# CTD 第 2 部

# 2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

## 2.6.1　緒言

MSD 株式会社

# 目次

頁
2.6.1　緒言 ..... 2



C Confidential

## 2.6.1　緒言

ペムブロリズマブ（遺伝子組み換え）（以下、MK-3475）は、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（mAb）であり、Fc 領域（fragment crystallizable region）に S228P 変異安定化配列を有する IgG4/kappa アイソタイプ抗体である。MK-3475はヒト PD-1（programmed cell death-1：プログラム細胞死-1）と結合し、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。ポリペプチドの理論分子量は146,288 Da、理論 pI 値は7.5である。親抗体であるマウス抗ヒト PD-1抗体（hPD-1.09A）は、マウスに hPD-1 DNA を免疫することにより作製した。MK-3475は、英国医学研究審議会（Cambridge, UK）が相補性決定領域（CDR）移植技術（U.S. Patent No. 5,225,539）を用いて、親抗体をヒト化することにより作製した。MK-3475の重鎖及び軽鎖可変領域並びにヒト IgG4をエンコードする遺伝子セグメントをコドン最適化し、合成し、ベクター内に組み込んだ。

すべての毒性試験で同一ロットの被験薬[redacted]　非臨床用原薬：Union 施設（Merck Research Laboratories, Union, New Jersey, U.S.）において[redacted]L 規模で製造｝を使用した。同ロットは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）を溶媒とする25 mg/mL MK-3475として提供された。

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利用される、免疫制御の主要なスイッチ機構である。MK-3475は、ヒト PD-1と結合し、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よう設計されている。この阻害作用により、MK-3475は、腫瘍退縮を促進するための標的リンパ球の機能的な活性を強化し、最終的には腫瘍に対する免疫拒絶反応を生じさせる。ここで重要なのは、MK-3475が T 細胞を非特異的に活性化することはなく、抗原の存在下でのみ既存の免疫応答を促進することであり、このことは、より特異性の低い免疫療法と一線を画す安全要因となっている。

非臨床 in vitro データより、MK-3475には PD-1に対する高い親和性と受容体阻害活性が認められている。切除不能又は転移性の悪性黒色腫並びに非小細胞肺癌に対する画期的治療として、MK-3475の開発を裏付ける非臨床薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の成績を、2.6項の以下の各項に要約して述べる。MK-3475については、局所進行性又は転移性の悪性黒色腫患者を対象に、10 mg/kg までの用量で2又は3週間に1回の静脈内投与による評価を実施している。MK-3475の非臨床プロファイルは、この用量での MK-3475の安全性を裏付けている。



C Confidential

# CTD 第 2 部

# 2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

# 2.6.2　薬理試験の概要文

MSD 株式会社

# 目次

頁
表一覧 2
図一覧 3
略号及び用語の定義 4
2.6.2.1　まとめ 5
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 8
2.6.2.2.1　In vitro 試験 8
2.6.2.2.1.1　結合親和性及びリガンド結合阻害 8
2.6.2.2.1.2　T 細胞機能調節能への影響 10
2.6.2.2.1.2.1　ブドウ球菌エンテロトキシン B（SEB）によるヒト T 細胞応答における増強作用 10
2.6.2.2.1.2.2　破傷風トキソイド（TT）接種によるヒト T 細胞リコール応答における増強作用 12
2.6.2.2.1.3　種交差反応性 13
2.6.2.2.1.4　免疫系に対する直接的な刺激作用 14
2.6.2.2.1.5　補体成分及び Fc 受容体との結合性 16
2.6.2.2.1.6　作用機序 17
2.6.2.2.1.6.1　悪性黒色腫及び NSCLC での PD-1、PD-L1及び PD-L2の発現 17
2.6.2.2.1.6.2　PD-L1の発現と抗 PD-1療法の抗腫瘍効果との関係 21
2.6.2.2.2　In vivo 試験 22
2.6.2.2.2.1　代替抗体 J43及びマウス化 DX400（muDX400）について 22
2.6.2.2.2.2　腫瘍モデルの選択 24
2.6.2.2.2.3　マウスの MC38同系腫瘍モデルでの J43の有効性 24
2.6.2.2.2.3.1　MC38同系腫瘍モデルでの J43単独療法の有効性 24
2.6.2.2.2.3.2　MC38同系腫瘍モデルでの J43及び5-FU 併用時の有効性 26
2.6.2.2.2.3.3　MC38同系腫瘍モデルでの J43及びゲムシタビン併用時の有効性 28
2.6.2.2.2.4　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 30
2.6.2.2.2.5　トランスレーショナルモデリング&シミュレーションに用いた試験 32
2.6.2.3　副次的薬理試験 32
2.6.2.4　安全性薬理試験 32
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験 32
2.6.2.6　考察及び結論 32
2.6.2.7　参考文献 34



C Confidential

# 表一覧

頁

表2.6.2: 1　MK-3475の非臨床薬理試験一覧 ..... 6
表2.6.2: 2　非臨床薬理試験に用いた MK-3475のロット番号 ..... 7
表2.6.2: 3　固相干渉法による PD-1-Fc に対する MK-3475の結合親和性 ..... 8
表2.6.2: 4　表面プラズモン共鳴法による PD-1-Fc に対する MK-3475の結合親和性 ..... 9
表2.6.2: 5　結合平衡除外法による PD-1-Fc に対する MK-3475の結合親和性 ..... 9
表2.6.2: 6　PD-1及び PD-L1/PD-L2に対する MK-3475の結合阻害 ..... 10
表2.6.2: 7　C1q、CD64（FcγRI）及び CD16a（FcγRIIIa）の入手先 ..... 16
表2.6.2: 8　MK-3475、IgG1及び IgG4と C1q、CD64（FcγRI）及び CD16a（FcγRIIIa）との結合性 ..... 17
表2.6.2: 9.　文献による悪性黒色腫及び NSCLC での PD-L1の発現 ..... 17
表2.6.2: 10.　J43及び muDX400の生物学的特徴の比較 ..... 23
表2.6.2: 11.　マウス担癌モデルでの PD-1及び PD-L1発現と PD-1阻害に対する反応性 ..... 24
表2.6.2: 12.　MC38同系腫瘍モデルでの J43単独療法の阻害効果（統計解析） ..... 25
表2.6.2: 13.　MC38同系腫瘍モデルでの J43及び5-FU 併用時の阻害効果（統計解析） ..... 27
表2.6.2: 14.　MC38同系腫瘍モデルでの J43及びゲムシタビン併用時の阻害効果（統計解析） ..... 29



Confidential

# 図一覧

頁

図2.6.2: 1　健康成人ドナー血液細胞での SEB 誘発 IL-2産生に対する MK-3475の増強作用 ..... 11
図2.6.2: 2　がん患者の血液細胞での SEB 誘発 IL-2産生に対する MK-3475の増強作用 ..... 12
図2.6.2: 3　破傷風トキソイド刺激依存性の IFNγ 産生に対する MK-3475の増強作用 ..... 13
図2.6.2: 4　カニクイザル血液細胞での IL-2産生に対する MK-3475の増強作用 ..... 14
図2.6.2: 5　ヒト血液の IL-2産生への MK-3475の影響 ..... 15
図2.6.2: 6　ヒト血液の急激な IL-2産生への固定化 MK-3475の影響 ..... 15
図2.6.2: 7　悪性黒色腫及び NSCLC での PD-1の発現 ..... 18
図2.6.2: 8　悪性黒色腫及び NSCLC での PD- L1の発現 ..... 19
図2.6.2: 9　悪性黒色腫及び NSCLC での PD- L2の発現 ..... 19
図2.6.2: 10　悪性黒色腫及び NSCLC での腫瘍浸潤性 CD8+及び CD4+リンパ球の PD-1発現 ..... 20
図2.6.2: 11　NSCLC での腫瘍浸潤性骨髄性細胞の PD-L1及び PD-L2の発現 ..... 21
図2.6.2: 12　MC38同系腫瘍モデルでの J43単独療法の阻害効果 ..... 25
図2.6.2: 13　MC38同系腫瘍モデルでの J43単独療法による生存率 ..... 26
図2.6.2: 14　MC38同系腫瘍モデルでの J43及び5-FU 併用時の阻害効果 ..... 27
図2.6.2: 15　MC38同系腫瘍モデルでの J43及び5-FU 併用時の生存率 ..... 28
図2.6.2: 16　MC38同系腫瘍モデルでの J43及びゲムシタビン併用時の阻害効果 ..... 29
図2.6.2: 17　MC38同系腫瘍モデルでの J43及びゲムシタビン併用時の生存率 ..... 30



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 |
| ADCC | Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity | 抗体依存性細胞傷害 |
| BSA | Bovine serum albumin | ウシ血清アルブミン |
| CDC | Complement-Dependent Cytotoxicity | 補体依存性細胞傷害 |
| $EC_{50}$ | Half-Maximal Effective Concentration | 50%効果濃度 |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay | 酵素結合免疫吸着 |
| Fc | Fragment, Crystallizable | 結晶性フラグメント |
| 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 |
| IGF-1R | Insulin-like growth factor 1 receptor | インスリン様成長因子1受容体 |
| IgG | Immunoglobulin G | 免疫グロブリン G |
| IL | Interleukin | インターロイキン |
| $k_{assoc}$ | Association-Rate Constant | 結合速度定数 |
| $K_D$ | Dissociation Constant | 解離定数 |
| $k_{dissoc}$ | Dissociation-Rate Constant | 解離速度定数 |
| mAb | Monoclonal Antibody | モノクローナル抗体 |
| MHC | Major Histocompatibility Complex | 主要組織適合遺伝子複合体 |
| NA | Not Applicable | 該当せず |
| ND | Not Done | 測定せず |
| NSCLC | Non-Small Cell Lung Carcinoma | 非小細胞肺癌 |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cell | 末梢血単核細胞 |
| PBS | Phosphate-buffered saline | リン酸緩衝食塩水 |
| PD-1 | Programed Cell Death-1 | プログラム細胞死-1 |
| SEB | *Staphylococcus* Enterotoxin B | ブドウ球菌エンテロトキシン B |
| SEM | Standard Error of the Mean | 標準誤差 |
| TT | Tetanus Toxoid | 破傷風トキソイド |



C Confidential

### 2.6.2.1　まとめ

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。ペムブロリズマブ（遺伝子組み換え）［(以下、MK-3475（SCH 900475とも記載)］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ヒト化モノクローナル抗体（mAb）である。

MK-3475について実施した非臨床薬理試験の内容を以下に示す。

- 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
- 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

報告書との相関を示したMK-3475の非臨床薬理試験の一覧を[表2.6.2: 1]に、また、非臨床薬理試験に用いたMK-3475のロット番号を[表2.6.2: 2]に示す。



Confidential

表 2.6.2: 1　　MK-3475 の非臨床薬理試験一覧

| 非臨床薬理試験 | 報告書 | |
|---|---|---|
| | Study No. | Study Title |
| 結合親和性及びリガンド結合阻害 | PD001[a] (PA 0070) | PD001 Ammendment 1: Biophysical Characterization of Humanized Anti-Human PD-1 Monoclonal Antibodies – Binding and Ligand Blockade |
| T 細胞機能調節能への影響 | 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 |
| 種交差反応性 | 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 |
| 免疫系に対する直接的刺激作用 | PD004 (SN [redacted]121) | Ex Vivo Biological Activity of Humanized Anti-Human PD-1 Monoclonal Antibody SCH 900475 |
| 補体成分及び Fc 受容体との結合性 | PD005 (SN [redacted]122) | Pharmaceutical Sciences Technical Report: Biological Characterization of SCH 900475 |
| 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 | PD006 (SN [redacted]546) | Assessment of Anti-Tumor Activity of Anti-Mouse PD-1 Antibody, J43, in Syngeneic Mouse Tumor Models |
| トランスレーショナルモデリング&シミュレーションに用いた試験 | PD007 | Source Data Supporting Translational Modeling & Simulation Analyses |
| | PD008 | Generation and Characterization of Anti-Mouse PD-1 Antibody DX400 and Murinized DX400 |
| | 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” |
| | PD012 | Amendment 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” |
| 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 | 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 |

[a] PD001の修正：Amendment 1（PD001 PA-0070）。PD 001 Amendment 1の添付資料には、修正前の PD001 SN [redacted]545 が含まれる。
MK-3475は SCH 900475又は ORG 307488-0とも記載されている。
[2.6.3.1項]



C Confidential

表 2.6.2: 2　　非臨床薬理試験に用いた MK-3475 のロット番号

| Study No. | Lot No. | Type of Batch | Site | Scale (L) |
|---|---|---|---|---|
| PD001 (PA-0070) | [redacted] | Research batches | [redacted] | NA |
| PD002 (SN [redacted]545) PD012 | [redacted] | Research batches | Former research site at [redacted] | NA |
| PD003 (SN [redacted]536) | [redacted] | Research batch | [redacted] | NA |
| PD004 (SN [redacted]121) | [redacted] | Research batches | Former research site at [redacted] | NA |
| | [redacted] | Research batches | [redacted] | NA |
| PD005 (SN [redacted]122) | [redacted][a] | Pre-clinical Drug Substance | [redacted] | 500 |
| | [redacted] | Process Development batches | [redacted] | 500 |
| | [redacted] | Research batches | [redacted] | NA |
| | [redacted] | Engineering batch | [redacted] | NA |
| | [redacted] | Clinical Drug Substance | [redacted] | 2000 |
| | [redacted] | Clinical Drug Product | [redacted] | 14 |
| PD006 (SN [redacted]546) [c] PD011 | NA | NA | NA | NA |
| PD007 [d] | NA | NA | NA | NA |
| PD013 [d] | NA | NA | NA | NA |

NA＝ 該当せず。No. ＝ 番号

a [redacted]と[redacted]は同一物質であるが、調製方法が異なり、[redacted]は10 mM ヒスチジン（pH 5.5）で調製し、[redacted]は10 mM ヒスチジン、7%スクロース及び0.02%ポリソルベート80（pH 5.5）で調製した。

b 10 mM ヒスチジン、7%スクロース及び0.02%ポリソルベート80（pH 5.5）で調製した。工程 A によるもので、[redacted]の施設で製造した原薬を[redacted]の施設で凍結乾燥製剤の50 mg バイアルとした。

c PD006（[redacted]546試験）では市販の抗体試薬 J43を使用した。

d 抗マウス PD-1代替抗体を用いた試験。

[2.6.3.1項]



Confidential

### 2.6.2.2　効力を裏付ける試験

#### 2.6.2.2.1　In vitro 試験

##### 2.6.2.2.1.1　結合親和性及びリガンド結合阻害

[資料4.2.1.1.1: PD001]

結合親和性の測定に国際的な統一手法は存在していない。一般的に使用されている表面プラズモン共鳴法、固相干渉法及び結合平衡除外法には、それぞれ有利な点と不利な点が認められている。ヒト PD-1に対する MK-3475の結合親和性については、ForteBio 社の Octet システムによる固相干渉法[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.1: PD001]、BIAcore 社の表面プラズモン共鳴法及び KinExA による結合平衡除外法[資料4.2.1.1.5: PD005]を用いて検討した[2.6.3.1項]。

Octet の固相干渉法を用いて算出したヒト PD-1に対する MK-3475の解離定数（$K_D$）は29 pM [表2.6.2: 3]であった。これは、MK-3475の異なる濃度（10、20、40及び80 nM）の数値データセットを4セット集計した結果である。なお、これら4セットの結合キネティクスは見かけ上の一次反応に、また、解離は1次の指数関数減衰にフィットさせた。ForteBio 社のソフトウェアによるグローバルフィッティングより、結合速度定数（$k_{assoc}$）及び解離速度定数（$k_{dissoc}$）を算出し、$k_{dissoc}$／$k_{assoc}$の比から $K_D$ 値を求めた。グローバルフィッティングは、1回の試験で測定した複数の結合曲線について同時に解析を行い、その相互作用について最もフィッティングが良好な1つの $K_D$ 値を求める際に用いられる確立された手法である。

Biacore 社の表面プラズモン共鳴法による試験では、異なるロットの MK-3475を用いた[表2.6.2: 4]。ほとんどのロットは、結合定数及び解離定数に類似が認められ、$K_D$ 値は約50 pM であった。KinExA の結合平衡除外法による試験は、Biacore 社の試験に用いたのと同じロットで実施した[表2.6.2: 5]。KinExA により得られた $K_D$ 値は0.4～1.9 pM の範囲であった。

以上、結合親和性について3つの異なる方法を用いて求めたが、いずれの結果でも MK-3475は PD-1に対して高い親和性を有する抗体であることが示された。

表 2.6.2: 3　　固相干渉法による PD-1-Fc に対する MK-3475 の結合親和性

| | $k_{assoc}$ (1/s) | $k_{dissoc}$ (1/Ms) | $K_D$ (pM) |
|---|---|---|---|
| Human | $1.04 \times 10^{6}$ | $3.05 \times 10^{-5}$ | 29 |
| Cynomolgus monkey | $2.05 \times 10^{6}$ | $2.42 \times 10^{-5}$ | 118 |

ヒト及びカニクイザルとも1試験の値を示す。
$k_{assoc}$ = 結合速度定数; $K_D$ = 解離定数; $k_{dissoc}$ = 解離速度定数
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.1: PD001]



C Confidential

表 2.6.2: 4　　表面プラズモン共鳴法による PD-1-Fc に対する MK-3475 の結合親和性

| Batch | Test | $k_{on} \times 10^5$ ($M^{-1}$ $s^{-1}$) | $k_{off} \times 10^{-5}$ ($s^{-1}$) | $K_D$ (pM) ± SD (pM) |
|---|---|---|---|---|
| [redacted] | DS | 8 | 4 | 51 ± 6 |
| | TA | 7 | 4 | 56 ± 1 |
| | DS | 7 | 4 | 55 ± 1 |
| | TA | 7 | 4 | 56 ± 4 |
| | DS | 8 | 5 | 55 ± 4 |
| | TA | 10 | 5 | 50 ± 5 |
| | Pre-lyo | 8 | 4 | 50 ± 5 |
| | Lyo | 8 | 4 | 54 ± 4 |
| | MCB DS | 9 | 5 | 54 ± 2 |
| | DP | 8 | 2 | 26 ± 2 |
| | DP-Lyo | 8 | 2 | 26 ± 1 |
| | DS | 10 | 5 | 48 ± 1 |
| | DS | 10 | 5 | 45 ± 1 |
| | DS | 9 | 4 | 52 ± 4 |
| | DS | 8 | 4 | 51 ± 4 |
| | DP | 6 | 5 | 94 ± 10 |

DP = 製剤; DP-Lyo = 凍結乾燥製剤; DS = 原薬; $K_D$ = 解離定数;
$k_{off} = k_{dissoc}$ =解離速度定数; $k_{on} = k_{assoc}$ =結合速度定数; Lyo = 凍結乾燥; M = molar;
MCB-DS = 原薬のマスターセルバンク; pM = picomolar; Pre-Lyo = pre-lyophilized; s = seconds; SD = 標準偏差; Test = 被験試料; TA = 被験物質又は毒性試験に用いたロットの試料
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.5: PD005]

表 2.6.2: 5　　結合平衡除外法による PD-1-Fc に対する MK-3475 の結合親和性

| Batch | Test | $K_D$ (pM) | 95% Confidence Intervals for $K_D$ (pM) | ABC% |
|---|---|---|---|---|
| [redacted] | DS | 0.6 | 0.3 – 1.0 | 80.8 |
| | TA | 1.4 | 0.8 – 2.1 | 77.6 |
| | DS | 1.5 | 0.6 – 2.7 | 73.9 |
| | TA | 1.0 | 0.6 – 1.6 | 83.7 |
| | DS | 1.0 | 0.4 – 1.9 | 83.6 |
| | TA | 1.3 | 0.5 – 2.4 | 88.1 |
| | Pre-lyo | 1.2 | 0.5 – 2.2 | 87.6 |
| | Lyo | 1.0 | 0.4 – 1.8 | 79.8 |
| | MCB DS | 0.4 | 0.0 – 1.3 | 98.8 |
| | DP | 1.4 | 0.6 – 2.5 | 67.7 |
| | DP-Lyo | 1.6 | 0.6 – 3.2 | 79.6 |
| | DS | 1.1 | 0.1 – 3.4 | 87.0 |
| | DS | 0.7 | 0.0 – 1.4 | 91.8 |
| | DS | 1.9 | 0.1 – 4.4 | 91.9 |
| | DS | 1.5 | 0.6 – 2.5 | 88.2 |
| | DP-Lyo | 0.7 | 0.2 – 1.3 | 98.4 |

1:　これらの試料は反復測定した。数値は $K_D$ 平均値、反復測定の最大信頼区間及び能動結合濃度の平均%
ABC% =能動結合濃度の平均%; DP = 製剤; DP-Lyo = 凍結乾燥製剤; DS = 原薬; $K_D$ =解離定数; Lyo = 凍結乾燥;
MCB-DS =原薬のマスターセルバンク;
pM = picomolar; Pre-Lyo = pre-lyophilized; Test = 被験試料; TA =被験物質又は毒性試験に用いたロットの試料
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.5: PD005]

MK-3475のヒト及びカニクイザル PD-1との $K_D$ を、固相干渉法を用いて速度論的定数を基に算



Confidential

出した[2.6.3.1項] [資料4.2.1.1.1: PD001]。ヒト及びカニクイザルの PD-1に対する MK-3475の結合親和性は同程度であった[表2.6.2: 3]。

ヒト及びカニクイザルの PD-1と PD-L1及び PD-L2との結合に対する MK-3475の阻害能を、競合的結合アッセイにより測定した[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.1: PD001]。ヒト及びカニクイザルの PD-1と PD-L1及び PD-L2との結合に対する MK-3475の阻害は同程度であった[表2.6.2: 6]。

表 2.6.2: 6　　PD-1 及び PD-L1/PD-L2 に対する MK-3475 の結合阻害

| | PD-L1<br>$IC_{50}$ (pM) (± SEM) | PD-L2<br>$IC_{50}$ (pM) (± SEM) |
|---|---|---|
| Human | 625 (130) | 695 (360) |
| Cynomolgus monkey | 721 (150) | 762 (200) |

独立した3試験の平均値を示す。
$IC_{50}$ = 50%阻害濃度; SEM = 標準誤差。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.1: PD001]

### 2.6.2.2.1.2　T 細胞機能調節能への影響

[資料4.2.1.1.2: PD002]

#### 2.6.2.2.1.2.1　ブドウ球菌エンテロトキシン B（SEB）によるヒト T 細胞応答における増強作用

T 細胞の活性に対する MK-3475の調節能を、健康成人又はがん患者の末梢血を用いて in vitro で評価した [2.6.3.1項][資料4.2.1.1.2: PD002]。

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 分子と T 細胞受容体の Vβ 領域と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（血液ドナーの Vβ3、Vβ12、Vβ14及び Vβ17を有する T 細胞の割合に依存）。

健康成人ドナーの末梢血を希釈して MK-3475又はヒト免疫グロブリン G（IgG）4アイソタイプ対照抗体（両抗体とも0及び0.00025～25 μg/mL）で30～60分間プレインキュベーションした後、SEB（0.1 μg/mL）で最長4日間刺激した。刺激後、上清中に分泌された IL-2の濃度を酵素結合免疫吸着（ELISA）及び各種サイトカイン測定キットを用いて測定した。MK-3475は最高濃度（25 μg/mL）で IL-2産生を3～4倍増強した[図2.6.2: 1]。


Confidential

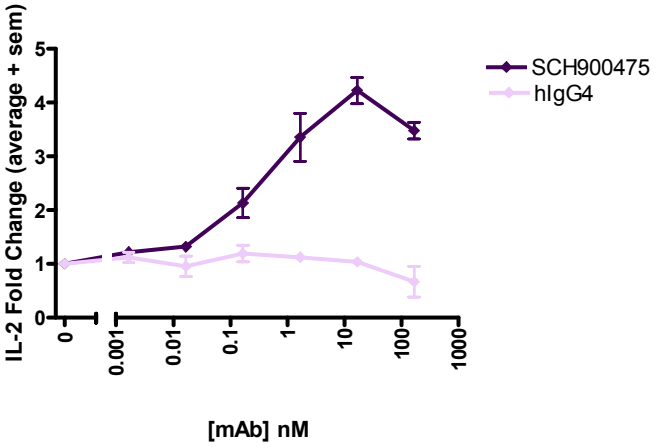



図 2.6.2: 1　　健康成人ドナー血液細胞での SEB 誘発 IL-2 産生に対する MK-3475 の増強作用

健康成人ドナーの末梢血を希釈し、MK-3475（図中では SCH900475）又はヒト IgG4アイソタイプ対照抗体（hIgG4）で30～60分間プレインキュベーションした後、SEB で最長4日間刺激した。IL-2濃度を正規化し、抗体存在下の IL-2産生濃度を抗体非存在下の IL-2産生濃度で除して変化倍率を算出した。結果はドナー3例の平均値 ± SEM を示す。[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.2: PD002]

がん患者 T 細胞の反応性の確認に上述した SEB アッセイを適用できるかどうかも評価した。進行性転移性黒色腫（ステージ IV）患者8例及び前立腺癌患者8例の末梢血を、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[図 2.6.2: 2]。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。



C Confidential

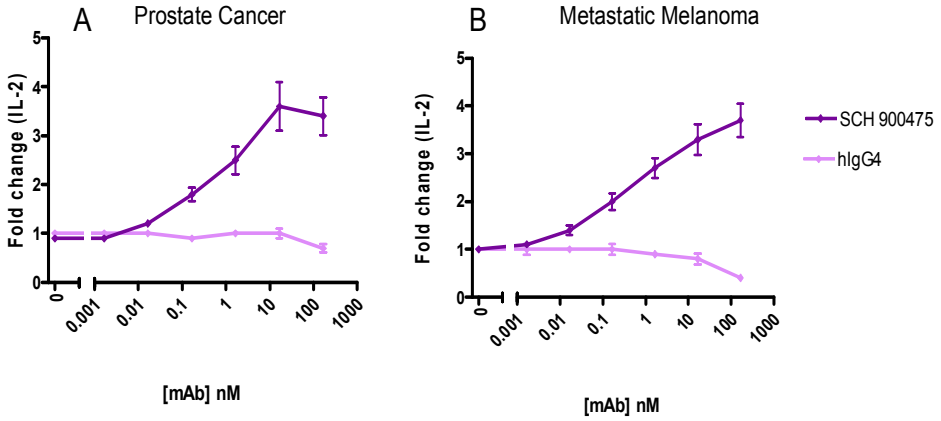



**図 2.6.2: 2　　がん患者の血液細胞での SEB 誘発 IL-2 産生に対する MK-3475 の増強作用**

がん患者の末梢血を希釈し、MK-3475（図中では SCH900475）又はヒト IgG4アイソタイプ対照抗体（hIgG4）で30～60分間プレインキュベーションした後、SEB で最長4日間刺激した。上清中の IL-2濃度を ELISA 及び多重分析で解析した。IL-2濃度を正規化し、MK-3475存在下での IL-2産生濃度を非存在下での IL-2産生濃度で除して変化倍率を算出した。MK-3475の結果は、前立腺癌患者8例（パネル A）及び進行性転移性黒色腫患者8例（パネル B）の末梢血より得た。hIgG4の結果は、前立腺癌患者6例及び進行性転移性黒色腫患者3例の末梢血より得た。いずれも平均値 ± SEM を示す。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.2: PD002]

### 2.6.2.2.1.2.2　破傷風トキソイド（TT）接種によるヒト T 細胞リコール応答における増強作用

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、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][資料4.2.1.1.10: PD012]。本アッセイでは、健康成人ドナー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のドナーから末梢血単核細胞（PBMC）を調製し、7日間 in vitro で MK-3475又はヒト IgG4アイソタイプ対照抗体（ともに0～25 μg/mL）の存在下又は非存在下で、TT（1 μg/mL）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[図2.6.2: 3]。



Confidential

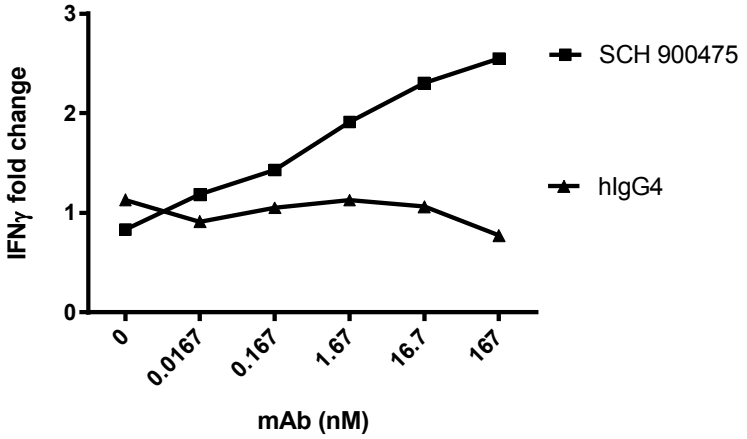



**図 2.6.2: 3　　破傷風トキソイド刺激依存性の IFNγ 産生に対する MK-3475 の増強作用**

ヒト PBMC を MK-3475（図中では SCH900475）又はヒト IgG4アイソタイプ対照抗体存在下で、in vitro で7日間 TT で刺激した。健康成人ドナー2例の PBMC を試験に用いた。表示した結果はドナー1例の典型的データである。[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.2: PD002] [資料4.2.1.1.10: PD012]

### 2.6.2.2.1.3　種交差反応性

[資料4.2.1.1.3: PD003]

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について、細胞外領域のアミノ酸配列を比較した[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細胞外領域は保存性がかなり低かった（イヌ：80%類似、72%一致；　ラット：76%類似、66%一致；マウス：74%類似、62%一致）。

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に対する MK-3475の結合性をフローサイトメトリーを用いて評価した[資料4.2.1.1.3: PD003]。MK-3475はチャイニーズハムスター卵巣細胞に発現させたヒト及びカニクイザルの PD-1に結合したが、マウスの PD-1には結合しなかった。また、MK-3475はヒト及びアカゲザルの末梢血リンパ球に結合したが、イヌ及びラットの末梢血リンパ球には結合しなかった[資料4.2.1.1.3: PD003]。

MK-3475の活性をカニクイザルの末梢血を用いて[2.6.2.2.1.2.1項]に記載した SEB アッセイにより評価した[資料4.2.1.1.3: PD003]。MK-3475は最高濃度（25 µg/mL）で IL-2産生を2～3倍に増強した[図2.6.2: 4]。



C Confidential

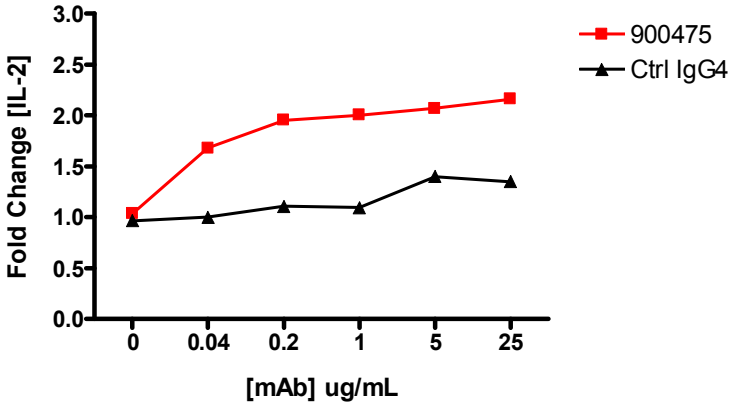



**図 2.6.2: 4　　カニクイザル血液細胞での IL-2 産生に対する MK-3475 の増強作用**

カニクイザルの末梢血を希釈し、MK-3475（図中では900475）又はヒト IgG4アイソタイプ対照抗体（Ctrl IgG4）で30～60分間プレインキュベーションした後、SEB で最長3日間刺激した。上清中の IL-2濃度を ELISA 及び多重分析法で測定した。IL-2濃度を正規化し、抗体存在下の IL-2産生濃度を抗体非存在下の IL-2産生濃度で除して変化倍率を算出した。実験にはカニクイザル6匹の末梢血を用いた。1回の試験の典型的データを示した。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.3: PD003]

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[表2.6.2: 3]、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[表2.6.2: 6]、さらにヒト[図2.6.2: 1]及びカニクイザル[図2.6.2: 4]の血球で活性を示した。以上より、カニクイザルは MK-3475の非臨床毒性の評価に適切な動物種であると考えられた。

### 2.6.2.2.1.4　免疫系に対する直接的な刺激作用

[資料4.2.1.1.4: PD004]

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つのアッセイで検討した[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.4: PD004]。免疫細胞の活性は上清中に分泌された IL-2の濃度により評価した。

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（25 µg/mL）又はヒト IgG4アイソタイプ対照抗体（25 µg/mL）でプレインキュベーションした後、4日間 SEB 存在下又は非存在下に放置した。上清中に分泌された IL-2の濃度は ELISA 法で測定した。MK-3475は SEB 存在下でのみ IL-2産生を増強し[図2.6.2: 5]、SEB 非存在下では IL-2濃度に影響を及ぼさなかった。



C Confidential

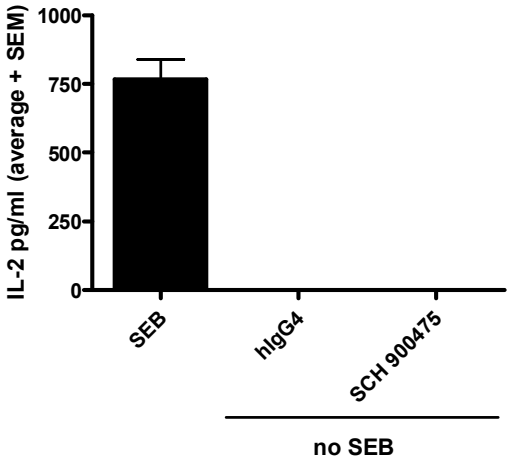



図 2.6.2: 5　　ヒト血液の IL-2 産生への MK-3475 の影響

健康成人ドナーの末梢血を希釈し、MK-3475（図中では SCH900475；25 µg/mL）又はヒト IgG4アイソタイプ対照抗体（hIgG4、25 µg/mL）でプレインキュベーション後、4日間 SEB 存在下又は非存在下に放置した。上清中の IL-2 濃度を ELISA 法で測定した。ドナー3例の平均値 ± SEM を示す。
[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）又はヒト 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、上清中に分泌された IL-2の濃度を測定した。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[図2.6.2: 6]。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[図2.6.2: 6]。

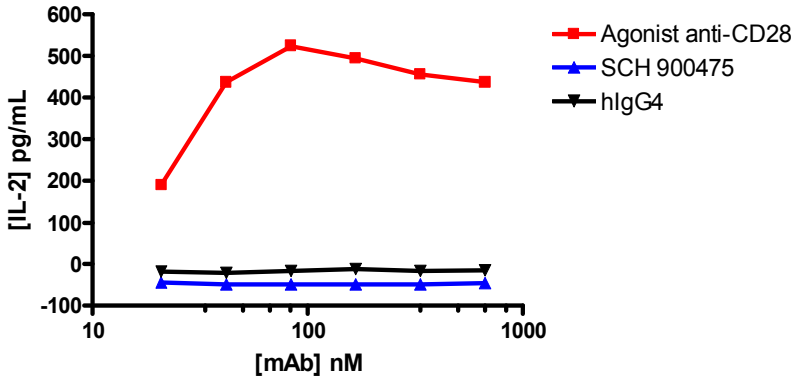



図 2.6.2: 6　　ヒト血液の急激な IL-2 産生への固定化 MK-3475 の影響

本アッセイは、MK-3475（図中では SCH900475）による急激なサイトカイン放出のリスクを評価するため、Stebbings ら（2007年）[資料4.3: 1]の方法で行った。MK-3475、抗 CD28抗体（図中では Agonist anti-CD28）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、上清中に分泌された IL-2の濃度を測定した。健康成人ドナー7例の PBMC を用い、表示した結果は代表例である。なお、報告書[資料4.2.1.1.4: PD004]では抗 CD28抗体は TGN1412と記載されている。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.4: PD004]



Confidential

### 2.6.2.2.1.5　補体成分及び Fc 受容体との結合性

[資料4.2.1.1.5: PD005]

PD-1などの細胞表面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結晶性フラグメント（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、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[2.6.3.1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。これらの試験で用いた C1q、CD64（FcγRI）及び CD16a（FcγRIIIa）の入手先を[表2.6.2: 7]に示す。

表 2.6.2: 7　　C1q、CD64（FcγRI）及び CD16a（FcγRIIIa）の入手先

| Reagent | Catalog number | Species/Description | Vendor | Location |
|---|---|---|---|---|
| C1q | [redacted] | Human, non-recombinant | [redacted] | [redacted] |
| CD64 (FcγRI) | [redacted] | Human Fc gamma Receptor I (CD64), recombinant | [redacted] | [redacted] |
| CD16a (FcγRIIIa) | [redacted] | Human Fc gamma Receptor IIIA (CD16a), recombinant | [redacted] | [redacted] |

[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.5: PD005]

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。なお、ヒト IgG1（SCH 717454）及びヒト IgG4（SCH 55700）は、Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J., U.S.A.（以下、米国本社）にて作製した。SCH 717454はインスリン様成長因子1受容体（IGF-1R）、SCH 55700はインターロイキン（IL）-5に対する抗体である。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 ELISA 法で評価した。MK-3475と C1q 及び CD64との結合の50%効果濃度（$EC_{50}$）値はヒト IgG4抗体の値と同程度であったが、ヒト IgG1抗体との親和性より大幅に弱かった[表2.6.2: 8]。

MK-3475と CD16a との結合は Biacore 社の表面プラズモン共鳴法を用いて評価した。$K_D$ 値より、MK-3475と CD16a との結合はヒト IgG1抗体と比較して大幅に弱かった[表2.6.2: 8] 。



C Confidential

表 2.6.2: 8　　MK-3475、IgG1 及び IgG4 と C1q、CD64（FcγRI）及び CD16a（FcγRIIIa）との結合性

| Antibody | C1q | | CD64 (FcγRI) | | CD16a (FcγRIIIa) |
|---|---|---|---|---|---|
| | $EC_{50}$ (nM)<br>平均 ± SD | n | $EC_{50}$ (pM)<br>平均 ± SD | n | $K_D$<br>(μM) |
| MK-3475 | 12 ± 1 | 8 | 237 ± 57 | 9 | 35 |
| IgG1 | 0.5 ± 0 | 8 | 24 ± 4 | 10 | 4 |
| IgG4 | 11[a] | 2 | 345 ± 142 | 3 | ND |

MK-3475と C1q 及び CD64（FcγRI）との結合は ELISA 法で、CD16a（FcγRIIIa）との結合は Biacore 社の表面プラズモン共鳴法で評価した。MK-3475（ロット番号[redacted]）での評価。
a 試験数が2回であったため、標準偏差を算出できなかった。試験1から得られた数値は14 nM、試験2は9 nM であった。
$EC_{50}$ = 50%効果濃度; n = 試験回数; ND = 測定せず; SD = 標準偏差。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.5: PD005]

#### 2.6.2.2.1.6　作用機序

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。

##### 2.6.2.2.1.6.1　悪性黒色腫及び NSCLC での PD-1、PD-L1及び PD-L2の発現

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%であった[表2.6.2: 9]。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%であった[表2.6.2: 9]。

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）[資料4.3: 8]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検体に発現が認められたと報告した。 Zhang ら（2014年）[資料4.3: 10]の報告では、NSCLC の143検体中71検体で PD-L2の発現が認められている。

表 2.6.2: 9.　　文献による悪性黒色腫及び NSCLC での PD-L1 の発現

| Cancer | Sample Size | Result | Reference |
|---|---|---|---|
| Melanoma | 30 – 81 | 14% to 57.6% | Hino et al 2010; Massi et al 2014; Taube et al 2014[資料4.3: 4] [資料4.3: 5][資料4.3: 8] |
| NSCLC | 17 – 303 | 19.6% to 75.2% | Chen et al 2012; Boland et al 2013; Taube et al 2014; Velcheti et al 2014; Yang et al 2014; Zhang et al 2014[資料4.3: 7] [資料4.3: 6] [資料4.3: 8] [資料4.3: 9] [資料4.3: 11] [資料4.3: 10] |


C Confidential

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（2014年）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%であった（総発現率：75%）。また、韓国（Samsung Medical Center）で実施された Sun ら（2014年）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%であった（総発現率：45%）。

また、米国本社では組織バンクの試料を用い、悪性黒色腫及び NSCLC における PD-1、PD-L1及び PD-L2の発現が評価された。その際には、組織のホルマリン固定後にパラフィン包埋切片を作製し、評価・確立・手順化された免疫組織化学染色により、PD-1、PD-L1及び PD-L2の発現を評価した。組織切片は陽性染色細胞の割合を基に半定量的スコアリング法を用いてスコア化した（0＝陰性、1＝ごくわずか、2＝低度、3＝中等度、4＝高度、5＝極めて高度）。対象とした細胞は以下より構成されていた。

- PD-1：リンパ球の形態を有する細胞
- PD-L1：腫瘍細胞とみなされる細胞及び炎症性浸潤の構成成分とみなされる細胞
- PD-L2：骨髄性細胞とみなされる細胞、腫瘍細胞及び内皮細胞とみなされる細胞

PD-1、PD-L1及び PD-L2発現を免疫組織化学染色により評価した結果を、それぞれ[図2.6.2: 7] [図2.6.2: 8]及び[図2.6.2: 9]に示す。

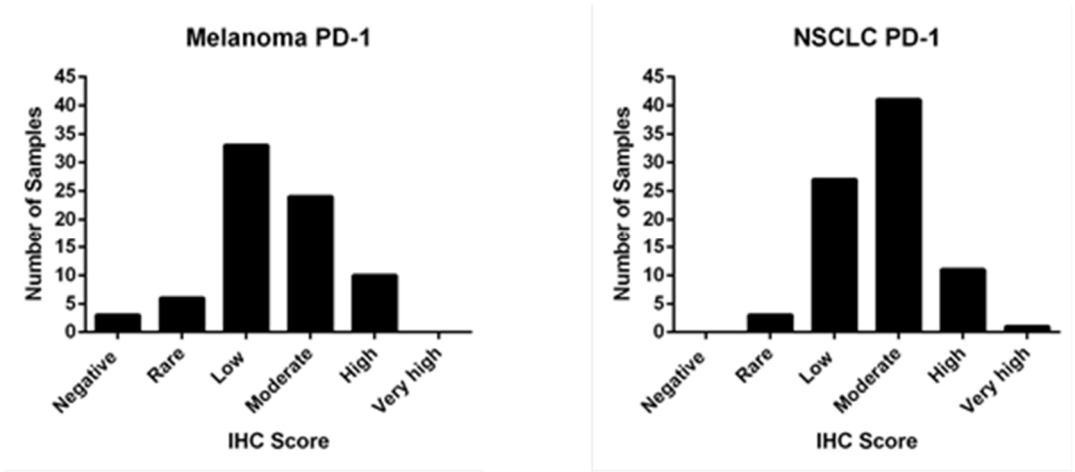



図 2.6.2: 7　　悪性黒色腫及び NSCLC での PD-1 の発現


C Confidential

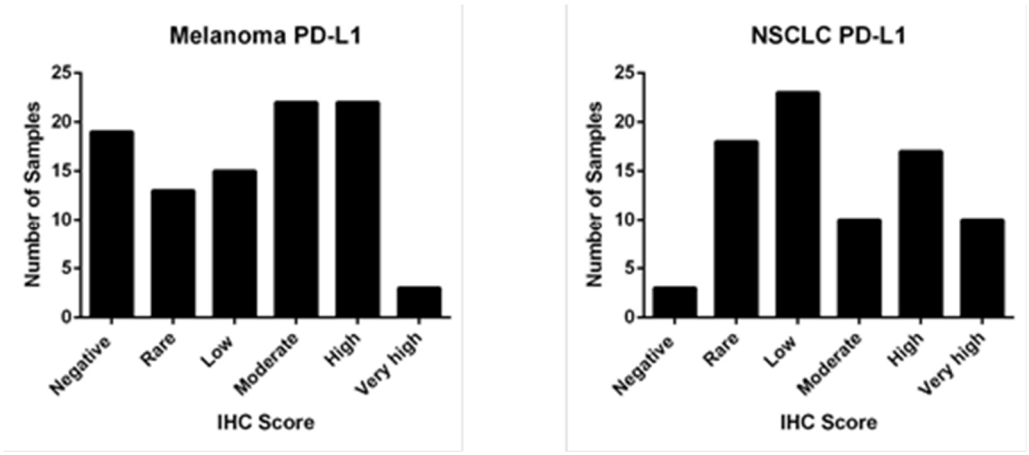



図 2.6.2: 8　　悪性黒色腫及び NSCLC での PD- L1 の発現

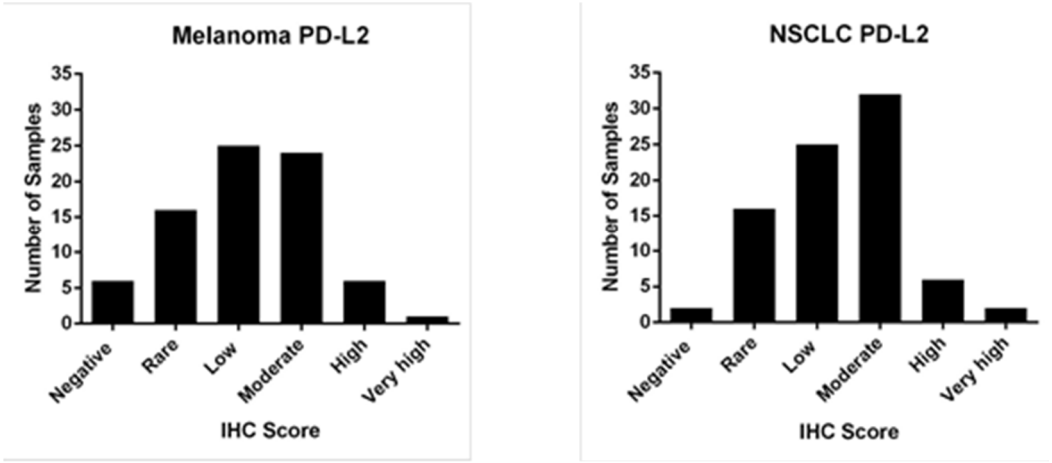



図 2.6.2: 9　　悪性黒色腫及び NSCLC での PD- L2 の発現

さらに、悪性黒色腫（9検体）及び NSCLC（24検体）における腫瘍浸潤性 CD8+及び CD4+リンパ球に発現する PD-1を、フローサイトメトリー法により評価した[図2.6.2: 10]。また、NSCLC（12検体）における腫瘍浸潤単球性の（CD45+/CD3-/CD11b+/CD33+/CD14+/CD66b-）及び顆粒球性の（CD45+/CD3-/CD11b+/CD33-/CD14-/CD66b+）骨髄性細胞に発現する PD-L1及び PD-L2を評価した[図2.6.2: 11]。



Confidential

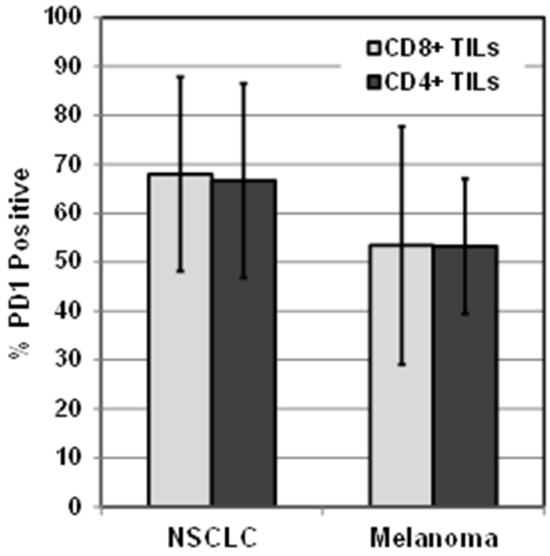



**図 2.6.2: 10　悪性黒色腫及び NSCLC での腫瘍浸潤性 CD8+及び CD4+リンパ球の PD-1 発現**

単細胞からなる腫瘍消化物の懸濁液を処理して Fc 受容体を遮断し、リン酸緩衝食塩水（PBS）、1%ウシ血清アルブミン（BSA）及び0.05%アジ化ナトリウムからなる蛍光活性化細胞選別緩衝液（FB）で洗浄した。PD-1発現解析には2つの染色パネルを用いた。1つ目のパネルには細胞系マーカー（CD45、CD3、CD4及び CD8α）に対する蛍光標識モノクローナル抗体及び抗 PD-1を含めた。2つ目のパネルには同じ細胞系マーカー（CD45、CD3、CD4及び CD8α）に対する蛍光標識モノクローナル抗体及び抗 PD-1モノクローナル抗体に対する適切なアイソタイプ対照を含めた。これらの細胞を適切なモノクローナル抗体染色カクテルに再懸濁してインキュベートし、FB で洗浄後、1.5%パラホルムアルデヒドで15分間固定した。その後洗浄し、FB に再懸濁して解析を実施した。すべての試料は FACSDiva ソフトウェア（BD Biosciences）を用いて4-レーザーLSR Ⅱ フローサイトメーターにて捕捉した。フローサイトメトリーによるすべてのデータは FlowJo（FlowJo, LLC）を用いて解析した。PD-1の発現はアイソタイプ対照モノクローナル抗体と比較して高い PD-1シグナルを示した細胞の頻度として算出した。



C Confidential

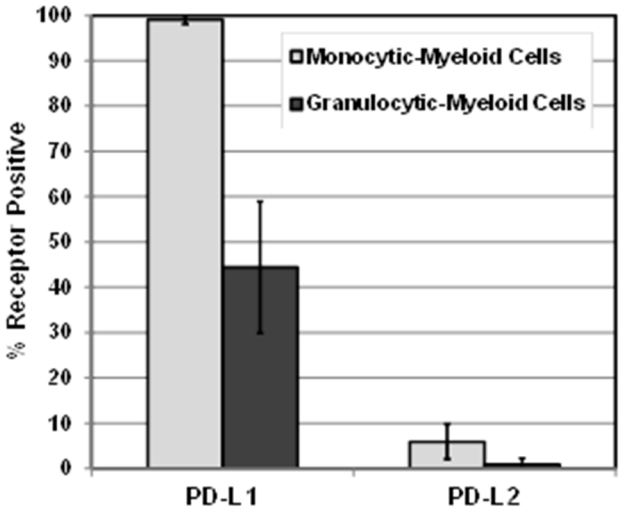



**図 2.6.2: 11　NSCLC での腫瘍浸潤性骨髄性細胞の PD-L1 及び PD-L2 の発現**

単細胞からなる腫瘍消化物の懸濁液を処理して Fc 受容体を遮断し、PBS、1%BSA 及び0.05%アジ化ナトリウムからなる蛍光活性化細胞選別緩衝液（FB）で洗浄した。PD-L1及び PD-L2発現解析には2つの染色パネルを用いた。1つ目のパネルには細胞系マーカー（CD45、CD11b、CD33、CD3、CD56、CD14及び CD66b）に対する蛍光標識モノクローナル抗体、抗 PD-L1及び抗 PD-L2を含めた。2つ目のパネルには同じ細胞系マーカー（CD45、CD11b、CD33、CD3、CD56、CD14及び CD66b）に対する蛍光標識モノクローナル抗体及び抗 PD-L1/抗 PD-L2モノクローナル抗体に対する適切なアイソタイプ対照を含めた。これらの細胞を適切なモノクローナル抗体染色カクテルに再懸濁してインキュベートし、FB で洗浄後、1.5%パラホルムアルデヒドで15分間固定した。その後洗浄し、FB に再懸濁して解析を実施した。すべての試料は FACSDiva ソフトウェア（BD Biosciences）を用いて4-レーザーLSR Ⅱフローサイトメーターにて捕捉した。フローサイトメトリーによるすべてのデータは FlowJo（FlowJo, LLC）を用いて解析した。PD-L1及び PD-L2の発現はアイソタイプ対照モノクローナル抗体と比較して高い PD-L1又は PD-L2シグナルを示した細胞の頻度として算出した。

観察された 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、評価に用いた方法（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及び腫瘍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の理由によるものと考えられた。

### 2.6.2.2.1.6.2　PD-L1の発現と抗 PD-1療法の抗腫瘍効果との関係

悪性黒色腫、NSCLC、腎癌、大腸癌及び去勢抵抗性前立腺癌における PD-1、PD-L1及び PD-L2の発現と抗 PD-1療法［ニボルマブ（遺伝子組換え）、以下、ニボルマブ］による抗腫瘍効果との関連性について、Taube ら（2014年）が評価・報告している[資料4.3: 8]。PD-L1の発現を68検体（患者41例）で評価したところ、34検体の腫瘍細胞及び37検体の浸潤性免疫細胞に PD-L1が発現していた。PD-L2の発現を38検体（患者27例）で評価したところ、4検体の腫瘍細胞及び4検体の浸潤性免疫細胞に PD-L2が発現していた。腫瘍浸潤リンパ球の PD-1の発現を63検体（患者37例）で評価したところ、12検体に PD-1が発現していた。



C Confidential

また、その際に観察されたニボルマブによる客観的奏効がみられた例は以下のとおりとされた。

- 腫瘍細胞；　PD-L1発現：9/23例、PD-L1非発現：1/18例
- 浸潤性免疫細胞；　PD-L1発現：8/23例、PD-L1非発現：2/18例
- 腫瘍細胞又は浸潤性免疫細胞；　PD-L2発現：0/4例、PD-L2非発現：2/9例
- 腫瘍浸潤リンパ球；　PD-1発現：7/16例、PD-1非発現：3/21例

Taube ら（2014年）[資料4.3: 8]は、“腫瘍における PD-L1の発現が免疫活性微小環境に影響を及ぼすこと、また、PD-1と PD-L2等の免疫抑制分子も関連するものの、抗 PD-1抗体による阻害反応に最も密接に関連した要素は PD-L1が発現していることである。”と結論付けている。

悪性黒色腫及び NSCLC における PD-L1の発現と抗 PD-1療法との具体的な関係については、現時点では1つの文献で報告されている（Topalian ら、2012年）[資料4.3: 30]。悪性黒色腫患者18例及び NSCLC 患者10例から得た検体を用いて、免疫組織化学染色により腫瘍細胞にある PD-L1の発現を評価したところ、悪性黒色腫患者15例及び NSCLC 患者4例が PD-L1を発現しており、これらのうち、客観的奏効が認められたのは悪性黒色腫患者6例及び NSCLC 患者1例であった。PD-L1陰性の悪性黒色腫及び NSCLC 患者で客観的奏効はみられなかったとしている。

しかし、これらの結果は初期的な評価によるものであり、解釈には注意が必要である。PD-1、PD-L1及び PD-L2並びに他の免疫調節に関わる受容体の発現量や発現率と PD-1阻害による腫瘍組織での影響については、今後も情報が集積されるものと考えられる。

#### 2.6.2.2.2　In vivo 試験

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

[資料4.2.1.1.7: PD007][資料4.2.1.1.8: PD008][資料4.2.1.1.11: PD013]

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。

ヒト及びマウスの PD-1細胞外領域のアミノ酸配列は74%類似・62%一致であった[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.3: PD003]。また、MK-3475はチャイニーズハムスター卵巣細胞に発現させたマウス PD-1に結合しない[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.3: PD003]。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、代替抗体の抗マウス PD-1抗体である J43及びマウス化 DX400（muDX400）を動物モデルに使用した。

MK-3475の開発初期には [redacted] 社又は [redacted] 社から入手した市販の J43（抗マウス PD-1抗体；ハムスターIgG2）を非臨床試験に使用した。当時、J43は唯一利用可能な抗マウス PD-1抗体であった。J43は Agata ら（1996年）[資料4.3: 14]の方法で作製されており、この抗体を使用するにあたり、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の結合に対する J43の阻害能を確認した。Ansari ら（2003年）[資料4.3: 31]によっても、J43によるマウス



C Confidential

PD-1とマウス PD-L1及び PD-L2の結合阻害が示されている。なお、J43が結合するマウス PD-1のエピトープについては不明である。

muDX400はラット抗マウス 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]。DX400及び muDX400を in vivo 試験に用いた[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.7: PD007] [資料4.2.1.1.11: PD013]。DX400及び muDX400が結合するマウス PD-1のエピトープについては確定していない。

J43及び muDX400の特徴を[表2.6.2: 10]に示す。

**表 2.6.2: 10.　J43 及び muDX400 の生物学的特徴の比較**

| Assay | J43 | muDX400 |
|---|---|---|
| Binding affinity to mouse PD-1 | 643 pM[1] (n=1)<br>369 pM[2] (n=1) | 311 to 637 pM[3]<br>2490 to 3444 pM[4] |
| Ligand blockade | [5] Demonstrated blocking of both mouse PD-L1 and mouse PD-L2 to PD-1/BHK transfected cells [$IC_{50}$ not reported]<br>[6] Demonstrated blocking of mouse PD-L1 and mouse PD-L2 to mouse PD-1 expressed on CHO-K1.mPD-1 cells [$IC_{50}$ not calculated] | [7] Demonstrated blocking of both mouse PD-L1 and mouse PD-L2 to mouse PD-1 on EL4 cells [$IC_{50}$ not calculated] |

1　Octet ForteBio 社の Octet システムを用いた固相干渉法により [redacted] 社のマウス PD-1-ヒト Fc に対する結合を評価した ([redacted])
2　[redacted] 社のマウス PD-1-ヒト Fc への結合を ELISA 法により $EC_{50}$で評価した ([redacted])
3　Biacore 社の表面プラズモン共鳴法により [redacted] 社のマウス PD-1-ヒト Fc への結合を評価した [資料4.2.1.1.8: PD008]
3　Biacore 社の表面プラズモン共鳴法により [redacted]社のマウス PDCD1への結合を評価した [資料4.2.1.1.8: PD008]
5　Ansari et al 2003[資料4.3: 31]
6　蛍光微量活性技術（FMAT）を用いた細胞結合アッセイにてリガンドの阻害を評価した ([redacted])
7　フローサイトメトリー法による細胞結合アッセイにてリガンドの阻害を評価した[資料4.2.1.1.8: PD008]
$EC_{50}$ = 50%効果濃度；$IC_{50}$ = 50%阻害濃度；n = number
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.8: PD008]

抗 PD-1療法では、PD-1とそのリガンドである PD-L1又は PD-L2との結合を直接阻害し、標的リンパ球の機能的活性を増強する。しかし、抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）については望ましくない作用と考えられる。

MK-3475は IgG4/kappa アイソタイプのヒト化モノクローナル抗体である。ヒト IgG4抗体は補体成分である C1q 及び 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。マウス IgG1（mDX400のアイソタイプ）は、ヒト抗体 Fc 領域の機能を十分に表現しているため、ヒト IgG4（MK-3475のアイソタイプ）と機能的に同等と認識されている[資料4.3: 32] [資料4.3: 34][資料4.3: 33][資料4.3: 35]。

J43及び muDX400ともマウス PD-1に対して結合親和性が高く、マウス PD-L1及びマウス PD-L2のマウス PD-1への結合を阻害するため、これらの抗体が非臨床薬理試験を進める上で MK-3475の代替抗体として有用と考えた。


C Confidential

#### 2.6.2.2.2.2　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。その結果、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することとした。

免疫組織化学的評価より、MC38及び RENCA はそれぞれ中等度及び高度に PD-1及び PD-L1を発現していることが判明した[表2.6.2: 11]。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。

表 2.6.2: 11.　マウス担癌モデルでの PD-1 及び PD-L1 発現と PD-1 阻害に対する反応性

| Model | Cancer Type | PD-1 Expression | PD-L1 Expression | Responsiveness to Anti-Mouse PD-1 muDX400 |
|---|---|---|---|---|
| [redacted] | Bladder | Low to Moderate | High | [2] Partially responsive |
| [redacted] | Bladder | High | Moderate to Very High | [3] Highly responsive |
| [redacted] | Breast | Moderate | [1]Low to Moderate to High | [3] Highly responsive |
| [redacted] | Breast | Low | [1]Low to Moderate to High | [4] Resistant |
| [redacted] | Colon | Moderate to High | Very High | [2] Partially responsive |
| MC38 | Colon | Moderate | High | [3] Highly responsive |
| RENCA | Kidney | Moderate | Very High | [2] Partially responsive |
| [redacted] | Lung | Low to Moderate | Low | [4] Resistant |
| [redacted] | Melanoma | Low | Low | [4] Resistant |

1 標本間で有意なばらつき
2 一部反応：腫瘍増殖抑制が観察された
3 高度な反応：完全及び持続的な腫瘍退縮
4 抵抗性：腫瘍増殖抑制が観察されなかった
muDX400：マウス化 DX400、抗マウス PD-1モノクローナル抗体で、MK-3475の代替抗体

#### 2.6.2.2.2.3　マウスの MC38同系腫瘍モデルでの J43の有効性

##### 2.6.2.2.2.3.1　MC38同系腫瘍モデルでの J43単独療法の有効性

[資料4.2.1.1.6: PD006]

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 J43の有効性を評価した[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]。腫瘍細胞はマウスに皮下移植した。被験物質はすべて腹腔内投与とした。投与量及び投与スケジュールは Nomi ら（2007年）[資料4.3: 36]の試験に基づいて決定した。

J43又はハムスターIgG 対照抗体を2及び10 mg/kg の用量で3～4日ごとに計5回投与した。

有効性は腫瘍の体積及び生存率に基づき評価した。GraphPad Prism 6を用いて一元配置分散分析



C Confidential

（one-way ANOVA）により試験日における全群の腫瘍体積を比較した。群間の有意差の判定にはBonferroni の多重比較検定を用いた。P 値が≤0.05（95%信頼区間）のとき有意と判断した。

J43は10 mg/kg の用量で MC38同系腫瘍の増殖を阻害した[図2.6.2: 12]。統計解析結果を[表2.6.2: 12]に示す。抗 PD-1モノクローナル抗体 J43の10 mg/kg 投与群ではハムスターIgG の10 mg/kg 投与対照群と比較して有意差が認められ、P 値は≤0.05であった。さらに、10 mg/kg 群の動物の50%及び2 mg/kg 群の動物の20%は試験終了時まで生存した[図2.6.2: 13]。ハムスターIgG 対照抗体投与動物のうち試験終了時まで生存したものはいなかった。

GraphPad Prism 6を用いて Log-rank（Mantel-Cox）検定により生存曲線を解析した。Log-rank（Mantel-Cox）検定では4つの投与群間の生存率に差はないとする帰無仮説が、P 値＝0.0046であったことから棄却された[図2.6.2: 13]。

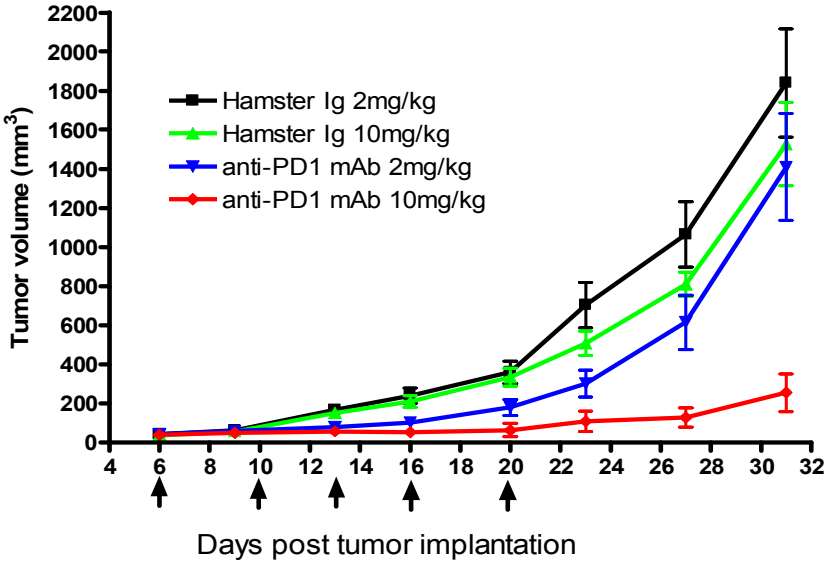



図 2.6.2: 12　MC38 同系腫瘍モデルでの J43 単独療法の阻害効果

MC38結腸腺癌細胞はマウスに皮下移植した。J43（図中では anti-PD1 mAb と表示）又はハムスターIgG 対照抗体は第6、10、13、16及び20日に腹腔内投与した（黒矢印）。腫瘍体積を3～4日ごとに測定し、平均値 ± SEM で示した。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]

表 2.6.2: 12.　MC38 同系腫瘍モデルでの J43 単独療法の阻害効果（統計解析）

| Treatment (Dose) | N | [1] Tumor Volume ($mm^3$) | Comparators | [2] p-value |
|---|---|---|---|---|
| Hamster Ig (2 mg/kg) | 10 | 1840 ± 277 | Yes | ≥ 0.05 |
| J43 Anti-PD-1 mAb (2 mg/kg) | 9 | 1410 ± 273 | | |
| Hamster Ig (10 mg/kg) | 10 | 1526 ± 213 | Yes | ≤ 0.05 |
| J43 Anti-PD-1 mAb (10 mg/kg) | 10 | 254 ±96 | | |

N = 動物数
1 第31日の腫瘍体積を平均値±SEM で示した。
2 One-way ANOVA 及び Bonferroni の多重比較検定による評価。P 値≤ 0.05のとき統計的に有意と判断した。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]



C Confidential

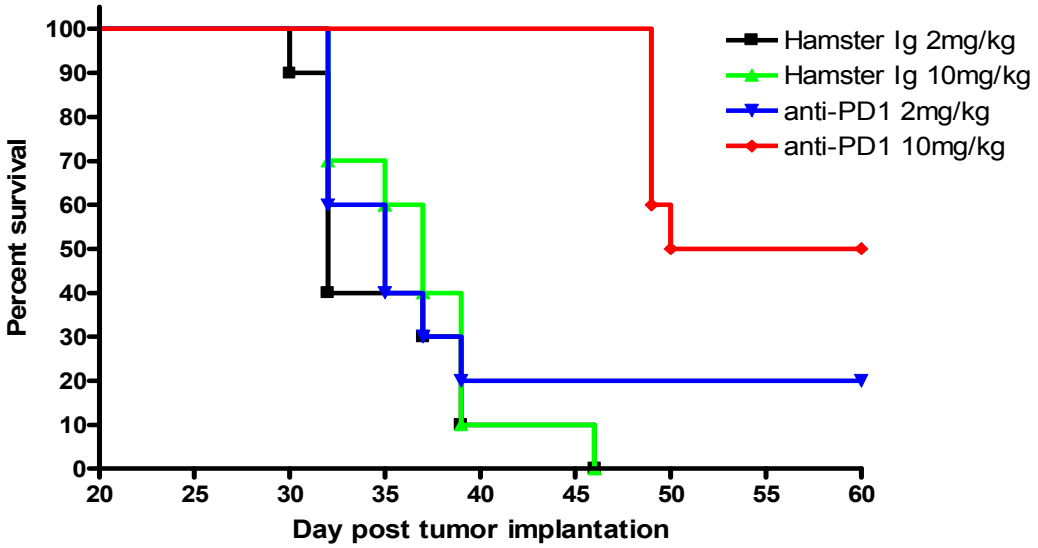



図 2.6.2: 13　MC38 同系腫瘍モデルでの J43 単独療法による生存率

MC38結腸腺癌細胞はマウスに皮下移植した。GraphPad Prism 6を用いて Log-rank（Mantel-Cox）検定により生存曲線を解析した。Log-rank（Mantel-Cox）検定では4つの投与群間の生存率に差はないとする帰無仮説が棄却された。P 値＝0.0046であったことから、帰無仮説の棄却が確認された。J43（図中では anti-PD1と表示）又はハムスターIgG 対照抗体は第6、10、13、16及び20日に腹腔内投与した。
[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[資料4.2.1.1.6: PD006]。

### 2.6.2.2.2.3.2　MC38同系腫瘍モデルでの J43及び5-FU 併用時の有効性

C57Bl/6マウスの MC38結腸腺癌同系担癌モデルを用い、5-フルオロウラシル（5-FU）との併用療法により J43の有効性を評価した[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]。腫瘍細胞は皮下移植した。被験物質はすべて腹腔内投与した。投与量及び投与スケジュールは Nomi ら（2007年）の試験[資料4.3: 36]に基づいて決定した。

J43又はハムスターIgG 対照抗体（いずれも10 mg/kg）を、3日ごとに合計5回5-FU（40 mg/kg）と併用投与した。有効性は腫瘍の体積及び生存率に基づき評価した。GraphPad Prism 6を用いて一元配置分散分析（one-way ANOVA）により試験日における全群の腫瘍体積を比較した。群間の有意差の判定には Bonferroni の多重比較検定を用いた。P 値が≤0.05（95%信頼区間）のとき有意と判断した。

J43は5-FU との併用により MC38同系腫瘍の増殖を抑制した[図2.6.2: 14]。関連する統計解析結果を[表2.6.2: 13]に示す。各群を個別に抗 PD-1モノクローナル抗体 J43の10 mg/kg と5-FU の40 mg/kg を併用した Group 4と比較した。いずれも P 値は≤0.05であった。J43及び5-FU 併用動物の60%及び J43単独投与動物の20%が試験終了時まで生存した[図2.6.2: 15]。ハムスターIgG 対照抗体の単独投与動物及び5-FU との併用動物で試験終了時まで生存したものはいなかった。GraphPad Prism


Confidential

6を用いて Log-rank（Mantel-Cox）検定により生存曲線を解析した。Log-rank（Mantel-Cox）検定では4つの投与群間の生存率に差はないとする帰無仮説が、P 値＝0.0012であったことから棄却された。[図2.6.2: 15]。

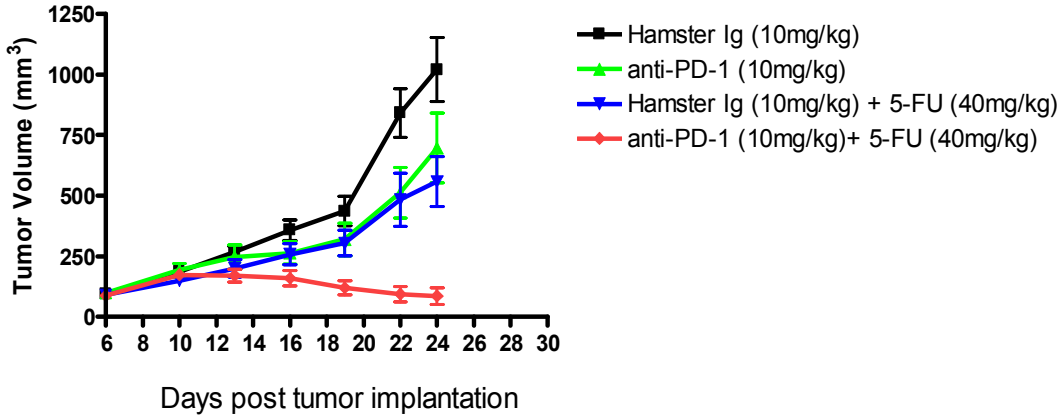



図 2.6.2: 14　MC38 同系腫瘍モデルでの J43 及び 5-FU 併用時の阻害効果

MC38結腸腺癌細胞はマウスに皮下移植した。J43（図中では anti-PD-1と表示）及びハムスターIgG 対照抗体は5-FUと同時に第7、10、13、16及び19日に投与した。被験物質はすべて腹腔内投与とした。腫瘍体積を3～4日ごとに測定し、平均値 ± SEM で示した。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]

表 2.6.2: 13.　MC38 同系腫瘍モデルでの J43 及び 5-FU 併用時の阻害効果（統計解析）

| Group | Treatment (Dose) | N | [1] Tumor Volume ($mm^3$) | Comparators | [2] p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Hamster Ig (10 mg/kg) | 9 | 457 ± 130 | 1, 4 | ≤ 0.05 |
| 2 | J43 Anti-PD-1 mAb (10 mg/kg) | 10 | 468 ± 151 | 2, 4 | ≤ 0.05 |
| 3 | Hamster Ig (10 mg/kg) plus 5-FU (40 mg/kg) | 10 | 408 ± 129 | 3, 4 | ≤ 0.05 |
| 4 | J43 Anti-PD-1 mAb (10 mg/kg) plus 5-FU (40 mg/kg) | 10 | 154 ± 25 | n/a | n/a |

N = 動物数、n/a＝適用なし
1 第24日の腫瘍体積を平均値±SEM で示した。
2 one-way ANOVA 及び Bonferroni の多重比較検定による評価。各群を抗 PD-1モノクローナル抗体 J43（10 mg/kg）と5-FU（40 mg/kg）を併用した Group 4と比較した。P 値≤ 0.05のとき統計的に有意と判断した。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]


Confidential

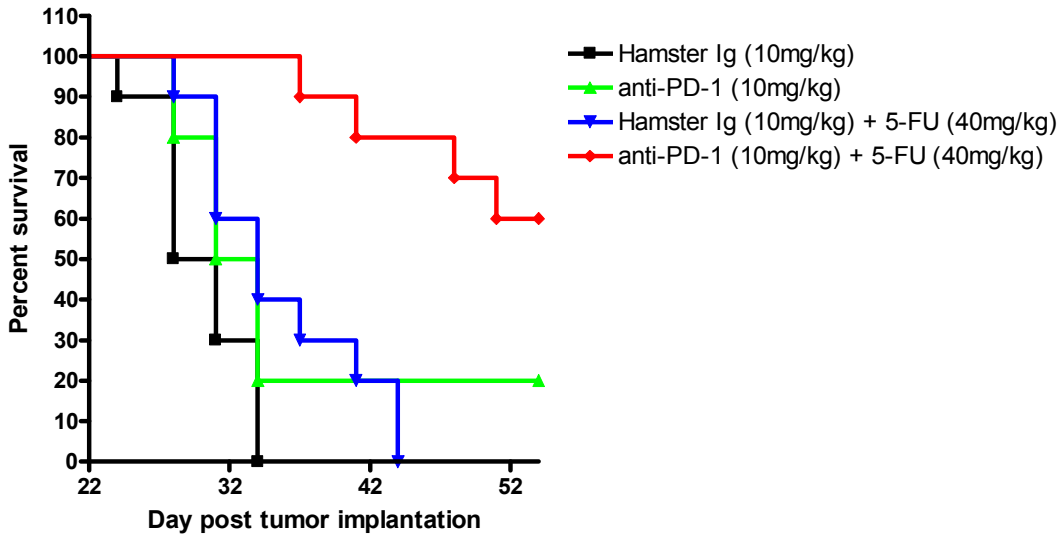



図 2.6.2: 15　MC38 同系腫瘍モデルでの J43 及び 5-FU 併用時の生存率

MC38結腸腺癌細胞はマウスに皮下移植した。J43（図中では anti-PD-1と表示）及びハムスターIgG 対照抗体は5-FUと同時に第7、10、13、16及び19日に投与した。被験物質はすべて腹腔内投与とした。GraphPad Prism 6を用いてLog-rank（Mantel-Cox）検定により生存曲線を解析した。Log-rank（Mantel-Cox）検定では4つの投与群間の生存率に差はないとする帰無仮説が棄却された。P 値＝0.0012であったことから、帰無仮説の棄却が確認された。[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]

### 2.6.2.2.2.3.3　MC38同系腫瘍モデルでの J43及びゲムシタビン併用時の有効性

C57Bl/6マウスの MC38結腸腺癌同系担癌モデルを用いてゲムシタビンとの併用療法により J43の有効性を評価した[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]。動物に腫瘍細胞を皮下移植した。被験物質はすべて腹腔内投与した。投与量及び投与スケジュールは Nomi ら（2007年）の試験[資料4.3: 36]に基づいて決定した。

J43、ハムスターIgG 対照抗体及びゲムシタビンは10 mg/kg の用量で投与した。J43及びハムスターIgG 対照抗体は第10、13、16、18、20及び22日に投与し、ゲムシタビンは第10、13及び16日に（J43及びハムスターIgG 対照抗体と同時に）投与した。有効性は腫瘍の体積及び生存率に基づき評価した。GraphPad Prism 6を用いて一元配置分散分析（one-way ANOVA）により試験日における全群の腫瘍体積を比較した。群間の有意差の判定には Bonferroni の多重比較検定を用いた。P 値が≤0.05（95%信頼区間）のとき有意と判断した。

J43はゲムシタビンとの併用で MC38同系腫瘍の増殖を阻害した[図2.6.2: 16]。関連する統計解析結果を[表2.6.2: 14]に示す。各群を個別に抗 PD-1モノクローナル抗体 J43の10 mg/kg とゲムシタビンの10 mg/kg を併用した Group 4と比較した。本試験では、ハムスターIgG の10 mg/kg+生理食塩水を投与した対照群と比較したときのみ有意差が認められ、P 値は≤0.05であった。J43とゲムシタビンの併用動物の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[図2.6.2: 17]。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。GraphPad Prism 6を用いて Log-rank（Mantel-Cox）検定により生存曲線を解析した。Log-rank（Mantel-Cox）検定では4つの投与群間の生存率に差はない


Confidential

とする帰無仮説が P 値＝0.0034であったことから棄却された[図2.6.2: 17]。

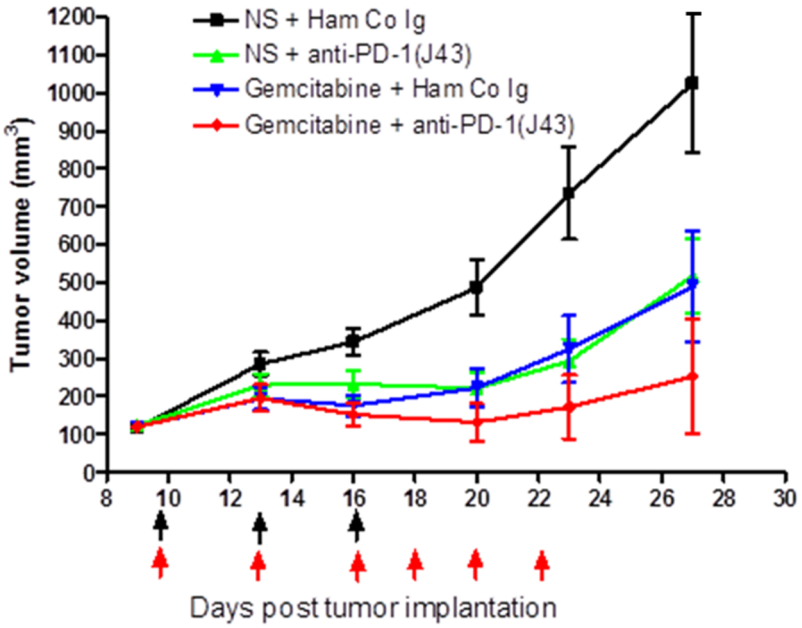



**図 2.6.2: 16　MC38 同系腫瘍モデルでの J43 及びゲムシタビン併用時の阻害効果**

MC38結腸腺癌細胞はマウスに皮下移植した。J43（図中では anti-PD-1と表示）、ハムスターIgG 対照抗体（Ham Co Ig）及びゲムシタビンは腹腔内投与した。J43及びハムスターIgG 対照抗体は第10、13、16、18、20及び22日に投与し（赤矢印）、ゲムシタビンは第10、13及び16日にこれらと同時に投与した（黒矢印）。腫瘍体積を3～4日ごとに測定し、平均値 ± SEM で示した。
NS = 生理食塩液。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]

**表 2.6.2: 14.　MC38 同系腫瘍モデルでの J43 及びゲムシタビン併用時の阻害効果（統計解析）**

| Group | Treatment (Dose) | [1] Tumor Volume ($mm^3$) | Comparators | [2] p-value |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Hamster Ig (10 mg/kg) + Normal Saline | 1024 ± 182 | 1, 4 | ≤ 0.05 |
| 2 | J43 Anti-PD-1 mAb (10 mg/kg) + Normal Saline | 517 ± 99 | 2, 4 | ≤ 0.05 |
| 3 | Hamster Ig (10 mg/kg) + Gemcitabine (10 mg/kg) | 489 ± 147 | 3, 4 | ≤ 0.05 |
| 4 | J43 Anti-PD-1 mAb (10 mg/kg) + Gemcitabine (10 mg/kg) | 253 ± 150 | n/a | n/a |

n/a＝適用なし
1 第27日の腫瘍体積を平均値±SEM で示した。
2 one-way ANOVA 及び Bonferroni の多重比較検定による評価。各群を抗 PD-1モノクローナル抗体 J43（10 mg/kg）とゲムシタビン（10 mg/kg）を併用した Group 4と比較した。P 値≤ 0.05のとき統計的に有意と判断した。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]



Confidential

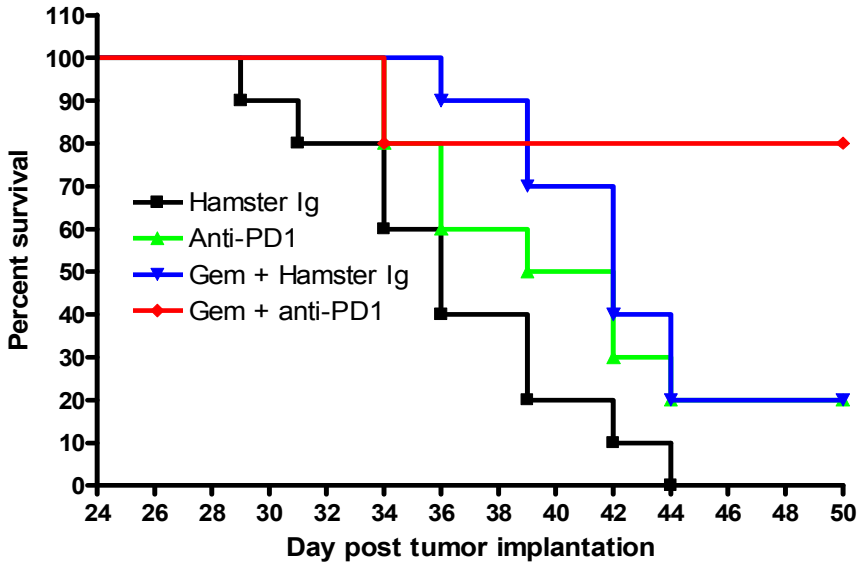



図 2.6.2: 17　MC38 同系腫瘍モデルでの J43 及びゲムシタビン併用時の生存率

MC38結腸腺癌細胞はマウスに皮下移植した。J43（図中では anti-PD1と表示）、ハムスターIgG 対照抗体及びゲムシタビン（図中では Gem と表示）は腹腔内投与した。J43及びハムスターIgG 対照抗体は第10、13、16、18、20及び22日に投与し、ゲムシタビンは第10、13及び16日にこれらと同時に投与した。GraphPad Prism 6を用いてLog-rank（Mantel-Cox）検定により生存曲線を解析した。Log-rank（Mantel-Cox）検定では4つの投与群間の生存率に差はないとする帰無仮説が棄却された。P 値＝0.0034であったことから、帰無仮説の棄却が確認された。
[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.6: PD006]

### 2.6.2.2.2.4　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

[資料4.2.1.1.8: PD008][資料4.2.1.1.11: PD013]

NSCLC の標準治療は、プラチナ製剤を基本としたシスプラチン又はカルボプラチン単剤、若しくはパクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタビン、ビノレルビン、イリノテカン又はペメトレキセドによる併用化学療法である。デキサメタゾンは通常、これら標準治療と併用されている。MK-3475のような免疫調節作用を有する抗体をこれら標準療法に追加することは、NSCLC の標準治療の向上に繋がる可能性がある。他方、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、デキサメタゾンが併用化学療法の有効性に影響を及ぼす可能性がある。

そこで、抗マウス PD-1抗体である muDX400（MK-3475代替抗体：マウス化 DX400）[2.6.3.1項][資料4.2.1.1.8: PD008]の NSCLC 標準治療に対する影響を、腎癌（renal carcinoma: RENCA）のマウス担癌モデルで検討した[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。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。

なお、MK-3475にはマウス PD-1との交差性が無いため、muDX400を MK-3475の代替抗体として使用した。また、NSCLC の適切なモデルを使用できなかったため、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。



C Confidential

muDX400との併用作用を評価したのは、以下の組み合わせによるNSCLC標準治療である。

- カルボプラチン、パクリタキセル及びデキサメタゾンの併用投与
- ペメトレキセド及びデキサメタゾンの併用投与
- シスプラチン、ペメトレキセド及びデキサメタゾンの併用投与
- カルボプラチン、パクリタキセル及びデキサメタゾンの併用投与後、ペメトレキセド及びデキサメタゾンの併用投与

結果として、抗マウスPD-1抗体（muDX400）の作用におけるNSCLC標準治療の悪影響はないことが明らかとなった。むしろ、いくつかの組み合わせにおいては、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。有意に高い抗腫瘍効果（$P<0.05$）が得られた組み合わせは、以下の通りである。

- カルボプラチン、パクリタキセル及びデキサメタゾン（0.5、1又は5 mg/kg）の併用投与
- シスプラチン、ペメトレキセド及びデキサメタゾン（0.5、1又は5 mg/kg）の併用投与
- カルボプラチン、パクリタキセル及びデキサメタゾン（1又は5 mg/kg）の併用投与後、ペメトレキセド及びデキサメタゾン（1又は5 mg/kg）の併用投与

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。muDX400との併用により、有意に高い抗腫瘍効果（$P < 0.05$）が得られた組み合わせは、以下の通りである。

- カルボプラチン、パクリタキセル及びデキサメタゾン（5 mg/kg）の併用投与
- ペメトレキセド及びデキサメタゾン（0.5 mg/kg）の併用投与
- シスプラチン、ペメトレキセド及びデキサメタゾン（0.5 mg/kg）の併用投与
- カルボプラチン、パクリタキセル及びデキサメタゾン（1又は5 mg/kg）の併用投与後、ペメトレキセド及びデキサメタゾン（1又は5 mg/kg）の併用投与

重要な点として、以下の組み合わせでは、muDX400との併用により腫瘍の完全退縮が認められた。

- カルボプラチン、パクリタキセル及びデキサメタゾン（5 mg/kg）の併用投与：12例中1例で完全退縮
- カルボプラチン、パクリタキセル及びデキサメタゾン（1 mg/kg）の併用投与後、ペメトレキセド及びデキサメタゾン（1 mg/kg）の併用投与：12例中2例で完全退縮
- カルボプラチン、パクリタキセル及びデキサメタゾン（5 mg/kg）の併用投与後、ペメトレキセド及びデキサメタゾン（5 mg/kg）の併用投与：12例中2例で完全退縮


C Confidential

#### 2.6.2.2.2.5　トランスレーショナルモデリング&シミュレーションに用いた試験

[資料4.2.1.1.7: PD007][資料4.2.1.1.8: PD008]

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&シミュレーション評価のデータ入力に用いた[2.6.3.1項][2.7.2項]。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[2.6.3.1項]。

### 2.6.2.3　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。

### 2.6.2.4　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。mAb 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。mAb 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（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）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。

### 2.6.2.5　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試験は実施していない。

### 2.6.2.6　考察及び結論

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受容体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 mAb 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。MK-3475にはイヌ、ラット及びマウスの PD-1との交差性はない。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する。重要な点として、MK-3475は T 細胞の受容体を介したシグナルの非存在下に 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）



C Confidential

及びCD16a（FcγRIIIa）との結合性は弱かったことから、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担癌モデルにおいて、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、同じ担癌モデルにおいて、J43の効果は5-FU 又はゲムシタビンとの併用により増強された。なお、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。腎癌のマウス担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担癌モデルは、無処置下の腫瘍微小環境における PD-1及びPD-L1発現量に基づいて選択した。したがって、これらの同系マウス腫瘍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、拮抗的に作用する抗体による PD-1阻害時の作用機序を直接調べることができる。

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試験の一環として行った安全性薬理の評価では、いずれのパラメータ（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、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における各パラメータ）にもMK-3475に関連した影響は認められなかった。



C Confidential

### 2.6.2.7　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. Poster session presented at: European Society for Medical Oncology 2014 Congress; 2014 Sept 26-30; Madrid, ES; 2014.

[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. Presented at the 50th American Society of Clinical Oncology (ASCO) annual meeting; 2014 May 30-June 3; Chicago, IL; 2014.

[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: 30] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med. 2012; 366: 2443-54.

[資料 4.3: 31] Ansari MJI, Salama AD, Chitnis T, et al. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. J Exp Med 2003; 198: 63-9.

[資料 4.3: 32] Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. Blood. 2012; 119: 5640-9.

[資料 4.3: 33] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. Science. 2005; 310: 1510-2.

[資料 4.3: 34] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Translating basic mechanisms of IgG effector activity into next generation cancer therapies. Cancer Immun. 2012; 12: 13-9.

[資料 4.3: 35] Lux A, Nimmerjahn F. Of mice and men: the need for humanized mouse models to study human IgG activity in vivo. J Clin Immunol. 2013; 33 Suppl 1: S4-8.

[資料 4.3: 36] Nomi T, Sho M, Akahori T, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2007; 13: 2151-7.



C Confidential

# CTD 第 2 部

# 2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

# 2.6.3　薬理試験概要表

MSD 株式会社

# TABLE OF CONTENTS

**2.6.3: 1　Pharmacology:  Overview ..... 2**
**2.6.3: 2　Primary Pharmacodynamics ..... 3**
**2.6.3: 3　Secondary Pharmacodynamics ..... 3**
**2.6.3: 4　Safety Pharmacology ..... 3**
**2.6.3: 5　Pharmacodynamics Drug Interactions ..... 3**

C Confidential

## 2.6.3: 1　Pharmacology: Overview

| | | | | | **Test Article:** MK-3475 (SCH 900475) |
|---|---|---|---|---|---|
| **Type of Study - Primary Pharmacodynamics** | **Species** | **Testing Facility** | **GLP** | **Study No.** | **Location** |
| PD001 Amendment 1: Biophysical Characterization of Humanized Anti-Human PD-1 Monoclonal Antibodies – Binding and Ligand Blockade | In vitro | Merck Research Laboratories, Cambridge, MA | No | PD001 (PA-0070) | [資料 4.2.1.1.1: PD001] |
| 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 | PD002 (SN [redacted]545) | [資料 4.2.1.1.2: PD002] |
| 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 | PD003 (SN [redacted]536) | [資料 4.2.1.1.3: PD003] |
| Ex Vivo Biological Activity of Humanized Anti-Human PD-I Monoclonal Antibody SCH 900475 | In vitro | Schering-Plough Research Institute, part of Merck Research Laboratories, Palo Alto, CA | No | PD004 (SN [redacted]121) | [資料 4.2.1.1.4: PD004] |
| Pharmaceutical Sciences Technical Report: Biological Characterization of SCH 900475 | In vitro | Merck Research Laboratories, Union, NJ | No | PD005 (SN [redacted]122) | [資料 4.2.1.1.5: PD005] |
| 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 | PD006 (SN [redacted]546) | [資料 4.2.1.1.6: PD006] |
| Source Data Supporting Translational Modeling & Simulation Analyses | Mouse | Merck Research Laboratories, Palo Alto, CA | No | PD007 (PA-0011) | [資料 4.2.1.1.7: PD007] |
| Generation and Characterization of Anti-Mouse PD-1 Antibody DX400 and Murinized DX400 | In vitro | Merck Research Laboratories, Palo Alto, CA | No | PD008 (PA-0022) | [資料 4.2.1.1.8: PD008] |
| Amendment1 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 | PD011 (PA-0026) | [資料 4.2.1.1.9: PD011] |
| Amendment 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 | PD012 (PA-0027) | [資料 4.2.1.1.10: PD012] |
| 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 | PD013 (PA-0028) | [資料 4.2.1.1.11: PD013] |

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

C Confidential

### 2.6.3: 2　Primary Pharmacodynamics

For details, please refer to Primary Pharmacodynamics [Sec. 2.6.2.2]. An overview of pharmacologic studies supporting MK-3475 is presented in [Table 2.6.3: 1].

### 2.6.3: 3　Secondary Pharmacodynamics

Studies evaluating secondary pharmacodynamics of MK-3475 have not been conducted.

### 2.6.3: 4　Safety Pharmacology

Stand-alone studies evaluating safety pharmacology of MK-3475 were not conducted. For details, please refer to Safety Pharmacology [Sec. 2.6.2.4].

### 2.6.3: 5　Pharmacodynamics Drug Interactions

Pharmacodynamic drug interaction studies with MK-3475 have not been conducted.

C Confidential