CTD 第 2 部

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6　毒性試験の概要文

MSD 株式会社

目次

頁

表一覧 2
図一覧 3
略号及び用語の定義 4
2.6.6.1　まとめ 5
2.6.6.2　単回投与毒性試験 6
2.6.6.3　反復投与毒性試験 6
2.6.6.3.1　カニクイザルの1ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（SN[redacted]396） 6
2.6.6.3.2　カニクイザルの6ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（TI[redacted]-1084） 8
2.6.6.4　遺伝毒性試験 14
2.6.6.5　がん原性試験 14
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 14
2.6.6.7　局所刺激性試験 23
2.6.6.8　その他の毒性試験 23
2.6.6.8.1　抗原性試験 23
2.6.6.8.2　免疫毒性試験 24
2.6.6.8.2.1　抗マウス PD-1抗体（muDX400[redacted]）：B 型肝炎ワクチン（[redacted]）を用いたマウス探索的反復皮下投与免疫毒性試験（TI[redacted]-1105） 24
2.6.6.8.3　作用機序に関する試験 26
2.6.6.8.4　依存性試験 26
2.6.6.8.5　代謝物の試験 26
2.6.6.8.6　不純物の試験 26
2.6.6.8.7　その他の試験 26
2.6.6.8.7.1　カニクイザルの正常組織における MK-3475（SCH 900475）の交差反応性試験（SN[redacted]395） 26
2.6.6.8.7.2　ヒトの正常組織における MK-3475（SCH 900475）の交差反応性試験（SN[redacted]394） 27
2.6.6.9　考察及び結論 28
2.6.6.10　参考文献 30

C Confidential

表一覧

頁

表2.6.6: 1　毒性試験一覧 5
表2.6.6: 2　カニクイザルに6、40又は200 mg/kg の MK-3475を静脈内（ボーラス）投与したときの初回投与後（試験0～7日目）及び5回目の投与後（試験28～35日目）のTK パラメータ［平均値（変動係数）、雌雄合算］ 7
表2.6.6: 3　カニクイザルに MK-3475を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験1日目（平均値 ± 標準誤差） 10
表2.6.6: 4　カニクイザルに MK-3475を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験1日目（抗 MK-3475抗体陽性動物除外後のデータ）（平均値 ± 標準誤差） 10
表2.6.6: 5　カニクイザルに MK-3475を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験71日目（平均値 ± 標準誤差） 11
表2.6.6: 6　カニクイザルに MK-3475を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験71日目（抗 MK-3475抗体陽性動物除外後のデータ）（平均値 ± 標準誤差） 11
表2.6.6: 7　カニクイザルに MK-3475を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験141日目（平均値 ± 標準誤差） 12
表2.6.6: 8　カニクイザルに MK-3475を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験141日目、（抗 MK-3475抗体陽性動物除外後のデータ）（平均値 ± 標準誤差） 12
表2.6.6: 9　カニクイザルに MK-3475を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験155日目（平均値 ± 標準誤差） 13
表2.6.6: 10　1ヵ月及び6ヵ月間静脈内投与試験での性成熟した雄及び雌の数 14
表2.6.6: 11　同種異系妊娠マウスの種々のモデルにおける流産率 17
表2.6.6: 12　MK-3475とニボルマブの比較 20
表2.6.6: 13　TT[redacted]-1105試験：　投与方法の概要 25
表2.6.6: 14　MK-3475の全身曝露量比 29

C Confidential

図一覧

頁

図2.6.6: 1　ヒトにおける IgG の胎盤移行の推移.....21
図2.6.6: 2　ヒトにおける在胎期間に対する胎児と母体の各 IgG 比.....22
図2.6.6: 3　カニクイザルとアカゲザルにおける胎児と母動物の IgG 比.....22

Confidential

略号及び用語の定義

略号	定義	
ADA	Anti-Drug Antibodies	抗薬物抗体（抗 MK-3475抗体）
AUC	Area Under the Curve	濃度－時間曲線下面積
C_{max}	Observed Maximum Concentration	最高血中濃度
DAP	3,3’- Diaminobenzidine	3,3’-ジアミノベンジジン
ePPND	enhanced pre- and postnatal development	拡張型出生前及び出生後の発生
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 Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL	Interleukin	インターロイキン
NOEL	No-Observed-Effect Level	無影響量
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect Level	無毒性量
PD	Programmed Cell Death	プログラム細胞死
PD-L	PD-Ligand	PD リガンド
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
RSV	Respiratory Syncytial Virus	RS ウイルス
SEB	*Staphylococcus* Enterotoxin B	ブドウ球菌エンテロトキシン B
$t_{1/2}$	Elimination Half-Life	消失半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	Time to Reach C_{max}	C_{max} 到達時間
w/v	Weight/Volume	重量／体積

C Confidential

2.6.6.1　まとめ

ペムブロリズマブ（遺伝子組換え）（以下、MK-3475又は SCH 900475）の毒性は、ICH S6（R1）「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」及び ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」などの非臨床安全性評価ガイドラインに準拠して評価した[表 2.6.6: 1]。毒性試験としては、カニクイザルの1ヵ月及び6ヵ月間反復投与長期毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）を実施した。ICH S9によれば製造販売承認申請のためには3ヵ月間の反復投与毒性試験で十分であるが、ICH S6（R1）の推奨に従って6ヵ月間の反復投与毒性試験を実施した。さらに、抗 PD-1抗体の投与により、ワクチン接種及びリコール反応後に免疫関連の毒性が生じる可能性を検討するために、代替抗体である抗マウス PD-1モノクローナル抗体を用いて、マウスの T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験を実施して免疫毒性を評価した。

これらの毒性試験を裏付けるため、MK-3475のトキシコキネティクス（TK）を検討した[2.6.7.2項] [2.6.7.3項]。また、ヒト及びカニクイザルの正常組織における組織交差反応性試験の2試験も実施した。すべての毒性試験で同一ロットの毒性試験用被験物質（ロット：[redacted]、Union 施設（Merck Research Laboratories, Union, New Jersey, U.S.）において[redacted] L 規模で製造）を用いた。本被験物質は、10 mM ヒスチジン、7%（w/v）スクロース及び0.02%（w/v）ポリソルベート80（pH 5.5）で調製した25 mg/mL MK-3475として供給された。毒性試験で用いた被験物質のロットを原薬の規格とともに[2.6.7.4項]に示す。

MK-3475を用いたすべての試験は、試験の結果や解釈に影響しない軽微な例外を除き、21 CFR パート58に記載された「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）」に準拠して実施した[2.6.7.1項]。

表 2.6.6: 1　　毒性試験一覧

Study Type and Duration	Route	Species	Dose Levels (mg/kg)	GLP	Study No.
Repeat dose toxicity					
1 month	IV	Cynomolgus monkey	6, 40, 200	Yes	SN[redacted]396
6 months	IV	Cynomolgus monkey	6, 40, 200	Yes	TT[redacted]-1084
Other toxicity studies					
Tissue Cross Reactivity	In vitro	Cynomolgus monkey tissues	N/A	Yes	SN[redacted]395
Tissue Cross Reactivity	In vitro	Human tissues	N/A	Yes	SN[redacted]394
T cell-dependent Antibody Response (TDAR)	SC	Mouse (with murine surrogate anti-PD-1)	5	No	TT[redacted]-1105

[2.6.7.1項]

マウスの T 細胞依存性抗体産生反応（TDAR）試験は、代替抗体である抗マウス PD-1抗体を用いた探索的試験であり GLP の原則に準拠して実施したが、被験物質 muDX400は GMP に基づいて作成しておらず、また代替抗体 muDX400に関するアッセイは非 GLP で実施した。

C Confidential

2.6.6.2　単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施しなかった。しかしながら、単回投与後の毒性は、カニクイザルへの反復投与毒性試験から評価した[2.6.6.3 項]。その結果、MK-3475の単回投与後の忍容性は良好であった。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

MK-3475の反復投与毒性を、カニクイザルの1ヵ月及び6ヵ月間反復投与毒性試験で評価した。これらの試験で得られたデータを以下に要約した。

2.6.6.3.1　カニクイザルの1ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（SN[redacted]396）

（評価資料）[資料4.2.3.2.1: SN[redacted]396]

本試験では、カニクイザルに MK-3475を週1回1ヵ月間静脈内反復投与（合計5回）して、毒性、投与部位の忍容性、TK プロファイル、免疫原性及び薬力学的効果を評価した。カニクイザルに6、40又は200 mg/kg の MK-3475を静脈内ボーラス投与し、各群雌雄各4匹を試験5週時に中間解剖し、残りの各群雌雄各2匹は、4ヵ月間回復期間後の試験23週時に最終解剖に供した[2.6.7.7A 項]。

毒性評価のため、摂餌量を毎日記録した。体重は、投与期間中及び回復期間中に週1回測定し、また群分け日及び計画屠殺日に測定した。個体ごとの一般状態の観察を投与前週は1日1回以上、投与日は1日1回以上（投与前又は投与時及び投与後1～3時間）、投与期間中の非投与日は1日1回以上、回復期間中は週1回以上行った。眼科学的検査を試験開始前2週、試験3及び22週時に実施した。臨床検査（血液、凝固、血清生化学及び尿検査）をすべての動物について試験開始前3及び1週、試験4及び22週時に実施した。詳細な剖検をすべての動物について実施した。

血清中抗薬物抗体（ADA）を測定するため、すべての生存動物から血液を、投与期間中は投与日（試験0、14、21及び28日目）の投与前に1回、回復期間中は定められた日（試験35、42、56、70、98、126及び154日目）に1回採取した。MK-3475の標的分子への結合の有無を調べるため、試験開始前2及び1週時、投与期間中の試験0及び28日目（投与後24時間）、並びに回復期間中の試験56、98、126及び154日目に採血した。TK を検討するため、すべての生存動物から血液を、投与期間中は試験0及び28日目（投与前並びに投与後1、3、6、24、48及び96時間）、7、14及び21日目（投与前及び投与後1時間）、さらに回復期間中は計画された採取予定日に1回採取した。

本試験で被験物質に関連した死亡は認められなかった。投与及び回復期間中の体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図及び血圧に被験物質に関連した変化は認められなかった。投与期間中にみられた被験物質に関連した一般状態の変化は、200 mg/kg 群の雄における鼠径部腫脹（左、右又は両側）の発現頻度の増加のみであったが、中間剖検時、この鼠径部腫脹に対応する肉眼的変化及び病理組織学的変化は認められなかったため、この所見は毒性ではないと考えられた。鼠径部腫脹は、投与期間中、一般状態の観察において対照群を含む全群で認められていた。この鼠径部腫脹は、200 mg/kg 群の雄2匹中1匹で継続してみられたが、他の1匹では回復した。血液、血清生化学、凝固及び尿／尿化学検査の各検査項目に MK-3475に関連した変化は認められなかった。ま

C Confidential

た、肉眼的及び病理組織学的にもMK-3475に関連した変化は認められなかった。MK-3475に関連して認められた唯一の変化は、試験5週時に屠殺された200 mg/kg群の雄における絶対及び相対脾臓重量の平均値の増加であったが、対応する病理組織学的変化は認められなかったため、この所見は毒性ではないと考えられた。試験23週時の屠殺では脾臓重量に被験物質に関連した変化は認められず、試験5週時にみられた変化の回復を示していた。以上のように、本試験では被験物質に関連した毒性変化は認められなかったため、無毒性量（NOAEL）は最高用量の200 mg/kg以上であった。

MK-3475の全身曝露量に性差はなく、曝露量は用量の増加に伴って増加した。MK-3475の曝露量（$AUC_{0\text{-}7d}$）は、初回投与後（試験0～7日目）より5回目の反復投与後（試験28～35日目）の方が大きかった。MK-3475は血清から多相性に消失し、個々の動物の消失半減期（$t_{1/2}$）は全用量で11.8～23.7日であった。ADAは6 mg/kg群の7匹及び40 mg/kg群の1匹に検出され、MK-3475のクリアランスの明らかな増加を伴っていた。TKパラメータを[表2.6.6: 2]に示す。

表2.6.6: 2　カニクイザルに6、40又は200 mg/kgのMK-3475を静脈内（ボーラス）投与したときの初回投与後（試験0～7日目）及び5回目の投与後（試験28～35日目）のTKパラメータ
［平均値（変動係数）、雌雄合算］

Dose (mg/kg)[a]	Dosing Interval	$AUC_{0\text{-}7d}$ (μg·day/mL)	C_{max} (μg/mL)	T_{max}[b] (hr)
6	1	923 (23)	292 (32)[c]	1 (1-24)[c]
	5	1790 (73)[d]	350 (82)	2 (1-24)
40	1	7240 (44)	2510 (57)	1 (1-168)
	5	24100 (76)[d]	4770 (72)	2 (1-168)
200	1	49700 (61)	14800 (66)	1 (1-48)
	5	170000 (30)[d]	86200 (125)	3 (1-24)

a　特に明記しない限り、各群12匹。
b　中央値（最小値 - 最大値）。
c　N = 13
d　N = 4

[2.6.7.7A項] MK-3475のカニクイザル1ヵ月間静脈内（ボーラス）投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（SN[redacted]396）

MK-3475の薬力学的効果を、ex vivoでのブドウ球菌エンテロトキシンB（SEB）刺激による末梢血細胞からのインターロイキン(IL)-2の分泌増強の程度を測定することにより検討した。各時点の値を比較するため、抗体存在下でのIL-2産生濃度を抗体非存在下でのIL-2産生濃度で除して変化倍率（活性比）を算出し、IL-2濃度を正規化した。投与前、全血にMK-3475及びSEBをex vivoで添加すると、IL-2産生は約2～3倍に増強された。同様に、対照動物から採取した全血にMK-3475及びSEBをex vivoで添加しても、IL-2産生は約2～3倍に増強された。しかし、MK-3475投与動物から採取した全血ではIL-2産生の増強は認められなかったため（活性比約1）、MK-3475がすでに標的分子に結合しており、ex vivoでさらにMK-3475に曝露してもそれ以上の分泌増強は起きないことが示された。このMK-3475の標的分子への結合は全用量群で同程度に観察され、ほとんどの動物において初回投与日（試験0日目）と最終投与日（試験28日目）の両方で認められた。6 mg/kg群の雄1匹ではMK-3475の標的分子への結合の減少が認められたが（活性比約2.55）、これは同動

C Confidential

物で検出された ADA によるものと考えられた。ADA が検出され、これに対応する薬物濃度低下が認められた6 mg/kg 群の他の動物では MK-3475の薬力学的効果は維持されており、試験28日目の最終投与後24時間の時点での SEB 誘導性の IL-2の活性比は約1のままであった。このことは、同用量における MK-3475の標的分子への結合が強固で、IL-2反応に対する薬力学的効果は十分に得られていることを示唆している。IL-2反応による薬力学的効果の低下は200 mg/kg 群の雄1匹にも認められたが、同動物に ADA は検出されなかった。回復期間中、6及び40 mg/kg の両群における標的分子への結合は、それぞれ試験98及び154日目までに試験前のレベルに戻った。200 mg/kg 群では、投与期間中にみられた IL-2反応が回復期間中も認められ、試験の全期間における標的分子への結合を示していた。

以上、MK-3475をカニクイザルに週1回、1ヵ月間投与したときの忍容性は良好で、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}7d}$）は最大で約170,000 μg•day/mL、無毒性量は200 mg/kg 以上であった。この無毒性量における曝露量は、ヒトの最高予想曝露量の47倍に相当した[表2.6.6: 14]。

2.6.6.3.2　カニクイザルの6ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（TT[redacted]-1084）

（評価資料）[資料4.2.3.2.2: TT[redacted]-1084]

本試験では、カニクイザルに MK-3475を2週に1回、約6ヵ月間静脈内投与（合計12回）した後、4ヵ月間の回復期間を設定して、毒性、投与部位の忍容性、TK プロファイル及び免疫原性を評価した[2.6.7.7B 項]。

カニクイザル（試験開始時に約1～3歳）を各群雌雄各5匹からなる4群に割り付け、1ヵ月間反復投与試験と同用量である6、40又は200 mg/kg の MK-3475［溶媒：10 mM ヒスチジン、7%（w/v）スクロース、0.02%（w/v）ポリソルベート80、pH 5.5］又は溶媒のみを、2週に1回、約6ヵ月間（合計12回）投与した。6ヵ月間の投与期間終了時（試験23週時の最終投与後3日目）に各群雌雄各3匹を中間解剖し、残りのサルは4ヵ月間の回復期間後に最終解剖に供した。投与はいずれの群も（伏在静脈からの）静脈内ボーラス投与とした。投与容量は、対照群及び200 mg/kg 群で8 mL/kg、40 mg/kg 群で1.6 mL/kg、6 mg/kg 群で0.24 mL/kg であった。

毒性評価のため、摂餌量を試験1～13、17、21、23、25、29、33、37及び40週時に記録した。体重をすべての動物について試験開始前と試験期間中（試験1～40週時）週1回測定した。個体ごとの生死及び一般状態の観察は毎日行った（ただし、回復期間中の週末は一般状態の確認は行わなかった）。眼科的検査をすべての動物について試験開始前と試験23週時に実施した。心電図検査をすべての動物について試験開始前と試験13及び23週時の投与後約1～4時間（± 15分）に実施した。臨床検査（血液、凝固、血清生化学及び尿検査）をすべての動物について試験開始前、試験4、74及び144日目並びに試験40週時に実施した。詳細な剖検をすべての動物について実施した。

血清中 ADA を測定するため、投与期間中は試験1及び158日目（試験158日目は中間剖検に供する動物のみ）並びに試験3、7、11、15、19、21及び23週時、回復期間中は試験28、32、36及び40週時並びに試験280日目（最終剖検時）に採血した。TK を検討するため、試験1、71及び141日目（投与前並びに投与後0.25、1、3、6、24、72、168及び336時間）、試験43、99及び127日目（投与前）、試験158日目（投与後72時間、中間剖検に供する動物のみ）、試験155日目、さらに試験28、

C Confidential

32、36、40週時及び試験280日目（回復期間中の動物）に採血した。

MK-3475の忍容性はすべての用量で良好であった。被験物質に関連した生前検査所見、心電図変化、眼科的所見、及び投与部位の変化はいずれも認められなかった。

投与終了時では、被験物質に関連した肉眼所見、器官重量の変化及び病理組織学的所見は認められなかった。回復期間終了時（最終剖検時）でも、被験物質に関連した肉眼所見はなく、MK-3475に起因することが特定された病理組織学的所見も認められなかった。

中間剖検及び最終剖検の評価時において、投与群の個々のサルに、主にリンパ球や組織球により形成される小規模な単核球の限局性浸潤が、偶発的な病理組織学的変化として2～3の散在する器官/組織に観察された。この変化は、カニクイザルで自然発生する過去の所見と類似するものであり、実質器官（臓器）の変性や障害は生じていなかった。これらの単核球の凝集には、血流量の増加やタンパク性浮腫液の漏出などの活動性の炎症過程と関連した典型的な他の要素がみられないため、進行する炎症過程を示すものではない。最も重要なこととして、実質臓器周囲の障害は、常在性の単核球の局所的な集積であったことである。これらの単核球の限局性浸潤は、浸潤がみられた器官/組織への有害作用を伴わないことから、安全性上のリスクを示すものではない。すなわち、活動性の炎症過程の一部ではなく、無害な常在性の炎症細胞の集団である可能性が高い[資料4.3: 39][資料4.3: 40]。さらに、すべてのサルにおいて試験期間中に炎症過程を示す一般症状は観察されなかった。観察された変化はMK-3475投与に関連するものではなく、文献で報告されているように[資料4.3: 39][資料4.3: 40]、当施設及び他施設で過去に実施した試験での対照群のサルで通常観察されている変化と同様であり、病理学的及び毒性学的に意義のない、背景データとしてみられる自然発生性の病理組織学的所見であると考えられた。

しかしながら、回復期間の最終時（最終剖検）に、40 mg/kg 群（中用量）の1匹の雄に、ごく軽度から軽度のリンパ球と組織球が主体の単核球の限局性浸潤が、脾臓及び胸腺に加えて複数の組織（下垂体、肝臓、前立腺、精巣上体、甲状腺、上皮小体及び食道）に認められた（その他の組織では認められなかった）。この中用量群の1匹のサルにおける単核球浸潤は、背景データとしてみられる自然発生する単核細胞の変化と類似していた。変化がみられた周囲の器官において形態学的に検出可能な有害作用はみられなかったが、変化がみられた器官の数及び浸潤している単核球の数は、当施設の過去の対照集団でみられる数よりも全体的に上回っていた。脾臓では、脾臓の動脈周囲リンパ組織（PALS）を形成するリンパ様細胞数のごく軽度の増加（脾臓重量の増加を伴う）がみられた。胸腺では、皮質リンパ系組織の顕著な減少（胸腺重量の減少を伴う）と同時に髄質のリンパ様細胞の中等度の増加がみられた。これらの所見の正確な原因は特定できなかったが、以下に述べる理由から自然に生じた免疫亢進による可能性が考えられる。1) この所見は40 mg/kg 群のみに認められ、200 mg/kg 群には認められていないため、明確な用量反応性がない。2) この所見は4ヵ月間の回復期間後の1匹の動物にのみに認められ、投与期間の最終時にはいずれの動物にも認められなかった。3) この所見は本試験において MK-3475を投与した30匹のサルの中で1匹のみに認められた。

しかしながら、この1匹のサルの所見と MK-3475との関連性については完全には否定できなかった。

C Confidential

MK-3475の全身曝露量は6～200 mg/kg で用量の増加に伴って増加した。MK-3475の TK に特記すべき性差は認められなかった。試験71及び141日目の平均 $AUC_{0\text{-}14d}$ は、6～40 mg/kg では用量比例性をやや上回る増加を示し、40～200 mg/kg ではほぼ用量に比例したが、これは、6 mg/kg 群の数匹における免疫原性（ADA）反応によるものであった。ADA 反応と合致した濃度プロファイルを示した6 mg/kg 群の動物を除外すると、試験71及び141日目の平均 $AUC_{0\text{-}14d}$ は6～200 mg/kg の全用量を通じてほぼ用量に比例した。試験1日目の平均 $AUC_{0\text{-}14d}$ は、試験71及び141日目の平均 $AUC_{0\text{-}14d}$ の約52%～89%であった。試験1日目の平均 C_{max} は、試験71及び141日目の平均 C_{max} の約71%～97%であった。MK-3475の全身曝露量は、全用量において試験71日目と試験141日目で同程度であった。

血清中 MK-3475の TK パラメータを[表2.6.6: 3]～[表2.6.6: 9]に示した。

表 2.6.6: 3　カニクイザルに MK-3475 を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験 1 日目（平均値 ± 標準誤差）

Dose (mg/kg)	Sex	$AUC_{0\text{-}14d}$ (μg·hr/mL)	C_{max} (μg/mL)	T_{max} (hr)
6	Female	21,900 ± 1410	192 ± 5.38	0.40 ± 0.15
	Male[a]	20,900 ± 635	152 ± 3.73	0.25 ± 0.0
	All[a]	21,400 ± 808	174 ± 7.72	0.33 ± 0.083
40	Female	172,000 ± 20,900	1620 ± 292	1.1 ± 0.50
	Male	179,000 ± 10,100	2050 ± 319	2.1 ± 1.1
	All	176,000 ± 11,000	1840 ± 216	1.6 ± 0.59
200	Female	829,000 ± 82,400	7970 ± 918	2.7 ± 1.0
	Male	867,000 ± 97,300	6980 ± 545	6.9 ± 4.4
	All	848,000 ±60,400	7470　± 529	4.8 ± 2.2

a　1匹（動物番号[redacted]-0126）は試験1日目に誤投与があったため除外した。
[2.6.7.7B 項]カニクイザルの6ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（TT[redacted]-1084）。

表 2.6.6: 4　カニクイザルに MK-3475 を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験 1 日目（抗 MK-3475 抗体陽性動物除外後のデータ）（平均値 ± 標準誤差）

Dose (mg/kg)	Sex	$AUC_{0\text{-}14d}$ (μg·hr/mL)	C_{max} (μg/mL)	T_{max} (hr)
6[a]	Female	23,600 ± 1700	188 ± 6.66	0.50 ± 0.25
	Male	20,900 ± 635	152 ± 3.73	0.25 ± 0.0
	All	22,000 ± 915	168 ± 7.90	0.36 ± 0.11
40	Female	172,000 ± 20,900	1620 ± 292	1.1 ± 0.50
	Male	179,000 ± 10,100	2050 ± 319	2.1 ± 1.1
	All	176,000 ± 11,000	1840 ± 216	1.6 ± 0.59
200	Female	829,000 ± 82,400	7970 ± 918	2.7 ± 1.0
	Male	867,000 ± 97,300	6980 ± 545	6.9 ± 4.4
	All	848,000 ± 60,400	7470 ± 529	4.8 ± 2.2

a　2匹（動物番号[redacted]-0157及び[redacted]-0159）は抗 MK-3475抗体が血清中 MK-3475濃度に影響を与えた可能性があったため除外した。1匹（動物番号[redacted]-0126）は試験1日目に誤投与があったため除外した。
[2.6.7.7B 項]カニクイザルの6ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（TT[redacted]-1084）

C Confidential

表 2.6.6: 5　　カニクイザルに MK-3475 を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験 71 日目（平均値 ± 標準誤差）

Dose (mg/kg)	Sex	$AUC_{0\text{-}14d}$ (µg·hr/mL)	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (hr)
6	Female	27,000 ± 14,200	263 ± 76.2	0.95 ± 0.53
	Male	20,400 ± 9320[a]	167 ± 40.8	1.7 ± 1.1
	All	24,100 ± 8480[a]	215 ± 43.8	1.3 ± 0.58
40	Female	340,000 ± 23,100	2130 ± 136	2.0 ± 1.1
	Male	286,000 ± 18,200	1730 ± 28.7	2.1 ± 1.1
	All	313,000 ± 16,500	1930 ± 93.8	2.0 ± 0.75
200	Female	1,550,000 ± 102,000	10,800 ± 785	0.70 ± 0.18
	Male	1,520,000 ± 71,400	10,200 ± 640	0.40 ± 0.15
	All	1,540,000 ± 59,100	10,500 ± 489	0.55 ± 0.12

a　1匹（動物番号[redacted]-0142）は $AUC_{0\text{-}14d}$ 算出に必要な定量可能時点が不足していたため除外した。
[2.6.7.7B 項]カニクイザルの6ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（T[redacted]-1084）

表 2.6.6: 6　　カニクイザルに MK-3475 を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験 71 日目（抗 MK-3475 抗体陽性動物除外後のデータ）（平均値 ± 標準誤差）

Dose (mg/kg)	Sex	$AUC_{0\text{-}14d}$ (µg·hr/mL)	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (hr)
6[a]	Female	61,700 ± ID	447 ± ID	2.0 ± ID
	Male	35,400 ± ID	217 ± ID	3.1 ± ID
	All	48,500 ± 8320	332 ± 67.6	2.6 ± 1.3
40	Female	340,000 ± 23,100	2130 ± 136	2.0 ± 1.1
	Male	286,000 ± 18,200	1730 ± 28.7	2.1 ± 1.1
	All	313,000 ± 16,500	1930 ± 93.8	2.0 ± 0.75
200	Female	1,550,000 ± 102,000	10,800 ± 785	0.70 ± 0.18
	Male	1,520,000 ± 71,400	10,200 ± 640	0.40 ± 0.15
	All	1,540,000 ± 59,100	10,500 ± 489	0.55 ± 0.12

ID = Insufficient Data（データ不足）
a　6匹（動物番号[redacted]-0157、[redacted]-0159、[redacted]-0161、[redacted]-0126、[redacted]-0142及び[redacted]-0164）は、抗 MK-3475抗体が血清中 MK-3475濃度に影響を与えた可能性があったため除外した。
[2.6.7.7B 項]カニクイザルの6ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（T[redacted]-1084）

C Confidential

表 2.6.6: 7　　カニクイザルに MK-3475 を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験 141 日目（平均値 ± 標準誤差）

Dose (mg/kg)	Sex	$AUC_{0\text{-}14d}$ (µg·hr/mL)	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (hr)
6	Female	26,900 ± 13,800	222 ± 52.0	0.25 ± 0.0
	Male[a]	31,200 ± 15,300	227 ± 48.9	0.25 ± 0.0
	All[a]	28,800 ± 9630	224 ± 33.9	0.25 ± 0.0
40	Female	320,000 ± 55,200	2010 ± 370	1.9 ± 1.0
	Male	323,000 ± 15,100	1770 ± 39.4	1.1 ± 0.50
	All	322,000 ± 27,000	1890 ± 180	1.5 ± 0.56
200	Female	1,800,000 ± 140,000	11,900 ± 1040	1.7 ± 1.1
	Male	1,440,000 ± 126,000	8770 ± 596	0.55 ± 0.18
	All	1,620,000 ± 107,000	10,400 ± 772	1.1 ± 0.55

a　1匹（動物番号[redacted]-0142）は試験141日目に定量可能な時点がなかったため除外した。
[2.6.7.7B 項]カニクイザルの6ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（TL[redacted]-1084）

表 2.6.6: 8　　カニクイザルに MK-3475 を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験 141 日目、（抗 MK-3475 抗体陽性動物除外後のデータ）（平均値 ± 標準誤差）

Dose (mg/kg)	Sex	$AUC_{0\text{-}14d}$ (µg·hr/mL)	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (hr)
6[a]	Female	60,600 ± ID	346 ± ID	0.25 ± ID
	Male	57,500 ± ID	307 ± ID	0.25 ± ID
	All	59,100 ± 1880	326 ± 18.6	0.25 ± 0.0
40	Female	320,000 ± 55,200	2010 ± 370	1.9 ± 1.0
	Male	323,000 ± 15,100	1770 ± 39.4	1.1 ± 0.50
	All	322,000 ± 27,000	1890 ± 180	1.5 ± 0.56
200	Female	1,800,000 ± 140,000	11,900 ± 1040	1.7 ± 1.1
	Male	1,440,000 ± 126,000	8770 ± 596	0.55 ± 0.18
	All	1,620,000 ± 107,000	10,400 ± 772	1.1 ± 0.55

ID = Insufficient Data（データ不足）
a　6匹（動物番号[redacted]-0157、[redacted]-0159、[redacted]-0161、[redacted]-0126、[redacted]-0142及び[redacted]-0164）は、抗 MK-3475抗体が血清中 MK-3475濃度に影響を与えた可能性があったため除外した。
[2.6.7.7B 項]カニクイザルの6ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（TL[redacted]-1084）

C Confidential

表 2.6.6: 9　　カニクイザルに MK-3475 を静脈内投与したときの血清中 TK パラメータ：試験 155 日目（平均値 ± 標準誤差）

Dose (mg/kg)	Sex	$t_{1/2}$ (hr)
6[a]	Female	409 ± ID
	Male	616 ± ID
	All	513 ± ID
40[b]	Female	601 ± ID
	Male	460 ± ID
	All	507 ± 54.4
200[c]	Female	421 ± ID
	Male	582 ± ID
	All	529 ± 53.9

ID = Insufficient Data（データ不足）
a　2匹（動物番号[redacted]-0157及び[redacted]-0126）は、抗 MK-3475抗体が血清中 MK-3475濃度に影響を与えた可能性があったため除外した。
b　1匹（動物番号[redacted]-0133）は、抗 MK-3475抗体が血清中 MK-3475濃度に影響を与えた可能性があったため除外した。
c　1匹（動物番号[redacted]-0125）は、抗 MK-3475抗体が血清中 MK-3475濃度に影響を与えた可能性があったため除外した。
[2.6.7.7B 項]カニクイザルの6ヵ月間静脈内投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）（T[redacted]-1084）

対照群の1匹で、定量下限値を上回る血清中 MK-3475濃度が試験1日目の投与後3時間に認められ（6 mg/kg 群の平均 C_{max} の約0.01%）、さらに試験99日目の投与前に対照群の2匹で認められた（同時点の6 mg/kg 群における平均血清中濃度の1%未満）。対照群において検出された値は内因性物質の干渉によるものと考えられ、TK に関する解釈や結論に影響を与えるものではない。

ADA は6 mg/kg 群の10匹中5匹で、投与期間中（試験1～155日目）の試験43、71又は99日目から観察され、これらの動物では MK-3475消失速度の明らかな上昇が関連して認められた。40及び200 mg/kg 群では、投与期間中 ADA は検出されなかった。回復期間中（試験156～280日目）には、投与期間中 ADA 陽性であった6 mg/kg 群の2匹に ADA が認められ、投与期間中 ADA 陰性であった200 mg/kg 群の1匹にわずかな ADA が検出された。中用量群及び高用量群（回復期間中に ADA が検出された1匹を除く）の動物では ADA は検出されなかったが、薬物濃度が高かったため ADA の検出が阻害された可能性がある。しかし、MK-3475投与群のほとんどの動物では TK プロファイルは予想されたとおりであり、未検出の ADA があったとしてもその影響は小さいものと考えられた。ADA が検出されても試験期間中の MK-3475の群平均曝露量にほとんど影響はみられなかった。また、いずれの動物にも、体重、摂餌量、眼科的検査、心電図、血液、血清生化学及び肉眼的・病理組織学的検査において、被験物質との関連性が特定された変化は認められなかったことから、病理組織学的検査を含む毒性試験結果は ADA の存在に影響されなかったといえる。重要な点として、高用量群のサルでは ADA が検出されなかった（回復期間中に検出された1匹を除く）ことから、本試験では MK-3475の高曝露量の毒性は十分に評価されたといえる。

以上、MK-3475をカニクイザルに2週に1回、6ヵ月間投与したときの忍容性は良好で、全身曝露量（$AUC_{0\text{-}14d}$）は最大で約67,500 µg•day/mL[表2.6.6: 7]、無毒性量は200 mg/kg 以上であった。この無毒性量における曝露量はヒトの最高予想曝露量の19倍に相当した[表2.6.6: 14]。

C Confidential

2.6.6.4　遺伝毒性試験

MK-3475はヒト IgG4を骨格に持つヒト化モノクローナル抗体で、その作用機序は細胞表面上に発現する受容体への結合であり、細胞の遺伝物質への影響を及ぼす懸念はないため、ICH S6（R1）に従い遺伝毒性試験は実施していない。

2.6.6.5　がん原性試験

MK-3475のがん原性試験は、ICH S9では進行がん患者の治療を目的とする医薬品については要求されていないため実施していない。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

1)　雌雄受胎能

MK-3475の雌雄受胎能に対する影響は、カニクイザルの1ヵ月間及び6ヵ月間反復投与毒性試験において評価した。1ヵ月及び6ヵ月間反復投与試験では同じ用量（6、40、200 mg/kg）を投与しても毒性は認められなかった。1ヵ月間反復投与試験での200 mg/kg の用量では標的分子への結合が4ヵ月間の回復期間中にわたり認められ、MK-3475の長期間持続した in vivo 活性が示されたことから、1ヵ月及び6ヵ月間反復投与試験からのデータを用いて、受胎能に対する MK-3475の影響を評価した。

[表2.6.6: 10]に要約したように、4匹の性成熟した雄（1ヵ月間反復投与試験の2匹と6ヵ月間反復投与試験の2匹）は十分な期間（ICH S6(R1)ガイドラインで勧告されている3ヵ月以上の期間）MK-3475に曝露されていた。この性成熟した雄の匹数（4匹）は、非ヒト霊長類を用いた反復投与毒性試験での一般的な匹数でもあることから、MK-3475の受胎能に対する影響を十分に評価することが可能であった。雌の受胎能については、1ヵ月間反復投与試験では2匹の雌が、6ヵ月間反復投与試験のすべての雌（9匹）が性成熟していたことから、確実な評価が可能であった。

表 2.6.6: 10　1ヵ月及び6ヵ月間静脈内投与試験での性成熟した雄及び雌の数

Necropsy	Dose level (mg/kg)	1-month study (SN[redacted]396)		6-month study (TT[redacted]-1084)	
		Males*	Females*	Males*	Females*
Interim	6	1/4	4/4	1/3	3/3
	40	0/4	3/4	0/3	3/3
	200	1/4	2/4	1/3	3/3
Final	6	2/2	2/2	1/2	2/2
	40	0/2	2/2	0/2	2/2
	200	2/2	2/2	0/2	2/2

*性成熟した雄又は雌の数/ 1群あたりの雄又は雌の数
下線は、評価可能な数（性成熟しておりかつ3ヵ月以上（回復期間を含む）の曝露期間をもつ数）

C Confidential

1ヵ月間及び6ヵ月間静脈内投与試験では、MK-3475を投与した性成熟又は若齢成獣のカニクイザルには被験物質に関連した一般状態の変化は認められず、また雄及び雌の生殖機能の評価のために検討したいずれの臓器／組織の肉眼的及び病理組織学的所見も認められなかった。特に精細管の病理組織学的評価では、いずれの成熟段階の精子にも形態学的異常は認められず、精子形成の規則的パターンの破綻も認められなかった。さらに、6ヵ月間静脈内投与試験の投与終了後及び回復期間終了後では、すべての雌の卵巣、子宮頸部、膣及び乳腺に異常は認められなかった。

カニクイザルの静脈内投与試験において受胎能に対する影響が認められなかったことは、MK-3475の作用機序である PD-1/PD-L1経路の阻害に関して現在得られている情報や公表文献の報告と一致するものである。すなわち PD-1/PD-L1経路の阻害は、妊娠中の母体胎児間免疫寛容の破綻を導くことにより胎児に対して有害な作用を引き起こす可能性があるが、受胎能には影響を与えないことが報告されている。PD-1ノックアウトマウスの試験では、出生児は正常に成長しその生殖器や受胎能には影響がないことが示されている[資料4.3: 41][資料4.3: 21][資料4.3: 66][資料4.3: 67][資料4.3: 53]。

さらに精巣と卵巣に対する MK-3475の直接的な影響を検討した。公表された報告からは PD-1と PD-L1は精巣に発現しており、PD-1/PD-L1経路はおそらく精巣の免疫特権に関与する免疫抑制性機構の一つであることが示唆されている[資料4.3: 44][資料4.3: 45][資料4.3: 46][資料4.3: 47][資料4.3: 48]。しかしながら、この PD-1/PD-L1経路の阻害が血液精巣関門の維持に影響を与えることを示した報告はない。卵巣では、PD-1の生理的役割に関する報告は少なく、PD-1が卵巣の生殖細胞のアポトーシスを誘導する多くの制御因子のひとつであることが示唆されているのみである[資料4.3: 49]。したがって、PD-1の阻害は卵巣のステロイドホルモン分泌機能を維持する方向に働き、閉経の発現を遅延させる可能性がある。ただし、両性において PD-1/PD-L1経路が視床下部-下垂体-性腺軸のホルモン制御に影響を及ぼすエビデンスは示されていない。これらの公表論文から得られた情報から、MK-3475が精巣及び卵巣に望ましくない影響を引き起こすとは考えられない。

2)　出生前及び出生後の発生

MK-3475の出生前及び出生後の発生に関する試験（PPND 試験）は、MK-3475の作用機序に基づいた妊娠に対する有害な影響のリスクを示す情報があることから、実施していない。

ICH S6 (R1)ガイドラインによると、「受胎能や胎児への有害作用を示唆する十分な科学的根拠（例えば、作用機序、遺伝子改変動物の表現型、クラスエフェクト）から、リスクコミュニケーションに必要な生殖発生に関する十分な情報が得られる場合には、必ずしも追加の非臨床試験は必要でない」とされている。また、ICH S9ガイドラインによると、「進行がん患者の治療を目的とした医薬品の臨床試験実施あるいは製造販売承認申請のためには、雌雄の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は必要でない」、「進行がん患者の治療を目的とした医薬品の臨床試験実施あるいは製造販売承認申請のためには、出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験は通常必要ない」とされている。

C Confidential

妊娠における PD-1/PD-L1経路の生理的機能

MK-3475は、PD-1とそのリガンドである PD-L1及び PD-L2の結合を直接的に阻害するように作成された高活性でかつ高選択性のヒト化モノクローナル抗体（IgG4/kappa）である。MK-3475の PD-1に対する PD-L1及び PD-L2結合の50%阻害濃度（IC_{50}）は1 nM 未満である。PD-1と PD-L1の結合が阻害されると T リンパ球の活性が増強して、がん患者において免疫によるがんの拒絶反応が引き起こされる。

正常な生理学的条件下では、末梢性免疫寛容において、PD-1/PD-L1経路は自己に対するネガティブセレクションを免れた自己反応性 T 細胞を制御する重要な役割を果たしている。PD-1/PD-L1経路のもう一つの生理学的機能は、遺伝的に異なった胎児に対する母体胎児間免疫寛容を維持することである。妊娠期間中に胎児が生存するためには、遺伝的に異なる父由来同種異系抗原に対する母体免疫反応が抑制されなくてはならない。胎児抗原が抗原提示細胞により取り込まれる多くの経路において母体免疫機構と接触することにより、母体免疫機構は胎児の同種異系抗原を明らかに認識している[資料4.3: 50][資料4.3: 51]。霊長類やマウスのような血液漿膜胎盤を形成する種では、胎盤栄養芽層細胞は母体免疫細胞に十分に曝露されており、母体細胞と胎児細胞が胎盤を通して双方向へ細胞移動を起こしてマイクロキメリズム（宿主の細胞とは遺伝的に異なる少数の細胞の定着）が誘導されている。母体では、抗胎児 T 細胞の増殖と抗体産生が妊娠中に起こる。胎児抗原は母体の脾臓で検出され、抗原特異的 T 細胞の増殖反応を起こし[資料4.3: 52]、妊娠女性の血清中には胎児抗原に対する抗体が検出される。母体の同種異系抗原反応性リンパ球は、妊娠中に全身から枯渇することはないため、子宮胎盤境界領域で局所的に働く複雑な免疫制御プロセスが、母体の胎児胎盤に対する免疫寛容の基本的な機構であると、現在では理解されている。

子宮胎盤境界領域での PD-L1の発現増加と PD-1/PD-L1経路の関与は、妊娠における免疫寛容を維持する中心的な機能を持つことが明らかとされている[資料4.3: 20][資料4.3: 19]。妊娠中に活性化した母体の T リンパ球は、B7ファミリー分子と CD28ファミリー受容体の相互作用を含む免疫調節経路のネットワークにより制御されている。このネットワークでの PD-1/PD-L1経路は、他の免疫寛容経路と共に子宮近傍リンパ節において、父由来抗原に特異的な T 細胞の集積を制御することにより、正常な妊娠と胎児発生の維持を調節していると考えられている[資料4.3: 53]。

マウス妊娠モデルでの PD-1/PD-L1経路と母体胎児間免疫寛容

マウスの異系交配の結果から、妊娠中の母体胎児間免疫寛容において同種異系の要素が重要であることが明らかとなっている。近交系（遺伝的に同一）のマウスは、連続20世代以上にわたり兄妹交配又は親子交配を行うことにより作成され、ホモ接合体遺伝子座が少なくとも平均98.6%となっている。現在の近交系マウスの系図から、CBA 系マウスと C57BL/6系マウスはほぼ完全に分離された系統となっているが、CBA 系マウスと DBA 系マウスは共通の祖先（Ohio dealer）を持つ[資料4.3: 54][資料4.3: 55]。この系図での距離と一致して、CBA 系マウスと C57BL/6の交配時の自然流産率は約18%であるが、CBA 系マウスと DBA 系マウス交配時での自然流産率は0%である。

PD-1/PD-L1経路の阻害により、受胎産物に対する母体胎児間免疫寛容が無効となることが同種

C Confidential

異系交配したマウスモデルで示されている。CBA 系マウスと C57BL/6系マウスの異系交配時の胎盤の子宮胎盤境界領域では、PD-1の発現が交配後10日には検出されているが、CBA 系マウスの同系交配ではごくわずかしか検出されていない。CBA × C57BL/6の同種異系マウス交配時の受胎産物の自然流産率は18%である。これに対し、抗 PD-L1モノクローナル抗体の投与により流産率が86%と著しく増加した。一方、同系受胎産物（CBA × CBA マウス）の場合は、抗 PD-L1モノクローナル抗体の投与による妊娠の転帰への影響はなかった。この実験結果は、PD-1/PD-L1経路が母体胎児間免疫寛容に必須であることを示す根拠となっている。このように、抗 PD-L1モノクローナル抗体を投与した同種異系交配妊娠動物では流産率が著しく増加するが、胎盤の組織切片の免疫組織化学染色法により、胎児吸収部位に T 細胞が集積し浸潤していることが示されており、胎児拒絶における T 細胞を介した免疫の役割が確認されている[資料4.3: 19]。

異系胎児に対する反応により、抗原特異的な母体 T 細胞は PD-1の発現を増加させることから、PD-1自体が妊娠中の胎児を防御するための重要な役割を担っていることが確認されている。PD-1は父由来抗原特異的 T 細胞のアポトーシスを誘発し、その細胞数を抑制することにより母体胎児間免疫寛容に関与していることが示されている[資料4.3: 53]。さらに、制御性 T 細胞（Tregs）の妊娠時での生理的な役割が、流産好発系妊娠マウスへの養子免疫細胞移入モデルを用いて示されている[資料4.3: 56]。この実験モデルでは、Tregs を枯渇させた妊娠マウスは同種異系胎児の拒絶反応が起こるが、そのマウスに正常妊娠マウスの Tregs を移入すると胎児に対する正常な保護機能が回復して、胎児拒絶反応が抑制される[資料4.3: 56][資料4.3: 57][資料4.3: 58]。この Tregs 移入により胎児保護機能が回復した妊娠マウスに対して、抗 PD-1モノクローナル抗体を投与すると流産率が増加したことから、PD-1が Tregs を介した胎児保護の重要な要素であることが示された[資料4.3: 20]。

PD-1/PD-L1経路が阻害されると、PD-1を発現した母体 T 細胞に対するチェックポイントが働かないため、異系胎児に対する免疫反応が抑制されず、正常に妊娠が完了する確率が減少する。同種異系妊娠マウスの種々のモデルにおける流産率と PD-1/PD-L1阻害による影響を[表2.6.6: 11]に要約した。子宮胎盤境界領域の PD-L1の発現増加を介したこの作用は、胎児の異系性の程度により影響を受けている。

表 2.6.6: 11　同種異系妊娠マウスの種々のモデルにおける流産率

Model	Spontaneous abortion rate	Dose (μg/dose)	Abortion rate after blocking PD-1 pathway	Degree of allogenicity	Reference
CBA x C57BL/6	18%	Anti-PD-L1 250 & 500	86% (~5-fold increase)*	Distant ancestry[1]	[資料4.3: 19]
C57BL/6 x ♂ CBA	18.8%	Anti-PD-L1 250 & 500	- Blockade of PD-L1 ↑ rate of abortion to 62% (~3-fold increase)* - Depletion of Tregs ↑ rate of abortion to 31.9% - Blockade of PD-L1 in mice depleted of Tregs has no further effect (rate of abortion ~30%)	Distant ancestry[1]	[資料4.3: 58]

C Confidential

CBA x DBA	0%	Anti-PD-1 250	35%	Common ancestry (Ohio dealer) [1]	[資料4.3: 20]

[1][資料4.3: 54][資料4.3: 55]
*2つの公表された試験結果における流産率の増加の程度が異なっているのは、試験間及び施設間のばらつきによると考えられる。

PD-1/PD-L1阻害による抗腫瘍活性と生殖発生毒性

がん細胞の免疫からの逃避機構と胎児に対する免疫寛容の機構は、PD-1/PD-L1経路の同じ機能に基づき作用することから、MK-3475を含む抗 PD-1モノクローナル抗体薬の生殖発生毒性評価については、通常の手法で評価することは困難であり、異なる評価が必要である。がん組織と胎児胎盤組織での PD-1/PD-L1の相互作用の薬理学的な阻害効果を乖離させることは困難と考えられる。

現在までに行われた臨床試験成績を基にすると、MK-3475は臨床用量において十分に標的と結合しているため（末梢血の抗原特異的に活性化された T リンパ球を用いて測定）、免疫治療に感受性のあるがんでは、薬理学的に十分な抗腫瘍活性が予想されている。またその感受性は、患者特異的な $CD8^+$腫瘍反応性レパートリー（リンパ球集団）[資料4.3: 59]と患者の T 細胞受容体のクローン性[資料4.3: 60]に依存していると考えられる。したがって、PD-1阻害剤が妊娠に対して有害作用（流産又は死産）を起こす可能性は腫瘍退縮効果に関連し、妊娠したがん患者が PD-1阻害剤による治療を受けた場合には、妊娠に対する有害作用が薬理学的に有効な曝露量で起こることが示唆される。

妊娠に対するリスク評価

通常、開発中の医薬品の生殖発生毒性のリスクは、動物を用いた生殖発生毒性試験結果より、治療効果と毒性が認められるそれぞれの血漿中濃度から全身曝露量の比を決定し、それを基に評価される。この通常の曝露比を基にしたリスク評価は、抗 PD-1モノクローナル抗体治療薬や類似した免疫寛容の阻害を介した免疫調節性の治療薬が薬理作用を示す範囲では適切な方法とはいえない。なぜならば、血漿中濃度から算出される全身曝露量は、胎児胎盤に局在した特異的な相互作用を介した機能阻害を反映していないと考えられるからである。

さらに、抗ヒト PD-1モノクローナル抗体の動物を用いた生殖発生毒性試験では、臨床で用いられる抗 PD-1モノクローナル抗体治療薬に反応性のある非ヒト霊長類を使用することになる。非ヒト霊長類を用いた生殖発生毒性試験は、ハザード同定としては最も適したものと考えられる。しかし、高い自然発生性流産率と少ない出生児数（妊娠動物1匹について1匹）のために、薬物に関連した明確な作用は得られず曖昧な結果をもたらすため、リスク評価のための試験としては限界があり、適切ではないと考えられる。また、MK-3475のヒトとカニクイザルの PD-1に対する結合親和性は in vitro の方法では同等であるが、in vivo での標的への結合親和性については異なっている可能性も否定できない。加えて、追加の生殖発生毒性試験データの有無にかかわらず、マウスモデルにおいて確認された妊娠に対するハザードは PD-1/PD-L1阻害の薬理作用に基づくと考えられる。したがって、これらのハザードは添付文書中で情報提供されることが必要と考えられる

C Confidential

ことから、MK-3475の添付文書では情報提供する予定である。

最も重要な点は、妊娠した治療中のがん患者の胎児に対して、PD-1/PD-L1経路の阻害により起こり得る作用は、個々の患者と胎児の組み合わせに固有の胎児の異系性構成成分（及び PD-L1の発現）のレベルにより影響されることである。妊娠に対する潜在的なリスク評価のために動物試験を基にした曝露比を決定することは、PD-1/PD-L1経路の阻害による影響とは関連性のないものになる。

類薬の生殖発生毒性

既承認の抗 PD-1モノクローナル抗体の類薬であるニボルマブ（遺伝子組換え）（以下、ニボルマブ）では、妊娠20～22日から分娩時までを投与期間とする拡張型出生前及び出生後の発生毒性試験（enhanced PPND 試験：ePPND 試験）が行われている。その結果、胚・胎児及び新生児の各死亡率は、担体を投与した動物に比して10 mg/kg（臨床相当量）以上で、概ね2倍程度高いことが示唆され、この増加は薬物に起因するものと考えられた（ニボルマブ申請資料、FDA Pharmacology Review の Table 21）。

一方、異系交配のマウスモデルを用いた試験では、抗マウス PD-1又は PD-L1モノクローナル抗体を250 µg（5 mg/kg 相当：抗腫瘍活性の認められた種々のマウス腫瘍モデルでの用量と同様；[資料4.2.1.1.6: PD006] [資料4.2.1.1.8: PD008] [資料4.2.1.1.11: PD013] [2.6.3項]）以上の用量で投与した際の胚胎児死亡率は、対照群でみられた自然発生性の胎児死亡率に比べて約3～5倍高いことが報告されている。

抗 PD-1モノクローナル抗体の生殖発生毒性試験の結果が、マウス及び非ヒト霊長類で同様ではあったが、非ヒト霊長類の試験結果は、そのモデルの変動性とサンプルサイズが小さいことから、妊娠したがん患者に抗 PD-1モノクローナル抗体を投与する場合の流産や死産の増加を理解するうえでは、マウスの試験結果よりも正確性に欠けると考えられる。さらに、ニボルマブの ePPND 試験では、胚、胎児及び新生児の死亡が臨床相当量で示されたが、催奇形性は示唆されなかった（ニボルマブ申請資料）。胎児死亡は直接的作用あるいは間接的な機能・構造欠損で引き起こされるが、そのどちらかであるかは胚胎児の死亡原因の徹底的な実験的研究が必要であり、一般的には胎児死亡と奇形は同等の意味を持つと考えられている。

最後に、妊娠したがん患者での胎児死亡の増加率については、患者特異的な胎児の異系性により影響をうけ、動物試験の曝露比のデータから評価することができない。同時に、非ヒト霊長類での流産率もまた、個々の動物に特異的な胎児の異系性に影響されると考えられ、抗 PD-1モノクローナル抗体の曝露のみに影響されるものとはならない。

類薬と MK-3475との比較

母体の免疫を介した胚胎児発生に対する作用に関しては、抗 PD-1抗体薬を差別化できる科学的な根拠は存在していない。ニボルマブと MK-3475はほぼ同様の PD-1に対する結合能とリガンド結合阻害活性を有している[表2.6.6: 12]。

C Confidential

表 2.6.6: 12　MK-3475 とニボルマブの比較

	MK-3475	**ニボルマブ***
Affinity (K_D)		
Human	~0.03 nM	3.06 nM
Cynomolgus monkey	~0.12 nM	3.92 nM
Ligand blockade (PD-L1) IC_{50}		
Human	625 pM	1040 pM
Cynomolgus monkey	712 pM	Not available
Clinical dosing regimen	2 mg/kg every 3 weeks	2 mg/kg every 3 weeks
Exposure in clinic	$AUC_{(0\text{-tau})}$ 721.5 µg.day/mL **17,316 µg.hr/mL** C_{max} ~70 µg/ml	$AUC_{(0\text{-tau})}$ **~ 15,204 µg.hr/mL** (estimated) C_{max} ~50 µg/ml (estimated)

*ニボルマブ申請資料より

ヒト PD-1に対する MK-3475の結合親和性は、[資料4.2.1.1.1: PD001]に記載した ForteBio Octet による固相干渉法に加え、[資料4.2.1.1.5: PD005]に記載した BIAcore による表面プラズモン共鳴法及び KinExA による結合平衡除外法を用いて測定した。現在のところ、結合親和性の測定に国際的な統一手法はなく、BIAcore、Octet 及び KinExA は、それぞれ長所と短所を併せ持っている。

Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc, Whitehouse Station, N.J., USA（以下、米国本社）では、3つすべての方法を用いて試験した。異なるロットの MK-3475を用いて BIAcore で測定した場合（[資料4.2.1.1.5: PD005]の表4）、ほとんどのロットでは同様の結合及び解離定数を示し、K_D 値は約50 pM であった。KinExA では、BIAcore での測定で用いられた MK-3475と同じロットを測定しているが（[資料4.2.1.1.5: PD005]の表5）、その K_D 値は0.4～1.9 pM の範囲であった。これら3つの異なった方法で得られた結合親和性は、いずれも高い結合親和性をもつ抗体であることを示していた。[表2.6.6: 12]には、固相干渉法により測定した値を記載した。一方、ニボルマブのヒト PD-1に対する結合親和性は、表面プラズモン共鳴法による測定で、ナノモルオーダーであった（ニボルマブ申請資料）。MK-3475のカニクイザル PD-1に対する結合親和性は、固相干渉法により測定し、0.12 nM であった[資料4.2.1.1.1: PD001]。ニボルマブのカニクイザルの PD-1に対する結合親和性は、固相干渉法で3.92 nM であった（ニボルマブ申請資料）。

米国本社では、蛍光定量的微量測定法により競合的結合試験を実施し、チャイニーズハムスター卵巣細胞に発現させた PD-1に対する MK-3475の PD-L1結合阻害能を測定した（[資料4.2.1.1.1: PD001]の表3）。MK-3475の50%結合阻害濃度は、ヒト PD-1では625 pM、カニクイザル PD-1では712 pM であった。一方、ニボルマブは、チャイニーズハムスター卵巣細胞に発現させたヒト PD-1に対する PD-L1結合の50%阻害濃度が、フローサイトメトリー結合法を用いて1.04 nM（1040 pM）であった（ニボルマブ申請資料）。

ニボルマブと MK-3475は、作用機序は同一であり、がん患者に対して非常に類似した用法用量であることから[表2.6.6: 12]、両薬剤は妊娠したがん患者における流産、死産及び新生児死亡を含む生殖発生毒性については同様のリスクを持つと考えられる。上述の薬理試験報告書は[2.6.3項]

C Confidential

に提示されている。

3)　IgG4の胎盤移行

ヒト及び非ヒト霊長類の胎児は、絨毛膜尿膜胎盤を介して能動輸送により母動物の抗体を獲得することが知られている。5つのクラスの主要免疫グロブリン（IgA、IgD、IgE、IgG、IgM）のうち、IgG クラスのみが胎盤を移行する。この輸送は主に胎児性 Fc 受容体（FcRn）を介して行われており、IgG1サブクラスの免疫グロブリンが最も効率的に輸送され、次いで IgG4、IgG3、最後に IgG2の順に輸送されやすい。胎児の IgG 量は最初の妊娠第2期までは低い状態にあり、通常第3期に増加し、胎児の IgG4量は母動物の循環血中と同程度かそれ以上になる[資料4.3: 61][資料4.3: 62]。

胎児の循環血中 IgG 量は在胎期間と正の相関関係を示す[図2.6.6: 1][資料4.3: 63]。妊娠17～22週では胎児の総 IgG 量は母動物の約5%～10%である。妊娠期間終了時、胎児の総 IgG 量は母動物の濃度より高い（130%）。胎児の IgG 増加は妊娠13週の早期に始まり、妊娠17～41週の間は線形に増加する。妊娠17～22週時の IgG1量は IgG2と比較して3倍高い[図2.6.6: 2A,B]。その後、妊娠37～41週には IgG1は急激に増加し、IgG2の約7倍になる。IgG3及び IgG4も急激な増加を示す。IgG3及び IgG4の合計は胎児の総 IgG 量の10%未満である。IgG3及び IgG4は妊娠期間中持続的に増加し、妊娠期間終了時には胎児の IgG3量は母動物の循環血中と同程度に達し、胎児の IgG4量は母動物の循環血中量を超える[図2.6.6: 2C,D]。一方、IgG2は妊娠期間中ゆっくりと増加し、妊娠期間終了時でも母動物の濃度より有意に低いままである[図2.6.6: 2B] [資料4.3: 63]。

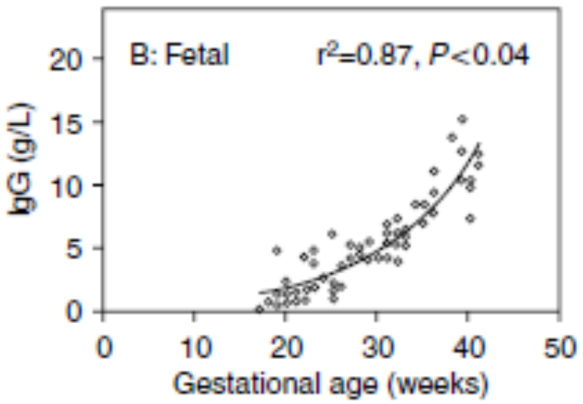


図 2.6.6: 1　　ヒトにおける IgG の胎盤移行の推移

C Confidential

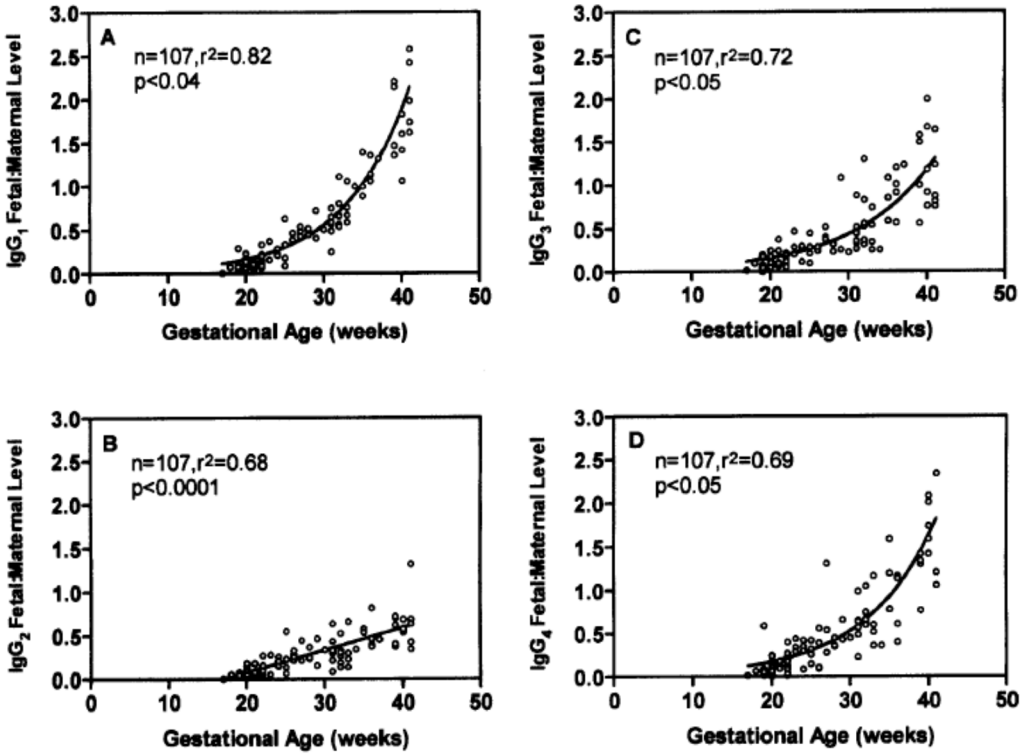


図 2.6.6: 2　　ヒトにおける在胎期間に対する胎児と母体の各 IgG 比

A：IgG1、B：IgG2、C：IgG3、D：IgG4

[資料4.3: 63]

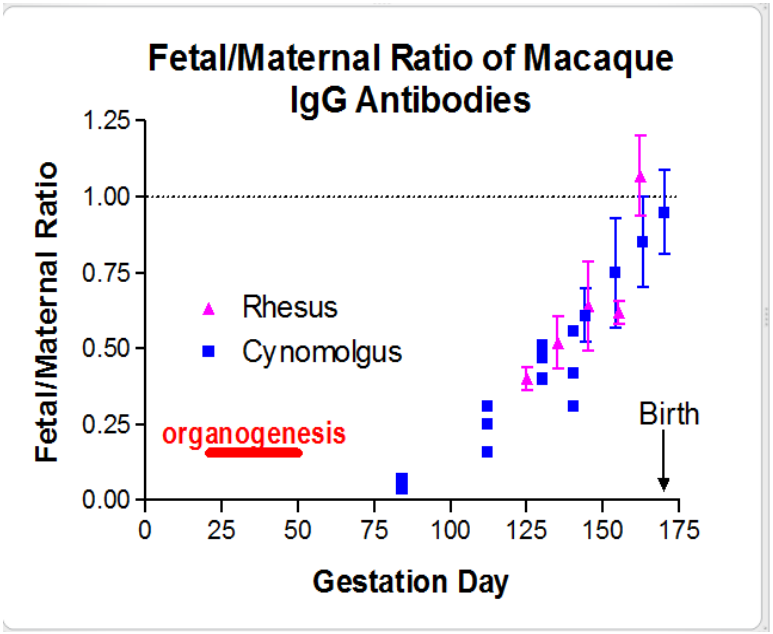


図 2.6.6: 3　　カニクイザルとアカゲザルにおける胎児と母動物の IgG 比

[資料4.3: 64][資料4.3: 65]

Confidential

[図2.6.6: 3]にカニクイザルとアカゲザルにおける胎児と母動物の IgG 比を示した。胎児期の IgG 曝露量増加の時期はサルとヒトで類似していた。

MK-3475はヒト化モノクローナル抗体の IgG4アイソタイプのため、ヒト及びサルともに胎盤移行すると予想される。器官形成期の胎児はほとんど MK-3475に曝露されないが、妊娠第3期には十分に曝露されると推測される。MK-3475の作用機序より、胎児が MK-3475に曝露されると免疫性疾患の発現や正常な免疫応答の変化が生じるリスクが増加する可能性がある。しかし、妊娠転帰に関して、抗 PD-1抗体の胎盤移行は胎児の死亡に関わる主たる要因ではないと考えられる。すなわち、前述のように、胎児死亡（流産又は死産）のリスクの増加は、胎盤面での同種異系胎児組織に対して母動物の免疫応答が活性化することにより、胎児への免疫寛容が阻害されることが関連している。

4)　結論

以上、ここで示した根拠から、MK-3475の非ヒト霊長類を用いた生殖発生毒性試験は必要ないと考える。MK-3475を含む抗 PD-1抗体には、その有効性のために必要な作用機序に基づく生殖発生に対するハザードが同定されており、したがって臨床的に有効な MK-3475の曝露量でこのリスクが存在している。すべての抗 PD-1及び PD-L1抗体についても、患者に必要とされる抗腫瘍効果を達成する場合にこのリスクが生じる。PD-1/PD-L1経路は、妊娠期に胎児に対する母体の免疫寛容を調節するうえで中心的な機能を持つことから、妊娠転帰に対する抗 PD-1モノクローナル抗体の影響は、抗体の直接曝露よりむしろ、母体の同種異系胎児に対する免疫応答によって引き起こされると考えられる。

MK-3475の非ヒト霊長類における追加試験を実施すれば妊娠動物に投与した際の全身曝露量データが得られるが、そのデータからヒト胎児における有害作用の発現に関する情報は得られないため、ヒトでのリスク評価について情報価値のあるもの、あるいは妥当なものにはならないであろう。ヒトにおけるリスクは、高度に患者特異的で、個々の胎児胎盤と母体の免疫システム系との相互作用に主に依存しており、薬剤の全身曝露量が同じでも患者によって異なる転帰をもたらすことが起こり得る。

2.6.6.7　局所刺激性試験

独立した MK-3475の局所刺激性試験は実施していない。局所刺激性は MK-3475の1ヵ月及び6ヵ月間反復投与毒性試験の中に含めて評価した[2.6.7.7A 項] [2.6.7.7B 項]。これらの試験では、投与部位に関する症状、肉眼所見及び病理組織学的所見を局所刺激性の評価項目として含めた。その結果、投与部位には被験物質に関連した変化はなく、MK-3475の静脈内投与部位における忍容性は良好であることが示された。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　抗原性試験

MK-3475の抗原性（免疫原性）は、1ヵ月及び6ヵ月間反復投与毒性試験の一部として評価した。

C Confidential

抗 MK-3475抗体（ADA）は、複数の動物で検出された。抗 MK-3475反応に関連した毒性学的な観察所見や変化はなく、抗 MK-3475抗体の TK パラメータへの影響はほとんどなかった[2.6.7.7A 項] [2.6.7.7B 項]。通常の反復投与毒性試験では、MK-3475によって誘発された抗原性に起因すると考えられる観察所見や変化は認められなかった。

2.6.6.8.2　免疫毒性試験

MK-3475は、PD-1とそのリガンドである PD-L1及び PD-L2との相互作用を阻害して、腫瘍浸潤リンパ球の機能的な活性を強化し、腫瘍を退縮させ、最終的には腫瘍に対する免疫拒絶反応を促進させるように設計されている。すなわち、MK-3475は、末梢での免疫寛容を制御する PD-1経路に影響することにより、免疫調節機能を発揮する。MK-3475の免疫毒性の評価は、「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」（ICH S8）で推奨された方法に準拠して、カニクイザルの1ヵ月及び6ヵ月間反復投与毒性試験に含めて実施した[2.6.7.7A 項] [2.6.7.7B 項]。これらの試験結果からは、自己免疫性又は炎症性の毒性や、リンパ組織に対する毒性は示されなかった。また、これらの試験での、血液学的検査、臓器重量並びに肉眼的及び病理組織学的検査の総合的な評価より、MK-3475に免疫毒性の懸念は認められなかったことから、新たな免疫毒性試験を実施する必要はないと考えられた。

2.6.6.8.2.1　抗マウス PD-1抗体（muDX400[redacted]）：B 型肝炎ワクチン（[redacted]）を用いたマウス探索的反復皮下投与免疫毒性試験（TT[redacted]-1105）

（参考資料）[資料4.2.3.7.7.3: TT[redacted]-1105]

MK-3475の作用機序と関連して、ワクチン接種後の免疫反応が変化する可能性を検討するため、T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験を、げっ歯類の抗 PD-1代替抗体を用いたマウスモデルにより実施した[2.6.7.17C 項]。

この試験は、B 型肝炎ワクチンに対する初回抗体反応（初回接種）及びリコール抗体反応（第2回目接種）の強度と動態に対して、抗 PD-1モノクローナル抗体による阻害の影響を評価する目的で行った。PD-1阻害の影響を、血漿中濃度が平衡状態に到達した時点の初回免疫反応と休薬期間後のリコール反応の強度で評価した。CD1マウスへ muDX400（[redacted]、マウス抗 PD-1モノクローナル抗体）5 mg/kg/day を試験1日目に単回皮下投与（群2）、又は試験1、8、15、22及び29日目に週1回、計5回皮下投与した（群3）。対照群のマウスへは、生理食塩水を29日間にわたり週1回皮下投与した（群1）。すべての動物に対して、B 型肝炎ワクチン（[redacted]）の初回接種及び第2回目接種を、試験2及び23日目に筋肉内投与（0.5 μg/dose）により行った。各群の雌雄各18匹を、サンプル収集のため、6匹/性/群のコホートへ割り付けた（コホート A、B、C）。群2では、抗 PD-1抗体の投与は初回の皮下投与で終了し、muDX400の非存在下で B 型肝炎抗原ワクチンに対する第2次（リコール）反応を評価した。群3では、マウスは B 型肝炎ワクチンの初回及びブースト投与の期間を通して muDX400を投与したので、muDX400の継続的な投与下における B 型肝炎ワクチンに対する初回及び第2次免疫反応の評価が可能であった。

投与方法の概要を下記の表に示す[表2.6.6: 13]

C Confidential

表 2.6.6: 13　TT[redacted]-1105 試験：　投与方法の概要

Dose Group	Test Article/Control Article[a]	Hepatitis B Vaccine[b]	Number of Females[c]	Number of Males[c]
1	Phosphate Buffered Saline 0 mg/kg/dose Study Days 1, 8, 15, 22, 29	Hepatitis B Vaccine 0.5 µg/dose Study Days 2 and 23	20	20
2	muDX400 5 mg/kg Study Day 1	Hepatitis B Vaccine 0.5 µg/dose Study Days 2 and 23	20	20
3	muDX400 5 mg/kg/dose Study Days 1, 8, 15, 22, 29	Hepatitis B Vaccine 0.5 µg/dose Study Days 2 and 23	20	20

[a] 皮下投与
[b] 筋肉内投与
[c] 各投与群の18匹/性はサンプル収集のため6匹/性/群のコホートへ割り付けられた（コホート A,B,C）。残りの2匹/性/群は血液及び脾臓サンプル収集のための交代動物であった。

免疫毒性は、死亡数、一般状態の観察、体重、血液、サイトカイン及び肉眼的病理評価、並びに脾臓細胞のイムノフェノタイピングを基に評価した。muDX400の薬物濃度は、群2及び3の動物において、試験3、24、35及び50日目に測定した。muDX400の抗薬物抗体は、同じ群の試験35及び50日目のサンプルで測定した。抗 B 型肝炎ワクチン抗体は、各投与群の試験10、18、27、34及び50日目に測定した。

被験物質に関連した死亡、一般状態の変化はなく、また体重、血液及びサイトカインの変化もなかった。muDX400投与に関連する肉眼的病理所見もなかった。

被験物質に関連した脾臓リンパ球の絶対数と B 細胞及び T 細胞のサブセットの軽度な増加（< 30%）が群2（muDX400単回投与）と群3（muDX400の週1回投与を計5回）の試験34及び50日目に観察された。この増加の程度は小さく、また脾臓の B 細胞及び T 細胞サブセットの割合が、試験34及び50日目における muDX400投与動物と PBS 投与動物との間で同様であることから、細胞絶対数の増加は毒性学的に意義のないものと考えられた。B 型肝炎ワクチンの初回及び第2回の接種を受けた条件下で muDX400を投与したマウスの脾臓内細胞数の変化は、PD-1ノックアウトマウスでの所見と一致しており、muDX400の作用として提案されている作用機序と関連すると考えられる[資料4.3: 21]。

群2（muDX400の単回投与）のすべての動物は、B 型肝炎ワクチン初回接種翌日の試験3日目では、muDX400へ曝露されていた。群3（muDX400週1回投与の計5回）のすべての動物は、B 型肝炎ワクチンの初回接種（試験2日目）及びブースト接種（試験23日目）の期間を含む試験24日目まで、muDX400へ曝露されていた。群2では、muDX400の濃度は試験24及び50日目の間で減少し、試験24日目では12匹中3匹が検出限界以下であった。また、試験34日目では12匹中7匹、試験50日目では12匹中8匹が検出限界以下であった。試験50日目までに、muDX400抗薬物抗体は12匹中11匹に存在していた。群3では、muDX400濃度は試験35日目及び50日目の間で減少し、試験35日目では12匹中4匹、試験50日目では12匹中6匹が検出限界以下であった。群3での抗薬物抗体は、試験50日目では12匹中10匹で存在が確認された。mxDX400を投与した両群では、全般的に低い muDX400血清濃度と抗薬物抗体の存在とが関連していた。

C Confidential

B 型肝炎ワクチンは、3つの投与群すべてに対して免疫原性があり、第2回目の接種後にブーストされる抗 B 型肝炎ワクチン抗体価を誘導し、その力価は時間とともに上昇して、典型的なワクチン抗体反応の動態を示した。個々のマウス間の抗体価の変動は比較的大きかったが、3つの投与群の抗体価の幾何平均値には有意差はなく、muDX400投与群は、対照群と比べて、ワクチンに対する初回及びリコール抗体反応において同様の動態を示した。

結論として、抗 PD-1投与群と対照群との間に、B 型肝炎ワクチンに対する初回及びリコール抗体反応の強度及び動態への影響はないことが観察された。

2.6.6.8.3　作用機序に関する試験

作用機序は薬効薬理試験の中に含めて評価した。それ以外の作用機序に関する試験は実施していない。

2.6.6.8.4　依存性試験

MK-3475には薬物乱用を引き起す可能性を示す薬理学的プロファイルは認められなかった。また、4ヵ月間の回復期間を含む反復投与毒性試験において向精神作用（鎮静作用又は刺激作用）を示す所見も認められなかった[2.6.7.7A 項] [2.6.7.7B 項]。このため、薬物乱用に関する動物試験は実施していない。

2.6.6.8.5　代謝物の試験

被験物質分子の性質を考慮し、代謝物の毒性を評価する試験は実施していない。

2.6.6.8.6　不純物の試験

被験物質分子の性質を考慮し、不純物に関する従来の試験は実施していない。ただし、MK-3475の毒性試験で用いた原薬及び製剤のロットについて行った主要な純度アッセイ（[redacted]）及び主要な不純物アッセイ（[redacted]）の結果によれば、毒性試験で用いた被験物質の純度は治験薬と非常に類似していた[2.6.7.4 項]。このため、毒性試験に用いた被験物質特有の毒性はないものと推察される。同様に、毒性試験で評価されなかった治験薬特有の不純物もないものと推察される。

2.6.6.8.7　その他の試験

2.6.6.8.7.1　カニクイザルの正常組織における MK-3475（SCH 900475）の交差反応性試験（SN[redacted]395）

（評価資料）[資料4.2.3.7.7.1: SN[redacted]395]

本試験では、カニクイザルの正常組織の凍結切片を用いて MK-3475の交差反応性を評価した（SN[redacted]395）[2.6.7.17A 項]。結合の検出では、非標識の被験物質 MK-3475をビオチン標識二次抗体とあらかじめ混合し、1及び10 µg/mL の濃度でカニクイザルの正常組織の凍結切片（可能であ

C Confidential

ればドナー3匹／組織）と反応させた。次にそのスライドをアビジン／ビオチン-ペルオキシダーゼ（ABC Elite 試薬）とインキュベートし、3, 3’-ジアミノベンジジン（DAB）基質で発色させ、組織切片中の標的抗原と一次抗体の結合部位を検出した。

適切な同時陽性及び陰性対照の組織（陽性対照組織：炎症時のヒト扁桃腺、陰性対照組織：骨格筋）及び抗体（陰性対照：抗 RSV-IgG4）並びにアッセイ対照を用いて試験結果の妥当性を確認した。その結果、予想どおり、MK-3475は陽性対照組織［炎症時のヒト扁桃腺の凍結切片（胚中心内の単核白血球）］で弱～強染色を示した。一方、陰性対照組織［ヒト正常横紋（骨格）筋の凍結切片］では特異的反応を示さなかった。

単核白血球膜の陽性染色結果は、PD-1の既知の生物学的特性及び発現部位に一致した標的分子への結合と考えられた[資料4.3: 22]。

標的分子以外との交差反応性染色も認められ、様々な組織／細胞の細胞質、下垂体後葉内細胞外物質、及び多くの組織の間質（細胞外結合組織基質）が染色性を示した。これらの非標的部位の染色性は、in vitro での組織交差反応性試験の実験方法（免疫組織化学染色における組織処理）によるアーティファクトを示すものであり、in vivo での毒性学的意義はないと考えられた。間質／細胞外物質の染色性についても、カニクイザルの1ヵ月及び6ヵ月間反復投与毒性試験で間質の所見では異常が認められなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。ICH S6（R1）ガイドラインでも、組織交差反応性試験に関する注釈として「組織結合自体は in vivo での生物活性を示すものではない。また、組織交差反応性試験において、in vivo では通常抗体が到達できない領域（例えば、細胞質）に結合が認められても、概してその生物学的意義は低い。これらの試験成績は、薬効薬理試験及び安全性試験全体を踏まえて評価されるべきである。」と同様の解釈が記載されている。

2.6.6.8.7.2　ヒトの正常組織における MK-3475（SCH 900475）の交差反応性試験（SN[redacted]394）

（評価資料）[資料4.2.3.7.7.2: SN[redacted]394]

本試験では、ヒトの正常組織の凍結切片を用いて MK-3475の交差反応性を評価した（SN[redacted]394）[2.6.7.17B 項]。結合の検出では、非標識の被験物質 MK-3475をビオチン標識二次抗体とあらかじめ混合し、1及び10 µg/mL の濃度でヒトの正常組織の凍結切片（可能であればドナー3例／組織）と反応させた。次にそのスライドをアビジン／ビオチン-ペルオキシダーゼ（ABC Elite 試薬）とインキュベートし、DAB 基質で発色させ、組織切片中の標的抗原と一次抗体の結合部位を検出した。

適切な同時陽性及び陰性対照の組織（陽性対照組織：炎症時のヒト扁桃腺、陰性対照組織：骨格筋）及び抗体（陰性対照：抗 RSV-IgG4）並びにアッセイ対照を用いて試験結果の妥当性を確認した。その結果、予想どおり、MK-3475は陽性対照組織［炎症時のヒト扁桃腺の凍結切片（胚中心内の単核白血球）］で弱～強染色を示した。一方、陰性対照組織［ヒト正常横紋（骨格）筋の凍結切片］では特異的反応を示さなかった。

MK-3475の免疫組織化学的交差反応性試験の結果は、カニクイザルとヒトの凍結組織切片間で染色性が全体的によく一致していた。両試験とも、単核白血球膜の陽性染色結果は、PD-1の既知

C Confidential

の生物学的特性及び発現部位に一致した標的分子との結合であると考えられた[資料4.3: 22]。

しかしながら、多くのヒト組織（ヒト胎盤を除く）の間質（細胞外結合組織基質）において、カニクイザルの組織でみられたものと同様に、標的分子以外との交差反応性染色が認められた。間質への染色は、実験手法（免疫組織化学染色における組織処理）によるアーティファクトと考えられるもので、免疫組織交差反応性試験の限界としてよく知られている[資料4.3: 23]。免疫組織化学の実験では、組織切片の作成が必要であり、その結果、モノクローナル抗体に対する細胞質の人工的な曝露が生じる。これは、in vivo の無傷細胞表面でのモノクローナル抗体と標的分子間で生じる相互作用とは全く異なるものである。この組織交差反応性試験での間質への染色は非特異的結合であるとの解釈は、カニクイザルを用いた in vivo 試験（1ヵ月及び6ヵ月間反復投与毒性試験）での病理組織的な所見においても、MK-3475の間質への結合は示唆されなかったことから確認された。以上から、間質への非特異的な染色は MK-3475添加とは関連がなく、ヒトに対する安全性のリスクを示すものではないと考えられた。

上述のように、MK-3475の組織交差反応性試験では、カニクイザル及びヒトの間で同様の染色性を示した。ひとつの例外として、ヒト卵巣切片のマクロファージの細胞質部分に陽性染色が観察されたが、カニクイザルの卵巣切片ではみられなかった。この染色はヒト卵巣内のマクロファージの細胞質内に生じており、MK-3475は in vivo では細胞の細胞質へは到達できないため、組織交差反応性試験の実験条件に起因するアーティファクトであり in vivo では曝露されてないものと考えられた。したがって、ヒト卵巣内のマクロファージの細胞質に対する MK-3475の染色は、毒性学的に意義がないものと考えられ、ヒトの安全性へのリスクを示すものではない。この解釈は、このような観察結果に対して ICH S6(R1)において推奨される解釈と一致している。

さらに、米国本社有害事象報告レビューシステム（Merck Adverse event Reporting and Review System: MARRS）のデータベース及び器官別大分類（SOC）が臨床検査（Investigations）に分類される有害事象の臨床情報に基づき、MK-3475を投与した患者の黄体形成ホルモン（LH）又は卵胞刺激ホルモン（FSH）の上昇やエストラジオール減少の兆候を調べることにより、卵巣に関する潜在的な有害事象を調査した。このデータベース調査の結果、卵巣を含む生殖腺の機能障害のエビデンスは示されなかった。入手可能なヒトの安全性データからは、MK-3475は卵巣に対する影響はないことが支持された。

以上、ヒト及びカニクイザルの組織を用いた交差反応性試験の結果、両種の単核白血球膜に標的分子との結合を示す染色性が認められた。両試験で標的分子以外との結合を示す染色（細胞質及び間質）も認められたが、これは実験方法（免疫組織化学染色における組織処理）によるアーティファクトと考えられるもので、組織交差反応性試験の限界としてよく知られている[資料4.3: 23]。したがって、in vitro で観察された細胞質及び間質の染色性には in vivo での生物学的意義がなく、ヒトの安全性に対するリスクを示すものではないと考えられる。

2.6.6.9　考察及び結論

MK-3475の毒性を、カニクイザルに6、40又は200 mg/kg を週1回静脈内投与（合計5回）した1

C Confidential

ヵ月間反復投与毒性試験及び、6、40又は200 mg/kg を2週に1回静脈内投与（合計12回）した6ヵ月間反復投与毒性試験で評価した。カニクイザルにおける MK-3475の忍容性は良好で、1ヵ月間試験の試験期間中の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}7d}$）は最大約170,000 µg•day/mL、6ヵ月間試験の試験期間中の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}14d}$）は最大約67,500 µg•day/mL であった。これらの試験結果からの曝露量と予想されるヒトの曝露量比を[表2.6.6: 14]に示した。

表 2.6.6: 14　MK-3475 の全身曝露量比

Species	Study Duration	Dose Levels (mg/kg/day)	AUC 0-tau (µg·day/mL) Dosing Interval 5 or 11[a]	Exposure Multiple (EM)	
				2.0 mg/kg[b,d]	10.0 mg/kg[c,d]
Monkey	1 month	6	1790	2.5	0.5
		40	24100	33	6.7
		200 (NOAEL)	170000	236	47
	6 month	6	1200	1.7	0.3
		40	13417	19	3.7
		200 (NOAEL)	67500	94	19

a　1ヵ月間試験では tau = 7日で、5回目の投与時（試験5週時）のデータを使用[表2.6.6: 2]。6ヵ月間試験では tau = 14日で、11回目の投与時（試験21-22週時）のデータを使用[表2.6.6: 7]。
b　臨床用量2 mg/kg（3週に1回投与）の $AUC_{(0\text{-}tau)}$の予測値721.5 µg•day/mL に基づく曝露量比。
c　臨床用量10 mg/kg（2又は3週に1回投与）の $AUC_{(0\text{-}tau)}$の予測値3,607.3 µg•day/mL に基づく曝露量比。$AUC_{(0\text{-}tau)}$は定義上投与間隔に影響されないため、2週に1回投与時の曝露量比と3週に1回投与時の曝露量比は同じである。
d　臨床での定常状態の AUC はクリアランスから算出した（投与量をクリアランスで除して、1週間の値に補正）。クリアランスは、母集団薬物動態解析モデルによって0.219 L/day と求められた。

MK-3475の1ヵ月及び6ヵ月間毒性試験のいずれにおいても毒性学的に意義のある所見は認められなかったことから、無毒性量は200 mg/kg（評価した最高用量）以上であった。また、ヒト及びカニクイザルの組織を用いた in vitro 組織交差反応性試験及び代替抗体を用いたマウスモデルでの T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験でも毒性学的に意義のある所見は認められなかった。このような非臨床試験のプロファイルは、MK-3475の臨床推奨用量での安全性を裏付けるものである。

C Confidential

2.6.6.10　参考文献

[資料4.3: 19] Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. J Exp Med. 2005; 202: 231-7.

[資料4.3: 20] 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: 283-92.

[資料4.3: 21] Nishimura H, Minato N, Nakano T, et al. Immunological studies on PD-1-deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. Int Immunol. 1998; 10: 1563-72.

[資料4.3: 22] Iwai Y, Okazaki T, Nishimura H, et al. Microanatomical localization of PD-1 in human tonsils. Immunol Lett. 2002; 83: 215-20.

[資料4.3: 23] Leach MW, Halpern WG, Johnson CW, et al. Use of tissue cross-reactivity studies in the development of antibody-based biopharmaceuticals: history, experience, methodology, and future directions. Toxicol Pathol. 2010; 38: 1138-66.

[資料4.3: 39] 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: 63-101.

[資料4.3: 40] Chamanza R, Marxfeld HA, Blanco AI, et al. Incidences and range of spontaneous findings in control cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) used in toxicity studies. Toxicol Pathol. 2010; 38: 642-57.

[資料4.3: 41] Keir ME, Liang SC, Guleria I, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. J Exp Med. 2006; 203: 883-95.

[資料4.3: 43] Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol. 2007; 19: 813-24.

[資料4.3: 44] Zhao1 S, Zhu W, Xue S, et al. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. Cell Mol Immunol. 2014; 11: 428-37.

[資料4.3: 45] Li N, Wang T, Han D. Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. Front Immunol. 2012; 3: 152.

[資料4.3: 46] Cheng X, Dai H, Wan N. Interaction of programmed death-1 and programmed death-1 ligand-1 contributes to testicular immune privilege. Transplantation. 2009; 87: 1778-86.

C Confidential

[資料4.3: 47] Graziotto R, Foresta C, Scannapieco P, et al. cDNA cloning and characterization of PD1: a novel human testicular protein with different expressions in various testiculopathies. Exp Cell Res. 1999; 248: 620-6.

[資料4.3: 48] Onisto M, Graziotto R, Scannapieco P, et al. A novel gene (PD1) with a potential role on rat spermatogenesis. J Endocrinol Invest. 2000; 23: 605-8.

[資料4.3: 49] Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. Rev Reprod. 1996; 1: 162-72.

[資料4.3: 50] Petroff MG, Chen L, Phillips TA, et al. B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. Biol Reprod. 2003; 68: 1496-504.

[資料4.3: 51] Schjenken JE, Tolosa JM, Paul JW, et al. Mechanisms of maternal immune tolerance during pregnancy.IN: Zheng J, editor. Recent advances in research on the human placenta. InTech; 2012. p211-42.

[資料4.3: 52] Erlebacher A, Vencato D, Price KA, et al. Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus. J Clin Invest. 2007; 117: 1399-411.

[資料4.3: 53] Taglauer ES, Yankee TM, Petroff MG. Maternal PD-1 regulates accumulation of fetal antigen-specific $CD8^+$ T cells in pregnancy. J Reprod Immunol. 2009; 80: 12-21.

[資料4.3: 54] Morse HC, III. The laboratory mouse - a historical perspective. IN: Foster HL, Small JD, Fox JG, editors. The mouse in biomedical research volume 1: history, genetics, and wild mice. Academic press; 1981. p1-16.

[資料4.3: 55] Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, et al. Genealogies of mouse inbred strains. Nat Genet. 2000; 24: 23-5.

[資料4.3: 56] Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol. 2004; 5: 266-71.

[資料4.3: 57] Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, et al. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced $CD4^+CD25^+$ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. Am J Pathol. 2005; 166: 811-22.

[資料4.3: 58] Habicht A, Dada S, Jurewicz M, et al. A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance. J Immunol. 2007; 179: 5211-9.

[資料4.3: 59] Gros A, Robbins PF, Yao X, et al. PD-1 identifies the patient-specific $CD8^+$ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. J Clin Invest. 2014; 124: 2246-59.

C Confidential

[資料4.3: 60]　Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. 2014; 515: 568-71.

[資料4.3: 61]　Pentsuk N, van der Laan JW. An interspecies comparison of placental antibody transfer: new insights into developmental toxicity testing of monoclonal antibodies. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2009; 86: 328-44.

[資料4.3: 62]　Kane SV, Acquah LA. Placental transport of immunoglobulins: a clinical review for gastroenterologists who prescribe therapeutic monoclonal antibodies to women during conception and pregnancy. Am J Gastroenterol. 2009; 104: 228-33.

[資料4.3: 63]　Malek A, Sager R, Kuhn P, et al. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. Am J Reprod Immunol. 1996; 36: 248-55.

[資料4.3: 64]　Fukumoto K, Terao K, Cho F, et al. The placental transfer of IgG in the cynomolgus monkey. Jpn J Med Sci Biol. 1983; 36: 171-6.

[資料4.3: 65]　Coe CL, Kemnitz JW, Schneider ML. Vulnerability of placental antibody transfer and fetal complement synthesis to disturbance of the pregnant monkey. J Med Primatol. 1993; 22: 294-300.

[資料4.3: 66]　Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, et al.　Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. Science. 2001; 291: 319-22

[資料4.3: 67]　Wang J, Yoshida T, Nakaki F, et al.　Establishment of NOD-Pdcd1-/- mice as an efficient animal model of type I diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102: 11823-8.

C Confidential

CTD 第 2 部

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7　毒性試験概要表

MSD 株式会社

TABLE OF CONTENTS

2.6.7.1 Toxicology: Overview....2
2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies....4
2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data....5
2.6.7.4 Toxicology: Drug Substance....6
2.6.7.5 Single-Dose Toxicity....7
2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies....7
2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity: Report Title: One-Month Intravenous (Bolus) Toxicity and Toxicokinetic Study of SCH 900475 in Cynomolgus Monkeys with a Four-Month Recovery Period (SN [redacted]396)....8
2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity: Report Title: Six-Month Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with a Four-Month Treatment Free Period (TT #[redacted]-1084)....14
2.6.7.8 Genotoxicity – In Vitro....17
2.6.7.9 Genotoxicity – In Vivo....17
2.6.7.10 Carcinogenicity....17
2.6.7.11 Reproductive and Developmental Toxicity: Non-Pivotal Studies....17
2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation....17
2.6.7.13 Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development....17
2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function....18
2.6.7.15 Reproductive and Developmental Toxicity – Studies in Which the Offspring (Juvenile Animals) are Dosed and/or Further Evaluated....18
2.6.7.16 Local Tolerance....18
2.6.7.17A Other Toxicity Studies: Cross-Reactivity Study of SCH 900475 with Normal Cynomolgus Monkey Tissues....19
2.6.7.17B Other Toxicity Studies: Cross-Reactivity Study of SCH 900475 with Normal Human Tissues....20
2.6.7.17C Other Toxicity Studies: Anti-Murine PD-1 Antibody (muDX400 [redacted]): Exploratory Multiple-Dose Subcutaneous Immunotoxicity Study in Mice with Hepatitis B Vaccine ([redacted]).....21

C Confidential

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Test Article: MK-3475 (SCH 900475)

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Vol. Section
Repeat-Dose Toxicity	Monkey/ Cynomolgus	IV	once every week for 1 month (a total of five doses) with a 4-month postdose period	6, 40, 200	Yes[b]	SPRI-LAF	SN [redacted]396	**[Ref. 4.2.3.2.1: SN [redacted]396]**
Repeat-Dose Toxicity	Monkey/ Cynomolgus	IV	once every other week for approximately 6 months (a total of 12 doses) followed by a 4-month treatment-free period	6, 40, 200	Yes	MRL-WP	TT #[redacted]-1084	**[Ref. 4.2.3.2.2: TT[redacted]-1084]**
Other Toxicity Studies/Tissue Cross Reactivity	Monkey Tissues/ Cynomolgus	In vitro	N/A	N/A	Yes[c]	[redacted]	SN [redacted]395	**[Ref. 4.2.3.7.7.1: SN [redacted]395]**
Other Toxicity Studies/Tissue Cross Reactivity	Human Tissues	In vitro	N/A	N/A	Yes[c]	[redacted]	SN [redacted]394	**[Ref. 4.2.3.7.7.2: SN [redacted]394]**
Other Toxicity Studies/TDAR	CD1 mice	SC injection	Multiple Dose (single dose on Study Day 1 or as once-weekly doses on Study Days 1, 8, 15, 22, and 29.)	5 mg/kg muD X400/ 0.5 µg/dose Hepatitis B Vaccine	No[d]	MRL-WP	TT #[redacted]-1105	**[Ref. 4.2.3.7.7.3: TT[redacted]-1105]**

Confidential

2.6.7.1 Toxicology: Overview (continued)

Test Article: MK-3475 (SCH 900475)

IV = Intravenous; N/A = Not applicable; SPRI-LAF = Schering Plough Research Institute, Lafayette NJ; MRL-WP = Merck Research Laboratories, West Point PA; [redacted]; TDAR = T-cell dependent antibody response; SC = Subcutaneous

a Unless otherwise specified. For Repeat-Dose Toxicity, the highest NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect Level) is underlined.

b GLP compliant with the exception that IL-2 analysis and serum analysis for the presence of neutralizing antibodies were performed using non-GLP methods

c GLP compliant with the following exceptions: (1) stability analysis of the test and control article within the carrier used for the study was not performed; (2) Analysis of test and control article concentration and uniformity within the carrier was also not conducted as specified under GLP regulations, as no sufficient method has been determined which can accurately determine the concentration of the test and control article under the conditions and carriers used in the assay.

d The T cell-dependent Antibody Response (TDAR) study in mice with murine surrogate anti-PD-1 was exploratory and conducted according to GLP principles with the exceptions that the test article muDX400 was not produced under GMP and the assays related to the surrogate antibody muDX400 were not GLP.

C Confidential

2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Test Article: MK-3475 (SCH 900475)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location Vol. Section
Toxicokinetics after repeat dose (one month)	Cynomolgus Monkey	Intravenous injection	6, 40, 200 mg/kg	Yes	SN [redacted]396	[Ref. 4.2.3.2.1: SN [redacted]396]
Toxicokinetics after repeat dose (six months)	Cynomolgus Monkey	Intravenous injection	6, 40, 200 mg/kg	Yes	TT #[redacted]-1084	[Ref. 4.2.3.2.2:TT[redacted]-1084]

Confidential

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data

Test Article: MK-3475 (SCH 900475)

Dose (mg/kg)	$AUC_{0\text{-}tau}$ (µg·day/mL)[a]	
	Monkey (M + F combined)	Human
2		721.5[f]
6	1790[b] (2350)[b,c] 1200[d] (2463)[c,d]	
10		3607.3[f]
40	24100[b,e] 13417[d]	
200	170000[b,e] 67500[d]	

a tau = 7 days in 1 month study and data are from Dosing Interval 5 (Study Week 5); tau = 14 days in 6 month study and data are from Dosing Interval 11 (Study Weeks 21-22)

b Values from SN[redacted]396 [Ref. 4.2.3.2.1: SN[redacted]396], $AUC_{0\text{-}7\ days}$ (µg·day/mL)

c AUC (in the bracket) after exclusion of ADA positive samples.

d Values from TT #[redacted]-1084 [Ref. 4.2.3.2.2: TT[redacted]-1084], $AUC_{0\text{-}14\ days}$ (µg·day/mL)

e Upper estimate; arithmetic mean of AUC(0-7 days) from 4 animals (2/sex)

f EM @ predicted AUC(0-tau) of 721.5 µg.day/mL for the clinical dose of 2 mg/kg, Q3W; EM @ predicted AUC(0-tau) of 3607.3 µg·day/mL for the clinical dose of 10 mg/kg, Q3W and Q2W. AUC(0-tau) is by definition independent of schedule and therefore the EMs for Q2W and Q3W are identical. Clinical AUC at steady state calculated from clearance as dose divided by clearance and normalized to one week. Clearance was determined by popPK modeling at 0.219 L/day.

C Confidential

2.6.7.4 Toxicology: Drug Substance

Test Article: MK-3475 (SCH 900475)

Assay Type	Assay	Testing Criteria	Batch No.	
			[redacted]	[redacted]
PURITY ASSAYS				
[redacted]	HPSEC	≥ [redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	CE-SDS (Reducing)	≥ [redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	CE-SDS (Non-Reducing)	≥ [redacted]	[redacted]	[redacted]
IMPURITY ASSAYS				
[redacted]	HP SEC	≤ [redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	HP SEC	≤ [redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	NA	< [redacted] ≤ [redacted] ≤ [redacted]	< [redacted] [c] < [redacted] [c] < [redacted] [c]	< [redacted] < [redacted] < [redacted]

HPSEC = High Pressure Size-Exclusion Chromatography; CE-SDS = Capillary Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulfate; ND = Not determined; DL = Detection Limit; NA = Not applicable; QL = Quantitation Limit;

a Batch No. used in the one-[Ref. 4.2.3.2.1: SN[redacted]396] and six-month [Ref. 4.2.3.2.2: TT[redacted]-1084] monkey toxicology studies.

b This batch was used as a reference standard for the bioanalytical immunoassays in the 1- and 6-month monkey toxicology studies.

c Values from the unformulated drug substance are used; the test is not repeated.

Confidential

2.6.7.5 Single-Dose Toxicity

No formal acute toxicity studies have been conducted with MK-3475. However, the toxicity after a single dose can be assessed from the repeat-dose toxicity studies in monkeys. See the study summaries of the repeat-dose toxicity studies presented in [Sec. 2.6.7.7A; 2.6.7.7B].

2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies

Non-pivotal repeat-dose toxicity studies have not been conducted with MK-3475.

C Confidential

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity: Report Title: One-Month Intravenous (Bolus) Toxicity and Toxicokinetic Study of SCH 900475 in Cynomolgus Monkeys with a Four-Month Recovery Period (SN [redacted]396)

Test Article: MK-3475 (SCH 900475)

Species: Cynomolgus monkey
Initial Age: 26 to 39 months (males); 24 to 51 months (females)
Date of First Dose: [redacted]

Duration of Dosing: Once every 7 days for 29 days (total of 5 doses)
Duration of Postdose: 126 days
Method of Administration: Intravenous (bolus) injection
Vehicle Formulation: MK-3475 Placebo solution[a]

Study No. SN [redacted]396
Location in CTD: Vol. Section [Ref. 4.2.3.2.1: SN [redacted]396]
GLP Compliance: Yes[b]

Special Features: NA
No Observed Adverse-Effect Level: 200 mg/kg

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		6		40		200	
Number of Animals[c]	M:6	F:6	M:6	F:7[d]	M:6	F:6	M:6	F:6
Toxicokinetics								
- Dosing Interval 1 (Days 0-7)								
AUC(0-7 days) (µg·day/mL)[e]								
arithmetic mean	NA		923		7240		49700	
geometric mean	NA		902		6700		43500	
Cmax (µg/mL)	NA		292		2510		14800	
Tmax (hr)	NA		1		1		1	
- Dosing Interval 5 (Days 28-35)								
AUC(0-7 days) (µg·day/mL)[e]								
arithmetic mean (before exclusions)	NA		1790		24100		170000	
arithmetic mean (after exclusions)	NA		2350		24100		170000	
geometric mean (after exclusions)	NA		2240		20200		164000	
Cmax (µg/mL)	NA		350		4770		86200	
Tmax (hr)	NA		2		2		3	

NA = Not applicable

a MK-3475 Placebo solution consists of 10 mM histidine (pH 5.5), 7% (w/v) sucrose and 0.02% (w/v) polysorbate 80.

b GLP compliant with the exception that IL-2 analysis and serum analysis for the presence of neutralizing antibodies were performed using non-GLP methods.

c Four monkeys/sex/group were euthanized during Week 5. Two monkeys/sex/group were euthanized during Week 23 after a four-month recovery period.

d Number includes one female that was euthanized on Day 1 due to an injury sustained on Day 0 and subsequently replaced.

e Male and female data combined. Mean toxicokinetic parameters for Dosing Interval 5 were calculated before and after the exclusion of animals for which anti-MK-3475 antibodies were detected and for which an increased rate of elimination (clearance) was apparent (two males and three females in the 6 mg/kg dose group).

C Confidential

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity Study No. [redacted]396 [Ref. 4.2.3.2.1: SN[redacted]396]

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		6		40		200	
Number of Animals	M:6	F:6	M:6	F:7[a]	M:6	F:6	M:6	F:6
Pharmacokinetics								
Terminal t½ (days)[b]	NA		15.7		22.3		19.8[c]	
Serum Analysis for Anti-MK-3475 Antibodies								
Day 0 (Predose)	0/6	1/6[d]	0/6	0/7	0/6	0/6	0/5	1/6[d]
Day 14 (Predose)	0/6	1/6[d]	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Day 21 (Predose)	1/6[d]	0/6	2/6	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Day 28 (Predose)	0/6	0/6	2/6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Day 35	0/2	1/2[d]	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Day 42	0/2	1/2[d]	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Day 56	0/2	1/2[d]	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Day 70	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Day 98	0/2	0/2	0/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2
Day 126	0/2	0/2	1/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2
Day 154	0/2	0/2	0/1	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2

NA = Not applicable # / # = number affected / number examined

a Number includes one female that was euthanized on Day 1 due to an injury sustained on Day 0 and subsequently replaced.

b Pharmacokinetic parameters were determined for animals assigned to the recovery period that did not test positive for anti-MK-3475 antibodies (one male in the 6 mg/kg dose group, one male and two females in the 40 mg/kg dose group, and two males and two females in the 200 mg/kg dose group). Male and female data combined. Individual terminal t½ ranged from 11.8 to 23.7 days across doses.

c Mean terminal t½ = 22.5 days after the exclusion of one male whose serum concentrations were lower than those of other animals in the group from Days 30-154 and whose terminal t½ was the lowest after the fifth dose (11.8 days).

d Measurable anti-MK-3475 antibody serum concentrations for one female in the 200 mg/kg dose group prior to dosing on the first day of dosing and one male and one female in the 0 mg/kg dose group may represent basal levels or endogenous matrix interference and had no impact on data analysis or conclusions.

C Confidential

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity Study No. [redacted]396 [Ref. 4.2.3.2.1: SN[redacted]396]

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		6		40		200	
Number of Animals	M:6	F:6	M:6	F:7[a]	M:6	F:6	M:6	F:6
Serum Analysis for Neutralizing Anti-MK-3475 Antibodies[b]								
Day 0 (Predose)	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	0/1
Day 14 (Predose)	NA	1/1	NA	0/1	NA	NA	NA	NA
Day 21 (Predose)	1/1	NA	1/2	1/3	NA	NA	NA	NA
Day 28 (Predose)	NA	NA	1/2	1/2	NA	NA	NA	NA
Day 35	NA	1/1	NA	0/1	NA	NA	NA	NA
Day 42	NA	0/1	NA	1/1	NA	NA	NA	NA
Day 56	NA	1/1	NA	1/1	NA	NA	NA	NA
Day 70	NA	NA	NA	1/2	NA	NA	NA	NA
Day 98	NA	NA	NA	2/2	0/1	NA	NA	NA
Day 126	NA	NA	0/1	2/2	0/1	NA	NA	NA
Day 154	NA	NA	NA	2/2	0/1	NA	NA	NA

In Vitro Analysis of MK-3475 Activity (IL-2): An ex-vivo SEB (Staphylococcus Enterotoxin B) whole-blood assay was conducted as a surrogate measure of in vivo target engagement in control MK-3475-dosed animals. Ex vivo addition of MK-3475 and SEB to whole blood collected from control animals potentiated IL-2 production approximately 2-3 fold. Potentiation of IL-2 production was not observed in whole blood collected from MK-3475-dosed animals, indicating target engagement as a result of test article administration. The ability to prevent potentiation was similar at all dose levels and was observed after administration on both Day 0 and Day 28 for the majority of animals. In one male in the 6 mg/kg dose group, the ability to prevent potentiation progressively decreased over time and was likely the result of anti-MK-3475 antibodies detected in this animal. A similar decrease in effect over time was also observed in a single male in the 200 mg/kg dose group; however, the cause is not clear as anti-MK-3475 antibodies were not detected in this animal. The observed pharmacodynamic effect (IL-2 activity ratio ~1) was sustained into the recovery period for all MK-3475 dose groups but returned to baseline (pre-study) levels over time in a dose-dependent manner in the 6 and 40 mg/kg dose groups. A gradual increase in the ability to potentiate IL-2 production was observed during the recovery period in the 6 and 40 mg/kg dose groups, with mean IL-2 values returning to control levels by Day 98 and Day 154, respectively. In animals administered 200 mg/kg MK-3475, the potentiation of IL-2 production remained inhibited throughout the recovery period, to an extent similar to that observed during the dosing period, indicating a prolonged target engagement.

NA = Not applicable # / # = number affected / number examined

a Number includes one female that was euthanized on Day 1 due to an injury sustained on Day 0 and subsequently replaced.

b Serum samples that tested positive for anti-MK-3475 antibodies were also assayed for the presence of neutralizing anti-MK-3475 antibodies.

C Confidential

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity Study No. [redacted]396 [Ref. 4.2.3.2.1: SN[redacted]396]

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		6		40		200	
Number of Animals	M:6	F:6	M:6	F:7[a]	M:6	F:6	M:6	F:6
Noteworthy Findings								
Mortality	0	0	0	1[a]	0	0	0	0
Body Weight[b] (%)	3.5 kg	3.0 kg	0	+3.3	-5.7	+3.3	0	-3.3
Body Weight Gain[c] (kg)	+0.1	0	0	0	0	0	0	0
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations								
Inguinal swelling (left, right or bilateral)[d]	4/6	-	2/6	-	3/6	-	6/6*	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
General Veterinary Examinations								
Inguinal swelling (with or without prominent lymph nodes)[d]	0/6	-	0/6	-	0/6	-	6/6*	-
Blood Pressure Evaluations	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis/Urine Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-

- = No noteworthy findings * = Considered test article-related # / # = number affected / number examined

a Number includes one female that was euthanized on Day 1 due to an injury sustained on Day 0 and subsequently replaced.

b At end of dosing period. For controls, group means are shown. For dose groups, percent differences from controls are shown.

c Mean absolute change from Day 0 to Day 28

d Inguinal swelling was not considered adverse in the absence of a histopathologic correlate or other associated findings.

C Confidential

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity Study No. [redacted]396 [Ref. 4.2.3.2.1: SN[redacted]396]

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		6		40		200	
Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:5[a]	M:4	F:4	M:4	F:4
Week 5 Necropsy Organ Weights[b] (%)								
Spleen	6.06 g	-	+16	-	+20	-	+61*	-
Gross Pathology[c]	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology[d]	-	-	-	-	-	-	-	-

- = No noteworthy findings * = Considered test article-related

a Number includes one female that was euthanized on Day 1 due to an injury sustained on Day 0 and subsequently replaced.

b Four monkeys/sex/group euthanized during Week 5. For controls, group mean is shown. For dose groups, percent differences from controls are shown for the absolute organ weights. For test article-related organ weight changes, both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Higher spleen weights were not considered adverse in the absence of a histopathologic correlate.

c Four monkeys/sex/group euthanized during Week 5 and one monkey that was sacrificed prior to scheduled necropsy.

d The following organs/tissues were examined microscopically: all processed organs/tissues collected from all monkeys euthanized during Week 5 and one monkey that was sacrificed prior to scheduled necropsy; and all collected gross findings.

Confidential

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity Study No. [redacted]396 [Ref. 4.2.3.2.1: SN[redacted]396]

Postdose Evaluation:

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		6		40		200	
Number Evaluated	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2
Clinical Observation								
Inguinal swelling (right or bilateral)[a,b]	1/2	-	0/2	-	2/2	-	2/2*	-
General Veterinary Examinations								
Inguinal swelling (with prominent lymph nodes)[b]	0/2	-	0/2	-	0/2	-	1/2*	-
Week 23 Necropsy	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)								
Gross Pathology[c]	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology[d]	-	-	-	-	-	-	-	-

- = No noteworthy findings * = Considered test article-related # / # = number affected / number examined

a Inguinal swelling in the 40 mg/kg dose group was not considered test article-related since one male also had swelling during the dosing period (which was considered incidental due to the low incidence) and the second male only had swelling during the recovery period. Inguinal swelling was not recorded as a clinical observation in the 200 mg/kg dose group after Day 77.

b Inguinal swelling was not considered adverse in the absence of a histopathologic correlate or other associated findings.

c Two monkeys/sex/group euthanized during Week 23.

d The following organs/tissues were examined microscopically: all processed organs/tissues collected from all monkeys euthanized during Week 23 and all collected gross findings.

C Confidential

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity: Report Title: Six-Month Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with a Four-Month Treatment Free Period (TT #[redacted]-1084)

Test Article: MK-3475 (SCH 900475)

Species/Strain: Cynomolgus monkey
Initial Age: Approximately 1 to 3 years

Date of First Dose: [redacted]

Special Features: NA
No Observed Adverse-Effect Level: ≥200 mg/kg

Duration of Dosing: Once every other week for approximately 6 months (total of 12 doses)
Duration of Postdose: 4-months
Method of Administration: Intravenous (bolus) injection
Vehicle Formulation: MK-3475 Placebo Solution[a]

Study No. TT #[redacted]-1084
Location in CTD: Vol. Section [Ref. 4.2.3.2.2: TT[redacted]-1084]

GLP Compliance: Yes

Bi Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		6		40		200	
Number of Toxicity Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5
Toxicokinetics								
-Study Day 1								
AUC(0-336 hr) (µg·hr/mL)								
arithmetic mean (before exclusions)	NA		21400		176000		848000	
arithmetic mean (after exclusions)	NA		22000		176000		848000	
Cmax (µg/mL)								
arithmetic mean (before exclusions)	NA		174		1840		7470	
arithmetic mean (after exclusions)	NA		168		1840		7470	
Tmax (hr)								
arithmetic mean (before exclusions)	NA		0.33		1.6		4.8	
arithmetic mean (after exclusions)	NA		0.36		1.6		4.8	

C Confidential

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity Study No. TT #[redacted]-1084 [Ref. 4.2.3.2.2: TT[redacted]-1084]

Bi Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		6		40		200	
Number of Toxicity Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5

Toxicokinetics (Continued)				
Bi Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	6	40	200
-Study Day 71				
AUC(0-336 hr) (µg·hr/mL)				
arithmetic mean (before exclusions)	NA	24100	313000	1540000
arithmetic mean (after exclusions)	NA	48500	313000	1540000
Cmax (µg/mL)				
arithmetic mean (before exclusions)	NA	215	1930	10,500
arithmetic mean (after exclusions)	NA	332	1930	10,500
Tmax (hr)				
arithmetic mean (before exclusions)	NA	1.3	2.0	0.55
arithmetic mean (after exclusions)	NA	2.6	2.0	0.55
-Study Day 141				
AUC(0-336 hr) (µg·hr/mL)				
arithmetic mean (before exclusions)	NA	28800	322000	1620000
arithmetic mean (after exclusions)	NA	59100	322000	1620000
Cmax (µg/mL)				
arithmetic mean (before exclusions)	NA	224	1890	10,400
arithmetic mean (after exclusions)	NA	326	1890	10,400
Tmax (hr)				
arithmetic mean (before exclusions)	NA	0.25	1.5	1.1
arithmetic mean (after exclusions)	NA	0.25	1.5	1.1

C Confidential

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity Study No. TT #[redacted]-1084 [Ref. 4.2.3.2.2: TT[redacted]-1084]

Bi Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		6		40		200	
Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5
Noteworthy Findings								
Mortality: Toxicity Animals	-	-	-	-	-	-	-	-
Mortality: Satellite Animals	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight[b] (%) Week 23	3.5 kg	3.1 kg	0.0	-3.2	2.9	-6.5	2.9	-3.2
Body Weight[b] (%) Week 40	4.2 kg	3.0 kg	-7.1	0.0	--12.0	13.3	-2.4	16.7
Food Consumption[b] (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis/Urine Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Interim Necropsy:	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose Evaluation (Final Necropsy):								
Number Evaluated	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-

- = No noteworthy findings * = Considered test article-related # / # = number affected / number examined NA = Not applicable

a MK-3475 Placebo solution consists of 10 mM histidine (pH 5.5), 7% (w/v) sucrose and 0.02% (w/v) polysorbate 80.

b At end of dosing period. For controls, group means are shown. For dose groups, percent differences from controls are shown.

C Confidential

2.6.7.8 Genotoxicity – In Vitro

In vitro genotoxicity studies with MK-3475 have not been conducted as these studies are not required for biotechnology-derived products, according to ICH S6 (R1).

2.6.7.9 Genotoxicity – In Vivo

In vivo genotoxicity studies with MK-3475 have not been conducted as these studies are not required for biotechnology-derived products, according to ICH S6 (R1).

2.6.7.10 Carcinogenicity

Carcinogenicity studies with MK-3475 have not been conducted as these studies are not required for biotechnology-derived products, according to ICH S6 (R1).

2.6.7.11 Reproductive and Developmental Toxicity: Non-Pivotal Studies

In light of the available information on the physiological role of PD-1 and the identified theoretical risk, no reproductive or developmental toxicity studies were conducted with MK-3475.

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation

In light of the available information on the physiological role of PD-1 and the identified theoretical risk, no reproductive or developmental toxicity studies were conducted with MK-3475.

2.6.7.13 Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development

In light of the available information on the physiological role of PD-1 and the identified theoretical risk, no reproductive or developmental toxicity studies were conducted with MK-3475.

C Confidential

2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

In light of the available information on the physiological role of PD-1 and the identified theoretical risk, no reproductive or developmental toxicity studies were conducted with MK-3475.

2.6.7.15 Reproductive and Developmental Toxicity – Studies in Which the Offspring (Juvenile Animals) are Dosed and/or Further Evaluated

In light of the available information on the physiological role of PD-1 and the identified theoretical risk, no reproductive or developmental toxicity studies were conducted with MK-3475.

2.6.7.16 Local Tolerance

Separate local tolerance studies with MK-3475 were not conducted. Local tolerance was evaluated as part of the one-month and the six-month repeat-dose toxicity studies with MK-3475, in which clinical signs, macroscopic findings and histopathologic examination of the injection site were the endpoints included for the evaluation of local tolerance [Sec. 2.6.7.7A; 2.6.7.7B]. There were no test article-related changes at injection sites, thus supporting the local tolerance at the site of intravenous administration.

C Confidential

2.6.7.17A Other Toxicity Studies: Cross-Reactivity Study of SCH 900475 with Normal Cynomolgus Monkey Tissues

Test Article: MK-3475 (SCH 900475)

Study Type	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Study Number
Tissue Cross Reactivity	In vitro	N/A	N/A	Cynomolgus Monkey Tissues	SN [redacted]395 **[Ref. 4.2.3.7.7.1: SN [redacted]395]**

Noteworthy Findings:

- MK-3475 produced weak to strong staining of the positive control material (cryosections of inflamed human tonsil [mononuclear leucocytes within germinal centers]). MK-3475 did not specifically react with the negative control material (cryosections of normal human striated [skeletal] muscle [skeletal myofibers]) although staining of extracellular matrix was observed and accounted for in evaluation of this assay. However, the negative control material which is the skeletal myofibers in the skeletal muscle did not stain. The control article (anti-RSV-IgG4) did not specifically react with either the positive or negative control material. There also was no staining of the assay control slides. The test article stained the positive control material, with no specific reactivity with the negative control material, suggesting the assay was sensitive and reproducible.
- MK-3475 staining of stroma (extracellular connective tissue matrix) (granular to fibrillar) was observed in bone marrow, eye, gastrointestinal tract- colon (large intestine), gastrointestinal tract- esophagus, gastrointestinal tract- small intestine, gastrointestinal tract- stomach, kidney, lungs, ovary, pancreas, peripheral nerve, pituitary, prostate, spinal cord, spleen, testis, tonsil, urinary bladder, uterus- body (endometrium), and uterus- cervix.
- MK-3475 staining of cytoplasm of endothelium was observed in the brain-cerebrum, breast (mammary gland), eye, gastrointestinal tract-colon(large intestine), gastrointestinal tract-esophagus, gastrointestinal tract-small intestine, gastrointestinal tract- stomach, heart, kidney, lymph node, lungs, ovary, pancreas, peripheral nerve, placenta, prostate, salivary gland, spinal cord, spleen, striated (skeletal) muscle, testis, thymus, thyroid, tonsil, ureter, urinary bladder, and uterus- body (endometrium) and uterus cervix.
- MK-3475 staining of the cytoplasm of intrinsic smooth myofibers was observed in the gastrointestinal tract-esophagus, gastrointestinal tract- small intestine, lung, ovary, fallopian tube (oviduct), prostate, and uterus- body (endometrium). MK-3475 staining of the cytoplasm, cytoplasmic granules, plasma membrane, and/or plasma membrane granules of mononuclear leucocytes was observed in the gastrointestinal tract- colon (large intestine), gastrointestinal tract- small intestine, gastrointestinal tract- stomach, kidney, lung, lymph node, salivary gland, spinal cord, spleen, testis, thymus, tonsil, and ureter.
- MK-3475 staining of the cytoplasm and/or cytoplasmic granules of epithelium was observed in the brain- cerebellum, gastrointestinal tract- small intestine, gastrointestinal tract-stomach, parathyroid, pituitary gland., and the prostate.
- MK-3475 staining of lens fibers was observed in the eye. MK-3475 staining of the cytoplasm of hepatocytes was observed in the liver. MK-3475 staining of the cytoplasm of epithelial-reticular cells including Hassal's corpuscles was observed in the thymus. MK-3475 staining of the cytoplasm of oocytes was observed in the ovary. MK-3475 staining of the cytoplasm of spindloid/dendritic cells was observed in the ovary. MK-3475 staining of the tails of spermatids was observed in the testis. MK-3475 staining of extracellular material was observed in the neurohypophysis of the pituitary.
- Much of the staining observed in this study was cytoplasmic in nature and it is unlikely that the cytoplasm would be accessible to the test article in vivo. Exceptions include: Stroma (extracellular connective tissue matrix), extracellular material (pituitary), and mononuclear leucocyte membranes. Membranous staining of mononuclear leucocytes is interpreted as on-target and appropriate to the known biology of the test article.

C Confidential

2.6.7.17B Other Toxicity Studies: Cross-Reactivity Study of SCH 900475 with Normal Human Tissues

Test Article: MK-3475 (SCH 900475)

Study Type	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Study Number
Tissue Cross Reactivity	In vitro	N/A	N/A	Normal Human Tissues	SN[redacted]394 **[Ref. 4.2.3.7.7.2: SN[redacted]394]**

Noteworthy Findings:

- MK-3475 produced weak to strong staining of the positive control material (cryosections of inflamed human tonsil [mononuclear leucocytes within germinal centers]). MK-3475 did not specifically react with the negative control material (cryosections of normal human striated [skeletal] muscle [skeletal myofibers]) although off target staining of extracellular matrix was observed and accounted for in evaluation of this assay. However, the negative control material which was the skeletal myofibers in the skeletal muscle did not stain.
- The control article (anti-RSV-IgG4) did not specifically react with either the positive or negative control material. There also was no staining of the assay control slides. The test article stained the positive control material, with no specific reactivity with the negative control material, suggesting the assay was sensitive and reproducible.
- MK-3475 staining of stroma (extracellular connective tissue matrix) (granular to fibrillar) was observed in all tissues except placenta.
- MK-3475 staining of cytoplasm and/or cytoplasmic granules of endothelium was observed in brain-cerebrum, gastrointestinal tract- colon, gastrointestinal tract- esophagus, gastrointestinal tract- stomach, kidney, liver, parathyroid, peripheral nerve, skin, testis, thymus, tonsil, urinary bladder, uterus- body, and uterus- cervix.
- MK-3475 staining of cytoplasm, cytoplasmic granules, plasma membrane, and/or plasma membrane granules of mononuclear leucocytes was observed in the gastrointestinal tract- esophagus, gastrointestinal tract- stomach, kidney, lymph node, spleen, thymus, and tonsil.
- MK-3475 staining of cytoplasmic material of macrophages was observed in the ovary.
- MK-3475 staining of cytoplasm and cytoplasmic granules of epithelium was observed in the pituitary.
- Much of the staining observed in this study was cytoplasmic in nature and it is unlikely that the cytoplasm would be accessible to the test article in vivo. Exceptions include: Stroma (extracellular connective tissue matrix) and mononuclear leucocyte membranes. Membranous staining of mononuclear leukocytes is interpreted as on-target and appropriate to the known biology of the test article.

C Confidential

2.6.7.17C Other Toxicity Studies: Anti-Murine PD-1 Antibody (muDX400 [redacted]): Exploratory Multiple-Dose Subcutaneous Immunotoxicity Study in Mice with Hepatitis B Vaccine ([redacted]).

Test Article: Murine anti-PD-1 antibody muDX400 ([redacted])

Study Type	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Study Number
TDAR (T cell-dependent Antibody Response)	SC Injection	Multiple Dose (single dose on Study Day 1 or as once-weekly doses on Study Days 1, 8, 15, 22, and 29)	5 mg/kg muDX400	20F/20M	TT #[redacted]-1105 **[Ref. 4.2.3.7.7.3: TT[redacted]-1105]**

NOTE: The study was conducted with the surrogate murine anti-PD-1 antibody, muDX400 ([redacted]).

All animals received primary and secondary immunizations of Hepatitis B vaccine ([redacted]) by IM injection (0.5 µg/dose) on Study Days 2 and 23.

Noteworthy Findings:

- There were no test article-related deaths or clinical signs, and no test article-related body weight, hematology, or cytokine changes. There were no gross pathology observations related to the administration of muDX400.
- A slight test article-related increase (< 30%) in absolute counts of splenic lymphocytes and in B and T cell subsets was observed in Dose Group 2 (single muDX400 dose) and Dose Group 3 (5 once-weekly muDX400 doses) on Study Days 34 and 50. Due to the small magnitude of the increase and because the proportions of splenic B and T cell subsets remained similar between muDX400 and PBS-treated animals on Study Days 34 and 50, the increase in absolute cell counts was considered to be of minimal toxicological significance. Changes of cellularity in spleens of mice treated with muDX400 under the condition of primary and secondary immunization with Hepatitis B Vaccine were consistent with findings in PD-1 knockout mice and are considered to be associated with the proposed mechanism of action of muDX400.
- All Dose Group 2 (single muDX400 dose) animals had evidence of muDX400 exposure on Study Day 3, the day after the primary vaccination with Hepatitis B Vaccine. All Dose Group 3 (5 once-weekly muDX400 doses) animals had evidence of muDX400 exposure up through Study Day 24, which covers the period of the primary vaccination (Study Day 2) and the boost (Study Day 23) with Hepatitis B Vaccine. In Dose Group 2, muDX400 concentrations decreased between Study Days 24 and 50, and were below the limit of detection in 3 out of 12 animals on Study Day 24; 7 out of 12 animals on Study Day 34; and 8 out of 12 animals on Study Day 50. By Study Day 50, muDX400 anti-drug antibodies were present in 11 out of 12 animals. In Dose Group 3, muDX400 concentrations decreased between Study Days 35 and 50, and were below the limit of detection in 4 out of 12 animals on Study Day 35, and 6 out of 12 animals on Study Day 50. The presence of anti-drug antibodies in Dose Group 3 was confirmed in 10 out of 12 animals on Study Day 50. In general, low serum muDX400 concentrations correlated with the presence of anti-drug antibodies in both muDX400-treated groups.
- The Hepatitis B Vaccine was immunogenic in all 3 dose groups and induced anti-Hepatitis B Vaccine antibody titers that boosted after a second vaccination and increased over time, following typical vaccine antibody response kinetics. Although variability in the magnitude of the measured titers among the individual mice was relatively large, the geometric mean titers of the 3 treatment groups were not meaningfully different and the muDX400-treated groups showed similar kinetics in primary and recall antibody responses to the vaccine compared to the antibody response occurring in the control group.
- In conclusion, the muDX400 and Hepatitis B Vaccine dosing paradigm was well tolerated in CD1 mice and resulted in measurable muDX400 concentrations during the primary and recall vaccination periods. On Study Days 34 and 50, in both muDX400-treated groups, there were slight increases in splenic lymphocyte, B cell, and T cell numbers, but the proportions of B and T cell subsets remained similar to those in the PBS-treated group and these changes were considered to be of minimal toxicological significance. Anti-Hepatitis B Vaccine antibody titers showed similar kinetics in primary and recall antibody responses during PD-1 inhibition to the antibody response occurring in the control group.

C Confidential