CTD 第 2 部

2.4　非臨床試験の概括評価

MSD 株式会社

目次

頁
表一覧 3
略号及び用語の定義 4
2.4.1　非臨床試験計画概略 5
2.4.2　薬理試験 9
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 9
2.4.2.1.1　In vitro 試験 9
2.4.2.1.1.1　結合親和性及びリガンド結合阻害 9
2.4.2.1.1.2　T 細胞機能調節能への影響 9
2.4.2.1.1.3　免疫系に対する直接的な刺激作用 10
2.4.2.1.1.4　補体成分及び Fc 受容体との結合性 10
2.4.2.1.2　作用機序、並びに悪性黒色腫及び NSCLC における PD-1、PD-L1及び PD-L2の発現 11
2.4.2.1.3　In vivo 試験 12
2.4.2.1.3.1　代替抗体 J43及びマウス化 DX400（muDX400）について 12
2.4.2.1.3.2　腫瘍モデルの選択 12
2.4.2.1.3.3　マウスでの各種同系腫瘍に対する抗マウス PD-1代替抗体の有効性 12
2.4.2.1.3.4　担癌モデルでの NSCLC 標準治療に対する抗マウス PD-1代替抗体の有効性 13
2.4.2.1.3.5　トランスレーショナルモデリング及びシミュレーションの裏付けとなる試験 14
2.4.2.2　副次的薬理試験 14
2.4.2.3　安全性薬理試験 14
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験 14
2.4.3　薬物動態試験 15
2.4.3.1　分析法 15
2.4.3.2　吸収 15
2.4.3.3　分布 16
2.4.3.4　代謝 16
2.4.3.5　排泄 16
2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用 16
2.4.3.7　その他の薬物動態試験 17
2.4.4　毒性試験 17
2.4.4.1　単回投与毒性試験 17
2.4.4.2　反復投与毒性試験 17

Confidential

2.4.4.3　遺伝毒性試験 18
2.4.4.4　がん原性試験 18
2.4.4.5　生殖発生毒性試験 18
2.4.4.6　局所刺激性試験 19
2.4.4.7　その他の毒性試験 19
2.4.4.7.1　抗原性試験 19
2.4.4.7.2　免疫毒性試験 19
2.4.4.7.3　作用機序に関する試験 20
2.4.4.7.4　依存性試験 21
2.4.4.7.5　代謝物の試験 21
2.4.4.7.6　不純物の試験 21
2.4.4.7.7　その他の試験 21
2.4.4.7.7.1　組織交差反応性試験 21
2.4.5　総括及び結論 22
2.4.6　参考文献 24

C Confidential

表一覧

頁

表2.4: 1　薬理試験一覧 7
表2.4: 2　毒性試験一覧 8
表2.4: 3　MK-3475の全身曝露量比 23

C Confidential

略号及び用語の定義

略号	定義	
5-FU	5-Fluorouracil	5-フルオロウラシル
ADA	Anti-Drug Antibodies	抗薬物抗体（抗 MK-3475抗体）
ADCC	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
AUC	Area Under the Curve	濃度－時間曲線下面積
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CL	Clearance	クリアランス
C_{max}	Observed Maximum Concentration	最高血中濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクロム P450
DDI	Drug-Drug Interaction	薬物相互作用
ECL	Electrochemiluminescence	電気化学発光
EM	Exposure Multiple	曝露比
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酵素結合免疫吸着
Fab	Fragment Antigen Binding	抗原結合性フラグメント
Fc	Fragment, Crystallizable	結晶性フラグメント
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
hERG	human Ether-à-go-go-Related Gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	Half-Maximal Inhibitory Concentration	50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IFNγ	Interferon Gamma	インターフェロンガンマ
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL	Interleukin	インターロイキン
K_D	Dissociation Constant	解離定数
MHC	Major Histocompatibility Complex	主要組織適合遺伝子複合体
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect Level	無毒性量
NSCLC	Non-Small Cell Lung Carcinoma	非小細胞肺癌
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	末梢血単核細胞
PD-1	Programmed Cell Death-1	プログラム細胞死-1
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
SCID	Severe Combined Immunodeficiency	重症複合免疫不全
SEB	*Staphylococcus* Enterotoxin B	ブドウ球菌エンテロトキシン B
$t_{1/2}$	Elimination Half Life	消失半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
TT	Tetanus Toxoid	破傷風トキソイド
wt	Wild Type	野生型
w/v	Weight/Volume	重量／体積

C Confidential

2.4.1　非臨床試験計画概略

PD-1（programmed cell death-1：プログラム細胞死-1）シグナル伝達系は、活性化されたT細胞による免疫監視機構を腫瘍細胞が回避するために利用される、免疫制御の主要なスイッチ機構である。ペムブロリズマブ（遺伝子組換え）（以下、MK-3475）はIgG4/kappaアイソタイプの強力かつ高い選択性を有するヒト化モノクローナル抗体であり、PD-1とそのリガンドであるPD-L1及びPD-L2との相互作用を直接阻害する。本薬の阻害作用により、標的リンパ球の機能的な活性が強化されて腫瘍を退縮させ、最終的には腫瘍に対する免疫拒絶反応が促進される。

MK-3475の非臨床試験では、ヒト、アカゲザル、カニクイザル、イヌ、ラット及びマウスのPD-1の細胞外領域におけるアミノ酸配列の比較を基に、カニクイザルを適切な動物種として選択した。ヒトのPD-1とアカゲザル、カニクイザル、イヌ、ラット及びマウスのPD-1とのアミノ酸一致度は、それぞれ96%、96%、72%、66%及び62%である。ヒトとサルの高いアミノ酸一致度に加えて、様々な種のPD-1発現細胞のフローサイトメトリー分析より、MK-3475はヒト、カニクイザル及びアカゲザルのPD-1には同様に結合するが、イヌ、ラット及びマウスのPD-1には結合しないことが示された。これらのデータは、MK-3475の毒性試験に適した動物種が非ヒト霊長類であることを示している。

MK-3475について以下の非臨床薬理試験を行った。

<u>In vitro 試験</u>

- 結合親和性及びリガンド結合阻害
- T細胞機能調節能への影響
- 種交差反応性
- 免疫系に対する直接的な刺激作用
- 補体成分及びFc受容体との結合性
- 作用機序、並びに悪性黒色腫及び非小細胞肺癌（NSCLC）でのPD-1、PD-L1及びPD-L2の発現

<u>In vivo 試験</u>

- 代替抗体及び腫瘍モデルの選択
- マウスでの各種同系腫瘍に対する抗マウスPD-1代替抗体の有効性
- 担癌モデルでのNSCLC標準治療に対する抗マウスPD-1代替抗体の有効性

MK-3475の毒性試験は、抗がん剤及びバイオ医薬品のための非臨床安全性試験のガイドラインに従い、カニクイザルの1ヵ月及び6ヵ月間反復投与毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）を行った。日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」によれば、製造販売承認申請のためには3ヵ月間の反復投与毒性試験で十分であるが、ICH S6（R1）「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」の推奨に従って6ヵ月間の反復投与毒性試験を実施した。ヒト及びカニクイザルの正常組織における組織交差反応性試験

C Confidential

も実施した。すべての毒性試験で同じロットの毒性試験用被験物質｛ロット：[redacted]、Union 施設（Merck Research Laboratories, Union, New Jersey, US）において[redacted] L 規模で製造｝を用いた。本被験物質は、10 mM ヒスチジン、7%（w/v）スクロース及び0.02%（w/v）ポリソルベート80（pH 5.5）で調製した25 mg/mL MK-3475として供給された。毒性試験の裏付けとして、カニクイザルにおける MK-3475の薬物動態（PK）及びトキシコキネティクス（TK）を評価した。また、重症複合免疫不全（SCID）マウスを用いて MK-3475の in vivo での抗体の抗原結合性フラグメント（Fab）アーム交換を検討する試験も実施した。

さらに、抗 PD-1抗体の投与により、ワクチン接種及びリコール反応後に免疫関連の毒性が生じる可能性を検討するために、代替抗体である抗マウス PD-1モノクローナル抗体を用いて、マウスの T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験を実施して免疫毒性を評価した。

MK-3475の生殖発生毒性試験は、妊娠に対して、MK-3475の作用機序に基づく有害な影響を及ぼすリスクを示す情報があることから実施していない。PD-1/PD-L1経路は、抑制性 T 細胞共刺激経路として、自己組織及び異物組織に対する免疫寛容の維持に中心的機能を果たしている。PD-1/PD-L1経路の役割は異系胎児に対する免疫寛容の維持であり、妊娠において必須とされるものである。抗 PD-1療法の作用メカニズムとして、PD-1と PD-1のリガンドである PD-L1及び PD-L2との結合を阻害して標的リンパ球の活性が増強されることから、胎児に対する免疫寛容が無効になり、このため胎児に悪影響を引き起こすことが予想される。妊娠維持における PD-1の役割から、妊娠中の抗 PD-1モノクローナル抗体（MK-3475）投与による PD-1の阻害は、流産や死産のリスクの増加を含む有害な影響をもたらすと予想される。ICH S6（R1）のガイドラインによれば、「受胎能や胎児への有害作用を示唆する十分な科学的根拠（例えば、作用機序、遺伝子改変動物の表現型、クラスエフェクト）から、リスクコミュニケーションに必要な生殖発生に関する十分な情報が得られる場合には、必ずしも追加の非臨床試験は必要でない」とされている。

MK-3475の非臨床光毒性試験は実施していない。これは、ヒト免疫グロブリンを95%超含むモノクローナル抗体が光毒性を有する可能性は低いためである。また、ICH S10の「医薬品の光安全性評価ガイドライン」では「一般的に、ペプチド、蛋白質、抗体薬物複合体あるいはオリゴヌクレオチドに適用されない」とされているため、MK-3475のような蛋白性薬物の評価は必要ではないと考えられる。

実施したすべての非臨床薬理試験及び毒性試験における、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）の適用について、次の[表2.4: 1]及び[表2.4：2]に示した。

C Confidential

表 2.4: 1 薬理試験一覧

Study No.	Study Title	Species	Testing Facility	GLP
PD001 (SN[redacted]544)	Biophysical Characterization of Humanized Anti-Human PD-1 Monoclonal Antibodies – Binding and Ligand Blockade	In vitro	Merck Research Laboratories, Cambridge, MA	No
PD002 (SN[redacted]545)	SEB-Induced T-Cell IL-2 Production as a Translational Biomarker for PD-1 Blockade Using SCH 900475/ORG 307488-0	In vitro	MSD Research Laboratories, Oss, Netherlands	No
PD003 SN[redacted]536	Assessment of Functional Cross-Reactivity of Humanized Anti-Human PD-1 Monoclonal Antibody SCH 900475 to PD-1 from Various Species	In vitro	Schering-Plough Research Institute, Cambridge, MA	No
PD004 (SN[redacted]121)	Ex Vivo Biological Activity of Humanized Anti-Human PD-1 Monoclonal Antibody SCH 900475	In vitro	Schering-Plough Research Institute, part of Merck Research Laboratories, Palo Alto, CA	No
PD005 (SN[redacted]122)	Pharmaceutical Sciences Technical Report: Biological Characterization of SCH 900475	In vitro	Merck Research Laboratories, Union, NJ	No
PD006 (SN[redacted]546)	Assessment of Anti-Tumor Activity of Anti-Mouse PD-1 Antibody, J43, in Syngeneic Mouse Tumor Models	Mouse	Schering-Plough Research Institute, part of Merck Research Laboratories, Palo Alto, CA	No
PD007	Source Data Supporting Translational Modeling & Simulation Analyses	Mouse	Merck Research Laboratories, Palo Alto, CA	No
PD008	Generation and Characterization of Anti-Mouse PD-1 Antibody DX400 and Murinized DX400	In vitro	Merck Research Laboratories, Palo Alto, CA	No
PD011	Amendment 1 to Study Report No. [redacted]546 Entitled “Assessment of Anti-Tumor Activity of Anti-Mouse PD-1 Antibody, J43, in Syngeneic Mouse Tumor Models”	Mouse	Merck Research Laboratories, Palo Alto, CA	No
PD012	Amendments 1 and 2 to Study Report No. [redacted]545 Entitled “SEB-Induced T-Cell IL-2 Production as a Translational Biomarker for PD-1 Blockade Using SCH 900475/ORG 307488-0”	In vitro	MSD Research Laboratories, Oss, Netherlands	No
PD013	Assessment of the Anti-tumor Efficacy of Treatment with muDX400 Alone or in Combination with Standard-of-Care for Non-small Cell Lung Carcinoma	Mouse	[redacted]	No

MK-3475 is also referred to as SCH 900475 and ORG 307488-0.
GLP = Good Laboratory Practice; No. = number.

C Confidential

表 2.4: 2 毒性試験一覧

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

MK-3475を用いたすべての毒性試験は、試験の結果や解釈に影響しない軽微な例外を除き、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）」に準拠して実施した。

1ヵ月間の反復投与毒性試験では、軽微な例外として、IL-2の分析及び中和抗体存在下での血清分析のみ非 GLP で実施した。この分析方法は、試験結果の質、信頼性及び妥当性に対して影響を及ぼさなかった。

カニクイザル（SN[redacted]395）及びヒト正常組織（SN[redacted]394）を用いた組織交差反応性試験では、以下に示す軽微な例外を除き、GLP を遵守して実施した。

1) 各試験で使用する組織内の被験物質（MK-3475）及び陰性対照物質（抗 RSV-IgG4）の安定性については、信頼できる方法がないため実施しなかった。しかしながら、被験物質のみ及び対照物質のみの安定性の分析結果は各試験レポートに記載した。
2) 試験に用いた条件下での担体中の被験物質及び対照物質の濃度を正確に求めるに足る方法を確立することができなかったため、担体中での被験物質及び対照物質の濃度及び均一性の分析については、GLP で規定されている通りには実施しなかった。

組織交差反応試験に適用された免疫組織化学のために処理された組織内での上記の測定及び組織内での被験物質の安定性を示すことは困難である。しかしながら、適切な陽性対照及び陰性対照を用いて同時に測定することによって、試験結果が妥当であることを確認した。したがって、上記に示した軽微な例外は、これらの試験では通常存在し、試験結果の質、信頼性及び妥当性に影響を与えるものではなかった。さらに、ICH S6(R1)によると、交差反応性試験は毒性所見の解釈の一助となることが主要な役割のひとつであるが、in vivo の毒性試験では、MK-3475に関連する毒性所見はみられなかったことから、これらの例外事項が全体の毒性評価に対して影響するものではないと考えられた。

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

C Confidential

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

MK-3475の薬理試験の概要を[2.6.3.1 項]に示す。

2.4.2.1.1　In vitro 試験

2.4.2.1.1.1　結合親和性及びリガンド結合阻害

ヒト、アカゲザル、カニクイザル、イヌ、ラット及びマウスの PD-1の細胞外領域のアミノ酸配列を比較した[2.6.2.2.1.3 項] [2.6.3.1 項] [資料4.2.1.1.3: PD003]。ヒトの PD-1の細胞外領域は、アカゲザル及びカニクイザルの PD-1と類似していた（99%類似、96%一致）。これに対し、イヌ、ラット及びマウスの PD-1の細胞外領域は保存性がかなり低かった。これらの結果と一致して、MK-3475は細胞表面に発現したヒト、アカゲザル及びカニクイザルの PD-1にのみ結合した。MK-3475はヒト及びカニクイザルの PD-1に同程度の親和性で結合し（K_D 値：それぞれ29及び118 pM）、ヒト及びカニクイザルの PD-1と PD-L1及び PD-L2との結合を同程度の強さで阻害した（IC_{50}値：それぞれ625及び721 pM、並びに695及び762 pM）[2.6.2.2.1.1 項] [2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.1: PD001]。

2.4.2.1.1.2　T 細胞機能調節能への影響

MK-3475の機能活性をカニクイザル[2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.3: PD003]及びヒト[2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.2: PD002]の末梢血を用いて評価した。MK-3475の T 細胞活性調節能はブドウ球菌エンテロトキシン B（SEB）を用いたアッセイで評価した。SEB などのスーパー抗原は、抗原提示細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラス II 分子を T 細胞受容体の Vβ 領域に結合することによって T 細胞を活性化させ、インターロイキン（IL）-2などのサイトカインを産生させる。リコール抗原による典型的な T 細胞応答では0.001%～0.1%の T 細胞しか活性化されないのに対し、SEB は最高10%～20%の T 細胞を活性化する。

カニクイザル及び健康成人ドナーの末梢血を希釈し、MK-3475又はヒト IgG4アイソタイプ対照抗体でプレインキュベーションした後、SEB で刺激した。刺激後、上清中に分泌された IL-2の濃度を測定した。MK-3475は最高濃度（25 µg/mL）で IL-2産生をカニクイザルの血液では2～3倍、ヒト血液では3～4倍増強した[2.6.2.2.1.2.1 項] [2.6.2.2.1.3 項] [2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.2: PD002][資料4.2.1.1.3: PD003]。

がん患者 T 細胞の反応性の確認に SEB アッセイを適用できるかどうかも評価した [2.6.3.1項] [資料4.2.1.1.2: PD002]。進行性転移性黒色腫（ステージ IV）患者及び前立腺癌患者の末梢血を、SEB アッセイを用いて上記の方法で検討した。MK-3475は最高濃度（25 µg/mL）で IL-2産生を3～4倍増強した。すなわち、MK-3475は健康成人ドナーとがん患者の末梢血白血球の IL-2産生を同程度に増強し、かつ同様の濃度・反応関係が示された[2.6.2.2.1.2.1 項] [2.6.3.1 項] [資料4.2.1.1.2: PD002]。

抗原特異的な T 細胞受容体の活性化に対する MK-3475の影響を評価するため、破傷風トキソイ

C Confidential

ド（TT）によるヒト T 細胞リコール応答についてのアッセイを行った[2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.2: PD002]。本アッセイでは、健康成人ドナーの末梢血中の既存メモリーT 細胞を TT で刺激し、インターフェロンガンマ（IFNγ）の産生を評価した。TT ワクチンを再接種後間もないドナーから末梢血単核細胞（PBMC）を調製し、MK-3475又はヒト IgG4アイソタイプ対照抗体の存在下又は非存在下に、TT で in vitro で刺激した。MK-3475は TT 誘発 IFNγ 産生を濃度依存的に増強した[2.6.2.2.1.2.2 項] [2.6.3.1 項] [資料4.2.1.1.2: PD002]。

上記の結果はカニクイザル及びヒトの末梢血 T 細胞に対する MK-3475の活性を示している。これらの in vitro アッセイにおいて、MK-3475による PD-1阻害は、T 細胞受容体依存性のサイトカイン応答を濃度依存的に増強することが明らかとなった。

2.4.2.1.1.3　免疫系に対する直接的な刺激作用

T 細胞受容体への同時刺激がないときの MK-3475による免疫系活性化能を2つの in vitro アッセイで検討した（いずれも IL-2濃度で評価）[2.6.3.1 項] [資料4.2.1.1.4: PD004]。最初のアッセイでは、健康成人ドナーの末梢血を希釈し、MK-3475又はヒト IgG4アイソタイプ対照抗体でプレインキュベーションした後、SEB 存在下または非存在下に放置した。このアッセイでは SEB が T 細胞受容体の特異的同時刺激となる。MK-3475は SEB の存在下でのみ IL-2産生を増強し、SEB 非存在下では IL-2濃度に影響を及ぼさなかった[2.6.2.2.1.4 項] [2.6.3.1 項] [資料4.2.1.1.4: PD004]。

さらに、Stebbings ら（2007年）[資料4.3: 1]のアッセイを用い、MK-3475による急激なサイトカイン放出のリスクを評価した。本アッセイでは、MK-3475、抗 CD28抗体（陽性対照）及びヒト IgG4抗体を、96ウェルポリスチレンプレートのウェル壁面で風乾（固定化）し、ヒト PBMC をこのウェルで48時間培養後、上清中の IL-2濃度を測定した。固定化された抗 CD28抗体は、追加刺激の無い状態で強力に IL-2を産生させた。これに対し、固定化された MK-3475は、追加刺激の無い状態で IL-2を産生させなかった。これらの結果から、T 細胞受容体に対するシグナルが同時にない状態で、MK-3475は末梢血 T 細胞を直接刺激しないことが示された[2.6.2.2.1.4 項] [2.6.3.1 項] [資料4.2.1.1.4: PD004]。

2.4.2.1.1.4　補体成分及び Fc 受容体との結合性

細胞表面の PD-1などの受容体に結合した免疫グロブリンは、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ及び単球を誘引することができる。Fcγ 受容体を介したこれらの細胞と免疫グロブリンの Fc 領域との結合は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘発することがある。一方、補体依存性細胞傷害（CDC）は、補体成分 C1q が免疫グロブリンの Fc 領域と結合することで開始される。ただし、IgG のアイソタイプにより Fc 受容体や補体蛋白との親和性が異なるため、エフェクター機能の程度は異なってくる。MK-3475は IgG4の Fc 領域を含むが、補体成分 C1q や Fcγ 受容体との結合が弱いため、一般にエフェクター機能は欠如している[資料4.3: 2][資料4.3: 3]。

エフェクター機能が限定的又は全く無いとの予想を裏付けるため、MK-3475と C1q、CD64（FcγRI）及び CD16a（FcγRIIIa）との結合を評価した[2.6.2.2.1.5 項] [2.6.3.1 項] [資料4.2.1.1.5: PD005]。結合アッセイは、ADCC（CD64及び CD16a との結合）又は CDC（C1q との結合）の可

C Confidential

能性を評価する代替アッセイとしても使用できると考えられる。MK-3475と CD64及び C1q との結合ではヒト IgG1及び IgG4抗体を対照として用い、CD16a との結合ではヒト IgG1抗体を対照として用いた。ヒト IgG1及び IgG4抗体を対照として用いたのは、C1q、CD64及び CD16a に対する結合親和性が既知のためである。

MK-3475と C1q 及び CD64との結合はヒト IgG4抗体と同程度であったが、ヒト IgG1抗体よりは大幅に弱かった。MK-3475と CD16a との結合もヒト IgG1抗体との親和性より大幅に弱かった。これらの結果から、MK-3475のエフェクター機能は限定的であることが予想される。

2.4.2.1.2　作用機序、並びに悪性黒色腫及び NSCLC における PD-1、PD-L1及び PD-L2の発現

腫瘍の微小環境下では、PD-1とそのリガンドとの相互作用により、有効な抗腫瘍反応を備える T 細胞の能力が阻害されている。PD-1に対するモノクローナル抗体でこれらの相互作用を阻害することにより、腫瘍における T 細胞の機能的活性化が改善される。すなわち、腫瘍の微小環境下での腫瘍浸潤 T 細胞（腫瘍細胞を殺滅させるエフェクターリンパ球）のアポトーシスが阻止されるとともに、抑制作用をもつ制御性 T 細胞のアポトーシスが増強される。腫瘍における T 細胞の機能活性が増強されることは、最終的に腫瘍の退縮につながる。

PD-1、PD-L1及び PD-L2の発現に関する文献情報は、悪性黒色腫及び NSCLC においては限定的であり、かつ一貫性に乏しい。悪性黒色腫での PD-L1の発現はいくつかの試験で評価されており、その発現率は14%～57.6%である[資料4.3: 4][資料4.3: 5]。他方、NSCLC での PD-L1の発現については、より幅広く特徴が明らかにされているが、悪性黒色腫と同様、NSCLC における PD-L1の発現は19.6%～75.2%である[資料4.3: 6] [資料4.3: 7][資料4.3: 8][資料4.3: 9][資料4.3: 10][資料4.3: 11]。また、PD-L2の発現に関するデータはさらに限定的である。Taube ら（2014年）は27例の患者から得た38検体を評価したところ、PD-L2は悪性黒色腫の5検体、NSCLC の2検体で発現が認められたと報告した[資料4.3: 8]。Zhang らの報告では、NSCLC の143検体中71検体で PD-L2の発現が認められた[資料4.3: 10]。

Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J., U.S.A.（以下、米国本社）によるレトロスペクティブ試験は、2014年に Sorensen ら[資料4.3: 12]及び Sun ら[資料4.3: 13]が実施した2試験であり、いずれも免疫組織化学染色により、NSCLC 患者の検体を用いて PD-L1発現を評価している。デンマーク（Aarhus University Hospital）で実施された Sorensen らの試験では204検体が評価され、PD-L1の強陽性及び弱陽性の割合はそれぞれ25%及び50%（総発現率は75%）であった。また、韓国（Samsung Medical Center）で実施された Sun らの試験では1070検体が評価され、PD-L1の強陽性及び弱陽性の割合はそれぞれ11%及び49%（総発現は45%）であった。

また、米国本社が有する組織バンクの試料を用いて悪性黒色腫及び NSCLC における PD-1、PD-L1及び PD-L2の発現を評価したところ、発現レベルは様々であった。

なお、PD-1、PD-L1及び PD-L2の発現に一貫性が認められなかったことは、評価に用いた手法（例えば、抗体、染色の手順、スコアリング法、陽性と判断するカットオフ値など）が一定でないこと、原発巣か転移巣かなど患者や検体の特性が異なること、並びに検体数が異なることなど

C Confidential

の理由によるものと考えられた。

2.4.2.1.3　In vivo 試験

2.4.2.1.3.1　代替抗体 J43及びマウス化 DX400（muDX400）について

MK-3475はマウス PD-1との交差性がないため、代替抗体として、マウス担癌モデルの in vivo 試験に抗マウス PD-1抗体を使用した。代替抗体は臨床抗体と機能的に同等な抗体であり、マウス等の対象動物種に発現する標的オルソログに特異的に結合する。MK-3475はマウス PD-1と結合せず、マウス腫瘍モデルにおいて機能的活性を示さないことから、PD-1経路の阻害が抗腫瘍効果をもたらすという概念を実証するため、抗マウス PD-1抗体である J43及びマウス化 DX400（muDX400）を代替抗体としてマウスのモデルで使用した。

市販のハムスター抗マウス PD-1抗体である J43 [資料4.3: 14]については、入手後にマウス PD-1に対する結合親和性及びマウス PD-1とマウス PD-L1及び PD-L2との結合に対する J43の阻害能を確認した[資料4.2.1.1.8: PD008]。また、muDX400は米国本社で作製されたラット抗マウス PD-1ハイブリドーマ DX400（マウス IgG1アイソタイプ）をマウス化したものである[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.8: PD008]。J43及びmuDX400は、ともにマウス PD-1に対して結合親和性が高くマウス PD-L1及び PD-L2とマウス PD-1との結合を阻害することから、非臨床薬理試験を進める上でこれらの抗体は MK-3475の代替抗体として有用と考えた。

2.4.2.1.3.2　腫瘍モデルの選択

腫瘍モデルを用いた非臨床 in vivo 試験は、PD-1/PD-L1経路を詳細に検討し、また、PD-1阻害による抗腫瘍活性を評価することを目的とした。このため腫瘍モデルの選択基準としては、癌腫ではなく、正常な免疫システムをもつモデル動物であり、かつ腫瘍の微小環境において PD-1及び PD-L1を発現していることとした。そのため、従来の異種移植モデルの代わりに同系腫瘍モデルを選択した。

免疫組織化学的評価より、MC38及び RENCA はそれぞれ中程度及び高度に PD-1及び PD-L1を発現していることが判明した。そのため、抗 PD-1単独療法及び標準療法との併用による評価には、MC38及び RENCA を優先して用いた。なお、悪性黒色腫由来[redacted]及び肺癌由来[redacted]モデルを用いて抗 PD-1代替抗体を評価したが、PD-1及び PD-L1の発現量が低いことに相関して[redacted]及び[redacted]とも抗 PD-1療法に対して抵抗性を示した。

2.4.2.1.3.3　マウスでの各種同系腫瘍に対する抗マウス PD-1代替抗体の有効性

試験では、C57Bl/6マウスの MC38結腸腺癌同系担癌モデルを用い、単独療法としての、若しくは5-フルオロウラシル（5-FU）又はゲムシタビンとの併用での J43の有効性を評価した[2.6.2.2.2.3 項] [2.6.3.1 項] [資料4.2.1.1.6: PD006]。投与の有効性は腫瘍体積及び生存率で評価した。

単独療法としての使用では、J43又はハムスターIgG 対照抗体を2及び10 mg/kg の用量で合計5回腹腔内投与した。J43は10 mg/kg の用量で MC38同系腫瘍の増殖を抑制した。J43の10 mg/kg 投与群とハムスターIgG の10 mg/kg 対照群との増殖には有意差が認められた(P 値 ≤ 0.05)。さらに、

C Confidential

10 mg/kg 群の動物の50%及び2 mg/kg 群の動物の20%は試験終了まで生存した。ハムスターIgG 対照抗体投与動物で試験終了まで生存したものはいなかった[2.6.2.2.2.3.1 項] [2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.6: PD006]。

5-FU との併用時には、J43又はハムスターIgG 対照抗体（いずれも10 mg/kg）を5-FU（40 mg/kg）と同時投与した。被験物質はすべて合計5回腹腔内投与した。J43は5-FU との併用で MC38同系腫瘍の増殖を抑制した。J43及び5-FU の併用動物の60%及び J43単独投与動物の20%は試験終了時まで生存した。ハムスターIgG 対照抗体の単独投与動物及び5-FU との併用動物のうち試験終了時まで生存したものはいなかった[2.6.2.2.2.3.2 項] [2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.6: PD006]。

ゲムシタビン併用時の J43の有効性についても評価した。J43、ハムスターIgG 対照抗体及びゲムシタビンは10 mg/kg の用量で腹腔内投与した。J43又はハムスターIgG 対照抗体をゲムシタビンと合計3回同時投与した後、ゲムシタビン投与を中止し、J43及びハムスターIgG 対照抗体のみの投与をさらに3回続けた。J43はゲムシタビンとの併用で MC38同系腫瘍の増殖を抑制した。J43及びゲムシタビン併用動物の80%、J43単独投与動物の20%及びハムスターIgG 対照抗体とゲムシタビンの併用動物の20%は試験終了時まで生存した。ハムスターIgG 対照抗体単独投与動物で試験終了時まで生存したものはいなかった[2.6.2.2.2.3.3 項] [2.6.3.1 項] [資料4.2.1.1.6: PD006]。

なお、J43単独療法での有効性は、[redacted]（C57Bl/6マウスの急性骨髄性白血病）、[redacted]（C57Bl/6マウスの扁平上皮癌）及び[redacted]（BALB/c マウスの B 細胞リンパ腫）の同系腫瘍モデルでも評価した。これら同系腫瘍モデルに対しても、J43の抗腫瘍効果が認められた。

2.4.2.1.3.4　担癌モデルでの NSCLC 標準治療に対する抗マウス PD-1代替抗体の有効性

デキサメタゾンは通常、NSCLC の標準治療と併用されている。MK-3475の作用機序が PD-1シグナル経路の遮断による T 細胞活性化に基づくものであり、抗炎症・免疫抑制作用を有するデキサメタゾンが NSCLC の標準治療に併用される場合には、併用化学療法の有効性にデキサメタゾンが影響を及ぼす可能性がある。

そこで、MK-3475代替抗体（抗マウス PD-1抗体：muDX400、マウス化 DX400）[2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.8: PD008]を用いて、NSCLC 標準治療に対する muDX400の影響を、腎癌（renal carcinoma: RENCA）のマウス担癌モデルで検討した[2.6.2.2.2.4 項][2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.11: PD013]。さらに、muDX400と NSCLC 標準治療による抗腫瘍効果を、NSCLC 標準治療のみの場合と比較した。なお、腎癌を免疫機能正常マウスに移植したマウス担癌モデルを用いたのは、NSCLC の適切なモデルを使用できなかったためである。ここでは、0.5、1又は5mg/kg のデキサメタゾンを含む、4種類の標準治療レジメンで評価した。

PD-1抗体による NSCLC 標準治療への悪影響は、ないことが明らかとなった。むしろ、薬剤のいくつかの組み合わせによっては、muDX400単独投与の場合と比べて、より大きな抗腫瘍効果が認められた[2.6.2.2.2.4 項] [2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.11: PD013]。さらに、本マウス担癌モデルは抗PD-1免疫療法への反応性が高くないにもかかわらず、NSCLC 標準治療に muDX400を加えることにより、標準治療のみの場合と比較してより高い抗腫瘍効果が認められた。重要な点として、ある組み合わせでは腫瘍の完全退縮例も認められた[2.6.2.2.2.4 項] [2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.11:

C Confidential

PD013]。

2.4.2.1.3.5　トランスレーショナルモデリング及びシミュレーションの裏付けとなる試験

MC38結腸腺癌同系担癌マウスを用いた in vivo の3試験のデータをトランスレーショナルモデリング及びシミュレーション評価のデータ入力に用いた[2.6.2.2.2.5 項] [2.6.3.1 項] [資料4.2.1.1.7: PD007]。これらの試験ではラット抗マウス PD-1代替抗体 DX400及びマウス化 DX400を用いた。詳細は[2.6.3.1 項][資料4.2.1.1.8: PD008]に記載した。

2.4.2.2　副次的薬理試験

MK-3475の副次的薬理試験は実施していない。

2.4.2.3　安全性薬理試験

Vargas ら（2008年）[資料4.3: 15]の総説にある科学的根拠から、MK-3475の in vitro ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）アッセイは実施していない。モノクローナル抗体が hERG チャネルの細胞外又は細胞内（ポア）ドメインとほとんど相互作用できないことは広く認められており、モノクローナル抗体が hERG チャネル活性を阻害する可能性は極めて低い。モノクローナル抗体は巨大分子であるため細胞膜を通過できないので、hERG チャネルの内部ポアを遮断できないと考えられる。

MK-3475の独立した安全性薬理試験は実施していない。ただし、ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」に基づき、4ヵ月間の回復期間を設定したカニクイザルの1及び6ヵ月間投与毒性及びトキシコキネティクス（TK）試験で MK-3475の安全性薬理を評価した［2.6.7.7A 項; 2.6.7.7.B 項］。試験では、心電図、体温及び血圧を含む全般的な獣医学的及び身体的検査、一般状態の観察（投与後1～3時間）、並びに心血管系、呼吸器系、腎臓及び神経系組織の病理組織学的検査でのパラメータについて評価した。評価したいずれのパラメータにも MK-3475に関連した影響は認められなかった。予想される最大臨床用量（10 mg/kg を2週間に1回投与）での $AUC_{(0\text{-}tau)}$の予測値（3,607.3 µg•day/mL）に基づくと、これらの非臨床試験で評価した最高用量（200 mg/kg）の曝露比は約19倍であった。

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験

MK-3475の薬力学的薬物相互作用（DDI）試験は実施していない。なお、バイオ医薬品及び低分子医薬品の薬物相互作用については、国際的コンソーシアムによるポジションペーパーで合意されているとおり、in vitro 及び in vivo の非臨床試験からヒトでの DDI を予測することは困難である[資料4.3: 16]。また、他の薬物との相互作用は、臨床試験でのみ評価可能である。

C Confidential

2.4.3　薬物動態試験

本項で考察する MK-3475の PK 試験には、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）」非準拠のカニクイザル単回投与 PK 試験1試験及び GLP 準拠のカニクイザル反復投与 TK 試験2試験（1及び6ヵ月）、並びにマウスを用いた MK-3475の in vivo 安定性（IgG4 Fab アーム交換の有無）を評価する試験1試験が含まれる。実施した吸収、分布、代謝及び排泄に関する非臨床試験の一覧を[2.6.5.1 項]に示す。

2.4.3.1　分析法

PK/TK 試験における血清中 MK-3475濃度の分析にはイムノアッセイを用いた。GLP 非準拠のカニクイザル単回投与 PK 試験では、酵素結合免疫吸着（ELISA）法を用いた。カニクイザルの反復投与 TK 試験は GLP に準拠しており、これらの TK 試験の血清中 MK-3475濃度は、電気化学発光（ECL）法を用いて測定した。抗 MK-3475抗体（ADA）の検出では、ブリッジング ECL 法を用い、ビオチン化 MK-3475で捕捉後、ルテニル化 MK-3475で検出した。標準品としてはアフィニティーカラムで精製したウサギ抗MK-3475ポリクローナル抗体を用いた。in vivo での野生型（wt）IgG4の Fab アーム交換を検討したマウスの試験では、ECL 法及び ELISA 法を用いてハイブリッド抗体分子及び親抗体分子を測定した。分析法の詳細を[2.6.5.2 項]に示す。

2.4.3.2　吸収

MK-3475の PK 及び TK は薬理学的に適切な動物種であるカニクイザルを用いて評価した。PK 試験における MK-3475の投与経路はいずれも静脈内とした。MK-3475の臨床投与経路は静脈内投与を予定しているため、血管外投与による試験は行わなかった。

MK-3475を0.3、3.0又は30 mg/kg の用量で雌カニクイザルに単回静脈内投与したとき、血清中濃度は多相性を示しながら消失した。ADA は主に投与後10日目以降にほとんどの投与動物で検出された。$AUC_{0\text{-last}}$ に基づく曝露量は、0.3と3.0 mg/kg の間では用量比をわずかに上回って増加し、3.0と30 mg/kg の間ではほぼ用量に比例した。クリアランス（CL）は低用量で高い値を示す傾向であった（0.3 mg/kg 群の5.7 ± 0.2 mL/day/kg に対し、3.0及び30 mg/kg 群ではそれぞれ4.2 ± 0.4及び3.7 ± 0.1 mL/day/kg）。消失半減期（$t_{1/2}$）も用量依存性を示し、ADA の有無にかかわらず、30 mg/kg 群の $t_{1/2}$（約10日）は3.0及び0.3 mg/kg 群の $t_{1/2}$（約4～6日）より長かった。サルの単回投与時の PK データの概要を[2.6.5.3.1 項]に示す。

MK-3475の TK を反復投与毒性試験の2試験で評価した[2.6.7.2 項] [2.6.7.3 項]。1ヵ月間反復投与試験では、カニクイザル（雄6匹、雌6匹）に6、40又は200 mg/kg の用量で週1回、合計5回静脈内投与した後、4ヵ月間の回復期間を設けた。TK パラメータは初回及び5回目の投与後7日間の間隔で算出した。MK-3475の6 mg/kg 群の12匹中7匹及び40 mg/kg 群の12匹中1匹が ADA 陽性であり、これらの動物では CL の増加が認められた。ADA 陰性動物の $t_{1/2}$の平均は全用量で15.7～22.3日であった。投与後7日間の曝露量に性差は認められず、曝露量は用量の増加に伴って増加した。初回投与後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-7 days}}$ は試験した用量範囲においてほぼ用量比例性を示した。また、5回目の投与後7日間の曝露量は初回投与後よりも大きかった（最大5.58倍）。サルの1ヵ月間反復投与

C Confidential

TK データの概要を[2.6.5.3.2 項]に示す。

6ヵ月間反復投与試験では、カニクイザル（雄5匹、雌5匹）に6、40又は200 mg/kg の用量で2週に1回、合計12回静脈内投与した後、4ヵ月間の回復期間を設けた。TK パラメータは初回（1日目）、6回目（71日目）及び11回目（141日目）の投与後14日間の間隔で算出した。MK-3475の6 mg/kg 群の10匹中5匹で投与期間中の43、71又は99日目に ADA 陽性で、これらの動物では MK-3475の CL の増加が認められた。ADA 陰性動物について最終投与（155日目の12回目投与）後に $t_{1/2}$を求めた。$t_{1/2}$の平均は全用量で21～22日であった。MK-3475の曝露量に性差は認められなかった。ADA 陽性動物以外の1、71及び141日目の平均 $AUC_{0\text{-}14\ days}$ 及び平均 C_{max} は、1日目の6と40 mg/kg の間でわずかに用量比を上回ったことを除けば、全用量においてほぼ用量比例性を示した。71日目の6回目の反復投与後14日間の曝露量は初回投与後の値と比較してわずかに増加した（最大1.8倍）。サルの6ヵ月間反復投与 TK データの概要を[2.6.5.3.3 項]に示す。

2.4.3.3　分布

ICH S6（R1）のガイダンス「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」に従い、MK-3475の組織分布試験は実施していない。

2.4.3.4　代謝

ICH S6（R1）のガイダンス「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」に従い、MK-3475について従来の代謝試験は実施していない。

MK-3475が Fab アーム交換をしないことを確認するための in vivo 試験を実施した。MK-3475は S228P 変異によって Fab アーム交換を防ぐようにデザインされている[資料4.3: 17]。C.B17 SCID マウスに MK-3475と抗 PCSK9 IgG4野生型分子（抗 PCSK9 wt）の混合物を投与し、ハイブリッド（二重特性）抗体の形成を調べた。その結果、MK-3475は他の IgG4分子とハイブリッド分子を形成しなかったが、対応する野生型 IgG4分子（抗 PCSK9 wt と抗 PD-1 wt）は in vivo でハイブリッド抗体を生成した。この結果は、Fab アーム交換が IgG4のコアヒンジ領域における点突然変異体（S228P）によって十分に防ぎうるという予想と一致した。この in vivo 試験結果は[2.6.5.5.1 項]に記載した。

2.4.3.5　排泄

ICH S6（R1）のガイダンス「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」に従い、MK-3475の排泄試験は実施していない。

2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用

MK-3475が薬物動態学的薬物相互作用（DDI）を受ける又は誘発することを評価する非臨床薬物動態試験は実施していない。MK-3475は IgG 分子であるため、蛋白分解経路で消失する。チトクロム P450（CYP）及び他の代謝酵素に影響を与える薬物は IgG 代謝に影響を与えないと考えられる。また、一般に IgG は、薬物の消失に関与する CYP、その他の代謝酵素及びトランスポータ

C Confidential

一の発現を直接阻害又は誘導しない。さらに、in vitro 試験及び非臨床の動物試験は、治療用蛋白質のヒトでの DDI の予測には有用ではないことが示されている[資料4.3: 16]。

2.4.3.7　その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施されていない。

2.4.4　毒性試験

MK-3475の毒性試験としては、カニクイザルの1ヵ月及び6ヵ月間反復投与長期毒性試験（4ヵ月間の回復期間を設定）並びにヒト及びカニクイザルの正常組織における組織交差反応性試験の4試験を実施した。MK-3475の毒性試験の一覧表を[2.6.7.1 項]に示す。すべての毒性試験で同一ロットの毒性試験用被験物質（ロット: [redacted]、Union 施設（Merck Research Laboratories, Union, New Jersey, U.S.）において[redacted] L 規模で製造）を用いた。本被験物質は、10 mM ヒスチジン、7%（w/v）スクロース及び0.02%（w/v）ポリソルベート80（pH 5.5）で調製した25 mg/mL MK-3475として供給された。毒性試験で用いた被験物質のロットを原薬の規格とともに[2.6.7.4 項]に示す。さらに、抗 PD-1抗体の投与により、ワクチン接種及びリコール反応後における免疫関連の毒性を検討するために、マウスモデルを用いた T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験を実施した。

2.4.4.1　単回投与毒性試験

独立した MK-3475の単回投与毒性試験は実施していない。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

MK-3475の全身毒性を、4ヵ月間の回復期間を設定したカニクイザルの1ヵ月間反復投与毒性試験[2.6.7.7A 項]及び4ヵ月間の回復期間を設定したカニクイザルの6ヵ月間反復投与毒性試験[2.6.7.7B 項]で評価した。

1ヵ月間毒性試験では、カニクイザルに MK-3475を6、40又は200 mg/kg の用量で週1回、合計5回静脈内投与した。試験5週時に各群雌雄各4匹を中間屠殺し、残りの各群雌雄各2匹は4ヵ月間の回復期間後の試験23週時に最終屠殺した。本試験でのサルにおける MK-3475の忍容性は良好であり、試験期間中の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}7d}$）は最大で約170,000 μg•day/mL であった。被験物質に関連した死亡は認められず、被験物質に関連した変化は200 mg/kg 群の雄における鼠径部腫脹の発現頻度の増加及び脾臓重量の増加のみであった。両所見には対応する病理組織学的変化は認められず、いずれも毒性ではないと考えられた。脾臓重量は回復期間終了後に実施された剖検では異常は認められなかった。ADA は6 mg/kg 群の7匹（12匹中）及び40 mg/kg 群の1匹（12匹中）に検出され、MK-3475の CL の明らかな増加を伴っていた。しかし、MK-3475の標的分子への十分な結合が（低用量群の1匹を除き）試験期間を通して認められており、低用量群の複数のサル及び中用量群の1匹における ADA の存在は薬力学的効果に影響を与えなかった。また、高用量群のいずれのサルにも ADA が検出されなかったことから、本試験では MK-3475の高曝露量での毒性は十分に評価されたといえる。本試験で被験物質に関連した毒性は認められなかったため、無毒性量

C Confidential

は200 mg/kg 以上であった。この無毒性量における曝露量は、ヒトに2週に1回投与したときの最高予想曝露量 $AUC_{(0\text{-}tau)}$の47倍に相当した。

6ヵ月間毒性試験では、カニクイザルに MK-3475を6、40又は200 mg/kg の用量で2週に1回、約6ヵ月間（合計12回）静脈内投与した後、4ヵ月間の回復期間を設けて、全身毒性を評価した。6ヵ月間の投与期間終了時（試験23週時の最終投与後3日目）に各群雌雄各3匹を中間剖検に供し、残りのサルは4ヵ月間の回復期間後に最終剖検に供した。MK-3475の忍容性はすべての用量で良好であり、試験期間中の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}14d}$）は最大で約67,500 μg•day/mL であった。被験物質に関連した検査所見、心電図変化、眼科的所見、及び投与部位の変化はいずれも認められなかった。また、中間及び最終剖検では、被験物質との関連性が特定された病理検査所見は確認されなかった。ADA は、投与期間中、6 mg/kg 群の5匹（10匹中）で観察され、これらの動物では投与に関連した MK-3475の消失速度の明らかな上昇が認められた。40及び200 mg/kg 群では、投与期間中、ADA は検出されなかった。回復期間中には、投与期間中から ADA 陽性であった6 mg/kg 群の2匹並びに投与期間中は ADA 陰性であった200 mg/kg 群の1匹に ADA が検出された。ADA が検出されても試験期間中の MK-3475投与群の平均全身曝露量にほとんど影響はみられなかった。また、検査したいずれの毒性評価パラメータにも被験物質との関連性が特定された変化は認められず、中用量群及び高用量群で投与期間中に ADA を発現したサルもいなかったことから、ADA の検出は6ヵ月間の試験期間中の MK-3475の毒性評価に影響を与えなかった。中用量群及び高用量群では薬物濃度が高かったため ADA の検出が阻害された可能性は否定できないが、中用量群及び高用量群のほとんどの動物では PK プロファイルは予想されたとおりであり、未検出の ADA があったとしてもその影響は小さいものと考えられる。以上、MK-3475をカニクイザルに2週に1回、6ヵ月間投与したときの忍容性は良好で、無毒性量は200 mg/kg（試験した最高用量）以上であった。この無毒性量における曝露量は、ヒトに2週に1回投与したときの最高予想曝露量 $AUC_{(0\text{-}tau)}$の19倍に相当した。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

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

2.4.4.4　がん原性試験

MK-3475のがん原性試験は、ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」では進行がん患者の治療を目的とする医薬品については要求されていないため、実施していない。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

MK-3475の生殖発生毒性試験は、妊娠に対して、MK-3475の作用機序に基づく有害な影響を及ぼすリスクを示す情報があることから実施していない[資料4.3: 19][資料4.3: 20]。

C Confidential

PD-1/PD-L1経路は、抑制性 T 細胞共刺激経路として、自己組織及び異物組織に対する免疫寛容の維持に中心的機能を果たしている。PD-1/PD-L1経路の役割は異系胎児に対する免疫寛容の維持であり、妊娠において必須とされるものである。子宮胎盤接合部に発現している PD-L1分子は、受胎産物を母体の T 細胞性免疫から効果的に保護している。PD-L1シグナル伝達が効果的に阻害されると、母体胎児間免疫寛容が無効になり、胎児吸収が増加することが同種異系交配のマウスモデルで示されている。通常は、母体の PD-1発現 T 細胞の同種異系胎児に対する免疫応答は免疫チェックポイントにより抑制されているが、妊娠の転帰は、このチェックポイントがブロックされると影響を受け、また胎児の異系性の程度により影響を受ける。さらに、PD-1は父由来抗原特異的 T 細胞のアポトーシスを誘発し、T 細胞数を制御することにより、母体胎児間免疫寛容における役割を担っている。これまでに実施された臨床試験に基づくと、臨床用量の MK-3475が投与された患者では、標的との十分な結合が達成されており、薬理学的抗腫瘍活性が十分に認められている。したがって、妊娠に対する潜在的に有害な影響（流産や死産）と免疫介在性の腫瘍退縮とは関連しているため、妊娠したがん患者へ PD-1阻害剤を投与する場合には、薬理学的に有効な曝露量で妊娠に対する有害な影響が発生する可能性がある。

ICH S6（R1）のガイドラインによれば、「受胎能や胎児への有害作用を示唆する十分な科学的根拠（例えば、作用機序、遺伝子改変動物の表現型、クラスエフェクト）から、リスクコミュニケーションに必要な生殖発生に関する十分な情報が得られる場合には、必ずしも追加の非臨床試験は必要でない」とされている。

2.4.4.6　局所刺激性試験

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

2.4.4.7　その他の毒性試験

2.4.4.7.1　抗原性試験

MK-3475の抗原性（免疫原性）は、1ヵ月及び6ヵ月間反復投与毒性試験の一部として評価した。抗 MK-3475抗体（ADA）は、複数の動物で検出された。抗 MK-3475反応に関連した毒性学的な観察所見や変化はなく、抗 MK-3475抗体の TK パラメータへの影響はほとんどなかった[2.6.7.7A 項] [2.6.7.7B 項]。通常の反復投与毒性試験では、MK-3475によって誘発された抗原性に起因すると考えられる観察所見や変化は認められなかった。

2.4.4.7.2　免疫毒性試験

MK-3475は、PD-1とそのリガンドである PD-L1及び PD-L2との相互作用を阻害して、腫瘍浸潤リンパ球の機能的な活性を強化し、腫瘍を退縮させ、最終的には腫瘍に対する免疫拒絶反応を促

C Confidential

進させるように設計されている。すなわち、MK-3475は、末梢での免疫寛容を制御するPD-1経路に影響することにより、免疫調節機能を発揮する。MK-3475の免疫毒性の評価は、「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」（ICH S8）で推奨された方法に準拠して、カニクイザルの1ヵ月及び6ヵ月間反復投与毒性試験に含めて実施した[2.6.7.7A 項] [2.6.7.7B 項]。これらの試験結果からは、自己免疫性又は炎症性の毒性や、リンパ組織に対する毒性は示されなかった。また、これらの試験では、血液学的検査、臓器重量並びに肉眼的及び病理組織学的検査で総合的に評価しており、MK-3475に免疫毒性の懸念は認められなかったことから、新たな免疫毒性試験を実施する必要はないと考えられた。

さらに、MK-3475の作用機序に関連して、ワクチン接種後に免疫反応が変化する可能性を検討するために、代替抗体である抗マウスPD-1抗体を用いて、マウスモデルでのT細胞依存性抗体産生（TDAR）試験を実施した[2.6.7.17C 項]。

この試験では、muDX400 5 mg/kgの単回又は反復（週1回で合計5回投与）皮下投与による、B型肝炎ワクチンの初回接種及びリコール（2回目の接種）抗体反応の程度及び動態への影響を溶媒対照と比較して評価した。免疫毒性の評価は、死亡数と一般状態の観察、体重、血液学的所見、サイトカイン、試験10、18、27、34及び50日目における抗B型肝炎ワクチン（抗HBsAg）抗体の血清中濃度、肉眼的病理評価、及び脾臓細胞のイムノフェノタイピングに基づいて実施した。また、muDX400の薬物濃度及びmuDX400の抗薬物抗体を測定した。

B型肝炎ワクチンは、3投与群（溶媒対照、muDX400単回投与、muDX400反復投与）のいずれに対しても免疫原性があり、2回目のワクチン接種後にブーストされた抗B型肝炎ワクチン抗体価を誘導し、その抗体価は典型的なワクチン抗体反応の動態を示して経時的に上昇した。個々のマウスで測定された抗体価の変動は比較的大きかったが、3投与群の幾何平均抗体価に有意差は認められず、ワクチンに対する初回及びリコール抗体反応において、muDX400投与群は対照群と比べて同様の動態を示した。

被験物質に関連した死亡、一般症状はなく、また被験物質に関連した体重、血液学的所見、肉眼的病理所見及びサイトカインの変化はなかった。被験物質に関連する脾臓リンパ球の絶対数の軽度な増加（< 30%）が抗PD-1抗体投与マウスに認められたが、B細胞及びT細胞サブセットの割合は変化せず、毒性学的意義はほとんどないものと考えられ、この所見はPD-1ノックアウトマウスでの所見と一致した[資料4.3: 21]。

抗PD-1抗体単回投与群のいずれの動物にも、B型肝炎ワクチンの初回接種の翌日となる試験3日目にはmuDX400への曝露が認められた。抗PD-1抗体反復投与群のいずれの動物にも、試験24日目までmuDX400への曝露が認められ、この期間はB型肝炎ワクチンの初回接種（試験2日目）及びブースト（試験23日目）の期間を含んでいた。各群の抗muDX400抗体は、それぞれ試験24日目と35日目に検出され、この抗体の存在と、試験後半時点での血清中muDX400濃度の低下が概ね関連していた。

2.4.4.7.3　作用機序に関する試験

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

C Confidential

いない。

2.4.4.7.4　依存性試験

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

2.4.4.7.5　代謝物の試験

被験物質分子の性質を考慮し、代謝物の毒性を評価する試験は実施していない。

2.4.4.7.6　不純物の試験

被験物質分子の性質を考慮し、不純物に関する従来の試験は実施していない。MK-3475の毒性試験で用いた原薬及び製剤のロットについて行った主要な純度アッセイ（[redacted]）及び主要な不純物アッセイ（[redacted]）の結果によれば、毒性試験で用いた被験物質の純度は治験薬と非常に類似していた[2.6.7.4 項]。このため、毒性試験に用いた被験物質特有の毒性はないものと推察される。同様に、毒性試験で評価されなかった治験薬特有の不純物もないものと推察される。なお、本被験物質は、ICH Q3A（R2）「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」でも適用対象外とされている。

2.4.4.7.7　その他の試験

2.4.4.7.7.1　組織交差反応性試験

MK-3475の免疫組織化学的交差反応性試験の結果は、カニクイザルとヒトの凍結組織切片間で染色性が全体的によく一致していた[2.6.7.17A,B 項]。単核白血球膜の陽性染色結果は、標的分子との結合であると考えられ、PD-1の既知の生物学的特性及び発現部位に一致していて[資料4.3:22]、ヒト及びカニクイザルの組織の両方で予想どおりに認められた。標的分子以外との交差反応性染色もヒト及びカニクイザルの両方で認められ、様々な組織／細胞の細胞質（ヒト及びサル）、下垂体後葉内細胞外物質（サル）並びに多くの組織の間質（細胞外結合組織基質、ヒト及びサル）が染色性を示した。これらの非標的部位の染色性は、in vitro での組織交差反応性試験の実験方法（免疫組織化学染色における組織処理）によるアーティファクトを示すものであり、in vivo での毒性学的意義はないと考えられた。なお、本試験では適切な同時陽性及び陰性対照の抗体（陰性対照：抗 RSV-IgG4）、組織（陽性対照組織：炎症時のヒト扁桃腺、陰性対照組織：骨格筋）並びにアッセイ対照を用いて試験結果の妥当性を確認した。

以上、ヒト及びカニクイザルの組織を用いた交差反応性試験の結果、予想したとおり、両種の単核白血球膜に標的分子との結合を示す染色性が認められた。両試験で標的分子以外との結合を示す染色（細胞質及び間質）も認められたが、これは実験方法（免疫組織化学染色における組織

C Confidential

処理）によるアーティファクトと考えられるもので、組織交差反応性試験の限界としてよく知られている[資料4.3: 23]。この文献[資料4.3: 23]の著者らは、「抗体及び抗体由来の被験物質の毒性評価において最も重要なのは適切な動物種の in vivo での毒性試験であり、in vivo の毒性試験で得られたデータは in vitro 及び ex vivo のデータに優先されるべきである」と述べている。サルの1ヵ月及び6ヵ月間反復投与試験では、組織交差反応性試験で染色性を示したいずれの組織にも in vivo で毒性は認められなかった[2.6.7.7A 項][2.6.7.7B 項]。このため、in vitro で観察された細胞質及び間質での結合には意味がなく、ヒトでの安全性に対するリスクを示すものではないと考えられる。

2.4.5　総括及び結論

PD-1シグナル伝達系は、活性化された T 細胞による免疫監視機構を腫瘍細胞が回避するために使われる、免疫制御の主要なスイッチ機構である。MK-3475は、PD-1とそのリガンドである PD-L1 及び PD-L2との相互作用を阻害する強力かつ選択性の高いヒト化モノクローナル抗体である。

In vitro 薬理試験では、MK-3475はヒト及びカニクイザルの PD-1に同程度の親和性で結合し、ヒト及びカニクイザルの PD-1と PD-L1及び PD-L2との結合を同程度の強さで阻害することが明らかとなった。MK-3475にはマウス PD-1との交差性はなかった。MK-3475は健康成人ドナー、がん患者及びカニクイザルの培養血液細胞において T 細胞の免疫応答を増強した。重要な点として、MK-3475は T 細胞受容体を介したシグナルの非存在下では T 細胞を活性化しなかったことから、サイトカインを放出させるおそれは小さい。また、IgG4アイソタイプである MK-3475と C1q、CD64（FcγRI）及び CD16a（FcγRIIIa）との結合性は弱かったことより、ADCC や CDC を惹起する可能性も低い。

In vivo 薬理試験では、結腸腺癌同系マウス腫瘍モデルにおいて、単独療法として用いた J43（抗マウス PD-1代替抗体）は腫瘍増殖を抑制し、生存率を上昇させた。また、同じ腫瘍モデルにおいて、J43の効果は5-FU 又はゲムシタビンとの併用で増強された。単独療法として用いたときの J43 の有効性は、急性骨髄性白血病、扁平上皮癌及び B 細胞リンパ腫の同系マウス腫瘍モデルでも認められた。マウス担癌（RENCA-MRL 腎癌）モデルを用いた試験成績より、NSCLC 標準治療で用いられるデキサメタゾンの免疫抑制性作用は、muDX400の抗腫瘍効果を減弱させないことが明らかとなった。さらに、muDX400及び NSCLC 標準治療併用時の抗腫瘍効果は、NSCLC 標準治療のみの場合と比較して高かった。いくつかの組み合わせでは、muDX400との併用により腫瘍の完全退縮が認められた。非臨床試験で用いた腫瘍モデルは、腫瘍の微小環境での投与前の PD-1及び PD-L1発現量に基づいて選択した。したがって、これらの同系モデルにおける免疫応答は主に PD-1/PD-L1経路で制御されており、拮抗作用を有する抗体（抗 PD-1抗体）による PD-1阻害時の作用機序を直接調べることができる。

MK-3475を0.3、3.0又は30 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、MK-3475の曝露量は0.3と3.0 mg/kg の間では用量比をわずかに上回って増加し、3.0と30 mg/kg の間ではほぼ用量に比例した。CL 及び $t_{1/2}$は用量依存性を示し、高用量群では CL が低く、$t_{1/2}$が延長する傾向にあったことから、低用量における標的介在性の薬物消失の関与の可能性が示唆された。ただし、MK-3475の非線形薬物動態については ADA の関与も否定できない。MK-3475を6、40又は200 mg/kg の用量

C Confidential

で週1回（1ヵ月間試験）又は2週に1回（6ヵ月間試験）投与したとき、MK-3475の曝露量に性差は認められず、曝露量は用量の増加に伴って増加した。ADA 陰性動物の C_{max} 及び曝露量は、試験した用量範囲においてほぼ用量比例性を示した。反復投与後の MK-3475の曝露量は1ヵ月間試験では顕著に増加し、6ヵ月間試験ではわずかに増加した。

SCID マウスを用いて実施した in vivo 試験では、MK-3475を野生型 IgG4分子と同時投与したとき、検出可能レベルのハイブリッド抗体は生成されなかった。この結果は、MK-3475の in vitro での詳細な試験結果とも一致しており、ヒンジ領域の228位に S から P への変異を有する MK-3475がヒトにおいて Fab アーム交換をする可能性は低いことを示している。

MK-3475の毒性試験として、カニクイザルに6、40又は200 mg/kg を週1回静脈内投与（合計5回）した1ヵ月間反復投与毒性試験及び、6、40又は200 mg/kg を2週に1回静脈内投与（合計12回）した6ヵ月間反復投与毒性試験を実施した。カニクイザルにおける MK-3475の忍容性は良好で、1ヵ月間試験（週1回投与）の試験期間中の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}7d}$）は最大約170,000 µg•day/mL、6ヵ月間試験（2週に1回投与）の試験期間中の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}14d}$）は最大約67,500 µg•day/mL であった。全身曝露量比を[表2.4: 3]に示す。

表 2.4: 3　MK-3475 の全身曝露量比

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

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

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

C Confidential

2.4.6　参考文献

[資料 4.3: 1] Stebbings R, Findlay L, Edwards C, et al. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. J Immunol. 2007; 179: 3325-31.

[資料 4.3: 2] Greenwood J, Clark M, Waldmann H. Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions. Eur J Immunol. 1993; 23: 1098-104.

[資料 4.3: 3] Gessner JE, Heiken H, Tamm A, et al. The IgG Fc receptor family. Ann Hematol. 1998; 76: 231-48.

[資料 4.3: 4] Hino R, Kabashima K, Kato Y, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. Cancer. 2010; 116: 1757-66.

[資料 4.3: 5] Massi D, Brusa D, Merelli B, et al. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. Ann Oncol. 2014; 25: 2433-42.

[資料 4.3: 6] Boland JM, Kwon ED, Harrington SM, et al. Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung. Clin Lung Cancer. 2013; 14: 157-63.

[資料 4.3: 7] Chen YB, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. Tumori. 2012; 98: 751-5.

[資料 4.3: 8] Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. Clin Cancer Res. 2014; 20: 5064-74.

[資料 4.3: 9] Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. Lab Invest. 2014; 94: 107-16.

[資料 4.3: 10] Zhang Y, Wang L, Li Y, et al. Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. Onco Targets Ther. 2014; 7: 567-73.

[資料 4.3: 11] Yang CY, Lin MW, Chang YL, et al. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes .Eur J Cancer. 2014; 50: 1361-9.

C Confidential

[資料 4.3: 12] Sorensen SF, Zhou W, Dolled-Filhart M, et al. PD-L1 expression and survival among advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with chemotherapy. European Society for Medical Oncology 2014 Congress; September 26-30; Madrid, Spain.

[資料 4.3: 13] Sun JM, Zhou W, Choi YL, et al. PD-L1 expression and survival in patients with non-small cell lung cancer in Korea. American Society of Clinical Oncology annual meeting 2014 May 30-June 3; Chicago, USA.

[資料 4.3: 14] Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes.Int Immunol. 1996; 8: 765-72.

[資料 4.3: 15] Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, et al. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. J Pharmacol Toxicol Methods. 2008; 58: 72-6.

[資料 4.3: 16] Evers R, Dallas S, Dickmann LJ, et al. Critical review of preclinical approaches to investigate cytochrome P450-mediated therapeutic protein drug-drug interactions and recommendations for best practices: a white paper. Drug Metab Dispos. 2013; 41: 1598-609.

[資料 4.3: 17] van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic fab arm exchange. Science. 2007; 317: 1554-7.

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

[資料 4.3: 20] Wafula PO, Teles A, Schumacher A, et al. PD-1 but not CTLA-4 blockage abrogates the protective effect of regulatory T cells in a pregnancy murine model. Am J Reprod Immunol. 2009; 62: 283-92.

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

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

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

C Confidential