2.4　非臨床試験の概括評価

デュルバルマブ

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次　　頁

目次 2
略語及び専門用語一覧表 3
2.4.1　非臨床試験計画概略 5
2.4.2　薬理試験 11
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 11
2.4.2.2　副次的薬理試験 13
2.4.2.3　安全性薬理試験 13
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験 14
2.4.3　薬物動態試験 14
2.4.3.1　吸収 14
2.4.3.2　分布 15
2.4.3.3　代謝 15
2.4.3.4　排泄 16
2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用 16
2.4.4　毒性試験 16
2.4.4.1　単回投与毒性試験 16
2.4.4.2　反復投与毒性試験 16
2.4.4.3　遺伝毒性試験 18
2.4.4.4　がん原性試験 18
2.4.4.5　生殖発生毒性試験 18
2.4.4.6　局所刺激性試験 19
2.4.4.7　その他の毒性試験 19
2.4.4.7.1　組織交差反応性試験 19
2.4.5　総括及び結論 20
2.4.6　参考文献一覧 22

表目次

表 1　デュルバルマブの非臨床薬理試験一覧 9
表 2　デュルバルマブの毒性試験一覧 10

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
ADA	anti-drug antibody：抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cell-mediated toxicity：抗体依存性細胞傷害
APC	antigen-presenting cells：抗原提示細胞
AR	accumulation ratio：累積係数
AUC	area under the serum concentration-time curve：血清中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-t}	area under the serum concentration-time curve from time 0 to time t：時間 0 から最終測定可能時点までの血清中濃度-時間曲線下面積
AUC_{τ}	area under the serum concentration-time curve within a dosing interval：投与間隔τの血清中濃度-時間曲線下面積
C_0	estimated serum concentrations at time 0：時間 0 における推定血清中濃度
CD	cluster of differentiation：白血球分化抗原（群）
CDC	complement-dependent cytotoxicity：補体依存性細胞傷害
C_{max}	maximum serum concentration：最高血清中濃度
CL	clearance: 全身クリアランス
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4：細胞傷害性 T リンパ球抗原 4
cyno	cynomolgus：カニクイザル
ePPND	enhanced pre- and postnatal development study：拡充型出生前及び出生後の発生に関する試験
Fc	fragment crystallisable：結晶形成フラグメント
Fcγ	fragment crystallizable gamma：結晶形成フラグメントγ
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
h	human：ヒト
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
IFN-γ	interferon gamma：インターフェロン-γ
Ig	Immunoglobulin：免疫グロブリン
IgG	Immunoglobulin G：免疫グロブリン G
IgG1κ	Immunoglobulin G1 kappa：免疫グロブリン G サブクラス 1、κ型アイソタイプ
KLH	keyhole limpet hemocyanin：キーホールリンペットヘモシアニン
m	Mouse：マウス
NOD/SCID	nonobese diabetic/severe combined immunodeficient：非肥満性糖尿病／重症複合免疫不全症
PBMC	peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核細胞
PD	pharmacodynamics：薬力学
PD-1	programmed cell death 1（別名：CD279）
PD-L1	programmed cell death ligand 1（別名：B7-H1、CD274）
PD-L2	programmed cell death ligand 2（別名：B7-DC、CD273）
PK	Pharmacokinetics：薬物動態

略語及び専門用語	用語の説明
sPD-L1	soluble PD-L1：可溶性 PD-L1
r	rat：ラット
rcyno	recombinant cynomolgus monkey：遺伝子組換えカニクイザル
rh	recombinant human：遺伝子組換えヒト
rm	recombinant mouse：遺伝子組換えマウス
$t_{1/2}$	terminal half-life：消失半減期
V_{ss}	volume of distribution at steady state：定常状態における分布容積

2.4.1　非臨床試験計画概略

アストラゼネカ社は、様々な癌の患者に対する治療薬としてデュルバルマブ（遺伝子組換え）（以下、デュルバルマブ、研究所コード：MEDI4736）の開発を進めている。デュルバルマブはヒトの programmed cell death ligand 1（PD-L1、別名：B7-H1、CD274）に対するヒト免疫グロブリン G サブクラス 1、κ型アイソタイプ（IgG1 κ）モノクローナル抗体である。T 細胞活性化の制御に関与する受容体-リガンドの複合システムに属する PD-L1 は、2 種類の受容体、即ち programmed cell death 1（PD-1、別名：CD279）及び CD80（別名：B7-1）に結合し、これら両受容体との相互作用を介して T 細胞に不活性化シグナルを伝達することにより（Keir et al 2008, Park et al 2010）、体内の様々な部位で免疫反応を調節する。この抑制性のシグナル伝達機構は、PD-L1 を発現している腫瘍によって免疫系による認識と排除から逃れる手段としても利用される。デュルバルマブは、IgG1 重鎖の定常領域に 3 箇所のアミノ酸変異（以下 3 箇所変異）を導入しているため、補体タンパク C1q への結合能の低下と共に、抗体依存性細胞傷害（ADCC）作用を惹起する Fcγ 受容体に対する Fc 領域の親和性が低下している（Oganesyan et al 2008）。そのためデュルバルマブでは補体依存性細胞傷害（CDC）及び ADCC 作用が大幅に低下している（Stewart et al 2015）。デュルバルマブが PD-L1 と結合すると、PD-L1 と免疫細胞上に発現している PD-1 及び CD80 との相互作用が阻害される。この作用により、抗腫瘍免疫に対する PD-L1 を介した阻害作用に拮抗できると考えられる。PD-L1 機能の阻害は T 細胞の再活性化につながるが、この作用機序は CD28 のような共刺激受容体に対する直接的なアゴニスト作用とは異なっていると考えられる。

PD-L1 は B7 ファミリーに属するリガンドの一種であり、通常は PD-1 受容体への結合を介して T 細胞の活性化を制御しており（Keir et al 2008）、様々な臓器の癌において高い頻度で認められている（Dong et al 2002）。PD-L1 は原発腫瘍及び二次リンパ系器官における抗腫瘍 T 細胞反応を抑制し、免疫系による異物排除から腫瘍を保護するとされている（Zou and Chen 2008）。腫瘍細胞における PD-L1 の発現には、生存期間の短縮や予後不良との関連性が認められており（Mu et al 2011, Thompson et al 2005, Thompson et al 2006, Krambeck et al 2007, Nomi et al 2007, Loos et al 2008, Wang et al 2010, Hamanishi et al 2007）、複数の非臨床試験において PD-L1/PD-1 経路の阻害による抗腫瘍効果が認められている（Hirano et al 2005, Iwai et al 2002, Okudaira et al 2009, Zhang et al 2008）。

デュルバルマブの非臨床薬理プロファイルについて、以下の試験で検討した。

- 細胞外ドメインのアミノ酸配列の比較で、ヒト（h）PD-L1 とカニクイザル（cyno）PD-L1 との間で高い相同性が認められたが、hPD-L1 とマウス（m）PD-L1 及びラット（r）PD-L1 との相同性は低かった。
- hPD-L1 の細胞外ドメインの 95 位のアルギニン（R95）がデュルバルマブの hPD-L1 への結合に関与することを確認した。
- デュルバルマブの hPD-L1 及び cynoPD-L1 に対する高い結合親和性を確認した。
- hPD-L1 に関連するアミノ酸配列又は hPD-L1 に関連する機能を有するヒトタンパク質及び mPD-L1 に対する結合親和性から、デュルバルマブの hPD-L1 に対する高い結合特異性を確認した。
- hPD-L1 と hPD-1 又は hCD80 との各結合相互作用に対するデュルバルマブの阻害作用を確認した。

- デュルバルマブは PD-L1 を介したヒト T 細胞活性化抑制に対して拮抗作用を示すことを確認した。
- 健康ドナーから採取した T 細胞を用い、T 細胞の活性化におけるデュルバルマブの効力を評価した。
- PD-L1 を介したシグナル伝達による抗原リコールアッセイにおいてデュルバルマブは抗原提示細胞（APC）機能に影響を及ぼさないことを確認した。
- デュルバルマブは *in vitro* において、PD-L1 発現標的細胞に対し、ADCC 及び CDC 作用を惹起しないことを確認した。
- 健康ドナーから採取した全血を用い、デュルバルマブのサイトカインの放出に及ぼす影響をサイトカイン産生試験法にて検討した。
- ヒト原発腫瘍組織の凍結切片における膜型 PD-L1 の発現及び可溶性 PD-L1（sPD-L1）の血清中濃度を評価した。
- デュルバルマブは mPD-L1 に対して交差反応を示さないため、抗 mPD-L1 抗体 10F.9G2 を代替抗体とし、正常免疫能のあるマウスの同系移植モデルを用いて PD-L1 阻害作用を検討した。10F.9G2 は mPD-L1 に対して、デュルバルマブの hPD-L1 と同様の特性を示したことから、10F.9G2 は *in vivo* 試験で使用するデュルバルマブの代替抗体として適切であることを確認した。
- ヒト悪性腫瘍異種移植マウスモデルにおいて、デュルバルマブは腫瘍の増殖を抑制することが確認された。この腫瘍増殖抑制作用の発現には、使用したヒト癌細胞に応答するヒト T 細胞の同時移植が必要であった。
- マウス結腸直腸癌同系移植モデルにおいて、抗 mPD-L1 抗体 10F.9G2 の抗腫瘍効果の用量依存性、及び、10F.9G2 と化学療法剤オキサリプラチンの併用効果を検討した。

細胞を用いた *in vitro* 試験で、デュルバルマブは初代ヒト T 細胞の活性化に及ぼす PD-L1 の抑制作用に拮抗することにより、T 細胞の増殖及びインターフェロン-γ（IFN-γ）産生を増強した。また、健康ドナーから採取した T 細胞を用いた *in vitro* 試験で、デュルバルマブによる T 細胞増殖促進作用にドナー間でばらつきが認められたが、3 μg/mL 以上の被験濃度ではドナー全例（100%）において 90%有効濃度（EC_{90}）に達した。一方、*in vitro* でヒト末梢血単核細胞（PBMC）による破傷風毒素に対するリコール応答に影響を及ぼさなかったことから、デュルバルマブは抗原提示細胞による抗原提示に作用しないことが示唆された。また、健康ドナーから採取した全血でサイトカイン放出を誘導する可能性を評価した結果、デュルバルマブは 300 μg/mL までの濃度で培養系への添加条件（溶液添加又はドライコーティング若しくはウエットコーティング法による培養プレート表面への固定化）を問わず、サイトカインの放出を誘導しなかった。さらに、デュルバルマブは、IgG1 の定常領域に 3 箇所変異導入により ADCC 及び CDC を惹起しないよう設計されており、細胞を用いた機能試験で ADCC 及び CDC を惹起しないことが確認された。*In vivo* において、ヒト悪性腫瘍由来細胞株（ヒト悪性黒色腫由来細胞株 A375 又はヒト膵臓癌由来細胞株 HPAC）と腫瘍特異的ヒト T 細胞を移植した非肥満性糖尿病／重症複合免疫不全症（NOD/SCID）マウスにデュルバルマブを投与した結果、ほぼ用量依存的な有意な抗腫瘍効果が認められた。重要なこととして、デュルバルマブが抗腫瘍効果を発現するには、移植した悪性腫瘍由来細胞株に反応するヒト T 細胞の移入が不可欠であった。このように抗腫瘍効果の発現が T 細胞の存在に依存していたことから、デュルバルマブが免疫反応を介した殺腫瘍作用を増強するという機序が裏付けられた。

正常免疫能のあるマウス結腸直腸癌由来細胞株 CT26 同系移植モデルにおいて、デュルバルマブの代替抗体である抗 mPD-L1 抗体 10F.9G2 を週 2 回静脈内投与したところ生存率は増加した。その効果は、10 mg/kg 未満の投与量に比べて 10 mg/kg 以上の投与量でより強力であった。さらに、10F.9G2 と化学療法剤オキサリプラチンとの併用投与により、それぞれの単独投与時と比較して著明な抗腫瘍効果が認められた。また、ヒト原発悪性腫瘍組織検体について免疫組織化学的染色を行った結果、10 種類の悪性腫瘍において PD-L1 の発現が確認されている。

カニクイザルは、デュルバルマブの薬物動態（PK）／薬力学（PD）及び毒性の評価に適切な唯一の動物種であると判断された。この結論に至った根拠として、1）cynoPD-L1 と hPD-L1 との間で細胞外ドメインのアミノ酸配列に高い相同性が認められたこと、2）デュルバルマブの遺伝子組換えヒト（rh）PD-L1（rhPD-1）への結合に必須であるアミノ酸が cynoPD-L1 に保存されていること、3）デュルバルマブは rcynoPD-L1 及び rhPD-1 に対して同程度の結合親和性を示すこと、並びに 4）デュルバルマブは rmPD-L1 には結合しないことが挙げられる。また、rPD-L1 及び mPD-L1 の細胞外ドメインにはデュルバルマブの rhPD-1 への結合に必須であるアミノ酸が存在せず、hPD-L1 と rPD-L1 及び mPD-L1 との間ではアミノ酸配列の相同性は低いことから、デュルバルマブが rPD-L1 及び mPD-L1 に結合する可能性は低いと考えられる。

薬理及び毒性試験の用量におけるデュルバルマブの PK/PD 及び免疫原性について、以下の 4 試験で検討した。

- カニクイザルを用いた PK/PD 及び用量設定試験（GLP 非適用）
- カニクイザルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（GLP 適用）
- カニクイザルを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（GLP 適用）
- カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の発生に関する試験（ePPND 試験）（GLP 適用）

カニクイザルにおけるデュルバルマブの CL は、0.1～1 mg/kg の用量範囲でヒト IgG で予測される CL よりも高値を示し、デュルバルマブの PK は非線形であった。同じ用量範囲において、標的である PD-L1（可溶性及び膜型）がデュルバルマブの消失過程に影響を及ぼす可能性が示唆された。より高用量ではデュルバルマブの PK は線形性を示したが、これは低用量でみられた標的を介した消失過程が飽和したためと考えられた。デュルバルマブの PK に明らかな雌雄差は認められなかった。カニクイザルにデュルバルマブを反復投与したとき、一部の動物に抗薬物抗体（ADA）が発現し、デュルバルマブの曝露量の低下が認められたが、投与期間を通してデュルバルマブの PD 作用は維持された。PD 作用として、用量設定試験では末梢白血球上の膜型 PD-L1 に対するデュルバルマブの占有（フリー膜型 PD-L1 の抑制）、他の反復投与毒性試験では血清中のフリーsPD-L1 の抑制を評価した。これらの評価により、標的である PD-L1 の関与が示されたことから、カニクイザルがデュルバルマブの毒性を評価する動物種として妥当であることが確認された。

デュルバルマブの毒性プロファイルについて、以下の 7 試験で検討した。

- カニクイザルを用いた PK/PD 及び用量設定試験（GLP 非適用）
- カニクイザルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（GLP 適用）
- カニクイザルを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（GLP 適用）
- カニクイザルを用いた ePPND 試験（GLP 適用）
- ヒト組織を用いた組織交差反応性試験（GLP 適用）
- カニクイザル組織を用いた組織交差反応性試験（GLP 適用）
- カニクイザル 4 週間反復投与毒性試験からの摘出組織における免疫複合体沈着に関する探索的試験（GLP 非適用）

デュルバルマブの毒性試験は、ICH S6（R1）及び S9 ガイドラインに準拠して実施した。デュルバルマブのカニクイザルを用いた反復静脈内投与毒性試験において、ヒトで問題になると考えられる毒性所見は認められなかった。上記の用量設定試験及び反復静脈内投与毒性試験で認められた所見は、ADA に関連した所見及び死亡であった。非臨床試験動物種におけるヒトモノクローナル抗体の免疫原性は一般的にヒトへの外挿性がないと考えられることから、反復投与毒性試験におけるデュルバルマブの無毒性量の判定に際しては、これらの ADA に関連する所見及び死亡を考慮しなかった。4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用）における無毒性量は、検討した最高用量である負荷用量 200 mg/kg 及び維持用量 100 mg/kg（週 1 回、4 週間又は 13 週間投与）と判断された。デュルバルマブのカニクイザルを用いた ePPND 試験（GLP 適用）において、母体毒性、胚・胎児発生や妊娠の転帰への影響、出生後 6 カ月間における新生児の成長及び発達に対する影響は認められなかった。当該試験における無毒性量は、検討した最高用量である負荷用量 200 mg/kg（妊娠確定時点に投与）及び維持用量 100 mg/kg（自然分娩時まで週 1 回投与）と判断された。組織交差反応性試験（GLP 適用）において、デュルバルマブのヒト又はカニクイザル組織に対する想定外の結合は認められなかった。

デュルバルマブの非臨床薬理試験を表 1に、毒性試験を表 2に示した。デュルバルマブの非臨床 PK は表 2の試験 302833、試験 VMM0008、試験 VMM0033 及び試験 8291365 において検討した。

表 1　　デュルバルマブの非臨床薬理試験一覧

試験番号	試験系	試験名	GLP 適用
ONC4736-00[redacted]	*In silico*	ヒト、マウス、ラット及びカニクイザルの B7-H1 の配列相同性解析	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	B7-H1 の 95 位のアルギニンに依存した MEDI41736 の遺伝子組換えヒト B7-H1 への結合	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	MEDI4736 と組換えヒト B7-H1 及び組換えカニクイザル B7-H1 との結合親和性	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	関連するヒト及びマウスタンパク質と比較した組換えヒト B7-H1 と MEDI4736 との結合特異性	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	組換えヒト B7-H1 と組換えヒト PD-1 及び CD80 との相互作用に対する MEDI4736 の阻害作用	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	*In vitro* における B7-H1 による初代ヒト T 細胞の抑制に対する MEDI4736 の拮抗作用の評価	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	初代ヒト T 細胞を用いた *in vitro* における MEDI4736 の効力の評価	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	抗原提示細胞の活性に及ぼす MEDI4736 の影響	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	MEDI4736 のエフェクター機能の評価	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	*In vitro* におけるヒト全血を用いた MEDI4736 のサイトカイン放出に対する影響	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	癌組織における B7-H1 の発現	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	ヒト腫瘍及び血漿サンプルにおける可溶性 B7-H1 の測定	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	抗マウス B7-H1 抗体 10F.9G2 の組換えマウス B7-H1 との結合親和性	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	組換えマウス B7-H1 と組換えマウス Programmed Death 1 及び CD80 との相互作用に対する抗マウス B7-H1 抗体（10F.9G2）の阻害作用	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vivo*	ヒト腫瘍を移植したマウスモデルにおける MEDI4736 の影響	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vivo*	マウス結腸直腸癌細胞株同系移植モデルにおける抗マウス PD-L1 抗体による用量依存的な抗腫瘍効果	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vivo*	マウス結腸直腸癌細胞株同系移植モデルにおける抗マウス B7-H1 抗体とオキサリプラチンとの併用効果	非適用

表中、PD-L1 は B7-H1、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

表 2　　デュルバルマブの毒性試験一覧

試験番号	動物種／投与経路	試験名	GLP 適用
302833	カニクイザル／静脈内投与	MEDI4736：カニクイザルを用いた PK/PD 及び用量設定試験	非適用
VMM0008	カニクイザル／静脈内投与	MEDI4736：カニクイザルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験	適用
VMM0033	カニクイザル／静脈内投与	MEDI4736：カニクイザルを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験	適用
8291365	カニクイザル／静脈内投与	MEDI4736：カニクイザルを用いた ePPND 試験	適用
20014789	*In vitro*	ヒト正常組織を用いた MEDI4736 の組織交差反応性試験	適用
20014791	*In vitro*	カニクイザル正常組織を用いた MEDI4736 の組織交差反応性試験	適用
20019776	*In vitro*	試験 VMM0008 の摘出組織における免疫複合体の沈着を評価する探索的試験	非適用

表中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

2.4.2　薬理試験

デュルバルマブの非臨床薬理試験の一覧表を表 1に示した。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

最初に、rhPD-L1 に対するデュルバルマブの結合特異性を ELISA 法にて確認した。類縁の rhB7-H2、rhB7-H3、rhPD-L2（別名：B7-DC）、組換えヒト細胞傷害性 T 細胞抗原 4（rhCTLA-4）、rhCD28 及び rhPD-1 への特異的結合は検出されなかった。さらに、mPD-L1 への結合も検出されなかった（試験 ONC4736-00[redacted]）。Kinetic Exclusion Assay（KinExA®）の label-free 技術を用いて、溶液中での rhPD-L1 及び rcynoPD-L1 へのデュルバルマブの結合親和性（平衡解離定数［K_D］で示す）を測定した（試験 ONC4736-00[redacted]）。デュルバルマブの rhPD-L1 及び rcynoPD-L1 への結合に対する K_D 値はそれぞれ、22 及び 78 pM であった。以上の結果から、デュルバルマブは rhPD-L1 及び rcynoPD-L1 の両方に対して高い親和性及び特異性をもって結合することが確認された。

デュルバルマブの rhPD-L1 及び rcynoPD-L1 に対する高い結合特異性及び結合親和性が確認されたことから、rhPD-L1 の rhPD-1 又は rhCD80 への結合に対するデュルバルマブの阻害作用を、均一時間分解蛍光測定法（HTRF®）による競合結合試験にて評価した（試験 ONC4736-00[redacted]）。その結果、デュルバルマブは rhPD-L1 の rhPD-1 又は rhCD80 に対する結合を阻害し、50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 0.10 及び 0.04 nM であった。本試験から、デュルバルマブは、hPD-L1 と、その受容体である PD-1 及び CD80 との結合を強力に阻害することが確認された。

T 細胞表面上の PD-1 に PD-L1 が結合すると T 細胞の活性化が抑制される（Keir et al 2008, Park et al 2010）。デュルバルマブによる PD-L1 と受容体との結合阻害が、T 細胞の活性化抑制に及ぼす影響を検討するため、細胞を用いた *in vitro* T 細胞活性化試験法を開発した（試験 ONC4736-00[redacted]）。抗 CD3 抗体（T 細胞受容体シグナル伝達を模倣目的で使用）、抗 CD28 抗体（共刺激受容体シグナル伝達の模倣目的で使用）及び CAT-004 抗体（無関連な mIgG1）をコーティングした抗体捕捉ビーズを初代ヒト T 細胞に添加した。これらのビーズを添加した結果、T 細胞の増殖及び IFN-γ の産生が増大した。一方、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び rhPD-L1 でコーティングしたビーズと共に T 細胞を培養すると、rhPD-L1 の非存在下に認められた T 細胞の増殖及び IFN-γ の産生が有意に低下し、本試験系で PD-L1 が抑制性シグナルを伝達することが確認された。抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び rhPD-L1 でコーティングしたビーズを含む T 細胞培養系にデュルバルマブを添加すると、rhPD-L1 による T 細胞の増殖及び IFN-γの産生への抑制性シグナルはほぼ濃度依存的に拮抗され、rhPD-L1 を添加していないレベルにまで回復した。本試験の結果から、機能試験系における hPD-L1 を介した T 細胞抑制に対して、デュルバルマブの望ましい特性である拮抗作用を示すことが認められた。

CD28 のような受容体の活性化を介して作動性シグナルを伝達することにより免疫系を活性化する薬剤については、免疫細胞が非特異的に活性化されるためにサイトカインストーム等の重度の有害事象（副作用）が生じる可能性がある（Suntharalingam et al 2006）。このような薬剤は、抗原特異的な T 細胞受容体によるシグナルがなくても作用を発揮できるため、T 細胞の非特異的活性化が全身性に誘発される可能性が高い。これに対して、抑制性シグナル伝達経路に拮抗することにより作用を発揮する薬剤は、既存の抗原特異的 T 細胞受容体シグナルを制御するため、全

身性の非特異的な T 細胞の活性化を誘発する可能性は限られている。このことは臨床でも、CTLA-4 及び PD-1 を標的とする分子標的薬によって実証されており、サイトカインストーム等の重度の有害事象（副作用）は生じなかったとされている（Berger et al 2008, Brahmer et al 2010, Wolchok et al 2010）。デュルバルマブがリガンド（PD-L1）に結合すると、リガンドの抑制性受容体（PD-1）への結合が阻害される。したがって、抗原特異的 T 細胞受容体シグナルがなければ、PD-L1 機能の阻害は全く効果がないと予測される。この予測は公表データによって裏付けられており、同データから、T 細胞受容体刺激がなければ、抗 PD-L1 抗体は効果がないことが明らかにされている（Dong et al 2003）。デュルバルマブによるサイトカイン放出の誘導を検討する目的で、ヒト全血を用いた *in vitro* サイトカイン放出試験を実施した（試験 ONC4736-00[redacted]）。これまでの複数の研究で、被験物質への曝露方法が試験成績に影響することが示唆されている（Stebbings et al 2007）ことから、ヒトの全血にデュルバルマブを溶液添加又はウェットコーティン及びドライコーティングによる培養プレート表面への固定化にて添加し、24 時間インキュベートしてサイトカイン放出を検討した。陽性対照は抗ヒト CD3 抗体とし、デュルバルマブの被験濃度は 3～300 μg/mL の範囲とした。これらの被験濃度は、ヒトへの初回投与における用量を点滴静注にて投与したときのデュルバルマブの最高血清中濃度（C_{max}）の予測値に基づいて設定したものである。予測された通り、抗ヒト CD3 抗体の添加により、24 時間のインキュベーション後、高濃度のサイトカイン（IFN-γ、インターロイキン［IL］-2、IL-6 及び腫瘍壊死因子-α［TNF-α］）の産生が誘導された。これに対して、デュルバルマブはいずれのドナーから採取した血液を用いていずれの濃度で検討した場合も、これら全てのサイトカインの産生を誘導しなかった。これらの結果及び PD-L1 に対するアンタゴニストとしての作用機序を考慮すると、デュルバルマブは臨床において急激なサイトカイン放出を惹起しないと予測される。

PD-L1 を介したシグナル伝達により、APC による抗原提示が阻害される可能性があることを示唆した研究が報告されている（Kuipers et al 2006）。デュルバルマブが APC 上の PD-L1 に結合することにより、受容体（PD-1）に対してアゴニスト作用を発揮して、抗原提示能を阻害する可能性、即ちデュルバルマブが好ましくない作用をもたらす可能性がある。そこで、抗原提示プロセスと抗原提示プロセスに及ぼすデュルバルマブの影響を検討するため、PBMC の増殖に基づいて抗原リコール反応を評価する *in vitro* 抗原リコールアッセイ法を開発した（試験 ONC4736-00[redacted]）。溶液添加又は架橋処理抗体の培養プレート表面への固定化（plate-bound cross-linking antibody）により、デュルバルマブを PBMC に添加して培養した結果、抗原リコール反応に対するデュルバルマブの顕著な影響は認められなかった。したがって、デュルバルマブは PD-L1 に対するアゴニスト作用を介したシグナル伝達によって APC の機能に影響を及ぼすことはないと考えられる。

上記の試験（試験 ONC4736-00[redacted]、試験 ONC4736-00[redacted]、試験 ONC4736-00[redacted]、試験 ONC4736-00[redacted]、試験 ONC4736-00[redacted]及び試験 ONC4736-00[redacted]）により、デュルバルマブは *in vitro* で、期待された薬理作用、即ち、特定の標的との相互作用、T 細胞活性化シグナル存在下のみでの T 細胞の活性化や機能の亢進作用等を発揮することが確認された。PD-L1 アンタゴニストとしての作用機序を考慮すると、デュルバルマブは臨床において急激なサイトカイン放出を惹起することはないと予測される。

次に、マウスに移植したヒト腫瘍細胞株の増殖に対するデュルバルマブの作用を検討した（試験 ONC4736-00[redacted]）。健康ドナーから単離した PBMC から、ヒト膵臓癌細胞株 HPAC 及びヒト悪性黒色腫細胞株 A375 に反応する初代 CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞株を作製した。試験 1 日目に、PD-L1 を発現する腫瘍細胞株 HPAC 及び A375 を単独で、又は、予め作製した T 細胞株と共に NOD/SCID マウスに移植した。これらのマウスにデュルバルマブを移植 1 時間後及び試験 3、5、8、10 日目に腹腔内投与した。その結果、デュルバルマブはアイソタイプ対照抗体と比較して、

HPAC 及び A375 両細胞株の増殖をそれぞれ最大で 74%及び 77%、有意に抑制した。同じく A375 細胞株を用い、ヒト T 細胞を同時に移植せずに同様の試験を実施した場合は、デュルバルマブの抗腫瘍効果は認められなかった。この試験から、デュルバルマブはマウスモデルにおけるヒト腫瘍の増殖を有意に抑制すること並びにこの抗腫瘍効果は腫瘍特異的ヒト T 細胞の存在に依存することが確認され、したがって、デュルバルマブが免疫反応を介した殺腫瘍細胞作用（抗腫瘍免疫応答）を増強するというメカニズムが裏付けられた。

化学療法剤と併用したときのデュルバルマブの PD-L1 阻害作用による抗腫瘍効果を検討するため、免疫系が完全に正常なマウスを用いて、マウス腫瘍細胞株同系移植モデルを作製した。デュルバルマブは rmPD-L1 に対して交差反応を示さないため（試験 ONC4736-00[redacted]）、抗マウス PD-L1 抗体 10F.9G2 を代替抗体とし（試験 ONC4736-00[redacted]）、これらのマウスモデルに 10F.9G2 を単独又は化学療法剤のオキサリプラチンと併用で投与し、抗腫瘍効果を検討した（試験 ONC4736-00[redacted]）。マウスにマウス結腸直腸癌細胞株 CT26 を移植し、その後、10F.9G2 若しくはオキサリプラチンの単独投与、又は 10F.9G2 とオキサリプラチンの併用投与を実施した。溶媒投与対照群の生存期間中央値は 19 日であった。10F.9G2 及びオキサリプラチンの単独投与群ではいずれも、生存期間中央値がそれぞれ 26.5 日及び 30 日に延長された。オキサリプラチンと 10F.9G2 を併用投与した群ではさらに生存期間中央値が 57 日に延長され、試験終了時点において同併用投与群の約 50%のマウスでは測定可能な腫瘍病変は認められなかった。本試験の結果から、抗 PD-L1 抗体とオキサリプラチンとの併用投与により、抗 PD-L1 抗体単独投与に比較して良好な効果が得られることが確認された。

sPD-L1 は健康人及び癌患者とも、mRNA-スプライスバリアントとして発現する。しかし、免疫制御における sPD-L1 の役割及び重要性は、完全長の膜型 PD-L1 に比べてあまり解明されていない（Frigola et al 2011）。非小細胞肺癌（Mu et al 2011）、腎臓癌（Thompson et al 2005, Thompson et al 2006, Krambeck et al 2007, Frigola et al 2011）、膵臓癌（Nomi et al 2007, Loos et al 2008, Wang et al 2010）、卵巣癌（Hamanishi et al 2007）を含む多くの癌で、膜型 PD-L1 又は sPD-L1 の発現には、生存期間の短縮や予後不良との関連性が認められている。健康ドナーから採取した血液中の sPD-L1 の濃度を電気化学発光法にて測定し、非小細胞肺癌の腺癌（NSCLC ADC）、非小細胞肺癌の扁平上皮癌（NSCLC SCC）又は結腸直腸癌（CRC）の患者から採取したヒト腫瘍組織サンプル及び血漿サンプル中の濃度と比較した（試験 ONC4736-00[redacted]）結果、sPD-L1 の血漿中濃度は健康ドナーに比べて癌患者で明らかに上昇していた。

2.4.2.2 副次的薬理試験

デュルバルマブの副次的薬理試験は実施しなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

デュルバルマブの独立した安全性薬理試験を実施しなかったが、カニクイザルを用いた 4 週間及び 13 週間反復投与毒性試験（試験 VMM0008 及び試験 VMM0033）で、デュルバルマブ投与後に神経学的（臨床的観察による評価）、心血管系（心電図及び血圧）、並びに呼吸数等の安全性薬理学的パラメータについて評価した。評価したパラメータでデュルバルマブの投与に関連した有害作用は認められなかった（毒性試験の概要文 2.6.6.3 項参照）。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

デュルバルマブの薬力学的相互作用試験は実施しなかった。

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

カニクイザルを用いた PK/PD 及び用量設定試験（試験 302833）、4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（試験 VMM0008）、13 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（試験 VMM0033）並びに ePPND 試験（試験 8291365）において、デュルバルマブの PK/PD 及び免疫原性を検討した。

試験 302833 において、試験 1 日目にカニクイザルにデュルバルマブを 0（溶媒）、0.1 及び 1 mg/kg の用量で初回静脈内投与、並びに試験 15、22 及び 29 日目に 0（溶媒）、10 及び 100 mg/kg の用量で反復静脈内投与し、デュルバルマブの PK/PD 及び免疫原性を評価した。試験 1 日目に 0.1 及び 1 mg/kg 初回投与後、デュルバルマブの C_0 はそれぞれ 1.77 ± 0.424 及び 20.8 ± 1.27 µg/mL であり、ほぼ用量に比例して増加したが、$AUC_{0\text{-}t}$ はそれぞれ 2.10 ± 0.165 及び 80.3 ± 14.7 µg·day/mL であり、用量比を上回る増加を示した。また、CL はそれぞれ 43.8 ± 3.27 及び 11.1 ± 1.11 mL/day/kg あり、用量の増加とともに低下した。これらより、0.1～1 mg/kg におけるデュルバルマブの PK は非線形であることが示唆され、その原因として標的である PD-L1 を介したデュルバルマブの消失過程の飽和が考えられた。このような PK の非線形性は、標的と結合する治療抗体で一般的に認められる事象である。試験 29 日目に 10 及び 100 mg/kg 最終投与後、$AUC_{0\text{-}t}$ はそれぞれ 70.0 ± 57.9 及び 7370 ± 7240 µg·day/mL であった。0.1/10 mg/kg 投与群の全例及び 1/100 mg/kg 投与群の 5 例中 4 例が ADA 陽性であった。100 mg/kg 投与群では、高い ADA 陽性率にかかわらずデュルバルマブの曝露量が認められ、PD-L1 の抑制は試験期間を通して維持されていた。

試験 VMM0008 において、試験 1 日目にカニクイザルにデュルバルマブを 0（溶媒）、30、60 及び 200 mg/kg（負荷用量）で初回静脈内投与、並びに試験 8、15、22 及び 29 日目に 0（溶媒）、15、30 及び 100 mg/kg（維持用量）で週 1 回静脈内投与し、デュルバルマブの PK/PD 及び免疫原性を評価した。30、60 及び 200 mg/kg 初回投与後、血清中デュルバルマブ濃度は二相性の消失を示し、$t_{1/2}$ は 5.9～6.8 日であった。デュルバルマブの CL は 3 用量で同程度（6.1～7.5 mL/day/kg）であり、C_{max} 及び AUC はほぼ用量に比例して増加した。この 30～200 mg/kg の用量範囲における PK の線形性は、試験 302833 の低用量で非線形性の原因とされた標的を介した消失過程が飽和したためと考えられた。デュルバルマブを投与した一部の動物にデュルバルマブの曝露量に対する ADA の影響が認められたが、大部分の動物では持続的な曝露量及び PD 作用が維持した。AUC_{τ} に基づく平均累積係数（AR）は、用量に関わらず 1.3～1.7 であった。血清中デュルバルマブ濃度は 8 週間の回復期間終了時まで残存したが、低値でばらつきが大きかった。このばらつきは、ADA 発現の程度の個体間差に起因すると考えられた。

試験 VMM0033 において、試験 1 日目にカニクイザルにデュルバルマブを 0（溶媒）、30、60 及び 200 mg/kg（負荷用量）で初回静脈内投与、並びに試験 8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85 及び 92 日目に 0（溶媒）、15、30 及び 100 mg/kg（維持用量）で週 1 回静脈内投与し、デュルバルマブの PK/PD 及び免疫原性を評価した。30、60 及び 200 mg/kg 初回投与後、血清中

デュルバルマブ濃度は二相性の消失を示し、$t_{1/2}$ は約 6～8 日であった。デュルバルマブの C_{max} 及び AUC_{τ} は 30～200 mg/kg の用量範囲でほぼ用量に比例して増加した。15、30 及び 100 mg/kg 週 1 回静脈内投与したとき、定常状態（試験 85 日目）におけるデュルバルマブの曝露量は初回投与後と比較して増加し、AUC_{τ} に基づく平均 AR は 1.56～1.91 であった。ADA が発現しなかった動物及び ADA が発現したがデュルバルマブの PK に影響がなかった動物において、デュルバルマブの曝露量は 15～100 mg/kg の用量範囲でほぼ用量に比例して増加した。負荷用量及び維持用量において、雌雄動物の血清中デュルバルマブ濃度はほぼ同程度であった。投与期間中の ADA 陽性率は、30/15、60/30 及び 200/100 mg/kg 投与群でそれぞれ 75.0%（12 例中 9 例）、66.7%（12 例中 8 例）及び 25.0%（12 例中 3 例）であり、溶媒対照群で 33%（12 例中 4 例）であった。30/15 及び 60/30 mg/kg 投与群の各 3 例（25%）において、ADA の発現によるデュルバルマブの CL の増加が認められた。デュルバルマブの曝露量に対する ADA の影響がないと判定された動物では、デュルバルマブ週 1 回（最長 13 週間）投与により、全投与期間を通して全例の血清中フリーsPD-L1 濃度が定量下限未満までほぼ完全に抑制されていた。

試験 8291365 において、妊娠 20 日のカニクイザルにデュルバルマブを 60 及び 200 mg/kg（負荷用量）で初回静脈内投与、並びに妊娠 27 日から分娩まで 30 及び 100 mg/kg（維持用量）で週 1 回静脈内投与し、デュルバルマブの PK/PD 及び免疫原性を評価した。60 及び 200 mg/kg 初回投与後、C_{max} 及び AUC_{τ} は用量に比例して増加した。30 及び 100 mg/kg 週 1 回静脈内投与したとき、血清中デュルバルマブ濃度はほぼ妊娠 76 日までに定常状態に達した。30 及び 100 mg/kg 投与群における 17 回目投与後の AUC_{τ} に基づく平均 AR は、それぞれ 1.68 及び 1.74 であった。分娩時にデュルバルマブ投与を中止した後、母動物の血清中デュルバルマブ濃度は低下したが、分娩後 28 及び 56 日でも曝露量が認められた。分娩後 28 日の母動物の乳汁中にデュルバルマブが検出され、デュルバルマブの乳汁移行が確認された。デュルバルマブの乳汁移行は用量依存的であった。妊娠 20 日の初回投与後から妊娠期間中を通して、デュルバルマブの曝露量と血清中フリーsPD-L1 のほぼ完全な抑制に関連性が認められた。デュルバルマブ投与後の ADA 陽性は比較的多かったが（40 例中 24 例）、ADA の発現によりデュルバルマブの曝露量に影響がみられたのは、30 mg/kg 投与群では 20 例中 2 例（10%）及び 100 mg/kg 投与群では 20 例中 1 例（5%）であった。これらの動物では、ADA を介した血清デュルバルマブの CL の増加と血清中フリーsPD-L1 濃度の回復に関連性が認められた。分娩後 1 ± 1 日における出生児の血清中デュルバルマブ濃度はほぼ用量に比例して増加した。出生児の血清中デュルバルマブ濃度は経時的に低下し、分娩後 180 ± 1 日では定量下限未満であった。出生児の血清中デュルバルマブ濃度の低下により、分娩後 180 ± 1 日での血清中フリーsPD-L1 濃度は対照群レベルまで上昇した。

2.4.3.2 分布

カニクイザルを用いたデュルバルマブの PK/PD 及び用量設定試験（試験 302833）において、デュルバルマブを 0.1 及び 1 mg/kg 静脈内投与後の V_{ss} はそれぞれ 49.1 ± 18.3 及び 40.5 ± 7.00 mL/kg であり、デュルバルマブの血管外分布は限定的であった。カニクイザルを用いたデュルバルマブの ePPND 試験（試験 8291365）において、デュルバルマブを反復静脈内投与した母動物から生まれた出生児の血清中にデュルバルマブが検出されたことから、デュルバルマブの胎盤通過が示唆された。

2.4.3.3 代謝

デュルバルマブの代謝試験は実施しなかった。

2.4.3.4 排泄

デュルバルマブの尿、糞及び胆汁中排泄試験は実施しなかった。カニクイザルを用いたデュルバルマブの ePPND 試験（試験 8291365）において、デュルバルマブを反復静脈内投与した母動物の乳汁中にデュルバルマブが検出されたことから、デュルバルマブは乳汁中に排泄されると考えられた。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

デュルバルマブの非臨床薬物動態学的相互作用試験は実施しなかった。

2.4.4　毒性試験

デュルバルマブの非臨床安全性について、カニクイザルを用いた PK/PD 及び用量設定試験（試験 302833、GLP 非適用）、カニクイザルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（試験 VMM0008、GLP 適用）、カニクイザルを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（試験 VMM0033、GLP 適用）、並びにカニクイザルを用いた ePPND 試験（試験 8291365、GLP 適用）において評価した。これらの試験では、臨床適用経路に準じて静脈内投与により実施した。ヒト及びカニクイザルの正常組織を用いた組織交差反応性試験（試験 20014789 及び試験 20014791、いずれも GLP 適用）を実施した。なお、ICH S6（R1）及び ICH S9 ガイドラインに従って、安全性薬理試験の評価項目は反復投与毒性試験に含めることとし、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。局所刺激性については反復投与毒性試験において評価した。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

デュルバルマブの単回投与毒性試験は実施しなかった。しかし、デュルバルマブの単回投与毒性については、GLP 適用の 4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験において評価した（毒性試験の概要文 2.6.6.3 項参照）。これらの試験において、投与初日にデュルバルマブを 30、60 及び 200 mg/kg の用量で投与したときの忍容性は良好であり、一般状態変化及び死亡は認められず、その他の検査項目においても毒性学的意義のある所見は認められなかった。以上のことから、デュルバルマブ静脈内投与時のカニクイザルにおける概略の致死量は ＞200 mg/kg と考えられた。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

カニクイザルを用いた PK/PD 及び用量設定試験（試験 302833）において、デュルバルマブを反復静脈内投与したときの PK/PD 及び毒性プロファイルを評価した。本試験では、試験 1 日に薬理作用が認められる 0.1 又は 1 mg/kg を投与し、試験 15、22 及び 29 日に毒性変化がみられると考えられる 10 又は 100 mg/kg を投与した。T 細胞依存性抗原に対する抗体反応に及ぼすデュルバルマブの影響を評価するため、試験 1 及び 29 日目の投与後、すべての動物を KLH 10 mg で免疫した。最終投与後 10 日の試験 39 日に計画剖検を実施し、病理組織学的検査のために組織を採取した。PK/PD に関して、デュルバルマブ 0.1 及び 1 mg/kg の初回投与後、血清中 sPD-L1 濃度は低下し、種々の白血球サブセットの膜型 PD-L1 は完全に占有された。初回投与後のデュルバルマブ

の PK は非線形性を示し、曝露量は用量増加に伴って用量比を上回る増加を示した。ADA 産生により、デュルバルマブ 10 及び 100 mg/kg の最終投与後の血清中 sPD-L1 濃度は部分的かつ一過性に低下したのみであった。ADA 産生にもかかわらず、10 mg/kg 群では試験 39 日までリンパ球でデュルバルマブと結合していない膜型 PD-L1 は検出されず（ただし、単核球及び顆粒球サブセットでは検出）、100 mg/kg 群では試験 39 日まですべての白血球サブセットでデュルバルマブと結合していない膜型 PD-L1 は検出されなかった。毒性学的に重要な所見としては、10 mg/kg 群の 1 例において ADA に起因すると考えられるアナフィラキシー反応が発現し、2 回目の投与後まもなく死亡した。この 1 例の死亡はデュルバルマブに対する ADA 産生に関連したものと考えられた。非臨床試験動物種におけるヒトモノクローナル抗体の免疫原性とそれによる副反応は一般的にヒトへの外挿性がないことから、本試験におけるデュルバルマブの無毒性量の判定に際しては、これらの ADA に関連する所見及び死亡は考慮しなかった。生存例の一般状態、体重、末梢血白血球数、全身性サイトカイン濃度、臨床病理検査パラメータ、剖検及び病理組織学的検査において、デュルバルマブに関連した変化及び毒性所見は認められなかった。デュルバルマブ投与群では、一次免疫後、対照群と比較して用量に依存しない KLH 特異的 IgM 及び IgG 抗体反応の抑制が認められた。しかし、一次抗体反応が低下した動物でも、依然として定量可能な抗体反応が認められ、さらに、KLH に対する二次抗体反応の強度は対照群の動物における反応の強度と区別することができなかったことから、KLH に対する一次抗体反応の低下は有害なものではないと考えられた。以上のことから、本試験における無毒性量は、検討した最高用量である 100 mg/kg と判断された。

デュルバルマブのカニクイザルを用いた 4 週間又は 13 週間反復静脈内投与毒性試験（試験 VMM0008、試験 VMM0033）では、PK/PD 及び用量設定試験（試験 302833）で高頻度に認められた免疫原性及び ADA を介した毒性所見を軽減するため、負荷用量としてデュルバルマブ 30、60 又は 200 mg/kg（維持用量の 2 倍）を試験 1 日に投与し、その後、15、30 又は 100 mg/kg を週 1 回、4 週間又は 13 週間投与した。さらに、アナフィラキシー反応のリスクを軽減するため、急速静脈内投与ではなく、30 分間の持続注入にて静脈内投与を行った。試験 32 日の最終投与の 3 日後及び 8 週間休薬後の試験 85 日に、計画剖検を実施した。両試験とも、カニクイザルの大半が ADA 陽性となったが、曝露量はほとんどのカニクイザルで維持され、sPD-L1 の血清中濃度も初回投与後 24 時間以内及び投与期間中は概ね完全に抑制されていた。

4 週間反復静脈内投与毒性試験では、200/100 mg/kg 投与群の 1 例において四肢及び頭部に発疹がみられ、試験 29 日より赤色尿が認められた。発疹は試験 32 日までに完全に消失した。このカニクイザルは ADA 検査の結果、陽性と判定され、それに伴い、この用量群の他のカニクイザルに比べてデュルバルマブの曝露量の急激な低下もみられ、sPD-L1 抑制の消失と相関していた。試験 32 日に剖検及び病理組織学的検査を実施した結果、この動物では、腎臓腫大、両側尿細管の著明な虚血性壊死及びフィブリノイド壊死を伴う多発血管炎が認められた。片腎の皮髄境界部の細動脈に血栓が認められ、さらに、脈絡叢、心臓の中動脈、精巣上体（片側）の血管複合体に炎症がみられ、坐骨神経の一部に軽度の炎症細胞浸潤が認められた。この一連の病理組織学的検査所見は薬物／ADA 複合体沈着に続発した病理学的変化と考えられ、その後の免疫組織化学的試験（試験 20019776）において、免疫複合体の沈着が確認された。非臨床試験に供した動物種におけるヒトモノクローナル抗体の免疫原性は、一般的にヒトへの外挿性がないことから、本試験において無毒性量を判定する際、この動物で認められた所見は考慮しなかった。その他の動物の一般状態、体重、眼科学的検査、安全性薬理評価項目（心電図、呼吸数、血圧及び神経行動学的検査）、末梢血白血球数、初回投与後の全身性サイトカイン濃度、臨床病理検査パラメータ、剖検及び病理組織学的検査において、デュルバルマブに関連した毒性所見は認められなかった。対照群に比べて統計学的有意差はみられなかったものの、200/100 mg/kg 投与群のカニクイザルの胸

腺は小さく、概して重量も低く、これに関連して、一部の動物（雄 3 例中 1 例、雌 3 例中 2 例）の胸腺皮質の細胞密度に軽度から中等度の減少が認められた。末梢リンパ組織及び末梢血 T 細胞数にデュルバルマブに関連した影響が認められなかったこと、並びに所見の発現頻度及びその程度から、これらの胸腺で認められた所見の毒性学的意義は乏しいと考えられた。なお、これらの所見は 8 週間の休薬期間終了後、完全に回復した。

13 週間反復静脈内投与毒性試験では、一般状態、体重、眼科学的検査、安全性薬理評価項目（心電図、呼吸数、血圧及び神経行動学的検査）、末梢血白血球数、臨床病理検査パラメータ及び剖検において、デュルバルマブに関連した毒性所見は認められなかった。胸腺において、皮質及び髄質のどちらか一方、あるいは両方の退縮／萎縮の発現頻度及び程度の増強が雌雄で認められた。また、腸間膜リンパ節胚中心の形成不全が 200/100 mg/kg 群の雄 2 例で認められたが、8 週間の休薬期間後には、いずれの組織も対照群との間に差は認められなかった。これらの所見に関して、末梢血 T 細胞数に対する影響は認められず、所見の発現頻度及びその程度から毒性学的意義は乏しいと考えられた。

以上のように、カニクイザルに負荷用量 200 mg/kg、その後 4 週間又は 13 週間にわたり維持用量 100 mg/kg を週 1 回静脈内持続注入投与しても、デュルバルマブに関連した毒性所見は認められなかった。したがって、これらの反復投与毒性試験における無毒性量は、検討した最高用量である負荷用量 200 mg/kg 及び維持用量 100 mg/kg（週 1 回、4 週間又は 13 週間投与）と判断された。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

ICH S6（R1）ガイドラインには、遺伝毒性試験はバイオテクノロジー応用医薬品の高分子タンパク質製剤に対しては適切なものではなく必要とされないと記載されている。デュルバルマブは高分子タンパク質であるため、核膜やミトコンドリア膜を通過せず、DNA やその他の染色体物質との直接的な相互作用を示さないと予測される。同ガイドラインに従い、デュルバルマブの遺伝毒性試験はこれまでに実施しておらず、実施する予定もない。

2.4.4.4 がん原性試験

デュルバルマブの特性及び癌患者に予定している臨床使用を考慮し、ICH S6（R1）及び S9 ガイドラインに従ってがん原性試験はこれまでに実施しておらず、実施する予定もない。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

デュルバルマブの組織交差反応性試験（試験 20014789、試験 20014791）において、カニクイザル正常組織では卵管上皮細胞及び栄養膜上皮細胞の細胞膜及び細胞質の染色、またヒト正常組織では栄養膜上皮細胞の細胞膜及び細胞質の染色が認められ、生殖器系における PD-L1 の発現が示唆された。性成熟したカニクイザルを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験（試験 VMM0033）及びカニクイザルを用いた ePPND 試験（試験 8291365）において、デュルバルマブの生殖発生に及ぼす影響を検討した。

受胎能の評価に関しては、非ヒト霊長類を用いた交配試験が実際的でないことが、規制当局のガイドライン（ICH S6 (R1) ガイドライン）等で広く認識されている。そのため、デュルバルマブのように非ヒト霊長類が非臨床安全性試験に適切な唯一の動物種である場合には、性成熟した

霊長類を用いた 3 カ月間以上の反復投与毒性試験における生殖器官の器官重量及び病理組織学的検査所見に基づき雌雄の受胎能への影響を評価することが一般的に受け入れられている。性成熟したカニクイザルを用いたデュルバルマブの 13 週間反復静脈内投与毒性試験（試験 VMM0033）において、雌雄ともに器官重量及び病理組織学的検査所見にデュルバルマブ投与に関連する影響は認められなかった。

デュルバルマブの出生前及び出生後の発生に及ぼす影響を評価するために、カニクイザルを用いた ePPND 試験（試験 8291365）を実施した。本試験では、妊娠カニクイザルにデュルバルマブを妊娠確定時点（妊娠 20 日）には 60 又は 200 mg/kg の負荷用量を、妊娠 27 日から分娩日までは維持用量として 30 又は 100 mg/kg を週 1 回静脈内持続投与し、出生児の発達を出生後 6 カ月間にわたり観察した。また、T 細胞依存性抗原（KLH）による抗原チャレンジを行い、新生児の免疫応答性も評価した。その結果、本試験では、デュルバルマブの投与による母体毒性は認められなかった。対照群との比較に基づく妊娠の転帰の評価では、明らかな用量依存性はみられないものの、デュルバルマブ投与により、妊娠中期及び後期の胎児死亡、死産又は出生時死亡児、全妊娠期間を通しての胎児死亡及び新生児死亡に影響を及ぼす可能性が示唆された。しかしながら、試験実施施設でこれまでに得られている妊娠カニクイザルの背景データ（n=267 例）との比較では、デュルバルマブ投与群のこれらのパラメータはいずれも正常範囲内であることが示された（詳細は毒性試験の概要文 2.6.6.6 項参照）。カニクイザルでは自然発生の生殖障害が顕著にみられることから、デュルバルマブ投与群の妊娠転帰パラメータを背景データと比較することは科学的により信頼性が高いと考えられた。さらに、母動物にデュルバルマブを投与しても、出生後 6 カ月間にわたり新生児の成長及び発達への影響は認められず、新生児における KLH による抗原チャレンジに対する抗体反応にも影響は認められなかった。

以上のように、デュルバルマブの反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験において、受胎能への影響、母体毒性、胚・胎児発生や妊娠の転帰への影響、出生後 6 カ月間における新生児の成長及び発達に対する影響は認められなかった。したがって、本試験における無毒性量は、検討した最高用量である負荷用量 200 mg/kg 及び維持用量 100 mg/kg と判断された。

2.4.4.6 局所刺激性試験

デュルバルマブの局所刺激性試験は実施していない。しかし、デュルバルマブのカニクイザルを用いた反復静脈内投与毒性試験（試験 302833、試験 VMM0008、試験 VMM0033）において、注射部位の局所刺激性評価を行った。これらの試験において、注射部位にデュルバルマブ投与に関連した毒性所見は認められなかった。

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1　　組織交差反応性試験

ヒト正常組織及びカニクイザル正常組織とのデュルバルマブの交差反応性を評価するため、GLP 適用の組織交差反応性試験を実施した（試験 20014789、試験 20014791）。検討したヒト組織のうち、単核細胞及び栄養膜上皮細胞の細胞膜及び細胞質、並びに下垂体上皮細胞の細胞質にデュルバルマブ特異的染色が認められた。カニクイザル組織では、単核細胞、卵管上皮細胞及び栄養膜上皮細胞の細胞膜及び細胞質にデュルバルマブ特異的染色が認められた。これらの組織交差反応性試験において、デュルバルマブによる想定外の組織染色は認められなかった。

2.4.5　総括及び結論

デュルバルマブは、hPD-L1 に対するヒト IgG1κモノクローナル抗体であり、IgG1 重鎖の定常領域に 3 箇所変異を有するため、補体タンパク C1q への結合の低下と共に、ADCC を惹起する Fcγ 受容体に対する Fc 領域の親和性が低下している（Oganesyan et al 2008）。*In vitro* 生化学試験において、デュルバルマブは rhPD-L1 に特異的に高親和性に結合し、この結合により、hPD-L1 と hPD-1 及び hCD80 との相互作用を阻害することが確認された。デュルバルマブと rcynoPD-L1 との結合親和性が高いことも確認された。

細胞を用いた *in vitro* 試験で、デュルバルマブは初代ヒト T 細胞に対する PD-L1 の作用を阻害することにより、T 細胞の増殖が回復して IFN-γの産生が増加することが示された。デュルバルマブは APC の機能には影響を及ぼさず、ADCC 及び CDC も惹起しないことが示された。デュルバルマブは抑制性受容体 PD-1 のリガンドである PD-L1 に結合して PD-L1 を中和するため、抗原特異的な T 細胞受容体によるシグナル伝達がなければ、PD-L1 の作用を阻害した場合にもサイトカイン放出等の反応は生じないと考えられる。このことは、健康ドナーから採取した全血試験系において、デュルバルマブは最高 300 μg/mL の濃度でも、3 つの試験条件（溶液添加、ウェットコーティング又はドライコーティングによる培養プレート表面への固定化）のいずれにおいてもサイトカイン放出を誘導しないことから明らかとなった。これらの結果から、デュルバルマブは PD-L1 に対するアンタゴニストとしての機序を有することが示唆され、臨床において急激なサイトカインの放出が起きる可能性は低いと考えられた。

In vivo において、腫瘍特異的ヒト T 細胞と共にヒト悪性腫瘍由来細胞株 A375 又は HPAC を移植した NOD/SCID マウスにデュルバルマブを投与した結果、用量依存性の有意な抗腫瘍効果が認められた。重要なこととして、デュルバルマブが抗腫瘍効果を発現するには、移植した癌細胞株に反応するヒト T 細胞の移入が不可欠であった。このように抗腫瘍効果の発現が T 細胞の存在に依存していたことから、デュルバルマブが免疫反応を介した殺腫瘍作用を増強するという作用機序が裏付けられた。また、マウス結腸直腸癌細胞株 CT26 同系移植モデルで、抗 mPD-L1 抗体と化学療法剤オキサリプラチンを併用投与した場合も、それぞれの単独投与時と比較して著明な抗腫瘍効果が認められた。なお、ヒト原発悪性腫瘍組織検体について免疫組織化学的染色を行った結果、10 種類の腫瘍において PD-L1 の発現が確認されている。

デュルバルマブの非臨床安全性評価に用いる動物種として、カニクイザルは唯一適切であると判断された。その根拠は、cynoPD-L1 と hPD-L1 の細胞外ドメインのアミノ酸配列の相同性が高かったこと、及び、デュルバルマブは rcynoPD-L1 及び rhPD-L1 に対して同程度の結合親和性を示したことである。一方、マウス及びラットは適切ではないと判断されたが、その根拠は、デュルバルマブは rmPD-L1 に結合しないこと、及び、デュルバルマブの hPD-L1 への結合に必須であるアミノ酸が mPD-LI 及び rPD-L1 の細胞外ドメインには保存されていないことである。カニクイザルにおいてフリーの sPD-L1 の血清中濃度及び各種白血球サブセット上の膜型 PD-L1 の占有率が用量及び曝露量依存的に変化したことから、*in vivo* における標的の関与が確認され、カニクイザルはデュルバルマブの非臨床安全性の評価に薬力学的に適切な動物種であることが追認された。

カニクイザルにおけるデュルバルマブの CL は 0.1～1 mg/kg の用量範囲で典型的なヒト IgG で予測される CL よりも高値を示し、デュルバルマブの PK は非線形であった。同じ用量範囲において、標的である PD-L1 がデュルバルマブの消失過程に影響を及ぼす可能性が示唆された。より

高用量ではデュルバルマブの PK は線形性を示したが、これは低用量でみられた標的を介した消失過程が飽和したためと考えられた。デュルバルマブの PK に明らかな雌雄差は認められなかった。デュルバルマブの反復投与後に ADA が発現し、デュルバルマブの曝露量の低下が認められた。

デュルバルマブの毒性試験は、ICH S6（R1）及び S9 ガイドラインに準拠しており、複数の癌腫を適応とする抗悪性腫瘍薬としてデュルバルマブの製造販売承認を取得することを目的として実施した。デュルバルマブのカニクイザルを用いた反復静脈内投与毒性試験において、ヒトで問題になると考えられるデュルバルマブ投与に関連した所見は認められなかった。唯一認められた毒性所見は ADA に関連する所見及び死亡であった。非臨床試験動物種におけるヒトモノクローナル抗体の免疫原性は一般的にヒトへの外挿性がないことから、デュルバルマブの無毒性量の判定に際しては、これらの ADA に関連する所見及び死亡は考慮しなかった。免疫系はデュルバルマブの主要な標的であることから、反復投与毒性試験の一環として免疫毒性の評価項目を検討した。その結果、いずれの反復投与毒性試験においても、血液学的検査パラメータや血液生化学的パラメータ、末梢血白血球サブセット（フローサイトメトリーにて評価）といった標準的な毒性評価項目に明らかな影響は認められなかった。4 週間の PK/PD 及び用量設定試験では、デュルバルマブの投与により、外因性タンパク質抗原（KLH）に対する一次抗体反応が用量非依存的に抑制されたが、KLH に対する二次抗体反応の抑制は認められず、KLH に対する一次抗体反応の変化は有害なものではないと考えられた。リンパ系器官の組織病理学的検査所見としては、4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験において胸腺への影響が認められた。4 週間反復静脈内投与毒性試験では、対照群に対して統計学的有意差はみられなかったものの、200/100 mg/kg 群の動物の胸腺は小さく、概して胸腺重量も低かった。これに関連して、一部の動物（雄 3 例中 1 例、雌 3 例中 2 例）では胸腺皮質の細胞密度に軽度から中等度の減少も認められた。13 週間反復静脈内投与毒性試験では、胸腺において、皮質及び髄質のどちらか一方、あるいは両方の退縮／萎縮の発現頻度及び増悪が雌雄で認められた。さらに、200/100 mg/kg 群の雄 2 例では、腸間膜リンパ節胚中心の形成不全も認められた。いずれの試験においても、これらの所見は、デュルバルマブ投与に関連する末梢リンパ組織又は末梢血 T 細胞数への影響を伴わなかった。さらに、これらの所見は 8 週間の休薬期間終了後、完全に回復した。したがって、これらの所見の毒性学的意義は乏しいと考えられた。

以上のことから、4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験における無毒性量は、検討した最高用量である負荷用量 200 mg/kg 及び維持用量 100 mg/kg（週 1 回、4 週間又は 13 週間投与）と判断された。この無毒性量と臨床用量（10 mg/kg、2 週間に 1 回投与）における曝露量を比較した場合、AUC で約 50～85 倍、C_{max} で約 31～52 倍の安全域が認められた（詳細は毒性試験の概要文 2.6.6.9 項参照）。

デュルバルマブの受胎能に及ぼす影響について、性成熟したカニクイザルを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験（試験 VMM0033）で雌雄の生殖器官の器官重量及び病理組織学的検査所見を評価することにより検討したところ、受胎能への影響を示す所見は認められなかった。また、デュルバルマブの出生前及び出生後の発生に及ぼす影響について、カニクイザルを用いた ePPND 試験において評価した。デュルバルを妊娠確定時点（妊娠 20 日）には 60 又は 200 mg/kg の負荷用量を、妊娠 27 日から分娩日までは維持用量として 30 又は 100 mg/kg を週 1 回静脈内持続投与しても、母体毒性、胚・胎児発生や妊娠の転帰への影響、出生後 6 カ月間における新生児の成長及び発達に対する影響は認められなかった。したがって、本試験における無毒性量は、検討した最高用量である負荷用量 200 mg/kg 及び維持用量 100 mg/kg と判断された。一方、公表文献で示されている非臨床試験データからは PD-1 と PD-L1 との相互作用はげっ歯類の妊娠の維持に重要

な役割を果たしていることが明らかにされていることから（Guleria et al 2005, Poulet et al 2016）、添付文書における適切な記載及びリスク管理手順が必要であると考えられる。

組織交差反応性試験において、デュルバルマブのヒト又はカニクイザル組織に対する想定外の結合は認められなかった。組織交差反応性試験の結果は概ね公表論文と整合しており、これらの論文では、樹状細胞、リンパ球、単球及びマクロファージなどの単核細胞（Augello et al 2005, Freeman et al 2000, Sharpe et al 2007）及び胎盤栄養膜細胞（Brown et al 2003, Holets et al 2006）で PD-L1 の発現が報告されている。したがって、ヒト及びカニクイザルにおけるこれらの組織染色は想定内ものであると考えられた。一方、下垂体上皮細胞（ヒト）及び卵管上皮細胞（カニクイザル）では特に PD-L1 の発現は報告されていないが、他の上皮細胞は PD-L1 を発現すると報告されている（Chen et al 2006, Das et al 2006, Tsuda et al 2005）。

本製造販売承認申請のための非臨床薬理、非臨床薬物動態及び毒性に関する非臨床試験プログラムにより得られた所見は、切除不能な局所進行の非小細胞肺癌患者にデュルバルマブを適用することの妥当性を裏付けるものである。

2.4.6　参考文献一覧

Augello et al 2005

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. Eur J Immunol. 2005;35(5):1482-90.

Berger et al 2008

Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, Landes S, Kneller A, Leiba M, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. Clin Cancer Res. 2008;14(10):3044-51.

Brahmer et al 2010

Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. J Clin Oncol. 2010;28(19):3167-75.

Brown et al 2003

Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. J Immunol. 2003;170(3):1257-66.

Chen et al 2006

Chen Y, Zhang J, Li J, Zou L, Zhao T, Tang Y, Wu Y. Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells. Nephron Exp Nephrol. 2006; 102: e81-e92.

Das et al 2006

Das S, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Graham DY, Reyes VE. Expression of B7-H1 on Gastric Epithelial Cells: Its Potential Role in Regulating T Cells during Helicobacter pylori Infection. J Immunol. 2006; 176(5): 3000-9.

Dong et al 2002

Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat Med. 2002;8(8):793-800.

Dong et al 2003

Dong H, Strome SE, Matteson EL, Moder KG, Flies DB, Zhu G, et al. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. J Clin Invest. 2003;111(3):363-70.

Freeman et al 2000

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. J Exp Med. 2000;192(7): 1027-34.

Frigola et al 2011

Frigola X, Inman BA, Lohse CM, Krco CJ, Cheville JC, Thompson RH, et al. Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2011;17(7):1915-23.

Guleria et al 2005

Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, Habicht A, Azuma M, Yagita H, Noelle RJ, Coyle A, Mellor AL, Khoury SJ, Sayegh MH. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. J Exp Med. 2005; 202(2): 231-7.

Hamanishi et al 2007

Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(9):3360-5.

Hirano et al 2005

Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity. Cancer Res. 2005;65(3):1089-96.

Holets et al 2006

Holets LM, Hunt JS, Petroff MG. Trophoblast CD274 (B7-H1) is Differentially Expressed Across Gestation: Influence of Oxygen Concentration. Biol Reprod. 2006;74(2):352-8.

Iwai et al 2002

Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(19):12293-7.

Keir et al 2008

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2008;26:677-704.

Krambeck et al 2007

Krambeck AE, Dong H, Thompson RH, Kuntz SM, Lohse CM, Leibovich BC, et al. Survivin and B7-H1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2007;13(6):1749-56.

Kuipers et al 2006

Kuipers H, Muskens F, Willart M, Hijdra D, van Assema FB, Coyle AJ, et al. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. Eur J Immunol. 2006;36(9):2472-82.

Loos et al 2008

Loos M, Giese NA, Kleeff J, Giese T, Gaida MM, Bergmann F, et al. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. Cancer Lett. 2008;268(1):98-109.

Mu et al 2011

Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. Med Oncol. 2011;28(3):682-8.

Nomi et al 2007

Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(7):2151-7.

Oganesyan et al 2008

Oganesyan V, Gao C, Shirinian L, Wu H, Dall'Acqua WF. Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008; 64(6):700-4.

Okudaira et al 2009

Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, Okada Y, Komoto S, Watanabe C, et al. Blockade of B7 H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. Int J Oncol. 2009;35(4):741-9.

Park et al 2010

Park JJ, Omiya R, Matsumura Y, Sakoda Y, Kuramasu A, Augustine MM, et al. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. Blood. 2010;116(8):1291-8.

Poulet et al 2016

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 Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2016; 107(2): 108-19.

Sharpe et al 2007

Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nat Immunol. 2007; 8(3): 239-45.

Stebbings et al 2007

Stebbings R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, et al. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. J Immunol. 2007;179(5):3325-31.

Stewart et al 2015

Stewart R, Morrow M, Hammond SA, Mulgrew K, Marcus D, Poon, E, et al. Identification and characterization of MEDI4736, an antagonist anti-PD-L1 monoclonal antibody. Cancer Immunol Res. 2015;3(9):1052-62.

Suntharalingam et al 2006

Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. N Engl J Med. 2006;355(10):1018-28.

Thompson et al 2005

Thompson RH, Gillett MD, Chevillem JC, Lohsem CM, Dongm H, Webster WS, et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. Cancer. 2005;104(10):2084-91.

Thompson et al 2006

Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. Cancer Res. 2006;66(7):3381-5.

Tsuda et al 2005

Tsuda M, Matsumoto K, Inoue H, Matsumura M, Nakano T, Mori A, et al. Expression of B7-H1 and B7-DC on the airway epithelium is enhanced by double-stranded RNA. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 330(1): 263-70.

Wang et al 2010

Wang L, Ma Q, Chen X, Guo K, Li J, Zhang M. Clinical significance of B7-H1 and B7-1 expressions in pancreatic carcinoma. World J Surg. 2010;34(5):1059-65.

Wolchok et al 2010

Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L, et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. Lancet Oncol. 2010;11(2):155-64.

Zhang et al 2008

Zhang C, Wu S, Xue X, Li M, Qin X, Li W, et al. Anti-tumor immunotherapy by blockade of the PD-1/PD-L1 pathway with recombinant human PD-1-IgV. Cytotherapy. 2008;10(7):711-9.

Zou and Chen 2008

Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol. 2008;8(6):467-77.