判断された。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は，ゾルベツキシマブが抗体であり，DNA に直接相互作用するとは考えにくいため実施しなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

がん原性試験は，ゾルベツキシマブが ICH S9 ガイドラインの適用範囲である進行がん患者の治療を目的としているため実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

妊娠中又は妊娠する可能性のある患者に，胚や胎児に対する潜在的なリスクに関する情報を提供するために，マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験を実施した。

ゾルベツキシマブは，進行がん患者の治療を目的としている。したがって，ICH S9 ガイドラインを参考に，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び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を実施しなかった。雌雄生殖器に関しては，マウス及びカニクイザルを用いた重要な反復投与試験の中で病理組織学的に検査した。いずれの試験（25469 試験，22337 試験）でも生殖器に毒性所見はみられなかった。

2.6.6.6.1 マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験のための予備試験

添付資料 4.2.3.5.2-1（参）及び 4.2.3.5.2-2（参）

適切な投与間隔を決めるために，非妊娠マウスを用いて単回投与トキシコキネティクス予備試験を実施した（8951-TX-1001 試験，添付資料 4.2.3.5.2-1（参））。

適切な投与量を決めるために，妊娠マウスを用いて胚・胎児発生に関する予備試験を実施した（8951-TX-1002 試験，添付資料 4.2.3.5.2-2（参））。媒体又はゾルベツキシマブを各群 11 又は 12 例の妊娠 NMRI マウスに 0，100，200 及び 300 mg/kg の投与量で妊娠 6 日及び妊娠 11 日に静脈内投与した。投与スケジュールは，非妊娠マウスを用いた単回投与トキシコキネティクス予備試験の結果を踏まえて決定した。妊娠 18 日に，胎児を採取して検査した。本試験では，妊娠動物又は胎児いずれにも毒性所見はみられなかった。

これら 2 つの試験結果を踏まえ，次に実施するマウスを用いた胚・胎児発生に関する試験（GLP）では，高用量を 300 mg/kg に設定し，投与を妊娠 6 日及び妊娠 11 日に行うことが適切と考えた。

2.6.6.6.2 マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験，重要な試験

添付資料 4.2.3.5.2-3

マウスを用いて胚・胎児発生に関する試験を GLP 下で実施した（8951-TX-0002 試験）。媒体又はゾルベツキシマブを各群 23 又は 24 例の妊娠 NMRI マウスに 0，100 及び 300 mg/kg の投与量で妊娠 6 日及び妊娠 11 日に静脈内投与した。

投与スケジュールは，着床から硬口蓋の閉鎖までに相当する妊娠 6 日から妊娠 15 日に亘って胚・胎児が被験物質に曝露されることを目的として決定した。

妊娠動物の週齢は，第 1 回投与（妊娠 6 日）の時点で 11 から 13 週齢であった。

妊娠 18 日に，抗薬物抗体用の血液を妊娠動物から採取した後，胎児を摘出して検査した。

妊娠動物に関する検査項目は，一般症状，体重，摂餌量，剖検時肉眼検査及び抗薬物抗体とした。

胎児に関する検査項目は，生存率，体重，性比，胎盤重量，胎盤の肉眼的観察，外表検査，内臓検査及び骨格検査とした。

親動物の血清中ゾルベツキシマブ濃度測定用に，サテライト群の妊娠動物から採血した。各時点の例数は 3 とした。

胎児がゾルベツキシマブに曝露されたことを確認するために，サテライト群の妊娠 18 日の胎児から血液を採取した。

本試験では，妊娠動物，胎児いずれにも毒性所見はみられなかった。

NOAEL は，妊娠動物，胎児いずれも 300 mg/kg と考えた。

300 mg/kg 群の妊娠動物における，妊娠 11 日（第 1 回投与の 120 時間後，第 2 回投与の直前）の血清中ゾルベツキシマブ濃度は，312 μg/mL であった。同群における妊娠 16 日（第 2 回投与の 120 時間後）の血清中ゾルベツキシマブ濃度は，42.3 μg/mL であった。

300 mg/kg 群における妊娠 18 日の胎児の血清中ゾルベツキシマブ濃度は，82.3 μg/mL であった。

妊娠動物では抗薬物抗体は検出されなかった。

2.6.6.7　局所刺激性試験

局所刺激性の評価は，マウスを用いた 13 週間反復投与試験［25469 試験］及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験［22337 試験］の一部として行った。

いずれの試験でも，肉眼的検査及び病理組織学的検査で投与部位に毒性はみられなかった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　毒性発現の機序に関する試験（嘔吐に関する検討）

ゾルベツキシマブの臨床試験で悪心及び嘔吐が報告されている。この機序を調べる目的でフェレットを用いた毒性発現の機序に関する試験を実施した。

2.6.6.8.1.1　フェレットを用いた単回静脈内持続投与予備試験（第 1 試験）

添付資料 4.2.3.7.3-1（参）及び 4.2.3.7.3-2（参）

ゾルベツキシマブを 4 例の雄のフェレットに 0 及び 300 mg/m^2（26 から 29 mg/kg に相当）の投与量で，頚静脈に留置したカテーテルを介して静脈内に 30 分間持続投与した（AB10622 試験，添付資料 4.2.3.7.3-1（参））。

本試験では，ゾルベツキシマブを持続投与開始後 20 分から 85 分の間に空嘔吐が 2 例のフェレットでみられた。なお，空嘔吐とは，リズミカルな腹部の収縮で，嘔吐と異なり吐物を吐き出さない症状と定義した。

他の 2 例のフェレットは持続投与開始後 5 時間又は 48 時間に死亡した。これらの 2 例は，嘔吐や空嘔吐の症状を示さなかった個体である。剖検時肉眼観察では，気管内の泡沫状物，肺で複数の暗色領域及び肺葉の硬結がみられた。病理組織学的検査では，充血，出血，気管支肺炎及び肺胞腔内に桿状細菌の増殖巣がみられた。

本試験で得られた組織を凍結したサンプルを用いて，フェレットの CLDN18.2 の mRNA やタンパクの発現を調べた（GP_P0118 試験，添付資料 4.2.3.7.3-2（参））。フェレットの CLDN18.2 の mRNA 配列情報の一部を利用して，アミノ酸配列を推定した。フェレットの CLDN18.2 のエクソン 1 のアミノ酸配列は，ヒトの CLDN18.2 のエクソン 1 のアミノ酸配列と同一であった。CLDN18.2 の mRNA が胃組織及び食道組織から検出されたが，肺組織からは検出されなかった。また，FITC でラベルしたゾルベツキシマブ及び抗 CLDN18 抗体を用いた免疫組織化学の結果，胃と十二指腸の粘膜上皮に陽性反応がみられた。

本試験でみられたフェレットの死亡は，CLDN18.2 が肺組織に発現していないことから，肺組織に対するゾルベツキシマブの結合に関連している可能性は低いと考えた。死亡の原因として，静脈留置カテーテルに関連した肺における細菌感染が考えられた。

臨床での使用方法を踏まえ，本試験は静脈内持続投与を採用した。しかし，フェレットに静脈内カテーテルを留置し維持することは技術的に難易度が高く，本試験では細菌感染が起きた。感染は結果解釈に影響を与えることから，以降の試験は投与方法をボーラス投与に変更した。

2.6.6.8.1.2　フェレットを用いた単回静脈内ボーラス投与予備試験（第 2 試験）

添付資料 4.2.3.7.3-3（参）

本第 2 試験（8951-TX-1003 試験）は，次の第 3 試験（8951-TX-1004 試験）の投与量を決めることを目的として，ゾルベツキシマブを各群 1 例又は 2 例の雄のフェレットに 0，0.2，1，5 及び 20 mg/kg の投与量で静脈内に単回ボーラス投与した。胃を投与後 24 時間に採取し，病理組織学的検査を行った。

1 mg/kg 以上では，一般症状（嘔吐と空嘔吐）及び病理組織学的所見（胃粘膜の萎縮，粘膜下の炎症細胞浸潤）がみられた。

5 あるいは 20 mg/kg では，顔面の紅潮，赤色便，低体温あるいは横臥がみられた。

本試験の結果を踏まえ，次の第 3 試験は 1 mg/kg の投与量を設定した。

2.6.6.8.1.3　フェレットを用いた経時的な胃の病理組織検査試験（第 3 試験）

添付資料 4.2.3.7.3-4（参）

本第 3 試験（8951-TX-1004 試験）は，嘔吐と胃の病理組織学的変化の関連性を検討することを目的として，ゾルベツキシマブを 12 例の雄のフェレットに 1 mg/kg の投与量で静脈内に単回ボーラス投与した。以下の 4 つのポイントで 3 例ずつ屠殺した：1）投与後 15 分（投与後 15 分間嘔吐症状のなかった個体），2）各個体の初回の嘔吐症状の発症直後（選ばれた 3 例は投与後 10 分から 22 分の間に屠殺した），3）投与後 6 時間，4）投与後 2 週間。

対照群には，生理食塩液を 3 例の雄のフェレットに静脈内に単回ボーラス投与した。対照群は投与後 2 週間のポイントで屠殺した。

投与後 6 時間まで症状を観察し，空嘔吐と嘔吐の回数を記録した。屠殺の際には，血液を採取し，血清中ゾルベツキシマブ濃度を測定した。放血後，胃を採取し，粘膜の pH を測定し，病理組織学的に検査した。

投与後 6 時間までの観察において，空嘔吐は 1 例当たり平均 212 回，嘔吐は 1 例当たり平均 18 回であった。特に最初の 1 時間は，空嘔吐及び嘔吐ともに高頻度にみられた。その後，投与後 6 時間までの間に次第にその頻度は低下した。投与後 6 時間のポイントでは，空嘔吐も嘔吐も消失した。

投与後 6 時間に屠殺した 3 例のフェレットのうち 2 例において，胃粘膜の pH が上昇（pH 6 又は pH 7）していた。

胃の病理組織学的検査の結果，以下の所見がみられた。

投与後 15 分（その間嘔吐はしていない）：胃底腺及び幽門腺粘膜における軽度の表層粘液細胞の剥離と軽度の粘膜下の炎症

初回嘔吐直後：胃底腺及び幽門腺粘膜における軽度から重度の表層粘液細胞の剥離と軽度から中等度の粘膜下の炎症

投与後 6 時間：胃底腺及び幽門腺粘膜における，中等度から重度のびらん（胃粘膜上皮の欠失，変性，壊死及び再生，固有層への炎症細胞浸潤，粘膜の萎縮，胃底腺や幽門腺の拡張）及び軽度から中等度の粘膜下の炎症

投与後 2 週間：幽門部における軽度から中等度の鉱質沈着。

生理食塩液を投与した対照群では，空嘔吐も嘔吐もみられなかった。胃粘膜の pH は 4 又は 5 であった。病理組織学的検査で所見はみられなかった。

血清中のゾルベツキシマブ濃度は，投与後 15 分，初回嘔吐直後（投与後 10 分から 22 分の間），投与後 6 時間及び投与後 2 週間のポイントで，それぞれ，29.5，32.5，16.2 及び 0 µg/mL であった。

以上より，本試験の結果，1）ゾルベツキシマブ投与後の初期病変は胃粘膜表層の傷害であること，2）この傷害がフェレットの嘔吐の発症と関連があること，が示された。

2.6.6.8.1.4　フェレットを用いたゾルベツキシマブ誘発の嘔吐に対する制吐剤の効果（第 4 及び第 5 試験）

添付資料 4.2.3.7.3-5（参），4.2.3.7.3-6（参）

ゾルベツキシマブ投与によって誘発される嘔吐及び胃粘膜傷害に対する制吐剤の効果を検討した（10844 試験及び 8951-TX-1005 試験）。各群 4 例の雄のフェレットに，制吐剤として，20 mg/kg のデキサメタゾン，3 mg/kg のオンダンセトロン又は 3 mg/kg のホスアプレピタントを静脈内に単回ボーラス投与，若しくは 0.03 mg/kg のオランザピンを単回筋肉内投与した。10844 試験においては，上記 4 種の制吐剤の併用効果を，8951-TX-1005 試験においては，オンダンセトロンとホスアプレピタントの併用効果も評価した。これらの制吐剤は 1 mg/kg のゾルベツキシマブの単回静脈内ボーラス投与の 3 から 30 分前に投与した。ゾルベツキシマブ投与後 6 時間ま

で症状を観察し，嘔吐の回数を記録した。その後，胃を採取し，胃組織を肉眼的，組織病理学的に検査した。

10844 試験において，ゾルベツキシマブ投与後の平均嘔吐回数（SD）は 1 例当たり 158.3（42.6）回であった。デキサメタゾン，オンダンセトロン，ホスアプレピタント又は 4 種の制吐剤の併用によりゾルベツキシマブによって誘発される嘔吐の回数は有意に抑制され，その平均嘔吐回数（SD）はそれぞれ，1 例当たり 75.0（46.1），49.8（63.1），4.5（5.4），及び 10.0（14.6）回であった。一方，オランザピン投与群における平均嘔吐回数は 1 例当たり平均 93.0（91.9）回に減少したが，有意な抑制ではなかった。ゾルベツキシマブによる胃粘膜の赤色変化，胃体中央の粘膜の赤みを帯びた斑点，噴門部から胃体の中心までの粘膜の出血斑などの肉眼的な異常は，制吐剤の投与によって軽減される傾向があった。病理組織学的検査においては，制吐剤投与による胃粘膜傷害の明らかな抑制はみられなかった。

8951-TX-1005 試験において，ゾルベツキシマブ投与後の平均嘔吐回数（SD）は 1 例当たり 122.8（78.7）回であった。ホスアプレピタント及びオンダンセトロンとホスアプレピタントの併用群における平均嘔吐回数（SD）はそれぞれ 1 例当たり 3.3（4.3）及び 8.3（6.7）回であった。デキサメタゾン，オンダンセトロン又はオランザピンは，ゾルベツキシマブによって誘発される嘔吐回数を抑制せず，平均嘔吐回数（SD）は，それぞれ 1 例当たり 128.5（39.0），145.0（128.6）及び 167.5（65.1）回であった。病理組織学的所見に関しては，デキサメタゾンは，ゾルベツキシマブによる粘膜下炎症及び胃粘膜異常を軽減する傾向があった。オンダンセトロンとホスアプレピタントの併用は，ゾルベツキシマブによる幽門部における胃粘膜の異常，表層粘液細胞／胃底腺先端の変性／壊死，粘膜びらん及び粘膜下炎症を軽減する傾向がみられた。その他の制吐剤は胃粘膜傷害の抑制作用を示さなかった。

以上より，ゾルベツキシマブ投与によって誘発される嘔吐回数は，ホスアプレピタント単独又はホスアプレピタントと他の制吐剤の併用により抑制される可能性が示唆された。病理組織学的には，胃粘膜傷害に対して，各制吐剤の単独投与による明確な作用はみられなかったが，デキサメタゾン又は制吐剤の併用投与により軽減される傾向が認められた。したがって，フェレットを用いたこれらの検討により，ゾルベツキシマブ投与による嘔吐の想定機序や病理学的変化に加え，制吐剤の効果に関する情報が得られた。本結果は，臨床試験でみられたゾルベツキシマブの悪心及び嘔吐を制吐剤が軽減できる可能性を示唆しているが，情報は限定的であり臨床での効果は不明である。

2.6.6.8.2 その他の試験

2.6.6.8.2.1 組織交差反応性，重要な試験以外の試験

添付資料 4.2.3.7.7-1（参），4.2.3.7.7-2（参），4.2.3.7.7-3（参），4.2.3.7.7-4（参）

ヒト，マウス，あるいはカニクイザルの組織パネルを用いて，ゾルベツキシマブの組織交差反応性試験及びマウスサロゲート抗体 muMAB362 の組織交差反応性試験を実施した（GP_P0110 試

験，添付資料 4.2.3.7.7-1（参）；GP_P0123 試験，添付資料 4.2.3.7.7-2（参）；GP_P0121 試験，添付資料 4.2.3.7.7-3（参）；GP_P0105 試験，添付資料 4.2.3.7.7-4（参））。

いずれの試験においても，ゾルベツキシマブ及びマウスサロゲート抗体は胃粘膜に陽性反応を示した。予期せぬ結合はみられなかった。

2.6.6.8.2.2　組織交差反応性，重要な試験

添付資料 4.2.3.7.7-5

予期せぬ結合の有無を調べるために，正常のヒト組織パネルから得られた凍結切片を用いて，組織交差反応性試験を実施した（00319 試験）。

2 つの異なるバッチのゾルベツキシマブに FITC 標識して，ホルマリン固定したヒト組織の凍結切片と反応させた。各組織に対して 3 人のドナーの組織切片を利用した。ゾルベツキシマブ濃度は 2，5 及び 10 μg/mL の 3 濃度とした。2 つのバッチは，クローン#15 及びクローン F02 からそれぞれ製造されたものである。

2 つの異なるバッチによる結果は同一であった。ゾルベツキシマブが細胞膜に陽性反応を示した組織は胃粘膜上皮であった。予期せぬ結合はみられなかった。

細胞質に陽性反応を示した組織は，クッパー細胞，膵臓の導管上皮，表皮及び赤脾髄であった。しかし，組織の薄切や固定は細胞膜を破壊し，通常であれば抗体が到達しない細胞質内エピトープを露出させる。加えて，細胞膜により抗体は細胞内に到達できない。したがって，ゾルベツキシマブによる細胞質の陽性反応に関してはその毒性学的意義は小さいと考えた。

2.6.6.9　考察及び結論

2.6.6.9.1　正常の胃組織における CLDN18.2 の局在

マウスを用いた 4 週間反復投与予備試験［GP_P0106 試験］及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験［22337 試験］から得られたサンプルを用いて，胃における CLDN18.2 の局在を調べた。CLDN18.2 の検出は，抗 CLDN18 抗体を用いた免疫組織化学を利用した。使用した抗体は CLDN18.2 及び CLDN18.1 の両方を認識する。しかし，CLDN18.1 は胃では発現しないことが報告されている［Niimi et al, 2001］。したがって，胃組織における抗 CLDN18 抗体に対する陽性反応は，CLDN18.2 の局在とみなしてよいと考えた。

マウス及びカニクイザルともに，胃粘膜で抗 CLDN18 抗体陽性反応がみられた。カニクイザルでは，胃粘膜表層でより強い反応を示す傾向があった。

フェレットでは，抗 CLDN18 抗体を用いた免疫組織化学により，胃及び十二指腸の粘膜上皮に陽性反応がみられた［GP_P0118 試験］。同様に，ヒトでも，抗 CLDN18 抗体を用いた免疫組織化学は，正常胃粘膜上皮に陽性反応を示すことが報告されている［Sahin et al, 2008］。

これらの知見を総合すると，CLDN18.2 は，動物種にかかわらず，胃粘膜，特に粘膜表層に局在すると考えられた。

2.6.6.9.2 ゾルベツキシマブを投与した動物の胃組織におけるゾルベツキシマブの局在

マウスを用いた 4 週間反復投与予備試験［GP_P0106 試験］及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験［22337 試験］から得られた胃組織を用いて，ゾルベツキシマブの局在を調べた。ゾルベツキシマブの検出は，抗ヒト IgG 抗体又は抗ヒト L 鎖（κ 鎖）抗体を用いた免疫組織化学を利用した。

ゾルベツキシマブが投与されたマウス及びカニクイザルともに，胃粘膜の表層に陽性反応がみられた。ゾルベツキシマブの局在は，CLDN18.2 の局在に一致していた。

マウスやサルの in vitro 系を用いて，ゾルベツキシマブの Fc 介在性のエフェクター機能に関する検討を行った［GP_P0137 試験］。いずれの動物でも，ゾルベツキシマブによる ADCC 及び CDC を誘発することが可能であった。

しかし，マウス及びカニクイザルともに，胃粘膜表層に対する作用はみられていない。これらの 2 つの動物種で胃粘膜の表層において Fc 介在性のエフェクター機能が起動しなかった可能性もあるが，その理由は不明のままであった。なお，フェレットにおけるゾルベツキシマブの Fc 介在性のエフェクター機能に関する検討は実施しなかった。

2.6.6.9.3 嘔吐

ゾルベツキシマブでは，カニクイザルを用いた毒性試験を 3 試験実施した。単回投与予備試験（50 及び 150 mg/kg）［22336 試験］及びトキシコキネティクス試験（10，30 及び 100 mg/kg）［8951-TX-0001 試験］では，被験物質に関連した嘔吐はみられなかった。一方，4 週間反復投与試験（10，30 及び 100 mg/kg）［22337 試験］では，10 mg/kg の雄 1 例及び 30 mg/kg の雄 1 例に嘔吐がみられた。しかし，発現頻度が低く（4 週間の投与期間中に 1 回），用量依存性がみられなかった（高用量である 100 mg/kg では嘔吐はみられなかった）ことから，毒性所見とは判断しなかった。

一方で，臨床試験では悪心や嘔吐が報告されている。しかし，これらの臨床の副作用は，マウスやカニクイザルを用いた一般毒性試験の結果からは予見できなかった。

フェレットは，嘔吐に関する薬理学的な動物モデルとして制吐剤の薬理評価にしばしば利用されている。そこで，ヒトでみられたゾルベツキシマブによる悪心や嘔吐の機序の解明に，フェレットを用いた。

フェレットから採取された組織を用いて，フェレットの CLDN18.2 の mRNA 配列の一部を同定した。フェレットとヒトの mRNA 配列からアミノ酸配列を解析したところ，フェレットの CLDN18.2 のエクソン 1 のアミノ酸配列は，ヒトのそれと同一であった。このエクソン 1 は，ゾルベツキシマブのエピトープを含むと推定されている［Türeci et al, 2011；8951-PH-0002 試験］。

免疫組織化学により，CLDN18.2 タンパクがフェレットの胃組織に発現していることが示された［GP_P0118 試験］。

フェレットはゾルベツキシマブ投与後に嘔吐することが確認できた［AB10622 試験］。したがって，ゾルベツキシマブに関連した嘔吐の機序について，フェレットを用いてさらに検討した。

フェレットを用いた経時的な胃の病理組織検査試験［8951-TX-1004 試験］の結果，以下に述べる点が明らかになった。1）初回嘔吐直後では，胃粘膜表層の組織傷害が明らかであること，2）投与後 6 時間では，嘔吐症状はもはや消失しているが，胃粘膜傷害は表層のみならず粘膜層全層に広がっていること。

これらの結果から，嘔吐の発症は胃粘膜表層の傷害に関連していること，胃粘膜の基底側の傷害は嘔吐の発症に関連していないことが示唆された。

ゾルベツキシマブを投与した後のゾルベツキシマブの組織局在は，フェレットでは調べていない。しかし，フェレットでも胃粘膜表層に検出される可能性は高いと考えられる。なぜなら，CLDN18.2 タンパクは，マウスやカニクイザルのみならず，フェレットでも胃粘膜に発現しているからである。なお，ゾルベツキシマブを投与した後のゾルベツキシマブの組織局在は，マウスとカニクイザルでは，胃粘膜の表層であった。

フェレットでは，正常の胃組織における CLDN18.2 タンパクの発現部位は，嘔吐の発症と関連している組織傷害の初発部位と一致していた。それゆえ，ゾルベツキシマブを投与したフェレットでみられた嘔吐は，CLDN18.2 タンパクを発現している胃粘膜に対する傷害に関連していると考えられた。

2.6.6.9.4　免疫原性

ゾルベツキシマブの動物における免疫原性は，抗薬物抗体の有無で評価した。抗薬物抗体は，カニクイザルで検出された。

カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験では，すべての血液サンプルで抗薬物抗体は陰性と判断された［22337 試験］。ただし，血液サンプルは，週 1 回の反復投与の翌日又は 5 日後に採取した。したがって，ゾルベツキシマブの干渉による偽陰性の可能性が考えられた。

カニクイザルを用いたトキシコキネティクス試験［8951-TX-0001 試験］では，半数例以上の動物で抗薬物抗体を検出した。8951-TX-0001 試験の用量は，22337 試験（4 週間反復投与試験）の用量と同一である。一方，8951-TX-0001 試験では，22337 試験とは異なり，血液を単回投与後 57 日に採取した。このタイミングでは，ゾルベツキシマブが抗薬物抗体測定に干渉する可能性は低い。

抗薬物抗体の存在の有無にかかわらず，トキシコキネティクスのパラメータへの影響はみられなかった。カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験では，C_{max} 及び AUC の値は，投与 1 日と投与 29 日でほぼ同等であった。

ICH S6(R1)に記載されているように，動物実験におけるヒト化タンパク質の免疫原性の評価は，ヒトでの免疫原性を予測するものではない。

2.6.6.9.5 免疫毒性

ゾルベツキシマブは，上皮のタイトジャンクションに関与する分子 CLDN18.2 に対する抗体である。CLDN18.2 は免疫細胞には発現していない。ADCC 及び CDC を除きゾルベツキシマブの薬理作用が，免疫系にもみられることは想定されていない。

マウスを用いた 13 週間反復投与試験［25469 試験］及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験［22337 試験］において，白血球数などの血液学的検査やグロブリン値を含む血液生化学的検査に対する影響はみられなかった。剖検時肉眼検査，器官重量及び病理組織学的検査を実施したが，リンパ系臓器組織に対する作用はみられなかった。

カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験［22337 試験］において，イムノフェノタイピングや血清中サイトカイン濃度を測定した。いずれの項目においても変化はみられなかった。加えて，マウスを用いた 4 週間反復投与予備試験［GP_P0106 試験］においても，イムノフェノタイピングを実施したが，変化はみられなかった。

以上をまとめると，ゾルベツキシマブが免疫毒性を有する可能性は低いと考えた。

2.6.6.9.6 曝露比

重要な非臨床毒性試験における NOAEL での血清中 C_{max} 又は AUC の値及び臨床用量（600 mg/m^2）との曝露比を下表に示す（表 2.6.6- 2）。

NOAEL での血清中 AUC は，臨床用量（600 mg/m^2）の少なくとも 7.5 倍であった。

表 2.6.6- 2　　動物の重要な試験における NOAEL での C_{max} 又は AUC ベースの曝露比

Study Type	NOAEL (mg/kg/ week)	Sex	Serum C_{max}		Serum AUC	
			C_{max} (μg/mL) †	Exposure multiple ‡	AUC_{168h} (μg·h/mL) †	Exposure multiple ‡
Mouse/ 13-week (iv) (Study 25469)	300	M	9454	22	232743	8.7
		F	9891	23	230768	8.6
Cynomolgus monkey/ single (iv) (Study 8951-TX-0001)	100 §	M	3010	7.1	232000	8.6
		F	2850	6.7	202000	7.5

NOAEL: no observed adverse effect level; iv: intravenous

†: day 1.

‡: The time factor of AUC was different between animals (AUC_{168h}) and humans (AUC_{21d}). Exposure multiple calculations, therefore, were adjusted for the following equation:

Exposure multiple = [animal C_{max}] or [animal AUC_{168h} x 3] / [human exposure at 600 mg/m^2]. The human exposure of C_{max} or AUC_{21d} was 425 µg/mL or 3359 µg·day/mL (80616 µg·h/mL), respectively (Report 8951-PK-0005).

§: NOAEL of 100 mg/kg/week was determined in the 4-week repeat dose study in cynomolgus monkeys (Study 22337).

Source: Study 25469; Study 8951-TX-0001; Report 8951-PK-0005

2.6.6.9.7 胚・胎児発生に関する試験におけるゾルベツキシマブの曝露

マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験［8951-TX-0002 試験］では，妊娠動物にゾルベツキシマブを 100 及び 300 mg/kg の投与量で，妊娠 6 日及び妊娠 11 日に静脈内投与した。300 mg/kg 群の妊娠動物における妊娠 11 日（第 2 回投与の直前）の血清中濃度は，312 µg/mL であった。この値は，臨床用量（600 mg/m^2）での C_{max} 値（425 µg/mL，［8951-PK-0005 レポート］）とほぼ同等であった。一方で，硬口蓋の閉鎖完了時点（妊娠 16 日）での 300 mg/kg 群の血清中濃度は 42.3 µg/mL と，臨床用量での C_{max} 値を下回った。

この試験では，胎児のゾルベツキシマブの曝露も測定した。妊娠 18 日の胎児血清中のゾルベツキシマブ濃度は，300 mg/kg 群で 82.3 µg/mL であった。

妊娠動物の全身曝露は，ヒトに 600 mg/m^2 を投与した際の C_{max} 値を必ずしも常に上回ることはできなかったが，胎児への曝露は確認できた。したがって，本試験の結果を用いて，胚・胎児発生に対するゾルベツキシマブの作用を評価することは可能と考えた。

胚・胎児発生に関する試験における NOAEL での血清中 C_{max} 又は AUC の値及び臨床用量（600 mg/m^2）との曝露比を下表に示す（表 2.6.6- 3）。

NOAEL での血清中 AUC は，臨床用量（600 mg/m^2）の 1.8 倍であった。

表 2.6.6- 3　胚・胎児発生に関する試験における NOAEL での C_{max} 又は AUC ベースの曝露比

Study Type	NOAEL (mg/kg)	Sex	Serum C_{max}		Serum AUC	
			C_{max} (µg/mL) †	Exposure multiple ‡	AUC_{120h} (µg·h/mL) †	Exposure multiple ‡
Mouse/ Embryo-Fetal Development (iv) (Study 8951-TX-0002)	300	F	5450	13	147000	1.8

NOAEL: no observed adverse effect level; iv: intravenous

†: Gestation day 6.

‡: Exposure multiple = [animal C_{max}] or [animal AUC_{120h}] / [human exposure at 600 mg/m^2]. The human exposure of C_{max} or AUC_{21d} was 425 µg/mL or 3359 µg·day/mL (80616 µg·h/mL), respectively (Report 8951-PK-0005).

Source: Study 8951-TX-0002; Report 8951-PK-0005

2.6.6.9.8 生殖発生毒性に関するリスク評価

ゾルベツキシマブは進行がん患者の治療を目的としている。したがって，ICH S9 ガイドラインを参考に，胚・胎児発生に関する試験を実施した一方で，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。

雌雄生殖器に関しては，重要な反復投与試験（マウスを用いた 13 週間反復投与試験及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験）の中で病理組織学的に検査した。いずれの試験［25469 試験，22337 試験］でも生殖器に毒性所見はみられなかった。

マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験［8951-TX-0002 試験］では，妊娠動物，胎児いずれにも 0，100 及び 300 mg/kg の投与量で毒性所見はみられなかった。この試験では，妊娠 18 日の胎児の血清中にゾルベツキシマブが検出され，ゾルベツキシマブが胎盤を通過したことが示された。マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験では毒性所見がみられていないことから，ゾルベツキシマブはヒトにおいて胚・胎児毒性を誘発する可能性は低いと考えられた。

ゾルベツキシマブを用いた，出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。一方で，CLDN18.2 のノックアウトマウスに関する論文において，生後 3 日以降で萎縮性胃炎が発症することが報告されている［Hayashi et al, 2012］。それゆえ，ヒトにおいても，ゾルベツキシマブが出生後に萎縮性胃炎を誘発する可能性が考えられた。

2.6.6.9.9 クローン F02 及びクローン#15 間の同等性

1 試験を除き重要な試験はいずれも，クローン F02 から製造された被験物質を用いて実施した。例外は，カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験［22337 試験］である。この試験は，クローン#15 から製造された被験物質を用いて実施した。そこで，クローン#15 及び F02 から製造したゾルベツキシマブの毒性プロファイルは，マウスを用いた 13 週間反復投与試験［25469 試験］及びヒト組織交差反応性試験［00319 試験］において比較した。

2 つの異なる被験物質の試験結果は同一であったことから，非臨床安全性の観点からは 2 つのクローンから製造された被験物質の同等性が示された。加えて，生化学的及び生物学的特性の観点からも，2 つのクローンから製造された被験物質の同等性が示されている［3.2.S.2.6 製造工程の開発の経緯］

したがって，クローン F02 から製造された被験物質の非げっ歯類を用いた反復投与試験を実施していないことは正当化できると考えた。

2.6.6.9.10 製剤に含まれるリン酸に関する非臨床安全性評価

リン酸は賦形剤として，製剤中に 100 mg バイアル当たり [redacted]mg 含まれている。ヒトに 800 mg/m^2 を投与した際，この賦形剤の量は [redacted]mg と推定される（体表面積を 1.65 m^2 と仮定）。

リン酸は，非臨床安全性試験で使われたバッチにも含まれていた。マウスを用いた 13 週間反復投与試験，カニクイザルを用いた 4 週間反復投与試験及びマウスを用いた胚・胎児発生に関する試験における NOAEL でのリン酸の量は，それぞれ[redacted]，[redacted] 及び[redacted] mg/kg であった。ヒトに換算する（体重 60 kg と仮定）と，[redacted] mg から[redacted] mg の範囲であった（表 2.6.6- 4）。

マウスやカニクイザルの NOAEL でのリン酸の量は，ヒトの投与量の少なくとも 2.6 倍以上であった。したがって，製剤に含まれるリン酸の量に関し，安全性は確認できたと考えた。

表 2.6.6- 4　　重要な試験の NOAEL におけるリン酸の量

Study (Study No.)	NOAEL (mg/kg)	Dosing Volume (mL/kg)	Batch ID	Phosphoric Acid Concentration in the Dosing Formulation of the Batch Used (mg/mL)	Phosphoric Acid Level at NOAEL (mg/kg)	Equivalent Phosphoric Acid Level to Humans (60 kg)
13-week study in mice (Study 25469)	300	10	P412118	[redacted]	[redacted]	[redacted]
4-week study in cynomolgus monkeys (Study 22337)	100	3.3	63309002	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Effects on embryo-fetal development in mice (Study 8951-TX-0002)	300	15	7D900	[redacted]	[redacted]	[redacted]

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level

Source: Study 25469; Study 22337; Study 8951-TX-0002

2.6.6.9.11 結論

ICH S6 及び S9 を参照しながら，非臨床毒性試験を実施した。ゾルベツキシマブに関する非臨床における安全性の評価結果は，製造販売承認申請の要件を満たしていると考えられた。

2.6.6.10 参考文献

Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, Yamazaki Y, Watanabe S, Suzuki K, et al. Deficiency of claudin-18 causes paracellular H^+ leakage, up-regulation of interleukin-1β, and atrophic gastritis in mice. Gastroenterology. 2012;142(2):292-304.

Niimi T, Nagashima K, Ward JM, Minoo P, Zimonjic DB, Popescu NC, et al. *claudin-18*, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. Mol Cell Biol. 2001;21(21):7380-90.

Sahin U, Koslowski M, Dhaene K, Usener D, Brandenburg G, Seitz G, et al. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. Clin Cancer Res. 2008;14(23):7624-34.

Türeci Ö, Koslowski M, Helftenbein G, Castle J, Rohde C, Dhaene K, et al. Claudin-18 gene structure, regulation, and expression is evolutionary conserved in mammals. Gene. 2011;481:83-92.

目次

2.6.7 毒性試験概要表.....2
2.6.7.1 毒性試験：一覧表.....2
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.....5
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.....6
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧.....7
2.6.7.5 単回投与毒性試験：重要な試験以外の試験.....8
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験.....9
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験.....10
2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験.....15
2.6.7.9 In vivo 遺伝毒性試験.....16
2.6.7.10 がん原性試験.....17
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験.....18
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.....19
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験.....20
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験.....23
2.6.7.15 局所刺激性試験.....24
2.6.7.16 その他の毒性試験.....25

2.6.7　毒性試験概要表

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

被験物質：ゾルベツキシマブ

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses [a)]	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Single-dose Toxicity	NMRI mice	intravenous bolus	Single dose	0, 1, 10, 50, 100 mg/kg	No	Ganymed, Germany	GP_P0125	4.2.3.1-1（参）
	NMRI mice	intravenous bolus	Single dose	0, 30, 100 mg/kg	No	Ganymed, Germany	GP_P0117	4.2.3.1-2（参）
	Cynomolgus monkeys	intravenous bolus	Single dose	50, 150 mg/kg	No	[redacted] Germany	22336	4.2.3.1-3（参）
Repeat-dose Toxicity	NMRI mice	intravenous bolus	Once weekly for 4 weeks	0, 30, 100 mg/kg	No	Ganymed, Germany	GP_P0106	4.2.3.2-1（参）
	NMRI mice	intravenous bolus	Once weekly for 2 weeks	100, 200, 400 mg/kg	Yes [b)]	[redacted] Germany	25468	4.2.3.2-2（参）
	NMRI mice	intravenous bolus	Once weekly for 13 weeks	0, 100, 200, 300 mg/kg	Yes	[redacted] Germany	25469	4.2.3.2-3
	Cynomolgus monkeys	intravenous bolus	Once weekly for 4 weeks	0, 10, 30, 100 mg/kg	Yes [b)]	[redacted] Germany	22337	4.2.3.2-4
	Cynomolgus monkeys	intravenous bolus	Single dose	10, 30, 100 mg/kg	Yes	[redacted] Japan	8951-TX-0001	4.2.3.2-5
Genotoxicity	No genotoxicity studies were conducted.							
Carcinogenicity	No carcinogenicity studies were conducted.							
Reproductive and Developmental Toxicity	NMRI mice	intravenous bolus	Single dose	30, 100, 300 mg/kg	No	[redacted] Japan	8951-TX-1001	4.2.3.5.2-1（参）
	NMRI mice	intravenous bolus	days 6 and 11 of gestation	0, 100, 200, 300 mg/kg	No	[redacted] Japan	8951-TX-1002	4.2.3.5.2-2（参）
	NMRI mice	intravenous bolus	days 6 and 11 of gestation	0, 100, 300 mg/kg	Yes	[redacted] Japan	8951-TX-0002	4.2.3.5.2-3

Table continued on next page

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Local Tolerance	No dedicated local tolerance studies were conducted.							
Other Toxicity Studies								
Mechanistic studies	Ferrets	intravenous infusion (30 minutes)	Single dose	0, 300 mg/m^2	No	[redacted] France	AB10622	4.2.3.7.3-1 （参）
	Tissues obtained from Study AB10622	NA	NA	NA	No	Ganymed, Germany	GP_P0118	4.2.3.7.3-2 （参）
	Ferrets	intravenous bolus	Single dose	0, 0.2, 1, 5, 20 mg/kg	No	[redacted] Japan	8951-TX-1003	4.2.3.7.3-3 （参）
	Ferrets	intravenous bolus	Single dose	0, 1 mg/kg	No	[redacted] Japan	8951-TX-1004	4.2.3.7.3-4 （参）
	Ferrets	Zolbetuximab, Dex, Ond, Fos: intravenous bolus Ola: intramuscular Combo: Dex, Ond, Fos and Ola	Single dose	Zolbetuximab: 0, 1 mg/kg Dex: 20 mg/kg Ond: 3 mg/kg Fos: 3 mg/kg Ola: 0.03 mg/kg	No	[redacted] Japan	10844	4.2.3.7.3-5 （参）
	Ferrets	Zolbetuximab, Dex, Ond, Fos: intravenous bolus Ola: intramuscular Combo: Ond and Fos	Single dose	Zolbetuximab: 0, 1 mg/kg Dex: 20 mg/kg Ond: 3 mg/kg Fos: 3 mg/kg Ola: 0.03 mg/kg	No	[redacted] Japan	8951-TX-1005	4.2.3.7.3-6 （参）

Table continued on next page

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Other studies (Tissue Cross-reactivity)	Humans	Application to frozen tissue samples	NA	Murine surrogate antibody 4 µg/mL	No	[redacted] Belgium	GP_P0110	4.2.3.7.7-1 （参）
	NMRI mice	Application to frozen tissue samples	NA	3.33 µg/mL	No	[redacted] Belgium	GP_P0123	4.2.3.7.7-2 （参）
	Cynomolgus monkeys	Application to frozen tissue samples	NA	Murine surrogate antibody 4 µg/mL	No	[redacted] Belgium	GP_P0121	4.2.3.7.7-3 （参）
	NMRI mice	Application to frozen tissue samples	NA	2, 5, 10 µg/mL	No	Ganymed, Germany	GP_P0105	4.2.3.7.7-4 （参）
	Humans	Application to frozen tissue samples	NA	2, 5, 10 µg/mL	Yes	[redacted] UK	00319	4.2.3.7.7-5

[redacted]; Dex: dexamethasone; Fos: fosaprepitant; Ganymed: Ganymed Pharmaceuticals; [redacted]; NA: not applicable; NOAEL: no observed adverse effect level; Ola: olanzapine; Ond: ondansetron; [redacted].

a): NOAEL is underlined.

b): Toxicokinetics was performed under non-GLP conditions.

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

被験物質：ゾルベツキシマブ

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location Vol. Section
2-week repeat-dose	NMRI mice	intravenous bolus	100, 200, 400	Yes [a)]	25468	4.2.3.2-2（参）
13-week repeat-dose	NMRI mice	intravenous bolus	0, 100, 200, 300	Yes	25469	4.2.3.2-3
4-week repeat-dose	Cynomolgus monkeys	intravenous bolus	0, 10, 30, 100	Yes [a)]	22337	4.2.3.2-4
Toxicokinetics (single)	Cynomolgus monkeys	intravenous bolus	10, 30, 100	Yes	8951-TX-0001	4.2.3.2-5
Toxicokinetics (single)	NMRI mice	intravenous bolus	30, 100, 300	No	8951-TX-1001	4.2.3.5.2-1（参）
Embryo-fetal development	NMRI mice	intravenous bolus	100, 300	Yes	8951-TX-0002	4.2.3.5.2-3

a): Toxicokinetics was performed under non-GLP conditions.

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

被験物質：ゾルベツキシマブ

		Mean AUC_{168h} (µg·h/mL)				Mean C_{max} (µg/mL)				Mean AUC_{21d} (µg·h/mL)	Mean C_{max} (µg/mL)
Dose (mg/kg)	Dose in Humans (mg/m^2)	Mouse [b)]		Monkey [c)]		Mouse [b)]		Monkey [c)]		Human [d)]	Human [d)]
		M	F	M	F	M	F	M	F		
10	NA	NA	NA	21800	23500	NA	NA	298	340	NA	NA
16.2 [a)]	600	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	80616	425
30	NA	NA	NA	62100	63200	NA	NA	936	1020	NA	NA
100	NA	85823	84182	232000	202000	2141	1927	3010	2850	NA	NA
200	NA	136411	140948	NA	NA	3622	4312	NA	NA	NA	NA
300	NA	232743	230768	NA	NA	9454	9891	NA	NA	NA	NA

NA: not applicable.

a): human body weight: 60 kg, body surface area: 1.62 m^2, k_m: 37.

b): On day 1 from Study 25469.

c): On day 1 from Study 8951-TX-0001.

d): From Report 8951-PK-0005.

2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

被験物質：ゾルベツキシマブ

Batch No.	Clone †	Purity (%)	Study Number	Type of Study
070515	#15	Not tested	GP_P0125	single-dose, mouse
UFDF2 20071114 001R	#15	96.6%	22336	single-dose, cynomolgus monkey
63309002	#15	96.3%	22337	repeat-dose, cynomolgus monkey
63309003	#15	96.3%	GP_P0106	repeat-dose, mouse
			GP_P0117	single-dose, mouse
63309004	#15	97.6%	25469	repeat-dose, mouse
070507	#15	Not tested	GP_P0123	tissue cross-reactivity
FITC-labelled 63309004	#15	Not tested	GP_P0105	tissue cross-reactivity
			00319	tissue cross-reactivity
63309009	#15	97.3%	25468	repeat-dose, mouse
			25469	repeat-dose, mouse
P412118	F02	97.6%	25468	repeat-dose, mouse
			25469	repeat-dose, mouse
FITC-labelled P412118	F02	Not tested	GP_P0105	tissue cross-reactivity
			00319	tissue cross-reactivity
1001384	F02	96.8%	AB10622	investigational study, ferret
7D900	F02	96.9%	8951-TX-0001	dedicated toxicokinetics, cynomolgus monkey
			8951-TX-1001	dedicated toxicokinetics, mouse
			8951-TX-1002	embryo-fetal development, mouse
			8951-TX-0002	embryo-fetal development, mouse
			8951-TX-1003	investigational study, ferret
			8951-TX-1004	investigational study, ferret
			10844	investigational study, ferret
			8951-TX-1005	investigational study, ferret

FITC: fluorescein isothiocyanate.

† Results from two GLP studies (25469 and 00319) comparing clones #15 and F02 demonstrated the comparability of the 2 clones in terms of toxicity profile.

2.6.7.5　単回投与毒性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：ゾルベツキシマブ

Species and Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
NMRI mice	intravenous bolus (PBS/Arginine buffer)	0, 1, 10, 50, 100	3 to 15 females	> 100	> 100	No toxicity findings (Zolbetuximab was detected in the gastric mucosa by immunohistochemistry)	GP_P0125
NMRI mice	intravenous bolus (PBS/Arginine buffer pH 7.4)	0, 30, 100	5 females	> 100	> 100	No toxicity findings	GP_P0117
Cynomolgus monkeys	intravenous bolus	50, 150 (dose-escalation, 17 days interval)	2 males, 2 females	> 150	> 150	No toxicity findings	22336

PBS: phosphate-buffered saline.

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：ゾルベツキシマブ

Species and Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and Number per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
NMRI mice	intravenous bolus (PBS/Arginine buffer pH 7.4)	Once weekly for 4 weeks (administration on day 0, 7, 14, 21, 28)	0, 30, 100	3 males, 3 females	Not applicable	No toxicity findings (CLDN18.2 and Zolbetuximab was detected in the gastric mucosa by immunohistochemistry.)	GP_P0106
NMRI mice	intravenous bolus (Arginine/H_3PO_4 pH 7.4)	Once weekly for 2 weeks (administration on day 1, 8, 15)	Part 1: 100 (clone #15, clone F02) Part 2: 100, 200, 400 (clone F02)	5 males, 5 females	Not applicable	Part 1: No toxicity findings regardless of clones Part 2: No toxicity findings	25468

CLDN18.2: claudin-18 splice variant 2; NOAEL: No observed adverse effect level; PBS: phosphate-buffered saline.

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1　マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験

被験物質：ゾルベツキシマブ

Report Title: 13-Week Subchronic Toxicity Study of IMAB362 by Repeated Intravenous Administration to NMRI Mice									
Species/Strain: NMRI mice	**Duration of Dosing:** once weekly for 13 weeks (14 doses in total)					**Study Number:** 25469			
Initial Age: 30 to 55 days	**Duration of Postdose:** 4 weeks					**Location in CTD:** Vol. 4, Section 4.2.3.2-3			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** intravenous bolus								
	Vehicle/Formulation: 200 mmol/L Arginine/H_3PO_4 (pH 7.4)					**GLP Compliance:** Yes			
Special Features: No									
No Observed Adverse Effect Level: 300 mg/kg									
Weekly Dose (mg/kg)	**0**		**100 (Clone F02)**		**200 (Clone F02)**		**300 (Clone F02)**		**300 (Clone #15)**	
Toxicokinetics										
Number of Animals [a)]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**
C_{max} (μg/mL)										
Day 1	NA	NA	2141	1927	3622	4312	9454	9891	8173	8667
Day 92	NA	NA	2603	2303	4997 [b)]	4957	8457	8055	9513	8738
AUC_{168h} (μg·h/mL)										
Day 1	NA	NA	85823	84182	136411	140948	232743	230768	203083	193540
Day 92	NA	NA	103985	106067	157331 [b)]	158981	223549	220938	241114	219648
Anti-zolbetuximab antibodies [c)]	-	-	-	-	-	-	- [d)]	-	-	-
Noteworthy Findings (Treatment Period)										
Number of Animals	**M: 20**	**F: 20**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 15**	**F: 15**
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Signs [e)]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Water Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Auditory Examination	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table continued on next page

Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**100 (Clone F02)**		**200 (Clone F02)**		**300 (Clone F02)**		**300 (Clone #15)**	
Number of Animals	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Gross Pathology [e)]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology [e)]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone Marrow Examination	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-	-	-
Noteworthy Findings (After 4-Week Recovery Period)										
Number of Animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 0**	**F: 0**
Died or Sacrificed Moribund	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	NA	NA
Clinical Signs [e)]	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Body Weight	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Food Consumption	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Water Consumption	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Ophthalmology	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Auditory Examination	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Hematology	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Clinical Biochemistry	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Urinalysis	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Gross Pathology [e)]	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Organ Weight	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Histopathology [e)]	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Bone Marrow Examination	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA

As reference, murine surrogate IgG2a antibody (muMAB362) and its vehicle groups were included in this study. A dose of 300 mg/kg of muMAB362 was administered once weekly and as of day 36 (5th administration) once every 14 days. Reduced motility, abdominal position, piloerection and swollen snouts were recorded immediately after the 3rd administration (day 15) and later. One female (No 172) died prematurely 15 minutes after the 4th administrations (day 22). Pre-treatment with 10 mg cyproheptadine and 1 mg dexamethasone/kg body weight as of day 64 (7th administration) reduced the incidence and severity of the clinical signs. One female (No 171) and one satellite female (No 285) died prematurely. These two deaths were considered to be due to the technical failure.

-: no noteworthy findings; IgG2a: immunoglobulin G2a; IMAB362: zolbetuximab; NA: not applicable; NE: not examined.

a): 3 males and 3 females per point. b): One satellite male (No. 211) was excluded because it was found dead on day 87. c): 3 males and 3 females. d): The level of anti-zolbetuximab antibody marginally exceeded the lower level of quantification in one sample (day 68 for one male No. 306). However, the other serum samples taken from this same male including on day 122 (at the end of 4-week treatment-free period) showed the values were below the limit of detection. Therefore, the presence of anti-zolbetuximab antibodies in this male was considered to be unlikely. e): Including injection site.

2.6.7.7.2 カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験

被験物質：ゾルベツキシマブ

Report Title: 4-Week Subchronic Toxicity Study of IMAB362 by Repeated Intravenous Administration to Cynomolgus Monkeys							
Species/Strain: Cynomolgus monkeys	**Duration of Dosing:** once weekly for 4 weeks (5 doses in total)			**Study Number:** 22337			
Initial Age: 40 to 62 months	**Duration of Postdose:** No			**Location in CTD:** Vol. 4, Section 4.2.3.2-4			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** intravenous bolus						
	Vehicle/Formulation: 200 mmol/L Arginine/H_3PO_4 (pH 7.4)			**GLP Compliance:** Yes			
Special Features: No							
No Observed Adverse Effect Level: 100 mg/kg (Vomiting was observed in a male at 10 and 30 mg/kg on day 8. Since vomiting was not observed in control animals in this study, the relationship to the test article cannot be ruled out. However, based on the no clear dose dependency and low frequency, this finding was not considered adverse.)							
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics [a)]								
Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
C_{max} (μg/mL)								
Day 1	NA	NA	318	306	1070	1038	3493	3233
Day 29	NA	NA	409	385	1297	1073	3983	3850
AUC_{24h} (μg·h/mL)								
Day 1	NA	NA	5814	5839	20046	19141	66828	57539
Day 29	NA	NA	7657	8088	24837	20294	78084	65265
Anti-zolbetuximab antibodies [b)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical signs [c)]								
Vomiting	0	0	1 (on day 8)	0	1 (on day 8)	0	0	0
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Water Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Auditory Examination	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiogram [d)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure [e)]	-	-	-	-	-	-	-	-

Table continued on next page

Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Respiratory Rate	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology [f)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunoglobulin in Plasma (IgE, IgG, IgM)	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytokine in Serum (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN-γ, IFN-α, TNF-α)	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology [c)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology [c) g) h)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone Marrow Examination	-	-	-	-	-	-	-	-

-: no noteworthy findings; CLDN18: claudin-18; IFN: interferon; Ig: immunoglobulin; IL: interleukin; IMAB362: zolbetuximab; NA: not applicable; QTc: corrected QT interval; TNF: tumor necrosis factor.

a): Toxicokinetics performed under non-GLP conditions. b): Days 13, 20, 27 and 30. c): including injection site. d): Heart rate, QRS interval, QT interval, QTc (using Bazett formula), PQ interval, P segment. e): Peripheral arterial systolic and diastolic pressure, and mean blood pressure. f): including immunophenotyping. g): In order to detect CLDN18 expression, immunohistochemistry using anti-CLDN18 antibody was conducted in the tissue panel (kidney, liver, heart, lung, pancreas, stomach, and duodenum) obtained from study 22337. Positive reaction was obtained in the stomach mucosa, especially in the superficial zone, and Brunner glands. h): In order to detect zolbetuximab distribution, immunohistochemistry using anti-human kappa light chain antibody was conducted in the same tissue panel (kidney, liver, heart, lung, pancreas, stomach, and duodenum). Positive reaction was obtained in stomach mucosa, especially the superficial zone, heart, and blood from the zolbetuximab-administered animals.

2.6.7.7.3 カニクイザルを用いたトキシコキネティクス試験

被験物質：ゾルベツキシマブ

Report Title: A Single Intravenous Bolus Toxicokinetic Study of IMAB362 in Cynomolgus Monkeys						
Species/Strain: Cynomolgus monkeys	**Duration of Dosing:** Single dose			**Study Number:** 8951-TX-0001		
Initial Age: 3 to 4 years	**Duration of Postdose:** 57 days			**Location in CTD:** Vol. 4, Section 4.2.3.2-5		
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** intravenous bolus					
	Vehicle/Formulation: lyophilised powder preparation was reconstituted with water for injection and diluted with physiological saline			**GLP Compliance:** Yes		
Special Features: This study is complimentary to non-GLP toxicokinetic data of the 4-week study in cynomolgus monkeys (Study 22337)						
No Observed Adverse Effect Level: not applicable						
Dose (mg/kg)	**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics						
C_{max} (μg/mL)						
Day 1	298	340	936	1020	3010	2850
AUC_{168h} (μg·h/mL)						
Day 1	21800	23500	62100	63200	232000	202000
Anti-zolbetuximab Antibody						
Day 57 (Number of animals)	2	3	3	3	2	0
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Body Weight	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations						
Vomiting	0	0	0	0	0	0

-: no noteworthy findings; IMAB362: zolbetuximab.

2.6.7.8　In vitro 遺伝毒性試験

ゾルベツキシマブは，バイオテクノロジー応用医薬品であることから，医薬品規制調和国際会議（ICH）S6 ガイドラインに従い，in vitro 遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.9　In vivo 遺伝毒性試験

ゾルベツキシマブは，バイオテクノロジー応用医薬品であることから，ICH S6 ガイドラインに従い，in vivo 遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.10 がん原性試験

ゾルベツキシマブは，進行がん患者の治療を目的としていることから，ICH S9 ガイドラインに従い，がん原性試験は実施しなかった。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：ゾルベツキシマブ

<table>
<tr><th>Species/Strain</th><th>Method of Administration (Vehicle/Formulation)</th><th>Duration of Dosing</th><th>Doses (mg/kg)</th><th>Number of Pregnant Animals/Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Study Number</th></tr>
<tr><td>NMRI mice</td><td>intravenous bolus (lyophilized powder preparation was reconstituted with water for injection and diluted with physiological saline)</td><td>Single dose</td><td>30, 100, 300</td><td>3 non-pregnant females/time point</td><td>No noteworthy findings
<table><tr><th>Dose (mg/kg)</th><th>C_{max} (µg/ml)</th><th>AUC_{120h} (µg·h/mL)</th></tr><tr><td>30</td><td>631</td><td>30800</td></tr><tr><td>100</td><td>2070</td><td>76100</td></tr><tr><td>300</td><td>5870</td><td>150000</td></tr></table></td><td>8951-TX-1001</td></tr>
<tr><td>NMRI mice</td><td>intravenous bolus (lyophilized powder preparation was reconstituted with water for injection and diluted with physiological saline)</td><td>days 6 and 11 of gestation</td><td>0, 100, 200, 300</td><td>11 or 12/group</td><td>F_0 females:
No noteworthy findings

Fetuses:
No noteworthy findings</td><td>8951-TX-1002</td></tr>
</table>

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

ゾルベツキシマブは，進行がん患者の治療を目的としていることから，ICH S9 ガイドラインに従い，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

被験物質：ゾルベツキシマブ

Report Title: Study for Effects of IMAB362 on Embryo-Fetal Development by Intravenous Administration in NMRI Mice			
Study design: Based on ICH 4.1.3 (ICH S5(R2))	**Duration of Dosing:** Twice (GD 6 and GD 11)		**Study Number:** 8951-TX-0002
Species/Strain: NMRI mice	**Day of Mating:** GD 0		**Location in CTD:** Vol. 4, Section 4.2.3.5.2-3
Initial Age at First Dose: 11 to 13 Weeks (Females)	**Day of C-Section:** GD 18		**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** intravenous bolus		**Vehicle/Formulation:** zolbetuximab placebo: 0.02% polysorbate 80 / solution
Special Features: F_1 litters: toxicokinetics			
No Observed Adverse Effect Level: F_0 females and F_1 litters: 300 mg/kg			
Toxicokinetics			
Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**100**	**300**
No. of F_0 females per point	3	3	3
C_{max} (µg/mL) GD 6	NA	1820	5450
GD 11	NA	2190	5060
AUC_{120h} (µg·h/mL) GD 6	NA	67400	147000
GD 11	NA	55700	119000
Serum concentrations of dams (µg/mL) 120 hours after the 1st dose	NA	235	312
120 hours after the 2nd dose	NA	25.6	42.3
GD18	NA	7.93	9.70
Serum concentrations of litters (µg/mL) GD18	NA	89.2	82.3
Anti-zolbetuximab Antibodies			
No. of F_0 females	5	5	5
No of animals anti-zolbetuximab antibodies detected on GD 18	0	0	0
Noteworthy Findings for F_0 Females			
No. of F_0 females	23	23	24
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0
Total Resorption of Litter	0	0	0
Body Weight, Food Consumption	---	---	---
Clinical Observations	---	---	---
Gross Pathology	---	---	---
Mean No. Corpora Lutea [a)]	12.6	12.9	13.5
Mean No. Implantations [a)]	11.6	12.4	13.2

Table continued on next page

Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**100**	**300**
Noteworthy Findings for F_1 Litters			
No. of Litters Evaluated	22	21	21
Placental Findings			
Abnormalities [b)]	1 (4.55)	0 (0.00)	0 (0.00)
Enlargement	1 (4.55)	0 (0.00)	0 (0.00)
Placental Weight (g): Males	0.121	0.116	0.114
Females	0.105	0.111	0.110
No. of Live Fetuses	242	246	261
Mean No. of Embryo-Fetal Deaths	0.6	0.7	0.8
Mean No. of Live Fetuses	11.0	11.7	12.4
Mean % Postimplantation Loss	4.8	7.1	6.4
Implantation Site Rate (%)	0.0	0.0	0.0
Placental Remnant Rate (%)	3.0	7.1	5.4
Dead Fetus Rate (%)	1.7	0.0* [c)]	1.1
Sex Ratio (Male/Total)	0.544	0.459	0.505
Body Weight of Fetus (g): Males	1.46	1.54	1.51
Females	1.40	1.51* [d)]	1.45
No. of Fetuses Evaluated	242	246	261
External Findings			
Malformations			
Total No. of Litters with Abnormalities	1	2	1
No. of Fetuses with Abnormalities [b)]	2 (0.91)	2 (0.96)	2 (0.73)
Polydactyly	2 (0.91)	2 (0.96)	2 (0.73)
No. of Fetuses Evaluated	115	NE	126
Visceral Findings			
Abnormalities [b)]	0 (0.00)	NE	0 (0.00)
Variations			
Total No. of Litters with Variations	0	NE	1
No. of Fetuses with Variations [b)]	0 (0.00)	NE	1 (0.80)
Convoluted ureter	0 (0.00)	NE	1 (0.80)

Table continued on next page

Dose (mg/kg)	0 (Control)	100	300
No. of Litters Evaluated	22	21	21
No. of Fetuses Evaluated	127	NE	135
Skeletal Findings			
Abnormalities			
Total No. of Litters with Abnormalities	3	NE	1
No. of Fetuses with Abnormalities [b)]	3 (1.95)	NE	1 (0.53)
Fused sternebra	1 (0.65)	NE	0 (0.00)
Misaligned sternebra	2 (1.30)	NE	1 (0.53)
Fused rib	1 (0.65)	NE	0 (0.00)
Fused thoracic arch	1 (0.65)	NE	0 (0.00)
Misshapen thoracic arch	1 (0.65)	NE	0 (0.00)
Fused thoracic centrum	1 (0.65)	NE	0 (0.00)
Supernumerary lumbar arch	1 (0.65)	NE	0 (0.00)
Fused lumbar centrum	1 (0.65)	NE	0 (0.00)
Variations			
Total No. of Litters with Variations	19	NE	20
No. of Fetuses with Variations [b)]	56 (48.20)	NE	73 (53.93)
Thready fusion of sternebra	0 (0.00)	NE	1 (0.68)
Asymmetrical fusion of sternebra	1 (0.76)	NE	0 (0.00)
Asymmetry of sternebra	3 (2.21)	NE	2 (1.36)
Cervical rib	21 (18.63)	NE	27 (21.02)
Full supernumerary rib	18 (17.32)	NE	22 (16.47)
Short supernumerary rib	21 (15.16)	NE	32 (22.47)
Splitting of thoracic centrum	1 (0.65)	NE	0 (0.00)
Supernumerary lumbar vertebra	0 (0.00)	NE	1 (0.80)
No. of Ossified			
Sternebrae	5.99	NE	6.00
Sacral and caudal vertebrae	13.05	NE	13.52

---: no noteworthy findings; GD: day of gestation; IMAB362: zolbetuximab; NA: not applicable; NE: not examined.
a): F_0 females delivered before C-section were excluded. b): Total No. (mean %). c): Wilcoxon’s rank-sum test, d): Dunnett’s test (Log transformation). *: $P<0.05$.

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

ゾルベツキシマブは，進行がん患者の治療を目的としていることから，ICH S9 ガイドラインに従い，出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。

2.6.7.15 局所刺激性試験

局所刺激性の評価は独立した試験としては実施しなかった。局所刺激性の評価は，マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験（25469 試験）及びカニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験（22337 試験）の一部として行った。

2.6.7.16 その他の毒性試験

2.6.7.16.1 毒性発現の機序に関する試験（嘔吐に関する検討）

被験物質：ゾルベツキシマブ

Species and Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Gender and Number per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Ferrets	30 minutes intravenous infusion (physiological saline)	Single dose	0, 300 mg/m^2 (26 to 29 mg/kg)	4 males	Retching was noted between 20 and 85 minutes after initiation of infusion at 300 mg/m^2 in 2 out of 4 males. Mortality occurred in 2 males at 300 mg/m^2. Macroscopic findings were froth in the trachea and multiple, diffuse dark area in the lungs and a firm lung lobe which correlated histologically with congestion, hemorrhage, and bronchopneumonia. Bacterial colonies (rods) were observed in alveolar spaces.	No	AB10622
	NA	NA	NA	Tissues samples obtained from Study AB10622	CLDN18.2 exon 1 sequence is identical between ferrets and humans on amino acid level. CLDN18.2 mRNA expression was shown in stomach and esophagus, but not shown in the lung. Immunohistochemistry using FITC labelled-zolbetuximab and anti-CLDN18 antibody showed positive staining in the mucosal epithelium in the stomach and duodenum.	No	GP_P0118
	Intravenous bolus (physiological saline)	Single dose	0, 0.2, 1, 5, 20 mg/kg	1 or 2 males	At 1 mg/kg or more, clinical signs (retching, vomiting) and microscopic findings (mucosal atrophy and submucosal inflammation in the stomach) were noted. At 5 and 20 mg/kg, facial flush, reddish feces, low body temperature or lateral position was noted. The results recommend a dose of 1 mg/kg for the future investigative study.	No	8951-TX-1003

Table continued on next page

<table>
<tr><th>Species and Strain</th><th>Method of Administration (Vehicle/Formulation)</th><th>Duration of Dosing</th><th>Doses</th><th>Gender and Number per Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>GLP</th><th>Study Number</th></tr>
<tr><td>Ferrets</td><td>Intravenous bolus (physiological saline)</td><td>Single dose</td><td>0, 1 mg/kg</td><td>0 mg/kg: 3 males
1 mg/kg: 12 males
(3 males/time point)</td><td>At 0 mg/kg: no noteworthy findings
At 1 mg/kg: 212 times retching and 18 times vomiting during 6 hours after dosing
[Other noteworthy findings at 1 mg/kg]
<table>
<tr><td></td><td>15 minutes</td><td>First vomiting (10 to 22 minutes)</td><td>6 hours</td><td>2 weeks</td></tr>
<tr><td>Number of animals</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td></tr>
<tr><td>Gastric pH [a)]</td><td>4</td><td>4</td><td>4, 6 or 7</td><td>4</td></tr>
<tr><td>Stomach microscopy</td><td>Mild detachment of surface mucous cell</td><td>Mild to severe detachment of surface mucous cell</td><td>Moderate to severe erosion</td><td>Mild to moderate mineral deposition</td></tr>
<tr><td>Serum concentration (μg/mL)</td><td>29.5</td><td>32.5</td><td>16.2</td><td>0</td></tr>
</table>
a): pH 4 or 5 at 0 mg/kg</td><td>No</td><td>8951-TX-1004</td></tr>
</table>

Table continued on next page

Species and Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Gender and Number per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Ferrets	Zolbetuximab: intravenous bolus (saline) Antiemetics (Dex, Ond, Fos: intravenous bolus; Ola: intramuscular) Combo: Dex, Ond, Fos and Ola 3-30 minutes prior to zolbetuximab administration	Single dose	Zolbetuximab: 0, 1 mg/kg Dex: 20 mg/kg Ond: 3 mg/kg Fos: 3 mg/kg Ola: 0.03 mg/kg	4 males	Dex, Ond, Fos and combination of the 4 antiemetics significantly suppressed the frequency of emesis induced by zolbetuximab. Antiemetics administration tended to alleviate macroscopic abnormalities caused by administration of zolbetuximab in the gastric mucosa. In histopathological examination, antiemetics administration did not show clear suppression of the gastric tissues damage induced by zolbetuximab.	No	10844
	Zolbetuximab: intravenous bolus (saline) Antiemetics (Dex, Ond, Fos: intravenous bolus; Ola: intramuscular) Combo: Ond and Fos 3-30 minutes prior to zolbetuximab administration	Single dose	Zolbetuximab: 0, 1 mg/kg Dex: 20 mg/kg Ond: 3 mg/kg Fos: 3 mg/kg Ola: 0.03 mg/kg	4 males	Fos and its combination with Ond showed lower emesis frequency than zolbetuximab alone group. Dex, Ond or Ola did not suppress emesis frequency induced by zolbetuximab. Dex and combination of Ond and Fos tended to alleviate macroscopic abnormalities caused by zolbetuximab in the gastric mucosa. In histopathological examination, Dex and the combination of Ond and Fos tended to suppress the gastric tissues damage.	No	8951-TX-1005

CLDN18-2: claudin-18 splice variant 2; Dex: dexamethasone; FITC: fluorescein isothiocyanate; Fos: fosaprepitant; mRNA: messenger ribonucleic acid. NA: not applicable; Ola: olanzapine; Ond: ondansetron.

2.6.7.16.2 その他の試験（組織交差反応性）

被験物質：ゾルベツキシマブ

Species and Strain	Method of Administration	Doses	Gender and Number per Group	Noteworthy findings	GLP	Study Number
Human	Application to frozen tissue samples	Murine surrogate antibody muMAB362 4 µg/mL	Tissue panel from 3 human donors	Membrane staining in the mucosal epithelium of stomach tissue. No unexpected binding was noted.	No	GP_P0110
NMRI mice	Application to frozen tissue samples	Zolbetuximab (Clone #15) 3.33 µg/mL	Tissue panel from 1 animal	Membrane staining in the mucosal epithelium of stomach tissue. No unexpected binding was noted.	No	GP_P0123
Cynomolgus monkeys	Application to frozen tissue samples	Murine surrogate antibody muMAB362 4 µg/mL	Tissue panel from 1 to 3 separate animals	Membrane staining in the mucosal epithelium of stomach tissue. No unexpected binding was noted.	No	GP_P0121
NMRI mice	Application to frozen tissue samples	FITC labelled-zolbetuximab (Clone #15 and F02) 2, 5, 10 µg/mL FITC labelled-murine surrogate antibody muMAB362 2, 5, 10 µg/mL	Tissue panel from 3 separate animals	Membrane staining in the mucosal epithelium of stomach tissue regardless of produced clones. No unexpected binding was noted.	No	GP_P0105
Human	Application to frozen tissue samples	FITC labelled-zolbetuximab (Clone #15 and F02) 2, 5, 10 µg/mL	Tissue panel from 3 human donors	Membrane staining in the mucosal epithelium of stomach tissue regardless of produced clones. No unexpected binding was noted.	Yes	00319

FITC: fluorescein isothiocyanate.