2.6.1 緒言

目次

1　アベルマブの構造及び製剤の特徴 3
2　薬理学的特徴 3
3　効能・効果及び用法・用量 4
4　参考文献 4

図目次

図 2.6.1 - 1　アベルマブの構造 3

略語一覧

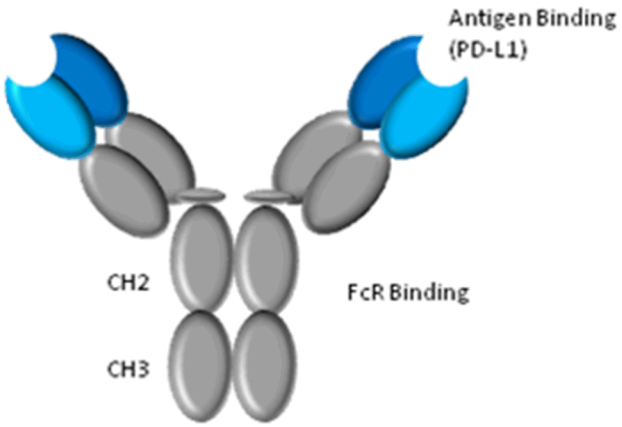
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
IgG1	Immunoglobulin G1	免疫グロブリン G1
KD	Affinity constant	解離定数
PD-1	Programmed death 1	プログラム細胞死 1
PD-L1	Programmed death ligand 1	プログラム細胞死リガンド 1

1　アベルマブの構造及び製剤の特徴

アベルマブ（開発コード：MSB0010718C 又は MSB0010718）は、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る、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）。

アベルマブの構造を図 2.6.1 - 1 に示す。

図 2.6.1 - 1　アベルマブの構造



アベルマブ製剤は、希釈して静脈内投与することを目的とした液剤で、16 mL の容量のガラスバイアル（Type I）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（3 項参照）。

2　薬理学的特徴

アベルマブはプログラム細胞死リガンド 1（programmed death ligand-1、PD-L1）に結合し、PD-L1 とプログラム細胞死 1（programmed death-1、PD-1）の相互作用を阻害する。

アベルマブのヒト PD-L1 に対する結合の解離定数（affinity constant、KD）は、0.7 nM である。また、アベルマブは、マウス及びカニクイザルの PD-L1 に対してもヒト PD-L1 に近い親和性を示すが、ラット PD-L1 に対する親和性は約 100 倍低い（モジュール 2.6.2.2.1.1 参照）。

PD-L1 は膜貫通タンパク質で、当初は自己寛容維持及び自己免疫抑制の役割を担う分子として同定された（Fife 2011）。樹状細胞上の PD-L1 は、T 細胞上の PD-1 受容体に結合することにより、細胞内に抑制性シグナルを伝達し、T 細胞にアナジー又はアポトーシスを誘導する（Riley 2009）。このような免疫チェックポイントは、しばしば腫瘍細胞においても働いている。すなわち、腫瘍細胞は、腫瘍微小環境での免疫監視機構を逃れるため、しばしば PD-L1 を過剰発現する。実際に、PD-L1 の発現と癌の予後の間には強い相関が認められる（Okazaki 2007）。腫瘍細胞上の PD-L1 と T 細胞上の PD-1

の相互作用の阻害は、腫瘍内の T 細胞の抑制を解除し、抗腫瘍免疫応答を効果的に増強することができる。アベルマブの癌患者への投与は、主に抗腫瘍 $CD8^+$ 細胞傷害性 T 細胞応答を増強することにより、また、副次的に腫瘍に対する抗体依存性細胞傷害（antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC）を誘導することにより、治療効果をもたらすことが期待される。

このようなアベルマブの効果は、非臨床薬理試験により裏付けられている。すなわち、非臨床薬理試験では、アベルマブが in vitro で T 細胞活性化を増強し、in vivo 動物モデルで PD-L1 発現腫瘍の増殖を抑制することが示された。このような in vivo 抗腫瘍効果は、主に $CD8^+$ T 細胞を介して発現することが確認された。更に、腫瘍に対する ADCC の誘導も in vivo 動物モデルの抗腫瘍効果発現に寄与していることが確認された。

3　効能・効果及び用法・用量

アベルマブは固形癌及び血液癌の治療薬として開発中である。本申請では、転移性メルケル細胞癌を適応症としている。

用法・用量としては、10 mg/kg（体重）のアベルマブを 2 週間間隔で 1 時間以上かけて点滴静注する。疾患の進行又は許容できない毒性が発現するまでは、本用法・用量にしたがって投与しなければならない。

アベルマブ製剤は、有効成分としてアベルマブを 20 mg/mL の濃度で含有する点滴用の注射剤である（モジュール 3.2.P.1 参照）。本製剤は、10 mL のアベルマブ溶液（200 mg のアベルマブ）を採取できるよう、16 mL のガラスバイアルに 10.4 mL のアベルマブ溶液を充填したものである。本製剤中には、添加物として、D-マンニトール、氷酢酸、ポリソルベート 20 及び水酸化ナトリウムを含む。溶液の性状は無色～微黄色澄明、pH は 5.0～5.6、及び生理食塩液に対する浸透圧比は約 1 である。

本剤はアベルマブの最終濃度として 1～10 mg/mL となるよう希釈し、0.2 ミクロンのインラインフィルターを通して投与する。

本剤投与時に発現することがある注入に伴う反応を軽減させるため、本剤投与 4 回目までは、本剤投与前に抗ヒスタミン剤、解熱鎮痛剤等の投薬を行う。

4　参考文献

Fife BT, Pauken KE. The Role of the PD-1 Pathway in Autoimmunity and Peripheral Tolerance. Ann NY Acad Sci 2011;1217:45-59.

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.

2.6.2 薬理試験の概要文

目次

1　まとめ 6
2　効力を裏付ける試験 12
2.1　効力を裏付ける in vitro 試験 12
2.1.1　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） 12
2.1.2　B7 ファミリーに対する結合特異性（PEAT[redacted]1213VS） 13
2.1.3　PD-L1 発現細胞への結合（IONC[redacted]04051DZ） 13
2.1.4　PD-L1/PD-1 相互作用の阻害（IONC[redacted]04051DZ） 16
2.1.5　抗原特異的 T 細胞活性化（IONC[redacted]04051DZ） 17
2.1.6　ヒト PBMC スーパー抗原刺激試験（IONC[redacted]04051DZ） 18
2.1.7　In vitro 標的占有率測定（IONC1909[redacted]SM） 19
2.1.8　ヒト腫瘍細胞に対する ADCC（PEAT1805[redacted]AJW） 20
2.1.9　ヒト腫瘍細胞に対する CDC（PEAT1805[redacted]BJW） 22
2.2　効力を裏付ける in vivo 試験 24
2.2.1　同系マウス腫瘍での PD-L1 発現 24
2.2.2　MC38 結腸癌モデルに対する用量依存的な抗腫瘍効果（IONC2004[redacted]AKH） 25
2.2.3　In vivo 作用機序試験（IONC11032011RT 及び IONC0806[redacted]RT） 28
2.2.4　C57BL/6 非担癌マウスでの PD-L1 占有率（IONC0308[redacted]RT） 30
3　副次的薬理試験 32
3.1　ヒト自己免疫細胞に対する ADCC 活性（IONC0929[redacted]SM） 32
4　安全性薬理試験 35
4.1　サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2710）での安全性薬理学的評価 35
4.2　サル 13 週間反復静脈内投与毒性試験（RF4990）での安全性薬理学的評価 35
5　薬力学的薬物相互作用 36
6　考察及び結論 36
7　図表 36
8　参考文献 37

表目次

表 2.6.2 - 1　薬理試験に使用した抗体 6
表 2.6.2 - 2　効力を裏付ける in vitro 試験の概要 9
表 2.6.2 - 3　効力を裏付ける in vivo 試験の概要 11
表 2.6.2 - 4　副次的薬理試験の概要 11
表 2.6.2 - 5　各種マウス腫瘍での PD-L1 発現の定量的 IHC による分析 24

図目次

図 2.6.2 - 1　各動物種の PD-L1 に対する On-Off Rate Map 12
図 2.6.2 - 2　ヒト腫瘍細胞に対する結合 13
図 2.6.2 - 3　PHA 刺激ヒト PBMC に対する結合 14
図 2.6.2 - 4　ヒト PD-L1 発現 HEK293 細胞への濃度依存的結合 15
図 2.6.2 - 5　カニクイザル PD-L1 発現 HEK293 細胞への濃度依存的結合 15
図 2.6.2 - 6　マウス PD-L1 発現 HEK293 細胞への濃度依存的結合 16
図 2.6.2 - 7　PD-L1/PD-1 相互作用に対する用量依存的阻害 17
図 2.6.2 - 8　抗原刺激 OT-1 T 細胞からの IFN-γ 放出の増加 18
図 2.6.2 - 9　SEA 刺激ヒト PBMC での IL-2 産生の増加 19
図 2.6.2 - 10　ヒト全血中の $CD3^+$ T 細胞上の PD-L1 に対する in vitro 標的占有率 20
図 2.6.2 - 11　ヒト A431 腫瘍細胞に対する ADCC 活性 21
図 2.6.2 - 12　ヒト A431、A549 及び M21 腫瘍細胞に対する CDC 活性 22
図 2.6.2 - 13　各種マウス腫瘍での PD-L1 発現の IHC 染色像 24
図 2.6.2 - 14　用量依存的な MC38 腫瘍増殖抑制作用 26
図 2.6.2 - 15　脾臓の $CD8^+$ T 細胞の表現型変化 27
図 2.6.2 - 16　脾臓の腫瘍抗原特異的 T 細胞の変化 28
図 2.6.2 - 17　$CD8^+$ T 細胞枯渇による in vivo 抗腫瘍効果の消失 29
図 2.6.2 - 18　抗腫瘍効果の副次的作用機序としての ADCC 活性 30
図 2.6.2 - 19　脾細胞上の PD-L1 占有率 31
図 2.6.2 - 20　血中の PD-L1 占有率 31
図 2.6.2 - 21　PBMC との共培養下での A431 腫瘍細胞の細胞死 33
図 2.6.2 - 22　A431 腫瘍細胞と PBMC の共培養下での各免疫細胞サブセットの細胞死 34

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
CDC	Complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞障害
CTLA-4	Anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4	細胞傷害性 T リンパ球抗原-4
EC_{50}	Effective concentration exerting 50% effect	50%効果濃度
ECG	Electrocardiogram	心電図
EGFR	Epidermal growth factor receptor	上皮成長因子受容体
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫吸着測定法
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent spot	エリスポット法
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化細胞選別装置
Fc	Fragment crystalline	結晶化可能フラグメント
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
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
IgE	Immunoglobulin E	免疫グロブリン E
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IHC	Immunohistochemistry	免疫組織化学
IL	Interleukin	インターロイキン
ka	Kinetic association	結合速度定数
kd	Kinetic dissociation	解離速度定数
KD	Affinity constant	解離定数
MAHA	Mouse anti-human antibody	マウス抗ヒト抗体
MHC	Major histocompatability complex	主要組織適合遺伝子複合体
NK	Natural killer	ナチュラルキラー
Ova	Ovalbumin	卵白アルブミン
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核球

PD-1	Programmed death 1	プログラム死 1
PD-L1	Programmed death ligand 1	プログラム死リガンド 1
PD-L2	Programmed death ligand 2	プログラム死リガンド 2
PHA	Phytohemagglutinin	フィトヘマグルチニン
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
SD	Standard deviation	標準偏差
SEA	Staphylococcal enterotoxin A	ブドウ球菌腸管毒素 A
SEM	Standard error of the mean	平均値の標準誤差
SPR	Surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
TCR	T cell receptor	T 細胞受容体
T_{EM}	T effector memory	エフェクターメモリーT 細胞
TO	Target occupancy	標的占有率

1　まとめ

アベルマブ（国際一般名：avelumab、開発コード：MSB0010718C）は、ファージディスプレイ法により作製された完全ヒト免疫グロブリン G（immunoglobulin G、IgG）1 抗体で、細胞表面のプログラム細胞死リガンド 1（programmed death ligand 1、PD-L1）分子に特異的に結合し、PD-L1 とその受容体であるプログラム細胞死 1（programmed death 1、PD-1）及び B7.1 との間の相互作用を阻害する。PD-L1/PD-1 相互作用を阻害することにより、アベルマブは PD-L1 を細胞表面に発現した腫瘍に対して有効な免疫応答を回復させることができる。アベルマブを用いた多くの in vitro 及び in vivo 薬理試験を実施した。また、開発初期には、他 2 つのアベルマブ関連抗体（MSB0010608H 及び MSB0010294）も試験に用いた。MSB0010608H は、[redacted]である。MSB0010294 は、アベルマブの類縁体（[redacted]、モジュール 3.2.S.1.2.1 参照）である。更に、陰性対照として、PD-L1 結合能を欠く MSB0010294 の変異体（不活化アイソタイプ抗体）を用いた。

薬理試験に使用した抗体を表 2.6.2 - 1 に示した。

表 2.6.2 - 1　薬理試験に使用した抗体

分子名	説明	ヒト PD-L1 に対する解離定数(KD)	使用した試験
アベルマブ (別名：MSB0010718C 又は MSB0010718)	安定的に遺伝子導入した CHO-S 細胞を用いて産生された最終型の完全ヒト IgG1 抗体。	0.7 nM	PEAT1805[redacted]AJW PEAT1805[redacted]BJW PEAT1805[redacted]CJW PEAT[redacted]1213VS IONC[redacted]04051DZ IONC2004[redacted]AKH IIONC0806[redacted]RT IONC0308[redacted]RT IONC1909[redacted]SM IONC0929[redacted]SM RF2710 RF4990
MSB0010608H	[redacted]	[redacted]	IONC[redacted]04051DZ（一部の実験のみ）
MSB0010294 (別名：MSB0010294H)	[redacted]	[redacted]	IONC1103[redacted]RT
MSB0010715H-1 MSB0010707C-1	MSB0010294 の変異型で PD-L1 結合能を完全に欠く陰性対照抗体（不活化アイソタイプ抗体）	ヒト PD-L1 に結合しない	全試験（安全性薬理試験を除く）

免疫系による継続的な攻撃に曝された悪性腫瘍は、免疫系を抑制する複雑なネットワークを構築し、免疫監視機構を回避する（Dunn 2004）。PD-L1（別名：CD274 及び B7-H1）は膜貫通タンパク質で、自己寛容の維持及び自己免疫の回避に関与するタンパク質として最初に発見された（Fife 2011）。PD-L1 が T 細胞表面に発現した PD-1 に結合することにより、抑制性シグナルが伝達され、T 細胞アナジー及びアポトーシスが促進される（Riley 2009、モジュール 3.2.S.3.1 参照）。PD-L1 の発現は、黒色腫、肺癌、結腸癌及び卵巣癌を含む多くの悪性腫瘍で認められている（Dong 2002）。ヒト及びマウスの多くの癌細胞株で、インターフェロン（interferon、IFN）、特に IFNγ の刺激により PD-L1 の発現が誘導されることが示されている（Blank 2006）。腫瘍に浸潤した細胞傷害性リンパ球、すなわち $CD8^+$ T 細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞は、腫瘍の微小環境において IFNγ を産生することから、これらの免疫エフェクター細胞は、腫瘍の PD-L1 発現を誘導し、間接的に自己の抗腫瘍作用を弱めていると考えられる。PD-L1/PD-1 経路の腫瘍免疫回避における重要な役割を強く裏付けるデータにより、PD-L1/PD-1 経路は腫瘍における極めて有望な治療標的と認識されるようになった（Blank 2006）。免疫チェックポイント阻害剤の臨床的有用性は、抗細胞傷害性 T リンパ球抗原-4（cytotoxic T lymphocyte antigen-4、CTLA-4）抗体であるイピリムマブの、進行期悪性黒色腫の治療薬としての最初の承認により示されている（Hodi 2010）。
更に、最近では PD-L1/PD-1 免疫チェックポイント経路を標的とする複数の抗体が癌治療の目的で臨床開発され、承認されている（Ascierto 2010、Brahmer 2012、Topalian 2012、Wang 2014、Deng 2016）。PD-L1/PD-1 経路の阻害は、腫瘍内 T 細胞の抑制を解除することにより、抗腫瘍免疫応答を効果的に増強する。この目的のため、完全ヒト IgG1 抗体である抗 PD-L1 抗体として、アベルマブが開発された。アベルマブはマウス PD-L1 と交差反応性を示すことから、効力を裏付ける in vivo 試験は免疫系が正常なマウスを用いて実施した。

効力を裏付ける in vitro 及び in vivo 試験の結果、アベルマブは in vivo で PD-L1 発現腫瘍に対して主に $CD8^+$ T 細胞依存性の作用機序により抗腫瘍効果を発揮し、副次的作用機序として抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cellular cytotoxicity、ADCC）活性も有することが示された。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。ヒト及びマウス由来の初代 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。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、補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity、CDC）活性は示さなかった。副次的薬理試験では、アベルマブは、腫瘍細胞と末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cell、PBMC）の共培養下で腫瘍細胞に対して ADCC 活性による殺細胞効果を示したが、予め活性化させたヒト免疫細胞に対しては検出可能な殺細胞効果を示さなかった。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。これらの結合親和性データは、効力を裏付ける in vivo 試験及び毒性試験の動物種選択の根拠として用いた。In vitro での評価結果は、PD-L1 発現腫瘍による T 細胞の抑制を解除し、T 細胞を介した腫瘍細胞に対する殺細胞効果を増強することによるアベルマブの in vivo での適用の妥当性を裏付けた。更に、アベルマブは副次的作用機序として ADCC を誘導するため、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。

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 週間とした。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。予め、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、PD-L1 発現レベルが最も高かったことから、MC38 を in vivo 効力を裏付ける試験に使用した。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。更に、腫瘍抗原特異的 $CD8^+$ T 細胞応答の増強も認められた。

アベルマブの作用機序を更に検討するため、全身の $CD8^+$ T 細胞を枯渇させた MC38 腫瘍移植マウスにアベルマブを投与したところ、アベルマブの抗腫瘍効果が消失した。このことから、細胞傷害性 T 細胞がアベルマブの抗腫瘍効果に重要な役割を果たしていることが示された。更に、アベルマブの抗腫瘍効果への ADCC の寄与を、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検討した。ADCC 能の無効化により、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ることが示唆された。

なお、カニクイザルを用いた 4 週間及び 13 週間反復静脈内投与毒性試験の一部として実施した安全性薬理学的評価では、アベルマブ投与による心血管系、呼吸系及び中枢神経系への影響は認められなかった。

効力を裏付ける in vitro 及び in vivo 試験の概要を表 2.6.2 - 2 及び表 2.6.2 - 3、並びに副次的薬理試験の概要を表 2.6.2 - 4 に示した。

表 2.6.2 - 2　効力を裏付ける in vitro 試験の概要

報告書番号	GLP適用	ロット#	試験方法	評価方法	主な結果
PEAT[redacted]l 213VS	非適用	[redacted]	SPR 法により、PD-L1 及び他の様々な B7 ファミリーメンバー（PD-L2、B7.1、B7.2、B7-H2 及び B7-H3）との結合を測定した。	SPR シグナルから、解離定数を求めた。	アベルマブ及び最適化 F02（アベルマブと同一の可変領域を有する抗 PD-L1 抗体）は PD-L1 に高い結合親和性を有し、最適化 F02 の結合は、検討した他の B7 ファミリーメンバーに比べて、PD-L1 選択的であった。
PEAT1805[redacted]CJW	非適用	[redacted]	SPR 法により、ヒト、カニクイザル、マウス、イヌ、ラット及びウサギ由来の PD-L1 に対するアベルマブの結合親和性を測定した。	SPR シグナルから、解離定数を求めた。	アベルマブの結合親和性がヒト、カニクイザル及びマウスで高く、イヌ、ラット及びウサギで低かった。
PEAT1805[redacted]AJW	非適用	[redacted]	IFN-γ による前刺激あり、又はなしの条件下で、ヒト腫瘍細胞株（A431 及び A549）に対するアベルマブの ADCC 誘導能を、高親和性、中親和性及び低親和性の FcγRIIIa を有するエフェクター細胞を用いて評価した。	標的細胞からの ^{51}Cr の放出を指標として ADCC を介した細胞溶解を測定した。	アベルマブの ADCC 誘導能が確認された。IFNγ による PD-L1 発現誘導は、A549 細胞の溶解を増加させた。 低親和性 FcγRIIIa を有するエフェクター細胞は ADCC 活性を示さなかった。
PEAT1805[redacted]BJW	非適用	[redacted]	ヒト腫瘍細胞株（A431、A549 及び M21）に対するアベルマブの CDC 誘導能を評価した。	標的細胞からの ^{51}Cr の放出を指標として CDC を介した細胞溶解を測定した。	アベルマブは、ヒト腫瘍細胞株に対して CDC を誘導しなかった。
IONC[redacted] 04051DZ	非適用	[redacted]	IFN-γ による前刺激あり、又はなしの条件下で、PD-L1 発現ヒト腫瘍細胞株（A431、A549、BxPC3、HCT116、M24、PC3mm2、U-87 MG）に対するアベルマブの結合を、FACS を用いて検出した。	FACS データからヒストグラムを作成し、評価した。	検討した全細胞株でアベルマブの明らかな結合が検出された。IFN-γ で前刺激すると、検討した全細胞株で PD-L1 発現が増加した。
	非適用	[redacted]	PHA で刺激したヒト PBMC に対するアベルマブの結合を、FACS を用いて検出した。	FACS データからヒストグラムを作成し、評価した。	ヒト PBMC に対するアベルマブの明らかな結合が検出された。

報告書番号	GLP適用	ロット#	試験方法	評価方法	主な結果
IONC[redacted]04051DZ	非適用	[redacted]	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 細胞に対するアベルマブの用量依存的結合を、FACS を用いて測定した。	FACS で測定した平均蛍光強度により評価した。	3 動物種のいずれにおいても、アベルマブの PD-L1 に対する用量依存的結合が認められた。EC_{50} はヒトで 0.30 nM、マウスで 0.34 nM、カニクイザルで 0.94 nM であった。
	非適用	[redacted]	固定化 PD-1 と放射性標識 PD-L1 の結合に対するアベルマブの競合的阻害能を測定した。	種々の濃度のアベルマブによる PD-L1 への特異的結合率を測定した。	PD-L1/PD-1 相互作用はアベルマブにより効果的に阻害された（IC_{50} : 0.071 nM）。
	非適用	[redacted]	蛍光標識 B7.1 と HEK293 細胞上に発現した PD-L1 の結合に対するアベルマブの競合的阻害能を測定した。	種々の濃度のアベルマブによる PD-L1 への特異的結合率を測定した。	PD-L1/B7.1 相互作用はアベルマブにより効果的に阻害された（IC_{50} : 0.2± nM）。
	非適用	[redacted]	種々の濃度の MSB0010608H 存在下で、SIINFEKL ペプチドを添加した PD-L1 発現 EL4 細胞及び OT-1 トランスジェニック T 細胞を共培養した。	抗原特異的 T 細胞活性化の指標として、培養上清中の IFN-γ 濃度を ELISA にて測定した。	MSB0010608H により T 細胞活性化が顕著に増強され、EC_{50} は 0.28 nM であった。
	非適用	[redacted]	種々の濃度のアベルマブ存在下で、SEA スーパー抗原を用いてヒト PBMC を刺激した。	T 細胞活性化の指標として、培養上清中の IL-2 濃度を ELISA にて測定した。	アベルマブにより T 細胞活性化が顕著に増強され、EC_{50} は 0.08 nM であった。
IONC1909[redacted]SM	非適用	[redacted]	連続希釈した種々の濃度のアベルマブでヒト全血を処理した。その後、$CD3^+$ T 細胞上の非占有 PD-L1 を、ビオチン化アベルマブで処理し、アロフィコシアニン標識ストレプトアビジンで染色し、フローサイトメトリーにより検出した。	CD3+ T 細胞上の TO（%）を算出した。	アベルマブの TO の EC_{50} は、0.122 µg/mL ± 0.042 µg/mL であった。

ADCC：抗体依存性細胞障害、CDC：補体依存性細胞傷害; EC_{50}：50%効果濃度、FACS：蛍光活性化細胞選別装置 Fc：結晶性断片、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、IC_{50}:：50%阻害濃度、IFNγ：インターフェロンガンマ、IL-2：インターロイキン-2、PBMC：末梢血単核球、PD-1：プログラム細胞死 1、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、PHA：フィトヘマグルチニン、SEA：ブドウ球菌腸管毒素 A、TO：標的占有率、SPR：表面プラズモン共鳴、ELISA：酵素免疫吸着測定法
#：試験に使用したアベルマブのロット

表 2.6.2 - 3　効力を裏付ける in vivo 試験の概要

報告書番号	個別試験番号	GLP適用	ロット#	動物種/モデル/各群の動物数	投与用量/投与スケジュール	主な結果
IONC2004 [redacted]AKH	TI[redacted]-050	非適用	[redacted]	マウス /MC38 結腸癌/10 匹	アベルマブ 100、200、400、又は 800 µg/マウスを 0、3 及び 6 日に i.v.	用量依存的な腫瘍増殖抑制が認められた。
	TI[redacted]-070	非適用	[redacted]	マウス /MC38 結腸癌/14 匹	アベルマブ 100、200、400、又は 800 µg//マウスを 0、3 及び 6 日に i.v.	用量依存的な腫瘍増殖抑制が認められた。
IONC1103 [redacted]RT	TI[redacted]-039	非適用	[redacted]	マウス /MC38 結腸癌/8 匹	MSB0010294 400 µg/マウスを 0、3 及び 6 日に i.p. $CD8^+$T 細胞を枯渇させるため、抗 CD8 抗体 100 µg/マウスを 0、5、10、15 及び 20 日に i.p.	$CD8^+$T 細胞の枯渇により、MSB0010294 の抗腫瘍効果が消失した。この結果から、抗腫瘍効果は主に $CD8^+$T 細胞を介した機序によることが確認された。
IONC0806 [redacted]RT	TI[redacted]-017	非適用	[redacted]	マウス /MC38 結腸癌/10 匹	アベルマブ 400 µg/マウス（グリコシル体及び脱グリコシル体）を 0、3 及び 6 日に i.p. NK 細胞を枯渇させるため、抗 ASGM1 抗体を-1、0、7、14 及び 21 日に i.p.	アベルマブを酵素的に脱グリコシル化した結果、抗腫瘍効果が減弱した。同様に、全身の NK 細胞枯渇後にも、抗腫瘍効果の減弱が認められた。この結果から、ADCC 誘導能がアベルマブの in vivo での有効性に貢献していることが示唆された。
IONC0308 [redacted]RT	TI[redacted]-051	非適用	[redacted]	マウス /C57BL6 非担癌/20 匹	アベルマブ 25、50、100、200、又は 400 µg/マウスを単回 i.v.	全用量で投与 2 日後及び 5 日後に末梢血及び脾細胞上における PD-L1 占有率が 75%～100%となり、8 日後及び 12 日後には用量依存的に減少した。

ADCC：抗体依存性細胞傷害性、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、i.p：腹腔内投与、i.v.：静脈内投与、NK：ナチュラルキラー、PD-L1：プログラム細胞死リガンド 1、ASGM1：アシアロ GM1
#：試験に使用したアベルマブのロット

表 2.6.2 - 4　副次的薬理試験の概要

報告書番号	GLP適用	ロット#	試験方法	評価方法	結果
IONC0929 [redacted]SM	非適用	[redacted]	ヒト A431 腫瘍細胞と抗 CD3 アゴニスト抗体により前刺激したヒト PBMC を、種々の濃度のアベルマブ存在下で 共培養した。腫瘍細胞及び免疫細胞に対する ADCC を、細胞へのヨウ化プロピジウムの取込みを指標としてフローサイトメトリーにより測定した。	腫瘍細胞及び免疫細胞サブセットに対するヨウ化プロピジウム陽性細胞の割合を指標として ADCC 活性を測定した。	アベルマブは、A431 腫瘍細胞に対して ADCC を介した細胞死を誘発したが、免疫細胞に対しては細胞死を誘発しなかった。

ADCC：抗体依存性細胞傷害性、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、PBMC：末梢血単核球
#：試験に使用したアベルマブのロット

2　効力を裏付ける試験

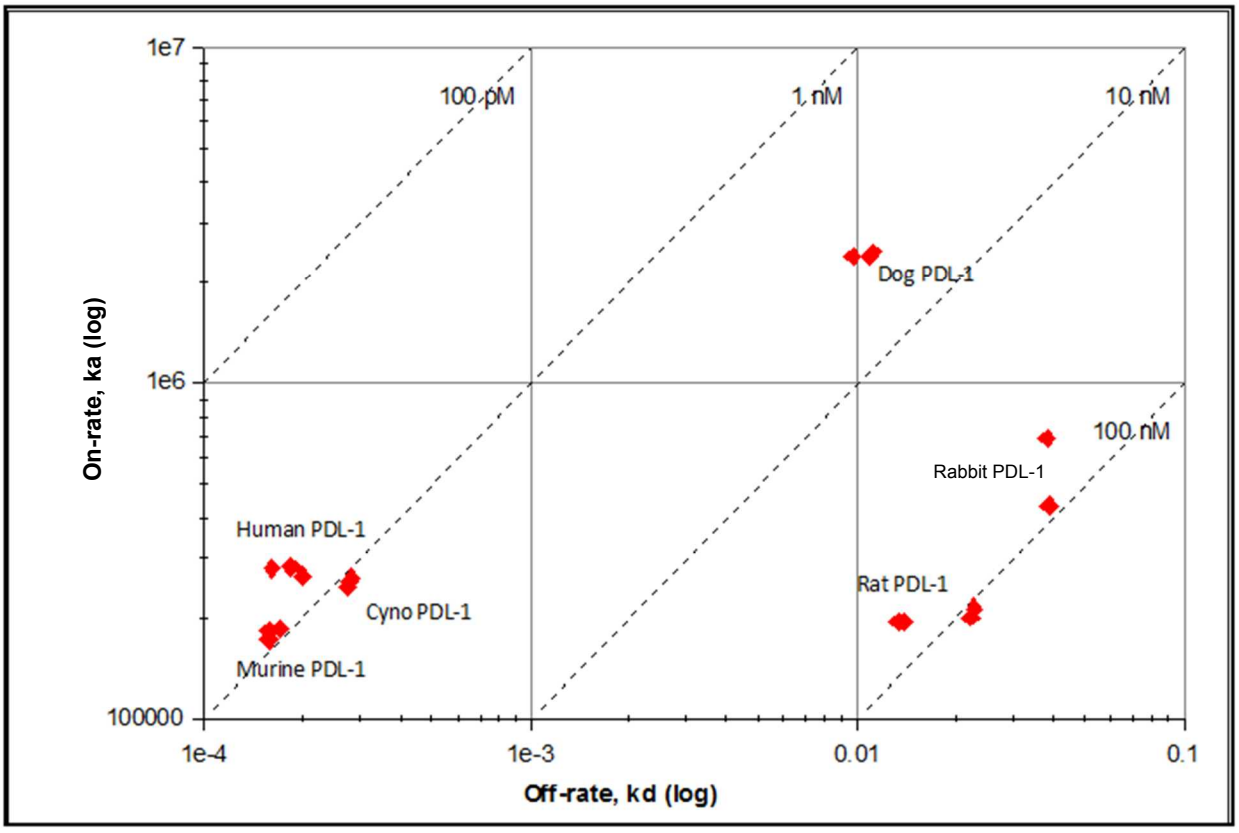
2.1　効力を裏付ける in vitro 試験

2.1.1　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）

添付資料番号：4.2.1.1.2

アベルマブの組み換えヒト、マウス、カニクイザル、イヌ、ラット及びウサギ PD-L1 に対する結合速度定数（kinetic association、ka）及び解離速度定数（kinetic dissociation、kd）を、表面プラズモン共鳴（Surface plasmon resonance、SPR）法を用いて測定した。測定は各動物種につき 3 サンプルを用いて実施した。その結果、アベルマブのヒト PD-L1 に対する解離定数［affinity constant、KD（kd/ka）］は、約 1 nM であった。マウス及びカニクイザル PD-L1 に対する KD はヒト PD-L1 と同程度であった。イヌ PD-L1 に対する結合親和性は低く、KD はヒト PD-L1 の約 10 倍であった。また、ラット及びウサギ PD-L1 に対する結合親和性は極めて低く、KD はそれぞれヒト PD-L1 の 100 倍及び 150 倍であった。アベルマブの各動物種の PD-L1 に対する ka 及び kd を On-Off Rate Map（ka/kd プロット）で示した（図 2.6.2 - 1）。

図 2.6.2 - 1　各動物種の PD-L1 に対する On-Off Rate Map



2.1.2　　B7 ファミリーに対する結合特異性（PEAT20131213VS）

添付資料番号：4.2.1.1.1

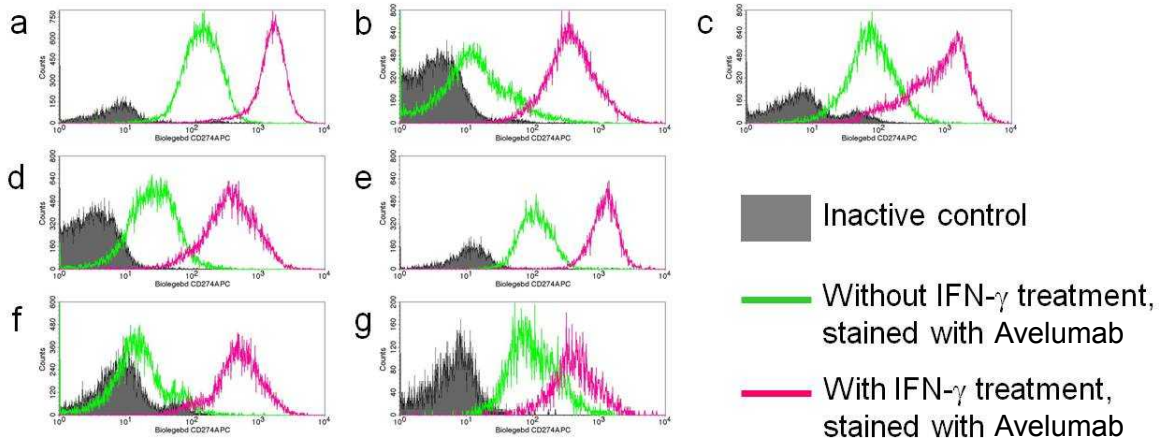
抗 PD-L1 抗体（アベルマブ又はその類縁体）について、ヒト PD-L1 とそのパラログであるヒト B7 ファミリーリガンドに対する結合能を SPR 法により評価した。抗 PD-L1 抗体のリガンドに対する ka 及び kd を測定し、KD を求めた。その結果、抗 PD-L1 抗体は、目的とする標的であるヒト PD-L1 に高い親和性で結合し、パラログである 5 種のヒト B7 ファミリーリガンド［プログラム細胞死リガンド 2（programmed death ligand 2、PD-L2）、B7.1、B7.2、B7-H2、B7-H3］にはアベルマブの PD-L1 に対する KD 値よりはるかに高い濃度（約 1000 倍）でも結合しないことが示された。したがって、アベルマブはヒト PD-L1 に特異的に結合することが示された。

2.1.3　　PD-L1 発現細胞への結合（IONC[redacted]04051DZ）

添付資料番号：4.2.1.1.5

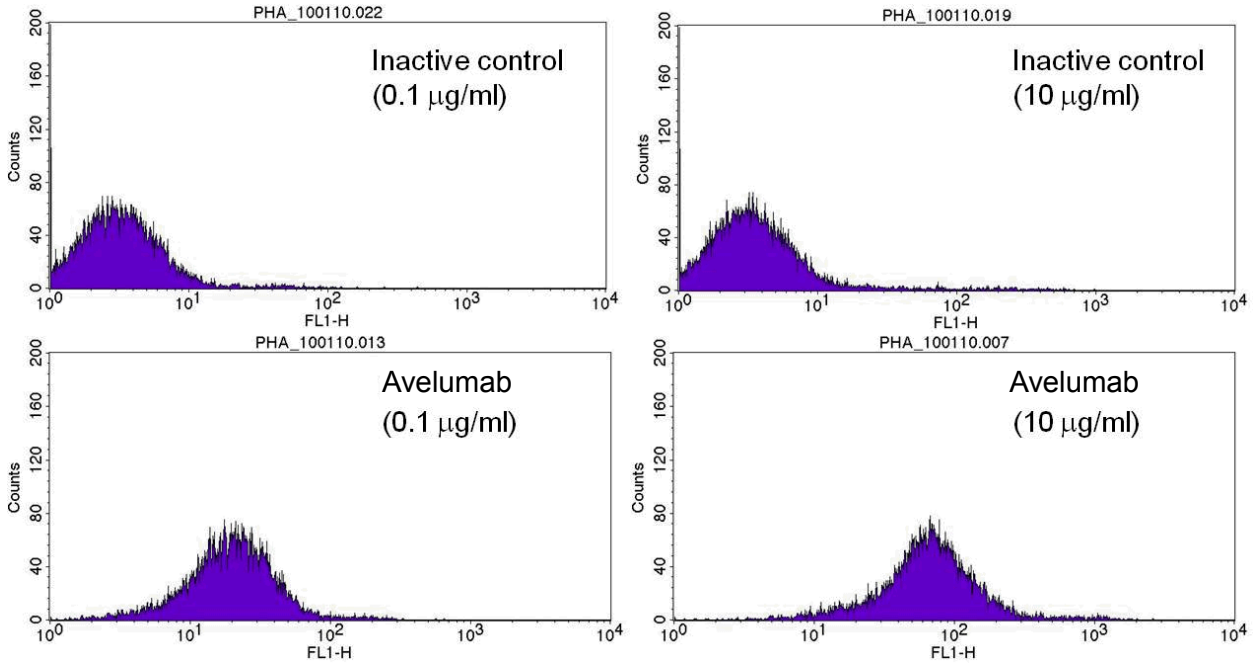
細胞表面上に PD-L1 を内因性に発現した種々のヒト腫瘍細胞及びヒト初代 PBMC に対するアベルマブの結合を、蛍光活性化細胞選別装置（fluorescence-activated cell sorting、FACS）を用いて検出した。FACS による検出前に、ヒト腫瘍細胞を IFN-γ（1000 U/mL）で 2 日間処理し、PD-L1 の発現を誘導した。アベルマブは最終濃度 5 µg/mL で、検討した全 7 種類のヒト腫瘍細胞の PD-L1 に対して陽性反応を示した（図 2.6.2 - 2）。ヒト初代 PBMC はフィトヘマグルチニン（phytohemagglutinin、PHA）で 48 時間処理し、PD-L1 の発現を誘導した。アベルマブはヒト初代 PBMC の PD-L1 に対しても陽性反応を示した（図 2.6.2 - 3）。

図 2.6.2 - 2　　ヒト腫瘍細胞に対する結合



a：A431 ヒト上皮様細胞癌細胞、b：A549 ヒト肺癌細胞、c：BxPC3 ヒト膵癌細胞、d：HCT116 ヒト大腸癌細胞、e：M24 ヒト悪性黒色腫細胞、f：PC3mm2 ヒト前立腺癌細胞、g：U-87 MG ヒト膠芽腫細胞

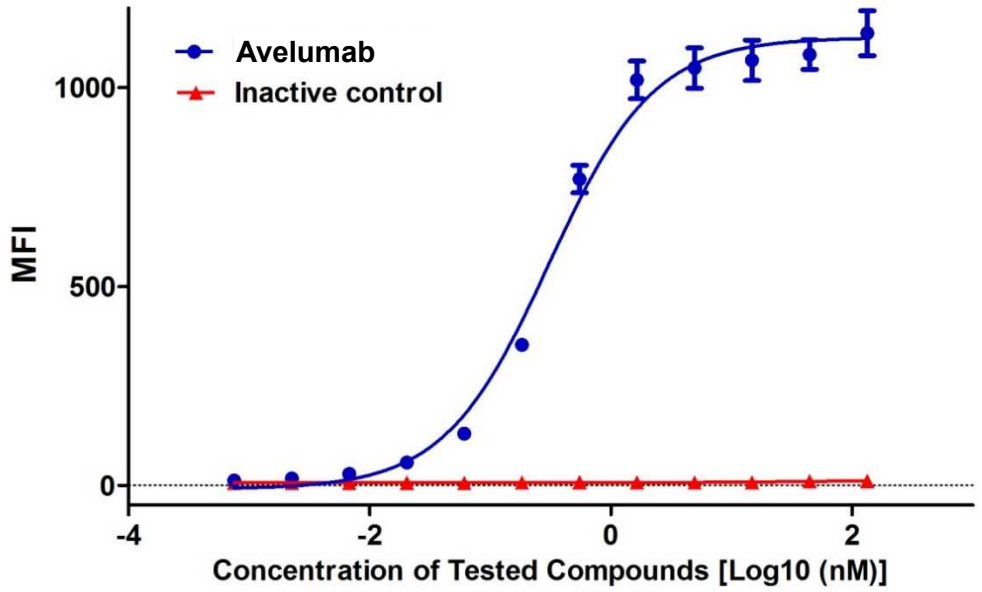
図 2.6.2 - 3　PHA 刺激ヒト PBMC に対する結合



アベルマブ又は MSB0010608H（表 2.6.2 - 1 参照、[redacted]）の様々な動物種の PD-L1 に対する濃度依存的結合を、ヒト PD-L1、マウス PD-L1、又はカニクイザル PD-L1 を発現するよう遺伝子導入した HEK293 細胞を用いて、FACS により検討した。HEK293 細胞の染色は 96 ウェルプレートを用いて実施した。細胞（$2x10^5$ 個/ウェル）を 0.006 μg/mL から 200 μg/mL のアベルマブ又は MSB0010608H と共に 4 時間培養した。アベルマブのヒト PD-L1 に対する結合の 50%効果濃度（effective concentration exerting 50% effect、EC_{50}）は 0.3 ± 0.02 nM（0.04 ± 0.003 μg/mL、図 2.6.2 - 4）、MSB0010608H のカニクイザル PD-L1 に対する結合の EC_{50} は 0.94 ± 0.015 nM（0.14 ± 0.002 μg/mL、図 2.6.2 - 5）、及びアベルマブのマウス PD-L1 に対する結合の EC_{50} は 0.34 ± 0.08 nM（0.05 ± 0.012 μg/mL、図 2.6.2 - 6）であった。

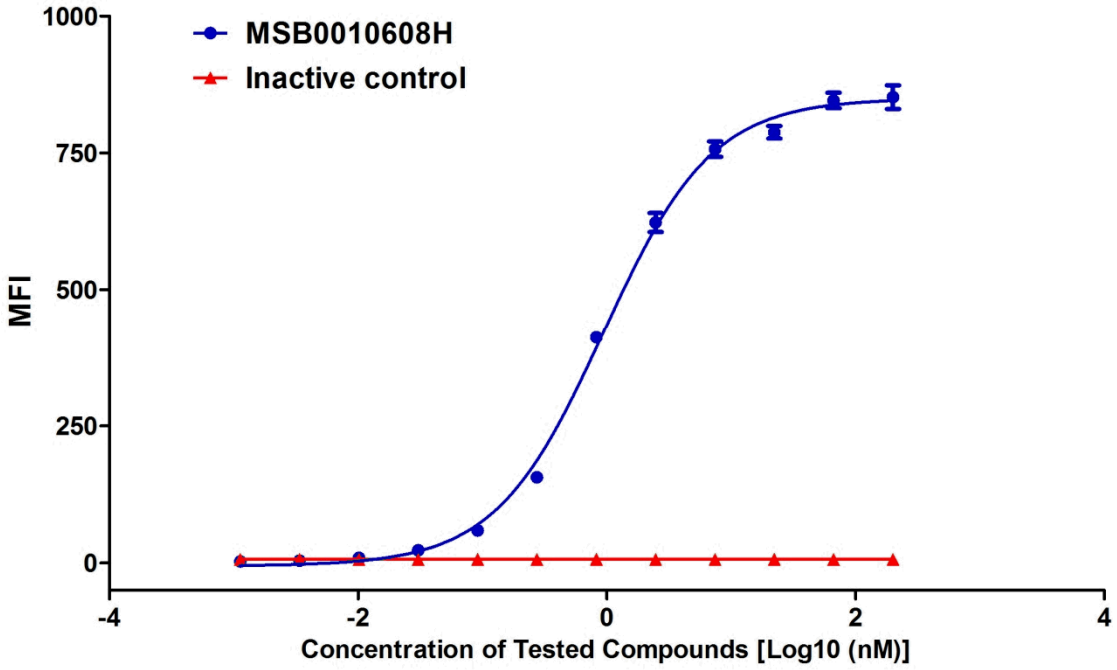
これらの様々な動物種の PD-L1 に対するアベルマブの濃度依存的結合の定量的評価結果に基づき、アベルマブが、ヒト、マウス及びカニクイザルのいずれの PD-L1 にも同程度に結合することが示された。これらの結果は SPR 法を用いて測定したアベルマブの各動物種の PD-L1 に対する結合親和性データともほぼ一致しており、本薬の効力を裏付ける試験にマウス及び毒性試験にカニクイザルを使用したことの妥当性を裏付ける（モジュール 2.6.6.1 参照）。

図 2.6.2 - 4　ヒト PD-L1 発現 HEK293 細胞への濃度依存的結合



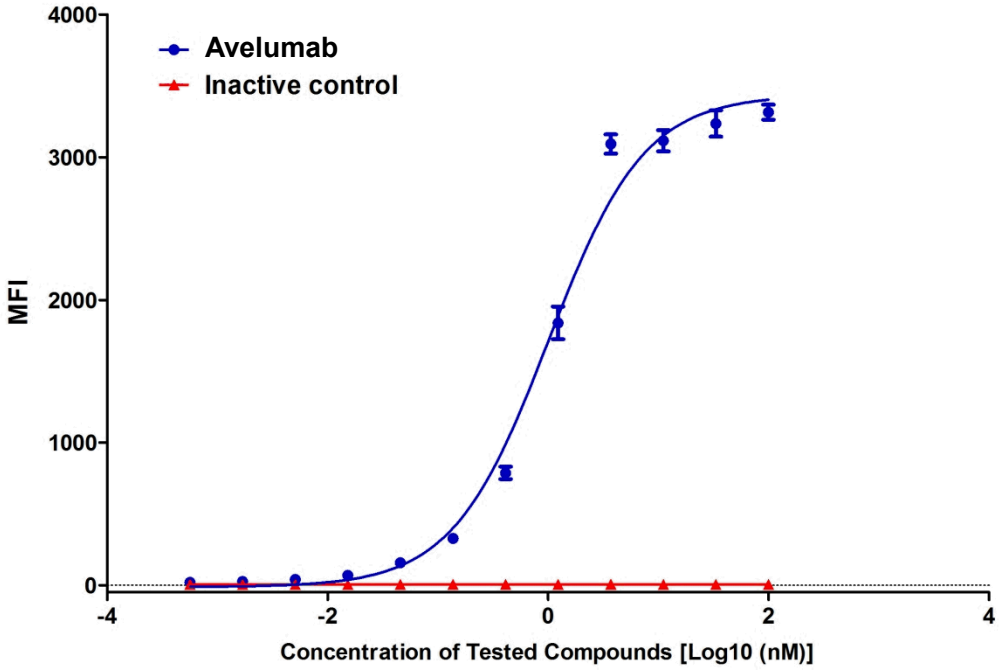
データは平均±標準偏差（n = 12）を示す。
MFI：平均蛍光強度

図 2.6.2 - 5　カニクイザル PD-L1 発現 HEK293 細胞への濃度依存的結合



データは平均±標準偏差（n =3）を示す。
MFI：平均蛍光強度

図 2.6.2 - 6　マウス PD-L1 発現 HEK293 細胞への濃度依存的結合



データは平均±標準偏差（n =3）を示す。
MFI：平均蛍光強度

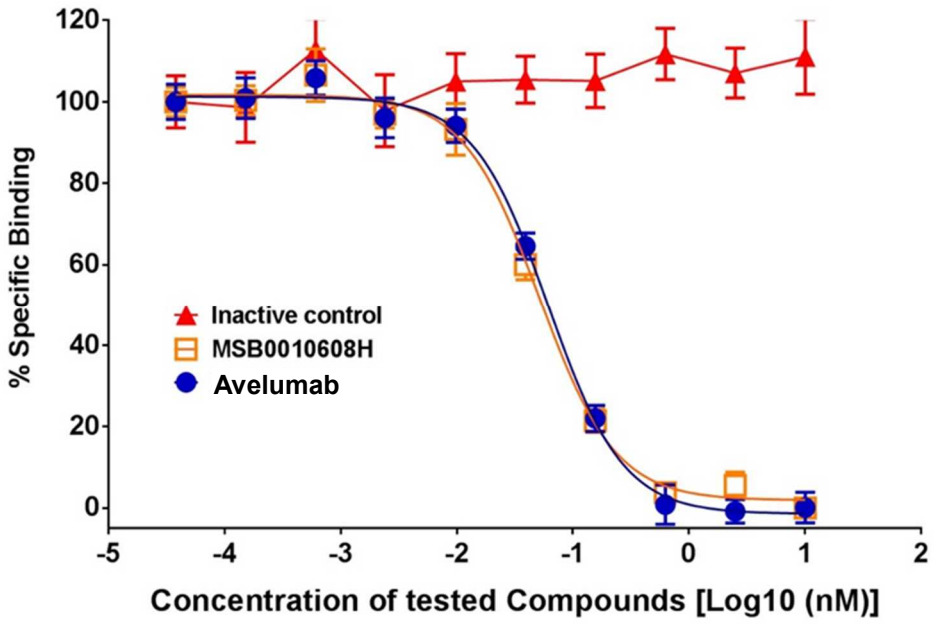
2.1.4　PD-L1/PD-1 相互作用の阻害（IONC[redacted]04051DZ）

添付資料番号：4.2.1.1.5

固定化 PD-1 と放射性標識 ^{125}I-PD-L1 の結合に対するアベルマブ及び MSB0010608H（表 2.6.2 - 1 参照）の競合的阻害能を、0.000006 µg/mL から 1.496 µg/mL の濃度範囲で測定した。アベルマブは PD-1 と PD-L1 の相互作用を効果的に阻害し、50%阻害濃度（concentration exerting 50% inhibition、IC_{50}）は 0.071 ±0.011 nM（0.01 ± 0.002 µg/mL）であった（図 2.6.2 - 7）。[redacted]MSB0010608H は、アベルマブと同程度の阻害能を示した。

更に、蛍光標識 B7.1 と HEK293 細胞上に発現した PD-L1 の結合に対するアベルマブの競合的阻害能を測定した結果、アベルマブは B7.1 と PD-L1 の相互作用も同様に阻害し、IC_{50} は 0.2±0.004 nM（0.03± 0.0006 µg/mL）であった。

図 2.6.2 - 7　PD-L1/PD-1 相互作用に対する用量依存的阻害



データは平均±標準誤差（n =2）を示す。

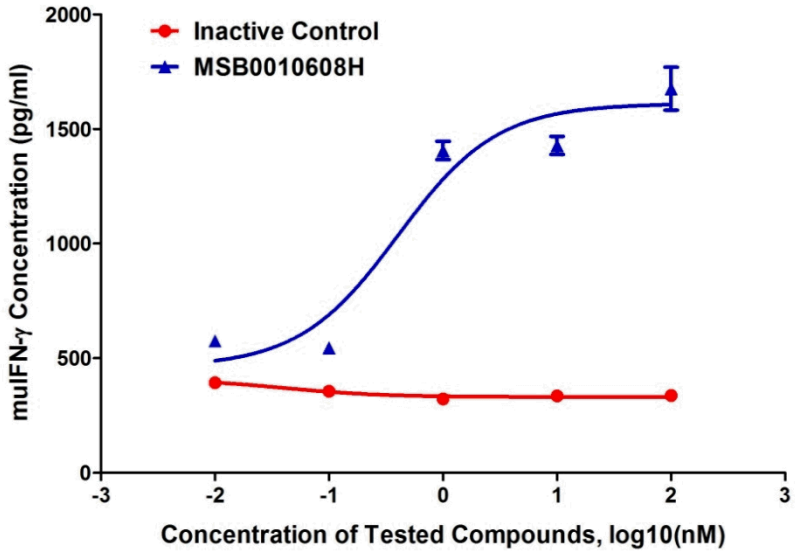
2.1.5　抗原特異的 T 細胞活性化（IONC[redacted]04051DZ）

添付資料番号：4.2.1.1.5

OT-1 トランスジェニックマウス由来の T 細胞を用いた in vitro 試験法を確立し、MSB0010608H（表 2.6.2 - 1 参照）の PD-L1 を介した抗原特異的 T 細胞応答の抑制を解除する能力を測定した。OT-1 マウスは、主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatability complex、MHC）クラス I 分子を介して抗原提示される鶏卵白アルブミン（ovalbumin、Ova）由来の SIINFEKL（Ser - Ile - Ile - Asn - Phe - Glu - Lys - Leu）ペプチドを特異的に認識できるトランスジェニック T 細胞受容体（T cell receptor、TCR）を発現する。OT-1 マウス脾細胞を in vitro で SIINFEKL ペプチドにより刺激し、OT-1 マウス由来の Ova 特異的 $CD8^+$ T 細胞を得た。この OT-1 T 細胞を、0.000015 µg/mL から 14.96 µg/mL の濃度範囲の MSB0010608H 存在下で、SIINFEKL で刺激した PD-L1 発現 EL4 胸腺腫細胞と 48 時間共培養した。OT-1 T 細胞活性化の指標として、培養液上清中の IFN-γ 濃度を酵素免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA）により測定した。

その結果、MSB0010608H は OT-1 T 細胞活性化を効果的に増強し、その EC_{50} は 0.28 ± 0.1 nM（0.04 ± 0.015 µg/mL）であった（図 2.6.2 - 8）。

図 2.6.2 - 8　抗原刺激 OT-1 T 細胞からの IFN-γ 放出の増加



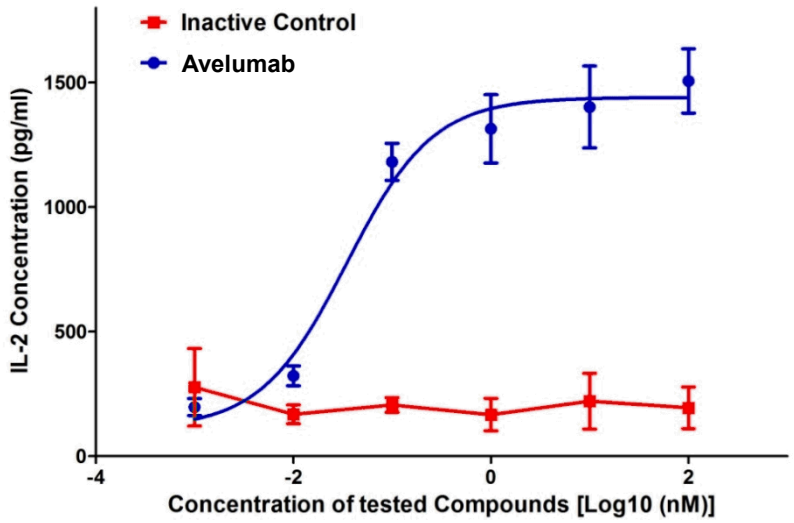
データは平均±標準偏差（n =3）を示す。

2.1.6　ヒト PBMC スーパー抗原刺激試験（IONC[redacted]04051DZ）

添付資料番号：4.2.1.1.5

ブドウ球菌腸管毒素 A（Staphylococcal enterotoxin A、SEA）は、TCR と MHC クラス II 分子の架橋を介して CD4$^+$ T 細胞の非特異的なポリクローナル活性化を誘発するスーパー抗原である（Torres 2001）。In vitro 試験法を確立し、SEA 活性化後に認められるアベルマブの T 細胞機能増強能を測定した。0.000015 µg/mL から 14.96 µg/mL の濃度範囲のアベルマブ存在下で、ヒト PBMC を SEA と共に 96 時間培養した。T 細胞活性化の指標として、培養液上清中のヒトインターロイキン（interleukin、IL）-2 の濃度を ELISA により測定した。アベルマブは、SEA 刺激ヒト PBMC の IL-2 産生を効果的に増加させ、その EC_{50} は 0.08 ±0.03 nM（0.012 ± 0.005 µg/mL）であった（図 2.6.2 - 9）。

図 2.6.2 - 9　SEA 刺激ヒト PBMC での IL-2 産生の増加



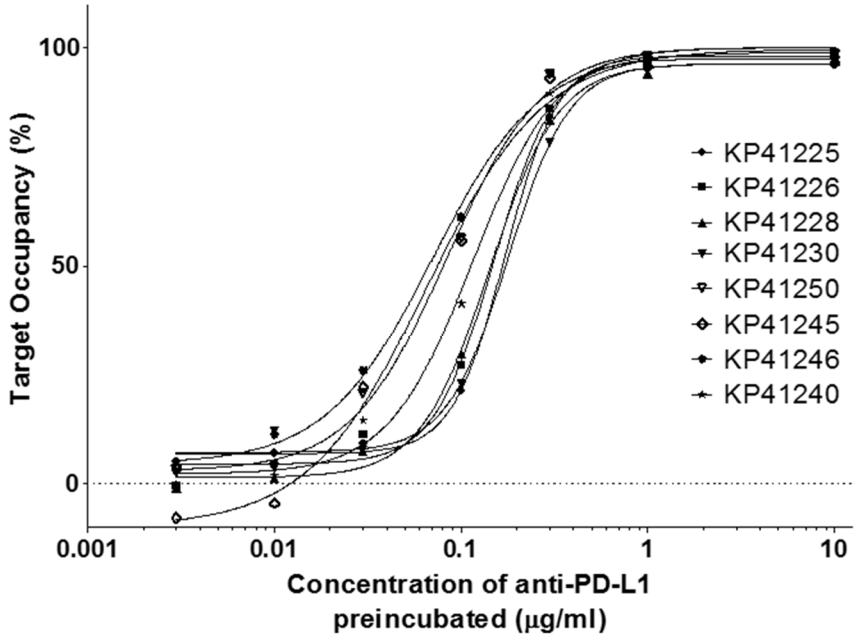
データは平均±標準偏差（n =3）を示す。

2.1.7　In vitro 標的占有率測定（IONC1909[redacted]SM）

添付資料番号：4.2.1.1.6

CD3$^+$ T 細胞上の PD-L1 に対するアベルマブの in vitro での標的占有率（target occupancy、TO）を測定した。すなわち、in vivo 環境に近づけるため、8 名のドナーから得たヒト全血をアベルマブの連続希釈液で処理して培養した後、PBMC を遠心分離した。この PBMC にビオチン化アベルマブを添加し、アロフィコシアニン標識ストレプトアビジンで蛍光標識した後、FACS 分析することにより、CD3$^+$ T 細胞上の非占有 PD-L1 を検出した。なお、生細胞染色色素 7-AAD を用いて生細胞を染色することにより、死細胞を分析から除外した。各試料の TO（%）は、0%及び 100%の結合を示す参照試料の平均蛍光強度と各試料の平均蛍光強度から算出した。その結果、アベルマブ濃度の対数（x 軸）と TO（%、y 軸）をプロットした図から、最小二乗法を用いて EC_{50} 値（細胞上の 50%の PD-L1 占有率を得るために必要なアベルマブ濃度）を含むシグモイド曲線が得られた（図 2.6.2 - 10）。計 8 名のドナー試料の平均 EC_{50} 値は、0.122±0.042 µg/mL［標準偏差（standard deviation、SD）］であった。また、いずれのドナー試料においても、1 µg/mL で 95%以上の PD-L1 占有率が得られた。

図 2.6.2 - 10　ヒト全血中の $CD3^+$ T 細胞上の PD-L1 に対する in vitro 標的占有率



データは 8 名の健常人ボランティア（ID：KP41225、KP41226、KP41228、KP41230、KP41250、KP41245、KP41246、KP41240）から得た各試料での測定結果を示す。

2.1.8　ヒト腫瘍細胞に対する ADCC（PEAT1805[redacted]AJW）

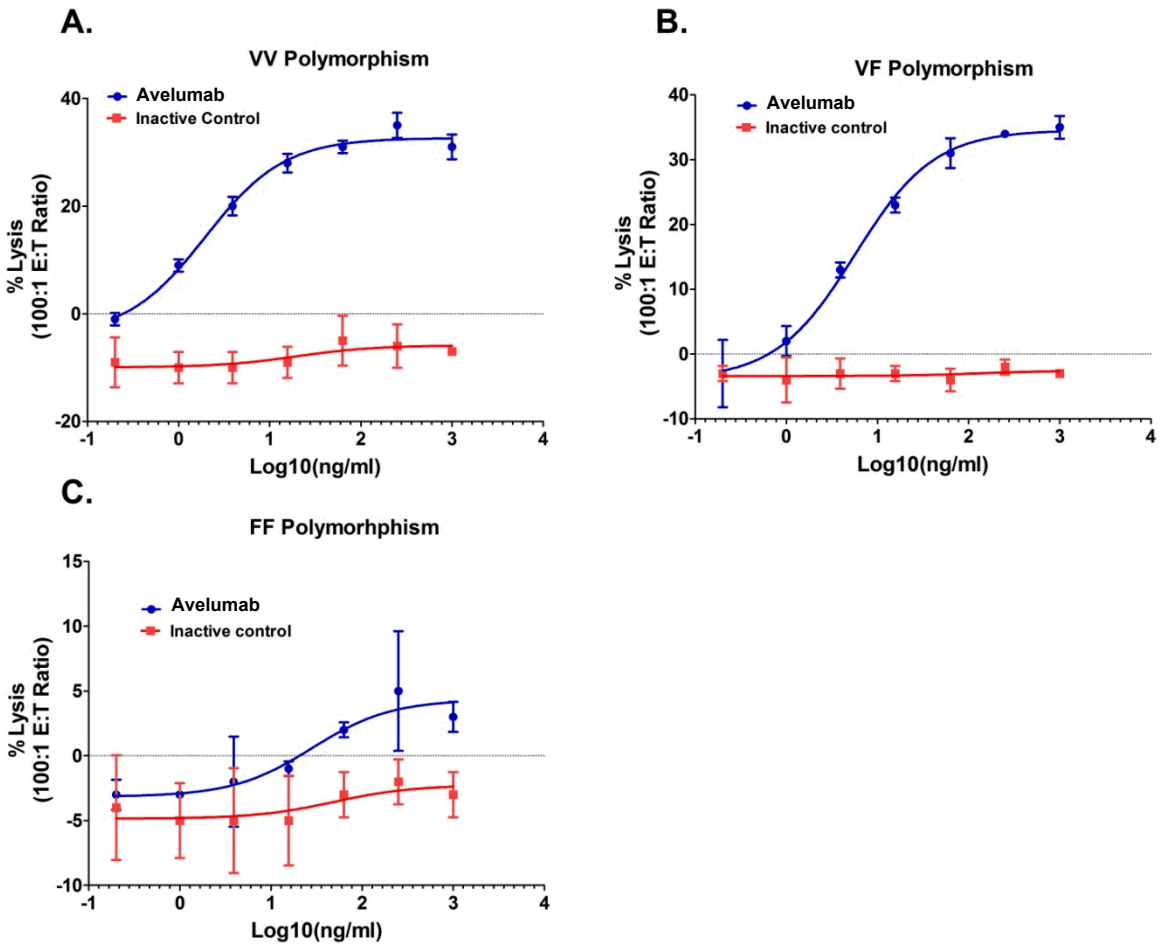
添付資料番号：4.2.1.1.3

完全ヒト IgG1 抗体であるアベルマブは、PD-L1 発現標的細胞に対して ADCC 誘導能を有する可能性が考えられる。そこで、アベルマブの ADCC 誘導能を、2 種類のヒト腫瘍細胞株（A431 類表皮癌細胞株及び A549 肺癌細胞株）を用いて、in vitro で評価した。陰性対照として、PD-L1 結合能を完全に喪失したアベルマブ変異体（不活化アイソタイプ抗体）を使用した。各腫瘍細胞株をヒト IFNγ で前刺激し、細胞表面の PD-L1 発現を誘発した。0.25 ng/mL から 10000 ng/mL の濃度範囲のアベルマブ又は不活化アイソタイプ抗体の存在下で、免疫エフェクター細胞（ヒト PBMC）を ^{51}Cr で放射標識した腫瘍細胞と 100:1 の存在比で共培養した。培養上清中に放出された ^{51}Cr 量を測定して腫瘍細胞の溶解を評価した。

その結果、十分に測定可能な腫瘍細胞の溶解が両細胞株で認められ、アベルマブは ADCC を介して間接的に腫瘍細胞を殺傷できることが確認された（A431 腫瘍細胞のデータを図 2.6.2 - 11 に示す）。アベルマブを介した ADCC の感受性は、ドナーのエフェクター細胞上の結晶化可能フラグメント（fragment crystalline、Fc）γRIIIa 遺伝子多型に依存することが示された。ある種の FcγRIIIa 遺伝子多型は、エフェクター細胞上の FcγRIIIa の発現量及び抗体の Fc 部位への結合親和性が高く、より高い ADCC 誘導能を持つことが知られている。低親和性のフェニルアラニン（F）のホモ体（FF）多型を

有するドナーのエフェクター細胞では、腫瘍細胞に対する ADCC 活性は低かった（図 2.6.2 - 11C）。それに対し、高親和性のバリン（V）のホモ体（VV）多型を有するエフェクター細胞（図 2.6.2 - 11A）及びヘテロ体（VF）多型を有するエフェクター細胞（図 2.6.2 - 11B）では、高い ADCC 活性が認められた。

図 2.6.2 - 11　ヒト A431 腫瘍細胞に対する ADCC 活性



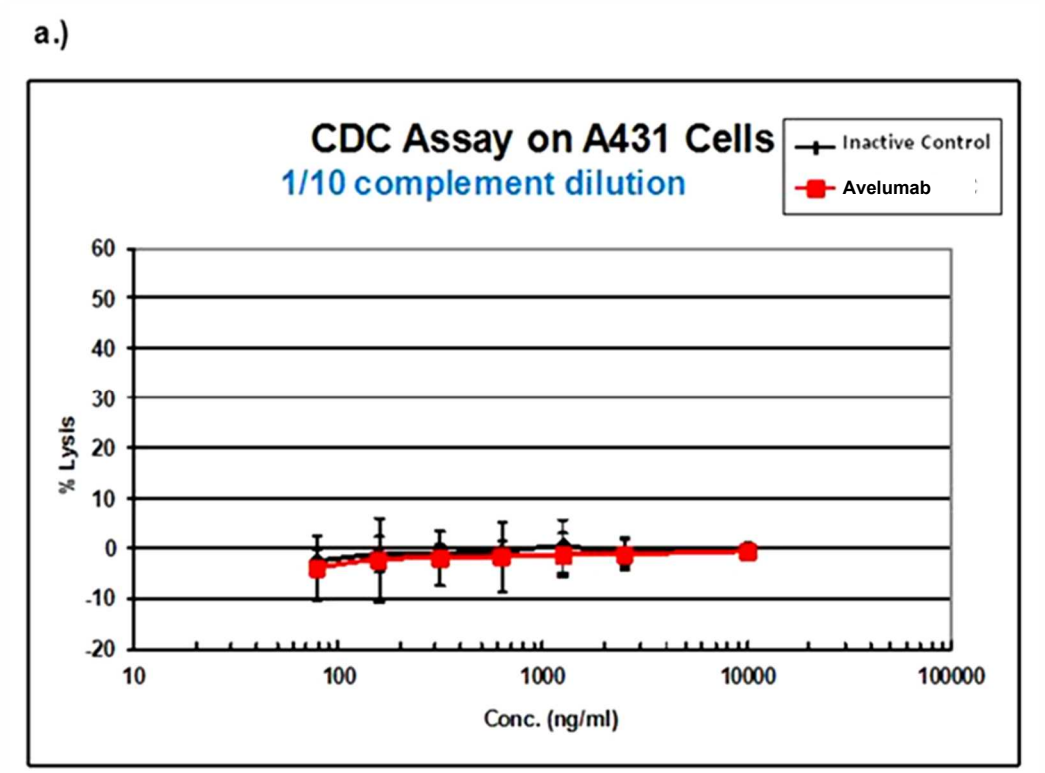
データは平均±標準偏差（n =3）を示す。
V：バリン、F：フェニルアラニン、E:T Ratio：標的細胞（T）に対するエフェクター細胞（E）の混合比

2.1.9　　ヒト腫瘍細胞に対する CDC（PEAT1805[redacted]BJW）

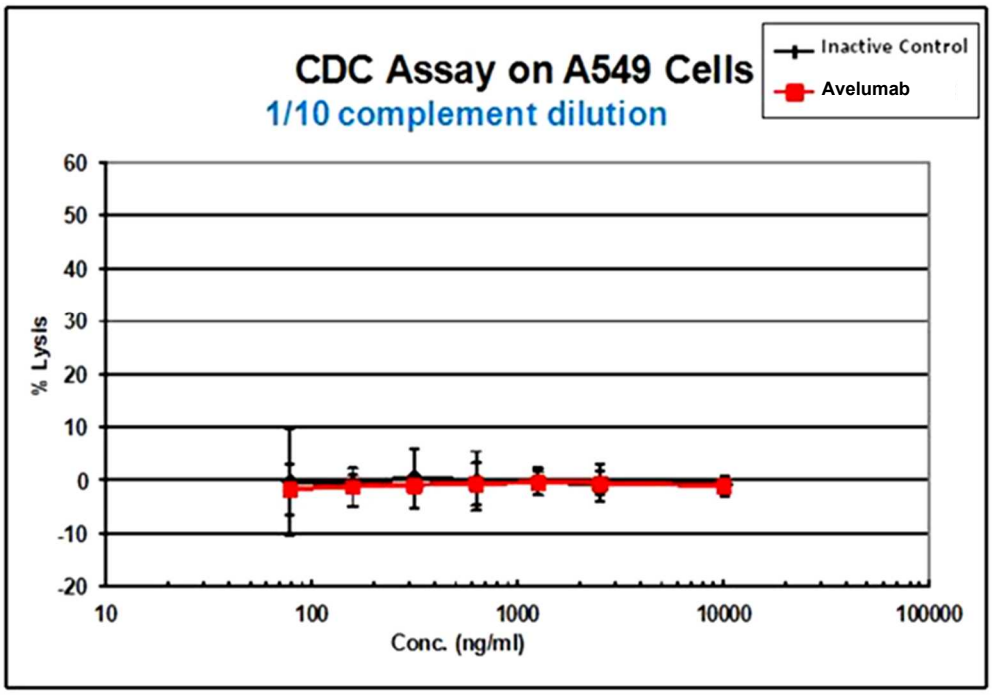
添付資料番号：4.2.1.1.4

アベルマブのような IgG1 アイソタイプ抗体は補体活性化能を有し、抗体の結合した標的細胞に対して CDC 経路を介した細胞溶解を誘導する可能性が考えられる。そこで、アベルマブの CDC 誘導能を、ヒト腫瘍細胞株 A431、A549 及び M21 を用いて、in vitro で評価した。^{51}Cr で放射標識した腫瘍細胞を、種々の濃度（2.43 ng/mL から 10000 ng/mL の濃度範囲）のアベルマブ及びヒト補体の存在下で 45 分間培養した。培養上清中に放出された ^{51}Cr 量を測定して CDC 活性を評価した。陽性対照として、CDC 誘導能を有することが予め確認されている抗体 14.18-IL2 を使用し、M21 腫瘍細胞に対する CDC 活性を評価した。更に、2 種の陰性対照抗体［アベルマブの不活化アイソタイプ抗体及び抗上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor、EGFR）抗体であるセツキシマブ］を使用した。その結果、アベルマブは、検討した全 3 種のヒト腫瘍細胞に対して CDC を誘導しないことが確認された（図 2.6.2 - 12）。

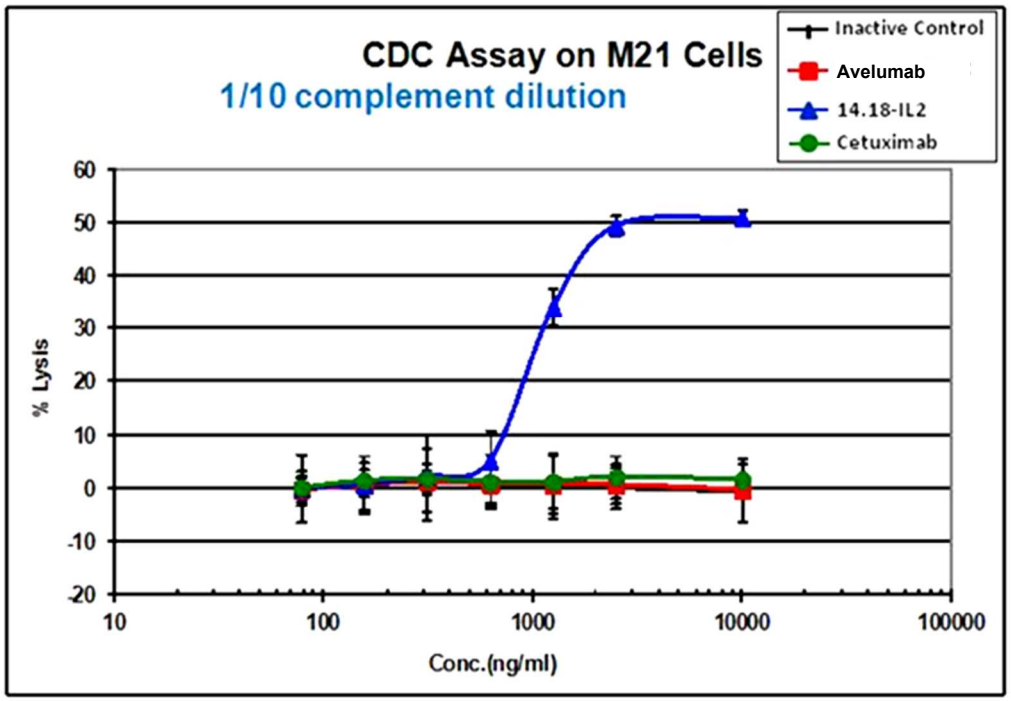
図 2.6.2 - 12　　ヒト A431、A549 及び M21 腫瘍細胞に対する CDC 活性



b.)



c.)



データは平均±標準偏差（n =3）を示す。

2.2　効力を裏付ける in vivo 試験

2.2.1　同系マウス腫瘍での PD-L1 発現

アベルマブはマウス PD-L1 に対して交差反応性を示すため、抗腫瘍効果及び作用機序を検討する試験を、正常な免疫能を有するマウスを宿主とした同系マウス腫瘍モデルで実施することが可能と考えられた。そこで、アベルマブの抗腫瘍効果を検討する in vivo 腫瘍モデルの選択に役立てるため、C57BL/6 マウス由来の一般的なマウス腫瘍 6 種類での PD-L1 発現を、免疫組織化学（immunohistochemistry、IHC）法によって評価した（Wilm 2010）。各マウス皮下増殖腫瘍を抗マウス PD-L1 抗体を用いて IHC 法で染色し、PD-L1 発現レベルを定性的及び定量的に評価した。定性的評価では、評価した腫瘍 6 種類のうち、MC38 マウス結腸癌で PD-L1 発現レベルが最も高かった（図 2.6.2 - 13）。PD-L1 発現の定量的評価の結果を、表 2.6.2 - 5 に示した。抗腫瘍効果及び作用機序を検討する in vivo 試験では、PD-L1 の発現レベルが高かった MC38 腫瘍モデルを使用した。

図 2.6.2 - 13　各種マウス腫瘍での PD-L1 発現の IHC 染色像

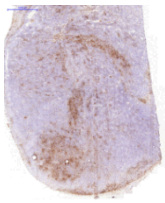
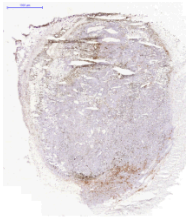
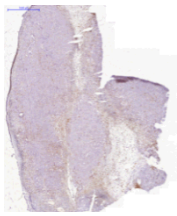
MC38 Colon Carcinoma	PANC02 Pancreatic Adenocarcinoma	Lewis Lung Carcinoma	B16 Melanoma	B78D14 Melanoma	EL4 Thymoma
					

表 2.6.2 - 5　各種マウス腫瘍での PD-L1 発現の定量的 IHC による分析

腫瘍の種類	動物数	陽性率（%）	強度	抗体染色性 （AU）
MC38	5	49.5 ± 10.5	129 ± 4	64.0 ± 15.5
PANC02	4	31.0 ± 14.3	133 ± 4	39.2 ± 19.4
Lewis Lung Carcinoma	4	12.5 ± 2.4	136 ± 2	15.0 ± 3.1
B78D14	5	3.8 ± 1.3	139 ± 1	4.4 ± 1.5
EL4	5	2.5 ± 0.5	140 ± 1	4.4 ± 1.5

PD-L1 をラット IgG2a モノクローナル抗体（eBioscience, #14-5982, clone MIH）で検出した。標本を MiraxSCAN（Zeiss）及び Axio Vision ソフトウェア（Zeiss）を用いて解析した（解像度：x/y；1 pixel = 0.23 x0.23 uM）。明らかな壊死領域を避け、生組織領域を解析した。陽性率は、100×［核及び細胞質の茶色の染色領域/（茶色の染色領域＋青色の染色領域）］の式により算出した。また、抗体染色性［任意単位（AU）］は、陽性率（%）×（255-強度）/100 の式により算出した。データは平均±標準偏差を示す。

2.2.2　MC38 結腸癌モデルに対する用量依存的な抗腫瘍効果（IONC2004[redacted]AKH）

添付資料番号：4.2.1.1.7

完全ヒト IgG1 抗体であるアベルマブはマウスにとって異種抗体であることから、アナフィラキシーを誘発する可能性がある抗薬物抗体（anti-drug antibody、ADA）が産生されるため（モジュール 2.6.6.8.1 参照）、抗腫瘍効果を評価するためのアベルマブの投与期間が制限された。そのため ADA 産生が起こる前に最大のアベルマブ曝露量を得るために、効力を裏付ける in vivo 試験では、アベルマブを 3 日ごとに最大 3 回まで投与した（例：0、3 及び 6 日に投与）。なお、以降の全ての in vivo 試験で、初回投与日を試験 0 日と定義した。

前述したように PD-L1 発現レベルが高いことから選択した MC38 腫瘍モデルを用いて、アベルマブを単剤投与する試験を 2 試験実施し（個別試験番号：TI10-050 及び TI10-070）、抗腫瘍効果の用量依存性を検討した。更に、アベルマブの抗腫瘍効果を担うと推定されるエフェクターリンパ球集団（すなわち、$CD8^+$ T 細胞）の表現型を FACS で解析した。

C57BL/6 雌マウスの右脇腹に $1x10^6$ 個の MC38 結腸癌細胞を皮下移植し、平均腫瘍体積が約 50 mm^3 に到達した時点でマウスを各群（14 匹/群）に振り分けた。アベルマブ投与群には、アベルマブを 100、200、400、又は 800 µg の用量で 0、3 及び 6 日に静脈内投与した。対照群には、不活性アイソタイプ抗体を投与した。腫瘍体積はノギスを用いて週 2 回測定した。

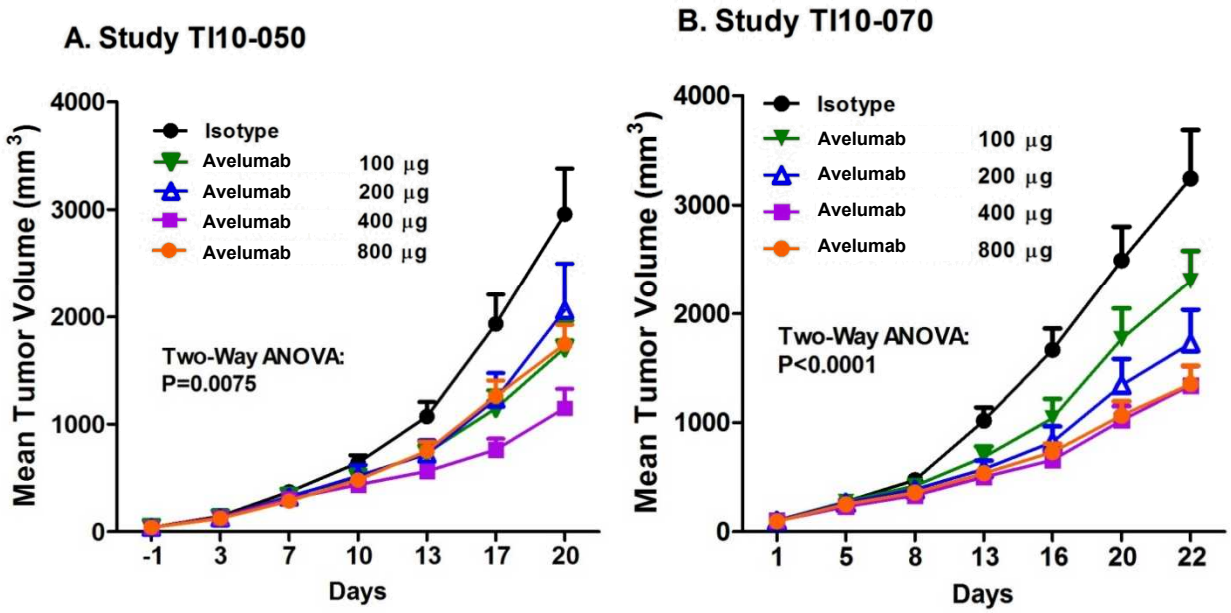
TI10-050 試験では、全アベルマブ投与群で対照群に比べて有意な腫瘍増殖抑制（P<0.050）が認められた（図 2.6.2 - 14A）。100、200 及び 400 µg 投与群での抗腫瘍効果を比較した結果、用量依存的な傾向が認められた。TI10-070 試験でも、同様に用量依存的な抗腫瘍効果が認められた（図 2.6.2 - 14B）。しかしながら、800 µg 投与群での抗腫瘍効果は 400 µg 投与群と同程度であった。400 µg を超える用量では抗腫瘍効果の増強が認められなかったことから、標的分子の飽和又は強い免疫応答（ADA 産生）によるアベルマブ曝露量の低下により、抗腫瘍効果が頭打ちを示したことが考えられた。最大効果が 400 µg で得られたことから、以降の効力を裏付ける in vivo 試験では、アベルマブの用量を 400 µg とした。

試験 9 日（アベルマブ最終投与後 3 日）に、各群 3 匹のサテライト動物を安楽死させ、脾臓から脾細胞を単離した。これらの細胞の表面マーカー（CD8、PD-1、CD44 及び CD62L）を蛍光標識抗体で染色した後、BD LSR II フローサイトメーターを用いて免疫表現型を FACS により解析した。特に、$CD8^+$ T 細胞の表現型に着目して解析した。その結果、アベルマブ投与により、$CD8^+PD\text{-}1^+$ T 細胞及び $CD8^+$ エフェクターメモリーT（T effector memory、T_{EM}）細胞の割合が増加することが明らかになった（図 2.6.2 - 15）。

MC38 腫瘍にはマウスの内因性レトロウイルスタンパク質（p15E）が発現しており、これが $CD8^+$ T 細胞に認識される腫瘍関連抗原であることが確認されている（Yang 2000）。そこで、p15E 由来抗原ペプチドエピトープを有する蛍光標識合成 MHC クラス I ペンタマーを用いて、p15E 抗原を特異的に認識する $CD8^+$ T 細胞の出現頻度を評価した。試験 9 日に各群 3 匹のサテライト動物の脾臓から単離した脾細胞を、抗 CD8 抗体及び p15E ペンタマーで染色し、CD8 及びペンタマーともに陽性の細胞の割合を BD LSR II フローサイトメーターを用いた FACS 解析により同定した。その結果、アベルマブ投与により、p15E 抗原特異的 $CD8^+$ T 細胞の割合が増加することが明らかになった（図 2.6.2 - 16）。

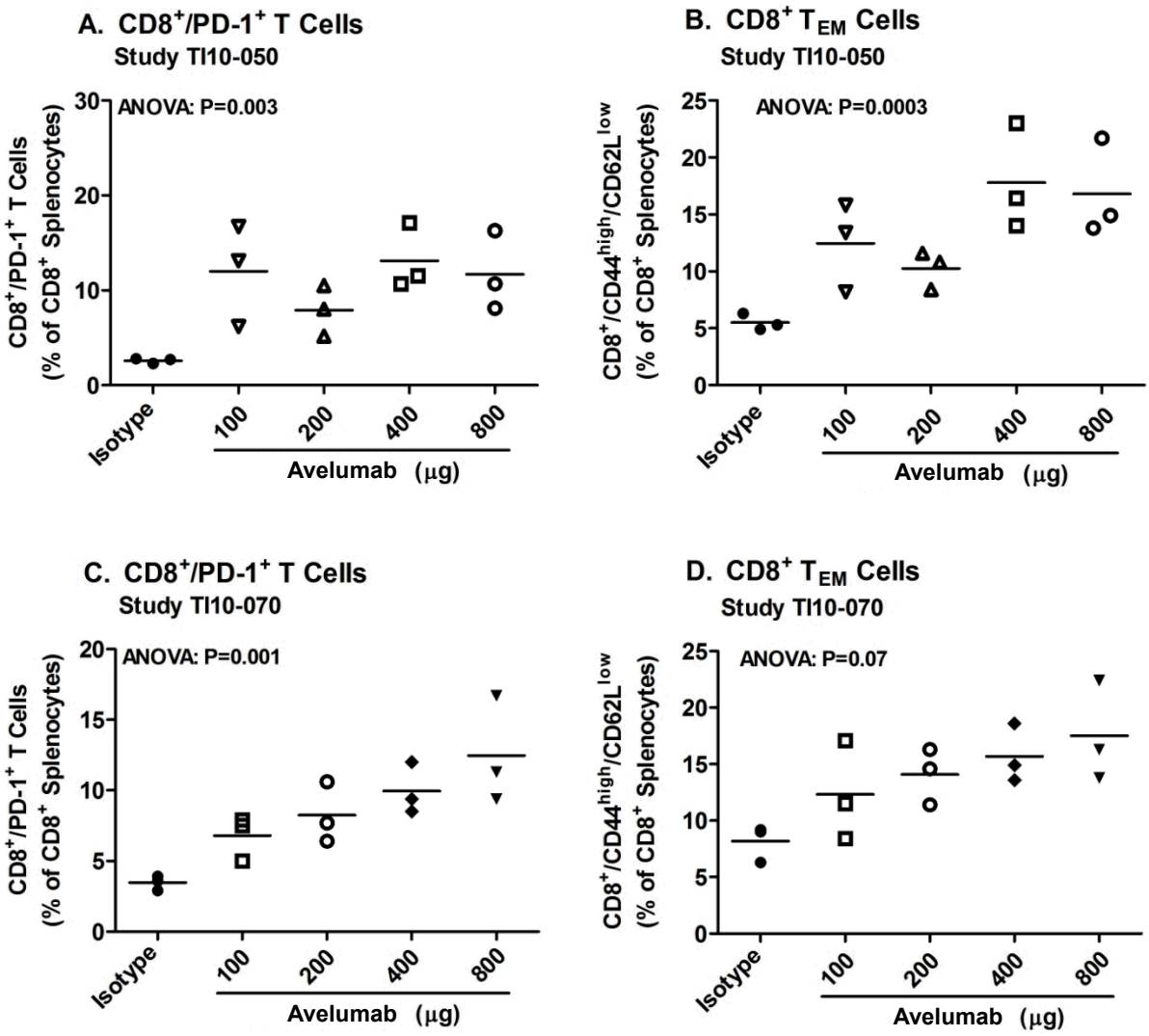
以上のように、アベルマブは、期待される作用機序に一致した免疫学的変化に基づき、マウス皮下移植 MC38 腫瘍に対し、単剤で用量依存的な抗腫瘍効果を示した。

図 2.6.2 - 14　用量依存的な MC38 腫瘍増殖抑制作用



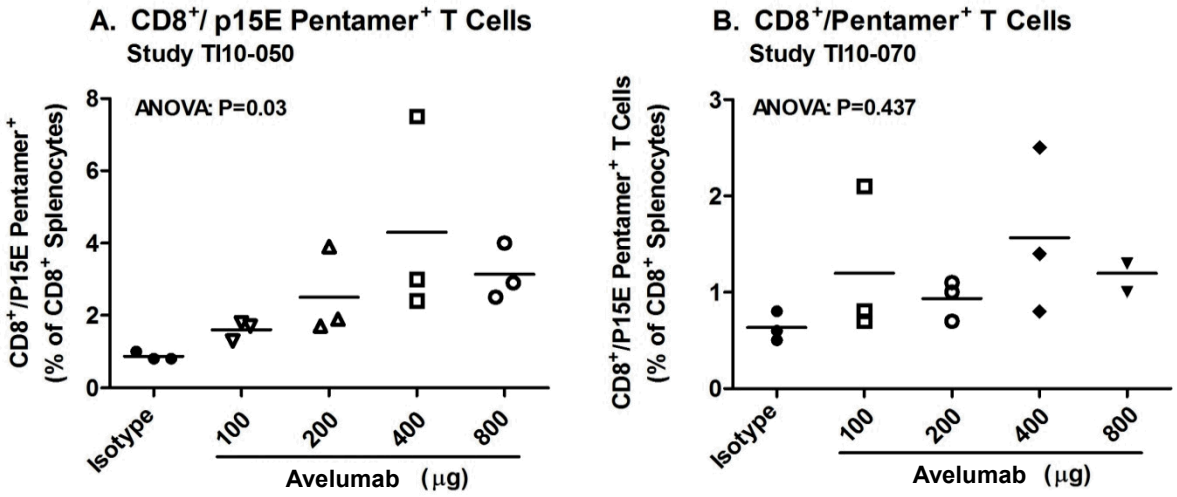
データは平均±標準誤差（n=14）を示す。

図 2.6.2 - 15　脾臓の CD8+ T 細胞の表現型変化



データは個別値及び平均値（n=3）を示す。

図 2.6.2 - 16　脾臓の腫瘍抗原特異的 T 細胞の変化



データは個別値及び平均値（n=3）を示す。

2.2.3　In vivo 作用機序試験（IONC1103[redacted]RT 及び IONC0806[redacted]RT）

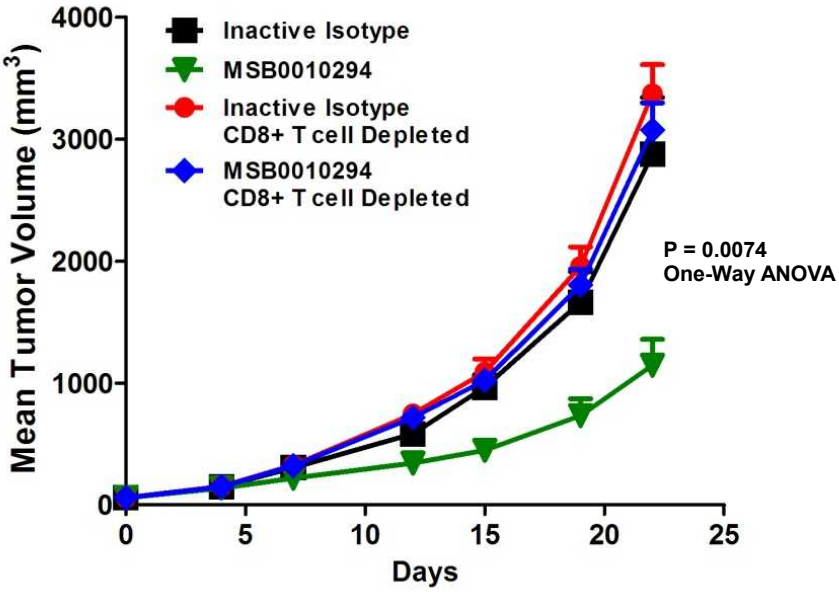
添付資料番号：4.2.1.1.8 及び 4.2.1.1.9

抗 PD-L1 療法の抗腫瘍効果は、腫瘍微小環境で細胞傷害性 $CD8^+$ T 細胞の抑制を解除することによると推測される。既存の方法（Benjamin 1986）に基づき、抗 CD8 抗体の投与により免疫エフェクター細胞集団を枯渇させた MC38 担癌マウスを用いて、PD-L1 阻害に基づく抗腫瘍効果における細胞傷害性 $CD8^+$ T 細胞の寄与を評価した（IONC1103[redacted]RT）。

MC38 細胞（$1x10^6$ 個）を C57BL/6 雌マウスに皮下移植し、平均腫瘍体積が約 60 mm^3 に到達した時点でマウスを各群（8 匹/群）に振り分けた。400 μg の抗 PD-L1 抗体 MSB0010294（アベルマブの類縁体）を 0、3 及び 6 日にマウスに腹腔内投与した。対照群には不活性アイソタイプ抗体を同様に投与した。MSB0010294 又はアイソタイプ抗体を投与した 2 群のマウスに、それぞれ抗 CD8 抗体（100 μg）を 5 日おき（0、5、10、15 及び 20 日）に腹腔内投与し、全身の $CD8^+$ T 細胞を枯渇させた。$CD8^+$ T 細胞の枯渇は、末梢血試料の FACS 解析により確認した。腫瘍体積はノギスを用いて週 2 回測定した。

その結果、$CD8^+$ T 細胞数が正常なマウスは、MSB0010294 投与によって、腫瘍増殖が有意に抑制された［P =0.0074、一元配置分散分析（analysis of variance、ANOVA］。一方、$CD8^+$ T 細胞の枯渇によって MSB0010294 の抗腫瘍効果が消失したことから、本腫瘍モデルでは腫瘍増殖抑制に $CD8^+$ T 細胞の働きが不可欠であることが確認された（図 2.6.2 - 17）。

図 2.6.2 - 17　CD8⁺ T 細胞枯渇による in vivo 抗腫瘍効果の消失



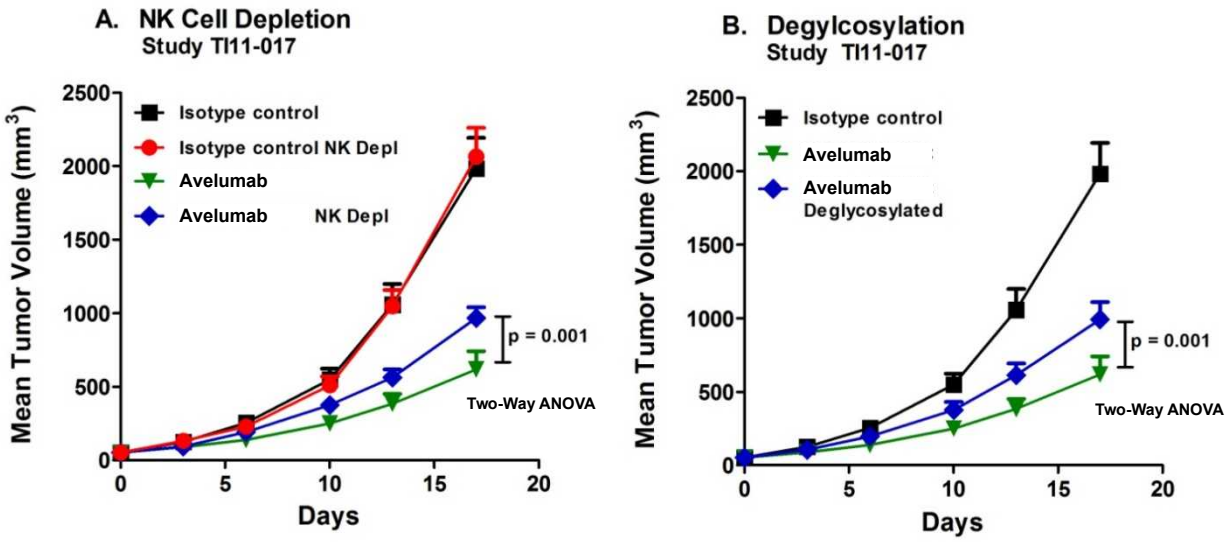
データは平均±標準誤差（n=8）を示す。

アベルマブは完全ヒト IgG1 であるため、腫瘍増殖抑制の副次的機序として、PD-L1 発現腫瘍細胞に対する ADCC 誘導能を有する可能性が考えられる。そこで、アベルマブの作用機序に対する ADCC の寄与を評価するため、以下の 2 種類の方法を採用し、in vivo 試験（IONC0806[redacted]RT）を実施した：1）アベルマブを酵素的に脱グリコシル化し、Fc 受容体への免疫エフェクター細胞の結合能を消失させることにより、ADCC 誘導能を無効化する、2）ADCC を主に担う NK 細胞を試験動物の全身から枯渇させる。

MC38 細胞（1x10⁶ 個）を雌 C57BL/6 マウスに皮下移植し、平均腫瘍体積が約 60 mm³ に到達した時点でマウスを各群（8 匹/群）に振り分けた。アベルマブ又は脱グルコシル化したアベルマブをそれぞれ 400 µg の用量で、0、3 及び 6 日にマウスに腹腔内投与した。また、対照群には不活性アイソタイプ抗体を同様に投与した。更に、アベルマブ又は不活性アイソタイプ抗体を投与する別の 1 群を設け、これらの抗体の投与と共に、抗アシアロ GM1（asialo-GM1、ASGM1）血清（50 µL）を週 1 回（-1、0、7、14 及び 21 日）腹腔内投与し、全身の NK 細胞を枯渇させた。NK 細胞の枯渇は、末梢血試料の FACS 解析により確認した。腫瘍体積はノギスを用いて週 2 回測定した。

その結果、脱グリコシル化したアベルマブでは、アベルマブに比べて抗腫瘍効果がやや減弱した。また、NK 細胞を枯渇させた場合も、アベルマブの抗腫瘍効果は同程度に減弱した（図 2.6.2 - 18）。これらの成績により、ADCC がアベルマブの抗腫瘍効果の副次的機序として機能していることが示唆された。

図 2.6.2 - 18　抗腫瘍効果の副次的作用機序としての ADCC 活性



データは平均±標準誤差（n=8）を示す。

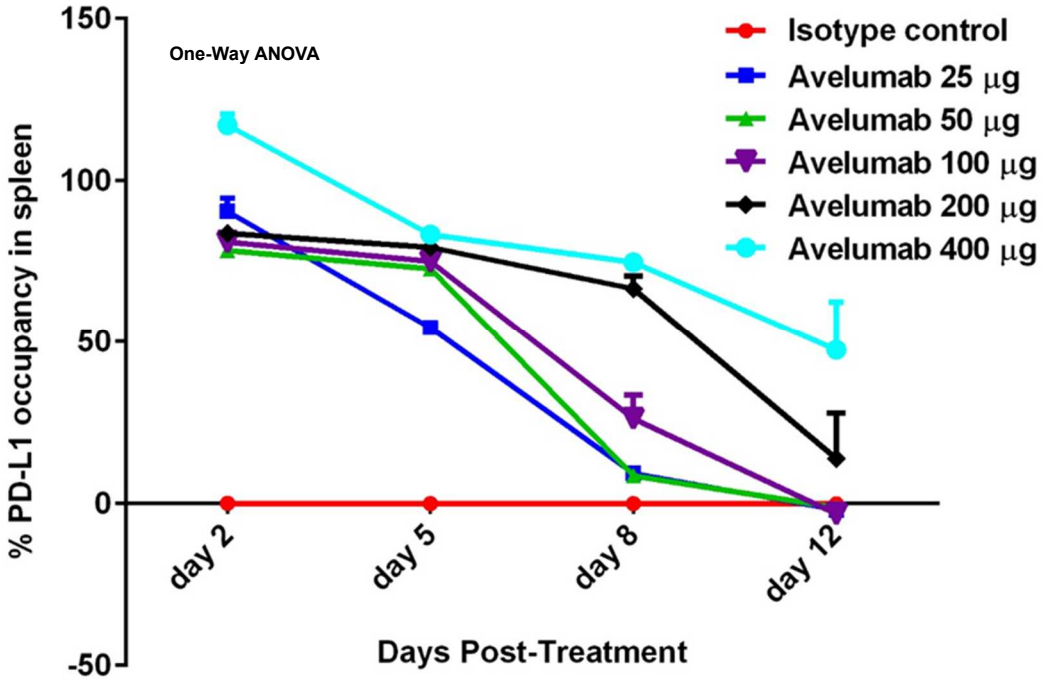
2.2.4　C57BL/6 非担癌マウスでの PD-L1 占有率（IONC0308[redacted]RT）

添付資料番号：4.2.1.1.10

アベルマブの薬物動態（pharmacokinetic、PK）モデリング及び臨床用量の予測を目的として、非担癌マウスでの PK データを得るため、本試験を実施した（モジュール 2.6.4.3.1.2 参照）。

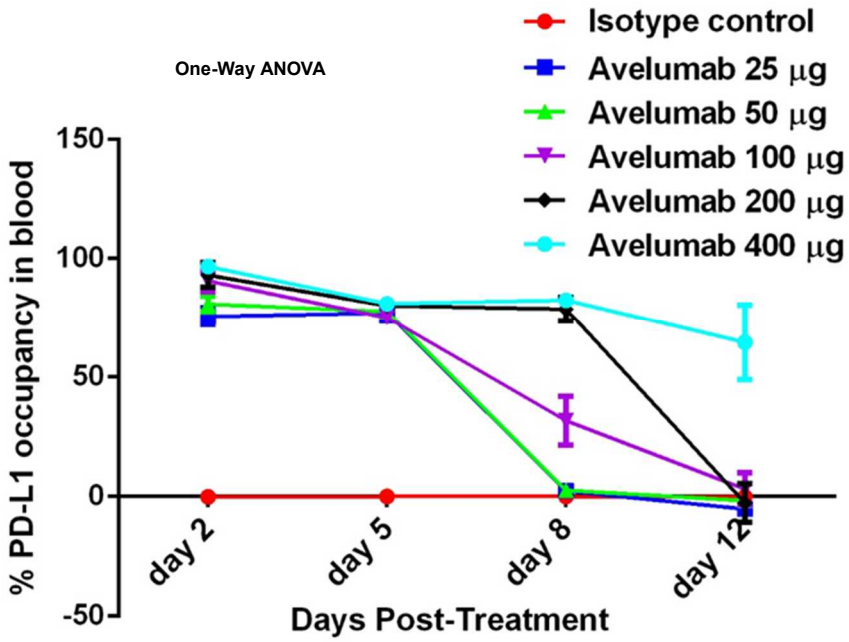
アベルマブを 25、50、100、200 又は 400 μg の用量で C57BL/6 マウス（非担癌）に単回静脈内投与した。対照群には不活性アイソタイプ抗体 400 μg を同様に投与した。FACS 分析により、末梢血及び脾細胞の PD-L1 占有率を算出した。その結果、アベルマブは、いずれの用量でも、試験 2 日及び 5 日に、末梢血及び脾細胞に対して同程度の PD-L1 占有率（75%～100%）を示した（図 2.6.2 - 19, 図 2.6.2 - 20）。試験 8 日及び 12 日には PD-L1 占有率の用量依存的な低下が認められた。試験 12 日には最高用量の 400 μg のみが、依然 50%前後の高い標的占有率を示した。

図 2.6.2 - 19　脾細胞上の PD-L1 占有率



データは平均±標準誤差（n=5）を示す。

図 2.6.2 - 20　血中の PD-L1 占有率



データは平均±標準誤差（n=5）を示す。

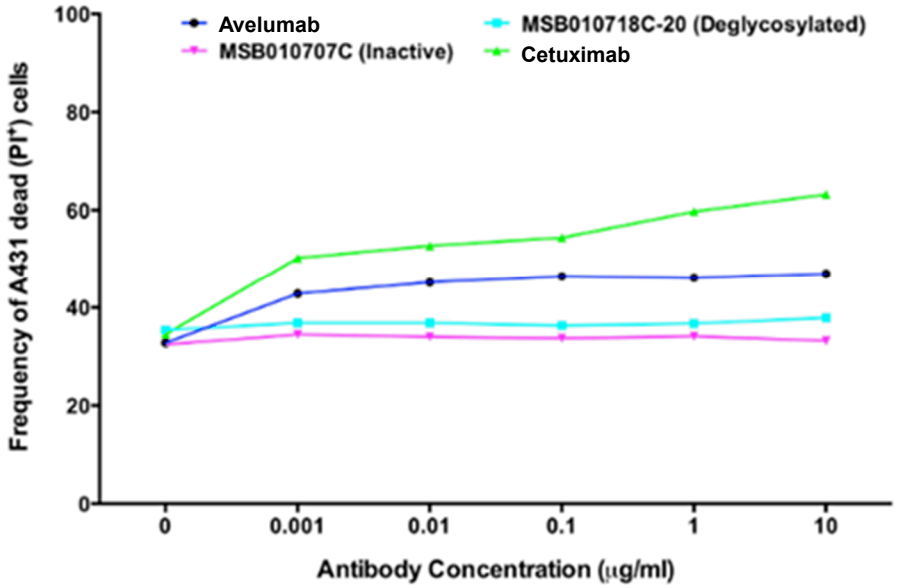
3　副次的薬理試験

3.1　ヒト自己免疫細胞に対する ADCC 活性（IONC0929[redacted]SM）

添付資料番号：4.2.1.2.1

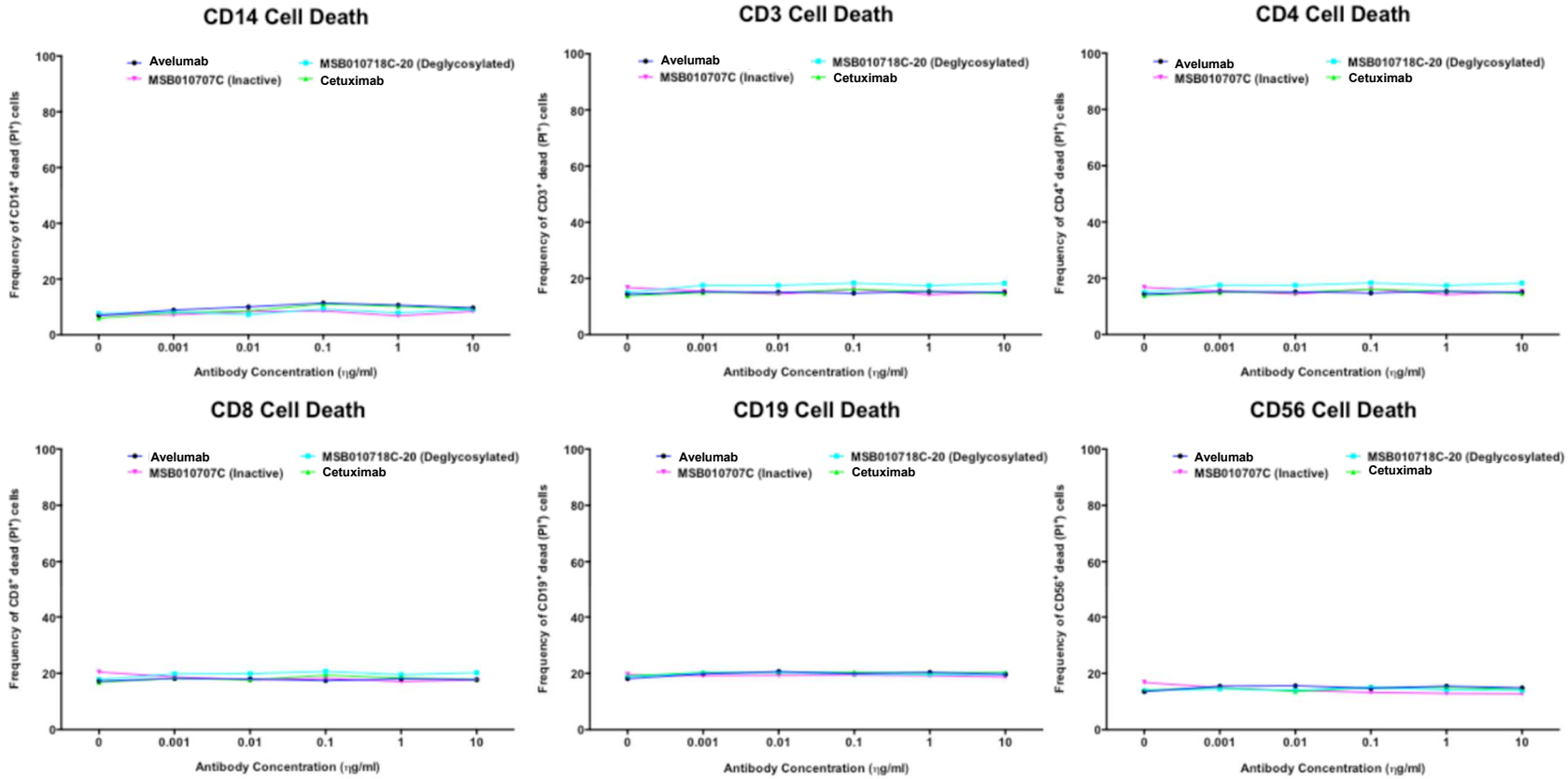
アベルマブのヒト PBMC 中の主な免疫細胞サブセットに対する ADCC 誘導能を評価するため、フローサイトメトリー法を用いた in vitro 試験を実施した。実験条件をなるべく生理的環境に近づけるため、試験には特定の免疫細胞集団を単離又は補填していないヒト PBMC を用いた。アベルマブの癌細胞に対する ADCC 誘導能と免疫細胞に対する ADCC 誘導能を比較するため、PBMC を PD-L1^{+}ヒト上皮様細胞癌由来細胞株 A431 と 20:1 の存在比で共培養した。A431 腫瘍細胞との共培養に先立ち、PBMC を抗 CD3 アゴニスト抗体で刺激し、免疫細胞上の PD-L1 発現を誘導した。PBMC 及び A431 腫瘍細胞をアベルマブ又は対照抗体の連続希釈液（0 µg/mL から 10 µg/mL）で処理し、共培養した。A431 腫瘍細胞及び主な免疫細胞サブセットにおける ADCC 誘発性の細胞死を、ヨウ化プロピジウムの細胞内取込みを指標として FACS を用いて測定した。陰性対照としては、PD-L1 結合能を欠くアベルマブの不活化アイソタイプ抗体（MSB010707C）を用いた。もうひとつの陰性対照としては、エフェクター細胞の Fcγ 受容体への結合を除去する目的で脱グリコシル化したアベルマブ（MSB010718C-20）を使用した。また、A431 腫瘍細胞に対して ADCC を誘導することが知られる抗 EGFR 抗体セツキシマブを、陽性対照とした。その結果、アベルマブは、A431 腫瘍細胞に対して、2 つの陰性対照抗体と比べて明らかな細胞死の増加を誘導した（図 2.6.2 - 21）。一方、陽性対照のセツキシマブは、A431 腫瘍細胞に対して期待された殺細胞効果を示し、その効果はアベルマブより強かった。しかしながら、アベルマブは、前刺激により PD-L1 を発現させた免疫細胞については、アベルマブの抗腫瘍効果発現に重要な CD8^{+}細胞傷害性 T 細胞を含むいずれのサブセットに対しても、細胞死を誘導しなかった（図 2.6.2 - 22）。したがって、アベルマブは、免疫細胞を巻き添えに傷害することなく、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。

図 2.6.2 - 21　PBMC との共培養下での A431 腫瘍細胞の細胞死



データは 7 名の健常人ドナー由来 PBMC での平均値を示す。
PI：ヨウ化プロピジウム

図 2.6.2 - 22　A431 腫瘍細胞と PBMC の共培養下での各免疫細胞サブセットの細胞死



データは 7 名の健常人ドナー由来 PBMC での平均値を示す。
PI：ヨウ化プロピジウム

4　安全性薬理試験

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、ICHI）S6（R1）及び S9 ガイドラインに基づき、アベルマブの心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対する影響の安全性薬理学的評価は、カニクイザルを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 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 参照）。

4.1　サル 4 週間反復静脈内投与毒性試験（RF2710）での安全性薬理学的評価

添付資料番号：4.2.3.2.4

アベルマブの 4 週間反復静脈内投与毒性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（good laboratory practice、GLP）適用下で実施した（モジュール 2.6.6.3.4 及び 2.6.7.7A 参照）。しかしながら、安全性薬理学的評価を含む一部の検査については、GLP 非適用下で行い、社内の標準操作手順書に従って実施した。安全性薬理学的評価には、雌雄各 4 匹（対照群とアベルマブ 140 mg/kg 群の各 2 匹/性）、計 8 匹のカニクイザルを用いた。各動物には、溶媒又は 140 mg/kg のアベルマブを週 1 回、約 1.5 時間かけて点滴静脈内投与した。試験 8 日（2 回目の投与日）及び 29 日（5 回目の投与日）の投与前及び投与開始後約 2.5 時間に、各動物の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］及び呼吸数を麻酔下で測定した。アベルマブの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）法にて実施した。観察は、試験 8 日及び 29 日の投与前に 2 回、投与開始後約 2 時間及び 24 時間に各 1 回行い、結果を記録した。また、直腸温の測定を、投与開始前に 1 回、試験 8 日及び 29 日の投与前及び投与開始後約 2.5 時間の動物の麻酔直前に実施した。

その結果、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、アベルマブ投与による影響は認められなかった。

4.2　サル 13 週間反復静脈内投与毒性試験（RF4990）での安全性薬理学的評価

添付資料番号：4.2.3.2.5

アベルマブの 13 週間反復静脈内投与毒性試験の一部として安全性薬理学的評価を GLP 適用下で実施したモジュール 2.6.6.3.5 及び 2.6.7.7B 参照）。評価は対照群及びアベルマブ 140 mg/kg 投与群の各群雌雄各 5 匹で実施した。各動物には、溶媒又は 140 mg/kg のアベルマブを週 1 回、約 1.5 時間かけて点滴静脈内投与した。試験 8 日（2 回目の投与日）、29 日（5 回目の投与日）及び 85 日（13 回目の投与日）の投与前及び投与開始後約 1.5 時間に、各動物の心拍数、ECG、呼吸数及び直腸温を麻酔下で測定した。同じ日の投与開始後 3.5 時間及び 24 時間に、動物を無麻酔非拘束下で、FOB 法（4.1 参照）による中枢神経系機能の評価を実施した。

その結果、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、アベルマブ投与による影響は認められなかった。

5　薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6　考察及び結論

アベルマブによるメルケル細胞癌の治療根拠は、臨床試験の概括評価の項に示した（モジュール 2.5.1.3.4 参照）。効力を裏付ける試験により、アベルマブは in vitro で T 細胞活性化を増強し、in vivo で PD-L1 発現腫瘍の増殖を抑制することが示された。PD-L1 中和によって抗腫瘍 T 細胞の免疫抑制状態が解除されるという仮説に一致する所見として、アベルマブの in vivo 抗腫瘍効果は主に $CD8^+$ T 細胞によって媒介されることが示された。これは、in vivo で $CD8^+$ T 細胞を枯渇させただけで抗腫瘍効果が消失したことからも明らかである。また、アベルマブは、PD-L1 発現腫瘍細胞に対して in vitro で ADCC を誘導し、in vivo で ADCC 誘導能を消失させた結果、抗腫瘍効果が減弱することが示された。このことから、ADCC は、アベルマブの抗腫瘍効果の副次的作用機序と考えられた。

アベルマブの免疫学的活性の特徴を更に把握するため、in vivo 効力を裏付ける試験の中で、免疫表現型解析を行った。FACS を用いた T 細胞サブセットの免疫表現型解析の結果、アベルマブ投与により、$CD8^+PD\text{-}1^+$T 細胞の割合が増加することが示された。活性化 T 細胞では、細胞表面の PD-1 発現が増加しているため、PD-L1 に対して感受性が高まり、アポトーシスが誘導される。しかし、アベルマブを投与すると、PD-L1 を介した活性化 T 細胞のアポトーシスが効果的に阻害されるため、$CD8^+PD\text{-}1^+$T 細胞が蓄積すると考えられる。アベルマブ投与により、また、$CD8^+T_{EM}$ の割合が増加することも示された。抗腫瘍 $CD8^+$T 細胞は、抑制性の PD-1 シグナル伝達が阻害されることによって活性化し、細胞傷害能が高いエフェクター段階に移行すると推測される。これらの活性化 T 細胞の一部が、更に T_{EM} 細胞に分化する。T_{EM} は、同種の抗原に再び曝露されたとき、非常に効果的な免疫応答を速やかに引き起こすことができる。アベルマブ投与に対する応答として $CD8^+PD\text{-}1^+$ T 細胞及び $CD8^+T_{EM}$ 細胞の増加が認められたことから、これらが臨床現場で使用する意義のある薬力学的バイオマーカーとなる可能性がある。T 細胞応答を測定した ELISPOT 分析やペンタマー分析も臨床で広く使用されている。そのため、アベルマブを投与した患者では、免疫表現型の変化に加え、可能な場合は腫瘍抗原特異的応答を測定することが有益と考えられる。

安全性薬理学的評価では、カニクイザルに 140 mg/kg のアベルマブを週 1 回、4 週間及び 13 週間投与しても、心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対する影響は認められなかった。

要約すると、非臨床薬理試験の結果から、アベルマブは、in vivo で腫瘍増殖を抑制することが示された。また、アベルマブは、安全性薬理学的懸念を生じることなく使用できる、PD-L1 を標的とする癌免疫療法であることが裏付けられた。したがって、アベルマブは、腫瘍微小環境で抗腫瘍 $CD8^+$ T 細胞の PD-L1 を介した免疫抑制状態を解除することにより、癌患者に大きな臨床効果をもたらすことが期待される。

7　図表

図表は本文中に記載した。

8　参考文献

Ascierto PA, Simeone E, Sznol M, et al. Clinical Experience With Anti-CD137 and Anti-PD1 Therapeutic Antibodies. Semin Oncol 2010;37:508-16.

Benjamin RJ, Waldman H. Induction of Tolerance by Monoclonal Antibody Therapy. Nature 1986;320:449-51.

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.

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. N Engl Med 2012;366(26):2455-65.

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

Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-Associated B7-H1 Promotes T-Cell Apoptosis: A Potential Mechanism of Immune Evasion. Nat Med 2002;8(8):793-800.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. Immunity 2004;21:137-48.

Fife BT, Pauken KE. The Role of the PD-1 Pathway in Autoimmunity and Peripheral Tolerance. Ann NY Acad Sci 2011;1217:45-59.

Hodi FS, ODay SJ, McDermott DF, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. New Engl J Med 2010;363(8):711-23.

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

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) Pathway to Activate Anti-tumor Immunity. Curr Opin Immunol 2012;24:207-12.

Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ, et al. Superantigens: The Good, the Bad, and the Ugly. Exp Biol Med 2001;226:164-76.

Wang C, Thudium KB, Han M, et al In Vitro Characterization of the Anti-PD-1 Antibody Nivolumab, BMS-936558, and In Vivo Toxicology in Non-Human Primates. Cancer Immunol Res 2014;2(9):846-56.

Wilm C, Biomarker Study Report TI10-005-723-EF-CW. Merck KGaA, Darmstadt, 2010, 1-11

Yang JC, Perry-Lalley D. The Envelope Protein of an Endogenous Murine Retrovirus Is a Tumor-Associated T-Cell Antigen for Multiple Murine Tumors. J Immunother 2000;23(2):177-83.

2.6.3 薬理試験の概要表

目次

1　薬理試験：　一覧表 2
2　効力を裏付ける試験 5
3　副次的薬理試験 9
4　安全性薬理試験 10
5　薬力学的薬物相互作用試験 11

1　薬理試験：　一覧表

Test Article: avelumab

Type of Study / Study Title	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number / Reference	Location CTD
Primary Pharmacodynamics – in vitro					
Affinity and specificity using surface plasmon resonance measurement	Binding to PD-L1 and other B7 family members	N.A.	ESRI	PEAT[redacted]1213VS	4.2.1.1.1
Kinetic binding analysis to PD-L1 from human, cynomolgus monkey, mouse, rat, rabbit, and dog using surface plasmon resonance measurement	Recombinant PD-L1 proteins	N.A.	ESRI	PEAT1805[redacted]CJW	4.2.1.1.2
In vitro ADCC activity against human tumor cells	Human PBMC in co-culture with human cancer cell lines (A549 or A431)	N.A.	ESRI	PEAT1805[redacted]AJW	4.2.1.1.3
In vitro CDC activity against human tumor cells	Human cancer cell lines (A549, A431, M21) treated in the presence of complete human complement	N.A.	ESRI	PEAT1805[redacted]BJW	4.2.1.1.4
Binding to human tumor cells by FACS	Human tumor cell lines (A431, A549, BxpC3, HCT116, M24, PC3mm2, U-87MG)	N.A.	ESRI	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
Binding to human primary PBMC stimulated with PHA by FACS	Human PBMCs	N.A.	ESRI	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
Dose-dependent binding activity against HEK293 cells engineered to express PD-L1 of human, murine, or cynomolgus monkey origin	Human PBMCs	N.A.	ESRI	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
Radioligand binding assay measuring competitive inhibition of the PD-L1/PD-1 interaction	Binding of radiolabeled PD-L1 to immobilized recombinant PD-1	N.A.	ESRI	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
FACS-based binding assay measuring competitive inhibition of soluble B7.1 binding to PD-L1 expressing cells	Binding of fluorescently-labeled soluble B7.1 protein to HEK293 cells expressing human PD-L1	N.A.	ESRI	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
T cell activation assay: Antigen-specific stimulation of OT-1 transgenic murine primary T cells	IFNγ production from CD8+ T cells isolated from OT-1 transgenic mice following co-culture with PD-L1 expressing EL4 antigen-presenting cells pulsed with OVA peptide	N.A.	ESRI	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5

1　薬理試験：　一覧表（つづき）

Test Article: avelumab

Type of Study / Study Title	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number / Reference	Location CTD
T cell activation assay: Super-antigen stimulation of human primary PBMC	IL-2 production from human PBMC stimulated with the super-antigen staphylococcus enterotoxin A	N.A.	ESRI	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
In vitro target occupancy	PD-L1 on CD3 T cells in human whole blood treated with various concentrations of avelumab was detected by FACS using biotinylated avelumab.	N.A.	ESRI	IONC1909[redacted]SM	4.2.1.1.6
Primary Pharmacodynamics – in vivo					
Dose-dependent in vivo anti-tumor activity	Mouse colon carcinoma MC38 subcutaneous tumor model; FACS-based immunophenotyping	iv	ESRI	IONC2004[redacted]AKH (TI[redacted]-050, TI[redacted]-070)	4.2.1.1.7
In vivo role of CD8+ cytotoxic T cells in anti-tumor effect	Mouse colon carcinoma MC38 subcutaneous tumor model in which CD8+ T cells were systemically depleted	ip	ESRI	IONC1103[redacted]RT (TI[redacted]-039)	4.2.1.1.8
In vivo contribution of ADCC to anti-tumor activity	Mouse colon carcinoma MC38 subcutaneous tumor model. Mice were treated with an ADCC-incompetent, deglycosylated preparation of avelumab or NK cells were systemically depleted	ip	ESRI	IONC0806[redacted]RT (TI[redacted]-017)	4.2.1.1.9
In vivo target occupancy in non-tumor-bearing mice	Mouse C57BL/6, non-tumor bearing	iv	ESRI	IONC0308[redacted]RT	4.2.1.1.10
Secondary Pharmacodynamics					
In vitro ADCC activity against autologous human immune cells	Human PBMC in co-culture with human A431 cancer cell line	N.A.	ESRI	IONC0929[redacted]SM	4.2.1.2.1

1　薬理試験：　一覧表（つづき）

Test Article: avelumab

Type of Study / Study Title	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number / Reference	Location CTD
Safety Pharmacology					
Cardiovascular, respiratory and central nervous system in vivo (Part of the 4-week repeat-dose toxicology study RF2710)	Cynomolgus monkey	iv	Istituto di Ricerche Biomediche RBM Italy	RF2710	4.2.3.2.4
Cardiovascular system in vivo (Part of the 13-week repeat-dose toxicology study RF4990): heart rate, arterial blood pressure, ECG (including QT interval)	Cynomolgus monkey	iv	Istituto di Ricerche Biomediche RBM Italy	RF4990	4.2.3.2.5
Respiratory System (Part of the 13-week repeat-dose toxicology study RF4990): Respiratory rate	Cynomolgus monkey	iv	Istituto di Ricerche Biomediche RBM Italy	RF4990	4.2.3.2.5
Central Nervous System (Part of the 13-week repeat-dose toxicology study RF4990): FOB parameters, rectal temperature	Cynomolgus monkey	iv	Istituto di Ricerche Biomediche RBM Italy	RF4990	4.2.3.2.5
Pharmacodynamic Drug Interactions					
None					

Abbreviations:
iv = intravenous　　ip = intraperitoneal
ESRI = EMD Serono Research Institute, Inc. USA
PBMC = peripheral blood mononuclear cells
PD-1 = programmed death 1
IL = interleukin
FOB = Functional observational battery
ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
CDC = complement-dependent cytotoxicitiy
FACS = fluorescence-activated cell sorting
PD-L1 = programmed death ligand 1
NK = natural killer
N.A. = not applicable
OVA = chicken ovalbumin
PHA = phytohemagglutinin
IFN = interferon
ECG = electrocardiogram

2　効力を裏付ける試験

Test Article: avelumab

Test system	Species /strain	Method of admin.	Doses (mg/kg)	Schedule	Results	Study number	Location CTD
Primary Pharmacodynamics – in vitro							
Surface plasmon resonance binding measurements to PD-L1 and various other B7 family members (i.e., PDL2, B7.1, B7.2, B7- H2, B7-H3)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Binding was selective for PD-L1 vs. the other B7 family members tested.	PEAT[redacted]1213VS	4.2.1.1.1
Surface plasmon resonance binding to measure affinity for PD-L1 derived from human, cynomolgus monkey, dog, rat, rabbit and mouse	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	High affinity for human, cynomolgus monkey, and mouse. Lower affinity for rat, rabbit, and dog.	PEAT1805[redacted]CJW	4.2.1.1.2
ADCC in vitro assay against human A549 and A431 tumor cell lines with or without IFNγ pre-stimulation.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Avelumab is ADCC competent. Induction of PD-L1 by IFNγ increased lysis of A549 cells. Effectors with low affinity for FcγRIIIa did not show ADCC.	PEAT1805[redacted]AJW	4.2.1.1.3
CDC in vitro assay against human A549, A431, and M21 tumor cell lines.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Avelumab is not capable of mediating CDC against human tumor cell lines.	PEAT1805[redacted]BJW	4.2.1.1.4

2　効力を裏付ける試験（つづき）

Test Article: avelumab

Test system	Species /strain	Method of admin.	Doses (mg/kg)	Schedule	Results	Study number	Location CTD
FACS-based assay to detect binding to PD-L1 expressing human tumor cell lines (A431, A549, BxPC3, HCT116, M24, PC3mm2, U-87 MG) with or without IFNγ treatment	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Binding was detected on all tested cell lines. IFNγ pre-treatment increased PD-L1 expression on all tested cell lines.	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
FACS based assay to detect binding to human PBMC stimulated with PHA.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Binding was detected on PBMC.	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
FACS-based assay to measure dose-dependent binding to HEK293 cells engineered to express human PD-L1, murine PD-L1 or cynomolgus monkey PD-L1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Dose-dependent binding was observed to the PD-L1 of all three tested species. EC50 of 0.30 nM against human. EC50 of 0.34 nM against murine. EC50 of 0.94 nM against cynomolgus monkey.	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
Radioligand Competition assay measuring the ability of avelumab to block the binding of radiolabeled PD-L1　to immobilized PD-1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	The PD-L1/PD-1 interaction was potently inhibited with an IC50 of 0.071 nM.	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5

2　効力を裏付ける試験（つづき）

Test Article: avelumab

Test system	Species /strain	Method of admin.	Doses (mg/kg)	Schedule	Results	Study number	Location CTD
FACS-based binding assay measuring competitive inhibition of soluble B7.1 binding to PD-L1 expressing cells	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	The PD-L1/B7.1 interaction was potently inhibited with an IC50 of 0.2±0.004 nM.	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
T cell activation assay: Antigen-specific stimulation of OT-1 transgenic murine primary T cells	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	T cell activation was significantly enhanced with an EC50 of 0.28 nM.	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
T cell activation assay: Super-antigen stimulation of human primary PBMC in the presence of various concentrations of avelumab	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	T cell activation was significantly enhanced with an EC50 of 0.08 nM.	IONC[redacted]04051DZ	4.2.1.1.5
In vitro target occupancy: PD-L1 on CD3 T cells in human whole blood treated with various concentrations of avelumab was detected by FACS using biotinylated avelumab	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	EC50 for target occupancy by avelumab was 0.122 µg/mL+/- 0.042 µg/mL.	IONC1909[redacted]SM	4.2.1.1.6

2　効力を裏付ける試験（つづき）

Test Article: avelumab

Test system	Species /strain	Method of admin.	Doses (mg/kg)	Schedule	Results	Study number	Location CTD
Primary Pharmacodynamics – in vivo							
Mouse colon carcinoma MC38 subcutaneous tumor model	Mouse	iv	Avelumab 100, 200, 400 or 800 µg/mouse	Day 0, 3 and 6	Dose-dependent in vivo anti-tumor activity (TI10-050).	IONC2004[redacted]AKH	4.2.1.1.7
Mouse colon carcinoma MC38 subcutaneous tumor model	Mouse	iv	Avelumab 100, 200, 400 or 800 µg/mouse	Day 0, 3 and 6	Dose-dependent in vivo anti-tumor activity (TI10-070).	IONC2004[redacted]AKH	4.2.1.1.7
Mouse colon carcinoma MC38 subcutaneous tumor model	Mouse	ip ip	MSB0010294H 400 µg/mouse Anti-CD8 Ab	Day 0, 3 and 6 Days 0, 5, 10, 15 and 20	Depletion of CD8+ T cells completely abrogated the anti-tumor efficacy.	IONC1103[redacted]RT	4.2.1.1.8
Mouse colon carcinoma MC38 subcutaneous tumor model	Mouse	ip ip	Avelumab (glycosylated and deglycosylated forms) 200 or 400 µg/mouse Anti-ASGM1 Ab	Day 0, 3 and 6 Day -1, 0, 7, 14 and 21	In vivo contribution of ADCC to anti-tumor activity was shown where enzymatically deglycosylated antibody showed significantly reduced anti-tumor activity. Similar reduction in efficacy observed following systemic NK cell depletion.	IONC0806[redacted]RT	4.2.1.1.9
Mouse C57BL/6, non-tumor- earing	Mouse	iv	Avelumab 25, 50, 100, 200, 400 µg/mouse	Single bolus dose	In vivo target occupancy in non-tumor-bearing mice	IONC0308[redacted]RT	4.2.1.1.10

Abbreviations:
iv = intravenous　　ip = intraperitoneal　　ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
CDC = complement-dependent cytotoxicitiy　　PBMC = peripheral blood mononuclear cells
FACS = fluorescence-activated cell sorting　　PHA = phytohemagglutinin
PD-1 = programmed death 1　　PD-L1 = programmed death ligand 1
IFN = interferon　　NK = natural killer
Ab = antibody　　N.A. = not applicable

3　副次的薬理試験

Test Article: avelumab

Test system	Species/strain	Method of admin.	Concentration or dose	Schedule	Results	Study number	Location CTD
In vitro ADCC activity against autologous human immune cells - Human PBMC in co-culture with human A431 cancer cell line	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Avelumab induced detectable ADCC-mediated killing against A431 tumor cells, but did not induce killing of immune cells	IONC0929[redacted]SM	4.2.1.2

Abbreviations:
ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
N.A. = not applicable
PBMC = peripheral blood mononuclear cells

4　安全性薬理試験

Test Article: avelumab

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin.	Concentration or dose	Gender and No. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number	Location CTD
Cardiovascular respiratory and central nervous systems	Monkey, Cynomolgus	iv (once weekly)	0, 20, 60 or 140 mg/kg	Control & high dose: 2 males / 2 females (low & mid dose: not evaluated)	All parameters were unaffected by treatment at high dose of 140 mg/kg.	Yes [a]	RF2710	4.2.3.2.4
Cardiovascular, respiratory and central nervous systems	Monkey, Cynomolgus	iv (once weekly)	0, 20, 60 or 140 mg/kg	Control & high dose: 5 males / 5 females (low & mid dose: not evaluated)	All parameters were unaffected by treatment at high dose of 140 mg/kg.	Yes [b]	RF4990	4.2.3.2.5

a The safety pharmacology assessment, bioanalytical measurements, multi analyte profiling, blood immunophenotyping, toxicokinetics and immunogenicity data analysis were not conducted in GLP compliance, but in accordance to the Merck KGaA-Quality Management System.
b The blood immunophenotyping, was not conducted in GLP compliance but in accordance to the Merck KGaA-Quality Management System.
Abbreviations:
GLP = Good Laboratory Practice　　iv = intravenous

5　薬力学的薬物相互作用試験

Test Article: avelumab

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。