サノフィ株式会社

セミプリマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.6 毒性試験の概要文

Total number of pages: 40

目　　次

2.6.6 毒性試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 4

図　目　次 5

略号と用語の定義 6

1　　まとめ 8

2　　単回投与毒性試験 11

3　　反復投与毒性試験 12

3.1　　カニクイザルを用いた 4 週間反復 IV 投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 12

3.2　　カニクイザルを用いた 26 週間反復 IV 投与毒性試験及び 12 週間回復性試験 18

4　　遺伝毒性試験 24

5　　がん原性試験 25

6　　生殖発生毒性試験 26

6.1　　性成熟カニクイザルを用いた 13 週間 IV 投与受胎能評価試験及び 12 週間回復性試験 28

7　　局所刺激性試験 32

8　　その他の毒性試験 33

8.1　　正常なヒト及びカニクイザルの組織を用いたビオチン標識セミプリマブの組織交差反応性試験 33

8.2　　その他 34

8.2.1 免疫毒性 34

8.2.2 薬物乱用性評価 35

9 考察及び結論 36

9.1 全体のまとめ 37

参 考 文 献 39

表 目 次

表 1 - セミプリマブの毒性試験の概要 8

表 2 - カニクイザルを用いた GLP 適用の反復 IV 投与毒性試験の NOAEL におけるセミプリマブの曝露量の要約 9

表 3 - カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験における TK データ及び ADA 反応の要約（REGN2810-TX-14059 試験） 13

表 4 - カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の 8 週間回復期間におけるセミプリマブの平均濃度（REGN2810-TX-14059 試験） 14

表 5 - カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の特記すべき所見 18

表 6 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における TK データ及び ADA 反応の要約（REGN2810-TX-14153 試験） 20

表 7 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における 12 週間の回復期間中の平均セミプリマブ濃度（REGN2810-TX-14153 試験） 21

表 8 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における特記すべき所見（REGN2810-TX-14153 試験） 22

表 9 - カニクイザルを用いた 13 週間受胎能評価試験からの特記すべき所見 28

表 10 - カニクイザルを用いた 13 週間受胎能評価試験における TK データ及び ADA 反応の要約（REGN2810-TX-15151 試験） 30

表 11 - カニクイザルを用いた 13 週間受胎能評価試験における 12 週間回復期間中の平均セミプリマブ濃度（REGN2810-TX-15151 試験） 31

表 12 - 正常なヒト及びカニクイザルの組織パネルを用いた組織交差反応性試験からの特記すべき所見 .. 34

図　目　次

図 1 - T リンパ球の増殖：試験前のベースライン平均値を上回る比率の変化 15

図 2 - T リンパ球の増殖：試験前のベースライン平均値を上回る T リンパ球比率の正味の増加..... 15

図 3 - カニクイザルにおける抗-KLH IgG 反応..... 16

略号と用語の定義

略号	定義
ADA	抗セミプリマブ抗体（Anti-drug antibody）
AUC	（血清中）濃度－時間曲線下面積（Area under the concentration-time curve）
AUC_{tau}	算出した投与間隔内の（血清中）濃度－時間曲線下面積（Area under the concentration-time curve calculated during the dosing interval）
AUC_{cum}	ゼロ時間から回復期間終了時までの（血清中）濃度－時間曲線下面積（Area under the concentration-time curve from time zero to end of the recovery period）
C_{max}	最高（血清中）濃度（Maximum concentration）
CNS	中枢神経系（Central nervous system）
C_{trough}	投与間隔内の最低（血清中）濃度（Lowest concentration in a dosing interval）
ECG	心電図（Electrocardiogram）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
ICH	医薬品規制調和国際会議（International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use）
IFA	フロイント不完全アジュバント（Incomplete Freund’s Adjuvant）
IgG	免疫グロブリン G（Immunoglobulin G）
IgM	免疫グロブリン M（Immunoglobulin M）
IHC	免疫組織化学（Immunohistochemical）
IV	静脈内（Intravenous）
JET	体外ジャケット式テレメトリー（Jacketed External Telemetry）
K_D	平衡解離定数（Equilibrium dissociation constant）
KLH	キーホールリンペットヘモシアニン（Keyhole limpet hemocyanin）
mAb	モノクローナル抗体（Monoclonal antibody）
NOAEL	無毒性量（No-observed-adverse-effect level）
NMDA	N-メチル-D-アスパラギン酸（N-methyl-D-aspartate）
PD-1	Programmed Cell Death-1
PD-L1	Programmed Cell Death-Ligand 1
REGN2810-Bio	ビオチン標識セミプリマブ（Biotinylated REGN2810）
SC	皮下（Subcutaneous）
TDAR	T 細胞依存性抗体反応（T cell-dependent antibody response）

略号	定義
TK	トキシコキネティクス（Toxicokinetic(s)）
T-reg	制御性 T 細胞（T regulatory cell）

1　まとめ

セミプリマブ（遺伝子組換え）（以下、セミプリマブ、開発コード REGN2810）の毒性試験プログラムの概要及び試験への医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用の有無を、Module 2.6.7 毒性試験概要表の「毒性試験一覧表（Module [2.6.7.1]）」に示す。

セミプリマブは、ヒト及びサルの受容体 PD-1（Programmed cell death-1）に高い親和性で結合し（しかしげっ歯類の PD-1 には結合しない）、その内因性リガンド PD-L1 との相互作用を阻害するヒトヒンジ安定化抗 PD-1 抗体である。PD-1/PD-L1 T 細胞抑制性シグナル伝達経路が阻害されると、エフェクターT 細胞のヘルパー機能及び細胞傷害性機能が回復することで、より活発な抗腫瘍免疫応答が得られる(1)(2)。PD-1 に対するセミプリマブの *in vitro* 結合の定量、PD-1/PD-L1 相互作用に対するセミプリマブの阻害活性の評価及び T 細胞シグナル伝達に対するセミプリマブの影響の検討を含めて、セミプリマブの薬理作用を、細胞を用いた *in vitro* アッセイで評価した（Module 2.6.2 薬理試験の概要文）。ヒト及びカニクイザルの PD-1 タンパク質に対するセミプリマブの結合親和性が同程度である（K_D 値はそれぞれ 5.61 及び 7.61 nmol/L）ことから、カニクイザルは毒性試験に最も適切な動物種と考えられた。

セミプリマブの安全性を評価するために実施した毒性試験の一覧を表 1 に示す。全ての試験は GLP 規制に従って実施した。

表 1 - セミプリマブの毒性試験の概要

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	セミプリマブの用量
反復投与毒性試験			
4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験	静脈内（IV）投与 [a]	カニクイザル	0、2、10 及び 50 mg/kg[b]
26 週間反復投与毒性試験及び 12 週間回復性試験	IV 投与 [a]	カニクイザル	0、2、10 及び 50 mg/kg[b]
生殖発生毒性試験			
13 週間受胎能評価試験及び 12 週間回復性試験	IV 投与 [a]	カニクイザル	0、10 及び 50 mg/kg[b]
その他の試験			
組織交差反応性試験	*Ex vivo*	ヒト及びカニクイザルの組織	2 及び 15 µg/mL（*ex vivo*）

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

a　約 30 分間の注入

b　週 1 回投与

最長 26 週間の投与期間を通して、用量依存的かつ持続的な曝露が、セミプリマブ 2 mg/kg/週群の 45%及びセミプリマブ 50 mg/kg/週群の 79%の動物で認められた。検出可能なセミプリマブの濃度が、8～12 週間の回復期間を通して、10 mg/kg/週以上の群で 63%の動物に認められた。週 1 回 IV 投与後のセミプリマブのトキシコキネティクス（TK）の特徴は、10 mg/kg 以上の用量では用量に比例した曝露量及び線形の動態であったが、2 mg/kg では投与後に明らかな標的を介した消失が認められた（Module 2.6.4 薬物動態試験の概要文）。TK パラメータの性差は認められなかった。全ての反復投与毒性試験におけるセミプリマブ曝露量を表 2 に要約する。

表 2 - カニクイザルを用いた GLP 適用の反復 IV 投与毒性試験の NOAEL におけるセミプリマブの曝露量の要約

パラメータ（単位）	4週間反復投与毒性試験 REGN2810-TX-14059	26週間反復投与毒性試験 REGN2810-TX-14153	13週間受胎能試験 REGN2810-TX-15151
NOAEL（mg/kg/週）	50	50	50
C_{max}[a]（µg/mL）	2010	2820	3180
C_{trough}[b]（µg/mL）	790[c]	1410[b]	1850[c]
AUC_{tau}[d]（µg•day/mL）	8030	12200	15600

NOAEL = 無毒性量；C_{max} = 最高（血清中）濃度；C_{trough} = 投与間隔内の最低（血清中）濃度；AUC_{tau} = 算出した投与間隔内での（血清中）濃度－時間曲線下面積

注：各試験において、外れ値又は抗セミプリマブ抗体（ADA）の影響を受けたと考えられる濃度は、データ解析から除外した。

a C_{max}及びC_{trough}値は、最終投与後の血清中薬物濃度に基づくものである。

b C_{trough}値は最終投与168時間後に測定した。

c C_{trough}値は最終投与167時間後に測定した。

d AUC_{tau} 値は最後の週 1 回投与間隔内の AUC に基づくものである。

サルを用いたいずれの毒性試験においても、セミプリマブの 50 mg/kg/週までの用量で毒性変化は認められなかった。26 週間反復投与毒性試験では抗セミプリマブ抗体（ADA）形成に一致する一般状態の変化により、10 及び 50 mg/kg/週群の各 1 例に途中死亡が発現し、その死因はいずれも肺出血及び肺水腫と考えられた。4 週間反復投与毒性試験における病理組織学的所見として、副腎、脾臓及び腋窩リンパ節の血管変化、脾臓及び肝臓のヘモジデリン沈着、脾臓及び下顎リンパ節のリンパ濾胞胚中心増加並びに副腎皮質束状帯細胞の空胞化／肥大が観察された。これらの所見の多くは、ADA 産生及びそれに続く ADA／薬物免疫複合体形成によるもので、間接的にセミプリマブに起因すると考えられた。観察された ADA は異種ヒトタンパク質のサルへの投与を反映したものであり、必ずしもヒトにおけるセミプリマブへの反応を予測するものではない。

体重、摂餌量、眼科学的及び心血管系評価項目、血圧、心拍数、体温、呼吸数及びヘモグロビン酸素飽和度、神経学的検査並びに臨床検査パラメータには、セミプリマブ関連の変化は認められなかった（26 週間反復投与毒性試験における 2 例の途中死亡例でみられたものは除く）。セミプリマブ

投与により、目的とする薬理作用に一致する非用量依存的かつ可逆的なT細胞増殖が誘導された。また、4週間反復投与毒性試験ではキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に対する二次免疫応答が軽度に亢進し、カニクイザルへのセミプリマブ投与による抗KLH抗体反応の低下は起こらないことが示された。剖検時にセミプリマブ関連の肉眼所見は認められなかった。いずれの毒性試験でのIV投与後又は単回投与薬物動態試験での皮下（SC）投与後においても、セミプリマブ投与関連の注射部位反応は認められなかった。

50 mg/kg/週までの用量での13週間投与を受けた性成熟サルにおいて、受胎能評価パラメータ（月経周期、精液分析又は精巣測定）及び雌雄の生殖組織にセミプリマブ関連の変化は認められなかった。文献に基づくとPD-1及びPD-L1経路の阻害により妊娠の早期終了が生じるが催奇形性変化は認められないことが知られているため、サルを用いた胚・胎児発生に関する試験は実施しなかった。

最長26週間の反復投与毒性試験におけるセミプリマブの無毒性量（NOAEL）は、最高投与量の50 mg/kg/週と判断された。

*Ex vivo*組織交差反応性試験では、評価した正常なヒト及びサルの組織のいずれにおいても、予期しないセミプリマブ特異的な染色は認められなかった。いずれの動物種においても、組織パネルを通して単核白血球の膜又は細胞質にビオチン標識セミプリマブの染色が認められた。これはリンパ球及び他の骨髄系細胞におけるPD-1の既知の発現に基づいて予想されるものであった。

最長26週間のサルを用いたGLP適用毒性試験において、心血管系に対するセミプリマブの影響の有無を検討した。50 mg/kg/週（検討した最高用量）までの用量で、セミプリマブに関連した調律及び波形の異常は認められなかった。同様に、セミプリマブに関連したRR、PR、QRS、QT及び心拍数で補正したQT間隔の変化並びにセミプリマブ関連の血圧の変化は、検討したいずれの時点においても認められなかった。

動物を用いた毒性試験及び薬理試験において、セミプリマブの依存性及び乱用性を示唆するエビデンスは認められなかった。カニクイザルを用いた最長26週間の反復投与毒性試験において、50 mg/kg/週までの用量で、セミプリマブ関連の行動に関する異常な一般状態の変化並びに中枢神経系（CNS）の機能的変化及び病理学的変化は認められなかった。モノクローナル抗体としての本薬のモダリティ及び進行悪性腫瘍を適応症とする本薬の使用に一致して、セミプリマブについての遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。

2　単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は実施しなかった。

3　反復投与毒性試験

カニクイザルを用いた最長 26 週間の IV 投与による反復投与毒性試験を、セミプリマブの 50 mg/kg/週までの用量で実施した。特定の試験では、TK プロファイル、ADA 反応及び免疫毒性パラメータを検討した。安全性薬理評価（心血管系、CNS 及び呼吸系）を、反復投与毒性試験に組み込んで実施した。

3.1　カニクイザルを用いた 4 週間反復 IV 投与毒性試験及び 8 週間回復性試験

[REGN2810-TX-14059] 試験（Module 4.2.3.2-1）

セミプリマブを 0、2、10 又は 50 mg/kg/週の用量で、30 分間の IV 投与により、カニクイザルに週 1 回、4 週間（合計 4 回）投与した（Module [2.6.7.7A]）。1 群の動物数は雌雄各 5 例とし、投与期間終了時に 1 群雌雄各 3 例を安楽殺するとともに、1 群雌雄各 2 例を投与終了 8 週間後まで飼育して、セミプリマブ関連の変化がみられた場合の回復を評価した。

評価パラメータは、生死確認、瀕死状態の有無、一般状態観察、体重、摂餌量、バイタルサイン、体外ジャケット式テレメトリー（JET）による心電図（ECG）、心拍数、血圧、呼吸数、ヘモグロビン飽和度（パルスオキシメトリーによる）、神経学的検査、臨床検査パラメータ（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）、眼科学的検査、免疫フェノタイピング、T 細胞依存性抗体反応（TDAR）、末梢血単核細胞刺激反応及び補体濃度とした。TK 測定用及び ADA 分析用の血液検体を、投与期間中及び回復期間中に採取した。肉眼的剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査も実施した。

投与期間を通した持続的なセミプリマブへの曝露が、セミプリマブ投与動物の 80%（30 例中 24 例）で維持された。ADA の発現頻度は高く、2、10 及び 50 mg/kg 群における ADA 反応陽性率は、それぞれ 100%、70%及び 60%であった。濃度経時的推移の外観検査及び ADA アッセイの陽性性の評価によると、曝露量への ADA の影響が、2、10 及び 50 mg/kg 群でそれぞれ 90%、40%及び 30%の動物に認められた。

セミプリマブの血清中濃度、TK パラメータ及び ADA 反応に性差は認められなかった。ADA の影響がみられた濃度は TK 解析から除外した。セミプリマブ初回 IV 投与後の平均 C_{max} 及び AUC_{tau} 値は、ほぼ用量に比例して増加した。4 回の週 1 回投与後の平均 C_{trough} 値は 1.1～1.7 倍に増加し、対応する AUC_{tau} 値は約 1.2～1.8 倍に増加したことから、投与期間中における軽度のセミプリマブ蓄積が示唆された。濃度時間曲線により、投与期間中の週 1 回投与による線形の動態が全ての用量を通して示唆され、回復期間中に 2 mg/kg の用量で機能的セミプリマブ濃度のより速やかな低下がみられたことから、標的を介した消失又は ADA の影響が示された。TK データ（ADA の影響がみられたデータを除く）、ADA 反応及び平均濃度を、それぞれ表 3 及び 表 4 に要約する。

表 3 - カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験における TK データ及び ADA 反応の要約
（REGN2810-TX-14059 試験）

パラメータ	単位	投与週	セミプリマブの用量（mg/kg/週）IV投与		
			2	10	50
C_{max}	μg/mL	1	53.3	256	1790
		4	98.0	378	2010
C_{max}/Dose	(μg/mL)/(mg/kg)	1	26.7	25.6	35.9
		4	49.0	37.8	40.2
C_{trough}[a]	μg/mL	1	19.5	97.2	716
		4	33.5	136	790
AUC_{tau}[b]	μg•day/mL	1	192	949	6810
		4	355	1480	8030
AUC_{tau}/Dose	(μg•day/mL)/(mg/kg)	1	96.0	94.9	136
		4	178	148	161
ADA	NA	全体[c]	10/10	7/10	6/10

C_{max} = 最高（血清中）濃度；C_{trough} = 投与間隔内の最低（血清中）濃度；AUC_{tau} = 算出した投与間隔内の（血清中）濃度－時間曲線下面積；ADA = 抗セミプリマブ抗体；NA = 該当せず

注：TKパラメータ及びADA反応に性差がみられなかったことから、結果を雌雄併合の平均値として示した。外れ値又はADAの影響を受けたと考えられる濃度は、データ解析から除外した。

a C_{trough} 濃度は投与 168 時間後に測定した。

b AUC_{tau} は週 1 回投与間隔内の AUC を示す。

c 比率は、ADA 陽性動物数／試験期間全体で評価された総動物数に基づく。

表 4 - カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の 8 週間回復期間におけるセミプリマブの平均濃度（REGN2810-TX-14059 試験）

試験の時点	セミプリマブの用量（mg/kg/週）IV投与		
	2	10	50
	セミプリマブの平均濃度（µg/mL）		
投与期間終了時[a]	33.5	136	790
回復期間（43日目）	6.83	83.6	641
回復期間（57日目）	0.426	65.5	294
回復期間（71日目）	NC[b]	38.8	258
回復期間終了時（85日目）	NC[b]	20.1	179
動物数[c]	NA[b]	2/2	3/3

NC = 算出せず；NA = 該当せず

注：濃度に性差がみられなかったことから、結果を雌雄併合の平均値として示した。全ての投与群において、外れ値又はADAの影響を受けたと考えられる濃度は、平均濃度の算出から除外した。

a 投与期間終了時は 29 日目（主試験の剖検）に相当し、22 日目の最終投与の 168 時間後である。

b 全ての動物が ADA の影響を受けたと考えられたため、平均濃度の算出から除外した。

c 回復期間終了時にセミプリマブの検出可能な濃度がみられた動物の数／回復性試験群の総動物数

カニクイザルにセミプリマブを 50 mg/kg までの用量で週 1 回、4 週間 IV 投与したときの忍容性は良好であった。試験中、途中死亡はみられず、セミプリマブ関連の一般状態の変化は認められなかった。病的状態及び死亡、体重、摂餌量、眼科学的検査、心血管系（ECG、血圧、心拍数）、呼吸系（呼吸数及びパルスオキシメトリー）、神経学的検査パラメータ及び体温を含む安全性薬理評価項目並びに臨床検査パラメータ（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）には、セミプリマブ関連の変化は認められなかった。

セミプリマブ関連の変化は、増殖中の T リンパ球、ヘルパーT リンパ球及び細胞傷害性 T リンパ球（Ki67 標識により判定）の頻度及び絶対数の非用量依存的な増加のみであり、これらの変化は 9 日目に発現し、23 日目にもより軽度に認められたが、概して 50 日目までに投与前のレベルに戻った。セミプリマブ群における投与前ベースライン値と比較した T 細胞増殖の増加は、対照群と比較して 1.4～2.0 倍であった（図 1）。T 細胞増殖の増加倍率に一致して、$CD3^+$ T 細胞比率の試験前ベースラインを上回る正味の増加が、全ての用量で認められた（図 2）。これらの結果は目的とするセミプリマブの薬理作用に一致しており、毒性変化ではないと考えられる。

図 1 - T リンパ球の増殖：試験前のベースライン平均値を上回る比率の変化

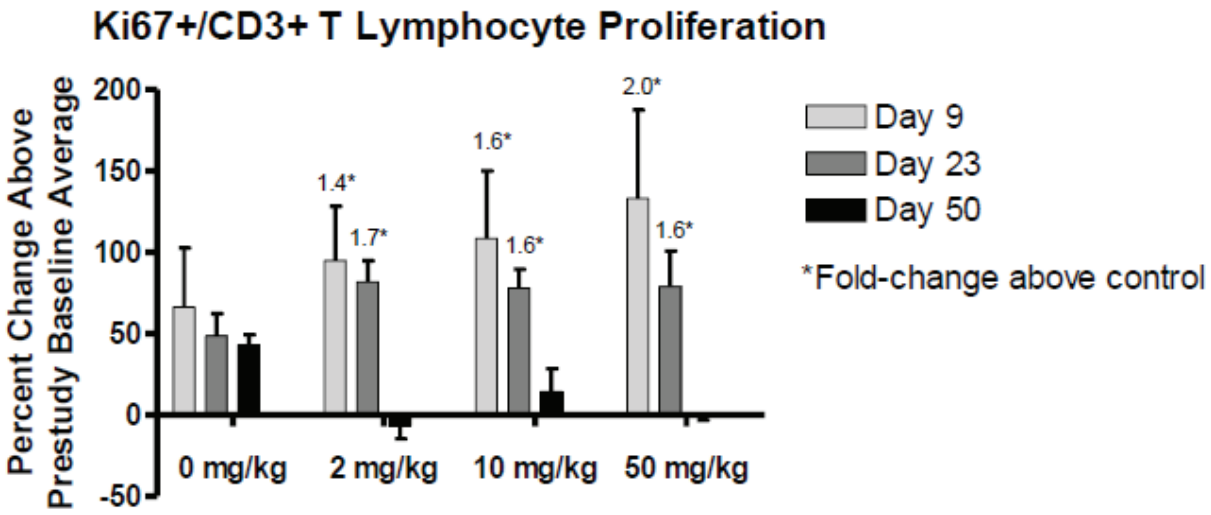
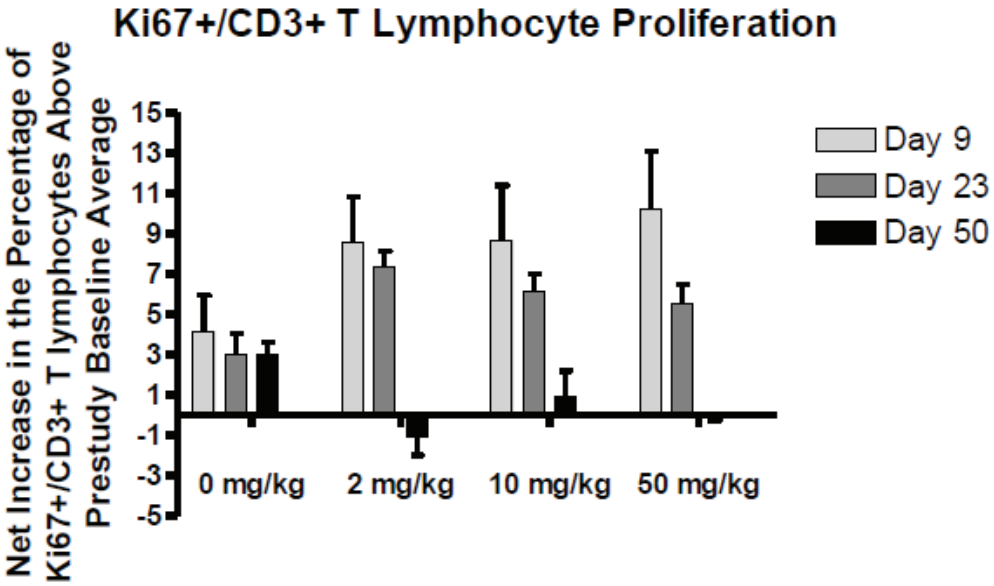
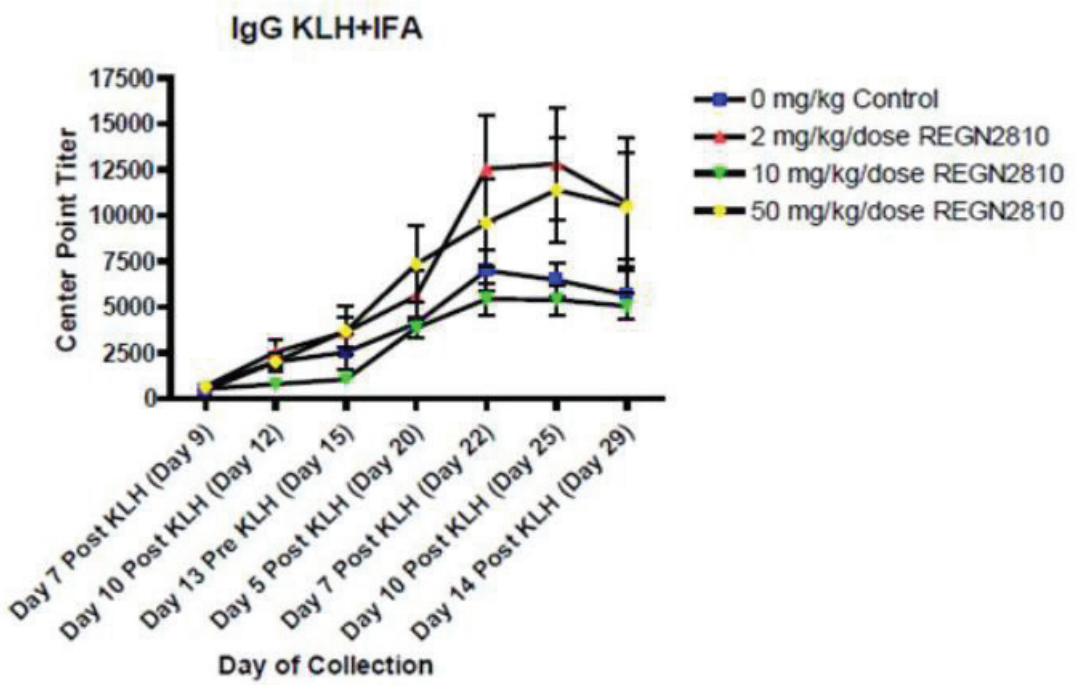


図 2 - T リンパ球の増殖：試験前のベースライン平均値を上回る T リンパ球比率の正味の増加



KLH 抗原に対する二次免疫応答の増加が、2 及び 50 mg/kg 群の動物に認められた。この変化は、対照群と比較した抗体価中央値（抗体価を 4 パラメータプロットにより評価される KLH への最大結合の半分にする血清希釈）の 1.5～2.1 倍の増加により証拠付けられた（図 3）。これらのデータは、セミプリマブをカニクイザルに投与しても抗 KLH 抗体反応の低下は生じないことを示しており、PD-1 経路阻害剤について報告された文献に一致している(3)(4)。

図 3 - カニクイザルにおける抗-KLH IgG 反応



セミプリマブ関連の肉眼所見は認められなかった。投与期間終了時剖検の時点で、副腎重量（絶対重量並びに体重比及び脳重量比重量）増加が、10 mg/kg 以上の群の雄で、同性の対照群と比較して認められた。これらの増加に関連して、軽微から軽度の副腎皮質束状帯の空胞化／肥大が観察された。セミプリマブ関連の器官重量の変化は、回復期間終了時（85 日目）には認められなかった。

投与期間終了時剖検（29 日目）で、セミプリマブ関連の病理組織学的所見が、2 mg/kg 以上で副腎、脾臓、肝臓及び下顎リンパ節に、10 mg/kg で腋窩リンパ節に認められた。副腎の主要な所見は、副腎皮質束状帯細胞における軽微から軽度の用量依存的な空胞化／肥大の増加であり、発現頻度は雄の方が高かった。この所見は、生理的ストレス又はヒト IgG タンパク質をサルに投与したことによる二次的な適応性変化と考えられ、セミプリマブの薬理作用に関連するものではないと考えられた。

投与期間終了時剖検（29 日目）において、セミプリマブ関連の血管所見が、副腎、脾臓及び腋窩リンパ節に認められた。全ての血管所見は免疫複合体の沈着に関連しており、これらの動物では ADA が検出されたことから、薬物と ADA の複合体で構成されている可能性があった。副腎では、2 mg/kg 群の雄 1 例において、軽微な急性出血及び血管拡張も認められた。この所見に関連して、免疫組織化学（IHC）染色でサル C3 を含む顆粒状沈着物がみられたことから、この変化における免疫複合体形成の寄与が示唆された(5)。脾臓では、軽微な動脈肥厚／過形成が 2 mg/kg 群の雄 2 例で、血管／血管周囲炎症及び壊死を伴う軽度の動脈肥厚／過形成が 50 mg/kg 群の雌 1 例で観察された。セミプリマブ投与動物からの脾臓組織の IHC 染色により、脾動脈中膜におけるサル IgG、IgM 又は C3 を含む顆粒状沈着物が、主に動脈周囲リンパ鞘内にみられ、脾臓における血管変化の基礎としての免疫複合体活性化が示唆された(5)。セミプリマブ 10 mg/kg 群の雌 1 例で腋窩リンパ節傍皮質が拡大し、

複数の肥大及び過形成を伴う血管構造により変形していた。変化がみられたリンパ節の血管は肥大した内皮細胞により縁取られ、平滑筋又は周皮細胞と推定される肥大性／過形成性の多角形ないし紡錘状の細胞からなる多重の同心円層により囲まれていた。この腋窩リンパ節の IHC 染色では、リンパ節洞（血管領域を含む）内における単球／マクロファージの細胞質内にサル IgG、IgM 又は C3 を含む顆粒状沈着物も認められたことから、腋窩リンパ節内の関連する血管変化の基礎としての免疫複合体活性化が示唆された(5)。免疫複合体沈着は、異種タンパク質（すなわちヒト IgG）の投与に対するサルの正常な免疫応答である。この反応はヒトにおいて問題となるものではなく、毒性変化ではないと考えられる。

投与期間終了時剖検（29 日目）での更なるセミプリマブ関連の病理組織学的所見は、50 mg/kg 群の雌雄各 1 例での脾臓リンパ濾胞／胚中心の軽微から軽度の数増加／大型化のみであった。この所見に関連して、形質細胞内にヒト IgG 並びにサル IgG 又は IgM が認められたことから、ADA データと合わせて、ヒト IgG タンパク質投与に対する局所的サル ADA 反応が示唆された。更に、これらの動物に IFA を伴った KLH 負荷を行ったところ、いずれの動物も抗 KLH IgG 反応が対照動物より著しく高く、KLH への免疫応答に関与すると考えられるサル IgG 又は IgM 産生形質細胞を含む胚中心の増加に一致していた。上記と同じ 50 mg/kg 群の雄 1 例及び 2 mg/kg 群の雄 1 例では、下顎リンパ節におけるリンパ濾胞胚中心の数増加／大型化もみられ、それに関連して ADA 反応も認められた。軽微から軽度の色素沈着（ヘモジデリン）が、全てのセミプリマブ群の雄のみで、脾臓（赤脾髄）及び肝臓（類洞クッパー細胞）に認められた。脾臓の単核細胞及び肝臓のクッパー細胞におけるヘモジデリンの存在に関連して、免疫複合体の特徴である C3 顆粒状沈着物増加が認められた。多くの動物で循環血中 ADA が認められたことから、これらの免疫複合体は薬物と ADA との複合体からなる可能性がある。これらの免疫複合体は補体受容体を介して赤血球に結合し、免疫複合体消失メカニズムの一環として脾臓及び肝臓内の単核細胞により内在化した可能性がある(5)。

10 及び 50 mg/kg 群の少数例で、胃（粘膜固有層）のリンパ球浸潤の発現頻度がわずかに対照群より高かった。カニクイザルでは背景所見としてリンパ球浸潤が普通にみられるが(6)、これらのリンパ球浸潤のわずかな発現頻度増加は、セミプリマブ投与に関連していた可能性があると考えられ、セミプリマブの目的とする薬理作用に一致していた。

回復期間終了時剖検（85 日目）では、セミプリマブ関連の肉眼所見及び器官重量の変化は認められなかった。セミプリマブ関連の病理組織学的所見は発現頻度及び重症度が低下し、回復性の傾向が示唆された。回復期間終了時まで継続して認められた所見は、2 mg/kg 以上で肝臓及び脾臓にみられた所見並びに 10 mg/kg で副腎にみられた所見のみであった。副腎皮質束状帯の細胞空胞化／肥大の軽微な増加が、10 mg/kg 群の雌 1 例で認められた。この所見に伴う出血及び血管拡張は認められなかった。脾臓（赤脾髄）及び肝臓（類洞クッパー細胞及びより低頻度に肝細胞）における軽微な色素沈着（ヘモジデリン）が、セミプリマブ群の雄全例で観察された。軽微かつ散発的な血管変化が脾臓のみでみられたが、投与終了時に認められた所見と類似していたことから、これにも免疫複合体が介在した可能性がある。全ての特記すべき所見を表 5 に要約する。

表 5 - カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の特記すべき所見

試験番号／試験期間／GLP適用の有無	動物種／試験系	セミプリマブの用量（mg/kg/週）（投与経路）	特記すべき所見
REGN2810-TX-14059 4週間（計4回の投与） GLP適用	カニクイザル	0、2、10及び50（IV投与）	• セミプリマブの目的とする薬理作用に一致して、セミプリマブは非用量依存的かつ可逆的な T 細胞増殖を誘導した。 • セミプリマブ投与による抗 KLH 抗体反応低下は認められなかった。 • T 細胞増殖を除いて、生存期間中のパラメータにはセミプリマブ関連の変化はみられず、剖検時にセミプリマブ関連の肉眼所見は認められなかった。 • 病理組織学的所見の多くは ADA 産生及びそれに続く ADA／薬物免疫複合体形成に起因すると考えられ、サルへの異種ヒトタンパク質投与に一致していた。病理組織学的所見として、血管変化が副腎、脾臓及び腋窩リンパ節に、ヘモジデリン沈着が脾臓及び肝臓に、リンパ濾胞胚中心増加が脾臓及び下顎リンパ節に、空胞化／肥大が副腎皮質束状帯細胞に、それぞれ認められた。 • NOAEL は最高投与量の 50 mg/kg/週と判断された。

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；ADA = 抗セミプリマブ抗体；KLH = キーホールリンペットヘモシアニン；NOAEL = 無毒性量

サルにおいてセミプリマブへの忍容性がみられ、所見の多くは免疫複合体又は ADA 反応に関連するものであり、ヒトで発現する可能性は低いことから、本試験の NOAEL は最高投与量の 50 mg/kg/週と判断された。

3.2 カニクイザルを用いた 26 週間反復 IV 投与毒性試験及び 12 週間回復性試験

[REGN2810-TX-14153] 試験（Module 4.2.3.2-2）

カニクイザルにセミプリマブを 0、2、10 又は 50 mg/kg/週の用量で、30 分間 IV 投与により週 1 回、26 週間（合計 26 回）投与した（Module [2.6.7.7B]）。1 群の動物数は雌雄各 6 例とした。1 群雌雄各 4 例は投与期間終了時に安楽殺し、1 群雌雄各 2 例は投与終了後 12 週間飼育してセミプリマブ関連の変化がみられた場合の回復を評価した。

評価パラメータは、生死確認、瀕死状態の有無、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、神経学的検査、バイタルサイン［呼吸数、ヘモグロビン飽和度（パルスオキシメトリーによる）、体温、血圧及び心拍数］、JET による ECG、臨床検査パラメータ（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）及び免疫フェノタイピングとした。TK 測定用及び ADA 分析用の血液

検体を、投与期間中及び回復期間中に採取した。肉眼的剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

陽性の ADA 反応がセミプリマブ投与動物の 53%で認められたが、低用量群が最も顕著（2 mg/kg/週群の 92%）であり、10 及び 50 mg/kg/週群ではいずれも 33%であった。1 例を除く全ての ADA 陽性動物でセミプリマブ消失の加速がみられ、それに関連して強力な ADA 反応レベル（ADA アッセイ反応シグナルが試験前の 10 倍以上）が認められた。ADA 反応に性差は認められなかった。

セミプリマブへの持続的曝露が、26 週間の投与期間を通して、2、10 及び 50 mg/kg/週群において、それぞれ 12 例中 3 例（25%）、12 例中 7 例（58%）及び 12 例中 8 例（67%）で維持された。12 週間の回復期間を通して、セミプリマブの濃度が、10 mg/kg/週群の 3 例中 2 例（67%）及び 50 mg/kg/週群の全例で検出されたが、2 mg/kg/週群では ADA の影響のため、いずれの動物においても検出されなかった。

曝露量パラメータの性差は認められなかった。ADA の影響がみられた濃度は TK 解析から除外した。平均 C_{max} 値は用量に比例して増加した。平均 C_{trough} 値は、10 及び 50 mg/kg 群で初回投与から 8 回目投与にかけて 2.3～3.4 倍に増加したことから、これらの群での投与期間中におけるセミプリマブの蓄積が示された。用量補正した AUC_{tau} 値は 10 mg/kg 群と 50 mg/kg 群で同程度であったことから、用量比例的な曝露量が示され、セミプリマブの濃度が高く標的飽和を上回る場合には線形の動態が認められた。2 mg/kg 群では ADA が高頻度にみられたため、標的を介した消失があったとしても、それを明確に評価できなかった。初回投与後の用量補正した AUC_{tau} 値は、全ての投与群を通して 1.4 倍以内と同程度であった。14 回の週 1 回投与後の用量補正した AUC_{tau} 値は、2、10 及び 50 mg/kg 群でそれぞれ約 4.0、3.9 及び 2.5 倍に増加し、その後は 10 及び 50 mg/kg/日群を通して 26 回目の投与まで同程度（1.1 倍以内）を維持した。投与期間及び回復期間におけるセミプリマブの実際の薬物曝露量に基づく累積 AUC は、10 mg/kg 群と 50 mg/kg 群の間で用量比例的に増加した。TK パラメータ（ADA の影響がみられたデータを除く）、ADA 反応及び平均濃度データを、それぞれ表 6 及び表 7 に要約する。

表 6 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における TK データ及び ADA 反応の要約
（REGN2810-TX-14153 試験）

パラメータ	単位	投与週	セミプリマブの用量（mg/kg/週）IV投与		
			2	10	50
C_{max}	µg/mL	1	48.3	216	1490
		14	219	618	2560
		26	112	608	2820
C_{max}/用量	(µg/mL)/(mg/kg)	1	24.1	21.6	29.9
		14	110	61.8	51.2
		26	56.0	60.8	56.4
C_{trough}[a,b]	µg/mL	1	17.3	73.9	563
		14	68.2	328	1640
		26	NA[c]	317	1410
AUC_{tau}[b]	µg•day/mL	1	178	752	5410
		14	714	2910	13700
		26	NA[c]	2930	12200
AUC_{tau}/用量	(µg•day/mL)/(mg/kg)	1	89.0	75.2	108
		14	357	291	273
		26	NA[c]	293	245
AUC_{cum}	µg•day/mL	NA	3060	44900	252000
ADA	NA	全体[d]	11/12	4/12	4/12

C_{max} = 最高（血清中）濃度；C_{trough} = 投与間隔内の最低（血清中）濃度；AUC_{tau} = 算出した投与間隔内の（血清中）濃度－時間曲線下面積；AUC_{cum} = ゼロ時間から回復期間終了時までの（血清中）濃度－時間曲線下面積；NA = 該当せず；ADA = 抗セミプリマブ抗体

注：TKパラメータ及びADA反応に性差がみられなかったことから、結果を雌雄併合の平均値／結果として示した。

a C_{trough} 濃度は投与 168 時間後に測定した。

b ADA の影響を受けたと考えられる濃度は、データ解析から除外した。

c 2 mg/kg 群で持続的曝露がみられた 3 例における最後の検体採取は 26 回目投与の 72 時間後であり、回復性試験例では 26 回目投与 168 時間後の濃度が BLQ であったため、この投与間隔での C_{trough} は求められず、AUC_{tau} は算出できなかった。

d 比率は ADA 陽性動物数／試験期間全体で評価した総動物数に基づくものである。

表 7 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における 12 週間の回復期間中の平均セミプリマブ濃度（REGN2810-TX-14153 試験）

試験の時点	セミプリマブの用量（mg/kg/週）IV投与		
	2	10	50
	平均セミプリマブ濃度（µg/mL）		
投与期間終了時[a]	NA[b]	317	1410
回復2週目（197日目）	NA	180	667
回復4週目（211日目）	NA	100	429
回復6週目（225日目）	NA	67.3	322
回復8週目（239日目）	NA	32.2	210
回復10週目（253日目）	NA	18.3	120
回復期間終了時（265日目）	NA	10.6	67.6
動物数[c]	NA	2/3[d]	3/3

NA = 該当せず

注：濃度に性差がみられなかったことから、結果を雌雄併合の平均値として示した。ADAの影響を受けたと考えられる濃度は、各群の平均値算出から除外した。

a 投与期間終了時は、176 日目の最終投与 168 時間後の 183 日目（主試験の剖検）に相当する。

b 2 mg/kg/週群の全ての回復性試験例における濃度値は、ADA の影響を受けたと考えられたため、早くも 15 日目以降の平均濃度算出から除外した。

c 回復期間終了時に検出可能なセミプリマブの濃度がみられた動物の数／総回復性試験例数

d 回復性試験例は合計 3 例であった。回復性試験例 1 例からの濃度値は ADA の影響を受けたと考えられたため、15 日目以降の平均濃度算出から除外した。

免疫原性関連の反応が 6 例（2、10 及び 50 mg/kg/週群のそれぞれ 12 例中 1、2 及び 3 例）にみられ、それに一致して強度の免疫原性（投与前レベルを 2500 倍以上上回る ADA 反応）及びセミプリマブ濃度低下が認められた。投与に対する反応として、吐気（嘔吐に至った場合を含む）（2、10 及び 50 mg/kg/週）、散瞳（10 mg/kg/週）、流涎（10 mg/kg/週）、一過性の顔面発赤又は腫脹（2、10 及び 50 mg/kg/週）、包皮腫脹（50 mg/kg/週）及び急性ないし投与中の活動性低下（10 及び 50 mg/kg/週）が観察された。

セミプリマブ投与に関連した ADA 形成に一致する一般状態の変化により、10 mg/kg/週群の 1 例が 36 日目に、50 mg/kg/日群の 1 例が 94 日目に、それぞれ途中安楽殺に至った。死因はいずれも肺出血及び肺水腫であった。いずれの動物においても、肺出血及び肺水腫の特徴は、赤血球、フィブリン及び体液による多巣性の肺胞充満並びに多巣性の血管周囲間質組織拡大であった。また、50 mg/kg/週群の動物では、腎臓の顕著な出血及び顕著な血管／血管周囲炎症／壊死、皮膚の軽度の出血及び軽度の血管／血管周囲炎症／壊死並びに膀胱の軽度の出血及び浮腫が観察された。いずれの動物においても、高濃度の血清中 ADA（投与前濃度の 2500 倍以上）により、確固とした ADA 反応が証拠付けら

れた。免疫原性は、異種タンパク質（すなわちヒト IgG）を投与されたサルにおける一般的な反応である。

この反応の外挿的意義は軽微であり、毒性変化ではないと考えられる。

ADA 形成に一致する一般状態の変化を除くと、セミプリマブを 50 mg/kg までの用量でカニクイザルに週 1 回 IV 投与したときの忍容性は概して良好であった。摂餌量、体重、眼科学的検査、心血管系（ECG、血圧、心拍数）、呼吸系（呼吸数及び酸素飽和度）、神経学的検査パラメータ及び体温を含む安全性薬理評価項目、臨床検査パラメータ（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）並びに免疫フェノタイピングにおいて、セミプリマブ関連の変化は認められなかった。セミプリマブに関して標的器官は特定されなかった。

特記すべき所見を表 8 に要約する。

表 8 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における特記すべき所見（REGN2810-TX-14153 試験）

試験番号／試験期間／GLP適用の有無	動物種／試験系	セミプリマブの用量（投与経路）	特記すべき所見
REGN2810-TX-14153 26週間（合計26回の投与） GLP適用	カニクイザル	0、2、10及び 50 mg/kg/週 （IV投与）	• セミプリマブ投与に対する免疫原性関連反応が全ての投与群（2、10 及び 50 mg/kg/週群のそれぞれ 12 例中 1、2 及び 3 例）でみられ、それに一致して強度の免疫原性及び機能的セミプリマブ濃度低下が 6 例全例で認められた。 • セミプリマブの投与に関連して、ADA 形成に一致する一般状態の変化がみられ、それによる途中安楽殺が 10 mg/kg/週群の 1 例に、途中死亡が 50 mg/kg/週群の 1 例に、それぞれ認められた。死因はいずれも肺出血及び肺水腫であった。 • 本試験で検討した ECG、眼科学的検査、バイタルサイン、免疫フェノタイピング及び臨床検査パラメータを含む他の評価項目には変化は認められなかった。標的器官は特定されなかった。 • NOAEL は 50 mg/kg/週と判断された。

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；ECG = 心電図；NOAEL = 無毒性量

急性注射反応を除いて、セミプリマブを 50 mg/kg/週までの用量でカニクイザルに IV 投与したときの忍容性は概して良好であった。標的器官は特定されず、観察された投与反応及び途中死亡は ADA

形成に関連するものであったことから、ADA 形成非存在下での NOAEL は、最高投与量の 50 mg/kg/週と判断された。

4　遺伝毒性試験

ICH S6(R1)ガイダンス「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」(7) によると、低分子医薬品について通常実施される標準的な遺伝毒性試験は、バイオテクノロジー応用医薬品には該当しない。セミプリマブのようなモノクローナル抗体については、DNA 又はその他の染色体物質との直接的な相互作用はないと予想される。そのため、セミプリマブの遺伝毒性試験は実施しなかった。

5　がん原性試験

セミプリマブは進行悪性腫瘍患者を対象として使用されることから、がん原性試験は実施しなかった（ICH S9 ガイダンス「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」(8) 参照）。

6　生殖発生毒性試験

マウスを用いた PD-1/PD-L1 経路の試験及び関連ある文献の精査に基づくと、セミプリマブの投与により、正常な妊娠の維持に必要なメカニズムが障害される可能性があると結論される。その結果、セミプリマブについて正式の生殖発生毒性試験を実施してもほとんど無益と考えられた。妊娠中の免疫寛容の維持における PD-1/PD-L1 経路の役割を裏付けるエビデンスを以下に要約する。

胎児に対する母体の免疫寛容は、妊娠中における 2 つの遺伝的に異なる生命体の共存を可能にするために不可欠である(9)。妊娠中の母体－胎児寛容は、異なる系統のマウス間での交配により生じた妊娠時の高い自然流産率により例証される。CBA x CBA といった近交系マウスの交配による自然流産率は極めて低い（5%未満）。反対に、CBA x C57 BL/6 系の交配による流産率ははるかに高い（約 18%）(9)。

妊娠中の免疫寛容維持における PD-1/PD-L1 経路の役割については、PD-L1 又は PD-L1 ノックアウトマウスを用いた流産傾向のある同種異系マウス妊娠モデルで研究されている。同種異系マウス妊娠モデルを用いて、CBA 雌マウスを C57 BL/6 雄マウスと交配させ、全ての受胎産物について、妊娠初期の受胎後 10.5 日目に、胎盤の子宮－胎盤境界面における PD-L1 発現を免疫組織化学により検出した。PD-L1 の発現が、胎盤の基底脱落膜部分の母体構成要素に限定されていたことから、母体の同種免疫応答の制御における PD-L1 の役割が示唆された。対照的に、同一遺伝子交配（CBA x CBA）での胎盤における PD-L1 発現は無視しうる程度であった。同種異系妊娠マウス（CBA x C57 BL/6）にマウス抗 PD-L1 モノクローナル抗体（mAb）を投与（250～500 µg/マウスで 2 日に 1 回）したところ、流産及び妊娠損失の比率（86%）がアイソタイプ対照投与マウス（18%）と比較して高かった。これらのデータは、胎児抗原に対する母体の同種免疫応答の制御における PD-1/PD-L1 の負の役割について、説得力のあるエビデンスを提供している(9)。同種異系マウスの妊娠所見に一致して、PD-L1$^{-/-}$雌マウスの流産率（1 腹の生存胎児数は 2.7 ± 1.6）は、同様に CBA 雄マウスと交配させた対照の PD-L1$^{+/-}$ヘテロ接合雌マウス（1 腹の生存胎児数は 8.5 ± 0.7）と比較して著しく増加した(9)。また、抗 PD-L1 抗体を介した胎児拒絶は T 細胞が欠損した RAG-1 雌マウスではみられなかったが、B 細胞欠損マウスでは引き続き認められたことから、同種異系胎児拒絶は B 細胞ではなく T 細胞に依存することが示された。更に、抗 PD-L1 mAb 投与動物では、胎児拒絶部位に T 細胞浸潤が認められた。PD-L1$^{-/-}$妊娠マウス及び抗 PD-L1 抗体投与マウスでは、いずれも母体－胎児境界面における IFNγ 産生 Th1 細胞の増加が示された。これらの細胞が同種異系胎児に対する免疫応答に関与し、その結果として胎児喪失が生じる可能性がある。

胎児寛容の維持における PD-1/PD-L1 経路の役割についても、制御性 T 細胞（T-reg）依存的な流産傾向のあるマウス妊娠モデル（CBA/J x DBA2/J）を用いて検討された(10)(11)。抗 CD25 mAb 投与により T-reg が枯渇したマウスにおける胎児吸収率（31.9%）は、IgG 対照抗体を投与したマウス（胎児吸収率は 18.8%にすぎない）と比較して高かった(10)。この試験において、抗 PD-L1 mAb 投与によ

り胎児吸収率は約 62%と更に高く、観察された PD-L1 阻害の効果は T-reg の存在に依存していることが示された。すなわち、抗 CD25 抗体投与により事前に $CD25^+$ T-regs が枯渇していた場合は、PD-L1 阻害の効果が弱かった(10)。更に、野生型動物から T-reg を PD-L1 欠損マウスに養子移入したところ、胎児生存率が著しく改善されたことから、PD-L1 発現 T-reg が胎児同種異系抗原に対する寛容に関与していることが示された(10)。別の流産傾向があるマウスモデル（CBA/J x DBA/2J）を用いて、T-reg を妊娠 CBA/J マウスに養子移入したところ、流産が対照 CBA/J 同種遺伝子マウスでみられたレベルまで抑制された(11)。これらのマウスに抗 PD-1 mAb を投与（250 µg/マウスで 3 日ごと）したところ、流産が増加し、妊娠中の T-reg の流産予防効果が消失した(11)。T-reg が妊娠中の胎児寛容維持において重要な役割を果たすとのエビデンスがあることから(12)(13)、抗 PD-1 抗体及び抗 PD-L1 抗体による上記のデータにより、妊娠中の胎児免疫寛容維持における PD-1/PD-L1 経路の役割のメカニズムが推察される。

同様に、妊娠中の望ましくない免疫応答の制御における免疫チェックポイントの重要な役割が、サルを用いた胚・胎児発生に関する試験で示された。この試験において、抗 CTLA4 mAb を妊娠第 3 期より母動物に投与したところ、流産率上昇、死産児数増加、早産増加及び乳児死亡率上昇が認められた。しかし、催奇形性は認められなかった（Yervoy FDA label, 2014 (14)）。

重要なこととして、遺伝子ノックアウト又は mAb 投与のいずれかにより PD-1/PDL1 経路を調節した動物で生存出生児に明らかな奇形が発現したとのエビデンスはない(9)(10)(11)。更に、PD-L1 はヒト胎児絨毛の合胞体栄養細胞及び細胞性栄養膜の母体－胎児境界面に発現することが知られており、胎児に対する免疫寛容維持に大きな役割を果たす可能性がある(15)。霊長類及びマウスのような血液絨毛胎盤を有する動物種では、胎盤の栄養芽細胞が母体の免疫細胞及び細胞の双方向移行に完全に曝露されるため、妊娠中、少数の胎児細胞が持続的に母体内に存在することになる（マイクロキメリズム）。胎児発生において異なる生理的役割を有する異なる領域に由来する母体及び胎児の両方が起源の細胞で覆われた胎児－胎盤ユニットに対する母体の免疫寛容は、子宮－胎盤境界面において、複合的な免疫制御過程により調節される。

いずれの動物種においても、胎児－母体境界面は、胎盤の 3 区域のいずれにおいても特定できる。最初の区域であるマウスの内膜帯又はヒトの絨毛膜絨毛が突出した末端絨毛には、毛細血管が含まれる。第二の区域である栄養膜細胞は母体静脈血への直接的アクセスがあり、第三の区域である胎児－母体境界面は接合体由来栄養芽細胞による進行性の母体子宮組織浸潤により作り出される(16)。

マウス及びカニクイザルは、いずれもヒトと同様の母体－胎児境界面を有している。マウスにおける上記の考察の結果及び他のチェックポイント阻害剤についてのカニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験の結果をまとめると、抗 PD-1 mAb の投与による生殖リスクは明確に特定される。ICH S9 ガイダンス(8) に基づくと、進行がん患者の治療を目的としたバイオ医薬品に関する潜在的生殖リスクの特定には科学的文献を利用することが可能であることから、セミプリマブについてサルを用いた胚・胎児発生に関する試験は実施しなかった。

6.1　性成熟カニクイザルを用いた 13 週間 IV 投与受胎能評価試験及び 12 週間回復性試験

[REGN2810-TX-15151] 試験（Module 4.2.3.5.1-1）

セミプリマブを、性成熟カニクイザルに、0、10 又は 50 mg/kg/週の用量で、30 分間 IV 投与により、週 1 回、13 週間（合計 13 回）投与した（Module [2.6.7.12]）。1 群の動物数は雌雄各 6 例とした。1 群雌雄各 4 例は投与期間終了時に安楽殺し、1 群雌雄各 2 例は投与終了後 12 週間飼育して、セミプリマブ関連の変化がみられた場合の回復を評価した。

評価パラメータは、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、受胎能（月経周期判定、精液分析及び精巣測定）及び臨床検査パラメータ（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）とした。TK 測定用並びに ADA 及びホルモン分析用の血液検体を、投与期間中及び回復期間中に採取した。肉眼的剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

全ての動物が計画剖検まで生存し、セミプリマブ関連の一般状態の変化並びに体重及び摂餌量の変化は認められなかった。いずれの群においても、投与期間中及び回復期間中の平均総精子数、精子密度、精子運動能、精子形態及び精巣測定値には、セミプリマブ関連の変化は認められなかった。投与期間中及び回復期間中における月経周期の回数及び平均持続期間には、セミプリマブ関連の差は認められなかった。雌雄の生殖組織において、セミプリマブ関連の病理組織学的所見は認められなかった。全ての雄の精巣で、精子形成周期ステージの正常な進行、精細管における正常な細胞連関（cell association）及び予想（主観的に）される割合で正常な精子形成の種々のステージが認められた。全ての雌で、正常な卵巣の形態学的特徴及び月経周期性が示された。特記すべき所見を表 9 に要約する。

表 9 - カニクイザルを用いた 13 週間受胎能評価試験からの特記すべき所見

試験番号／試験期間／GLP適用の有無	動物種／系統	セミプリマブの用量（投与経路）	特記すべき所見
REGN2810-TX-15151 13週間（合計13回投与） GLP適用	カニクイザル	0、10及び50 mg/kg/週（IV投与）	• セミプリマブ関連の一般状態の変化、生存期間中パラメータの変化、雌雄の受胎能評価の変化はみられず、雌雄の生殖組織にセミプリマブ関連の病理組織学的所見は認められなかった。 • 受胎能に関する NOAEL は雌雄ともに 50 mg/kg/週と判断された。

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；NOAEL = 無毒性量

10 及び 50 mg/kg/週群において、セミプリマブへの持続的な曝露が、投与期間を通してそれぞれ 58%（12 例中 7 例）及び 83%（12 例中 10 例）の動物で維持された。回復期間を通して、10 及び 50 mg/kg/週群（1 群 4 例の回復性試験例）において、セミプリマブの検出可能な濃度が、それぞれ 2 及び 3 例のセミプリマブ投与動物で認められた。

セミプリマブ投与動物のうち、10 mg/kg/週群の 50%（12 例中 6 例）及び 50 mg/kg/週群の 17%（12 例中 2 例）で陽性の ADA 反応が認められた。8 例の ADA 陽性動物のうち 7 例の ADA 反応は強度

（ADA アッセイ反応シグナルが試験前の 10 倍以上）に分類され、セミプリマブ消失の加速が示された。陽性の ADA 反応は雄でより高頻度に認められた（8 例の ADA 陽性動物のうち 6 例が雄であった）。

曝露量データに性差は認められなかった。ADA の影響がみられる濃度は TK 解析から除外した。平均 C_{max} 及び AUC_{tau} 値は用量比例的に増加したことから、試験期間全体で線形の動態が示された。いずれの群においても、平均 C_{trough} 濃度は初回投与から 8 回目投与にかけて 3.3 倍に増加したことから、投与期間中のセミプリマブの蓄積が示された。13 回の週 1 回投与後の用量補正した AUC_{tau} 値は、10 及び 50 mg/kg/週群でそれぞれ約 3.0 倍及び 3.1 倍に増加し、13 回目の投与を通して 2 群間で同程度（1.1 倍以内）に留まった。投与期間中及び回復期間中におけるセミプリマブの実際の薬物曝露量に基づく累積 AUC は、用量比例的に増加した（REGN2810-TX-15151 試験）。TK パラメータ（ADA の影響がみられたデータを除く）及び ADA 反応並びに平均濃度を、それぞれ表 10 及び 表 11 に要約する。

表 10 - カニクイザルを用いた 13 週間受胎能評価試験における TK データ及び ADA 反応の要約
（REGN2810-TX-15151 試験）

パラメータ	単位	投与週	セミプリマブの用量（mg/kg/週）IV投与	
			10	**50**
C_{max}	μg/mL	1	299	1420
		7	533	2880
		13	619	3180
C_{max}/用量	(μg/mL)/(mg/kg)	1	29.9	28.4
		7	53.3	57.7
		13	61.9	63.6
C_{trough}[a,b]	μg/mL	1	109	547
		7	317	1670
		13	398	1850
AUC_{tau}[b]	μg•day/mL	1	1090	5080
		7	2640	14400
		13	3250	15600
AUC_{tau}/用量	(μg•day/mL)/(mg/kg)	1	109	102
		7	264	287
		13	325	313
AUC_{cum}	μg•day/mL	NA	25100	168000
ADA	NA	全体[c]	6/12	2/12

C_{max} = 最高（血清中）濃度；C_{trough} = 投与間隔内の最低（血清中）濃度；AUC_{tau} = 算出した投与間隔内の（血清中）濃度－時間曲線下面積；AUC_{cum} =ゼロ時間から回復期間終了時までの（血清中）濃度－時間曲線下面積（試験期間全体の総曝露量を反映）；ADA = 抗セミプリマブ抗体；NA = 該当せず

注：TKパラメータに性差がみられなかったことから、結果を雌雄併合の平均値／結果として示した。

a C_{trough} 濃度は投与 167 時間後に測定した。

b ADA の影響を受けたと考えられる濃度は、全ての投与群でデータ解析から除外した。

c 比率は、ADA 陽性動物数／試験期間全体で評価された総動物数に基づく。

表 11 - カニクイザルを用いた 13 週間受胎能評価試験における 12 週間回復期間中の平均セミプリマブ濃度（REGN2810-TX-15151 試験）

試験の時点	セミプリマブの用量（mg/kg/週）IV投与	
	10	50
	平均セミプリマブ濃度（µg/mL）	
投与期間終了時[a]	398	1850
回復期間（106日目）	255	1020
回復期間（120日目）	149	544
回復期間（134日目）	78.1	343
回復期間（148日目）	55.0	181
回復期間終了時（162日目）	26.7	97.4
動物数[b]	2/2[c]	3/3[c]

注：濃度に性差がみられなかったことから、結果を雌雄併合の平均値として示した。ADAの影響を受けたと考えられる濃度は、全ての投与群で平均濃度算出から除外した。

a 投与期間終了時は 92 日目（主試験の剖検）、すなわち 85 日目の最終投与の 167 時間後に相当する。

b 回復期間終了時にセミプリマブの検出可能な濃度がみられた動物の数／回復性試験群の総動物数

c 回復性試験群の動物数は 1 群 4 例。10 mg/kg 群の 2 回復試験例及び 50 mg/kg 群の 1 回復試験例の濃度値は、ADA の影響を受けたと考えられたため、投与期間の 22 日目以降の平均濃度算出から除外した。

以上、セミプリマブを 50 mg/kg までの用量で週 1 回 IV 投与したところ、生存期間中のパラメータ、臨床検査所見及び病理学的所見において、いかなるセミプリマブ関連の所見も認められなかった。月経周期の評価、精液分析、精巣測定及び生殖組織の病理組織学的検査に基づくと、受胎能に対するセミプリマブ関連の変化は認められなかった。毒性変化が認められなかったことから、受胎能に関する NOAEL は雌雄ともに最高投与量の 50 mg/kg/週と判断された。

7　局所刺激性試験

セミプリマブの IV 投与による局所刺激性を、GLP 適用のサルを用いた 4 及び 26 週間反復投与毒性試験の一環として評価した（3.1 項、REGN2810-TX-14059 試験；3.2 項、REGN2810-TX-14153 試験）。セミプリマブの最高用量である 50 mg/kg/週まで（4 及び 26 週間試験でそれぞれ 12.5 及び 25 mg/mL）の用量で、投与部位における毒性的な一般状態の変化、肉眼的変化及び病理組織学的変化は認められなかった。いずれの試験においても、投与期間終了時又は回復期間終了時の剖検で注射部位に観察された病理組織学的所見（軽微から軽度の皮下出血及び線維化、軽微な血栓形成並びに／又は軽微から軽度の単核細胞、好中球若しくは混合細胞浸潤）は、偶発的又は処置関連であり、したがってセミプリマブ投与との関連はないと考えられた。

セミプリマブの 15 mg/kg（10 mg/mL）までの用量での SC 投与による局所刺激性を、雌サルを用いた単回投与薬物動態試験の一環として評価した（[REGN2810-PK-14152]；Module[2.6.4]）。セミプリマブ投与部位と希釈剤投与部位の病理組織学的所見は類似しており、偶発的な処置関連の変化と考えられたことから、注射部位におけるセミプリマブ関連の変化は認められなかった。

8　その他の毒性試験

8.1　正常なヒト及びカニクイザルの組織を用いたビオチン標識セミプリマブの組織交差反応性試験

[REGN2810-TX-14073]試験（Module 4.2.3.7.7-1）

Ex vivo 組織交差反応性試験を実施し、ヒト及びカニクイザルの組織（1 パネル当たり 36 種類の組織）の凍結切片を用いて、受容体 PD-1 に対するモノクローナルヒト IgG4 抗体であるビオチン標識セミプリマブ（REGN2810-Bio）の結合能を検討した（Module [2.6.7.17]）。

REGN2810-Bio を、2 つの濃度（15 及び 2 µg/mL）で、正常なヒト及びカニクイザルの組織（1 組織当たり 3 例のドナー）の凍結切片に適用した。受容体 PD-1 に結合しないビオチン標識ヒト IgG4 抗体の REGN1945-Bio を対照物質としたところ、陽性及び陰性対照ビーズのいずれに対しても、特異的な反応は認められなかった。陽性対照として、マウス Fc セファロース結合ビーズに融合させた遺伝子組換えヒト PD-1 エクトドメイン及びマウス Fc セファロース結合ビーズに融合させた遺伝子組換えサル PD-1 エクトドメインの凍結切片を使用したところ、いずれも REGN2810-Bio による中等度又は強度の染色が認められた。ヒト扁桃（単核白血球）を補助的対照としたところ、対照物質のいずれの濃度においても染色は認められなかった。主に扁桃の胚中心内に存在するまれな単核細胞の REGN2810-Bio による弱度から中等度の染色が、いずれの染色濃度においても認められた。陰性対照である遺伝子組換えヒト DLL4.hFc セファロース結合ビーズの凍結切片では、REGN2810-Bio のいずれの濃度においても染色は認められなかった。更なるアッセイ対照として被験物質及び対照物質の非存在下で分析した検体を使用したところ、これらのアッセイ対照スライドの染色は認められなかった。

ヒト組織では、REGN2810-Bio による染色が、リンパ節、脾臓、胸腺及び扁桃といったリンパ系組織内並びに腎臓の間質凝集体における単核白血球の細胞質に認められた。単核白血球の形質膜染色が、リンパ節、脾臓及び扁桃で観察された。

カニクイザル組織では、REGN2810-Bio による染色が、リンパ節、脾臓、甲状腺及び扁桃における単核白血球の形質膜に認められた。この所見はヒト組織で観察された染色に一致している。

REGN2810-Bio の高濃度（15 µg/mL）での染色強度は、ヒト及びカニクイザルの組織のいずれにおいても同程度（概して低グレード［弱度又は弱度ないし中等度］）であり、低頻度（極めてまれないし散発的）に認められた。ヒト組織では、REGN2810-Bio の低濃度（2 µg/mL）での染色による強度又は頻度が 15 µg/mL の濃度と比較して幾分低かったのに対し、サル組織での染色の強度及び頻度は、REGN2810-Bio のいずれの濃度においても同程度であった。

正常なヒト及びカニクイザルの組織パネルにおける特記すべき所見を以下の表 12 に要約する。

表 12 - 正常なヒト及びカニクイザルの組織パネルを用いた組織交差反応性試験からの特記すべき所見

試験番号／試験期間／GLP適用の有無	動物種／試験系	セミプリマブの濃度（投与経路）	特記すべき所見
REGN2810-TX-14073 GLP適用	正常なヒト及びカニクイザルの組織	2及び15 µg/mL （*ex vivo*）	• 両動物種の組織パネルを通して、REGN2810-Bio による染色が、単核白血球の膜又は細胞質に認められた。 • リンパ球及びその他の骨髄系細胞における PD-1 の既知の発現に基づくと、染色が予想された。

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床の実施の基準

リンパ球及びその他の骨髄系細胞における PD-1 発現に関する文献報告に基づくと、REGN2810-Bio による単核白血球の染色が予想された(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)。REGN2810-Bio による染色は、ヒト及びサルの脳（小脳、大脳）、眼、脊髄及び下垂体における膠細胞の細胞質／細胞質突起にも認められた。モノクローナル抗体は *in vivo* で細胞質にアクセスできないため、組織交差反応性試験における細胞質の染色はヒトへのリスクを示すものではないと考えられる。

ヒト及びカニクイザルの組織パネルで観察された REGN2810-Bio による染色パターンは類似していた。観察された小さな違いは、切片のばらつき、ドナーの年齢差又は疾患状態、染色過程又はその他の未特定の差を示している可能性がある。したがって、本試験における全ての染色は標的抗原との予想される反応性を示しており、被験物質の予想外の結合は認められなかった。

8.2 その他

8.2.1 免疫毒性

特異的な免疫毒性の評価項目を、サルを用いた 4 及び 26 週間反復投与毒性試験（それぞれ 3.1 項及び 3.2 項）で評価した。4 週間反復投与毒性試験では、セミプリマブの作用機序（PD-1 チェックポイント阻害を介した T 細胞活性化）に一致して、非用量依存的かつ可逆的な T 細胞増殖が誘導された。T 細胞依存的抗体反応アッセイにおいて、セミプリマブ投与による抗 KLH 抗体反応の低下は認められなかった。セミプリマブ投与は *in vitro* T 細胞刺激に対する単離末梢血単球の反応に影響を及ぼさず、セミプリマブに関連した補体存在下での循環血中免疫複合体の増加は認められなかった（REGN2810-TX-14059 試験）。26 週間反復投与毒性試験では、T リンパ球、細胞傷害性 T リンパ球、ヘルパーT リンパ球、単球、B リンパ球及びナチュラルキラー細胞集団に、セミプリマブ関連の変化は認められなかった（REGN2810-TX-14153 試験）。

サルを用いた反復投与毒性試験において、血液学的パラメータを評価し、標準的な病理組織学的検査を実施した。セミプリマブ関連の血液学的変化は認められなかった。いずれの試験においても、リンパ系器官重量に対するセミプリマブの影響は認められなかった。4 週間反復投与毒性試験では、骨髄及び胸腺の肉眼所見及び病理組織学的所見はみられず、脾臓、腋窩及び下顎リンパ節並びに肝臓

における病理組織学的所見の多くは、異種ヒトタンパク質のサルへの投与に一致する ADA 産生及びそれに続く ADA／薬物免疫複合体形成に起因すると考えられた（3.1 項；Module [2.6.7.7A]）。13 週間受胎能評価試験及び 26 週間反復投与毒性試験では、骨髄、胸腺、脾臓、リンパ節及び肝臓の肉眼所見（13 及び 26 週間）及び病理組織学的所見（26 週間）は認められなかった（REGN2810-TX-15151 試験；REGN2810-TX-14153 試験）。

8.2.2 薬物乱用性評価

全体として、セミプリマブの依存性及び乱用性を示唆する生物学的根拠はなく、動物を用いた毒性試験及び薬理試験におけるエビデンスもないことから、セミプリマブの薬物乱用性評価に特化した試験は実施しなかった。その理由を以下に詳述する。

セミプリマブは PD-1 に結合する遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体 IgG4^{P} アイソタイプである。セミプリマブの分子量は約 150 kDa であるため、問題となる程度に血液脳関門を通過する可能性は低い。血液脳関門は血液から脳への薬物の移動を抑制する。一般に、治療薬が脂溶性で分子量が 400～600 Da の場合を除いて、脳移行は制限される(24)。そのため、類似したモノクローナル抗体の文献データを考慮すると、脳脊髄液中のセミプリマブ濃度は極めて低いと予想され（血漿中濃度の 1000 分の 1 と推定される）、乱用性の可能性は極めて限定的と考えられる(25)。モノクローナル抗体にはいかなる活性代謝物もなく、特定された規制薬物の前駆物質でもない。一般にモノクローナル抗体は分解により代謝されて小さなペプチド及び各アミノ酸になり、続いて内因性異化を受けると認識されており、これらの小型ペプチド及びアミノ酸が生物学的活性を有する可能性は低い。したがって、セミプリマブの代謝経路によると、薬物依存性及び乱用性は低いことが示唆される。

セミプリマブが、CNS に発現して薬理活性を媒介する乱用性関連の受容体及びトランスポーター（オピエート、ドパミン作動性、ノルアドレナリン作動性、セロトニン作動性、NMDA 作動性、シグマ、GABA 作動性等）に結合するとのエビデンスはない。ヒト及びサルの組織を用いた組織交差反応性試験において、CNS 組織の膜染色に関するエビデンスは示されなかった。

反復投与毒性試験において、カニクイザルに 50 mg/kg/週までの用量で最長 26 週間 IV 投与したところ、26 週間反復投与毒性試験で免疫原性関連の一般状態の変化がみられたのを除いて、セミプリマブ関連の異常行動に関する一般状態の変化や CNS の機能的変化及び病理学的変化は認められなかった。

9　考察及び結論

ヒト及びカニクイザルの PD-1 タンパク質に対するセミプリマブの結合親和性は同程度であることから、カニクイザルはセミプリマブの毒性評価に最も適した動物種と考えられた（Module 2.6.2「薬理試験の概要文」）。セミプリマブの安全性プロファイルを、2 つの GLP 適用反復投与毒性試験で評価した。これらの試験ではセミプリマブの 2、10 及び 50 mg/kg の用量での週 1 回 IV 投与をそれぞれ 4 及び 26 週間実施した後、それぞれ 8 及び 12 週間の回復期間をおいた。性成熟カニクイザルを用いた受胎能評価試験を 10 及び 50 mg/kg の用量での週 1 回、13 週間の IV 投与により実施した後、12 週間の回復期間をおいた。GLP 適用の *ex vivo* 組織交差反応性試験において、ヒト及びカニクイザルの組織パネルの凍結切片に対するビオチン標識セミプリマブの結合能を評価した。

全ての毒性試験において、セミプリマブの全身曝露が 10 mg/kg/週以上の群の大半の動物で、投与期間を通して検出可能な濃度で維持された。用量依存的な ADA 反応がみられ、セミプリマブの消失が加速した。最も顕著なのは 2 mg/kg/週群であった。しかし、ADA の存在は試験に負の影響を及ぼさず、毒性評価を損なうこともなかった。セミプリマブを週 1 回 IV 投与したときのセミプリマブの TK の特徴は、10 mg/kg/週以上の用量での用量比例的な曝露量の増加及び線形の動態であった。

ADA 関連の所見を除くと、セミプリマブを 50 mg/kg/週までの用量で最長 26 週間投与したサルにおいて毒性変化は認められなかった。観察された ADA 反応は異種ヒトタンパク質をサルに投与した結果と考えられ、必ずしもヒトにおけるセミプリマブの反応を予測するものではなかった。

体重、摂餌量、眼科学的及び心血管系評価項目、血圧、心拍数、体温、呼吸数及びパルスオキシメトリー、神経学的検査パラメータ並びに臨床検査パラメータ（ADA 関連の途中安楽殺及び途中死亡でみられたものを除く）には、セミプリマブ関連の変化は認められなかった。セミプリマブ投与により、目的とするセミプリマブの薬理作用に一致する非用量依存的かつ可逆的な T 細胞増殖が誘導された。剖検時にセミプリマブ関連の肉眼所見は認められなかった。

それぞれの反復投与毒性試験におけるセミプリマブの NOAEL は、最高投与量の 50 mg/kg/週であった。

雌雄の性成熟サルを用いて実施した 13 週間受胎能評価において、生存期間中のパラメータ、臨床検査所見、生殖組織の病理学的所見並びに月経周期の評価、精液分析及び精巣測定に基づく受胎能には、セミプリマブ関連の変化は認められなかった。毒性変化が認められなかったことから、受胎能に関する NOAEL は、雌雄ともに最高投与量の 50 mg/kg と判断された。

受容体 PD-1 による PD-L1 誘導シグナル伝達が阻害されることにより妊娠の早期終了に至るが、それに関連する催奇形性の変化はみられないことが文献的に知られていることに基づき、サルを用いた胚・胎児発生に関する試験は実施しなかった。

Ex vivo 組織交差反応性試験における REGN2810-Bio 染色はセミプリマブ標的抗原との予想される反応性に一致しており、被験物質の予想外の組織結合は認められなかった。REGN2810-Bio による単

核白血球の膜又は細胞質の染色が、ヒト及びカニクイザルの組織パネルを通して認められた。組織内単核白血球の染色は、リンパ球及びその他の骨髄系細胞における既知の PD-1 発現に基づいて予想されるものであった。REGN2810-Bio による染色は、ヒト及びサルの脳、眼、脊髄及び下垂体における膠細胞の細胞質／細胞質突起にも認められたが、*in vivo* でモノクローナル抗体は細胞質にアクセスできないため、組織交差反応性試験における細胞質染色の存在はヒトへのリスクを示すものではないと考えられる。

9.1　全体のまとめ

セミプリマブの安全性を評価するため、カニクイザルに 50 mg/kg までの用量で週 1 回、最長 26 週間反復 IV 投与し、最長 12 週間の回復期間をおいた。セミプリマブへの曝露により、セミプリマブの薬理作用に直接起因する毒性変化は認められなかった。26 週間反復投与毒性試験の初期に 2 例の動物が死亡したが、その死因は ADA 形成及びそれに続く免疫複合体沈着であった。いずれの毒性試験においても、セミプリマブに起因する心血管系、呼吸系及び CNS 障害の機能的及び解剖学的エビデンスはみられず、いかなる注射部位反応も認められなかった。セミプリマブを週 1 回、最長 26 週間反復 IV 投与したときの NOAEL は、最高投与量の 50 mg/kg/週と判断された。

性成熟カニクイザルを用いて実施した 13 週間受胎能評価毒性試験において、雌雄の生殖組織にはセミプリマブ関連の病理組織学的所見はみられず、受胎能パラメータの変化も認められなかった。また、雌雄のいずれにおいても、セミプリマブ曝露量の変化は認められなかった。本試験における受胎能に関する NOAEL は、雌雄のいずれにおいても最高投与量の 50 mg/kg/週と判断された。関連ある文献の精査に基づくと、セミプリマブは正常な妊娠の維持に必要なメカニズムを障害する可能性があると結論されるため、セミプリマブの正式な生殖発生毒性試験は全体に無益と判断されたことから実施しなかった。

毒性試験において、10 mg/kg/週以上の用量で、セミプリマブの C_{trough} 値が、セミプリマブの初回投与以降、最終投与後 8 週間以上にわたって持続的に、標的を介した消失を飽和するのに必要な濃度（20 µg/mL 超）を大幅に上回ったことから、投与期間全体及び回復期間の大部分を通した PD-1 標的飽和が示唆された。

毒性試験におけるセミプリマブへの曝露は、サルの免疫系に有害な影響を及ぼさなかった。目的とする薬理作用に一致して、セミプリマブは、増殖中の細胞傷害性及びヘルパーT 細胞の頻度及び絶対数を非用量依存的かつ可逆的に増加させ、KLH 抗原に対する二次免疫応答を増強した。T リンパ球、細胞傷害性 T リンパ球、ヘルパーT リンパ球、単球、B リンパ球及び NK 細胞集団にはセミプリマブ関連の変化は認められなかった。

セミプリマブへの曝露による ADA の発現頻度には、用量との中等度から高度の逆相関が認められた。陽性の ADA 反応はほとんど常にセミプリマブ消失を増加させ、その結果、同じ用量の ADA 陰性動物と比較して血清中薬物濃度が低下した。しかし、高用量投与により到達した曝露量であったた

め、ADA の存在は薬物動態プロファイル評価及び PD-1 阻害作用の安全性評価に悪影響を及ぼさなかった。サルで観察された免疫原性は、必ずしもヒトにおける免疫原性を予測するものではない。

正常なヒト及びカニクイザルの組織を用いた *ex vivo* 組織交差反応性試験において、いずれの動物種においても類似した染色パターンがみられ、正常組織における既知の PD-1 発現パターンに基づいて予想される標的－抗原反応性を反映していた。

参 考 文 献

1. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. J Clin Oncol. 2014;32:1020-30.
2. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. Nature Immunol. 2013;14:1212-8.
3. 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.
4. Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, Lai L, et al. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. Nature. 2009;458:206-10.
5. Rojko JL, Evans MG, Price SA, Han B, Waine G, DeWitte M, et al. Formation, clearance, deposition, pathogenicity, and identification of biopharmaceutical-related immune complexes: review and case studies. Toxicol Pathol. 2014;42:725-64.
6. Chamanza R, Marxfeld HA, Blanco AI, Naylor SW, Bradley AE. Incidences and range of spontaneous findings in control cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) used in toxicity studies. Toxicol Pathol. 2010;38:642-57.
7. ICH S6(R1) バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価, 2012
8. ICH S9 抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン, 2010
9. Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, Habicht A, Azuma M, Yagita H, et al. A critical role for the programmed death-ligand 1 in fetomaternal tolerance. J Exp Med. 2005;202:231-7.
10. Habicht A, Dada S, Jurewicz M, Fife BT, Yagita H, Azuma M, et al. A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance. J Immunol. 2007;179:5211-9.
11. Wafula PO, Teles A, Schumacher A, Pohl K, Yagita H, Volk HD, et al. PD-1 but not CTLA-4 blockage abrogates the protective effect of regulatory T cells in a pregnancy murine model. Am J Reprod Immunol. 2009;62:283-92.
12. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol. 2004;5:266-71.
13. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. Mol Hum Reprod. 2004;10:347-53.
14. Yervoy (Ipilimumab) FDA label 2014.

15. Petroff MG, Chen L, Phillips TA, Azzola D, Sedlmayr P, Hunt JS. B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. Biol Reprod. 2003;68:1496-504.
16. 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 (Part B). 2016;107:108-19.
17. Cheng X, Veverka V, Radhakrishnan A, Waters LC, Muskett FW, Morgan SH, et al. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. J Biol Chem. 2013;288:11771-85.
18. Lazar-Molnar E, Yan Q, Cao E, Ramagopal U, Nathenson SG, Almo SC. Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:10483-8.
19. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2008;26:677-704.
20. Iwai Y, Okazaki T, Nishimura H, Kawasaki A, Yagita H, Honjo T. Microanatomical localization of PD-1 in human tonsils. Immunol Lett. 2002;83:215-20.
21. Wang C, Hillsamer P, Kim CH. Phenotype, effector function, and tissue localization of PD-1-expressing human follicular helper T cell subsets. BMC Immunol. 2011;12:53.
22. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol. 2007;19:813-24.
23. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. J Exp Med. 2006;203:2281-92.
24. Jones AR, Shusta EV. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. Pharm Rs. 2007; 24:1759-71.
25. Tabrizi M, Bornstein GG, Suria H. Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. AAPS J. 2010;12:33-43.

サノフィ株式会社

セミプリマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.7 毒性試験概要表

Total number of pages: 40

目　　次

2.6.7 毒性試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　毒性試験一覧表 4

2　　トキシコキネティクス試験の一覧表 6

3　　トキシコキネティクス試験成績の一覧 7

4　　毒性試験使用ロット 11

5　　単回投与毒性試験 12

6　　反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験 13

7　　反復投与毒性試験 14

8　　遺伝毒性試験：In vitro 27

9　　遺伝毒性試験：In vivo 28

10　　がん原性試験 29

11　　生殖発生毒性試験（重要ではない試験） 30

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 31

13　　生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験 34

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 35

15　　新生児を用いた試験 36

16　　局所刺激性試験 37

17　　その他の毒性試験 38

表　目　次

表2.6.7.1 - Toxicology Tabulated Summary – Overview - Study Program 4
表2.6.7.2 - Overview of Toxicokinetics Studies 6
表2.6.7.3 A - Toxicokinetics – Overview of Toxicokinetics Data 7
表2.6.7.3 B - Toxicokinetics – Overview of Toxicokinetics Data 8
表2.6.7.3 C - Toxicokinetics – Overview of Toxicokinetics Data 10
表2.6.7.4 - Drug Product 11
表2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys 14
表2.6.7.7 B - Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Intravenous Toxicology Study with a 12-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys 24
表2.6.7.12 - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic Development to Implantation 31
表2.6.7.16 - Local Tolerability 37
表2.6.7.17 - Other Toxicity Studies – Tissue Cross Reactivity 38

1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1 - Toxicology Tabulated Summary – Overview - Study Program

Test Article: REGN2810

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
Single-Dose Toxicity – Not applicable						
Repeat-Dose Toxicity						
Monkey (cynomolgus)	IV infusion	4 weeks	0, 2, 10, 50 mg/kg/week	GLP	[redacted]	[REGN2810-TX-14059] (Module 4.2.3.2-1)
Monkey (cynomolgus)	IV infusion	26 weeks	0, 2, 10, 50 mg/kg/week	GLP	[redacted]	[REGN2810-TX-14153] (Module 4.2.3.2-2)
Genotoxicity – Not applicable						
Carcinogenicity – Not applicable						
Fertility and Early Embryonic Development						
Monkey (cynomolgus)	IV infusion	13 weeks	0, 10, 50 mg/kg/week	GLP	[redacted]	[REGN2810-TX-15151] (Module 4.2.3.5.1-1)
Embryo-Fetal Development – Not applicable						
Prenatal and Postnatal Development – Not applicable						
Juvenile Studies – Not applicable						
Local Tolerance – Not applicable						
Other Toxicity Studies – Tissue Cross Reactivity						
Tissues from human and monkey (cynomolgus)	Ex vivo	NA	2 and 15 µg/mL	GLP	[redacted]	[REGN2810-TX-14073] (Module 4.2.3.7.7-1)

2.6.7 毒性試験概要表
セミプリマブ（遺伝子組換え） - 子宮頸癌

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number

GLP = Good Laboratory Practice; IV = Intravenous; NA = Not applicable Note:
The no-observed-adverse-effect level (NOAEL) is underlined.

2　トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2 - Overview of Toxicokinetics Studies

Test Article: REGN2810

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/dose)	GLP Compliance	Study Number
Single-Dose Toxicity – Not applicable					
Repeat-Dose Toxicity – Not applicable					
4 week	Cynomolgus Monkey	IV infusion[a]	0, 2, 10, 50	GLP	[REGN2810-TX-14059] (Module 4.2.3.2-1)
26 week	Cynomolgus Monkey	IV infusion[a]	0, 2, 10, 50	GLP	[REGN2810-TX-14153] (Module 4.2.3.2-2)
Genotoxicity – Not applicable					
Carcinogenicity – Not applicable					
Reproductive and Developmental Toxicity					
Fertility	Cynomolgus Monkey	IV infusion[a]	0, 10, 50	GLP	[REGN2810-TX-15151] (Module 4.2.3.5.1-1)
Juvenile Studies – Not applicable					
Local Tolerance – Not applicable					
Other Toxicity Studies – Not applicable					

IV = Intravenous; GLP = Good Laboratory Practices

a. The IV dose was administered as an infusion over approximately 30 minutes.

3　トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3 A - Toxicokinetics – Overview of Toxicokinetics Data

Test Article: REGN2810

Species/Strain:	**Cynomolgus monkey**								
Study Number:	[REGN2810-TX-14059] (Module 4.2.3.2-1)								
Parameter (Units)		**2 mg/kg/week**			**10 mg/kg/week**			**50 mg/kg/week**	
	Dose (IV)	**n**	**Mean**	**SD**	**n**	**Mean**	**SD**	**n**	**Mean**	**SD**
C_{trough} (µg/mL)	1	10	19.5	3.33	10	97.2	16.0	10	716	101
	2	8	39.5	7.87	7	133	26.4	8	633	157
	3	5	42.0	14.7	7	164	94.6	7	773	445
	4	4	33.5	16.5	7	136	76.9	7	790	525
AUC_{tau} (µg•day/mL)	1	10	192	23.6	10	949	140	10	6810	1590
	4	5	355	107	7	1480	548	7	8030	3330

IV = Intravenous; n = Number of animals; SD = Standard deviation; C_{trough} = Lowest concentration in a dosing interval; AUC_{tau} = Area under the concentration- time curve in a weekly dosing interval

Note: Data is presented as combined male and female mean values. Concentrations considered to be outliers or likely impacted by ADA were excluded from analysis (REGN2810-TX-14059).

表 2.6.7.3 B - Toxicokinetics – Overview of Toxicokinetics Data

Test Article: REGN2810

Species/Strain:	**Cynomolgus monkey**								
Study Number:	[REGN2810-TX-14153] (Module 4.2.3.2-2)								
Parameter	**Dose (IV)**	**2 mg/kg/week**			**10 mg/kg/week**			**50 mg/kg/week**		
		n	**Mean**	**SD**	**n**	**Mean**	**SD**	**n**	**Mean**	**SD**
C_{trough} (µg/mL)[a]	1	12	17.3	2.26	12	73.9	14.3	12	563	91.0
	2	7	26.1	5.67	8	118	33.0	10	821	194
	3	4	32.4	5.19	6	140	70.7	6	1020	201
	4	1	42.5	NC	6	144	69.3	6	1220	438
	5	1	47.7	NC	6	173	83.2	6	1360	271
	6	1	56.3	NC	7	200	123	6	1060	164
	7	1	79.4	NC	7	235	96.5	6	1250	199
	8	1	58.6	NC	7	236	86.3	7	1310	300
	9	1	92.2	NC	7	254	65.4	7	1400	197
	10	1	83.8	NC	7	253	76.0	8	1370	284
	11	1	54.5	NC	7	236	60.5	8	1410	283
	12	1	72.4	NC	7	296	80.7	8	1570	377
	13	1	72.8	NC	7	307	73.7	8	1560	339
	14	1	68.2	NC	7	328	79.7	8	1640	394
	15	1	74.1	NC	7	271	57.1	8	1730	309
	16	1	76.6	NC	7	290	60.3	8	1840	189
	17	1	79.5	NC	7	285	62.2	8	1870	261
	18	1	78.1	NC	7	290	55.5	8	1740	259
	19	1	82.8	NC	8	272	63.9	8	1810	259

表 2.6.7.3 B - Toxicokinetics – Overview of Toxicokinetics Data （続き）

Test Article: REGN2810

Species/Strain:	Cynomolgus monkey									
Parameter	Dose (IV)	2 mg/kg/week			10 mg/kg/week			50 mg/kg/week		
		n	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD
C_{trough} (µg/mL)[a]	20	1	76.8	NC	8	299	78.8	8	1750	283
	21	1	83.6	NC	8	317	80.6	8	1710	333
	22	2	71.4	NC	8	304	83.1	8	1760	232
	23	2	71.4	NC	8	342	84.4	8	1710	319
	24	2	68.5	NC	8	320	79.9	8	1710	474
	25	2	63.6	NC	8	325	81.1	8	1770	519
	26	0	NA	NA	2	317	NC	3	1410	380
AUC_{taugh} (µg•day/mL)[a]	1	12	178	18.2	12	752	144	12	5410	539
	14	1	714	NC	7	2910	686	8	13700	2460
	26	0	NA	NA	2	2930	NC	3	12200	2990
AUC_{taugh} (µg•day/mL)[a]	NA	3060			44900			252000		

IV = Intravenous; n = Number of animals; SD = Standard deviation; C_{trough} = Lowest concentration in a dosing interval; AUC_{tau} = Area under the concentration-time curve in a weekly dosing interval; AUC_{cum} = Area under the concentration-time curve from time zero to end of the recovery period; NC = Not calculated; NA = Not applicable

Note: Data is presented as combined male and female mean values.

a. Concentrations likely impacted by ADA were excluded from analysis (REGN2810-TX-14153).

表 2.6.7.3 C - Toxicokinetics – Overview of Toxicokinetics Data

Test Article: REGN2810

Species/Strain:	**Cynomolgus monkey**						
Study Number:	[REGN2810-TX-15151] (Module 4.2.3.5.1-1)						
Parameter	**Dose (IV)**	**10 mg/kg/week**			**50 mg/kg/week**		
		n	**Mean**	**SD**	**n**	**Mean**	**SD**
C_{trough} (µg/mL)[a]	1	12	109	43.7	12	547	94.9
	2	12	166	99.4	12	853	219
	3	8	196	70.5	10	1090	247
	4	7	218	98.7	10	1300	238
	5	7	238	99.9	10	1440	266
	6	7	319	120	10	1580	390
	7	7	317	108	10	1670	391
	8	7	355	133	10	1780	449
	9	7	345	158	10	1760	454
	10	7	367	106	10	1760	619
	11	7	378	101	10	1880	845
	12	7	393	110	10	1790	682
	13	7	398	136	10	1850	854
AUC_{tau} (µg•day/mL)[a]	1	12	1090	421	12	5080	919
	7	7	2640	902	10	14400	3380
	13	7	3250	808	10	15600	5850
AUC_{cum} (µg•day/mL)	NA	25100			168000		

IV = Intravenous; n = Number of animals; SD = Standard deviation; C_{trough} = Lowest concentration in a dosing interval; AUC_{tau} = Area under the concentration-time curve in a weekly dosing interval; AUC_{cum} = AUC computed from time zero to end of the recovery period, reflecting the overall exposure during the entire study duration; NA = Not applicable

Note: Data is presented as combined male and female mean values.

a. Concentrations likely impacted by ADA were excluded from analysis (REGN2810-TX-15151).

4 毒性試験使用ロット

表 2.6.7.4 - Drug Product

Test Article: REGN2810

Batch Number	Process Impurities				Purity[a] (%)	Endotoxin (EU/mg)	Potency[b] (%)	Study Number/Type of Study
	CHO Protein (ppm)	CHO DNA (pg/mg)	Insulin (ppm)	Protein A (ppm)				
Proposed Specification	**For Information Only**							
[redacted] (REGN2810)[c]	13.1	3.08	<0.077	<0.18	99.6	0.0052	110	[REGN2810-TX-14059] (Module 4.2.3.2-1) Repeat-Dose Toxicity in Cynomolgus Monkeys
[redacted] (REGN2810)[d]	Result 1:12[e] Result 2:15[e]	< 0.1	Not analyzed	< 1	98.1	0.002	113	[REGN2810-TX-14153] (Module 4.2.3.2-2) Repeat-Dose Toxicity in Cynomolgus Monkeys [REGN2810-TX-15151] (Module 4.2.3.5.1-1) Fertility Assessment Study in Cynomolgus Monkeys

a. Purity determined by size-exclusion HPLC and reported as % main peak.
b. Bioassay results reported as percent of reference standard.
c. Process impurities were evaluated from the REGN2810 Drug Substance Lot [redacted], which was used to make the REGN2810 Drug Product Lot [redacted]. CHO = Chinese hamster ovary cell line
d. Process impurities were evaluated from the REGN2810 Drug Substance Lot [redacted] which was used to make the REGN2810 Drug Product Lot [redacted].
e. Two results are reported on the certificate of analysis.

5　単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は実施されていない。

6　反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験

該当なし。

7　反復投与毒性試験

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys

REGN2810: 4-Week Intravenous Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period								**Test Article: REGN2810**
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus (*Macaca fascicularis*)								**Study No.:** [REGN2810-TX-14059] (Module 4.2.3.2-1)
Duration of Dosing: 4 weeks (4 total doses)			**Dosing Frequency:** once weekly					**Total Number of Doses:** 4
Initial Age: 3.1 to 6.1 years			**Duration of Recovery Period:** 8 weeks					**GLP Compliance:** GLP
Date of First Dose: 16 Apr 2014			**Method of Administration:** Intravenous infusion for approximately 30 minutes (± 1 minute)					
Vehicle/Formulation: 10 mM histidine, 5% sucrose, 0.1% polysorbate 80, pH 6.0								
Special Features: Cardiovascular telemetry, pulse oximetry, neurologic examination, anti-drug antibody (ADA), immunophenotyping, T cell dependent antibody response (TDAR) to keyhole limpet hemacyanin (KLH) with and without Incomplete Freund's Adjuvant (IFA), peripheral blood mononucleated cell (PBMC) stimulation assays, complement analysis, immunohistochemistry analysis of selected tissues								
No-observed-adverse-effect level (NOAEL): Based on the clinical tolerability of REGN2810 and ADA-mediated microscopic changes in the monkey the NOAEL is 50 mg/kg								
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2**		**10**		**50**	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**
for Primary Necropsy	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
for Recovery Necropsy	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Toxicokinetics:[a]								
Mean C_{5min} or C_{max} (µg/mL)								
after the First Dose	BLQ		53.3		256		1790	
after the Fourth Dose	BLQ		98.0		378		2010	
Mean AUC_t (µg•day/mL)								
after First Dose	NA		192		949		6810	
after Fourth Dose	NA		355		1480		8030	
ADA results								
End of Dosing Period	0	0	5	5	4	2	2	3
ADA results								
End of Recovery Period	0	0	2	2	2	1	1	0

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

REGN2810: 4-Week Intravenous Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period							**Test Article: REGN2810**	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2**		**10**		**50**	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**
for Primary Necropsy	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
for Recovery Necropsy	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Body Weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Food Consumption	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmoscopy	–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiology	–	–	–	–	–	–	–	–
Blood Pressure and Heart Rate	–	–	–	–	–	–	–	–
Body Temperature	–	–	–	–	–	–	–	–
Respiratory Rate	–	–	–	–	–	–	–	–
Pulse Oximetry	–	–	–	–	–	–	–	–
Neurologic Assessment	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–		
Flow Cytometry:[b, c, d]								
Immunophenotyping:								
Ki67$^+$/CD3$^+$ (Proliferating T-Lymphocytes)								
Day 9: Absolute (per µL)	580	500	927	702	666	522	498	715
Day 9: % Baseline	182	152	218	221	174	220	171	294

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

REGN2810: 4-Week Intravenous Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period							**Test Article: REGN2810**	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2**		**10**		**50**	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**
for Primary Necropsy	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
for Recovery Necropsy	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
$Ki67^+/CD3^+/CD4^+$ (Proliferating T-helper Lymphocytes)								
Day 9: Absolute (per µL)	237	269	390	380	331	305	262	399
Day 9: % Baseline	184	149	247	236	187	238	180	291
$Ki67^+/CD3^+/CD8^+$ (Proliferating T-cytotoxic Lymphocytes)								
Day 9: Absolute (per µL)	297	238	504	376	315	226	228	328
Day 9: % Baseline	196	159	209	209	180	226	178	362
Day 23: Absolute (per µL)	127	170	296	323	235	185	140	129
Day 23: % Baseline	124	102	108	174	124	175	98	126
T-cell Dependent Antibody Response (TDAR):[b]								
Anti-KLH IgG Titer[e] **(post-KLH administration)**	2[f]	4	3	3	3	3	3	3
7 days PD1 (Day 9)	ND		458		751		553	
10 days PD1 (Day 12)	670		709		1461		744	
13 days PD1 (Day 15)	677		897		913		897	
5 days PD2 (Day 20)	1262		3565		1556		1283	
7 days PD2 (Day 22)	1594		4795		1772		1624	
10 days PD2 (Day 25)	1324		2216		1577		1415	
14 days PD2 (Day 29)	1364		1963		1498		1322	

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

REGN2810: 4-Week Intravenous Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period							**Test Article: REGN2810**	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2**		**10**		**50**	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**
for Primary Necropsy	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
for Recovery Necropsy	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Anti-KLH IgG Titer e (post-KLH + IFA administration)	2[f]	2	2	2	2	2	2	2
7 days PD1 (Day 9)	475		671		542		693	
10 days PD1 (Day 12)	2015		2539		801		2326	
13 days PD1 (Day 15)	2544		3657		1076		4374	
5 days PD2 (Day 20)	4126		5629		3865		8917	
7 days PD2 (Day 22)	7015		12548		5435		11682	
10 days PD2 (Day 25)	6487		12824		5407		13955	
14 days PD2 (Day 29)	5687		10716		5062		12822	
Anti-KLH IgM Titer [e] (post-KLH administration)	2[f]	4	3	3	3	3	3	3
7 days PD1 (Day 9)	263		199		321		209	
10 days PD1 (Day 12)	355		268		424		249	
13 days PD1 (Day 15)	312		262		321		219	
Anti-KLH IgM Titer [e] (post-KLH + IFA administration)	2[f]	2	2	2	2	2	2	2
7 days PD1 (Day 9)	403		453		450		419	
10 days PD1 (Day 12)	605		535		398		543	
13 days PD1 (Day 15)	556		523		464		730	

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

REGN2810: 4-Week Intravenous Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period						Test Article: REGN2810		
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2**		**10**		**50**	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**
for Primary Necropsy	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
for Recovery Necropsy	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Primary Necropsy, Day 29	3[f]	3	3	3	3	3	3	3
Organ Weights (%) [g]								
Adrenal								
Absolute	0.4443[g]	-	-	-	+53*	-	+47*	-
Relative to Body Weight	0.0110 %	-	-	-	+85*	-	+55*	-
Relative to Brain Weight	0.6697 %	-	-	-	+41*	-	+37	-
Macroscopic	–	–	–	–	–	–	–	–
Microscopic[h]	3[f]	3	3	3	3	3	3	3
Adrenal								
Increased vacuolization/ hypertrophy, zona fasciculata	(0)[i]	(0)	(3)	(0)	(1)	(1)	(2)	(0)
Minimal	-	-	3	-	1	1	-	-
Mild	-	-	-	-	-	-	2	-
Acute hemorrhage and vascular dilatation, zona fasciculata	(0)[i]	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Minimal	-	-	1	-	-	-	-	-
Spleen								
Increased number/size, lymphoid follicle, germinal center	(0)[i]	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)
Minimal	-	-	-	-	-	-	-	1
Mild	-	-	-	-	-	-	1	-

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

REGN2810: 4-Week Intravenous Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period						**Test Article: REGN2810**		
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2**		**10**		**50**	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**
for Primary Necropsy	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
for Recovery Necropsy	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Hypertrophy/hyperplasia, arterial	(0)[i]	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)
Minimal	-	-	2	-	-	-	-	-
Mild	-	-	-	-	-	-	-	1
Inflammation/necrosis, vascular/perivascular	(0)[i]	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)
Minimal	-	-	-	-	-	-	-	1
Pigmentation, hemosiderin, red pulp	(0)[i]	(0)	(3)	(0)	(2)	(0)	(1)	(0)
Minimal	-	-	2	-	2	-	1	-
Mild	-	-	1	-	-	-	-	-
Mandibular lymph node								
Increased number/size, lymphoid follicle, germinal center	(0)[i]	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)
Mild	-	-	1	-	-	-	1	-
Axillary lymph node								
Hypertrophy/hyperplasia, vascular/perivascular, para- cortex (high endothelial venule)	(0)i	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)
Moderate	-	-	-	-	-	1	-	-

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

REGN2810: 4-Week Intravenous Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period						**Test Article: REGN2810**		
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2**		**10**		**50**	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**
for Primary Necropsy	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
for Recovery Necropsy	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Stomach								
Infiltration, lymphocytic/ lamina propria	(2)[i]	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Minimal	0	3	0	0	1	1	2	1
Mild	2	0	3	3	1	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	1	2	0	1
Liver								
Pigmentation, hemosiderin, Kupffer cell	(0)[i]	(0)	(3)	(0)	(3)	(0)	(3)	(0)
Minimal	-	-	2	-	3	-	2	-
Mild	-	-	1	-	-	-	1	-
Immunohistochemistry (IHC) for CD31, smooth muscle actin, and CD104 [j]								
Spleen	2[f]	2	2	0	0	0	0	1
Axillary lymph node	0[f]	2	0	0	0	1	0	0
Immunohistochemistry (IHC) [h,k]								
Adrenal gland	2[f]	0	1	0	0	0	0	0
Increased granular deposits containing C3 in cortical epithelial cells		NA	1	NA	NA	NA	NA	NA
Axillary lymph node	0[f]	2	0	0	0	1	0	0
Monkey immunoglobulins (interpreted as anti-drug antibody [ADA]) and/or C3 detected	NA	-	NA	NA	NA	1	NA	NA

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

REGN2810: 4-Week Intravenous Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period						**Test Article: REGN2810**		
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2**		**10**		**50**	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**
for Primary Necropsy	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
for Recovery Necropsy	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Liver	2[f]	0	3	0	3	0	3	0
Increased granular deposits containing C3 in Kupffer cells	-	NA	3	NA	3	NA	3	NA
Sciatic nerve (no findings noted)	2[f]	0	0	0	0	0	1	0
Spleen	2[f]	2	3	0	2	0	2	2
Monkey immunoglobulins (interpreted as anti-drug antibody [ADA]) and/or C3 detected	-	-	3	NA	-	NA	-	1
Recovery Necropsy, Day 85								
Microscopic [h]	2[f]	2	2	2	2	2	2	2
Adrenal								
Increased vacuolization/ hypertrophy, zona fasciculata	(0)[j]	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)
Minimal	-	-	-	-	-	1	-	-
Spleen								
Hypertrophy/hyperplasia, arterial	(0)[j]	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)
Minimal	-	-	-	-	-	1	-	-
Pigmentation, hemosiderin, red pulp	(0)[j]	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Minimal	-	-	1	-	-	-	-	-

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

REGN2810: 4-Week Intravenous Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period						**Test Article: REGN2810**		
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2**		**10**		**50**	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**
for Primary Necropsy	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
for Recovery Necropsy	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Stomach								
Infiltration, lymphocytic/ lamina propria	(1)[i]	(1)	(2)	(2)	(2)	(1)	(2)	(2)
Minimal	1	1	2	2	1	1	1	2
Mild	0	0	0	0	1	0	1	0
Liver								
Pigmentation, hemosiderin, Kupffer cell/hepatocellular	(0)[i]	(0)	(2)	(0)	(2)	(0)	(2)	(0)
Minimal	-	-	2	-	2	-	2	-

表 2.6.7.7 A - Repeat-Dose Toxicity: 4-Week Intravenous Toxicology Study with an 8-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

REGN2810: 4-Week Intravenous Toxicology Study in Cynomolgus Monkeys with an 8-Week Recovery Period	Test Article: REGN2810

- = No noteworthy findings; ADA = Anti-drug antibody; AUC_t = represents the area under the concentration-versus-time curve in a weekly dosing interval; BLQ = Below the limit of quantitation; $C_{0.5h}$ = Concentration at 0.5 hours after dosing; C_{max} = Maximum concentration (observed at the first sampling time point [5 minutes following the end of infusion]); F = Female; GLP = Good Laboratory Practice; IFA = Incomplete Freund's Adjuvant; IV = Intravenous; M = Male; NA = Not applicable; ND = Not detectible; NOAEL = No-observed-adverse effect level; PD1, PD2 = postdose 1 (study Day 2) or postdose 2 (study Day 15) for KLH or KLH + IFA immunization.

*ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($P \leq 0.05$).

a. There were no marked differences between male and female values, thus the ADA are pooled and presented as combined ADA. Concentrations considered as outliers or likely impacted by ADA positivity were excluded from analysis.

b. No statistical evaluation was conducted for flow cytometry and T-cell dependent antibody response ADA

c. Fluctuations in the T-lymphocyte, B-lymphocyte, T-cytotoxic lymphocyte, Natural-killer cell, Monocyte populations, HLA-DR+ activated T-lymphocytes, HLA-DR+ activated T-helper lymphocytes, HLA-DR+ activated T-cytotoxic lymphocytes, $CD69^+$ activated T-lymphocytes, $CD69^+$ activated T-helper lymphocytes, $CD69^+$ activated T-cytotoxic lymphocytes, and IFN-gamma producing T-helper lymphocytes were observed across all groups, including controls and were not considered to be test article related.

d. The interpretation of ADA for determination of PD-1 expressing activated T-lymphocyte populations (commercial PD-1 and REGN2810 binding) and the interpretation of ADA for determination of REGN2810 bound T-lymphocyte populations were limited due to high levels of background labeling present for the antibodies used in the assays. There were no changes in the binding of REGN2810 to target cell populations (or the internalization of the PD-1 receptor) after REGN2810 administration that could be detected under the conditions of these assays.

e. A center point titer could not be determined for some sample dilutions for both IgM and IgG analyses and was documented in the study record as not detectable (ND); therefore, mean titers shown may have been for less than the total number of animals immunized with KLH or KLH + IFA.

f. Number of animals evaluated. For TDAR evaluation this is the number of animals immunized with KLH or KLH + IFA.

g. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual ADA (not percent differences).

h. DATA reported as group incidence.

i. Total number of animals with finding.

j. The immunohistochemistry (IHC) staining for CD31, smooth muscle actin, and CD105 was performed on spleen and axillary lymph nodes from affected REGN2810-dosed animals with vascular alterations. The IHC staining characteristics with these markers confirmed that these were hypertrophic/hyperplastic vascular structures. The hypertrophic/hyperplastic spindle cells in the axillary lymph node had staining characteristics most consistent with the smooth muscle cells. These vascular alterations were associated with granular deposits of monkey IgG, IgM, and/or C3 within the affected spleens and axillary lymph nodes (noted elsewhere in this table).

k. The immunohistochemistry (IHC) findings were consistent with an anti-drug antibody mediated (immune-complex) basis with complement activation for the associated pathology in the adrenal gland, spleen, liver, and axillary lymph node tissues from these animals.

表 2.6.7.7 B - Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Intravenous Toxicology Study with a 12-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys

Report Title: REGN2810: A 26-Week Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Period						**Test Article: REGN2810**		
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus						**Study No.:** [REGN2810-TX-14153] (Module 4.2.3.2-2)		
Duration of Dosing: 26 weeks		**Dosing Frequency:** once weekly				**Total Number of Doses:** 26		
Initial Age: 2 to 5 years		**Duration of Recovery Period:** 12 weeks				**GLP Compliance:** GLP		
Date of First Dose: 25 Feb 2015		**Method of Administration:** intravenous infusion (target 30 minutes)						
Vehicle: 10 mM histidine, 10% sucrose , 0.1% polysorbate 80, pH 6.0								
Special Features: Electrocardiology via jacketed external telemetry, anti-drug antibody (ADA), immunophenotyping (flow cytometry)								
No-observed-adverse-effect level (NOAEL): 50 mg/kg/dose								
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2**		**10**		**50**	
Number of Animals	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
for Primary Necropsy	**M:4**	**F:4** [a]	**M:4**	**F:4**	**M:4**	**F:4**[a]	**M:4**	**F:4**
for Recovery Necropsy	**M:2**	**F:2** [a]	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2** [a]	**M:2** [a]	**F:2**
Toxicokinetics: [b]								
C_{max} (µg/mL)								
after Dose 1	BLQ		48.3		216		1490	
after Dose 14	BLQ		219		618		2560	
after Dose 26	BLQ		112		608		2820	
AUC_{tau} (ug•day/mL)								
after Dose 1	BLQ		178		752		5410	
after Dose 14	BLQ		714		2910		13700	
after Dose 26	BLQ		NA		2930		12200	
Anti-drug antibody (ADA) [c]	0/12 (0%)		11/12 (92%)		4/12 (33%)		4/12 (33%)	

表 2.6.7.7 B - Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Intravenous Toxicology Study with a 12-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

Report Title: REGN2810: A 26-Week Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Period						**Test Article: REGN2810**		
Died or Euthanized Moribund	0	2	0	0	0	2	1	0
Clinical Observations (Immunogenicity-related) [d]	0	0	0	1	1	1	3	0
Body Weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Food Consumption	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmic Examinations	–	–	–	–	–	–	–	–
Electro cardiology (qualitative and quantitative	–	–	–	–	–	–	–	–
Respiration Rates	–	–	–	–	–	–	–	–
Pulse Oximetry	–	–	–	–	–	–	–	–
Body Temperature	–	–	–	–	–	–	–	–
Blood Pressure and Heart Rate	–	–	–	–	–	–	–	–
Neurologic Examination	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Immunology (Flow Cytometry)	–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology	–	–	–	–	–	–	–	–

表 2.6.7.7 B - Repeat-Dose Toxicity: 26-Week Intravenous Toxicology Study with a 12-Week Recovery Period in Cynomolgus Monkeys（続き）

Report Title: REGN2810: A 26-Week Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Period	**Test Article: REGN2810**

- No noteworthy findings; ADA = Anti-drug antibody; AUC_{tau} = the area under the concentration-time curve calculated during the dosing interval; BLQ = Below the limit of quantitation; C_{max} = Maximum concentration; F = Female; GLP = Good laboratory practice; M = Male; NA = Not applicable; NOAEL – No- observed-adverse-effect level.

a. Five animals were euthanized early or found dead. Three animals were euthanized or found dead due to reasons not associated with administration of the test article (one control female each on Days 84 and 99, and one 10 mg/kg/dose female on Day 17). A 10 mg/kg/dose female was euthanized in moribund condition on Day 36 (near the end of administration of the 6th dose), and a 50 mg/kg/dose male was found dead on Day 94 (the 14th dose was administered on Day 92). While the moribundity or death of these 2 animals was considered related to the administration of REGN2810, the constellation of gross and microscopic findings in these animals are consistent with and likely represent secondary effects related to the immunogenicity of the test article rather than a direct test article- related effect. The cause of these deaths was ultimately attributed to pulmonary hemorrhage and edema in the lung, characterized by multifocal filling of alveoli with erythrocytes, fibrin, and fluid and multifocal perivascular expansion of interstitial tissues in both animals. The animal at 50 mg/kg/dose also had marked hemorrhage and marked vascular/perivascular inflammation/necrosis in the kidney, mild hemorrhage and mild vascular/perivascular inflammation/necrosis in the skin, and mild hemorrhage and edema in the urinary bladder.

b. REGN2810 was not detected in any prestudy or control group samples. No marked difference was observed between the male and female concentration values, so all data were pooled and are presented as combined mean values. Mean toxicokinetic parameters of REGN2810 for all dose groups, estimated based on ADA- excluded concentrations, are shown. Except for ADA-impacted animals, continuous exposure to REGN2810 was maintained throughout the 26-week treatment period in 18/36 (50%) of REGN2810-treated animals. Continuous exposure was maintained throughout the 12-week recovery period in 2/3 (67%) and 3/3 (100%) REGN2810-treated animals in the 10 and 50 mg/kg groups, respectively, whereas REGN2810 was undetectable in all 4 animals in the 2 mg/kg dose group due to ADA impact.

c. Number of positive ADA animals per total animals assessed (percent positive) over the entire study duration is shown.

d. Number of animals with acute clinical findings consistent with formation of antibodies to the test article is shown. These findings included retching/vomiting, pupil dilation, salivation, transient facial reddening or swelling, prepuce swelling, and decreased activity. These findings occurred between Day 22 and Day 94 and resulted in the death of two animals (a 10 mg/kg/dose female and a 50 mg/kg/dose male). Due to decreased activity and reduced body temperature (a 10 mg/kg/dose male) and decreased activity with prepuce swelling (a 50 mg/kg/dose male) present on Day 57 (9th dose), these animals received diphenhydramine pretreatment prior to all subsequent doses).

8　遺伝毒性試験：In vitro

該当なし。

9　遺伝毒性試験：In vivo

該当なし。

10　がん原性試験

該当なし。

11　生殖発生毒性試験（重要ではない試験）

該当なし。

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

表 2.6.7.12 - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic Development to Implantation

Report Title: REGN2810: A 13-Week Intravenous Toxicology Fertility Assessment Study in SexuallyMature Cynomolgus Monkeys With a 12-Week Recovery Period					**Test Article: REGN2810 Drug Product**	
Species/Strain: Cynomolgus monkeys	**Duration of Dosing:** 13 weeks				**Study No.:** [REGN2810-TX-15151] (Module 4.2.3.5.1-1)	
Initial Age: 5 to 7 years	**Duration of Recovery:** 12 weeks				**GLP Compliance:** Yes	
Date of First Dose (Males): 17 May 2016	**Method of Administration:** Intravenous infusion					
Date of First Dose (Females): 18 May 2016	**Vehicle Control Article:** REGN2810 Placebo Product (10 mM histidine, 5% sucrose, 0.1% polysorbate 80, pH 6.0)					
Special Features: Reproductive assessments including menstrual cycle determination, semen analysis, orchidometry, and hormone analysis						
No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg						
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**50**	
Number of Animals at Study Start	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Dosing Phase						
Toxicokinetics:						
Dose 1						
AUC_{tau} (µg•day/mL)	BLQ	BLQ	1270	904	5350	4820
C_{max} (µg/mL)	BLQ	BLQ	335	263	1510	1330
Dose 7						
AUC_{tau} (µg•day/mL)	BLQ	BLQ	2680	2620	16200	13200
C_{max} (µg/mL)	BLQ	BLQ	551	525	3240	2650
Dose 13						
AUC_{tau} (µg•day/mL)	BLQ	BLQ	4080	2920	18700	13600
C_{max} (µg/mL)	BLQ	BLQ	745	569	3680	2850

表 2.6.7.12 - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic Development to Implantation（続き）

Report Title: REGN2810: A 13-Week Intravenous Toxicology Fertility Assessment Study in SexuallyMature Cynomolgus Monkeys With a 12-Week Recovery Period					**Test Article: REGN2810 Drug Product**	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**50**	
Number of Animals at Study Start	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Anti-REGN2018 Antibody Analysis[a]						
Prior to Dose 1	0/12		0/12		1/12	
Prior to Dose 7	0/12		6/12		2/12	
Prior to Dose 13	0/12		5/12		2/12	
Noteworthy Findings:						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-
Menstrual Cycle Determinations	-	-	-	-	-	-
Semen Analysis	-	-	-	-	-	-
Orchidometry	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7.12 - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic Development to Implantation（続き）

Report Title: REGN2810: A 13-Week Intravenous Toxicology Fertility Assessment Study in SexuallyMature Cynomolgus Monkeys With a 12-Week Recovery Period					**Test Article: REGN2810 Drug Product**	
Recovery Phase						
Number of Animals in Recovery	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2
Anti-REGN2018 Antibody Analysis[a]						
Week 6	0/4		2/4		1/4	
Week 12	0/4		2/4		1/4	

- = No noteworthy findings; $AUC_{(tau)}$ = Area under concentration-time curve during the dose interval; BLQ = Below the limit of quantitation (0.078 µg/mL); C_{max} = Maximum concentration; GLP = Good Laboratory Practices; NA = Not applicable.

a. Presented as the total number of positive animals/the total number of animals in the dose group. Sexes were combined.

13　生殖発生毒性試験－胚・胎児発生に関する試験

該当なし。

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

該当なし。

15　新生児を用いた試験

該当なし。

16　局所刺激性試験

表 2.6.7.16 - Local Tolerability

Test Article: REGN2810

Species (Strain)	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. PerGroup	Noteworthy Findings	Study Number
Monkey (cynomolgus)	IV	0, 2, 10, and 50	5M/5F	There were no REGN2810-related effects at the injection sites.	[REGN2810-TX-14059] (Module 4.2.3.2-1)
Monkey (cynomolgus)	IV	0, 2, 10, and 50	6M/6F	There were no REGN2810-related effects at the injection sites.	[REGN2810-TX-14153] (Module 4.2.3.2-2)
Monkey (cynomolgus)	SC	0[a], 1, 5, 15[a]	5F	There were no REGN2810-related effects at the injection sites.	[REGN2810-PK-14152] (Module 4.2.2.2-2)

IV = Intravenous; SC = Subcutaneous; M = Males; F = Females

Note: Local tolerability of the IV administration of REGN2810 was evaluated in the repeat-dose toxicology studies in monkeys (2.6.7.7A; 2.6.7.7B). Local tolerability of the SC administration of REGN2810 was evaluated in the single-dose pharmacokinetics study in female monkeys.

a. The same animals received both diluent and 15 mg/kg REGN2810. While all groups were observed for injection site reactions, microscopic evaluations were only performed for those animals that received diluent and 15 mg/kg REGN2810.

17　その他の毒性試験

表 2.6.7.17 - Other Toxicity Studies – Tissue Cross Reactivity

Test Article: REGN2810

<table>
<tr><td colspan="2">Report Title: A Tissue Cross-Reactivity Study of Biotinylated REGN2810 in Normal Human andCynomolgus Monkey Tissues</td><td>Test Article: REGN2810</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td>Study No. [REGN2810-TX-14073] (Module 4.2.3.7.7-1)</td></tr>
<tr><td>Test System: Tissue Cryosections</td><td>Immunochemistry Detection: Direct avidin-biotin complex (ABC) immunoperoxidase procedure</td><td>GLP Compliance: GLP</td></tr>
<tr><td>REGN2810 concentrations: 2 or 15 µg/mL</td><td>Exposure Period: 1 hour</td><td>Tissue Source: Commercial tissue banks</td></tr>
<tr><td>No. of Tissues Evaluated: 36 per species</td><td>No. of Samples/Tissues Evaluated: 3 human donors or 3 animal donors per tissue</td><td rowspan="2">Notes: Positive staining of all evaluated tissues (except blood cells) with an antibody directed against von Willebrand Factor (vWF) demonstrated that the tissues were suitable for immunohistochemical staining</td></tr>
<tr><td>Positive control: Recombinant human PD-1 ectodomain fused to mouse Fc (REGN1481) sepharose-conjugated beads and recombinant monkey PD-1 ectodomain fused to mouse Fc (REGN1531) sepharose-conjugated beads</td><td>Negative control: Recombinant human DLL4.hFc (REGN25) sepharose-conjugated beads</td></tr>
<tr><td colspan="3">---------- Tissue Elements/Tissues Where Cross-Reactivity was Detected ----------</td></tr>
<tr><td colspan="2">Human</td><td>Cynomolgus Monkey</td></tr>
<tr><td colspan="2">Bladder (urinary)
No staining observed</td><td>Bladder (urinary)
Cytoplasm of mononuclear leucocytes</td></tr>
<tr><td colspan="2">Brain – cerebellum
Cytoplasm/cytoplasmic processes of glial cells</td><td>Brain – cerebellum
Cytoplasm/cytoplasmic processes of glial cells</td></tr>
<tr><td colspan="2">Brain – cerebral cortex
Cytoplasm/cytoplasmic processes of glial cells</td><td>Brain – cerebral cortex
Cytoplasm/cytoplasmic processes of glial cells</td></tr>
<tr><td colspan="2">Colon (large intestine)
No staining observed</td><td>Colon (large intestine)
Cytoplasm of mononuclear leucocytes (GALT)</td></tr>
</table>

表 2.6.7.17 – Other Toxicity Studies – Tissue Cross Reactivity（続き）

Test Article: REGN2810

Report Title: A Tissue Cross-Reactivity Study of Biotinylated REGN2810 in Normal Human andCynomolgus Monkey Tissues	**Test Article: REGN2810**
Human	**Cynomolgus Monkey**
Eye Cytoplasm/cytoplasmic processes of glial cells (retina)	**Eye** Cytoplasm/cytoplasmic processes of glial cells (optic disc)
Gastrointestinal Tract – small intestine No staining observed	**Gastrointestinal Tract – small intestine** Cytoplasm of mononuclear leucocytes (GALT)
Gastrointestinal Tract – stomach No staining observed	**Gastrointestinal Tract – stomach** Cytoplasm of mononuclear leucocytes (GALT)
Kidney (glomerulus, tubule) Cytoplasm of mononuclear leucocytes	**Kidney (glomerulus, tubule)** Cytoplasm of mononuclear leucocytes
Lung No staining observed	**Lung** Cytoplasm of mononuclear leucocytes (BALT)
Lymph Node Plasma membrane and cytoplasm of mononuclear leucocytes	**Lymph Node** Plasma membrane and cytoplasm of mononuclear leucocytes
Pituitary Cytoplasm/cytoplasmic processes of glial cells	**Pituitary** Cytoplasm/cytoplasmic processes of glial cells
Salivary Gland No staining observed	**Salivary Gland** Cytoplasm of mononuclear leucocytes
Spinal Cord Cytoplasm/cytoplasmic processes of glial cells	**Spinal Cord** Cytoplasm/cytoplasmic processes of glial cells
Spleen Plasma membrane and cytoplasm of mononuclear leucocytes	**Spleen** Plasma membrane and cytoplasm of mononuclear leucocytes
Thymus Cytoplasm of mononuclear leucocytes	**Thymus** Cytoplasm of mononuclear leucocytes

表 2.6.7.17 – Other Toxicity Studies – Tissue Cross Reactivity（続き）

Test Article: REGN2810

Report Title: A Tissue Cross-Reactivity Study of Biotinylated REGN2810 in Normal Human andCynomolgus Monkey Tissues	**Test Article: REGN2810**
Human	**Cynomolgus Monkey**
Thyroid No staining observed	**Thyroid** Plasma membrane and cytoplasm of mononuclear leucocytes
Tonsil Plasma membrane and cytoplasm of mononuclear leucocytes	**Tonsil** Plasma membrane and cytoplasm of mononuclear leucocytes

GLP = Good laboratory practice; GALT = gut-associated lymphoid tissue; BALT = bronchus-associated lymphoid tissue.