テセントリク点滴静注1200 mg
（アテゾリズマブ（遺伝子組換え））
［非小細胞肺癌］

第2部　（モジュール2）：CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ADCC	antibody-dependent cell cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
FcγR	Fcγ receptor	Fcγ 受容体
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
PD-1	programmed death-1	（PD-L1, PD-L2の受容体）
PD-L1	programmed death-ligand 1	（PD-1, B7-1のリガンド）
PD-L2	programmed death-ligand 2	（PD-1のリガンド）

目次

頁
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 アテゾリズマブの物理化学的性質と構造 4
2.6.1.2 PD-L1 を標的とする科学的根拠 4
2.6.1.3 本薬の作用機序 5
2.6.1.4 臨床適応症 5
2.6.1.5 参考文献 5

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 アテゾリズマブの物理化学的性質と構造

アテゾリズマブ（遺伝子組換え）（以下，本薬）は，programmed death-ligand 1（PD-L1, B7-H1, CD274）を標的とした，ヒト IgG1のフレームワーク配列をベースとするヒト化モノクローナル抗体である。本薬は，ヒト抗体ファージディスプレイライブラリからヒト PD-L1の細胞外ドメインに対する高親和性クローンを選抜し，単離した相補性決定領域をヒト IgG1に由来するフレームワーク及び定常領域と組み合わせることで作製した[1)]。本薬は，各重鎖の CH2ドメインにある298位のアミノ酸残基がアスパラギンからアラニンに置換されているため，N 結合型糖鎖を欠き，Fcγ 受容体（Fcγ receptor; FcγR）に対する結合性をほとんど示さない。ヒト IgG1抗体は NK 細胞やマクロファージ等の Fcγ 受容体に結合し，antibody-dependent cell cytotoxicity（ADCC）活性を示すが[2)]，アミノ酸残基の置換により Fcγ 受容体（特に FcγRIIIA）への結合性を低下させた場合には，ADCC 活性は減弱することが知られている[3)]。そのため，本薬は Fcγ 受容体を介したエフェクター活性化機能を発揮することなく，PD-L1発現免疫細胞を傷害しないと考えられる。

2.6.1.2 PD-L1を標的とする科学的根拠

免疫系は，悪性腫瘍や自己免疫疾患等において，重要な役割を演じている。免疫の活性化又は抑制に関与する分子は，免疫チェックポイント分子と呼ばれ，近年，治療標的として注目されている[4),5)]。本薬の標的である PD-L1は，T 細胞活性化を制御する免疫チェックポイント分子の一つである。

PD-L1は，樹状細胞やマクロファージ等の抗原提示細胞に加えて，T 細胞や B 細胞等，ほとんどの免疫細胞で発現がみられる[6)]。また，全身の様々な臓器の実質細胞や血管内皮細胞等の非実質細胞でも発現がみられ，ウイルス感染等で炎症が起こると，その発現レベルは上昇する。

PD-L1の発現は多くのヒト腫瘍でもみられ[6)]，肺癌，腎癌，卵巣癌，悪性黒色腫等では，PD-L1の発現レベルと予後不良との関連性を示唆する報告がされている[7)-10)]。Zhang らは，外科手術対象となる肺腺癌患者143症例を解析し，PD-L1陽性例（70症例）は陰性例（73症例）と比較して，relapse-free survival 及び overall survival が有意に短いことを報告している[7)]。

悪性腫瘍や慢性の感染症等，持続的な刺激によって活性化された T 細胞上には，PD-L1の受容体である programmed death-1（PD-1, CD279）の発現が誘導される。この PD-1と PD-L1が結合することにより，T 細胞の増殖，インターフェロン γ 等のサイトカイン産生及び細胞傷害活性等，T 細胞の機能が抑制される[11),12)]。このように腫瘍細胞は PD-L1を発現することにより，抗腫瘍免疫応答を抑制し，免疫系からの攻撃を回避している[13)]。したがって，腫瘍特異的 T 細胞免疫を再活性化する方法として，PD-L1/PD-1経路の遮断に期待が寄せられている。

モノクローナル抗体を用いて PD-L1又は PD-1機能を阻害した実験では，複数のマウス腫瘍モデルにおいて強力な抗腫瘍活性が認められた[14),15)]。これらのデータから，腫瘍微小環境には腫瘍特異的 T 細胞が不活化又は疲弊した状態で存在しており，PD-L1/PD-1経路を阻害することで腫瘍特異的 T 細胞応答を再活性化できることが推察される。以上の知見から，PD-L1/PD-1経路の遮断は，悪性腫瘍に対する新たな治療標的として有望であると考えられる。

また，PD-L1を標的とする本薬は，PD-1のもう一つのリガンドである programmed death-ligand 2（PD-L2, B7-DC, CD273）には結合しないため，PD-L2/PD-1経路に由来する Th2型免疫応答の抑制を維持できると考えられる[1),16),17)]。一方，PD-L1は，T 細胞上の B7-1（CD80）と結合することにより，T 細胞の活性化とサイトカイン産生を抑制することが知られているが[18)]，本薬は，PD-L1/PD-1経路と PD-L1/B7-1経路の両経路に由来する抑制性シグナルを遮断できるため，T 細胞の再活性化が促進され，強い抗腫瘍免疫応答の獲得が期待できる[16)]。

2.6.1.3 本薬の作用機序

本薬は，免疫細胞又は腫瘍細胞上の PD-L1と結合することにより，PD-L1/PD-1経路及び PD-L1/B7-1（CD80）経路に由来する抑制性シグナルを遮断し，T 細胞の再活性化を促進する薬剤である。すなわち T 細胞の活性化とそれに伴う抗腫瘍免疫応答の誘導により，抗腫瘍効果が発揮されるものと考えられる[19)]。

2.6.1.4 臨床適応症

本薬の効能・効果，用法・用量等の詳細については，M2.2に記載した。

2.6.1.5 参考文献

1) Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature 2014;515:563-7.
2) Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. Nat Rev Immunol 2008;8:34-47.
3) Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. J Biol Chem 2001;276:6591-604.
4) Pedoeem A, Azoulay-Alfaguter I, Strazza M, Silverman GJ, Mor A. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. Clin Immunol 2014;153:145-52.
5) Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. J Clin Oncol 2015;33:1974-82.
6) Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol 2007;19:813-24.
7) Zhang Y, Wang L, Li Y, Pan Y, Wang R, Hu H, et al. Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. Onco Targets Ther 2014;7:567-73.
8) Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. Cancer Res 2006;66:3381-5.
9) Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating $CD8^+$ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:3360-5.
10) Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. Cancer 2010;116:1757-66.
11) Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. Cancer Immunol Immunother 2005;54:307-14.
12) Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol 2008;26:677-704.
13) Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. Cancer Immunol Immunother 2007;56:739-45.
14) Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:12293-7.

15) Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. Cancer Res 2003;63:6501-5.
16) Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: next-generation immunotherapy–inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. Clin Cancer Res 2012;18:6580-7.
17) Rozali EN, Hato SV, Robinson BW, Lake RA, Lesterhuis WJ. Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. Clin Dev Immunol 2012: Article ID 656340.
18) Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. Immunity 2007;27:111-22.
19) Cha E, Wallin J, Kowanetz M. PD-L1 inhibition with MPDL3280A for solid tumors. Semin Oncol 2015;42:484-7.

テセントリク点滴静注1200 mg
（アテゾリズマブ（遺伝子組換え））
［非小細胞肺癌］

第2部　（モジュール2）：CTD の概要（サマリー）

2.6.2 薬理試験の概要文

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
AUC	area under the fitted curve	近似曲線下面積
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣細胞
CR	complete response	完全奏効
D266A	amino acid substitution (aspartic acid to alanine) at position 266	266位のアミノ酸残基をアスパラギン酸からアラニンに置換
EC_{50}	50% effective concentration	50%有効濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	固相酵素免疫測定
FcγR	Fcγ receptor	Fcγ 受容体
Gp33	glycoprotein 33-41 peptide	（LCMV のエピトープペプチド）
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
IFN-γ	interferon-γ	インターフェロンγ
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
K_d	dissociation constant	解離定数
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス
LLC	Lewis Lung Carcinoma	ルイス肺癌
LME	linear mixed-effects	線形混合効果
N298A	amino acid substitution (asparagine to alanine) at position 298	298位のアミノ酸残基をアスパラギンからアラニンに置換
ND	not determined	未測定
OVA	ovalbumin	卵白アルブミン
PD-1	programmed death-1	（PD-L1, PD-L2の受容体）
PD-L1	programmed death-ligand 1	（PD-1, B7-1のリガンド）
PD-L2	programmed death-ligand 2	（PD-1のリガンド）
PR	partial response	部分奏効
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖阻害
TIW	three times per week	週3回
TNF-α	tumor necrosis factor-α	腫瘍壊死因子 α
TTP5X	time (in days) for animal to have tumor progress to 5-fold above starting volume	（試験開始時の腫瘍体積の5倍に到達するまでの日数）

目次

頁

2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.2.1 *In vitro* 試験 6
2.6.2.2.1.1 本薬及びキメラ抗体（PRO304397 及び PRO314483）の PD-L1 に対する *in vitro* 結合性 6
2.6.2.2.1.2 本薬及びキメラ抗体による B7-1 及び PD-1 と PD-L1 との結合に対する阻害活性 7
2.6.2.2.1.3 本薬の Fcγ 受容体との結合性 9
2.6.2.2.2 *In vivo* 試験（腫瘍移植モデル） 11
2.6.2.2.2.1 マウス結腸・直腸癌 MC38 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483 の抗腫瘍効果 11
2.6.2.2.2.2 マウス結腸・直腸癌 MC38.OVA 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483 の抗腫瘍効果 13
2.6.2.2.2.3 マウス結腸・直腸癌 CT26 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483 の抗腫瘍効果 15
2.6.2.2.2.4 マウス悪性黒色腫 Cloudman S91 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483 の抗腫瘍効果 17
2.6.2.2.2.5 マウス肺癌 Lewis Lung Carcinoma (LLC) 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483 の抗腫瘍効果 19
2.6.2.3 副次的薬理試験 21
2.6.2.3.1 LCMV 感染モデルにおける抗 PD-L1 抗体の薬効評価及び宿主反応・機序解析 21
2.6.2.4 安全性薬理試験 22
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 22
2.6.2.6 考察及び結論 22
2.6.2.7 図表 23
2.6.2.8 参考文献 23

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

アテゾリズマブ（遺伝子組換え）（以下，本薬又は MPDL3280A）は，programmed death-ligand 1 (PD-L1) を標的とした，ヒト化 IgG1モノクローナル抗体である[1)]。本薬の薬理学的活性を明らかにするため，種々の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。なお，非臨床薬理試験では本ヒト化抗体に加えて，その誘導体である二種類のヒト／マウスキメラ抗体も使用した（表 2.6.2.1-1）。

本薬のアイソタイプは IgG1であるが，1アミノ酸置換（N298A）を施すことにより，Fcγ 受容体（Fcγ receptor; FcγR）との結合性が低減するように改変されている。また，本薬はヒト抗体由来のフレームワーク配列を有するため，マウスを用いた *in vivo* 試験では，その誘導体であるヒト／マウスキメラ抗体 PRO304397及び PRO314483を使用した。これらのキメラ抗体は，マウス IgG2a のフレームワーク配列に，本薬由来の PD-L1結合配列（すなわち可変領域）を組み込んで作製した。PRO304397は，マウス Fcγ 受容体との結合を阻害することを目的として，Fc 領域に二つの遺伝子変異（D266A，N298A）を導入した。PRO314483は，Fc 領域の配列に変異はないものの，大腸菌（*Escherichia coli*）を用いて作製することにより，Fcγ 受容体と効果的に相互作用するために必要な N 結合型糖鎖を欠如させた。

表 2.6.2.1-1 非臨床薬理試験で使用した抗 PD-L1抗体の特徴

抗体	動物種	アイソタイプ	生産宿主	Fc 領域の変異	N 結合型糖鎖
本薬	ヒト	IgG1	CHO 細胞	N298A	無
PRO304397	ヒト/マウス	マウス IgG2a	CHO 細胞	D266A，N298A	無
PRO314483	ヒト/マウス	マウス IgG2a	大腸菌	なし	無

CHO：チャイニーズハムスター卵巣細胞，IgG：免疫グロブリン G

(1) *In vitro* 試験

本薬及びキメラ抗体の結合親和性（K_d: 解離定数）は，ヒト及びマウス PD-L1を発現させた293細胞を用いて，平衡結合試験により測定した。本薬の K_d 値は，ヒト PD-L1に対して0.433, 0.400 nmol/L（n = 2，以下同様），マウス PD-L1に対して0.134, 0.120 nmol/L であった。また，キメラ抗体 PRO304397の K_d 値は，ヒト PD-L1に対して0.374, 0.336 nmol/L，マウス PD-L1に対して0.147, 0.188 nmol/L であった。

本薬の結合活性（EC_{50}: 50%有効濃度）は，ヒト及びカニクイザルの活性化 T 細胞を用いたフローサイトメトリー法においても測定した。EC_{50}値は，ヒト PD-L1に対して0.395 ± 0.030 nmol/L（平均値 ± 標準偏差，以下同様），カニクイザル PD-L1に対して0.704 ± 0.084 nmol/L であった。また，マウス PD-L1を発現させた293細胞を用いて，本薬及びキメラ抗体（PRO304397及び PRO314483）の結合活性をフローサイトメトリー法にて測定した結果，ほぼ同等の EC_{50}値を示した。

本薬及びキメラ抗体による結合阻害活性（IC_{50}: 50%阻害濃度）は，ヒト及びマウスの programmed death-1 (PD-1)，PD-L1及び B7-1の組換え蛋白を用いて，競合 ELISA 法により評価した。本薬は，ヒト PD-L1とその標的受容体 PD-1（IC_{50}: 82.8 ± 40.3 pmol/L）及び B7-1（IC_{50}: 48.4 ± 25.9 pmol/L）との結合を阻害した。また，本薬は，マウス PD-L1とその標的受容体 PD-1（IC_{50}: 104 ± 38.7 pmol/L）及び B7-1（IC_{50}: 75.6 ± 14.8 pmol/L）との結合も阻害した。なお，キメラ抗体（PRO304397及び PRO314483）も，本薬と同程度の IC_{50}値を示した。

また，本薬と Fcγ 受容体との結合性については，6種類のヒト Fcγ 受容体（FcγRIA, FcγRIIA-R131, FcγRIIA-H131, FcγRIIB, FcγRIIIA-F158, FcγRIIIA-V158）を用いて，ELISA 法により評価した。本薬は Fcγ 受容体との結合性が低減するように改変されており，いずれの

Fcγ 受容体に対しても，ほとんど結合性を示さなかった。

以上の結果から，本薬は PD-L1との結合性を示すこと，PD-L1/PD-1又は PD-L1/B7-1経路を阻害する活性を有することが確認された。また，キメラ抗体を本薬のサロゲート抗体として使用することの妥当性も示された。

(2) *In vivo* 試験（腫瘍移植モデル）

キメラ抗体 PRO314483の *in vivo* 抗腫瘍活性は，5種類のマウス腫瘍移植モデルを用いて評価した。腫瘍の移植に際しては，それぞれの腫瘍由来の宿主と同系のマウスを使用した。

マウス結腸・直腸癌 MC38移植モデル（C57BL/6マウス）において，PRO314483（10 mg/kg，週3回 × 1-3週間）は，投与期間に応じた抗腫瘍効果を示し，腫瘍増殖阻害率（Tumor Growth Inhibition, TGI）は，1週間投与が76%，2週間投与が98%，3週間投与が103%であった。2週間及び3週間投与では，それぞれ完全奏効（CR）3例と部分奏効（PR）3例が認められ，全奏効率（CR + PR）は60%であった。TTP5X（試験開始時の腫瘍体積の5倍に到達するまでの日数）は，PRO314483投与により，コントロール群よりも1.4-3.0倍延長された。

MC38に卵白アルブミンを発現させて免疫原性を高めた MC38.OVA 移植モデル（C57BL/6マウス）において， PRO314483（10 mg/kg，週3回 × 1-3週間）は強い抗腫瘍効果を示し，すべてのマウスで腫瘍の完全退縮が認められた（CR rate: 100%）。

マウス結腸・直腸癌 CT26移植モデル（Balb/c マウス）において，PRO314483（10 mg/kg，週3回 × 3週間）は，TGI 92%，全奏効率（CR 1例，PR 1例）20%の抗腫瘍効果を示した。TTP5X は，PRO314483投与により，コントロール群よりも2.4倍延長された。

マウス悪性黒色腫 Cloudman S91移植モデル（DBA/2マウス）において，PRO314483（10 mg/kg，週3回 × 3週間）は，TGI 78%，全奏効率（PR 2例）20%の抗腫瘍効果を示した。TTP5X は，PRO314483投与により，コントロール群よりも1.75倍延長された。

マウス肺癌 Lewis Lung Carcinoma（LLC）移植モデル（C57BL/6マウス）において，PRO314483（10 mg/kg，週3回 × 3週間）は，抗腫瘍効果を示さなかった。TGI は-10%であり，全奏効率は0%であった。TTP5X の延長も認められなかった。

なお，すべてのモデルにおいて，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

(3) 副次的薬理試験（LCMV 感染モデル）

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（lymphocytic choriomeningitis virus; LCMV）感染モデルを用いて，キメラ抗体の *in vivo* 薬理作用を評価した。

LCMV CL-13株感染後14日目から， PRO314483（10 mg/kg，週3回 × 1-2週間）を投与すると，血中，肝臓，肺，腎臓のウイルス力価は有意に減少した。脾臓では，LCMV 由来 gp33ペプチドに反応する CD107a 発現あるいはインターフェロン γ（IFN-γ）産生 CD8陽性 T 細胞の割合が増加しており，LCMV 特異的な CD8陽性 T 細胞の機能増強が推察された。

(4) 安全性薬理試験

本薬については，独立した安全性薬理試験を実施していないが，ICH S6(R1)（バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価）及び ICH S7A（安全性薬理試験ガイドライン）に従い，中枢神経系，心血管系及び呼吸器系に及ぼす影響を，カニクイザル8週間静脈内及び皮下投与試験，並びに26週間静脈内投与試験で評価した。いずれの試験においても，異常は認められなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

2.6.2.2.1.1 本薬及びキメラ抗体（PRO304397及び PRO314483）の PD-L1に対する *in vitro* 結合性

（資料番号 4.2.1.1-1, 4.2.1.1-2）

ヒト及びマウス PD-L1を発現させた293細胞（ヒト胎児由来腎臓上皮細胞）と，放射性ラベルされた本薬及びキメラ抗体（PRO304397）を用いて，平衡結合試験により結合親和性（K_d）を測定した。算出された各 K_d 値を，表 2.6.2.2.1.1-1に示した。

本薬の K_d 値は，ヒト PD-L1に対して0.433, 0.400 nmol/L，マウス PD-L1に対して0.134, 0.120 nmol/L であった。また，キメラ抗体（PRO304397）も同様に高い親和性を示し，K_d 値は，ヒト PD-L1に対して0.374, 0.336 nmol/L，マウス PD-L1に対して0.147, 0.188 nmol/L であった。

表 2.6.2.2.1.1-1 293細胞に発現させたヒト及びマウス PD-L1に対する本薬及びキメラ抗体の結合性（平衡結合試験）

被験物質	結合親和性 K_d (nmol/L, n = 2)	
	293細胞に発現させたヒト PD-L1	293細胞に発現させたマウス PD-L1
本薬	0.433; 0.400	0.134; 0.120
PRO304397	0.374; 0.336	0.147; 0.188

K_d = dissociation constant.

[4.2.1.1-1 Table 3を改変]

ヒト及びカニクイザルの末梢血を採取し，赤血球成分を溶血除去することにより，白血球成分を分画した。次に，phorbol myristate acetate 及び ionomycin で刺激を加え，T 細胞上に PD-L1を発現させた。フローサイトメトリーを用いて，抗 CD4抗体と抗 CD8抗体によるマルチカラー染色で CD8陽性 T 細胞を同定し，本薬の結合性を測定した。また，マウス PD-L1を発現させた293細胞を用いて，本薬及びキメラ抗体（PRO304397及び PRO314483）の結合性を，同様に測定した。算出した各 EC_{50}値を，表 2.6.2.2.1.1-2に示した。

本薬の結合活性（EC_{50}）は，活性化 T 細胞上のヒト PD-L1に対して0.395 ± 0.030 nmol/L，カニクイザル PD-L1に対して0.704 ± 0.084 nmol/L であった。293細胞上のマウス PD-L1に対する結合活性は，本薬が0.519 ± 0.025 nmol/L，PRO304397が0.412 ± 0.071 nmol/L，PRO314483が0.433 ± 0.114 nmol/L であった。

以上の結果から，本薬は，ヒト，カニクイザル及びマウスの PD-L1に対して，高い親和性をもって結合することが示された。なお，臨床試験に用いた本薬について，平衡結合試験により結合親和性を測定した結果，Phase I 検体の K_d 値は0.228 ± 0.095 nmol/L，Phase III 検体の K_d 値は0.255 ± 0.018 nmol/L であった（4.2.1.1-2 Table 1）。

表 2.6.2.2.1.1-2 活性化 T 細胞又は293細胞上に発現した PD-L1に対する本薬及びキメラ抗体の結合性（フローサイトメトリー法）

被験物質	結合活性 EC_{50} (nmol/L, 平均値 ± 標準偏差) [a]		
	ヒト T 細胞上のヒト PD-L1	カニクイザル T 細胞上のカニクイザル PD-L1	293細胞に発現させたマウス PD-L1
本薬	0.395 ± 0.030	0.704 ± 0.084	0.519 ± 0.025
PRO304397	ND	ND	0.412 ± 0.071
PRO314483	ND	ND	0.433 ± 0.114

EC_{50} = 50% effective concentration; ND = not determined.

[a] ヒト及びカニクイザル PD-L1に対する試験： n = 4

マウス PD-L1に対する試験： n = 3 (本薬), n = 8 (PRO304397), n = 5 (PRO314483)

[4.2.1.1-1 Table 4 を改変]

2.6.2.2.1.2 本薬及びキメラ抗体による B7-1及び PD-1と PD-L1との結合に対する阻害活性

（資料番号 4.2.1.1-1）

PD-L1は，T 細胞上の PD-1又は B7-1と結合することにより，T 細胞に抑制性シグナルを伝達する。本薬及びキメラ抗体（PRO304397, PRO314483）が，これらの結合をどの程度阻害するのか明らかにするために，ヒト及びマウスの PD-1，PD-L1及び B7-1の組換え蛋白を用いた競合 ELISA 法により阻害活性を評価した。算出された各 IC_{50}値を，表 2.6.2.2.1.2-1に示した。また，結合阻害曲線の代表例を図 2.6.2.2.1.2-1及び図 2.6.2.2.1.2-2に示した。

本薬は，ヒト PD-L1とその標的受容体 PD-1（IC_{50}: 82.8 ± 40.3 pmol/L）及び B7-1（IC_{50}: 48.4 ± 25.9 pmol/L）との結合を阻害した。また，マウス PD-L1とその標的受容体 PD-1（IC_{50}: 104 ± 38.7 pmol/L）及び B7-1（IC_{50}: 75.6 ± 14.8 pmol/L）との結合も阻害したことから，PD-L1/B7-1及び PD-L1/PD-1の両方の相互作用を阻害することが明らかとなった。なお，PRO304397及び PRO314483も，ヒト及びマウスの PD-1又は B7-1との結合に対して，本薬と同程度の阻害活性を示した。

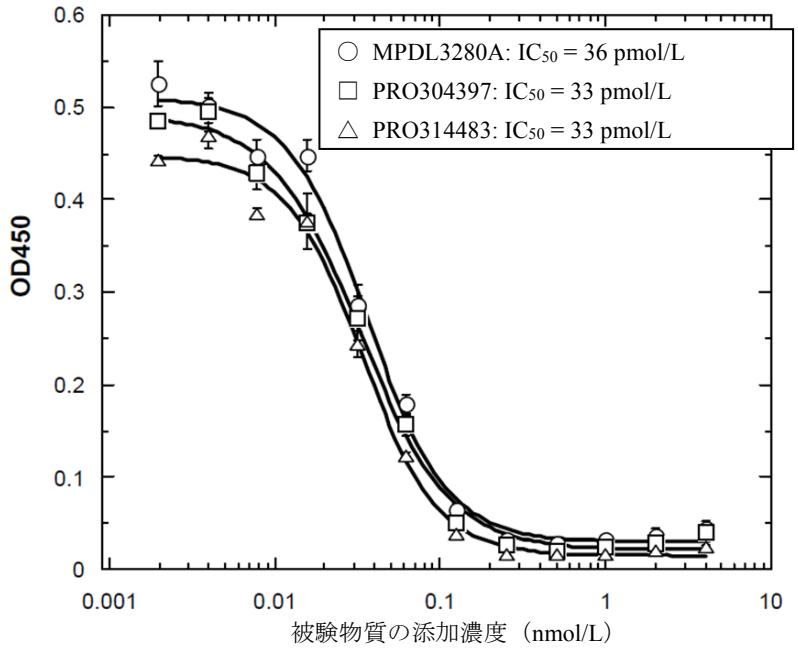
表 2.6.2.2.1.2-1 本薬及びキメラ抗体による B7-1及び PD-1と PD-L1との結合に対する阻害活性（競合 ELISA 法）

被験物質	結合阻害活性 IC_{50} (pmol/L, n = 3, 平均値 ± 標準偏差)			
	ヒト B7-1／ヒト PD-L1	ヒト PD-1／ヒト PD-L1	マウス B7-1／マウス PD-L1	マウス PD-1／マウス PD-L1
本薬	48.4 ± 25.9	82.8 ± 40.3	75.6 ± 14.8	104 ± 38.7
PRO304397	47.5 ± 26.3	77.5 ± 25.2	79.4 ± 15.5	113 ± 31.5
PRO314483	41.0 ± 15.8	78.9 ± 31.0	96.6 ± 27.2	125 ± 16.5

IC_{50} = 50% inhibitory concentration

[4.2.1.1-1 Table 5 を改変]

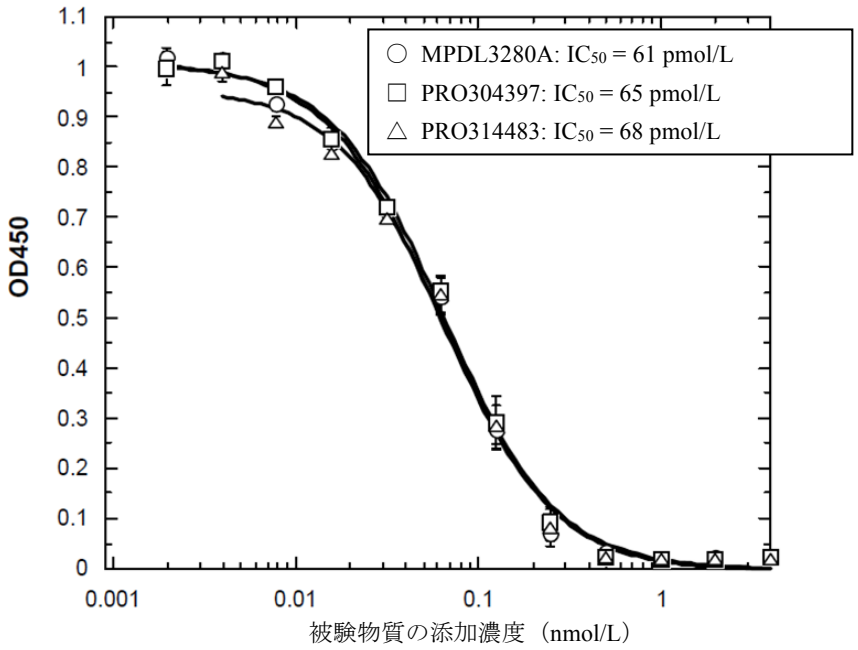
図 2.6.2.2.1.2-1 本薬及びキメラ抗体による
ヒト B7-1とヒト PD-L1との結合阻害曲線（競合 ELISA 法による代表例）



各プロットは，平均値 ± 標準偏差を示す。IC_{50}値は，非線形最小二乗法により算出した。

[4.2.1.1-1 Figure 8 を改変]

図 2.6.2.2.1.2-2 本薬及びキメラ抗体による
ヒト PD-1とヒト PD-L1との結合阻害曲線（競合 ELISA 法による代表例）



各プロットは，平均値 ± 標準偏差を示す。IC_{50}値は，非線形最小二乗法により算出した。

[4.2.1.1-1 Figure 9 を改変]

2.6.2.2.1.3 本薬の Fcγ 受容体との結合性

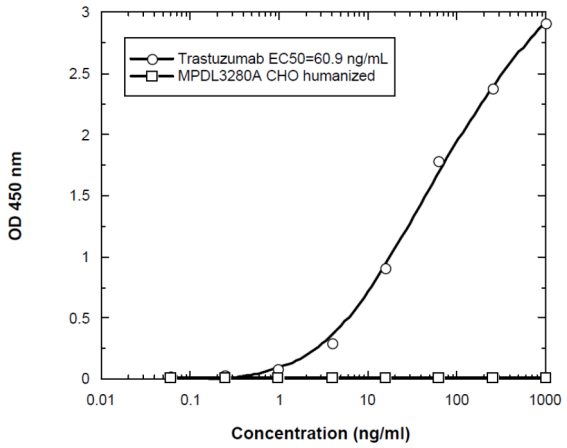
（資料番号 4.2.1.1-1）

本薬は，ヒト IgG1のフレームワーク配列をベースとするモノクローナル抗体であるが，1アミノ酸置換（N298A）を施すことにより，Fcγ 受容体との結合性が低下するように改変されている。実際に結合性が低減されていることを確認するために，6種類のヒト Fcγ 受容体（FcγRIA, FcγRIIA-R131, FcγRIIA-H131, FcγRIIB, FcγRIIIA-F158, FcγRIIIA-V158）を用いて，本薬との結合性を ELISA 法により評価した。GST（Gly-6xHis-glutathione S-transferase）ポリペプチドと，Fcγ 鎖の細胞外ドメインとの fusion 蛋白として調製したものを，Fcγ 受容体として使用した。なお，ヒト化 IgG1の陽性対照物質として trastuzumab を使用した。

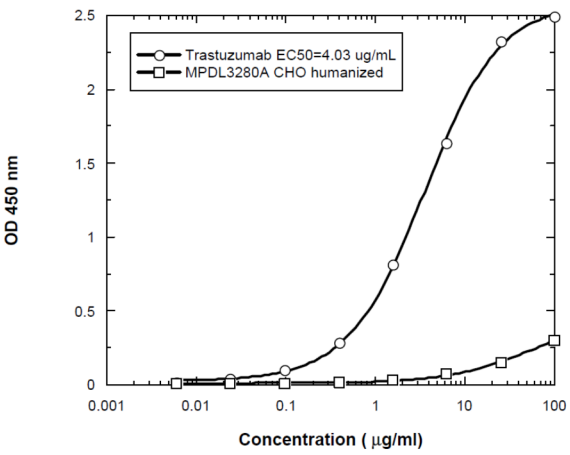
結合曲線の代表例を図 2.6.2.2.1.3-1に示した。本薬は，いずれの Fcγ 受容体に対しても，ほとんど結合性を示さなかった。一方，陽性対照として用いた trastuzumab は，すべての Fcγ 受容体に結合した。

図 2.6.2.2.1.3-1 Fcγ 受容体に対する本薬及び trastuzumab の結合性（代表例）

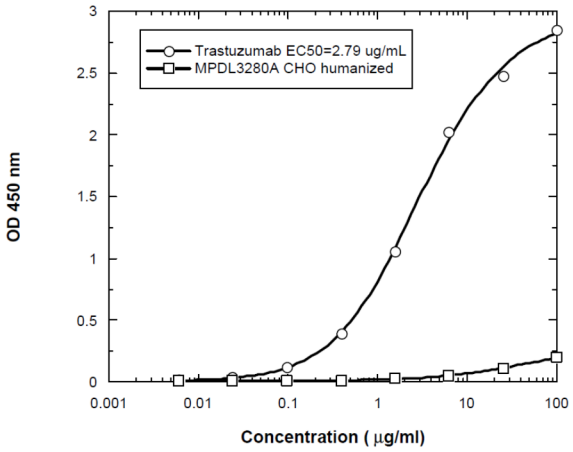
(1) FcγRIA



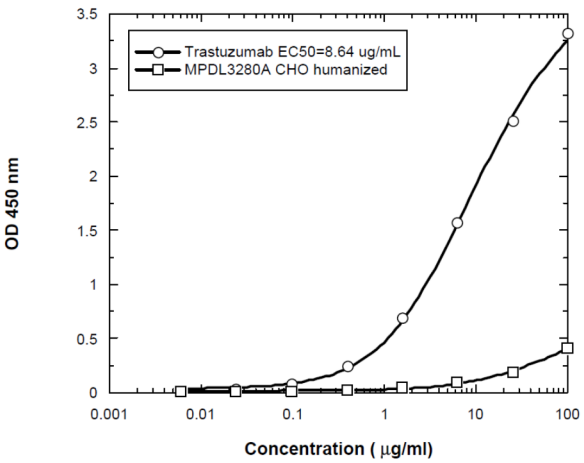
(2) FcγRIIA-R131



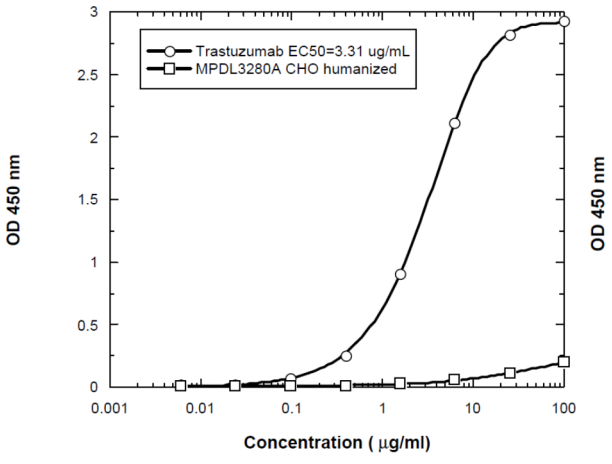
(3) FcγRIIA-H131



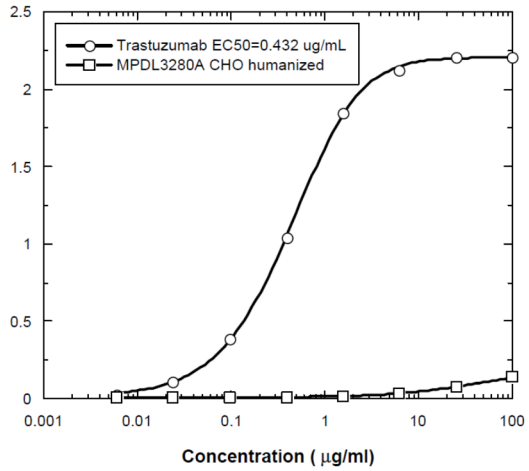
(4) FcγRIIB



(5) FcγRIIIA-F158



(6) FcγRIIIA-V158



MPDL3280A CHO humanized: 本薬

グラフの横軸は被験物質又は陽性対照物質の添加濃度，縦軸は吸光度（Optical density）を示した。

各プロットは duplicate の平均値を示し，結合曲線は4パラメーターモデルを用いて作成した。

EC_{50}値は，3回試験を実施し，その平均値を表示した。

[4.2.1.1-1 Figure B1-B6 を改変]

2.6.2.2.2 *In vivo* 試験（腫瘍移植モデル）

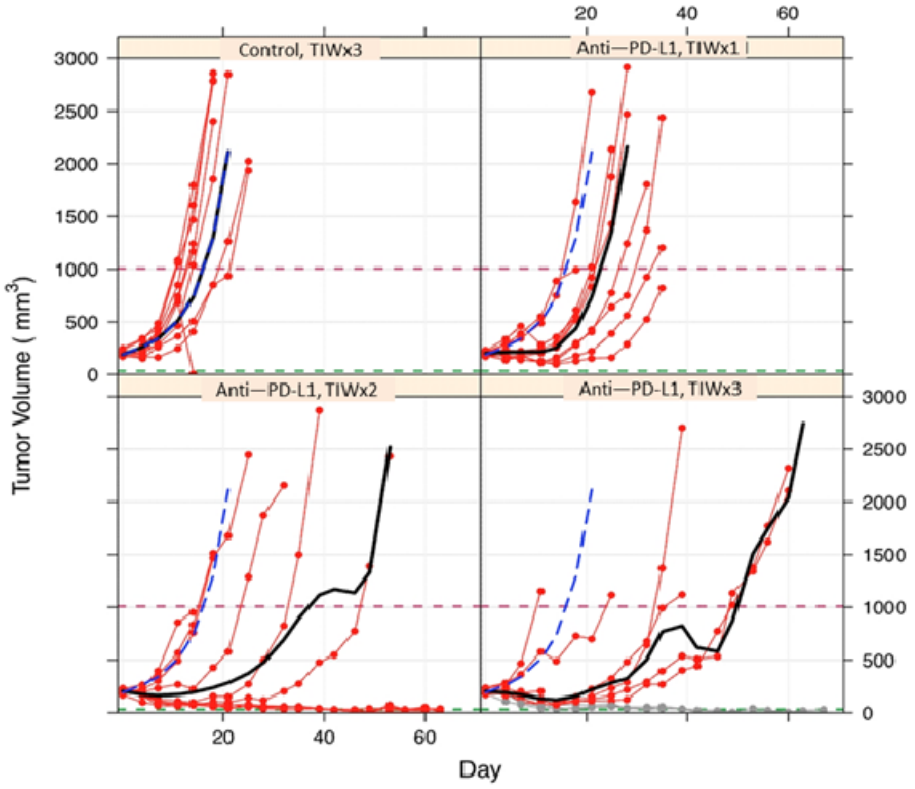
2.6.2.2.2.1 マウス結腸・直腸癌 MC38移植モデルにおけるキメラ抗体PRO314483の抗腫瘍効果

（資料番号 4.2.1.1-3）

マウス結腸・直腸癌 MC38移植モデルを用いて，キメラ抗体 PRO314483による抗腫瘍効果を検討した。C57BL/6マウスの皮下に，MC38細胞5 × 10^6個を移植し，固形腫瘍を形成させた。平均腫瘍体積が187 mm^3に到達した時点で群分けを実施し（n = 10 × 4群），コントロール抗体（Anti-gp120 mAb, 10 mg/kg, 週3回 × 3週間）又は PRO314483（10 mg/kg, 週3回 × 1-3週間）をマウスの腹腔内へ投与した。

腫瘍体積の個体別の推移を図 2.6.2.2.2.1-1に，またそれらの個体値を LME（線形混合）モデルで解析後，得られた平均値を曲線回帰させたグラフを図 2.6.2.2.2.1-2に，主な評価項目の結果を表 2.6.2.2.2.1-1に示した。PRO314483投与群における TGI は，1週間投与が76%，2週間投与が98%，3週間投与が103%であった。PRO314483の2週間及び3週間投与では，それぞれ CR 3例と PR 3例が認められ，全奏効率（CR + PR）は60%であった。また，TTP5X は，PRO314483投与により1.4-3.0倍延長された。なお，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

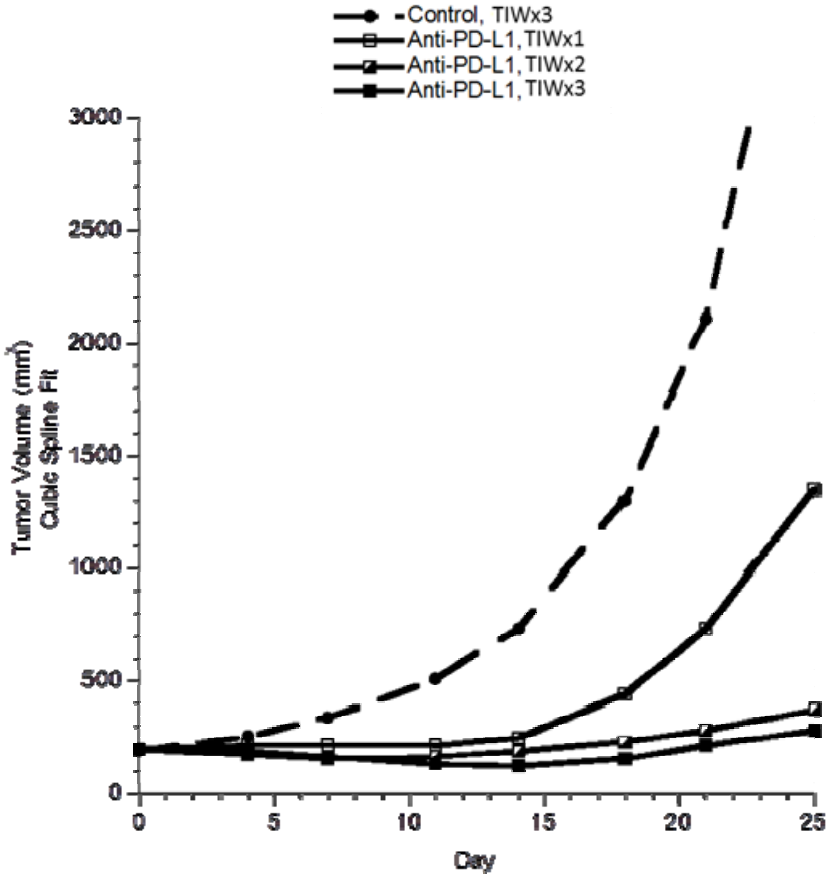
図 2.6.2.2.2.1-1 MC38移植モデルにおけるマウス個体別の腫瘍体積推移



Anti-PD-L1： キメラ抗体 PRO314483， TIW： 週3回投与
黒色実線： 各群の平均腫瘍体積の推移， 青色点線： Control 群の平均腫瘍体積の推移
赤色実線・灰色実線： マウス個体ごとの腫瘍体積の推移（灰色は，試験終了時まで生存）
赤色点線（横軸平行線）： 試験開始時の腫瘍体積の5倍を表示（TTP5X の指標となる値）

[4.2.1.1-3 Figure 1B を改変]

図 2.6.2.2.2.1-2 MC38移植モデルにおける PRO314483の抗腫瘍効果



Anti-PD-L1： キメラ抗体 PRO314483， TIW： 週3回投与

各群の腫瘍体積推移： 各測定時点での平均値及び曲線回帰させた三次スプライン曲線

[4.2.1.1-3 Figure 1A を改変]

表 2.6.2.2.2.1-1 MC38移植モデルにおける PRO314483の評価結果

Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Schedule	n	Tumor Volume (mm^3)	%TGI	PR	CR	TTP5X (days)
1	Control	10	TIWx3	10	>3000	0	0	0	16.5
2	PRO314483	10	TIWx1	10	1349	76	1	0	23.5
3	PRO314483	10	TIWx2	10	372	98	3	3	37
4	PRO314483	10	TIWx3	10	282	103	3	3	50

Tumor Volume と%TGI は，Control 群の最終測定日である Day 25 に算定した。なお，Control 群の腫瘍体積は，LME-fitted value に基づいて算出し，%TGI の計算に用いた。

%TGI (Tumor Growth Inhibition) = $[1 - (AUC_{treatment}/day)/(AUC_{control}/day)] \times 100$

AUC (Area under the fitted curve): 腫瘍体積の近似曲線下面積。

CR (Complete Response): 腫瘍体積が測定限界（8 mm^3）以下に縮小した時に CR と判定した。

PR (Partial Response): 腫瘍体積が試験開始時の半分以下に縮小した時に PR と判定した。

TTP5X: 腫瘍体積が試験開始時の 5 倍に到達するまでの日数。

[4.2.1.1-3 Table 2 及び 4.2.1.1-3 Table 3 を改変]

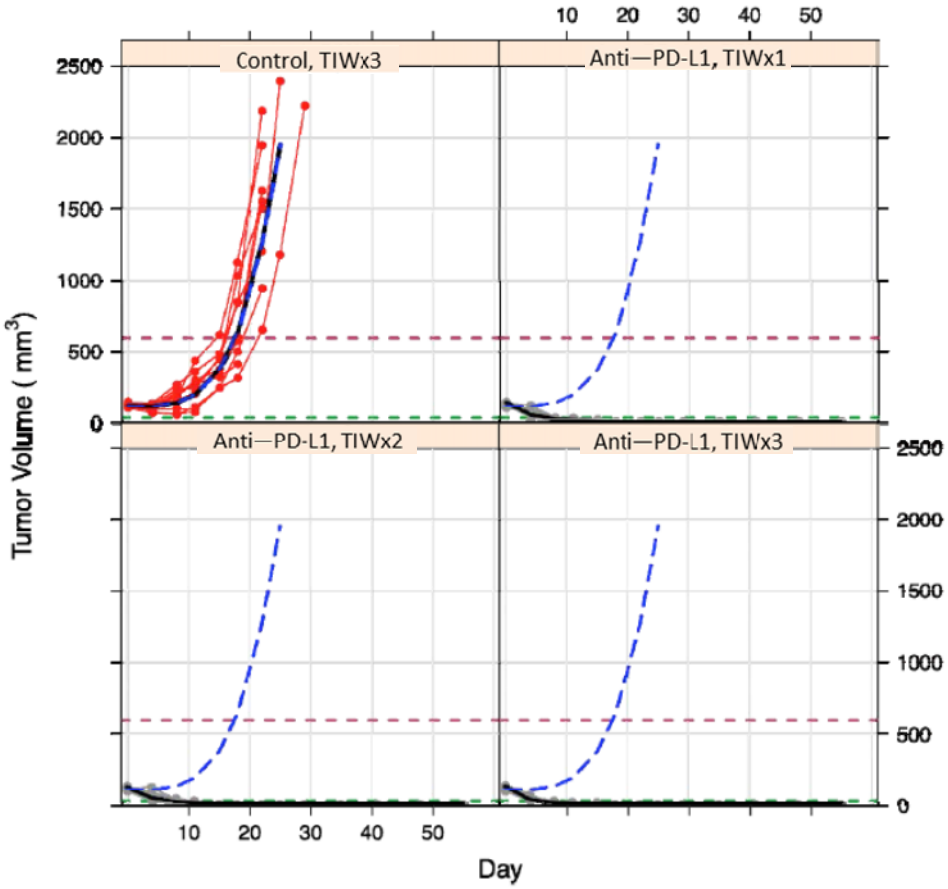
2.6.2.2.2.2 マウス結腸・直腸癌 MC38.OVA 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483の抗腫瘍効果

（資料番号 4.2.1.1-4）

マウス結腸・直腸癌 MC38に異種蛋白である卵白アルブミンの遺伝子を導入して免疫原性を高めた MC38.OVA 移植モデルを用いて，キメラ抗体 PRO314483による抗腫瘍効果を検討した。C57BL/6マウスの皮下に，MC38.OVA 細胞5 × 10^6個を移植し，固形腫瘍を形成させた。平均腫瘍体積が129 mm^3に到達した時点で群分けを実施し（n = 10 × 4群），コントロール抗体（Anti-gp120 mAb, 10 mg/kg, 週3回 × 3週間）又は PRO314483（10 mg/kg, 週3回 × 1-3週間）をマウスの腹腔内へ投与した。

腫瘍体積の個体別の推移を図 2.6.2.2.2.2-1に，またそれらの個体値を LME モデルで解析後，得られた平均値を曲線回帰させたグラフを図 2.6.2.2.2.2-2に，主な評価項目の結果を表2.6.2.2.2.2-1に示した。PRO314483投与群では，全群のマウスで MC38.OVA 腫瘍の完全退縮が認められ，完全退縮は試験終了時の Day 55まで持続した。なお，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

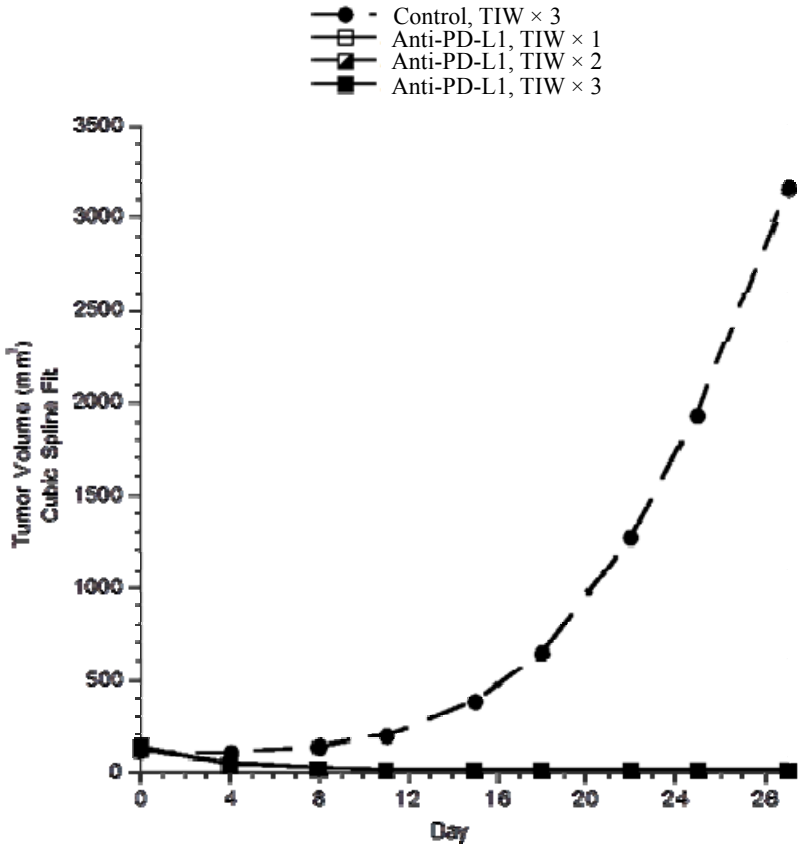
図 2.6.2.2.2.2-1 MC38.OVA 移植モデルにおけるマウス個体別の腫瘍体積推移



Anti-PD-L1： キメラ抗体 PRO314483， TIW： 週3回投与
黒色実線： 各群の平均腫瘍体積の推移， 青色点線： Control 群の平均腫瘍体積の推移
赤色実線・灰色実線： マウス個体ごとの腫瘍体積の推移（灰色は，試験終了時まで生存）
赤色点線（横軸平行線）： 試験開始時の腫瘍体積の5倍を表示（TTP5X の指標となる値）

[4.2.1.1-4 Figure 1B を改変]

図 2.6.2.2.2.2-2 MC38.OVA 移植モデルにおける PRO314483の抗腫瘍効果



Anti-PD-L1： キメラ抗体 PRO314483， TIW： 週3回投与
各群の腫瘍体積推移： 各測定時点での平均値及び曲線回帰させた三次スプライン曲線
PRO314483投与群は，3本の曲線が重ねっているため，図中では1本に見えている。

[4.2.1.1-4 Figure 1A を改変]

表 2.6.2.2.2.2-1 MC38.OVA 移植モデルにおける PRO314483の評価結果

Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Schedule	n	Tumor Volume (mm^3)	%TGI	PR	CR	TTP5X (days)
1	Control	10	TIWx3	10	>3000	0	1	0	18
2	PRO314483	10	TIWx1	10	0	118	0	10	NA
3	PRO314483	10	TIWx2	10	0	116	0	10	NA
4	PRO314483	10	TIWx3	10	0	119	0	10	NA

Tumor Volume と%TGI は，Control 群の最終測定日である Day 29 に算定した。なお，Control 群の腫瘍体積は，LME-fitted value に基づいて算出し，%TGI の計算に用いた。

%TGI (Tumor Growth Inhibition) = $[1 - (AUC_{treatment}/day)/(AUC_{control}/day)] \times 100$

AUC (Area under the fitted curve): 腫瘍体積の近似曲線下面積。

CR (Complete Response): 腫瘍体積が測定限界（8 mm^3）以下に縮小した時に CR と判定した。

PR (Partial Response): 腫瘍体積が試験開始時の半分以下に縮小した時に PR と判定した。

TTP5X: 腫瘍体積が試験開始時の 5 倍に到達するまでの日数。NA: Never achieved.

[4.2.1.1-4 Table 2 及び 4.2.1.1-4 Table 3 を改変]

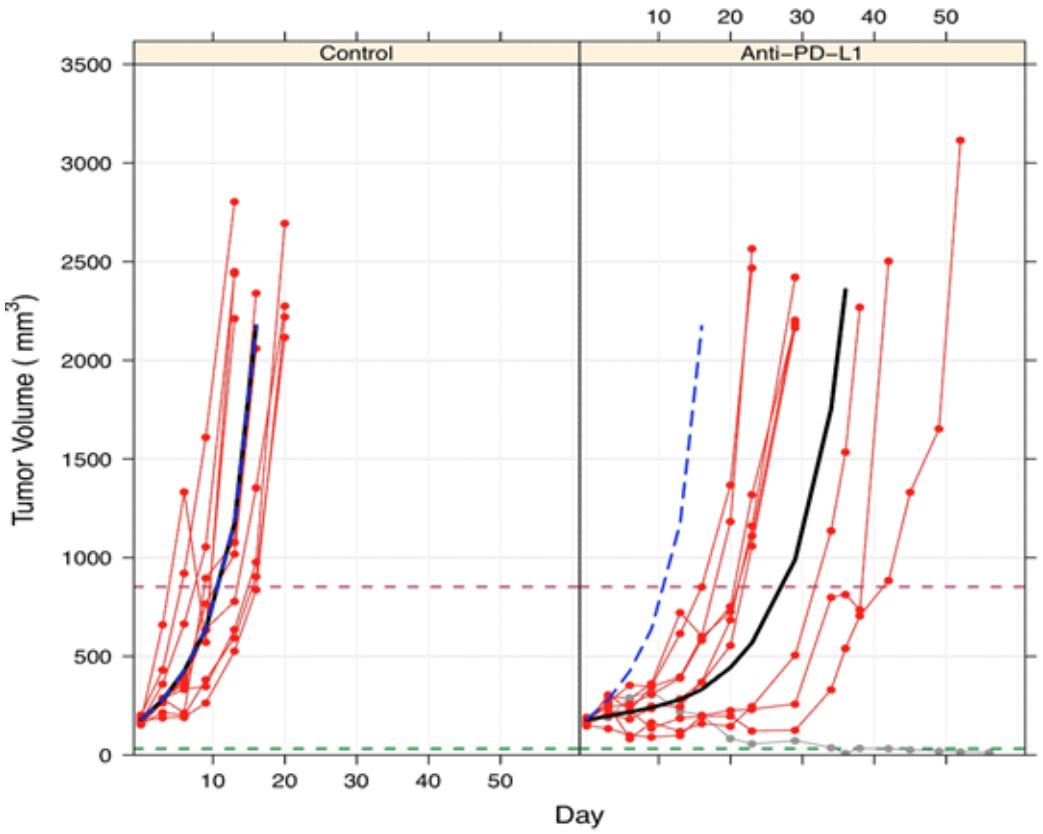
2.6.2.2.2.3 マウス結腸・直腸癌 CT26移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483の抗腫瘍効果

（資料番号 4.2.1.1-5）

マウス結腸・直腸癌 CT26移植モデルを用いて，キメラ抗体 PRO314483による抗腫瘍効果を検討した。Balb/c マウスの皮下に，CT26細胞0.1 × 10^6個を移植し，固形腫瘍を形成させた。平均腫瘍体積が180 mm^3に到達した時点で群分けを実施し（n = 10 × 2群），コントロール抗体（Anti-gp120 mAb, 10 mg/kg, 週3回 × 3週間）又は PRO314483（10 mg/kg, 週3回 × 3週間）をマウスの腹腔内へ投与した。

腫瘍体積の個体別の推移を図 2.6.2.2.2.3-1に，またそれらの個体値を LME モデルで解析後，得られた平均値を曲線回帰させたグラフを図 2.6.2.2.2.3-2に，主な評価項目の結果を表2.6.2.2.2.3-1に示した。PRO314483は，CT26腫瘍に対して，TGI 92%の抗腫瘍効果を示した。PRO314483投与群では，CR 1例と PR 1例が認められ，全奏効率（CR + PR）は20%であった。また，TTP5X は，PRO314483投与により2.4倍延長（11.5日 → 27.5日）された。なお，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

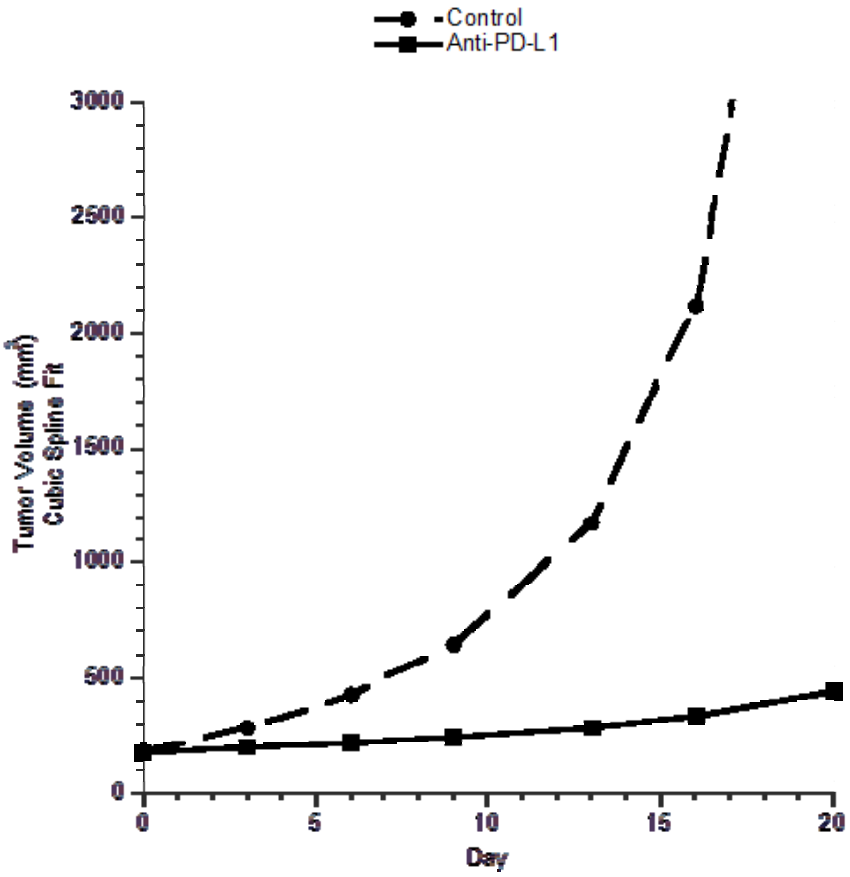
図 2.6.2.2.2.3-1 CT26移植モデルにおけるマウス個体別の腫瘍体積推移



Anti-PD-L1： キメラ抗体 PRO314483
黒色実線： 各群の平均腫瘍体積の推移， 青色点線： Control 群の平均腫瘍体積の推移
赤色実線・灰色実線： マウス個体ごとの腫瘍体積の推移（灰色は，試験終了時まで生存）
赤色点線（横軸平行線）： 試験開始時の腫瘍体積の5倍を表示（TTP5X の指標となる値）

[4.2.1.1-5 Figure 1B を改変]

図 2.6.2.2.2.3-2 CT26移植モデルにおける PRO314483の抗腫瘍効果



Anti-PD-L1： キメラ抗体 PRO314483

各群の腫瘍体積推移： 各測定時点での平均値及び曲線回帰させた三次スプライン曲線

[4.2.1.1-5 Figure 1A を改変]

表 2.6.2.2.2.3-1 CT26移植モデルにおける PRO314483の評価結果

Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Schedule	n	Tumor Volume (mm^3)	%TGI	PR	CR	TTP5X (days)
1	Control	10	TIWx3	10	>3000	0	0	0	11.5
2	PRO314483	10	TIWx3	10	443	92	1	1	27.5

Tumor Volume と%TGI は，Control 群の最終測定日である Day 20 に算定した。なお，Control 群の腫瘍体積は，LME-fitted value に基づいて算出し，%TGI の計算に用いた。

%TGI (Tumor Growth Inhibition) = $[1 - (AUC_{treatment}/day)/(AUC_{control}/day)] \times 100$

AUC (Area under the fitted curve): 腫瘍体積の近似曲線下面積。

CR (Complete Response): 腫瘍体積が測定限界（8 mm^3）以下に縮小した時に CR と判定した。

PR (Partial Response): 腫瘍体積が試験開始時の半分以下に縮小した時に PR と判定した。

TTP5X: 腫瘍体積が試験開始時の 5 倍に到達するまでの日数。

[4.2.1.1-5 Table 2 及び 4.2.1.1-5 Table 3 を改変]

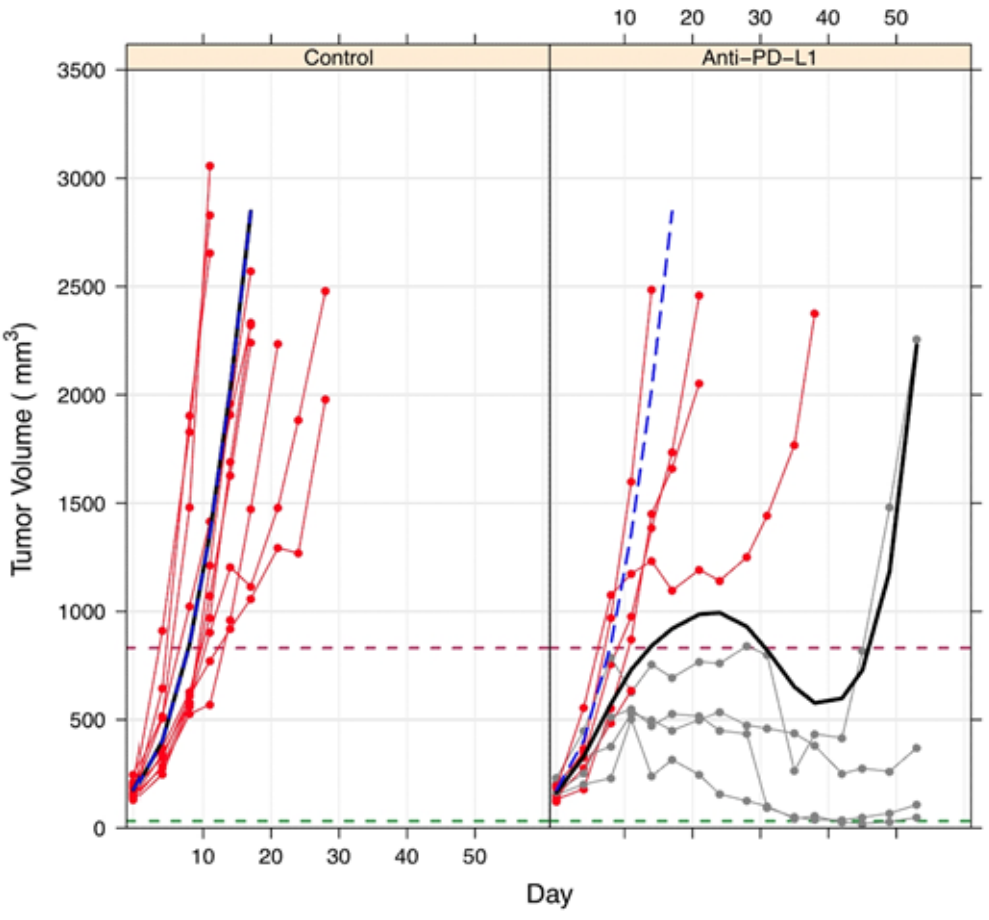
2.6.2.2.2.4 マウス悪性黒色腫 Cloudman S91移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483の抗腫瘍効果

（資料番号 4.2.1.1-6）

マウス悪性黒色腫 Cloudman S91移植モデルを用いて，キメラ抗体 PRO314483による抗腫瘍効果を検討した。DBA/2マウスの皮下に，Cloudman S91細胞0.1 × 10^6個を移植し，固形腫瘍を形成させた。平均腫瘍体積が174 mm^3に到達した時点で群分けを実施し（n = 10 × 2群），コントロール抗体（Anti-gp120 mAb, 10 mg/kg, 週3回 × 3週間）又はPRO314483（10 mg/kg, 週3回 × 3週間）をマウスの腹腔内へ投与した。

腫瘍体積の個体別の推移を図 2.6.2.2.2.4-1に，またそれらの個体値をLMEモデルで解析後，得られた平均値を曲線回帰させたグラフを図 2.6.2.2.2.4-2に，主な評価項目の結果を表2.6.2.2.2.4-1に示した。PRO314483は，Cloudman S91腫瘍に対して，TGI 78%の抗腫瘍効果を示した。PRO314483投与群では，PR 2例が認められ，全奏効率（CR + PR）は20%であった。また，TTP5X は，PRO314483投与により1.75倍延長（8日 → 14日）された。なお，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

図 2.6.2.2.2.4-1 Cloudman S91移植モデルにおけるマウス個体別の腫瘍体積推移



Anti-PD-L1： キメラ抗体 PRO314483

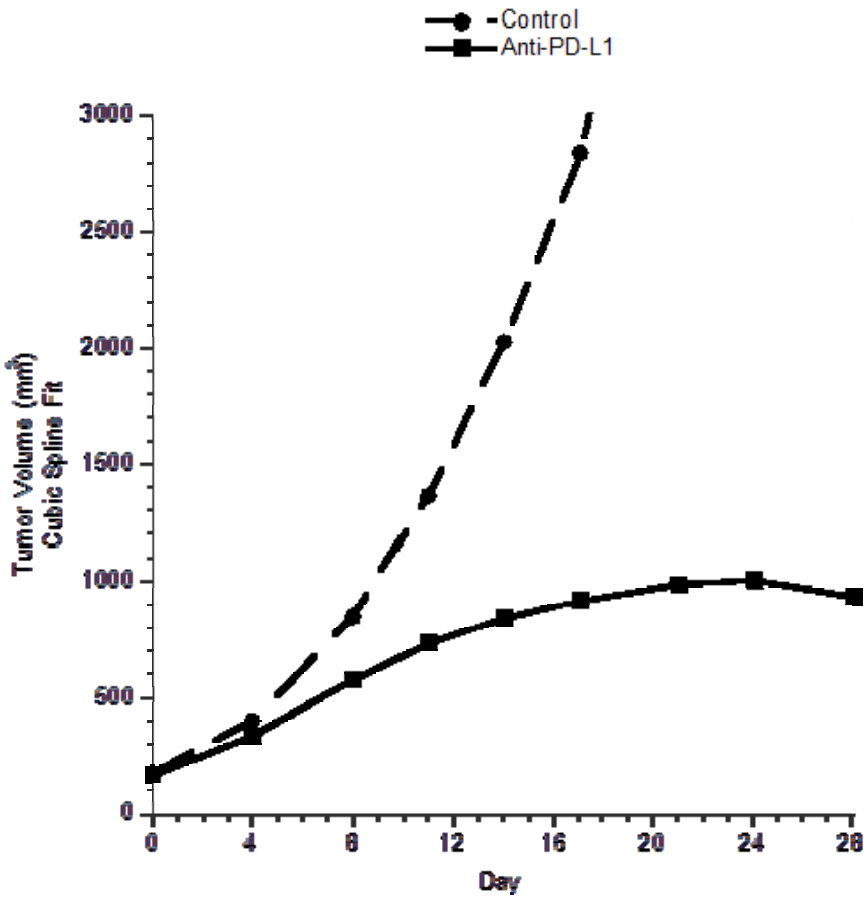
黒色実線： 各群の平均腫瘍体積の推移， 青色点線： Control 群の平均腫瘍体積の推移

赤色実線・灰色実線： マウス個体ごとの腫瘍体積の推移（灰色は，試験終了時まで生存）

赤色点線（横軸平行線）： 試験開始時の腫瘍体積の5倍を表示（TTP5X の指標となる値）

[4.2.1.1-6 Figure 1B を改変]

図 2.6.2.2.2.4-2 Cloudman S91移植モデルにおけるPRO314483の抗腫瘍効果



Anti-PD-L1： キメラ抗体 PRO314483

各群の腫瘍体積推移： 各測定時点での平均値及び曲線回帰させた三次スプライン曲線

[4.2.1.1-6 Figure 1A を改変]

表 2.6.2.2.2.4-1 Cloudman S91移植モデルにおけるPRO314483の評価結果

Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Schedule	n	Tumor Volume (mm^3)	%TGI	PR	CR	TTP5X (days)
1	Control	10	TIWx3	10	>3000	0	0	0	8
2	PRO314483	10	TIWx3	10	1082	78	2	0	14

Tumor Volume と%TGI は，Control 群の最終測定日である Day 28 に算定した。なお，Control 群の腫瘍体積は，LME-fitted value に基づいて算出し，%TGI の計算に用いた。

%TGI (Tumor Growth Inhibition) = $[1 - (AUC_{treatment}/day)/(AUC_{control}/day)] \times 100$

AUC (Area under the fitted curve): 腫瘍体積の近似曲線下面積。

CR (Complete Response): 腫瘍体積が測定限界（8 mm^3）以下に縮小した時に CR と判定した。

PR (Partial Response): 腫瘍体積が試験開始時の半分以下に縮小した時に PR と判定した。

TTP5X: 腫瘍体積が試験開始時の 5 倍に到達するまでの日数。

[4.2.1.1-6 Table 2 及び 4.2.1.1-6 Table 3 を改変]

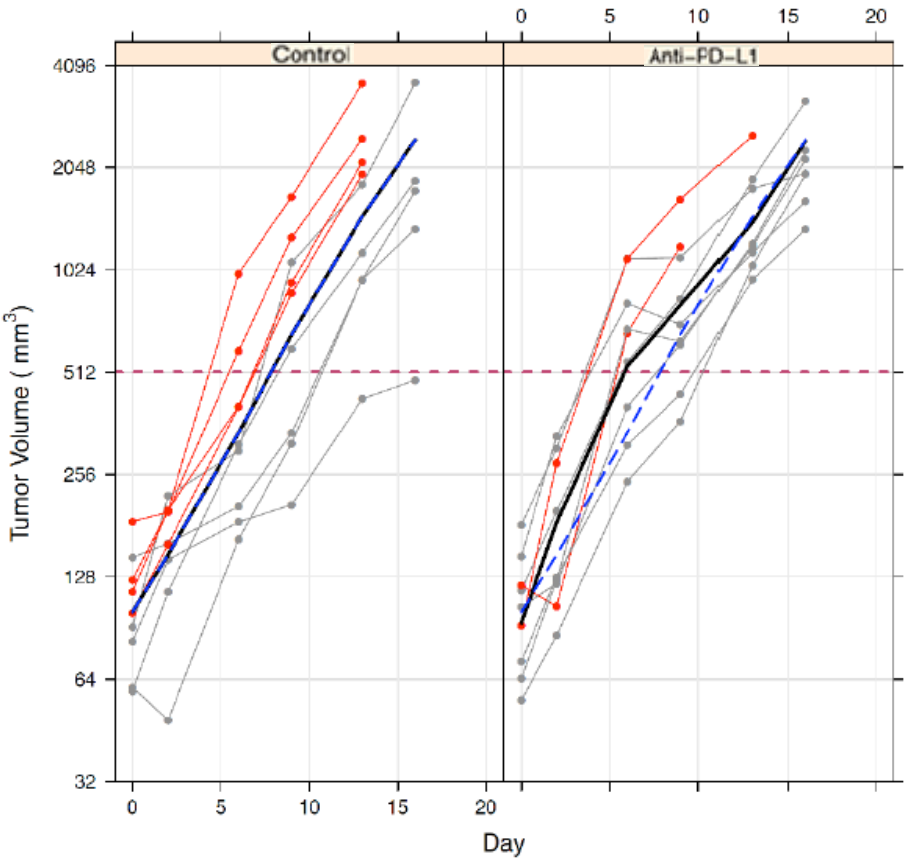
2.6.2.2.2.5 マウス肺癌 Lewis Lung Carcinoma (LLC) 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483の抗腫瘍効果

（資料番号 4.2.1.1-7, 参考資料）

マウス肺癌 LLC 移植モデルを用いて，キメラ抗体 PRO314483による抗腫瘍効果を検討した。C57BL/6マウスの皮下に，LLC 細胞0.3 × 10^6個を移植し，固形腫瘍を形成させた。平均腫瘍体積が107 mm^3に到達した時点で群分けを実施し（n = 9 × 2群），コントロール抗体（Anti-gp120 mAb, 10 mg/kg, 週3回 × 3週間）又は PRO314483（10 mg/kg, 週3回 × 3週間）をマウスの腹腔内へ投与した。

腫瘍体積の個体別の推移を図 2.6.2.2.2.5-1に，またそれらの個体値を LME モデルで解析後，得られた平均値を曲線回帰させたグラフを図 2.6.2.2.2.5-2に，主な評価項目の結果を表2.6.2.2.2.5-1に示した。PRO314483は，LLC 腫瘍に対して，抗腫瘍効果を示さなかった。TGIは-10%であり，CR 及び PR 例は認められなかった。また，TTP5X の延長も認められず，抗PD-L1投与群（6.0日）は，コントロール群（8.0日）と同程度であった。なお，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

図 2.6.2.2.2.5-1 LLC 移植モデルにおけるマウス個体別の腫瘍体積推移



Anti-PD-L1： キメラ抗体 PRO314483

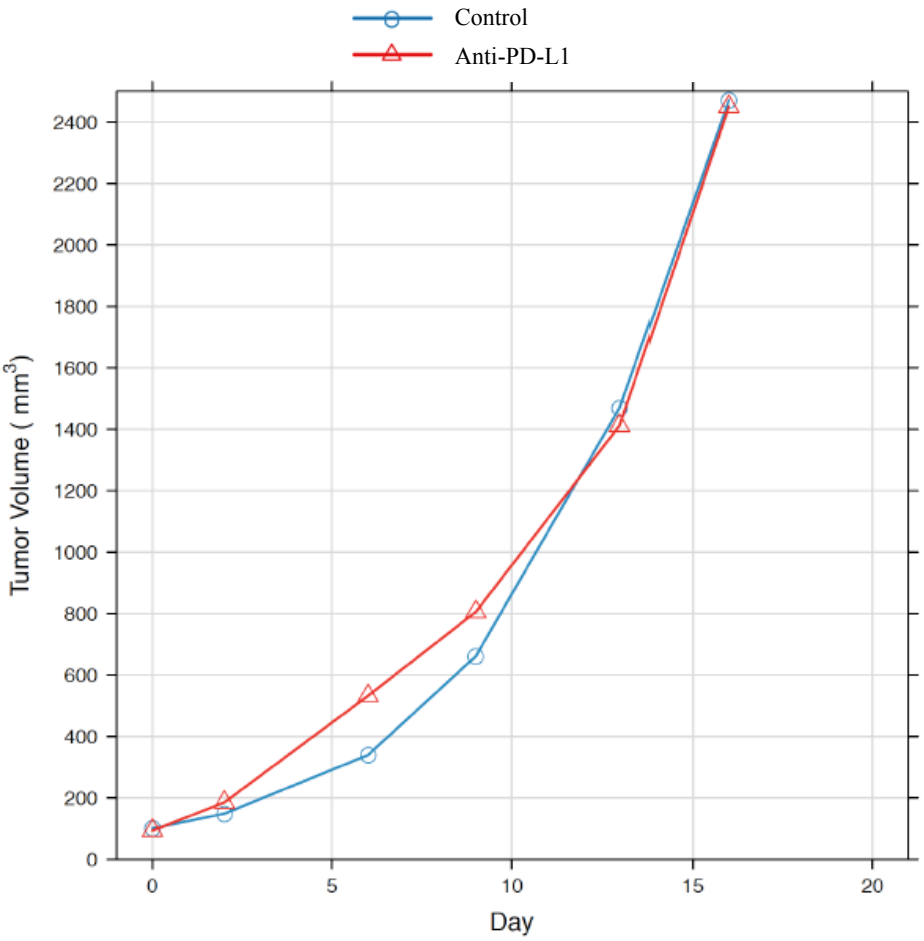
黒色実線： 各群の平均腫瘍体積の推移， 青色点線： Control 群の平均腫瘍体積の推移

赤色実線・灰色実線： マウス個体ごとの腫瘍体積の推移（灰色は，試験終了時まで生存）

赤色点線（横軸平行線）： 試験開始時の腫瘍体積の5倍を表示（TTP5X の指標となる値）

[4.2.1.1-7 Figure 2 を改変]

図 2.6.2.2.2.5-2 LLC 移植モデルにおける PRO314483の抗腫瘍効果



Anti-PD-L1： キメラ抗体 PRO314483
各群の腫瘍体積推移： 各測定時点での平均値及び曲線回帰させた三次スプライン曲線

[4.2.1.1-7 Figure 1 を改変]

表 2.6.2.2.2.5-1 LLC 移植モデルにおける PRO314483の評価結果

Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Schedule	n	Tumor Volume (mm^3)	%TGI	PR	CR	TTP5X (days)
1	Control	10	TIWx3	9	2407	0	0	0	8.0
2	PRO314483	10	TIWx3	9	2389	-10	0	0	6.0

Tumor Volume と%TGI は，Control 群の最終測定日である Day 16 に算定した。なお，Control 群の腫瘍体積は，LME-fitted value に基づいて算出し，%TGI の計算に用いた。

%TGI (Tumor Growth Inhibition) = $[1 - (AUC_{treatment}/day)/(AUC_{control}/day)] \times 100$

AUC (Area under the fitted curve): 腫瘍体積の近似曲線下面積。

CR (Complete Response): 腫瘍体積が測定限界（8 mm^3）以下に縮小した時に CR と判定した。

PR (Partial Response): 腫瘍体積が試験開始時の半分以下に縮小した時に PR と判定した。

TTP5X: 腫瘍体積が試験開始時の 5 倍に到達するまでの日数。

[4.2.1.1-7 Table 2 及び 4.2.1.1-7 Table 3 を改変]

2.6.2.3 副次的薬理試験

[redacted]LCMV 感染モデルを用いた薬理試験を実施した。本項では，抗 PD-L1抗体の *in vivo* 薬理作用を，抗ウイルス効果，宿主反応評価及び病態機序解析の観点から検証した内容について示す。LCMV の感染には，毒性の高い CL-13株（広範な組織分布及び高ウイルス力価の長期間持続）及びその親株である Armstrong 株（感染の持続性が弱く，組織分布が限定的）を用いた。

2.6.2.3.1 LCMV 感染モデルにおける抗 PD-L1抗体の薬効評価及び宿主反応・機序解析

（資料番号 4.2.1.2-1, 4.2.1.2-2, 4.2.1.2-3, 4.2.1.2-4（参考資料））

(1) LCMV CL-13株の感染14日後から，抗 PD-L1抗体（PRO314483, 10 mg/kg）を，週3回 × 1週間（Days 14-21）又は週3回 × 2週間（Days 14-28），マウスの腹腔内へ投与した。抗 PD-L1抗体の1週間投与により，血中，肝臓，肺，腎臓のウイルス力価は，対照群と比較して有意に減少した。2週間投与では，更に強い減少効果が得られ，血中のウイルスは，5例中3例で検出されなかった。なお，抗 PD-L1抗体投与群の脾臓では，LCMV 由来 gp33ペプチドに反応する CD107a 発現あるいは IFN-γ 産生 CD8陽性 T 細胞の割合が増加しており，LCMV 特異的な CD8陽性 T 細胞の機能増強が推察された。

(2) LCMV CL-13株の感染7日後（感染の急性期）又は感染17及び19日後（感染の慢性期）に，抗 PD-L1抗体（キメラ抗体 [PRO314483, PRO304397] 又はマウス抗体 [PRO304135], 10 mg/kg）を，マウスの腹腔内へ投与した。感染17及び19日後に，抗 PD-L1抗体を投与した場合には，全例のマウスが生存したが，感染7日後に投与した場合には，60-100%のマウスが死亡した。感染の急性期に，抗 PD-L1抗体を投与したことにより，死亡例が発生した原因を探るため，以下の試験を実施した。

(3) LCMV CL-13株の感染17日後に，IFN-α 発現アデノウイルス（Ad5-IFN-α）をマウスの静脈内に投与し，LCMV とアデノウイルスの2種類に感染した状態を作出した。LCMV 感染21日後（アデノウイルス感染4日後）から，抗 PD-L1抗体（PRO304397, 10 mg/kg）を，週3回 × 2週間（Days 21-35），マウスの腹腔内へ投与した。血中の LCMV ウイルス力価は，Ad5-IFN-α 又は抗 PD-L1抗体の単独投与，若しくは併用投与により，検出限界以下まで減少した。本試験では，マウスに有害事象や死亡などのイベントは惹起されなかったことから，アデノウイルス感染の急性期に抗 PD-L1抗体を投与しても，死亡例は発生しないということが明らかになった。

(4) LCMV Armstrong 株又は CL-13株を感染させ，肝臓，腎臓，肺等の臓器におけるウイルス力価の推移を測定した結果，CL-13株感染マウスは，Armstrong 株感染マウスよりも，高いウイルス力価を示し（10^3～10^4倍），感染期間も長期持続した（Armstrong 株は10日間で検出限界以下になったのに対して，CL-13株は20日間経過しても残存した）。CL-13株感染マウスに，抗 PD-L1抗体（PRO314483，10 mg/kg）を感染2, 7又は17日後に単回投与した結果，2日後投与では5日以内に8例中3例（37.5%），7日後投与では2-4日以内に8例中8例（100%）のマウスが死亡した。感染の慢性期である17日後投与では死亡例は見られなかった。CL-13株感染マウスの血清中 TNF-α 及び IFN-γ のレベルは，抗 PD-L1抗体投与により顕著に増加し，CD8陽性 T 細胞の機能増強が考えられた。一方，Armstrong 株感染マウスに抗 PD-L1抗体を投与しても，これらのサイトカインレベルはわずかしか上昇しなかった。また，CL-13株感染マウスでは，CD8陽性 T 細胞の PD-1発現レベルは，抗 PD-L1抗体投与により顕著に増加したが，Armstrong 株感染マウスでは，抗 PD-L1抗体投与による増加はわずかであった。Armstrong 株感染マウスでは，感染後のいずれのタイミングで抗 PD-L1抗体を投与しても死亡例はみられなかった。CL-13株感染急性期における抗 PD-L1抗体投与による死亡例発生は，複数の臓器で高ウイルス負荷が持続する状態で，CD8陽性 T 細胞の機能が亢進されたこと

に起因するものと推察された。

(5) LCMV CL-13株の感染3及び6日後に，抗 PD-1抗体（Clone 29F-1A12, 200 μg/mouse）を投与すると，感染6日後から8日後にかけて，すべてのマウスが死亡した。また，PD-1欠損（PD-1/PD-L1による免疫抑制機構が働かない）マウスに，LCMV CL-13株を感染させたところ，感染8日後までに全例死亡したが，Armstrong 株の感染では，死亡例は発生しなかった。
LCMV CL-13株感染マウスに，抗 CD8抗体を投与して CD8陽性 T 細胞を除去した後に，抗 PD-L1抗体（Clone 10F.9G2, 200 μg/mouse）を投与しても，マウスは全例生存し，死亡例は発生しなかった。また，CD8陽性 T 細胞を除去したマウスでは，抗 PD-L1抗体を投与しても，血中のサイトカインレベル（IFN-γ や TNF-α 等）は上昇しなかった。LCMV CL-13株感染マウスに，IL-2を感染8又は15日後に投与すると全例死亡したが，感染30日後の投与では死亡例は発生しなかった。一方，Armstrong 株感染マウスでは，IL-2を感染8日後に投与しても，死亡例は発生しなかった。
以上の結果から，CL-13株感染急性期における抗 PD-L1抗体投与による死亡例発生は，抗 PD-L1抗体に特有のものではなく，抗 PD-1抗体投与又は PD-1欠損により発生すること，CD8陽性 T 細胞の活性化，それに伴うサイトカインレベルの上昇により誘発されることが明らかとなった。また，IL-2投与により死亡例が発生することから，LCMV CL-13株感染の急性期では，免疫調節剤に対する感受性が高まっている状態にあることが推察された。

2.6.2.4 安全性薬理試験

GLP 下でのカニクイザル8週間静脈内／皮下投与試験及び26週間静脈内投与試験において，中枢神経系，心血管系及び呼吸器系に対する影響を評価した。本薬の50 mg/kg までの用量における週1回，計9回の静脈内又は皮下投与において，一般症状，体温，神経行動学的パラメータ，体表心電図測定における各種パラメータ，血圧，呼吸数及び血中酸素飽和度に異常は認められなかった。50 mg/kg の静脈内投与については，別途テレメトリー評価群を設定し，テレメトリー測定における心電図パラメータ，平均動脈圧，心拍数及び体温に異常は認められなかった。更に，本薬の50 mg/kg までの用量における週1回，計27回の静脈内投与において，一般症状，体温，神経行動学的パラメータ，体表心電図測定における各種パラメータ，血圧及び呼吸数に異常は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は，実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

PD-L1は，活性化された免疫細胞上の PD-1又は B7-1と結合することにより，免疫機構の働きを抑制している[2),3)]。特に，悪性腫瘍においては，腫瘍細胞自身が PD-L1を発現することにより，宿主の免疫活性を低下させ，免疫細胞により排除されにくい環境を作り出している[4)]。肺癌，卵巣癌，悪性黒色腫等，多くのヒト悪性腫瘍で PD-L1の発現がみられており[4),5)]，その過剰発現は腫瘍浸潤リンパ球数の減少[5)]や予後不良[6)]と相関するという報告がある。そのため，PD-L1と PD-1又は B7-1との結合を阻害することは，抗腫瘍免疫の回復・活性化につながり，重要な意義を持っている。そこで，抗 PD-L1抗体である本薬及びキメラ抗体の薬理学的作用を，*in vitro* 及び *in vivo* の試験系を用いて検証した。

本薬は，ヒト，カニクイザル及びマウスの PD-L1に対して，サブナノモルレベルの結合親和性又は結合活性を示した。また，本薬は PD-L1と結合することにより，PD-L1がその受容体である PD-1又は B7-1と結合することを阻害した。

本薬のキメラ抗体 PRO314483を，マウス結腸・直腸癌 MC38又は卵白アルブミンを発現させて免疫原性を高めた MC38.OVA 移植モデルに投与したところ，前者での奏効率は60%であっ

たが，後者ではすべての腫瘍が完全退縮し，強い抗腫瘍効果が認められた。また，マウス結腸・直腸癌 CT26及びマウス悪性黒色腫 Cloudman S91移植モデルにおいても，腫瘍増殖抑制効果と TTP5X の延長効果が認められた。これらのモデルでは，遺伝的に異なるバックグランドを持つ3種類の近交系マウス（C57BL/6, Balb/c, DBA/2）を使用したが，いずれの系統においても抗腫瘍効果が認められており，PRO314483の薬効はマウスの系統に左右されないことが示唆された。なお，いずれのモデルにおいても，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，忍容性は良好であった。抗 PD-L1抗体は，抗悪性腫瘍剤として十分な能力を有していることが示された。

マウス肺癌 LLC 移植モデルでは抗腫瘍効果が認められなかったが，LLC 腫瘍は低免疫原性（poorly immunogenic model）であることが知られている[7]。Lechner らはマウス腫瘍モデルにおける免疫原性について検討しており，CT26モデルの腫瘍組織では T 細胞（CD3, CD4等）及び T 細胞活性化（CD25, CD62L 等）関連遺伝子等の発現がアップレギュレーションしており高免疫原性であるのに対し，LLC モデルの腫瘍組織ではそれらの遺伝子発現が正常組織よりダウンレギュレーションしており低免疫原性であることを示している。したがって，LLC モデルにおいて PRO314483が抗腫瘍効果を示さなかった理由としては，本モデルにおける免疫原性が低いために，PRO314483により免疫抑制状態が解除されても，腫瘍細胞傷害活性に結び付かなかったものと考えられた。

近年，ヒトがんゲノムデータの網羅的解析が進められ，肺癌や悪性黒色腫等の腫瘍細胞では，体細胞変異が高頻度で存在することが報告されている[8]。本薬は，宿主免疫応答の再活性化を誘導して抗腫瘍効果を発揮するため，体細胞変異頻度が高く，高免疫原性を有すると考えられる悪性腫瘍に対しては，強い薬効を示すことが期待される。抗 PD-1抗体 pembrolizumab は，体細胞変異を高頻度で有する肺癌患者において，高い有効性を示すことが報告されており[9]，PD-L1を標的とする本薬においても，同様の薬理作用が期待される。

本薬の副次的薬理試験として，LCMV 感染モデルにおける抗 PD-L1抗体の *in vivo* 薬理作用を評価した。LCMV CL-13株の感染慢性期に抗 PD-L1抗体を投与したところ，血中，肝臓，肺，腎臓のウイルス力価は有意に減少し，LCMV 特異的な CD8陽性 T 細胞の機能増強が推察された。一方，CL-13株の感染急性期に抗 PD-L1抗体を投与すると，60-100%のマウスが死亡した。この死亡例発生は，抗 PD-L1抗体に特有のものではなく，抗 PD-1抗体投与又は PD-1欠損により発生すること，IL-2投与により惹起されることから，CD8陽性 T 細胞の活性化，それに伴うサイトカインレベルの上昇により誘発されたものと推察された。また，Armstrong 株やアデノウイルス等，他のウイルス感染モデルでは，死亡例は発生しなかったことから，CL-13株感染時の特徴（複数の臓器で，高いウイルス力価が長期間持続し，ウイルス感染のピーク時に強力な T 細胞応答が誘導される等[10]）に起因するものと考えられた。なお，既知のヒトウイルス感染症の中で，このような特徴を示すものはほとんどないものと考えられる。

2.6.2.7 図表

図表は，本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1） Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature 2014;515:563-7.

2） Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol 2007;19:813-24.

3） Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. Immunity 2007;27:111-22.

4) Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. Nat Med 2002;8:793-800.
5) Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. Clin Cancer Res 2004;10:5094-100.
6) Zhang Y, Wang L, Li Y, Pan Y, Wang R, Hu H, et al. Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. Onco Targets Ther 2014;7:567-73.
7) Lechner MG, Karimi SS, Barry-Holson K, Angell TE, Murphy KA, Church CH, et al. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. J Immunother 2013;36:477-89.
8) Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature 2013;499:214-8.
9) Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science 2015;348:124-8.
10) Frebel H, Nindl V, Schuepbach RA, Braunschweiler T, Richter K, Vogel J, et al. Programmed death 1 protects from fatal circulatory failure during systemic virus infection of mice. J Exp Med 2012;209:2485-99.

テセントリク点滴静注1200 mg
（アテゾリズマブ（遺伝子組換え））
［非小細胞肺癌］

第2部　（モジュール2）：CTD の概要（サマリー）

2.6.3 薬理試験概要表

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
AUC	area under the fitted curve	近似曲線下面積
BW	body weight	体重
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CR	complete response	完全奏効
D266A	amino acid substitution (aspartic acid to alanine) at position 266	266位のアミノ酸残基をアスパラギン酸からアラニンに置換
EC_{50}	50% effective concentration	50%有効濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	固相酵素免疫測定
FcγR	Fcγ receptor	Fcγ 受容体
Gp33	glycoprotein 33-41 peptide	（LCMV のエピトープペプチド）
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IFN-γ	interferon-γ	インターフェロン γ
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IP	intraperitoneal	腹腔内
IV	intravenous	静脈内
K_d	dissociation constant	解離定数
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス
LLC	Lewis Lung Carcinoma	ルイス肺癌
N298A	amino acid substitution (asparagine to alanine) at position 298	298位のアミノ酸残基をアスパラギンからアラニンに置換
OVA	ovalbumin	卵白アルブミン
PD-1	programmed death-1	（PD-L1, PD-L2の受容体）
PD-L1	programmed death-ligand 1	（PD-1, B7-1のリガンド）
PD-L2	programmed death-ligand 2	（PD-1のリガンド）
PR	partial response	部分奏効
SC	subcutaneous	皮下
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖阻害
TIW	three times per week	週3回
TNF-α	tumor necrosis factor-α	腫瘍壊死因子 α
TTP5X	time (in days) for animal to have tumor progress to 5-fold above starting volume	（試験開始時の腫瘍体積の5倍に到達するまでの日数）
TV	tumor volume	腫瘍体積

目次

頁
2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.3.2.1 *In vitro* 試験 6
2.6.3.2.1.1 アテゾリズマブ及びキメラ抗体（PRO314483 及び PRO304397）の *in vitro* 薬理活性 6
2.6.3.2.1.2 本薬（Phase I 及び Phase III 検体）の *in vitro* 結合性評価 8
2.6.3.2.2 *In vivo* 試験（腫瘍移植モデル） 9
2.6.3.2.2.1 マウス結腸・直腸癌 MC38 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483 の抗腫瘍効果 9
2.6.3.2.2.2 マウス結腸・直腸癌 MC38.OVA 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483 の抗腫瘍効果 10
2.6.3.2.2.3 マウス結腸・直腸癌 CT26 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483 の抗腫瘍効果 11
2.6.3.2.2.4 マウス悪性黒色腫 Cloudman S91 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483 の抗腫瘍効果 12
2.6.3.2.2.5 マウス肺癌 Lewis Lung Carcinoma（LLC）移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483 の抗腫瘍効果 13
2.6.3.3 副次的薬理試験（LCMV 感染モデル） 14
2.6.3.3.1 リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（Lymphocytic Choriomeningitis Virus; LCMV）感染モデルにおける抗 PD-L1 抗体の薬効評価 14
2.6.3.3.2 LCMV 感染モデルにおける抗 PD-L1 抗体とインターフェロン α（IFN-α）発現アデノウイルスの併用効果 16
2.6.3.3.3 LCMV Armstrong 株及び CL-13 株感染モデルにおける抗 PD-L1 抗体単回投与後の宿主反応評価 17
2.6.3.3.4 LCMV 感染モデルにおいて抗 PD-L1 抗体によって促進される病態の機序解析： CL-13 株と Armstrong 株の比較 18
2.6.3.4 安全性薬理試験 20
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 20

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

試験の種類	試験系	被験物質	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
効力を裏付ける試験						
PD-L1に対する結合性	ヒト及びマウスPD-L1を発現させた293細胞 ヒト及びカニクイザルの活性化T細胞	Atezolizumab PRO304397 PRO314483	*In vitro*	Genentech, Inc.	[redacted]-0426 (AMENDMENT 1)	4.2.1.1-1
PD-1及びB7-1とPD-L1との結合阻害活性	ヒト及びマウスのPD-1，PD-L1及びB7-1の組換え蛋白を用いた競合ELISA					
Fcγ 受容体との結合性	種々のヒトFcγ受容体を用いたELISA	Atezolizumab				
PD-L1に対する結合性	ヒト PD-L1を発現させた293細胞	Atezolizumab (Phase I/III materials)	*In vitro*	Genentech, Inc.	[redacted]-0984	4.2.1.1-2
マウス結腸・直腸癌 MC38移植モデルにおける抗腫瘍効果	C57BL/6マウス MC38 皮下移植	PRO314483	*In vivo* 腹腔内	Genentech, Inc.	[redacted]-1883	4.2.1.1-3
マウス結腸・直腸癌 MC38.OVA 移植モデルにおける抗腫瘍効果	C57BL/6マウス MC38.OVA 皮下移植	PRO314483	*In vivo* 腹腔内	Genentech, Inc.	[redacted]-1033E	4.2.1.1-4
マウス結腸・直腸癌 CT26移植モデルにおける抗腫瘍効果	Balb/c マウス CT26 皮下移植	PRO314483	*In vivo* 腹腔内	Genentech, Inc.	[redacted]-1734D	4.2.1.1-5
マウス悪性黒色腫 Cloudman S91移植モデルにおける抗腫瘍効果	DBA/2マウス Cloudman S91 皮下移植	PRO314483	*In vivo* 腹腔内	Genentech, Inc.	[redacted]-2165I	4.2.1.1-6
マウス肺癌 LLC 移植モデルにおける抗腫瘍効果	C57BL/6マウス LLC 皮下移植	PRO314483	*In vivo* 腹腔内	[redacted]	[redacted]-1269	参考資料 4.2.1.1-7

Atezolizumab: アテゾリズマブ（遺伝子組換え）

PRO304397及びPRO314483: Atezolizumabの誘導体であるヒト／マウスキメラ抗体

試験の種類	試験系	被験物質	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
副次的薬理試験						
LCMV 感染モデルにおける薬効評価	C57BL/6マウス LCMV CL-13 静脈内投与	PRO314483 PRO304397 PRO304135	*In vivo* 腹腔内	Genentech, Inc.	[redacted]-0559A [redacted]-0559B [redacted]-1160	4.2.1.2-1
LCMV 感染モデルにおける IFN-α 発現アデノウイルスとの併用効果	C57BL/6マウス LCMV CL-13 静脈内投与	PRO304397	*In vivo* 腹腔内	Genentech, Inc.	[redacted]-1309A (AMENDMENT 1)	4.2.1.2-2
LCMV 感染モデルにおける宿主反応評価	C57BL/6マウス LCMV CL-13 LCMV Armstrong 静脈内投与	PRO314483	*In vivo* 腹腔内	Genentech, Inc.	[redacted]-2500 [redacted]-2500B [redacted]-2501 [redacted]-2501A	4.2.1.2-3
LCMV 感染モデルにおける病態の機序解析	C57BL/6j マウス RAG-1欠損マウス PD-1欠損マウス LCMV CL-13 LCMV Armstrong 静脈内投与（一部，腹腔内投与）	Clone 10F.9G2	*In vivo* 腹腔内	[redacted]	[redacted]-1394	参考資料 4.2.1.2-4
安全性薬理試験						
カニクイザル 8週間反復投与試験	カニクイザル	Atezolizumab	*In vivo* 静脈内/皮下	[redacted]	[redacted]-1148	4.2.3.2-2
カニクイザル 26週間反復投与試験	カニクイザル	Atezolizumab	*In vivo* 静脈内	[redacted]	[redacted]-3278	4.2.3.2-3

Atezolizumab: アテゾリズマブ（遺伝子組換え）

PRO304397及び PRO314483: Atezolizumab の誘導体であるヒト／マウスキメラ抗体

PRO304135: 抗マウス PD-L1抗体（Isotype: Mouse IgG）

Clone 10F.9G2: 抗マウス PD-L1抗体（Isotype: Rat IgG2b）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 *In vitro* 試験

2.6.3.2.1.1 アテゾリズマブ及びキメラ抗体（PRO314483及び PRO304397）の *in vitro* 薬理活性

資料番号	4.2.1.1-1
報告書 タイトル	In Vitro Binding and Biological Activity of MPDL3280A (rhuMAb PD-L1) ([redacted]-0426_AMENDMENT 1)
評価抗体	(1) アテゾリズマブ（遺伝子組換え）（以下，本薬）: Lot 729339 ・Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いて作製 ・Humanized IgG1 monoclonal antibody ・Fc 領域にアミノ酸置換（N298A）を施すことによって，Fcγ 受容体（Fcγ receptor; FcγR）との結合性を低下させている (2) PRO314483: Lot 59746-5 ・大腸菌（E. coli）を用いて作製 ・本薬の誘導体であるヒト／マウスキメラ抗体（マウス IgG2a のフレームワーク配列に，本薬由来の PD-L1結合配列／可変領域を組み込んで作製） ・Mouse IgG2A ・大腸菌で作製しているため，Fcγ 受容体と効果的に結合するために必要な N 結合型糖鎖が欠如している (3) PRO304397: Lot PUR17510 (K_d, EC_{50}), PUR18594 (IC_{50}) ・CHO 細胞を用いて作製 ・本薬の誘導体であるヒト／マウスキメラ抗体（マウス IgG2a のフレームワーク配列に，本薬由来の PD-L1結合配列／可変領域を組み込んで作製） ・Mouse IgG2A-DANA ・Fc 領域に DANA mutation (D266A, N298A) を導入し，Fcγ 受容体との結合性を低下させている
PD-L1 に対する結合性評価	【試験方法】 (1) ヒト及びマウス PD-L1を発現させた293細胞（ヒト胎児由来腎臓上皮細胞）を用いて，放射性ラベル（^{125}I）された本薬及び PRO304397の結合親和性（K_d: 解離定数）を平衡結合試験により測定した（N＝2）。 (2) ヒト及びカニクイザルの末梢血を採取し，赤血球成分を溶血除去することにより，白血球成分を分画した。次に，phorbol myristate acetate 及び ionomycin で刺激を加え，T 細胞上に PD-L1を発現させた。フローサイトメトリーを用いて，抗CD4抗体と抗 CD8抗体によるマルチカラー染色で CD8陽性 T 細胞を同定し，本薬の結合活性を測定した（N = 4）。また，マウス PD-L1を発現させた293細胞を用いて，本薬（N = 3）及びキメラ抗体（PRO304397 [N = 8] 及び PRO314483 [N = 5]）の結合活性を，同様に測定した。

PD-L1 に対する結合性評価	【結果】 (1) 本薬の K_d は，ヒト PD-L1に対して0.433, 0.400 nmol/L，マウス PD-L1に対して0.134, 0.120 nmol/L であった。また，PRO304397も同様に高い親和性を示し，K_d 値は，ヒト PD-L1に対して0.374, 0.336 nmol/L，マウス PD-L1に対して0.147, 0.188 nmol/L であった。 (2) 本薬の結合活性（EC_{50}: 50%有効濃度）は，活性化 T 細胞上のヒト PD-L1に対して0.395 ± 0.030 nmol/L（平均値 ± 標準偏差，以下同様），カニクイザル PD-L1に対して0.704 ± 0.084 nmol/L であった。293細胞上のマウス PD-L1に対する結合活性は，本薬が0.519 ± 0.025 nmol/L，PRO304397が0.412 ± 0.071 nmol/L，PRO314483が0.433 ± 0.114 nmol/L であった。 以上の結果から，本薬は，ヒト，カニクイザル及びマウスの PD-L1に対して，サブナノモルレベルの親和性をもって，結合することが示された。
B7-1 及び PD-1と PD-L1との結合に対する阻害活性評価	【試験方法】 ヒト及びマウスの PD-1，PD-L1及び B7-1の組換え蛋白を用いた競合 ELISA 法により，本薬及びキメラ抗体（PRO304397, PRO314483）の阻害活性を評価した（N = 3）。 【結果】 本薬は，ヒト PD-L1とその標的受容体 PD-1（IC_{50}: 82.8 ± 40.3 pmol/L，平均値 ± 標準偏差，以下同様）及び B7-1（IC_{50}: 48.4 ± 25.9 pmol/L）との結合を阻害した。また，本薬は，マウス PD-L1とその標的受容体 PD-1（IC_{50}: 104 ± 38.7 pmol/L）及び B7-1（IC_{50}: 75.6 ± 14.8 pmol/L）との結合も阻害した。RO304397及び PRO314483も，ヒト及びマウスの PD-1又は B7-1との結合に対して，本薬と同程度の阻害活性を示した。
Fcγ 受容体との結合性評価	【試験方法】 6種類のヒト Fcγ 受容体（FcγRIA, FcγRIIA-R131, FcγRIIA-H131, FcγRIIB, FcγRIIIA-F158, FcγRIIIA-V158）を用いた ELISA 法により，本薬の Fcγ 受容体との結合性を評価した（duplicate で3回試験を実施）。ヒト化 IgG1の陽性対照物質として trastuzumab を使用した。 【結果】 本薬は，いずれの Fcγ 受容体に対しても，ほとんど結合性を示さなかった。一方，陽性対照として用いた trastuzumab は，すべての Fcγ 受容体に結合した。

2.6.3.2.1.2 本薬（Phase I 及び Phase III 検体）の *in vitro* 結合性評価

資料番号	4.2.1.1-2
報告書 タイトル	In Vitro Binding Affinity of MPDL3280A ([redacted]-0984)
評価抗体	(1) 本薬 (Phase I 検体): Lot 729341 (2) 本薬 (Phase III 検体): Lot 602044
PD-L1 に対する結合性評価	【試験方法】 ヒト PD-L1を発現させた293細胞を用いて，本薬の結合親和性（K_d）を平衡結合試験により測定した（N = 3）。 【結果】 本薬（Phase I 検体）の K_d 値は0.228 ± 0.095 nmol/L，本薬（Phase III 検体）の K_d 値は0.255 ± 0.018 nmol/L であった。

2.6.3.2.2 *In vivo* 試験（腫瘍移植モデル）

2.6.3.2.2.1 マウス結腸・直腸癌 MC38移植モデルにおけるキメラ抗体PRO314483の抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-3
報告書 タイトル	Evaluation of the Anti-Tumor Efficacy of Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody in the Sygeneic MC38 Colorectal Model in C57BL/6 Mice（[redacted]-1883）
材料と方法	使用動物： C57BL/6マウス（雌，入荷時8週齢） 移植細胞： マウス結腸・直腸癌 MC38 ※ Matrigel と1:1で混合し，5×10^6個の細胞を，マウス右側腹部皮下へ移植 実験群構成（N = 10）： 群分け時の平均腫瘍体積は187 mm^3 Group 1: Control 群（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg，TIW × 3週間） Group 2: PRO314483群（Lot 59554.96，10 mg/kg，TIW × 1週間） Group 3: PRO314483群（Lot 59554.96，10 mg/kg，TIW × 2週間） Group 4: PRO314483群（Lot 59554.96，10 mg/kg，TIW × 3週間） 投与方法： 腹腔内投与（IP），週3回（TIW） × 1-3週間
主な 評価項目	腫瘍体積（Tumor Volume; TV）： TV (mm^3) = 長径 × 短径 × 短径 × 0.5 腫瘍増殖阻害率（Tumor Growth Inhibition; %TGI） $\%TGI = [1 - (AUC_{treatment}/day)/(AUC_{control}/day)] \times 100$ AUC (Area under the fitted curve): TV の近似曲線下面積 完全奏効（Complete Response; CR）： TV 値が測定限界（8 mm^3）以下に縮小 部分奏効（Partial Response; PR）： TV 値が試験開始時の半分以下に縮小 無増悪期間（TTP5X）： TV 値が試験開始時の5倍に到達するまでの日数 体重（Body Weight; BW）
結果	PRO314483は，マウス結腸・直腸癌 MC38移植モデルにおいて，TGI 76-103%の抗腫瘍効果を示した。PRO314483投与群（TIW × 2週間，及び TIW × 3週間）では，それぞれ CR 3例と PR 3例が認められ，全奏効率（CR + PR）は60%であった。また，PRO314483投与群の無増悪期間（23.5-50日）は，コントロール群（16.5日）に対して，1.4-3.0倍延長された。なお，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

2.6.3.2.2.2 マウス結腸・直腸癌 MC38.OVA 移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483の抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-4
報告書 タイトル	Evaluation of the Anti-Tumor Efficacy of Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody in the Sygeneic MC38.OVA Colorectal Cancer Model in C57BL/6 Mice（[redacted]-1033E）
材料と方法	使用動物： C57BL/6マウス（雌，入荷時8週齢） 移植細胞： マウス結腸・直腸癌 MC38.OVA（Ovalbumin 発現細胞株） ※ Matrigel と1:1で混合し，5×10^6個の細胞を，マウス右側腹部皮下へ移植 実験群構成（N = 10）： 群分け時の平均腫瘍体積は129 mm^3 Group 1: Control 群（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg，TIW × 3週間） Group 2: PRO314483群（Lot 59554.96，10 mg/kg，TIW × 1週間） Group 3: PRO314483群（Lot 59554.96，10 mg/kg，TIW × 2週間） Group 4: PRO314483群（Lot 59554.96，10 mg/kg，TIW × 3週間） 投与方法： 腹腔内投与（IP），週3回（TIW） × 1-3週間
主な 評価項目	腫瘍体積（Tumor Volume; TV）： TV (mm^3) = 長径 × 短径 × 短径 × 0.5 腫瘍増殖阻害率（Tumor Growth Inhibition; %TGI） $\%TGI = [1 - (AUC_{treatment}/day)/(AUC_{control}/day)] \times 100$ AUC (Area under the fitted curve): TV の近似曲線下面積 完全奏効（Complete Response; CR）： TV 値が測定限界（8 mm^3）以下に縮小 部分奏効（Partial Response; PR）： TV 値が試験開始時の半分以下に縮小 無増悪期間（TTP5X）： TV 値が試験開始時の5倍に到達するまでの日数 体重（Body Weight; BW）
結果	PRO314483投与群では，すべてのマウスで，MC38.OVA 腫瘍の完全退縮が認められた（CR rate: 100%）。腫瘍の完全退縮は，試験終了時の Day 55まで持続した。なお，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

2.6.3.2.2.3 マウス結腸・直腸癌 CT26移植モデルにおけるキメラ抗体PRO314483の抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-5
報告書 タイトル	Evaluation of the Anti-Tumor Efficacy of Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody in the Sygeneic CT26 Colorectal Cancer Model in Balb/c Mice（[redacted]-1734D）
材料と方法	使用動物： Balb/c マウス（雌，入荷時8週齢） 移植細胞： マウス結腸・直腸癌 CT26 ※ 0.1×10^6個の細胞を，マウスの右側腹部皮下へ移植 実験群構成（N = 10）： 群分け時の平均腫瘍体積は180 mm^3 Group 1: Control 群（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg） Group 2: PRO314483群（Lot 59554.96，10 mg/kg） 投与方法： 腹腔内投与（IP），週3回（TIW） × 3週間
主な 評価項目	腫瘍体積（Tumor Volume; TV）： TV (mm^3) = 長径 × 短径 × 短径 × 0.5 腫瘍増殖阻害率（Tumor Growth Inhibition; %TGI） $\%TGI = [1 - (AUC_{treatment}/day)/(AUC_{control}/day)] \times 100$ AUC (Area under the fitted curve): TV の近似曲線下面積 完全奏効（Complete Response; CR）： TV 値が測定限界（8 mm^3）以下に縮小 部分奏効（Partial Response; PR）： TV 値が試験開始時の半分以下に縮小 無増悪期間（TTP5X）： TV 値が試験開始時の5倍に到達するまでの日数 体重（Body Weight; BW）
結果	PRO314483は，マウス結腸・直腸癌 CT26移植モデルにおいて，TGI 92%の抗腫瘍効果を示した。PRO314483投与群では，CR 1例と PR 1例が認められ，全奏効率（CR + PR）は20%であった。また，PRO314483投与群の無増悪期間（27.5日）は，コントロール群（11.5日）に対して，2.4倍延長された。なお，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

2.6.3.2.2.4 マウス悪性黒色腫 Cloudman S91移植モデルにおけるキメラ抗体PRO314483の抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-6
報告書 タイトル	Evaluation of the Anti-Tumor Efficacy of Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody in the Sygeneic Cloudman S91 Melanoma Model in DBA/2 Mice（[redacted]-2165I）
材料と方法	使用動物： DBA/2マウス（雌，入荷時8週齢） 移植細胞： マウス悪性黒色腫 Cloudman S91 ※ 0.1×10^6個の細胞を，マウスの右側腹部皮下へ移植 実験群構成（N = 10）： 群分け時の平均腫瘍体積は174 mm^3 Group 1: Control 群（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg） Group 2: PRO314483群（Lot 59554.96，10 mg/kg） 投与方法： 腹腔内投与（IP），週3回（TIW） × 3週間
主な 評価項目	腫瘍体積（Tumor Volume; TV）： TV (mm^3) = 長径 × 短径 × 短径 × 0.5 腫瘍増殖阻害率（Tumor Growth Inhibition; %TGI） $\%TGI = [1 - (AUC_{treatment}/day)/(AUC_{control}/day)] \times 100$ AUC (Area under the fitted curve): TV の近似曲線下面積 完全奏効（Complete Response; CR）： TV 値が測定限界（8 mm^3）以下に縮小 部分奏効（Partial Response; PR）： TV 値が試験開始時の半分以下に縮小 無増悪期間（TTP5X）： TV 値が試験開始時の5倍に到達するまでの日数 体重（Body Weight; BW）
結果	PRO314483は，マウス悪性黒色腫 Cloudman S91移植モデルにおいて，TGI 78%の抗腫瘍効果を示した。PRO314483投与群では，PR 2例が認められ，全奏効率（CR + PR）は20%であった。また，PRO314483投与群の無増悪期間（14日）は，コントロール群（8日）に対して，1.75倍延長された。なお，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

2.6.3.2.2.5 マウス肺癌 Lewis Lung Carcinoma（LLC）移植モデルにおけるキメラ抗体 PRO314483の抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-7（参考資料）
報告書 タイトル	Evaluation of the Anti-Tumor Efficacy of Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody in the Syngeneic Lewis Lung Carcinoma (LLC) Model in C57BL/6 Mice（[redacted]-1269）
材料と方法	使用動物： C57BL/6マウス（雌，入荷時6-8週齢） 移植細胞： マウス肺癌 Lewis Lung Carcinoma (LLC) ※ Matrigel と1:1で混合し，0.3×10^6個の細胞を，マウス右側腹部皮下へ移植 実験群構成（N = 9）： 群分け時の平均腫瘍体積は107 mm^3 Group 1: Control 群（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg） Group 2: PRO314483群（Lot 59554-96，10 mg/kg） 投与方法： 腹腔内投与（IP），週3回（TIW） × 3週間
主な 評価項目	腫瘍体積（Tumor Volume; TV）： TV (mm^3) = 長径 × 短径 × 短径 × 0.5 腫瘍増殖阻害率（Tumor Growth Inhibition; %TGI） $\%TGI = [1 - (AUC_{treatment}/day)/(AUC_{control}/day)] \times 100$ AUC (Area under the fitted curve): TV の近似曲線下面積 完全奏効（Complete Response; CR）： TV 値が測定限界（8 mm^3）以下に縮小 部分奏効（Partial Response; PR）： TV 値が試験開始時の半分以下に縮小 無増悪期間（TTP5X）： TV 値が試験開始時の5倍に到達するまでの日数 体重（Body Weight; BW）
結果	PRO314483は，マウス肺癌 LLC 移植モデルにおいて，抗腫瘍効果を示さなかった。PRO314483投与群の TGI は-10%であり，全奏効率（CR + PR）は0%であった。また，PRO314483投与群の無増悪期間（6.0日）は，コントロール群（8.0日）と同等であり，無増悪期間の延長は認められなかった。なお，試験期間中の平均体重減少率は5%未満であり，PRO314483の忍容性は良好であった。

2.6.3.3 副次的薬理試験（LCMV 感染モデル）

2.6.3.3.1 リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（Lymphocytic Choriomeningitis Virus; LCMV）感染モデルにおける抗 PD-L1抗体の薬効評価

資料番号	4.2.1.2-1
報告書 タイトル	Therapeutic Efficacy and Dose Titration of Anti-PD-L1 mAb in the Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection Model（[redacted]-0559A, [redacted]-0559B, [redacted]-1160）
材料と方法	評価抗体： (1) PRO314483: Lot 59746.5 (2) PRO304397: Lot PUR17510 (3) PRO304135: Lot 59746.9 ※ PRO304135は，CHO 細胞を用いて作製した抗 PD-L1マウス抗体（mouse IgG） 使用動物： C57BL/6マウス（雌，入荷時8-10週齢） LCMV CL-13感染： 2×10^6 PFU (Plaque Formation Unit) を静脈内投与（IV） ※ LCMV 感染6-7日後に，血中のウイルス力価を測定し，群分けを実施
[redacted]-0559A	実験群構成（N = 5）： 腹腔内投与（IP），週3回（TIW）× 1-2週間 Group 1: Control 群（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg，TIW × 1，Days 14-21） Group 2: Anti-PD-L1群（PRO314483，10 mg/kg，TIW × 1，Days 14-21） Group 3: Control 群（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg，TIW × 2，Days 14-28） Group 4: Anti-PD-L1群（PRO314483，10 mg/kg，TIW × 2，Days 14-28） 結果： LCMV 感染14日目から，抗 PD-L1抗体を1週間投与すると，血中，肝臓，肺，腎臓のウイルス力価は，対照群に対して有意に減少した。脳でも有意ではないが，減少傾向はみられた。2週間投与では，更に強い減少効果が得られ，血中のウイルスは，5例中3例で検出されなかった。なお，抗 PD-L1抗体投与群の脾臓では，LCMV 由来 gp33ペプチドに反応する CD107a 発現あるいは IFN-γ 産生 CD8陽性 T 細胞の割合が増加しており，LCMV 特異的な CD8陽性 T 細胞の機能増強が推察された。
[redacted]-0559B	主な実験群構成（N = 5）： 腹腔内投与，単回又は2回 Group 1: Control 群（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg，Day 7に単回投与） Group 2: Anti-PD-L1群（PRO314483，10 mg/kg，Day 7に単回投与） Group 3: Anti-PD-L1群（PRO304397，10 mg/kg，Day 7に単回投与） Group 4: Anti-PD-L1群（PRO304135，10 mg/kg，Day 7に単回投与） Group 5: Non-treated Control 群（LCMV 感染あり） Group 6: Non-treated Control 群（LCMV 感染なし） Group 7: Control 群（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg，Day 17及び Day 19に投与） Group 8: Anti-PD-L1群（PRO314483，10 mg/kg，Day 17及び Day 19に投与） Group 9: Anti-PD-L1群（PRO304397，10 mg/kg，Day 17及び Day 19に投与） Group 10: Anti-PD-L1群（PRO304135，10 mg/kg，Day 17及び Day 19に投与） Group 11: Non-treated Control 群（LCMV 感染あり） Group 12: Non-treated Control 群（LCMV 感染なし） 結果： LCMV 感染後17及び19日目（感染の慢性期）に，抗 PD-L1抗体を投与した場合には，感染後20日目の時点で全例のマウスが生存したが，感染後7日目（感染の急性期）に投与した場合には，投与1～3日後にかけて60-100%のマウスが死亡した。

[redacted]-1160	実験群構成（N = 5）： 腹腔内投与，週3回 × 2週間（Days 17-28） Group 1, 5, 9: Control 群（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg） Group 2, 6, 10: Anti-PD-L1群（PRO304397，10 mg/kg） Group 3, 7, 11: Anti-PD-L1群（PRO304397，2 mg/kg） Group 4, 8, 12: Anti-PD-L1群（PRO304397，0.5 mg/kg） ウイルス力価測定： Day 31 (G1-4), Day 38 (G5-8), Day 47 (G9-12) 結果： Day 31の血中，肝臓，肺，腎臓におけるウイルス力価は，抗 PD-L1抗体の2又は10 mg/kg 投与によって，Control 群と比較して有意に減少した。脳では，抗 PD-L1抗体投与によってウイルス力価の減少傾向はみられたものの，Control 群との間で有意差は認められなかった。一方，0.5 mg/kg 投与では，血中と肝臓のウイルス力価は有意に減少したが，肺，腎臓，脳では有意差は認められなかった。なお，Day 38と47では，すべての投与量及び臓器において，Control 群との間で有意差は認められなかった。

2.6.3.3.2 LCMV 感染モデルにおける抗 PD-L1抗体とインターフェロンα（IFN-α）発現アデノウイルスの併用効果

資料番号	4.2.1.2-2
報告書 タイトル	Evaluation of the Combined Effects of Adenovirus Expressed Interferon-alpha (IFN-a) and Anti-PD-L1 mAb in Mice Infected with Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV)（[redacted]-1309A_AMENDMENT 1）
材料と方法	使用動物： C57BL/6マウス（雌，入荷時8-10週齢） LCMV CL-13感染： 2×10^6 PFU (Plaque Formation Unit) を静脈内投与（IV） ※ LCMV 感染8日後に，血中のウイルス力価を測定し，群分けを実施 アデノウイルス感染： コントロールウイルス（Ad5-LacZ）又は IFN-α 発現ウイルス（Ad5-IFN-α）は，LCMV 感染17日後に，1×10^9 PFU で IV 投与 抗体投与： コントロール抗体（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg）又は抗 PD-L1抗体（PRO304397，10 mg/kg）は，LCMV 感染21日後から，週3回で2週間（Days 21-35），腹腔内投与（IP） 主な実験群構成（N = 5）： Group 1: Ad5-LacZ + Anti-gp120 Group 2: Ad5-LacZ + Anti-PD-L1 Group 3: Ad5-IFN-α + Anti-gp120 Group 4: Ad5-IFN-α + Anti-PD-L1 LCMV ウイルス力価測定（Day 35）： 血中，腎臓，脳
結果	血中の LCMV ウイルス力価は，Group 2-4（単独又は併用治療）において，検出限界以下まで減少した。Ad5-IFN-α 又は抗 PD-L1抗体の単独治療のみで十分な効果が得られたため，併用効果をみるには至らなかった。 腎臓の LCMV ウイルス力価は，Group 2-4（単独又は併用治療）において，有意に減少した。Ad5-IFN-α 単独治療で8倍，抗 PD-L1抗体単独治療で26倍の LCMV ウイルス減少効果が得られた。一方，併用治療による減少効果は14倍であり，併用による上乗せ効果は認められなかった。 脳においては，Group 2-4（単独又は併用治療）において，ウイルス力価の減少傾向はみられたものの，有意差は認められなかった。 なお，本試験では，LCMV 感染の慢性期（Day 17以降）に，アデノウイルスを感染させ，その急性期（アデノウイルス感染から4日後以降）に抗 PD-L1抗体を投与したが，マウスに有害事象や死亡などのイベントは惹起されなかった。

2.6.3.3.3 LCMV Armstrong 株及び CL-13株感染モデルにおける抗 PD-L1抗体単回投与後の宿主反応評価

資料番号	4.2.1.2-3
報告書 タイトル	Evaluation of the Host Response to Armstrong and CL-13 Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) Infection in Mice following Administration of a Single Dose of Anti-PD-L1 Antibody at Different Times during Infection（[redacted]-2500, [redacted]-2500B, [redacted]-2501, [redacted]-2501A）
材料と方法	使用動物： C57BL/6マウス（雌，入荷時8-10週齢） LCMV Armstrong 株又は CL-13株感染： 2×10^6 PFU を IV 投与（Day 0） 抗体投与（N = 8/timepoint）： コントロール抗体（Anti-gp120 mAb，10 mg/kg）又は抗 PD-L1抗体（PRO314483 [Lot 59746-5]，10 mg/kg）を，Armstrong モデルでは Day 0, 3, or 7に，CL-13モデルでは Day 2, 7, or 17に，それぞれ単回投与 ※ ウイルス力価のピーク： Armstrong は Day 3，CL-13は Day 7 主な評価項目： LCMV ウイルス力価（血液及び主な感染臓器），LCMV 由来 gp33ペプチドに反応する CD107a 発現あるいは IFN-γ 産生 CD8陽性 T 細胞の割合，血中又は脾臓中のリンパ球数の計測と表面抗原のフローサイトメトリー解析，マウス血清中の各種サイトカイン濃度，各種臓器の病理評価等
結果	CL-13株感染マウスは，Armstrong 株感染マウスよりも，高い値のウイルス力価を示し（10^3～10^4倍），感染期間も長期持続した（Armstrong 株は10日間で検出限界以下になったのに対して，CL-13株は20日間経過しても残存した）。 CL-13株感染マウスに，抗 PD-L1抗体を単回投与した結果，Day 2投与では Day 7に8例中3例（37.5%），Day 7投与では2-4日で8例中8例（100%）のマウスが死亡した。感染の慢性期である Day 17投与では，死亡例はみられなかった。一方，Armstrong 株感染マウスでは，いずれのタイミングで抗 PD-L1抗体を投与しても，死亡例はみられなかった。 Armstrong 株感染マウスでは，CL-13株感染マウスと比べて，脾臓中の LCMV 特異的 CD8陽性 T 細胞数が増加しており（3-4倍），抗 PD-L1抗体の投与によって，その数は更に増加した。Armstrong 株感染モデルで死亡例がみられなかったことから，CD8陽性 T 細胞の絶対数増加と死亡例発生との間に，関連性はないことが判明した。 一方，CL-13株感染マウスの血清中 TNF-α 及び IFN-γ のレベルは，Armstrong 株感染マウスと比べて，抗 PD-L1抗体投与によって顕著に増加した。CD8陽性 T 細胞の絶対数は少ないにもかかわらず，これらサイトカインレベルが増加したことから，T 細胞の機能増強が考えられた。 また，CL-13株感染マウスでは，CD8陽性 T 細胞の PD-1発現レベルは，抗 PD-L1抗体投与によって，Armstrong 株感染マウスよりも顕著に増加することが示された。 以上の結果から，CL-13株感染急性期における抗 PD-L1抗体投与による死亡例発生は，高ウイルス負荷状態で，CD8陽性 T 細胞の機能が亢進されたことに起因するものと推察された。

2.6.3.3.4 LCMV 感染モデルにおいて抗 PD-L1抗体によって促進される病態の機序解析： CL-13株と Armstrong 株の比較

資料番号	4.2.1.2-4（参考資料）
報告書 タイトル	Studies to Address Mechanism of Anti-PD-L1 Enhanced Pathology in Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) Infection: Comparisons between Clone-13 and Armstrong Strains（[redacted]-1394）
材料と方法	使用動物： (1) C57BL/6j マウス（雌，入荷時8-10週齢） (2) RAG-1欠損マウス（B6.129S7-*Rag1*^{tm1Mom}/J，雌）→ T／B 細胞欠損 (3) PD-1欠損マウス（雌） LCMV CL-13株又は Armstrong 株感染： 2×10^6 PFU を IV 投与（Day 0） ※ Experiment 2では，Armstrong 株は 2×10^5 PFU を IP 投与（Day 0） 使用抗体： (1) コントロール抗体（Rat IgG2b isotype control, LTF-2, 200 μg/mouse, IP 投与） (2) 抗 PD-L1抗体（Clone 10F.9G2, 200 μg/mouse, IP 投与） (3) 抗 PD-1抗体（Clone 29F-1A12, 200 μg/mouse, IP 投与） ※ (2)及び(3)の抗体は，[redacted] より入手
Experiment 1	実験群構成（C57BL/6j, N = 6）： Armstrong 株（G1-2），CL-13株（G3-5） Group 1: コントロール抗体投与（Days 3, 6, 9） Group 2: 抗 PD-L1抗体投与（Days 3, 6, 9） Group 3: コントロール抗体投与（Days 3, 6） Group 4: 抗 PD-1抗体投与（Days 3, 6） Group 5: 抗 PD-L1抗体投与（Days 3, 6） 結果： CL-13株感染マウス（G3，コントロール抗体）では，Day 8から Day 12にかけて（感染の急性期），マウスの体重は約20%減少したが，死亡例は発生しなかった。しかしながら，抗 PD-1抗体（G4）又は抗 PD-L1抗体（G5）を投与すると，Day 6から Day 9にかけて，すべてのマウスが死亡した。一方，Armstrong 株感染マウスでは，抗 PD-L1抗体（G2）を投与しても，死亡例は発生しなかった。
Experiment 2（抗体投与なし）	実験群構成： Armstrong 株（G1-2），CL-13株（G3-4） Group 1（C57BL/6j マウス, N = 8） Group 2（PD-1欠損マウス, N = 8） Group 3（C57BL/6j マウス, N = 5） Group 4（PD-1欠損マウス, N = 5） 結果： PD-1欠損マウスは，CL-13感染（G4）によって，Day 8までに全例死亡した。一方，Armstrong 株感染（G2）では，死亡例は発生しなかった。
Experiment 3	実験群構成（RAG-1欠損マウス, N = 3）： CL-13株 Group 1: コントロール抗体投与（Day 5） Group 2: 抗 PD-L1抗体投与（Day 5） 結果： RAG-1欠損マウスに CL-13株を感染させ，抗 PD-L1抗体を投与しても，体重減少や死亡例はみられなかった。

Experiment 4	試験デザイン： Day 0: CL-13株感染 Day -2, 0, 2: 抗 CD4抗体（GK1.5）又は抗 CD8抗体（2.43），500 μg/mouse，IP Day 5: 抗 PD-L1抗体投与 実験群構成： Group 1 (N = 3): No depletion Group 2 (N = 4): CD4 depletion Group 3 (N = 11): CD8 depletion Group 4 (N = 11): CD4/CD8 depletion 結果： 抗 CD8抗体によって CD8陽性 T 細胞を除去した場合（G3及び G4），抗 PD-L1抗体を投与しても，マウスは全例生存し，死亡例は発生しなかった。一方，CD4陽性 T 細胞のみを除去した場合（G2）は，どちらも除去しなかった場合（G1）と同様に，全例死亡した。
Experiment 5	試験デザイン： Day 0: CL-13株感染 Day -2, 0, 2: 抗 CD8抗体（2.43），500 μg/mouse，IP Day 5: コントロール抗体又は抗 PD-L1抗体投与 Day 7, 9: 血清採取，サイトカイン測定（IFN-γ, TNF-α, IL-6, MCP-1, MIG） 実験群構成： Group 1 (N = 54): No depletion，コントロール抗体 Group 2 (N = 81): No depletion，抗 PD-L1抗体 Group 3 (N = 40): CD8 depletion，抗 PD-L1抗体 結果： 抗 PD-L1抗体を投与したマウス（G2）では，コントロールマウス（G1）と比較して，血清のサイトカインレベルは有意に上昇した。一方，CD8陽性 T 細胞を除去すると，サイトカインレベルの上昇は強く抑制された。
Experiment 6	試験デザイン： Day 0: CL-13株感染（2×10^6 PFU, IP）又は Armstrong 株感染（2×10^5 PFU, IP） Day -2, 0, 2: 抗 CD4抗体（GK1.5）又は抗 CD8抗体（2.43），500 μg/mouse，IP Day 8, 15, 30: IL-2投与（1500 IU） 結果： CL-13株感染マウスに，IL-2を Day 8又は Day 15に投与すると全例死亡したが，Day 30投与では死亡例は発生しなかった。一方，Armstrong 株感染マウスでは，IL-2を Day 8に投与しても，死亡例は発生しなかった。また，CL-13株感染マウスにおいて，CD8陽性 T 細胞を除去すると，IL-2を Day 8に投与しても，死亡例は発生しなかった。

2.6.3.4 安全性薬理試験

試験項目	試験系	投与期間 ／投与方法	投与量 （mg/kg/週）	結果	資料番号
中枢神経系					
一般症状 体温 神経行動学的検査	カニクイザル 雌雄各5例／群	8週間 IV/SC 投与	IV/SC: 0 IV: 5, 15, 50 SC: 15, 50	影響なし	4.2.3.2-2
	カニクイザル 雌雄各5例／群	26週間 IV 投与	IV: 0, 5, 15, 50	影響なし	4.2.3.2-3
心血管系					
体表心電図 血圧	カニクイザル 雌雄各5例／群	8週間 IV/SC 投与	IV/SC: 0 IV: 5, 15, 50 SC: 15, 50	影響なし	4.2.3.2-2
テレメトリー （心電図，平均動脈圧，心拍数，体温）	カニクイザル 雌雄各3例／群	8週間 IV 投与	IV: 0, 50	影響なし	
体表心電図 血圧	カニクイザル 雌雄各5例／群	26週間 IV 投与	IV: 0, 5, 15, 50	影響なし	4.2.3.2-3
呼吸器系					
呼吸数 血中酸素飽和度	カニクイザル 雌雄各5例／群	8週間 IV/SC 投与	IV/SC: 0 IV: 5, 15, 50 SC: 15, 50	影響なし	4.2.3.2-2
呼吸数	カニクイザル 雌雄各5例／群	26週間 IV 投与	IV: 0, 5, 15, 50	影響なし	4.2.3.2-3

IV: 静脈内，SC: 皮下

2.6.3.5 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，実施しなかった。