目次

1.　まとめ 6
2.　単回投与毒性試験 10
2.1　MMAE 10
3.　反復投与毒性試験 11
3.1　チソツマブ 11
3.1.1　カニクイザルを用いたチソツマブの探索的反復投与毒性試験 11
3.2　チソツマブ　ベドチン 13
3.2.1　カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの探索的反復投与毒性試験 13
3.2.2　カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの 10 週間投与用量設定試験及び 6 週間回復性試験 14
3.2.3　カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの 13 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験 17
3.3　MMAE 23
3.3.1　ラットを用いた MMAE の反復投与毒性試験 23
3.3.2　カニクイザルを用いた MMAE の反復投与毒性試験 25
3.4　標的非結合性対照 ADC 28
3.4.1　カニクイザルを用いた標的非結合性対照 ADC の 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 28
4.　遺伝毒性試験 29
4.1　In vitro 試験 29
4.1.1　MMAE の細菌を用いる復帰突然変異試験 29
4.1.2　MMAE のマウスリンフォーマ試験 29
4.2　In vivo 試験 29
4.2.1　MMAE のラットを用いる in vivo 骨髄小核試験 29
5.　がん原性試験 30
6.　生殖発生毒性試験 30
6.1　受胎能 30
6.2　胚・胎児発生に関する試験 31
6.2.1　ラットを用いた MMAE の胚・胎児発生に関する試験 31
7.　局所刺激性試験 31
8.　その他の毒性試験 31
8.1　交差反応性試験 31
8.1.1　各種動物種由来の TF に対するチソツマブの交差反応性 31
8.1.2　正常ヒト及びカニクイザル組織におけるチソツマブ-FITC 及びチソツマブ　ベドチン-FITC の組織交差反応性試験 33

8.2　光毒性 35

9.　考察及び結論 35

9.1　全般的結論 39

10.　参考文献一覧 40

表目次

Table 1　非臨床毒性試験で使用した被験物質の化合物コード 5
Table 2　チソツマブ　ベドチン：毒性試験一覧 7
Table 3　チソツマブの反復投与毒性探索的試験：試験デザイン 11
Table 4　チソツマブ　ベドチンの探索的反復投与毒性試験：試験デザイン 13
Table 5　雌カニクイザルにおけるチソツマブ　ベドチンの用量設定試験：試験デザイン 15
Table 6　チソツマブ　ベドチン及びチソツマブのカニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験：試験デザイン 17
Table 7　MMAE のラットを用いた用量設定試験：試験デザイン 23
Table 8　MMAE のラットを用いた GLP 適用反復投与毒性試験：試験デザイン 24
Table 9　MMAE のカニクイザルを用いた用量設定試験：試験デザイン 25
Table 10　MMAE のカニクイザルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験：試験デザイン 27
Table 11　標的非結合性対照 ADC のカニクイザルを用いた毒性試験：試験デザイン 28
Table 12　毒性試験用動物種の TF に対するチソツマブの結合特性の概略 32
Table 13　各種動物の TF とヒト TF とのアミノ酸配列の類似性 33
Table 14　カニクイザルとヒトの組織交差反応性データの比較 34

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADC	antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
A/G	albumin/globulin ratio	アルブミン／グロブリン比
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the concentration-time curve	薬物濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}168}$	area under the concentration-time curve from time zero to 168 hours	0 時間から 168 時間までの薬物濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24}$	area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours	0 時間から 24 時間までの薬物濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration	0 時間から最終定量可能時点までの薬物濃度－時間曲線下面積
cDNA	complementary DNA	相補的 DNA
CL	clearance	クリアランス
C_{max}	maximum drug concentration	最高血中濃度
CRP	C-reactive protein	C 反応性タンパク質
CTD	Common Technical Document	コモン・テクニカル・ドキュメント
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FITC	fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
FVIIa	activated coagulation factor VII	活性型血液凝固第 VII 因子
GGT	gamma-glutamyl transpeptidase	γ-グルタミルトランスペプチダーゼ
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
HNSTD	highest non-severely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IFNγ	interferon gamma	インターフェロン γ
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgG1	immunoglobulin G1	免疫グロブリン G1
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学検査
IL	interleukin	インターロイキン
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
mcMMAF	maleimidocaproyl monomethyl auristatin F	マレイミドカプロイルモノメチルアウリスタチン F
MMAE	monomethyl auristatin E	モノメチルアウリスタチン E
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
TEG	thromboelastography	トロンボエラストグラフィ
TF	tissue factor	組織因子
TFT	trifluorothymidine	トリフルオロチミジン
TFT^r	trifluorotymidine resistance	TFT 抵抗性
Th	helper T cell	ヘルパーT 細胞
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
tk	thymidine kinase	チミジンキナーゼ
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
vc	valine-citrulline	バリンーシトルリン
vcMMAE	valine-citrulline monomethyl auristatin E	バリンーシトルリンモノメチルアウリスタチン E

被験物質の名称

チソツマブ　ベドチンの開発過程では、種々の名称及び化合物コードが使用されている。また、開発プログラムでは各種試験で他の被験物質も評価した。非臨床試験に関するコモン・テクニカル・ドキュメント（Common Technical Documant、CTD）モジュール及び試験報告書のレビューを容易にするため、非臨床試験で使用した被験物質の化合物コードを Table 1 にまとめた。本モジュールではチソツマブ　ベドチン及びチソツマブの成績のみ要約したが、「2.6.7 毒性試験概要表」には完全性を期すためチソツマブ　ベドチンの試験で評価した全ての被験物質の成績を要約した。

チソツマブ　ベドチンのモノメチルアウリスタチン E（monomethyl auristatin E、MMAE）部位は低分子化合物である。MMAE の試験は、米国、EU 及び日本でのアドセトリス®（ブレンツキシマブ　ベドチン）の製造販売承認申請のために実施した。これらの試験で得られた MMAE の成績も要約し、本モジュール及び「2.6.7 毒性試験概要表」に記載した。

Table 1　非臨床毒性試験で使用した被験物質の化合物コード

被験物質	化合物コード
チソツマブ（Tisotumab）	HuMax-TF IgG1-1015-011
チソツマブ　ベドチン （Tisotumab vedotin）	HuMax-TF-ADC IgG1-1015-011-vcMMAE
アイソタイプ対照抗体 （Isotype control antibody）	IgG1-b12 [a)]
アイソタイプ対照 ADC （Isotype control ADC）	IgG1-b12-vcMMAE
チソツマブ-FITC （Tisotumab-FITC）	IgG1-1015-011-FITC
チソツマブ　ベドチン-FITC （Tisotumab vedotin-FITC）	IgG1-1015-011-vcMMAE-FITC
MMAE, vcMMAE, NAC-vcMMAE	SGD-1010, SGD-1006, SGD-1427
ブレンツキシマブ　ベドチン （Brentuximab vedotin）	SGN-35
その他の抗ヒト TF ADC	IgG1-1015-098-vcMMAE IgG1-1015-098-1006 IgG1-1015-098-1269 IgG1-1015-111-1006 IgG1-1015-111-1269
標的非結合性対照 ADC （Non-binding control ADC）	h00-1006(4)

ADC：抗体薬物複合体；FITC：フルオレセインイソチオシアネート；MMAE：モノメチルアウリスタチン E；vcMMAE：バリンーシトルリンモノメチルアウリスタチン E；NAC：N-アセチル-L-システイン；TF：組織因子
a)　抗 HIV 抗体 IgG1-b12 をベースに作製（Barbas et al, 1993）

1. まとめ

チソツマブ　ベドチンは、ヒト組織因子（tissue factor、TF）特異的ヒト免疫グロブリン G1（immunoglobulin G1、IgG1）κ モノクローナル抗体（monoclonal antibody、mAb）を、プロテアーゼで切断可能なバリンーシトルリン（valine citrulline、vc）リンカーを介して微小管重合阻害作用を有する MMAE と共有結合させた抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate、ADC）である。抗体 1 分子当たり平均 4 分子の MMAE が結合している。Genmab A/S 社は、チソツマブ　ベドチンを、TF を発現する子宮頸癌及びその他の固形癌治療薬として、Seagen, Inc.（現 Pfizer Inc.）と共同開発している。

TF は高度の転移性を有する腫瘍細胞の細胞膜並びに腫瘍血管内皮細胞及び間質細胞に発現し、TF の発現は予後不良と関連する。チソツマブ　ベドチンは効率的に TF 発現細胞に結合し、速やかに細胞内に取り込まれ、リソソームに輸送され、そこでリンカーが切断されて細胞傷害性ペイロードが放出される。MMAE を介した腫瘍細胞傷害作用が、in vivo でのチソツマブ　ベドチンの主要な作用機序である。リソソームで切断されると、細胞膜上に遊離型 MMAE が拡散し、その結果、チソツマブ　ベドチンはバイスタンダー効果を示し、隣接腫瘍細胞に対して細胞傷害作用が誘発される。さらに、in vitro 試験では、チソツマブ　ベドチンは抗体依存性細胞傷害、抗体依存性細胞貪食及び活性型血液凝固第 VII 因子（activated factor VII、FVIIa）依存性細胞内シグナル伝達の抑制を誘発することが示された。いずれも、チソツマブ　ベドチンの抗腫瘍効果に寄与する可能性がある。

チソツマブ　ベドチンの非臨床毒性試験プログラムは、ICH S9、ICH S6(R1)及び他の関連する ICH ガイドライン並びに経済協力開発機構（Organization for Economic Co-operation and Development、OECD）データ相互受入制度加盟国で、OECD テストガイドライン及び GLP に従って実施した。

GLP 適用毒性試験は、チソツマブ　ベドチンの非 GLP 探索的非臨床安全性試験の情報に基づいてデザインし実施した。探索的安全性試験もチソツマブ　ベドチンに関連する安全性リスクの理解の助けとなる。

臨床投与経路は静脈内投与であることから、チソツマブ、MMAE、標的非結合性対照 ADC 及びチソツマブ　ベドチンの全ての非臨床安全性試験の投与経路は静脈内投与を選択した。サルを用いた重要な非臨床毒性試験では、臨床試験で使用した原薬を代表するチソツマブ　ベドチン原薬のバッチを使用した[3.2.S.4.4 項]。

この毒性試験の概要文は、チソツマブ　ベドチンの製造販売承認を支持するために、チソツマブ、MMAE 及び標的非結合性対照 ADC の試験成績を含むチソツマブ　ベドチンの非臨床毒性試験成績の包括的な概要を提示することを意図している。全ての非臨床毒性試験の概要表を「2.6.7 毒性試験概要表」に掲載した。

チソツマブ　ベドチン、チソツマブ、MMAE 及び標的非結合性対照 ADC で実施した毒性試験の一覧を Table 2 に示す。

Table 2　チソツマブ　ベドチン：毒性試験一覧

試験の種類	投与経路	試験系	被験物質	GLP	試験番号
単回投与毒性試験					
	静脈内	ラット	MMAE	非適用	[redacted]1019-001
	静脈内	ラット	MMAE	非適用	[redacted]-15
	静脈内	ラット	MMAE	非適用	[redacted]-33
反復投与毒性試験					
用量漸増探索的試験（1 週間間隔で 4 回）	静脈内	サル	チソツマブ	非適用	[redacted]514850
用量漸増探索的試験（1 週間間隔で 3 回）	静脈内	サル	チソツマブ ベドチン	非適用	[redacted]520010
用量設定試験（3 週間間隔で 4 回）	静脈内	サル	チソツマブ ベドチン	非適用	[redacted]521988
13 週間投与毒性試験（3 週間間隔で 5 回）	静脈内	サル	チソツマブ、チソツマブ ベドチン	適用	[redacted]522531
用量設定試験（1 週間間隔で 4 回）	静脈内	ラット	MMAE	非適用	[redacted]-13
4 週間投与毒性試験（1 週間間隔で 4 回）	静脈内	ラット	MMAE	適用	[redacted]7646-118
用量設定試験（3 週間間隔で 2 回）	静脈内	サル	MMAE	非適用	[redacted].163.19
11 週間投与毒性試験（3 週間間隔で 4 回）	静脈内	サル	MMAE	適用	[redacted].163.16
4 週間投与毒性試験（1 週間間隔で 4 回）	静脈内	サル	標的非結合性対照 ADC	適用	[redacted]163.66

試験の種類	投与経路	試験系	被験物質	GLP	試験番号
遺伝毒性試験					
細菌を用いる復帰突然変異試験	In vitro	ネズミチフス菌、大腸菌	MMAE	適用	[redacted] AA66EH.503.BTL
マウスリンフォーマ試験	In vitro	マウスリンパ腫細胞	MMAE	適用	[redacted]8204155
骨髄小核試験	静脈内	ラット	MMAE	適用	[redacted]8204151
生殖発生毒性試験					
胚・胎児発生に関する試験	静脈内	ラット	MMAE	適用	[redacted]8204397
その他の毒性試験					
交差反応性試験	n.a.	ヒト、チンパンジー、カニクイザル、イヌ、ブタ、ウサギ、ラット、マウス	チソツマブ	非適用	GMB1015-088
交差反応性試験	n.a.	ヒト、カニクイザル	チソツマブ ベドチン-FITC、チソツマブ-FITC	適用	[redacted]20023264
光毒性試験	n.a.	n.a.	MMAE、vcMMAE	n.a.	[redacted]-2926-A

ADC：抗体薬物複合体；FITC：フルオレセインイソチオシアネート；MMAE：モノメチルアウリスタチン E；vcMMAE：バリンーシトルリンモノメチルアウリスタチン E；n.a.：該当せず

チソツマブはヒト及びカニクイザルの TF と結合するが、他の動物種（イヌ、ブタ、ウサギ、ラット又はマウス）の TF とは結合しないことから、チソツマブ　ベドチンに関連する毒性の評価に適切な動物種としてカニクイザルを選択した。チソツマブ　ベドチン及びチソツマブの組織交差反応性は、ヒト及びカニクイザルの組織を用いて、GLP 適用組織交差反応性試験で評価した。

重要な試験として、性成熟したカニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験を実施した。本試験では、安全性薬理、生殖毒性（月経周期、ホルモン測定及び精子検査を含む）、局所刺激性及びトキシコキネティクス（toxicokinetics、TK）の評価も実施した。

サル 13 週間投与試験では、チソツマブ　ベドチンを投与した動物の大部分で抗薬物抗体（anti-drug antibody、ADA）が形成された。ADA が高抗体価を示した一部の動物では、その後の投与により循環血中のチソツマブ　ベドチンの減少及び遊離型 MMAE の増加が見られた。しかし、特に高用量（5 mg/kg）では、概して ADA 存在下においても投与期間中チソツマブ　ベドチ

ンの曝露量が十分に維持された。チソツマブを反復投与したサルで、試験終了時に ADA 陽性を示した個体が 1 匹のみ認められたが、全身曝露は持続していた。

チソツマブ　ベドチンの反復投与毒性試験で認められた主な標的器官は、皮膚、骨髄及び雄性生殖器官であった。概して、観察された毒性所見は、他の MMAE を含む ADC で観察された毒性所見（Saber et al., 2015）と一致した。また、ヒトでの臨床所見並びにチソツマブ　ベドチンを投与したサルの獣医学的検査及び一般状態所見から、結膜も標的器官と考えられた。組織交差反応性試験では、皮膚及び結膜にチソツマブ　ベドチンの染色が認められたことから、これらの組織の毒性所見に抗体の標的である TF が関与している可能性が示唆される。

正常な生理的状態では TF は大部分血中の凝固因子から隔離されている。しかし、血管損傷が起こると TF は凝固カスケードを誘導する。この血液凝固作用での TF の重要な役割から、TF を標的とする ADC が血液凝固系に影響を及ぼすことが懸念される。チソツマブ　ベドチン及びチソツマブを用いた in vitro 副次的薬理試験で、血液凝固パラメーターに及ぼす影響を検討した。アッセイ系中の TF 濃度が過剰にならないように改変した標準的な試験条件下では、チソツマブは in vitro で一貫して TF 依存性の血液凝固パラメーターの延長を示した（[2.6.2-3 項]）。これらの変化の程度にはばらつきが認められ、チソツマブ　ベドチンをヒトに投与したときとの関連性は不明である。

カニクイザルを用いた GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験では、チソツマブ　ベドチンは 5 mg/kg までの反復投与で血液凝固パラメーター［プロトロンビン時間（prothrombin time、PT）及び活性化部分トロンボプラスチン時間（activated partial thromboplastin time、APTT）］に影響を及ぼさなかった。しかし、チソツマブを 25 mg/kg の用量で同様に 3 週間に 1 回反復投与した場合には、雌雄で投与期間及び回復期間を通して、対照群又は投与前値と比べて統計学的に有意な PT の延長が認められた。観察された PT の延長は軽微（対照群と比べて 20%未満）であった。当該試験でチソツマブを投与したサルに、これ以外の血液凝固又は出血に関連する所見が見られなかったことを考慮すると、これらの影響は有害所見ではないと考えられ、本試験でのチソツマブの無毒性量（no observed adverse effect level、NOAEL）は 25 mg/kg と判断された。

サルを用いたチソツマブの探索的試験では、1 日目に溶媒［リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline、PBS）］を、8、15 及び 22 日目にチソツマブをそれぞれ 1、10 又は 100 mg/kg の用量漸増で静脈内投与し、Surgicutt®デバイスを用いた皮膚切開アッセイで出血時間を測定した。出血時間に大きな個体差が見られたが、100 mg/kg までのチソツマブ投与によって毒性学的に意義のある出血時間の延長は見られなかった。チソツマブ 100 mg/kg 投与後の 1 時点（22 日目の投与後 1 時間）のみ、PBS を投与した動物と比べて平均出血時間が有意に延長した（1 日目の投与後 1 時間、$P = 0.012$）。しかし、投与前（−7 及び−14 日目）の平均出血時間と比べて有意差はなく、毒性学的意義はないと考えられた。また、これ以外には 8、15 及び 22 日目の投与後に測定した出血時間と、1 日目の出血時間の間に統計学的有意差は認められなかった。その他、一般状態観察、病理所見、一般的な血液凝固パラメーター（PT、APTT 及びフィブリノゲン）、血小板数並びに血栓の形成、動態、強度、安定性及び溶解などのトロンボエラストグラフィ（thromboelastography、TEG）検査値には、チソツマブと関連する変化は見られなかった。しかし、一部の検査（PT 及び TEG）では、検出感度が低いため測定パラメーターに影響が見られなかった可能性がある。例えば、血栓形成試験では凝固がカオリンで開始されることから、チ

ソツマブの干渉はないと考えられた。また、PT 測定ではチソツマブとの交差反応が予想されないカルシウムトロンボプラスチン（ウサギ脳由来）で凝固が開始された。

標的非結合性対照 ADC の反復投与毒性試験では、骨髄毒性（造血細胞減少及び顆粒球系細胞／赤芽球系細胞比低下）、リンパ系器官毒性（脾臓の胚中心減少及び胸腺のリンパ球枯渇）及び卵巣毒性（二次及び三次卵胞減少又は欠乏）が観察された。

MMAE に関連した毒性の評価には、毒性評価に適切な動物種としてラット及びカニクイザルを選択した。MMAE の毒性試験として、探索的単回投与毒性試験（ラット）、非 GLP 及び GLP 適用反復投与毒性試験（ラット及びサル）、標準的な遺伝毒性試験、胚・胎児発生に関する試験を実施した。MMAE の遺伝毒性を標準的な試験の組合せ（細菌及び哺乳類細胞を用いる in vitro 試験並びに哺乳類を用いる in vivo 試験）で評価し、妊娠ラットに MMAE を反復投与して胚・胎児発生毒性を評価した。

ラット及びカニクイザルにおける MMAE の急性及び長期毒性として、骨髄毒性（末梢血の血小板、赤血球及び白血球パラメーターの低下並びに骨髄細胞密度の低下）、肝毒性（血清肝酵素の上昇並びに肝細胞のアポトーシス、壊死及び有糸分裂像の増加）、リンパ系器官毒性（胸腺及び脾臓のリンパ系細胞密度低下）、消化管毒性（軽微な単細胞壊死）及び雄性生殖能への影響（精子運動性の低下、精巣及び精巣上体重量の減少並びに精細管変性）が認められた。

MMAE は、細菌を用いる復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ試験で遺伝毒性を示さなかった。MMAE のラットを用いる骨髄小核試験で多染性赤血球に動原体を有する小核の形成が認められた（異数性誘発性）。この結果は、微小管阻害薬である MMAE で予想される作用機序と一致する。

胚・胎児発生に関する試験では、妊娠ラットに MMAE を 0.2 mg/kg の用量で 1 週間間隔で 2 回、妊娠 6 日及び 13 日に静脈内投与した結果、胚・胎児毒性が認められた。これは MMAE の作用機序から予想された結果である。

チソツマブ　ベドチンは進行がん患者の治療に使用することから、MMAE 又はチソツマブ　ベドチンのがん原性試験は実施しなかった。

MMAE 及びバリンーシトルリンモノメチルアウリスタチン E（valine-citrulline monomethyl auristatin E、vcMMAE）は波長 290～700 nm の範囲で光吸収を示さず、直接的な光毒性の懸念は生じない。

以上のとおり、チソツマブ　ベドチンの非臨床毒性試験により詳細な毒性プロファイルが明らかとなり、臨床でのリスク評価に係わる情報が得られ、がん患者へのチソツマブ　ベドチンの投与が支持された。

2.　単回投与毒性試験

2.1　MMAE

報告書番号 [redacted]1019-001、添付資料番号[4.2.3.1-1 項]
報告書番号 [redacted]-15、添付資料番号[4.2.3.1-2 項]
報告書番号 [redacted]-33、添付資料番号[4.2.3.1-3 項]

MMAE の単回投与毒性を、ラットを用いた 3 つの非 GLP 単回静脈内投与毒性試験（投与量 0.01～0.25 mg/kg）で検討した。これらの試験では、MMAE に起因する骨髄抑制及び末梢血細胞の変化（好中球減少及び赤血球量減少）、胸腺萎縮、消化管毒性並びに肝毒性が認められた。ラットに MMAE を 0.2 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの忍容性は不良であり、全身状態が悪化し瀕死状態に至ったため早期に安楽死させた。骨髄毒性の病理組織学的特徴として投与 2～5 日後に進行性で重度の骨髄細胞密度低下が認められ、その後迅速な再生反応が認められ、投与 7～8 日後までに回復した。これらの試験での単回静脈内投与後の最大耐量（maximum tolerated dose、MTD）は 0.1 mg/kg であった。

カニクイザルについては、MMAE の非 GLP 静脈内投与用量設定試験（3.3.2.1 項）に、単回投与群を設定し、評価した。本試験では、0.116 mg/kg の MMAE 投与により末梢血細胞の変化（好中球減少、赤血球量減少及び血小板数増加）を伴う可逆的な骨髄抑制が認められた。

3.　反復投与毒性試験

MMAE についてはラット及びサルを用いた非 GLP 用量設定試験及び GLP 適用反復投与毒性試験を実施した。

チソツマブ　ベドチンの抗体部分に対する動物種間の交差反応性は限定的（8.1 項）であることから、チソツマブ　ベドチン及びチソツマブの毒性評価にはカニクイザルを用いた探索的及び GLP 適用試験を実施した。

3.1　チソツマブ

3.1.1　カニクイザルを用いたチソツマブの探索的反復投与毒性試験

報告書番号 [redacted]514850、添付資料番号[4.2.3.2-1 項]

カニクイザルを用いた非 GLP 探索的反復投与毒性試験を実施し、凝固カスケード阻害による出血リスク評価を含むチソツマブの潜在的な毒性を探索した。カニクイザル（雌雄）に Table 3 に示す用量を投与した。

Table 3　チソツマブの反復投与毒性探索的試験：試験デザイン

Group	Test Article	Day of Treatment	Dose (mg/kg)	Animal Identification Numbers	
				Males	Females
1	tisotumab	1	0	1, 2	3, 4
		8	1		
		15	10		
		22	100		

動物には 1 日目に溶媒（PBS）を、8、15 及び 22 日目にチソツマブをそれぞれ 1、10 及び 100 mg/kg の用量で静脈内漸増投与した。いずれの投与でも 10 mL/kg の投与容量で 30 分かけて投与した。投与後 5 日間動物を観察し、27 日目に安楽死させた。

評価項目は、一般状態観察、体重、TK、ADA 測定、血液学的検査、血液生化学的検査、凝固検査（TEG 検査を含む）、尿検査、サイトカイン濃度［インターロイキン（interleukin、IL）-

1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor、TNF）α及びインターフェロンγ（interferon gamma、IFNγ）］、補体成分（C3a、C4a及びC5a）、末梢血細胞（フローサイトメトリー）、直接クームス試験、総失血量及び出血時間の測定（Surgicutt®）、血栓形成分析、剖検並びに病理組織学的検査とした。

出血時間を評価するため、前腕腹側筋部位の皮膚表面にSurgicutt®デバイスを押し当て、長さ5 mm及び深さ1 mmの切開を作成した。

TK評価の結果、AUCはチソツマブの投与量比を上回って増加したが、C_{max}は投与量にほぼ比例して増加した。クリアランス（clearance、CL）推定値は比較的低く、1 mg/kgと比べて10及び100 mg/kgの方が低値であった。以上のデータから、10 mg/kg以上で消失の飽和が示唆された。$t_{1/2}$は1～7日の範囲であった。

TKパラメーターから示唆されるように、他の免疫グロブリンG（immunoglobulin G、IgG）抗体と同様にチソツマブに対するADAは検出されなかった（Lin et al., 1999）。しかし、ADA評価用の最終試料の採取時点で循環血中にチソツマブが存在していたため、被験物質の干渉を否定することはできない。

一般状態観察、体重、尿検査値、血清中サイトカイン濃度、器官重量、剖検又は病理組織学的所見に、被験物質に関連した変化は認められなかった。直接クームス試験は陰性であり、TEG®分析装置（Thromboelastograph®止血分析装置）で測定した血栓の物理的特性に関して、チソツマブ投与による毒性学的意義のある影響は認められなかった。

試験期間中、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の減少並びに網状赤血球数の増加が認められた。これらの所見は採血方法に関連するものであり、チソツマブ投与に関連するものではないと判断した。各投与1時間後に認められた好中球数及び総白血球数の増加は溶媒投与後にも認められており、ストレスに関連した反応である可能性があり、投与に直接関連した変化ではないと考えられた。凝固パラメーターに投与による明らかな影響は認められなかった。

末梢血フローサイトメトリーでは、チソツマブ投与の数日後にT細胞、B細胞、単球及び血小板数の増加が認められた。15及び22日目の投与直後に好中球数の大幅な増加が認められたが、次の測定時点では再び減少した。一部の動物で投与直後にナチュラルキラー細胞数の減少が認められたが、次の測定時点までに再び増加した。これらの影響は溶媒投与後にはいずれも認められなかった。

補体成分（C3a、C4a及びC5a濃度）に毒性学的意義のある変化は認められなかった。炎症性及びヘルパーT細胞（helper T cell、Th）1/Th2サイトカインの分析では、影響が見られなかった。

Surgicutt®デバイスによる皮膚切開アッセイで出血時間を評価した。切開時点から出血時間を測定した。切開創の端に濾紙が接触して血小板プラグを乱すことがないように切開部位に濾紙ディスクをできるだけ近づけて、30秒ごとに血液をラベル付き濾紙でブロットした。これを濾紙に血液が付着しなくなるまで繰り返した（2回）。100 mg/kgまでのチソツマブ投与により、出血時間に大きな個体差が認められたが、毒性学的意義のある出血時間の延長は認められなかった。チソツマブ100 mg/kg投与後の1時点（22日目の投与1時間後）のみ、PBS投与後と比べて平均出血時間が有意に延長したが（$P = 0.012$）、投与前（−7及び−14日目）の平均出血時間と

比較して有意差は認められず、毒性学的意義はないと考えられた。8、15 及び 22 日目の投与後に測定した出血時間と 1 日目の出血時間の間に上記以外の統計学的有意差は認められなかった。

一般状態観察、病理所見、血液凝固パラメーター（PT、APTT、フィブリノゲン及び血小板数）又は TEG 検査値（血栓の形成、動態、強度、安定性及び消失）にチソツマブと関連する変化は認められなかった。しかし、一部の検査（PT 及び TEG）では、試験の検出感度が低いため測定パラメーターに対する影響が見られなかった可能性が考えられる。例えば、血栓形成試験ではカオリンにより凝固を開始したため、チソツマブによる干渉は予想されなかった。PT 測定では、チソツマブと交差反応しないと予想されるカルシウムトロンボプラスチン（ウサギ脳由来）を用いて凝固を開始した。

以上のように、カニクイザルにチソツマブを 1、10 又は 100 mg/kg の用量漸増でそれぞれ 8、15 及び 22 日目に静脈内投与したとき、毒性徴候又は病理組織学的変化は認められなかった。一部の血液凝固パラメーターにばらつきが認められたが、本試験では、100 mg/kg 以下の用量でチソツマブ投与に関連した凝固系に対する顕著な影響は確認されなかった。

3.2　チソツマブ　ベドチン

3.2.1　カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの探索的反復投与毒性試験

報告書番号 [redacted]520010、添付資料番号[4.2.3.2-2 項]

3 種の抗ヒト TF 抗体（IgG1-1015-098、IgG1-1015-111 及びチソツマブ）並びにアイソタイプ対照抗体を、vcMMAE 又はマレイミドカプロイルモノメチルアウリスタチン F（maleimidocaproyl monomethyl auristatin F、mcMMAF）のいずれかに結合させ、非 GLP 反復投与毒性探索的試験を実施した。本試験はリード化合物選択の基礎的データ及びその後の用量設定試験（3.2.2 項）のデザインに関する情報を得るために実施した。本試験の結果に基づき、チソツマブ　ベドチンをリード化合物として選択した。したがって、本項ではチソツマブ　ベドチン（第 7 群）及びアイソタイプ対照 ADC（第 5 群）の結果についてのみ要約する。

雌雄カニクイザルを Table 4 に示す用量群に割り付けた。

Table 4　チソツマブ　ベドチンの探索的反復投与毒性試験：試験デザイン

Group	Test Article	Day of treatment	Dose (mg/kg)	Animal Identification Numbers	
				Males	Females
5	isotype control-ADC	1[a)], 8, 15, 22	0, 1, 2.5, 5	5	13
7	tisotumab vedotin			7	15

ADC: antibody-drug conjugate; PBS: phosphate-buffered saline
a)　PBS was administered on Day 1; tisotumab vedotin or isotype control ADC were administered on Days 8, 15, and 22.

雌雄各 1 匹のカニクイザルに 1 日目に PBS を、8、15 及び 22 日目にチソツマブ　ベドチン又はアイソタイプ対照 ADC の PBS 溶液を、それぞれ 1、2.5 及び 5 mg/kg の用量で静脈内投与（30 分間点滴）した。投与容量は全て 10 mL/kg とした。

評価項目は、一般状態観察、体重、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、肝機能検査、腎機能検査、TK、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。最終投与 5 日後（27 日目）に剖検した。1、8、15 及び 22 日目の投与終了後 1 時間は特に歯肉、眼及び体毛の少ない部位の出血に注意して観察した。

チソツマブ　ベドチン及びアイソタイプ対照 ADC の血漿中濃度は投与 5～7 日後に測定したのみであり、正確な消失動態を反映していないため、TK 値は過小評価と考えられた。C_{max} は 1 mg/kg から 5 mg/kg への投与量増加に伴って、線形又は用量比をやや上回る増加を示した。AUC は C_{max} と同様の用量相関性を示し、半減期の増加に従って増加した。評価した用量範囲のチソツマブ　ベドチンの $t_{1/2}$ は 1～2 日であった。

一般状態観察、体重、凝固検査、尿検査及び器官重量に、チソツマブ　ベドチン又はアイソタイプ対照 ADC に関連した影響は認められなかった。

投与期間中にチソツマブ　ベドチン又はアイソタイプ対照 ADC を投与した 1 又は 2 匹で、赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット）の低値が認められた。これは網状赤血球数の高値、散発的な赤血球パラメーターの変化（平均赤血球容積の高値及び平均赤血球ヘモグロビン濃度の低値）及び赤血球分布幅の高値と関連した。生存期間終了時（27 日目）に、チソツマブ　ベドチン及びアイソタイプ対照 ADC を投与した両動物（雌雄）で、顕著な好中球数減少とそれに伴う総白血球数の減少が認められた。

血液生化学的検査で認められた変化は、チソツマブ　ベドチンを投与した雌雄で生存期間終了時（27 日目）に認められた鉄濃度の高値のみであった。

チソツマブ　ベドチンを投与した雌雄及びアイソタイプ対照 ADC を投与した雌で、中等度又は顕著な骨髄細胞密度の減少が認められた（骨髄塗抹標本及び胸骨骨髄）。病理組織学的検査では、器官の出血は認められなかった。

以上より、カニクイザルに 8、15 及び 22 日目にチソツマブ　ベドチン及びアイソタイプ対照 ADC を、それぞれ 1、2.5 又は 5 mg/kg の用量で静脈内投与したとき、末梢血赤血球量の減少、総白血球数及び好中球数の減少並びに鉄濃度の増加を伴う骨髄細胞密度の低下が認められた。

骨髄抑制及び好中球数減少が認められたことから、次回投与までに骨髄の回復が見られるよう、以後の試験では週 1 回より投与間隔を開けることとした。

3.2.2　カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの 10 週間投与用量設定試験及び 6 週間回復性試験

報告書番号 [redacted]521988、添付資料番号[4.2.3.2-3 項]

雌カニクイザルを用いた非 GLP 10 週間用量設定試験及び 6 週間回復性試験を実施し、チソツマブ　ベドチン及び代替候補 IgG1-1015-098-vcMMAE の毒性を探索的に評価した。チソツマブ　ベドチンをリード化合物として選択したことから、チソツマブ　ベドチンの結果（第 1 群、第 2 群及び第 3 群）のみを本項で要約する。本試験は、チソツマブ　ベドチンの重要な GLP 適用反復投与毒性試験のデザイン及び用量設定の情報を得るために実施した。

雌カニクイザルを Table 5 に示す用量群に割り付けた。

Table 5　雌カニクイザルにおけるチソツマブ　ベドチンの用量設定試験：試験デザイン

Group	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Day of Treatment	Animal Identification Numbers	
				Main study	Recovery
1	tisotumab vedotin	1	1, 22, 43, 64	1, 2	-
2		3	1, 22, 43, 64	3, 4	5, 6
3[a)]		6/5	1, 43, 64, 85	7, 8	9, 10

a) Dose changed from 6 to 5 mg/kg on 2nd, 3rd, and 4th dosing occasion, due to severe neutrophil suppression and sepsis, which necessitated sacrifice of a monkey treated at 6 mg/kg on Day 11. Therefore, in order to monitor the animals more closely, dosing was suspended on Day 22. The dose level was lowered to 5 mg/kg from Day 43 onwards. These animals received their 4th dose on Day 85.

被験物質を各動物に 10 mL/kg の投与容量で 30 分間かけて各投与日に静脈内投与した。主試験群は最終投与 7 日後の 71 日目（第 1 群及び第 2 群）又は 92 日目（第 3 群）に安楽死させた。回復群は最終投与（第 2 群 64 日目、第 3 群 85 日目）後 6 週間の観察期間を設定した。

評価項目は、生死、一般状態観察、体重、呼吸数、心電図検査、眼科学的検査、TK、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、肝機能検査、腎機能検査、肺機能検査、尿検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。

好中球減少に備え、第 3 群の全ての動物に抗生物質（バイトリル®2.5%注射液及びフシジン酸ナトリウム軟膏）を 44、67 及び 88 日目から最長 10 日間予防的に投与した。

6 mg/kg の初回投与後に好中球数の顕著な減少が認められた。これらの個体では、補助的な抗生物質の予防的投与により白血球数が改善したことを示す所見が認められたが、血液学的パラメーターはベースライン値まで回復しなかった。11 日目に 1 匹（動物番号 9）を早期に安楽死させた。したがって、動物をより詳細に観察するため、第 3 群は 22 日目の投与を中止し、43 日目以降、投与量を 5 mg/kg に減量した。これらの動物は 85 日目に 4 回目の投与を行った。

全例で初回投与後に被験物質の曝露が認められ、曝露量は用量依存的に増加した。大部分の動物では、反復投与後の曝露量は ADA 産生により減少又は消失した。3 mg/kg 群の 1 匹（動物番号 4）では、ADA 産生による曝露量の減少はごくわずかであった。

全ての投与群で投与後に遊離型 MMAE が測定され、最高濃度に明らかな用量依存性が認められた。高用量群（第 3 群）の 1 匹（動物番号 8）で投与期間中に遊離型 MMAE が顕著に増加し、投与期間終了時には他の個体に比べ顕著な高値を示した。この個体では ADA の高い抗体価も見られた。

試験期間中にチソツマブ　ベドチンに関連した死亡が 1 匹に認められた。6 mg/kg 群の 1 匹（動物番号 9）を、呼吸困難（浅呼吸、努力性呼吸、喘ぎ呼吸及び喘鳴呼吸）などの一般状態悪化のため 11 日目に安楽死させた。剖検前に採取した血液試料では、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリットの低値、網状赤血球及び血小板数の高値、好中球及び総白血球数の低値並びにフィブリノゲン濃度の著しい高値が認められた。

1 mg/kg 群では、薬物に関連した一般状態の変化は認められなかった。3 mg/kg 群では、8～14 日目に大腿部、肩、胸部、背部、頸部及び下肢で乾燥した薄片状の皮膚が認められた。その後の投与では同様の所見は認められなかった。6 又は 5 mg/kg の初回及び 2 回目投与で、大腿部、下肢、背部、腕、腋下、肩、胸部、全身及び眼と口の周囲に乾燥した薄片状の皮膚が認められた。64 及び 85 日目の投与後に同様の所見は観察されなかった。

3 mg/kg 群の 1 匹では、22 日目の投与中に顔面の発赤並びに眼及び口唇の腫脹を特徴とする急性期反応が認められた。投与開始後 17 分に投与を中断したところ、投与終了後 56 分の動物の状態は正常であった。皮膚プリックテストでは有害な過敏反応や補体又はサイトカイン反応の変化は認められなかったため、この反応の説明はできなかった。予防措置として、残り 2 回の投与（43 及び 64 日目）では投与時間を延長して 60 分間としたところ、これらの投与日に急性期反応は認められなかった。

体重、眼科学的検査、心電図検査及び呼吸数に、チソツマブ　ベドチン投与に関連した変化は認められなかった。

1 mg/kg 群の 1 匹では、投与期間中に好中球数の低値が散見された。3 mg/kg 群では、初回投与後の 14 日間は好中球数がおおむね低値であったが、その後投与を継続しても同様の所見は認められなかった。6/5 mg/kg 群では、各投与後 14 日以内は好中球数がおおむね低値であった。

概して、3 又は 6/5 mg/kg 群の個体で投与期間中に赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット）の漸減並びに網状赤血球及び血小板数の増加が観察された。個体内変動が大きく、6 mg/kg の初回投与後に最も顕著な影響が認められた。そのため、これらの個体には赤血球量が投与前値まで回復するように回復期間を延長し、43 日目に投与量を減量（5 mg/kg）して投与を再開した。

6/5 mg/kg 群の 2 匹で投与期間中にフィブリノゲン濃度が高値を示した。1 及び 3 mg/kg 群では同様の変化は認められなかった。

3 又は 6 mg/kg 群では 7 日目に鉄濃度の高値が認められた。このうち 1 匹は 14 日目も鉄濃度が高値であった。1 mg/kg 群では同様の影響は認められなかった。

肝機能及び腎機能のバイオマーカー（それぞれ α-グルタチオン-S-トランスフェラーゼ及び β2-マイクログロブリン）に、投与による影響は見られなかった。肺機能のバイオマーカーであるサーファクタントタンパク質 D 濃度は、3 又は 6/5 mg/kg を投与した動物で 22 日目以降散発的に高値を示した。

尿検査値に投与の影響は見られなかった。

当初予定した 30 分間の持続投与中に急性期反応が認められた動物番号 6（第 2 群）について、22 日目にサイトカイン及び補体検査を実施した結果、いずれの試料にも影響は認められなかった。

器官重量に投与の影響は見られなかった。

11 日目に安楽死させた 6 mg/kg 群の 1 匹（動物番号 9）の剖検で、腎臓髄質の変色、海綿状の暗色肺葉、眼瞼周囲の暗色皮膚及び気管内の白色泡沫状液体が認められた。その他の個体にチソツマブ　ベドチンに関連する肉眼的所見は認められず、投与後 6 週間の観察期間終了時にも肉眼的所見は認められなかった。

早期死亡例（6 mg/kg 群の動物番号 9）の病理組織学的検査では、肺の軽度の浮腫性うっ血／出血（局在性であり、変色した海綿状肺と関連）が観察され、一般状態所見及び死亡の主な要因と考えられた。骨髄塗抹標本及び胸骨骨髄の病理組織学的検査で著しい好中球減少が認められ、中等度の骨髄過形成により再生反応が示された。これは、11 日目に採取した血液試料で認められた総白血球数の低値及び好中球減少と関連した。この個体では、軽度の赤血球系細胞の減少及びストレスに関連する可能性が考えられる胸腺皮質細胞密度の軽度減少が認められた。

計画剖検例では、6/5 mg/kg 群の 1 匹（動物番号 8）で骨髄塗抹標本及び胸骨骨髄の病理組織学的検査により好中球減少が認められた。回復期間終了時の剖検（3 mg/kg 群 107 日目、6/5 mg/kg 群 128 日目）では、チソツマブ　ベドチンに関連する病理組織学的所見は認められず、特に骨髄所見は認められなかった。

カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを 1 又は 3 mg/kg の用量で 3 週間に 1 回静脈内投与したとき、忍容性が認められた。6 mg/kg は忍容性に乏しく、1 匹が早期に死亡したため、この用量は 1 回投与後に中止した。骨髄が毒性標的器官であり、好中球減少が毒性バイオマーカーとして同定された。二次感染を予防するために、各投与後に予防的に抗生物質を投与することにより、好中球減少を管理する必要があった。

これらの所見に基づき、チソツマブ　ベドチンの GLP 適用反復投与毒性試験の高用量は 5 mg/kg が妥当と判断された。

3.2.3　カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの 13 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

報告書番号 [redacted]522531、添付資料番号[4.2.3.2-4 項]

カニクイザルを用いた GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験を実施し、チソツマブ　ベドチンの毒性及び回復性、用量間比較による TK プロファイル並びに末梢血細胞の減少及び回復を評価した。ADA の産生も評価した。チソツマブ単独群を設定し、薬物非結合型抗体であるチソツマブの反復投与毒性を検討した。さらに、チソツマブ　ベドチンに関連する皮膚所見を評価するため、中間剖検群（第 6 群）に割り付けた動物で皮膚生検を実施した。

性成熟したカニクイザル（54 匹：雌雄各 27 匹）を Table 6 に示す各用量群に割り付けた。

Table 6　チソツマブ　ベドチン及びチソツマブのカニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験：試験デザイン

Group	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Animal Identification Numbers					
			Interim Study		Main Study		Recovery	
			Males	Females	Males	Females	Males	Females
1	Vehicle	0	-	-	1-3	32-34	4, 5	35, 36
2	tisotumab vedotin	1[a)]	-	-	8-10	39-41	11, 12	42, 43
3	tisotumab vedotin	3	-	-	15-17	46-48	18, 19	49, 50
4	tisotumab vedotin	5	-	-	22-24	53-55	25, 26	56, 57
5	tisotumab	25	-	-	27-29	58-60	30, 31	61, 62
6	tisotumab vedotin	4	13,14	51, 52	-	-	-	-

a) Based on persistently low achieved concentrations on each dosing occasion the actual dose level was between 0.79 and 0.91 mg/kg.

第 1～5 群の動物には、チソツマブ　ベドチン、チソツマブ又は溶媒（0.9%塩化ナトリウム）を 3 週間間隔で 5 回（1、22、43、64 及び 85 日目）、10 mL/kg の投与容量で 30 分間かけて尾静脈内に投与した。第 6 群（中間剖検群）の動物には、1 日目にチソツマブ　ベドチンを 10 mL/kg の投与容量で 30 分間かけて尾静脈内に単回投与し、12 日目に安楽死させた。

評価項目は、一般状態観察、体重、眼科学的検査、行動評価、呼吸数、心電図検査、TK 及び ADA 評価、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、イムノフェノタイピング、器官重量、剖検並びに病理組織学的検査とした。

獣医学的処置として、動物の全身状態又は好中球抑制の程度に応じて、予防的に抗生物質を投与した。第 4 群の動物のみ、チソツマブ　ベドチン 5 mg/kg 初回投与後 10 日間（5～14 日目）予防措置として抗生物質を投与した。チソツマブ　ベドチン 5 mg/kg を投与した動物で投与期間中に認められた皮膚の有害所見に対し、必要に応じて病変部位をふき取り、微生物学的検査を実施した。

投与前及び各投与後 3 日間の便潜血を検査した。

生殖機能検査として、雌で月経周期をモニタリングするための膣垢塗抹標本の観察を連日実施した。雄では、投与 11/12 週目及び回復期間 5/6 週目に精巣サイズ及び精子検査を実施した。また、ホルモン分析用の血液試料を、雄では投与前、投与 12 週目及び回復期間 6 週目に採取し、雌では投与前並びに投与期間及び回復期間の最終月経周期に採取した。

第 6 群の動物については、全身麻酔下の標準的な無菌外科技法を用いて、観察された皮膚反応に応じて 6 又は 8 日目並びに剖検時（12 日目）に皮膚生検を実施した。全ての病変の病変部位／病変周囲／辺縁部又は隣接する正常な皮膚を含む病変部位の皮膚検体（各領域あたり 3 検体）を採取した。各皮膚検体を 2 つに分割し、一方をホルマリンに固定して病理組織学的検査に供し、他の一方は発現機序の研究のために急速凍結した。

3.2.3.1　チソツマブ　ベドチン（1、3 又は 5 mg/kg）群

1 日目のチソツマブ　ベドチンの全身曝露量は、雌で遊離型 MMAE がわずかに用量比を上回って増加したものの、おおむね用量に比例して増加した。チソツマブ　ベドチンの全身曝露量は遊離型 MMAE より明らかに高く、遊離型 MMAE の C_{max} はチソツマブ　ベドチンよりも遅れて観察された。チソツマブ　ベドチン及び遊離型 MMAE の曝露量は、3 及び 5 mg/kg 群の雌で 64 及び 85 日目の遊離型 MMAE 濃度が高かったことを除き、投与群及び試料採取日を通して明らかな性差は認められなかった。

チソツマブ　ベドチン投与群では、大部分の動物で ADA が産生された。ADA 抗体価が高かった一部の動物では、その後の投与で循環血中のチソツマブ　ベドチンの減少及び遊離型 MMAE の増加が認められた。しかし、特に高用量（5 mg/kg）群では、ADA が認められた場合でも概して、投与期間中のチソツマブ　ベドチンの曝露量は十分に維持された。投与期間を通じて蓄積は認められなかった。

チソツマブ　ベドチン 5 mg/kg 群の 3 匹［動物番号 23（雄）、55（雌）及び 57（雌）］は、以下のように皮膚病変が観察されたため、それぞれ初回投与後の 10 及び 26 日目［動物番号 23（雄）及び 55（雌）］並びに 2 回目投与後の 41 日目［動物番号 57（雌）］に、早期に安楽死させた。

- 動物番号 23（雄）：投与開始（1 日目）の前に、同居動物との闘争により左上腕に大きな創傷を負った。そのため、この動物への投与開始は約 4 週間後に延期した。投与 8 日目に腕

の創傷が開放し、全身状態が悪化した。8 日目に動物は円背位となり、振戦、不活発及び鼻孔／鼻孔周辺の赤色物が認められた。この動物は動物愛護の観点から 10 日目に安楽死させた。肉眼的所見として、鼠径／腋窩リンパ節の腫大、全身の皮膚痂皮、胸腺の小型化、精巣の海綿状変化、精巣上体の軟化が認められた。被験物質に関連した病理組織学的所見として、皮膚病変部にグラム陽性細菌叢を伴う混合型炎症性細胞浸潤（著明／重度）及び皮膚壊死が、精巣に軽度のびまん性精細管萎縮が、骨髄に軽度の細胞密度低下（顆粒球／赤芽球減少）が観察され、骨髄塗抹標本で軽度の顆粒球低形成が認められた。皮膚の炎症に対する全身的反応を示す所見が広範囲に認められた（腋窩／鼠径リンパ節の単核細胞浸潤、骨髄細胞密度の増加、肺の白血球増加及び副腎の髄外造血）。

- 動物番号 55（雌）：22 日目の投与前の心電図検査のために拘束したところ、両腕の下の治癒した創傷が開放し、浸出液が認められた。この動物では 4 日目から皮膚反応が認められ、22 日目にも皮膚反応が継続していた。この動物は 22 日目の投与を行わなかったが、腕の下の創傷の状態が悪化し、湿潤して黄色の分泌物が認められ、下層の筋肉が露出した。この動物は動物愛護の観点から 26 日目に安楽死させた。肉眼的所見として、膝関節部に皮膚の蒼白化／変色が、腋窩部に皮膚の欠損が認められた。病理組織学的所見として、腋窩に潰瘍性皮膚炎が、膝関節に軽度の皮膚線維化／混合型炎症性細胞浸潤が認められた。病変の認められた皮膚にグラム陽性細菌叢による二次感染が認められた（von Kossa 染色で無機質が確認された）。その他の所見として、胸骨骨髄の細胞密度増加、骨髄塗抹標本における軽度の顆粒球増多及び胸腺の小型化が認められた。

- 動物番号 57（雌）：この個体は 25 日目に背部に咬傷及び軟性腫脹が認められた。27 日目より背部に巨大な滲出性膿瘍が認められた。膿瘍は緩徐な回復を示したが、41 日目までに痂皮は認められず、膿瘍部位に湿潤病変が認められた。この動物は動物愛護の観点から 41 日目に安楽死させた。肉眼的所見として皮膚の欠損部が認められ、関連する病理組織学的所見としてグラム陽性細菌叢を伴う中等度の潰瘍性皮膚炎が見られた。二次的ストレス反応を反映した著明な胸腺の萎縮／退縮が認められた。

チソツマブ　ベドチン 1 mg/kg 群に、被験物質投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。チソツマブ　ベドチン 3 又は 5 mg/kg 群では、初回投与後 7～17 日以内に体表の種々の部位に皮膚の発赤及び乾燥した薄片状の皮膚が認められ、当該所見は、その後の投与でも 5 mg/kg 群の一部の個体で認められた。皮膚反応は各投与前には軽減しており、反復投与により重症度、発現頻度及び持続期間は減少した。観察された反応は個体差が大きく、特にチソツマブ ベドチン 5 mg/kg 群の雌では、所見は必ずしも、体表全体や反復投与後の全生存例に見られたわけではなかった。

多くの場合、最初の皮膚反応は大腿部又は胸部の皮膚発赤として観察され、乾燥した薄片状の皮膚に進行した。これらの所見は体表の他の部位にも見られ、ほぼ 14 日以内におおむね回復したが、5 mg/kg を投与した 3 匹では皮膚反応が広範囲に悪化したため、動物愛護の観点から早期に安楽死させた。

チソツマブ　ベドチン 5 mg/kg 群ではその他の毒性所見として、眼の充血又は半眼が散発的に見られ、抗生物質の点眼により治療した。また、大腿部の病変並びに胸部、大腿部及び腕の擦過痕が認められた。

投与期間中、眼の充血、結膜の発赤又は腫脹（分泌物を伴う又は伴わない）、眼瞼の腫脹、半眼、眼脂を伴う眼瞼の腫脹及び結膜炎などの所見を治療するため、獣医学的判断に基づいてフシジン酸（抗生物質）点眼薬も投与した。

体重、呼吸数、心電図、神経行動学的評価、凝固検査、尿検査、糞便検査及び月経周期には、チソツマブ　ベドチンに関連した影響は認められなかった。

さらに、チソツマブ　ベドチン 5 mg/kg 群の雄 3 匹では、投与 12 週目（4 回投与後）の眼科学的検査で眼底に軽微なガラス様変化が認められた。しかし、これらの動物の回復期間 2 及び 5 週目（それぞれ 96 及び 118 日目）に所見は見られず、その他の動物では、投与 12 週目及び回復期間中のいずれにも所見は認められなかった。眼底所見は軽微な変化であり、チソツマブ　ベドチン投与に関連しないと判断した。

血液学的検査では、チソツマブ　ベドチン 1 又は 3 mg/kg 群に赤血球パラメーター及び網状赤血球数への影響は認められなかった。5 mg/kg 群の雌雄では赤血球パラメーターへの影響として、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリットの減少（対照群又は投与前値との比較）が 10 又は 14 日目に認められた。これらの変化は概して投与期間を通して継続した。5 mg/kg 群の全例で 10 日目の網状赤血球数が減少し、その後の投与期間中も個体間でばらつきが認められた。赤血球パラメーター及び網状赤血球の変化は、6 週間の休薬により回復した。血小板数は、5 mg/kg 群の雄で 4 日目に、3 及び 5 mg/kg 群の雌雄で 6 日目に、3 及び 5 mg/kg 群の雌で 43～88 日目に低値であった（対照群又は投与前値との比較）。全ての群で統計学的に有意ではなかったが、3 及び 5 mg/kg 群の雌雄で 14 及び 56 日目に血小板数が高値を示した。チソツマブ　ベドチン 3 及び 5 mg/kg 群では、赤血球量、網状赤血球数及び血小板数の変化に応じて、赤血球、血小板及びヘモグロビン分布幅に統計学的に有意な変化が散見された。チソツマブ　ベドチン 3 及び 5 mg/kg 群では、骨髄塗抹標本で顆粒球低形成が、胸骨骨髄で細胞密度の低下が認められた。骨髄塗抹標本及び胸骨骨髄の所見は投与終了後 6 週間で回復した。

チソツマブ　ベドチン 5 mg/kg 群の雌雄で、各回の投与後 10 日以内に総白血球数及び好中球数の低値が認められ、次回の投与までにおおむね回復した。抗生物質の投与を必要としなかった個体でも、次回の投与前に好中球数減少は回復した。6 週間の回復期間終了時には、血球数は対照群又は投与前値と同程度であると判断された。試験期間中の総白血球数及び好中球数の減少は、リンパ球数、単球数及び好酸球数の減少とも関連が見られた。

血液生化学的検査では、5 mg/kg 群の雌雄でアルブミン濃度の低値及びグロブリン濃度の高値、それに伴うアルブミン／グロブリン比（albumin/globulin ratio、A/G）の低下がおおむね投与期間を通して認められた。また、5 mg/kg 群の雌雄では、ハプトグロビン濃度も投与期間を通しておおむね高値を示した。6 週間の回復期間中のアルブミン、グロブリン及びハプトグロビン濃度は、対照群及び投与前値と同程度であった。

生殖機能の評価では、チソツマブ　ベドチン 3 及び 5 mg/kg 群の雄で投与 11 週目に精巣サイズが投与前値と比較して減少した。同群の雄では、回復期間中もこの影響が認められた。精子の形態はチソツマブ　ベドチン投与の影響を受けなかったが、3 及び 5 mg/kg 群の雄で 11/12 週目

に精子数の減少又は完全な欠如が認められ、これらの群では回復期間中も同様の変化が認められた。1 mg/kg 群の雄 2 匹で 11/12 週目に精子数の減少が認められたが、この群では回復期間中に同様の所見は認められなかった。全てのチソツマブ　ベドチン投与群の雄で、11/12 週目に精子運動性が低下又は消失した。回復期間では、3 mg/kg 群の雄 1 匹で精子運動性の低下が認められ、5 mg/kg 群の雄 2 匹から採取した試料には精子が認められなかった。

3 及び 5 mg/kg 群の雄で精巣及び精巣上体重量の減少が認められた。5 mg/kg 群の雄では、6 週間の回復期間終了後も精巣及び精巣上体重量の低値が持続した。

投与期間終了時には、1 mg/kg 群の 3 匹中 1 匹、3 mg/kg 群の 3 匹中 2 匹及び 5 mg/kg 群の 2 匹中 2 匹の雄で、精巣のびまん性精細管萎縮並びに精巣上体の無精子／乏精子及び上皮空胞化が認められた。この変化は、3 又は 5 mg/kg 群で見られた精巣の肉眼的所見（軟化）と関連していた。

チソツマブ　ベドチン 3 及び 5 mg/kg 群では、6 週間の回復期間終了後に、精巣及び精巣上体で観察された変化が部分的に回復した。精細管萎縮は再生が見られ、精巣上体には精原細胞及び好酸性物質が存在した。1 mg/kg 群では精巣及び精巣上体の完全な回復が認められた。骨髄塗抹標本及び胸骨骨髄の変化は投与終了後 6 週間で回復した。

3.2.3.2　チソツマブ（25 mg/kg）群

反復投与後の全身曝露量はおおむね雌雄で同程度であった。反復投与後にチソツマブの蓄積は認められなかった（1 及び 85 日目の $AUC_{0\text{-}t}$：雄はそれぞれ 50700 及び 68500 µg· h/mL、雌はそれぞれ 50100 及び 63200 µg· h/mL）。チソツマブに対する ADA 反応は雌の 2 匹にのみ認められた（動物番号 60 の投与前及び動物番号 61 の 127 日目）。

チソツマブ投与に関連した所見として、雌雄で投与期間及び回復期間を通して、対照群又は投与前値と比べて統計学的に有意な PT の延長が認められたが、観察された PT の延長は軽微（対照群と比べて 20%未満）であった。この所見は有害所見とは判断されなかった。

また、チソツマブ 25 mg/kg を投与した雄で 12 週目（4 回投与後）の眼科学的検査で眼底にガラス様変化が認められたが、軽微な変化であった。これらの動物では 5 回投与終了後（96 日目）及び回復期間 5 週目（118 日目）に影響は認められなかった。一方、他の動物では 12 週目及び回復期間中の検査で影響は認められなかった。この変化は軽微な所見であり、被験物質とは関連なしと判断された。

3.2.3.3　チソツマブ　ベドチン（4 mg/kg）中間剖検群

皮膚反応を病理組織学的に検査するために、チソツマブ　ベドチン 4 mg/kg を投与する中間剖検群を設けた。皮膚反応（6 又は 8 日目）の発現から 24 時間以内に、4 mg/kg を投与した 4 匹の病変部位及び正常部位から皮膚生検試料を採取した。3 匹［動物番号 13（雄）、14（雄）及び 51（雌）］は 12 日目に安楽死させ、1 匹［動物番号 52（雌）］は大腿の生検部位の状態悪化（縫合不全及び血栓）により 11 日目に安楽死させた。

4 mg/kg 投与で認められたチソツマブ　ベドチンに関連する所見は、概して 3 又は 5 mg/kg 投与で認められた所見（皮膚の発赤及び皮膚反応並びに血液学的及び血液生化学的検査値の変化）と同様であった。

剖検では、被験物質に関連した所見として腹部体表、生殖器周囲及び四肢の乾燥した薄片状の皮膚が全例に認められた。雄 1 匹で皮膚の欠損（頸部）、変色（前肢）及び痂皮（眼窩周囲）が、雌 1 匹で痂皮（尾）が、雌 1 匹で皮膚の欠損（後肢）が認められた。これらの所見は皮膚生検による創傷部位に見られた。

チソツマブ　ベドチン 4 mg/kg を単回投与した全例（4 匹）に、被験物質と関連のある中等度の潰瘍性皮膚炎が認められた。皮膚生検（6/8 日目及び 11/12 日目）の所見として、潰瘍性皮膚炎、皮下混合型炎症性細胞浸潤、表皮の水腫性変性／過形成及び出血が認められた。チソツマブ　ベドチン 5 mg/kg 群の 3 匹の早期死亡例でも同様の所見が認められた。死亡例［動物番号 52（雌）］では、大腿部皮下に皮膚生検の試料採取部位に認められた血栓に関連した顕著な出血も認められた。より投与量の低い中間剖検動物では、重症度が低いものの、皮膚反応が進行性であることが示された。

骨髄塗抹標本検査では、全ての動物で中等度の顆粒球低形成も認められた。精巣及び精巣上体には被験物質に関連した変化は認められず、その他の病理組織学的変化は全て偶発的所見であり、チソツマブ　ベドチンと関連なしと判断された。

3.2.3.4　まとめ

カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを 1 又は 3 mg/kg の用量で 3 週間に 1 回静脈内投与したとき、忍容性は良好であった。5 mg/kg の用量で初回［動物番号 23（雄）及び 55（雌）］又は 2 回目［動物番号 57（雌）］投与後、3 匹に重度の皮膚反応が発現したため、動物愛護の観点からこれらの動物を早期に安楽死させた。重症度は低いものの、同様の皮膚反応が 3 mg/kg では初回投与後のみ、5 mg/kg では各回の投与後 6～7 日以内に発現した。これらの皮膚反応は、次回の投与前に完全に回復し、反復投与により重症度、発現頻度及び持続期間は減少した。4 mg/kg のチソツマブ　ベドチンを単回投与した動物を用いて、皮膚反応の病理組織学的検査を実施した。皮膚生検の所見として、潰瘍性皮膚炎、皮下混合型炎症性細胞浸潤、表皮の水腫性変性／過形成及び病変部位（皮下組織）からの出血が認められた。これらの所見は、5 mg/kg の早期死亡例で認められた所見より重症度が低いと考えられた。

被験物質と関連するその他の所見として、3 又は 5 mg/kg 群で末梢血の赤血球量の変化及び好中球減少と関連する顆粒球低形成及び骨髄細胞密度低下が認められた。1、3 及び 5 mg/kg 群では、精巣の小型化、精子数の減少又は完全な消失及び精子運動性の低下と関連して、精巣の精細管萎縮並びに精巣上体の無精子、精子減少及び上皮空胞化が認められた。骨髄所見は完全に回復した。3 及び 5 mg/kg 群の精巣及び精巣上体所見は部分的に回復し、1 mg/kg 群の精巣及び精巣上体所見は投与終了後 6 週間で完全に回復した。

チソツマブ　ベドチンの NOAEL は、雌では 1 mg/kg、雄では 1 mg/kg 未満と考えられた。チソツマブ　ベドチンの重篤な毒性が発現しない最大投与量（highest non-severely toxic dose、

HNSTD）は、雌雄いずれも 3 mg/kg と考えられた。チソツマブの NOAEL は 25 mg/kg と判断された。

3.3　MMAE

3.3.1　ラットを用いた MMAE の反復投与毒性試験

3.3.1.1　用量設定試験

報告書番号 [redacted]-13、添付資料番号[4.2.3.2-5 項]

MMAE のラットを用いた非 GLP 反復投与用量設定試験を実施した。ラットに MMAE を 1 週間間隔で 4 回静脈内投与したときの毒性及び 2 週間の休薬期間後の回復性を検討した。本試験の結果から、MMAE のラットを用いた GLP 適用反復投与毒性試験の用量を設定した。雌雄 Sprague Dawley ラットを Table 7 に示す群に割り付けた。

Table 7　MMAE のラットを用いた用量設定試験：試験デザイン

Group [a)]	Treatment	Dose Frequency	Dose (mg/kg)	Terminal Necropsy Day 23 (Male/Female)	Recovery Necropsy Day 36 (Male/Female)
2	Vehicle	Days 1, 8, 15, 22	0	3/3	-
6	MMAE	Days 1, 8, 15, 22	0.0097	3/3	2/2
7	MMAE	Days 1, 8, 15, 22	0.097	3/3	2/2
8	MMAE	Days 1, 8, 15, 22 [b)]	0.29	3/3	2/2

ADC: antibody-drug conjugate; MMAE: monomethyl auristatin E

a) In this study, dose groups 1, 3, 4, 5 were assigned to an unrelated ADC (Brentuximab vedotin); results for these dose groups are not reported here.

b) All 5 Group 8 male animals were administered only 1 dose of MMAE (on Day 1) due to early moribund termination on Day 3.

評価項目は、動物の生死、一般状態観察、体重、臨床病理学的検査（23 及び 36 日目）、剖検及び病理組織学的検査（特定組織のみ）とした。最終投与の 1 日後（23 日目）及び 2 週間後（36 日目）に剖検した。

MMAE 0.29 mg/kg 群の雄は、初回投与 2 日後に後肢麻痺（筋力低下を示唆）、鼻周囲の血性分泌物、嗜眠、立毛及び体重減少（9%未満）などの一般状態の変化が認められ、瀕死状態となったため全例を安楽死させた。早期に安楽死させた雄の血液学的検査値の変化として、リンパ球及び単球の減少並びに程度は低いが好塩基球及び好酸球の減少が認められた。

MMAE 0.29 mg/kg 群の雌で軽度～中等度の立毛及び尾の異常並びに一過性の体重減少（15%未満）が認められた。0.29 mg/kg 群の雌では 23 日目の血液学的検査値の変化として、赤血球、ヘモグロビン量及びヘマトクリットの中等度の減少、軽度の白血球減少（特に好中球）並びに中等度の血小板減少が認められた。一過性の血液生化学的検査値の変化として、AST（4～5 倍）、ALT 及びコレステロールの中等度の上昇が認められた。

MMAE 0.29 mg/kg 群の雌では、投与終了時剖検（23 日目）で被験物質に関連する影響が認められた標的器官は、骨髄（重度かつびまん性の胸骨骨髄枯渇、3 匹中 3 匹）、肝臓（軽度の多巣

性胆管肥大／過形成、3 匹中 3 匹）及び脾臓（軽度の赤脾髄異型有糸分裂、3 匹中 3 匹）であった。2 週間の回復期間終了時には、肝臓の胆管病変は部分的に回復していた（2 匹中 1 匹）が、その他の所見として軽度の肝臓の多巣性壊死（2 匹中 2 匹）が認められた。

MMAE 0.097 mg/kg 以下の群では病理組織学的変化は認められなかった。

以上より、ラットに MMAE 0.29 mg/kg を静脈内投与したときの忍容性は不良であり、雄では初回投与 2 日後に瀕死状態に至った。MMAE 0.29 mg/kg 群の雌では、主な標的器官は骨髄、肝臓及び脾臓であった。NOAEL は 0.0097 mg/kg、HNSTD/MTD は 0.097 mg/kg であった。

3.3.1.2　4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

報告書番号 [redacted]7646-118、添付資料番号[4.2.3.2-6 項]

ラットを用いた MMAE の GLP 適用 4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験を実施した。ラットに MMAE を 1 週間間隔で 4 回静脈内投与したときの毒性並びに 4 週間の回復期間終了後の回復性、持続性及び遅発性変化の有無について評価した。

雌雄 Crl:CD(SD)ラットを Table 8 に示す群に割り付けた。

Table 8　MMAE のラットを用いた GLP 適用反復投与毒性試験：試験デザイン

Group	Treatment [a), b)]	Dose Frequency	Dose (mg/kg)	Terminal Necropsy Day 26 (Male/Female)	Recovery Necropsy Day 51 (Male/Female)
1	Vehicle	Days 1, 8, 15, 22	0	10/10	5/5
2	MMAE	Days 1, 8, 15, 22	0.0097	10/10	-
3	MMAE	Days 1, 8, 15, 22	0.097	10/10	5/5
4	MMAE	Days 1, 8, 15, 22	0.194	10/10	5/5
10	Vehicle (TK)	Days 1, 8, 15, 22	0	-	-
11	MMAE (TK)	Days 1, 8, 15, 22	0.0097	-	-
12	MMAE (TK)	Days 1, 8, 15, 22	0.097	-	-
13	MMAE (TK)	Days 1, 8, 15, 22	0.194	-	-

i.v.: intravenous; MMAE: monomethyl auristatin E; TK: toxicokinetics
In this study, dose groups 5 to 9 and 14 to 18 were assigned to another antibody or ADC SGN 30/Brentuximab vedotin; results for these dose groups are not reported here.
a) MMAE was administered as a bolus i.v. injection into the tail vein
b) Toxicokinetic animals were included for TK and immunogenicity sample collections

評価項目は、動物の生死、一般状態観察、体重、摂餌量、臨床病理学的検査、剖検、器官重量、病理組織学的検査、TK 及び免疫原性評価とした。動物は 26 日目（最終投与 4 日後）及び 51 日目（最終投与 4 週間後）に安楽死させた。

MMAE の曝露量は、0.0097 mg/kg から 0.194 mg/kg への用量の増加に伴って増加した。C_{max} はおおむね用量比を下回って増加したが、$AUC_{0\text{-}24}$ はおおむね用量に比例して増加した。概して顕著な性差は認められなかった。

MMAE 0.0097 mg/kg の低用量投与では、血清中濃度は二相性に低下し、$t_{1/2}$ は 4.68～5.76 時間であった。反復投与後に $t_{1/2}$ の顕著な増加は見られなかった。中用量群及び高用量群では明確な消失相が見られなかったため、中用量群の雄で 1 日目の $t_{1/2}$ が 10.9 時間であったことを除き、$t_{1/2}$

の推定は行わなかった。C_{max} 及び AUC_{0-24} を用いて MMAE の蓄積性を評価した結果、反復投与により、ラット血清中 MMAE の体内動態が変化する可能性が示された。また、分布容積から、MMAE は血管外コンパートメントに広く分布することが示された。

MMAE 0.194 mg/kg の投与により、体重、体重増加量及び摂餌量の減少が認められたが、いずれも回復期間中に回復した。

MMAE 0.194 mg/kg の投与では、臨床病理学的検査で赤血球産生の低下（網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリットの低値）及び肝酵素の上昇［総ビリルビン、AST、ALT 及び γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（gamma-glutamyl transpeptidase、GGT）の高値］など、最も顕著で毒性学的に重要な影響が認められた。

病理組織学的検査では、MMAE の 0.194 mg/kg 群で軽微～顕著な胸腺のリンパ球枯渇並びに胸骨及び大腿骨骨髄の細胞密度低下が認められた。また、MMAE 0.194 mg/kg 群の雄で認められた肝臓の凝固壊死巣の発現頻度のわずかな増加は、肝障害マーカーの上昇と一致していた。

0.194 mg/kg 群で認められた被験物質に関連するその他の所見として、精巣及び精巣上体重量の減少、精細管変性、セルトリ細胞の空胞化、精子形成の減少並びに精巣上体無精子症が認められた。低用量では精巣の変化は見られなかった。

回復期間中に、胸腺、骨髄及び肝臓の変化は回復が認められた。しかし、MMAE 0.194 mg/kg 群の雄では、回復期間終了時に精巣の変化（びまん性精細管変性、セルトリ細胞空胞化及び精子形成減少）及び精巣上体の無精子症が認められた。

以上より、ラットに MMAE 0.194 mg/kg を 1 週間間隔で 4 回静脈内投与したとき、体重及び摂餌量の減少、赤血球産生の低下、肝障害（凝固壊死）に一致する臨床病理学的変化、胸腺、精巣及び精巣上体重量の減少、胸腺のリンパ球減少及び骨髄細胞密度低下、精巣の精細管変性、セルトリ細胞空胞化及び精子形成減少並びに精巣上体の無精子症が認められた。NOAEL は 0.097 mg/kg、HNSTD は 0.194 mg/kg であった。

3.3.2　カニクイザルを用いた MMAE の反復投与毒性試験

3.3.2.1　用量設定試験

報告書番号 [redacted].163.19、添付資料番号[4.2.3.2-7 項]

MMAE のカニクイザルを用いた非 GLP 静脈内投与用量設定試験を実施した。本試験はカニクイザルに高用量を単回静脈内投与、又は低用量を 2 回反復静脈内投与したときの MMAE の忍容性を検討することを目的として実施した。本試験の結果から、MMAE のサルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験の用量を設定した。4 匹のカニクイザルを Table 9 に示す MMAE 投与群に割り付けた。

Table 9　MMAE のカニクイザルを用いた用量設定試験：試験デザイン

Group	Dose Frequency	Dose (mg/kg)	Dose Volume (mL/kg)	Number and Sex of Animals		Study Specific Animal Number (Female, Male)
				Female	Male	
1	Day 1	0.116	10	1	1	1, 2
2	Days 1, 22	0.058	10	1	1	3, 4

第 1 群の動物には MMAE 0.116 mg/kg を単回投与し、投与後 63 日間の観察期間を設けた。第 2 群には MMAE 0.058 mg/kg を 3 週間間隔で 2 回反復投与し、その後 28 日間観察した。全ての用量を 10 mL/kg の投与容量で静脈内投与した。

評価項目は、生死、一般状態観察、体重、臨床病理学的検査、剖検（早期死亡例のみ）とした。観察期間終了時の生存動物の剖検は実施しなかった。

MMAE 0.116 mg/kg 群の雄が投与 28 日後に死亡した。死亡例の肉眼的所見として、右肺の膿瘍及び左肺前葉の薄灰色から淡黄褐色の着色が認められた。膿瘍の形成は、肺炎に関連した一次又は二次細菌感染の可能性を示した。肺病変／肺炎が死因の可能性が考えられた。

0.116 mg/kg 群ではこれ以外に MMAE に関連する所見として、食欲不振、体重減少及び一般状態の悪化（円背位、乾燥又は硬化した糞）、血液学的検査値の変化（白血球の全パラメーター、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット及び網状赤血球の減少）並びに血液生化学的検査値の変化（アルブミンの減少及び AST の軽度上昇）が認められた。0.058 mg/kg 群でも同様の一般状態の変化（円背位）及び臨床病理学的検査値の変化が認められたが、これらの所見は概して重症度が低く、持続期間も短かった。試験終了時には、高用量群の雌を含む全ての生存動物が回復又は回復傾向を示した。

総白血球数については、用量依存的な減少傾向が認められ、全例で代償性の白血球増多症が見られた。白血球数が最も少なかったのは通常投与後 7～10 日であり、代償性白血球増多症のピークはおおむね投与後 2～3 週であった。低用量（0.058 mg/kg）群の 22 日目の 2 回目投与でも、同様の白血球数の反応が見られた。総白血球数は投与後 7～10 日に減少し、投与後 21 日以内に回復した。このような傾向は両投与群の雌雄で認められた。白血球数の低値は、好中球、リンパ球、単球、好酸球及び好塩基球の低値と関連が見られた。

網状赤血球の割合又は絶対数は投与後に減少傾向を示し、最低値は初回投与後 7 日に発現した。低用量群では 2 回目の投与後にも網状赤血球数の低下が認められた。網状赤血球数は減少した後、リバウンド現象が見られ投与前値を上回った。MMAE の投与により白血球数及び赤血球数が減少したが、血小板の数又はサイズの減少は認められなかった。しかし、投与 7 日目以降に血小板数の増加傾向が認められた。血小板数の変化と MMAE 投与との関連は不明である。

血液生化学的検査では、MMAE 投与との関連が疑われる変化として、アルブミン濃度及び AST の低下が認められた。高用量群の雄（28 日目に死亡）では、死亡前にナトリウム、クロール、カルシウム及び ALT の減少並びにグロブリン及びトリグリセリドの増加に加えて、アルブミンの減少及び AST の軽度上昇が認められた。高用量群の雌雄及び低用量群の雄で、3 日目に AST の軽度上昇が認められた。アルブミン濃度の用量依存的な減少傾向が認められ、高用量群の雄で最も減少が大きかった。

以上より、カニクイザルに MMAE の 0.116 mg/kg を単回投与したときの忍容性は不良であり、雄で死亡例が認められ、一般状態観察、体重、血液学的検査値（赤血球及び白血球）及び血液生化学的検査値（アルブミン及び AST）に変化が認められた。カニクイザル 2 匹に MMAE 0.058 mg/kg を 3 週間間隔で 2 回反復投与したときの忍容性は良好であり、軽度の一般状態の変化及び臨床病理学的検査値（赤血球・白血球パラメーター、アルブミン及び AST）の変化が認められた。

3.3.2.2　11 週間反復静脈内投与毒性試験及び 5 週間回復性試験

報告書番号 [redacted].163.16、添付資料番号[4.2.3.2-8 項]

カニクイザルを用いた MMAE の GLP 適用 11 週間反復静脈内投与毒性試験及び 5 週間回復性試験を実施した。カニクイザルに MMAE を 3 週間間隔で 4 回投与したときの毒性並びに 5 週間の回復期間終了後の回復性、持続性及び遅発性変化の有無について評価した。カニクイザルを Table 10 に示す群に割り付けた。

Table 10　MMAE のカニクイザルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験：試験デザイン

Group	Treatment	Dose Frequency	Dose (mg/kg)	Terminal Necropsy Day 71 (Male/Female)	Recovery Necropsy Day R29 (Male/Female)
1	Vehicle	Days 1, 22, 43, 64	0	4/4	2/2
5	MMAE	Days 1, 22, 43, 64	0.058	3/3	2/2

ADC: antibody-drug conjugate; MMAE: monomethyl auristatin E
In this study, dose groups 2-4 were assigned to an unrelated ADC (Brentuximab vedotin); results for these dose groups are not reported here.

第 5 群の動物に MMAE を 0.058 mg/kg の用量で、3 週間間隔で 4 回静脈内投与した。動物は最終投与の 1 週間後（投与終了時剖検）又は 5 週間後（回復期剖検）に剖検した。動物の好中球数が減少している期間の日和見感染のリスクを低下させるため、投与期間及び回復期間中にセファゾリン（25～50 mg/kg、1 日 2 回）を投与した。

評価項目は、一般状態観察、摂餌量、体重、血圧、心拍数、体温、心電図、眼科学的検査、血液学的検査（リンパ球サブセットのフローサイトメトリーを含む）、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。MMAE の血清中濃度も測定した。

反復投与を通して、各投与後の血清中 MMAE 濃度は同様の推移を示した。MMAE 0.058 mg/kg を投与した動物で、各投与直後の MMAE の C_{max} は 1872～4626 pg/mL の範囲であった。

MMAE 0.058 mg/kg を 3 週間間隔で 4 回投与したときの忍容性は良好であった。摂餌量、体重、血圧、心拍数、体温、心電図、眼科学的検査、凝固検査及び尿検査では、被験物質に関連した影響は認められなかった。

被験物質に関連した影響は主に骨髄（細胞密度低下）並びに胸腺及び脾臓（リンパ球減少）で認められた。

臨床病理学的検査では、重度の好中球減少（多くの場合は 500/μL 未満、しばしば 200/μL 未満）が認められ、投与後 1 週間に最低値となり、投与後 2 週間までには好中球増加のリバウンドが認められた。しかし、MMAE 反復投与後は、概して好中球減少が長く持続した。リンパ球、単球、好酸球、赤血球及び網状赤血球の数的減少は一様ではなく、毒性学的意義はないと判断された。血液生化学的検査値に明らかな影響はなかった。

5 週間の回復期間終了時には、被験物質と関連する所見は全て回復した。

以上より、カニクイザルに MMAE を 0.058 mg/kg の用量で、3 週間間隔で 4 回投与した結果、重度の好中球減少並びに白血球分画及び赤血球パラメーターの減少を伴う、可逆的な骨髄抑制が認められた。胸腺及び脾臓で可逆的なリンパ球減少も認められた。

3.4　標的非結合性対照 ADC

3.4.1　カニクイザルを用いた標的非結合性対照 ADC の 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

報告書番号 [redacted]163.66、添付資料番号[4.2.3.2-9 項]

カニクイザルを用いた標的非結合性対照 ADC の GLP 適用 4 週間反復静脈内投与毒性試験を実施し、MMAE を含む ADC の標的抗原非依存的毒性を検討した。本試験には 40 匹のカニクイザルを使用し、Table 11 に示す各用量群に割り付けた。雌雄各 3 匹／群を最終投与 1 週間後に剖検し、雌雄各 2 匹／群を最終投与 4 週間後に剖検した。

Table 11　標的非結合性対照 ADC のカニクイザルを用いた毒性試験：試験デザイン

Treatment	Dose Frequency	Dose (mg/kg)	Terminal Necropsy (Male/Female)	Recovery Necropsy (Male/Female)
Control Article a)	Days 1, 8, 15, 22	0	3/3	2/2
Non-binding control ADC	Days 1, 8, 15, 22	3	3/3	2/2
		4	3/3	2/2
		5	3/3	2/2

ADC: antibody-drug conjugate
a)　0.9% Sodium Chloride for Injection, USP

評価項目は、一般状態観察、摂餌量、体重、眼科学的検査、心電図検査、神経学的検査、体温、血圧、呼吸数、サイトカイン濃度、イムノフェノタイピング、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

総抗体、ADC 及び遊離型 MMAE の曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}168}$）は用量に比例して増加し、性差は認められなかった。

全例が計画剖検時まで生存した。標的非結合性対照 ADC に関連した所見は概して用量依存的に認められ、他の MMAE を含む ADC で観察される所見に一致した。それらの所見は造血抑制（赤血球、骨髄細胞及びリンパ球系列）及び軽度の炎症［フィブリノゲン、C 反応性タンパク質（C-reactive protein、CRP）、グロブリン、IL-8、マクロファージ遊走阻止因子及び単球遊走活性化因子増加並びにアルブミン及び A/G 低下］であった。病理組織学的検査では、骨髄（造血細胞減少及び顆粒球系細胞／赤芽球系細胞比低下）、脾臓（胚中心減少）、胸腺（リンパ球枯渇）及び卵巣（二次及び三次卵胞の減少又は欠乏）に所見が認められた。4 週間の回復期間後、胸腺の小型化が観察された以外、全ての所見は部分的又は完全に回復した。

以上より、観察された所見はいずれも MMAE の作用機序に関連しており、変化は可逆的で重篤な毒性は認められなかった。HNSTD は最高用量の 5 mg/kg と判断された。

4.　遺伝毒性試験

4.1　In vitro 試験

4.1.1　MMAE の細菌を用いる復帰突然変異試験

報告書番号[redacted]AA66EH.503.BTL、添付資料番号[4.2.3.3.1-1 項]

MMAE の変異原性を評価するため、GLP 適用の細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。MMAE を 75、200、600、1800 及び 5000 µg/プレートの用量で、ネズミチフス菌株 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌株 WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化系存在下及び非存在下で評価した。

本試験条件下で、MMAE は変異原性を示さないと考えられた。

4.1.2　MMAE のマウスリンフォーマ試験

報告書番号[redacted]8204155、添付資料番号[4.2.3.3.1-2 項]

マウスリンパ腫細胞 L5178Y*tk*$^{+/-}$株を用いて、MMAE のチミジンキナーゼ（thymidine kinase、*tk*）遺伝子座における突然変異誘発能を GLP 適用の in vitro マウスリンフォーマ試験により評価した。アッセイは代謝活性化系存在下及び非存在下で実施し、変異原性は 5-トリフルオロチミジン（trifluorothymidine、TFT）存在下での TFT 抵抗性（trifluorotymidine resistance、TFT^{r}）コロニー形成により評価した。

確認試験では、MMAE を代謝活性化系存在下 0.0500、0.100、0.250、0.500、1.00、2.50、5.00、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0 及び 70.0 ng/mL（4 時間処理）並びに代謝活性化系非存在下 0.00100、0.00500、0.0100、0.0500、0.100、0.250、0.500、0.750、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、4.00、5.00 及び 6.00 ng/mL（24 時間処理）の濃度で評価した。

いずれの濃度でも用量依存的な変異頻度の増加は認められず、溶媒対照群の変異頻度の平均値を上回るクローン細胞 10^6 個当たり 90 個以上の TFT^{r} 変異細胞の増加は認められなかった。

本試験条件下で、MMAE は変異原性を示さないと考えられた。

4.2　In vivo 試験

4.2.1　MMAE のラットを用いる in vivo 骨髄小核試験

報告書番号[redacted]8204151、添付資料番号[4.2.3.3.2-1 項]

GLP 適用の in vivo ラット骨髄小核試験を実施した。ラットに MMAE 0.01、0.1 及び 0.2 mg/kg を単回静脈内投与したときの骨髄中の多染性赤血球細胞での小核形成を評価することにより、MMAE の in vivo 染色体異常誘発能及び分裂装置障害性を評価した。

雄ラット 35 匹を 5 群に割り付け、溶媒［0.01 N 塩酸（3.9%）及び 0.9%塩化ナトリウム注射液（96.1%）］、シクロホスファミド 60 mg/kg（陽性対照）又は MMAE 0.01、0.1 及び 0.2 mg/kg を単回静脈内投与した。

被験物質に関連した一般状態の変化は認められなかった。しかし、MMAE を 0.1 又は 0.2 mg/kg 投与した動物では、骨髄で小核を有する多染性赤血球の形成が増加した（$P \leq 0.01$）。

作用機序の解析により、MMAE は異数性誘発性の小核形成により動原体陽性の小核の形成を誘発することが確認された。これは微小管阻害薬である MMAE で予想される作用機序と一致する。

5.　がん原性試験

チソツマブ　ベドチンは進行がん患者の治療を目的としているため、ICH S9 ガイドラインに従って、MMAE 又はチソツマブ　ベドチンのがん原性試験は実施していない。

6.　生殖発生毒性試験

ICH S9 に従い、成熟カニクイザルを用いたチソツマブ　ベドチンの GLP 適用反復投与毒性試験の一環として生殖に関する指標を評価した。また、雌雄生殖能に対する MMAE 及び標的非結合性対照 ADC の影響を、ラット及び／又はカニクイザルの GLP 適用反復投与毒性試験の病理組織学的検査で検討した。

ラットを用いた MMAE の胚・胎児毒性試験を実施し、妊婦又は妊娠する可能性のある患者でのチソツマブ　ベドチン投与による胚・胎児発生に対する潜在的リスクを検討した。

チソツマブ　ベドチンは進行がん患者の治療を目的としていることから、受胎能試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は必要ないと考えられる。

6.1　受胎能

ラットに MMAE を 1 週間間隔で 4 回静脈内投与し、その後 4 週間の回復期間を設けた試験では、MMAE を 0.0097、0.097 又は 0.194 mg/kg の用量で投与した（3.3.1.2 項）。被験物質に関連した所見として、0.194 mg/kg で精巣及び精巣上体重量の減少、精巣の精細管変性、セルトリ細胞空胞化及び精子形成減少並びに精巣上体の無精子症が認められた。低用量では精巣の変化は認められなかった。高用量（0.194 mg/kg）の MMAE を投与した雄では、回復期間終了時に、精巣のびまん性精細管変性、セルトリ細胞空胞化及び精子形成減少並びに精巣上体の無精子症が認められた。

成熟カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを 3 週間間隔で 5 回、13 週間反復投与した試験で、雌雄の生殖能を評価した（3.2.3 項）。1、3 又は 5 mg/kg のチソツマブ　ベドチンを投与した動物で精巣に精細管萎縮が認められた。精巣上体では、無精子／乏精子及び上皮空胞化が認められた。精子運動性は、1、3 及び 5 mg/kg 群で低下又は消失した。これらの用量群では、精巣及び精巣上体重量が対照群よりも低値であった。1 mg/kg 群の精巣の変化は 6 週間の休薬後に完全に回復し、3 及び 5 mg/kg 群の動物では部分的な回復が見られ、精細管萎縮の再生が見られ、精巣上体に精原細胞及び好酸性物質が認められた。

チソツマブ　ベドチンでは認められなかったが、標的非結合性対照 ADC の GLP 適用反復投与毒性試験において卵巣への影響が認められた（3.4.1 項）。3 mg/kg 以上を 1 週間間隔で 4 回投与した若齢雌カニクイザルで、軽度から中等度の二次及び三次卵胞の減少（又は欠乏）が観察された。これらの所見は、回復期間後、数例で二次及び三次卵胞への発育が見られ、部分的な回復性

が認められた。これらの所見は、標的非依存的であり、MMAE の作用機序によって引き起こされることが示唆された。

6.2　胚・胎児発生に関する試験

6.2.1　ラットを用いた MMAE の胚・胎児発生に関する試験

報告書番号 [redacted]8204397、添付資料番号[4.2.3.5.2-1 項]

ラットを用いた GLP 適用の胚・胎児発生に関する試験を実施し、MMAE を妊娠期間中に投与したときの母動物及び胚・胎児毒性並びに催奇形性を検討した。

母動物の妊娠 6 及び 13 日に溶媒又は MMAE 0.2 mg/kg を静脈内ボーラス投与した。母動物は妊娠 21 日に安楽死させた。

試験の評価項目は、母動物の一般状態観察、体重及び体重増加量、摂餌量、血液学的検査及び病理解剖学的検査、帝王切開による子宮内観察、胚・胎児検査（生存率、成長及び発育）並びに胎児検査（外表、内臓及び骨格）とした。さらに、TK 評価のために母動物及び胎児の血液試料並びに羊水を採取した。

妊娠 21 日に早期分娩し、他の動物より先に安楽死させた 1 匹を除き、全ての母動物が計画剖検時まで生存した。剖検の直前に早産した母動物は計画剖検例とした。

MMAE は胎盤を通過し、胎児血清中で測定可能であった。MMAE に関連した毒性所見として、総吸収胚数及び着床後胚損失率の増加、早期分娩、生存胎児の減少及び胎児の外表奇形が認められた。胎児奇形は舌突出、下顎奇形（無顎）、四肢回転異常及び腹壁破裂が認められた。被験物質に関連した胎児の内臓及び骨格の奇形は認められず、平均黄体数、平均着床数及び着床前胚損失率には、対照群と比較して MMAE に関連した差は認められなかった。

以上より、妊娠ラットに MMAE を 0.2 mg/kg の用量で妊娠 6 及び 13 日に 2 回静脈内投与したとき、胚・胎児毒性が認められた。

7.　局所刺激性試験

局所刺激性の評価に特化した試験は実施しなかった。MMAE についてはラット及びサルを、チソツマブ　ベドチン及びチソツマブについてはサルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験の一部として、投与部位の病理組織学的検査を実施した。

被験物質投与に関連した投与部位の変化は認められなかった。

8.　その他の毒性試験

8.1　交差反応性試験

8.1.1　各種動物種由来の TF に対するチソツマブの交差反応性

報告書番号 GMB1015-088、添付資料番号[4.2.3.7.7-1 項]

チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンの非臨床安全性評価に適した毒性試験用動物種を特定するために、種々の毒性試験用動物種の組織の TF に対するチソツマブの結合を免疫組織化学検査（immunohistochemistry、IHC）により評価した。本試験ではフローサイトメトリーを用いて、チ

ンパンジー、カニクイザル、イヌ、ブタ、ウサギ、ラット又はマウスの TF を発現する相補的 DNA（complementary DNA、cDNA）をトランスフェクトしたヒト胎児腎（human embryonic kidney、HEK）293F 細胞に対するチソツマブの結合も評価に含めた。

チソツマブはカニクイザルの腎臓（腎小体）において、至適濃度 1 μg/mL で TF と交差反応性を示した（IHC による）。一方、試験に用いた他の動物種（イヌ、ブタ及びウサギ）の組織では、TF の染色は認められなかった。カニクイザルの腎小体の染色強度は、ヒトの腎小体に比べてやや高かった。

チソツマブはヒト、チンパンジー及びカニクイザルの TF を導入した HEK293F 細胞にも結合した（フローサイトメトリーによる）が、試験に用いた他の動物種（イヌ、ブタ、ウサギ、ラット及びマウス）では結合は見られなかった。酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA）により試験した場合も、マウス TF に対する交差反応性は陰性であった。

フローサイトメトリーで測定したカニクイザルの TF に対するチソツマブの親和性［50%効果濃度（50% effective concentration、EC_{50}）：126 ng/mL］は、ヒト TF（EC_{50}：276 ng/mL）と同程度であった。

非 GLP 組織交差反応性試験及びフローサイトメトリー試験のデータの概略を Table 12 に示す。

Table 12　毒性試験用動物種の TF に対するチソツマブの結合特性の概略

	Immunohistochemistry						Flow Cytometry			ELISA
Test item/ Species	293/TF	Human	Cyno	Pig	Dog	Rabbit	Human	Chimp	Cyno	Mouse
tisotumab	+++	++	+++	-	-	-	+ (276)	+ a)	+ (126)	-

Chimp: chimpanzee; Cyno: cynomolgus monkey; EC_{50}: 50% effective concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

+++, very strong binding; ++, strong binding; +, moderate binding; -, no binding. Numbers in parenthesis are EC_{50} values in ng/mL.

a) Binding to chimpanzee TF was investigated in a separate study. In that study, the EC_{50} (assessed using flow cytometry) in chimpanzee, human, and cynomolgus monkey were 6.8, 8.3, and 6.0 ng/mL, respectively – suggesting similar binding affinity in the 3 species.

Source: Study GMB1015-088, Table 5, modified

チソツマブで認められたチンパンジー及びカニクイザルとの交差反応性は、Table 13 に示すように、ヒトとこれらの動物種における TF のアミノ酸配列の類似性の高さとよく一致している。本試験に用いた動物種間のアミノ酸相同性は、チンパンジーの> 98%からマウスの約 56%の範囲であった。

Table 13　各種動物の TF とヒト TF とのアミノ酸配列の類似性

Organism	Species name	Human amino acid sequence similarity (%)	NCBI Reference number
Chimpanzee	*Pan troglodytes*	98.6	XP_001156450.1
Cynomolgus monkey	*Macaca fascicularis*	94.1	EGM_00854
Rhesus monkey	*Macaca mulatta*	94.1	AFE77126.1
Dog	*Canis familiaris*	75.8	BAD98568.1
Pig	*Sus scrofa*	74.0	NP_998950
Mouse	*Mus musculus*	56.4	NP_034301.2
Rat	*Rattus norvegicus*	57.3	NP_037189.2
Rabbit	*Oryctolagus cuniculus*	73.5	AAA63469.1

NCBI: National Center for Biotechnology Information
Source: Study GMB1015-088, Table 1

8.1.2　正常ヒト及びカニクイザル組織におけるチソツマブ-FITC 及びチソツマブ　ベドチン-FITC の組織交差反応性試験

報告書番号 [redacted]20023264、添付資料番号[4.2.3.7.7-2 項]

本試験は、フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate、FITC）で標識したチソツマブ（チソツマブ-FITC）及びチソツマブ　ベドチン-FITC と、FDA が推奨するヒト及びカニクイザルの正常組織パネルの凍結切片との交差反応性を評価することを目的として実施した。2 濃度（2 及び 0.5 µg/mL）のチソツマブ-FITC 及びチソツマブ　ベドチン-FITC を、ヒト及びカニクイザルの正常組織（1 組織当たり 3 ドナー）の凍結切片に適用し、結合を検討した。さらに、アイソタイプ対照抗体-FITC 及びアイソタイプ対照 ADC-FITC を凍結切片に適用した。また、これらの抗体又は ADC を含まない対照（アッセイコントロール）も同様に処理した。

チソツマブ-FITC 及びチソツマブ　ベドチン-FITC は、いずれの濃度でも陽性対照の A431 細胞で中等度～強度の染色を示した。チソツマブ-FITC 及びチソツマブ　ベドチン-FITC はいずれの濃度でも、陰性対照［ヒト腎臓（血管平滑筋細胞）凍結切片］と特異的な反応を示さなかった。アイソタイプ対照抗体-FITC 及びアイソタイプ対照 ADC-FITC は、陽性対照及び陰性対照のいずれとも特異的な反応を示さなかった。アッセイコントロールにも染色は認められなかった。陽性対照との特異的な反応が良好であったこと、陰性対照との特異的な反応が認められなかったこと、並びに対照物質に反応が認められなかったことから、本分析法は感度が高く、特異的かつ再現性があることが確認された。

ヒト及びカニクイザルの正常組織パネルでは、概して膜及び細胞質の両方で染色が認められた。本試験で観察された染色は、文献で報告される TF 発現部位とおおむね一致した。しかし、骨格筋、卵巣の黄体細胞及び莢膜細胞並びに精巣の精子形成細胞及びライディッヒ細胞での TF の発現を報告している入手可能な公表文献はなかった。したがって、これらの組織の染色は、TF の未報告部位での発現を意味する可能性がある。

染色パターンは Table 14 に示したように、ヒトとカニクイザルの組織パネル間でおおむね類似していたが、全体として、被験物質による染色が認められた組織はカニクイザルでより少なかった。ヒトとカニクイザルで認められた TF 染色の類似点及び相違点を Table 14 に示す。

Table 14　カニクイザルとヒトの組織交差反応性データの比較

Human	Cynomolgus Monkey
Membrane and/or cytoplasm/cytoplasmic granules in epithelium in the breast (ducts, glands), eye (cornea, conjunctiva, lens), gastrointestinal tract (esophagus [including submucosal glands]), kidney (parietal), liver (bile ducts), lung (bronchioles, alveoli), ovary (cyst), pancreas (acini, ducts), parathyroid, pituitary (adenohypophysis), prostate, salivary gland (acini, ducts), skin (epidermis, hair follicles, sweat glands), thymus (lymphoepithelium, Hassall's corpuscles), tonsil (surface, crypts), ureter (transitional), and uterus (endometrium [surface, glands] and cervix [internal and external os])	Membrane and cytoplasm/cytoplasmic granules in epithelium in the breast (ducts, glands), eye (conjunctiva, lens), Fallopian tube, gastrointestinal tract (esophagus [including submucosal glands]), kidney (parietal, tubules), liver (bile ducts), lung (bronchioles, bronchi, alveoli), ovary (surface, follicles), parathyroid, pituitary (adenohypophysis), prostate, salivary gland (ducts), skin (epidermis, hair follicles), thymus (lymphoepithelium, Hassall's corpuscles), thyroid (follicles, ducts), tonsil (surface, crypts), ureter (transitional), urinary bladder (transitional), and uterus (endometrium [surface, glands] and cervix [internal os])
Membrane and cytoplasm of stroma/stromal cells in most tissues	Membrane and cytoplasm of stroma/stromal cells in most tissues
Cytoplasm and processes of glial cells in the grey matter, and to a lesser extent in the white matter, of the cerebellum, cerebrum, and spinal cord and in the neurohypophysis of the pituitary	Cytoplasm and processes of glial cells in the grey matter, and to a lesser extent in the white matter, of the cerebellum, cerebrum, and spinal cord and in the neurohypophysis of the pituitary
Membrane and cytoplasm of arachnoid cap cells in the cerebellum and spinal cord	See footnote [a)]
Peripheral nerve associated cell processes (most likely endoneurium or stromal cells) in the Fallopian tube, gastrointestinal tract (esophagus), heart, kidney, liver, lymph node, peripheral nerve, prostate, salivary gland, striated (skeletal) muscle, thyroid, ureter, and urinary bladder	Peripheral nerve associated cell processes (most likely endoneurium or stromal cells) in the prostate
See footnote[a)]	Membrane and cytoplasm of mesothelium in the Fallopian tube, gastrointestinal tract (esophagus and small intestine), liver, lung, pancreas, spleen, and urinary bladder
See footnote[a)]	Cytoplasm of endothelium in the spleen
Cytoplasm of perineurium in the Fallopian tube, gastrointestinal tract (esophagus), heart, liver, prostate, salivary gland, and spinal cord	Cytoplasm of perineurium in the adrenal, prostate, and ureter
Cytoplasm of ganglion cells in the adrenal	See footnote[a)]
Membrane and cytoplasm of retinal cell processes in the inner and outer nuclear and plexiform layers of the retina	Membrane and cytoplasm of retinal cell processes in the inner and outer nuclear and plexiform layers of the retina
Cytoplasm of myenteric plexus cells and processes (likely ganglion and satellite cells) in the gastrointestinal tract (colon, small intestine, and stomach)	Cytoplasm of myenteric plexus cells and processes (likely ganglion and satellite cells) in the gastrointestinal tract (colon, small intestine, and stomach)
Cytoplasm of adipocytes in the adrenal, breast, gastrointestinal tract (esophagus), heart, lymph node, ureter, and urinary bladder	Cytoplasm of adipocytes in the adrenal
Cytoplasm of mononuclear cells in submucosal lymphoid nodules of the gastrointestinal tract (colon, small intestine, and stomach) and germinal centers of lymph node and tonsil	Cytoplasm of mononuclear cells in submucosal lymphoid nodules of the gastrointestinal tract (colon, small intestine, and stomach), a small infiltrate in the heart and prostate, and germinal centers of the lymph node and tonsil

Human	Cynomolgus Monkey
Membrane and cytoplasm of alveolar macrophages in the lung	Membrane and cytoplasm of alveolar macrophages in the lung
Membrane and cytoplasm of cardiomyocytes in the heart	Membrane and cytoplasm of cardiomyocytes in the heart
Membrane and cytoplasm of striated skeletal myocytes in the eye	See footnote [a)]
Membrane and cytoplasm of intrinsic smooth myocytes in the esophagus, stomach, and prostate	See footnote [a)]
Membrane and cytoplasm of glomerular tuft cells in the kidney	Membrane and cytoplasm of glomerular tuft cells in the kidney
Membrane and cytoplasm of islet cells in the pancreas	See footnote [a)]
Cytoplasm of luteal cells in the ovary	See footnote [a)]
See footnote [a)]	Cytoplasm of thecal cells in the ovary
Membrane and cytoplasm of spermatogenic cells and Leydig cells in the testis	Membrane and cytoplasm of Leydig cells in the testis

a) The reasons for the observed differences in staining between the human and cynomolgus monkey were not determined, but most likely included section-to-section variation, donor variation, differences in comparative donor age, cause of death, post-mortem delays and processing, or other unidentified differences, rather than true species differences. For further information on the methodology and staining pattern please see Report [redacted]20023264.

以上より、チソツマブ-FITC 及びチソツマブ　ベドチン-FITC により、カニクイザルで染色が認められたが、ヒトでは認められなかった組織は、中皮、脾臓の内皮及び卵巣の莢膜細胞であった。一方、ヒトでは染色が認められたが、カニクイザルでは認められなかった組織は、小脳及び脊髄のクモ膜帽細胞、副腎の神経節細胞、眼の横紋筋細胞、食道、胃及び前立腺の固有平滑筋細胞、膵臓の膵島細胞、卵巣の黄体細胞並びに精巣の精子形成細胞であった。

8.2　光毒性

報告書番号 [redacted]-2926-A、添付資料番号[4.2.3.7.7-3 項]

MMAE 及び vcMMAE は 290～700 nm の範囲で吸収を示さず、光毒性の直接的な懸念はなかった。

9.　考察及び結論

チソツマブ　ベドチンの毒性試験として、チソツマブ　ベドチン、チソツマブ、MMAE 及び標的非結合性対照 ADC を用いて包括的な一連の非臨床試験を実施した。毒性試験は、直近の規制ガイダンス（ICH S1A、S2(R1)、S5(R3)、S6(R1)、S9、S9 Q&A、S10 及び M3(R2)）を十分に考慮してデザインし、重要な試験は全て GLP 適用で実施した。重要な in vivo 試験では、カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを 3 週間間隔で 13 週間静脈内投与した。反復投与毒性試験で確認された主な標的器官は、皮膚、骨髄及び雄性生殖器官であった。また、臨床試験の所見並びにチソツマブ　ベドチンを投与したサルの獣医学的検査及び一般状態観察に基づき、結膜が標的器官であると考えられた。ラット及びカニクイザルで認められた MMAE 投与に関連する標的器官は、骨髄、肝臓、消化管、雄性生殖器官及びリンパ系器官であった。チソツマブは、サルへの 25 mg/kg の 3 週間間隔で 5 回の投与で良好な忍容性を示し、毒性徴候は認められなかった。

チソツマブ　ベドチンによる毒性は、一般に他の MMAE を含む ADC で認められた毒性と一致していた（Saber et al., 2015）。しかし、組織交差反応性試験では、皮膚及び結膜にチソツマブ　ベドチンの染色が認められたことから、皮膚及び結膜の毒性には TF の発現が関与している可能性が示唆された。

チソツマブ　ベドチンの非臨床安全性試験パッケージには、in vitro 組織交差反応性試験並びに in vivo 試験として、ラット（MMAE）及びカニクイザル（MMAE、チソツマブ、標的非結合性対照 ADC 及びチソツマブ　ベドチン）を用いた一般毒性試験が含まれる。これらの試験で特殊な評価項目として、生殖機能、皮膚生検、免疫原性、安全性薬理及び局所刺激性の評価を実施した。さらに、チソツマブの毒性を探索するため、カニクイザルを用いた非 GLP 探索的毒性試験を実施し、チソツマブが凝固カスケードを阻害することにより出血リスクを増加させるか否かについて検討した。チソツマブ及びチソツマブ　ベドチンはヒト、チンパンジー及びカニクイザルの TF に結合するが、検討した他の動物種（イヌ、ブタ、ウサギ、ラット及びマウス）には結合しないため、チソツマブ　ベドチン（又はチソツマブ）の毒性を評価するために適切な動物種としてカニクイザルを選択した。フローサイトメトリーを用いて評価したチソツマブ　ベドチンのカニクイザル TF に対する親和性（EC_{50}：126 ng/mL）は、ヒト TF に対する親和性（EC_{50} 値：276 ng/mL）と同程度であった。MMAE の毒性評価には、適切な動物種としてラット及びカニクイザルを選択した。MMAE の遺伝毒性は標準的組合せの遺伝毒性試験で評価した。妊娠ラットに MMAE を反復投与して、胚・胎児発生毒性を検討した。チソツマブ　ベドチンは進行がん患者の治療を目的としていることから、チソツマブ　ベドチン又は MMAE の動物を用いたがん原性試験は実施していない。MMAE は波長 290～700 nm の範囲の光を吸収しないことから、光毒性試験は実施しなかった。

重要な反復投与試験で認められた主な毒性所見の概略を、「2.6.7 毒性試験概要表」に示す。これらの試験で得られたチソツマブ　ベドチンの全身曝露量を、予定する臨床用量での曝露量と比較し、薬物動態試験の概要文（[2.6.4-Table 8]）に示す。

皮膚毒性：

カニクイザルを用いた重要な反復投与毒性試験では、1、3 及び 5 mg/kg のチソツマブ　ベドチンを 3 週間間隔（1、22、43、64 及び 85 日目）で静脈内投与した。1 又は 3 mg/kg の用量は忍容性が良好であった。5 mg/kg（AUC は臨床推奨用量投与時のヒトの約 4 倍）の 3 匹で初回又は 2 回目投与後に重度の皮膚有害反応が認められたため、これらの動物を早期に安楽死させた。重症度は低いものの同様の皮膚反応が、3 mg/kg（AUC は臨床推奨用量投与時のヒトの約 2.3 倍）では初回投与後のみ、5 mg/kg ではその後の各投与後 6～7 日以内に発現した。これらの反応は次回の投与前に完全に回復し、反応の重症度、発現頻度及び持続期間は反復投与により減少した。4 mg/kg のチソツマブ　ベドチンを単回投与した動物を用いて、皮膚反応部位の病理組織学的検査を実施した。皮膚生検の所見として、潰瘍性皮膚炎、皮下混合型炎症性細胞浸潤、表皮の水腫性変性／過形成及び病変部位（皮下組織）からの出血が認められた。これらの所見は、5 mg/kg の早期死亡例で認められた所見よりも重症度が低いと考えられた。

ヒト及びカニクイザルを用いた組織交差反応性試験では、皮膚の扁平上皮にチソツマブ　ベドチン特異的な染色が認められたことから、サルで認められたこれらの所見は、チソツマブ　ベドチンが皮膚組織の TF に結合することに起因する可能性が示唆された。この影響は用量依存的であり、休薬により完全に回復することから、これらの所見は薬剤に関連する可能性が高いが管理可能であると結論される。

眼毒性：

カニクイザルの 13 週間投与毒性試験では、チソツマブ　ベドチン 5 mg/kg を投与した大部分の動物で、獣医学的又は一般状態所見として、眼の充血、結膜の発赤又は腫脹（分泌物を伴う又は伴わない）、眼瞼の腫脹、半眼、眼脂を伴う眼瞼の腫脹及び結膜炎が認められ、フシジン酸（抗生物質）点眼薬により治療した。

ヒト及びカニクイザルを用いた組織交差反応性試験では、結膜を含む眼組織でチソツマブ　ベドチン特異的な染色が認められた。これらのデータから、サルで認められた所見は、結膜での TF へのチソツマブ　ベドチンの結合に起因する可能性が示唆された。サルで見られた影響は用量依存的であり、休薬により回復することから、これらの所見は薬剤に関連する可能性が高いが管理可能であると結論される。

血液学的所見／骨髄所見：

カニクイザルを用いた重要な反復投与毒性試験では、チソツマブ　ベドチンに関連した所見として、循環血中の赤血球パラメーター（赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット）、総白血球数及び好中球数の減少が認められ、3 又は 5 mg/kg（AUC はヒトに臨床推奨用量を投与したときの約 2.3～4 倍）で顆粒球低形成及び骨髄細胞密度の低下と相関が見られたが、この変化は投与終了後 6 週間で回復した。カニクイザルに MMAE を 0.058 mg/kg（チソツマブ　ベドチンの 3 mg/kg に結合する MMAE の量に相当）を投与した場合にも同様の所見が認められた。

これらのデータは、血液学的影響が MMAE を介している可能性を示している。ビンクリスチンや他の MMAE を含む ADC などの微小管阻害薬で血液学的影響が報告されており、これらの影響は標的非依存的に生じると考えられる（Lin et al., 2015; Donaghy, 2016）。

サルの血液学的所見はモニタリング可能かつ可逆的であり、微小管阻害薬で予測された変化であることから、この変化は管理可能であると結論した。

雄性生殖器官の所見：

カニクイザルの 13 週間反復投与試験で精巣毒性が認められた。チソツマブ　ベドチンの 1、3 及び 5 mg/kg（AUC は臨床推奨用量でのヒト曝露量の約 0.5～4 倍）投与では、精巣の精細管萎縮、精巣の小型化と関連した精巣上体の無精子／乏精子及び上皮空胞化並びに精子数及び精子運動性の低下又は完全な欠如が認められた。精巣及び精巣上体の変化は、投与終了後 6 週間で 3 及び 5 mg/kg では部分的に回復し、1 mg/kg では完全に回復した。

臨床的に精子数を減少させることが報告されているビンクリスチンなど、他の微小管阻害薬でも雄性生殖器官の変化が認められている（VinCRIStine Prescribing Information, 2023）。ブレンツ

キシマブ　ベドチン（ADCETRIS European Public Assessment Report, 2012）及びエンホルツマブ ベドチン（PADCEV European Public Assessment Report, 2022）など、他の MMAE を含む ADC もラットで精巣毒性を引き起こした。これらの変化は、がん治療に伴うリスク–ベネフィット評価の観点から許容可能と考えられる。

雌性生殖器官の所見：

チソツマブ　ベドチンでは観察されていないが、標的非結合性対照 ADC の反復投与毒性試験において卵巣への影響が認められた。3 mg/kg 以上を 1 週間間隔で 4 回投与した若齢雌カニクイザルで、軽度から中等度の二次及び三次卵胞の減少（又は欠乏）が観察された。これらの所見は、回復期間後、数例で二次及び三次卵胞への発育が見られ、部分的な回復性が認められた。

胚・胎児発生に関する所見：

チソツマブ　ベドチンの胚・胎児発生に関する試験は実施していないが、MMAE に関するデータが得られている。妊娠ラットに、MMAE 0.2 mg/kg を器官形成期の妊娠 6 及び 13 日に 2 回静脈内投与した。MMAE に関連した毒性として、総吸収胚数及び着床後胚損失率の増加、早期分娩、生存胎児の減少及び胎児の外表奇形が認められた。胎児奇形は舌突出、下顎奇形（無顎）、四肢回転異常及び腹壁破裂が認められた。これらの影響は、ラットではヒトの MMAE 曝露量よりも低い曝露量で観察された。被験物質に関連した胎児の内臓及び骨格の奇形は認められず、平均黄体数、平均着床数及び着床前胚損失率には、対照群と比較して MMAE に関連した差は認められなかった。

がん化学療法薬では胚・胎児毒性との関連がしばしば見られており、このリスクを軽減するために適切な情報提示及び患者カウンセリングを行うべきである。

その他の所見：

血液生化学的検査では、カニクイザルの 13 週間反復投与毒性試験で 5 mg/kg のチソツマブ ベドチンを投与した雌雄で、炎症に一致する変化（ハプトグロビン濃度の高値並びにアルブミンの低値及びグロブリンの高値に伴う A/G の低下）が、概して投与期間を通して認められた。投与終了 6 週間後のアルブミン、グロブリン及びハプトグロビン濃度は対照群及び投与前値と同程度であり、回復性が認められた。患者の血液生化学検査で炎症の徴候を観察する必要がある。

凝固系への影響：

In vitro 副次的薬理試験では、試験液中の TF 濃度が過剰にならないように改変した標準的な試験条件下では、チソツマブは血液凝固パラメーターの延長を示した（[2.6.2-3 項]）。しかし、サルの皮膚切開アッセイでは 100 mg/kg までのチソツマブの単回投与で出血時間の延長は認められず、一般状態観察、病理所見、一般的な血液凝固パラメーター（PT、APTT 及びフィブリノゲン及び血小板数）及び TEG 検査値（血栓の形成、動態、強度、安定性及び消失）にチソツマブに関連した変化は認められなかった。

5 mg/kg［臨床推奨用量でのヒト曝露量（AUC）の約 4 倍］までのチソツマブ　ベドチンを 3 週間間隔で 13 週間投与したサルでは、血液凝固パラメーターの変化及び出血に関連する所見は認められなかった。チソツマブを 25 mg/kg の用量で投与した動物では、投与期間及び回復期間を通して軽微な PT 延長（対照群と比べて 20%未満の延長）が認められた。しかし、この PT 延長は臨床推奨用量でのヒト全身曝露量（チソツマブ　ベドチンの AUC）の約 37 倍で発現しており、他の関連する毒性所見を伴わなかった（出血に関連する所見及び凝固系の異常を示唆する病理所見は認められない）。

サルではチソツマブ　ベドチン投与に関連した凝固系の変化は認められなかったが、患者では必要に応じて出血性イベントを観察する必要がある。

末梢神経障害：

チソツマブ　ベドチンを含む MMAE を含む ADC の臨床試験では、リスクとして末梢神経障害が確認されている。MMAE 及びチソツマブ　ベドチンのラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験では、末梢神経障害を示す一般状態の変化及び病理組織学的所見は報告されていない。

チソツマブ　ベドチン及び MMAE のいずれにも、サルで末梢神経障害の所見は認められなかったが、末梢神経障害に関連する所見について適切に患者を観察する必要がある。

9.1　全般的結論

チソツマブ　ベドチンの毒性試験として、チソツマブ　ベドチン、MMAE、標的非結合性対照 ADC 及びチソツマブを用いて実施した試験を含む包括的な一連の非臨床試験を実施した。毒性試験プログラムは、チソツマブ　ベドチンの臨床開発を支持するものであり、本申請の裏付けに必要なデータを提供するものである。カニクイザルにチソツマブ　ベドチンを反復投与したときに認められた投与に関連する主要な用量制限毒性は、抗体の標的である TF と関連した皮膚毒性であり、次いで TF に関連しない骨髄毒性であった。さらに、チソツマブ　ベドチン投与後の標的器官として、雄性生殖器官及び結膜（獣医学的検査及び一般状態観察に基づく）が確認された。その他に、MMAE 及び／又は標的非結合性対照 ADC 投与後に確認された標的器官は、リンパ系器官、消化管、肝臓及び卵巣であった。チソツマブ　ベドチンの非臨床毒性試験では、凝固系の異常を示す所見は認められなかった。チソツマブ　ベドチン（MMAE 及び vcMMAE）に光毒性はないと考えられる。MMAE は異数性誘発性の作用機序により遺伝毒性を示す。MMAE は胚・胎児発生毒性を示す。チソツマブ　ベドチン及び MMAE の投与により精巣毒性が発現したが、部分的な回復が認められた。これらの所見は、MMAE の薬理作用から予測される影響と一致する。

以上より、非臨床試験で観察された毒性所見はモニタリング可能であり可逆的であることから、チソツマブ　ベドチンの非臨床安全性プロファイルは癌患者へのチソツマブ　ベドチンの使用を支持している。

10. 参考文献一覧

ADCETRIS European Public Assessment Report. Takeda Global Research and Development Centre. 2012.

Barbas 3rd CF, Collet TA, Amberg W, Roben P, Binley JM, Hoekstra D, et al. Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. J Mol Biol. 1993;230(3):812-23.

Donaghy H. Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates. MAbs. 2016;8(4):659-71.

Lin K, Rubinfeld B, Zhang C, Firestein R, Harstad E, Roth L, et al. Preclinical development of an anti-NaPi2b (SLC34A2) antibody-drug conjugate as a therapeutic for non-small cell lung and ovarian cancers. Clin Cancer Res. 2015;21(22):5139-50.

Lin YS, Nguyen C, Mendoza JL, Escandon E, Fei D, Meng YG, et al. Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor. J Pharmacol Exp Ther. 1999;288(1):371-8.

PADCEV European Public Assessment Report. Astellas Pharma Europe B.V. 2022.

Saber H, Leighton JK. An FDA oncology analysis of antibody-drug conjugates. Regul Toxicol Pharmacol. 2015;71(3):444-52.

VinCRIStine Prescribing Information. Hospira, Inc. Lake Forest, IL 60045. Revised: 1/2023. https://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?format=PDF&id=4653, accessed 16-Feb-2024.

目次

1. 毒性試験：一覧表 2
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 6
3. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 6
4. 単回投与毒性試験 8
5. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 10
6. 反復投与毒性試験：重要な試験 15
6.1 Tisotumab vedotin 15
6.2 MMAE 28
6.2.1 MMAE のラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 28
6.2.2 MMAE のカニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与毒性試験及び 5 週間回復性試験 32
7. In Vitro 遺伝毒性試験 40
7.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 40
7.2 マウスリンフォーマ TK 試験 43
8. In Vivo 遺伝毒性試験 48
8.1 ラットを用いる in vivo 骨髄小核試験 48
9. がん原性試験 50
10. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 50
11. 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 50
12. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 51
13. 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 57
14. 新生児を用いた試験 57
15. 局所刺激性試験 57
16. その他の毒性試験 58

1. 毒性試験：一覧表

Test Articles: Tisotumab vedotin, Tisotumab, and MMAE

Study Type/Title	Testing Facility	Study No.	GLP	Species	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Dosing Schedule	Location in CTD
Single-Dose Toxicity									
A comparison study of the acute effects of monomethyl auristatin E (MMAE) and MMAE-based antibody-drug conjugates administered intravenously in the rat	[redacted], USA	[redacted]1019-001	No	Rat	i.v.	MMAE	0.05, 0.25	Single-dose	[4.2.3.1-1]
Single dose intravenous toxicity study of SGN-35 and SGD-1010	[redacted], USA	[redacted]-15	No	Rat	i.v.	MMAE	0.01, 0.1, 0.2	Single-dose	[4.2.3.1-2]
Single dose, bone marrow and hematology toxicity kinetic study of SGD-1010 in the rat	[redacted], USA	[redacted]-33	No	Rat	i.v.	MMAE	0.2	Single-dose	[4.2.3.1-3]
Repeat-Dose Toxicity									
Multiple dose intravenous toxicity study of SGN-35 and SGD-1010 in male and female rats	[redacted], USA	[redacted]-13	No	Rat	i.v.	MMAE	0.0097, 0.097, 0.29	Q1W×4	[4.2.3.2-5]
A 4-week intravenous injection toxicity and toxicokinetic study of SGN-35, SGD-1010, and SGN-30 in rats with a 4-week recovery	[redacted] USA	[redacted]7646-118	Yes	Rat	i.v.	MMAE	0.0097, 0.097, 0.194	Q1W×4	[4.2.3.2-6]
A pilot intravenous dose range finding and toxicity study of SGD-1010 in cynomolgus monkeys	[redacted] USA	[redacted].163.19	No	Monkey	i.v.	MMAE	0.058/0.116	Q3W×2/ Single-dose	[4.2.3.2-7]

Study Type/Title	Testing Facility	Study No.	GLP	Species	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Dosing Schedule	Location in CTD
An 11-week repeat-dose intravenous infusion toxicity study of SGN-35 and SGD-1010 in cynomolgus monkeys with a five-week recovery period	[redacted], USA	[redacted].163.16	Yes	Monkey	i.v.	MMAE	0.058	Q3W×4	[4.2.3.2-8]
HuMab-TF (IgG1-1015-011): Pilot repeat dose toxicology study in cynomolgus monkeys	[redacted], UK	[redacted]514850	No	Monkey	i.v.	Tisotumab	1, 10, 100	Q1W×4	[4.2.3.2-1]
Tissue factor antibody drug conjugates (IgG1-1015-098-1006, IgG1-1015-098-1269, IgG1-1015-011-1006, IgG1-1015-011-1269, IgG1-B12-1006, IgG1-B12-1269, IgG1-1015-111-1006, IgG1-1015-111-1269): Pilot repeat dose toxicology study in cynomolgus monkeys	[redacted], UK	[redacted]520010	No	Monkey	i.v.	Tisotumab vedotin	1, 2.5, 5	Q1W×3	[4.2.3.2-2]
Tissue factor antibody drug conjugates (IgG1-1015-098-vcMMAE and IgG1-1015-011-vcMMAE): 10 week dose range finding study in cynomolgus monkeys with a 6 week recovery period	[redacted], UK	[redacted]521988	No	Monkey	i.v.	Tisotumab vedotin	1, 3, 6/5	Q3W×4	[4.2.3.2-3]
HuMax-TF-ADC: 13 week repeat dose toxicity study in cynomolgus monkeys with a 6 week recovery period	[redacted], UK	[redacted]522531 ([redacted]1015-151)	Yes (No)	Monkey	i.v.	Tisotumab vedotin, Tisotumab	1, 3, 5, 25	Q3W×5	[4.2.3.2-4]
A 4-Week Repeat Intravenous Dose Study of h00-1006(4) in Cynomolgus Monkeys with a 4-Week Recovery Period (GLP)	[redacted], USA	[redacted]163.66	Yes	Monkey	i.v.	Non-binding control ADC	3, 4, 5	Q1W×4	[4.2.3.2-9]

Study Type/Title	Testing Facility	Study No.	GLP	Species	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Dosing Schedule	Location in CTD
Genotoxicity									
L5178Y*tk*$^{+/-}$ mouse lymphoma forward mutation assay with a confirmatory assay	[redacted], USA	[redacted]8204155	Yes	Mouse lymphoma L5178Y cell line	in vitro	MMAE	+S9: 0.05 – 70 ng/mL -S9: 0.001 – 6 ng/mL	NA	[4.2.3.3.1-2]
Bacterial reverse mutation assay	[redacted], US	[redacted]AA6 6EH.503.BTL	Yes	Salmonella typhimurium and Escherichia coli strains	in vitro	MMAE	+/-S9: 75 – 5000 µg/plate	NA	[4.2.3.3.1-1]
In vivo rat bone marrow micronucleus assay	[redacted], USA	[redacted]8204151	Yes	Rat	i.v.	MMAE	0.01, 0.1, 0.2	Single-dose	[4.2.3.3.2-1]
Carcinogenicity									
NA									
Reproduction and Development Toxicity									
Intravenous injection study for effects on embryo-fetal developmental and toxicokinetics with SGN-35 and SGD-1010 in rats	[redacted], USA	[redacted]8204397	Yes	Rat	i.v.	MMAE	0.2	Q7D×2	[4.2.3.5.2-1]
Local Tolerance									
NA									

Study Type/Title	Testing Facility	Study No.	GLP	Species	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Dosing Schedule	Location in CTD
Other Toxicity Studies									
A tissue cross-reactivity study of IgG1-1015-011-FITC and IgG1-1015-011-vcMMAE-FITC in normal human and cynomolgus monkey tissue	[redacted], USA	[redacted]20023264	Yes	Human and monkey tissues	NA	Tisotumab vedotin-FITC, Tisotumab-FITC	NA	NA	[4.2.3.7.7-2]
Cross-reactivity of HuMax-TF with TF from various animal species	Genmab, NL	GMB1015-088	No	Human, chimpanzee, cynomolgus monkey, dog, pig, rabbit, rat or mouse	NA	Tisotumab	NA	NA	[4.2.3.7.7-1]
Real time stability of FITC-labeled naked and vcMMAE-conjugated IgG1-1015-011 and IgG1-b12 during 3-6 months storage and freeze thaw stability	Genmab, NL	SD1015-104-01	No	NA	NA	Tisotumab vedotin-FITC, Tisotumab-FITC	NA	NA	[4.2.3.7.7-2]
SGD-1006, SGD-1427 and SGD-1010 photosafety evaluation	[redacted]., USA	[redacted]-2926-A	No	NA	NA	MMAE, vcMMAE	NA	NA	[4.2.3.7.7-3]

ADC: antibody-drug conjugates; FITC: fluorescein isothiocyanate; GLP: Good Laboratory Practice; i.v.: intravenous; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; Q7D: once every 7 days; Q1W: once a week; Q3W: once every 3 weeks; ROA: route of administration; vcMMAE: valine-citrulline monomethyl auristatin E

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

全てのトキシコキネティクス試験は 2.6.5 項に要約した。

3. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: MMAE

Batch No.	[redacted] Purity (%)	Specified Impurities		Study No.	Type of Study and Dosing Schedule
		[redacted]	[redacted]		
Proposed Specification [a]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
[redacted] [b]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	AA66EH.503.BTL	Genotoxicity: Bacterial mutagenicity assay
				[redacted]1019-001	Single-dose toxicity
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted].163.19	Repeat-dose toxicity (Q1W×1, Q3W×2)
				[redacted].163.16	Repeat-dose toxicity (Q3W×4)
				[redacted]-13	Repeat-dose toxicity (Q1W×4)
				[redacted]7646-118	Repeat-dose toxicity (Q1W×4)
				[redacted]-15	Single-dose toxicity
[redacted] [c]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]-33	Single-dose toxicity
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]8204115	Genotoxicity (*in vitro*) – mouse lymphoma assay
				[redacted]8204151	Genotoxicity (*in vivo*) – rat micronucleus assay
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]8204397	Embryo-fetal development (Q7D×2)

API: active pharmaceutical ingredient; MMAE: monomethyl auristatin E; [redacted]; [redacted]; [redacted]; [redacted];
Q7D: once every 7 days; Q1W: once a week; Q3W: once every 3 weeks

a) MMAE is not an API, it is released from tisotumab vedotin by proteolytic cleavage in lysosomes following uptake into cells.

b) [redacted] is also known as [redacted] on the Certificate of Testing.

c) [redacted] is also known as [redacted] on the Certificate of Testing.

Test Articles: Tisotumab vedotin, Tisotumab, controls, Non-binding control ADC and other alternate anti-TF HuMab ADC

Batch No.	Purity (%)	DAR	Specified Impurities (%)				Study No.	Type of Study and Dosing Schedule
			[redacted] (%)	[redacted]	[redacted]	[redacted] (%)		
Proposed Specification	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]521988	Repeat-dose toxicity (Q3W×4)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]521988	Repeat-dose toxicity (Q3W×4)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]514850	Repeat-dose toxicity (Q1W×4)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]520010	Repeat-dose toxicity (Q1W×3)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]520010	Repeat-dose toxicity (Q1W×3)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]520010	Repeat-dose toxicity (Q1W×3)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]520010	Repeat-dose toxicity (Q1W×3)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]520010	Repeat-dose toxicity (Q1W×3)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]520010	Repeat-dose toxicity (Q1W×3)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]520010	Repeat-dose toxicity (Q1W×3)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]520010	Repeat-dose toxicity (Q1W×3)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted].5	[redacted]520010	Repeat-dose toxicity (Q1W×3)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]522531	Repeat-dose toxicity, pivotal (Q3W×5)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]522531	Repeat-dose toxicity, pivotal (Q3W×5)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted] 163.66	Repeat-dose toxicity (Q1W×4)

ADC: antibody-drug conjugates; DAR: drug-antibody ratio; [redacted]; [redacted]; [redacted]; HuMab: human monoclonal antibody; [redacted]; [redacted]; Q1W: once a week; Q3W: once every 3 weeks; TF: tissue factor; [redacted]

[redacted]

4.　単回投与毒性試験

Test Article: MMAE

Species	Study No. / Location in CTD	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Gender and Number per group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings
Rat	[redacted]1019-001 / [4.2.3.1-1]	i.v. bolus	MMAE	0.05, 0.25	4M/4F 4M/4F	0.25	ND	Mortality: No unscheduled deaths. Clinical Pathology: Decreases in red cell parameters, increased ALP. Histopathology: sternal bone marrow atrophy, thymic necrosis/atrophy, gastrointestinal epithelial single cell necrosis, hepatic subacute inflammation. Target organs: bone marrow, thymus, GI-tract and liver.
Rat	[redacted]-15 / [4.2.3.1-2]	i.v. bolus	MMAE	0.01, 0.1, 0.2	3M/3F 3M/3F 3M/3F	0.1	0.2	Mortality: all rats treated with 0.2 mg/kg MMAE were euthanized 2 days postdose. Bone marrow cytology at 0.1 mg/kg: erythroid hyperplasia accompanied by mild cellular lysis. Histopathology: thymus (lymphoid depletion) and liver (single cell necrosis and biliary hyperplasia). Target organs: bone marrow and liver.

Species	Study No. / Location in CTD	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Gender and Number per group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings
Rat	[redacted]-33 / [4.2.3.1-3]	i.v. bolus	MMAE	0.2	3F	ND	0.2	Mortality: 3/33 rats died 3-4 days postdose. Clinical Pathology: reductions in total leukocytes (predominantly neutrophils) from 2-5 days postdose, with recovery by 7-8 days postdose; decrease in erythrocyte mass from 2-8 days postdose, with recovery by 14 days postdose. Histopathology: progressive, severe, bone marrow pancytopenia from 2-5 days postdose with a rapid regenerative recovery.

ALP: alkaline phosphatase; F: female; GI: gastrointestinal; i.v.: intravenous; M: male; MMAE: monomethyl auristatin E; ND: not determined; ROA: route of administration

5.　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Articles: Tisotumab vedotin, Tisotumab, Non-binding control ADC, and MMAE

Species	Study No. / Location in CTD	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Dosing Schedule	Gender and Number per group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings
Rat	[redacted]-13 / [4.2.3.2-5]	i.v. bolus	MMAE	0.0097, 0.097, 0.29	Q1W×4	5M/5F 5M/5F 5M/5F	0.0097	Mortality: all male rats treated with 0.29 mg/kg MMAE. Clinical Pathology: reductions in red cell mass, leukocytes and platelets, elevations in AST, ALT, total bilirubin, GGT, ALP, total protein and cholesterol and reduction in albumin. Gross pathology: multi-organ paleness, splenic atrophy and lymphadenopathy. Histopathology: bone marrow (depletion), liver (necrosis and biliary hyperplasia), spleen (atypical mitosis). Target organs: bone marrow, liver and spleen.

Species	Study No. / Location in CTD	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Dosing Schedule	Gender and Number per group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings
Monkey	[redacted].163.19/ [4.2.3.2-7]	i.v.	MMAE	0.116 0.058	Q1W×1 Q3W×2	1M/1F 1M/1F	ND	Mortality at 0.116 mg/kg; 0.058 mg/kg was well tolerated. MMAE-related indicators of toxicity in high dose animals included inappetence, reductions in body weight and adverse clinical observations (hunched posture and dry or hard feces). Clinical pathology: There were possible MMAE-related changes in the following serum analytes: decreased albumin concentrations and AST activity. In the high dose male (found dead on Day 28) there were also reductions in sodium (Na), chloride (Cl), calcium (Ca), and ALT and elevations in globulin and triglycerides at time points preceding death), and serum chemistry changes (reductions in albumin and slight elevations in AST). Hematology changes included reductions in all white cell endpoints, erythrocytes, hemoglobin, hematocrit and reticulocytes Histopathology: No necropsies were performed.
Monkey	[redacted]514850 / [4.2.3.2-1]	i.v.	Tisotumab	1, 10, 100	Q1W×4	2M/2F	ND	Well-tolerated up to 100 mg/kg. No effect of functional bleeding time (Surgicutt™). No significant effect on coagulation parameters. Histopathology: No treatment-related findings. Target organs: no target organs identified.

Species	Study No. / Location in CTD	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Dosing Schedule	Gender and Number per group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings
Monkey	[redacted]520010 / [4.2.3.2-2]	i.v.	Tisotumab vedotin	1, 2.5, 5	Q1W×3	1M/1F	ND	Mortality: No unscheduled deaths. Clinical Pathology: reductions in red cell mass, and leukocytes, elevations in reticulocytes and iron. Histopathology: moderate or marked decrease in bone marrow cellularity (bone marrow smear and sternum). Target organ: bone marrow.
Monkey	[redacted]521988 / [4.2.3.2-3]	i.v.	Tisotumab vedotin	1, 3, 6/5	Q3W×4	2F or 4F	ND	Mortality: one female at 6 mg/kg Clinical observations: dry flaky skin on areas of body surface within 10 days after first dose at 3 mg/kg or after 2 doses at 6/5 mg/kg. Clinical Pathology: reductions in red cell mass and leukocytes, elevations in fibrinogen and iron. Moderate myeloid hyperplasia in bone marrow. Target organs: bone marrow and skin.

Species	Study No./ Location in CTD	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Dosing Schedule	Gender and Number per group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings
Monkey	[redacted]522531, [redacted]1015-151, [redacted] Expert Opinion (specialized assessment not included in main study report) / [4.2.3.2-4]	i.v.	Tisotumab vedotin	4	Single dose	2F/2M	ND	Immunohistochemical analysis for TF expression and the presence of MMAE and tisotumab vedotin in skin samples from animals 52F, 51F, 13M, 14M, excised 6-8 days after treatment with tisotumab vedotin at 4 mg/kg. At [redacted]. In macroscopically annotated “normal” skin, the microscopic histology of the epidermis and dermis was normal. In “normal” skin, TF was found in the epidermis, confined to the membrane of suprabasal layer keratinocytes (stratum spinosum/stratum granulosum). In sequential (“normal”) skin sections MMAE was detected in the epidermis, and likewise confined to the suprabasal layer keratinocytes. MMAE showed a membranous staining on the suprabasal layer keratinocytes. In macroscopically annotated “border lesion” skin samples, microscopy of the epidermal layer showed histological features that were also described/observed by the dermato-pathologist expert ([redacted], Expert Opinion), namely basal layer vacuolization, keratinocyte dysmaturation and dyskeratosis. In addition, basal layer keratinocytes showed increased proliferation (increased number of Ki-67^{+} keratinocytes). In the skin “border lesions”, TF was expressed on the membrane of both the (affected) suprabasal layer and (affected) basal layer keratinocytes, but was most prominent in the basal layer cells. In sequential (border lesion) skin sections, MMAE was detected in both the affected suprabasal layer and

Species	Study No./ Location in CTD	ROA	Test Article	Dose Level (mg/kg)	Dosing Schedule	Gender and Number per group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings
								basal layer keratinocytes, but was most prominent in the (affected) basal layer cells. MMAE showed a membranous staining of the (affected) suprabasal layer and basal layer keratinocytes.
Monkey	[redacted] 163.66/ [4.2.3.2-9]	i.v.	Non-binding control ADC	3, 4, 5	Q1W×4	5M/5F	ND	Mortality: none Clinical observations: none Clinical Pathology: suppression of hematopoiesis (erythroid, myeloid and lymphoid lineages), increased fibrinogen, interleukin-8 (IL-8), macrophage migration inhibitory factor (MIF), monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, C-reactive protein and globulin, decreased albumin and albumin/globulin ratio. Target organs: bone marrow (decreased hematopoietic cells and decreased myeloid to erythroid ratio), spleen (decreased germinal centers), thymus (lymphocyte depletion), ovary (decreased numbers/absent secondary and tertiary follicles)

ADC: antibody-drug conjugates; ALP: alkaline phosphatase; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate transaminase; F: female; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase; i.v.: intravenous; M: male; MMAE: monomethyl auristatin E; ND: not determined; NOAEL: no observed adverse effect level; Q1W: once a week; Q3W: once every 3 weeks; ROA: route of administration; TF: tissue factor

6.　反復投与毒性試験：重要な試験

6.1　Tisotumab vedotin

Report Title: 13-week repeat dose toxicity study in cynomolgus monkeys with a 6-week recovery period
Species: Cynomolgus monkey
Initial Age: 4 to 6 years
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Duration of Dosing: 13 weeks
Duration of Postdose: 6 weeks
Method of Administration: i.v. (30-minute infusion at 10 mL/kg administered once every three weeks (Days 1, 22, 43, 64, and 85)
Vehicle/Formulation: sodium chloride 0.9% w/w
Test Article: Tisotumab vedotin, Tisotumab
Study Number: [redacted]522531
Location in CTD: [4.2.3.2-4]
GLP Compliance: Yes
Special Features: electro-ejaculation sperm sample collection
No Observed Adverse Effect Level: 1 mg/kg in females, no NOAEL determined in males

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Toxicokinetics [a)]:										
AUC_t (µg·h/mL) (Day 1)	1010 ± 182	895 ± 63.0	3340 ± 707	3540 ± 306	4640 n=2	6410 n=2	7400 ± 592	4670 ± 696	50100 ± 4260	50700 ± 4790
AUC_t (µg·h/mL) (Day 85)	835 n=1	822 n=2	3540 ± 126 n=3	2470 ± 1220 n=3	NA	NA	6580 n=2	5130 ± 660 n=4	63200 ± 7040	68500 ± 5420
C_{max} (µg/mL) (Day 1)	30.9 ± 3.42	28.4 ± 1.44	79.3 ± 17.2	82.9 ± 6.32	104 n=2	117 n=2	152 ± 17.0	114 ± 7.95	721 ± 68.2	729 ± 88.6
C_{max} (µg/mL) (Day 85)	10.8 ± 15.1 n=4	14.5 ± 13.7 n=4	62.0 ± 41.7 n=4	55.2 ± 45.0 n=5	NA	NA	149 n=2	124 ± 17.0 n=4	826 ± 97.2	829 ± 83.6
ADA (Pretrial)	0	0	0	1	NA	NA	0	0	1	0
ADA (Day 22)	5	2	5	5	1	0	5	3 n=4	0	0
ADA (Day 43)	5	4	5	5	NA	NA	3	2	0	0
ADA (Day 64)	5	4	5	5	NA	NA	3	1	0	0
ADA (Day 85)	5	5	5	5	NA	NA	3	3	0	0
ADA (Day 97)	5	4	5	5	NA	NA	2	1	0	0
ADA (Day 127)	2	2	2	2	NA	NA	1	2	1	0

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0
Body Weight (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption (visual assessment)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations										
Skin reddening over body surface	-	-	+	+	+	+	+++	+++	-	-
Dry flaky skin over body surface	-	-	+	+	+	+	+++	+++	-	-
Reddened/partially closed eyes	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Behavioural assessment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiratory rates	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haematology										
White blood cells ($\times 10^9$/L)										
Pre-trial	10.71	8.31	10.48	16.12	13.26, 13.71	18.59, 26.40	11.32	11.57	13.90	16.76
Day 10	10.12	10.57	7.60*	6.24** n=3	5.69, 6.91	4.18, 4.07	5.86**	3.53*** n=4	11.61	12.79
Day 14	10.36	9.46	8.53*	7.64	NA	NA	26.69**	24.34** n=4	10.36	14.62
Day 22	9.30	10.28	17.14	16.25	NA	NA	19.52*	16.60 n=4	12.03	12.28
Day 31	9.95	8.45*	9.74	10.57	NA	NA	11.43 n=4	6.64** n=4	10.07	15.01
Day 43	11.68	9.32	13.98	12.72	NA	NA	15.11 n=3	11.53 n=4	11.97	14.36
Day 52	9.27	9.30***	8.93	10.56***	NA	NA	5.22 n=3	4.68*** n=4	10.20	10.80***
Day 64	9.51	9.90	11.00	13.36	NA	NA	18.20** n=3	21.11*** n=4	10.77	13.80
Day 73	8.89*	7.81***	8.42*	10.90*	NA	NA	5.02*** n=3	6.26*** n=4	8.88*	8.79***
Day 85	9.69	9.06	11.11	15.54	NA	NA	19.42 n=3	16.05 n=4	11.61	12.39
Day 94	8.89	10.68	9.44	11.91	NA	NA	8.24 n=3	5.68*** n=4	8.48	9.61

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Neutrophil count ($\times 10^9$/L)										
Pre-trial	4.50	4.41	4.90	12.66	9.36, 9.62	4.67, 3.02	7.58	7.59	9.68*	13.77*
Day 10	3.88	4.62	1.78*	2.02 n=3	0.97, 1.36	0.73, 0.07	3.09*	0.69* n=4	7.21	6.95
Day 14	4.11*	3.61	1.27***	1.44	NA	NA	18.50*	14.33** n=4	5.39	9.55
Day 22	2.87	3.09	9.30	8.43*	NA	NA	13.06**	11.86*** n=4	7.15	7.53*
Day 31	3.63	2.31	4.00	4.63	NA	NA	6.15 n=4	2.34* n=4	4.57	10.30
Day 43	4.00	2.59	7.17	5.95*	NA	NA	9.98 n=3	6.39* n=4	7.71	9.51***
Day 52	3.54	3.41**	3.32	4.40*	NA	NA	0.86** n=3	0.41*** n=4	5.93	4.34*
Day 64	3.38	2.99	5.18	6.26	NA	NA	12.71** n=3	13.99*** n=4	6.74	8.27**
Day 73	3.34*	2.07**	3.11*	4.72	NA	NA	0.84*** n=3	1.88** n=4	4.28	3.32*
Day 85	3.34*	2.94	4.80	8.27**	NA	NA	13.75 n=3	9.81*** n=4	7.46	7.98**
Day 94	3.10***	4.18	2.56***	4.95	NA	NA	2.33*** n=3	1.46 n=4	3.56***	3.50
Erythrocyte count ($\times 10^{12}$/L)										
Pre-trial	6.80	6.60	6.26	6.90	5.51, 6.78	7.46, 7.83	5.50*	6.62	6.04	7.00
Day 10	6.68	6.32	5.91	6.01 n=3	4.82, 5.13	6.13, 6.54	4.99***	5.67 n=4	5.96	6.45
Day 14	6.82	6.44	6.06	6.17*	NA	NA	5.17***	5.64** n=4	6.02	6.53
Day 22	7.08	6.56	6.35	6.69	NA	NA	5.05***	5.58*** n=4	6.24	6.75
Day 31	6.84	6.17	5.83	5.96	NA	NA	5.11** n=4	5.51 n=4	5.96	6.26
Day 43	6.91	6.66	6.39	6.64	NA	NA	5.90 n=3	6.43 n=4	6.29	6.66
Day 52	6.62	6.39	6.06	6.34	NA	NA	5.29* n=3	5.86 n=4	5.93	6.52
Day 64	6.75	6.71	6.29	6.71	NA	NA	5.78 n=3	5.74** n=4	6.10	6.90
Day 73	6.49	6.51	5.67	6.35	NA	NA	4.85** n=3	5.66** n=4	5.82	6.73
Day 85	6.97**	6.78	6.29	6.56	NA	NA	5.70 n=3	6.32 n=4	6.12	6.82
Day 94	6.46*	6.42	5.59	6.19	NA	NA	5.16 n=3	5.70 n=4	5.77	6.59

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Haemoglobin (g/dL)										
Pre-trial	12.8	13.4	12.8	14.4	11.4, 13.3	13.7, 13.6	11.9	13.3	12.6	13.6
Day 10	12.4	13.2	12.0	12.8 n=3	9.7, 10.0	11.2, 11.6	10.7***	11.9 n=4	12.3	12.9
Day 14	12.7	13.4	12.3	13.3	NA	NA	10.9***	11.5*** n=4	12.3	13.0
Day 22	13.2	13.8	12.7	14.2	NA	NA	10.8***	11.5*** n=4	12.9	13.6
Day 31	12.5	12.8	11.6	12.8	NA	NA	10.4*** n=4	11.4 n=4	12.1	12.4
Day 43	12.7	13.5	12.7	14.1	NA	NA	11.9 n=3	13.0 n=4	12.7	13.1
Day 52	12.2	13.1	12.1	13.4	NA	NA	10.6** n=3	11.8 n=4	12.0	12.7
Day 64	12.5	13.8	12.7	14.2	NA	NA	11.6 n=3	11.5*** n=4	12.4	13.5
Day 73	12.0	13.2	11.4	13.4	NA	NA	9.7*** n=3	11.3*** n=4	11.6	13.2
Day 85	13.0	13.8	12.8	13.9	NA	NA	11.7 n=3	12.6 n=4	12.6	13.3
Day 94	12.0	13.2	11.3	13.1	NA	NA	10.4** n=3	11.3*** n=4	11.8	12.8
Haematocrit (L/L)										
Pre-trial	0.455	0.452	0.437	0.474	0.382, 0.437	0.448, 0.473	0.388**	0.461	0.427	0.461
Day 10	0.451	0.435	0.424	0.416 n=3	0.323, 0.329	0.364, 0.379	0.359**	0.399 n=4	0.430	0.430
Day 14	0.466	0.447	0.435	0.433	NA	NA	0.371***	0.399** n=4	0.432	0.438
Day 22	0.483	0.462	0.447	0.480	NA	NA	0.367***	0.399*** n=4	0.456	0.460
Day 31	0.453	0.434	0.400	0.425	NA	NA	0.357** n=4	0.398 n=4	0.419	0.422
Day 43	0.458	0.469	0.443	0.475	NA	NA	0.404 n=3	0.461 n=4	0.444	0.447
Day 52	0.431	0.432	0.413	0.438	NA	NA	0.353*** n=3	0.403 n=4	0.414	0.421
Day 64	0.445	0.472	0.437	0.486	NA	NA	0.396 n=3	0.403** n=4	0.430	0.465
Day 73	0.426	0.441	0.392	0.439	NA	NA	0.325*** n=3	0.380*** n=4	0.404	0.432
Day 85	0.462*	0.460	0.440	0.457	NA	NA	0.390 n=3	0.431 n=4	0.432	0.439
Day 94	0.413	0.432	0.375	0.422	NA	NA	0.341* n=3	0.381*** n=4	0.396	0.418

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Reticulocyte count ($\times 10^9$/L)										
Pre-trial	49	44	57	31	19, 51	60, 48	52	36	55	27
Day 10	48	21*	50	15** n=3	17, 103	29, 13	13**	17* n=4	73	34
Day 14	62	25	97**	73***	NA	NA	47	24 n=4	50	27
Day 22	50	31	39	51	NA	NA	91	106** n=4	55	25
Day 31	78	25	100	21	NA	NA	165 n=4	66** n=4	88	28
Day 43	81	35	61	51	NA	NA	65 n=3	54 n=4	60	30
Day 52	81	36	61	32	NA	NA	119 n=3	8*** n=4	97	34
Day 64	64	30	59	46	NA	NA	71 n=3	67* n=4	81	25
Day 73	119	37	138	32	NA	NA	168* n=3	56 n=4	78	34
Day 85	58	35	47	47	NA	NA	78 n=3	58 n=4	54	26
Day 94	77	38	113	33	NA	NA	135 n=3	13** n=4	82	36
Platelet count ($\times 10^9$/L)										
Pre-trial	359	378	329	397	321, 358	391, 286	325	318	372	374
Day 10	383	364	401	420 n=3	554, 612	617, 467	519	398 n=4	480	365
Day 14	360	357	436	542**	NA	NA	744	615*** n=4	415	357
Day 22	317	324	309	370	NA	NA	440	355 n=4	347	315
Day 31	404	339	411	476	NA	NA	533 n=4	413 n=4	391	395
Day 43	364	349	308**	328	NA	NA	289** n=3	309 n=4	404	367
Day 52	402	434	401	507	NA	NA	559 n=3	433 n=4	419	389
Day 64	370	325	279***	327	NA	NA	288** n=3	316 n=4	405	324
Day 73	435	357	492	439	NA	NA	576 n=3	430 n=4	416	369
Day 85	383	359	312**	401	NA	NA	313** n=3	338 n=4	406	338
Day 94	389	378	515	473	NA	NA	429 n=3	343 n=4	429	381

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Lymphocyte count ($\times 10^9$/L)										
Pre-trial	5.17	3.36*	4.63	2.97*	3.39, 3.74	6.87, 7.66	3.13***	3.47*	3.31***	2.48**
Day 10	5.15	5.08**	4.62	3.54*** n=3	3.39, 3.81	2.49, 3.79	1.97***	1.90*** n=4	3.43**	4.81**
Day 14	5.17	5.05	5.66	5.15	NA	NA	6.44*	8.06 n=4	3.98	4.17*
Day 22	5.22	6.14	6.73	6.75	NA	NA	5.50	4.02*** n=4	3.87***	3.85***
Day 31	5.08	5.21*	4.69	5.04*	NA	NA	4.28 n=4	3.60*** n=4	4.24	3.77***
Day 43	5.93	5.75*	5.53	5.58**	NA	NA	4.20 n=3	4.30*** n=4	3.34**	3.73***
Day 52	4.76	5.05	4.55	5.09	NA	NA	3.45 n=3	3.71** n=4	3.35	5.34
Day 64	5.02	5.83	4.70	5.80	NA	NA	4.53 n=3	6.29 n=4	3.25*	4.48
Day 73	4.50	4.89	4.19	5.23	NA	NA	3.51 n=3	3.67** n=4	3.67	4.64
Day 85	5.20	5.28	5.28	6.25	NA	NA	4.68 n=3	5.26 n=4	3.26**	3.52***
Day 94	4.72	5.50	5.62	5.77	NA	NA	4.36 n=3	3.61*** n=4	3.97	5.20*
Monocyte count ($\times 10^9$/L)										
Pre-trial	0.46	0.23	0.43	0.30	0.38, 0.26	0.98, 0.57	0.27	0.27	0.35	0.32
Day 10	0.53	0.39	0.54	0.26 n=3	0.64, 1.13	0.67, 0.13	0.28	0.40 n=4	0.44	0.55
Day 14	0.55	0.38	0.93	0.66	NA	NA	0.58	0.52 n=4	0.41	0.44
Day 22	0.40	0.44	0.53	0.62	NA	NA	0.61	0.46 n=4	0.42	0.49
Day 31	0.56	0.40	0.52	0.47	NA	NA	0.62 n=4	0.32 n=4	0.68	0.55
Day 43	0.72	0.52	0.66	0.58	NA	NA	0.57 n=3	0.57 n=4	0.49	0.76
Day 52	0.45	0.49	0.53	0.51	NA	NA	0.44 n=3	0.33** n=4	0.55	0.58
Day 64	0.53	0.48	0.47	0.57	NA	NA	0.67 n=3	0.52 n=4	0.37	0.55
Day 73	0.47	0.47	0.57	0.56	NA	NA	0.42 n=3	0.46 n=4	0.50	0.45
Day 85	0.45**	0.44	0.45**	0.52	NA	NA	0.67 n=3	0.66 n=4	0.43**	0.59
Day 94	0.53	0.55	0.62	0.48*	NA	NA	0.79 n=3	0.34*** n=4	0.53	0.50*
Eosinophil count ($\times 10^9$/L)										
Pre-trial	0.36	0.14	0.30	0.07**	0.18, 0.28	0.44, 0.57	0.21	0.13	0.39	0.06**
Day 10	0.41	0.25	0.43	0.26 n=3	0.41, 0.49	0.18, 0.04	0.17	0.08** n=4	0.38	0.27
Day 14	0.35	0.21	0.30	0.16	NA	NA	0.12	0.08 n=4	0.38	0.28
Day 22	0.64	0.37	0.31	0.17**	NA	NA	0.06***	0.05*** n=4	0.40	0.25
Day 31	0.55	0.35	0.37	0.27	NA	NA	0.22 n=4	0.18 n=4	0.43	0.23
Day 43	0.87**	0.32*	0.43	0.46	NA	NA	0.19 n=3	0.15** n=4	0.31	0.25*

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Eosinophil count ($\times 10^9$/L)										
Day 52	0.42	0.24	0.38	0.45	NA	NA	0.37 n=3	0.15 n=4	0.28	0.45
Day 64	0.42	0.35	0.45	0.47	NA	NA	0.07 n=3	0.04*** n=4	0.27	0.30
Day 73	0.48	0.27	0.44	0.27	NA	NA	0.15 n=3	0.16 n=4	0.36	0.26
Day 85	0.51	0.28	0.33	0.33	NA	NA	0.07 n=3	0.18 n=4	0.29	0.22
Day 94	0.45	0.34	0.50	0.60	NA	NA	0.64 n=3	0.20 n=4	0.35	0.34
Coagulation										
PT (s)										
Pre-trial	13.0	13.1	12.8	13.3	13.9, 13.4	13.0, 13.1	12.7	13.0	13.2	13.7
Day 14	12.5	13.1	12.4	13.0	NA	NA	12.9	12.2 n=4	14.5***	14.5**
Day 22	12.5	13.0	12.2	12.5	NA	NA	11.6	12.3 n=4	14.2***	14.5***
Day 35	12.5	13.6	12.4	13.5	NA	NA	11.8 n=4	13.1 n=4	14.3***	15.0**
Day 43	12.8	12.9	12.2	12.7	NA	NA	11.9 n=3	12.9 n=4	13.7*	14.5***
Day 56	12.4	13.4	12.6	13.3	NA	NA	11.8 n=3	12.5 n=4	14.0**	14.9*
Day 64	12.7	13.4	12.2	13.2	NA	NA	11.5 n=3	12.7 n=4	14.2***	14.8**
Day 77	13.0	12.7	12.9	12.7	NA	NA	12.4 n=3	12.7 n=4	14.4***	14.4***
Day 85	12.6	12.9	12.5	12.8	NA	NA	12.1 n=3	12.4 n=4	13.7***	14.2**
Day 90	12.7	13.0	13.0	12.9	NA	NA	13.3 n=3	14.3** n=4	14.1**	14.5***
Serum Chemistry										
Albumin (g/L)										
Pre-trial	44	49	45	51	47, 48	45, 48	46	48	47	49
Day 14	44	48	43*	49	NA	NA	37***	38*** n=4	47	48
Day 22	44	45	44	47	NA	NA	39***	39*** n=4	47	47
Day 35	42	47	43	47	NA	NA	39* n=4	43* n=4	44	47
Day 43	44	45	44	46	NA	NA	42 n=3	43 n=4	46	46
Day 56	43	46	43	45	NA	NA	42 n=3	40** n=4	46	46
Day 64	43	45	45	46	NA	NA	43 n=3	41* n=4	47	47
Day 77	43	47	44	47	NA	NA	43 n=3	45 n=4	45	48
Day 85	44	46	43	46	NA	NA	43 n=3	44 n=4	47**	48
Day 90	43	47	42	46	NA	NA	42 n=3	43* n=4	46*	47

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Globulin(g/L)										
Pre-trial	36	37	34	37	34, 31	34, 35	35	37	34	37
Day 14	35	34	36	36	NA	NA	42**	47** n=4	36	35
Day 22	36	35	36	38	NA	NA	43*	43 n=4	35	36
Day 35	37	33	36	36	NA	NA	47** n=4	44* n=4	37	36
Day 43	35	34	35	36	NA	NA	40 n=3	42 n=4	36	36
Day 56	37	32*	35	33	NA	NA	40 n=3	46*** n=4	36	34
Day 64	36	33*	35	36	NA	NA	39 n=3	42 n=4	35	35
Day 77	36	33*	36	35	NA	NA	38 n=3	41 n=4	35	34
Day 85	37	34	37	37	NA	NA	38 n=3	42 n=4	36	35
Day 90	37	32**	36	35	NA	NA	39 n=3	37 n=4	35	33*
Albumin:Globulin ratio										
Pre-trial	1.2	1.3	1.3	1.4	1.4, 1.5	1.3, 1.4	1.3	1.3	1.4	1.3
Day 14	1.3	1.4	1.2	1.4	NA	NA	0.9***	0.8*** n=4	1.3	1.4
Day 22	1.2	1.3	1.2	1.3	NA	NA	0.9***	0.9** n=4	1.3	1.3
Day 35	1.2	1.4	1.2	1.3	NA	NA	0.9** n=4	1.0* n=4	1.2	1.3
Day 43	1.2	1.3	1.2	1.3	NA	NA	1.1 n=3	1.0 n=4	1.3	1.3
Day 56	1.2	1.4*	1.2	1.4	NA	NA	1.1 n=3	0.9*** n=4	1.3	1.4
Day 64	1.2	1.4**	1.3	1.3	NA	NA	1.1 n=3	1.0* n=4	1.4	1.3
Day 77	1.2	1.4*	1.3	1.4	NA	NA	1.2 n=3	1.1 n=4	1.3	1.4
Day 85	1.2	1.4**	1.2	1.3	NA	NA	1.1 n=3	1.1 n=4	1.3	1.4**
Day 90	1.2	1.5*	1.1	1.3	NA	NA	1.1 n=3	1.2 n=4	1.3	1.4*
Haptoglobin (mg/dL)										
Pre-trial	81.70	86.96	84.56	71.36	54.70, 82.00	52.00, 75.20	82.58	76.62	79.94	80.88
Day 14	71.52	75.50	107.02	95.28	NA	NA	178.86***	201.15*** n=4	66.64	64.56
Day 22	61.92	76.48	80.44	80.04	NA	NA	122.36*	114.45 n=4	65.22	82.96
Day 35	70.64	61.06	78.54	60.54	NA	NA	125.25 n=4	100.83 n=4	77.02	73.82
Day 43	68.96	67.14	80.06	62.06	NA	NA	85.23 n=3	77.68 n=4	68.90	81.50
Day 56	77.22	58.00	77.30	61.92	NA	NA	124.60* n=3	191.40*** n=4	58.18	64.30
Day 64	69.28	63.74	65.38	60.30	NA	NA	88.37 n=3	109.38** n=4	68.42	64.00
Day 77	57.18	74.90	65.36	71.84	NA	NA	116.10 n=3	126.58* n=4	65.90	68.98
Day 85	57.00	70.10	64.56	68.88	NA	NA	84.30 n=3	98.93 n=4	73.50	75.28
Day 90	56.10	79.42	79.00	83.74	NA	NA	90.73 n=3	94.33 n=4	68.84	73.98

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Faecal occult blood	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights – Main study (Day 97)										
Epididymides										
Absolute (g)	NA	5.5057	NA	4.1987	NA	NA	NA	3.7365 n=2	NA	4.2560
% body weight	NA	0.07890	NA	0.06829	NA	NA	NA	0.06289 n=2	NA	0.07705
Testes										
Absolute (g)	NA	36.33	NA	21.33	NA	NA	NA	12.23 n=2	NA	25.91
% body weight	NA	0.517	NA	0.352	NA	NA	NA	0.207 n=2	NA	0.470
Necropsy – Main study (Day 97)										
Number evaluated	3	3	3	3	NA	NA	2	2	3	3
Testes										
Abnormal consistency	NA	0	NA	1	NA	NA	NA	2	NA	0
Histopathology – Main study (Day 97)										
Number evaluated	3	3	3	3	NA	NA	2	2	3	3
Bone marrow										
Decreased granulopoiesis										
Minimal	0	0	0	1	NA	NA	0	0	0	0
Mild	0	0	2	2	NA	NA	1	0	0	0
Marked	0	0	0	0	NA	NA	1	2	0	0
Epididymis										
Absence of sperm	NA	0	NA	2	NA	NA	NA	2	NA	0
Decreased sperm content										
Marked	NA	1	NA	0	NA	NA	NA	0	NA	0
Tubular epithelial vacuolation										
Mild	NA	0	NA	1	NA	NA	NA	1	NA	0

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Sternum										
Decreased cellularity, bone marrow										
Minimal	0	0	1	0	NA	NA	0	0	0	0
Mild	0	0	0	1	NA	NA	1	2	0	0
Testes										
Tubular atrophy, seminiferous, diffuse										
Moderate	NA	1	NA	1	NA	NA	NA	0	NA	0
Marked	NA	0	NA	1	NA	NA	NA	0	NA	0
Severe	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	2	NA	0
Additional Examinations										
Menstrual cycle duration	-	NA	-	NA	NA	NA	-	NA	-	NA
Immunophenotyping										
Total WBC (CD45+) (cells/µL)										
Pre-trial	11114	9923	11165	13041	11103	14569	12556	10954	14343	14614
Day 14	10241	9828	8689	7960	NA	NA	24038	25315 n=4	10295	14374
Day 22	9762	11250	17566	16465	NA	NA	20211	16969 n=4	12329	13319
Day 25	12109	10951	11630	11969	NA	NA	12836 n=4	11948 n=4	11200	13337
Monocytes (CD3-CD14+) (cells/µL)										
Pre-trial	438	276	431	324	222	481	330	289	435	331
Day 1	NA	NA	NA	NA	168	553	NA	NA	NA	NA
Day 4	464	370	466	291	431	755	483	603	584	724
Day 14	483	372	860	555	NA	NA	1613	408 n=4	327	413
Day 22	371	401	540	395	NA	NA	788	544 n=4	429	490
Day 25	489	540	449	506	NA	NA	915 n=4	894 n=4	377	660
Day 85	396	362	430	463	NA	NA	542 n=4	658 n=4	440	516
Day 88	511	382	706	651	NA	NA	558 n=3	793 n=4	468	696
Day 90	513	544	570	539	NA	NA	529 n=3	647 n=4	554	438

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)	F(2)	M(2)	F(5)	M(5)	F(5)	M(5)
Total T cells (CD3+) (cells/µL)										
Pre-trial	2470	1941	2373	1893	1565	1924	2074	1881	2000	1440
Day 4	2050	2363	1318	1931	1742	2200	882	1541	1552	1826
Day 6	2498	3240	2000	2304	NA	NA	1132	1598	2308	2012
Day 12	NA	NA	NA	NA	2278	4550	NA	NA	NA	NA
Day 14	2095	2875	2788	2892	NA	NA	3837	6180 n=4	2064	2068
Day 22	2627	3734	3678	4151	NA	NA	3046	2643 n=4	1978	1928
NK cells (CD3-CD8+CD16+) (cells/µL)										
Pre-trial	882	448	773	461	470	362	764	434	471	349
Day 4	484	478	277	385	490	260	241	268	372	348
Day 25	552	460	471	444	NA	NA	501 n=4	230 n=4	351	303
Day 27	763	561	853	523	NA	NA	582	314 n=4	506	394
Day 88	537	330	407	402	NA	NA	249 n=3	248 n=4	282	290
Total B cells (CD3-CD20+) (cells/µL)										
Pre-trial	833	713	727	913	422	764	441	688	557	829
Day 4	792	796	580	757	517	1114	239	622	561	1069
Day 6	907	925	654	838	NA	NA	243	463	641	915
Day 12	NA	NA	NA	NA	460	983	NA	NA	NA	NA
Day 22	701	873	835	1036	NA	NA	476	406 n=4	484	916
Day 25	834	918	645	1047	NA	NA	351 n=4	321 n=4	507	1016
Day 27	922	891	660	866	NA	NA	389	323 n=4	550	1082
Day 35	952	828	667	899	NA	NA	477 n=4	435 n=4	673	1019
Day 88	803	854	637	1186	NA	NA	286 n=3	492 n=4	572	1523
Day 90	966	1076	654	1095	NA	NA	360 n=3	394 n=4	642	1211
Sperm analysis – Week 11/12										
Sperm morphology	NA	-	NA	-	NA	NA	NA	-	NA	-
Sperm count										
Reduced or absent	NA	2	NA	3	NA	NA	NA	4	NA	0
Sperm motility										
Reduced or absent	NA	1	NA	2	NA	NA	NA	3	NA	0

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(2)	M(2)	F(2)	M(2)	F(0)	M(0)	F(2)	M(2)	F(2)	M(2)
Postdose Evaluations:										
Organ weights – Day 128										
Epididymides										
Absolute (g)	NA	5.1575	NA	4.6085	NA	NA	NA	3.6475	NA	5.799
% body weight	NA	0.07591	NA	0.07207	NA	NA	NA	0.06257	NA	0.09684
Testes										
Absolute (g)	NA	34.92	NA	26.95	NA	NA	NA	16.47	NA	33.32
% body weight	NA	0.512	NA	0.429	NA	NA	NA	0.283	NA	0.558
Histopathology – Day 128										
Number examined	NA	2	NA	2	NA	NA	NA	2	NA	2
Epididymides										
Absence of sperm	NA	0	NA	1	NA	NA	NA	2	NA	0
Spermatogenic cells, luminal										
Minimal	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	1	NA	0
Mild	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	1	NA	0
Moderate	NA	0	NA	1	NA	NA	NA	0	NA	0
Eosinophilic material, luminal										
Minimal	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	1	NA	0
Mild	NA	0	NA	1	NA	NA	NA	1	NA	0
Testes										
Seminiferous tubular atrophy, diffuse										
Mild	NA	0	NA	1	NA	NA	NA	2	NA	0
Regeneration tubular, seminiferous										
Marked	NA	0	NA	1	NA	NA	NA	2	NA	0

	Tisotumab vedotin								Tisotumab	
Dose Level (mg/kg)	1		3		4		5		25	
Gender (number of animals)	F(2)	M(2)	F(2)	M(2)	F(0)	M(0)	F(2)	M(2)	F(2)	M(2)
Sperm analysis – Week 5										
Sperm morphology	NA	-	NA	-	NA	NA	NA	-	NA	-
Sperm count										
Reduced or absent	NA	0	NA	1	NA	NA	NA	2	NA	0
Sperm motility										
Reduced or absent	NA	0	NA	1	NA	NA	NA	2	NA	0

Statistically significant compared with control: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

ADA: anti-drug antibodies; AUC: area under the concentration-time curve; AUC_t: area under the concentration-time curve from time zero to time t; CD: cluster of differentiation; C_{max}: maximum concentration in serum or blood; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; GLP: Good Laboratory Practice; IgG: immunoglobulin G; i.v.: intravenous; M: male; NA: not applicable; NK: natural killer; NOAEL: No observed adverse effect level; PT: prothrombin time; WBC: white blood cell counts

-: No noteworthy findings; +: Mild; ++: Moderate; +++: Marked

a) Data derived for tisotumab vedotin parameters using IgG ELISA assay. Values presented for 5th dose included all tisotumab vedotin ADA positive animals. Only one male (Animal 25M) at 5 mg/kg tisotumab vedotin was ADA negative up to Day 85 (C_{max} = 131 µg/mL; AUC_t = 5330 µg·h/mL).

6.2　MMAE

6.2.1　MMAE のラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Report Title: A 4-Week Intravenous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study of SGN-35, SGD-1010, and SGN-30 in Rats with a 4-Week Recovery Period
Test Article: MMAE
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley
Duration of Dosing: 4 weeks (Q1W×4)
Study No.: [redacted]7646-118
Initial Age: 7-8 weeks
Duration of Postdose: 4 weeks
Location in CTD: [4.2.3.2-6]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Method of Administration: i.v. (once weekly)
GLP Compliance: Yes
Control: 0.01N HCl and NaCl
No Observed Adverse Effect Levels: 0.097 mg/kg MMAE

	Control		MMAE		MMAE		MMAE	
Dose Level (mg/kg)	0		0.0097		0.097		0.194	
Gender: Number of Animals	M: 15	F: 15	M: 10	F: 10	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Toxicokinetics:								
$AUC_{0\text{-}24}$ (pg·h/mL) [a)]								
Day 1	0	0	2610	2567	25698	28591	49414	91009
Day 22	0	0	3984	3067	52445	28600	70993	49184
Noteworthy findings [b)]:								
Body weight (%) [c),d)]	413 g	250 g	0.7	-2.0	-3.1	-1.6	-10.2*	-3.2
Body weight gain: (g)								
Days 1-8	45	24	47	26	39*	22	18*	20
Days 15-22	27	18	31	16	29	14	19*	13
Days 1-22	108	59	114	58	100	57	69*	50
Food consumption (%) [c),e)]	211 g	159 g	1.4	-1.9	-1.0	-1.9	-7.6	-3.1
Hematology and coagulation:								
Erythrocyte count ($\times 10^6/\mu L$)	8.32	8.23	8.39	8.07	7.47*	7.23*	4.73*	5.51*
Hemoglobin (g/dL)	16.0	16.3	16.3	16.3	14.9*	14.9*	10.2*	11.9*
Hematocrit (%)	47.9	46.8	49.2	46.4	44.3*	42.8*	29.9*	34.2*
MCV (fL)	57.6	57.0	58.7	57.5	59.4*	59.2*	63.4*	62.2*
MCH (pg)	19.3	19.8	19.5	20.2	19.9*	20.7*	21.6*	21.6*
MCHC (g/dL)	33.5	34.8	33.1	35.1	33.6	34.9	34.2*	34.7
Reticulocyte count ($\times 10^3/\mu L$)	176.7	160.7	192.1	166.1	91.0*	102.0*	15.2*	9.4*
Platelet count ($\times 10^3/\mu L$)	1141	1134	1118	1189	1180	1167	1035	1321*

	Control		MMAE		MMAE		MMAE	
Dose Level (mg/kg)	0		0.0097		0.097		0.194	
Gender: Number of Animals	M: 15	F: 15	M: 10	F: 10	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
White blood cell count ($\times 10^3/\mu L$)	8.28	7.16	8.26	5.10*	8.10	6.79	5.16*	5.06*
Neutrophil count ($\times 10^3/\mu L$)	1.27	1.06	1.25	0.77	1.31	1.15	0.82*	0.28*
Lymphocyte count ($\times 10^3/\mu L$)	6.59	5.74	6.61	4.12*	6.44	5.34	4.13*	4.62
Monocyte count ($\times 10^3/\mu L$)	0.21	0.14	0.19	0.07*	0.18	0.11	0.12*	0.07*
Eosinophil count ($\times 10^3/\mu L$)	0.11	0.15	0.10	0.08	0.06*	0.13	0.03*	0.02*
APTT (seconds)	19.4	19.9	18.9	19.6	18.7	19.7	15.7*	17.8*
Serum Chemistry:								
Glucose (mg/dL)	101	106	102	102	97	103	108*	119*
Urea nitrogen (mg/dL)	14	15	16*	16	15	15	17*	17
Creatinine (mg/dL)	0.6	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6*	0.7
Total protein (g/dL)	6.3	6.6	6.4	6.8	6.1	6.5	5.8*	6.0*
Albumin (g/dL)	4.2	4.6	4.2	4.6	3.9*	4.3*	3.7*	4.0*
Albumin/globulin ratio	2.0	2.2	1.9	2.2	1.8*	2.0*	1.8	2.0*
Cholesterol (mg/dL)	54	51	56	57	70*	60	86*	66*
Total bilirubin (mg/dL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2*	0.1
AST (U/L)	124	139	124	137	138	127	228*	145
Alkaline phosphatase (U/L)	151	115	158	112	149	120	110*	97*
GGT (U/L)	1	2	1	2	1	2	10*	4*
Phosphorus (mg/dL)	8.7	7.3	8.5	6.8	8.9	8.2*	8.3	8.5*
Potassium (mmol/L)	5.8	5.4	5.8	5.2	5.9	5.5	5.8	5.9*
Chloride (mmol/L)	101	103	102	104	102	104	104*	106*
Organ Weights [e),f)] (%):								
Number evaluated:	10	10	10	10	10	9	10	10
Thymus	0.4622 g	0.4582 g	-1.3	-3.1	-28.7*	-23.6	-68.1*	-41.3
Testis	3.3882 g	NA	0.2	NA	-2.1	NA	-16.0*	NA

	Control		MMAE		MMAE		MMAE	
Dose Level (mg/kg)	0		0.0097		0.097		0.194	
Gender: Number of Animals	M: 15	F: 15	M: 10	F: 10	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Histopathology:								
Number evaluated:	10	10	10	10	10	9	10	10
Thymus: depletion, lymphocytes								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	3
Slight	0	0	0	0	0	0	4	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	4	2
Thymus: necrosis, lymphocytes								
Minimal	–	0	–	0	–	0	–	2
Marrow, sternum: hypocellular								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	4
Slight	0	0	0	0	0	0	1	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	5	1
Moderately severe	0	–	0	–	0	–	2	–
Marrow, femur: hypocellular								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	2
Slight	0	0	0	0	0	0	2	1
Moderately severe	0	–	0	–	0	–	5	–
Testis: tubules with decreased spermatocytes								
Minimal	0	NA	0	NA	0	NA	6	NA
Liver: necrosis, coagulative								
Minimal	1	–	0	–	0	–	3	–

	Control		MMAE		MMAE		MMAE	
Dose Level (mg/kg)	0		0.0097		0.097		0.194	
Gender: Number of Animals	M: 15	F: 15	M: 10	F: 10	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery evaluations [g)]								
Number evaluated:	5	5	0	0	5	5	5	5
Body weight gain (g): recovery D4-D11	28	8	NA	NA	30	15	50*	18
Clinical Pathology:								
Erythrocyte count ($\times 10^6/\mu L$)	8.85	8.83	NA	NA	8.50	8.05*	7.77*	7.89*
MCV(fL)	54.9	54.7	NA	NA	58.3*	58.8*	65.7*	61.1*
MCH (pg)	18.5	18.3	NA	NA	19.6*	19.9*	22.1*	20.6*
APTT (seconds)	19.3	17.8	NA	NA	18.0*	17.8	16.8*	17.7
Cholesterol (mg/dL)	56	69	NA	NA	76*	75	83*	79
Organ Weight [e),f)]:								
Epididymis	1.4612 g	NA	NA	NA	2.4	NA	-17.3*	NA
Testis	3.5366 g	NA	NA	NA	-8.4	NA	-47.4*	NA
Histopathology:								
Number evaluated:	5	NA	NA	NA	5	NA	5	NA
Testis, degeneration, seminiferous tubule								
Slight	0	NA	NA	NA	0	NA	3	NA
Moderate	0	NA	NA	NA	0	NA	1	NA
Testis, vacuolation, Sertoli cells								
Minimal	0	NA	NA	NA	0	NA	3	NA
Epididymis, aspermia								
Minimal	0	NA	NA	NA	0	NA	3	NA

* Statistically different from control article at $P \leq 0.05$ (t-test).

Microscopic scoring, increasing in severity: minimal, slight, moderate, moderately severe, and severe.

-: no noteworthy findings; APTT: activated partial thromboplastin time; AST: aspartate transaminase; AUC0-24: area under the concentration-time curve from time zero to 24 h; D: day; F: female; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase; GLP: Good Laboratory Practice; HCl: hydrochloric acid; i.v.: intravenous; M: male; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV: mean corpuscular volume; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; NaCl: sodium chloride; Q1W: once a week

a) Samples for toxicokinetic evaluation were collected from separate animals (generally 2M and 2F per time point).

b) At end of dosing period, except as noted.

c) For control group, group mean is presented. For treated groups, percent differences from control are presented. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

d) At start of 4th week of study.

e) Week 3 of study.

f) Generally, both absolute and relative organ weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights.

g) At end of recovery period.

6.2.2　MMAE のカニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与毒性試験及び 5 週間回復性試験

Report Title: An 11-Week Repeat-Dose Intravenous Infusion Toxicity Study of SGN-35 and SGD-1010 in Cynomolgus Monkeys with a Five-Week Recovery Period
Test Article: MMAE
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus
Duration of Dosing: 11 weeks (Q3W×4)
Study No.: [redacted].163.16
Initial Age: 4-7 years
Duration of Recovery: 5 weeks
Location in CTD: [4.2.3.2-8]
Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]
Method of Administration: i.v.
GLP Compliance: Yes

Dose Level (mg/kg) ‡	Control		MMAE (with Cefazolin)	
	0		0.058	
Sex: Number of Animals a)	M: 6	F: 6	M: 5	F: 5
Toxicokinetics:				
AUC	ND	ND	ND	ND
C_{max} (pg/mL)				
Day 1, 20 minutes postdose	0	0	2020.0	1724.0
Day 64, 20 minutes postdose	0	0	3240.0	5610.0
ADA Incidence on Day 64	0	0	0	0
Noteworthy Findings b):				
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Food consumption (biscuits) c)	10.0	10.0	10.0	10.0
Clinical Observations:				
Hunched posture	0	0	0	0
Anorexic condition	0	–	0	–
Febrile	0	–	0	–
Unresponsive	0	–	0	–
Petechial hemorrhage	0	–	0	–
Hematology d)				
White blood cell count ($\times 10^3/\mu L$)				
Day 8	14.08	11.60	7.03*	4.29*
Day 29	16.00	12.34	5.63	5.05*
Day 36	18.15	13.58	10.60	8.80

Dose Level (mg/kg) ‡	Control		MMAE (with Cefazolin)	
	0		0.058	
Erythrocyte count (×10^6/μL)				
Day 8	5.59	5.26	5.22	4.58*
Day 15	–	5.14	–	4.84
Day 20	–	5.14	–	5.06
Day 22	–	5.12	–	4.83
Day 29	–	4.83	–	4.30*
Day 36	–	5.22	–	5.24
Day 43	–	5.04	–	5.02
Day 50	–	4.95	–	4.54
Day 57	–	5.15	–	5.02
Day 64	–	5.15	–	4.87
Day 70	–	4.84	–	4.39
Hemoglobin (g/dL)				
Day 8	13.40	12.30	12.18*	10.82*
Day 20	–	11.97	–	11.76
Day 22	–	11.90	–	11.24
Day 29	–	11.27	–	10.14
Day 36	–	11.67	–	11.36
Day 43	–	12.17	–	11.98
Day 50	–	11.58	–	10.56
Day 57	–	12.38	–	11.98
Day 64	–	12.40	–	11.68
Day 70	–	11.67	–	10.46
Hematocrit (%)				
Day 8	41.6	38.8	37.8*	34.3*
Day 20	–	38.3	–	38.8
Day 22	–	37.8	–	36.5
Day 29	–	36.3	–	33.0
Day 36	–	39.6	–	40.7
Day 43	–	38.7	–	39.4
Day 50	–	38.4	–	35.9
Day 70	–	36.8	–	33.5

Dose Level (mg/kg) ‡	Control		MMAE (with Cefazolin)	
	0		0.058	
MCV (fL)				
Day 57	–	77.2	–	79.4
Day 64	–	77.5	–	78.6
Day 70	–	76.1	–	76.3
MCH (pg)				
Day 50	–	23.5	–	23.2
Day 57	–	24.1	–	23.9
Day 64	–	24.1	–	24.0
Day 70	–	24.2	–	23.9
MCHC (g/dL)				
Day 15	–	31.3	–	30.8
Day 43	–	31.5	–	30.4*
Day 57	–	31.3	–	30.1
Day 64	–	31.1	–	30.5
Platelet count ($\times 10^3/\mu L$)				
Day 1	374	–	499*	–
Day 8	356	–	649*	–
Day 15	–	438	–	546
Day 20	–	473	–	352
Day 29	–	476	–	640
Day 43	–	432	–	312
Day 57	–	413	–	484
Day 64	–	404	–	334
Day 70	–	415	–	433
Neutrophil count ($\times 10^3/\mu L$)				
Day 8	4.16	4.77	0.21*	0.19*
Day 15	–	5.45	–	9.51
Day 29	–	5.81	–	0.86*
Day 36	–	5.00	–	1.97
Day 64	–	3.05	–	8.83*

Dose Level (mg/kg) ‡	Control		MMAE (with Cefazolin)	
	0		0.058	
Monocyte count (×10^3/μL)				
Day 29	–	0.37	–	0.34
Day 50	–	0.36	–	0.28
Eosinophil count (×10^3/μL)				
Day 1	0.34	–	0.05	–
Day 8	0.44	–	0.01*	–
Day 15	–	0.36	–	0.04
Day 20	–	0.60	–	0.09
Day 22	–	0.44	–	0.06
Day 29	–	0.49	–	0.07
Day 36	–	0.60	–	0.05*
Day 43	–	0.38	–	0.04
Day 57	–	0.56	–	0.06
Day 64	–	0.41	–	0.07
Day 70	–	0.32	–	0.05
Basophil count (×10^3/μL)				
Day 8	0.08	–	0.03*	–
Reticulocyte count (×10^3/μL)				
Day 8	0.070	0.055	0.008*	0.015
Day 29	–	0.104	–	0.086
Day 36	–	0.073	–	0.149*
Day 43	–	0.061	–	0.062
Day 50	–	0.084	–	0.026*
Day 57	–	0.064	–	0.130*
Day 64	–	0.044	–	0.060
Day 70	–	0.055	–	0.008*

Dose Level (mg/kg) ‡	Control		MMAE (with Cefazolin)	
	0		0.058	
Red cell distribution width (%)				
Day 22	–	13	–	14
Day 29	–	13	–	15*
Day 36	–	13	–	14
Day 43	–	13	–	14
Day 50	–	13	–	13
Day 57	–	12	–	14
Day 64	–	12	–	14
Day 70	–	12	–	13
Coagulation:				
APTT (seconds)				
Day 8	28.7	28.0	27.4	28.8
Fibrinogen (mg/dL)				
Day 70	–	234	–	239
PT(seconds)				
Day 8	11.7	11.2	11.8	12.3*
Serum Chemistry:				
AST (U/L)				
Day 8	–	27	–	29
Day 70	–	31	–	31
Calcium (mg/dL)				
Day 22	–	9.3	–	8.7*
Day 70	–	9.6	–	9.6
Total cholesterol (mg/dL)				
Day 8	–	134	–	139
Glucose (mg/dL)				
Day 8	–	65	–	73
Inorganic phosphorus (mg/dL)				
Day 70	–	5	–	4

Dose Level (mg/kg) ‡	Control		MMAE (with Cefazolin)	
	0		0.058	
Immunophenotyping [c]:				
T cell subset, CD3+ (Relative %)	64.25	61.19	82.09	72.16
T cell subset, CD3+ CD4+ (Relative %)	33.05	34.61	50.52	43.69
B cell subset, CD3-/CD20+ (Relative %)	27.75	32.90	12.39	15.65
Monocytes, CD3-/CD14+ (Relative %)	7.63	7.12	1.05	2.94
Number Evaluated:	8		6	
Organ Weights (g) [e]:				
Number Evaluated:	4	4	3	3
Thymus	4.19	3.66	-9.8%	-50.24%
Gross Pathology [b]:				
Number Evaluated:	5	5	5	5
Bone marrow: sternum: pale	0	0	0	0
Spleen: atrophy	0	0	0	2
Histopathology [b]:				
Number Evaluated:	4	4	3	3
Bone marrow: sternum:				
Hypercellularity: megakaryocytes:				
Slight	–	0	–	1
Moderate	0	0	1	1
Hypercellularity: granulocyte precursors:				
Slight	–	0	–	0
Moderate	0	0	0	0
Hypercellularity: erythroid precursors:				
Very slight	0	–	1	–
Slight	–	0	–	2
Hypercellularity: hematopoietic progenitors:				
Moderate	0	0	1	0
Hypocellularity: all hematopoietic cells:				
Slight	0	0	1	0
Moderate	0	0	1	2
Marked	0	–	0	–

Dose Level (mg/kg) ‡	Control		MMAE (with Cefazolin)	
	0		0.058	
Hypocellularity: megakaryocytes:				
Slight	0	–	0	–
Hypocellularity: granulocyte precursors:				
Slight	0	0	3	1
Moderate	0	0	0	1
Marked	–	0	–	1
Hypocellularity: erythroid precursors:				
Moderate	0	–	0	–
Hypocellularity: hematopoietic progenitors:				
Slight	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0
Marked	0	–	0	–
Necrosis/cellular debris:				
Slight	0	0	1	2
Moderate	0	0	1	1
Marked	0	0	0	0
Hemorrhage/congestion:				
Slight	0	0	1	1
Moderate	0	0	1	1
Marked	0	–	0	–
Thymus, apoptosis; cortical lymphocytes:				
Slight	0	0	0	2
Thymus, hypocellularity; cortical lymphocytes:				
Very slight	–	0	–	0
Slight	0	0	0	1
Spleen hypocellularity, lymphocytic; germinal centers:				
Very slight	0	0	1	0
Slight	0	0	2	1
Moderate	–	1	–	0
Marked	–	0	–	2

Dose Level (mg/kg) ‡	Control		MMAE (with Cefazolin)	
	0		0.058	
Spleen hypocellularity, lymphocytic; PALS:				
Very slight	0	0	2	2
Slight	0	1	1	1

Incidence grading: very slight, slight, moderate, marked

* Multiple t-test (Dunnett's test or Miller's procedure [equal sample sizes] or Dunn's procedure [unequal sample sizes]). Statistically different from Control Article at $P \leq 0.05$.

ADA: anti-drug antibodies; APTT: activated partial thromboplastin time; AST: aspartate transaminase; AUC: area under the concentration-time curve; CD: cluster of differentiation; C_{max}: maximum concentration in serum or blood; F: female; GLP: Good Laboratory Practice; i.v.: intravenous; M: male; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV: mean corpuscular volume; MMAE: monomethyl auristatin E; ND: not determined; PT: prothrombin time; Q3W: once every 3 weeks

(–):No statistically significant findings

‡ : Infusion of 10 mL/kg with volume based on the most recent body weight

a) Total number of animals placed on study

b) At end of dosing period unless otherwise noted

c) Day 70 shown as an example

d) Day 8 hematology, female group, n = 5

e) For control, group mean is shown. For treated groups, percent differences from control are shown.

7.　In Vitro 遺伝毒性試験

7.1　細菌を用いる復帰突然変異試験

Report Title: Bactrial reverse mutation assay
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells
Strains: *S. typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, TA1537, and *E. coli* strain WP2 *uvrA*
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9
Vehicle for Test Article: DMSO
Number of Independent Assays: 3
Number of Replicate Cultures: 2 (Assay 1) and 3 (Assays 2 and 3)
Number of Cells Analyzed/Cultured: ≥ 0.3×10^9 cells/mL
Vehicles for Positive Controls: DMSO (all except sodium azide), water (for sodium azide)
Test Article: MMAE
Study No.: [redacted]AA66EH.503.BTL
Location in CTD: [4.2.3.3.1-1]
GLP Compliance: Yes
Treatment: Plate incorporation for 48-72 hours
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects None
Dates of Treatment: [redacted] 20[redacted]

			Assay 1, Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 *uvrA*
Without Activation	DMSO	50 µL/plate	17 ± 4	178 ± 11	11 ± 1	18 ± 1	11 ± 1
	MMAE	0.25	21 ± 1	194 ± 11	12 ± 1	13 ± 4	15 ± 5
	MMAE	0.75	20 ± 1	202 ± 5	18 ± 5	15 ± 8	11 ± 4
	MMAE	2.5	19 ± 3	213 ± 16	15 ± 3	19 ± 1	18 ± 0
	MMAE	7.5	17 ± 4	199 ± 27	19 ± 6	17 ± 3	17 ± 8
	MMAE	25	15 ± 2	219 ± 8	16 ± 0	15 ± 8	10 ± 0
	MMAE	75	20 ± 3	227 ± 3	22 ± 11	17 ± 6	16 ± 1
	MMAE	200	19 ± 1	220 ± 6	19 ± 0	16 ± 4	19 ± 8
	MMAE	600	26 ± 1	249 ± 19	12 ± 4	12 ± 6	13 ± 3
	MMAE	1800	21 ± 4	181 ± 6	18 ± 4	13 ± 0	17 ± 4
	MMAE	5000	20 ± 2	210 ± 19	20 ± 5	18 ± 3	17 ± 1
	2-Nitrofluorene	1.0	134 ± 35	NA	NA	NA	NA
	Sodium azide	1.0	NA	574 ± 74	398 ± 48	NA	NA
	9-Aminoacridine	75	NA	NA	NA	62 ± 1	NA
	MMS	1000	NA	NA	NA	NA	124 ± 6

			Assay 1, Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2 *uvrA*
With Activation	DMSO	50 µL/plate	29 ± 8	209 ± 16	15 ± 1	11 ± 3	12 ± 1
	MMAE	0.25	29 ± 10	207 ± 28	14 ± 4	13 ± 4	15 ± 1
	MMAE	0.75	25 ± 1	192 ± 6	13 ± 3	13 ± 0	17 ± 2
	MMAE	2.5	27 ± 1	212 ± 20	10 ± 1	14 ± 4	11 ± 4
	MMAE	7.5	21 ± 5	190 ± 22	14 ± 1	10 ± 0	14 ± 1
	MMAE	25	18 ± 4	210 ± 3	11 ± 0	9 ± 1	10 ± 1
	MMAE	75	28 ± 8	201 ± 8	12 ± 2	13 ± 1	17 ± 1
	MMAE	200	30 ± 2	180 ± 25	12 ± 1	12 ± 4	15 ± 6
	MMAE	600	26 ± 1	217 ± 9	15 ± 1	16 ± 1	14 ± 3
	MMAE	1800	32 ± 1	239 ± 24	15 ± 2	15 ± 6	16 ± 6
	MMAE	5000	19 ± 1	197 ± 17	17 ± 4	10 ± 3	13 ± 2
	2-Aminoanthracene	1.0 (all *S.* strains) 10 (WP2 *uvrA*)	2117 ± 203	1545 ± 792	272 ± 28	222 ± 59	86 ± 3
			Assays 2 and 3, Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	TA 98	TA 100 [a)]	TA 1535	TA 1537	WP2 *uvrA*
Without Activation	DMSO	50 µL/plate	13 ± 2	125 ± 11	13 ± 1	12 ± 2	11 ± 1
	MMAE	75	11 ± 1	133 ± 26	13 ± 1	11 ± 1	13 ± 2
	MMAE	200	11 ± 1	132 ± 21	12 ± 1	11 ± 1	11 ± 2
	MMAE	600	11 ± 1	133 ± 13	13 ± 4	11 ± 1	11 ± 1
	MMAE	1800	12 ± 1	140 ± 11	12 ± 1	11 ± 1	11 ± 2
	MMAE	5000	12 ± 2	129 ± 14	12 ± 1	10 ± 1	10 ± 1
	2-Nitrofluorene	1.0	152 ± 19	NA	NA	NA	NA
	Sodium azide	1.0	NA	549 ± 22	506 ± 61	NA	NA
	9-Aminoacridine	75	NA	NA	NA	1087 ± 122	NA
	MMS	1000	NA	NA	NA	NA	208 ± 21

			Assays 2 and 3, Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	TA 98	TA 100 [a)]	TA 1535	TA 1537	WP2 *uvrA*
With Activation	DMSO	50 µL/plate	16 ± 4	136 ± 14	11 ± 1	8 ± 3	10 ± 1
	MMAE	75	15 ± 1	146 ± 7	10 ± 2	5 ± 2	12 ± 2
	MMAE	200	11 ± 2	130 ± 6	8 ± 3	10 ± 1	12 ± 1
	MMAE	600	13 ± 2	138 ± 17	10 ± 3	8 ± 1	11 ± 1
	MMAE	1800	13 ± 2	141 ± 17	10 ± 2	10 ± 2	11 ± 1
	MMAE	5000	11 ± 1	129 ± 9	11 ± 2	10 ± 2	11 ± 1
	2-Aminoanthracene	1.0 (all *S.* strains) 10 (WP2 *uvrA*)	890 ± 85	828 ± 90	171 ± 54	1471 ± 114	376 ± 56

DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: Good Laboratory Practice; NA: not applicable; MMAE: monomethyl auristatin E; MMS: methyl methanesulfonate; SD: standard deviation

a) Due to culture contamination, strain TA100 was not evaluated in Assay 2 but was retested in Assay 3.

7.2　マウスリンフォーマ TK 試験

Report Title: L5178Y TK$^{+/-}$ mouse lymphoma forward mutation assay with a confirmatory assay
Test Article: MMAE
Test for Induction of: Forward mutation in mouse lymphoma cells
Number of Independent Assays: 3
Study No. [redacted]8204155
Strain: Mouse lymphoma L5178Y TK$^{+/-}$ cell line
Number of Replicate Cultures: 1-3
Location in CTD: [4.2.3.3.1-2]
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9
Number of Cells Analyzed: 3×10^6
GLP Compliance: Yes
Vehicle for Test Article: 0.9% sodium chloride injection USP
Vehicle for Positive Controls: Methyl methanesulfonate and methylcholanthrene
Dates of Treatment: [redacted] 20[redacted]
Treatment: Continuous treatment for 4 hours (initial, re-test, and confirmatory assays) or 24 hours (confirmatory assay) followed by a 2-day expression period
Cytotoxic Effects: Dose related decreases in total growth relative to average vehicle control growth
Genotoxic Effects: None

			Initial Mutation Assay			
				Mutant Frequency ($\times10^{-6}$) [a)]		
Metabolic Activation	Test Article	Concentration	Relative Growth (%)	Total	Small	Large
With activation	Vehicle	10%	87.7	47.2	15.6	31.6
	Vehicle	10%	121.1	39.1	16.1	22.9
	Vehicle	10%	92.5	48.3	24.9	23.4
	MCA	1.5 µg/mL	11.9	382.6*	202.7	179.9
	MCA	2.0 µg/mL	11.2	336.7*	177.4	159.3
	MMAE	20 ng/mL	61.5	69.2	23.6	45.6
	MMAE	30 ng/mL	45.2	67.7	31.0	36.7
	MMAE	40 ng/mL	18.6	80.7	30.5	50.2
	MMAE	50 ng/mL	16.6	63.6	28.0	35.6
	MMAE	60 ng/mL	7.7	I	ND	ND
	MMAE	70 ng/mL	7.5	I	ND	ND
	MMAE	80 ng/mL	4.0	I	ND	ND
	MMAE	90 ng/mL	4.2	I	ND	ND
	MMAE	100 ng/mL	2.2	I	ND	ND

			Initial Mutation Assay			
				Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$) [a)]		
Metabolic Activation	Test Article	Concentration	Relative Growth (%)	Total	Small	Large
Without activation	Vehicle	10%	91.4	38.1	9.3	28.8
	Vehicle	10%	100.6	54.9	14.2	40.6
	Vehicle	10%	106.8	42.7	11.4	31.3
	MMS	15 μg/mL	16.4	375.9*	219.5	156.4
	MMS	20 μg/mL	7.6	471.9*	305.6	166.3
	MMAE	0.05 ng/mL	93.3	59.8	18.8	41.0
	MMAE	0.1 ng/mL	99.7	44.1	19.6	24.5
	MMAE	0.5 ng/mL	95.3	45.4	12.5	32.9
	MMAE	1.0 ng/mL	92.1	43.0	15.5	27.5
	MMAE	2.5 ng/mL	82.4	39.8	11.5	28.3
	MMAE	5.0 ng/mL	30.0	59.2	19.5	39.7
	MMAE	7.5 ng/mL	22.1	69.3	20.4	48.9
	MMAE	10 ng/mL	7.3	I	ND	ND
	MMAE	12.5 ng/mL	3.4	I	ND	ND
	MMAE	15 ng/mL	2.5	I	ND	ND

			Re-test Mutation Assay			
				Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$) [a)]		
Metabolic Activation	Test Article	Concentration	Relative Growth (%)	Total	Small	Large
With activation	Vehicle	10%	91.9	35.2	9.8	25.4
	Vehicle	10%	102.0	53.9	16.2	37.8
	Vehicle	10%	100.4	48.5	14.5	34.1
	MCA	1.5 μg/mL	15.0	352.3*	187.9	164.5
	MCA	2.0 μg/mL	9.4	395.8*	216.0	179.8
	MMAE	0.25 ng/mL	103.5	49.2	17.8	31.4
	MMAE	0.5 ng/mL	111.5	50.3	13.5	36.8
	MMAE	1.0 ng/mL	112.9	27.9	11.2	16.8
	MMAE	5 ng/mL	91.8	49.9	16.5	33.4
	MMAE	10 ng/mL	78.7	45.5	14.4	31.0
	MMAE	20 ng/mL	70.0	38.9	16.2	22.7
	MMAE	30 ng/mL	44.0	56.9	19.9	37.0
	MMAE	40 ng/mL	18.0	51.7	15.8	35.8
	MMAE	50 ng/mL	15.7	100.0	40.3	59.7
	MMAE	60 ng/mL	6.4	I	ND	ND
Without activation	Vehicle	10%	81.2	42.7	8.9	33.9
	Vehicle	10%	88.4	36.4	12.1	24.2
	Vehicle	10%	133.4	28.7	11.8	16.9
	MMS	15 μg/mL	19.9	357.9*	240.8	117.1
	MMS	20 μg/mL	7.2	523.5*	320.6	202.9
	MMAE	0.01 ng/mL	73.5	34.5	12.9	21.5
	MMAE	0.05 ng/mL	71.7	25.9	9.8	16.1
	MMAE	0.1 ng/mL	90.3	24.7	4.6	20.1
	MMAE	0.25 ng/mL	83.7	35.2	9.8	25.4
	MMAE	0.5 ng/mL	83.1	30.5	8.5	22.0
	MMAE	0.75 ng/mL	57.3	37.4	9.5	27.9
	MMAE	2.5 ng/mL	61.8	47.9	14.6	33.3
	MMAE	5 ng/mL	27.0	69.6	14.8	54.8
	MMAE	7.5 ng/mL	9.4	I	ND	ND
	MMAE	10 ng/mL	2.6	I	ND	ND

			Confirmatory Mutation Assay			
				Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$) [a)]		
Metabolic Activation	Test Article	Concentration	Relative Growth (%)	Total	Small	Large
With activation	Vehicle	10%	86.4	49.9	18.1	31.8
	Vehicle	10%	112.1	45.9	14.9	31.1
	Vehicle	10%	102.1	48.4	12.7	35.7
	MCA	1.5 µg/mL	15.5	419.3*	202.0	217.3
	MCA	2.0 µg/mL	12.0	341.5*	163.1	178.5
	MMAE	0.05 ng/mL	89.0	31.3	6.8	24.5
	MMAE	0.25 ng/mL	79.4	50.6	12.7	38.0
	MMAE	0.5 ng/mL	62.4	57.0	11.0	46.0
	MMAE	2.5 ng/mL	62.9	46.3	17.1	29.2
	MMAE	5 ng/mL	79.4	45.6	16.7	28.9
	MMAE	10 ng/mL	80.5	39.6	12.0	27.6
	MMAE	20 ng/mL	40.3	60.8	21.4	39.5
	MMAE	30 ng/mL	24.8	74.4	24.4	50.0
	MMAE	50 ng/mL	9.7	I	ND	ND
	MMAE	60 ng/mL	6.8	I	ND	ND
Without activation	Vehicle	10%	75.5	44.9	12.0	32.9
	Vehicle	10%	118.3	29.3	7.2	22.1
	Vehicle	10%	108.7	31.3	12.1	19.2
	MMS	6.5 µg/mL	25.5	204.1*	109.6	94.5
	MMS	10 µg/mL	17.8	321.7*	173.3	148.3
	MMAE	0.005 ng/mL	80.5	44.6	9.6	35.1
	MMAE	0.01 ng/mL	73.3	35.7	8.7	27.0
	MMAE	0.1 ng/mL	96.1	27.4	6.2	21.2
	MMAE	0.5 ng/mL	96.4	33.3	9.0	24.4
	MMAE	0.75 ng/mL	93.0	34.4	6.9	27.5
	MMAE	1 ng/mL	78.9	27.2	3.9	23.3
	MMAE	1.5 ng/mL	61.4	44.9	10.7	34.1
	MMAE	2 ng/mL	50.1	66.7	17.8	48.9
	MMAE	2.5 ng/mL	17.8	92.5	21.5	71.0
	MMAE	3 ng/mL	9.0	I	ND	ND

GLP: Good Laboratory Practice; I: insufficient data; ND: not Determined; MCA: methylcholanthrene; MMAE: monomethyl auristatin E; MMS: methyl methanesulfonate

*: Mutagenic. Exceeds minimum criterion

a) Mutant frequency = (total mutant colonies/total viable colonies) × (2×10-4)

8.　In Vivo 遺伝毒性試験

8.1　ラットを用いる in vivo 骨髄小核試験

Report Title: *In vivo* rat bone marrow micronucleus assay
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley
Age: 8 weeks
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes
Number of Cells Evaluated/Animal: 2000
Treatment Schedule: Single-dose
Sampling Times: 24 and 48 hours after dosing
Method of Administration: i.v.
Vehicle/Formulation: 3.9% 0.01N HCl/96.1% 0.9% sodium chloride for injection
Test Article: MMAE
Study No.: [redacted]8204151
Location in CTD: [4.2.3.3.2-1]
GLP Compliance: Yes
Dates of Treatment: [redacted] 20[redacted]
Special Features: Confirmatory micronucleus assay with antikinetochore analysis
Toxic/Cytotoxic Effects: Cytotoxicity found in 0.2 mg/kg 48-hour group.
Genotoxic Effects: Increase in micronucleated PCEs at 0.1 and 0.2 mg/kg. Induced micronuclei were predominately centromere+ (aneugenic mode of action).
Evidence of Exposure: Cytotoxicity and increase in micronuclei in bone marrow.

				Micronucleus Assay	
Test Article	Dose Level (mg/kg)	Harvest Times (Hours)	Number of Animals (Males)	% Micronucleated PCEs Mean ± SD	Ratio PCE:NCE Mean ± SD
HCl/saline vehicle	5 mL/kg	24	5	0.07 ± 0.07	0.70 ± 0.11
HCl/saline vehicle	5 mL/kg	48	5	0.08 ± 0.09	0.82 ± 0.21
MMAE	0.01	24	5	0.12 ± 0.15	0.70 ± 0.18
MMAE	0.1	24	5	1.18 ± 0.33*	0.66 ± 0.16
MMAE	0.2	24	5	1.34 ± 0.46*	0.55 ± 0.07
MMAE	0.2	48	5	1.59 ± 0.33*	0.38 ± 0.07**
Cyclophosphamide positive control	60	24	5	1.77 ± 0.99*	0.69 ± 0.10

HCl: hydrochloric acid; i.v.: intravenous; MMAE: monomethyl auristatin E; NCE: normochromatic erythrocytes; PCE: polychromatic erythrocytes; SD: standard deviation

*: Significantly greater that the vehicle control, $P \leq 0.01$ (Dunnett's t-test).

**: Significantly less than the vehicle control, $P \leq 0.01$ (Dunnett's t-test).

				Confirmatory Micronucleus Assay	
Test Article	Dose Level (mg/kg)	Harvest Times (Hours)	Number of Animals [a)] (Males)	% Micronucleated PCEs Mean ± SD	Ratio PCE:NCE Mean ± SD
HCl/saline vehicle	0	24	3	0.16 ± 0.10	0.72 ± 0.12
MMAE	0.1	24	3	1.23 ± 0.53	0.48 ± 0.15
MMAE	0.2	24	3	0.93 ± 0.46	0.23 ± 0.10
Positive controls:					
Cyclophosphamide	60	24	3	2.13 ± 0.33	0.46 ± 0.05
Carbendazim [b),c)]	1250	24	3	0.48 ± 0.39	0.19 ± 0.04
Carbendazim [b),c)]	1500	24	3	0.51 ± 0.46	0.43 ± 0.08

* Significantly greater than the corresponding vehicle control, $p \leq 0.01$.

** Significantly less than the corresponding vehicle control, $p \leq 0.01$.

GLP: Good Laboratory Practice; HCl: hydrochloric acid; MMAE: monomethyl auristatin E; NCE: normochromatic erythrocytes; PCE: polychromatic erythrocytes; SD: standard deviation

a) 1 animal from each of the cyclophosphamide, carbendazim, and 0.2 mg/kg groups, and 2 animals from the 0.1 mg/kg group, were used in the antikinetochore analysis.

b) 4000 cells evaluated per animal.

c) Animals were dosed once daily for 2 days prior to harvest time point.

9.　がん原性試験

がん原性試験は実施していない。

10. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

重要な試験以外の生殖発生毒性試験は実施していない。

11. 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

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ていない。

12. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

Report Title: Intravenous injection study for effects on embryo-fetal developmental and toxicokinetics with SGN-35 and SGD-1010 in rats
Test Article: MMAE
Design Similar to ICH 4.1.3: Yes
Duration of Dosing: 7 days (Q7D×2)
Study No.: [redacted]8204397
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley
Day of Mating: Prior to confirmation, Day 0
Location in CTD: [4.2.3.5.2-1]
Initial Age: 12 weeks
Day of C-Section: Day 21 of gestation
GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Method of Administration: i.v.
Basis for High Dose Selection: [redacted]-34 (pilot study conducted at [redacted])
Vehicle/Formulation: 40% formulation buffer (20 mmol/L citrate, 63 mg/mL trehalose, 0.2 mg/mL polysorbate 80, pH 6.6) in 60% 0.9% sodium chloride
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: Not determined

Treatment		Control	MMAE
Dose Level (mg/kg)		0	0.2
Dams:	Toxicokinetics: $AUC_{0\text{-last}}$ (ng·h/mL)		
	GD 6	NA	0.7
	GD 13	NA	1.1
	Toxicokinetics: C_{max} (ng/mL)		
	GD 6	NA	29.7
	GD 13	NA	50.2
	No. Pregnant	25	24
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	1
	Clinical Observations		
	Red/Black Vaginal Discharge (GD 18-21)	0	2
	Pale, entire body (GD 21)	0	1
	Red Fluid in Cage Pan (GD 19-20)	0	2
	Body Weight [a)]	379.4 g	92% [d)]
	Food Consumption (g/day) [b)]	30.5	27.4
	Mean No. Corpora Lutea	13.8	14.2
	Mean No. Implantation Sites	12.8	12.8
	Mean % Preimplantation Loss	6.8	9.3

Treatment		Control	MMAE
Dose Level (mg/kg)		0	0.2
Dams:	Hematology (GD 20)		
	Erythrocytes (×10^6/μL)	6.29	4.07 [d)]
	Hemoglobin (g/dL)	12.2	8.4 [d)]
	Hematocrit (%)	34.7	24.5 [d)]
	MCV (fL)	55.2	60.8
	MCH (pg)	19.4	20.6
	MCHC (g/dL)	35.1	33.9 [f)]
	Platelets (×10^3/μL)	1256	1152
	White Blood Cells (×10^3/μL)	10.74	8.68
	Neutrophils (×10^3/μL)	3.83	2.27 [d)]
	Lymphocytes (×10^3/μL)	6.26	5.76 [d)]
	Monocytes (×10^3/μL)	0.45	0.48 [d)]
	Eosinophils (×10^3/μL)	0.10	0.03 [d)]
	Basophils (×10^3/ μL)	0.02	0.02 [f)]
	Large Unstained Cells (×10^3/μL)	0.09	0.13
	Reticulocytes (×10^3/ μL)	174.7	555.9 [f)]
	Necropsy Observations		
	No. No remarkable observations	25	25
	Macroscopic Observations		
	Spleen, large	0	2
	Microscopic Observations		
	No. animals examined	3	5
	Spleen, Hematopoiesis, Extramedullary, Increased	1	5
	Spleen, Hematopoiesis, Extramedullary, Decreased	0	0
	Thymus, Depletion, Lymphocytes	0	1
	Thymus, Tingible-Body Macrophages, Increased	0	0
	Uterus, Placentation Site, Involution/Resorption	0	0
	Vagina, Mucification, Pregnancy-Associated	3	5
	Bone Marrow, Sternum, Erythroid Hyperplasia	0	0
	Bone Marrow, Sternum, Hypercellular	0	2

Treatment		Control	MMAE
Dose Level (mg/kg)		0	0.2
Litters:	No. Litters Evaluated	25	23
	Mean No. Live Fetuses Per Litter	12.7	9.2
	No. Live Fetuses	317	220
	Mean No. Resorptions	0.1	3.6
	Mean % Post-implantation Loss	1.0	24.3
	Mean Fetal Body Weight (g)	5.63	5.37
	Fetal Sex Ratios (M:F)	52:48	45:55
	Fetal Anomalies:		
	Gross External Anomalies		
	External Variation, Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.5)
	External Variation, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	Curly Tail, Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.5)
	Curly Tail, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	External Malformations, Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	3 (1.4)
	External Malformations, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	3 (13)
	Protruding Tongue, Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.5)
	Protruding Tongue, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	Malrotated Hindlimbs, Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	2 (0.9)
	Malrotated Hindlimbs, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	2 (8.7)
	Umbilical Hernia, Fetus Incidence (%)†	0 (0.0)	0 (0.0)
	Umbilical Hernia, Litter Incidence (%)†	0 (0.0)	0 (0.0)
	Gastroschisis, Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	2 (0.9)
	Gastroschisis, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	2 (8.7)
	Agnathia, Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.5)
	Agnathia, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)

Treatment		Control	MMAE
Dose Level (mg/kg)		0	0.2
Litters:	Visceral Anomalies		
	Soft Tissue Variations, Fetal Incidence (%)†	1 (0.6)	0 (0.0)
	Soft Tissue Variations, Litter Incidence (%)	1 (4.0)	0 (0.0)
	Dilation of Lateral Ventricle(s), Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Dilation of Lateral Ventricle(s), Litter Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Absent Innominate Artery, Fetus Incidence (%)†	1 (0.6)	0 (0.0)
	Absent Innominate Artery, Litter Incidence (%)†	1 (4.0)	0 (0.0)
	Dilated Ureter(s), Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Dilated Ureter(s), Litter Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Situs Inversus, Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	Situs Inversus, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.5)
	Testis(es), Reduced Size, Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Testis(es), Reduced Size, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Skeletal Anomalies		
	Skeletal Variations, Fetal Incidence (%)	18 (11)	21 (19)
	Skeletal Variations, Litter Incidence (%)	11 (44)	12 (52)
	Incomplete Ossification of Skull, Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Incomplete Ossification of Skull, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Bipartite Vertebral Centrum (A), Fetus Incidence (%)	7 (4.3)	8 (7.1)
	Bipartite Vertebral Centrum (A), Litter Incidence (%)	5 (20)	6 (26)
	Less Than Four Caudal Vertebrae Ossified, Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Less Than Four Caudal Vertebrae Ossified, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	25 Presacral Vertebrae, Fetus Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	25 Presacral Vertebrae, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	5th/6th Sternebra(e) Incomplete Ossification, Fetal Incidence (%)	2 (1.2)	3 (2.7)
	5th/6th Sternebra(e) Incomplete Ossification, Litter Incidence (%)	2 (8.0)	3 (13)
	5th/6th Sternebra(e) Bipartite, Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	5th/6th Sternebra(e) Bipartite, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	Other Sternebra(e) Bipartite, Fetal Incidence (%)	1 (0.6)	0 (0.0)
	Other Sternebra(e) Bipartite, Litter Incidence (%)	1 (4.0)	0 (0.0)

Treatment		Control	MMAE
Dose Level (mg/kg)		0	0.2
Litters:	5th Sternebra(e) Unossified, Fetal Incidence (%)	2 (1.2)	0 (0.0)
	5th Sternebra(e) Unossified, Litter Incidence (%)	1 (4.0)	0 (0.0)
	Sternebra(e) Asymmetrically Ossified, Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	Sternebra(e) Asymmetrically Ossified, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	6th Sternebra(e) Unossified, Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	6th Sternebra(e) Unossified, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	Other Sternebra(e) Incomplete Ossification, Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Other Sternebra(e) Incomplete Ossification, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	14th Rudimentary Rib(s), Fetal Incidence (%)	8 (5.0)	7 (6.2)
	14th Rudimentary Rib(s), Litter Incidence (%)	6 (24)	6 (26)
	13th Rudimentary Rib(s), Fetal Incidence (%)	1 (0.6)	1 (0.9)
	13th Rudimentary Rib(s), Litter Incidence (%)	1 (4.0)	1 (4.3)
	Wavy/Bent Rib(s), Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	Wavy/Bent Rib(s), Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	Incomplete Ossification of Rib(s), Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Incomplete Ossification of Rib(s), Litter Incidence (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Less Than Four Metatarsals Ossified, Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	Less Than Four Metatarsals Ossified, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)

Treatment		Control	MMAE
Dose Level (mg/kg)		0	0.2
Litters:	Skeletal Malformations, Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	2 (1.8)
	Skeletal Malformations, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	2 (8.7)
	Mandible(s) Malformed, Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	Mandible(s) Malformed, Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	Misaligned, Fused, and/or Absent Caudal Vertebra(e), Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	Misaligned, Fused, and/or Absent Caudal Vertebra(e), Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	Split Sternebra(e), Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	Split Sternebra(e), Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)
	Shortened Long Bone(s), Fetal Incidence (%)	0 (0.0)	1 (0.9)
	Shortened Long Bone(s), Litter Incidence (%)	0 (0.0)	1 (4.3)

$AUC_{0\text{-}last}$: area under the concentration-time curve from time zero to last; C_{max}: maximum concentration in serum or blood; F: female; GD: gestational day; GLP: Good Laboratory Practice; ICH: International Council for Harmonisation; i.v.: intravenous; M: male; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV: mean corpuscular volume; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable, or insufficient number of fetuses to determine parameters; Q7D: once every 7 days

†: Significantly positive trend by the Cochran-Armitage test for linear trend followed by the Fisher-Irwin Exact test.

a) Evaluated at GD 21 at scheduled C-section. For control, group mean is shown. For treated groups, percent differences from control are shown.

b) Evaluated at GD 4-21.

c) Dunnett's t-test; significantly different from Group 1, Control, $P \leq 0.01$ (footnote from original report table, study contained additional test articles not reported here).

d) Dunnett's t-test; significantly different from Group 5 (SGN-35, 10 mg/kg), $P \leq 0.01$.

e) Dunnett's t-test; significantly different from Group 1, Control, $P \leq 0.05$ (footnote from original report table, study contained additional test articles not reported here).

f) Dunnett's t-test; significantly different from Group 5, (SGN-35, 10 mg/kg), $P \leq 0.05$.

13. 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

出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施していない。

14. 新生児を用いた試験

新生児を用いた試験は実施していない。

15. 局所刺激性試験

局所刺激性試験は実施していない。

16. その他の毒性試験

Test Article: Tisotumab vedotin, Tisotumab, Tisotumab vedotin-FITC, Tisotumab-FITC, MMAE, vcMMAE

Species	ROA	Dose Level (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD/ GLP	Study Type
Normal human, chimpanzee, cynomolgus monkey, dog, pig, rabbit, rat or mouse tissues or TF-transfected cells.	NA	NA	Tisotumab showed cross-reactivity with TF in cynomolgus kidney (renal corpuscles) at an optimal concentration of 1 µg/mL, whereas no staining was observed in any of the other species tested (dog, pig and rabbit). The staining intensity of renal corpuscules in cynomolgus monkey was somewhat higher as compared to human renal corpuscles. In addition to IHC, interspecies cross-reactivity of tisotumab was evaluated by flow cytometry. HEK293F cells were transiently transfected with DNA expression constructs for TF of the following species: human, chimpanzee, cynomolgus monkey, pig, dog, rabbit, rat or mouse. Mock-transfected cells were included as a negative control. As expected, tisotumab vedotin bound to cells transfected with human, chimpanzee and cynomolgus TF, but not with any of the other species evaluated (dog, pig, rabbit, rat, or mouse). Cross-reactivity to mouse TF was also tested by ELISA and was again found negative.	GMB1015-088/ [4.2.3.7.7-1]/ GLP: No	Cross-reactivity of tisotumab with TF from various animal species
Normal human and cynomolgus monkey tissues	NA	NA	Staining patterns were generally similar between human and cynomolgus monkey tissues. Overall, staining of fewer tissue elements was present in cynomolgus monkey tissues. Staining was observed in the following human tissues: Membrane and/or cytoplasm/cytoplasmic granules in epithelium in the breast (ducts, glands), eye (cornea, conjunctiva, lens), gastrointestinal tract (esophagus [including submucosal glands]), kidney (parietal), liver (bile ducts), lung (bronchioles, alveoli), ovary (cyst), pancreas (acini, ducts), parathyroid, pituitary (adenohypophysis), prostate, salivary gland (acini, ducts), skin (epidermis, hair follicles, sweat glands), thymus (lymphoepithelium, Hassall's corpuscles), tonsil (surface, crypts), ureter (transitional), and uterus (endometrium [surface, glands] and cervix [internal and external os]). Membrane and cytoplasm of stroma/stromal cells in most tissues. Processes of glial cells in the grey matter, and to a lesser extent in the white matter, of the cerebellum, cerebrum, and spinal cord and in the neurohypophysis of the pituitary. Membrane and cytoplasm of arachnoid cap cells in the cerebellum and spinal cord. Peripheral nerve associated cell processes (most likely endoneurium or stromal cells) in the Fallopian tube, gastrointestinal tract (esophagus), heart, kidney, liver, lymph node, peripheral nerve, prostate, salivary gland, striated (skeletal) muscle, thyroid, ureter, and urinary bladder. Cytoplasm of perineurium in the Fallopian tube, gastrointestinal tract (esophagus), heart, liver, prostate, salivary gland, and spinal cord. Cytoplasm of ganglion cells in the adrenal. Membrane and cytoplasm of retinal cell processes in the inner and outer nuclear and plexiform layers of the retina. Cytoplasm of myenteric plexus cells and processes (likely ganglion and satellite cells) in the gastrointestinal tract (colon, small intestine, and stomach). Cytoplasm of adipocytes in the adrenal, breast, gastrointestinal tract (esophagus), heart, lymph node, ureter, and urinary bladder. Cytoplasm of mononuclear	[redacted]20023264/ [4.2.3.7.7-2]/ GLP: Yes	A tissue cross-reactivity study of tisotumab vedotin-FITC and tisotumab-FITC in normal human and cynomolgus monkey tissue

			cells in submucosal lymphoid nodules of the gastrointestinal tract (colon, small intestine, and stomach) and germinal centers of lymph node and tonsil. Membrane and cytoplasm of alveolar macrophages in the lung. Membrane and cytoplasm of cardiomyocytes in the heart. Membrane and cytoplasm of striated skeletal myocytes in the eye. Membrane and cytoplasm of intrinsic smooth myocytes in the esophagus, stomach, and prostate. Membrane and cytoplasm of glomerular tuft cells in the kidney. Membrane and cytoplasm of islet cells in the pancreas. Cytoplasm of luteal cells in the ovary. Membrane and cytoplasm of spermatogenic cells and Leydig cells in the testis. In the cynomolgus monkey tissues staining was observed in the following tissues: Membrane and/or cytoplasm/cytoplasmic granules in epithelium in the breast (ducts, glands), eye (conjunctiva, lens), Fallopian tube, gastrointestinal tract (esophagus [including submucosal glands]), kidney (parietal, tubules), liver (bile ducts), lung (bronchioles, bronchi, alveoli), ovary (surface, follicles), parathyroid, pituitary (adenohypophysis), prostate, salivary gland (ducts), skin (epidermis, hair follicles), thymus (lymphoepithelium, Hassall's corpuscles), thyroid (follicles, ducts), tonsil (surface, crypts), ureter (transitional), urinary bladder (transitional), and uterus (endometrium [surface, glands] and cervix [internal os]). Membrane and/or cytoplasm of mesothelium in the Fallopian tube, gastrointestinal tract (esophagus and small intestine), liver, lung, pancreas, spleen, and urinary bladder. Cytoplasm of endothelium in the spleen. Membrane and cytoplasm of stroma/stromal cells in most tissues. Processes of glial cells in the grey matter, and to a lesser extent in the white matter, of the cerebellum, cerebrum, and spinal cord and in the neurohypophysis of the pituitary. Peripheral nerve associated cell processes (most likely endoneurium or stromal cells) in the prostate. Cytoplasm of perineurium in the adrenal, prostate, and ureter. Membrane and cytoplasm of retinal cell processes in the inner and outer nuclear and plexiform layers of the retina. Cytoplasm of myenteric plexus cells and processes (likely ganglion and satellite cells) in the gastrointestinal tract (colon, small intestine, and stomach). Cytoplasm of adipocytes in the adrenal. Cytoplasm of mononuclear cells in submucosal lymphoid nodules of the gastrointestinal tract (colon, small intestine, and stomach), prostate, lymph node and a small infiltrate in the heart and germinal centers of the tonsil. Membrane and cytoplasm of alveolar macrophages in the lung. Membrane and cytoplasm of cardiomyocytes in the heart. Membrane and cytoplasm of glomerular tuft cells in the kidney. Cytoplasm of thecal cells in the ovary. Membrane and cytoplasm of Leydig cells in the testis.		

Species	ROA	Dose Level (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No. / Location in CTD/ GLP	Study Type
NA	NA	NA	Three biochemical assays and one binding assay were used to evaluate the stability of tisotumab vedotin-FITC and tisotumab-FITC upon storage at 2-8°C or < -65°C and upon repeated cycles of freeze-thawing. Freeze thaw stress experiments showed that the biochemical properties and binding characteristics of the FITC-labeled materials were not affected by 3 times freezing at < -65°C and subsequent thawing to room temperature. From the real time storage data, it could be concluded that the batches of FITC-labeled test articles and controls are suitably stable for its intended use in IHC analysis in [redacted]20023264 when stored at a concentration of 0.5 mg/mL at 2-8°C or < -65°C for a time period of up to 3 months.	SD1015-104-01/ [4.2.3.7.7-2]/ GLP: No	Analysis of stability of tisotumab vedotin-FITC and tisotumab-FITC
NA	NA	NA	MMAE and vcMMAE had no absorption in the range of 290 to 700 nm and do not present a direct phototoxicity concern.	[redacted]-2926-A / [4.2.3.7.7-3]/ GLP: No	MMAE and vcMMAE photosafety evaluation

DNA: deoxyribonucleic acid; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FITC: fluorescein isothiocyanate; GLP: Good Laboratory Practice; HEK: human embryonic kidney; IHC: immunohistochemistry; MMAE: monomethyl auristatin E; NA: not applicable; ROA: route of administration; TF: tissue factor; vcMMAE: valine-citrulline monomethyl auristatin E