2.4 非臨床試験の概括評価

目次

1　非臨床試験計画概略 5
1.1　GLP 適用の有無 9
1.2　非臨床試験に使用した被験物質 10
2　薬理試験 10
2.1　効力を裏付ける in vitro 試験 10
2.2　効力を裏付ける in vivo 試験 11
2.3　副次的薬理試験 12
2.4　安全性薬理試験 12
2.5　薬力学的薬物相互作用試験 12
3　薬物動態試験 12
3.1　分析法 12
3.2　吸収 13
3.3　分布 13
3.4　代謝 14
3.5　排泄 14
3.6　薬物動態学的薬物相互作用 14
3.7　免疫原性 14
4　毒性試験 15
4.1　単回投与毒性試験 15
4.2　反復投与毒性試験 15
4.2.1　げっ歯類の反復投与毒性試験 15
4.2.2　カニクイザルの反復投与毒性試験 16
4.3　遺伝毒性試験 16
4.4　がん原性試験 17
4.5　生殖発生毒性試験 17
4.6　局所刺激性試験 17
4.7　その他の毒性試験 17
4.7.1　マウスのアナフィラキシー様反応の発現機序に関する試験 17
4.7.2　CRA 試験 18
4.7.3　TCR 試験 18
4.7.4　光毒性試験 19
4.8　原薬及び製剤中の不純物、添加物及び溶出物の毒性学的評価 19
5　ヒト及び動物の安全性データの比較 19
5.1　ヒト及び動物のアベルマブ曝露量の比較 19
5.2　毒性試験で認められた所見と臨床試験での有害事象の比較 20
6　総括及び結論 21

7　参考文献 23

表目次

表 2.4 - 1　単回投与による薬物動態試験の一覧 7
表 2.4 - 2　毒性試験の一覧 9
表 2.4 - 3　サル反復投与毒性試験及びヒト臨床試験のアベルマブ曝露量の比較 20

図目次

図 2.4 - 1　アベルマブの構造 5

略語一覧

ADA	Anti-drug antibodies	抗薬物抗体
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ANOVA	Analysis of variance	分散分析
AUC	Area under the concentration-time curve	血中濃度－時間曲線下面積
CDC	Complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞障害
C_{max}	Maximum observed concentration	最高血中濃度
CRA	Cytokine release assay	サイトカイン放出試験
CYP	Cytochrome P450	チトクロム P450
DDI	Drug-drug interaction	薬物相互作用
ECG	Electrocardiogram	心電図
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価
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
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
[redacted]	[redacted]	[redacted]
ICH	International conference on harmonization of technical requirements and registration of pharmaceuticals for human use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IFN	Interferon	インターフェロン
Ig	Immunoglobulin	免疫グロブリン
IgE	Immunoglobulin E	免疫グロブリン E
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgG1	Immunoglobulin G1	免疫グロブリン G1
IL	Interleukin	インターロイキン
IL-1RA	Interleukin-1 receptor antagonist	インターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト
IP-10	Interferon-inducible protein 10	インターフェロン誘導タンパク質 10
IRR	Infusion-related reactions	注入に伴う反応
KD	Affinity constant	解離定数
[redacted]	[redacted]	[redacted]

MAHA	Mouse anti-human antibody	マウス抗ヒト抗体
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1	単球走化性タンパク-1
MIP-1α	macrophage inflammatory protein-1α	マクロファージ炎症性タンパク質 1α
NK	Natural killer	ナチュラルキラー
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核球
PD	Pharmacodynamic(s)	薬力学
PD-1	Programmed death 1	プログラム細胞死 1
PD-L1	Programmed death ligand 1	プログラム細胞死リガンド 1
PDE	Permitted daily exposure	1 日許容曝露量
PHA	Phytohemagglutinin	フィトヘマグルチニン
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
SEA	Staphylococcal enterotoxin A	ブドウ球菌腸管毒素 A
SPR	Surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
$t_{1/2}$	Terminal half life	終末相半減期
TCR	Tissue cross reactivity	組織交差反応性
TGF	Transforming growth factor	トランスフォーミング増殖因子
TK	Toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
TNF	Tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TO	Target occupancy	標的占有率
UV-VIS	Ultraviolet visible	紫外線-可視光
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態分布容積

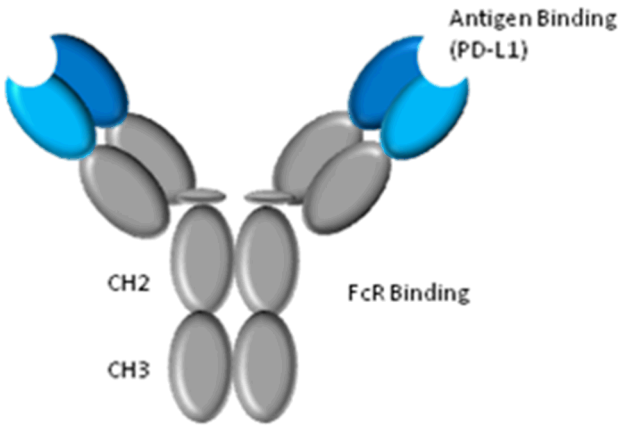
1　非臨床試験計画概略

プログラム細胞死リガンド 1［programmed death ligand-1、PD-L1（B7-H1 及び CD274 としても知られる）］は膜貫通タンパク質で、活性化した T 細胞表面に存在するプログラム細胞死 1（programmed death-1、PD-1）との相互作用により T 細胞活性化を抑制する。PD-L1 と PD-1 の相互作用は T 細胞に強い抑制性のシグナルを送り、その結果、細胞傷害性のエフェクター機能が消失し、アナジーが誘導される（Keir 2008、Riley 2009）。癌患者では、腫瘍細胞上に過剰に発現した PD-L1 が、癌の進行、浸潤及び予後不良と相関することが報告されている（Okazaki 2007）。T 細胞応答を抑制するという PD-L1 の既知の作用、及び PD-L1 の発現と癌の予後との強い相関関係から、PD-L1/PD-1 相互作用の阻害は、癌の免疫療法による治療戦略として極めて有望である。PD-L1 又は PD-1 を標的とした複数の抗体が癌の治療薬として承認済又は開発中である（Ascierto 2010、Deng 2016）。

アベルマブ（開発コード：MSB0010718C 又は MSB0010718）は、PD-L1 に特異的に結合し、PD-L1 と PD-1 及び B7.1 との相互作用を阻害する、ヒト免疫グロブリン G1（immunoglobulin G1、IgG1）（λ）フレームワーク領域を有する完全ヒトモノクローナル抗体である。アベルマブは、遺伝子組換え技術によりチャイニーズハムスター卵巣細胞で産生され、450 個のアミノ酸残基からなる 2 つの重鎖及び 216 個のアミノ酸残基からなる 2 つの軽鎖から構成され、構造内に典型的なジスルフィド結合を有する IgG1 抗体である。糖鎖を除くアミノ酸構成及び予測されたジスルフィド結合から算出されたアベルマブの分子量は、143829.80 Da である（モジュール 3.2.S.1.2 参照）。糖鎖を含む分子量は、約 147000 Da である。

アベルマブの構造を図 2.4 - 1 に示す。

図 2.4 - 1　アベルマブの構造



アベルマブ製剤は、ガラスバイアル中に 20 mg/mL のアベルマブ、10 mM の酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.2）、280 mM の D-マンニトール及び 0.05%（w/v）ポリソルベート 20 を含む点滴静注用の滅菌液剤である（モジュール 3.2.P.1 参照）。

アベルマブは進行固形癌及び血液癌の単剤療法による治療薬として開発中である。アベルマブの用法・用量としては、10 mg/kg を 2 週間間隔で 1 時間以上かけて点滴静注する。

非臨床試験は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（international conference on harmonization of technical requirements and registration of pharmaceuticals for human use、ICH）S9 及び S6（R1）ガイドラインに基づき実施した。

アベルマブの非臨床試験に用いる適切な動物種は、遺伝子組換え技術により作製された複数の動物種の PD-L1 に対するアベルマブの結合親和性データ（PEAT1805[redacted]CJW）に基づき選択した。結合親和性データから、カニクイザル、マウス及びヒトの PD-L1 に対するアベルマブの結合親和性は同程度であったが［解離定数（affinity constant、KD）はそれぞれ 1.1 nM、0.9 nM 及び 0.7 nM）］、イヌ、ラット及びウサギの PD-L1 では明らかにこれより低かった（KD はそれぞれ 4.5 nM、66.8 nM 及び 105.4 nM）。

薬理試験では、アベルマブの標的リガンドへの結合特異性、標的細胞への結合に関する in vitro 及び in vivo での薬力学的（pharmacodynamic、PD）効果、並びに抗腫瘍効果の発現機序を検討した。効力を裏付ける in vivo 試験は、正常な宿主免疫系を有するマウス同系腫瘍モデルを用いて実施した。また、アベルマブはエフェクター機能を有する IgG1 抗体であることから、アベルマブの癌患者での治療効果に、腫瘍に対する抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity、ADCC）が寄与する可能性がある（Wilson 2011）。これについても、複数の in vitro 及び in vivo 試験で検討した。更に、臨床での有効量を予測するための試験も実施した。

アベルマブの効力を裏付ける試験として、以下の試験を実施した（試験結果の概要はモジュール 2.6.2.1 参照）。

効力を裏付ける in vitro 試験：

- ヒト、マウス、カニクイザル、イヌ、ラット及びウサギの PD-L1 に対する結合親和性（PEAT1805[redacted]CJW）
- B7 ファミリーに対する結合特異性（PEAT[redacted]1213VS）
- PD-L1 発現細胞への結合（IONC[redacted]04051DZ）
  - 種々のヒト腫瘍細胞への結合
  - フィトヘマグルチニン（phytohemagglutinin、PHA）刺激ヒト初代末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cells、PBMC）への結合
  - ヒト PD-L1、マウス PD-L1、又はカニクイザル PD-L1 を発現するよう操作した HEK293 細胞に対する濃度依存的結合
- PD-L1/PD-1 相互作用の阻害（IONC[redacted]04051DZ）
- 抗原特異的 T 細胞活性化（IONC[redacted]04051DZ）
- ヒト PBMC スーパー抗原刺激試験（IONC[redacted]04051DZ）
  - ブドウ球菌腸管毒素 A（Staphylococcal enterotoxin A、SEA）刺激ヒト初代 PBMC の IL-2 産生増加
- In vitro 標的占有率（target occupancy、TO）測定（IONC1909[redacted]SM）
- ヒト腫瘍細胞に対する ADCC（PEAT1805[redacted]AJW）
- ヒト腫瘍細胞に対する CDC（PEAT1805[redacted]BJW）

効力を裏付ける in vivo 試験：

- MC38 結腸癌モデルでの用量依存的な抗腫瘍効果（IONC2004[redacted]AKH）

- In vivo 作用機序試験（IONC1103[redacted]RT 及び IONC0806[redacted]RT）
  - 全身の $CD8^+$ T 細胞を枯渇させた MC38 担癌 C57BL/6 マウスを用いた試験（IONC1103[redacted]RT）
  - ADCC 誘導能を無効化したアベルマブ及び全身のナチュラルキラー（natural killer、NK）細胞を枯渇させた MC38 担癌 C57BL/6 マウスを用いた試験（IONC0806[redacted]RT）

また、目的とする標的以外に対する作用として、アベルマブのヒト免疫細胞に対する ADCC 誘導能を評価するため、in vitro で副次的薬理試験を実施した（IONC0929[redacted]SM）。

アベルマブの安全性薬理学的評価（心血管系、呼吸系、及び中枢神経系の評価）は、ICH S6（R1）ガイドラインに基づき、カニクイザルの反復投与毒性試験に組み込み実施した（表 2.4 - 2 参照）。

静脈内単回投与後のマウス及びカニクイザルの PK 試験において、アベルマブの薬物動態（PK)特性を評価した（表 2.4 - 1 参照）。マウス、ラット及びカニクイザルの反復投与毒性試験において、反復投与での PK/TK を評価した（表 2.4 - 2 参照）。マウス及びカニクイザルの単回投与 PK 試験、マウス、ラット及びカニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験、カニクイザルの 13 週間反復投与毒性試験において、免疫原性を評価した。

以下の単回投与 PK 試験を実施した。

表 2.4 - 1　単回投与による薬物動態試験の一覧

試験番号	試験デザイン	バッチ No.	動物数/群	投与経路	投与用量 (mg/kg)	GLP 適用
B-[redacted]-009	CD-1 マウスへの MSB0010294 の単回投与による PK 試験（15 日間）	A08-274-1（F02）、MSB0010294 [a]	3 匹/群（雌又は雄）	静脈内（単回）	0.4、4、20	非適用
IONC0308[redacted]RT	C57BL/6 マウスへの MSB0010718 の単回投与による PK/PD 試験	A10-329-12	20 匹/群（雌）	静脈内（単回）	1.25、2.5、5、10、20	非適用
RF2120	カニクイザルへの MSB0010682 の単回投与による PK/PD 試験	A10-134-4、MSB0010682 [a]	3 匹/群（雄）	静脈内（単回）	0.8、4、20	非適用

a　アベルマブの類縁体
GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、PD：薬力学、PK：薬物動態

カニクイザルを用いた毒性試験における TK 及び免疫原性の評価のために、サル血清中のアベルマブの定量及び抗薬物抗体（ADA）の検出の測定法を開発し、必要なバリデーションを行った（モジュール 2.6.5.2 参照）。

臨床で予定されているアベルマブの投与方法は、1 時間以上かけての点滴静脈内投与である。したがって、アベルマブの毒性プロファイルを、げっ歯類及びカニクイザルへの反復静脈内投与により検討した。げっ歯類の試験（RF2740、T16226、RF3310 及び IONC-TI12-003RVT）は、急速静脈内投与で実施した。カニクイザルの試験（RF2710 及び RF4990）は、約 90 分間の点滴静脈内投与で実施し、これは臨床でのアベルマブの投与方法に類似している。

マウスへのアベルマブの反復投与により致死的なアナフィラキシー反応が発現したこと、及びラットの PD-L1 に対するアベルマブの結合親和性が低いことから、げっ歯類はアベルマブの毒性試験に

用いる適切な動物種ではないと考えられた。したがって、マウス及びラットを用いた探索的毒性試験（非 GLP）を除き、アベルマブの毒性はカニクイザル 1 種のみで評価した。なお、in vitro 組織交差反応性（tissue cross reactivity、TCR）試験の結果からも、カニクイザルが毒性試験に用いる適切な動物種であることが確認されている。（4.7.3 項参照）。

カニクイザルでは、まずアベルマブの週 1 回、4 週間反復点滴静脈内投与による毒性試験（GLP 適用、RF2710）を実施し、続いて週 1 回、13 週間反復点滴静脈内投与による毒性試験（GLP 適用、RF4990）を実施した。13 週間反復投与毒性試験では 8 週間の回復期間も設けた。

アベルマブの単回投与毒性試験、遺伝毒性試験及び癌原性試験は、ICH S6（R1）及び S9 ガイドラインに基づき実施しなかった。アベルマブの急性毒性は、カニクイザルの 4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験の初回投与後に評価した。また、生殖能への影響は、限定的ながら、カニクイザルの反復投与毒性試験の結果（生殖器の病理組織学的評価）から評価した。アベルマブの本申請での対象とする患者集団（成人進行癌患者）及び PD-1/PD-L1 に関連した生殖発生毒性に関する文献情報（Austin 2016）に基づき、生殖発生毒性試験及び幼若動物を用いた試験は実施していない。

その他に実施した毒性試験を以下に示す。

- マウスのアナフィラキシー様反応の発現機序に関する試験（IONC-TI[redacted]-003RVT、モジュール 2.6.6.8.1 参照)
- ヒト及びカニクイザルの全血及び PBMC のサイトカイン放出試験（cytokine release assays、CRA）（T17985 及び T17986、モジュール 2.6.6.8.2 参照）
- ヒト PBMC の CRA 試験：複数ヒトドナーの比較（[redacted]-DA471-N0、モジュール 2.6.6.8.3 参照）
- カニクイザル及びヒト正常組織を用いた TCR 試験（20015187 及び 20015186、モジュール 2.6.6.8.4 及び 2.6.6.8.5 参照）
- 紫外線-可視光（ultraviolet-visible、UV-VIS）吸収スペクトルによる光毒性の評価（モジュール 2.6.6.8.6 参照）

更に、アベルマブ製剤の容器及び栓から溶出する可能性のある不純物の毒性学的評価を実施した（モジュール 2.6.6.8.8 参照）。

アベルマブの主な毒性試験の概要を表 2.4 - 2 に示す。

表 2.4 - 2　毒性試験の一覧

試験の種類及び期間	試験系	投与方法	投与用量（mg/kg）	GLP[a]適用	試験番号
反復投与毒性試験					
4 週間	CD-1 マウス	静脈内、週 1 回	0、20、40、140	非適用	RF2740
4 週間	CD-1 マウス	静脈内、週 1 回	0、20	非適用	T16228
4 週間	Wistar Han ラット	静脈内、週 1 回	0、20、40、140	非適用	RF3310
4 週間	カニクイザル	静脈内、週 1 回	0、20、60、140	適用	RF2710[1]
13 週間＋8 週間（回復）	カニクイザル	静脈内、週 1 回	0、20、60、140	適用	RF4990[1]
その他の毒性試験					
アナフィラキシー様反応の発現機序に関する試験	CD-1 マウス	静脈内、週 1 回	5、20	非適用	IONC-TI[redacted]-003RVT
サイトカイン放出試験	ヒト及びカニクイザル全血	in vitro	0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10、100 nM	非適用	T17985
サイトカイン放出試験	ヒト及びカニクイザル PBMC	in vitro	0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10、100 nM	非適用	T17986
サイトカイン放出試験	ヒト PBMC	in vitro	13.9、69.52、131.04、695.2、1390.4、6952、13904 nM	非適用	[redacted]-DA471-N0
TCR 試験	カニクイザル組織	in vitro	1、15 µg/mL	適用	20015187
TCR 試験	ヒト組織	in vitro	1、15 µg/mL	適用	20015186
UV-VIS 吸収プロファイル	該当せず	(UV-VIS 吸収)	該当せず	非適用	モジュール 3.2.S.3.1 参照

a　GLP 非適用下で実施した検査項目については 1.1 項参照
GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、HPLC：高速液体クロマトグラフィー、PBMC：末梢血単核球、UV：紫外線、UV-VIS：紫外線－可視光、TCR：組織交差反応性

1.1　GLP 適用の有無

効力を裏付ける in vitro 及び in vivo 試験、並びに副次的薬理試験は、GLP 非適用下で実施した。

PK 試験は、GLP 非適用下で実施した。カニクイザル血清中のアベルマブ濃度及び免疫原性［(抗薬物抗体（anti-drug antibodies、ADA)］の分析法バリデーションは GLP 非適用下で実施したが、13 週間反復投与毒性試験（RF4990）のアベルマブ濃度及び免疫原性測定は GLP 適用下で実施した。

げっ歯類を用いた探索的反復投与毒性試験及びマウスのアナフィラキシー様反応の発現機序に関する試験は、GLP 非適用下で実施した。

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験は GLP 適用下で実施した。4 週間反復投与毒性試験（RF2710）の一部の検査項目、すなわち安全性薬理学的評価、multi-analyte profiling（MAP）、血液免疫表現型検査、TK 及び免疫原性の測定は GLP 非適用下で実施した。13 週間反復投与毒性試験（RF4990）では、血液免疫表現型検査のみ GLP 非適用下で実施した。

毒性試験に用いたアベルマブ調製液の均一性及び安定性試験のための分析法バリデーション（RF5050 及び RF5710）は、GLP 非適用下で実施した。アベルマブ調製液の均一性及び安定性試験は GLP 適用下で実施した（RF5060 及び RF5720、モジュール 2.6.6.8.7 参照）。

ヒト及びカニクイザルの全血及び PBMC を用いた in vitro CRA 試験、並びに UV-VIS 吸収スペクトル測定は、GLP 非適用下で実施した。ヒト及びカニクイザル正常組織を用いた TCR 試験は、GLP 適用下で実施した。

非 GLP 試験及び GLP 試験において GLP 非適用下で実施した一部の検査項目は、データの質と完全性を保証するための社内手順書に従った。

1.2　非臨床試験に使用した被験物質

薬理試験及び PK 試験の一部には、[redacted]のバッチ又はアベルマブ関連抗体を使用した（詳細はモジュール 2.6.2.1 及び 2.6.4.1 参照）。これらの[redacted]バッチは[redacted]にて製造された。毒性試験には、in vitro CRA 試験（[redacted]-DA471-N0、モジュール2.6.6.8.3 参照）を除き、アベルマブの　製剤 1*　を使用した。In vitro CRA 試験（[redacted]-DA471-N0）には、　製剤　1*　及び　製剤　2*　を使用した。　製剤 1*　と　製剤 2*　の[redacted]に基づき（モジュール 3.2.S.2.6 参照）、　製剤　2*　の安全性は　製剤　1*　を用いた毒性試験により保証されている。臨床試験は、　製剤　1*　及び　製剤　2*　を用いて実施された（両製剤の臨床試験での比較はモジュール 2.7.1.3 及び 2.7.4 参照）。毒性試験に使用した製剤に用いた原薬バッチについては、毒性試験の概要表に示した（モジュール 2.6.7.4 及び3.2.P.5.4 参照）。

2　薬理試験

効力を裏付ける in vitro 及び in vivo 試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験（毒性試験の一部として実施）でアベルマブの薬理学的評価を実施した（モジュール 2.6.3.1 参照）。

2.1　効力を裏付ける in vitro 試験

In vitro での薬理学的特性評価により、アベルマブは PD-L1 発現ヒト腫瘍細胞に結合し、PD-L1 とその同族受容体である PD-1 及び B7.1 との間の相互作用を競合的に阻害することが示された（IONC[redacted]04051DZ、モジュール 2.6.2.2.1.3 及び 2.6.2.2.1.4 参照）。しかし、その他の B7 ファミリーリガンドには結合しなかった（IPEAT[redacted]1213VS、モジュール 2.6.2.2.1.2 参照）。ヒト及びマウス由来の一次 T 細胞を用いた 2 つの in vitro 試験で、アベルマブは T 細胞活性化を用量依存的に増強した（IONC[redacted]04051DZ、モジュール 2.6.2.2.1.5 及び 2.6.2.2.1.6 参照）。

また、アベルマブはヒト腫瘍細胞株に対して in vitro で ADCC 活性を示したが、CDC 活性は示さなかった（PEAT1805[redacted]AJW 及び PEAT1805[redacted]BJW、モジュール 2.6.2.2.1.8 及び 2.6.2.2.1.9 参照）。

種々の動物種の PD-L1 に対する結合親和性の検討では、アベルマブは、ヒト、マウス及びカニクイザルの PD-L1 に対して同様の結合親和性を示した（PEAT1805[redacted]CJW）。PD-L1 は多くのヒト正常組織に免疫チェックポイントとして発現し（モジュール 2.6.6.8.5 参照）、いくつかの腫瘍細胞にも免

疫監視機構を回避するために発現している（Blank 2006）。In vitro でアベルマブが種々のヒト腫瘍細胞に結合することが確認された（IONC[redacted]04051DZ、モジュール 2.6.2.2.1.3 参照）。In vitro での評価結果は、アベルマブが、in vivo の腫瘍微小環境で細胞表面に PD-L1 を発現した腫瘍細胞による T 細胞の抑制を解除し、T 細胞を介した腫瘍細胞の殺傷能を回復させることを示唆している。ヒト全血を用いた in vitro での標的占有率の測定では、ヒト $CD3^+$T 細胞上で 50%の PD-L1 占有率を得るために必要なアベルマブ濃度は 0.122 ± 0.042 μg/mL、95%の PD-L1 占有率を得るために必要なアベルマブ濃度は試験した全てのドナー試料で 1 μg/mL であった（IONC1909[redacted]SM、モジュール 2.6.2.2.1.7 参照）。更に、アベルマブは副次的作用機序として in vitro での ADCC 誘導能を有することから、PD-L1 発現腫瘍は ADCC を介した免疫系による排除の標的となり得ることが示唆された。

2.2　効力を裏付ける in vivo 試験

アベルマブの効力を裏付ける in vivo 試験は、腫瘍での免疫調節による治療効果を検討するため、同系マウス腫瘍モデルで実施した。このマウスモデルは完全に正常な自然及び獲得免疫系を有するため、ヒト抗体であるアベルマブに対するマウス抗ヒト抗体（mouse anti-human antibody、MAHA）を産生する。MAHA によりアベルマブの生物学的活性が中和されることから、マウス in vivo 試験でのアベルマブの投与期間は 1 週間に制限された。すなわち、アベルマブの in vivo 効力を裏付ける試験では、アベルマブを 3 日おきに計 3 回投与した。このような条件下にもかかわらず、アベルマブは単剤で C57BL/6 マウスの皮下に移植した MC38 腫瘍（結腸癌）に対して強い腫瘍増殖抑制効果を示した。免疫組織化学的手法で 5 種の同系マウス腫瘍を評価したところ、MC38 の PD-L1 発現レベルが最も高かったことから、MC38 を、効力を裏付ける in vivo 試験に使用した（モジュール 2.6.2.2.2.1 参照）。

アベルマブは MC38 腫瘍 に対して抗腫瘍効果を示し、この効果は、脾臓の $CD8^+PD\text{-}1^+$ T 細胞の増加及びエフェクターメモリー$CD8^+$T 細胞の増加を含む T 細胞表現型の変化と関連していた（IONC2004[redacted]AKH、モジュール 2.6.2.2.2.2 参照）。更に、腫瘍抗原特異的 $CD8^+$T 細胞応答の増強も認められ、エフェクターメモリー細胞機能の維持が示唆された。免疫記憶に対する効果を評価するための抗原チャレンジ試験は実施していない。

アベルマブの抗腫瘍効果に対する ADCC の寄与を検討するため、2 つの in vivo 試験を実施した（モジュール 2.6.2.2.2.3 参照）。最初の試験（IONC1103[redacted]RT）で、MC38 腫瘍移植マウスの全身の $CD8^+$ T 細胞を枯渇させた結果、MSB0010294（アベルマブの類縁体）の抗腫瘍効果が完全に消失した。このことから、抗腫瘍効果の発現に細胞傷害性 T 細胞が不可欠であることが示された。次の試験（IONC0806[redacted]RT）で、酵素的に脱グリコシル化することにより ADCC 能を無効化したアベルマブを用いて（Nose 1983）、アベルマブの抗腫瘍効果への ADCC の寄与を検討した。ADCC 能の無効化により、MC38 腫瘍移植マウスでのアベルマブの抗腫瘍効果は、わずかながら弱まった。また、主に ADCC を媒介する NK 細胞の全身枯渇下で MC38 腫瘍移植マウスにアベルマブを投与したところ、同様にアベルマブの抗腫瘍効果が弱まった。これらの結果から、T 細胞媒介性の抗腫瘍効果に加えて、NK 細胞媒介性の ADCC がアベルマブの抗腫瘍効果を高めていることが示唆された。一方、全身の免疫細胞サブセットを枯渇させた MB49 腫瘍（膀胱癌）移植マウスを用いた別の実験では、アベルマブの抗腫瘍効果に対する $CD8^+$ T 細胞及び $CD4^+$ T 細胞の寄与が確認されたが、NK 細胞の寄与は認められなかったと報告されている（Vandeveer 2016）。

2.3　副次的薬理試験

アベルマブの目的とする薬理作用以外の効果である、ヒト PBMC に対する ADCC 誘導能の有無を評価するため、副次的薬理試験を実施した（IONC0929[redacted]SM、モジュール 2.6.2.3 試験）。その結果、in vitro で免疫細胞上の PD-L1 発現を誘導した条件下で、アベルマブは、抗腫瘍効果発現に必須である $CD8^+$細胞傷害性 T 細胞を含む免疫細胞サブセットに対して、細胞死を誘導しなかった。一方、陽性対照として用いた PD-L1 を高発現した腫瘍細胞に対しては、アベルマブは、ADCC を介した細胞死を誘導した。したがって、アベルマブは、免疫細胞を傷害することなく、ADCC を介して腫瘍細胞を殺傷することができると考えられる。

2.4　安全性薬理試験

アベルマブの安全性薬理学的評価は、ICH S6（R1）ガイドラインに基づき、カニクイザルでの 4 週間及び 13 週間の反復静脈内投与毒性試験の一部として実施した（モジュール 2.6.6.3.4 及び 2.6.6.3.5 参照）。心血管系パラメータ［心拍数、QT 間隔を含む心電図（electrocardiogram、ECG）及び動脈圧］、直腸温及び呼吸数の測定を、投与開始前、試験 8 日及び 29 日、並びに 85 日（13 週間試験のみ）に、麻酔下の動物で実施した。中枢神経系に対する影響の評価は、機能観察総合評価（functional observational battery、FOB）法を用いて、覚醒下の動物で実施した（モジュール 2.6.2.4 参照）。

その結果、いずれの試験でも、140 mg/kg（最大投与可能量）の用量で週 1 回投与されたアベルマブは、心拍数、ECG、動脈圧、呼吸数、中枢神経系パラメータ及び直腸温に対して影響を与えなかった。

2.5　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

3　薬物動態試験

3.1　分析法

マウス及びカニクイザルにおける単回投与 PK 試験、並びにげっ歯類とカニクイザルにおける 4 週間反復投与毒性試験における TK 測定は、バリデートされていない測定法を使用したが、社内の信頼性基準に従い実施した。カニクイザルにおける 13 週間反復投与毒性試験（RF4990）には、バリデートされた定量法を適用した。この試験では、カニクイザル血清中濃度を Gyrolab sandwich assay 法で測定した（モジュール 2.6.4.2.1 参照）。LLOQ は血清中で 900 ng/mL であり、-80°C で 12 ヶ月まで安定であった（バリデーションの結果の概要については、モジュール 2.6.5 Table 2 参照）。

げっ歯類における単回投与 PK 試験及び 4 週間反復投与毒性試験、並びにカニクイザルにおける 4 週間反復投与毒性試験では、ADA の検出のために表面プラズモン共鳴（SPR）法を使用した（モジュール 2.6.4.2.2 参照）。

カニクイザルにおける 13 週間反復投与毒性試験（RF4990）での ADA の検出には、バリデートされた ELISA を使用した（モジュール 2.6.4.2.2 参照）。この方法の測定感度は、免疫精製したヤギ抗アベルマブ抗体で 40 ng/mL であり、保存安定性は-80℃ で 12 ヶ月間まで確認された。この ADA 陽性対照のシグナルは、14.6 ng/mL 以上のアベルマブ濃度の存在下においては消失した。TK 試験ではアベルマブ濃度が 14.6 ng/mL を上回ることが多かったため、低レベルの反応は血清試料中に存在するアベルマブによって妨害された可能性があり、陽性反応がなくても免疫原性がないとは限らない（バリデーションの結果の概要は、モジュール 2.6.5 Table 3 を参照）。

3.2　吸収

アベルマブの類縁体及びアベルマブは、マウス及びカニクイザルにおける単回投与 PK 試験において、20 mg/kg より低い用量で非線形の PK を示した。これは、一次関数的な異化クリアランスと標的を介した飽和性クリアランスの混在を示唆する（モジュール 2.6.4.3.1.1 参照）。

マウスの単回投与試験では、非線形性のため、消失相半減期（$t_{1/2}$）を正確に算出できなかった。しかしながら、高用量で実施された反復投与毒性試験では、全ての用量で概ね同程度の $t_{1/2}$（約 45～91 時間）が認められた （モジュール 2.6.4.3.1.3 参照）。

マウス、ラット及びカニクイザルにおける反復投与毒性試験から得た TK データでは、PK は 20～140 mg/kg の用量範囲で直線性を示し、20 mg/kg より高い用量では標的介在性クリアランスが飽和することが示唆された。

カニクイザルにおける 4 週間の反復投与毒性試験（RF2710、モジュール 2.6.5 Table 8 参照）では、全ての用量群で初回投与後の $t_{1/2}$ は 58～70 時間であり、マウスでの $t_{1/2}$ と同程度であった（モジュール 2.6.4.3.2.2 参照）。

カニクイザルにおける 13 週間の反復投与毒性試験（RF4990、モジュール 2.6.5 Table 9 参照）では、全ての動物は試験期間を通してアベルマブに全身曝露され、曝露量は 20～140 mg/kg の用量範囲で投与量にほぼ比例して増加した。反復点滴静注後の蓄積性については、1 日目と比較して 29 日目でわずかな蓄積が認められたのみで、85 日目では蓄積の増加は認められなかった。蓄積は全ての用量で同程度であり、用量比例性が保持されていた。性差は認められなかった。

血液中のアベルマブの標的占有率と薬物濃度の相関を示すために、C57BL/6 マウスにおける PK/PD 試験を実施した（ONC0308[redacted]RT、モジュール 2.6.4.8.1 参照）。3.1 µg/mL のアベルマブ濃度で 50%の標的占有率が達成された。少なくとも 95%の標的占有率がアベルマブの有効性を得るために必要であると仮定すると、これを達成するために必要な薬物濃度は 58.8 µg/mL と算出された。

アベルマブは静脈内投与されるために、バイオアベイラビリティ試験は実施していない。

3.3　分布

RF2710 試験における、静脈内投与後の定常状態での平均分布容積（用量及び投与回数に関わらず、Vss:40.8～67.2 mL/kg）は、カニクイザルの血清量と同程度であった。したがって、アベルマブは細胞膜受容体を標的とする IgG1 抗体で予測される PK 挙動を示すこと、及び予期しない臓器毒性が認められなかったことから、組織分布試験は重要な意義を持たないと考えられる。

3.4　代謝

バイオテクノロジー応用医薬品の代謝で予測されるのは、小ペプチドと個々のアミノ酸への分解である。ICH-S6（R1）ガイドライン「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」には、一般の医薬品で実施される従来の生体内変化を調べる試験は必要ないと記載されており、代謝に関する試験は実施しなかった。

3.5　排泄

アベルマブは、内因性免疫グロブリンと同様、小ペプチドとアミノ酸に分解されるため、排泄に関する試験は実施しなかった。

3.6　薬物動態学的薬物相互作用

非臨床 in vitro 及び in vivo 薬物相互作用に特化した試験は実施しなかった。サイトカインは広範な CYP 酵素のダウンレギュレーションを引き起こす可能性がある（Lee 2010、Morgan 2008）ことから、サイトカインが低分子薬との薬物相互作用を引き起こすかについて、in vitro の肝細胞データに基づいて予測するのは、現在のところ、適切であると考えられていない（Girish 2011、Kraynov 2011）。しかしながら、アベルマブは、その in vitro のサイトカイン放出可能性を考慮すると、治療用量より高い濃度では併用薬との薬物相互作用に関与する可能性がある（モジュール 2.6.6.8.3 参照）。In vitro のサイトカイン放出測定はこのリスクを過剰評価する可能性があるため、臨床試験における in vivo でのヒトサイトカインデータをもとに併用薬との薬物相互作用のリスクを評価した（モジュール 2.7.2.3.3.2 参照）。

3.7　免疫原性

マウスの単回投与 PK 試験（B-[redacted]-009、モジュール 2.6.5 Table 4 参照）及びカニクイザルの単回投与 PK 試験（RF2120、モジュール 2.6.5 Table 5 参照）において、全ての動物にアベルマブに対する ADA が検出された。マウスとラットの 4 週反復投与毒性試験では、およそ 25%～50%の動物で ADA が検出された（モジュール 2.6.5 Table 6 及び Table 7 参照）。

カニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験では、アベルマブを投与したサル 12 例中 3 例（25%）で検出可能なレベルの ADA が産生した（モジュール 2.6.5 Table 8 参照）。単回投与に比べて、この試験で発現率が低かったのは、高い投与量により曝露量が増加して、遊離薬物による干渉を受けた可能性が考えられる(モジュール 2.6.4.3.3.2 参照)。TK プロファイルの変化及び 4 回目投与後の曝露量の減少が、カニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験における低用量群で認められたことから、産生した ADA がアベルマブのクリアランスを増加させたと推測される。

カニクイザルの 13 週間反復投与毒性試験では、ADA は検出されなかった。この試験で用いられた ADA 測定法による ADA 検出が曝露した薬物によって妨害されたことが一因と考えられるが、試験期間を通して動物は薬物に曝露されていたことから、当該試験における ADA 以外の評価項目に及ぼす影響は小さいと考えられる。(モジュール 2.6.4.3.3.2 参照)。

完全ヒト抗体であるアベルマブは、動物の免疫系にとって異種タンパク質であるため、げっ歯類及びヒト以外の霊長類で認められたアベルマブの免疫原性は、ヒトにおける免疫原性の予測にはあてはまらないと推測される(モジュール 2.7.2.4.1.3 参照)。

4　毒性試験

アベルマブの毒性プロファイルを、ヒト及びカニクイザルの組織並びに血球を用いた試験、更にげっ歯類（マウス及びラット）及び非げっ歯類（カニクイザル）を用いた in vivo 試験で評価した。

4.1　単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施しなかった。アベルマブの急性毒性は、カニクイザルの 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2710、モジュール 2.6.6.3.4 参照）及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験（RF4990、モジュール 2.6.6.3.5 参照）の初回投与後に評価した。

カニクイザルに 0、20、60、及び 140 mg/kg のアベルマブを初回投与した後、一般状態を観察した。その結果、いずれの用量でも死亡や毒性所見は観察されなかった。したがって、アベルマブの概略の致死量は、140 mg/kg 超と考えられた。

4.2　反復投与毒性試験

4.2.1　げっ歯類の反復投与毒性試験

CD-1 マウスの 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2740、モジュール 2.6.7.6 参照）で、0、20、40 及び 140 mg/kg のアベルマブを各群雌雄各 10 匹のマウスに週 1 回、4 週間（計 5 回）投与した。TK、免疫表現型及び免疫原性の評価のためのサテライト群も設けた（モジュール 2.6.6.3.1 参照）。その結果、20、40 及び 140 mg/kg のアベルマブを投与したマウスのそれぞれ 46%、34%及び 14%が、投与後 30 分以内に死亡した。全用量で死亡が認められたことから、本試験で最大耐量を確認することはできなかった。一般状態の変化及び病理組織学的所見（血管への免疫複合体沈着）はマウスでのアナフィラキシー反応を強く示唆するものであった。投与部位（尾部）に、アベルマブによる影響は認められなかった。

更に、20 mg/kg のアベルマブを CD-1 マウスに 4 週間反復静脈内投与する 2 回目の試験（T16228、モジュール 2.6.7.6 参照）を実施し、先の試験で認められた所見を再検討した。その結果、同様の臨床症状が認められた（モジュール 2.6.6.3.2 参照）。

アベルマブの CD-1 マウスへの反復静脈内投与により認められた致死的反応の発現機序を検討する目的で、CD-1 マウスを用いてアベルマブの反復静脈内投与による追加試験を実施した（IONC-TI[redacted]-003RVT、4.7.1 項、モジュール 2.6.6.8.1 及び 2.6.7.17A 参照）。なお、Wistar ラットへのアベルマブの週 1 回、4 週間反復静脈内投与による毒性試験（RF3310、モジュール 2.6.7.6 参照）を実施したが、ラット PD-L1 に対するアベルマブの結合親和性の低さから、ラットはアベルマブの毒性試験で用いる動物種として適切ではないと考えられたため、本項では結果の概要を記載しない。

4.2.2　カニクイザルの反復投与毒性試験

カニクイザルを用いたアベルマブの反復静脈内投与毒性試験を 2 試験実施した。

4 週間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用、RF2710、モジュール 2.6.7.7A 参照）では、0、20、60 及び 140 mg/kg（アベルマブの投与液濃度とカニクイザルへの投与容量の上限に基づく最大投与可能量）のアベルマブを各群雌雄各 2 匹のカニクイザルに週 1 回、4 週間（1、8、15、22 及び 29 日の計 5 回）点滴静脈内投与した。投与期間終了時に全例を安楽死させ、病理学的検査に供した。

13 週間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用、RF4990、モジュール 2.6.7.7 B 参照）では、0、20、60 及び 140 mg/kg のアベルマブを各群雌雄各 3 匹（対照群と 140 mg/kg 投与群は雌雄各 5 匹）のカニクイザルに週 1 回、13 週間（1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78 及び 85 日）点滴静脈内投与した。最終投与の 1 週間後に 20 及び 60 mg/kg 投与群の雌雄全例と、対照群及び 140 mg/kg 投与群の雌雄各 3 例を安楽死させ、病理学的検査に供した。対照群及び 140 mg/kg 投与群の残りの雌雄各 2 例は、最終投与後 8 週間の回復期間後に安楽死させ、病理学的検査に供した。

両試験とも、試験期間中に動物の死亡は認められなかった。一般状態観察では、両試験とも、いずれの用量でも､試験期間を通して過敏症を示唆するものも含めて､症状変化はみられなかった｡また、体重、摂餌量及び眼科学的検査項目にも、アベルマブ投与による影響は認められなかった。一方、血液学的検査では、4 週間反復静脈内投与毒性試験の 140 mg/kg 投与群で、投与期間終了時に総リンパ球数のわずかな減少が認められたが、13 週間反復静脈内投与毒性試験の同用量では同様の所見は認められなかった。血液免疫表現型検査では、4 週間の投与期間終了時に 140 mg/kg 投与群で、血液学的検査所見に一致する総リンパ球数及び NK 細胞数のわずかな減少がみられた。13 週間反復静脈内投与毒性試験では同様の所見は認められなかった。

各種のサイトカイン［インターロイキン（interleukin、IL）-1β、IL-1 レセプターアンタゴニスト（IL-1RA）、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12（p40）、IL-15、IL-17、IFN-α、IFN-γ、インターフェロン誘導タンパク質 10（interferon-inducible protein 10、IP-10）、単球走化性タンパク-1（monocyte chemotactic protein-1、MCP-1）、マクロファージ炎症性タンパク質 1α（macrophage inflammatory protein-1α、MIP-1α）、トランスフォーミング増殖因子（transforming growth factor、TGF）-β、腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor、TNF）-α、及び TNF-β］に対して、アベルマブ投与による影響は認められなかった（モジュール 2.6.6.3.4 及び 2.6.6.3.5 参照）。

両試験とも、臓器重量に特記すべき変化は認められなかった。投与部位には、両試験で病理組織学的に用量依存性のない炎症性変化が認められたが、アベルマブ投与群では、対照群と比較して変化の程度が強かった。投与部位の所見は、13 週間反復静脈内投与毒性試験では、8 週間の回復期間後には完全に回復していた。その他に、特記すべき病理学的変化は認められなかった。両試験の全身毒性についての無毒性量は、140 mg/kg と判断された。

4.3　遺伝毒性試験

ICH S6（R1）ガイドライン（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）に基づき、アベルマブの遺伝毒性試験は実施しなかった。

4.4　がん原性試験

ICH S6（R1）ガイドライン（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）、ICH S1A ガイドライン（医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス）、ICH S9 ガイドライン（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、アベルマブのがん原性試験は実施しなかった。

4.5　生殖発生毒性試験

ヒト及びカニクイザルの正常組織を用いた TCR 試験のデータから、アベルマブが雌雄生殖器に結合することが確認された（4.7.3 項参照）。

アベルマブの生殖発生毒性試験は実施していない。しかしながら、アベルマブ投与による生殖発生毒性のリスクは、本薬の対象とする適応症及び患者集団を考慮し、本薬を用いたカニクイザルの反復投与毒性試験の結果（モジュール 2.6.6.3.5 参照）及び公表文献から適切に評価した（Austin 2016）。PD-1/PD-L1 の相互作用の阻害が妊娠中の流産や出生児の死亡のリスクを著しく増加させることが報告されていることから、アベルマブ投与が胚・胎児発生に影響を及ぼす可能性は否定できない。

アベルマブの乳汁中への分泌についての試験は実施していない。IgG 抗体の乳汁中への分泌が知られていることから（Hurley 2011）、アベルマブも乳汁中に分泌され得ると考えられる。

4.6　局所刺激性試験

アベルマブの局所刺激性は、マウスでの 2 回目の 4 週間反復投与毒性試験（T16228）以外の全ての反復投与毒性試験で評価した。

げっ歯類の反復静脈内投与毒性試験（RF2740 及び RF3310）では、投与部位にアベルマブ投与による変化は認められなかった。

カニクイザルの反復静脈内投与毒性試験（RF2710 及び RF4990）では、対照群及びアベルマブ投与群で、投与部位局所の皮下、血管周囲又は血管に変化（出血、混合性炎症性細胞浸潤、線維芽細胞増殖、及び血管内皮の肥厚並びに壊死等）が認められた。しかしながら、対照群で観察された所見の重篤度及び発現頻度はアベルマブ投与群に比べて低かった。アベルマブ投与群で観察された所見に用量依存性はみられなかった。これらの所見は反復静脈内投与又は点滴静脈内投与により認められる典型的な所見と一致していることから、アベルマブの局所忍容性は良好で、重篤な局所傷害を引き起こさないものと考えられた。更に、13 週間反復静脈内投与毒性試験で認められた投与部位の所見は、8 週間の回復期間中に完全に回復した。

4.7　その他の毒性試験

4.7.1　マウスのアナフィラキシー様反応の発現機序に関する試験

先のマウスの反復静脈内投与毒性試験（RF2740 及び T16228）で認められた致死的反応の発現機序を検討するため、アベルマブの CD-1 マウスへの反復静脈内投与による追加試験を実施した（IONC-

TI[redacted]-003RVT、モジュール 2.6.7.17A 参照)。アベルマブは完全ヒト IgG1 抗体であり、マウスに対して異種タンパク質であるため、アナフィラキシー反応を誘発した可能性が高いと考えられた。

本試験の結果から、CD-1 マウスへのアベルマブの反復投与はアナフィラキシー反応を誘発することが示された。この反応は、IgG アイソタイプの MAHA が高濃度に産生されたこと、及び IgG 介在経路の阻害剤で免疫グロブリン E（immunoglobulin E、IgE）介在経路の阻害剤よりも強い予防効果が得られたことから、主に IgG 抗体が媒介することが示唆された。しかしながら、IgE 介在経路の阻害による効果も認められたことから、両経路の関与が示唆された。

4.7.2　CRA 試験

ヒト及びカニクイザルの全血及び PBMC を用いた CRA 試験（T17985 及び T17986、モジュール 2.6.7.17B 及び 2.6.7.17C 参照）では、明確な炎症性サイトカイン放出は認められなかった（モジュール 2.6.6.8.2 参照)。更に、16 名のヒトドナー由来の PBMC を PHA で前刺激してサイトカイン放出を最大化するようにデザインされたサイトカイン放出試験（[redacted]-DA471-N0）を実施し、製造プロセス変更前後の 2 つの製造プロセス（プロセス A 及びプロセス B、モジュール 3.2.S.2.6 参照）由来のアベルマブの作用を比較した。その結果、アベルマブは主に IL-6、MCP-1 及び TNF-α の放出を誘導した。また、男性ドナー由来の活性化 PBMC は、女性ドナー由来のものとは異なるサイトカイン放出プロファイルを示した。すなわち、IL-6 及び TNF-αと同時に顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（granulocyte macrophage colony-stimulating factor、GM-CSF）及び IL-10 の放出も誘発された。両性で、IL-8 及び IL-1βの弱く散発的な増加も認められた（モジュール 2.6.6.8.3 参照)。これら 2 つのサイトカインは PHA（マイトジェンとして作用して細胞増殖を促進する）の主な標的である T 細胞から放出される。

これらの結果に基づき、アベルマブ投与による全身性のサイトカイン放出のリスクは否定できない。そのため、本リスクの臨床的評価も実施した（5.2 項参照)。

製造プロセス変更前後の 2 つのプロセスにより製造されたアベルマブのサイトカイン放出プロファイルは同様であった。差がみられたのは、プロセス変更後に製造されたアベルマブで、サイトカイン放出レベルがより低かった点であった（モジュール 2.6.6.8.3 参照)。測定法における変動性やドナー間の個体差を考慮すると、プロセス A 及びプロセス B 間のサイトカイン放出リスクの差について結論づけることはできなかった。

4.7.3　TCR 試験

ヒト及びカニクイザル正常組織の TCR 試験では、ヒトとカニクイザルの組織の PD-L1 発現を検出する染色の結果が類似していた（モジュール 2.6.6.8.4、2.6.6.8.5、2.6.7.17E 及び 2.6.7.17F 参照)。これにより、カニクイザルは毒性試験の動物種として適切であることが確認された。ヒト TCR 試験では、PD-L1 の発現が知られている以下の組織に強い染色が認められた。すなわち、種々の上皮細胞、内皮細胞、単核細胞（樹状細胞、リンパ球、単球及びマクロファージを含む)、膵臓の島細胞、胎盤の栄養膜及び脱落膜細胞、平滑筋細胞、神経細胞、並びに間葉系幹細胞である。更に、中皮細胞、甲状腺の傍濾胞細胞、卵巣の顆粒膜細胞、精巣の間質細胞及び巨核球にも染色が認められた。これらの細胞

の PD-L1 発現に関する報告はないことから、これまでに知られていなかった PD-L1 発現の存在、又は PD-L1 と類似性が高い別のエピトープによる想定外の交差反応の可能性が考えられる。

4.7.4　光毒性試験

アベルマブの紫外線-可視光（ultraviolet-visible、UV-VIS）吸収プロファイルの検討は、原薬の特性解析の一環として実施された（モジュール 3.2.S.3.1.4.12 参照）。その結果、アベルマブが光毒性を誘発する可能性はないと考えられ、更なる光毒性の検討は実施しなかった（モジュール 2.6.6.8.6 参照）。

4.8　原薬及び製剤中の不純物、添加物及び溶出物の毒性学的評価

毒性試験で使用した原薬及び製剤中の不純物プロファイルは、それらが製造された時点での分析方法を用いて評価した（モジュール 2.6.7.4 及び 3.2.P.5.4 参照）。

アベルマブ原薬の製造工程由来の不純物には、　不純物　1*　　、　不純物　2*　　及び　不純物　3*　が含まれる（モジュール3.2.S.3.2.2 参照）。また、製品由来の不純物　A*　　及び不純物　B*　　等も存在する可能性がある（モジュール 3.2.S.3.2.3）。プロセスバリデーション試験では、アベルマブの精製工程により製造工程由来不純物の一貫した除去が可能であることが示された（モジュール 3.2.S.2.5-4 参照）。アベルマブの原薬及び製剤のリリース試験には、不純物B*及び不純物A*のモニタリングが含まれている。

アベルマブの製剤中に含まれる添加物は、注射剤に一般的に使用され、日本薬局方及び日本の医薬品添加物規格に適合している。したがって、アベルマブの製剤中の添加物についての毒性試験を実施する必要はないと考えられた。

予定している保存条件及び加速条件下で容器及び栓から製剤中に溶出する可能性のある不純物を評価するため、アベルマブ製剤を用いて溶出物試験（溶出物及び抽出物の評価）を実施した（モジュール 3.2.P.2.4 参照）。その結果、アベルマブ製剤中に 3 種の化合物（又は化合物群）の溶出が検出されたことから、それらの毒性学的評価を実施した（Broschard 2016）。毒性学的評価の結果から、いずれの溶出物にも遺伝毒性を発現する可能性は認められず、製剤中の存在濃度は 1 日許容曝露量（permitted daily exposure、PDE）未満であった。したがって、アベルマブ投与に伴い、容器及び栓から製剤中に溶出した不純物に曝露された患者に対する毒性学的リスクはないと考えられた。

5　ヒト及び動物の安全性データの比較

5.1　ヒト及び動物のアベルマブ曝露量の比較

臨床試験では、10 mg/kg のアベルマブを 2 週毎に 1 回、静脈内投与（1 時間点滴）し、カニクイザルの反復投与毒性試験では、最高 140 mg/kg のアベルマブを週 1 回、静脈内投与（90 分間点滴）した。安全域は、カニクイザルの 4 週間及び 13 週間反復投与毒性試験の無毒性量での曝露量と、予定している臨床用量でのヒト曝露量から算出した。カニクイザルの最終測定時点（4 週試験の 4 回投与後及び 13 週試験の 13 回投与後）の 1 投与間隔（168 時間）の血中濃度－時間曲線下面積（area under the curve、AUC）をヒトの初回投与後の 1 投与間隔（336 時間）の AUC と比較した。

ヒトの PK データは第 I 相用量漸増試験（EMR100070 001 試験及び EMR100070 002 試験、モジュール 2.7.2.2 参照）から得られた。

カニクイザルとヒトのアベルマブ曝露量の比較を表 2.4 - 3 に示す。

1 投与間隔の AUC の比較で、カニクイザルのアベルマブ曝露量はヒトのアベルマブ曝露量に比べて 10 倍以上高かった。投与間隔の違い（ヒトでは隔週投与、カニクイザルでは毎週投与）を考慮すると、20 倍以上と推定される。なお、最高血中濃度（maximum observed concentration、C_{max}）の比較では、カニクイザルのアベルマブ曝露量はヒトの 15 倍以上高かった。

表 2.4 - 3　サル反復投与毒性試験及びヒト臨床試験のアベルマブ曝露量の比較

種	投与経路	投与量 (mg/kg)	投与期間（週）	NOAEL (mg/kg)	サル NOAEL の C_{max} [a] (µg/mL)	サル NOAEL の AUC [a] (µg/mL x hr)	ヒト臨床用量 [b] の C_{max} (µg/mL)	ヒト臨床用量 [b] の AUC (µg/mL x hr)	サル NOAEL のヒト臨床用量 [b] に対する AUC 比 [c]
サル [d]	静脈内	20-140	4	140	4410	227000	該当せず	該当せず	10
サル [e]	静脈内	20-140	13	140	4658	330088	該当せず	該当せず	15
ヒト 001 試験 [f]	静脈内	1-20	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず	294	22813	該当せず
ヒト 002 試験 [g]	静脈内	3-20	該当せず	該当せず	該当せず	該当せず	179	20131	該当せず

a　雌雄の平均値、AUC は $AUC_{0\text{-}168hr}$
b　予定している臨床用量：10 mg/kg
c　AUC_{NOAEL}/AUC_{avg}（ヒトの 001 試験及び 002 試験の加重平均 ＝22515 µg/mL x hr）
d　サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2710）の 22 日のデータ
e　サル 13 週間反復静脈内投与毒性試験（RF4990）の 85 日のデータ
f　非盲検臨床第 I 相試験（EMR100070-001）の初回投与後のデータ
g　非盲検臨床第 I 相試験（EMR100070-002）の初回投与後の日本人データ
AUC：血中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血中濃度、NOAEL：無毒性量

5.2　毒性試験で認められた所見と臨床試験での有害事象の比較

アベルマブの臨床試験では、薬物過敏症を含む免疫関連有害事象及び注入に伴う反応（infusion-related reactions、IRR）が重要なリスクとして特定された（モジュール 2.7.4 参照）。しかしながら、マウスでみられたようなアナフィラキシー反応の発現はこれまで認められていない。CD-1 マウスでみられた反応は、ヒトタンパク質であるアベルマブの反復投与によりマウス体内に産生された MAHA によるアナフィラキシー反応（IgE/IgG 介在性）である可能性が高い。免疫細胞上に発現した PD-L1 に対するアベルマブの作用により、マウスではヒトモノクローナル抗体に対する免疫応答が高まった可能性も考えられる。また、マウスでは、IgE によって媒介される過敏症反応に比べ、IgG による免疫複合体が関与する過敏症反応の方がより重要であることが報告されている（Finkelman 2005）。カニクイザルの毒性試験では過敏症の症状は認められなかった。

アベルマブの第 I 相試験（EMR100070-001 及び EMR100070-002）では、初回及び 4 回目の投与前、投与後約 48 時間、7 日及び 14 日に、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFNγ 及び TNFα といった主要な循環血中のサイトカインを測定した（モジュール 2.7.2.2.1 参照）。試験 3 日、すなわち、初回投与

後約 48 時間に一過性で軽度（4 倍未満）のサイトカインの増加が認められた（モジュール 2.7.2.2.1 参照）。しかしながら、1 mg/kg から 20 mg/kg のアベルマブ投与により、CYP 酵素に影響を及ぼす可能性があるほどのサイトカインの変化はみられなかった。最大反応を得るために最適化した in vitro CRA 試験では PHA 誘導性の炎症性サイトカインの放出にアベルマブが影響を与える可能性が示唆されたが、臨床試験ではサイトカインに意義のある変化は認められなかったことから、アベルマブは CYP 酵素に影響を与えないか、与えたとしてもわずかであり、生物薬品である本薬と他の薬物との相互作用のリスクは低いと考えられる（モジュール 2.7.2.3.2.5.2 参照）。したがって、薬物相互作用を検討するための更なる試験は実施しなかった。

In vitro CRA 試験でみられたアベルマブによるサイトカイン放出の誘導は、ヒトで IRR が発現する可能性を示唆するものである。臨床試験でサイトカイン濃度に意義のある変化はみられなかったものの、IRR は一般的に投与日に観察されたのに対し、サイトカイン測定のための採血は投与 48 時間後に行われたことから、この結果から臨床試験で認められた IRR を完全には説明することはできない。

毒性試験で感染症が認められなかったため、免疫記憶に対する影響を検討するための新たな試験は実施しなかった。感染、PD-L1 及び PD-1 の発現、並びに解剖学的局在性に関する問題の複雑さから、免疫記憶に対する影響は病原体及び標的組織に依存すると考えられる（Blackburn 2010）。マウスの効力を裏付ける試験でエフェクターメモリーT 細胞集団が増加し、腫瘍抗原への反応性が高まったことは、アベルマブがこれらの細胞機能を維持させることを示唆している（2.2 項参照）。アベルマブの臨床試験で行われた標準的な安全性評価の中で感染症の有害事象が報告されたが、アベルマブ投与に起因する重篤な感染症の発現率増加は認められなかった（モジュール 2.7.4 及び 2.5 参照）。

毒性試験で、その他に特記すべき病理学的所見は認められなかった。

6　総括及び結論

効力を裏付ける in vitro 及び in vivo 試験の結果、癌の治療におけるアベルマブの有用性が示唆された。これらの試験結果は、アベルマブの主な作用機序である腫瘍微小環境での T 細胞の抑制解除、及び副次的作用機序である ADCC 活性を裏付けるものであった。

マウス及びカニクイザルにおける静脈内投与後の薬物動態の特徴は、一次関数的な異化クリアランスと標的を介した飽和性クリアランスが混在しており、細胞上の標的に結合する抗体薬の特性を示していた。マウスと霊長類の恒常的な標的発現量の違いのため、霊長類では標的がより低い薬物濃度で飽和した。これは in vitro において、ヒト T 細胞の受容体がマウス T 細胞より、かなり低いアベルマブ濃度で飽和したことと一致する。アベルマブの分布容積は小さく、血漿又は血清量の範囲内であった。サルにおける 4 週間反復投与毒性試験では、20～140 mg/kg の用量範囲で、同程度の $t_{1/2}$ が認められた（平均 58～70 時間）。

マウスの PK/PD 試験では、3.1 µg/mL のアベルマブ濃度で 50%の標的占有率が得られた。アベルマブが効力を発揮するために必要と考えられる 95%の標的占有率を得るには、少なくとも 58.5 µg/mL のアベルマブ濃度が必要と算出された。この濃度は、MC38 マウス同系腫瘍移植モデルで腫瘍増殖を抑制することができる用量（モジュール 2.6.2.2.2.2 参照）のアベルマブを、マウスに投与したときの最小血中濃度である 50 µg/mL とほぼ同じである。この濃度は、抗 PD-L1 抗体である MPDL3280A がマウス血中の標的を飽和させるのに必要な濃度を明らかに上回る（Deng 2016）。ヒト全血を用いた in

vitro 標的占有率試験 （2.1 項参照）では、ヒト $CD3^+$ T 細胞上にある 50%の PD-L1 を飽和させるのに必要なアベルマブ濃度は 0.122 ± 0.042 μg/mL で、95%の PD-L1 を飽和させるのに必要なアベルマブ濃度は全ドナー試料で 1 μg/mL であった。ヒトに比べてマウスでは PD-L1 の発現が高いことが報告されている（Butte 2008、Keir 2008）。したがって、ヒトでは、中心コンパートメントの標的を飽和させるのに必要な血中アベルマブ濃度はマウスに比べて非常に低いと考えられる。このことは、第 I 相用量漸増試験（EMR100070-001 及び EMR100070-002）で得られたヒトの血液試料を用いた ex vivo での標的占有率の分析により確認された（モジュール 2.7.2.3.3.2 参照）。この結果とヒト PK の結果から、アベルマブのヒトでの推奨用量を 10 mg/kg の 2 週間に 1 回投与とした。

カニクイザルで観測されたクリアランスからヒトへのアロメトリックスケーリングによって、ヒトにアベルマブ 10 mg/kg を 2 週毎に投与したときのクリアランスを約 0.02 L/h、$t_{1/2}$ を約 4 日と予測した（モジュール 2.6.4.8.2 参照）。この予測値は、固形がん患者にアベルマブ 10 mg/kg を 2 週毎に投与したときのクリアランス及び $t_{1/2}$ と近似していた（集団 PK モデルからクリアランスは 0.0247 L/h、$t_{1/2}$ は約 5 日、モジュール 2.7.2.3.2.2 参照）。これは、カニクイザルが PK 試験に適切な動物種であり、サルとヒトで類似した標的の発現を示唆する。同系マウス腫瘍モデルにおける用量－反応のデータ、マウス及びカニクイザルでの曝露量データ、ヒト全血での in vitro 標的占有率データを考慮すると、2 週毎にアベルマブ 10 mg/kg を投与する用量は、がん患者の病態改善に最適な曝露を与えると期待された。

当初、各動物種の PD-L1 へのアベルマブの結合親和性データに基づき、カニクイザル及びマウスをアベルマブの毒性試験に用いる適切な動物種として選択した。しかしながら、マウスではアベルマブの反復投与後に種特異的に発現すると考えられる致死的なアナフィラキシー反応が認められたことから、マウスはアベルマブの毒性試験に用いる動物種として適切ではないと考えられた。また、ラットの PD-L1 に対するアベルマブの結合親和性が低かったことから、ラットもアベルマブの毒性試験の動物種として適切ではないと考えられた。したがって、アベルマブの重要な毒性試験はカニクイザルのみで実施した。

20、60、及び 140 mg/kg のアベルマブをカニクイザルに週 1 回、最長 13 週間まで点滴静脈内投与した結果、最高用量の 140 mg/kg（最大投与可能量）でも、安全性薬理学的パラメータを含む全身毒性の検査項目にアベルマブ投与による毒性は認められず、忍容性は良好であったことから、全身毒性についての無毒性量を 140 mg/kg と判断した。一方、局所刺激性については、アベルマブを反復静脈内投与した動物では、溶媒対照群の動物に比べて投与部位局所での炎症反応がわずかに強まった。しかしながら、これらの所見に用量依存性はなく、13 週間試験では 8 週間の回復期間後に完全な回復がみられた。

カニクイザルの投与部位にみられた軽度な変化の他に、毒性試験で観察されたアベルマブに関連した所見は、in vitro CRA 試験でみられた PHA 刺激ヒト PBMC からの複数のサイトカインの放出誘導であり、これは、ヒトでの IRR の可能性を示唆するものであった。

アベルマブによる妊娠中の流産や胚・胎児発生に及ぼす悪影響（4.5 項参照）の可能性、及びヒトでのアベルマブの $t_{1/2}$（4～5 日）を考慮すると、アベルマブの最終投与後 2 ヵ月間（$t_{1/2}$ の約 10 倍）は適切な避妊法を用いて妊娠を避ける必要がある。更に、ヒトを含む霊長類では、IgG アイソタイプの免疫グロブリンが胎盤経由で胎児循環血中に移行することが知られており、母体由来の IgG は正常なヒトの乳汁中にも低濃度に認められる。このことから、アベルマブで治療中の妊婦における胚・

胎児へのアベルマブの曝露、及び母親から母乳を介した乳児へのアベルマブの曝露の可能性は否定できない。このため、アベルマブでの治療中、及び最終投与後 2 ヵ月間は授乳を避ける必要がある。

ヒトとカニクイザルでの曝露量の比較により、アベルマブは予定する臨床用法・用量（疾患の進行又は許容できない毒性がみられるまでアベルマブ 10 mg/kg を 2 週間に 1 回投与）で、適切な安全域を有することが確認された。

結論として、非臨床薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験で得られている成績により、進行癌患者に対するアベルマブの有用性が裏付けられていると考えられた。

7　参考文献

Ascierto PA, Simeone E, Sznol, M, et al. Clinical Experiences with Anti-CD137 and Anti-PD-1 Therapeutic Antibodies. Semin Oncol 2010;37:508-16.

Austin EW, Roesener S. Reproductive Toxicity Assessment for Avelumab. EMD Serono, Billerica MA, 2016, 1-6.

Blackburn SD, Crawford A, Shin H, et al. Tissue-Specific Differences in PD-1 and PD-L1 Expression during Chronic Viral Infection: Implications for CD8 T-Cell Exhaustion. J Virology 2010;84(4):2078-2089.

Blank C, Kuball J, Voekl S, et al. Blockade of PD-L1 (B7-H1) Augments Human Tumor Specific T-Cell Responses in vitro. Int J Cancer 2006;119:317-27.

Broschard T. Evaluation of Leachables Identified in MSB0010718C (Avelumab) in Drug Product. Merck KGaA, Darmstadt, 2016, 1-15.

Butte MJ, Pena-Cruz V, Kim MJ, et al. Interaction of Human PD-L1 and B7-1. Mol Immunol. 2008; 45(13): 3567–357.

Deng R, Bumbaca D, Pastuskovas CV, et al. Preclinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Tissue Distribution, and Tumor Penetration of Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody, an Immune Checkpoint Inhibitor. MABS 2016;8(3):593-603.

Finkelman FD, Rothenberg ME, Brandt EB, et al. Molecular mechanisms of anaphylaxis: Lessons from studies with murine models. J Allergy Clin Immunol 2005;115(3):449-57.

Girish S, Martin SW, Peterson MC, et al. AAPS Workshop Report: Strategies to Address Therapeutic Protein–Drug Interactions during Clinical Development. AAPS J 2011;13(3):405-16.

Hurley W, Theil P. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Breast Milk. Nutrients 2011;3:442-74.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. Annu Rev Immunol 2008;26:677-704.

Kraynov E, Martin SW, Hurst S, et al. How Current Understanding of Clearance Mechanisms and Pharmacodynamics of Therapeutic Proteins Can Be Applied for Evaluation of Their Drug-Drug Interaction Potential. Drug Metab Dispos 2011;39(10):1779-83.

Lee J-I, Zhang L, Men AY, et al. CYP-Mediated Therapeutic Protein-Drug Interactions: Clinical Findings, Proposed Mechanisms and Regulatory Implications. Clin Pharmacokinet 2010;49:295-310.

Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, et al. Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Infection, Inflammation, and Cancer. Drug Metab Disp 2008;36(2):205-16.

Nose M, Wigzell H. Biological Significance of Carbohydrate Chains on Monoclonal Antibodies. Proc Natl Acad Sci 1983;80:6632-6.

Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 Ligands: From Discovery to Clinical Application. Int Immunol 2007;19(7):813-824.

Riley JL. PD-1 Signaling in Primary T Cells. Immunol Rev 2009;229:114-25.

Vandeveer AJ, Fallon JK, Tighe R, et al. Systemic Immunotherapy of Non-Muscle Invasive Mouse Bladder Cancer with Avelumab, an Anti–PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitor. Cancer Immunol Res 2016;4(5):452.462.

Wilson NS, Yang B, Yang A, et al. An Fcγ Receptor-Dependent Mechanism Drives Antibody-Mediated Target-Receptor Signaling in Cancer Cells. Cancer Cell 2011;19:101-13.