CTD 第 2 部

2.7　臨床概要

2.7.1　生物薬剤学試験及び関連する分析法

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
2.7.1　生物薬剤学試験及び関連する分析法 5
2.7.1.1　背景及び概観 5
2.7.1.1.1　製剤の概要 6
2.7.1.1.1.1　原薬 6
2.7.1.1.1.2　製剤開発 6
2.7.1.1.1.3　臨床試験用及び市販用の製剤 6
2.7.1.1.2　生物学的分析法及び分析法バリデーションの概観 8
2.7.1.1.2.1　ヒト血清中 MK-3475濃度の生物学的分析法 8
2.7.1.1.2.2　ヒト血清中の抗 MK-3475抗体の検出及び確認のための免疫原性スクリーニング及び確認分析 14
2.7.1.1.2.3　ヒト血清中 MK-3475中和抗体（NAb）の検出のための免疫原性試験 20
2.7.1.1.3　薬力学的分析法の概要 26
2.7.1.1.3.1　MK-3475を投与した患者における MK-3475の薬力学評価を目的とする全血 PD-1受容体修飾アッセイ 26
2.7.1.1.3.2　T 細胞の免疫学的特性アッセイ 28
2.7.1.2　個々の試験結果の要約 30
2.7.1.3　全試験を通しての結果の比較と解析 30
2.7.1.3.1　原薬及び製剤の変更の影響 30
2.7.1.4　結論 30

C Confidential

表一覧

頁

表 2.7.1-1　MK-3475のサプライチェーンの概要.....7
表 2.7.1-2　臨床試験で使用した MK-3475のサプライチェーンの概要.....8
表 2.7.1-3　[redacted] にて実施された薬物濃度分析法（第1法）のバリデーションパラメータ.....10
表 2.7.1-4　[redacted] 社にて実施された薬物濃度分析法（第2法）のバリデーションパラメータ.....11
表 2.7.1-5　[redacted] 社にて実施された薬物濃度分析法（第3法）のバリデーションパラメータ.....12
表 2.7.1-6　[redacted] 社にて実施された薬物濃度分析法（第3法）のバリデーションパラメータ.....13
表 2.7.1-7　臨床試験で用いた分析法と CRO.....14
表 2.7.1-8　[redacted] にて実施された ADA アッセイのバリデーションパラメータ.....17
表 2.7.1-9　[redacted] 社にて実施された ADA アッセイのバリデーションパラメータ.....18
表 2.7.1-10　[redacted] 社にて実施された ADA アッセイのバリデーションパラメータ.....19
表 2.7.1-11　[redacted] にて実施された NAb アッセイのバリデーションパラメータ.....23
表 2.7.1-12　[redacted] 社にて実施された NAb アッセイのバリデーションパラメータ.....24
表 2.7.1-13　[redacted] 社にて実施された NAb アッセイのバリデーションパラメータ.....25
表 2.7.1-14　PD-1受容体修飾アッセイの分析能.....28

C Confidential

図一覧

頁

図 2.7.1-1　ヒト血清中 MK-3475濃度測定法の模式図.....9
図 2.7.1-2　免疫原性試験のフローチャート.....15
図 2.7.1-3　ヒト血清中 ADA の検出方法の模式図.....15
図 2.7.1-4　ヒト血清検体中の NAb 検出に使用する測定法の模式図.....21
図 2.7.1-5　T 細胞における SEB 刺激の模式図.....27
図 2.7.1-6　臨床試験用及び市販用の製剤並びに分析による同等性／同質性評価.....30

C Confidential

略号及び用語の定義

略号	定義	
%CV	Coefficient of variation, expressed as a percent	百分率で示した変動係数
ADA	Anti-drug antibody	抗 MK-3475抗体
[redacted]	[redacted] Germany	[redacted] ドイツ[redacted]
CD	Cluster of Differentiation	Cluster of Differentiation
CDR	Complementarity Determining Region	相補性決定領域
CPF	Cut Point Factor	カットポイント係数
CRO	Contract Research Organization	医薬品開発業務受託機関
CV	Coefficient of variation	変動係数
ECL	Electrochemiluminescence	電気化学発光
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酵素結合免疫吸着法
[redacted]	[redacted] USA	[redacted] 米国[redacted]
Fc	Fragment Crystallizable	結晶性フラグメント
HBV	Hepatitis B Virus	B 型肝炎ウイルス
HIV	Human Immunodeficiency Virus	ヒト免疫不全ウイルス
HLA	Human Leukocyte Antigen	ヒト白血球抗原
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL-2	Interleukin-2	インターロイキン-2
LLOQ	Lower Limit of Quantitation	定量下限
MSD	Meso Scale Discovery®	Meso Scale Discovery®
N/A	Not Applicable	該当なし
NAb	Neutralizing Antibodies	中和抗体
NC	Negative Control	陰性対照
NF	Cut Point Normalization Factor	カットポイント正規化係数
NK cells	Natural Killer cells	ナチュラルキラー細胞
PD-1	Programmed Cell Death-1	プログラム細胞死-1
PD-L1	Programmed Cell Death-Ligand 1	プログラム細胞死リガンド1
PD-L2	Programmed Cell Death-Ligand 2	プログラム細胞死リガンド2
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
QC	Quality Control	Quality Control
SD	Standard Deviation	標準偏差
S/N	Signal/Noise	シグナル／ノイズ比
SEB	Staphylococcal Enterotoxin B	ブドウ球菌エンテロトキシン B
TBNK	Activated T-cell assay and T-cell, B-cell and Natural Killer cell assay	活性化 T 細胞アッセイ並びに T 細胞、B 細胞及びナチュラルキラー細胞アッセイ
[redacted]	[redacted] Switzerland	[redacted] スイス[redacted]
w/v	Weight/Volume	重量／体積

C Confidential

2.7.1　生物薬剤学試験及び関連する分析法

2.7.1.1　背景及び概観

ペムブロリズマブ（遺伝子組換え）（以下、MK-3475）は、プログラム細胞死-1（PD-1）受容体に作用し、PD-1とそのリガンドプログラム細胞死リガンド1（PD-L1）及びプログラム細胞死リガンド2（PD-L2）との相互作用を直接阻害する免疫グロブリン G4（IgG4）/kappa アイソタイプの強力な高選択性ヒト化モノクローナル抗体である。PD-1経路は、腫瘍細胞が活性化 T 細胞の免疫機構を抑制（免疫寛容）するに当たり、重要な免疫抑制スイッチとなる[資料5.4: 51]。腫瘍細胞における PD-L1の高発現（PD-L1より低いものの PD-L2の発現も認められている）と様々な種類のがんの予後が不良で生存率が低いこととの間には相関があることが、これまでに確認されている[資料5.4: 52]、[資料5.4: 4]、[資料5.4: 53]、[資料5.4: 54]、[資料5.4: 38]。さらに、PD-1は悪性黒色腫患者の腫瘍細胞特異的 T 細胞増殖を抑制することが示唆されている[資料5.4: 7]。MK-3475は、健康成人及びがん患者の培養血液細胞において T 細胞免疫応答を増強することが確認されている。重要な点として、MK-3475はがん微小環境中では腫瘍特異的な細胞傷害性 T リンパ球を活性化するが、T 細胞受容体シグナルの非存在下では T 細胞を活性化することがない[2.4.2.1.1.3 項]。したがって、目標とする抗腫瘍効果が得られ、化学療法や他の免疫チェックポイント阻害剤よりも副作用が少ないと考えられる[資料5.4: 55]。

生物薬剤学試験及び関連する分析法の概要では、MK-3475開発段階における製剤開発の概観、臨床試験にて使用した製剤並びに臨床薬物動態（PK）、抗 MK-3475抗体（ADA）、中和抗体（NAb）及び薬力学的バイオマーカー［ex vivo インターロイキン-2（IL-2）アッセイ及び T 細胞の免疫学的特性］の評価のために使用したバリデーション済みの分析法について示す。血清中 MK-3475濃度の測定並びに ADA の検出のために臨床試験で使用した分析方法及びその性能特性の要約については、[資料5.3.1.4.1: BT00093]、[資料5.3.1.4.2: BT00094]、[資料5.3.1.4.3: BT00094A]、[資料5.3.1.4.4: RCZO2]及び[資料5.3.1.4.5: BT00095]に示す。

臨床試験に供給された MK-3475は、無菌の水で溶解する凍結乾燥製剤（50 mg／バイアル）又は溶液製剤（100 mg／バイアル）であり、静脈内投与の際には生理食塩液又は5%ブドウ糖液でさらに希釈する。悪性黒色腫患者を対象に実施中の国際共同治験では、[redacted]50LYO、[redacted]50LYO 及び[redacted]50LYO（いずれも凍結乾燥製剤）並びに[redacted]100（溶液製剤）を使用している。また[redacted]100及び[redacted]20（いずれも溶液製剤）が本邦での市販予定製剤である。広範な in vitro 分析試験を実施し、これらの製剤を比較した結果、臨床試験に使用したすべての製剤は互いに同等／同質であり、市販予定の製剤とも同等／同質であることが示された。

MK-3475の血清中濃度測定法、ADA 及び NAb 測定法は、高分子に関する現行のガイドライン（[2.7.1.1.2 項]に記載したバリデーション要約報告書にて参照しているガイドライン）に基づいてバリデートされており、ex vivo リンパ球刺激による IL-2反応（全血 PD-1受容体修飾アッセイ）及び T 細胞の免疫学的特性などの薬力学的評価に用いた分析法もバリデートされている。PK データのほか、免疫原性の評価並びに薬力学データについて別途[2.7.2 項]に要約する。

C Confidential

上記のとおり、市販用製剤を含め、臨床試験に使用した製剤の同等性／同質性が確認されている。MK-3475の投与方法は静脈内投与であるため、絶対的バイオアベイラビリティ及び食事の影響については検討していない。

2.7.1.1.1　製剤の概要

2.7.1.1.1.1　原薬

MK-3475の H 鎖及び L 鎖を含む[redacted]発現プラスミドを使用し、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞[redacted]株に導入して、抗体発現クローン（[redacted]）を選択し、マスター・シード・バンクを作製した。これを用いて、MK-3475原薬製造用のマスター・セル・バンクを作製した。MK-3475は、ヒンジ領域の228位のセリン残基をプロリン残基に置換し、IgG1抗体に類似したヒンジ領域を持つように改変した IgG4である。この改変により、IgG4抗体アイソタイプの代表的特性である Fab アーム交換が抑制される。この抗体では各 H 鎖 Fc 領域の297位のアスパラギンが不均一にグリコシル化されており、付加する糖鎖に応じて、典型的な分子量が148.9～149.5 kDa の範囲となる。

市販用製剤に用いる MK-3475原薬は[redacted], Germany（以下、「[redacted]」）の製造施設で製造される予定である[表 2.7.1-1]。

2.7.1.1.1.2　製剤開発

MK-3475製剤の組成は、適切な製剤組成を特定するために実施した予備的な処方開発研究及び処方開発研究に基づき選択された。最初の3回の処方開発研究に基づき、処方化した原薬（精製白糖を7 w/v%及びポリソルベート80を0.02 w/v%含有する pH 5.5の10 mmol/L ヒスチジン緩衝液中に MK-3475を25 mg/mL 含む）を凍結したものを毒性試験に使用した。臨床使用製剤を製造するにあたり、処方の安定性を最適化するため、毒性試験で用いた検体の処方マトリックスと同一の凍結乾燥製剤処方を開発した。臨床試験に用いた製剤及び市販用製剤の最終的な組成は毒性試験で使用したものと同一であり、精製白糖を7 w/v%及びポリソルベート80を0.02 w/v%含有する pH 5.5の10 mmol/L ヒスチジン緩衝液中に MK-3475を25 mg/mL 含む。

2.7.1.1.1.3　臨床試験用及び市販用の製剤

臨床開発用の MK-3475凍結乾燥製剤は、[redacted]（オランダ）（以下、「[redacted]」）及び[redacted]（アイルランド、[redacted]）（以下、「[redacted]」）の2箇所の製造施設で製造されたため、3種類のサプライチェーン（[redacted]50LYO、[redacted]50LYO 及び[redacted]50LYO）が存在する。また、3種類の溶液製剤、すなわち現在実施中の臨床試験で使用されている[redacted]100、並びに市販予定の製剤[redacted]100及び[redacted]20は、[redacted]（アイルランド、[redacted]）（以下、「[redacted]」）の製造施設で製造される（[表 2.7.1-1]）。

- [redacted] *50LYO*：[redacted]施設から供給される原薬を用いて[redacted]施設で製造する50 mg/vial

C Confidential

の凍結乾燥製剤

- [redacted]*50LYO*:[redacted]施設から供給される原薬を用いて[redacted]施設で製造する50 mg/vial の凍結乾燥製剤
- [redacted]*50LYO*:[redacted]施設から供給される原薬を用いて[redacted]施設で製造する50 mg/vial の凍結乾燥製剤
- [redacted]*100*：[redacted]施設から供給される原薬を用いて[redacted]施設で製造する100 mg/vial の溶液製剤
- [redacted]*100*：[redacted]施設から供給される原薬を用いて[redacted]施設で製造する100 mg/vial の溶液製剤
- [redacted]*20*:[redacted]施設から供給される原薬を用いて[redacted]施設で製造する20 mg/vial の溶液製剤

表 2.7.1-1　　MK-3475 のサプライチェーンの概要

	臨床試験用製剤のサプライチェーン				市販用製剤のサプライチェーン
	[redacted]50LYO	[redacted]50LYO	[redacted]50LYO	[redacted]100	[redacted]20 [redacted]100
原薬の製造施設	[redacted]		[redacted]		[redacted]
製剤の製造施設	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
剤型	50 mg/vial 粉末	50 mg/vial 粉末	50 mg/vial 粉末	100 mg/vial 溶液	20 mg/vial 100 mg/vial 溶液

各バイアルは単回使用を目的としている。凍結乾燥製剤では1バイアル中に表示量50 mg の MK-3475を含み、用時、無菌の注射用水で溶解して MK-3475の最終濃度を25 mg/mL とする。溶解した製剤は生理食塩液又は5%ブドウ糖液で1～10 mg/mL に希釈した後、静脈内投与する。溶液製剤では1バイアル中に表示量100 mg 又は20 mg の MK-3475を含む。溶液製剤は生理食塩液又は5%ブドウ糖液で希釈した後、静脈内投与する。

代表的な原薬及び製剤ロットを、出荷試験、特性解析試験、強制分解試験及び安定性試験で評価することにより、原薬及び製剤の両レベルで同等性／同質性を確認した。その結果、異なる製造所で製造された原薬は互いに同等／同質であり、溶液製剤は凍結乾燥製剤と同等／同質であった。

臨床試験で使用した MK-3475のサプライチェーンの概要を[表 2.7.1-2]に示す。

C Confidential

表 2.7.1-2　　臨床試験で使用した MK-3475 のサプライチェーンの概要

臨床試験	臨床試験用製剤のサプライチェーン			
	[redacted]50LYO	[redacted]50LYO	[redacted]50LYO	[redacted]100
001	○	○	－	－
002	○	○	－	－
006	－	○	○	－
010	－	○	－	○
011	－	○	－	－
024	－	－	－	○
025	－	○	－	－
041	－	－	－	○

○：使用。
－：使用せず。

2.7.1.1.2　　生物学的分析法及び分析法バリデーションの概観

血清中 MK-3475濃度の定量並びにヒト血清中の MK-3475に対する ADA 及び NAb の検出に用いる生物学的分析法のバリデーション結果をそれぞれ、バリデーション要約報告書[資料5.3.1.4.1: BT00093]、[資料5.3.1.4.2: BT00094]、[資料5.3.1.4.3: BT00094A]、[資料5.3.1.4.4: RCZO2]及び[資料5.3.1.4.5: BT00095]に要約する。

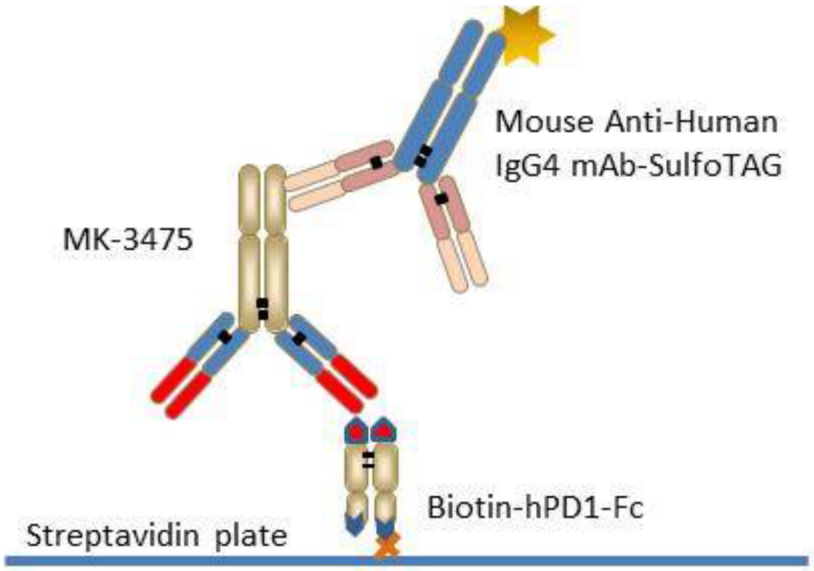
以下の項目で、MK-3475薬物濃度に関する生物学的分析法[2.7.1.1.2.1 項]、ADA 検出法[2.7.1.1.2.2 項]及び NAb 評価法[2.7.1.1.2.3 項]に関してバリデートされた試験法の概要を示す。

2.7.1.1.2.1　　ヒト血清中 MK-3475濃度の生物学的分析法

2.7.1.1.2.1.1　　MK-3475定量法の概要

臨床試験における血清中 MK-3475濃度の定量的評価を目的とした電気化学発光（ECL）イムノアッセイを開発し、規制ガイダンスに従いバリデーションを実施した。測定方法は直接結合法であり、R&D Systems 製（ミネアポリス、ミネソタ州、米国）のビオチン化組換えヒト PD-1-Fc キメラ（rhPD1-Fc 融合体）を捕捉試薬（Biotin-hPD1-Fc）として、Meso Scale Discovery®製（MSD）SULFO-TAG™で標識したマウスモノクローナル抗ヒト IgG4抗体を検出試薬としてそれぞれ使用する[図 2.7.1-1]。まず、捕捉試薬をストレプトアビジンでコーティングした MSD 製標準 MA2400 96ウェルプレートに加える。最小希釈倍率（1:10）で標準試料、QC (Quality Control)用及び実試料の分析を実施する。インキュベーションした後に洗浄を実施し、検出試薬を MSD プレートに加える。再度インキュベーションした後に洗浄を実施し、結合したマウス抗ヒト IgG4 SULFO-TAG™の ECL 反応（相対発光量）を MSD 製 Sector™ Imager 2400測定器を用いて測定する。血清中濃度4.89～1,250 ng/mL の標準曲線に適合するよう重み付け5パラメータロジスティックモデルアルゴリズムによる検量線を用い、内挿することにより、測定試料中の MK-3475濃度を定量する。バリデートされた範囲は10～800 ng/mL である。

C Confidential



Data source：[資料5.3.1.4.1: BT00093]

図 2.7.1-1　　ヒト血清中 MK-3475 濃度測定法の模式図

2.7.1.1.2.1.2　　MK-3475定量法バリデーションの経緯

ヒト血清中の MK-3475濃度を定量するイムノアッセイの経緯を本項に要約する。その他詳細は[資料5.3.1.4.1: BT00093]に示す。

まず、[redacted]年[redacted]月に Merck Research Laboratories（[redacted]、オランダ）にて分析法は開発され、バリデーションを実施した。その際、リガンド結合法における典型的なバリデーションを実施し、アッセイの分析能を評価した。パラメータの概要を[表 2.7.1-3]に示す。このバリデートされた分析法（第1法）は、臨床試験で採取した血清中 MK-3475濃度測定には使用されていない。この第1法は、その後 CRO（医薬品開発業務受託機関）の[redacted]社（[redacted]、米国）に分析法を移管した際のバリデーションの基となった。

C Confidential

表 2.7.1-3　[redacted]にて実施された薬物濃度分析法（第 1 法）のバリデーションパラメータ

バリデーションパラメータ	分析能
分析範囲	2.09～523 ng/mL（ヒト血清）
標準曲線真度	−6.4～8.6（%誤差）
標準曲線精度	CV ≤ 5.0%
QC 真度	試験内%理論値：85.8%～101.6%
	試験間%理論値：87.9%～104.7%
QC 精度	試験内%CV ≤ 8.1%
	試験間%CV ≤ 14.1%
希釈直線性	最大418000 ng/mL
感度（LLOQ）	2.09 ng/mL（ヒト血清）
選択性	QC 試料については31.4 ng/mL
特異性	PD-L1、PD-L2及び IgG4κ による本分析法への影響なし
ADA の影響	QC 試料31.4 ng/mL では ADA10 ng/mL で影響なし
室温安定性	最大24時間
凍結／融解安定性	4凍結／融解サイクル
長期保存安定性	−20°C で最大1ヵ月間

ng/mL = ナノグラム／ミリリットル ; CV = 変動係数 ; QC = Quality Control ; %CV = 百分率で示した CV ; LLOQ = 定量下限 ; PD-L1 = プログラム細胞死リガンド1 ; PD-L2 = プログラム細胞死リガンド2 ; IgG4κ = IgG4 Kappa ; ADA = 抗 MK-3475抗体

Data source：[資料5.3.1.4.1: BT00093]

[redacted] の分析法（第1法）を [redacted] 社に移管後、[redacted] 年[redacted]月に同分析法を改善し、バリデーションを実施した。パラメータの要約を[表 2.7.1-4]に示す。

C Confidential

表 2.7.1-4　[redacted] 社にて実施された薬物濃度分析法（第 2 法）のバリデーションパラメータ

バリデーションパラメータ	分析能
分析範囲	10～800 ng/mL（ヒト血清）
標準曲線真度	−2.4～4.6（%誤差）
標準曲線精度	CV ≤ 5.6%
QC 真度	試験内%RE：−11.26～18.40%
	試験間%RE：−1.1～10.2%
QC 精度	試験内%CV ≤ 16.91%
	試験間%CV ≤ 9.0%
希釈直線性	最大8,000,000 ng/mL
感度（LLOQ）	10 ng/mL（ヒト血清）
選択性	健康成人：QC 試料では30及び400 ng/mL
	がん：QC 試料では30及び400 ng/mL
	HBV：QC 試料では30及び400 ng/mL
	HIV：QC 試料では30及び400 ng/mL
長期 QC 保存安定性	−70°C で最大14ヵ月
	−20°C で最大11ヵ月
標準物質の長期保存安定性	−70°C で最大13.5ヵ月

ng/mL＝ ナノグラム／ミリリットル；CV＝ 変動係数；QC＝Quality Control；%RE＝［(実測値−理論値）÷ 理論値］× 100；%CV＝ 百分率で示した CV；HBV＝B 型肝炎ウイルス；HIV＝ ヒト免疫不全ウイルス；ADA＝ 抗 MK-3475抗体

Data source：[資料5.3.1.4.1: BT00093]

第1法（[redacted]）と第2法（[redacted] 社）の大きな違いは、PD-1捕捉試薬が可溶性 PD-1（第1法）から組換えヒト PD-1 Fc キメラ（第2法）に変更されていることである。同分析法で組換えヒト PD-1 Fc キメラ［R&D Systems（ミネソタ州、米国)］を捕捉試薬とした場合の適合性は、非臨床 PK 試験において確認されている。したがって、非臨床から臨床の検体分析まで測定法による違いを考慮することなく解釈が可能である。[表 2.7.1-4]に示すとおり、[redacted] 社で実施した分析法バリデーションにより、リガンド結合法における主要パラメータがいずれも許容可能であることが示された。

さらに、分析性能の観点及び現行の規制ガイダンス（2001年5月、FDA Guidance for Industry [資料5.4: 56]；2011年7月21日、EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 [資料5.4: 57]）に基づき、この第2法は[redacted]年[redacted]月に更改され、更なるバリデーションが実施された（第3法)。あらためて実施した部分的なバリデーションでは、健康成人及び患者集団における分析法の選択性が、分析能に対する主要な評価項目の1つとなっているが、これは定量下限（LLOQ）で調製した対照試料を用いて選択性を評価するというガイドラインの要件に準拠するためである。この要件を満たすべく、同分析法に市販試薬 LowCross-Buffer®を採用した。MK-3475が LLOQ 濃度（10 ng/mL）となるように添加した健康成人、悪性黒色腫、非小細胞肺がん、骨髄異形成症候群、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫及び多発性骨髄腫患者の各血清検体では、選択性は許容可能な結果であった。また、PD-L1、PD-L2及び IgG4κ 存在下で、真度、精度、希釈直線性及び特異性な

C Confidential

どのパラメータを、第2法及び当初の第1法のそれぞれの捕捉試薬を用いて確認したところ、いずれのパラメータもほぼ同様であった。これらのパラメータの要約を[表 2.7.1-5]に示す。

表 2.7.1-5　[redacted]社にて実施された薬物濃度分析法（第 3 法）のバリデーションパラメータ

バリデーションパラメータ	分析能
分析範囲	10～800 ng/mL（ヒト血清）
標準曲線真度	−1.4～1.7（%誤差）
標準曲線精度	CV ≤ 2.2%
QC 真度	試験内%誤差：−20.2～0.5%（HQC、MQC 及び LQC） −24～2.6%（ULOQ 及び LLOQ）
	試験間%誤差：−3.7～22.2%
QC 精度	試験内%CV ≤ 7.4%
	試験間%CV ≤ 10.7%
感度（LLOQ）	10 ng/mL（ヒト血清）
希釈直線性	最大100,000,000 ng/mL
特異性	PD-L1及び PD-L2 100 ng/mL 並びにヒト IgG4κ 500 µg/mL による ULOQ 及び LLOQ への影響なし
選択性	健康成人、悪性黒色腫、非小細胞肺がん、骨髄異形成症候群、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫及び多発性骨髄腫患者：LLOQ 10 ng/mL

ng/mL = ナノグラム／ミリリットル ; CV = 変動係数 ; QC = Quality Control ; %CV = 百分率で示した CV ; HQC = 高濃度 QC ; MQC = 中間濃度 QC ; LQC = 低濃度 QC ; ULOQ = 定量上限 ; LLOQ = 定量下限

Data source：[資料5.3.1.4.1: BT00093]

さらに第3法の分析法は、自動化の促進、検体の処理能力向上、ばらつきの軽減を目的とし、第2の CRO である[redacted]社（[redacted]、米国）に移管され、バリデートされた[資料5.3.1.4.6: RCVB2]。パラメータの要約を[表 2.7.1-6]に示す。

C Confidential

表 2.7.1-6　[redacted] 社にて実施された薬物濃度分析法（第 3 法）のバリデーションパラメータ

バリデーションパラメータ	分析能
分析範囲	10～800 ng/mL（ヒト血清）
標準曲線真度	−1.31～1.95（%誤差）
標準曲線精度	CV ≤ 3.58%
QC 真度	試験内%誤差：−14.4～4.07%
	試験間%誤差：−9.35～1.36%
QC 精度	試験内%CV ≤ 7.49%
	試験間%CV ≤12.5%
希釈直線性	最大1,000,000 ng/mL
感度（LLOQ）	10 ng/mL（ヒト血清）
フック効果	検出されず（最大1,000,000 ng/mL まで確認）
凍結／融解安定性	8凍結／融解サイクル
室温安定性	最大24時間
QC 安定性（-25°C）	最大12日
QC 安定性（-80°C）	最大13日
選択性	悪性黒色腫：10 ng/mL（LLOQ）
	非小細胞肺がん：10 ng/mL（LLOQ）
	健康成人：10 ng/mL（LLOQ）
	溶血：未添加及び10 ng/mL（LLOQ）で影響なし
	脂肪血症：未添加及び10 ng/mL（LLOQ）で影響なし
添加 QC の施設間バリデーション	同一の高、中及び低濃度添加 QC 試料で施設間再現性あり（すべての QC 試料の濃度が理論値から20%以内）
プールした実試料の施設間バリデーション	同一の15プール実試料の施設間再現性あり（実試料のすべてが相対誤差30%以内）

ng/mL = ナノグラム／ミリリットル ; CV = 変動係数 ; QC = Quality Control ; %CV = 百分率で示した CV ; LLOQ = 定量下限

Data source：[資料5.3.1.4.1: BT00093]

2.7.1.1.2.1.3　臨床検体中の MK-3475定量を目的とするバリデーション済み MK-3475 ECL イムノアッセイの使用

[redacted]年[redacted]月[redacted]日以前に得られた海外第 I 相試験（KEYNOTE-001試験、以下001試験）の患者血清検体の MK-3475濃度は[redacted] 社で第2法により分析した。[redacted]年[redacted]月[redacted]日以降に得られた001試験の検体は[redacted] 社にて第3法の分析法を用いた。001試験以降のすべての試験については[redacted]年[redacted]月[redacted]日以前に得られた検体は[redacted] 社、[redacted]年[redacted]月[redacted]日以降の検体は[redacted] 社にて第3法の分析法を用いて測定した。さらに、国内第 I 相試験（KEYNOTE-011試験、以下011試験）のパート A の検体は[redacted]社にて第3法の分析法を用いて測定した[表 2.7.1-7]。

C Confidential

表 2.7.1-7　　臨床試験で用いた分析法と CRO

試験	パート	[redacted]年[redacted]月[redacted]日まで	[redacted]年[redacted]月[redacted]日以降	[redacted]年[redacted]月[redacted]日まで	[redacted]年[redacted]月[redacted]日以降
001試験	A、B、C、D	[redacted]社にて分析（第2法）	[redacted]社にて分析（第3法）	N/A	N/A
001試験	F	N/A	[redacted]社にて分析（第3法）	N/A	N/A
011試験 パートA	N/A	[redacted]社にて分析（第3法）	[redacted]社にて分析（第3法）	N/A	N/A
その他の試験	N/A	N/A	N/A	[redacted]社にて分析（第3法）	[redacted]社にて分析（第3法）

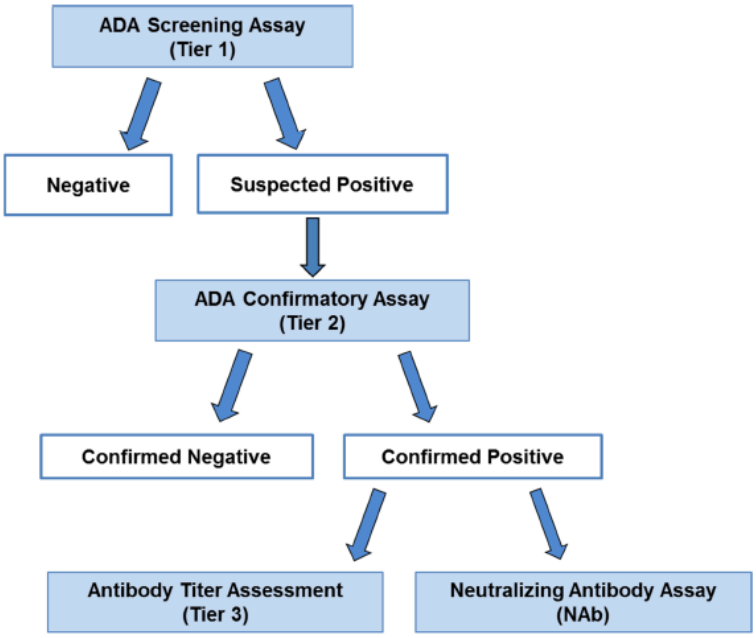
N/A：該当なし。

2.7.1.1.2.2　　ヒト血清中の抗 MK-3475抗体の検出及び確認のための免疫原性スクリーニング及び確認分析

2.7.1.1.2.2.1　　抗 MK-3475抗体（ADA）アッセイの概要

ヒト血清中の ADA の検出を目的としたブリッジング ECL 法の開発及び最適化を実施した[資料5.3.1.4.2: BT00094]、[資料5.3.1.4.3: BT00094A]、[資料5.3.1.4.4: RCZO2]。ADA に関する生物学的分析法では、以下の代表的な3段階の試験法を使用する[図 2.7.1-2]。すなわち、(1) ADA が陽性であるか陰性であるかを評価するスクリーニングアッセイ（第1段階）、(2) スクリーニングアッセイで陽性が疑われる場合、そのシグナルが MK-3475に特異的であるかどうかを評価する確認分析（第2段階）、(3) 確認分析にて陽性であった検体中の ADA の力価を評価する抗体価測定（第3段階）の3つである。力価は、カットポイント以上の陽性シグナルを示した最大希釈倍率とする。第2段階で ADA 陽性が確認された検体については、MK-3475に対する中和抗体活性についても評価する。中和抗体の評価に関する分析法バリデーションについては、[2.7.1.1.2.3 項]に記載する。

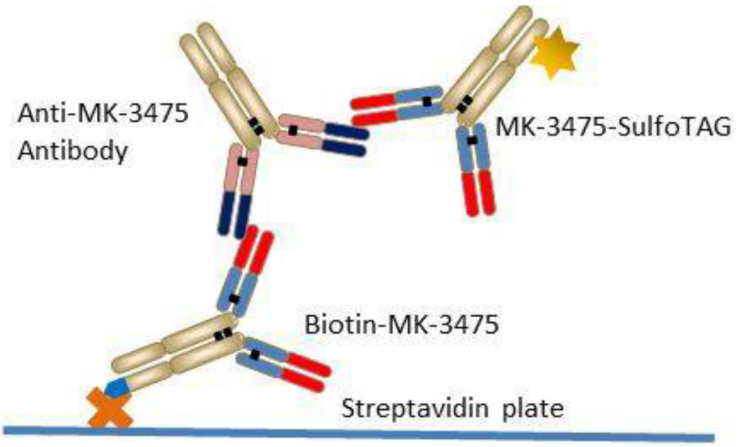
C Confidential



Data source：[資料5.3.1.4.2: BT00094]、[資料5.3.1.4.3: BT00094A]

図 2.7.1-2　　免疫原性試験のフローチャート

ADA アッセイの模式図を[図 2.7.1-3]に示す。



Data source：[資料5.3.1.4.2: BT00094]、[資料5.3.1.4.3: BT00094A]

図 2.7.1-3　　ヒト血清中 ADA の検出方法の模式図

C Confidential

捕捉試薬（ビオチン化 MK-3475）及び検出試薬（SULFO-TAG™標識 MK-3475）とともにインキュベーションする前に、実試料を酸処理し、その後 pH を中性にする。これは、モノクローナル抗体に対する ADA アッセイにおいて、ADA の検出に対する薬剤の影響をできる限り避けるためによく用いられる手法である。pH 中和後、酸処理した陽性対照、陰性対照及び実試料をただちにポリプロピレンプレートに加え、ビオチン化 MK-3475及び SULFO-TAG™-標識 MK-3475とともにインキュベートし、マスターミックスを作製する。インキュベート後、一定量のマスターミックスをストレプトアビジンでコーティングした標準 MA2400 96ウェルプレートに移す。プレートを洗浄して非結合物を除去し、結合した MK-3475 SULFO-TAG™の ECL 反応（相対発光量）を Sector™ Imager 2400により検出する。シグナル応答がカットポイントを上回る場合、ADA が存在する可能性があることを示している。よって、この分析法のカットポイントを上回るシグナル応答値を示した実試料は、ADA 陽性となる可能性が示唆され、この分析法のカットポイントを下回るシグナル応答値を示した実試料は ADA 陰性とした。

第2段階の確認分析では、第1段階のスクリーニングアッセイと同じ酸処理法を用いるが、第1段階とは異なり、酸処理前に最終濃度が10 µg/mL となるように過剰量の非標識 MK-3475を試料に添加する。MK-3475添加によってカットポイントを上回る反応シグナルの拮抗阻害を示す試料は、ADA 陽性に分類する。

分析の第3段階では、プールされた健康成人血清で試料を段階的に希釈し、その後酸処理を実施し、ADA が確認された試料の力価を測定する。第2段階で ADA 陽性であることが確認された試料に限り、力価を報告する。

この分析法の最小希釈倍率に関して、バリデーション報告書では未希釈（未処理血清）と記載されている。これは、測定施設では分析実施前に実試料を緩衝液であらかじめ希釈していないことを示す。ただし、すでに記載したとおり、MK-3475 ADA アッセイにおいて、ADA の検出に対する薬剤の影響をできる限り避けるため、捕捉試薬及び検出試薬とのインキュベーション前に酸処理を実施しており、実質の最小希釈倍率は1:13である。この最小希釈倍率においてバリデーションを実施した結果、モノクローナル抗体に関するブリッジング ADA アッセイの分析能が許容可能であることが確認されている。

2.7.1.1.2.2.2　抗 MK-3475 抗体（ADA）アッセイバリデーションの経緯

本項では、ADA アッセイの経緯について要約する。その他詳細は[資料5.3.1.4.2: BT00094]、[資料5.3.1.4.3: BT00094A]、[資料5.3.1.4.4: RCZO2]、[資料5.3.1.4.7: RCZO4]、[資料5.3.1.4.8: RCZO5]に示す。

ADA アッセイは、[redacted]年[redacted]月に[redacted] が開発し、バリデーションを実施し、ADA 検出法として必要な分析性能特性を評価した。パラメータの要約を[表 2.7.1-8]に示す。

この分析法は、[redacted]年[redacted]月に[redacted] 社に移管され、バリデーションが実施された。パラメータの要約を[表 2.7.1-9]に示す。さらに、この分析法は血清中の MK-3475を測定している[redacted] 社に移管され、バリデーションが実施された[資料5.3.1.4.4: RCZO2]、[資料5.3.1.4.7: RCZO4]、[資

C Confidential

料5.3.1.4.8: RCZO5]。パラメータの要約を[表 2.7.1-10]に示す。

表 2.7.1-8　[redacted] にて実施された ADA アッセイのバリデーションパラメータ

バリデーションパラメータ	分析能[a]		
カットポイント係数（CPF） カットポイント = 平均 NC × CPF	固形がん：1.513		
確認カットポイント （比：MK-3475による阻害）	固形がん：0.646		
感度	ウサギポリクローナル抗 MK-3475抗イディオタイプ濃縮抗体：<10 ng/mL		
精度 スクリーニングアッセイ	試験内	50 ng/mL	3.6%
		5000 ng/mL	5.0%
	試験間	50 ng/mL	13.4%
		5000 ng/mL	13.9%
精度 確認分析	試験内	50 ng/mL	14.3%
		5000 ng/mL	12.8%
	試験間	50 ng/mL	14.5%
		5000 ng/mL	21.8%
マトリックスの影響	ヘモグロビン最大30 µg/mL：ADA 50及び5000 ng/mL の検出に有意な影響なし		
	ビリルビン最大30 µg/mL：ADA 50及び5000 ng/mL の検出に有意な影響なし		
	脂肪最大3 mg/mL：ADA 50及び5000 ng/mL の検出に有意な影響なし		
	PD-L1最大100 ng/mL： PD-L1 100 ng/mL は ADA 50 ng/mL のシグナルを増強したが、これ以外は ADA 50及び5000 ng/mL の検出に有意な影響なし		
	PD-L2最大100 ng/mL : ADA 50及び5000 ng/mL の検出に有意な影響なし		
	IgG4κ 最大595 µg/mL : ADA 50及び5000 ng/mL の検出に有意な影響なし		
ADA の検出に影響を与えた可能性が否定できない薬剤濃度の基準値	ADA 含有量50 ng/mL の試料では、MK-3475最大14 µg/mL まで陽性を示した		
	ADA 含有量5000 ng/mL の試料では、MK-3475の最高濃度100 µg/mL まで陽性を示した		
フック効果	ADA 最大100,000 ng/mL までフック効果は認められず		

a：分析法バリデーションでは、酸処理を含める場合と含めない場合のいずれについても検討した。本表では、酸処理を含めた試験の結果のみ記載している。

CPF = カットポイント係数 ; NC = 陰性対照 ; ng/mL = ナノグラム／ミリリットル ; µg/mL = マイクログラム／ミリリットル ; ADA = 抗 MK-3475抗体 ; mg/mL = ミリグラム／ミリリットル ; PD-L1 = プログラム細胞死リガンド1 ; PD-L2 = プログラム細胞死リガンド2 ; IgG4κ = IgG4 Kappa

Data source：[資料5.3.1.4.2: BT00094]、[資料5.3.1.4.3: BT00094A]

C Confidential

表 2.7.1-9　[redacted] 社にて実施された ADA アッセイのバリデーションパラメータ

バリデーションパラメータ	分析能		
カットポイント正規化係数（NF） カットポイント = 平均 NC + NF	健康成人：NF = 7.5		
	固形がん：NF = 7.5[a]		
	悪性黒色腫：NF = 7.5[a]		
	非小細胞肺がん：NF = 7.5[a]		
確認カットポイント（%：MK-3475による阻害）	正常：33%		
	固形がん：33%		
	悪性黒色腫：57%		
	非小細胞肺がん：45%		
感度	ウサギポリクローナル抗 CDR 濃縮抗 MK-3475抗体：4.1 ng/mL		
	ウサギポリクローナル抗 MK-3475アフィニティ精製抗体：13.63 ng/mL		
精度 スクリーニングアッセイ	試験内	10 ng/mL	<17.9%
		500 ng/mL	<10.9%
	試験間	10 ng/mL	21.3%
		500 ng/mL	22.8%
精度 確認分析	試験内	10 ng/mL	<20.1%
		500 ng/mL	<0.8%
	試験間	10 ng/mL	12.2%
		500 ng/mL	1.2%
選択性	健康成人：ADA 120 ng/mL の10/10例がバイアス<25%［個別試料／標準 × 100)］を示した		
	固形がん：ADA 120 ng/mL の4/5例がバイアス<25%［個別試料／標準 × 100)］を示した		
	悪性黒色腫：ADA 10及び20 ng/mL の5/5例がカットポイントを上回った		
	非小細胞肺がん：ADA 10及び20 ng/mL の5/5例がカットポイントを上回った		
ADA の検出に影響を与えた可能性が否定できない薬剤濃度の基準値	ADA 250 ng/mL を含量する試料では、MK-3475最大25 µg/mL まで陽性を示した		
フック効果	ADA 最大 10,000 ng/mL までフック効果は認められなかった		
安定性	凍結／融解：5サイクル		
	室温：24時間		
	−20°C：25ヵ月		
	−70°C：12ヵ月		
a：悪性黒色腫、非小細胞肺がん及び固形がんの試料分析では、NF の差が20%未満となるため、NF = 7.5（健康成人）を使用する。			

NF = カットポイント正規化係数；NC = 陰性対照； CDR = 相補性決定領域；ng/mL = ナノグラム／ミリリットル；ADA = 抗 MK-3475抗体；µg/mL = マイクログラム／ミリリットル

Data source：[資料5.3.1.4.2: BT00094]、[資料5.3.1.4.3: BT00094A]

C Confidential

表 2.7.1-10　[redacted] 社にて実施された ADA アッセイのバリデーションパラメータ

バリデーションパラメータ	分析能		
スクリーニング シグナル／ノイズ カットポイント（SNC）（プレートカットポイント = 平均 NC x SNC）	SNC = 1.185[a]		
確認カットポイント（%：MK-3475による阻害）	23.5%[a]		
感度	スクリーニングアッセイ：ウサギポリクローナル抗 CDR 濃縮抗 MK-3475抗体：2.60 ng/mL		
	確認分析：ウサギポリクローナル抗 CDR 濃縮抗 MK-3475抗体：4.40 ng/mL		
精度 スクリーニングアッセイ	試験内	7.00 ng/mL	3.99%
		500 ng/mL	6.78%
	試験間	7.00 ng/mL	16.9%
		500 ng/mL	24.7%
精度 確認分析	試験内	7.00 ng/mL	6.51%
		500 ng/mL	2.40%
	試験間	7.00 ng/mL	12.0%
		500 ng/mL	13.4%
選択性／マトリックスの影響	健康成人：ADA 7.00 ng/mL の10/10例はカットポイントを上回り、ADA 未添加の19/20例はカットポイントを下回った		
	悪性黒色腫：ADA 7.00 ng/mL の10/10例はカットポイントを上回り、ADA 未添加の20/20例はカットポイントを下回った		
	非小細胞肺がん：ADA 7.00 ng/mL の10/10例はカットポイントを上回り、ADA 未添加の17/20例はカットポイントを下回った 未添加のデータは許容基準を満たさなかったため、カットポイントは非小細胞がん患者から得られた投与前検体を用いて再評価した		
	溶血は分析に影響しない 脂肪血症は正常に比べて陽性を示す可能性が高い		
ADA の検出に影響を与えた可能性が否定できない薬剤濃度の基準値	ADA 250 ng/mL を含量する試料では、MK-3475最大124 µg/mL まで陽性を示した		
フック効果	ADA 最大 100,000 ng/mL までフック効果は認められなかった		
安定性	凍結／融解：6サイクル		
	室温：24時間		
a：スクリーニング及び確認カットポイントは非小細胞肺がん患者より得られた投与前検体を用いて確立した。このカットポイントは、悪性黒色腫及び非小細胞肺がんのいずれにも用いた。			

SNC = シグナル／ノイズ カットポイント；NC = 陰性対照； CDR = 相補性決定領域；ng/mL = ナノグラム／ミリリットル；ADA = 抗 MK-3475抗体；µg/mL = マイクログラム／ミリリットル

Data source：[資料5.3.1.4.4: RCZO2]、[資料5.3.1.4.7: RCZO4]、[資料5.3.1.4.8: RCZO5]、[資料5.3.1.4.2: BT00094]

[redacted] 社で使用した ADA 陽性対照は、MK-3475で高度免疫処置したウサギが産生したポリクローナル抗 MK-3475抗体であった。当初、陽性対照は MK-3475結合アフィニティカラムを用いて精製した。さらに、モノクローナル抗体蛋白医薬品の陽性対照に関する規制ガイダンス（FDA 2009 draft guidance [資料5.4: 58]や EMA 2012 guidance for immunogenicity assays [資料5.4: 59]など）に準ずるため、抗相補性決定領域（CDR）濃縮 ADA 陽性対照を作製した。この抗体

C Confidential

を用い、感度、選択性、ADA の検出に影響を与えた可能性が否定できない薬剤濃度の基準値、精度、プロゾーン（フック）効果、保存安定性及び凍結／融解安定性に関して、あらためて分析法をバリデートした[資料5.3.1.4.2: BT00094]、[資料5.3.1.4.3: BT00094A]。この抗 CDR 濃縮 ADA 陽性対照（250 ng/mL）では、MK-3475の濃度が最大25 µg/mL まで許容可能である。[redacted]社で使用した方法では、酸処理後、pH を中性にするタイミングを改良するとともに、ADA の検出に対する薬剤の影響をさらに避けるために終夜のインキュベーション時間を延長した。その結果、抗 CDR 濃縮 ADA の250 ng/mL を含む ADA 陽性検体にて MK-3475の124 µg/mL まで許容可能であった[資料5.3.1.4.4: RCZO2]。その後、[redacted]年[redacted]月以降に開始したすべての臨床試験では、血清検体中 ADA 生物学的分析の陽性対照として、アフィニティ精製抗体からこの抗体へ変更した。

2.7.1.1.2.2.3　臨床血清検体中の ADA 検出を目的とするバリデーション済みブリッジング ECL イムノアッセイの使用

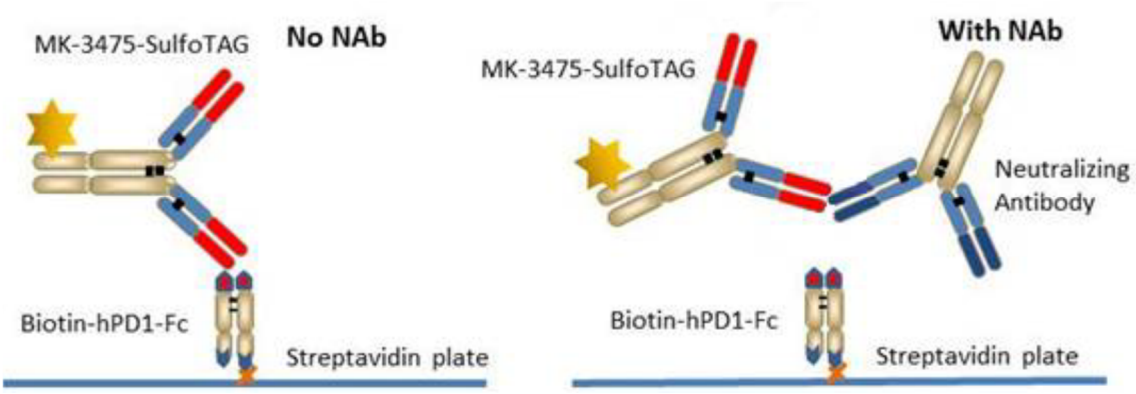
011試験（パート A）、並びに初期の001、002及び海外第Ⅲ相試験（KEYNOTE-006試験、以下006試験）で採取した血清検体中の ADA 測定には、[redacted]社でバリデーションを実施した方法を使用した。後期の001、002及び006試験並びに他の試験で採取した血清検体中の ADA 測定には、[redacted]社でバリデーションを実施した方法を使用した。

2.7.1.1.2.3　ヒト血清中 MK-3475中和抗体（NAb）の検出のための免疫原性試験

2.7.1.1.2.3.1　MK-3475中和抗体（NAb）アッセイの概要

NAb 検出のために確立された測定法は、ADA が MK-3475の薬理作用の重要な第1段階である PD-1への結合を阻害（中和）する能力に基づいている[資料5.3.1.4.5: BT00095]。この試験法の模式図を[図 2.7.1-4]に示す。

C Confidential



Data source：[資料5.3.1.4.5: BT00095]

図 2.7.1-4　　ヒト血清検体中の NAb 検出に使用する測定法の模式図

この方法は、モノクローナル抗体薬に対する中和抗体を検出するために、細胞アッセイに代わり競合的リガンド結合法を使用することを示した FDA 及び EMA の最近のガイダンス（FDA 2009 draft guidance [資料5.4: 58]及び EMA 2012 guidance for immunogenicity assays [資料5.4: 59]など）に準拠した方法である。よって、本生物学的分析法は、MK-3475の臨床試験で採取した血清検体中の NAb の評価に適切であると考えられる。

まず、分析にて ADA の検出に対する薬剤の影響をできる限り避けるため、陽性対照、陰性対照及び実試料（ADA 陽性が確認された検体）を酸処理し、その後 pH を中性にする。pH 中和後ただちに、酸処理した陽性／陰性対照及び実試料を SULFO-TAG™で標識した MK-3475（MK-3475-SULFO-TAG）とともに、ビオチン化 hPD1-Fc を加えたストレプトアビジンコーティング標準 MA2400 96ウェルプレートでインキュベートする。インキュベーション後、試料／MK-3475-SULFO-TAG 混合液をビオチン-rhPD1-Fc 結合 MA2400 96ウェルプレートに移す。非結合物を洗浄し、結合した MK-3475-SULFO-TAG の ECL シグナル（相対発光量）を Sector™ Imager 2400により測定する。MK-3475反応シグナルが減弱し、設定したカットオフポイントを下回る場合、NAb が存在している可能性が考えられる。結果は、陰性対照に対する実試料のシグナル／ノイズ比（S/N）で示される。

ADA 陽性となった検体における NAb の評価には2種の方法を用いた。偽陽性を5%としたスクリーニングカットポイントの場合、NAb 確認試験を実施した。NAb 陽性の可能性ありとされた実試料は、NAb の有無を検証するため、さらに確認試験を実施する。NAb 確認分析では、NAb 陽性の可能性ありとされる実試料から免疫グロブリンを除去するために、Protein G HP MultiTrap™プレート（GE Healthcare Life Sciences）を使用する。Protein G プレートにより反応性 IgG が枯渇すると、MK-3475-SULFO-TAG シグナルが増大し（S/N 比が増大する）、中和抗体の有無が確認できる。偽陽性を1%としたスクリーニングカットポイントの場合、NAb 確認試験を

C Confidential

実施しなかった。

この分析法では、バリデーション報告書に未希釈（未処理血清）と記載されている。これは、測定施設では分析実施前に実試料を緩衝液であらかじめ希釈していないことを示す。ただし、ADA の検出に対する薬剤の影響をできる限り避けるため、捕捉試薬及び検出試薬とのインキュベーション前に酸処理し、さらにその後中和しており、酸処理した場合、最小希釈倍率は1:13である。この最小希釈倍率を用いてバリデーションを実施した結果、本分析法はバリデーション計画書に概説した判定基準に準じて許容可能であることが確認されている。

2.7.1.1.2.3.2　　MK-3475 中和抗体（NAb）アッセイ法バリデーションの経緯

本項では、NAb アッセイの経緯について要約する。その他詳細は[資料5.3.1.4.5: BT00095]、[資料5.3.1.4.9: RCZQ2]に示す。

本分析法は当初、[redacted]年[redacted]月に[redacted] が開発し、バリデーションを実施し、NAb アッセイに必要となる分析性能を評価した。パラメータを[表 2.7.1-11]に示す。

C Confidential

表 2.7.1-11　[redacted] にて実施された NAb アッセイのバリデーションパラメータ

バリデーションパラメータ	分析能		
カットポイント係数（CPF） カットポイント ＝ 平均 NC − CPF	固形がん：7057 ECL 数		
確認カットポイント （比：MK-3475による阻害）	スクリーニングカットポイントを偽陽性率1%に設定しているため、確認試験を省略している。		
感度	固形がん：604.9 ng/mL		
精度	試験内	1000 ng/mL	≤5.1%
		5000 ng/mL	≤19.7%
	試験間	1000 ng/mL	32.4%
		5000 ng/mL	38.1%
特異性	最高濃度1600 ng/mL までポリクローナル抗 MK-3475アイソタイプ抗体に対する中和活性は確認されなかった。		
	最高濃度600 µg/mL まで非特異的 IgG4κ に対する中和活性は確認されなかった。		
マトリックスの影響	ヘモグロビン最大30 µg/mL : ADA 300及び2000 ng/mL の検出に有意な影響なし。		
	ビリルビン最大30 µg/mL : ADA 300及び2000 ng/mL の検出に有意な影響なし。		
	脂肪最大3 mg/mL：ADA 300及び2000 ng/mL の検出に有意な影響なし。		
	PD-L1最大100 ng/mL : ADA 300及び2000 ng/mL の検出に有意な影響なし。		
	PD-L2最大100 ng/mL : ADA 300及び2000 ng/mL の検出に有意な影響なし。		
	IgG4κ 最大595 µg/mL：ADA 300及び2000 ng/mL の検出に有意な影響なし。		
ADA の検出に影響を与えた可能性が否定できない薬剤濃度の基準値	ADA 含有量2000 ng/mL の試料では、MK-3475の最高濃度100 µg/mL まで陽性を示した。		
フック効果	ADA 最大25,000 ng/mL までフック効果が認められなかった。		

CPF = カットポイント係数 ; NC = 陰性対照 ; ECL = 電気化学発光 ; ng/mL = ナノグラム／ミリリットル ; IgG4κ = IgG4 Kappa ; µg/mL = マイクログラム／ミリリットル ; ADA = 抗 MK-3475抗体 ; PD-L1 = プログラム細胞死リガンド1 ; PD-L2 = プログラム細胞死リガンド2

Data source：[資料5.3.1.4.5: BT00095]

[redacted] 法は、[redacted]年[redacted]月に CRO の [redacted] 社に移管し、バリデーションを実施している。[redacted] 社におけるバリデーションパラメータを[表 2.7.1-12]に示す。

C Confidential

表 2.7.1-12 [redacted] 社にて実施された NAb アッセイのバリデーションパラメータ

バリデーションパラメータ	分析能	
スクリーニングアッセイカットポイント： 個別の平均 S/N（有効な全分析単位のうち有効な個別の全 HS）－ 個別の SD × 1.645	健康成人：1.02	
	固形がん：1.08	
確認カットポイント： ［S/N（G 蛋白質処理済み）÷ S/N（G 蛋白質未処理)］の平均（有効な全分析単位のうち有効な個別の全 HS）＋ 個別の SD × 2.33	健康成人：1.06	
	固形がん：1.07	
感度	正常：685 ng/mL	
スクリーニングアッセイ精度 ADA 750 ng/mL	試験内	≤7.3%
	試験間	4.2%
確認分析精度 ADA 750 ng/mL	試験内	≤13.0%
	試験間	4.6%
選択性	健康成人：ADA 750 ng/mL の10/10例が陽性を示した。 （S/N ≤ カットポイント）	
	固形がん：ADA 750 ng/mL の10/10例が陽性を示した。 （S/N ≤ カットポイント）	
安定性	−20°C：12ヵ月	
	−70°C：15ヵ月	

S/N = シグナル／ノイズ比 ; HS = ヒト血清 ; SD = 標準偏差 ; ng/mL = ナノグラム／ミリリットル ; ADA = 抗薬物抗体

Data source：[資料5.3.1.4.5: BT00095]

NAb アッセイ法は[redacted] 社に移管し、[redacted]年[redacted]月にバリデーションを実施している。[redacted] 社におけるバリデーションパラメータを[表 2.7.1-13]に示す。

Confidential

表 2.7.1-13　[redacted] 社にて実施された NAb アッセイのバリデーションパラメータ

バリデーションパラメータ	分析能	
アッセイカットポイント： 標準化補正率（NCF） カットポイント＝平均 NC × NCF	0.836	
確認カットポイント	スクリーニングカットポイントは偽陽性を1%に設定したため、確認は省略した。	
感度	97.5 ng/mL	
アッセイ精度 LPC ADA 190 ng/mL	試験内	≤5.08%
	試験間	19.5%
アッセイ精度 HPC ADA 500 ng/mL	試験内	≤7.07%
	試験間	22.6%
選択性	健康成人：未添加の10/10例が陰性（S/N >カットポイント）、ADA 190 ng/mL の10/10例及び ADA 500 ng/mL の10/10例が陽性（S/N ≤カットポイント）を示した。	
	悪性黒色腫：未添加の10/10例が陰性（S/N >カットポイント）、ADA 190 ng/mL の9/10例及び ADA 500 ng/mL の10/10例が陽性（S/N ≤カットポイント）を示した。	
	非小細胞肺がん：未添加の10/10例が陰性（S/N >カットポイント）、ADA 190 ng/mL の9/10例及び ADA 500 ng/mL の10/10例が陽性（S/N ≤カットポイント）を示した。	
	脂肪血症の影響は観察されなかった。 溶血検体は正常検体より偽陽性の確率が高かった。	
安定性	凍結／溶解を6サイクル：有意な影響なし	
	室温24時間：有意な影響なし	
フック効果	最大 ADA 100000 ng/mL まで：有意な影響なし	
ADA の検出に影響を与えた可能性が否定できない薬剤濃度の基準値	最高375 ng/mL の薬剤存在下で500 ng/mL の抗体が検出された。	
S/N = シグナル／ノイズ比； ng/mL = ナノグラム／ミリリットル；ADA = 抗 MK-3475抗体；LPC = 低濃度陽性対照；HPC = 高濃度陽性対照		

Data source：[資料5.3.1.4.9: RCZQ2]

2.7.1.1.2.3.3　臨床検体分析を目的とする NAb アッセイの使用

011試験（パート A）並びに初期の001、002及び006試験で採取した血清検体中の NAb 検出には、[redacted] 社でバリデーションを実施した方法を使用した。その後、この方法は血清中の MK-3475を測定している [redacted] 社に移管され、再バリデーションした[資料5.3.1.4.9: RCZQ2][redacted] 社の方法は、後期の001、002及び006試験並びに他の試験で採取した血清検体中の NAb 検出に用いた。[redacted] 社の分析能の要約は[表 2.7.1-13]に示す。ADA 確認分析によって、検体が ADA 陽性であることが確認された場合に、この NAb アッセイによって分析を実施した。この NAb アッセイで陽性であることが確認された検体を中和抗体活性陽性とした。

C Confidential

2.7.1.1.3　薬力学的分析法の概要

2.7.1.1.3.1　MK-3475を投与した患者における MK-3475の薬力学評価を目的とする全血 PD-1受容体修飾アッセイ

2.7.1.1.3.1.1　試験原理

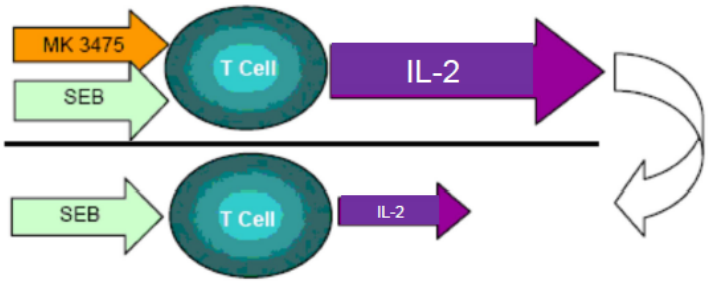
MK-3475の PD-1受容体への結合能を評価するために、全血 PD-1受容体修飾アッセイを用いた。この分析法では、ex vivo で MK-3475の存在下又は非存在下でブドウ球菌エンテロトキシン B（SEB）を全血に加えた後、リンパ球活性化の指標として IL-2濃度を測定する。SEB によって誘発される反応は通常、PD-1経路によって阻害されるが、PD-1阻害剤である MK-3475を加えることにより再活性化が可能となる[2.4.2.1.1.2 項]。これより、MK-3475による PD-1経路の機能的遮断は IL-2放出バイオマーカーによって表すことができるため、MK-3475の標的結合の評価に用いられる。バイオマーカーデータは、検体採取時点の全血検体（血中に存在する MK-3475のみを含む）と、最大の反応を確実に得られるよう MK-3475を過剰添加した同一患者の全血との IL-2刺激比で表す。

この分析法では、各検体を SEB 単独又は SEB 及び飽和濃度の MK-3475（25 μg/mL）で処理する。IL-2刺激比は、SEB 及び MK-3475で処理した検体の IL-2濃度を、SEB 単独で処理した同検体の IL-2濃度で除して算出する。

$$\text{IL-2刺激比} = \frac{[\text{IL-2}]\,\text{SEB} + 25\,\mu\text{g/mL MK-3475}}{[\text{IL-2}]\,\text{SEB}}$$

MK-3475投与患者では、MK-3475がすでに PD-1受容体を阻害していることより、IL-2分泌量が多くなっている。一方、投与前検体には MK-3475が存在せず、MK-3475を ex vivo で添加することによって IL-2分泌量が増大するため、投与前検体の IL-2刺激比が投与後検体よりも高くなると考えられる。投与によって PD-1受容体に MK-3475が十分に結合した検体では、ex vivo で MK-3475を添加してもこれ以上の刺激がもたらされるとは考えにくいため、IL-2刺激比がほぼ1になると考えられる。これとは対照的に、投与前検体や血中 MK-3475濃度のごく低い検体では、ex vivo で MK-3475を添加すると IL-2反応が増強される余地があるため、IL-2刺激比が1を上回ると考えられる。この分析法の模式図を[図 2.7.1-5]に示す。

C Confidential



Data source：[資料5.3.1.4.10: VAL809]

図 2.7.1-5　　T 細胞における SEB 刺激の模式図

2.7.1.1.3.1.2　　分析法の特性

MK-3475の存在下又は非存在下で全血検体を SEB 処理し、組織培養液で1:10に希釈して37°Cで4日間インキュベートする。インキュベーション終了後、上清を回収し、分析実施まで−80°Cで凍結保存する。MesoScale Human IL-2 Ultra-sensitive kit（MSD、#K111AHC）を用いて、回収した上清中の IL-2濃度を測定する。分析法の詳細及びバリデーションにより確立された分析能については、バリデーション報告書[資料5.3.1.4.10: VAL809]に示す。

実試料と同じ方法により、低濃度、中濃度及び高濃度の QC 試料を調製した。繰り返し QC 試料を測定して試験内及び試験間の精度を評価した（試験内精度：10回、試験間精度：21回）。低濃度、中濃度及び高濃度の QC 試料の試験内及び試験間%CV はそれぞれ5.5%～8.8%、12.7%～13.5%であった。

IL-2の低濃度試料を繰り返し5回測定することにより、IL-2アッセイの定量下限（LLOQ）を求めた。LLOQ（4.0 pg/mL）は、試験間 CV＜20%で測定可能な IL-2の最低濃度である。

3つの異なる濃度の IL-2標準品（低濃度、中濃度及び高濃度）を用いて、細胞培養上清試料に対する分析対象物質の添加回収率を評価した。以下の式により回収率を算出した。

（上清試料に添加した IL-2濃度 －IL-2を添加しなかった上清試料の IL-2濃度）/（緩衝液中に添加した IL-2濃度） × 100

添加濃度（3濃度）のいずれについても、回収率が許容可能であることが確認された（94.0%～105.5%）。

健康成人7例から採取した検体を用いて、室温における全血中の IL-2の安定性を評価した。採取当日（対照）、採取後24及び48時間後に、溶媒又は MK-3475 0.42 µg/mL を含有する試料を処理し、各時点で IL-2刺激比を算出した。室温で保存した場合、全血試料は少なくとも採取後48時間は安定であった（変化率 ＜30%）。

低濃度、中濃度及び高濃度の QC 試料を用い、凍結／融解操作後の IL-2の安定性を評価した。

C Confidential

凍結／融解を繰り返した全試料と、凍結／融解を実施していない対照試料とを比較した。試料は、少なくとも3凍結／融解サイクルまで安定であった（変化率 ＜30%）。

分析能の要約を[表 2.7.1-14]に示す。

表 2.7.1-14　PD-1 受容体修飾アッセイの分析能

分析方法	MesoScale Human Ultra-Sensitive IL-2 ELISA
バリデーション報告	MK-3475の薬力学的作用を評価する PD-1受容体修飾アッセイ（SEB にて刺激された全血中の IL-2産生）
試料	Quality Control 試料（低濃度、中濃度、高濃度）
希釈	刺激用に全血を1:10で希釈 分析では上清を1:81に希釈
感度	LLOQ = 4.0 pg/mL
精度	試験内%CV = 5.5%～8.8% 試験間%CV = 12.7%～13.5%
回収率	低濃度、中濃度及び高濃度添加では、94%～105.5%
安定性	全血：室温で48時間 上清：−80°C で6ヵ月 IL-2：3凍結／融解サイクル
%CV = 百分率で示した変動係数；ELISA = 酵素結合免疫吸着法；IL-2 = インターロイキン2；LLOQ = 定量下限	

Data source：[資料5.3.1.4.10: VAL809]

2.7.1.1.3.2　　T 細胞の免疫学的特性アッセイ

MK-3475が T リンパ球に及ぼす薬力学的作用を評価するため、活性化 T 細胞アッセイ並びに T 細胞、B 細胞及びナチュラルキラー細胞（TBNK）アッセイの、2種類のヒト全血フローサイトメトリー免疫表現型アッセイを用いた。

2.7.1.1.3.2.1　　活性化 T 細胞アッセイ

活性化 T 細胞の有無の特定を目的とし、ヒト白血球抗原（HLA）-DR^+を用いた活性化 T 細胞アッセイが[redacted]（[redacted]、米国）により開発され、バリデーションが実施された[資料5.4: 60]。フローサイトメトリーT 細胞アッセイの活性化マーカーとしては、その安定した発現及び採取後の安定性から HLA-DR を使用した。これにより、001試験のような国際共同治験での分析が容易になる[資料5.3.5.2.1.1: P001V01]。本測定法では、$CD4^+$T 細胞及び$CD8^+$T 細胞に存在する HLA-DR^+T 細胞の頻度を報告する。以下に本測定法を要約する。まず室温で Cyto-Chex® BCT 管（Streck Labs）に全血検体を採取した。次に血液100 µL を CD3-PerCP、CD4-V450、CD8-AF700、HLA-DR-FITC 及び ICOS-PE から成る蛍光色素結合モノクローナル抗体カクテル（Becton Dickinson Biosciences）とともに室温暗所で20分間インキュベートした。赤血球を溶解及び洗浄した後、白血球を固定し、BD FACS Canto II フローサイトメーターによりストップカウント30,000リンパ球で測定を行った。その後、WinList software 7.0によりリストモードファイルを解析し、以下の値を報告した。

C Confidential

- 活性化 CD4 T 細胞の頻度［% HLA-DR$^+$（CD3$^+$CD4$^+$CD8$^-$リンパ球）］
- 活性化 CD8 T 細胞の頻度［% HLA-DR$^+$（CD3$^+$CD4$^-$CD8$^+$リンパ球）］

この分析では、QC に CD-Chex™ Plus（Streck Clinical Laboratory）を用いた。

バリデーションパラメータとして、健康成人の全血を用いて試験内及び試験間精度（%CV）並びに採取後検体の安定性を評価した[資料5.3.1.4.11: VR01]。試験内及び試験間精度の平均%CV値は、総じて20%以内であった。バリデーションデータにより、活性化 T 細胞アッセイにおいて Cyto-Chex® BCT 管中の採取後試料は、室温で少なくとも4日間安定であることが示された。

2.7.1.1.3.2.2　T 細胞、B 細胞及びナチュラルキラー細胞（TBNK）アッセイ

TBNK アッセイは、当初より [redacted] で開発され、バリデーションされた分析法であり[資料5.3.1.4.12: VR02]、T 細胞（CD4$^+$T 細胞及び CD8$^+$T 細胞）、B 細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞などのヒト末梢血中リンパ球サブセットの計数及び頻度のモニタリングに日常的に使用されている。この分析法で用いた単一プラットフォーム BD TruCount™法では、非洗浄溶解法及び BD TruCount™管の校正済みカウントビーズを用いた絶対計数法が採用されている。以下に本測定法を要約する。まず室温で Cyto-Chex® BCT 管に全血検体を採取した。次に、血液100 µL を、蛍光モノクローナル抗体カクテルを含む下記の BD TruCount™管2本に添加した。

- 管1：BD MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4（BD カタログ番号340499）
- 管2：BD MultiTEST CD3/CD16&CD56/CD45/CD19（BD カタログ番号340500）

室温暗所で20分間インキュベートして赤血球を溶解した後、ただちにストップカウント5,000 CD45$^+$ゲーティングリンパ球で測定した。その後、WinList 7.0を用いてリストモードファイルを解析し、以下のリンパ球の絶対数（血液1 µL 当たりの細胞数）及び頻度（%）を報告した。

- T 細胞［CD3$^+$絶対数及び CD3$^+$頻度（CytCxBCT）］
- CD4 T 細胞［CD3$^+$/CD4$^+$絶対数及び CD3$^+$/CD4$^+$頻度（CytCxBCT）］
- CD8 T 細胞［CD3$^+$/CD8$^+$絶対数及び CD3$^+$/CD8$^+$頻度（CytCxBCT）］
- B 細胞［CD3$^-$/CD19$^+$絶対数及び CD3$^-$/CD19$^+$頻度（CytCxBCT）］
- NK 細胞［CD3$^-$/CD16$^+$CD56$^+$絶対数及び CD3$^-$/CD16$^+$CD56$^+$頻度（CytCxBCT）］

バリデーションパラメータとして、健康成人の全血を用いて試験内及び試験間精度（%CV）並びに採取後検体の安定性を評価した[資料5.3.1.4.12: VR02]。試験内及び試験間精度の平均%CV 値は、総じて20%以内であった。バリデーションデータにより、TBNK アッセイにおいて、Cyto-Chex® BCT 管中の採取後試料は、室温で少なくとも3日間安定であることが示された。

C Confidential

2.7.1.2　　個々の試験結果の要約

臨床生物薬剤学試験は実施していない。

2.7.1.3　　全試験を通しての結果の比較と解析

MK-3475は静脈内投与で使用するため、バイオアベイラビリティは100%となることから、絶対的バイオアベイラビリティは検討していない。また、静脈内投与で使用する製剤は in vitro-in vivo 相関や食事の影響の評価対象とならないため、試験を実施していない。

2.7.1.3.1　　原薬及び製剤の変更の影響

初期の臨床開発プログラムでは一貫して凍結乾燥製剤が使用された。この製剤の製造には異なるサプライチェーンを用いたことから、製剤が3種類となった（[redacted]50LYO、[redacted]50LYO、及び [redacted]50LYO）。その後、溶液製剤（成分組成は同一）が臨床試験に導入された。市販用には溶液製剤を使用する予定である。製剤の起源を[図 2.7.1-6]に要約する。広範な試験を実施し、臨床試験用製剤及び市販予定の製剤間の同等性／同質性を評価した。これらの評価により、臨床試験用製剤及び市販予定の製剤が、原薬及び製剤の両レベルで同等／同質であることが実証され、異なる製造所で製造された原薬は互いに同等／同質であり、溶液製剤は凍結乾燥製剤と同等／同質であることが示された。

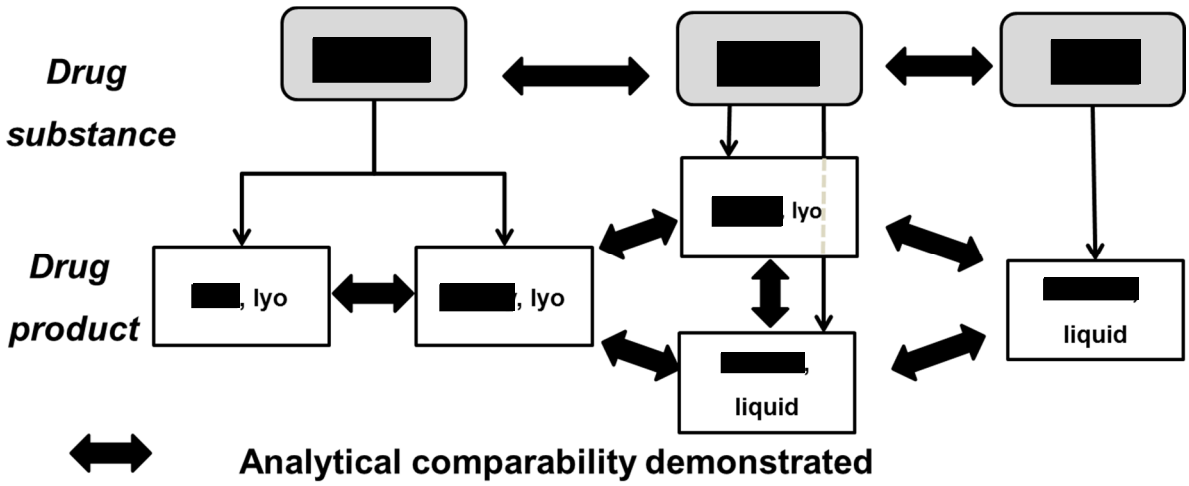


図 2.7.1-6　　臨床試験用及び市販用の製剤並びに分析による同等性／同質性評価

2.7.1.4　　結論

- 初期の臨床開発用の製剤は、凍結乾燥した MK-3475を50mg 含む単回使用のバイアルとして供給された。後期の臨床開発用及び市販予定の製剤は、同一成分組成の MK-3475溶液

C Confidential

を100 mg 又は20 mg 含む単回使用のバイアルとして供給される。

- 幅広い in vitro 分析試験を実施し、臨床開発において使用した製剤と市販予定製剤を比較した。その結果、市販予定の製剤は臨床試験に使用した製剤と同等／同質であることが示された。
- バリデーション済みの生物学的分析法により、(1) MK-3475の血清中濃度、(2) 抗 MK-3475 抗体（ADA）及び（3）中和抗体（Nab）を測定することが可能であった。血清中薬物濃度に関しては、各 CRO で異なる生物学的分析法を用いて測定を実施したが、母集団薬物動態解析により、これらの分析法が測定値に影響しないことが確認された[資料5.3.1.4.13: PPKCOMP]。
- バリデーション済みの薬力学的分析法により、（1）ex vivo リンパ球刺激による IL-2反応及び（2）T 細胞の免疫学的特性を評価することが可能であった。

C Confidential