2.6.6　毒性試験の概要文

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	4
2.6.6.1	まとめ	5
2.6.6.1.1	毒性試験プログラムの概要	5
2.6.6.1.2	動物種の選択根拠	6
2.6.6.1.3	主要な結果の要約	7
2.6.6.2	単回投与毒性試験	8
2.6.6.3	反復投与毒性試験	8
2.6.6.3.1	カニクイザルを用いた薬物動態／薬力学及び用量設定試験（試験 302833；GLP 非適用）	8
2.6.6.3.2	カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（試験 VMM0008；GLP 適用）	10
2.6.6.3.3	カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（試験 VMM0033；GLP 適用）	12
2.6.6.4	遺伝毒性試験	13
2.6.6.5	がん原性試験	13
2.6.6.6	生殖発生毒性試験	13
2.6.6.6.1	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（試験 8291365；GLP 適用）	13
2.6.6.7	局所刺激性試験	17
2.6.6.8	その他の毒性試験	17
2.6.6.8.1	組織交差反応性試験（試験 20014789、試験 20014791；共に GLP 適用）	17
2.6.6.8.2	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（試験 20019776；GLP 非適用）	18
2.6.6.9	考察及び結論	19
2.6.6.10	図表	22
2.6.6.11	参考文献	22

表目次

表 1　デュルバルマブの毒性試験一覧 6
表 2　試験 302833 の試験デザイン 9
表 3　試験 VMM0008 の試験デザイン 10
表 4　試験 VMM0033 の試験デザイン 12
表 5　試験 8291365 の試験デザイン 14
表 6　試験 8291365 で示された妊娠の転帰 15
表 7　デュルバルマブの安全域 20

図目次

図 1　試験 8291365 に関するノルモグラム 16

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 cellular cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害
AUC	Area under the serum concentration-time curve：血清中濃度-時間曲線下面積
CBER	Center for Biologics Evaluation and Research：生物学的製剤評価研究センター
CDC	Complement-dependent cellular cytotoxicity：補体依存性細胞傷害
C_{max}	Maximum observed concentration：最高血清中濃度
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
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin：キーホールリンペットヘモシアニン
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：医薬品規制調和国際会議
Ig	Immunoglobulin：免疫グロブリン
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）
PK	Pharmacokinetics：薬物動態

2.6.6.1 まとめ

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の製造販売承認の取得を目指している。デュルバルマブはヒトの programmed cell death ligand 1（PD-L1、別名：B7-H1、CD274）を標的とする完全ヒト IgG1 κモノクローナル抗体である。デュルバルマブは定常領域に 3 箇所のアミノ酸変異を導入しており、これにより C1q への結合を低下させるとともに、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を惹起する Fcγ 受容体に対する Fc 領域の親和性を低下させている（Oganesyan et al 2008）。この変異の導入によって、デュルバルマブによる ADCC 及び補体依存性細胞傷害（CDC）は生じないと予測され、このことは実際に細胞レベルの機能試験で確認された（薬理試験の概要文 2.6.2 参照）。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 programmed cell death 1（PD-1）及び CD80 受容体との相互作用を阻害する。この作用により、PD-L1 を介した抗腫瘍免疫応答の減弱を抑制できると考えられる。

2.6.6.1.1 毒性試験プログラムの概要

デュルバルマブの毒性プロファイル（トキシコキネティクスを含む）を以下の試験により評価した。

- カニクイザルを用いた薬物動態（PK）／薬力学（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）
- 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 ICH S9 ガイドラインに従って実施されたもので、抗悪性腫瘍薬としての製造販売承認を目的として実施したものである。これまでに実施したデュルバルマブの毒性試験を表 1に示す。本項では、毒性試験に用いた動物種の適切性及び得られた毒性試験成績について要約する。なお、主要な試験は GLP 適用下で実施した。一部の GLP 非適用下で実施した試験についても実質的には GLP 要件に従って実施したが、試験報告書の監査は行わなかった。

表 1　　デュルバルマブの毒性試験一覧

試験番号 GLP 適用／ 非適用の区分	試験名	動物種／ 投与経路	試験実施施設	報告書の 記載箇所
反復投与毒性試験				
302833 GLP 非適用	MEDI4736：カニクイザルを用いた PK/PD 及び用量設定試験	カニクイザル／ 静脈内投与	[redacted] Canada	4.2.3.2.1
VMM0008 GLP 適用	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	カニクイザル／ 静脈内投与	[redacted] UK	4.2.3.2.2
VMM0033 GLP 適用	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	カニクイザル／ 静脈内投与	[redacted] UK	4.2.3.2.3
生殖発生毒性試験				
8291365 GLP 適用	MEDI4736：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	カニクイザル／ 静脈内投与	[redacted] Germany	4.2.3.5.3.1
その他の試験				
20014789 GLP 適用	ヒト正常組織を用いた MEDI4736 の組織交差反応性試験	*In vitro*	[redacted] USA	4.2.3.7.1
20014791 GLP 適用	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	*In vitro*	[redacted] USA	4.2.3.7.2
20019776 GLP 非適用	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	*In vitro*	[redacted] USA	4.2.3.7.3

この表ではデュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

2.6.6.1.2　動物種の選択根拠

デュルバルマブの局所刺激性及び全身毒性の評価に適切な動物種は、カニクイザルのみと考えられた（薬理試験の概要文 2.6.2 参照）。カニクイザル PD-L1 とヒト PD-L1 との間で細胞外ドメインのアミノ酸配列に 95.9%という高い相同性が認められている（試験 ONC4736-0012）。また、

デュルバルマブのヒト PD-L1 への結合に必須であるアミノ酸がカニクイザル PD-L1 にも保存されており（試験 ONC4736-0012 及び試験 ONC4736-0014）、デュルバルマブはカニクイザル PD-L1 に対してヒト PD-L1 と同程度の結合親和性を有する（試験 ONC4736-0001）。さらに、カニクイザルを用いた *in vivo* 試験において、デュルバルマブは血清中の可溶型 PD-L1（sPD-L1）を抑制し、0.1 mg/kg（検討した最低用量）以上の投与量で種々の白血球サブセットで膜上の PD-L1 を完全に占有し、カニクイザルの内因性 PD-L1 の関与が示唆された（試験 302833）。一方、マウス PD-L1 及びラット PD-L1 とヒト PD-L1 との間では、細胞外ドメインのアミノ酸配列の相同性がそれぞれ 73.5%及び 74.4%と低く、デュルバルマブのヒト PD-L1 への結合に必須であるアミノ酸も保存されていない（試験 ONC4736-0012）。また、デュルバルマブはマウス PD-L1 には結合しなかった（試験 ONC4736-0007）。なお、ラット PD-L1 とマウス PD-L1 の細胞外ドメインのアミノ酸配列については 86.3%の相同性が認められた（試験 ONC4736-0012）。

2.6.6.1.3 主要な結果の要約

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、概し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。

カニクイザルを用いた 4 週間の PK/PD 及び用量設定試験（GLP 非適用）並びにカニクイザルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用）で認められた毒性所見は、抗薬物抗体（ADA）に関連する所見及び死亡であった。PK/PD 及び用量設定試験で認められた 1 例の死亡は、ADA に伴う急性アナフィラキシー反応に起因すると考えられた。さらに、4 週間反復静脈内投与毒性試験の 1 例で認められた一般症状及び病理組織学的所見も ADA-デュルバルマブ免疫複合体を介した影響と考えられた。その後の探索的免疫組織化学的試験において、検討した組織で ADA-デュルバルマブ免疫複合体の存在が確認された。これらの所見はデュルバルマブの薬理作用に関連するものではなく、デュルバルマブとは別のヒトモノクローナル抗体を投与したカニクイザルにおいても同様の所見が過去に認められており、ヒトへの外挿性はないと考えられた。以上の理由から、上記の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。

PK/PD 及び用量設定試験では、その他に、一次免疫後のキーホールリンペットヘモシアニン（Keyhole Limpet Hemocyanin：KLH）特異的 IgM 及び IgG 抗体反応に用量非依存的な抑制が認められた。しかし、KLH による二次免疫に対する抗体反応では、KLH 特異的 IgG 反応の強度と対照群における抗原特異的 IgG 反応と同程度の抗原特異的 IgG 反応がみられたのみであり、デュルバルマブによる影響は認められなかった。一次抗体反応が低下したカニクイザルにおいても、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はデュルバルマブによる影響を受けなかったことから、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。当該試験では上記以外にデュルバルマブ投与に関連する所見は認められなかった。

カニクイザルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用）で認められたデュルバルマブ投与に関連するその他の所見としては、高用量群において胸腺の小型化及び胸腺重量の減少がみられ、これに関連して一部のカニクイザルでは胸腺皮質の細胞密度の軽度から中等度の減少が認められた。しかし、8 週間の休薬期間終了後にはこれらの胸腺の所見は認められず、また末梢リンパ組織や末梢血 T 細胞数にデュルバルマブ投与の影響が認められなかったことから、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。

カニクイザルを用いた 13 週間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用）では、デュルバルマブ投与に関連する毒性所見は認められなかった。当該試験では、胸腺の退縮又は萎縮の発現頻度及び

増悪が雌雄で認められた。また、高用量群の雄 2 例において、腸間膜リンパ節胚中心の形成不全も認められた。これらの所見は 8 週間の休薬期間終了後には完全に回復した。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。なお、当該試験では、デュルバルマブを投与した性成熟カニクイザルの生殖器を含め、病理組織学的検査を実施したその他の組織のいずれにおいても、デュルバルマブ投与に関連する所見は認められなかった。

カニクイザルを用いた 4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用）において毒性所見が認められなかったことから、これらの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 週間反復静脈内投与）と判断された。

さらに、デュルバルマブの生殖発生毒性を評価するためにカニクイザルを用いた ePPND 試験（GLP 適用）を実施し、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）から自然分娩時まで静脈内投与した。当該試験においては、母動物の一般状態、体重及び剖検所見にデュルバルマブ投与による影響は認められなかった。妊娠の転帰にもデュルバルマブ投与の影響はみられず、デュルバルマブ投与により認められた出生前胎児死亡及び出生後新生児死亡の数は背景データの範囲内であった。また、出生後 6 カ月間の観察期間中、デュルバルマブによる新生児の成長及び発達への影響は認められなかった。したがって、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 及び維持用量 100 mg/kg（週 1 回、自然分娩時まで投与）と判断された。

2.6.6.2 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ていない。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（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。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

デュルバルマブの反復投与毒性試験として、カニクイザルを用いた静脈内投与による 3 試験、すなわち、PK/PD 及び用量設定試験（試験 302833、GLP 非適用）、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）、並びに 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）を実施した。

2.6.6.3.1 カニクイザルを用いた薬物動態／薬力学及び用量設定試験（試験 302833；GLP 非適用）

本試験の目的は、カニクイザルにデュルバルマブを反復投与したときの PK/PD 及び毒性を検討することであった。カニクイザルの雄 15 例を 3 群（グループ 1：媒体対照、グループ 2：0.1 及

び 10 mg/kg、グループ 3：1 及び 100 mg/kg）に割り付け、試験 1 日にデュルバルマブを 0（媒体）、0.1 又は 1 mg/kg の用量で、試験 15、22 及び 29 日にデュルバルマブを 0（媒体）、10 又は 100 mg/kg の用量で静脈内投与した。試験 1 及び 29 日の投与後、すべての動物に KLH 10 mg を皮下投与し、T 細胞依存性抗体反応に対するデュルバルマブの影響を評価した。試験 39 日にあたる最終投与後 10 日に計画剖検を実施した。試験デザインを表 2に示す。

表 2　　試験 302833 の試験デザイン

群	動物数	投与経路	投与量[a]（mg/kg）		剖検動物数
			試験 1 日	試験 15、22、29 日	試験 39 日
1	雄 5	静脈内	0（媒体[b]）	0（媒体[b]）	雄 5
2	雄 5	静脈内	0.1	10	雄 5
3	雄 5	静脈内	1.0	100	雄 5

a　投与容量はいずれも 2 mL/kg
b　媒体として 50 mM 酢酸ナトリウム及び 100 mM 塩化ナトリウム（pH 5.5）を用いた。

初回投与後のデュルバルマブの薬物動態は非線形性を示し、用量増加に伴って曝露量は用量比を上回る増加を示した（平均 $AUC_{0\text{-}t}$：2.10～80.3 μg·d/mL、平均 C_{max}：1.77～20.8 μg/mL）。ADA 産生により、大部分の動物において、最終投与後の薬物動態プロファイルに大きなばらつきがみられ、曝露持続時間は予想より短かった。デュルバルマブ初回投与後、0.1 mg/kg という低い用量で、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。sPD-L1 の抑制及び膜型 PD-L1 の完全占有状態の持続時間には用量依存性が認められた。デュルバルマブ 10 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。また、デュルバルマブ 100 mg/kg の最終投与後の sPD-L1 抑制は一過性であり、試験 39 日にはベースラインの 50%抑制にまで低下した。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。このことから、100 mg/kg 投与により ADA が認められたにもかかわらず、試験期間全体を通して、想定されるデュルバルマブの薬理作用が概ね維持されることが示唆された。

本試験では 1 例の死亡が認められた。この動物は 10 mg/kg の 2 回目投与後まもなく死亡し、死因は ADA に関連する急性アナフィラキシー反応によるものと推定された。その根拠は、1）死亡前にアナフィラキシー様反応の徴候（自発運動の低下、努力呼吸、側臥位）が認められたこと、2）肺に急性アナフィラキシーと符合する剖検所見（気管に不透明な暗色の液体、肺の暗色変化がみられ、虚脱は認められない）並びに病理組織学的所見（浮腫及び出血）が認められたこと、3）デュルバルマブは 0.1 mg/kg でも初回投与後速やかにデュルバルマブは消失し、投与後 72 時間以内に ADA が検出されたこと、4）死亡時の血中 IgE 濃度が高かったことである。したがって、この動物の死亡は、カニクイザルのデュルバルマブに対する抗ヒト抗体反応の免疫学的結果による二次的なものであると考えられた。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を判定する際、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。また、投与部位にデュルバルマブ投与に起因した影響はみられなかった。デュルバ

ルマブ投与群では、一次免疫後、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、KLH による二次免疫に対する抗体反応にデュルバルマブによる影響は認められず、KLH 特異的 IgG 反応の強度と対照動物における反応の強度を区別することはできなかった。KLH に対する一次抗体反応の低下は、一次抗体反応が低下した動物においても定量可能な抗体反応が認められ、KLH に対する二次抗体反応はデュルバルマブによる影響を受けなかったことから、有害なものではないと考えられた。

以上のように、カニクイザルにデュルバルマブを 100 mg/kg の用量まで 4 回静脈内投与しても、ADA に関連する急性アナフィラキシー反応が原因と推定されるサル 1 例の死亡を除いて、デュルバルマブに関連する毒性所見は認められなかった。先述の通り、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、無毒性量の判定に際して、これらの ADA に関連する所見及び死亡を考慮しなかった。したがって、本試験における無毒性量は 100 mg/kg と判断された。

2.6.6.3.2 カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（試験 VMM0008；GLP 適用）

本試験の目的は、デュルバルマブの反復投与における局所毒性及び全身毒性を評価することであった。カニクイザル（6 例/性/群）に、デュルバルマブを週 1 回（試験 1、8、15、22 及び 29 日）静脈内持続投与（0.5 mL/kg/分）した。先に実施した用量設定試験（試験 302833）では 100 mg/kg の 3 回の週 1 回投与によってもデュルバルマブによる毒性変化はみられなかったことから、100 mg/kg を高用量とすることが可能と考えられ、以下 30 及び 15 mg/kg を設けた。さらに、試験 302833 で認められた高い免疫原性発現率を軽減させるために試験 1 日には負荷用量（維持用量の 2 倍）として 0（媒体）、30、60 又は 200 mg/kg を、試験 8、15、22 及び 29 日には維持用量として 0（媒体）、15、30 又は 100 mg/kg を投与した。対照群には媒体（25 mM ヒスチジン、265 mM トレハロース、及び 0.02%（w/v）ポリソルベート 80：pH 6.0）を同様に投与した。投与容量は 15 mL/kg とした。試験 32 日にあたる最終投与後 3 日（3 例/性/群）及び試験 85 日にあたる 8 週間の休薬期間後（3 例/性/群）に計画剖検を実施した。試験デザインを表 3に示す。

表 3　試験 VMM0008 の試験デザイン

群	動物数（雄/雌）	投与経路	投与量[a]（mg/kg）		剖検動物数（雄/雌）	
			試験 1 日	試験 8、15、22、29 日	試験 32 日	試験 85 日
1	6/6	静脈内	0（媒体[b]）	0（媒体[b]）	3/3	3/3
2	6/6	静脈内	30	15	3/3	3/3
3	6/6	静脈内	60	30	3/3	3/3
4	6/6	静脈内	200	100	3/3	3/3

a　投与容量はいずれも 15 mL/kg
b　媒体として 25 mM ヒスチジン、265 mM トレハロース及び 0.02%（w/v）ポリソルベート 80（pH 6.0）を用いた。

デュルバルマブの全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は用量とともに増加し、線形性を示した。最終投与後の平均 C_{max} は 729～4470 μg/mL、平均 AUC_{τ} 値は 3170～20500 μg·d/mL であった。投与期間中、検討した動物の多く（36 例中 24 例）で ADA 陽性となったが、ADA 産生によりデュルバルマブ曝露量に影響が認められた例数は、30/15、60/30 及び 200/100 mg/kg 群でそれぞれ 12 例

中 6 例、12 例中 1 例及び 12 例中 1 例のみであった。想定されるデュルバルマブの薬力学的効果と符合する形で、デュルバルマブの初回投与後 24 時間以内に血清中 sPD-L1 濃度はほぼ完全に抑制され、その後投与期間を通して持続した。例外的に、デュルバルマブの曝露量に有意な影響を生じるものの PD-L1 抑制がみられない ADA 陽性例が認められた。8 週間の休薬期間終了時まで、すべての個体及び群を通して、血中デュルバルマブ濃度は低く、ばらついたままであった。このばらつきは、ADA 産生量の動物間差に起因するものと考えられた。休薬期間を通して sPD-L1 抑制状態が維持された例数は、30/15、60/30 及び 200/100 mg/kg 群でそれぞれ 6 例中 1 例、6 例中 3 例及び 6 例中 4 例であった。

200/100 mg/kg 群の雄 1 例（動物番号 645）で後肢、耳介、前肢、眼周囲及び頭部に発疹が認められた。この動物では試験 29 日の 100 mg/kg 最終投与後まもなく赤色尿がみられ、試験 30 日にも飼育ケージに赤色尿が認められた。発疹は試験 32 日までに消失した。試験 32 日の剖検及び病理組織学的検査では、腎臓腫大、両側尿細管の顕著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。腎臓（片側）の皮髄境界部の細動脈では血栓が認められた。この他にも、この動物では、脈絡叢、心臓の中動脈、精巣上体の血管複合体（片側）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。一連の病理組織所見は薬物／ADA 複合体沈着に続発する病理学的変化と考えられた。その後の探索的試験において、検討した組織に免疫複合体の沈着が確認された（試験 20019776、2.6.6.8.2項参照）。この動物の ADA 産生による影響は同群における他の動物とは異なり、デュルバルマブ曝露量は 3 回目の投与後に ADA の影響を受け、5 回目（最終）の投与後にはさらに顕著な影響が認められた。この時点で sPD-L1 の抑制も消失した。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、本試験における無毒性量の判定に際して、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。200/100 mg/kg 群の動物の胸腺は小さく、概して重量も低く（有意差は認めず）、これと関連して、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の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。8 週間の休薬期間後には胸腺に所見は認められなかった。

以上のように、カニクイザルにデュルバルマブ 200 mg/kg を負荷量として投与後、100 mg/kg の用量を週 1 回 4 週間静脈内投与（計 5 回投与）しても、デュルバルマブに関連する毒性所見は認められなかった。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、この試験における無毒性量の判定に際して、200/100 mg/kg 群の 1 例で認められた薬物／ADA 複合体沈着に関連した病理組織学的所見は考慮しなかった。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（AUC_{τ}値として 20500 μg·d/mL、C_{max} 値として 4470 μg/mL）と判断された。

2.6.6.3.3 カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（試験 VMM0033；GLP 適用）

本試験の目的は、デュルバルマブの反復投与における局所毒性及び全身毒性を評価することであった。性成熟したカニクイザル（6 例/性/群）にデュルバルマブを週 1 回静脈内持続投与（0.5 mL/kg/分）した。先に実施した 4 週間投与毒性試験（試験 VMM0008）の結果に基づいて、本試験においても 15、30 及び 100 mg/kg が適切な設定用量と考えられた。さらに、先の毒性試験で認められた高い免疫原性発現率を軽減させるため、試験 1 日には 0（媒体）、30、60 又は 200 mg/kg の負荷用量（維持用量の 2 倍）を、試験投与 8～92 日には維持用量として 0（媒体）、15、30 又は 100 mg/kg を投与した。対照群には、媒体（25 mM ヒスチジン、265 mM トレハロース、及び 0.02%（w/v）ポリソルベート 80：pH 6.0）を同様に投与した。投与容量は 15 mL/kg とした。試験 95 日にあたる最終投与後 3 日（4 例/性/群）及び試験 152 日にあたる 8 週間の休薬期間後（2 例/性/群）に計画剖検を実施した。試験デザインを表 4に示す。

表 4　試験 VMM0033 の試験デザイン

群	動物数（雄/雌）	投与経路	投与量[a]（mg/kg）		剖検動物数（雄/雌）	
			試験 1 日	試験 8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、92 日	試験 95 日	試験 152 日
1	6/6	静脈内	0（媒体[b]）	0（媒体[b]）	4/4	2/2
2	6/6	静脈内	30	15	4/4	2/2
3	6/6	静脈内	60	30	4/4	2/2
4	6/6	静脈内	200	100	4/4	2/2

a　投与容量はいずれも 15 mL/kg
b　媒体として 25 mM ヒスチジン、265 mM トレハロース及び 0.02%（w/v）ポリソルベート 80（pH 6.0）を用いた。

デュルバルマブの全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は用量とともに増加した。最終投与後の平均 C_{max} 値は 1380～7470 μg/mL、平均 AUC_{τ}値は 6040～34900 μg·d/mL であった。デュルバルマブ投与後に ADA が認められた動物は多かったが（27/36 例）、ADA 産生によりデュルバルマブ曝露量に影響がみられた個体数は、30/15、60/30 及び 200/100 mg/kg 群でそれぞれ、3/12、3/12 及び 0/12 例であった。想定されるデュルバルマブの薬理作用と符合する形で、デュルバルマブの初回投与後 24 時間及び投与期間中は、血清中 sPD-L1 濃度はほぼ完全に抑制された。例外的に、デュルバルマブの曝露量に大きな影響がみられるものの PD-L1 抑制がみられない ADA 陽性例が認められた。デュルバルマブの血清中濃度は、最終投与後に徐々に減少したが、8 週間の休薬期間中も定量可能な血清中濃度がすべての用量群で認められ、sPD-L1 抑制が休薬期間中の 30/15、60/30 及び 200/100 mg/kg 群で、それぞれ 3/4、3/4 及び 4/4 例で持続した。デュルバルマブ投与例のうち 2/12 例で sPD-L1 抑制の消失が認められたが、これは ADA 産生と符合するものであった。

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、皮質及び髄質又は皮質のみで退縮／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。性成熟した動物を用いた本試

験では、生殖器官を含めた病理組織学的検査において、デュルバルマブ投与に関連した影響は認められなかった。

以上のように、カニクイザルに負荷用量として 200 mg/kg 投与し、その後 13 週間にわたり 100 mg/kg を週 1 回持続静脈内投与しても、デュルバルマブ投与に関連した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（AUC_{τ}値として 34900 μg·d/mL、C_{max} 値として 7470 μg/mL）と判断された。

2.6.6.4 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。

2.6.6.5 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。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

デュルバルマブの非臨床評価において薬理学的に適切な動物種はカニクイザルのみであるが、サルを用いた交配試験は実際的でなく、ICH S6（R1）ガイドラインに従い、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において生殖器官（器官重量及び病理組織学的検査）を評価することにより、雌雄の受胎能への影響を評価した（試験 VMM0033、2.6.6.3.3項参照）。当該試験では、雌雄の生殖器官の器官重量及び病理組織学的所見にはデュルバルマブによる影響は認められなかった。さらに、カニクイザルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験においても、雌雄の生殖器官（器官重量、剖検及び病理組織学的検査）に対するデュルバルマブによる影響は認められなかった（試験 VMM0008、2.6.6.3.2項参照）。デュルバルマブの胚・胎児発生及び出生後の発生に対する影響について、カニクイザルを用いた ePPND 試験で評価した（試験 8291365）。

2.6.6.6.1 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（試験 8291365；GLP 適用）

本試験の目的は、妊娠カニクイザルにデュルバルマブを妊娠確定時点から自然分娩時まで投与したときの妊娠の転帰、胚・胎児発生及び出生児の生存と出生後の発生に及ぼす影響を検討することであった。妊娠カニクイザル（20 例/群）にデュルバルマブを 15 mL/kg の投与容量で週 1 回静脈内持続投与した。本試験における用量として、先に実施した 13 週間反復静脈内投与毒性試

験（試験 VMM0033）に基づき、良好な忍容性が認められ、また 15 mg/kg の用量に比べて免疫原性を低減させると考えられる 30 及び 100 mg/kg を選択した。本試験の主目的はデュルバルマブの生殖発生毒性リスクを評価することであり、動物倫理の観点から使用動物数を削減することを考慮し、当該試験では上記の 2 用量のみを選択した。先の反復投与毒性試験では ADA の発現率が高く、このような免疫原性を低減するため、妊娠カニクイザルに対して、妊娠 20 日の妊娠確定時点には 60 又は 200 mg/kg の負荷用量（維持用量の 2 倍）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 を投与した。対照群には媒体（26 mM ヒスチジン/ヒスチジン塩酸塩、275 mM トレハロース二水和物、0.02% (w/v)ポリソルベート 80 : pH 6.0）を同様に投与した。母動物及び出生児の計画剖検は分娩後 180 ± 1 日とした。試験デザインを表 5に示す。

表 5　　試験 8291365 の試験デザイン

群	動物数（雌）	投与経路	投与量[a]（mg/kg/週）	
			妊娠 20 日	妊娠 27 日-分娩日
1	20	静脈内	0（媒体[b]）	0（媒体[b]）
2	20	静脈内	60	30
3	20	静脈内	200	100

a　投与容量はいずれも 15 mL/kg
b　媒体として 26 mM ヒスチジン/ヒスチジン塩酸塩、275 mM トレハロース二水和物及び 0.02%（w/v）ポリソルベート 80（pH 6.0）を用いた。

妊娠 20 日のデュルバルマブ初回静脈内投与後、母動物における平均全身曝露量は用量とともに増加し、60 及び 200 mg/kg 群の平均 C_{max} はそれぞれ 1610 ± 323 及び 5060 ± 1180 μg/mL、平均 AUC_{τ}値はそれぞれ 6760 ± 1160 及び 21000 ± 5430 μg·d/mL であった。30 又は 100 mg/kg を週 1 回静脈内投与した結果、デュルバルマブの全身への累積はほぼ妊娠 76 日までに定常状態付近に達し、17 回目（妊娠 132 日）の投与後の AUC_{τ}に基づいて求めた定常状態における平均累積係数は 60/30 mg/kg 群で 1.68 ± 0.333、200/100 mg/kg 群で 1.74 ± 0.687 であった。同日の平均 C_{max} 及び AUC_{τ}も用量とともに増加し、60/30 mg/kg 群でそれぞれ 2060 ± 419 μg/mL 及び 10800 ± 2040 μg·d/mL、200/100 mg/kg 群でそれぞれ 6880 ± 1681 μg/mL 及び 34800 ± 7922 μg·d/mL であった。血清中デュルバルマブ濃度は分娩日に投与を中止して以降、低下に転じたが、母動物におけるデュルバルマブの血清中曝露量は分娩後 28 及び 56 日においても依然として検出可能なレベルが維持され、分娩後 56 日における平均血清中濃度は 60/30 mg/kg 群で 91.1 ± 78.3 μg/mL、200/100 mg/kg 群で 358 ± 189 μg/mL であった。分娩後 28 日に授乳期の母動物から乳汁を採取したところ、定量可能な量のデュルバルマブが検出され、デュルバルマブは母乳に移行することが確認された。母乳への移行は用量依存的であり、分娩後 28 日の平均乳汁中濃度は 60/30 mg/kg 群で 0.453 ± 0.250 μg/mL、200/100 mg/kg 群で 1.95 ± 0.860 μg/mL であった。

想定されたデュルバルマブの薬理作用と符合する形で、血清中 sPD-L1 濃度は妊娠 20 日にデュルバルマブ投与を開始後、ほぼ完全に抑制され定量下限（80 pg/mL）未満まで低下し、この抑制状態は妊娠期間を通して持続した。デュルバルマブ投与中止後の分娩後 56 日においても、母動物の血清中 sPD-L1 濃度の抑制は持続し、低レベルで維持されているデュルバルマブの曝露量との相関性が認められた。デュルバルマブ投与後に ADA 陽性となったカニクイザルは 40 例中 24 例に及んだが、ADA 形成によるデュルバルマブの曝露量への影響が認められたのは、60/30 mg/kg 群及び 200/100 mg/kg 群でそれぞれ 20 例中 2 例及び 20 例中 1 例にすぎなかった。ADA 陽性となったこれらのカニクイザルでは、ADA を介したデュルバルマブの血清クリアランスの増大に伴い、血清中 sPD-L1 濃度のリバウンドがみられた。分娩後 1 ± 1 日に 60/30 mg/kg 群

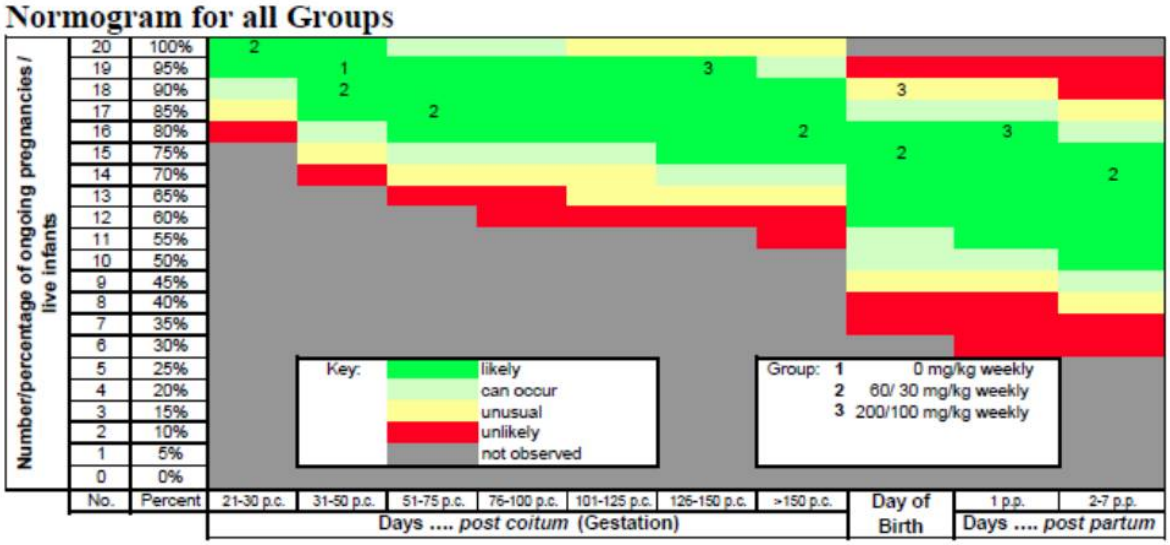
及び 200/100 mg/kg 群の新生児から血清を採取したところ、血清中にそれぞれ平均で 242 ± 121 µg/mL 及び 1010 ± 491 µg/mL 濃度のデュルバルマブが検出され、デュルバルマブの胎盤通過性が確認された。新生児における血清中デュルバルマブ濃度は経時的に低下し、分娩後 180 ± 1 日までに定量不可（80 pg/mL 未満）となった。新生児においては、血清中デュルバルマブ濃度の漸減に伴い、分娩後 180 ± 1 日までに血清中 sPD-L1 濃度が対照群の値にまで上昇した。ADA 陽性となった母動物 3 例のうち、1 例から生児が出生した。この新生児（17677-1）は分娩後 1 日及び 180 日の検査で ADA 陽性と判定され（母動物に発現した ADA の胎盤通過性を示す所見）、結果的にこの新生児の分娩後 1 日の血清中デュルバルマブ濃度は定量下限未満であった。この新生児については分娩後 1 日及び 90 日の血清中 sPD-L1 濃度は測定しなかったが、分娩後 180 日に測定した血清中 sPD-L1 濃度は対照群の新生児の値と同程度であった。

母動物では、一般状態、体重及び剖検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。カニクイザルでは自然発生の生殖障害が頻繁にみられるため、この動物種を用いた ePPND 試験における妊娠の転帰の評価は複雑になる。この点を考慮し、妊娠の転帰を当該試験の対照群及び試験実施施設の背景データ（n=267）の両方と比較して評価し、さらにノルモグラムを作成して妊娠の転帰を Jarvis らによる 2010 年の公表文献（Jarvis et al 2010）の成績と対比させて視覚化した。妊娠の転帰に関する成績及びノルモグラムをそれぞれ表 6及び図 1に示す。

表 6　　試験 8291365 で示された妊娠の転帰

投与群	例数	妊娠中の胎児死亡数			死産又は出生時死亡児数	全妊娠・分娩死亡数	新生児死亡数（分娩後1～7 日）
		初期（妊娠 20～50 日）	中期（妊娠 51～100 日）	後期（妊娠 101～160 日）			
1. 媒体投与	20	1（妊娠 34 日；5%）	—	—	—	1（5%）	—
2. デュルバルマブ 60/30 mg/kg	20	2（妊娠 40 日、48 日；10%）	1（妊娠 57 日；5%）	1（妊娠 157 日；5%）	1（妊娠 149 日；5%）	5（25%）	1（分娩後 6 日；5%）
3. デュルバルマブ 200/100 mg/kg	20	—	—	1（妊娠 129 日；5%）	1（妊娠 136 日；5%）	2（10%）	2（分娩後 1 日；10%）
試験実施施設の背景データ	267	9.7%	5.2%	4.5%	12%	31%	6.8%

図 1　　試験 8291365 に関するノルモグラム



ノルモグラムでは、妊娠の転帰において「発生する可能性が高い」（"likely"）、「発生する可能性がある」（"can occur"）、「稀れに発生する」（"unusual"）」及び「発生する可能性は低い」（"unlikely"）（背景データに基づくと、それぞれの妊娠の転帰の確率は 70%超、約 20%、約 8%及び約 2%に相当）に分類し、各分類の色分け及び用量群の説明を図中に示した。ノルモグラム中の番号（1、2 又は 3）は、本試験において発生した妊娠中死亡又は新生児死亡の群番号を示している。なお、試験実施施設の背景データは、対照となる妊娠例 267 例の成績に基づく。

表 6に示した妊娠の転帰に関する成績から、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、対照群と比較して妊娠中期及び後期での胎児死亡、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が増加する可能性が示唆された。しかしながら、背景データとの比較では、デュルバルマブ投与群における妊娠転帰のパラメータはいずれも正常範囲内であった（表 6）。

この結果をノルモグラム（図 1）にて視覚化したところ、デュルバルマブ投与群（2 及び 3 群）の分娩後 7 日までの妊娠の転帰において胎児又は新生児の死亡のすべてが「発生する可能性が高い」（"likely"；緑色）の範囲内（背景データでは妊娠の転帰の 70%超に相当）であることが確認された。したがって、デュルバルマブ投与群の妊娠の転帰は、試験実施施設でこれまでに得られている計 267 例に基づく背景データと同等であった。これに対して、対照群（1 群）については、分娩後 7 日までの妊娠の転帰は同ノルモグラムの「発生する可能性は低い」（"unlikely"；赤色）の範囲内（背景データでは妊娠の転帰の約 2%に相当）にあると考えられる。したがって、対照群については、妊娠成功率は極めて高いと考えられ、20 例の妊娠に際して新生児は分娩後 180 日まで 19 例が生存した。すなわち、背景データにおける全妊娠期間を通しての胎児死亡率が 31%であったのに対し、対照群の妊娠中胎児死亡は妊娠 34 日の 1 例のみで、全妊娠期間を通しての胎児死亡率は 5%であった（表 6）。したがって、本試験における妊娠の転帰を対照群との比較のみに基づいて評価した場合は、事実上起こり得ない妊娠の転機の方向にデータの評価が歪められると考えられる。この点を考慮すると、妊娠の転帰に関するデータの評価には、試験実施施設でこれまでに得られている背景データとの比較が最も適切であると判断された。

背景データとの比較に基づくと、妊娠の転帰に関するパラメータには、デュルバルマブ投与による影響は認められなかった。さらに、一般状態、体重、外表奇形検査、形態、神経行動学的検査、握力、骨格発達、臨床病理検査、末梢血の免疫表現型、KLH による抗原チャレンジ後の抗体

反応の評価、剖検所見、器官重量及びリンパ系組織の病理組織学的所見に基づいて評価した結果、母動物へのデュルバルマブ投与による生後 6 カ月間の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。

以上のように、妊娠カニクイザルに負荷用量としてデュルバルマブ 60 又は 200 mg/kg を妊娠確定時点に静脈内持続投与し、その後、デュルバルマブ 30 又は 100 mg/kg を週 1 回、自然分娩時点まで静脈内持続投与しても、背景データと比較して母体毒性、胚・胎児毒性及び妊娠の転帰への影響はみられず、出生児の成長及び発達に対する影響も認められなかった。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（AUC_{τ}値として 34800 μg·d/mL、C_{max} 値として 6880 μg/mL）と判断された。

2.6.6.7 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、カニクイザルを用いたデュルバルマブの反復静脈内投与毒性試験（試験 302833、試験 VMM0008 及び試験 VMM0033）の一環として注射部位の局所刺激性評価を行った。

デュルバルマブの PK/PD 及び用量設定試験（試験 302833、2.6.6.3.1項参照）では、最終投与後 10 日に注射部位の病理組織学的検査を実施して局所刺激性を評価した。また、デュルバルマブの 4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験（試験 VMM0008 及び試験 VMM0033、2.6.6.3.2及び 2.6.6.3.3項参照）では、投与期間中、持続静脈内投与部位について Draize の評価基準に従って皮膚の評価を行い、さらに最終投与後 3 日に注射部位の病理組織学的検査も実施して局所刺激性を評価した。その結果、注射部位にデュルバルマブ投与に関連する毒性所見は認められなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 組織交差反応性試験（試験 20014789、試験 20014791；共に GLP 適用）

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。ヒト及びカニクイザルの組織パネルには、欧州委員会指令 75/318 / EEC「モノクローナル抗体の作製及び品質管理」の別冊 II にある「モノクローナル抗体の交差反応性の免疫組織化学的又は細胞化学的検討のために使用するヒト組織の推奨リスト」、及び 1997 年に米国 FDA/CBER から発出された「ヒト使用のためのモノクローナル抗体製品の製造及び試験における考慮すべき点」で推奨されているすべての組織を含めた。

デュルバルマブの組織交差反応性試験（GLP 適用）では、デュルバルマブそれ自体の試験に加えて、対照抗体としてアイソタイプ適合 IgG1 モノクローナル抗体（ハプテンニトロフェノールに対するヒト IgG1 モノクローナル抗体の NIP228）についても同じ組織に対してスクリーニングした。デュルバルマブ及び対照抗体の IgG1 を 0.5 及び 5 μg/mL の濃度でヒト及びカニクイザル正常組織の凍結切片に処理し、間接的酵素免疫測定法にて組織への結合を検出した。その結果、陽性対照組織（ヒト胎盤）の栄養膜上皮細胞への弱い結合～強い結合が認められ、陰性対照組織（ヒト小脳凍結切片内のニューロン）への結合は認められなかった。

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、卵管上皮細胞並びに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。PD-L1 の発現は、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（Freeman et al 2000, Augello et al 2005, Sharpe et al 2007）及び胎盤栄養膜細胞（Brown et al 2003, Holets et al 2006）で報告されている。したがって、上記組織の染色は想定範囲内のものと判断された。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 PD-L1 の発現は特に報告されていないが、他の上皮細胞については PD-L1 の発現が報告されている（Tsuda et al 2005, Chen et al 2006, Das et al 2006）。

2.6.6.8.2 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（試験 20019776；GLP 非適用）

試験 VMM0008 において、200/100 mg/kg 群の雄カニクイザル 1 例（動物番号 645）のいくつかの組織で薬物／ADA 複合体沈着に続発する病理学的変化と符合する病理組織学的所見が認められた。本探索的試験（試験 20019776）の目的は、免疫組織化学的方法を用いて、試験 VMM0008 のこの特定の雄から作製した脳（脈絡叢）、精巣上体、坐骨神経、心臓、腎臓及び肝臓のパラフィン切片におけるデュルバルマブとカニクイザルの内因性免疫グロブリン（IgG 及び IgM）との免疫複合体の存在を明らかにすることであった。対照として、試験 VMM0008 の対照群の雄カニクイザルから作製したパラフィン切片を使用した。

腎臓、精巣上体、脈絡叢及び心臓の炎症がみられる血管において、デュルバルマブ、カニクイザル IgG、IgM、C3 及び sC5b-9 を含む免疫複合体関連顆粒状沈着物が確認されたが、いずれの組織においても炎症が認められない血管では、基本的にこのような沈着物は認められなかった。免疫複合体沈着部位は、血管炎症及びその他の組織学的変化が認められた部位と対応しており、血管炎症の形態学的特徴（分岐部局在性、内皮細胞の空胞化又は増殖、巣状血栓、関連する腎皮質の虚血性変化、壁性又は血管周囲性の炎症細胞浸潤）は免疫複合体の形成機序と符合していた。

デュルバルマブ、カニクイザル IgM、及び sC5b-9 を含む免疫複合体関連顆粒状沈着物は、腎臓の単球／マクロファージ及び好中球並びに肝臓のクッパー細胞でも認められた。これらの免疫組織化学的所見から、デュルバルマブ、免疫グロブリン（恐らく ADA）及び sC5b-9 を含む免疫複合体が過度に全身性に形成され、肝臓のクッパー細胞並びに腎臓の単球／マクロファージ及び好中球による貪食能が亢進したことが示された。

したがって、試験 VMM0008 の動物番号 645 における免疫組織化学的所見は、心臓及び精巣上体の血管炎、腎臓の血管炎／フィブリノイド壊死及び血栓並びに脈絡叢の炎症が、デュルバルマブ、免疫グロブリン（恐らく ADA）及び罹患血管における補体成分を含む免疫複合体が過度に形成され、除去されることなく沈着したことによって誘発されたことを示している。その他の腎臓の組織学的所見（例えば、腎皮質壊死、好塩基性尿細管、タンパク性円柱生成）及び免疫組織化学的所見（例えば、尿細管上皮細胞／尿細管腔における顆粒状沈着物）は、免疫複合体を介する原発性血管炎及びその後の虚血又は糸球体からのタンパク漏出又は再吸収低下に続発する二次的な変化であると考えられた。

動物番号 645 では坐骨神経における炎症性細胞浸潤が認められたが、対照群の動物においても軽度ながら観察されている。両動物の免疫組織化学的所見は同様であり、坐骨神経における免疫複合体形成あるいはその沈着によるものであることを示唆する所見は認められなかった。

2.6.6.9 考察及び結論

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。

カニクイザルはデュルバルマブの非臨床安全性評価において薬理学的に適した唯一の動物種であると判断され、最長 13 週間の反復静脈内投与毒性試験を実施した。また、デュルバルマブの生殖発生毒性を評価するため、カニクイザルを用いた ePPND 試験を実施した。さらに、ヒト正常組織及びカニクイザル正常組織について全組織パネルを用いた組織交差反応性試験を実施した。ICH S6（R1）及び S7A ガイドラインに従い、単独の安全性薬理試験を実施する代わりに、反復投与毒性試験に安全性薬理試験の評価項目を含めた。その結果、検討した評価項目（心血管パラメータ［心電図、血圧］、呼吸数、及び神経行動学的検査所見）のいずれについても、デュルバルマブ投与に関連する所見は認められなかった。ICH S6（R1）及び S9 ガイドラインに従って、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。デュルバルマブに関する毒性試験の結果について以下に考察する。

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、概し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。反復静脈内投与毒性試験のうち、カニクイザルを用いた 4 週間の PK/PD 及び用量設定試験（GLP 非適用）並びにカニクイザルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用）で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。PK/PD 及び用量設定試験で認められたカニクイザル 1 例の死亡は、ADA 産生に伴う急性アナフィラキシー反応に起因すると考えられた。さらに、4 週間反復静脈内投与毒性試験で 200/100 mg/kg 群の 1 例でみられた一般症状及び病理組織学的所見も ADA を介した影響に関連するものであった。この動物では、試験 29 日の最終投与後に一般症状（四肢及び頭部の発疹、赤色尿）が認められ、ADA 検査の結果、陽性と判定され、併せてデュルバルマブ曝露量の急激な低下も認められた。また、病理組織学的検査の結果、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明らかとなった。さらに、腎臓（片側）の皮髄境界部の細動脈に血栓が認められ、脈絡叢、心臓の中動脈及び精巣上体の血管複合体の炎症（片側）並びに坐骨神経の一部に軽度の炎症細胞浸潤も認められた。この一連の病理組織学的所見は薬物／ADA 複合体沈着に続発した病理学的変化と考えられ、その後実施した免疫組織化学的試験（試験 20019776）において、ADA-デュルバルマブ免疫複合体の沈着が様々な組織で確認された。これらの所見はデュルバルマブの薬理作用によるものではなく、非ヒト霊長類におけるデュルバルマブの免疫原性とそれによる下流事象に起因するものであり、また、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、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、これらの試験で認められた 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に関する項目を評価した。その結果、いずれの試験においても、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は、デュルバルマブの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みられなかった。PD-L1 と T 細胞共刺激受容体 PD-1 との相互作用は T 細胞依存性抗体反応に役割を果たしていると考えられることから、デュルバルマブによる抗 KLH 抗体反応の調節は想定外のことではなかった。実際、PD-L1/PD-1 経路の遮断によって抗体反応が低下しうることを示すデー

タが報告されている（Liang et al 2006, Good-Jacobson et al 2010, Hamel et al 2010）。また、PD-L1/PD-1 経路の遮断後、抗体反応の亢進が優位になることを報告した文献もある（Velu et al 2009, Hams et al 2011）。上記試験で認められた一次抗 KHL 抗体反応の調節は、デュルバルマブには免疫調節作用があり、KLH に対する一次抗体反応の抑制が認められたものの、二次抗体反応は対照群における反応と識別できない程度であった点を考慮すると、一次抗 KLH 抗体反応の調節は毒性学的意義の乏しい所見と考えられた。

リンパ器官の病理組織学的所見について、4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験（いずれも GLP 適用）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、デュルバルマブ 200/100 mg/kg 群のカニクイザルの胸腺は小さく、概して胸腺重量も低かった。これに関連して、一部のカニクイザル（雄 3 例中 1 例、雌 3 例中 2 例）では胸腺皮質の軽度～中等度の細胞密度の低下も認められた。13 週間反復静脈内投与毒性試験では、胸腺において、皮質及び髄質又は皮質のみで退縮／萎縮の発現頻度及び程度の増強が雌雄で認められた。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、これらの所見は末梢リンパ組織又は末梢血 T 細胞数への影響を伴わず、8 週間の休薬期間終了後に完全に回復した。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。デュルバルマブの標的が免疫系であることを考慮すると、デュルバルマブによる PD-L1 阻害と胸腺で認められた所見の関連性を否定することは困難であるが、13 週間反復静脈内投与毒性試験では、多くの動物で 8 週間の休薬期間中も血清中 sPD-L1 抑制が認められたことから、胸腺で認められた所見は、デュルバルマブによる PD-L1 阻害に関連した変化というよりも動物へのストレスに起因した変化である可能性が考えられた。

以上のように、免疫関連の毒性所見を含め、薬理作用に起因する毒性所見は認められなかったことから、GLP 適用の反復静脈内投与毒性試験におけるデュルバルマブの無毒性量は負荷用量 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（表 7）。

表 7　　デュルバルマブの安全域

毒性試験	無毒性量（mg/kg）	C_{max} (μg/mL) [a]	AUC_T (μg·d/mL) [a]	安全域（曝露量比）[b]	
				$C_{maxcyno}/C_{maxh}$	AUC_{cyno}/AUC_h
サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験（試験 VMM0008)	200/100	4470	20500	31	50
サル 13 週間反復静脈内投与毒性試験（試験 VMM0033)	200/100	7470	34900	52	85

AUC_{cyno}: area under the concentration-time curve in cynomolgus monkeys; AUC_h: area under the concentration-time curve in humans; $C_{maxcyno}$: maximal concentration in cynomolgus monkeys; C_{maxh}: maximal concentration in humans

a. 4 週間反復静脈内投与毒性試験（試験 VMM0008）及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験（試験 VMM0033）の無毒性量におけるそれぞれ試験 29 日及び試験 85 日のトキシコキネティクスデータ（C_{max} 及び AUC_τ）。

b. 安全域の算出には、試験 D4190C00002 の日本人患者におけるデュルバルマブ 10 mg/kg 初回静脈内投与時の PK パラメータ（$AUC_{0\text{-}14}$=826 μg·d/mL、C_{max}=145 μg/mL）を使用。

非臨床に関する文献データで、PD-L1 と PD-1 との相互作用は胎児に対する母体の免疫寛容を維持する働きがあり、それにより妊娠を維持する役割を果たしていることが示唆されている（Petroff 2005, Zhang et al 2015, Poulet et al 2016）。実際、マウスにおいて、抗体によって PD-L1 シグナル伝達を遮断し、PD-L1 遺伝子を欠失させると、同種異系の妊娠において胎児に対する免疫寛容が破綻し、胎児死亡が増加することが明らかにされている（Guleria et al 2005）。母胎間インターフェースにおける PD-L1 の発現に対する潜在的役割に符合して、デュルバルマブの組織交差反応性試験においても、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が染色され（試験 20014791）、ヒト正常組織では栄養膜上皮細胞の細胞膜及び細胞質が染色された（試験 20014789）。胎児に対する母胎の免疫寛容に及ぼす潜在的影響に加えて、子宮内でのデュルバルマブへの曝露により出生児において免疫介在性疾患の発症リスクや、正常な免疫応答に変化が生じるリスクが高まる可能性があり、PD-L1 及び PD-1 遺伝子ノックアウトマウスでは免疫介在性疾患の発症が報告されている（Nishimura et al 1999, Nishimura et al 2001, Latchman et al 2004）。

デュルバルマブの生殖発生に及ぼす影響の可能性について、性成熟カニクイザルを用いた 3 カ月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）で評価した。受胎能の評価に際して、非ヒト霊長類を用いた交配試験が実際的でないことは、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。さらに、4 週間反復静脈内投与毒性試験（試験 VMM0008）においても、雌雄カニクイザルの生殖器官に対する影響を評価した結果（器官重量、剖検及び病理組織学的検査）、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。

デュルバルマブの胚・胎児発生及び出生後の発生に対する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。当該試験では、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）から自然分娩時まで投与し、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、デュルバルマブを投与しても、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結果は、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が、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を示唆する内容であった。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、ノルモグラム及び妊娠転帰パラメータの解析結果から、対照群は妊娠成功率が極めて高く、妊娠哺育期間を通しての胎児新生児死亡率が 5%であったのに対して、背景データの胎児新生児死亡率は 31%であった。したがって、対照群との比較のみに基づくと、データの解釈が「発生する可能性は低い」（ノルモグラムに基づく背景データの妊娠の転帰の約 2%に相当）に偏ると考えられる。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と予測されるため、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。これらの比較に基づくと、妊娠転帰パラメータはデュルバルマブ投与による影響を受けず、ノルモグラムからもこれらのパラメータは正常範囲内（妊娠の転帰の 70%超に相当）であることが示された。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、胚・胎児発生、妊娠の維持及び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。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。

以上のように、デュルバルマブの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ず、デュルバルマブの臨床用量での安全性を支持するものである。

2.6.6.10 図表

本項におけるすべての表は本文中に示した。

2.6.6.11 参考文献

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.

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.

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.

Good-Jacobson et al 2010

Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. Nat Immunol. 2010; 11(6): 535-42.

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.

Hamel et al 2010

Hamel KM, Cao Y, Wang Y, Rodeghero R, Kobezda T, Chen L, Finnegan A. B7-H1 expression on non-B and non-T cells promotes distinct effects on T- and B-cell responses in autoimmune arthritis. Eur J Immunol. 2010; 40: 3117-27.

Hams et al 2011

Hams E, McCarron MJ, Amu S, Yagita H, Azuma M, Chen L, Fallon PG. Blockade of B7-H1 (Programmed Death Ligand 1) Enhances Humoral Immunity by Positively Regulating the Generation of T Follicular Helper Cells. J Immunol. 2011; 186: 5648-55.

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.

Jarvis et al 2010

Jarvis P, Srivastav S, Vogelwedde E, Stewart J, Mitchard T, Weinbauer GF. The Cynomolgus Monkey as a Model for Developmental Toxicity Studies: Variability of Pregnancy Losses, Statistical Power Estimates, and Group Size Considerations. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2010: 89; 175-87.

Latchman et al 2004

Latchman YE1, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, Kuchroo VK, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(29): 10691-6.

Liang et al 2006

Liang SC, Greenwald RJ, Latchman YE, et al. PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to cutaneous leishmaniasis. Eur J Immunol. 2006; 36: 58-64.

Nishimura et al 1999

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. Immunity. 1999; 11(2): 141-51.

Nishimura et al 2001

Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. Science. 2001; 291(5502): 319-22.

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.

Petroff 2005

Petroff MG. Immune interactions at the maternal-fetal interface. J Reprod Immunol. 2005; 68(1-2): 1-13.

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.

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.

Velu et al 2009

Velu V, Titanji K, Zhou B, et al. Enhancing SIV-Specific Immunity In Vivo by PD-1 Blockade. Nature. 2009; 458(7235): 206-10.

Zhang et al 2015

Zhang YH, Tian M, Tang MX, Liu ZZ, Liao AH. Recent insight into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in feto-maternal tolerance and pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2015; 74(3): 201-8.

2.6.7　毒性試験概要表

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
2.6.7.1	毒性試験：一覧表	3
2.6.7.2	トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表	5
2.6.7.3	トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧	6
2.6.7.4	毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧	7
2.6.7.5	単回投与毒性試験	8
2.6.7.6	反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験	9
2.6.7.7	反復投与毒性試験：重要な試験	12
2.6.7.7.1	サル 4 週間反復投与毒性試験	12
2.6.7.7.2	サル 13 週間反復投与毒性試験	15
2.6.7.8	In Vitro 遺伝毒性試験	18
2.6.7.9	In Vivo 遺伝毒性試験	18
2.6.7.10	がん原性試験	18
2.6.7.11	生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験	18
2.6.7.12	生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	18
2.6.7.13	生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験	18
2.6.7.14	生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	19
2.6.7.15	新生児を用いた試験	23
2.6.7.16	局所刺激性試験	23
2.6.7.17	その他の毒性試験	24
2.6.7.17.1	ヒト組織交差反応性試験	24
2.6.7.17.2	サル組織交差反応性試験	24
2.6.7.17.3	探索的試験	25

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

被験物質：デュルバルマブ

Type of Study	Study Number	Species and Strain	ROA	Duration of dosing	Dose (mg/kg)	GLP Compliance	Study Site	Location in CTD
Single-dose Toxicity	No single-dose toxicity studies were conducted with durvalumab.							
Repeat-dose Toxicity	302833	Cynomolgus monkey	IV	4 weeks (Number of Doses: 4)	Day 1: 0, 0.1 or 1 mg/kg Days 15, 22, 29: 0, 10 or 100 mg/kg	No	[redacted] Canada	4.2.3.2.1
	VMM0008	Cynomolgus monkey	IV	4 weeks (Number of Doses: 5)	Day 1: 0, 30, 60, 200 mg/kg Days 8, 15, 22, 29: 0, 15, 30, 100 mg/kg	Yes	[redacted] UK	4.2.3.2.2
	VMM0033	Cynomolgus monkey	IV	13 weeks (Number of Doses: 14)	Day 1: 0, 30, 60, 200 mg/kg Days 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 92: 0, 15, 30, 100 mg/kg	Yes	[redacted] UK	4.2.3.2.3
Genotoxicity	No genotoxicity studies were conducted with durvalumab.							
Carcinogenicity	No carcinogenicity studies were conducted with durvalumab.							
Reproductive and Developmental Toxicity	8291365	Cynomolgus monkey	IV	Animals dosed weekly from confirmation of pregnancy until parturition	First dose, Gestational Day (GD) 20: 0, 60 or 200 mg/kg GD27- parturition: 0, 30 or 100 mg/kg	Yes	[redacted] Germany	4.2.3.5.3.1
Studies in Juvenile Animals	Studies in juvenile animals were not conducted with durvalumab.							

Type of Study	Study Number	Species and Strain	ROA	Duration of dosing	Dose (mg/kg)	GLP Compliance	Study Site	Location in CTD
Local Tolerance	No formal local tolerance studies were conducted with durvalumab. Intravenous injection sites were evaluated in Study 302833, Study VMM0008, and Study VMM0033.							
Other Toxicity Studies - TCR	20014789	In vitro/ human tissue	NA	NA	0.5 and 5 µg/mL	Yes	[redacted] USA	4.2.3.7.7.1
	20014791	In vitro/ cynomolgus monkey tissue	NA	NA	0.5 and 5 µg/mL	Yes	[redacted] USA	4.2.3.7.7.2
Other Toxicity Studies - Investigative	20019776	In vitro/ cynomolgus monkey tissue	Evaluation of formation and deposition of immune complexes in select tissues from Study VMM0008			No	[redacted] USA	4.2.3.7.7.3

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; NA = not applicable; ROA = route of administration; TCR = tissue cross-reactivity
Unless otherwise specified, for repeat dose and reproductive toxicity studies, the NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) is underlined.

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質：デュルバルマブ

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location Vol. Section
Repeat-dose Toxicity	Cynomolgus monkey	IV	Day 1: 0, 0.1, 1 mg/kg Days 15, 22, 29: 0, 10, 100 mg/kg	No	302833	4.2.3.2.1
Repeat-dose Toxicity	Cynomolgus monkey	IV	Day 1: 0, 30, 60, 200 mg/kg Days 8, 15, 22, 29: 0, 15, 30, 100 mg/kg	Yes	VMM0008	4.2.3.2.2
Repeat-dose Toxicity	Cynomolgus monkey	IV	Day 1: 0, 30, 60, 200 mg/kg Days 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 92: 0, 15, 30, 100 mg/kg	Yes	VMM0033	4.2.3.2.3
Reproductive and Developmental Toxicity	Cynomolgus monkey	IV	First dose, GD20: 0, 60, 200 mg/kg GD27- parturition: 0, 30, 100 mg/kg	Yes	8291365	4.2.3.5.3.1

GD = Gestation Day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; NA = not applicable

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

被験物質：デュルバルマブ

AUC Following Repeated Intravenous Administration of Durvalumab

Dose (mg/kg)	Monkey							Human
	Weekly dosing							
	4 Week Intravenous Toxicity Study			13 Week Intravenous Toxicity Study		Enhanced Pre- and Postnatal Development Study		
	$AUC_{(0-\tau)}$ (µg·d/mL)			$AUC_{(0-\tau)}$ (µg·d/mL)		$AUC_{(0-7d)}$ (µg·d/mL)		AUC_{0-14} (µg·d/mL)
	Day 1	Day 22	Day 29	Day 1	Day 85	GD 20	GD 132	
	M+F	M+F	M+F	M+F	M+F	Pregnant F	Pregnant F	
10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	826 [a]
30/15	2490	3910	3170	3575	6040	NA	NA	
60/30	4530	6690	5500	6215	10900	6760	10800	
200/100	14550	19900	20500	23200	34900	21000	34800	

F = female; GD = Gestation Day; M = male; NA = not applicable
a. PK parameters for durvalumab following the first IV Infusion of 10 mg/kg to Japanese patients (D4190C00002).

C_{max} Following Repeated Intravenous Administration of Durvalumab

Dose (mg/kg)	Monkey							Human
	Weekly dosing							
	4 Week Intravenous Toxicity Study			13 Week Intravenous Toxicity Study		Enhanced Pre- and Postnatal Development Study		
	C_{max} (µg/mL)			C_{max} (µg/mL)		C_{max} (µg/mL)		C_{max} (µg/mL)
	Day 1	Day 22	Day 29	Day 1	Day 85	GD 20	GD 132	
	M+F	M+F	M+F	M+F	M+F	Pregnant F	Pregnant F	
10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	145 [a]
30/15	630	815	729	833	1380	NA	NA	
60/30	1180	1520	1340	1725	2190	1610	2060	
200/100	3800	4410	4470	6425	7470	5060	6880	

F = female; GD = Gestation Day; M = male; NA = not applicable
a. PK parameters for durvalumab following the first IV Infusion of 10 mg/kg to Japanese patients (D4190C00002).

2.6.7.4　　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

被験物質：デュルバルマブ

Test Article	Batch Number	Specified Impurities	Study Number	Type of Study
Durvalumab	SP10-235	None	302833	Repeat-dose toxicity
Durvalumab	SP11-184	None	VMM0008	Repeat-dose toxicity
Durvalumab	SP13-252	None	VMM0033	Repeat-dose toxicity
Durvalumab	95160-040	None	8291365	Reproductive and developmental toxicity
Durvalumab	SP11-184	None	20014789	TCR
Durvalumab	SP11-184	None	20014791	TCR

TCR = tissue cross-reactivity

2.6.7.5　　単回投与毒性試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：デュルバルマブ

Report Title: MEDI4736: A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic and Dose Range Finding Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys					
Study Number: 302833		**Test Article:** Durvalumab	**Species:** Cynomolgus monkey		**Duration of dosing:** 4 weeks (a total of 4 doses)
Route of Administration: Intravenous bolus		**Duration of Postdose Period:** NA		**GLP Compliance:** No	
Vehicle/formulation: 50 mM sodium acetate and 100 mM sodium chloride at pH 5.5					
Study Objective: To determine the PK/PD relationship and potential toxicity of durvalumab upon repeat dosing to male cynomolgus monkeys					
Group	**Test Article**	**Number of Animals (M)**	**Dose Level (mg/kg)**		**Number of Animals Necropsied**
			Day 1	**Days 15, 22, 29**	**Day 39**
1	Vehicle	5	0	0	5
2	Durvalumab	5	0.1	10	5
3	Durvalumab	5	1.0	100	5
Endpoints Evaluated and Findings					
Dose Level (mg/kg)			**0**	**0.1** [a]**/10** [b]	**1.0** [a]**/100** [b]
Pharmacokinetics (group mean value (SD)) [c]					
$AUC_{(0\text{-}t)}$ (µg·d/mL)	Day 1		NA	2.1 (0.165)	80.3 (14.7)
	Day 29 [d]		NA	70 (57.9)	7370 (7240)
C_{max} (µg/mL)	Day 1		NA	1.77 (0.424)	20.8 (1.27)
	Day 29		NA	124 (26.9)	2660 (692)
Incidence of ADA (number of M)					
Day 29			0 of 4 [e]	4 of 4 [f]	4 of 5

Noteworthy findings

- Mortality: Male 203 died on Day 22. This death, suspected to be due to an ADA-associated anaphylactic reaction, occurred shortly following administration of the second dose of 10 mg/kg durvalumab [g].
- Clinical observations: decreased activity, labored breathing, lying on the side for Male 203 (0.1/10 mg/kg durvalumab). There were no treatment-related findings in the remaining animals.
- Body weight/food consumption: no treatment-related changes.
- Hematology, coagulation, clinical chemistry: no treatment-related changes.
- Peripheral blood leukocyte counts (flow cytometry): no treatment-related changes.
- T-cell-dependent antibody response: non-dose-related decreases in KLH-specific IgM and IgG antibody responses were observed following primary immunization on Day 1. The reduction in the primary antibody response to KLH was not considered adverse because substantial primary antibody responses were still mounted and secondary antibody responses (KLH-specific IgG) to KLH immunization on Day 29 were identical to control.
- Cytokine release: no treatment-related effects.
- Levels of soluble PD-L1 and PD-L1 receptor occupancy: soluble PD-L1 in serum was suppressed and membrane PD-L1 on various leukocyte subsets was fully occupied at doses as low as 0.1 mg/kg of durvalumab. The duration of suppression of soluble PD-L1 and full occupancy of membrane PD-L1 were dose-related. Despite a high incidence of ADA, free membrane PD-L1 remained undetectable in all leukocyte subsets through to Day 39 (the day of necropsy) at 100 mg/kg durvalumab.
- Local tolerance: no treatment-related findings at the IV injection site.
- Gross pathology: dark opaque fluid in the trachea, dark discoloration and uncollapsed lungs for Male 203 (0.1/10 mg/kg durvalumab) that died on Day 22 following a suspected ADA-linked anaphylactic response. There were no treatment-related findings in the remaining animals.
- Organ weights: no treatment-related changes.
- Microscopic pathology: lung edema and hemorrhage for Male 203 (0.1/10 mg/kg durvalumab) that died on Day 22 following a suspected ADA-linked anaphylactic response. There were no treatment-related findings in the remaining animals.

NOAEL: 100 mg/kg durvalumab [g]

ADA = anti-drug antibody; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; KLH = keyhole limpet hemocyanin; M = male; NA = not applicable; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; PD = pharmacodynamics; PK = pharmacokinetics

a. Dose administered on Day 1.
b. Dose administered on Days 15, 22, and 29.
c. In 0.1/10-mg/kg dose group, 4 animals were evaluated; Male 203 died shortly after dosing on Day 22.
d. High variability in the PK profiles and shorter than expected duration of exposure were observed in most animals following the final dose of durvalumab due to the formation of ADA.
e. Samples of 4 animals only were evaluated.
f. Male 203 died shortly following dosing on Day 22 but was positive for ADA predose on Day 22 and following the first dose of durvalumab.

g. The death of Male 203 is suspected to be due to an ADA-associated anaphylactic reaction based on 1) clinical signs of an anaphylactic-like reaction noted prior to death (decreased activity, laboured breathing, lying on the side), 2) lung macroscopic (dark opaque fluid in the trachea, dark discoloration, uncollapsed lungs) and microscopic findings (edema, haemorrhage) consistent with anaphylaxis, 3) rapid clearance of durvalumab following the previous dose and presence of ADA within 72 hours following the initial dose of 0.1 mg/kg of durvalumab, and 4) high concentrations of circulating IgE at the time of death. The death of this animal is therefore considered to be secondary to the immunological consequences of the monkey anti-human antibody response to durvalumab. Given that immunogenicity of human monoclonal antibodies in nonclinical species is not generally predictive of responses in humans, the death of this animal was not taken into consideration for the determination of the NOAEL of durvalumab in this study.

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1　サル 4 週間反復投与毒性試験

被験物質：デュルバルマブ

<table>
<tr><td colspan="6">Report Title: MEDI4736: A 4 Week Intravenous Toxicity Study in the Cynomolgus Monkeys with an 8 Week Treatment-Free Period</td></tr>
<tr><td colspan="2">Study Number: VMM0008</td><td colspan="2">Test Article: Durvalumab</td><td colspan="2">Species: Cynomolgus monkey</td></tr>
<tr><td colspan="2">Route of Administration: Intravenous (infusion)</td><td colspan="2">Duration of Post-dose Period: 8 weeks</td><td colspan="2">GLP Compliance: Yes</td></tr>
<tr><td colspan="6">Vehicle/formulation: 25 mM histidine, 265 mM trehalose, and 0.02% (w/v) polysorbate 80, pH 6.0</td></tr>
<tr><td colspan="6">Study Objective: To assess the potential local and systemic toxicity of durvalumab when dosed to cynomolgus monkeys over a period of 4 weeks</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Group</td><td rowspan="2">Test Article</td><td rowspan="2">Number of Animals (M/F)</td><td colspan="2">Dose Level (mg/kg)</td><td colspan="2">Number of Animals Necropsied (M/F)</td></tr>
<tr><td>Day 1</td><td>Days 8, 15, 22, 29</td><td>Day 32</td><td>Day 85</td></tr>
<tr><td>1</td><td>Vehicle</td><td>6/6</td><td>0</td><td>0</td><td>3/3</td><td>3/3</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Durvalumab</td><td>6/6</td><td>30</td><td>15</td><td>3/3</td><td>3/3</td></tr>
<tr><td>3</td><td>Durvalumab</td><td>6/6</td><td>60</td><td>30</td><td>3/3</td><td>3/3</td></tr>
<tr><td>4</td><td>Durvalumab</td><td>6/6</td><td>200</td><td>100</td><td>3/3</td><td>3/3</td></tr>
</table>

Endpoints Evaluated and Findings					
Dose Level (mg/kg)		**0**	**30 [a]/15 [b]**	**60 [a]/30 [b]**	**200 [a]/100 [b]**
Pharmacokinetics [c] (group mean value (SD))					
$AUC_{(0-\tau)}$ (μg·d/mL)	Day 1	NA	2490 (313)	4530 (776)	14550 (2560)
	Day 22	NA	3910 (763)	6690 (1560)	19900 (5270)
	Day 29	NA	3170 (922)	5500 (1430)	20500 (7380)
C_{max} (μg/mL)	Day 1	NA	630 (64.6)	1180 (181)	3800 (928)
	Day 22	NA	815 (146)	1520 (256)	4410 (1320)
	Day 29	NA	729 (129)	1340 (286)	4470 830)
Incidence of ADA (M/F) [d]					
Pretreatment [e]		0/0	0/0	1/0	1/1
Day 8 pre-dose		0/0	0/1	0/0	1/0
Day 15 pre-dose		0/0	5/6	3/2	3/1
Day 22 pre-dose		0/0	5/6	4/2	4/1
Day 29 pre-dose		0/0	5/6	3/2	3/2

Noteworthy findings

- Mortality: none.
- Clinical observations: Male 645 (200/100 mg/kg durvalumab) presented with rash on the legs, ears, arms, ocular regions, and head and had red stained urine beginning on Day 29 shortly following administration of the final dose of 100 mg/kg durvalumab. Red stained urine was also observed in the home cage of this animal on Day 30. The rash had completely resolved by Day 32. There were no toxicology significant findings in the remaining animals.
- Body weight/food consumption: no treatment-related findings.
- Ophthalmoscopy: no treatment-related findings.

- Safety pharmacology (ECG, respiration rate, blood pressure, neurobehavioral screening): no treatment-related findings.
- Hematology, coagulation, clinical chemistry: no treatment-related findings.
- Peripheral blood leukocyte counts (flow cytometry): no treatment-related findings.
- Cytokine release: no treatment-related effects following dosing on Day 1.
- Pharmacodynamics (levels of soluble PD-L1): soluble PD-L1 in serum was generally fully suppressed within 24 hours following the first administration of durvalumab and throughout the dosing period. Suppression of sPD-L1 was maintained throughout the 8-week treatment-free period in 1 of 6, 3 of 6, and 4 of 6 animals in 30/15-, 60/30-, and 200/100-mg/kg dose groups, respectively.
- Local tolerance: no treatment-related findings at the IV injection site.
- Gross pathology: small thymus in all animals administered 200/100 mg/kg durvalumab. Enlarged kidneys for Male 645 (200/100 mg/kg durvalumab).
- Organ weights: thymi of animals administered 200/100 mg/kg of durvalumab were generally of lower weight than concurrent controls (without reaching statistical significance). There were no treatment-related changes in the remaining animals.
- Microscopic pathology: slight to moderate reduction in cellularity of the thymic cortex in some animals [f] (1 of 3 M and 2 of 3 F) in 200/100-mg/kg dose group, which was absent in animals examined after the 8-week treatment-free period. Bilateral, marked, tubular ischemic necrosis and multifocal vasculitis with fibrinoid necrosis (one with a small thrombus) in Male 645 (200/100-mg/kg dose group). This animal also had inflammation in the choroid plexus, a medium-sized artery in the heart, in a complex of vessels in one epididymis, and slight inflammatory cell infiltration in the section of sciatic nerve.

NOAEL: 200 mg/kg loading dose followed by 4 weekly doses of 100 mg/kg durvalumab

ADA = anti-drug antibody; ECG = electrocardiogram; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; NOAEL = no-observed-adverse-effect level

a. Dose administered on Day 1.
b. Dose administered on Days 8, 15, 22, and 29.
c. Sexes combined. Animals that were positive for ADA with changes in TK concentration-time profiles were excluded in the descriptive statistics.
d. By the end of the study, all animals administered 30/15 or 60/30 mg/kg of durvalumab were positive for the presence of ADA (i.e., 3M and 3F at each dose level) and 4 of 6 animals administered 200/100 mg/kg of durvalumab were positive for the presence of ADA (i.e., 2M and 2F).
e. Pre-treatment ADA were considered false positives.
f. This finding correlates with the observation of grossly small thymi and thymi of reduced organ weight at this dose level.
g. Based on the previous experience of the Sponsor and a subsequent investigative study to evaluate immune complex formation by immunohistochemistry (Study 20019776), the spectrum of histopathologic findings in Male 645 is consistent with pathologic sequelae subsequent to drug/ADA complex deposition. Of note, the ADA response in this animal was unique from other animals at this dose level given that exposure to durvalumab was impacted by ADA following the third dose and severely impacted following the fifth (final) dose, at which time suppression of soluble PD-L1 was lost. Given that immunogenicity of human monoclonal antibodies in nonclinical species is not generally predictive of responses in humans, the findings in this animal were not taken into consideration for the determination of the NOAEL in this study.

2.6.7.7.2 サル 13 週間反復投与毒性試験

被験物質：デュルバルマブ

<table>
<tr><td colspan="8">Report Title: MEDI4736: A 13 Week Repeat Dose Intravenous Toxicity Study in the Cynomolgus Monkey Followed by an 8 Week Treatment-Free Period</td></tr>
<tr><td colspan="2">Study Number: VMM0033</td><td colspan="2">Test Article: Durvalumab</td><td colspan="2">Species: Cynomolgus monkey</td><td colspan="2">Duration of dosing: Once weekly for 13 weeks (a total of 14 doses)</td></tr>
<tr><td colspan="3">Route of Administration: Intravenous (infusion)</td><td colspan="3">Duration of Post-dose Period: 8 weeks</td><td colspan="2">GLP Compliance: Yes</td></tr>
<tr><td colspan="8">Vehicle/formulation: 25 mM histidine, 265 mM trehalose, and 0.02% (w/v) polysorbate 80, pH 6.0</td></tr>
<tr><td colspan="8">Study Objective: to assess the potential local and systemic toxicity of durvalumab when dosed to cynomolgus monkeys over a period of 13 weeks</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Group</td><td rowspan="2">Test Article</td><td rowspan="2">Number of Animals (M/F)</td><td colspan="2">Dose Level (mg/kg)</td><td colspan="2">Number of Animals Necropsied (M/F)</td></tr>
<tr><td>Day 1</td><td>Days 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 92</td><td>Day 95</td><td>Day 152</td></tr>
<tr><td>1</td><td>Vehicle</td><td>6/6</td><td>0</td><td>0</td><td>4/4</td><td>2/2</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Durvalumab</td><td>6/6</td><td>30</td><td>15</td><td>4/4</td><td>2/2</td></tr>
<tr><td>3</td><td>Durvalumab</td><td>6/6</td><td>60</td><td>30</td><td>4/4</td><td>2/2</td></tr>
<tr><td>4</td><td>Durvalumab</td><td>6/6</td><td>200</td><td>100</td><td>4/4</td><td>2/2</td></tr>
<tr><td colspan="8">Endpoints Evaluated and Findings</td></tr>
<tr><td colspan="2">Dose Level (mg/kg)</td><td>0</td><td colspan="2">30 [a]/15 [b]</td><td colspan="2">60 [a]/30 [b]</td><td>200 [a]/100 [b]</td></tr>
<tr><td colspan="8">Pharmacokinetics [c] (group mean value (SD))</td></tr>
<tr><td rowspan="2">$AUC_{(0-\tau)}$ (μg·d/mL)</td><td>Day 1</td><td>NA</td><td colspan="2">3570 (1030)</td><td colspan="2">6215 (1380)</td><td>23200 (4400)</td></tr>
<tr><td>Day 85</td><td>NA</td><td colspan="2">6040 (2300)</td><td colspan="2">10900 (2330)</td><td>34900 (8740)</td></tr>
<tr><td>C_{max}</td><td>Day 1</td><td>NA</td><td colspan="2">833 (171)</td><td colspan="2">1725 (325)</td><td>6425 (1490)</td></tr>
</table>

(μg/mL)	Day 85	NA	1380 (508)	2190 (339)	7470 (1710)
Incidence of ADA (M/F) [d]					
Pretreatment [e]		0/1	-	-	-
Day 1 pre-dose		-	-	-	-
Day 15 pre-dose		-	2/5	4/3	3/0
Day 29 pre-dose		0/1	4/5	4/4	-
Day 57 pre-dose		1/1	-	-	-
Day 92 pre-dose		-	-	-	-
Day 124 [f]		1/0 [g]	-	0/1 [g]	0/1 [g]
Day 152 [f]		-	-	-	-

Noteworthy findings

- Mortality: none.
- Clinical observations: none
- Body weight/food consumption: no treatment-related findings.
- Ophthalmoscopy: no treatment-related findings.
- Safety pharmacology (ECG, respiration rate, blood pressure, neurobehavioral screening): no treatment-related findings.
- Hematology, coagulation, clinical chemistry: no treatment-related findings.
- Peripheral blood leukocyte counts (flow cytometry): no treatment-related findings.
- Pharmacodynamics (levels of soluble PD-L1): soluble PD-L1 in serum was generally fully suppressed within 24 hours following the first administration of durvalumab and throughout the dosing period. During the treatment free phase, suppression of soluble PD-L1 was maintained throughout in 3 of 4, 3 of 4 and 4 of 4 animals that previously received 30/15, 60/30 and 200/100 mg/kg durvalumab, respectively. In the animals that lost PD-L1 suppression there was a correlation with an ADA response that significantly impacted exposure to durvalumab.
- Local tolerance: no treatment-related findings at the IV injection site.
- Gross pathology: no treatment-related findings.
- Organ weights: no treatment-related findings.
- Microscopic pathology: In the thymus, an increase in incidence and/or severity of involution/atrophy (cortex and medulla or cortex) was observed in

males and females. In the mesenteric lymph node, decreased germinal center development was noted in two males treated at 200/100 mg/kg/occasion. Following the 8 week treatment-free period, no difference from control was observed in either of these tissues. These findings were not associated with any changes in peripheral-blood T cells counts, were considered to have an uncertain relationship to treatment and given their incidence or severity, if they were related to treatment, they were considered not to be adverse.
NOAEL: 200 mg/kg loading dose followed by 13 weekly doses of 100 mg/kg durvalumab

ADA = anti-drug antibody; ECG = electrocardiogram; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; NOAEL = no observed adverse effect level

a. Dose administered on Day 1.
b. Dose administered on Days 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 92.
c. Sexes combined. Animals that were positive for ADA with changes in TK concentration-time profiles were excluded in the descriptive statistics.
d. By the end of the study, all animals administered 30/15 or 60/30 mg/kg of durvalumab were positive for the presence of ADA (i.e., 3 M and 3 F at each dose level) and 4 of 6 animals administered 200/100 mg/kg of durvalumab were positive for the presence of ADA (i.e., 2 M and 2 F)
e. Pre-treatment ADA were considered false positives.
f. Refers to the treatment-free phase of the study.
g. At this time point 8/12 animals had been sacrificed, therefore n = 4.

2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.10　がん原性試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.14　　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

被験物質：デュルバルマブ

Report Title: MEDI4736: An enhanced pre- and postnatal development study in cynomolgus monkeys				
Study Number: 8291365		**Test Article:** durvalumab	**Species:** Cynomolgus monkey	**Duration of dosing:** from confirmation of pregnancy until parturition
Route of Administration: Intravenous infusion		**Duration of Post-dose Treatment-free Period:** NA		**GLP Compliance:** Yes
Vehicle/formulation: 26 mM Histidine/Histidine HCl, 275 mM Trehalose Dihydrate, 0.02% (w/v) Polysorbate-80, pH 6.0				
Study Objectives: To investigate the potential effects of durvalumab on embryonic development, maintenance of pregnancy and postnatal development when dosed to pregnant cynomolgus monkeys from confirmation of pregnancy until parturition				
Group	**Test Article**	**Number of Pregnant Females**	**Dose Level (mg/kg)**	
			GD20	**GD27-parturition**
1	Vehicle	20	0	0
2	Durvalumab	20	60	30
3	Durvalumab	20	200	100
Endpoints Evaluated and Findings				
Dose Level (mg/kg)		**0**	**60 [a]/30 [b]**	**200 [a]/100 [b]**
Pharmacokinetics in maternal animals (group mean value ± SD)				
$AUC_{(0\text{-}7d)}$ (µg·h/mL)	GD20	NA	6760 ± 1160	21000 ± 5430
	GD132	NA	10800 ± 2040	34800 ± 7922
C_{max} (µg/mL)	GD20	NA	1610 ± 323	5060 ± 1180
	GD132	NA	2060 ± 419	6880 ± 1681
Incidence of ADA in maternal animals				
GD20		1/20	1/20	-
GD34		-	8/20	1/20
GD48		-	10/20	6/20
GD76		-	11/20	7/20
GD104		-	-	8/20

GD132	2/20	-	10/20
GD146	-	-	-
Day 28 p.p.	-	12/20	12/20
Day 56 p.p.	-	-	-
Durvalumab in breast milk maternal animals (group mean value ± SD) (μg/mL)			
Day 28 p.p.	NA	0.453 ± 0.250	1.95 ± 0.860
Exposure in infants (group mean value ± SD, M+F) (μg/mL)			
Day 1 p.p. ± 1 day	NA	242 ± 121	1010 ± 491
Day 90 p.p. ± 1 day	NA	7.85 ± 7.26	42.2 ± 21.6
Day 180 p.p. ± 1 day	NA	BLQ	BLQ
Incidence of ADA in infants (M+F)			
Day 1 p.p. ± 1 day	0/19	1/15	0/16
Day 90 p.p. ± 1 day	0/19	1/14	0/16
Day 180 p.p. ± 1 day	0/19	1/14	0/16

Pregnancy outcome

Dose group (mg/kg)	No. Pregnant Females	% Pregnancy loss per trimester (number, GD)				% Total pregnancy loss GD20-160 (number)	% Infant deaths Day 1-7 p.p. (number, Day p.p.)	No. of infants Day 180 p.p.
		GD20-GD50	GD51-GD100	GD101-GD160	Stillbirths, found dead			
0	20	5% (1, GD34)	-	-	-	5% (1)	-	19
60/30	20	10% (1, GD40) (1, GD48)	5%, (1, GD57)	5% (1, GD157)	5% (1, GD149)	25% (5)	5% (1, Day 6 p.p.)	14
200/100	20	-	-	5% (1, GD129)	5% (1, GD136)	10% (2)	10% (2, Day 1 p.p.)	15
Facility historical control data	267	9.7%	5.2%	4.5%	12%	31%	6.8%	NA

Noteworthy findings - Maternal animals:

- Mortality: none
- Clinical observations: no treatment-related findings.
- Body weight/food consumption: no treatment-related findings.
- Gestation length: no treatment-related findings.
- Pharmacodynamics (levels of soluble PD-L1): soluble PD-L1 in serum was generally fully suppressed and dropped to below the lower limit of qualification following the start of durvalumab treatment on GD20, and remained suppressed throughout gestation. Following parturition and cessation of dosing, maternal serum sPD-L1 levels remained suppressed on Day 56 p.p., which correlated with persistent low level exposure to durvalumab. The only exceptions to this were 2 of 20 and 1 of 20 maternal animals dosed at 60/30 or 200/100 mg/kg, in which exposure to durvalumab was lost due to ADA and a rebound of serum sPD-L1 levels was observed.
- Gross pathology: no treatment-related findings.
- Organ weights: no treatment-related findings.

Noteworthy findings - Infants:

- Mortality: no treatment-related effects on incidence of infant mortality.
- External examination, skeletal development and morphological measurements: no treatment-related findings.
- Neurobehavioural assessment, grip strength: no treatment-related findings.
- Skeletal development: no treatment-related findings.
- Infant external examination, morphological measurements, neurobehavioural assessment, grip strength, skeletal development: no treatment-related findings.
- Clinical observations: no treatment-related findings.
- Body weight/food consumption: no treatment-related findings.
- Hematology, coagulation, clinical chemistry: no treatment-related findings.
- Peripheral blood leukocyte counts (flow cytometry): no treatment-related findings.
- Pharmacodynamics (levels of soluble PD-L1): soluble PD-L1 in serum was generally fully suppressed and below the lower limit of qualification on Day 1 p.p. and either partially or fully suppressed by Day 90 p.p. At termination on Day 180 p.p. serum soluble PD-L1 had returned to baseline. Of the 3 maternal animals that tested positive for ADA and showed impact on durvalumab exposure, 1 gave birth to a live infant. In this infant exposure to durvalumab was below the limit of quantitation on Day 1 p.p. (indicating placental transfer of ADA).

- Antigen challenge: the ability of the infants to mount IgM and IgG antibody responses to a T-cell-dependent antigen were assessed by immunization with KLH on Day 137 and 158 p.p.; no treatment-related effects on the primary or secondary antibody response to KLH were observed.
- Gross pathology: no treatment-related findings.
- Organ weights: no treatment-related findings.
- Microscopic pathology of lymphoid tissues: no treatment-related findings.

Noteworthy findings – Pregancy Outcomes:

- Comparisons to concurrent control: assessment of pregnancy outcome data relative to concurrent controls was suggestive of a potential effect of durvalumab on in mid- and late stage pregnancy losses, stillbirths or infants found dead, and total pregnancy loss and infant loss, without a clear trend in dose relationship.
- Study normogram: analysis of pregnancy outcome parameters relative to historical control data from the test facility (n=267 pregnancies) indicated that the concurrent controls showed an unusually high pregnancy success rate, with total pregnancy loss of 5%, against a historical control total pregnancy loss of 31%. Therefore, comparisons to concurrent controls skew data interpretation toward an unlikely pregnancy outcome scenario (2% of historical pregnancy outcomes according to the study normogram). Pregnancy outcomes for the durvalumab-treated groups were within the normal range of the study normogram (consistent with >70% of historical control pregnancy outcomes).
- Comparisons to historical control: given the unusual pregnancy success rate in the control group, assessment of pregnancy outcome parameters of the durvalumab-treated groups relative to historical controls were considered more scientifically robust. Based on these comparisons, all of the pregnancy outcome parameters were unaffected by administration of durvalumab.

NOAEL: 200 mg/kg loading dose followed by weekly doses of 100 mg/kg durvalumab

ADA = anti-drug antibody; AUC = area under the concentration-time curve; BLQ = below limit of quantitation; C_{max} = maximal concentration; F = female; GD = Gestation Day; GLP = Good Laboratory Practice; KLH = keyhole limpet hemocyanin; M = male; NA = not applicable; p.p. = postpartum; TDAR = T-cell-dependent antibody response

a. Dose administered on Day GD20.
b. Dose administered from GD27 to parturition.

2.6.7.15　　新生児を用いた試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.16　　局所刺激性試験

該当する試験は実施しなかった。

2.6.7.17　その他の毒性試験

2.6.7.17.1　ヒト組織交差反応性試験

被験物質：デュルバルマブ

Report Title: A Tissue Cross-Reactivity Study of MEDI4736 in Normal Human Tissues		
Study Number: 20014789	**Test Article:** Durvalumab	**Species:** In vitro/human tissue
Number of Doses: NA	**Route of Administration:** NA	**GLP Compliance:** Yes
Study Objectives: To evaluate the potential cross-reactivity of durvalumab with cryosections of normal human tissues		
Number of Donors per Tissue: At least 3	**Concentration of durvalumab:** 0.5 and 5 µg/mL	
Noteworthy findings: • Durvalumab-specific staining was present on the membrane and in cytoplasm of mononuclear cells and trophoblastic epithelium and in the cytoplasm of pituitary epithelium.		

GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable

2.6.7.17.2　サル組織交差反応性試験

被験物質：デュルバルマブ

Report Title: A Tissue Cross-Reactivity Study of MEDI4736 in Normal Cynomolgus Monkey Tissues		
Study Number: 20014791	**Test Article:** Durvalumab	**Species:** In vitro/cynomolgus monkey tissue
Number of Doses: NA	**Route of Administration:** NA	**GLP Compliance:** Yes
Study Objectives: To evaluate the potential cross-reactivity of durvalumab with cryosections of normal cynomolgus monkey tissues		
Number of Donors per Tissue: At least 3	**Concentration of durvalumab:** 0.5 and 5 µg/mL	
Noteworthy findings: • Durvalumab -specific staining was present on the membrane and in cytoplasm of mononuclear cells, fallopian tube epithelium, and trophoblastic epithelium.		

GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable

2.6.7.17.3　探索的試験

被験物質：デュルバルマブ

Report Title: An Investigative Study to Evaluate Deposition of Immune Complexes in Select Tissues from Study HLSVMM0008		
Study Number: 20019776	**Test Article:** Durvalumab	**Species:** In vitro/cynomolgus monkey tissue
Number of Doses: NA	**Route of Administration:** NA	**GLP Compliance:** No
Study Objectives: To evaluate the presence of immune complexes in select tissues from Study VMM0008		
Noteworthy findings: • Vasculitis in the heart and epididymides, perivascular inflammation in the choroid plexus, and the vasculitis/fibrinoid necrosis and thrombosis in the kidney of Male 645 were caused by excessive formation, lack of clearance, and, hence, deposition of immune complexes containing durvalumab, immunoglobulin (likely ADA), and/or complement components in affected vessels. Other histologic (eg, renal cortical necrosis, basophilic tubules, proteinaceous cast formation) and IHC findings in kidney (eg, granular deposits in tubular epithelial cells/lumens) were considered secondary to the primary immune complex-mediated vasculitis and subsequent ischemia or glomerular protein loss and failure of reuptake.		

ADA = anti-drug antibody; GLP = Good Laboratory Practice; IHC = immunohistochemistry; NA = not applicable.