目次

略号一覧 2
1. まとめ 4
2. 単回投与毒性試験 6
2.1. カニクイザルを用いた非 GLP 単回投与薬物動態試験 6
3. 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 7
3.1. カニクイザルを用いた 3 週間反復投与非 GLP 毒性試験 7
3.2. カニクイザルにおける 4 週間 GLP 試験［＋10 週間の回復期間］ 8
3.3. 13 週間反復投与 GLP 毒性試験 11
4. 遺伝毒性試験 13
5. がん原性試験 13
6. 生殖発生毒性試験 13
7. 局所刺激性試験 14
8. その他の毒性試験 14
8.1. 組織交差反応性 14
8.2. T 細胞依存性抗体産生試験 14
9. 考察及び結論 15
10. 参考文献 16

表一覧

Table 1: Retifanlimab Toxicology Program Overview 5
Table 2: Summary of Toxicokinetics and ADA Response after Repeated Retifanlimab Administration for 3 weeks 8
Table 3: Histopathology Observations of Uncertain Relationship to Retifanlimab Treatment 9
Table 4: Summary of Toxicokinetics and ADA Response after Repeated Retifanlimab Administration for 4 weeks 10
Table 5: Summary of Toxicokinetics and ADA Response after Repeated Retifanlimab Administration for 13 Weeks 12

略号一覧

略号	定義	
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
AEX1188	retifanlimab	レチファンリマブ（遺伝子組換え）
AEX1197	nivolumab replica	ニボルマブのレプリカ
AUC	area under the curve	血中濃度-時間曲線下面積
AUC_{inf}	area under the curve to infinity	無限大時間までの血中濃度-時間曲線下面積
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue	気管支関連リンパ組織
BLQ	below the limit of quantitation	定量下限未満
CD	cluster of differentiation	表面抗原分類
C_{max}	maximum serum concentration	最高血清中濃度
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ECG	electrocardiogram	心電図
EOI	end of infusion	投与終了時
F	female	雌
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	International Council on Harmonization	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IFN-γ	interferon-gamma	インターフェロンγ
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学検査
IL	interleukin	インターロイキン
INCMGA00012	retifanlimab	レチファンリマブ（遺伝子組換え）
IV	intravenous	静脈内
kDa	kilodalton	キロダルトン
KLH	keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
M	male	雄
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MGA012	retifanlimab	レチファンリマブ（遺伝子組換え）
MK-3475	authentic pembrolizumab	純正のペムブロリズマブ
NA	not applicable	該当せず
NCA	noncompartmental analysis	ノンコンパートメント解析

略号	定義	
NK	natural killer (cells)	ナチュラルキラー（細胞）
NOAEL	no-observed-adverse-effect level	無毒性量
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development (European Union)	経済協力開発機構（欧州連合）
PD-1	programmed cell death protein 1	プログラム細胞死タンパク 1
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PTI	prior to infusion	投与前
TIM-3	T-cell immunoglobulin 3	T 細胞免疫グロブリン 3
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha	腫瘍壊死因子 α

1. まとめ

レチファンリマブ（遺伝子組換え）（以下、レチファンリマブ）（INCMGA00012、MGA012、AEX1188）は、ヒンジ結合により安定化させたヒト化免疫グロブリン G4κ（IgG4κ）からなるモノクローナル抗体（mAb）であり、ヒトプログラム細胞死タンパク 1（PD-1）を認識する。レチファンリマブは、ヒト IgG4 のフラグメント結晶化可能（Fc）領域を含むためにエフェクター機能が排除される一方、新生児 Fc 受容体（FcRn）結合能が保持されていることにより、循環血中半減期が延長する。

PD-1（別名 CD279）は活性化 T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B 細胞及びマクロファージに発現する細胞表面受容体である（Greenwald et al 2005、Okazaki and Honjo 2007）。PD-1 は T 細胞の活性化を抑制する内因性のネガティブフィードバックシステムとして機能し、その結果、自己免疫を低下させ自己免疫寛容を促進する。腫瘍浸潤リンパ球及び慢性ウイルス感染後の T 細胞上における PD-1 の高発現は、「T 細胞の疲弊」と呼ばれる免疫機能不全と関連している（Fourcade et al 2010、McMahan et al 2010、Trautmann et al 2006）。レチファンリマブは、PD-1 を発現する T 細胞を標的として、チェックポイントにおいて PD-1 とそのリガンドであるプログラム細胞死リガンド 1（PD-L1）及びプログラム細胞死リガンド 2（PD-L2）との抑制的な相互作用を阻害することにより、そのエフェクター機能を維持又は復元するように設計されている。

レチファンリマブはカニクイザル及びアカゲザルでは PD-1 と交差反応性を示すが、げっ歯類又はイヌでは PD-1 と交差反応性を示さない。そのため、毒性試験プログラムは薬理学的に適切な動物種として、カニクイザルのみを用いて実施した。レチファンリマブのヒトの PD-1 に対する結合親和性はカニクイザルの PD-1 に対する結合親和性の約 6 倍である。

レチファンリマブの非臨床毒性試験プログラム（Table 1 に要約する）は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S9（2009）及び ICH S6 (R1)（2011）ガイドラインに従いデザインした。申請者は、全ての主要な非臨床試験（以後 GLP の下で実施されていることを意味する）が、1987 年 10 月 5 日付の米国食品医薬品局、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する規制（US FDA GLP Regulations；21 CFR パート 58）を遵守し、経済協力開発機構（OECD）規制が適用される国家における相互承認の下で、米国で実施されたことを確認している。

Table 1:　　Retifanlimab Toxicology Program Overview

試験の種類 試験番号	期間	GLP 適合 状況	投与経路及び投与頻度	動物種 （群毎の動物数）
単回投与毒性				
【T15-06-12】	単回投与 （9 週間の回復期間）	非 GLP	1 時間 IV 持続投与	カニクイザル （1M/1F）
反復投与毒性				
【T15-08-05】	3 週間	非 GLP	1 時間 IV 持続投与 週 1 回	カニクイザル （1M/1F）
【T19-01-03】	4 週間 （10 週間の回復期間）	GLP	1 時間 IV 持続投与 週 1 回	カニクイザル （5M/5F）
【T18-02-10】	13 週間	GLP	30 分 IV 持続投与 週 1 回	カニクイザル （5M/5F）
その他の試験				
組織交差反応性				
【T16-02-22】	該当せず	GLP	該当せず	ヒト（N = 3）
免疫毒性				
【T22-05-01】	9 週間	GLP	30 分 IV 持続投与 週 1 回	カニクイザル （2M/2F）

略語：F = 雌、GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、IV = 静脈内、M = 雄

4 週間投与（最高用量 150 mg/kg）及び 13 週間投与（最高用量 100 mg/kg）の毒性試験ではいずれも、レチファンリマブの忍容性は良好であった。早期死亡や被験薬と関連のある毒性はなかった。いずれの試験でも、臨床所見、体重、摂餌量、身体検査、眼所見、体温、血圧、心拍数、呼吸数、神経学的検査、心電図（ECG）、生化学検査、血液凝固系検査、肉眼病理所見、臓器重量に変化は認められなかった。主な所見は以下のとおりであった。

- 4 週間投与試験では雌雄共に、13 週間投与試験では雄のみに初回投与後、リンパ球の僅かな低下が認められ、4 週間投与試験では以降の投与後に低下の変動が大きくなった。4 週間投与試験の投与 1 日目、8 日目、15 日目及び 22 日目の投与後に、循環免疫細胞集団（総白血球、T 細胞、B 細胞及び NK 細胞）の用量非依存的な一過性の低下が認められた。概して免疫細胞集団は投与終了から 72 時間まで及び回復期間全体を通じて、ベースラインの値まで回復した。
- 13 週間投与試験では、軽度から中等度のフィブリノゲンの増加（投与 2 日目）が認められたが、明確な用量反応性は認められず、外来性タンパクの投与に対する反応であると考えられた。炎症の存在を示すその他の所見は認められなかった。
- 13 週間投与試験では、全用量群（対照動物を含む）でインターロイキン（IL）-6 濃度の上昇が認められたが、明確な用量反応性は認められなかった。この所見とレチファンリマブとの関連性は確かではないと考えられた。
- 4 週間投与試験では、全ての用量で投与期間中に PD-1 陽性／CD4 陽性細胞及び PD-1 陽性／CD8 陽性細胞に対する結合の飽和が認められた。抗薬物抗体（ADA）が認められない回復期間の動物では、回復期間を通して PD-1 陽性／CD4 陽性 T 細胞及び PD-1 陽性／CD8 陽性 T 細胞に対する最大結合率が維持され、血清中濃度の維持と相関した。

- 4 週間投与試験では、多くの組織に血管周囲単核免疫細胞のびまん性浸潤が認められ、抗 PD-1 抗体の作用機序と一致していた。また、投与部位の病理組織学的所見は反復投与と一致した。13 週間試験では、このような影響は観察されなかった。
- 両試験の全用量群で ADA が認められ、反復投与を受けた個々の動物における曝露量の減少と関連していた。
- 無毒性量（NOAEL）は各試験で検討した最高用量であり、4 週間投与試験では 150 mg/kg［雌雄を併合した平均最高血清中濃度（C_{max}）は 3.94 mg/mL、血中濃度-時間曲線下面積（AUC）は 746 h·mg/mL］、13 週間投与試験では 100 mg/kg（投与 13 週目の雌雄を併合した平均 C_{max} は 4.88 mg/mL、AUC は 237 h·mg/mL）であった。

ヒト正常組織パネルを用いた組織交差反応性試験では、多数の組織のリンパ球の細胞膜及び細胞質にレチファンリマブの染色が認められた。この染色は、リンパ器官の T 細胞上の PD-1 発現に関する文献報告（Breitfield et al 2000、Kim et al 2001、Yang et al 2015）に基づいて予測されたとおりであり、レチファンリマブでは、想定外の組織染色は見られなかった。

レチファンリマブは T 細胞依存性抗体反応に影響を及ぼさなかった。サルを用いた 9 週間の免疫毒性試験において、レチファンリマブを 20 mg/kg/週の用量で 30 分間持続静注したとき、KLH による免疫に関連する一次及び二次免疫反応の産生に対する影響は認められなかった。

以上の試験の結果から、レチファンリマブは適応患者集団に使用した場合、安全であることが示されている。

2. 単回投与毒性試験

2.1. カニクイザルを用いた非 GLP 単回投与薬物動態試験

試験デザイン：この非 GLP 試験【T15-06-12 試験】では、レチファンリマブを他の 2 種類の抗 PD-1 IgG4κ mAb と比較した。比較には、MK-3475［純正のペムブロリズマブ（キイトルーダ®、Merck）］及び AEX1197［ニボルマブの公表されている配列情報に基づき [redacted] が作成した抗 PD-1 抗体（以降はニボルマブのレプリカと称する）］を用いた。2 頭のカニクイザル（雄 1、雌 1）に 10 mg/kg の各抗体を 1 時間かけて IV 持続投与し、65 日間のモニタリングの後に群に戻した。この試験から得られた薬物動態（PK）データの説明については、【モジュール 2.6.4、3.1 項】を参照する。

この試験では以下のパラメータを評価した：臨床所見、体重、質的摂餌量、血清サイトカイン分析並びにフローサイトメトリーによる免疫表現型分類及び PD-1 陽性細胞に対する結合状態の経時的分析。

結果：被験物質と関連する臨床所見、体重、摂餌量、サイトカインの変動及びレチファンリマブ又はニボルマブのレプリカの投与に伴う免疫表現型分類の変動はなかった。純正のペムブロリズマブについては、投与後に見られた IL-5 の増加を除き、データは同様であった。

レチファンリマブ及び純正のペムブロリズマブ 10 mg/kg の単回投与後、CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞表面上の PD-1 に対する結合時間が延長したが（PD-1 との結合 80%以上の持続が 28 日間以上）、ニボルマブのレプリカの結合時間は短縮した（PD-1 との結合 80%以上の持続が 21 日間以下）。各抗 PD-1 抗体について、T 細胞上の PD-1 に対する結合データは、抗体の血清中濃度と関連していた。

結論：カニクイザルにレチファンリマブ 10 mg/kg を単回 IV 投与した際の忍容性は良好であった。循環血中の免疫細胞サブセットの変動及びサイトカイン放出の所見は認められなかった。CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞上の PD-1 に対するレチファンリマブの結合プロファイル

は、純正のペムブロリズマブによって示されたものと同様であったが、ニボルマブのレプリカによって示されたものよりも持続し、血清中濃度と相関していた。

3. 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

3.1. カニクイザルを用いた 3 週間反復投与非 GLP 毒性試験

試験デザイン：カニクイザル（1 頭／性別／群）にレチファンリマブを 0（溶媒）、1 又は 100 mg/kg の用量で週 1 回、3 週間にわたり 1 時間かけて IV 持続投与した（【T15-08-05 試験】、非 GLP）。最終投与から 3 日後（投与 18 日目）又は 7 日後（投与 22 日目）に動物を安楽死させた。

この試験では以下のパラメータ及び評価項目の評価を行った：臨床所見、体重、摂餌量、体温、血液学的検査、血液凝固系検査、生化学検査、トキシコキネティクス（TK）のパラメータ、ADA、血清サイトカイン、フローサイトメトリー（免疫表現型分類及び PD-1 陽性細胞に対するレチファンリマブの結合状態の経時的分析について）、肉眼剖検所見、臓器重量及び病理組織学的所見。

結果：レチファンリマブを投与した全動物が安楽死予定日まで生存した。臨床所見、摂餌量、体重、体温、血液学的検査、血液凝固系検査、生化学検査、免疫表現型分類のパラメータ及び肉眼剖検所見にレチファンリマブと関連する変化は見られなかった。

サイトカイン評価：レチファンリマブの投与の結果、インターフェロン γ（IFN-γ）、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10 及び腫瘍壊死因子 α（TNF-α）について、血清中濃度に注目すべき変化は見られなかった。IL-6 で僅かな一過性の増加（100 pg/mL 未満）が、投与から 3 時間後及び 6 時間後に認められたが、投与から 24 時間以内にベースライン値又はそれに近い値に戻った。しかし、溶媒対照の投与後にも類似した程度の IL-6 の増加が見られたため、この変化はレチファンリマブと関連するものとは考えられなかった。100 mg/kg のレチファンリマブを投与した 1 頭のカニクイザルにおいて、投与 1 日目の投与から 3 時間後に最大 1946 pg/mL の IL-6 の孤発の一過性の増加が生じたが、投与から 6 時間後までにベースライン（8 pg/mL）に近い値に戻った。その後、このカニクイザルの投与 8 日目及び投与 15 日目では、投与後に認められた IL-6 の増加はごく僅か（10 pg/mL 未満）であった。このカニクイザルについて、試験中に注目すべき臨床所見は認められなかった。

PD-1 結合：1 mg/kg 又は 100 mg/kg の用量でレチファンリマブを投与した結果、CD4 陽性及び CD8 陽性の T 細胞の表面上の PD-1 に対する結合が飽和した。CD4 陽性及び CD8 陽性の T 細胞上の PD-1 との結合割合（%）は、レチファンリマブを投与した全てのカニクイザルにおいて、投与 18 日目又は投与 22 日目（剖検前の最終時点）を通じて 80%以上で維持された。投与開始前の時点又は対照を投与したカニクイザルでは、結合は全く検出されないか、検出されても僅かであった。

解剖病理学的検査：レチファンリマブを投与したカニクイザルでは、投与 18 日目及び投与 22 日目に、脾臓重量の増加及び赤脾髄における用量依存性の軽度から中等度のリンパ組織球性浸潤が顕著であった。周辺のリンパ球と比較し、リンパ組織球性浸潤を構成する細胞は細胞質の色調が薄く、核形不整が認められた。明瞭な核分裂像がまれに認められた。浸潤は脾臓重量の増加と鏡検所見と相関していた。

TK 及び ADA：TK 及び ADA に関する結果を Table 2 に要約し、詳細を【モジュール 2.6.4、3.2.1 項】に記載する。レチファンリマブを投与したカニクイザルにおける血清中濃度-時間プロファイルから、若干の例外を除き、この動物種の抗体について予想されたプロファイルが示された。4 頭の血清中濃度プロファイルで、3 回目の投与後の方が初回投与後よりもクリアランスが速く、ADA の発現可能性が示された。このうち 3 頭に ADA が確認された。もう 1 頭は投与 18

日目に安楽死させたが、レチファンリマブの血清中濃度が高かったことにより ADA の検出に干渉した可能性があり、当該動物は ADA 陽性と判断された。

Table 2: Summary of Toxicokinetics and ADA Response after Repeated Retifanlimab Administration for 3 weeks

	レチファンリマブ投与群			
	1 mg/kg（グループ 2A/2B）		**100 mg/kg（グループ 3A/3B）**	
TK プロファイルに基づく ADA 陽性疑い例数	**2/4［2002、2501］[a]**		**2/4［3501[b]、3502］[a]**	
ADA 陽性が確認された例数	**2［2002、2501］[a]**		**1［3502］[a]**	
TK（雌雄併合）	C_{max} (mg/mL)	AUC (h· mg/mL)	C_{max} (mg/mL)	AUC (h· mg/mL)
ノンコンパートメント解析（投与 1 週目）	0.0291	**3.74[c]**	3.44	**428[c]**
2 コンパートメント解析（全データ）（ADA が疑われる又は確認された動物を除く）	0.0294	6.49	3.06	548

[a] 角括弧内の数字はカニクイザルの個別の番号を示す。

[b] 投与 18 日目（剖検日）に動物 3501 に ADA は検出されなかった。しかし、レチファンリマブの血清中濃度が ADA 検出に干渉した可能性がある。そのため、当該動物は血清中濃度プロファイルの変化に基づき ADA 陽性と判断された。

[c] $AUC_{inf,\ predicted}$

薬物分布［免疫組織化学検査（IHC）］：本試験のサルから採取した特定の組織（下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、筋肉、結腸、胸腺、脾臓及び扁桃）を用いて、IHC に基づく方法によりレチファンリマブの分布を評価した（詳細は【モジュール 2.6.4、4 項】を参照）。レチファンリマブの染色は、これらの組織に存在するリンパ球に限局していた。サル組織に認められたこれらの所見は、ヒト組織を用いた GLP 組織交差反応性試験（8.1 項）で得られた所見と同等であり、PD-1 発現に関する公表データと一致している。以上を総合すると、これらのデータは PD-1 を発現する組織にレチファンリマブが分布及び結合することを示す直接的な根拠となるものである。

結論：カニクイザルにレチファンリマブ 1 mg/kg 及び 100 mg/kg を週 1 回 3 週間（投与 1 日目、投与 8 日目及び投与 15 日目）IV 持続投与した際の忍容性は良好であった。1 mg/kg 及び 100 mg/kg のいずれのレチファンリマブでも、赤脾髄における用量依存性の軽度から中等度のリンパ組織球性浸潤が認められた。

3.2. カニクイザルにおける 4 週間 GLP 試験［＋10 週間の回復期間］

試験デザイン：カニクイザル（5 頭／性別／群）にレチファンリマブを 0（溶媒）、10、40 又は 150 mg/kg の用量で週 1 回、1 時間かけて IV 持続投与した（GLP 試験、【T19-01-03 試験】）。6 頭のカニクイザル（3 頭／性別／群）の剖検を投与 25 日目に行い、残りのカニクイザル（2 頭／性別／群）の剖検は投与 95 日目に行った。

以下のパラメータについて評価を行った：臨床所見、体重、摂餌評価、身体検査、眼所見、心電図、体温、呼吸数、血圧及び心拍数、神経学的検査、血液学的検査、血液凝固系検査、生化学検査、尿検査、TK のパラメータ、ADA の形成、フローサイトメトリー（免疫表現型分類及び

PD-1 陽性細胞に対するレチファンリマブの結合状態の経時的分析について）、肉眼剖検所見、臓器重量及び病理組織学的所見。

結果：全動物が投与 25 日目又は投与 95 日目の剖検予定日まで生存した。臨床所見、体重、ECG、眼所見、生化学検査パラメータ、尿検査、肉眼病理所見及び臓器重量にレチファンリマブに関連した影響は認められなかった。

血液学的検査：レチファンリマブを投与したいずれの群でも、投与 2 日目（投与から 23 時間後）にリンパ球絶対数の中等度の減少が認められた（投与 1 日前の群平均の 0.45 倍）。投与 8 日目の投与前にリンパ球数がほぼ試験前の値に戻ったが、投与 9 日目（投与から 23 時間後）に全ての用量で一部の雌雄に軽度の減少が認められた（投与 1 日前の 0.47～0.68 倍）。リンパ球は投与 15 日目及び投与 22 日目の投与前に増加したが、投与 16 日目及び投与 23 日目に数頭の雄及び雌で減少した（投与から 23 時間後、0.36～0.54 倍）。

病理組織学的検査：投与 25 日目の投与期間終了時に、レチファンリマブと関連する顕微鏡的変化が IV 投与部位に認められたが、その変化は表皮内血管周囲の微小な多巣性単核細胞浸潤であった（40 mg/kg 以上の雄、10 mg/kg 以上の雌）。回復期間終了時（投与 95 日目）に、10 mg/kg 群の 1 頭の IV 投与部位に浸潤が認められた。この所見は外来性タンパク（mAb）の反復投与で予想される反応である。

投与 25 日目に認められた顕微鏡的変化の一部は、発現が散発性（用量と関連しない）のものであったこと、また発現割合及び／又は重症度はレチファンリマブを投与した動物の方が高いが対照動物にも発現したことから、被験物質との関連性は確かではなかった。これらの所見を Table 3 に要約した。

その他に認められた全ての病理組織学的所見は、カニクイザルの特性としてよく認められる偶発的なもの及び／又は対照のカニクイザルと投与後のカニクイザルにおける発現割合及び重症度が類似するものと考えられたため、レチファンリマブ投与との関連はないと考えられた。

Table 3: Histopathology Observations of Uncertain Relationship to Retifanlimab Treatment

組織	組織学的所見	雄（mg/kg）[a]				雌（mg/kg）[a]			
		0	10	40	150	0	10	40	150
投与部位	浸潤、単核細胞；血管周囲		1R	1	3		1	1	2
	浸潤、混合細胞						1		
	浸潤、単核細胞；濾胞						1R		
脳	浸潤、単核細胞；血管周囲	1		1	2	1R	1		2、1R
甲状腺	浸潤、混合細胞；脂肪組織								1
心臓	浸潤、単核細胞	1、2R	2、1R	2、1R	2、1R	1、1R		1、1R	2、1R
	浸潤、混合細胞；脂肪組織					1			1
大腸、直腸	浸潤、単核細胞；壁						1		1
	浸潤、単核細胞；脂肪組織			1R			1		1
肺	浸潤、混合細胞；血管周囲								1
脊髄	単核細胞浸潤、血管周囲							1R	2
気管	浸潤、混合細胞；脂肪組織								1
膀胱	浸潤、単核細胞；血管周囲	1	1、1R	2、1R	3、1R	1R	2、1R	2、2R	1、1R

[a] いずれの所見も重症度は軽微から軽度であった。値は当該所見が認められた群毎の雌雄の動物数を示す。
R = 回復コホートの動物。

フローサイトメトリー：免疫細胞集団のフローサイトメトリー評価は、投与 1、8、15 及び 22 日目の投与前（PTI）並びに投与終了（EOI）から 23 時間後及び 71 時間後に実施し、回復期間中は週に 1 回実施した。また、当該時点で、CD4 陽性及び CD8 陽性の T 細胞と結合したレチファンリマブを、抗ヒト IgG4 抗体を用いて検出することにより、T 細胞占有率を評価した。

レチファンリマブを投与したカニクイザルでは対照群と比較し、総白血球、T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を含む循環免疫細胞集団の一過性の用量非依存的な低下が、EOI から 23 時間後に認められた。最大の変化は投与 1 日目に認められた。概して免疫細胞集団は EOI から 72 時間まで及び回復期間全体を通じて、ベースラインの値又はそれに近い値まで回復した。レチファンリマブを投与した動物では、循環単球に変化は認められなかった。

この試験のレチファンリマブ投与期間中に、検討した全ての用量（10、40 又は 150 mg/kg）で、PD-1 陽性／CD4 陽性及び PD-1 陽性／CD8 陽性の細胞に対するレチファンリマブの最大結合が認められた。ADA が認められない回復期間の動物では、10 週間の回復期間全体を通して PD-1 陽性／CD4 陽性及び PD-1 陽性／CD8 陽性の T 細胞に対するレチファンリマブの結合が維持され、血清中濃度と相関した。

TK 及び ADA：Table 4 に TK 及び ADA 反応を要約した。本試験の TK 評価に関する詳細な考察は、【モジュール 2.6.4、3.2.2 項】に記載する。

レチファンリマブの初回投与前に採取した検体及び対照群（グループ 1）の検体のいずれからも、いずれの時点でもレチファンリマブは検出されなかった。

レチファンリマブの反復投与後にレチファンリマブの血清中濃度低下の所見が、10、40 及び 150 mg/kg 投与群でそれぞれ 10 頭中 7 頭、10 頭中 4 頭及び 10 頭中 3 頭に見られた。ADA の存在は、10、40 及び 150 mg/kg 投与群でそれぞれ 4 頭、2 頭及び 1 頭に見られた（Table 4）。ADA が確認されなかった動物は全て、最終的に剖検を行う群であった。これらの動物ではレチファンリマブの血清中濃度が高かったため、ADA 検出能に干渉した可能性があった。

レチファンリマブの TK の性差は軽微であったため、結果を併合して提示する。TK パラメータは、全ての動物及び投与間隔のデータを用いた 2 コンパートメント解析により求めた。ただし、ある投与間隔のトラフ濃度が先行するトラフ濃度よりも低くなった場合、当該動物のそれ以後のデータは打ち切りとした。

Table 4:　Summary of Toxicokinetics and ADA Response after Repeated Retifanlimab Administration for 4 weeks

	レチファンリマブ投与群 [a]		
	10 mg/kg（グループ 2）	**40 mg/kg（グループ 3）**	**150 mg/kg（グループ 4）**
TK プロファイルに基づく ADA 陽性疑い例数	7/10［2001、2003*、2005、2501*、2503*、2504、2505］	4/10［3001*、3003*、3004、3005］	3/10［4003*、4005*、4504］
ADA 陽性が確認された例数	4［2001、2005、2504、2505］	2［3004、3005］	1［4504］
C_{max}（mg/mL）	0.240	1.08	3.94
AUC（h· mg/mL）	47.3	206	746

[a] 角括弧内の数字はカニクイザルの個別の番号を示す。

* アスタリスクを付した動物では ADA が確認されなかった。当該動物の剖検は投与 25 日目に行われた。ADA 評価用に収集された検体は投与 22 日目のものであるため、レチファンリマブの血清中濃度が ADA 検出に干渉した可能性がある。

要約：レチファンリマブ最高 150 mg/kg を 4 週間週 1 回 IV 投与した際の忍容性は臨床的に良好であった。認められた作用は、外来性タンパクの注射と関連した循環リンパ球の一過性の減少及び注射部位の僅かな変化に限られた。これらの結果に基づき、NOAEL は 150 mg/kg（両性の平均 C_{max} は 3.94 mg/mL、AUC は 746 h·mg/mL）と考えられた。

投与動物では組織学的に免疫細胞のびまん性浸潤が認められたが、用量反応性はなく、対照動物に類似所見が見られたことから、レチファンリマブとの関連性は確かではないと考えられた。これらの所見は、抗 PD-1 抗体を投与したカニクイザルを用いた反復投与試験で認められた免疫細胞浸潤と類似しており（Wang et al 2014、Herzyk and Haggerty 2018）、抗 PD-1 抗体の作用機序である免疫抑制性 PD-1-PD-L1/L2 経路を介したシグナル伝達の阻害と一致している。

3.3. 13 週間反復投与 GLP 毒性試験

試験デザイン：カニクイザル（5 頭／性別／群）にレチファンリマブを 0、5、20 又は 100 mg/kg の用量で 13 週間にわたり週 1 回、30 分かけて IV 持続投与した（GLP 試験、【T18-02-10 試験】）。投与 88 日目に全動物の剖検を実施した。

以下のパラメータを評価した：臨床所見、体重、血液学的検査、血液凝固系検査、生化学検査、尿検査、眼所見、心電図、TK パラメータ、ADA、フローサイトメトリー（免疫表現型分類について）、サイトカイン／ケモカイン分析、肉眼剖検所見、臓器重量及び病理組織学的所見。

結果：全動物が剖検予定日まで生存した。レチファンリマブに関連する臨床所見、体重、ECG、眼所見、生化学検査、尿検査、肉眼病理所見、臓器重量又は病理組織学的変化は認められなかった。

血液学的検査：5 mg/kg 超を投与した雄では、投与 2 日目にレチファンリマブに関連した軽度のリンパ球数減少が認められたが、用量反応性はなかった。レチファンリマブを投与した雌の一部では投与 2 日目、レチファンリマブを投与した動物の一部では投与 28 日目にリンパ球数の減少が認められたが、発現割合が低く、程度が軽微であり、予測される生理的変動であったため、被験物質との関連性は確かではなかった。投与 88 日目のリンパ球数は特記すべきものではなかった。

5 mg/kg を投与した雌 1 頭で投与 15 日目（規定外の解析）に認められたリンパ球数の軽度の減少は、当該動物の臨床状態に関連するストレス（内因性糖質コルチコイドの増加：測定せず）と一致していたが、被験物質に関連した影響である可能性は否定できなかった。当該動物では投与 15 日目（規定外の解析）及び投与 28 日目に赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）の軽度の減少が認められると共に、投与 21 日目から投与 26 日目に黒色便が認められたことから、消化管失血が示唆された。当該動物に投与 28 日目に認められた平均赤血球ヘモグロビン濃度の低下は、失血に伴う鉄欠乏と一致していた。赤血球量の減少は、投与 28 日目に認められた網状赤血球数の中等度の増加、赤血球分布幅の増加及び有核赤血球数の増加を含む顕著な赤血球再生反応と関連していた。これらの赤血球変化は、自然発生的な消化管異常に伴うものであり、レチファンリマブに関連するものではないと判断された。

血液凝固系検査：投与群では投与 2 日目にレチファンリマブに関連する用量反応性のない軽微から中等度のフィブリノゲン増加が発現したが、外来性タンパクに対する非特異的反応であった可能性がある。5 mg/kg 超を投与した動物に、投与 28 日目又は 88 日目にフィブリノゲンの増加が認められたが、発現割合が低く、対照動物に散発性の発現が認められたことから、レチファンリマブとの関連性は確かではなかった。レチファンリマブに関連するグロブリン又は白血球の増加は併発しなかったことから、炎症反応が維持されたことが示唆される。

フローサイトメトリー（免疫表現型分類）：レチファンリマブに関連する所見は、100 mg/kg を投与した雌に認められた平均単球絶対数の僅かな減少（投与 7 日前の投与前の 0.65 倍）に限定された。

サイトカイン／ケモカイン分析：投与 1 日目及び 85 日目の投与前並びに投与 1、4 及び 24 時間後にサイトカイン分析用の血液検体を採取した。全群の全ての評価時点で、サイトカイン／ケモカイン濃度の過半が定量下限未満（BLQ）であった。

全群を通して数例の動物（対照動物を含む）で、投与後に用量反応性のない測定可能濃度の IL-6 がしばしば認められたが、少なくとも部分的には、レチファンリマブとの関連性を否定できなかった。

投与 1 日目（投与 4 及び 24 時間後）及び投与 86 日目（投与 24 時間後）に、5 mg/kg を投与した雌 1 頭に IL-12 濃度の上昇が認められた。この動物では投与後にのみ IL-12 が検出されたが、低用量の 1 頭にのみ発現したことから、この事象がレチファンリマブに関連する可能性は低いと考えられた。

TK 及び ADA：レチファンリマブの投与前に採取した検体及び対照群（グループ 1）の検体のいずれからも、いずれの時点でもレチファンリマブは検出されなかった。

Table 5 に TK 及び ADA 反応を要約した。本試験の TK 評価に関する詳細な考察は、【モジュール 2.6.4、3.2.3 項】に記載する。

反復投与後にレチファンリマブの血清中濃度低下の所見が、5、20 及び 100 mg/kg 投与群でそれぞれ 10 頭中 8 頭、10 頭中 3 頭及び 10 頭中 1 頭に見られた。このうち、8 頭中 8 頭、3 頭中 2 頭及び 1 頭中 0 頭に ADA 陽性が確認された。これらの動物では、レチファンリマブの曝露量が高かったこと（特にグループ 4 の動物）が ADA の検出に干渉した可能性がある点に注意が必要である。

TK 評価用に検体を投与 1 週目、投与 4 週目及び投与 13 週目に採取した。TK パラメータは、全ての動物及び投与間隔のデータを用いた NCA により求めた。ただし、ある投与間隔のトラフ濃度が先行するトラフ濃度よりも低くなった場合、当該動物の当該投与間隔については TK パラメータを算出しなかった。TK 解析により、曝露量が用量に比例し、線形を示すことが明らかにされた。推定半減期は約 8 日であった。曝露量又は分布に明白な性差は認められなかったため、結果を併合して提示する。

Table 5: Summary of Toxicokinetics and ADA Response after Repeated Retifanlimab Administration for 13 Weeks

	レチファンリマブ投与群		
	5 mg/kg（グループ 2）	**20 mg/kg（グループ 3）**	**100 mg/kg（グループ 4）**
TK プロファイルに基づく ADA 陽性疑い例数	8/10［2001、2002、2003、2004、2501、2502、2503、2505］	3/10［3004、3005、3505］	1/10［4502］
ADA 陽性が確認された例数	8［2001、2002、2003、2004、2501、2502、2503、2505］	2［3004、3005］	0
C_{max}（mg/mL）	0.306	0.960	4.88
AUC（h· mg/mL）	17.0	51.8	237

結論：カニクイザルにレチファンリマブ 5、20 又は 100 mg/kg を 13 週間週 1 回 IV 投与した際の忍容性は良好であった。観察された作用は、投与 2 日目に雄に認められたリンパ球減少及びレチファンリマブを投与した全群に認められたフィブリノゲンの軽微から中等度の増加に限定された。レチファンリマブに関連する病理組織学的所見は認められなかった。これらの結果に基づき、NOAEL は 100 mg/kg/回と判断された。

4. 遺伝毒性試験

レチファンリマブは抗体ベースの 148.2 kDa のタンパクであり、デオキシリボ核酸（DNA）及び他の染色体構成物との直接の相互作用が予測されないため、遺伝毒性試験は行われていない。そのため、標準的な遺伝毒性試験の実施が適切とは考えられない（ICH S6(R1) 2011）。

5. がん原性試験

ICH S6 (R1)（2011）及び ICH S9（2009）の推奨事項に従い、レチファンリマブを用いたがん原性試験は実施していない。

6. 生殖発生毒性試験

レチファンリマブについて、標準的な受胎能及び初期胚発生試験、胚・胎児発生毒性試験、出生前及び出生後発生試験は実施されていない。進行癌の治療薬では、出生前及び出生後発生試験は必要とされていない（ICH S9 2009）。作用機序及び文献に基づく生殖毒性評価（FDA 2019）を踏まえ、レチファンリマブは以下に要約するように妊娠の維持に影響を及ぼすと考えられる。そのため、カニクイザルを用いた胚・胎児発生試験を実施しても有益な情報が得られる可能性は低い。

文献によると、PD-1/PD-L1 経路は妊娠中の胎児に対する母体免疫寛容で重要な役割を果たすことが示唆されている。PD-L1 は、妊娠中のヒト胎盤並びにヒト胎児絨毛の栄養膜合胞体層及び栄養膜細胞層における母体-胎児界面に発現する（Petroff et al 2003、Miko et al 2019）。同種異系マウスモデル（CBA x C57BL/6）の妊娠では、受胎後早くて 10.5 日で胎盤の子宮胎盤界面にて PD-L1 の発現が検出された（Guleria et al 2005、La Rocca et al 2014、Tripathi and Guleria 2015、Miko et al 2019）。受胎後 6.5 日、8.5 日、10.5 日及び 12.5 日に 250 µg から 500 µg のマウス抗 PD-L1 mAb を同種異系妊娠マウスの腹腔内に投与すると、吸収の発生率がアイソタイプ対照（18%）と比較して高くなった（86%）（Guleria et al 2005）。本実験では、同種異系胎児の拒絶反応は T 細胞依存性であった。また、雌の PD-L1 ホモ接合ノックアウト（PD-L1 -/-）マウスでは、雌の PD-L1 ヘテロ接合ノックアウトマウスに比べて吸収の発生率が高くなった（Guleria et al 2005）。妊娠 PD-L1 -/-マウス並びに抗 PD-L1 抗体を投与したマウスでは、当該の対照と比較して母体-胎児界面に IFN-γ 産生 Th1 細胞が多く認められた（Guleria et al 2005）。

他の非臨床試験では、制御性 T 細胞（Tregs）の枯渇により胎児吸収への影響及び妊娠 C57BL/6 マウスの生存に対する PD-L1 阻害の効果が抑制され、他方で野生型マウスから PD-L1 -/-マウスへの Treg 養子移植により胎児の生存率が上昇したことから（Habicht et al 2007）、PD-L1 発現 Treg が胎児の同種抗原に対する免疫寛容に関与していることが示唆されている。これとは逆に、CBA/J x DBA/2J 妊娠マウスモデルでは、PD-1 の阻害により Treg の保護作用が抑制され、対照と比較して流産傾向のマウスでの流産率が高くなった（Wafula et al 2009）。特に、PD-L1 -/-マウス又は抗 PD-1/PD-L1 抗体を介した PD-1/PD-L1 シグナル伝達の阻害により、出生児に明らかな異常が認められなかった（Guleria et al 2005、Habicht et al 2007、Wafula et al 2009）。マウスの母体-胎児界面はヒトのものと類似しており、同種異系妊娠のマウスモデルから得られた知見はヒトにも適応できることが示唆される。

したがって、その作用機序及び妊娠マウスモデルから得られた知見に基づくと、レチファンリマブの投与は正常な妊娠の維持を阻害する可能性がある。この仮説のとおり、妊娠カニクイザルに器官形成期から分娩時までの期間にニボルマブを投与したところ、流産及び新生児の死亡が認められた（Poulet et al 2016）。

妊娠中のレチファンリマブ投与に伴う潜在的リスクには、流産及び死産の発生率の増加がある。更に、PD-1 -/-マウスでは遅発性の自己免疫表現型を発現することから（Okazaki and Honjo

2007、Miko et al 2019）、胎児がレチファンリマブに曝露すると正常な免疫反応が変化するか又は免疫関連疾患発症のリスクが上昇する可能性がある。

7. 局所刺激性試験

別途、局所刺激性試験は実施していないが、ICH S6 (R1)（2011）及び ICH M3 (R2)（2009）のガイドラインに従い、単回投与又は反復投与毒性試験で局所刺激性の評価が可能である。

4 週間 GLP 毒性試験【T19-01-03 試験】の投与期間終了時に、レチファンリマブと関連する顕微鏡的変化が IV 投与部位に認められたが、その変化は表皮内血管周囲の微小な多巣性単核細胞浸潤であった（40 mg/kg 以上の雄、10 mg/kg 以上の雌）。13 週間投与試験では、投与部位に軽微な単核細胞浸潤又は混合細胞浸潤が認められたが、対照群の雄でもこの所見が認められた【T18-02-10 試験】。この所見は外来性タンパク（mAb）の反復投与で予想される反応である。回復期間終了時に、レチファンリマブと関連する顕微鏡的変化は認められなかった。

8. その他の毒性試験

8.1. 組織交差反応性

この試験【T16-02-22 試験】の目的は、広範なヒト組織の凍結切片を用いて、レチファンリマブの交差反応性の可能性を判定することであった。

ビオチン化したレチファンリマブ（MGA012-Bio）を、ヒトの正常組織（可能な場合、組織当たりの提供者 3 名）の凍結切片に、2 通りの濃度（2.5 µg/mL 及び 0.25 µg/mL）で使用し、その後間接法による 2 段階の IHC 染色を行った。MGA012-Bio による特異的染色は、結腸、食道、小腸、腎臓、肺（BALT）、リンパ節、前立腺、脾臓、胸腺、扁桃、尿管、子宮頸部及び子宮を含む複数の組織の単核細胞（リンパ球）の細胞膜及び細胞質に共に認められた。

レチファンリマブで染色されたリンパ球はリンパ器官（リンパ節、脾臓、扁桃）の胚中心で最も高頻度に見られた。ただし、主に髄質にある胸腺及び結腸、食道、小腸、腎臓、尿管、子宮頸部、子宮、肺（BALT）等のいくつかのヒト組織やリンパ球が存在する組織（腎、前立腺等）の粘膜下のリンパ球集簇巣は除く。この染色は、リンパ器官の濾胞内のリンパ球において T 細胞上に発現した PD-1 に関する文献報告（Breitfeld et al 2000、Kim et al 2001、Schaerli et al 2000、Yang et al 2015）から予測されたとおりと判断された。レチファンリマブでは、想定外の組織染色は見られなかった。

8.2. T 細胞依存性抗体産生試験

この試験【T 22-05-01 試験】の目的は、T 細胞依存性の抗体反応に対するレチファンリマブの影響を検討することであった。カニクイザル（雌雄各 2 匹/群）にレチファンリマブを 0（溶媒）及び 20 mg/kg/週の用量で週 1 回、9 週間静脈内投与（投与時間：約 30 分間）した。

本試験では、以下のパラメータ及び評価項目を評価した：死亡、一般状態、体重、定性的な摂餌量、臨床検査パラメータ（血液学的検査、凝固検査及び血液生化学検査）、トキシコキネティクスパラメータ、抗薬物抗体評価及び T 細胞依存性抗体反応。

結果：一般状態、体重、定性的な摂餌量、血液学的検査、凝固検査及び血液生化学検査において、レチファンリマブに関連する変化は認められなかった。

免疫反応：対照（溶媒）群及びレチファンリマブ投与群に割り付けられた全ての動物で、16 日目の免疫後に一次抗 KLH IgM 及び IgG 反応が生じ、44 日目の免疫後に二次抗 KLH IgG 反応が生

じた。抗 KLH IgM 又は IgG には、レチファンリマブに関連すると考えられる変化は認められなかった。

TK 及び ADA：レチファンリマブ投与前に採取した検体及び対照群のいずれの時点の検体からも、レチファンリマブは検出されなかった。

1、15 及び 43 日目の雌サルの全身曝露量は、雄サルとおおむね同程度であった。15 日目及び 43 日目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}168h}$ の平均値は 1 日目よりも高かったが、43 日目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}168h}$ の平均値は 15 日目と同程度であった。$t_{½}$ の平均値は 130～230 時間であった。

1 日目の静注前のベースライン時に ADA 陽性であった動物はおらず、溶媒又はレチファンリマブ 20 mg/kg/週を投与した動物で 57 日目まで毎週評価したところ、ADA 陽性反応は認められなかった。

結論：レチファンリマブは T 細胞依存性抗体反応に影響を及ぼさなかった。20 mg/kg/週の週 1 回の投与は、KLH による免疫に関連する一次及び二次免疫応答の産生に影響を及ぼさなかった。

9. 考察及び結論

カニクイザルを用いてレチファンリマブの可能性のある毒性を評価した。レチファンリマブはカニクイザルの PD-1 と交差反応性を示し、親和性はヒト PD-1 の約 1/6 である。そのため、カニクイザルは薬理学的に適切な動物種であると考えられる。4 週間及び 13 週間の主要な GLP 毒性試験では、レチファンリマブの忍容性が良好であることが確認された［4 週間反復投与試験では最高 150 mg/kg（週 1 回 × 4）、13 週間反復投与試験では最高 100 mg/kg（週 1 回 × 13）］。いずれの試験でも、臨床所見、体重、摂餌量、眼所見、ECG、体温、血圧、心拍数、呼吸数及び神経学的検査の所見は認められなかった。

4 週間反復投与試験では雌雄共に、13 週間反復投与試験では雄のみに初回投与後、リンパ球の僅かな低下が認められた。13 週間反復投与試験では、軽度から中等度のフィブリノゲンの増加が認められたが（投与 2 日目）、明確な用量反応性は認められなかった。リンパ球の減少は、フローサイトメトリーにより評価した循環免疫細胞集団（総白血球、T 細胞、B 細胞及び NK 細胞）の一過性の用量非依存的な低下と相関した。概して免疫細胞集団は投与終了後 72 時間まで及び回復期間全体を通じて、ベースラインの値まで回復した。フィブリノゲンの増加は、外来性タンパクに対する非特異的反応の可能性がある。

13 週間反復投与試験では、明確な用量反応性のない IL-6 の上昇が全用量群（対照動物を含む）で認められた。ただし、高用量群で変化の程度が最大となったため、レチファンリマブとの関連性は否定できない。

4 週間反復投与試験では、いずれの用量でも、投与期間中に PD-1 陽性／CD4 陽性及び PD-1 陽性／CD8 陽性 T 細胞に対するレチファンリマブの結合が最大となった。PD-1 陽性／CD4 陽性及び PD-1 陽性／CD8 陽性 T 細胞に対する結合は、ADA が認められない動物の回復期間を通して維持された。

ヒト化タンパクで予測されるように、4 週間反復投与試験及び 13 週間反復投与試験ではいずれも ADA が認められた。一部の動物で曝露量の減少を伴う ADA の発現が認められたが、両試験の投与期間を通して曝露量は維持された。レチファンリマブの薬物動態は、評価した用量範囲（4 週間反復投与試験では 10～150 mg/kg、13 週間反復投与試験は 5～100 mg/kg）で線形を示した。4 週間反復投与試験及び 13 週間反復投与試験では、半減期はそれぞれ 14 日及び 8 日と推定された。

多くの組織で血管周囲の単核免疫細胞のびまん性浸潤が認められ、4 週間反復投与試験では投与部位に反復投与と一致する所見が見られた。13 週間反復投与試験においても同様の所見（細胞

浸潤）が様々な組織で認められたが、いずれも重症度が最小であったこと、対照動物にも認められたこと、ならびに最小限の単核細胞浸潤がカニクイザルにおいて様々な組織で一般的に偶発的に認められる所見であることが文献（Sato et al 2012）で報告されていることから、いずれもレチファンリマブに関連するもの、あるいは有害なものとは判断されなかった。これらの所見は、発現が用量と関連しない散発性のものであり、対照動物でも明らかであったが、対象動物における発現割合及び／又は重症度はレチファンリマブを投与した動物より低かったため、これらの所見とレチファンリマブとの関連性は不明であった。カニクイザルに他の抗 PD-1 抗体を投与した反復投与試験では、同様のパターンの免疫細胞浸潤が認められた（Wang et al 2014、Herzyk and Haggerty 2018）。この浸潤に関する所見は、抗 PD-1 抗体の作用機序である免疫抑制性 PD-1－PD-L1/L2 経路を介したシグナル伝達の阻害と完全に一致している。レチファンリマブの 13 週間反復投与試験で同様の所見が認められなかった理由は不明である。

レチファンリマブの胚・胎児発生に対する影響の可能性については評価しなかった。PD-1/PD-L1 経路は妊娠中の胎児に対する母体免疫寛容で重要な役割を果たしている。そのため、レチファンリマブの投与により正常妊娠の維持が阻害される可能性がある。更に、公表文献に記載されている試験では、レチファンリマブの作用機序に基づき、レチファンリマブの胎児曝露により、出生児に免疫介在性疾患又は免疫機能の変化をもたらすリスクが生じる可能性があることが示されている。

ヒト組織パネルを用いた組織交差反応性試験では、レチファンリマブの染色は、PD-1 の組織発現の報告（Breitfeld et al 2000、Kim et al 2001、Schaerli et al 2000、Yang et al 2015）に基づいて予測されたとおりと判定され、想定外の組織染色は見られなかった。

レチファンリマブは T 細胞依存性抗体反応に影響を及ぼさなかった。20 mg/kg/週の週 1 回の投与は、KLH による免疫に関連する一次及び二次免疫応答の産生に影響を及ぼさなかった。

要約すると、カニクイザルを用いた 4 週間 GLP 毒性試験（最高 150 mg/kg）及び 13 週間 GLP 毒性試験（最高 100 mg/kg）では、レチファンリマブの忍容性は良好であった。NOAEL は各試験で検討した最高用量であり、4 週間反復投与試験では 150 mg/kg、13 週間反復投与試験では 100 mg/kg であった。この所見は PD-1 阻害の薬理作用と一致していた。レチファンリマブは ADA の形成を誘導したが、毒性試験期間を通して十分な曝露量が維持された。

10. 参考文献

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer Eet al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. J Exp Med 2000 Dec 4;192(11):1545-1552.

Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry: Oncology Pharmaceuticals: Reproductive Toxicity Testing and Labeling Recommendations. May 2019.

Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. J Exp Med 2010 Sep 27;207(10):2175-2186.

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. Annu Rev Immunol. 2005;23:515-548.

Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. J Exp Med 2005 Jul 18;202(2):231-237.

Habicht A, S Dada, M Jurewicz, et al. A Link between PDL1 and T Regulatory Cells in Fetomaternal Tolerance, J Immunol 2007;179(8):5211-5219.

Herzyk DJ, Haggerty HG. Cancer Immunotherapy: Factors Important for the Evaluation of Safety in Nonclinical Studies. AAPS J. 2018 Feb 7;20(2):28.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH S6(R1) Guideline: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. 12 June 2011.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH S9 Guideline: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals. 29 October 2009.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH M3(R2) Guideline: Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. 11 June 2009.

Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, et al. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. J Exp Med. 2001 Jun 18;193(12):1373-1381.

La Rocca C, Carbone F, Longobardi S, Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. Immunol Lett. 2014 Nov;162 (1 Pt A):41-48.

McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, et al. Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. J Clin Invest 2010 Dec;120(12):4546-4557.

Miko E, Meggyes M, Doba K, Barakonyi A, Szereday L Immune Checkpoint Molecules in Reproductive Immunology. Front Immunol 2019 Apr 18;10:846.

Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol. 2007 Jul;19(7):813-824.

Petroff MG, Chen L, Phillips TA, et al. B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. Biol Reprod 2003 May;68(5):1496-1504.

Poulet FM, Wolf JJ, Herzyk DJ, DeGeorge JJ. An evaluation of the impact of PD-1 pathway blockade on reproductive safety of therapeutic PD-1 inhibitors. Birth Def Res (Part B) 2016; 107:108-119.

Sato J, Doi T, Kanno T, et al. Histopathology of incidental findings in cynomolgus monkeys (Macaca Fascicularis) used in toxicity studies. J Toxicol Pathol. 2012;25(1):63-101.

Schaerli P, Willimann K, Lang AB, et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. J Exp Med. 2000 Dec 4;192(11): 1553-1562.

Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. Nat Med. 2006 Oct;12(10):1198-1202.

Tripathi S, Guleria I. Role of PD1/PDL1 pathway, and TH17 and treg cells in maternal tolerance to the fetus. Biomed J 2015 Jan-Feb;38(1):25-31.

Wafula PO, Teles A, Schumacher A, et al. PD-1 but not CTLA-4 blockage abrogates the protective effect of regulatory T cells in a pregnancy murine model. Am J Reprod Immunol. 2009;62:283‑292.

Wang C, Thudium KB, Han M, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. Cancer Immunol Res 2014;2:846-856.

Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, et al. PD-1 expression defines two distinct T-cell sub-populations in follicular lymphoma that differentially impact patient survival. Blood Cancer J 2015;5:e281.

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概要 3
3. トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の概要 4
4. 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧 5
5. 単回投与毒性試験 6
6. 反復投与毒性試験： 非 GLP 7
7. 反復投与毒性試験： 4 週間投与試験 8
8. 反復投与毒性試験： 13 週間投与試験 13
9. 遺伝毒性試験： *In Vitro* 15
10. 遺伝毒性試験： *In Vivo* 15
11. がん原性試験 15
12. 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験 15
13. 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 15
14. 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験 15
15. 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 15
16. 幼若動物を用いた試験 16
17. 局所刺激性試験 16
18. その他の毒性試験 17

1. 毒性試験：一覧表

被験物質：レチファンリマブ							
試験の種類／動物種／系統	**投与方法**	**投与群別のレチファンリマブ投与期間 [a]**	**週 1 回投与の用量（mg/kg）[b]**	**GLP[c]**	**試験施設**	**試験番号**	**CTD の該当箇所**
単回投与毒性							
カニクイザルを用いて限定した毒性評価項目を検討する薬物動態（PK）試験	IV 1 時間持続投与	単回投与	10	非準拠	[redacted][d]	【T15-06-12】 （20077288）	4.2.2.2
反復投与毒性							
カニクイザル	IV 1 時間持続投与	3 週間； 3 又は 7 日間の回復期間	0（溶媒）、1、100	非準拠	[redacted][d]	【T15-08-05】 （20079545）	4.2.3.2
カニクイザル	IV 1 時間持続投与	4 週間； 10 週間の回復期間	0（溶媒）、10、40、150	準拠	[redacted][d]	【T19-01-03】 （20082892）	4.2.3.2
カニクイザル	IV 30 分持続投与	13 週間；	0（溶媒）、5、20、100	準拠	[redacted][e]	【T18-02-10】 （[redacted].292.06）	4.2.3.2
その他の毒性試験：*組織交差反応性試験*							
ヒト	該当せず			準拠	[redacted]	【T16-02-22】 （20085103）	4.2.3.7
その他の毒性試験：*T 細胞依存性抗体反応試験*							
カニクイザル	9 週間 IV 30 分持続投与、0（溶媒）、20			準拠	[redacted][d]	【T22-05-01】 (20336919)	4.2.3.7

[a] レチファンリマブ投与期間：動物は溶媒（0 mg/kg）のみの追加投与も受けている可能性がある。

[b] 無毒性量（NOAEL）に下線を引いた。

[c] 試験に GLP 適合状況に関する陳述が含まれているかどうかを示す。

[d] [redacted]（[redacted]）は、試験の生存期間中のパートを実施した医薬品開発業務受託機関である。試験の一部は他の試験施設で実施され、詳細は各報告書に記載されている。具体的には、MacroGenics, Inc.は T15-06-12（20077288）試験、T15-08-05（20079545）試験及び T19-01-03（20082892）試験の生体試料分析、トキシコキネティクス（TK）、抗薬物抗体（ADA）、サイトカイン評価及びフローサイトメトリー解析の試験施設であった。

[e] [redacted] は、試験の生存期間中のパートを実施した医薬品開発業務受託機関である。MacroGenics, Inc.は生体試料分析及び ADA 評価の試験施設であり、Incyte は TK 評価の試験施設であった。

略語：CTD = コモン・テクニカル・ドキュメント、GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、IV = 静脈内

2. トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の概要

被験物質：レチファンリマブ						
試験の種類	**GLP[a]**	**試験系**	**投与方法**	**用量（mg/kg）**	**試験番号**	**CTD の該当箇所**
レチファンリマブの単回投与 PK 試験	非準拠	カニクイザル	IV（1 時間持続投与）；単回投与	10	【DMB-20.46】（[redacted]20077288-15-1001）（PK）；T15-06-12（20077288）（主要報告書）	4.2.3.1
レチファンリマブの反復投与毒性試験	非準拠	カニクイザル	IV（1 時間持続投与）；週 1 回 × 3	0（溶媒）、1、10	【DMB-20.47】（[redacted]20079545-15-1001）（TK）；T15-08-05（20079545）（主要報告書）	4.2.3.2
レチファンリマブの反復投与毒性試験	準拠	カニクイザル	IV（1 時間持続投与）；週 1 回 × 4	0（溶媒）、10、40、150	【DMB-20.49】（[redacted]20082892-16-1001）（TK）；T19-01-03（20082892）（主要報告書）	4.2.3.2
レチファンリマブの反復投与毒性試験	準拠	カニクイザル	IV（30 分持続投与）；週 1 回 × 13	0（溶媒）、5、20、100	【DMB-18.146】（TK）；T18-02-10（[redacted].292.06）（主要報告書）	4.2.3.2
レチファンリマブの免疫毒性試験	準拠	カニクイザル	IV（30 分持続投与）；週 1 回 × 9	0（溶媒）、20	【DMB-22.99】（TK）；T22-05-01（20336919）（主要報告書)	4.2.3.7

[a] 試験に GLP 適合状況に関する陳述が含まれているかどうかを示す。

3. トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の概要

被験物質：レチファンリマブ										
試験	【DMB-20.46】 T15-06-12 (Appendix 6) (20077288)	【DMB-20.47】 T15-08-05 (Appendix 10) (20079545)		【DMB-20.49】 T19-01-03 (Appendix 19) (20082892)			【DMB-18.146】 T18-02-10 (Appendix 12) ([redacted].292.06)			【DMB-22.99】 T22-05-01 (Appendix 11) (20336919)
動物種	カニクイザル									
投与方法	IV（1 時間持続投与）						IV（30 分持続投与）			
性別（M/F）	1M/1F	2M/2F	2M/2F	5M/5F	5M/5F	5M/5F	5M/5F	5M/5F	5M/5F	2M/2F
用量（mg/kg）	10	1	100	10	40	150	5	20	100	20
$AUC_{inf,pred}$（h•μg/mL）[a]	30222.36 ± 8506.01[b]	6486.86 ± 2978.15[c]	548303 ± 201155[c]	47310 ± 16970[c]	205723 ± 65215[c]	745681 ± 134493[c]	17021[c]	51850 ± 15614[c]	236962 ± 29541[c]	88350[c]

[a] データは平均値 ± 標準偏差で示した。
[b] 全データのノンコンパートメント解析。
[c] 全データの 2 コンパートメント解析
略語：$AUC_{inf,pred}$ = 無限大時間に外挿した予測血清中濃度曲線下面積、F = 雌、IV = 静脈内、M = 雄、PK = 薬物動態

4.　毒性試験：　被験物質（バッチ毎）一覧

被験物質：レチファンリマブ					
バッチ番号	SE-HPLC による純度（%）	規格設定された不純物		試験番号	試験の種類
		*不純物A[a]	*不純物L		
申請規格 [b]	≥ [redacted]%	≤ [redacted]%	< [redacted] EU/mg	該当せず	該当せず
[redacted]	[redacted]	[redacted]	< [redacted]	【T15-06-12】（20077288）	非 GLP 単回投与 PK 試験
[redacted]	[redacted]	[redacted]	< [redacted]	【T15-08-05】（20079545）	非 GLP 反復投与毒性
[redacted]	[redacted]	[redacted]	< [redacted]	【T19-01-03】（20082892）	GLP 反復投与毒性
[redacted]	[redacted]	[redacted]	< [redacted]	【T18-02-10】（[redacted].292.06）	GLP 反復投与毒性
[redacted]	[redacted]	[redacted]	< [redacted]	【T22-05-01】（20336919）	GLP 免疫毒性

[a] [redacted]：[redacted]。[redacted]。

[b] 出荷規格は通常、毒性試験用ロットが製造された時点では確立されていない。臨床用の申請出荷規格は、参照用としてのみ記載した。
組織交差反応性試験には特にビオチン化した被験物質を使用。
略語：GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、SE-HPLC = サイズ排除高速液体クロマトグラフィー、[redacted] = [redacted]

5. 単回投与毒性試験

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	用量（mg/kg）	性別及び動物数／群	観察された最大非致死量（mg/kg）	特記すべき所見	試験番号
カニクイザル	IV、1 時間持続投与（リン酸緩衝生理食塩水）	10	1M/1F	該当せず	本試験は、限定した毒性評価項目を検討した単回投与 PK 試験である。 レチファンリマブを単回 IV 投与した際の忍容性は良好であった。 レチファンリマブの投与に伴う被験物質と関連する臨床所見、体重及び摂餌量の変化は認められなかった。 評価した免疫表現型分類パラメータに変化は認められなかった。血清中にインターフェロン γ（IFN-γ）、インターロイキン（IL）-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及び腫瘍壊死因子 α（TNF-α）は検出されず、レチファンリマブの投与後にいずれの濃度も測定の定量下限（LLOQ）未満に維持された。 PK 解析の結果については、【モジュール 2.6.4、3.1 項】を参照する。	【T15-06-12】（20077288）

略語：F = 雌、h = 時間、IV = 静脈内、M = 雄

6.　反復投与毒性試験：　非 GLP

動物種／系統	投与方法（溶媒／投与形態）	レチファンリマブ投与期間	用量（mg/kg）週 1 回投与	性別及び動物数／群	NOAEL（mg/kg）	特記すべき所見	試験番号
カニクイザル	IV、1 時間持続投与（リン酸緩衝生理食塩水）	3 週間	0（溶媒）、1、100	2M/2F	100	レチファンリマブを 3 週間週 1 回 IV 投与した際の忍容性はいずれの用量でも良好であった。 臨床所見、摂餌量、体重、体温、血液学的検査、血液凝固系検査若しくは生化学検査のパラメータ及び肉眼剖検所見に被験物質と関連する変化は見られなかった。 血清中 IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10 及び TNF-α に注目すべき変化は認められなかった。100 mg/kg を投与した 1 頭では、投与 1 日目の投与から 3 時間後に IL-6 の一過性の増加が認められたが、その後の投与日では当該動物での増加幅が減少した。 両用量で、赤脾髄における用量依存性の軽度から中等度のリンパ組織球性浸潤の脾臓の変化が認められた。周辺のリンパ球と比較し、リンパ組織球性浸潤を構成する細胞は細胞質の色調が薄く、核形不整が認められた。明瞭な核分裂像がまれに認められた。浸潤は脾臓重量の増加と顕微鏡的に相関していた。	【T15-08-05】（20079545）

略語：F = 雌、h = 時間、IV = 静脈内、M = 雄、NOAEL = 無毒性量

7.　反復投与毒性試験：　4 週間投与試験

報告書の題名：カニクイザルを対象にレチファンリマブのトキシコキネティクス及び薬力学的評価項目を評価する 4 週間週 1 回 IV 持続投与、10 週間の回復期間を設けた反復投与毒性試験							**試験番号：**【T19-01-03】（20082892）	
動物種／系統：カニクイザル（*Macaca fascicularis*）	**投与期間：**週 1 回（対照 1 回、実薬 3 回）[a]						**CTD の該当箇所：**4.2.3.2	
試験開始時の年齢：2.2～3.9 歳	**投与後の期間：**3 又は 73 日間						**GLP 適合状況：**準拠	
初回投与日：20■年■月■日	**投与方法：**静脈内持続投与（5.88 mL/kg/1 時間）							
溶媒／投与形態：注射用生理食塩水、USP（0.9%塩化ナトリウム）								
特記事項：ADA、フローサイトメトリー（末梢血免疫表現型分類、薬力学）								
NOAEL：150 mg/kg								
用量レベル（mg/kg）[a]	**0（対照）**		**10**		**40**		**150**	
動物数：[b]	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**
TK（平均値）：[c]								
投与 1 回目の NCA モデリング： $C_{max,obs}$（µg/mL） AUC(0-7 days)（h·µg/mL）			 251 18997		 1140 82108		 4114 305355	
全投与の 2 コンパートメントモデル： $C_{max,pred}$（µg/mL） AUC（h·µg/mL） CL（mL/h/kg）			 240 47310 0.236		 1078 205723 0.210		 3938 745681 0.208	
ADA： 総評価数[d] ADA 陽性確認総数[d] 投与 22 日目（投与期間）の投与前の評価数[d] 投与 22 日目の ADA 陽性			 7 4 (7) 1		 4 2 (4) 0		 3 1 (3) 0	

7. 反復投与毒性試験： 4週間投与試験（続き）

用量レベル（mg/kg）[a]	**0（対照）**		**10**		**40**		**150**	
動物数：[b]	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**
TK（平均値）：[c]								
投与22日目のADA陽性			1		0		0	
投与5～13週目（回復期間）の評価数			(3)		(2)		(1)	
投与5週目のADA陽性			0		1		0	
投与6週目のADA陽性			1		0		0	
投与7週目のADA陽性			0		1		1	
投与9週目のADA陽性			0		1		0	
投与10週目のADA陽性			1		0		0	
投与13週目のADA陽性			1		0		0	
特記すべき所見								
死亡又は切迫屠殺	特記すべき所見なし							
臨床所見	特記すべき所見なし							
摂餌量	特記すべき所見なし							
体重	特記すべき所見なし							
獣医学的身体検査	特記すべき所見なし							
眼底検査	特記すべき所見なし							
心電図	特記すべき所見なし							
体温	特記すべき所見なし							
呼吸数	特記すべき所見なし							
血圧及び心拍数	特記すべき所見なし							
神経学的検査	特記すべき所見なし							

7. 反復投与毒性試験： 4 週間投与試験（続き）

用量レベル（mg/kg）[a]	**0（対照）**		**10**		**40**		**150**	
動物数：[b]	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**
血液学的検査：								
リンパ球[e] （群平均、$10^3/\mu L$） 投与 2 日目（EOI から 23 時間後）	7.49	5.61	3.60*	4.64	3.05*	3.6*	4.88	2.76
大型非染色球[f] （群平均、$10^3/\mu L$） 投与 15 日目（投与前） 投与 16 日目（EOI から 23 時間後） 投与 22 日目（投与前） 投与 23 日目（EOI から 23 時間後）	 0.05 0.04 0.07 0.04	 0.06 - 0.05 -	 - - - -	 - - - -	 0.14 0.12 0.11 -	 - - - -	 0.15 0.12 0.21* 0.13*	 0.08 - 0.08 -
血液凝固系検査	特記すべき所見なし							
生化学検査	特記すべき所見なし							
尿検査	特記すべき所見なし							
フローサイトメトリー、末梢血	レチファンリマブを投与したカニクイザルでは対照群と比較し、総白血球、T 細胞、B 細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞を含む循環免疫細胞集団の一過性の用量非依存的な低下が、投与終了から 23 時間後に認められた。最大の変化は投与 1 日目の初回投与後に認められ、その後投与 8、15 又は 22 日目の投与後はより小さな一過性の変化が認められた。概して免疫細胞集団は EOI 後 72 時間まで及び回復期間全体を通じて、ベースラインの値又はそれに近い値まで回復した。レチファンリマブを投与したカニクイザルでは対照群と比較して、循環単球に変化は認められなかった。							

7. 反復投与毒性試験： 4 週間投与試験（続き）

用量レベル（mg/kg）[a]	**0（対照）**		**10**		**40**		**150**	
動物数：[b]	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**
循環 T 細胞上のプログラム細胞死タンパク 1（PD-1）に対するレチファンリマブの結合	この試験のレチファンリマブ投与期間中に、10、40 又は 150 mg/kg の用量で、PD-1 陽性／CD4 陽性及び PD-1 陽性／CD8 陽性細胞に対するレチファンリマブの最大結合が認められた。ADA 反応が出現しなかった回復期間中のカニクイザルでは、レチファンリマブの血清中濃度は 29 µg/mL 超を維持し、PD-1 陽性／CD4 陽性及び PD-1 陽性／CD8 陽性 T 細胞に対するレチファンリマブの最大結合は、10 週間の回復期間を通じて維持された。当該カニクイザルでは、T 細胞上の PD-1 調節の所見は認められなかった。ADA 反応が出現した回復期間中のカニクイザルでは、PD-1 陽性 T 細胞に対するレチファンリマブ結合の頻度はベースラインレベルまで低下した。ADA 陽性カニクイザルの PD-1 陽性／CD4 陽性及び PD-1 陽性／CD8 陽性 T 細胞に対するレチファンリマブの最大結合からのこの低下は、レチファンリマブの血清中濃度が約 25 µg/mL を下回った際に生じた。しかしながら、この見かけの閾値の関連性が、ADA 陰性のカニクイザルにも適用されるかは不明である。							
終了時剖検（投与 25 日目） **評価動物数：**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**
肉眼病理所見	特記すべき所見なし							
臓器重量	特記すべき所見なし							
病理組織学的所見（発現割合）：[g]								
部位、投与、IV： 浸潤、単核細胞； 血管周囲 軽微	0	0	0	1	1	1	3	2

7. 反復投与毒性試験： 4 週間投与試験（続き）

用量レベル（mg/kg）[a]	**0（対照）**		**10**		**40**		**150**	
動物数：[b]	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**
回復時剖検（投与 95 日目） 評価動物数：	**M：2**	**F：2**	**M：2**	**F：2**	**M：2**	**F：2**	**M：2**	**F：2**
肉眼病理所見	特記すべき所見なし							
臓器重量	特記すべき所見なし							
病理組織学的所見	特記すべき所見なし							

[a] 投与 8、15 及び 22 日目に、該当する動物に適切な末梢静脈から溶媒又は被験物質を静脈内持続投与した。投与時間の目安は 60 分とした。投与のために動物を一時的に拘束したが、鎮静は実施しなかった。いずれの投与製剤も治験実施計画書に規定された基準を満たした。

[b] 投与 25 日目に主試験の動物（3 頭/性別/群）を安楽死させ、投与 95 日目に回復期の動物（2 頭/性別/群）を安楽死させた。

[c] レチファンリマブの薬物動態は評価した用量範囲（10～150 mg/kg）では線形を示し、性差は軽微であった。いずれの投与製剤も治験実施計画書に規定された許容基準を満たしたため、TK 解析では名目用量を用いた。

[d] TK プロファイルの変化に基づき ADA 陽性が疑われた動物のみを評価した。この 14 頭のうち、7 頭は ADA 陽性ではないことが確認された（10、40 及び 150 mg/kg 群でそれぞれ 7 頭中 3 頭、4 頭中 2 頭及び 3 頭中 2 頭）。当該動物は全て、最終的に剖検を行う群であったため（投与 25 日目）、ADA 評価用に収集された検体は投与 22 日目のものであり、レチファンリマブの血清中濃度が ADA 検出に干渉した可能性がある。投与 22 日目に ADA 陽性が確認された 1 頭（10 mg/kg 群の雄）では、全用量群の他の全動物（20,000 ng/mL 超）と比較して、当該時点でレチファンリマブの血清中濃度がはるかに低かった（530 ng/mL）。その結果、1 頭を除きその後の TK 解析で ADA が検出されなかったと仮定し、トラフ濃度が先行するトラフ濃度よりも低くなった場合、その時点以降のデータは打ち切りとした。

[e] 投与 8 日目の投与前にリンパ球がほぼ試験前の値に戻ったが、投与 9 日目（投与から 23 時間後）に全ての用量レベルで一部の雌雄に軽度の減少が認められた（投与前の 0.47～0.68 倍）。リンパ球は投与 15 日目及び投与 22 日目の投与前に増加したが、投与 16 日目及び投与 23 日目（投与から 23 時間後）に数頭の雄及び雌で減少した（試験前の 0.36～0.54 倍）。

[f] レチファンリマブと関連する大型非染色球の変化は非特異的であり、期間中に白血球の他の変化は認められなかったため、これらに毒性学的関連はないと考えられた。

[g] 投与部位の所見は外来性タンパク質（モノクローナル抗体）の反復投与で予測される反応である。他の顕微鏡的変化は、発現が（用量と関連しない）散発性のものであったこと、また発現割合及び／又は重症度はレチファンリマブを投与した動物の方が高いが対照動物にも発現したことから、被験物質との関連性は確かではなかった。これらの所見には以下のものが含まれる。脳（髄膜及び／又は脈絡叢：対照及びレチファンリマブ投与後）、脊髄（レチファンリマブ投与後）、膀胱（対照及びレチファンリマブ投与後）における、僅かから軽度の血管周囲の単核細胞浸潤。甲状腺（レチファンリマブ投与後）、心臓（対照及びレチファンリマブ投与後）及び気管（レチファンリマブ投与後）に付随する脂肪組織における、僅かな混合細胞浸潤。直腸壁（レチファンリマブ投与後）における僅かから軽度の単核細胞炎症。

– 所見なし、ADA = 抗薬物抗体、AUC = 無限大時間に外挿した単回投与の血清中濃度曲線下面積、AUC(0-7 days) = 0 時間から投与 7 日目までの血清中濃度曲線下面積、$C_{max,obs}$ = 観察された最高血清中濃度、$C_{max,pred}$ = モデル予測最高血清中濃度、CL = 薬物クリアランス、NCA = ノンコンパートメント解析、TK = トキシコキネティクス

* Dunnett/Dunn 法を用いた分散分析（ANOVA）（≤ 0.05）。

8. 反復投与毒性試験： 13 週間投与試験

動物種／系統：カニクイザル（Macaca fascicularis）
試験開始時の年齢：2～4 歳
初回投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日
特記事項：5 頭/性別/群
NOAEL：100 mg/kg

投与期間：週 1 回、13 週間
投与後の期間：3 日間
投与方法：IV 持続投与
対照物質：0.9%塩化ナトリウム注射液、USP（滅菌生理食塩水）

試験番号：【T18-02-10】（[redacted].292.06）
被験物質：レチファンリマブ
試験の標題：カニクイザルにおけるレチファンリマブの 13 週間の週 1 回静脈内投与後の毒性及びトキシコキネティクス試験（GLP）
GLP 適合状況：米国連邦規則集 21 章パート 58（1979 年 6 月 20 日発効）

週 1 回投与の用量（mg/kg）：	**0**		**5**		**20**		**100**	
動物数：	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**
TK（血漿）：	-	-	-	-	-	-	-	-
C_{max}（μg/mL）	-	-						
投与 1 週目			120 ± 8.4	114 ± 8.7	467 ± 44	497 ± 70	2525 ± 152	2545 ± 128
投与 4 週目			192	187	832 ± 190	838 ± 127	4105 ± 426	3711 ± 445
投与 13 週目			307	304	968 ± 341	953 ± 93	5243 ± 224	4520 ± 1196
Tmax（h）	-	-						
投与 1 週目			0.70 ± 0.4	0.70 ± 0.4	0.70 ± 0.4	0.90 ± 0.5	1.10 ± 0.5	1.10 ± 0.5
投与 4 週目			4.50	0.50	0.75 ± 0.5	0.50 ± 0	1.70 ± 1.6	1.00 ± 0.6
投与 13 週目			1.50	1.50	1.50 ± 0	1.00 ± 0.6	2.10 ± 1.3	0.90 ± 0.5
$AUC_{0\text{-}167.5hr}$（hr*μg/mL）投与 1 週目	-	-	9477 ± 338	8709 ± 762	35157 ± 5004	36608 ± 2344	195165 ± 6032	179059 ± 12029
$AUC_{0\text{-}167.5hr}$（hr*μg/mL）投与 4 週目			21344	19103	73245 ± 15330	69127 ± 18778	369924 ± 59801	322399 ± 76836
$AUC_{0\text{-}71.5hr}$（hr*μg/mL）投与 13 週目			16860	17183	50618 ± 23347	53082 ± 7882	267361 ± 23071	206563 ± 36012
t½ term（h）	-	-						
投与 1 週目			212.30 ± 55.8	166.57 ± 55	227.34 ± 56.1	221.37 ± 40.6	215.86 ± 36.3	207.86 ± 87.3
投与 4 週目			197.63	179.22	136.91 ± 38.7	193.07 ± 93.1	196.67 ± 25.3	161.24 ± 49.3
投与 13 週目			190.02	142.54	133.14 ± 90.7	105.62 ± 25.3	166.54 ± 40	90.02 ± 30.0
特記すべき所見：	-	-	-	-	-	-	-	-
死亡又は切迫屠殺	0	0	0	0	0	0	0	0
詳細な臨床所見	-	-	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-	-	-
心電図	-	-	-	-	-	-	-	-
眼所見	-	-	-	-	-	-	-	-
生化学検査	-	-	-	-	-	-	-	-

8. 反復投与毒性試験： 13 週間投与試験（続き）

週 1 回投与の用量（mg/kg）：	**0**		**5**		**20**		**100**	
動物数：	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**	**M：5**	**F：5**
血液凝固系検査：軽微から中等度の増加（統計学的に有意ではない） フィブリノゲン（mg/dL）								
投与 2 日目	277	254	406	333	309	260	312	367
投与 28 日目	223	261	233	320	266	218	262	226
投与 88 日目	242	211	273	225	278	211	248	247
尿検査／尿生化学検査	-	-	-	-	-	-	-	-
フローサイトメトリー（T 細胞、B 細胞、NK 細胞及び単球）	-	-	-	-	-	-	-	-
サイトカイン（IFN-γ、IL-10、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-8、IL-12、TNF-α）：投与 1 及び 85 日目－投与前、投与 1、4、24 時間後	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-6（pg/mL） 投与 1 日目	1 時間－6.76		投与前－3.17 1 時間－8.99 4 時間－6.70		投与前－該当せず 1 時間－5.96 4 時間－7.36		投与前－該当せず 1 時間－24.34 4 時間－3.53	
投与 85 日目	-		投与前－該当せず 1 時間－65.75 4 時間－該当せず		投与前－該当せず 1 時間－11.12 4 時間－該当せず		投与前－該当せず 1 時間－該当せず 4 時間－該当せず	
臓器重量	-	-	-	-	-	-	-	-
肉眼病理所見	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的所見	-	-	-	-	-	-	-	-

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、M = 雄、F = 雌、N/A = 該当せず、TK = トキシコキネティクス

- = 被験物質関連の所見なし

9. 遺伝毒性試験： *In Vitro*

レチファンリマブを用いた in vitro 遺伝毒性試験は実施していない。

10. 遺伝毒性試験： *In Vivo*

レチファンリマブを用いた in vivo 遺伝毒性試験は実施していない。

11. がん原性試験

レチファンリマブを用いたがん原性試験は実施していない。

12. 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験

レチファンリマブを用いた生殖発生毒性試験は実施していない。

13. 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

レチファンリマブを用いた生殖発生毒性試験は実施していない。

14. 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

レチファンリマブを用いた生殖発生毒性試験は実施していない。

15. 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

レチファンリマブを用いた生殖発生毒性試験は実施していない。

16. 幼若動物を用いた試験

特に幼若動物を用いたレチファンリマブの試験は実施していない。

17. 局所刺激性試験

別途、局所刺激性試験は実施していないが、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S6（R1）（2011）及び ICH M3（R2）（2009）のガイドラインに従い、単回投与又は反復投与毒性試験で局所刺激性の評価が可能である。そのため、これまでに実施した全ての毒性試験で、カニクイザルにおける局所刺激性を 1～150 mg/kg の用量で評価した。

4 週間 GLP 毒性試験［【T19-01-03】（20082892）試験］の投与期間終了時に、レチファンリマブと関連する顕微鏡的変化が IV 投与部位に認められたが、その変化は表皮内血管周囲の微小な多巣性単核細胞浸潤であった（40 mg/kg 以上の雄、10 mg/kg 以上の雌）。この所見は外来性タンパク質（モノクローナル抗体）の反復投与で予想される反応である。回復期間終了時に、レチファンリマブと関連する顕微鏡的変化は認められなかった。

詳細は【モジュール 2.6.6、7 項】を参照する。

18. その他の毒性試験

被験物質：レチファンリマブ					
動物種	**試験の標題**	**GLP[a]**	**用量（μg/kg）**	**特記すべき所見**	**試験番号**
ヒト	ヒトの正常組織におけるレチファンリマブの組織交差反応性試験	準拠	0.25、2.5	レチファンリマブでは、想定外の組織染色は見られなかった。 レチファンリマブで染色されたリンパ球はリンパ器官（リンパ節、脾臓、扁桃）の胚中心で最も高頻度に見られた。ただし、主に髄質にある胸腺及び結腸、食道、小腸、尿管、子宮頸部、肺（BALT）やリンパ球が存在する組織（腎、前立腺）の粘膜下のリンパ球集簇巣は除く。 染色は、リンパ器官の濾胞内のリンパ球において T 細胞上に発現した PD-1 に関する文献報告から予測されたとおりと判断された。	【T16-02-22】（20085103）

[a] 試験に GLP 適合状況に関する陳述が含まれているかどうかを示す。

18. その他の毒性試験（続き）

免疫毒性試験	**報告書の標題：**INCMGA00012（レチファンリマブ）のカニクイザルを用いた週 1 回静脈内投与による T 細胞依存性抗体反応試験		
被験物質：レチファンリマブ			
動物種／系統：サル／カニクイザル	**投与期間：**9 週間 [a]	**試験番号：**【T22-05-01】（[redacted] No. 20336919）	
試験開始時の年齢：2.55～3.6 歳	**投与後の期間：**14 日間	**CTD の該当箇所：**4.2.3.7	
初回投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日	**投与方法：**静脈内持続投与 [a]	**GLP 適合状況：**準拠	
溶媒／投与形態：対象物質：0.9%塩化ナトリウム；**免疫刺激物質：**キーホールリンペットヘモシアン（KLH）；**免疫刺激物質の溶媒：**注射用滅菌水 USP			
特記事項：抗 KLH 抗体分析（IgM 及び IgG）によるキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）の一次刺激に対する T 細胞依存性抗体応答（TDAR）			

用量レベル（mg/kg/week） [a]	**0（溶媒）**		**20**	
動物数 [b]	**M：2**	**F：2**	**M：2**	**F：2**
トキシコキネティクス（平均） [c]				
INCMGA00012				
投与 1 日目（評価例数）	（4）		（2）	（2）
C_{max}（μg/mL）	BQL		425	529
$AUC_{0\text{-}168h}$（h*μg/mL）			40200	42900
投与 15 日目（評価例数）	（4）		（2）	（2）
C_{max}（μg/mL）	BQL		740	806
$AUC_{0\text{-}168h}$（h*μg/mL）			69400	69700
投与 43 日目（評価例数）	（4）		（2）	（2）
C_{max}（μg/mL）	BQL		847	792
$AUC_{0\text{-}168h}$（h*μg/mL）			83200	73500
抗薬物抗体（ADA） [d]	0/2（0%）	0/2（0%）	0/2（0%）	0/2（0%）

18. その他の毒性試験（続き）

用量レベル（mg/kg/week）[a]	0（溶媒）		20	
動物数 [e]	M：2	F：2	M：2	F：2
特記すべき所見				
予定外の安楽死	0	0	0	0
臨床所見 [e]	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-
体重	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-
血液凝固系検査	-	-	-	-
生化学検査	-	-	-	-
キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に対するT細胞依存性抗体産生（TDAR）	投与23日目（免疫後7日）から投与37日目（免疫後21日）までの測定で、1群及び2群の全ての動物で投与16日目の免疫後に一次抗KLH IgM及びIgG反応が認められた。 1群及び2群の全ての動物で、免疫後44日目（投与51日目［二次免疫後7日］の測定）に二次的な抗KLH IgG反応がみられた。二次免疫後の抗IgG応答は、一次免疫後に測定された値よりも大きかった。 全体として、レチファンリマブを投与した動物から得られたデータを対照群の動物と比較したところ、抗KLH IgM及びIgG値にレチファンリマブに関連した差は認められなかった。			

[a] 被験物質および対照物質を、週1回、計9回（1、8、15、22、29、36、43、50、及び57日目）、静脈内点滴（5.0 mL/kg;目標30分）により投与した。
[b] 全ての動物は71日目に試験を終了した。
[c] 対照群の評価した全ての血清検体及びレチファンリマブ投与群の投与1日目（投与前）に評価した全ての血清検体が定量限界（BQL；0.0782 µg/mL）未満であった。投与1日目、15日目及び43日目における雌サルの全身曝露量は、雄サルとおおむね同程度であった。
[d] 評価例数当たり1回以上ADA陽性が確認された例数（陽性率）を示す。投与1日目の点滴静注前のベースライン時にADA陽性は認められず、投与57日目（8、15、22、29、36、43、50又は57日目）まで毎週評価したところ、溶媒又はレチファンリマブを投与した動物にADA陽性は認められなかった。
[e] 一般状態及び生死の評価のため、少なくとも1日1回、ケージ周囲の観察を実施した。
– 所見なし。
ADA = 抗薬物抗体；$AUC_{0\text{-}168h}$ = 0時間から投与168時間までの血清中濃度曲線下面積；BQL = 定量限界以下； C_{max} =最高血清中濃度；F = 雌；M = 雄。