第 2 部　CTD の概要

トレメリムマブ

版番号：[redacted]

2.4　非臨床試験の概括評価
トレメリムマブ

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

標題ページ 1
目次 2
略語及び専門用語一覧表 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.1.1 *In vitro* 試験 8
2.4.2.1.2 *In vivo* 試験 10
2.4.2.2 副次的薬理試験 10
2.4.2.3 安全性薬理試験 10
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 10
2.4.3 薬物動態試験 11
2.4.3.1 非臨床薬物動態プログラムの概要 11
2.4.3.2 吸収 11
2.4.3.3 分布 11
2.4.3.4 代謝 11
2.4.3.5 排泄 11
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 11
2.4.4 毒性試験 12
2.4.4.1 毒性試験プログラムの概要 12
2.4.4.2 動物種の選択根拠 12
2.4.4.3 単回投与毒性試験 12
2.4.4.4 反復投与毒性試験 12
2.4.4.5 遺伝毒性試験 14
2.4.4.6 がん原性試験 14
2.4.4.7 生殖発生毒性試験 14
2.4.4.8 幼若動物を用いた試験 14
2.4.4.9 局所刺激性試験 14
2.4.4.10 その他の毒性試験 15
2.4.4.10.1 組織交差反応性試験 15
2.4.4.10.2 免疫毒性試験 15
2.4.4.10.3 併用投与毒性試験 15
2.4.5 総括及び結論 15
2.4.6 参考文献 18

表目次

表 1 トレメリムマブに関する非臨床薬理試験の一覧 6
表 2 トレメリムマブに関する非臨床薬物動態試験の一覧 7
表 3 トレメリムマブに関する毒性試験の一覧 7
表 4 トレメリムマブのカニクイザル及びヒトにおける反復静脈内投与時の曝露量（平均 AUC [µg·hr/mL]） 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
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated 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
CD	Cluster of differentiation：白血球分化抗原
CL	Clearance：全身クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4：細胞傷害性 T リンパ球抗原 4
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定法
h	Human：ヒト
HNSTD	Highest Non-Severely Toxic Dose：重篤な毒性が発現しない最大投与量
ICH	International Council for Harmonisation：医薬品規制調和国際会議
IFN	Interferon：インターフェロン
Ig	Immunoglobulin：免疫グロブリン
IgG2	Immunoglobulin G2：免疫グロブリン G2
IL	Interleukin：インターロイキン
mAb	Monoclonal antibody：モノクローナル抗体
GLP	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
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
NK	Natural killer：ナチュラルキラー（細胞）
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核細胞
PD-L1	Programmed cell death-ligand 1
PD	Pharmacodynamic(s)：薬力学
PHA	Phytohemagglutinin：フィトヘマグルチニン
PK	Pharmacokinetic(s)：薬物動態
Q3W	Once every 3 weeks：3 週毎に 1 回（投与）
Q4W	Once every 4 weeks：4 週毎に 1 回（投与）
QTc	Corrected QT Interval：補正した QT 間隔
rcyno	Recombinant cynomolgus：遺伝子組換えカニクイザル
rh	Recombinant human：遺伝子組換えヒト
SEA	Staphylococcal enterotoxin A：ブドウ球菌エンテロトキシン A
Tregs	Regulatory T cells：制御性 T 細胞
$t_{1/2}$	Terminal half-life：消失半減期
TK	Toxicokinetics：トキシコキネティクス
TNF	Tumor necrosis factor：腫瘍壊死因子
TSH	Thyroid-stimulating hormone：甲状腺刺激ホルモン
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

トレメリムマブ（旧称：CP-675,206）は、活性化 T 細胞の表面に発現している受容体である細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（CTLA-4、別名：CD152）に結合するよう遺伝子組換えを行った完全ヒト免疫グロブリン γ-2（IgG2）モノクローナル抗体（mAb）である。T 細胞が活性化されると CTLA-4 の発現がアップレギュレートされることによって免疫反応が抑制され、T 細胞活性化が調節されて最終的には T 細胞が不活化する。CTLA-4 の天然リガンドは CD80（B7.1）及び CD86（B7.2）であり、抗原提示細胞（APC）に発現している。CTLA-4 が CD80/CD86 に結合すると、主に CD80/86 へのアクセスが CD28 と競合することにより T 細胞活性化が抑制される（Walker and Sansom 2015）。*In vitro* においてトレメリムマブは T 細胞機能を増強し、これはインターロイキン（IL）-2、インターフェロン（IFN）-γ 及びその他のサイトカインの放出の増加によって示される（Tarhini and Kirkwood 2008）。癌の動物モデルにおいて、抗マウス CTLA-4 mAb を用いて CTLA-4 の機能を阻害すると T 細胞機能が増強され（Wu et al 2012）、PD-L1 阻害薬との併用により抗腫瘍効果が増強されることが報告されている（Fiegle et al 2019）。

作用機序及び抗腫瘍活性、薬物動態（PK）、薬力学（PD）並びに毒学的プロファイルに関するトレメリムマブの特性を明らかにするために、包括的な一連の *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験を計画した。

一連の非臨床薬理試験でトレメリムマブの機能的特性の評価を行った（表 1）。*In vitro* 薬理試験において、トレメリムマブが T 細胞の CTLA-4 に結合して CTLA-4 の活性を阻害するときの結合親和性、特異性及び機能的特性を評価した。一連の *in vivo* 試験では、免疫応答性マウス腫瘍モデルにおいて CTLA-4 阻害薬を単独投与又は PD-L1 阻害薬と併用投与したときの薬理作用を調査した。

薬理試験では（1）トレメリムマブの結合及び機能的特性に基づいて、臨床試験で検討する治験薬として適切であることを明らかにすること、（2）安全性及び毒性試験に用いる動物種の選択を支持するデータを提供すること、（3）CTLA-4 と CD80/CD86 との結合阻害による生物的及び機序的作用を調査すること、並びに（4）トレメリムマブ及びデュルバルマブの薬理学的に適切なマウス代替抗体を併用したときの相加的又は相乗的作用を評価することを目的としていた。

トレメリムマブはヒト及びカニクイザルの CTLA-4 に選択的に結合することに基づき、トレメリムマブの非臨床安全性評価で使用する薬理学的に適切な動物種はカニクイザルであると考えられた。トレメリムマブは、遺伝子組み換えヒト CTLA-4 と同程度の結合親和性で遺伝子組み換えカニクイザル CTLA-4 と結合し（試験 14-CP-675,206、2.4.2.1.1 項）、また、カニクイザルの活性化 T 細胞に結合する（試験 15-CP -675,206、2.4.2.1.1 項）。

トレメリムマブの非臨床薬物動態及び TK は、以下の試験で検討された（表 2 及び表 3）。

- カニクイザルを用いたトレメリムマブの単回静脈内及び皮下投与薬物動態試験
- カニクイザルを用いたトレメリムマブの毒性試験（単回投与試験、1 カ月間反復投与試験、6 カ月間反復投与試験、胚・胎児発生に関する試験）

トレメリムマブの非臨床安全性プロファイルについて、以下の 7 試験で評価した（表 3）。

- カニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（GLP 非適用）
- カニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（GLP 適用）
- カニクイザルを用いた 1 カ月間反復静脈内投与毒性及び 2 カ月間回復性試験（GLP 適用）
- カニクイザルを用いた 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用）

- カニクイザルを用いた胚･胎児発生に関する試験（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）

トレメリムマブの非臨床安全性試験は、ICH S6（R1）及び ICH S9 ガイドラインを含む、関連する ICH ガイドラインに示されている要件を満たしている。全ての重要な非臨床安全性試験は、OECD 加盟国おいて、OECD GLP ガイダンスに従い実施した。

非臨床安全性試験における投与経路は、予定されている臨床投与経路である静脈内投与とした。上記の非臨床安全性試験パッケージは、切除不能な肝細胞癌の適応に対するトレメリムマブの承認をサポートするために適切かつ十分であると考えられる。臨床では、デュルバルマブ 1500 mg の初回投与時にトレメリムマブ 300 mg を併用投与し、以降デュルバルマブ 1500 mg Q4W の投与が行われる。

表 1　　トレメリムマブに関する非臨床薬理試験の一覧

Study Number	Study Type	Study Title	GLP
06-CP-675,206	*In Vitro*	Selectivity of CP-675,206 Relative to CTLA-4 Binding	No
15-CP-675,206	*In Vitro*	Binding of CP-675,206 to Activated T Cells or Lymphocytes	No
14-CP-675,206	*In Vitro*	Comparison of CP-675,206 Binding Affinities to Recombinant Human and Recombinant Cynomolgus Monkey CTLA-Ig Using Biacore Technology	No
03-CP-675,206	*In Vitro*	Inhibition of CTLA-4 Binding to B7 by CP-675,206	No
02-CP-675,206	*In Vitro*	Enhancement of IL-2 and Interferon-Gamma (IFN-γ) Production by CP-675, 206 in Human T Cell Blasts Stimulated with Raji cells	No
08-CP-675,206	*In Vitro*	B7 Dependence of the SEA Superantigen Assay	No
01-CP-675,206	*In Vitro*	Enhancement of Interluekin-2 (IL-2) Production by CP-675,206 in Superantigen Stimulated Human PBMC or Blood Cultures	No
13-CP-675,206	*In Vitro*	Enhancement of IL-2 Production by CP-675,206 in Superantigen Stimulated Human PBMC or Blood Cultures from Cancer Patients	No
04-CP-675,206	*In Vitro*	Enhancement of IL-2 production by CP-675,206 in Superantigen Stimulated Cynomolgus Monkey Blood	No
11-CP-675,206	*In Vitro*	Effects of CP-675,206 on Suppression of $CD4^+$ $CD25^-$ T Cells by Human T Regulatory Cells	No
07-CP-675,206	*In Vitro*	Activity of Plate-Bound CP-675,206	No
05-CP-675,206	*In Vitro*	Effects of CP-675,206 on Spontaneously Induced Cytokine Release in Human Whole Blood	No
10-CP-675,206	*In Vitro*	Effects of CP-675,206 on Platelet Counts in an in Vitro Human Whole Blood Assay	No
16-CP-675,206	*In Vitro*	Binding of CP-675,206 to Human of Cynomolgus Monkey Fc Receptors	No
09-CP-675,206	*In Vitro*	Effects of CP-675,206 on Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity of Naive and Activated Human T Cells	No
ONC4736-0017	*In vitro*	*In Vitro* Assessment of MEDI4736/tremelimumab-mediated Cytokine Release in Human Whole Blood	No
12-CP-675,206	*In Vivo*	A Murine CTLA-4 Monoclonal Antibody (9H10) Inhibits the Growth of a Murine Fibrosarcoma in Mice	No

表 1 トレメリムマブに関する非臨床薬理試験の一覧

Study Number	Study Type	Study Title	GLP
ONC1123-0001	*In Vivo*	Activity of Tremelimumab Murine Surrogate as Monotherapy or in Combination with Anti-mouse PD-L1 in Mouse Syngeneic Tumour Models	No

CP-675,206 = tremelimumab; CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4; GLP = Good Laboratory Practice; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; IFN-γ =interferon gamma; IL-2 = interleukin 2.

表 2 トレメリムマブに関する非臨床薬物動態試験の一覧

Study Number	Study Title	Species/ROA	GLP
DM2003-675206-011	Intravenous Pharmacokinetics of CP 675,206 in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkey/IV	No
DM2003-675206-012	Intravenous Pharmacokinetics of CP-675,206 in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkey/IV	No
DM2003-675206-009	Pharmacokinetics of CP-675,206 in Cynomolgus Monkeys Following Subcutaneous Administration	Cynomolgus monkey/SC	No

CP-675,206 = tremelimumab; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; ROA = route of administration; SC = subcutaneous.

表 3 トレメリムマブに関する毒性試験の一覧

Study Type/Number	Study Title	Species/ROA	GLP
Single-dose/ 00-1985-06	CP-675,206 Single Dose Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkey/IV	No
Single-dose/ 99-1985-01	CP-675,206 Acute IV Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkey/IV	Yes
Repeat-dose/ 00-1985-04	CP-675,206 1-Month Intravenous Toxicity Study with a 2-Month Post-Dose Observation in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkey/IV	Yes
Repeat-dose/ 2004-0150	6-Month Intravenous Toxicity Study of CP-675,206 In Monkeys	Cynomolgus monkey/IV	Yes
Reproductive Toxicity/ 2501-001	CP-675,206 Intravenous Embryo-Fetal Development Study in the Cynomolgus Monkey	Cynomolgus monkey/IV	Yes
Tissue Cross-Reactivity/ IM676	Cross-Reactivity of CP-675,206 with Normal Human Tissues	Human tissue/ *In vitro*	Yes
Tissue Cross-Reactivity/ IM645	Cross-Reactivity of CP-675,206 with Normal Cynomolgus Monkey Tissues	Cynomolgus monkey tissue/ *In vitro*	Yes

CP-675,206 = tremelimumab; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; ROA = route of administration.

2.4.2 薬理試験

トレメリムマブの非臨床薬理学特性の検討では、*in vitro* の 16 試験及びマウスを用いた *in vivo* 2 試験を実施した。トレメリムマブのカニクイザルにおける安全性薬理は毒性試験の一部として評価した（試験 99-1985-01、試験 00-1985-04、試験 2004-0150）。

非臨床薬理試験の一覧を表 1 に示した。薬理試験の概要文及び薬理試験概要表をそれぞれ 2.6.2 項及び 2.6.3 項に示した。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 *In vitro* 試験

トレメリムマブについて、関連蛋白質であるヒト（h）CD28-Ig、hCD86-Ig 及び hIgG1 と比較したときの hCTLA-4-Ig 選択性を ELISA 法により評価した。トレメリムマブの遺伝子組換えヒト（rh）CTLA-4-Ig への結合は、hCD28-Ig、hCD86-Ig 及び hIgG1 と比較して 500 倍超の高い選択性で結合したことから、トレメリムマブは CTLA-4 に高い選択性を示すことが裏付けられた（試験 06-CP-675,206）。トレメリムマブは、フィトヘマグルチニン（PHA）で活性化させたヒト、カニクイザル及びアカゲザル T 細胞に発現する CTLA-4 に結合することがフローサイトメトリーで確認された（試験 15 CP 675,206）。一方、トレメリムマブはマウス、ラット、ウサギ及びハムスターの活性化 T 細胞には結合しなかった（試験 15-CP-675,206）。表面プラズモン共鳴法を用いて固定化 rhCTLA-4 及び rcynoCTLA-4 に対するトレメリムマブの親和性（平衡解離定数［K_D］で表す）を測定した結果、トレメリムマブの rhCTLA-4 及び rcynoCTLA-4 への結合に関する K_D 値はそれぞれ 0.28 及び 0.98 nM であった（試験 14-CP-675,206）。

競合 ELISA ベースの結合アッセイで、トレメリムマブは rhCTLA-4 の rhCD80 及び rhCD86 への結合をいずれも阻害することが確認され、その 50%阻害濃度（IC_{50}）は、それぞれ 0.78 ± 0.05 nM 及び 0.46 ± 0.04 nM であった（試験 03-CP-675,206）。

トレメリムマブが CTLA-4 とそのリガンドの相互作用を阻害することにより CTLA-4 の機能に影響を及ぼすか否かを、セルベースの *in vitro* T 細胞活性化アッセイを用いて検討した（試験 02-CP-675,206）。初代ヒト T 細胞を PHA で 48 時間活性化した後、CD80 及び CD86 の両方を発現する Raji 細胞とともに培養した。T 細胞を Raji 細胞と共培養したとき、この刺激に反応して IL-2 及び IFN-γ の両方が細胞培養上清中に放出された。放出された際の IL-2 及び IFN-γ の濃度は 30 μg/mL（200 nM）のトレメリムマブを添加したとき有意に増加した（$p<0.001$）。

ブドウ球菌エンテロトキシン A（SEA）を用いたスーパー抗原刺激試験で、トレメリムマブの T 細胞の反応に及ぼす影響を検討した（試験 08-CP-675,206）。健康ドナー由来末梢血単核細胞（PBMC）又は全血を SEA 及び固定化抗 CD3 存在下で培養した。それにより誘発された IL-2 の細胞培養上清中への放出を ELISA 法で測定した。30 μg/mL のトレメリムマブを添加すると、IL-2 放出は 15 例の健康ドナー由来培養ヒト PBMC で平均 400%増加し、15 例の健康ドナー由来培養全血で平均 120%増加した（試験 01-CP-675,206）。ヒトの培養全血で得られた結果と同様にトレメリムマブによりカニクイザルにおける IL-2 放出は最大 91%増加した（試験 04-CP-675,206）。

続いて実施した試験（試験 13-CP-675,206）において、別の 12 例の健康ドナー及び 80 例を超える様々な癌（黒色腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、前立腺癌、腎臓癌、結腸癌、直腸癌及び卵巣癌）患者由来培養 PBMC 及び全血をスーパー抗原で刺激したときの IL-2 放出に対するトレメリムマブの作用を 0.1～100 μg/mL の濃度で評価した。トレメリムマブ処理により、健康ドナー由来 PBMC 及び全血からの IL-2 放出が濃度依存的に増加した。癌患者由来 PBMC では 87 例中 84 例、癌患者由来全血では 93 例中 85 例で IL-2 放出の濃度依存的な増加が認められ

た。ベースライン時の IL-2 放出レベル及びトレメリムマブによる IL-2 放出増加の程度はドナーによりばらつきがみられた。このような反応及び反応の程度におけるばらつきは健康ドナー由来と癌患者由来の全血及び PBMC 間でほぼ同程度であり、癌の病期や種類によって影響されなかった。

制御性 T 細胞（Tregs；CD4+CD25+）により他の T 細胞集団の活性化が抑制されることから、この抑制に対するトレメリムマブの影響を *in vitro* 試験系で評価した（試験 11-CP-675,206）。異なる 3 例のドナー由来レスポンダーCD4+CD25-T 細胞と Tregs を共培養したとき、レスポンダーT 細胞単独と比較して IFN-γ 産生量及び ^{3}H-チミジン取込みが減少した。30 又は 100 μg/mL のトレメリムマブ又は抗 KLH 対照抗体を添加しても顕著な影響は認められなかった。したがって、本試験の条件下において、トレメリムマブは刺激されたヒト末梢血レスポンダーT 細胞の活性及び増殖に対するヒト末梢血 Tregs の抑制作用に影響しないことが示された。

固相化したトレメリムマブが CTLA-4 を高度に凝集させることにより T 細胞の活性化を阻害するか否かを、SEA で刺激した 3 例の健康ドナー由来ヒト PBMC を用いて検討した（試験 07-CP-675,206）。これらの試験で、トレメリムマブ及び抗 KLH 抗体は IL-2 放出量に顕著な影響を及ぼさなかったことから、トレメリムマブは生体内で凝集又は細胞表面に結合した場合でも T 細胞の活性化を抑制しないことが示唆された。

トレメリムマブが、サイトカイン放出を誘導するか否かを、*in vitro* サイトカイン放出試験により検討した（試験 05-CP-675,206）。健康ドナー6 例から採取した全血をトレメリムマブ又は抗ヒト CD3 抗体（陽性対照）の存在下で培養した。培養開始から 5 時間後に、細胞培養上清中の IL-6 及び腫瘍壊死因子 α（TNF-α）の放出量を ELISA 法にて測定した。なお、48 時間培養後に IL-1β の放出量も測定した。過去の研究（Wing et al 1995）で、この測定法はヒトにおける抗体を介したサイトカイン放出と相関することが示されている。10 及び 100 μg/mL の濃度のトレメリムマブを添加して培養したとき、トレメリムマブは *in vitro* でサイトカイン放出を誘導しないことが示された。また、デュルバルマブがトレメリムマブ併用下でサイトカイン放出を誘導するか否かを検討するため、同一の方法で追加の *in vitro* サイトカイン放出試験を実施した（試験 ONC4736-0017）。その結果、いずれの試験条件下でデュルバルマブ及びトレメリムマブによる単独処置及び併用処置を行った場合も、いずれのドナーから採取した全血からもサイトカインの放出は認められなかった。これらの結果から、デュルバルマブは、臨床において単剤又はトレメリムマブとの併用のいずれにおいても、急激なサイトカイン放出を惹起することはないとの予測が裏付けられた。

血小板数に対するトレメリムマブの作用を、健康ドナー5 例から採取した全血を用いて検討した（試験 10-CP-675,206）。トレメリムマブとともに培養した検体では、抗 KLH 抗体（アイソタイプの対照抗体）とともに培養した検体と比較して血小板数に更なる変化はみられなかった。一方、抗 CTLA-4 mAb の CP-642,570（陽性対照）とともに培養した検体では、抗 KLH 抗体とともに培養した検体と比較して血小板数が速やかに 72%減少した。抗 CTLA-4 mAb（陽性対照）との培養開始から 24 時間後までに、抗 KLH 抗体とともに培養した検体と比較した血小板数の減少率は 40%まで回復した。以上の結果から、トレメリムマブはヒト全血中の血小板数に顕著な影響を及ぼさないことが裏付けられた。

ドナー4 例から採取したヒト末梢血細胞に放射性ヨウ素で標識したトレメリムマブを結合させ、その後、500 倍過剰量の非標識トレメリムマブを競合させることにより、トレメリムマブの Fc 受容体への結合の程度を評価した（試験 16-CP-675,206）。その結果、陽性対照の IgG1 抗体と比較して、トレメリムマブは Fc 受容体を有するヒト白血球への特異的結合能はほとんどないことが示された。

トレメリムマブが IL-2 活性化 NK 細胞による ADCC を惹起するか否かについてフローサイトメトリーを用いて評価した（試験 09-CP-675,206）。抗ヒト CD3 陽性対照抗体では、ナイーブ T 細胞に対して最大 37%、抗 CD3/CD28 活性化 T 細胞に対して最大 48%の細胞傷害が認められた。トレメリムマブ及びアイソタイプ陰性対照抗体は、ナイーブ T 細胞及び細胞表面に CTLA-4 を発現する活性化 T 細胞に対して ADCC を誘発しなかった。

2.4.2.1.2 *In vivo* 試験

トレメリムマブはマウス CTLA-4 と交差反応しないため、その効果を免疫応答性マウス腫瘍モデルで評価することはできなかった。

代替法として、線維肉腫マウスモデルにおいて、ハムスター抗マウス CTLA-4 mAb（9H10）を用いて抗 CTLA-4 mAb の抗腫瘍効果を評価した（試験 12-CP-675,206）。9H10 の投与により 28 日目の平均腫瘍サイズは、アイソタイプ対照抗体と比較して 90%縮小した。更に 60 日間観察したところ、9H10 を投与されたマウス 5 例中 4 例で検出可能な腫瘍は認められなくなり、これらのマウスでは腫瘍の再移植に対して耐性を示した。

また、エフェクター機能を有さず（即ち CTLA-4+細胞の枯渇を媒介しない）、CTLA-4 に対してトレメリムマブと同程度の親和性を有する抗マウス CTLA-4 mAb（clone 9D9 mIgG1）を用いて、マウス同系腫瘍モデルに CTLA-4 阻害薬単独投与及び CTLA-4 阻害薬と PD-L1 阻害薬併用投与したときの抗腫瘍活性を評価した（試験 ONC1123-0001）。抗 CTLA-4 マウス代替 mAb は、CT26 マウス結腸癌、EMT6 マウス乳癌及び MCA205 マウス線維肉腫のマウス同系腫瘍モデルで単独投与による活性を示し、また、CT26 マウス結腸癌モデルで PD-L1 との併用投与により付加的活性を示した。クローン 9D9 の mIgG2a 及び mIgG2b アイソタイプでそうであったように、抗 CTLA-4 mIgG1 mAb 投与により腫瘍内 CTLA-4+Treg 枯渇を示さず、9D9 mIgG1 が適切なマウス代替 mAb であることが確認された。

これらの試験結果から、抗 CTLA-4 抗体はマウスがんモデルで有意な抗腫瘍効果を示すことが確認された。また、抗 PD-L1 mAb との併用による免疫療法も含めて、がん治療における抗 CTLA-4 抗体のプルーフ・オブ・プリンシプルが得られた。

2.4.2.2 副次的薬理試験

トレメリム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

ICH S6(R1)及び ICH S7A（安全性 薬理試験ガイドライン）に従ってトレメリムマブの独立した安全性薬理評価は実施しなかった。GLP 適用下、カニクイザルを用いた単回投与毒性試験（試験 99-1985-01）、並びに 1 カ月間（試験 00-1985-04）及び 6 カ月間（試験 2004 0150）反復投与毒性試験において、トレメリムマブを静脈内投与し、神経系（一般状態観察により評価）、心血管系（心電図［PR、QRS、QT 及び QT(c) 間隔］及び血圧）、並びに呼吸数を含む安全性薬理パラメータを評価した。検討したいずれの用量及びいずれのパラメータについても、トレメリムマブの投与に関連した変化はみられなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

トレメリム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 非臨床薬物動態プログラムの概要

カニクイザルを用いたトレメリムマブの非臨床薬物動態及び TK プログラムは、単回静脈内投与薬物動態試験（試験 DM2003-675206-011 及び試験 DM2003 675206-012）及び単回皮下投与薬物動態試験（試験 DM2003-675206-009）、並びに単回及び反復投与毒性試験（単回投与毒性試験［試験 99-1985-01］、1 カ月間反復投与毒性試験［試験 00-1985-04］、6 カ月間反復投与毒性試験［試験 2004-0150］、胚・胎児発生に関する試験［試験 2501-001］）で構成された。

薬物動態試験の概要文及び薬物動態試験概要表はそれぞれ 2.6.4 項及び 2.6.5 項、分析法及び TK データは 2.6.4 項を参照のこと。

2.4.3.2 吸収

カニクイザルにトレメリムマブを単回静脈内投与した後の CL は 4.4～4.9 mL/day/kg、V_{ss} は 54～71 mL/kg、$t_{1/2}$ は 9.1～11 日であった。カニクイザルにトレメリムマブを 5 mg/kg の用量で単回皮下内投与した後の吸収を検討した。皮下投与したトレメリムマブの C_{max} は投与 3.5 日後に認められ、皮下投与後のバイオアベイラビルティは 54.2%であった。クローン細胞株及び非クローン細胞株由来トレメリムマブの薬物動態に違いは認められなかった。

カニクイザルを用いたトレメリムマブの単回及び反復投与毒性試験において、トレメリムマブの TK を評価した。トレメリムマブ単回及び反復静脈内投与後の C_{max} 及び AUC は、検討した用量範囲でほぼ用量に比例して増加した。いずれの TK 試験においても、曝露量に非線形及び雌雄差は認められなかった。

2.4.3.3 分布

トレメリムマブの組織分布に関する試験は実施されていない。カニクイザルにトレメリムマブを単回静脈内投与した後、血漿中トレメリムマブ濃度推移に初期分布相（投与後 3 日未満）及びその後の長い消失相が認められた。トレメリムマブの V_{ss} は 54～71 mL/kg であり、カニクイザルの血漿量（44.8 mL/kg）と同程度であったことから、トレメリムマブの分布は主に血管内及び細胞外液中に限定されることが示唆された。

2.4.3.4 代謝

トレメリムマブの代謝に関する試験は実施されていない。トレメリムマブの主な代謝経路は、タンパク質の異化作用による小さなペプチド及びアミノ酸への分解と考えられる。

2.4.3.5 排泄

トレメリムマブの排泄に関する試験は実施されていない。トレメリムマブは分子サイズが大きいことから、未変化体のまま腎排泄されることはないと考えられる。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

トレメリムマブの薬物動態学的薬物相互作用に関する試験は実施されていない。トレメリムマブは mAb であり、その標的分子は活性化 T 細胞表面上に存在することから、他の併用薬と薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられる。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 毒性試験プログラムの概要

トレメリムマブの非臨床安全性プロファイルについて、カニクイザルを用いた単回投与毒性試験 2 試験、カニクイザルを用いた 1 カ月間及び 6 カ月間反復投与毒性試験、並びにカニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験により評価した（表 3）。これらのトレメリムマブの試験は、予定している臨床適用経路に準じて静脈内投与により実施した。更に、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を実施した。トレメリムマブの遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。また、その他の生殖発生毒性試験についても実施しておらず、実施する予定もない。単回投与毒性試験 1 試験を除く全ての毒性試験は、GLP を遵守して実施した。毒性試験の一覧を表 3 に示した。毒性試験の概要文及び毒性試験概要表をそれぞれ 2.6.6 項及び 2.6.7 項に示した。

2.4.4.2 動物種の選択根拠

トレメリムマブの非臨床安全性評価で使用する薬理学的に適切な動物種は、カニクイザルであると考えられた。トレメリムマブはヒトと同程度の結合親和性でカニクイザルの CTLA-4 と結合し（試験 14-CP-675,206、2.4.2.1.1 項）、また、トレメリムマブはカニクイザルの活性化 T 細胞に結合する（試験 15-CP -675,206、2.4.2.1.1 項）。トレメリムマブはアカゲザルの CTLA-4 にも結合するが、マウス、ラット、ハムスター及びウサギの CTLA-4 には結合しない（試験 15-CP -675,206、2.4.2.1.1 項）。

トレメリムマブのカニクイザルを用いた反復投与毒性試験で認められた一般状態変化や検査所見は、想定される薬理作用である CTLA-4 阻害によるリンパ球の持続的な活性化と一致するものであった（2.4.4.3 項及び 2.4.4.4 項）。このようにトレメリムマブの毒性試験の結果から、カニクイザルが薬理学的に適切な動物種であることが示されている。

2.4.4.3 単回投与毒性試験

カニクイザルにトレメリムマブを単回静脈内（ボーラス）投与したときの TK、薬力学及び忍容性を評価するために、独立した 2 試験（試験 00-1985-06：GLP 非適用、試験 99-1985-01：GLP 適用）を実施した。検討した用量範囲は 10～100 mg/kg であり、対照群の動物には媒体を投与した。試験 00-1985-06 において、*ex vivo* SEA アッセイにより薬力学活性を評価した結果、予想された通り IL-2 産生の増加が静脈内投与後 0.5 時間より認められた。また、GLP 適用の試験 99-1985-01 においては、トレメリムマブの投与により 30 mg/kg 以上の用量でリンパ球数の可逆的な増加がみられ、すべての用量の雌及び 100 mg/kg の雄で好酸球数の増加が認められた。更に、この試験では、トレメリムマブの投与により下痢又は軟便の発現頻度及び発現回数が用量依存的に増加したが、これらの変化に伴う体重や摂餌量の変化は認められなかった。安全性薬理パラメータ（心電図、血圧、呼吸数、体温）に影響はみられず、試験 106 日に剖検した 100 mg/kg（高用量群）の動物で病理組織学的所見は認められなかった。

2.4.4.4 反復投与毒性試験

トレメリムマブのカニクイザルを用いた反復投与毒性試験（GLP 適用）として、1 カ月間反復投与毒性及び 2 カ月間回復性試験（試験 00-1985-04）並びに 6 カ月間反復投与毒性試験（試験 2004-0150）を実施した。両試験で検討した用量はともに 5、15 及び 50 mg/kg/週であり、媒体を投与する対照群を設けた。両試験におけるトレメリムマブの全身曝露量は用量とともに増加した。これらの試験において、リンパ系、血液系、消化管、皮膚、甲状腺及び肝臓が標的臓器とし

て特定された。皮膚及び甲状腺に対する影響は、6 カ月間反復投与毒性試験でのみ認められた。標的臓器で認められた影響はトレメリムマブの作用機序（CTLA-4 阻害及び付随する免疫活性化）と一貫するものと考えられる。以下に所見の要約を示す。

カニクイザルを用いた 1 カ月間反復投与毒性試験（試験 00-1985-04、GLP 適用）

- トレメリムマブ投与に関連した一般状態変化として、投与期間中にすべての用量で間歇的な下痢又は軟便が用量依存的に認められた。これらの一般状態変化は体重及び摂餌量への影響や病理組織学的変化を伴うものではなかったが、50 mg/kg 群の雄 2 例では支持治療（補液投与）が必要であったことから、本用量での影響は毒性所見と判断された。
- トレメリムマブ投与により、投与期間終了時に末梢血リンパ球（絶対数及び比率）の増加が認められた。これらの所見はトレメリムマブの薬理作用と一致する変化であり、回復期間終了時までに完全に回復した。
- 投与期間終了時に、脾臓及び腸間膜リンパ節に軽微から軽度のリンパ組織過形成が認められたが、これらの所見は有害ではなく、薬理作用に関連した所見と考えられた。また、肝臓では軽微から軽度の単巣性ないし多巣性の混合型単核細胞浸潤が認められた。回復期間終了時に、リンパ組織の変化については完全に回復又は回復傾向がみられ、肝臓の変化については雌で回復がみられたが、雄では回復が認められなかった。

カニクイザルを用いた 6 カ月間反復投与毒性試験（試験 2004-0150、GLP 適用）

- トレメリムマブ投与に関連した一般状態変化として、すべての用量で持続性の下痢、食欲減退、体重減少及び皮膚状態悪化（眼瞼腫脹、皮膚の乾燥、ひび割れ、鱗状化又は硬化、皮疹又は皮膚発赤、痂皮部位及び皮膚黄色化）が認められた。50 mg/kg 群ではこれらの所見の重症度が高く、6 例で支持治療（補液投与）が必要であった。50 mg/kg 群では週 1 回投与を 6 回又は 7 回行った後に投与を中断し、8 例を試験 44～79 日に安楽死させ、残りの動物は新たに設定した 99 日間の回復期間へと移行した。5 及び 15 mg/kg 群における皮膚病変は発現頻度及び重症度がより低く、投与の継続とともに回復した。5 mg/kg 群の雄 1 例では支持治療が必要となる持続性の下痢がみられ、試験 52 日に死亡した。この動物で認められた一連の所見は、50 mg/kg 群の動物でみられた慢性炎症ではなく、急性感染症で一般的にみられるものであることから、当該動物の死亡はトレメリムマブの投与に直接関連するものではないと考えられた。
- トレメリムマブの薬理作用に関連して、血液中の白血球数（主に $CD3^+CD4^+$ T リンパ球、やや少ない $CD3^+CD8^+$ T リンパ球）の可逆性の増加が認められた。
- トレメリムマブ投与に関連した剖検所見として、50 mg/kg 群（高用量群）のみで皮膚病変がみられ、すべての用量で用量依存的なリンパ節腫大の発現頻度の増加が認められた。トレメリムマブ投与に関連した病理組織学的所見は、トレメリムマブの作用機序と一貫する免疫活性化よるものと考えられた。高用量群でみられた一般状態変化と相関する病理組織学的所見として、盲腸及び結腸の炎症、皮膚の単核細胞浸潤性の炎症、並びに末梢リンパ節のリンパ組織過形成が認められた。これらの所見は 5 及び 15 mg/kg 群でも認められたが、発現頻度及び重症度は 50 mg/kg 群よりも低かった。トレメリムマブの薬理作用に関連した有害ではない所見として、単核細胞浸潤及び炎症が多くの臓器で認められた。15 及び 50 mg/kg 群の各 1 例でトレメリムマブの投与により中等度から重度の甲状腺萎縮が認められ、これに相関して甲状腺ホルモンの減少及び TSH の増加が認められた。トレメリムマブ投与に関連した病理組織学的所見に関して、99 日間の回復期間終了時までに概ね回復が認められた。

以上のように、トレメリムマブのカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、リンパ系、血液系、消化管、皮膚、甲状腺及び肝臓が標的臓器として特定された。一般状態変化及び病

理組織学的所見の発現頻度、重症度及び有害性は、用量及び投与期間に依存して上昇した。この特定された標的臓器は、臨床試験で特定された標的臓器及び臨床的安全性の所見と一貫するものと考えられ、臨床試験で観察された消化管への影響、皮膚の発疹、甲状腺機能低下等の内分泌障害は、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において適切に特定された。

2.4.4.5 遺伝毒性試験

トレメリムマブは高分子タンパク質であり、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考えられることから、ICH S6（R1）ガイドラインに従い、トレメリムマブの遺伝毒性試験は実施しておらず、実施する予定もない。

2.4.4.6 がん原性試験

ICH S6（R1）及び ICH S9 ガイドラインに従い、トレメリムマブの特性及び進行がん患者で予定している間歇的な臨床用法を考慮し、トレメリムマブのがん原性試験は実施しておらず、実施する予定もない。

2.4.4.7 生殖発生毒性試験

ICH S9 ガイドラインに従い、受胎能及び出生後の発生に関する評価は実施しなかった。

カニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験（試験 2501-001、GLP 適用）

ICH S9 ガイドラインに従い、トレメリムマブの胚・胎児発生に対する影響についてカニクイザルを用いて評価した（試験 2501-001）。本試験では、妊娠カニクイザルの器官形成期（妊娠が確認された妊娠 20 日から妊娠 50 日）にトレメリムマブを 0（媒体）、5、15 及び 30 mg/kg の用量で週 1 回静脈内投与した。妊娠 48 日の最終投与の後も動物を飼育し、妊娠 100 ± 1 日に帝王切開を実施して胎児検査を行った。試験期間中に予期せぬ死亡例は認められず、トレメリムマブの投与に関連した一般状態変化として、対照群に比べて下痢の発現頻度の軽微な上昇のみが認められた。また、妊娠母動物において体重、膣垢検査、胎盤の重量及び外観、並びに流産率／出生前死亡率にトレメリムマブに関連した影響は認められなかった。帝王切開後の胎児検査では、胎児体重、外表、内臓及び骨格検査、並びに器官重量において、トレメリムマブに関連した影響は認められなかった。以上のように、本試験においてトレメリムマブの投与による母動物毒性、発生毒性及び催奇形性は認められなかった。

2.4.4.8 幼若動物を用いた試験

トレメリムマブの幼若動物を用いた試験は実施しなかった。ICH S9 ガイドラインに従うと、通常、抗悪性腫瘍薬の開発に小児を対象として組み入れるために幼若動物を用いた試験は実施されず、ヒトにおける安全性データ及び非臨床試験成績が対象年齢層の小児での安全性を評価する上で不十分であると考えられる場合にのみ幼若動物を用いた毒性試験の実施を考慮すべきである。

2.4.4.9 局所刺激性試験

トレメリムマブの静脈内投与による局所刺激性について、単回投与毒性試験（2.4.4.3 項）及び反復投与毒性試験（2.4.4.4 項）の一環として評価した。これらの試験における注射部位の観察及び病理組織学的評価では、トレメリムマブ投与に関連した注射部位の変化は認められなかった。なお、トレメリムマブ又は媒体を投与した動物の一部でみられた注射部位の局所変化は投与手技によるものであり、トレメリムマブ又は媒体に関連したものではないと考えられた。

2.4.4.10 その他の毒性試験

2.4.4.10.1 組織交差反応性試験

GLP 適用の組織交差反応性試験（2 試験）を実施し、トレメリムマブの正常ヒト組織（試験 IM676）及び正常カニクイザル組織（試験 IM645）に対する交差反応性を評価した。

ヒト及びカニクイザルの組織において、トレメリムマブに特異的な染色が、扁桃、リンパ節、脾臓及び（非退縮）胸腺を含む種々のリンパ系組織に認められた。また、ヒト及びカニクイザルのいずれにおいても、消化管（大腸、小腸及び／又は胃）の粘膜下リンパ小節を含む粘膜関連リンパ系組織のリンパ球で特異的な染色が稀に又は散発的に認められた。ドナー1 例から採取したヒト組織では、非リンパ系組織（甲状腺）の小型間質リンパ小節においても稀にリンパ球が染色された。トレメリムマブによって染色された細胞は、その典型的な形態及びそれぞれの組織内での位置（例えば T:B リンパ球相互作用に関連する部位、特にリンパ濾胞の明帯）からリンパ球と判断された。以上より、ヒト及びカニクイザルの組織でみられた組織交差反応性は高度に類似性があり、ヒトにおける CTLA-4 の免疫組織化学的分布（Xerri et al 1997, Alegre et al 1998, Vandenborre et al 1998）と一致するものと考えられた。

2.4.4.10.2 免疫毒性試験

免疫毒性については、反復投与毒性試験において評価した（試験 00-1985-04、試験 2004-0150 を参照）。

2.4.4.10.3 併用投与毒性試験

ICH S9 ガイドラインに従い、トレメリムマブとデュルバルマブの併用投与毒性試験は実施しなかった。

2.4.5 総括及び結論

一連の *in vitro* アッセイ（ELISA、SPR 及びフローサイトメトリー）において、トレメリムマブが hCTLA-4 及び cynoCTLA-4 に特異的に高い親和性で結合するが、マウス、ラット、ハムスター及びウサギ CTLA-4 には結合しないことが示された。また、トレメリムマブは hCTLA-4 と hCD80 及び hCD86 との相互作用を強力に阻害することが確認された。これらの相互作用の阻害により、生物学的変化として T 細胞活性化の増強が起こることが予想されるが、これは、セルベースアッセイにおいて、スーパー抗原で活性化したヒト又はカニクイザル由来 PBMC 及び全血で IL-2 放出が増加したことから確認された。また、癌患者から採取した PBMC 及び全血を用いて実施した試験においても同様の機能活性が認められた。一方、トレメリムマブは Tregs の活性には影響を及ぼさず、プレートに固定化した状態では T 細胞活性化の抑制を指標とするアゴニスト作用を示さなかった。また、トレメリムマブは免疫細胞表面の Fc 受容体に結合せず、ナイーブ及び活性化 T 細胞に対する ADCC を誘発しなかった。さらに、トレメリムマブは、単独処置又はデュルバルマブとの併用処置を行った場合でも、ヒト全血の血小板数に影響を及ぼさず、ヒト全血でサイトカイン放出を誘導しなかった。これらの結果から、デュルバルマブは、臨床において単剤又はトレメリムマブとの併用のいずれにおいても、急激なサイトカイン放出を惹起することはないとの予測が裏付けられた。

In vivo では、3 種のマウス同系腫瘍モデルにおいて、トレメリムマブの代替抗体である抗マウス CTLA-4 mAb の投与により有意な抗腫瘍活性が認められた。また、抗 PD-L1 mAb と抗 CTLA-4 mAb との併用投与によって、抗 PD-L1 mAb 又は抗 CTLA-4 mAb のいずれかを単独投与した場合に比較して抗腫瘍活性は増強した。

カニクイザルにトレメリムマブを単回静脈内投与した後のトレメリムマブの CL は 4.4～4.9 mL/day/kg、V_{ss} は 54～71 mL/kg、$t_{1/2}$ は 9.1～11 日であった。カニクイザルにトレメリムマブを単回皮下投与した後の C_{max} は投与 3.5 日後に認められ、皮下投与後のバイオアベイラビリティは 54.2%であった。クローン細胞株及び非クローン細胞株由来トレメリムマブの薬物動態に違いは認められなかった。

トレメリムマブの TK は、カニクイザルを用いた単回及び反復投与毒性試験において評価した。単回及び反復静脈内投与後のトレメリムマブの C_{max} 及び AUC は、検討した用量範囲でほぼ用量に比例して増加した。いずれの試験においても、曝露量に非線形及び雌雄差は認められなかった。血漿中トレメリムマブ濃度の蓄積は予測より低かったが、これは一部の動物に ADA が発現し、トレメリムマブの CL が増加及び曝露量が低下したためと考えられた。6 カ月間反復投与毒性試験における平均血漿中曝露量（$AUC_{0\text{-}168hr}$）とヒトで予定している治療用量（300 mg、体重 30 kg 以下の場合は 4 mg/kg）における AUC との比較を表 4 に示す。

表 4　トレメリムマブのカニクイザル及びヒトにおける反復静脈内投与時の曝露量（平均 AUC [μg·hr/mL]）

Dose (mg/kg/week)	AUC (μg·hr/mL) [SD]	
	Monkey [a] 6-Month Repeat-Dose	Human [c, d]
4[b]		19104 [4872]
5	13200 [2500]	
15 HNSTD	33900 [3000]	
50	121000 [18000]	

AUC = area under the concentration-time; HNSTD = highest non-severely toxic dose; SD = standard deviation

[a] AUC from 0 to 168 hours

[b] Human dose of 300 mg is equivalent to 4 mg/kg assuming a 75 kg subject.

[c] The tremelimumab population PK analysis was based on a pooled dataset including 8 clinical trials: D4190C00002 (Phase 1), D4190C00006 (Phase 1b), D4190C00010 (Phase 1), D4880C00003 (DETERMINE, Phase 2b), D4884C00001 (BASKET, Phase 2), D419MC00004 (POSEIDON, Phase 3), D419CC00002 (HIMALAYA, Phase 3) and D4190C00022 (Study 22, Phase 1/2). The studied dose range was 1-10 mg/kg, or 75 to 750 mg Q4W or every 12 weeks (Q12W) or a 300 mg single priming dose from study D419CC00002.

[d] Derived AUC from the dosing interval (Cycle 1, 0-28 days); converted from μg·day/mL.

非臨床安全性に関して、ヒト及びカニクイザルの組織を用いた組織交差反応性試験において、トレメリムマブは CTLA-4 発現細胞を含むと考えられる組織中の細胞のみに結合し、標的外への結合は認められなかった。トレメリムマブのカニクイザルを用いた毒性試験において、リンパ系、血液系、消化管、皮膚、甲状腺及び肝臓が標的臓器として特定された。これらの毒性試験において、いずれの用量においても心電図検査パラメータ、血圧、呼吸数、尿検査、局所刺激性評価及び眼科学的検査における有害な影響は認められなかった。一般状態変化及び病理組織学的所見の発現頻度、重症度及び有害性は、用量及び投与期間に依存して上昇した。

トレメリムマブ投与による消化管への影響に関して、明らかな一般状態変化が単回投与毒性試験においても認められ、下痢又は軟便の発現頻度及び発現回数が用量依存的に増加した。これらの変化に伴う体重及び摂餌量への影響は認められず、また試験 106 日の剖検後に病理組織学的所見が認められなかったことから、これらの所見は毒性所見とは判断されなかった。1 カ月間反復投与毒性試験（GLP 適用）では、間歇的な下痢又は軟便が認められ、50 mg/kg 群の雄 2 例では支持治療（補液投与）が必要となった。6 カ月間反復投与毒性試験（GLP 適用）では、50 mg/kg 群（高用量群）で食欲減退及び体重減少を伴う持続性の下痢が認められ、毒性所見と判断された。

50 mg/kg 群では週 1 回投与を 6 回又は 7 回行った後に投与を中断したが、一般状態は改善せず、動物愛護の観点から早期安楽死させた。5 及び 15 mg/kg 群（低用量群及び中用量群）では、一般状態変化は発現頻度及び重症度がより低く、週 1 回 6 カ月間投与に対する忍容性が認められた。下痢及び軟便に関連した病理組織学的所見として盲腸及び結腸の炎症が認められ、これらの所見はトレメリムマブの作用機序と一貫する免疫活性化に関連するものと考えられた。5 mg/kg 群の雄 1 例では支持治療が必要となる持続性の下痢が認められ、試験 52 日に死亡が発見された。この動物で認められた所見（腸潰瘍）は、他の動物でみられた慢性炎症よりも急性感染症に典型的な所見であり、このことから当該動物の死亡はトレメリムマブの投与に直接関連するものではないと考えられた。

トレメリムマブ投与による血液学的所見、リンパ組織及び肝臓での所見として、用量依存的な末梢リンパ球の増加、リンパ節腫脹、リンパ組織過形成、多くのリンパ組織／非リンパ組織における単核細胞浸潤及び炎症、並びに肝臓門脈周囲の混合型単核細胞浸潤が認められた。これらの所見は、トレメリムマブの薬理作用による免疫活性化に関連した変化であると考えられた。また、これらの所見は用量及び投与期間に依存したが、休薬による完全な回復又は部分的な回復が認められたことから、毒性所見と判断されなかった。1 カ月間反復投与毒性試験において、肝臓門脈周囲の混合型単核細胞浸潤は雌でのみ回復性が確認されたが、血中ビリルビン値又は肝酵素値には肝臓障害や肝機能障害の兆候は認められなかった。6 カ月間反復投与毒性試験では、上記の変化のほとんどで回復性がみられ、回復期間終了時には唾液腺及び皮膚の軽微な炎症が認められたのみであった。

トレメリムマブ投与による皮膚及び甲状腺に対する影響は、6 カ月間反復投与毒性試験でのみ認められた。50 mg/kg 群でみられた皮膚病変は毒性所見と判断され、本用量では眼瞼腫脹、皮膚の乾燥、ひび割れ、鱗状化又は硬化、皮疹又は皮膚発赤、痂皮部位及び皮膚黄色化が認められた。5 及び 15 mg/kg 群では、皮膚病変として全身性の瘤及び痂皮のみが試験後半に認められたが、投与の継続とともに回復した。皮膚病変に関連した病理組織学的所見として、皮膚における単核細胞浸潤性の炎症が認められた。これらの変化はトレメリムマブ投与による免疫活性化に関連するものと考えられ、50 mg/kg 群では 6 又は 7 回投与後に回復性が認められ、5 及び 50 mg/kg 群では上記のように投与の継続とともに消失した。15 mg/kg 群の雌 1 例及び 50 mg/kg 群の雄 1 例で中等度から重度の甲状腺萎縮が認められ、これに相関してトリヨードサイロニン及びサイロキシン値の減少及び TSH の増加が認められた。

トレメリムマブの生殖発生毒性について、カニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験により評価した。本試験においてトレメリムマブ投与による影響は認められず、母動物毒性、発生毒性及び催奇形性は認められなかった。

以上のように、カニクイザルを用いた毒性試験でトレメリムマブを静脈内投与したときに認められた毒性所見は薬理作用と一貫するものであり、トレメリムマブの CTLA-4 への結合により CD80/CD86 相互作用が阻害されることで生じるリンパ球の持続的な活性化によるものと考えられる。更に、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験で認められた所見から、消化管への影響、皮膚の発疹、甲状腺機能低下等の内分泌障害を含む臨床的安全性の所見が予測された。毒性試験で認められた毒性所見の大部分は用量依存的であり、休薬により部分的又は完全に回復した。レメリムマブの非臨床安全性試験成績から、予測／管理可能及び可逆的な副作用からなる安全性プロファイルが示されている。

これらの非臨床プログラムは、予定している切除不能な肝細胞癌の適応に対するトレメリムマブのデュルバルマブとの併用投与を支持するものである。

2.4.6 参考文献

Alegre et al 1998

Alegre M-L, Shiels H, Thompson CB, Gajewski TF. Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. The Journal of Immunology. 1998;161(7):3347-56.

Fiegle et al 2019

Fiegle E, Doleschel D, Koletnik S, Rix A, Weiskirchen R, Borkham-Kamphorst E, et al. Dual CTLA-4 and PD-L1 Blockade Inhibits Tumor Growth and Liver Metastasis in a Highly Aggressive Orthotopic Mouse Model of Colon Cancer. Neoplasia. 2019 Sep;21(9):932-944.

Tarhini and Kirkwood 2008

Tarhini AA, Kirkwood JM. Tremelimumab (CP-675,206): a fully human anticytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody for treatment of patients with advanced cancers. Expert opinion on biological therapy. 2008;8(10):1583-93.

Vandenborre et al 1998

Vandenborre K, Delabie J, Boogaerts MA, De Vos R, Lorre K, De Wolf-Peeters C, et al. Human CTLA-4 is expressed in situ on T lymphocytes in germinal centers, in cutaneous graft-versus-host disease, and in Hodgkin's disease. The American journal of pathology. 1998;152(4):963-73.

Walker and Sansom 2015

Walker LS, Sansom DM. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. Trends in immunology. 2015;36(2):63-70.

Wing et al 1995

Wing M, Waldmann H, Isaacs J, Compston D, Hale G. Ex-vivo whole blood cultures for predicting cytokine-release syndrome: dependence on target antigen and antibody isotype. Therapeutic immunology. 1995;2(4):183-90.

Wu et al 2012

Wu L, Yun Z, Tagawa T, Rey-McIntyre K, De Perrot M. CTLA-4 blockade expands infiltrating T cells and inhibits cancer cell repopulation during the intervals of chemotherapy in murine mesothelioma. Mol Cancer Ther. 2012:1809-19.

Xerri et al 1997

Xerri L, Devilard E, Hassoun J, Olive D, Birg F. In vivo expression of the CTLA4 inhibitory receptor in malignant and reactive cells from human lymphomas. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. 1997;183(2):182-7.