テビムブラ点滴静注 100 mg

2.6.6　毒性試験の概要文
（根治切除不能な進行・再発の食道癌）

BeiGene Japan 合同会社
Confidential
BeiGene Japan 合同会社の許可を得ることなく
使用，漏洩，公表，又はその他の方法で開示することを禁じます。

目　次

1 まとめ 4
2 単回投与毒性試験 6
2.1 マウスを用いた単回静脈内投与毒性試験 6
2.2 サルを用いた単回静脈内投与毒性試験 7
3 反復投与毒性試験 7
3.1 サルを用いた13週間反復投与毒性試験 7
3.2 サルを用いた13週間反復投与毒性試験（主試験） 9
4 遺伝毒性試験 11
5 がん原性試験 11
6 生殖発生毒性試験 11
6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 11
6.2 胚・胎児発生に関する試験 12
6.3 出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験 13
6.4 幼若動物を用いた試験 13
7 局所刺激性試験 13
8 その他の毒性試験 13
8.1 免疫原性 13
8.2 免疫毒性試験 14
8.2.1 ヒトPBMCを用いたリコール応答試験 14
8.2.2 B-hPD-1マウスを用いたリコール応答試験 14
8.3 組織交差反応性試験 16
8.3.1 カニクイザル正常組織を用いた組織交差反応性試験 16
8.3.2 ヒト組織を用いた組織交差反応性試験 16
8.3.3 ヒト細胞膜タンパク質を用いた結合プロファイル 16
8.3.4 Biacoreの表面プラズモン共鳴法（SPR）を用いたTREML1結合プロファイル 17
8.4 In vitro溶血性試験 17
8.5 サイトカイン放出アッセイ 17
8.5.1 ヒト全血液細胞を用いたサイトカイン放出アッセイ 17
8.5.2 ヒトPBMCを用いたサイトカイン放出アッセイ 18
9 考察及び結論 18
10 参考文献 20

表 一 覧

Table 1-1 チスレリズマブの毒性試験一覧 5
Table 2-1 サルを用いた単回静脈内投与毒性試験におけるTKパラメータ 7
Table 3-1 サルを用いた13週間反復静脈内投与毒性試験におけるTKパラメータ 9
Table 3-2 サルを用いた13週間反復静脈内投与毒性試験（主試験）におけるTKパラメータ 11
Table 6-1 アロ妊娠モデルにおける流産発生頻度 12
Table 8-1 B-hPD-1マウスを用いたリコール応答試験の試験デザイン 15
Table 9-1 サル及びヒトにおける曝露量の比較 19

1 まとめ

チスレリズマブ（BGB-A317 ）の非臨床安全性及びトキシコキネティクス（TK）プロファイルは，医薬品規制調和国際会議（ICH）S6 (R1)「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」，及び ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」に基づき，マウス及びカニクイザルを用いた単回投与毒性試験，カニクイザルを用いた 2 週間に 1 回（Q2W）投与による 13 週間反復静脈内投与毒性試験により評価した。その他の毒性試験として，ヒト末梢血単核球（PBMC）及び B-hPD-1 マウス［ヒト PD-1 トランスジェニック（TG）マウス］を用いたリコール応答試験，サル及びヒトの正常凍結組織を用いた組織交差反応性試験，ヒト細胞膜タンパク質又は Biacore を用いた結合プロファイル試験，ウサギ赤血球を用いた *in vitro* 溶血性試験，サルの抗薬物抗体（ADA）陽性血清試料を用いた中和活性試験，ヒト全血細胞及びヒト PBMC を用いた *in vitro* サイトカイン放出アッセイ（CRA）を実施した。

非臨床安全性試験は，米国食品医薬品局（米国 FDA），経済協力開発機構（OECD），及び中国国家薬品監督管理局（NMPA）の Good Laboratory Practice（GLP）基準に準拠して [redacted]（中国）で実施した。2022 年 11 月の欧州の承認申請時に [redacted]（中国）で実施されたカニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験[Table 2.6.7.7 A-P14-057-CD]，並びにカニクイザル正常組織又はヒト組織を用いた組織交差反応性試験[Table 2.6.7.17 C-O14-057-2ZJ], [Table 2.6.7.17 D-O14-057-1ZJ]を対象とした欧州医薬品庁（EMA）の GLP 適合性に対するリモート査察が実施された。2023 年 1 月に受領した GLP 適合性に対するリモート査察報告書では，上記 3 試験は OECD（経済協力開発機構）の GLP 原則を遵守して実施されていないと判断された。そのため，チスレリズマブの非臨床安全性試験の充足性を適切に保持するため，OECD 加盟国（USA）で，GLP 適合施設を有する [redacted] にて，カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（GLP 適用）[Table 2.6.7.7 B-2270246]を新たに実施した。また，組織交差反応性試験成績を補完するため，ヒト細胞膜タンパク質又は Biacore を用いた結合プロファイル[Table 2.6.7.17 E-RP2177]，[Table 2.6.7.17 F-RD-2023-00116]を実施した。なお，[redacted] で実施されたその他の GLP 試験[Table 2.6.7.5-M14-057-JD]，[Table 2.6.7.5-P14-057-JD], [Table 2.6.7.17 H-O14-057-RX]については，上記の EMA の GLP リモート査察に基づき OECD の GLP 基準を保証できない。チスレリズマブの毒性試験一覧をTable 1-1に示す。

Table 1-1 チスレリズマブの毒性試験一覧

試験の種類及び投与期間		投与経路	試験系
単回投与毒性試験	単回	静脈内	マウス
		静脈内，持続投与	カニクイザル
反復投与毒性試験	13 週間	静脈内，持続投与	カニクイザル
	13 週間	静脈内	カニクイザル
		皮下	
その他の毒性試験			
リコール応答		*in vitro*	ヒト PBMC
	3 週間	腹腔内	ヒト PD-1 TG マウス
組織交差反応性		*in vitro*	カニクイザル正常組織
		in vitro	ヒト正常組織
結合プロファイル		*in vitro*	ヒト細胞膜タンパク質
		in vitro	ヒト TREML1 タンパク質
溶血性		*in vitro*	ウサギ赤血球
ADA 中和活性		*in vitro*	カニクイザル血清
CRA		*in vitro*	ヒト全血細胞
		in vitro	ヒト PBMC

毒性評価の動物種には，標的結合親和性及び機能活性アッセイ，並びに動物種間の PD-1ECD の配列相同性の結果を考慮して，薬理学的作用を示す動物種であるカニクイザルを選択した [2.6.2-2.1.1.3 項]，[2.6.2-2.1.2 項]。さらに，サルはモノクローナル抗体（mAb）に関する毒性試験で汎用され，十分な背景データを有することから，動物種の選択は妥当と考える。投与経路には，予定臨床投与経路である静脈内投与を選択した。毒性試験に供試した被験物質は，臨床開発及び販売承認に使用されるものと同等であった。

マウス及びカニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験では，100 mg/kg までの用量で死亡及び投薬に関連した毒性変化は認められず，忍容性は良好であった。

カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（主試験）では，60 mg/kg IV 群の雌 1 例が状態悪化により安楽殺処分され，忍容性は認められなかった。瀕死の原因は，血小板数の減少（消費性凝血障害）による出血に起因したものと考えられた。腎臓の変化を特徴とした重度の腎前性又は腎性高窒素血症を伴う顕著な低ナトリウム血症，及び複数臓器に血管の変化も認められた。60 mg/kg IV 群の別の雌 1 例でも安楽殺処分動物と同様の所見がみられ，本薬投与に関連した免疫原性に起因した毒性変化と考えられた。その他，全投薬群で心血管系，呼吸系，及び中枢神経系の機能に対する影響は認められなかった。TK 試験では，曝露量は用量依存的な増加を示し，雄では雌に比べ累積性が高かった。中和抗体試験では，単回及び反復投与のいずれにおいても多

くのサルで中和抗体が確認された。無毒性量（NOAEL）である 30 mg/kg における曝露量（AUC）は，予定臨床用量（200 mg）を投与した患者における曝露量の約 4.3～6.6 倍であった。

ヒト PBMC を用いた *in vitro* リコール応答試験ではリコール応答促進作用がみられたが，B-hPD-1 マウスを用いた *in vivo* 試験では抗体産生に及ぼす影響は認められなかった。

免疫組織化学による組織交差反応性試験では，正常サル組織及び正常ヒト組織に対するチスレリズマブの特異的結合は認められなかった。ヒト細胞膜タンパク質をコードする Retrogenix 細胞マイクロアレイを用いたオフターゲット結合プロファイルでは，チスレリズマブは標的である PD-1 (PDCD1)に結合し，TREML1 に対して弱い結合を示した。TREML1 の結合親和性は， PD-1 に比べて極めて弱い（3750 倍以上弱い）ことから，チスレリズマブの TREML1 結合に対する生理学的意義は低いと考えられた。なお，Biacore を用いた TREML1 結合プロファイルでは，チスレリズマブは TREML1 タンパク質への結合を示さなかった。

ウサギ赤血球を用いた *in vitro* 溶血性試験では，10 mg/mL 濃度で溶血性は認められなかった。ヒト全血細胞及びヒト PBMC を用いた CRA では，サイトカインの明らかな放出は認められなかった。

チスレリズマブの作用機序及び文献情報に基づき，胎児の発生に影響を及ぼす可能性が考えられることから（6.2項），ICH S9 ガイドラインに従い，チスレリズマブの生殖発生毒性試験は実施しなかった。

以上より，本概要に示す毒性試験成績は添付文書で規定される用法・用量の範囲内において，チスレリズマブのがん患者への使用を支持するものと考える。

2 単回投与毒性試験

2.1 マウスを用いた単回静脈内投与毒性試験

本試験[Table 2.6.7.5-M14-057-JD]は，チスレリズマブのマウスにおける急性毒性評価を目的として，GLP 適用で実施した。ただし，EMA の GLP リモート査察に基づき OECD GLP 基準を保証できない。1 群雌雄各 10 例の ICR マウスに，注射用生理食塩液で希釈し調製したチスレリズマブを 0（placebo 製剤：25 mM クエン酸，15 mM ヒスチジン，190 mM トレハロース，0.02%ポリソルベート），30，及び 100 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。投与後 28 日間観察し，試験 28 日に剖検した。

本試験で死亡及び瀕死は認められず，一般状態，体重，摂餌量，及び剖検に異常は認められなかった。

以上のとおり，本試験における概略の致死量は 100 mg/kg を超える量と考えられた。

2.2 サルを用いた単回静脈内投与毒性試験

本試験[Table 2.6.7.5-P14-057-JD]は，チスレリズマブのサルにおける急性毒性評価を目的として，GLP 適用で実施した。ただし，EMA の GLP リモート査察に基づき OECD GLP 基準を保証できない。1 群雌雄各 1 例のカニクイザルに，注射用生理食塩液で希釈し調製したチスレリズマブを 0（placebo 製剤：25 mM クエン酸，15 mM ヒスチジン，190 mM トレハロース，0.02%ポリソルベート），10，30，及び 100 mg/kg の用量で単回持続静脈内投与した。投与速度は 30 mL/kg/h，投与容量は 10 mL/kg（持続投与時間は約 20 分間）とした。投与後 28 日間観察し，試験 28 日に剖検した。

本試験で死亡及び瀕死は認められず，一般状態，体重，摂餌量，体温，心電図，血液学的検査，血液凝固系検査，血液生化学的検査，尿検査，及び剖検に異常は認められなかった。

TK 試験の結果，チスレリズマブの曝露量は概ね用量に比例して増加し，曝露量に明らかな性差は認められなかった（Table 2-1）。

中和抗体が各群の 2 例中 1 例に検出されたが，免疫関連毒性を示唆する免疫複合体の形成及び沈着，並びに曝露量への明らかな影響は認められなかった。したがって，中和抗体の存在は，本試験の評価に影響を及ぼすものではないと考えられた。

以上のとおり，本試験における概略の致死量は 100 mg/kg を超える量と考えられた。

Table 2-1 サルを用いた単回静脈内投与毒性試験における TK パラメータ

用量 (mg/kg)	C_{max} (µg/mL)		$AUC_{0\text{-}648h}$ (µg.h/mL)	
	雄	雌	雄	雌
10	290.93	269.98	52658.71	48083.12
30	960.23	834.53	160976.09	163032.88
100	3674.21	2955.57	825890.67	654400.92

Source：Table 2.6.7.5-P14-057-JD

3 反復投与毒性試験

3.1 サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験

本試験[Table 2.6.7.7 A-P14-057-CD]は，チスレリズマブの反復投与毒性及び休薬による毒性の回復性の検討を目的として，GLP 適用で実施した。しかし，EMA の GLP リモート査察に基づき GLP 原則を遵守して実施されていないと判断された。1 群雌雄各 6 例のカニクイザルに注射用生理食塩液で希釈し調製したチスレリズマブを 0（placebo 製剤：25 mM クエン酸，15 mM ヒスチジン，190 mM トレハロース，0.02%ポリソルベート／注射用生理食塩液），3，10，及び 30 mg/kg の用量で，2 週間に 1 回，13 週間反復持続静脈内投与した。投与速度は 30 mL/kg/h，投与容量は 5 mL/kg（持続投与時間は約 10 分間）とした。対照群の動物には，注射用生理食塩液で高用量と同じ割合に希釈した placebo 製剤を投与した。（ただし初回投与日は placebo 製剤のみ）。

1 群雌雄各 2 例は回復性試験群とし，投与期間終了後，6 週間の休薬により回復性を検討した。検査項目として，一般状態観察（投与部位の観察を含む），体重及び摂餌量測定，体温測定，心電図測定，眼科学的検査，血液学的検査，血液凝固系検査，血液生化学的検査，尿検査，リンパ球サブセット検査（$CD3^+$，$CD4^+$，$CD8^+$，$CD20^+$，$CD40^+$，$CD4^+/CD8^+$比），サイトカイン検査（TNF-α，IFN-γ，IL-2，IL-6），剖検，器官重量測定，病理組織学的検査，TK 試験，及び ADA 検査を実施した。

死亡及び瀕死は認められなかった。一般状態（投与部位を含む），体重，摂餌量，体温，及び心電図に投薬に関連した影響はみられず，眼科学的検査，血液学的検査，血液凝固系検査，血液生化学的検査，尿検査，リンパ球サブセット検査，及びサイトカイン検査において毒性学的意義のある変化は認められなかった。剖検，器官重量測定，及び病理組織学的検査では，投薬に関連した異常は認められなかった。

TK 試験の結果，曝露量は用量依存的な増加を示し，明らかな性差は認められなかった。30 mg/kg 群の雌雄における曝露量（$AUC_{0\text{-}336h}$）は，いずれの検査日においても 3 mg/kg 群の曝露量の 10～30 倍の範囲内であった。試験 1 日と試験 71 日の $AUC_{0\text{-}336h}$ を比較すると，すべての用量で 0.61～1.87 倍の範囲内であり，反復投与による累積性又は曝露量の明らかな変化は認められなかった（Table 3-1）。

ADA 検査では，投与期間終了時（試験 91 日）に 3，10，及び 30 mg/kg 群でそれぞれ 8/12 例，6/12 例，及び 5/12 例に ADA が検出され（雌雄合計），回復性試験期間終了時（試験 133 日）にも認められた。ADA 陽性例の発現頻度は投与期間に依存する傾向がみられたが，用量依存性は認められなかった。また，これらの抗体の多くにチスレリズマブに対する中和活性が認められた[Table 2.6.7.17 G-NAB-P14-057]。カニクイザルの血清中チスレリズマブは，ヒト PD-1 ECD を固相化抗原とした酵素結合免疫測定（ELISA）法により定量した。チスレリズマブに結合した中和抗体は，チスレリズマブの PD-1 ECD への結合と競合し，チスレリズマブの検出を妨げると考えられた。ELISA 法で定量した 30 mg/kg 群の血清中チスレリズマブ濃度は，予定臨床用量（200 mg）を投与した患者における曝露量の約 5～8 倍の高値であった。したがって，中和抗体非結合のチスレリズマブ曝露量は本薬の特性を把握するのに十分な量であったことから，本試験で認められた中和抗体が評価に及ぼす影響はないと考えられた。

Table 3-1 サルを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験における TK パラメータ

用量 (mg/kg)	検査日	C_{max} (μg/mL)		$AUC_{0\text{-}336h}$ (μg.h/mL)	
		雄	雌	雄	雌
3	1	86.34	75.47	11869.38	11924.35
	29	66.73	66.59	5400.11	6297.68
	71	62.76	61.85	7287.91	9114.64
10	1	251.59	257.36	36425.96	37188.03
	29	344.54	332.38	28803.27	36961.88
	71	403.54	518.54	44584.56	69396.93
30	1	849.18	846.97	125871.33	117736.34
	29	1025.81	1059.39	144696.29	113969.77
	71	1238.80	908.50	218887.91	138577.50

Source：Table 2.6.7.7 A-P14-057-CD

以上のとおり，チスレリズマブを 3，10，及び 30 mg/kg の用量で，カニクイザルに 2 週間に 1 回，計 7 回，13 週間反復静脈内投与した結果，明らかな毒性及び炎症性変化は認められなかった。病理組織学的検査では，雌雄生殖器系を含むいずれの器官・組織においても投薬に関連した変化はみられず，心血管系，呼吸系，及び中枢神経系の機能に対する影響も認められなかった。中和抗体が検出された動物の曝露量は，検出されなかった動物よりも低い傾向が認められた。30 mg/kg 群の曝露量は，予定臨床用量（200 mg）を投与した患者と比較して約 5～8 倍と高値であったことから，本試験においてチスレリズマブの毒性プロファイルは適切に評価されたものと考えられる。本試験の NOAEL は 30 mg/kg Q2W と考えられた。

3.2 サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（主試験）

本試験[Table 2.6.7.7 B-2270246]は，チスレリズマブの反復投与毒性の検討を目的として，GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 3 例のカニクイザルに注射用生理食塩液で希釈し調製したチスレリズマブを 0（placebo 製剤：25 mM クエン酸，15 mM ヒスチジン，190 mM トレハロース，0.02% ポリソルベート／注射用生理食塩液），30，及び 60 mg/kg の用量で，2 週間に 1 回，13 週間反復静脈内投与した。また，1 群雄 3 例にチスレリズマブを 100 mg/kg の用量で，2 週間に 1 回，計 2 回（試験 75 日及び 89 日）皮下投与した際の毒性及び曝露量を評価して，投与経路間のバイオアベイラビリティを比較した。

検査項目として，一般状態観察（投与部位の観察を含む），体重及び摂餌量測定，心電図測定，呼吸検査，眼科学的検査，血液学的検査，血液凝固系検査，血液生化学的検査，尿検査，骨髄塗抹標本検査，リンパ球サブセット検査（CD3+CD20-CD14-，CD3+CD4+CD8-，CD3+CD4-CD8+，CD3-CD20+，CD3-CD20-CD159a+），サイトカイン検査（TNF-α，IFN-γ，IL-2，IL-4，IL-5，IL-6，IL-10，及び IL-13），剖検，器官重量測定，病理組織学的検査，TK 試験，及び ADA 検査を実施した。

いずれの投薬群においても体重及び摂餌量に投薬に関連した影響はみられず，眼科学的検査，尿検査，剖検，及び器官重量測定では本薬投与に関連した変化は認められなかった。心血管系，中枢神経系，及び呼吸系への影響も認められなかった。

60 mg/kg IV 群の雌 1 例で鼻出血，立毛，眼のくぼみ，蒼白，皮膚の色素異常，円背位，不規則/可聴呼吸，及び活動性低下が認められたため，投与後 31 日に安楽殺処分した。瀕死例の血液学的検査では，血小板数，赤血球量，網状赤血球数，網状赤血球率，平均赤血球容積，リンパ球数，及び単球数の減少，活性化部分トロンボプラスチン，及びプロトロンビン時間の延長，並びにフィブリノゲンの増加が認められた。瀕死例の血液生化学的検査では，ナトリウム，クロール，リン，及びアルブミンの減少，並びに尿素窒素，クレアチニン，C 反応性蛋白，トリグリセリド，AST，ALT，グルタミン酸脱水素酵素，γ-グルタミルトランスフェラーゼ，カリウム，グルコース，及び総ビリルビンの増加が認められた。瀕死例の病理組織学的検査では，肝臓で好中球浸潤を伴う肝細胞壊死，肝細胞の空胞化及び単核細胞浸潤，並びに複数組織（心臓，膀胱，直腸，子宮頸部，及び膣）に血管の変化が認められた。瀕死例のサイトカイン測定では，投与後 30 日に IL-6 の増加（血管炎に関連）が認められた。

生存例の血液凝固系検査では，60 mg/kg IV 群の雌 1 例でフィブリノゲンの増加が認められた。

生存例の血液生化学検査では，60 mg/kg IV 群の雌 1 例で C 反応性蛋白，グロブリン，トリグリセリド，AST，グルタミン酸脱水素酵素，及び ALP の増加，並びにアルブミン／グロブリン比及びリン濃度の減少が認められた。60 mg/kg IV 群の雄 1 例で C 反応性蛋白の増加，並びにアルブミン及びアルブミン／グロブリン比の減少が認められた。

生存例のリンパ球サブセット検査では，60 mg/kg IV 群の 3 例で血中総 T 細胞，ヘルパーT 細胞及び細胞傷害性 T 細胞の一過性の減少がみられたが，投与期間中に部分的又は完全に回復したことから毒性学的意義は不明であった。

生存例の病理組織学的検査では，60 mg/kg IV 群の雌 1 例で複数組織（心臓，大動脈，膵臓，甲状腺，膀胱，坐骨神経，食道，盲腸，結腸，卵巣，子宮，子宮頸部，膣）の血管に変化（変性，壊死，混合性炎症細胞，又は内皮細胞の肥大），腎臓に好塩基性尿細管，タンパク円柱，尿細管変性／壊死，混合性炎症細胞，糸球体の細胞充実性及び基質の増加，並びに血管拡張が認められ，本薬投与に関連した変化と考えられた。

TK 試験の結果，NOAEL の 30 mg/kg IV Q2W 投与時の投与後 71 日の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}336h}$ は，先に実施した 13 週間反復静脈内投与毒性試験（3.1項）と同程度であり，反復投与により同様の累積性が認められた。曝露量は用量依存的な増加を示し，雄では雌に比べ累積性が高かった。100 mg/kg SC 群の曝露量と 30 及び 60 mg/kg IV 群の曝露量を比較したバイオアベイラビリティは，それぞれ 85.9%及び 88.2%と推定された（Table 3-2）。30 mg/kg 群の血清中チスレリズマブ濃度は，予定臨床用量（200 mg）を投与した患者における曝露量の約 4.3～6.6 倍であった。

ADA 検査では，投与期間終了時までに 30 及び 60 mg/kg 群で雌雄合計 10/12 例に ADA が検出された。

以上のとおり，チスレリズマブを 30 及び 60 mg/kg の用量で，カニクイザルに 2 週間に 1 回，計 7 回，13 週間反復静脈内投与した結果，60 mg/kg IV 群の雌 1 例が一般状態の悪化に伴う安楽殺処分されたことから忍容性は認められなかった。瀕死状態の原因は，血小板数減少（消費性凝血障害）に起因した出血，並びに重度の腎前性又は腎性高窒素血症を伴う顕著な低ナトリウム血症と考えられた。生存した 60 mg/kg IV 群の雌 1 例では本薬投与に関連した腎臓及び血管に病理組織学的変化が認められ，多臓器性の血管炎症を伴う免疫原性によるものと考えられた。100 mg/kg SC 群については，いずれの検査項目においても毒性変化は認められなかった。

本試験の NOAEL は IV 群では 30 mg/kg，SC 群では 100 mg/kg と考えられた。

Table 3-2　サルを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験（主試験）における TK パラメータ

用量 (mg/kg)	検査日	C_{max} (µg/mL)		$AUC_{0\text{-}336h}$ (µg.h/mL)	
		雄	雌	雄	雌
30（IV）	1	695	696	105000	102000
	71	1200	818	178000	116000
60（IV）	1	1360	1380	205000	193000
	71	2480	1320	484000	194000
100（SC）	1	NA	NA	NA	NA
	75	1230	NA	301000	NA

Source：Table 2.6.7.7 B-2270246

4　遺伝毒性試験

チスレリズマブはモノクローナル抗体であり，DNA 又は他の染色体物質と直接相互作用するとは考え難いことから，ICH S6 (R1)ガイドラインに従い，遺伝毒性試験は実施しなかった。

5　がん原性試験

チスレリズマブは進行がんの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。

6　生殖発生毒性試験

6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（主試験）（3.2項）では，雌雄の生殖器に肉眼的及び病理組織学的変化は認められなかった。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。

6.2 胚・胎児発生に関する試験

本薬の胚・胎児発生に関する試験は実施しなかったが，ICH S9 ガイドラインに従い，PD-1/PD-L1（プログラム細胞死リガンド 1）の動物における胚・胎児毒性，女性の正常及び異常妊娠，並びに TG マウス及び患者の免疫関連反応に及ぼす影響について文献情報に基づく評価を実施した。その概要を以下に示す。

PD-1/PD-L1 経路は胎児に対する免疫寛容の維持に関与しているため，動物モデルにおいて，PD-1/PD-L1 経路の阻害により胎児に対する免疫寛容が破綻し，胚・胎児死亡に至る可能性が示されている（Tripathi and Guleria 2015）。腫瘍に高発現する PD-L1 への PD-1 の結合は，子宮胎盤境界面に高発現する PD-L1 への PD-1 の結合と類似している（Guleria et al. 2005，Habicht et al. 2007，Petroff and Perchellet 2010）。同種異系妊娠マウスモデルでは，PD-1/PD-L1 経路の阻害による胎児死亡又は流産の誘発が報告されている（Table 6-1）。なお，これらの動物の出生児において，PD-1/PD-L1 経路の阻害に関連した催奇形性は報告されていない。

Table 6-1 アロ妊娠モデルにおける流産発生頻度

モデル F × M	自然流産発生頻度	用量	PD-1 阻害後の流産発生頻度	同種異系レベル	文献
CBA × C57BL/6	18%	抗 PD-L1: 250, 500 µg/dose	86%	遠祖	Guleria et al. 2005
C57BL/6 × CBA	19%	抗 PD-L1: 250, 500 µg/dose	62%	遠祖	Habicht et al. 2007

F × M：交配した雌及び雄の系統を示す

さらに，アロ抗原特異的 $CD4^+$ TCRTG マウスモデルにおいて，PD-L1 及びヘルパーT17 細胞（Th17）と胎児母体寛容との関連性が示されている（D'Addio et al. 2011）。PD-L1 阻害抗体を投与した Thy1.1 コンジェニック B6 妊娠雌マウス（Bm12 雄マウスと交配）では，胎児死亡の増加及び平均出生児数の減少が報告されているが，インターロイキン 17（IL-17）を中和すると，平均胎児吸収の有意な減少及び平均出生児数の増加が認められ，胎児生存率に対する抗 PD-L1 作用が消失する。PD-L1 誘発性胎児母体寛容における制御性 T 細胞（Treg）の役割を検討した結果，抗 PD-L1 モノクローナル抗体（mAb）を投与したマウスの平均出生児数は 6 例付近であったのに対し，Treg 移植後の平均出生児数は最大 8 例まで増加した（D'Addio et al. 2011）。

妊娠中の PD-1/PD-L1 経路の影響はヒトでも報告されている。2 回以上の流産を経験した不育症の女性を対象とした前向きコホート研究では，1 人以上の生児を出産した女性と比較して，不育症の女性は Th17 細胞での PD-1 及び PD-L1 の発現，並びに Th1 細胞での PD-1 の発現が有意に低いことが報告されている（Wang et al. 2020）。ヒト胎盤での PD-L1 の発現は，第 1 妊娠三半期で低く，第 2 及び第 3 妊娠三半期で顕著に増加することから，妊娠の進行過程における PD-L1 の役割が示唆される（Holets et al. 2006）。同様に，反復性流産等の妊娠合併症を有する女性の脱落膜では M1 型マクロファージが高頻度に存在し，PD-1 の発現低下と関連している（Zhang et al.

2019）。これらの報告は，PD-1/PD-L1 の発現が妊娠の成立に重要な役割を果たしていることを示すものである。

以上のように，動物モデルでは PD-1/PD-L1 経路の阻害により胎児死亡が生じ，PD-1/PD-L1 の発現は正常な妊娠の成立及び維持に不可欠な役割を有する。これらの文献に基づく評価から，チスレリズマブを妊婦に投与した場合，胎児毒性の発現，流産又は死産の増加，あるいは胎児の正常な免疫応答に影響を及ぼす可能性が示唆される。したがって，PD-1/PD-L1 経路の阻害に伴う発生毒性は既知の事象であることから，チスレリズマブの胚・胎児発生に関する試験は実施しなかった。

6.3 出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験

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動物の機能に関する試験は実施しなかった。

公表文献では，PD-1 は自己反応性リンパ球の活性化を阻害することにより，異常な免疫応答を抑制する上で重要な役割を有するとされている。PD-1 及び PD-L1 ノックアウトマウスは，ループス様糸球体腎炎，関節炎及び心筋症等の遅発性自己免疫表現型を発症することが報告されている（Nishimura et al. 1999，Okazaki and Honjo 2007）。また，メタアナリシスでは，PD-1 の遺伝子多型が関節リウマチ，強直性脊椎炎及び 1 型糖尿病患者の感受性と関連していることが示唆されている（Lee et al. 2015）。これらの報告から，妊娠中の PD-1/PD-L 経路の阻害により，新生児での自己免疫疾患の誘発又は増悪の可能性が示唆される。

6.4 幼若動物を用いた試験

該当資料なし。

7 局所刺激性試験

チスレリズマブの独立した局所刺激性試験は実施しなかった。投与部局所への影響は，サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（3.1項，3.2項）で一般状態観察及び病理組織学的検査により評価した。当該試験ではチスレリズマブ投与に関連した異常は認められなかった。

8 その他の毒性試験

8.1 免疫原性

免疫原性に関する特定の非臨床試験は実施しなかった。ADA 及び中和活性はサルを用いた 13 週間反復投与毒性試験で評価した。多くのサルで中和抗体が検出されたものの，免疫複合体に関連した毒性は認められなかった。13 週間反復投与毒性試験（主試験）における NOAEL 30 mg/kg でのサルの AUC は，予定臨床用量の 200 mg を投与した患者と比較して 4.3～6.6 倍高かった（3.2項）。

8.2 免疫毒性試験

免疫毒性の評価は，サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（3.1項，3.2項）にて実施した。血液学的検査，血液凝固系検査，血液生化学的検査，リンパ球サブセット検査，サイトカイン検査，器官重量測定，及び病理組織学的検査で，免疫毒性を示唆する変化は認められなかった。

メモリーT 細胞上の PD-1 受容体がアップレギュレートすることにより，過去に認識した外来抗原に対するリコール応答が顕著に低下することが報告されている（Fuse et al. 2009）。抗 PD-1 抗体による治療中の患者がワクチン接種を受けた場合，PD-1 阻害により抗原に対するリコール応答が増強される可能性がある。そこで，リコール応答又は免疫記憶に対するチスレリズマブの潜在的な影響を評価するため，ヒト PBMC を用いた *in vitro* 試験及び B-hPD-1 マウスを用いた *in vivo* 試験を実施した。

8.2.1 ヒト PBMC を用いたリコール応答試験

本試験[2.6.7.17 A-BLGC-029]は，チスレリズマブのリコール応答に対する影響を評価する目的で，GLP 非適用で実施した。HLA-A2.1^{+}健康ドナーから単離した PBMC をチスレリズマブ存在下で 4 日間培養し，サイトメガロウイルス pp65 ペプチド（リコール抗原，Slezak et al. 2007）で再刺激した。T 細胞活性化の指標として，IFN-γ 産生量を ELISA にて測定した。

その結果，チスレリズマブ処理により，陰性対照（培地又はヒト IgG 抗体）と比較して，IFN-γ 産生の有意な亢進が認められた。

同様の *in vitro* アッセイにおいて，ニボルマブがサイトメガロウイルスリコール応答におけるサイトカインの産生を増強することが示されている（Wang et al. 2014）。ニボルマブとの併用によるカニクイザルを用いたワクチン接種試験では，抗原ワクチンを接種したサルにおけるニボルマブの液性免疫応答（抗体価）に対する影響は，有意ではない又はわずかであった（Wang et al. 2014）。また，ペムブロリズマブを投与されたがん患者において，インフルエンザワクチン接種と免疫関連有害事象の増加との間に関連は認められず，インフルエンザワクチン接種の安全性が裏付けられた（Chong et al. 2020，Failing et al. 2020）。

以上より，ヒト PBMC を用いた *in vitro* 試験の結果から，既承認の抗 PD-1 抗体薬と同様に，チスレリズマブが T 細胞介在性のリコール応答を増強する可能性があり，過去に認識した外来抗原に対する免疫応答の増強，及び免疫応答関連の毒性発現の可能性が示唆された。ワクチン接種後の抗 PD-1 抗体の使用によって液性免疫応答（抗体価）が促進される可能性は低いと考えられた。

8.2.2 B-hPD-1 マウスを用いたリコール応答試験

本試験[2.6.7.17 B-BGB-A317-IVP-Tox-OT-0001]は，チスレリズマブの免疫刺激作用及び抗体産生亢進作用について評価する目的で，GLP 非適用で実施した。1 群 6 例，計 4 群の B-hPD-1 雌マウスを用い，キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）を抗原として T 細胞依存性抗体産生反応（TDAR）に対するチスレリズマブの作用を評価した。1 群（抗原非感作対照群）には媒体（Dulbecco リン酸緩衝生理食塩液，DPBS）を，2～4 群には KLH（5 mg/kg）を，試験 2 日及び

23 日に皮下投与し感作した。2 群は溶媒対照群として DPBS を週 1 回腹腔内投与し，3 及び 4 群にはチスレリズマブを 10 mg/kg の用量で，それぞれ初回応答を確認する目的で試験 1，8，及び 15 日に，並びにリコール応答を確認する目的で試験 22，29，及び 36 日に腹腔内投与した。試験 2 日から週 1 回，各群のマウスから採血し，ELISA により抗 KLH 抗体（IgG）抗体価を測定した。さらに，3 群では試験 2，8，9，15，及び 16 日に，4 群では試験 23，29，30，36，37，及び 40 日に採血し，ELISA により血清中チスレリズマブ濃度を測定し，抗体価に及ぼす影響を評価した。本試験の試験デザインをTable 8-1に示す。

Table 8-1　　B-hPD-1 マウスを用いたリコール応答試験の試験デザイン

群	KLH 感作日	被験物質	投与日		採血日	
	試験 2, 23 日		試験 1, 8, 15 日	試験 22, 29, 36 日	KLH 測定用	PK 測定用
1	DPBS, s.c.	NA	NA	NA	試験 2, 9, 16, 23, 30, 37, 44 日	NA
2	5 mg/kg, s,c,	Vehicle	DPBS, i.p.	DPBS, i.p.		NA
3	5 mg/kg, s,c,	チスレリズマブ	10 mg/kg, i.p.	DPBS, i.p.		試験 2, 8, 9, 15, 16 日
4	5 mg/kg, s,c,	チスレリズマブ	DPBS, i.p.	10 mg/kg, i.p.		試験 23, 29, 30, 36, 37, 40 日

DPBS：Dulbecco リン酸緩衝生理食塩液，i.p.：腹腔内，KLH：スカシガイ由来ヘモシアニン，NA：該当なし，s.c.： 皮下

中和抗体の影響により，3 群及び 4 群ともに 3 回投与後の血清中チスレリズマブはほとんど検出されなかった。チスレリズマブの 14 日間の曝露量（$AUC_{0\text{-}14d}$）は，3 群で 1279 ± 85 µg.day/mL，4 群で 1192 ± 103 µg.day/mL であり，有効臨床用量（200 mg を 3 週間に 1 回投与）における曝露量（$AUC_{0\text{-}21d}$：1122 µg·day/mL）と比較して高値であった。B-hPD-1 マウスにおいて，2～3 群のいずれにおいても初回 KLH 感作によりわずかな抗体産生がみられ，2 回目投与後にはリコール応答による抗体産生の増大が認められた。チスレリズマブ群では，対照群（2 群）と同様の一次及びリコール応答がみられ，KLH 感作に対するチスレリズマブの影響は認められなかった。試験期間を通して，群間の体重推移に明らかな差は認められなかった。

本結果は，ヒト抗 PD-1 抗体（ニボルマブ，Wang et al. 2014）が，サルを用いた TDAR 評価において一次及び二次応答を亢進させなかったことを示す公表データと一致している。B 型肝炎ワクチンを用いた TDAR マウスモデルを用い，ペムブロリズマブの機能的サロゲート抗体である muDX400 について検討した試験では，対照群と比較して，ワクチンに対する免疫応答の変化は認められなかった（Hutchins et al. 2020，Plitnick et al. 2020）。これらの公表文献より，*in vivo* 動物モデルにおいては，PD-1 を介した T 細胞機能の再活性化によってワクチン接種に対する抗体反応が亢進されるリスクは低いと考えられた。

以上のとおり，ヒト PBMC を用いた *in vitro* 試験及び B-hPD-1 マウスを用いた *in vivo* 試験の結果，チスレリズマブによる治療中の患者が感染又はワクチン接種を受けた場合，過去に認識した抗原に対するリコール応答の増強及びリコール抗原に対する過剰反応に関連した毒性が発現する可能性は否定できなかった。

8.3 組織交差反応性試験

8.3.1 カニクイザル正常組織を用いた組織交差反応性試験

本試験[Table 2.6.7.17 C-O14-057-2ZJ]は，チスレリズマブの組織交差反応性を評価する目的で，GLP 適用で実施した。ただし，EMA の GLP リモート査察に基づき GLP 原則を遵守して実施されていないと判断された。正常カニクイザル 3 例から採取した 30 組織について凍結切片を作製し，免疫組織化学法により評価した。一次抗体として 0.5 及び 2 µg/mL のビオチン標識チスレリズマブ（BT317）を用い，ビオチン標識ヒト免疫グロブリン G1（IgG1，2 µg/mL）抗体を対照抗体とした。陰性対照群は 0.05% Tween 20 リン酸緩衝生理食塩液（PBST）で処理した。陽性及び陰性対照細胞には PD-1 導入及び未導入の Jurkat 細胞（Jurkat/PD-1 細胞及び Jurkat 細胞）をそれぞれ使用した。

試験の結果，カニクイザル正常組織に対するチスレリズマブの特異的染色は認められなかった。

8.3.2 ヒト組織を用いた組織交差反応性試験

本試験[Table 2.6.7.17 D-O14-057-1ZJ]は，チスレリズマブの組織交差反応性を評価する目的で，GLP 適用で実施した。ただし，EMA の GLP リモート査察に基づき GLP 原則を遵守して実施されていないと判断された。健康ドナー3 例から採取した 30 組織について凍結切片を作製し，免疫組織化学法により評価した。一次抗体として 0.5 及び 2 µg/mL の BT317 を用い，ビオチン標識 IgG1（2 µg/mL）を対照抗体とした。陰性対照群は PBST で処理した。陽性対照細胞には Jurkat/PD-1 細胞を，陰性対照細胞には Jurkat 細胞を使用した。

試験の結果，ヒト正常組織に対するチスレリズマブの特異的染色は認められなかった。

8.3.3 ヒト細胞膜タンパク質を用いた結合プロファイル

本試験[Table 2.6.7.17 E-RP2177]は，チスレリズマブの非特異的結合性を評価する目的で，GLP 非適用で実施した。6101 種のヒト細胞膜タンパク質（分泌型及び細胞表面結合型ヒト分泌タンパク質及び 396 種のヒトヘテロ二量体）を発現したヒト HEK293 細胞に対するチスレリズマブの結合性を評価した。なお，チスレリズマブは PD-1（PDCD1）遺伝子がコードするヒト PD-1 タンパク質を標的とする。AlexaFluor 647 標識抗ヒト IgG Fc（AF647 anti-hIgG Fc）検出抗体を使用して，[redacted] の蛍光分析（AF647 及び ZsGreen1）により同定した。未固定又は固定した HEK293 細胞に 20 µg/mL チスレリズマブで処理した（固定細胞：n = 2，未固定細胞：n = 1）。陰性対照では PBS，陽性対照では 1 µg/mL のリツキシマブバイオシミラーで処理した。

試験の結果，チスレリズマブで処理した固定細胞及び未固定細胞では，標的である PD-1 に特異的な強い相互作用を示した。なお，チスレリズマブで処理した未固定細胞では，TREML1 にも相互作用を示したが，その強度は弱く，固定細胞では検出されなかった。陽性対照では，固定細胞で過剰発現した CD20 に中等度又は強力な相互作用を示したことから，試験系の妥当性が確認された。フローサイトメトリーの追加検討では，チスレリズマブは標的である PD-1 に強い蛍光

強度の結合（EC_{50} = 0.08 µg/mL）がみられ，TREML1 に弱い蛍光強度の結合（EC_{50} > 300 µg/mL）が認められた。

以上のことから，チスレリズマブは標的である PD-1 に結合し，TREML1 に対して弱い結合を示した。TREML1 の結合親和性は，PD-1 に比べて極めて弱い（3750 倍以上弱い）ことから，チスレリズマブの TREML1 結合に対する生理学的意義は低いと考えられた。

8.3.4 Biacore の表面プラズモン共鳴法（SPR）を用いた TREML1 結合プロファイル

本試験[Table 2.6.7.17 F-RD-2023-00116]は，チスレリズマブのヒト細胞膜タンパク質を用いた結合プロファイル[Table 2.6.7.17 E-RP2177]で TREML1 に弱い相互作用が認められたことから，Biacore の SPR を用いた TREML1 のオフターゲット結合プロファイルを抗ヒト Fab 捕捉法及び抗ヒスチジン捕捉法にて検討した。市販の TREML1 及び陽性対照（抗 TREML1 抗体）を使用した。

抗ヒト Fab 捕捉法では，固相化した抗 Fab IgG 抗体にチスレリズマブ（1.56～100 nM）を捕捉した後，TREML1，陽性対照（PD1-Fc）又は陰性対照をオーバーフローさせた。抗ヒスチジン捕捉法では，固相化した抗ヒスチジン IgG 抗体に TREML1 を捕捉した後，チスレリズマブ（3.12～100 nM），陽性対照（抗 TREML1 抗体）及び陰性対照をオーバーフローさせた。

試験の結果，陽性対照は結合親和性を示したが，いずれの方法においてもチスレリズマブは TREML1 への結合を示さなかった。

8.4 In vitro 溶血性試験

本試験[Table 2.6.7.17 H-O14-057-RX]は，ウサギ赤血球（RBC）を用いてチスレリズマブの溶血性を評価する目的で，GLP 適用で実施した。ただし，EMA の GLP リモート査察に基づき OECD GLP 基準を保証できない。チスレリズマブ（10 mg/mL，容量 0.1～0.5 mL，注射用食塩液を 2.5 mL まで添加）を 2% RBC 浮遊液の 2.5 mL と，37ºC で 3 時間インキュベートした。陰性対照には注射用生理食塩液を，陽性対照には滅菌注射用水を使用した。

試験の結果，チスレリズマブ及び陰性対照では溶血及び凝集は認められなかった。陽性対照では溶血が確認され，試験法の正当性が検証された。

以上のことから，本試験条件下においてチスレリズマブのウサギ赤血球に対する溶血作用及び凝集作用は認められなかった。

8.5 サイトカイン放出アッセイ

8.5.1 ヒト全血液細胞を用いたサイトカイン放出アッセイ

本試験[Table 2.6.7.17 I-CRA-A317-1]は，ヒト全血細胞を用いたサイトカイン放出アッセイ（CRA）により，チスレリズマブのサイトカイン放出症候群（CRS）誘発リスクを評価する目的で，GLP 非適用で実施した。

健康ドナー27～30 例の血漿置換全血細胞に，チスレリズマブを 10，100，及び 1000 µg/mL の濃度で添加し，20～24 時間培養した。抗 CD3 モノクローナル抗体である OKT3 及び T 細胞マイトジェンであるフィトヘマグルチニン（PHA）を陽性対照とし，溶媒対照及びヒト IgG（HuIgG）抗体を陰性対照として使用した。マルチプレックスアッセイにより，培養上清中の 15 種類のサイトカイン／ケモカイン量を測定した（IL-2，IL-1β，IL-6，IL-8，TNF-α，IFN-γ，IL-4，IL-10，MCP-1/CCL2，MIP-1α/CCL3，IP-10/CXCL10，IL-12(P70)，IL-17A，IL-13，及び GM-CSF）。

試験の結果，いずれのドナー試料においても 1000 µg/mL までの濃度で有意なサイトカイン／ケモカインの放出は認められなかった。陽性対照（OKT3 及び PHA）及び陰性対照（溶媒及び HuIgG 抗体）の結果から，実験系の正当性が検証された。

結論として，チスレリズマブはヒト末梢血細胞からのサイトカイン放出を誘発しなかったことから，チスレリズマブによる急性 CRS 誘発リスクは低いと考えられた。

8.5.2 ヒト PBMC を用いたサイトカイン放出アッセイ

本試験[Table 2.6.7.17 J-CRA-A317-2]は，ヒト末梢血単核球を用いた CRA により，チスレリズマブの CRS 誘発リスクを評価する目的で，GLP 非適用で実施した。エアドライ法（Stebbings et al. 2007，Findlay et al. 2010）により固相化したチスレリズマブ（10 及び 100 µg/well），OKT3（陽性対照：1 µg/well），及び HuIgG 抗体（陰性対照：1 µg/well）を，健康ドナー27 例から採取・単離したヒト PBMC と 20～24 時間培養した。マルチプレックスアッセイにより，培養上清中の 15 種類のサイトカイン／ケモカイン量を測定した（IL-2，IL-1β，IL-6，IL-8，TNF-α，IFN-γ，IL-4，IL-10，MCP-1/CCL2，MIP-1α/CCL3，IP-10/CXCL10，IL-12(P70)，IL-17A，IL-13，及び GM-CSF）。

試験の結果，チスレリズマブでは，いずれのサイトカイン／ケモカインの放出も認められなかった。一方，OKT3 ではすべてのサイトカイン／ケモカインの放出がみられ，HuIgG 抗体では IL-12，IL-17A，IL-8，MIP-1α，MCP-1，及び TNF-α の低レベルの放出が認められた。単球上の FcγRI，ナチュラルキラー（NK）細胞及び単球上の FcγRIIIa 等，PBMC には種々の免疫細胞に発現する多くの FcγR が存在しており，これらの細胞が HuIgG 抗体に結合することにより活性化し，サイトカインを放出した可能性が考えられた。これに対し，チスレリズマブはいずれの FcγR とも結合せず，サイトカイン放出が認められなかったものと考えられる。

以上のとおり，チスレリズマブはヒト PBMC のサイトカイン放出を誘発しなかったことから，チスレリズマブの急性 CRS 誘発リスクは低いことが示唆された。

9 考察及び結論

チスレリズマブの非臨床安全性及び TK プロファイルを，マウス及びカニクイザル用いた単回投与毒性試験，カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験により検討した。また，その他

の毒性試験により，チスレリズマブの組織交差反応性，ヒト細胞膜タンパク質又は Biacore を用いた結合プロファイル，ADA の中和活性，リコール応答，溶血性，及びサイトカイン放出誘発性について評価した。

マウス及びカニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験では，100 mg/kg までの用量で，死亡及び投薬に関連した毒性変化は認められなかった。カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（主試験）では，60 mg/kg IV 群の雌 1 例が状態悪化により安楽殺処分され，忍容性は認められなかった。瀕死の原因は，血小板数の減少（消費性凝血障害）による出血に起因したものと考えられた。腎臓の変化を特徴とした重度の腎前性又は腎性高窒素血症を伴う顕著な低ナトリウム血症，及び複数臓器に血管の変化も認められた。上記の安楽殺処分動物を含めて 60 mg/kg IV 群の雌 3 例中 2 例で本薬投与に関連した免疫原性に起因した毒性変化が認められたが，本所見はカニクイザル特異的変化でありヒトへの外挿性は低いと考えられた（Vahle 2018）。

その他，全投薬群で心血管系，呼吸系，及び中枢神経系の機能に対する影響も認められなかった。TK 試験では，曝露量は用量依存的な増加を示し，雄では雌に比べ累積性が高かった。中和抗体試験では，単回及び反復投与のいずれにおいても多くのサルで中和抗体が確認された。NOAEL である 30 mg/kg における曝露量（AUC）は，予定臨床用量（200 mg）を投与した患者における曝露量の約 4.3～6.6 倍であった（Table 9-1）。

Table 9-1　　サル及びヒトにおける曝露量の比較

試験の種類	用量 (mg/kg)	投与経路	性	C_{max} (μg/mL)	AUC (μg·day/mL)	曝露量比 [a] C_{max} 比	AUC 比
単回,サル [b]	100		雌雄	3315	30839	25.3	27.5
13 週, サル [c]	3	IV	雄	63	304	0.5	0.3
			雌	62	380	0.5	0.3
	10	IV	雄	404	1858	3.1	1.7
			雌	519	2892	4.0	2.6
	30 (NOAEL)	IV	雄	1239	9120	9.5	8.1
			雌	909	5774	6.9	5.1
13 週, サル [d]	30 (NOAEL)	IV	雄	1200	7417	9.2	6.6
			雌	818	4833	6.2	4.3
	60	IV	雄	2480	20167	18.9	18.0
			雌	1320	8083	10.1	7.2
	100 (NOAEL)	SC	雄	1230	12542	9.4	11.2
Phase Ia/Ib, ヒト	200 mg (Q3W)		男女	131	1122	NA	NA

Source：[Table 2.6.7.5-P14-057-JD]，[Table 2.6.7.7 A-P14-057-CD]，[Table 2.6.7.7 B-2270246]，[BGB-A317-102 試験]

a：臨床用量 200 mg Q3W（BGB-A317-102 試験）の Cycle 5 における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}21d}$ から算出，n = 12（平均値）

b：単回投与後の $AUC_{0\text{-}21d}$ を示す（P14-057-JD 試験），n = 2（雌雄の平均値）

c：6 回投与後の $AUC_{0\text{-}14d}$ を示す（P14-057-CD 試験），n = 5 又は 6（平均値）
d：6 回投与後の $AUC_{0\text{-}14d}$ を示す（2270246 試験），n = 2 又は 3（平均値）

リコール応答試験では，ヒト PBMC 細胞を用いた *in vitro* 試験でチスレリズマブのリコール応答への影響がみられたものの，B-hPD-1 マウスを用いた *in vivo* 試験で明らかな影響は認められなかった。結合プロファイルでは，チスレリズマブは PD-1 に特異的に結合し，TREML1 に対して弱い結合を示した。TREML1 の結合親和性は，PD-1 に比べて極めて弱いことから，チスレリズマブの TREML1 結合に対する生理学的意義は低いと考えられた。なお，Biacore を用いた TREML1 結合プロファイルでは，チスレリズマブは TREML1 タンパク質への結合を示さなかった。組織交差反応試験では，サル及びヒトの正常組織に対するチスレリズマブの組織交差反応性は認められず，*in vitro* 溶血性試験で溶血作用は認められなかった。また，サイトカイン放出アッセイでは，ヒト全血細胞及び PBMC からの明らかなサイトカイン放出は認められなかった。

公表文献及び既知の作用機序に関する情報から，PD-1/PD-L1 経路を阻害した動物モデルでは胚・胎児死亡が発現することから，PD-1/PD-L1 経路は正常な妊娠の維持に不可欠な役割を果たすとされている。文献に基づく評価により，妊娠中の女性へのチスレリズマブ投与により，胎児毒性，流産又は死産の発現頻度の増加，免疫関連疾患の発症，あるいは胎児の免疫応答の変化等の発現リスクが増大する可能性が推察される。

結論として，本概要に示した毒性試験の成績は，添付文書に規定される用法・用量に従ったチスレリズマブのがん患者への使用を支持するものと判断した。

10 参考文献

[Chong CR, Park VJ, Cohen B, et al. (2020)] Safety of inactivated influenza vaccine in cancer patients receiving immune checkpoint inhibitors. Clin Infect Dis; 70:193-9.

[D'Addio F, Riella LV, Mfarrej BG, et al. (2011)] The link between the PDL1 costimulatory pathway and Th17 in fetomaternal tolerance. J Immunol; 187:4530-41.

[Failing JJ, Ho TP, Yadav S, et al. (2020)] Safety of influenza vaccine in patients with cancer receiving pembrolizumab. JCO Oncol Pract; 16:e573-80.

[Findlay L, Eastwood D, Stebbings R, et al. (2010)] Improved *in vitro* methods to predict the *in vivo* toxicity in man of therapeutic monoclonal antibodies including TGN1412. J Immunol Methods; 352:1-12.

[Fuse S, Tsai CY, Molloy MJ, et al. (2009)] Recall responses by helpless memory $CD8^+$ T cells are restricted by the up-regulation of PD-1. J Immunol; 182:4244-54.

[Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, et al. (2005)] A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. J Exp Med; 202:231-7.

[Habicht A, Dada S, Jurewicz M, et al. (2007)] A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance. J Immunol; 179:5211-9.

[Holets L, Hunt JS, Petroff MG (2006)] Trophoblast CD274 (B7-H1) is differentially expressed across gestation: influence of oxygen concentration. Biol Reprod; 74:352-8.

[Hutchins B, Starling GC, McCoy MA, et al. (2020)] Biophysical and immunological characterization and *in vivo* pharmacokinetics and toxicology in nonhuman primates of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab. Mol Cancer Ther; 19:1298-307.

[Lee YH, Bee SC, Kim JH, et al. (2015)] Meta-analysis of genetic polymorphisms in programmed cell death 1. Z Rheumatol; 74:230-9.

[Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. (1999)] Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the *PD-1* gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. Immunity; 11:141-51.

[Okazaki T and Honjo T (2007)] PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol; 19:813-24.

[Petroff MG and Perchellet A (2010)] B7 family molecules as regulators of the maternal immune system in pregnancy. Am J Reprod Immunol; 63:506-19.

[Plitnick LM, Hutchins B, Dubey S, et al. (2020)] A T-cell-dependent antibody response study using a murine surrogate anti-PD-1 monoclonal antibody as an alternative to a non-human primate model. J Immunotoxicol; 17:175-85.

[Slezak SL, Bettinotti M, Selleri S, et al. (2007)] CMV pp65 and IE-1 T cell epitopes recognized by healthy subjects. J Transl Med; 5:1-16.

[Stebbings R, Findlay L, Edwards C, et al. (2007)] "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. J Immunol; 179:3325-31.

[Tripathi S and Guleria I (2015)] Role of PD1/PDL1 pathway, and Th17 and Treg cells in maternal tolerance to the fetus. Biomed J; 38:25-31.

[Vahle JL (2018)] Immunogenicity and Immune Complex Disease in Preclinical Safety Studies. Toxicol Pathol; 46(8):1013-9.

[Wang C, Thudium KB, Han M, et al. (2014)] *In vitro* characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and *in vivo* toxicology in non-human primates. Cancer Immunol Res; 2:846-56.

[Wang WJ, Salazar Garcia MD, Deutsch G, et al. (2020)] PD-1 and PD-L1 expression on T-cell subsets in women with unexplained recurrent pregnancy losses. Am J Reprod Immunol; 83:e13230.

[Zhang Y, Ma L, Hu X, et al. (2019)] The role of the PD-1/PD-L1 axis in macrophage differentiation and function during pregnancy. Hum Reprod; 34:25-36.

テビムブラ点滴静注 100 mg

2.6.7　毒性試験概要表
（根治切除不能な進行・再発の食道癌）

BeiGene Japan 合同会社
Confidential
BeiGene Japan 合同会社の許可を得ることなく
使用，漏洩，公表，又はその他の方法で開示することを禁じます。

目　次

2.6.7.1 毒性試験一覧 3
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一覧表 5
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績一覧表 6
2.6.7.4 毒性試験に用いた原薬／不純物 7
2.6.7.5 単回投与毒性試験 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 10
2.6.7.7 A サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験 10
2.6.7.7 B サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（主試験） 17
2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験 28
2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験 29
2.6.7.10 がん原性試験 30
2.6.7.11 生殖発生毒性試験 – 重要な試験以外の試験 31
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 32
2.6.7.13 生殖発生毒性試験 – 胚・胎児発生に関する試験 33
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 34
2.6.7.15 新生児を用いた試験 35
2.6.7.16 局所刺激性試験 36
2.6.7.17 その他の毒性試験 37
2.6.7.17 A その他の毒性試験 – *in vitro* 免疫毒性試験 37
2.6.7.17 B その他の毒性試験 – *in vivo* 免疫毒性試験 38
2.6.7.17 C その他の毒性試験 – 組織交差反応性試験（カニクイザル組織） 39
2.6.7.17 D その他の毒性試験 – 組織交差反応性試験（ヒト組織） 41
2.6.7.17 E その他の毒性試験 – オフターゲット作用に関する検討 1 43
2.6.7.17 F その他の毒性試験 – オフターゲット作用に関する検討 2 46
2.6.7.17 G その他の毒性試験 – 中和活性アッセイ 47
2.6.7.17 H その他の毒性試験 – *in vitro* 溶血性試験 51
2.6.7.17 I その他の毒性試験 – サイトカイン放出アッセイ（ヒト全血細胞） 53
2.6.7.17 J その他の毒性試験 – サイトカイン放出アッセイ（ヒト PBMC） 54

2.6.7.1 毒性試験一覧

Test article: tislelizumab

Study Type	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg) [a]	GLP Compliance	Testing Facilities	Study Number	Location in CTD
Single Dose Studies								
Single dose	Mice, ICR	Tail vein, injection	One day	0, 30, 100	Yes [b]	[redacted], China	[M14-057-JD]	4.2.3.1-1
	Monkeys, Cynomolgus	Hindlimb vein, infusion	One day	0, 10, 30, 100	Yes [b]	[redacted], China	[P14-057-JD]	4.2.3.1-2
Repeat Dose Study								
13-week + 6-week recovery	Monkeys, Cynomolgus	Hindlimb vein, infusion	13 weeks (Q2W, 7 doses)	0, 3, 10, 30	Yes [c]	[redacted], China	[P14-057-CD]	4.2.3.2-1
13-week	Monkeys, Cynomolgus	Cephalic vein, injection Subcutaneous injection	IV: 13 weeks (Q2W, 7 doses) SC: 13 weeks (14 days apart, 2 single doses on Days 75 and 89)	IV: 0, 30, 60 SC: 100	Yes	[redacted], USA	[2270246]	4.2.3.2-2
Other Toxicity Studies								
Immunologic recall response	Human PBMC	*in vitro*	NA	NA	No	BeiGene Co. Ltd., China	[BLGC-029]	4.2.3.7.2-1
	Human PD-1 transgenic mice (C57BL/6)	Intraperitoneally, bolus	3 weeks, QW	10	No	BeiGene Co. Ltd., China	[BGB-A317-IVP-Tox-OT-0001]	4.2.3.7.2-2

Test article: tislelizumab

Study Type	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg) [a]	GLP Compliance	Testing Facilities	Study Number	Location in CTD
TCR	Frozen normal cynomolgus monkey tissues	*in vitro*	NA	NA	Yes [c]	[redacted], China	[O14-057-2ZJ]	4.2.3.7.7-1
	Frozen normal human tissues	*in vitro*	NA	NA	Yes [c]	[redacted], China	[O14-057-1ZJ]	4.2.3.7.7-2
Human plasma membrane protein cell array	HEK293 transfected cells	*in vitro*	NA	NA	No	[redacted], UK	[RP2177]	4.2.3.7.7-3
Biacore assay (surface plasmon resonance)	NA	*in vitro*	NA	NA	No	[redacted], US	[RD-2023-00116]	4.2.3.7.7-4
Neutralization activity assay	Cynomolgus monkey ADA positive serum samples	*in vitro*	NA	NA	No	BeiGene Co. Ltd., China	[NAB-P14-057]	4.2.3.7.7-5
Hemolysis test	Rabbit red blood cells	*in vitro*	NA	NA	Yes [b]	[redacted], China	[O14-057-RX]	4.2.3.7.7-6
CRA	Human whole blood cells	*in vitro*	NA	NA	No	BeiGene Co. Ltd., China	[CRA-A317-1]	4.2.3.7.7-7
	Human PBMC	*in vitro*	NA	NA	No	BeiGene Co. Ltd., China	[CRA-A317-2]	4.2.3.7.7-8

ADA: anti-drug antibody; CRA: cytokine release assay; GLP: good laboratory practice; IV: intravenous; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; QW: once a week; Q2W: once every 2 weeks; NA: not applicable; SC: subcutaneous; TCR: tissue cross reactivity; TK: toxicokinetics

a = The highest NOAEL (No observed adverse effect level) is underlined.

b = NMPA (formerly CFDA) and US FDA GLP compliance were claimed; however, based on EMA GLP inspection of certain studies, GLP compliance of this study cannot be assured. Refer to footnote c for transparency.

c = The study initially claimed GLP compliance; however, a GLP inspection requested by EMA was conducted in November 2022. A list of critical observations was identified, indicating that these studies were not conducted in compliance with GLP principles. Subsequent follow-up investigations by EMA issued on 20 January 2023 confirmed the inspection findings.

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一覧表

Test article: tislelizumab

Type of Study / Treatment Duration	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Sample Collection Time Point	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
Single dose toxicity study	Monkeys, Cynomolgus	Peripheral vein, infusion	0, 10, 30, 100	Days 1, 2, 4, 8, 11, 15, 22, and 28 Pre-dose, immediately after completion of infusion (± 1 min), and 2, 6, 8, 24, 72, 168, 240, 336, 504, 648 hours post-dose.	Yes	P14-057-JD	4.2.3.1-2
13-week repeat-dose toxicity study	Monkeys, Cynomolgus	Peripheral vein, infusion	0, 3, 10, 30	Days 1, 29, and 71 Pre-dose, immediately after completion of infusion (± 1 min), and 2, 6, 8, 24, 72, 168, 240, 336 hours post-dose.	Yes	P14-057-CD	4.2.3.2-1
13-week repeat-dose toxicity study	Monkeys, Cynomolgus	Cephalic vein, injection Subcutaneous, injection	IV: 0, 30, 60 SC: 100	IV: Days 1 and 71, SC: Day 75 Pre-dose, immediately after dosing, and 2, 6, 8, 24, 48,72, 168, 240, 336 hours post-dose.	Yes	2270246	4.2.3.2-2

GLP: good laboratory practice; IV: intravenous; SC: subcutaneous

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績一覧表

Test Article: tislelizumab

AUC (μg·h/mL)

Dose Level (mg/kg)	Cynomolgus Monkeys		Humans	Location in CTD
	Male	Female	Sex combined	
0.5, Q2W			178.6 ± 102.6 [a] (3)	
2, Q2W			1094 ± 388.2 [a] (4)	
3, Q2W	7288 ± 8695 [b] (5)	9115 ± 12565 [b] (5)		4.2.3.2-1
5, Q2W			1682 ± 746.2 [a] (3)	
10, single dose	52659 [c] (1)	48083 [c] (1)		4.2.3.1-2
10, Q2W	44585 ± 53139 [b] (6)	69397 ± 46563 [b] (6)		4.2.3.2-1
			3453 [a] (1)	
30, single dose	160976 [c] (1)	163033 [c] (1)		4.2.3.1-2
30, Q2W	218888 ± 135668 [b] (6)	138578 ± 109970 [b] (6)		4.2.3.2-1
	178000 ± 54600 [d] (3)	116000 ± 75200 [d] (3)		4.2.3.2-2
60, Q2W	484000 ± 97500 [d] (3)	194000 ± NA [d] (2)		4.2.3.2-2
100, single dose (SC)	301000 ± 154000 [d] (3)	NA		4.2.3.2-2
100, single dose	825891 [c] (1)	654401 [c] (1)		4.2.3.1-2
200 mg/dose, fixed dose, Q3W			1122 ± 352 [e]	

IV: intravenous; NA: not applicable; Q2W: once every 2 weeks; Q3W: once every 3 weeks; SC: subcutaneous; SD: standard deviation; ( ): numbers of animals or patients per dose

a = Source study no. BGB-A317_Study_001 CSR, $AUC_{0\text{-}14d}$ from Cycle 4 or 5 was presented. Data was presented as mean ± SD.

b = Source study no. P14-057-CD, $AUC_{0\text{-}14d}$ following the sixth dose was presented. Data was presented as mean ± SD.

c = Source study no. P14-057-JD, $AUC_{0\text{-}27d}$ following the single dose was presented.

d = Source study no. 2270246, $AUC_{0\text{-}14d}$ following the sixth dose (IV) and first dose (SC) was presented. Data was presented as arithmetic mean ± SD.

e = Source study no. BGB-A317-102 CSR, $AUC_{0\text{-}21d}$ from Cycle 5 was presented. Data was presented as arithmetic mean ± SD.

2.6.7.4 毒性試験に用いた原薬／不純物

Test Article: tislelizumab

Batch / Lot No.	Concentration	Purity	Activity	Study Number	Type of Study
[redacted]	10.1 mg/mL [a] formulated in placebo (25 mM citrate, 15 mM histidine, 190 mM trehalose, 0.02% polysorbate)	96.9% - 97.8% (CGE)	99% (Fab ELISA binding assay)	M14-057-JD	Single-dose toxicity in ICR mice
				P14-057-JD	Single-dose toxicity in cynomolgus monkeys
				P14-057-CD	13-week repeat-dose toxicity in cynomolgus monkeys
				BLGC-029	*In vitro* immunologic recall response
				CRA-A317-1	CRA in human whole blood cells
				O14-057-1ZJ	TCR in normal human frozen tissues
				O14-057-2ZJ	TCR in normal cynomolgus monkey frozen tissues
[redacted]	10.3 mg/mL formulated in placebo (25 mM citrate, 15 mM histidine, 190 mM trehalose, 0.02% polysorbate)	96% - 99% (CGE)	111% (Fab ELISA binding assay)	O14-057-RX	*In vitro* hemolysis test in rabbit red blood cells
				BGB-A317-IVP-Tox-OT-0001	Immunologic recall response in the human PD-1 transgenic mice
[redacted]	10.1 mg/mL formulated in placebo (25 mM citrate, 15 mM histidine, 190 mM trehalose, 0.02% polysorbate)	98.1% (CGE)	95% (binding ELISA activity)	2270246	13-week repeat-dose toxicity in cynomolgus monkeys (IV injection)
				RD-2023-00116	Off-target assessment by Biacore
				RP2177	Human plasma membrane protein cell array
[redacted]	156.6 mg/mL	97.2% (CE-SDS reduced)	108% (antigen binding ELISA)	2270246	13-week repeat-dose toxicity in cynomolgus monkeys (SC injection)
[redacted]	NR	NR	NR	CRA-A317-2	CRA in human PBMC

CE-SDS: capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate; CGE: capillary gel electrophoresis; CRA: cytokine release assay; ELISA: enzyme linked immunosorbent assay; IV: intravenous; NR: not reported; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; SC: subcutaneous; TCR: tissue cross reactivity

a = The concentrations were analyzed in two independent assays.

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: tislelizumab

Species and Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per-Group	Approximately Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
ICR Mice	Tail vein, injection (Placebo for control; 0.9% sodium chloride injection for tislelizumab / solution)	0, 30, 100	M: 10, F: 10	> 100	There was no drug-related mortality or moribundity, no abnormal symptoms noted among the 3 groups or abnormal changes in body weight, food consumption, or other macroscopic findings.	Yes	[M14-057-JD]	4.2.3.1-1
Cynomolgus Monkeys	Peripheral vein, infusion (Placebo for control; 0.9% sodium chloride injection for tislelizumab / solution)	0, 10, 30, 100	M: 1, F: 1	> 100	There was no drug-related mortality or moribundity, no abnormal symptoms noted among the 4 groups, or abnormal changes in body weights, food consumption, body temperature, electrocardiogram parameters, clinical pathology, or macroscopic examination. Anti-drug antibody was detected in both males of group 2 and 3 on Day 14 and 28, and was detected in one female of group 4 on Day 28.	Yes	[P14-057-JD]	4.2.3.1-2

F: female; GLP: good laboratory practice; M: male

2.6.7.6 反復投与毒性試験 – 重要な試験以外の試験

該当資料なし

2.6.7.7 反復投与毒性試験

2.6.7.7 A サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験

Test Article: tislelizumab

Report Title: A 13-week intravenous infusion toxicity study of a monoclonal antibody BGB-A317 with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys

Study Number: [P14-057-CD]

Species / Strain: Cynomolgus monkeys

Duration of Dosing: 13 weeks (Q2W, 7 doses)

Location in CTD: 4.2.3.2-1

Initial Age: 2.5 to 4.5 years

Duration of Post dose: 6 weeks

GLP Compliance: Yes [a]

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Method of Administration: Intravenous infusion via peripheral vein, 30 mL/kg/h

Vehicle / Formulation: Placebo + 0.9% sodium chloride injection for control; 0.9% sodium chloride injection for tislelizumab / solution

Special Features: Immunotoxicity assessment, anti-drug antibodies, and safety pharmacology

No Observed Adverse Effect Level (NOAEL): 30 mg/kg

Dose Level (mg/kg)		**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals	Main study	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
	Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Toxicokinetics:									
C_{max} (µg/mL)	Day 1 (1st dose)	BLQ	BLQ	86.34	75.47	251.59	257.36	849.18	846.97
	Day 29 (3rd dose)	BLQ	BLQ	66.73	66.59	344.54	332.38	1025.81	1059.39
	Day 71 (6th dose)	BLQ	BLQ	62.76	61.85	403.54	518.54	1238.80	908.50
$AUC_{0\text{-}336h}$ (µg·h/mL)	Day 1 (1st dose)	NA	NA	11869.38	11924.35	36425.96	37188.03	125871.33	117736.34
	Day 29 (3rd dose)	NA	NA	5400.11	6297.68	28803.27	36961.88	144696.29	113969.77
	Day 71 (6th dose)	NA	NA	7287.91	9114.64	44584.56	69396.93	218887.91	138577.50

2.6.7.7 A　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: P14-057-CD

Report Title: A 13-week intravenous infusion toxicity study of a monoclonal antibody BGB-A317 with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)		**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals	Main study	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
	Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Noteworthy Findings:									
Died or Sacrificed moribund		-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical observation		-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight		-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption		-	-	-	-	-	-	-	-
Body temperature		-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography		-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy		-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology		-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation		-	-	-	-	-	-	-	-
Serum chemistry		-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis		-	-	-	-	-	-	-	-
ADA / Neutralization activity									
Day 15		0/NA	0/NA	1/1	1/1	1/1	0/NA	0/NA	0/NA
Day 29		0/NA	0/NA	4/4	4/4	4/4	2/2	1/1	3/2
Day 85		1/0	0/NA	4/4	4/4	3/3	3/2	1/1	4/3
Day 91		0/NA	0/NA	4/4	4/4	3/3	3/2	1/1	3/3
Day 105		0/NA	0/NA	2/2	1/1	1/1	2/1	0/NA	2/2
Day 133		0/NA	0/NA	2/2	1/1	1/1	2/2	0/NA	2/2
T-and B-lymphocyte subsets: ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD20^+$, $CD40^+$, ratio of $CD4^+$ / $CD8^+$)		-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7 A　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: P14-057-CD

Report Title: A 13-week intravenous infusion toxicity study of a monoclonal antibody BGB-A317 with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)		**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals	Main study	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
	Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Cytokine assay: (TNF-α, IFN-γ, IL-2 and IL-6)		-	-	-	-	-	-	-	-
Gross pathology		-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights		-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology [b] (at the end of dosing phase, Day 91)									
Heart									
Infiltrate, inflammatory cells, myocardial									
	Minimal	0	0	0	0	0	0	1	1
	Slight	0	0	1	0	0	0	0	0
Kidneys									
Infiltrate, inflammatory cells, interstitial									
	Minimal	0	2	2	0	3	2	1	4
	Slight	0	0	0	3	0	1	0	0
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	0	2	2	1	1	1	2	0
	Slight	0	0	0	0	1	0	0	0
Lacrimal glands									
Aggregates, lymphoid									
	Slight	1	0	1	0	2	0	0	0

2.6.7.7 A　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: P14-057-CD

Report Title: A 13-week intravenous infusion toxicity study of a monoclonal antibody BGB-A317 with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)		**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals	Main study	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
	Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Larynx									
Infiltrate, inflammatory cells									
	Slight	0	0	0	0	1	0	0	0
Liver									
Inflammatory cells, foci									
	Minimal	0	3	1	1	0	2	0	1
Parathyroids									
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	0	0	0	0	1	1	0	0
Pituitary									
Aggregates, lymphoid									
	Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Salivary gland, mandibular									
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	1	1	1	0	2	1	0	2
Salivary gland, parotid									
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	2	2	2	1	1	2	1	2
	Slight	1	0	1	2	0	1	1	1
	Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0

2.6.7.7 A　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: P14-057-CD

Report Title: A 13-week intravenous infusion toxicity study of a monoclonal antibody BGB-A317 with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)		**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals	Main study	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
	Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Salivary gland, sublingual									
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	1	3	1	1	1	3	0	2
	Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Skin and Subcutis									
Infiltrate, inflammatory cell									
	Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Stomach									
Infiltration, inflammatory cell									
	Slight	1	1	1	4	1	1	2	1
	Moderate	1	0	0	0	0	0	0	0
Tail									
Infiltrate, inflammatory cell									
	Marked	0	0	0	0	0	0	1	1
Thyroids									
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0
	Slight	1	0	0	0	0	0	0	0
Venous, injection site									
Infiltrate, inflammatory cells, perivascular									
	Minimal	1	1	0	1	1	0	1	1

2.6.7.7 A　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: P14-057-CD

Report Title: A 13-week intravenous infusion toxicity study of a monoclonal antibody BGB-A317 with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)		**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals	Main study	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
	Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Histopathology [b] (at the end of recovery phase, Day 133)									
Heart									
Infiltrate, inflammatory cells, myocardial									
	Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Kidneys									
Infiltrate, inflammatory cells, interstitial									
	Minimal	0	1	0	1	0	1	0	2
	Slight	0	0	0	1	0	0	0	0
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	1	0	1	2	2	1	2	1
	Slight	0	0	1	0	0	0	0	0
Lacrimal glands									
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	0	0	0	1	0	0	1	0
Liver									
Inflammatory cells, foci									
	Minimal	0	0	0	1	0	0	1	1
	Slight	0	0	0	0	0	1	0	0
Salivary gland, mandibular									
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	0	0	1	2	0	0	2	1

2.6.7.7 A　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: P14-057-CD

Report Title: A 13-week intravenous infusion toxicity study of a monoclonal antibody BGB-A317 with a 6-week recovery period in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)		**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals	Main study	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
	Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Salivary gland, parotid									
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	2	2	1	0	1	1	1	1
	Slight	0	0	0	1	0	0	1	0
Salivary gland, sublingual									
Aggregates, lymphoid									
	Minimal	1	0	1	0	0	1	0	0
Stomach									
Infiltration, inflammatory cell									
	Slight	1	0	2	1	1	1	2	1

ADA: anti-drug antibody; BGB-A317: tislelizumab; BLQ: below limit of quantitation (LOQ = 3 ng/mL); CD: cluster of differentiation; F: female; GLP: good laboratory practice; IFN-γ: interferon gamma; IL-2: interleukin-2; IL-6: interleukin-6; M: male; NA: not applicable; Q2W: once every 2 weeks; TNF: tumor necrosis factor

- = no abnormal findings

a = The study initially claimed GLP compliance; however, a GLP inspection requested by EMA was conducted in November 2022. A list of critical observations was identified, indicating that these studies were not conducted in compliance with GLP principles. Subsequent follow-up investigations by EMA issued on 20 January 2023 confirmed the inspection findings.

b = numbers of animals with positive result was reported. 4 animals/sex/group were necropsied on Day 91 for histopathology evaluation, and the remaining 2 animals/sex/group were necropsied after the 6-week recovery.

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（主試験）

Test Article: tislelizumab

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Study Number: [2270246]

Species / Strain: Cynomolgus monkeys

Duration of Dosing: 13 weeks (IV: Q2W, 7 doses; SC: 2 single doses on Day 75 and 89)

Location in CTD: 4.2.3.2-2

Initial Age: 2 to 4 years

Duration of Post dose: None

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Method of Administration:

IV injection via peripheral vein, 60-120 mL/kg/h (slow bolus) for groups 1-3;

SC injection for Group 4, dorsal left for vehicle control and dorsal right for test article (0.639 mL/kg)

Vehicle / Formulation:

IV: 25 mM citrate, 15 mM histidine, 190 mM trehalose, 0.02% tween 20, pH 6.5

SC: BGB-A317 SubQ DS buffer

Special Features: Immunotoxicology (peripheral blood immunophenotyping), cytokine analysis, anti-drug antibody analysis

No Observed Adverse Effect Level (NOAEL): 30 mg/kg for IV injection; 100 mg/kg for SC injection

Dose Level (mg/kg)		**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**
Number of Animals		M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Toxicokinetics:								
C_{max} (µg/mL)	Day 1 (Group 1-3)	BLQ	BLQ	695	696	1360	1380	NA
	Day 71 (Group 1-3)	BLQ	BLQ	1200	818	2480	1320	NA
	Day 75 (Group 4)	BLQ	BLQ	NA	NA	NA	NA	1230
$AUC_{0\text{-}336h}$ (µg·h/mL)	Day 1 (Group 1-3)	NA	NA	105000	102000	205000	193000	NA
	Day 71 (Group 1-3)	NA	NA	178000	116000	484000	194000	NA
	Day 75 (Group 4)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	301000
Noteworthy Findings:								
Anti-drug antibody		The incidence of ADA induction to VDT482 was quite high with 83.3% (10 out of 12) monkeys in Groups 2 and 3 (30 mg/kg and 60 mg/kg IV dose groups), showing positive screen of ADA following administration of VDT482.						

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: 2270246

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)		**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**
Number of Animals		M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Died or Sacrificed moribund		0	0	0	0	0	1 [a]	0
Clinical observations		-	-	-	-	-	-	-
Veterinary observations		-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy		-	-	-	-	-	-	-
Body weight		-	-	-	-	-	-	-
Safety pharmacology								
Respiratory rates		-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography		-	-	-	-	-	-	-
Hematology		-	-	-	-	-	-	-
Coagulation								
Fibrinogen (mg/dL)	Day 30	-	-	-	-	-	+55% [b]	-
	Day 88	-	-	-	-	-	+95% [b]	-

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: 2270246

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)		**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**
Number of Animals		M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Clinical chemistry								
C-reactive protein (mg/dL)	Day 30	-	-	-	-	-	4.3 × [c]	-
	Day 56	-	-	-	-	-	5.0 × [c]	-
	Day 88	-	-	-	-	115 × [d]	8.3 × [c]	-
Globulin (g/dL)	Day 88	-	-	-	-	-	+86% [b]	-
Albumin (g/dL)	Day 88	-	-	-	-	−16% [d]	-	
Albumin:globulin ratio	Day 88	-	-	-	-	−43% [d]	−41% [b]	-
Triglyceride (mg/dL)	Day 88	-	-	-	-	-	+574% [b]	-
Aspartate aminotransferase (U/L)	Day 88	-	-	-	-	-	5.6 × [c]	-
Glutamate dehydrogenase (U/L)	Day 88	-	-	-	-	-	3.3 × [c]	-
Alkaline phosphatase (U/L)	Day 88	-	-	-	-	-	3.5 × [c]	-
Phosphorus (mg/dL)	Day 88	-	-	-	-	-	−34% [b]	-
Urinalysis		-	-	-	-	-	-	-
Immunotoxicology								
Peripheral blood immunophenotyping								
T cells	Day 2	-	-	-	-	−56 to −62% [e]		-
Helper T cells	Day 2	-	-	-	-	−47 to −61% [e]		-
Cytotoxic T cells	Day 2	-	-	-	-	−63 to −68% [e]		-
Cytokine analysis		-	-	-	-	-	IL-6↑ [f]	-

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: 2270246

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)	**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Organ weights	-	-	-	-	-	-	-
Gross pathology	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology [g]							
Heart							
Degeneration / necrosis, vessel							
Moderate	0	0	0	0	0	1	0
Hypertrophy, endothelium, vessel							
Slight	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, mixed cell, vessel							
Moderate	0	0	0	0	0	1	0
Aorta							
Degeneration / necrosis, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Hypertrophy, endothelium, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, mixed cell, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: 2270246

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)	**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Histopathology [g] (cont.)							
Pancreas							
Degeneration / necrosis, vessel							
Slight	0	0	0	0	0	1	0
Hypertrophy, endothelium, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, mixed cell, vessel							
Slight	0	0	0	0	0	1	0
Thyroid							
Degeneration / necrosis, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, mixed cell, vessel							
Slight	0	0	0	0	0	1	0
Urinary bladder							
Degeneration / necrosis, vessel							
Slight	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, mixed cell, vessel							
Slight	0	0	0	0	0	1	0

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: 2270246

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)	**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Histopathology [g] (cont.)							
Nerve, sciatic							
Degeneration / necrosis, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, mixed cell, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Esophagus							
Inflammation, mixed cell, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Cecum							
Degeneration / necrosis, vessel							
Slight	0	0	0	0	0	1	0
Hypertrophy, endothelium, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, mixed cell, vessel							
Slight	0	0	0	0	0	1	0
Colon							
Hypertrophy, endothelium, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, mixed cell, vessel							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: 2270246

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)	**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Histopathology [g] (cont.)							
Ovary							
Degeneration / necrosis, vessel							
Minimal	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Hypertrophy, endothelium, vessel							
Minimal	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Inflammation, mixed cell, vessel							
Minimal	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Uterus							
Degeneration / necrosis, vessel							
Moderate	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Hypertrophy, endothelium, vessel							
Slight	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Inflammation, mixed cell, vessel							
Moderate	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Cervix							
Degeneration / necrosis, vessel							
Moderate	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Hypertrophy, endothelium, vessel							
Moderate	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Inflammation, mixed cell, vessel							
Moderate	NA	0	NA	0	NA	1	NA

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: 2270246

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)	**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Histopathology [g] (cont.)							
Vagina							
Degeneration / necrosis, vessel							
Minimal	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Hypertrophy, endothelium, vessel							
Minimal	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Inflammation, mixed cell, vessel							
Minimal	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Kidney							
Basophilic tubule							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Cast, proteinaceous							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Degeneration / necrosis, tubule							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, mixed cell							
Minimal	0	0	0	0	0	1	0
Cellularity, increased, glomerulus							
Slight	0	0	0	0	0	1	0
Matrix, increased, glomerulus							
Slight	0	0	0	0	0	1	0
Dilation, vessel, glomerulus							
Moderate	0	0	0	0	0	1	0

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: 2270246

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)	**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Histopathology - Injection site							
Left cephalic							
Degeneration / necrosis, dermis and subcutis							
Minimal	1	0	0	1	0	0	NA
Hemorrhage, subcutis							
Minimal	1	1	1	1	0	0	NA
Slight	0	0	0	0	1	0	NA
Infiltrate, mononuclear cell, dermis							
Minimal	0	0	0	0	1	0	NA
Inflammation, mixed cell, dermis and subcutis							
Minimal	1	0	0	1	0	0	NA
Right cephalic							
Degeneration / necrosis, muscle							
Minimal	0	1	0	0	0	0	NA
Edema, subcutis							
Slight	0	0	1	0	0	0	NA
Hemorrhage, subcutis							
Minimal	0	0	0	1	0	0	NA
Slight	1	0	0	0	0	0	NA
Moderate	0	0	1	0	0	1	NA

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: 2270246

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)	**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Histopathology - Injection site (cont.)							
Right cephalic (cont.)							
Infiltrate, mononuclear cell, dermis							
Minimal	0	1	0	0	0	0	NA
Inflammation, mixed cell, muscle							
Minimal	0	1	0	0	0	0	NA

2.6.7.7 B　サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Study Number: 2270246

Report Title: VDT482: A 13-week iv bolus and subcutaneous injection toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys

Dose Level (mg/kg)	**0 (Control-Group 1, IV)**		**30 (Group 2, IV)**		**60 (Group 3, IV)**		**100 (Group 4, SC)**	
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	
Histopathology - Injection site (cont.)								
Subcutaneous, injection site							C [h]	D [i]
Degeneration / necrosis, dermis								
Minimal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1
Exudate								
Minimal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
Hyperplasia, epidermis								
Minimal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0
Infiltrate, mononuclear cell								
Minimal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	2

ADA: anti-drug antibody; BLQ: below limit of quantitation (LOQ = 400 ng/mL); F: female; GLP: good laboratory practice; IV: intravenous; M: male; NA: not applicable; Q2W: once every 2 weeks; SC: subcutaneous; -: no noteworthy findings

a = One female (animal P603) in Group 3 (60 mg/kg, IV) was euthanized on Day 31 of the dosing phase due to clinical observations of epistaxis, piloerection, sunken eyes, slight pale appearance, abnormal skin color (purple) on all four limbs and head, hunched posture, irregular / audible respiration, and decreased activity. Microscopically, the cause of death was attributed to VDT482-related multi-systemic vascular inflammation that was prominent in the kidney and heart consistent with an immunogenicity reaction to VDT482.

b = One female (animal P602) in Group 3 (60 mg/kg, IV), is presented in % difference compared with individual baseline.

c = One female (animal P602) in Group 3 (60 mg/kg, IV), is presented in fold change compared with individual baseline.

d = One male (animal P203) in Group 3 (60 mg/kg, IV), is presented in fold change and % change compared with individual baseline.

e = Transient decreases on Day 2 in absolute counts compared to baseline in 2 males (animals P201 and P203) and 1 female (animal P601) in Group 3 (60 mg/kg, IV). As partial to complete resolution of these changes was noted in these 3 animals at subsequent dosing phase timepoints (Days 56 and 88), they were considered equivocally related to VDT482.

f = One female (animal P603) in Group 3 (60 mg/kg, IV) presented with increased IL-6 (approximately 12-fold over lower limit of assay (LOQ = 4.88 pg/mL)) on Day 30.

g = At the terminal necropsy, VDT482-related findings were limited to a single female (animal P0602) in Group 3 (60 mg/kg, IV), and included adverse vascular findings in multiple tissues.

h = Vehicle control injection site

i = VDT482 injection site

2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験

該当資料なし

2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験

該当資料なし

2.6.7.10　がん原性試験

該当資料なし

2.6.7.11　生殖発生毒性試験 – 重要な試験以外の試験

該当資料なし

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

該当資料なし

2.6.7.13　生殖発生毒性試験 – 胚・胎児発生に関する試験

該当資料なし

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

該当資料なし

2.6.7.15　新生児を用いた試験

該当資料なし

2.6.7.16　局所刺激性試験

チスレリズマブの独立した局所刺激性試験は実施しなかった。投与部局所への影響は，サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（Table 2.6.7.7 A-P14-057-CD 及び Table 2.6.7.7 B-2270246）で一般状態観察及び病理組織学的検査により評価した。当該試験ではチスレリズマブ投与に関連した異常は認められなかった。

2.6.7.17　その他の毒性試験

2.6.7.17 A　その他の毒性試験 – *in vitro* 免疫毒性試験

Test Article: tislelizumab

Report Title: BGB-A317 enhances T cell-mediated recall responses by inhibiting PD-1 signaling
Test System: peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from HLA-A2.1^{+} healthy donors
Recall Antigen: CMV-derived HLA-A2.1-restricted pp65 peptide
Negative Control: Human IgG (HuIgG)
Special Features: IFN-γ was used as readout for cell activation

Study Number: [BLGC-029]
Location in CTD: 4.2.3.7.2-1
GLP Compliance: No
Date of Test Initiation: [redacted], 20[redacted]

Compound / Test Article	Concentration	Noteworthy Findings
BGB-A317	0.1, 1 µg/mL	Significant IFN-γ production enhanced up to 4 days
HuIgG	1 µg/mL	No significant IFN-γ production enhanced up to 4 days

BGB-A317: tislelizumab; CMV: cytomegalovirus; GLP: good laboratory practice; HuIgG: human IgG; IFN-γ: interferon-γ

2.6.7.17 B　その他の毒性試験 – *in vivo* 免疫毒性試験

Test Article: tislelizumab

Report Title: Effects of BGB-A317 on the primary and recall T-cell-dependent antibody responses (IgG) to KLH antigen in the human PD-1 transgenic mice

Study Number: [BGB-A317-IVP-Tox-OT-0001]

Location in CTD: 4.2.3.7.2-2

Date of Study Initiation: [redacted], 20[redacted]

GLP Compliance: No

Species / Strain: Human PD-1 transgenic (B-hPD-1) mice

Vehicle / Formulation: DPBS / solution

Special Features: B-hPD-1 mice in groups 2-4 were immunized subcutaneously with 5 mg/kg KLH on Days 2 and 23 to assess the effects of BGB-A317 on primary and secondary T-cell-dependent antibody responses (TDAR). B-hPD-1 mice in group 1 were administered subcutaneously with DPBS on Days 2 and 23 as the vehicle control.

Result: BGB-A317 did not alter the normal primary or recall response to KLH antigen in human PD-1 transgenic mice.

Group	Test Article	Dose	Days of Administration		Blood Sample Collection Time Points		Noteworthy Findings
			BGB-A317	DPBS	For PK	For anti-KLH Ab titers	
1	NA	NA	NA	NA	NA	Days 2 (before the first KLH injection in Groups 2-4), 9, 16, 23 (before the second KLH injection in Groups 2-4), 30, 37 and 44	BGB-A317 did not alter the normal primary or recall response to KLH antigen in B-hPD-1 mice
2	DPBS	0 mg/kg, i.p.	NA	Days 1, 8, 15, 22, 29, 36	NA		
3	BGB-A317	10 mg/kg, i.p.	Days 1, 8, 15	Days 22, 29, 36	Days 2, 8, 9, 15, 16		
4	BGB-A317	10 mg/kg, i.p.	Days 22, 29, 36	Days 1, 8, 15	Days 23, 29, 30, 36, 37, 40		

Ab: antibody; BGB-A317: tislelizumab; DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline; GLP: good laboratory practice; i.p.: intraperitoneal; KLH: keyhole limpet hemocyanin; NA: not applicable

2.6.7.17 C　その他の毒性試験 – 組織交差反応性試験（カニクイザル組織）

Test Article: tislelizumab

Report Title: Tissue cross-reactivity of a monoclonal antibody BGB-A317 in normal cynomolgus monkey frozen tissues
Species / Strain: Cynomolgus monkey frozen tissue
Study Number: [O14-057-2ZJ]
Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]
Location in CTD: 4.2.3.7.7-1
Special Features: The biotinylated BGB-A317 (BT317) was the specific primary antibody
GLP Compliance: Yes [a]
Result: No specific tissue cross reactivity with BGB-A317 was noted.

Tissue / Cell type	BT317		Human IgG1 (2 µg/mL)	PBST
	2 µg/mL	0.5 µg/mL		
Jurkat cells transfected with PD-1 (positive control)	++	+	–	–
Jurkat cells without PD-1 (negative control)	–	–	–	–
Stomach	(0 [b]/3 [c])	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Heart	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Liver	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Jejunum	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Spleen	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Lung	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Colon	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Kidney	(0/2)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Muscle	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Urinary bladder	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Aorta	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Thymus	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Skin	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Breast	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Pancreas	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Cerebrum	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)

2.6.7.17 C　その他の毒性試験 – 組織交差性反応試験（続き）

Test Article: tislelizumab

Report Title: Tissue cross-reactivity of a monoclonal antibody BGB-A317 in normal cynomolgus monkey frozen tissues

Tissue / Cell type	**BT317**		**Human IgG1 (2 µg/mL)**	**PBST**
	2 µg/mL	**0.5 µg/mL**		
Cerebellum	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Spinal cord	(0/2)	(0/2)	(0/2)	(0/2)
Ureter	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Thyroid	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Parathyroid glands	(0/0)	(0/0)	(0/0)	(0/0)
Adrenal / Zona fasciculate of cortex	+ (1/3 [d])	+ (3/3 [d])	+ (3/3 [d])	+ (3/3 [d])
Mesenteric lymph nodes	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Testis	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Prostate	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Uterus	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Oviduct	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Ovary	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Eyeball	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Hypophysis	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Bone marrow	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)

BGB-A317: tislelizumab; BT317: biotinylated BGB-A317; GLP: good laboratory practice; PBST: phosphate tween buffer

++ = moderate positive signals; + = weak positive signals; − = negative signals

a = The study initially claimed GLP compliance; however, a GLP inspection requested by EMA was conducted in November 2022. A list of critical observations was identified, indicating that these studies were not conducted in compliance with GLP principles. Subsequent follow-up investigations by EMA issued on 20 January 2023 confirmed the inspection findings.

b = numbers of positive tissue slide

c = number of tissues examined (3 different donors)

d = positive signals seen in cytoplasm

2.6.7.17 D　その他の毒性試験 – 組織交差反応性試験（ヒト組織）

Test Article: tislelizumab

Report Title: Tissue cross reactivity of a monoclonal antibody BGB-A317 in normal human frozen tissues
Species / Strain: Normal human frozen tissues
Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]
Special Features: The biotinylated BGB-A317 (BT317) was the specific primary antibody
Result: No specific tissue cross reactivity with BGB-A317 was noted.

Study Number: [O14-057-1ZJ]
Location in CTD: 4.2.3.7.7-2
GLP Compliance: Yes [a]

Tissue / Cell type	BT317		Human IgG1 (2 µg/mL)	PBST
	2 µg/mL	0.5 µg/mL		
Jurkat cells transfected with PD-1 (positive control)	++	+	–	–
Jurkat cells without PD-1 (negative control)	–	–	–	–
Adrenal	(0 [b]/3 [c])	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Bone marrow	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Mammary gland	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Brain, cerebellum	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Brain, cerebral cortex	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Brain, pituitary	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Colon	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Endothelium (aorta, thoracic, artery)	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Esophagus	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Fallopian tube	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Heart (ventricle, right, left)	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Kidney / Renal tubule epithelial cells	+ (3/3 [d])	(0/3)	+ (3/3 [d])	(0/3)
Liver / Liver cells	+ (3/3 [d])	(0/3)	+ (2/3 [d])	(0/1)
Lung	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Lymph node	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Ovary	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)

2.6.7.17 D　その他の毒性試験 – 組織交差性反応試験（続き）

Test Article: tislelizumab

Report Title: Tissue cross reactivity of a monoclonal antibody BGB-A317 in normal human frozen tissues

Tissue / Cell type	BT317		Human IgG1 (2 µg/mL)	PBST
	2 µg/mL	0.5 µg/mL		
Pancreas	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Placenta	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Prostate	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Skin	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Spinal cord	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Spleen	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Striated muscle	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Stomach / Epithelial cells of gland	+ (3/3 [d])	(0/3)	+ (3/3 [d])	(0/3)
Testis	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Thymus	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Thyroid	(0/3)	(0/2)	(0/3)	(0/2)
Ureter	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Uterus cervix	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
Uterus endometrium	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)

BGB-A317: tislelizumab; BT317: biotinylated BGB-A317; GLP: good laboratory practice; PBST: phosphate tween buffer

++ = moderate positive signals; + = weak positive signals; − = negative signals

a = The study initially claimed GLP compliance; however, a GLP inspection requested by EMA was conducted in November 2022. A list of critical observations was identified, indicating that these studies were not conducted in compliance with GLP principles. Subsequent follow-up investigations by EMA issued on 20 January 2023 confirmed the inspection findings.

b = numbers of positive tissue slide

c = number of tissues examined (3 different donors)

d = positive signals seen in cytoplasm

2.6.7.17 E　その他の毒性試験 – オフターゲット作用に関する検討 1

Test Article: tislelizumab

Report Title: Assessment of the binding profile of BGB-A317 using a human plasma membrane protein cell array

Study Number: [RP2177]

Test System: transfected HEK293 cells

Location in CTD: 4.2.3.7.7-3

VDT482 Concentrations: 2, 5, 20 µg/mL

GLP Compliance: No

Negative Control: PBS (pre-screen), PBS and secondary antibody (library and confirmation screens), assay buffer and secondary antibody and ZsGreen-only transfectants (flow cytometry)

Date of Test Initiation: [redacted], 20[redacted]

Special Features: None

Results

In the Pre-screen the maximum concentration of 20 µg/mL was selected for subsequent screening steps. At 20 µg/mL and fixed cell microarray (confirmatory screen), VDT482 showed a strong intensity interaction only with its target PD-1 (PDCD1); at 20 µg/mL and in the absence of fixation (confirmatory screen), VDT482 showed a strong intensity interaction with its target PD-1 (PDCD1) and a weak intensity interaction with TREML1. In the subsequent flow cytometry assay, VDT482 showed dose-related binding to PD-1 (PDCD1) with an EC_{50} value of 0.08 µg/mL. Dose-related binding could also be observed for TREML1 but an EC_{50} value could not be accurately determined as binding was not maximal at the highest concentration tested (300 µg/mL).

2.6.7.17 E　その他の毒性試験－オフターゲット作用に関する検討 1（続き）

Test Article: tislelizumab

Report Title: Assessment of the binding profile of BGB-A317 using a human plasma membrane protein cell array

Assay	Compound / Test Article	Test System	Dose (µg/mL)	Noteworthy Findings
Pre-screen	VDT482	Transfected HEK293 cells expressing PDCD1	0, 2, 5, 20	Only low levels of background staining and detection of the primary target (PDCD1) at all doses tested. Therefore, selection of the highest dose for subsequent screens.
Library screen	VDT482	Transfected HEK293 cells expressing 6101 individual full-length human plasma membrane proteins, secreted and cell surface-tethered human secreted proteins, as well as a further 396 human heterodimers	20	16 library interactions were identified from very weak to strong.
Confirmation screen	VDT482, Rituximab biosimilar	Overexpression of identified library interactions including very weak interactions and 2 control receptors (CD20 and EGFR)	20	Fixed cell microarray: after exclusion of non-specific or non-significant interactions, VDT482 had 1 strong intensity interaction with its target (PDCD1) Unfixed cell microarray: VDT482 had a strong intensity interaction with its target (PDCD1) and a weak intensity interaction with TREML1
Flow cytometry follow-up 1	VDT482, Rituximab biosimilar	Overexpressing of PDCD1, TRELM1, and CD20 in HEK293 and ZsGreen-only transfected cells	20	VDT482 showed strong fluorescence intensity binding to PDCD1 and weak fluorescence intensity binding to TREML1

2.6.7.17 E　その他の毒性試験－オフターゲット作用に関する検討 1（続き）

Test Article: tislelizumab

Report Title: Assessment of the binding profile of BGB-A317 using a human plasma membrane protein cell array

Assay	Compound / Test Article	Test System	Dose (µg/mL)	Noteworthy Findings
Flow cytometry follow-up 2	VDT482, Rituximab biosimilar	Overexpressing of PDCD1, TRELM1, and CD20 in HEK293 and ZsGreen-only transfected cells	0.018 – 300	Test antibody VDT482 showed dose-related binding to PDCD1, the primary target, with an EC_{50} value of 0.08 µg/mL. Dose-related binding was also observed to TREML1. An EC_{50} for this interaction could not be accurately determined as binding was not maximal at the highest dose of test antibody. The EC_{50} value for this interaction is reported as > 300 µg/mL

CD: cluster of differentiation; EC_{50}: half maximal effective concentration; EGFR: epidermal growth factor receptor; GLP: good laboratory practice; HEK: human embryonic kidney; PBS: phosphate buffered saline; TREML1: triggering receptor expressed on myeloid cells-like protein 1

2.6.7.17 F　その他の毒性試験 – オフターゲット作用に関する検討 2

Test Article: tislelizumab

Report Title: Off-target assessment for VDT482 (anti-PD1) to human TREML1 by Biacore
Test System: NA
VDT482 Concentrations: 1.56 - 100 µg/mL or 3.12 - 100 µg/mL
Negative Control: PBS
Special Features: None

Study Number: [RD-2023-00116]
Location in CTD: 4.2.3.7.7-4
GLP Compliance: No
Date of Test Initiation: [redacted], 20[redacted]

Results

No binding of VDT482 to TREML1 was detected in the Biacore SPR assay.

Assay	Compound / Test Article	Test Method	Dose (nM)	Noteworthy Findings
Avid format	VDT482, anti-TRELM1 antibody	Anti-Fab capture method	1.56 – 100	No binding was detected for VDT482 to either TREML1 proteins (two different vendors). Monovalent binding was detected for the positive control PD1-Fc to VDT482. The buffer negative control did not show any binding.
Monovalent format	VDT482, anti-TREML1 antibody	Anti-histidine capture method where TREML1 was captured via its histidine tag, and antibodies flown over.	3.12 – 100	No binding was detected for VDT482 to either TREML1 proteins (two different vendors). Avid binding was detected for the positive control antibody to TREML1. The buffer negative control did not show any binding.

Fc: fragment crystallizable; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable; PBS: phosphate buffered saline; SPR: surface plasmon resonance; TREML1: triggering receptor expressed on myeloid cells-like protein 1

2.6.7.17 G　その他の毒性試験 – 中和活性アッセイ

Test Article: tislelizumab

Report Title: Neutralization activity test for ADA positive serum samples from cynomolgus monkeys
Study Number: [NAB-P14-057]
Test System: HuT78 cells transfected with PD-1 (HuT78 / PD1)
Location in CTD: 4.2.3.7.7-3
Date of Test Initiation: [redacted], 20[redacted]
GLP Compliance: No
Special Features: The method was based on the competitive binding between BGB-A317 and biotinylated PD-L1 with PD-1 receptor expressed on the surface of HuT78 cells. In the presence of neutralization ADA, it binds to BGB-A317 and allows more biotinylated PD-L1 to bind to PD-1 on the surface of HuT78 / PD1 cells, which results in the increase in FACS signals.

Serum samples were from Study P14-057-JD

Group	Dose (mg/kg)	Study Day	Sex	Numbers of Animals with Positive Signal	
				Anti-BGB-A317 Antibody	Neutralization Activity
1	0	14	Male	0	NA
			Female	0	NA
		28	Male	0	NA
			Female	0	NA
2	10	14	Male	1	1
			Female	0	NA
		28	Male	1	1
			Female	0	NA
3	30	14	Male	1	1
			Female	0	NA
		28	Male	1	1
			Female	0	NA
4	100	14	Male	0	NA
			Female	0	NA
		28	Male	0	NA
			Female	1	0

2.6.7.17 G　その他の毒性試験 – 中和活性アッセイ（続き）

Report Title: Neutralization activity test for ADA positive serum samples from cynomolgus monkeys

Serum samples were from Study P14-057-CD　　Test Article: tislelizumab

Group	Dose (mg/kg)	Study Day	Sex	Numbers of Animals with Positive Signal	
				Anti-BGB-A317 Antibody	Neutralization Activity
1	0	15	Male	0	NA
			Female	0	NA
		29	Male	0	NA
			Female	0	NA
		85	Male	1	0
			Female	0	NA
		91	Male	0	NA
			Female	0	NA
		105	Male	0	NA
			Female	0	NA
		133	Male	0	NA
			Female	0	NA
2	3	15	Male	1	1
			Female	1	1
		29	Male	4	4
			Female	4	4
		85	Male	4	4
			Female	4	4
		91	Male	4	4
			Female	4	4
		105	Male	2	2
			Female	1	1
		133	Male	2	2
			Female	1	1

2.6.7.17 G　その他の毒性試験 – 中和活性アッセイ（続き）

Report Title: Neutralization activity test for ADA positive serum samples from cynomolgus monkeys

Serum samples were from Study P14-057-CD　　Test Article: tislelizumab

Group	Dose (mg/kg)	Study Day	Sex	Numbers of Animals with Positive Signal	
				Anti-BGB-A317 Antibody	Neutralization Activity
3	10	15	Male	1	1
			Female	0	NA
		29	Male	4	4
			Female	2	2
		85	Male	3	3
			Female	3	2
		91	Male	3	3
			Female	3	2
		105	Male	1	1
			Female	2	1
		133	Male	1	1
			Female	2	2
4	30	15	Male	0	NA
			Female	0	NA
		29	Male	1	1
			Female	3	2
		85	Male	1	1
			Female	4	3
		91	Male	1	1
			Female	3	3
		105	Male	0	NA
			Female	2	2
		133	Male	0	NA
			Female	2	2

2.6.7.17 G　その他の毒性試験 – 中和活性アッセイ（続き）

Report Title: Neutralization activity test for ADA positive serum samples from cynomolgus monkeys

Serum samples were from Study P14-057-CD　　Test Article: tislelizumab

Group	Dose (mg/kg)	Study Day	Sex	Numbers of Animals with Positive Signal	
				Anti-BGB-A317 Antibody	Neutralization Activity

BGB-A317: tislelizumab; FACS: fluorescence-activated cell sorting; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable

2.6.7.17 H　その他の毒性試験 – *in vitro* 溶血性試験

Test Article: tislelizumab

Report Title: *In vitro* hemolysis test of BGB-A317 with rabbit red blood cells

Study Number: [O14-057-RX]

Test System: Rabbit red blood cells

Location in CTD: 4.2.3.7.7-4

Date of Blood Collection: [redacted], 20[redacted]

Negative Control: 0.9% Sodium chloride for injection

GLP Compliance: Yes [a]

Date of Testing: [redacted], 20[redacted]

Positive Control: Sterile water for injection

Vehicle / Formulation: 0.9% sodium chloride for injection / solution

Special Features: In seven labeled test tubes, 2% of RBC suspension, 0.9% sodium chloride injection, test article formulation, and sterile water for injection were added sequentially as shown in the table below. After mixing, each test tube was incubated at 37ºC ± 0.5ºC for 3 hours.

Results: No hemolysis or aggregation up to 3 hours post incubation

2.6.7.17 H　その他の毒性試験 – *in vitro* 溶血性試験（続き）

Report Title: *In vitro* hemolysis test of BGB-A317 with rabbit red blood cells

Test Tubes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Test Article (added volume)	**BGB-A317**	**BGB-A317**	**BGB-A317**	**BGB-A317**	**BGB-A317**	**0.9% sodium chloride for injection**	**Sterile water for injection**
2% RBC suspension (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
0.9% sodium chloride for injection (mL)	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	0
BGB-A317 formulation (mL)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0
Sterile water for injection (mL)	0	0	0	0	0	0	2.5
Results of the assay							
Post-mixing time							
15 min	C	C	C	C	C	C	A
30 min	C	C	C	C	C	C	A
45 min	C	C	C	C	C	C	A
1 h	C	C	C	C	C	C	A
2 h	C	C	C	C	C	C	A
3 h	C, E	C, E	C, E	C, E	C, E	C, E	A

BGB-A317: tislelizumab; GLP: good laboratory practice; RBC: red blood cells

Assay results: A = complete hemolysis; C = no hemolysis; E = no aggregation

a = NMPA (formerly CFDA) and US FDA GLP compliance were claimed; however, based on EMA GLP inspection of certain studies, GLP compliance of this study cannot be assured.

2.6.7.17 I　その他の毒性試験 – サイトカイン放出アッセイ（ヒト全血細胞）

Test Article: tislelizumab

Report Title: Cytokine release responses in human whole blood cells
Study Number: [CRA-A317-1]
Test System: Human whole blood cells
Location in CTD: 4.2.3.7.7-5
Negative Control: Placebo (formulation buffer) or human IgG
GLP Compliance: No
Positive Control: OKT3 or PHA
Date of Test Initiation: [redacted], 20[redacted]

Special Features: Plasma-replaced whole blood samples from 27-30 healthy donors were cultured in the presence of BGB-A317 at concentrations of 0.01, 0.1 or 1 mg/mL overnight. OKT3 and PHA were used as positive controls, whereas human IgG and placebo were used as negative control. 15 cytokines / chemokines (IL-2, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-10, MCP-1 / CCL2, MIP-1α / CCL3, IP-10 / CXCL10, IL-12(P70), IL-17A, IL-13 and GM-CSF) in the culture supernatants were analyzed by Milliplex assay system.

Compound / Test Article	Concentration	Noteworthy Findings
BGB-A317	0.01, 0.1 or 1 mg/mL	No significant cytokine releases up to 24 hours post incubation
Placebo	0 mg/mL	No significant cytokine releases up to 24 hours post incubation
OKT3 (anti-CD3 antibody)	50 µg/mL	Significant cytokine releases up to 24 hours post incubation
PHA	10 µg/mL	Significant cytokine releases up to 24 hours post incubation

BGB-A317: tislelizumab; GLP: good laboratory practice; PHA: phytohemagglutinin

2.6.7.17 J　その他の毒性試験 – サイトカイン放出アッセイ（ヒト PBMC）

Test Article: tislelizumab

Report Title: Evaluation of cytokine release responses in human PBMCs by “air-dry” antibody-coating method
Study Number: [CRA-A317-2]
Test System: Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)
Location in CTD: 4.2.3.7.7-6
Negative Control: Human IgG (HuIgG)
GLP Compliance: No
Positive Control: OKT3
Date of Test Initiation: [redacted], 20[redacted]

Special Features: Fresh human PBMC from 27 healthy donors were isolated and cultured in the antibody-bound plates for overnight with testing antibody BGB-A317 and control antibodies, OKT3 and human IgG. 15 cytokines / chemokines (IL-2, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-10, MCP-1 / CCL2, MIP-1α / CCL3, IP-10 / CXCL10, IL-12(P70), IL-17A, IL-13 and GM-CSF) in the culture supernatants were analyzed by Milliplex assay system.

Compound / Test Article	Concentration	Noteworthy Findings
BGB-A317	10 or 100 µg/well	No significant cytokine releases up to 24 hours post incubation
HuIgG	1 µg/well	No or low cytokine release up to 24 hours post incubation
OKT3 (anti-CD3 antibody)	1 µg/well	Significant cytokine releases up to 24 hours post incubation

BGB-A317: tislelizumab; GLP: good laboratory practice