2.6.1　緒言

デュルバルマブ

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次 頁

目次 2
略語及び専門用語一覧表 3
2.6.1.1 緒言 4
2.6.1.2 デュルバルマブの一般的な情報 7
2.6.1.2.1 名称 7
2.6.1.2.2 一般的特性 7
2.6.1.2.3 処方 7
2.6.1.2.4 安定性 7
2.6.1.2.5 構造 7
2.6.1.2.6 効能・効果（案） 7
2.6.1.2.7 用法・用量（案） 7
2.6.1.3 参考文献 8

表目次

表 1 各種腫瘍細胞における PD-L1 の発現 5

図目次

図 1 T 細胞の活性化における重要なシグナル 4
図 2 複数の部位で生じる PD-L1 シグナル伝達による抗腫瘍 T 細胞反応の抑制 6

略語及び専門用語一覧表

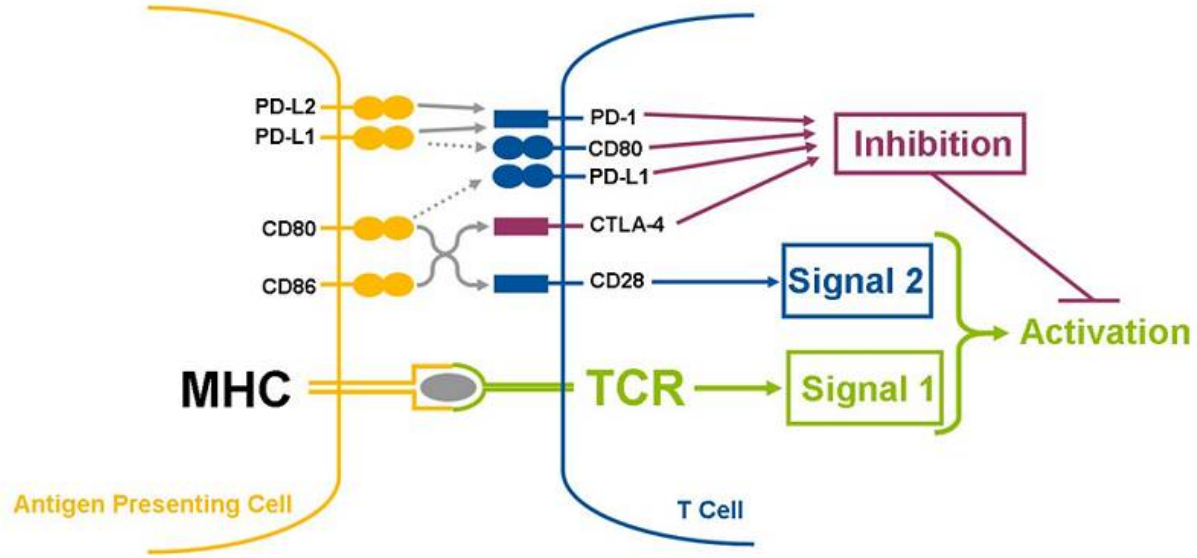
本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4: 細胞傷害性 T リンパ球抗原 4
Fc	fragment crystallisable: 結晶形成フラグメント
Fcγ	fragment crystallizable gamma: 結晶形成フラグメントγ
Ig	Immunoglobulin: 免疫グロブリン
IgG	Immunoglobulin G: 免疫グロブリン G
IgG1κ	Immunoglobulin G1 kappa: 免疫グロブリン G サブクラス 1、κ型アイソタイプ
PD-1	programmed cell death 1（別名：CD279）
PD-L1	programmed cell death ligand 1（別名：B7-H1、CD274）
PD-L2	programmed cell death ligand 2（別名：B7-DC、CD273）

2.6.1.1　　緒言

アストラゼネカ社は、様々な癌の患者に対する治療薬としてデュルバルマブ（遺伝子組換え）（以下、デュルバルマブ、研究所コード：MEDI4736）の開発を進めている。デュルバルマブは、ヒト programmed cell death ligand 1（PD-L1、別名：B7-H1、CD274）に対するヒト免疫グロブリン G サブクラス 1、κ型アイソタイプ（IgG1 κ）モノクローナル抗体である。PD-L1 は、T 細胞活性化の制御に関与する受容体-リガンドの複合システムに属する（図 1）。PD-L1 は、2 種類の受容体、即ち programmed cell death 1（PD-1、別名：CD279）及び CD80（別名：B7-1）に結合し、これら両受容体との相互作用を介して T 細胞に不活性化シグナルを伝達することにより（Keir et al 2008, Park et al 2010）、体内の様々な部位で免疫反応を調節する。この抑制性のシグナル伝達機構は、PD-L1 を発現している腫瘍によって免疫系による検出と排除から逃れる手段としても利用される。

図 1　　T 細胞の活性化における重要なシグナル



T 細胞は 2 つのシグナル伝達により活性化される。そのうちのシグナル 1 は、T 細胞上の T 細胞受容体が抗原提示細胞（APC）上の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子を介して提示された抗原を認識したときに伝達される一次活性化シグナルである。シグナル 2 は、T 細胞上の CD28 がその 2 つのリガンド、CD80 又は CD86 に結合したときに伝達されるシグナル（共刺激シグナル）である。シグナル 1 とシグナル 2 が共に伝達されることにより、完全な T 細胞の活性化が誘導される。このような T 細胞の活性化は、T 細胞に対して抑制性のシグナルを伝達する一連の受容体によって制御され、これらの受容体は T 細胞が活性化されると T 細胞表面上でアップレギュレーションされる。最も重要な抑制性シグナルは、①T 細胞上の細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（CTLA-4）と APC 上の CD80 又は CD86 との結合、及び②T 細胞上の programmed cell death 1（PD-1）と APC 上の programmed cell death ligand 1（PD-L1）又は programmed cell death ligand 2（PD-L2）との結合を介して伝達される 2 つのシグナルである。PD-L1 は CD80 にも結合するため、抑制性のシグナルをさらに伝達する。このような PD-L1 と CD80 との二方向性のシグナルにより、T 細胞に対する抑制性のシグナル伝達が増大する。

デュルバルマブは、遺伝子組換えヒト PD-L1 で予め免疫したゼノマウス®（Xenomouse®）から得たハイブリドーマのスクリーニングによって同定された。デュルバルマブはハイブリドーマか

ら得られた IgG2 の定常領域を IgG1 の定常領域に変えることによって生成されたものである。デュルバルマブは定常領域に 3 箇所のアミノ酸変異を導入しているため、補体タンパク C1q への結合能の低下と共に、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を惹起する結晶形成フラグメント γ（Fcγ）受容体に対する Fc 領域の親和性が低下している（Oganesyan et al 2008）。そのためデュルバルマブでは補体依存性細胞傷害（CDC）活性及び ADCC 活性が大幅に低下している（Stewart et al 2015）。デュルバルマブが PD-L1 と結合すると、PD-L1 と免疫細胞上に発現している PD-1 及び CD80 との相互作用が阻害される。この作用により、抗腫瘍免疫に対する PD-L1 を介した阻害作用に拮抗できると考えられる。PD-L1 機能の阻害は T 細胞の再活性化につながるが、この作用機序は CD28 のような共刺激受容体に対する直接的なアゴニスト作用とは異なっている。

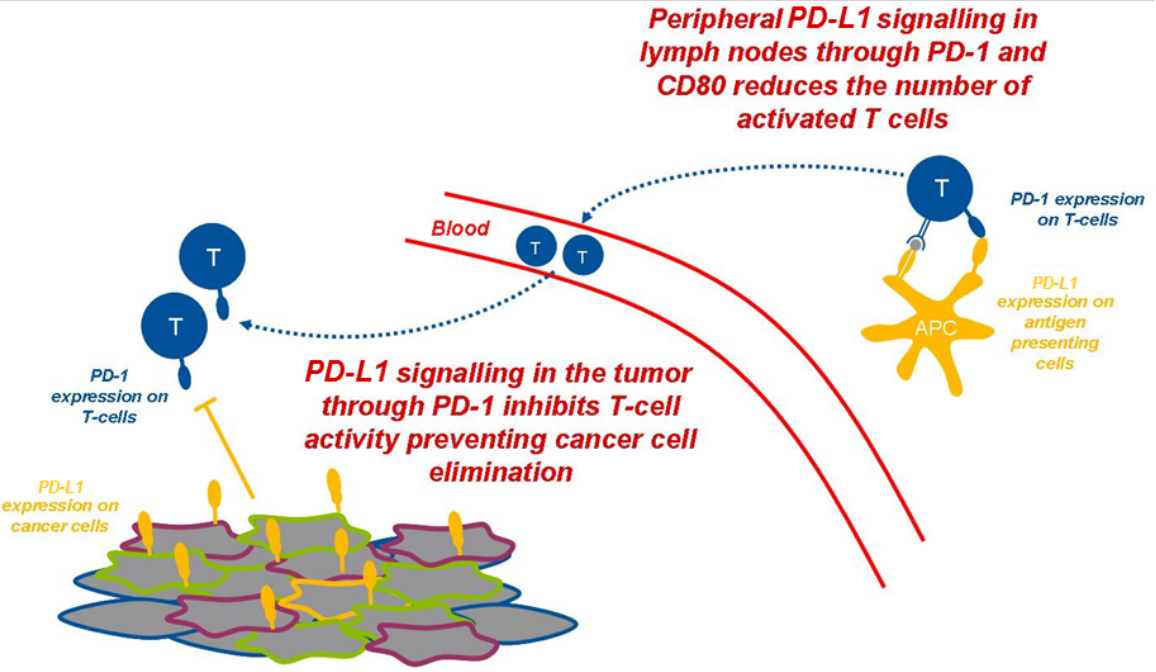
PD-L1 は、CD80、CD86 及び PD-L2（別名：B7-DC、CD273）とは異なり、免疫系細胞だけでなく最大で 88%に達する高い頻度で、様々な腫瘍において発現が認められる（表 1）。肺癌（Mu et al 2011）、腎癌（Thompson et al 2005, Thompson et al 2006, Krambeck et al 2007）、膵癌（Nomi et al 2007, Loos et al 2008, Wang et al 2010）、卵巣癌（Hamanishi et al 2007）を含む多くの癌で、腫瘍細胞における PD-L1 の発現には、生存期間の短縮や予後不良との関連性が認められている。例えば、PD-L1 の発現が低い卵巣癌患者の 5 年生存率は 80.2%であるのに対して、PD-L1 の発現が高い患者では 52.6%であった（Hamanishi et al 2007）。肺癌では、腫瘍に PD-L1 が発現している患者では 3 年を超える生存者は 20%のみであったが、PD-L1 が発現していない患者では 49%であった（Mu et al 2011）。

表 1　　各種腫瘍細胞における PD-L1 の発現

腫瘍細胞の種類	PD-L1 陽性率（%）	PD-L1 陽性率範囲（%）	患者数	試験数	参考文献
悪性黒色腫	88	67 to 100	34	2	Dong et al 2002, Gadiot et al 2011
肺癌	73	53 to 100	196	4	Dong et al 2002, Brown et al 2003, Konishi et al 2004, Mu et al 2011
卵巣癌	72	33 to 87	96	3	Dong et al 2002, Brown et al 2003, Hamanishi et al 2007
胃癌	43	42 to 67	105	2	Brown et al 2003, Sun et al 2007
結腸直腸癌	53	48 to 100	89	3	Dong et al 2002, Brown et al 2003, Liu et al 2009
膵臓癌	48	39 to 55	202	4	Nomi et al 2007, Loos et al 2008, Geng et al 2008, Wang et al 2010
肝臓癌	26	25 to 100	244	2	Brown et al 2003, Gao et al 2009
乳癌	35	29 to 75	125	3	Brown et al 2003, Ghebeh et al 2006, Ghebeh et al 2007
腎臓癌	34	23 to 66	800	3	Thompson et al 2005, Thompson et al 2006, Krambeck et al 2007
膀胱癌	24	12 to 67	715	5	Brown et al 2003, Inman et al 2007, Nakanishi et al 2007, Boorjian et al 2008, Wang et al 2009

PD-L1 は体内の様々な部位で、生体免疫システムと腫瘍の間では免疫系による検出と排除を回避するために腫瘍によって利用される（図 2）。リンパ節では、抗原提示細胞上の PD-L1 が活性化 T 細胞の PD-1 又は CD80 と結合し、T 細胞に対して抑制性のシグナルを伝達する（Keir et al 2008, Park et al 2010）。その結果、活性化 T 細胞は抑制され、循環血中では活性化 T 細胞の数が減少する。腫瘍周辺の微小環境では、腫瘍細胞上に発現した PD-L1 は、腫瘍に到達した活性化 T 細胞上の PD-1 に結合する。これにより、T 細胞には抑制性のシグナルが伝達され、標的となった腫瘍細胞の殺滅が阻止され、腫瘍は免疫系の攻撃から免れる（Zou and Chen 2008）。

図 2　　複数の部位で生じる PD-L1 シグナル伝達による抗腫瘍 T 細胞反応の抑制



PD-L1 とその受容体との相互作用を阻害する抗体は PD-L1 依存性の免疫抑制作用を軽減し、抗腫瘍 T 細胞の細胞傷害活性を増強し得ることが *in vitro* 試験で明らかにされている（Blank et al 2006）。悪性黒色腫、結腸直腸癌、肺癌を含む多くの癌において、腫瘍浸潤リンパ球、具体的には細胞傷害性 T 細胞の数は、予後の改善と相関しており（Pages et al 2010）、抗腫瘍免疫応答は癌患者にベネフィットをもたらすことが示唆されている。これらの知見に基づくと、抗 PD-L1 抗体は抗腫瘍免疫応答を増強することにより癌患者の治療に用いることができると考えられる。マウスの腫瘍モデルを用いた複数の非臨床試験の結果からもこの仮定は支持されており、これらの試験では PD-L1 又はその受容体である PD-1 に対する抗体は抗腫瘍効果を発揮することが明らかにされている（Iwai et al 2002, Hirano et al 2005, Zhang et al 2008, Okudaira et al 2009）。

デュルバルマブはヒト PD-L1 に高い親和性を示し、生化学分析において組換えヒト PD-L1 と組換えヒト PD-1 及び組換えヒト CD80 との両相互作用を完全に阻害することが確認された。*In vitro* において、デュルバルマブは組換えヒト PD-L1 存在下に培養した初代ヒト T 細胞の増殖及び活性化を増強した。また、ヒト腫瘍のマウス異種移植モデルを用いた *in vivo* 試験で、デュルバルマブは投与量及び T 細胞依存性にヒト腫瘍細胞の増殖を抑制した。

2.6.1.2 デュルバルマブの一般的な情報

2.6.1.2.1 名称

本剤の一般的名称（JAN）はデュルバルマブ（遺伝子組換え）であり、国際一般名（INN）は durvalumab である。MEDI4736 は本剤の研究所コードである。また、2.14H9 及び Germ_2.14H9 としても知られている。

2.6.1.2.2 一般的特性

デュルバルマブはヒト IgG1 κモノクローナル抗体であり、糖鎖を含む全体の分子量は約 149000 である。インタクトタンパク質の実測分子量及びペプチドマップは、DNA 配列に基づいて想定された一次構造に一致している。デュルバルマブは、2 分岐複合型 N 結合糖鎖が各重鎖の 301 番残基のアスパラギンに結合している。

2.6.1.2.3 処方

デュルバルマブの処方については 3.2.P.1 項に記載されている。

2.6.1.2.4 安定性

デュルバルマブの安定性については 3.2.S.7.1 項及び 3.2.P.8.1 項に記載されている。

2.6.1.2.5 構造

デュルバルマブの重鎖及び軽鎖の推定アミノ酸配列については 3.2.S.1.2 項に示されている。

2.6.1.2.6 効能・効果（案）

切除不能な局所進行の非小細胞肺癌

2.6.1.2.7 用法・用量（案）

通常、成人にはデュルバルマブ（遺伝子組換え）として、1 回 10mg/kg（体重）を 2 週間間隔で 60 分間以上かけて点滴静注する。

2.6.1.3 参考文献

Blank et al 2006

Blank C, Kuball J, Voelkl S, Wiendl H, Becker B, Walter B, et al. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. Int J Cancer. 2006;119(2):317-27.

Boorjian et al 2008

Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, Farmer SA, Lohse CM, Kuntz SM, et al. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. Clin Cancer Res. 2008;14(15):4800-8.

Brown et al 2003

Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. J Immunol. 2003;170(3):1257-66.

Dong et al 2002

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(8):793-800.

Gadiot et al 2011

Gadiot J, Hooijkaas AI, Kaiser AD, van Tinteren H, Blank C. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. Cancer. 2011;117(10):2192-201.

Gao et al 2009

Gao Q, Wang X, Qiu S, Yamato I, Sho M, Nakajima Y, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res. 2009;15(3):971-9.

Geng et al 2008

Geng L, Huang D, Liu J, Qian Y, Deng J, Li D, et al. B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression. J Cancer Res Clin Oncol. 2008;134(9):1021-7.

Ghebeh et al 2006

Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. Neoplasia. 2006;8(3):190-8.

Ghebeh et al 2007

Ghebeh H, Tulbah A, Mohammed S, Elkum N, Bin Amer SM, Al-Tweigeri T, et al. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. Int J Cancer. 2007;121(4):751-8.

Hamanishi et al 2007

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 USA. 2007;104(9):3360-5.

Hirano et al 2005

Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity. Cancer Res. 2005;65(3):1089-96.

Inman et al 2007

Inman BA, Sebo TJ, Frigola X, Dong H, Bergstralh EJ, Frank I, et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. Cancer. 2007;109(8):1499-505.

Iwai et al 2002

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 USA. 2002;99(19):12293-7.

Keir et al 2008

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2008;26:677-704.

Konishi et al 2004

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(15):5094-100.

Krambeck et al 2007

Krambeck AE, Dong H, Thompson RH, Kuntz SM, Lohse CM, Leibovich BC, et al. Survivin and B7-H1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2007;13(6):1749-56.

Liu et al 2009

Liu SM, Liu GH, Zhang QX, Liu ZJ. Expression of B7-H1 and its significance in colon cancer. World Chinese Journal of Digestology. 2009;17(8):841-3.

Loos et al 2008

Loos M, Giese NA, Kleeff J, Giese T, Gaida MM, Bergmann F, et al. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. Cancer Lett. 2008;268(1):98-109.

Mu et al 2011

Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. Med Oncol. 2011;28(3):682-8.

Nakanishi et al 2007

Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. Cancer Immunol and Immunother. 2007;56(8):1173-82.

Nomi et al 2007

Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(7):2151-7.

Oganesyan et al 2008

Oganesyan V, Gao C, Shirinian L, Wu H, Dall'Acqua WF. Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008; 64(6):700-4.

Okudaira et al 2009

Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, Okada Y, Komoto S, Watanabe C, et al. Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. Int J Oncol. 2009;35(4):741-9.

Pages et al 2010

Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. Oncogene. 2010;29(8):1093-102.

Park et al 2010

Park J, Omiya R, Matsumura Y, Sakoda Y, Kuramasu A, Augustine MM, et al. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. Blood. 2010;116(8):1291-8.

Stewart et al 2015

Stewart R, Morrow M, Hammond SA, Mulgrew K, Marcus D, Poon, E, et al. Identification and characterization of MEDI4736, an antagonist anti-PD-L1 monoclonal antibody. Cancer Immunol Res. 2015;3(9):1052-62.

Sun et al 2007

Sun J, Xu K, Wu C, Wang Y, Hu Y, Zhu Y, et al. PD-L1 expression analysis in gastric carcinoma tissue and blocking of tumor-associated PD-L1 signaling by two functional monoclonal antibodies. Tissue Antigens. 2007;69(1):19-27.

Thompson et al 2005

Thompson RH, Gillett MD, Chevillem JC, Lohsem CM, Dongm H, Webster WS, et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. Cancer. 2005;104(10):2084-91.

Thompson et al 2006

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(7):3381-5.

Wang et al 2009

Wang Y, Zhuang Q, Zhou S, Hu Z, Lan R. Costimulatory molecule B7-H1 on the immune escape of bladder cancer and its clinical significance. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2009;29(1):77-9.

Wang et al 2010

Wang L, Ma Q, Chen X, Guo K, Li J, Zhang M. Clinical significance of B7-H1 and B7-1 expressions in pancreatic carcinoma. World J Surg. 2010;34(5):1059-65.

Zhang et al 2008

Zhang C, Wu S, Xue X, Li M, Qin X, Li W, et al. Anti-tumor immunotherapy by blockade of the PD-1/PD-L1 pathway with recombinant human PD-1-IgV. Cytotherapy. 2008;10(7):711-9.

Zou and Chen 2008

Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol. 2008;8(6):467-77.

2.6.2　薬理試験の概要文

デュルバルマブ

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次　　頁

目次 2
略語及び専門用語一覧表 5
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 10
2.6.2.2.1 *In vitro* 試験 10
2.6.2.2.1.1 ヒト、マウス、ラット及びカニクイザルの PD-L1 の配列相同性解析（試験 ONC4736-00[redacted]）及び 95 位のアルギニンに依存したデュルバルマブの遺伝子組換えヒト PD-L1 への結合（試験 ONC4736-00[redacted]） 10
2.6.2.2.1.2 ヒト及びカニクイザル PD-L1 に対するデュルバルマブの高親和性（試験 ONC4736-00[redacted]）、並びに、関連するアミノ酸配列又は機能をもつヒトタンパク質及びマウス PD-L1 と比較したヒト PD-L1 に対するデュルバルマブの結合特異性（試験 ONC4736-00[redacted]） 10
2.6.2.2.1.3 ヒト PD-1 又は CD80 とヒト PD-L1 との結合に対するデュルバルマブの阻害作用（試験 ONC4736-00[redacted]）、及び、PD-L1 による初代ヒト T 細胞の抑制に対するデュルバルマブの *in vitro* 拮抗作用（試験 ONC4736-00[redacted]） 11
2.6.2.2.1.4 ドナー別にみた初代 T 細胞における *in vitro* でのデュルバルマブの効力（試験 ONC4736-00[redacted]） 13
2.6.2.2.1.5 デュルバルマブの抗原提示細胞に及ぼす影響及びエフェクター機能の評価（試験 ONC4736-00[redacted]、試験 ONC4736-00[redacted]） 15
2.6.2.2.1.6 ヒト全血を用いたデュルバルマブのサイトカインの放出に及ぼす影響の評価（試験 ONC4736-00[redacted]） 19
2.6.2.2.1.7 様々なヒト悪性腫瘍における膜結合型 PD-L1 及び可溶性 PD-L1 の発現の評価（試験 ONC4736-00[redacted]及び試験 ONC4736-00[redacted]） 24
2.6.2.2.1.8 10F.9G2 のマウス PD-L1 との結合親和性、並びにマウス PD-L1 と PD-1 及び CD80 との結合相互作用に対する 10F.9G2 の阻害作用（試験 ONC4736-00[redacted]、試験 ONC4736-00[redacted]） 25
2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験 26
2.6.2.2.2.1 マウスにおける免疫反応による殺腫瘍作用を介したデュルバルマブのヒト腫瘍増殖に対する阻害作用（試験 ONC4736-00[redacted]） 26
2.6.2.2.2.2 マウス結腸直腸癌細胞株 CT26 同系移植モデルで認められた抗マウス PD-L1 抗体による用量依存的な抗腫瘍効果（試験 ONC4736-00[redacted]） 30
2.6.2.2.2.3 マウス結腸直腸癌細胞株 CT26 同系移植モデルにおける抗マウス PD-L1 抗体とオキサリプラチンとの併用効果（試験 ONC4736-00[redacted]） 31
2.6.2.3 副次的薬理試験 32
2.6.2.4 安全性薬理試験 32
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 33
2.6.2.6 考察及び結論 33

2.6.2.7　図表 33
2.6.2.8　参考文献 34

表目次

表 1　デュルバルマブの非臨床薬理試験一覧 9
表 2　2.14H9 mIgG1 の添加により染色の細胞内局在が認められ、染色陽性と判定された腫瘍組織サンプル数 25
表 3　ヒト T 細胞を移入したマウスモデルにおけるヒト膵臓癌細胞株 HPAC の増殖に対するデュルバルマブの作用 28
表 4　ヒト T 細胞を移入したマウスモデルにおけるヒト悪性黒色腫細胞株 A375 の増殖に対するデュルバルマブの作用 29

図目次

図 1　T 細胞増殖に対する PD-L1 の抑制に及ぼすデュルバルマブの影響 12
図 2　T 細胞からの IFN-γ 産生に対する PD-L1 の抑制に及ぼすデュルバルマブの影響 13
図 3　CHO クローン 37 細胞と共培養した CD3 陽性 T 細胞の増殖 14
図 4　8 名の個別の健康ドナーから採取した T 細胞を用いたアッセイで示されたデュルバルマブの T 細胞増殖促進作用の 90%有効濃度（EC_{90}）の累積頻度分布 15
図 5　破傷風毒素及び架橋処理した被験物質又は対照物質の存在下に培養したヒト PBMC によるチミジン取込み量 16
図 6　デュルバルマブ、2.14H9 hIgG1 及び抗 HER2 抗体の抗体依存性細胞傷害の評価 17
図 7　デュルバルマブ及び 2.14H9 hIgG1 の補体依存性細胞傷害の評価 18
図 8　ヒト血清及び加熱不活性化したヒト血清存在下での補体依存性細胞傷害の評価 19
図 9　ヒト全血中のリンパ球及び CD14 陽性単球上における PD-L1 の発現 20
図 10　ヒト全血における IFN-γ産生の誘導 21
図 11　ヒト全血における IL-2 産生の誘導 22
図 12　ヒト全血における IL-6 産生の誘導 23
図 13　ヒト全血における TNF-α産生の誘導 24
図 14　ヒト T 細胞を移入したマウスモデルにおけるヒト膵臓癌細胞株 HPAC の増殖に対するデュルバルマブの作用 27
図 15　マウスモデルにおけるヒト T 細胞に依存したヒト悪性黒色腫細胞株 A375 の増殖に対するデュルバルマブの作用 29
図 16　抗マウス PD-L1 抗体 10F.9G2 投与によるマウスの生存率 31

図 17　　マウス結腸直腸癌細胞株 CT26 同系移植モデルにおける 10F.9G2 と
オキサリプラチン併用投与群の生存率.....32

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
ADCC	antibody-dependent cell-mediated toxicity: 抗体依存性細胞傷害
APC	Antigen presentation cell: 抗原提示細胞
CD	cluster of differentiation: 白血球分化抗原（群）
CDC	complement-dependent cytotoxicity: 補体依存性細胞傷害
CHO	Chinese hamster ovary: チャイニーズハムスター卵巣
cyno	cynomolgus monkey: カニクイザル
EC_{90}	90% effective concentration: 90%有効濃度
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay: 酵素免疫測定法
Fc	fragment crystallisable: 結晶形成フラグメント
Fcγ	fragment crystallizable gamma: 結晶形成フラグメントγ
GLP	Good Laboratory Practice: 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
h	human: ヒト
HER2	human epidermal growth factor receptor 2: ヒト上皮増殖因子受容体 2
IFN-γ	interferon gamma: インターフェロン-γ
IgG	Immunoglobulin G: 免疫グロブリン G
IgG1κ	Immunoglobulin G1 kappa: 免疫グロブリン G サブクラス 1、κ型アイソタイプ
IL	Interleukin: インターロイキン
K_D	equilibrium dissociation constant: 平衡解離定数
m	mouse: マウス
mPD-L1	mouse programmed cell death ligand 1: マウス PD-L1
NOD/SCID	nonobese diabetic/severe combined immunodeficient: 非肥満性糖尿病／重症複合免疫不全症
OKT3	anti-human CD3 antibody: 抗ヒト CD3 抗体
PBMC	peripheral blood mononuclear cell: 末梢血単核細胞
PD-1	programmed cell death 1（別名：CD279）
PD-L1	programmed cell death ligand 1（別名：B7-H1、CD274）
PD-L2	programmed cell death ligand 2（別名：B7-DC、CD273）
r	rat: ラット
rcyno	recombinant cynomolgus monkey: 遺伝子組換えカニクイザル
rh	recombinant human: 遺伝子組換えヒト
rm	recombinant mouse: 遺伝子組換えマウス
rPD-L1	rat programmed cell death ligand 1: ラット PD-L1
R95	95 位のアルギニン
TNF-α	tumor necrosis factor: 腫瘍壊死因子-α

2.6.2.1　　まとめ

アストラゼネカ社は、様々な癌の患者に対する治療薬としてデュルバルマブ（遺伝子組換え）（以下、デュルバルマブ、研究所コード：MEDI4736）の開発を進めている。デュルバルマブはヒトの programmed cell death ligand 1（PD-L1、別名：B7-H1、CD274）に対するヒト免疫グロブリン G サブクラス 1、κ型アイソタイプ（IgG1 κ）モノクローナル抗体である。T 細胞活性化の制御に関与する受容体-リガンドの複合システムに属する PD-L1 は、2 種類の受容体、即ち programmed cell death 1（PD-1、別名：CD279）及び CD80（別名：B7-1）に結合し、これら両受容体との相互作用を介して T 細胞に不活性化シグナルを伝達することにより（Keir et al 2008, Park et al 2010）、体内の様々な部位で免疫反応を調節する。この抑制性のシグナル伝達機構は、PD-L1 を発現している腫瘍によって免疫系による認識と排除から逃れる手段としても利用される。デュルバルマブは、IgG1 重鎖の定常領域に 3 箇所のアミノ酸変異（以下 3 箇所変異）を導入しているため、補体タンパク C1q への結合能の低下と共に、抗体依存性細胞傷害（ADCC）作用を惹起する結晶形成フラグメント γ（Fcγ）受容体に対する Fc 領域の親和性が低下している（Oganesyan et al 2008）。そのためデュルバルマブでは補体依存性細胞傷害（CDC）及び ADCC 作用が大幅に低下している（Stewart et al 2015）。デュルバルマブが PD-L1 と結合すると、PD-L1 と免疫細胞上に発現している PD-1 及び CD80 との相互作用が阻害される。この作用により、抗腫瘍免疫に対する PD-L1 を介した阻害作用に拮抗できると考えられる。PD-L1 機能の阻害は T 細胞の再活性化につながるが、この作用機序は CD28 のような共刺激受容体に対する直接的なアゴニスト作用とは異なっていると考えられる。

PD-L1 は B7 ファミリーに属するリガンドの一種であり、通常は PD-1 受容体への結合を介して T 細胞の活性化を制御している（Keir et al 2008）。PD-L1 は複数臓器の悪性腫瘍への異常発現が高頻度に認められており（Dong et al 2002）、原発腫瘍及び二次リンパ系器官における抗腫瘍 T 細胞反応を抑制し、免疫系による異物排除から腫瘍を保護するとされている（Zou and Chen 2008）。腫瘍細胞における PD-L1 の発現には、生存期間の短縮や予後不良との関連性が認められており（Mu et al 2011, Thompson et al 2005, Thompson et al 2006, Krambeck et al 2007, Nomi et al 2007, Loos et al 2008, Wang et al 2010, Hamanishi et al 2007）、複数の非臨床試験において、PD-L1/PD-1 経路の阻害による抗腫瘍効果が認められている（Hirano et al 2005, Iwai et al 2002, Okudaira et al 2009, Zhang et al 2008）。

デュルバルマブについて実施した非臨床薬理試験の内容及び主な結果を以下に示す。

- 細胞外ドメインのアミノ酸配列の比較で、ヒト（h）PD-L1 とカニクイザル（cyno）PD-L1 との間で高い相同性が認められたが、hPD-L1 とマウス（m）PD-L1 及びラット（r）PD-L1 との相同性は低かった。
- hPD-L1 の細胞外ドメインの 95 位のアルギニン（R95）がデュルバルマブの hPD-L1 への結合に必須であることを確認した。
- デュルバルマブの hPD-L1 及び cynoPD-L1 に対する高い結合親和性を確認した。
- hPD-L1 に関連するアミノ酸配列又は hPD-L1 に関連する機能を有するヒトタンパク質及び mPD-L1 に対する結合親和性から、デュルバルマブの hPD-L1 に対する高い結合特異性を確認した。
- hPD-L1 と hPD-1 又は hCD80 との各結合相互作用に対するデュルバルマブの阻害作用を確認した。

- デュルバルマブは PD-L1 を介したヒト T 細胞活性化抑制に対して拮抗作用を示すことを確認した。
- 健康ドナーから採取した T 細胞を用い、T 細胞の活性化におけるデュルバルマブの効力を評価した。
- PD-L1 を介したシグナル伝達による抗原リコールアッセイにおいてデュルバルマブは抗原提示細胞（APC）機能に影響を及ぼさないことを確認した。
- デュルバルマブは *in vitro* において、PD-L1 発現標的細胞に対し、ADCC 及び CDC 作用を惹起しないことを確認した。
- 健康ドナーから採取した全血を用い、デュルバルマブのサイトカインの放出に及ぼす影響をサイトカイン産生試験法にて検討した。
- ヒト原発腫瘍組織の凍結切片における膜結合型 PD-L1 の発現及び可溶性 PD-L1 の血清中濃度を評価した。
- デュルバルマブは mPD-L1 に対して交差反応を示さないため、抗 mPD-L1 抗体 10F.9G2 を代替抗体とし、正常免疫能のあるマウスの同系移植モデルを用いて PD-L1 阻害作用を検討した。10F.9G2 は mPD-L1 に対して、デュルバルマブの hPD-L1 と同様の特性を示したことから、10F.9G2 は *in vivo* 試験で使用するデュルバルマブの代替抗体として適切であることを確認した。
- ヒト悪性腫瘍異種移植マウスモデルにおいて、デュルバルマブは腫瘍の増殖を抑制することが確認された。この腫瘍増殖抑制作用の発現には、使用したヒト癌細胞に応答するヒト T 細胞の同時移植が必要であった。
- マウス結腸直腸癌同系移植モデルにおいて、抗 mPD-L1 抗体 10F.9G2 の抗腫瘍効果の用量依存性、及び、10F.9G2 と化学療法剤オキサリプラチンの併用効果を検討した。

細胞を用いた *in vitro* 試験で、デュルバルマブは初代ヒト T 細胞の活性化に及ぼす PD-L1 の抑制作用に拮抗することにより、T 細胞の増殖及びインターフェロン-γ（IFN-γ）産生を増強した。また、健康ドナーから採取した T 細胞を用いた *in vitro* 試験で、デュルバルマブによる T 細胞増殖促進作用にドナー間でばらつきが認められたが、3 μg/mL 以上の被験濃度ではドナー全例（100%）において 90%有効濃度（EC_{90}）に達した。一方、*in vitro* でヒト末梢血単核細胞（PBMC）による破傷風毒素に対するリコール応答に影響を及ぼさなかったことから、デュルバルマブは抗原提示細胞による抗原提示に作用しないことが示唆された。また、健康ドナーから採取した全血でサイトカイン放出を誘導する可能性を評価した結果、デュルバルマブは 300 μg/mL までの濃度で培養系への添加条件（溶液添加又はドライコーティング若しくはウエットコーティング法による培養プレート表面への固定化）を問わず、サイトカインの放出を誘導しなかった。さらに、デュルバルマブは、IgG1 の定常領域に 3 箇所変異導入により ADCC 及び CDC を惹起しないよう設計されており、細胞を用いた機能試験で ADCC 及び CDC を惹起しないことが確認された。*In vivo* において、ヒト悪性腫瘍由来細胞株（ヒト悪性黒色腫由来細胞株 A375 又はヒト膵臓癌由来細胞株 HPAC）と腫瘍特異的ヒト T 細胞を移植した非肥満性糖尿病／重症複合免疫不全症（NOD/SCID）マウスにデュルバルマブを投与した結果、ほぼ用量依存的な有意な抗腫瘍効果が認められた。重要なこととして、デュルバルマブが抗腫瘍効果を発現するには、移植した悪性腫瘍由来細胞株に反応するヒト T 細胞の移入が不可欠であった。このように抗腫瘍効果の発現が T 細胞の存在に依存していたことから、デュルバルマブが免疫反応を介した殺腫瘍作用を増強するという機序が裏付けられた。

正常免疫能のあるマウスの結腸直腸癌由来細胞株 CT26 同系移植モデルにおいて、デュルバルマブの代替抗体である抗 mPD-L1 抗体 10F.9G2 を週 2 回投与したところ生存率は増加した。その効果は、10 mg/kg 未満の投与量に比べて 10 mg/kg 以上の投与量でより強力であった。さらに、10F.9G2 と化学療法剤オキサリプラチンとの併用投与により、それぞれの単独投与時と比較して著明な抗腫瘍効果が認められた。また、ヒト原発悪性腫瘍組織検体について免疫組織化学的染色を行った結果、10 種類の悪性腫瘍において PD-L1 の発現が確認されている。

デュルバルマブについて実施した非臨床薬理試験の一覧表を表 1に示す。

表 1　　デュルバルマブの非臨床薬理試験一覧

試験番号	試験系	試験名	GLP 適用
ONC4736-00[redacted]	*In silico*	ヒト、マウス、ラット及びカニクイザルの B7-H1 の配列相同性解析	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	B7-H1 の 95 位のアルギニンに依存した MEDI41736 の遺伝子組換えヒト B7-H1 への結合	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	MEDI4736 と組換えヒト B7-H1 及び組換えカニクイザル B7-H1 との結合親和性	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	関連するヒト及びマウスタンパク質と比較した組換えヒト B7-H1 と MEDI4736 との結合特異性	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	組換えヒト B7-H1 と組換えヒト PD-1 及び CD80 との相互作用に対する MEDI4736 の阻害作用	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	*In vitro* における B7-H1 による初代ヒト T 細胞の抑制に対する MEDI4736 の拮抗作用の評価	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	初代ヒト T 細胞を用いた *in vitro* における MEDI4736 の効力の評価	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	抗原提示細胞の活性に及ぼす MEDI4736 の影響	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	MEDI4736 のエフェクター機能の評価	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	*In vitro* におけるヒト全血を用いた MEDI4736 のサイトカイン放出に対する影響	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	癌組織における B7-H1 の発現	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	ヒト腫瘍及び血漿サンプルにおける可溶性 B7-H1 の測定	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	抗マウス B7-H1 抗体 10F.9G2 の組換えマウス B7-H1 との結合親和性	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	組換えマウス B7-H1 と組換えマウス Programmed Death 1 及び CD80 との相互作用に対する抗マウス B7-H1 抗体（10F.9G2）の阻害作用	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vivo*	ヒト腫瘍を移植したマウスモデルにおける MEDI4736 の影響	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vivo*	マウス結腸直腸癌細胞株同系移植モデルにおける抗マウス PD-L1 抗体による用量依存的な抗腫瘍効果	非適用
ONC4736-00[redacted]	*In vivo*	マウス結腸直腸癌細胞株同系移植モデルにおける抗マウス B7-H1 抗体とオキサリプラチンとの併用効果	非適用

この表では、PD-L1 を B7-H1、デュルバルマブを MEDI4736 と表示している。

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 ヒト、マウス、ラット及びカニクイザルの PD-L1 の配列相同性解析（試験 ONC4736-00[redacted]）及び 95 位のアルギニンに依存したデュルバルマブの遺伝子組換えヒト PD-L1 への結合（試験 ONC4736-00[redacted]）

hPD-L1 の細胞外ドメインのアミノ酸配列を cynoPD-L1、rPD-L1 及び mPD-L1 と比較した（試験 ONC4736-00[redacted]）。UniProt 配列アノテーションアルゴリズムにより、hPD-L1 の細胞外ドメインは 19～238 位のアミノ酸で構成されることが明らかになっている。この配列を用いて、cynoPD-L1、rPD-L1 及び mPD-L1 の細胞外ドメインと比較した。

PD-L1 の細胞外ドメインのアミノ酸配列に関して、hPD-L1 と cynoPD-L1 との間で 95.9%の相同性（アミノ酸 220 個中 211 個）、hPD-L1 と mPD-L1 との間で 73.5%の相同性（アミノ酸 219 個中 161 個）、hPD-L1 と rPD-L1 との間で 74.4%（アミノ酸 219 個中 163 個）の相同性が認められた。hPD-L1 と cynoPD-L1 との間で細胞外ドメインのアミノ酸配列に高い相同性が認められたことから、デュルバルマブが cynoPD-L1 に結合する可能性が高いことが示唆された。一方、hPD-L1 と rPD-L1 及び mPD-L1 との間では細胞外ドメインのアミノ酸配列の相同性は低く、デュルバルマブが rPD-L1 及び mPD-L1 に結合する可能性は低いことが示唆された。

hPD-L1 の細胞外ドメインの R95（完全長 PD-L1 アミノ酸配列の 113 位に相当［R113］）は PD-1 との相互作用に関与することが明らかになっている（Lin et al 2008）。このアルギニンがデュルバルマブの結合に必須であることを確認するため、遺伝子組換えヒト（rh）PD-L1 の R95 をアラニンで置換した（試験 ONC4736-00[redacted]）。この変異型 rhPD-L1 にデュルバルマブは結合しなかったことから、デュルバルマブの hPD-L1 への結合には R95 が必須であることが確認された。rPD-L1 及び mPD-L1 には R95 が存在しないことから、デュルバルマブが rPD-L1 及び mPD-L1 に結合しないと考えられる。

2.6.2.2.1.2 ヒト及びカニクイザル PD-L1 に対するデュルバルマブの高親和性（試験 ONC4736-00[redacted]）、並びに、関連するアミノ酸配列又は機能をもつヒトタンパク質及びマウス PD-L1 と比較したヒト PD-L1 に対するデュルバルマブの結合特異性（試験 ONC4736-00[redacted]）

hPD-L1 に対するデュルバルマブの結合特異性について検討した。

KinExA の label-free 技術を用いて、溶液中での rhPD-L1 及び rcynoPD-L1 へのデュルバルマブの結合親和性（平衡解離定数［K_D］で示す）を測定した（試験 ONC4736-00[redacted]）。デュルバルマブの rhPD-L1 及び rcynoPD-L1 への結合に対する K_D 値はそれぞれ、22 及び 78 pM であった。以上の結果から、デュルバルマブは rhPD-L1 及び rcynoPD-L1 の両方に対して高い親和性及び特異性で結合することが確認された。

hPD-L1 に関連するアミノ酸配列又は機能を持つヒトタンパク質及び mPD-L1 にデュルバルマブを結合させる試験を実施して、hPD-L1 に対するデュルバルマブの結合特異性をさらに詳細に

検討した（試験 ONC4736-00[redacted]）。hPD-L1 と 30%以上のアミノ酸配列相同性を示す 2 種類のタンパク質、ヒトの programmed cell death ligand 2（PD-L2、別名：B7-DC、CD273）と hB7-H3 を同定した。さらに、hPD-L1 に関連する機能をもつ 4 種類のタンパク質、hCTLA-4、hPD-1、hB7-H2 及び hCD28 も同定した。デュルバルマブのこれらのタンパク質への結合を酵素免疫測定法（ELISA）にて測定することにより、デュルバルマブの hPD-L1 に対する結合特異性を検討した。その結果、デュルバルマブはこれらのタンパク質のいずれにも結合しなかった。さらにデュルバルマブは mPD-L1 にも結合しなかった。したがって、デュルバルマブは hPD-L1 に対して高い結合親和性及び結合特異性を示すと考えられる。

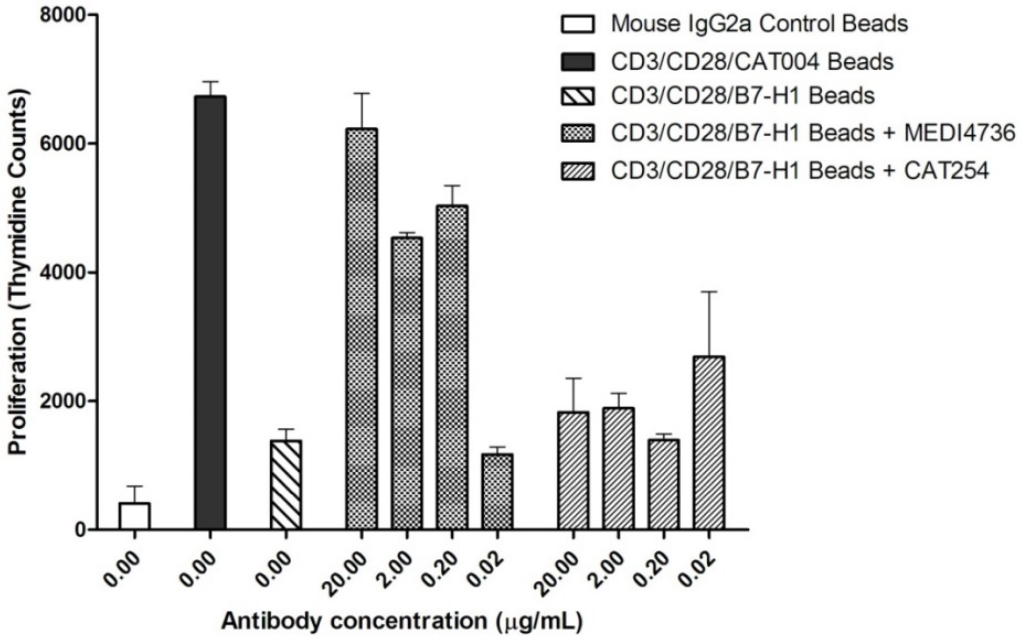
2.6.2.2.1.3 ヒト PD-1 又は CD80 とヒト PD-L1 との結合に対するデュルバルマブの阻害作用（試験 ONC4736-00[redacted]）、及び、PD-L1 による初代ヒト T 細胞の抑制に対するデュルバルマブの *in vitro* 拮抗作用（試験 ONC4736-00[redacted]）

rhPD-L1 の rhPD-1 又は rhCD80 への結合に対するデュルバルマブの阻害作用を評価した。

rhPD-L1 の rhPD-1 又は rhCD80 への結合に対するデュルバルマブの阻害作用を、均一時間分解蛍光測定（HTRF®）法による競合結合試験にて評価した（試験 ONC4736-00[redacted]）。その結果、デュルバルマブは rhPD-L1 の rhPD-1 又は rhCD80 に対する結合を阻害し、50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 0.10 及び 0.04 nM であった。本試験から、デュルバルマブは hPD-L1 と PD-1 及び CD80 との結合を強力に阻害することが示された。

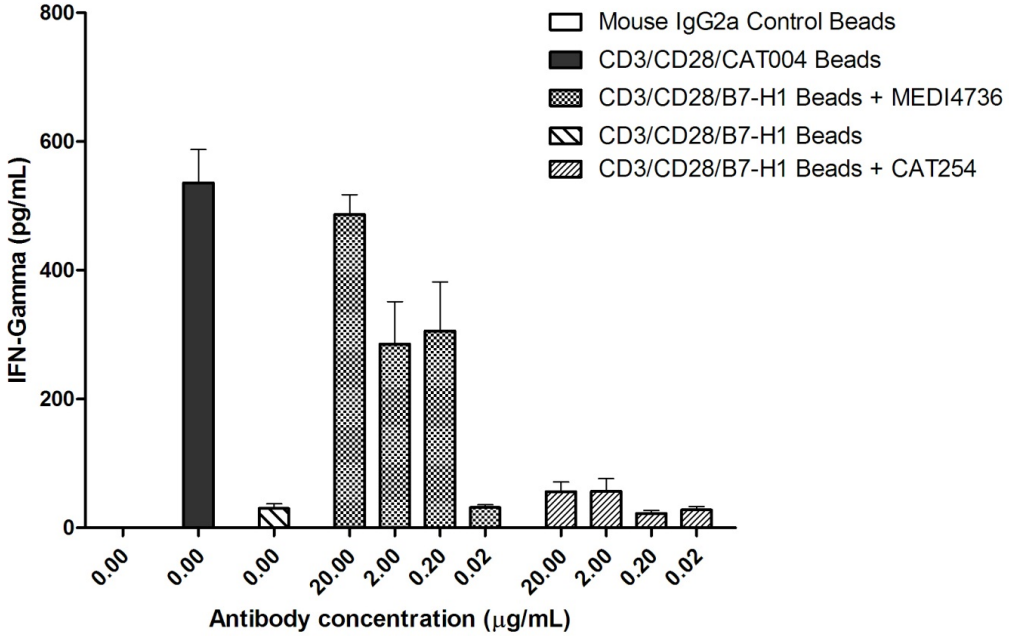
T 細胞表面上の PD-1 に PD-L1 が結合すると、T 細胞の活性化が抑制される。デュルバルマブの PD-L1 とリガンドとの結合阻害作用による T 細胞の活性化に対する影響を検討するため、*in vitro* T 細胞活性化試験を実施した（ONC4736-00[redacted] 試験）。抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び CAT-004 抗体（ローディング・コントロールとして添加した、無関連（不適合の相補性決定領域を有する）mIgG1）をコーティングした抗体捕捉ビーズを初代ヒト T 細胞に添加すると、T 細胞増殖及び IFN-γ の産生が増大した。一方、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び rhPD-L1 でコーティングしたビーズと共に T 細胞を培養すると、T 細胞増殖及び IFN-γの産生が有意に低下した。以上の結果から、本試験系において、PD-L1 が抑制性シグナルを伝達することが確認された。抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び rhPD-L1 でコーティングしたビーズを含む T 細胞培養系にデュルバルマブを添加すると、抑制性シグナルはほぼ濃度依存的に回復した。試験最高濃度 20 μg/mL のデュルバルマブでは、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び CAT-004 抗体のみでコーティングしたビーズを添加したときとほぼ同程度の T 細胞増殖及び IFN-γの産生が認められた（図 1及び図 2）。

図 1　　T 細胞増殖に対する PD-L1 の抑制に及ぼすデュルバルマブの影響



初代ヒト T 細胞に抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び CAT-004 抗体（無関連マウス IgG1）でコーティングした抗体捕捉ビーズを添加して培養した結果、T 細胞の増殖が認められた。一方、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体に加えて、ヒト PD-L1 でコーティングしたビーズを用いると、初代 T 細胞の増殖が顕著に抑制された。この培養系にデュルバルマブを添加すると、PD-L1 による抑制作用からのほぼ濃度依存的な回復が認められた。アイソタイプ対照抗体の CAT254 ではこのような作用は認められなかった。
被験物質を添加する実験は各 2 ウェルずつ、被験物質を添加しない実験は各 3 ウェルずつ実施した。また、対照ビーズを添加する実験は各 2 ウェルずつ実施した。エラーバーは平均値の標準誤差を示している。
CAT254 = 3 箇所変異を有する IgG1 アイソタイプ対照抗体。
図中、PD-L1 を B7-H1、デュルバルマブを MEDI4736 と表示している。

図 2　　T 細胞からの IFN-γ 産生に対する PD-L1 の抑制に及ぼすデュルバルマブの影響



ヒト初代 T 細胞に、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び CAT-004 抗体（無関連マウス IgG1）でコーティングした抗体捕捉ビーズを添加すると、IFN-γの産生が認められた。一方、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体に加えて、rhPD-L1 でコーティングしたビーズを用いると、IFN-γの産生が顕著に減少した。この T 細胞培養系にデュルバルマブを添加すると、ほぼ濃度依存的に PD-L1 による抑制作用が回復した。アイソタイプ対照抗体では影響は認められなかった。
エラーバーは、平均値の標準誤差を示す。
CD = cluster of differentiation（白血球分化抗原）、IFNγ = インターフェロン-γ、IgG = 免疫グロブリン G。
CAT254 = 3 箇所変異を有する抗ドキソルビシンヒト IgG1 アイソタイプ対照抗体。
図中、PD-L1 を B7-H1、デュルバルマブを MEDI4736 と表示している。

以上の結果から、機能試験において、デュルバルマブは、PD-L1 を介したヒト活性化 T 細胞抑制作用に対して拮抗作用を示すことが確認された（試験 ONC4736-00[redacted]）。

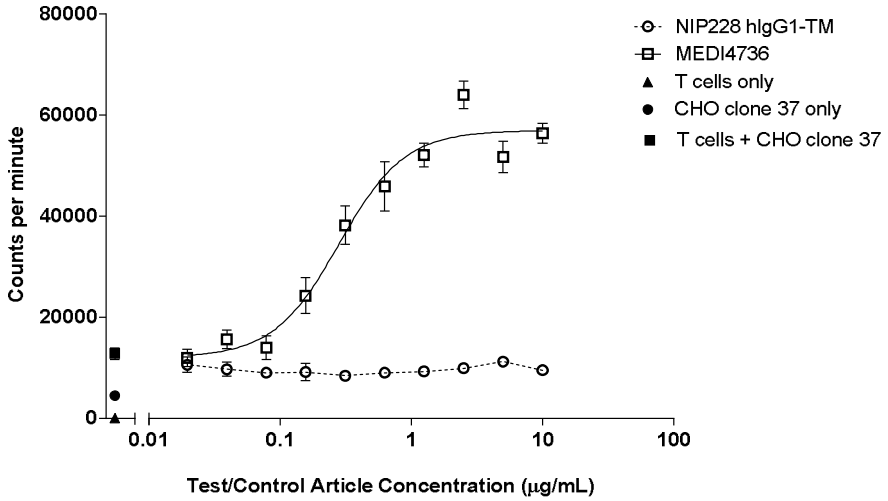
2.6.2.2.1.4　ドナー別にみた初代 T 細胞における *in vitro* でのデュルバルマブの効力（試験 ONC4736-00[redacted]）

上記アッセイ法の変法として、抗体でコーティングしたビーズの代わりに、膜結合型の抗ヒト CD3 抗体 OKT3 とヒト PD-L1 を発現させた CHO 細胞株（CHO クローン 37）を用いる方法を開発した（試験 ONC4736-00[redacted]）。マイトマイシン C で処理した CHO クローン 37 細胞を初代ヒト CD3 陽性 T 細胞と共に培養し、これらの培養細胞にデュルバルマブ又はアイソタイプの対照抗体（NIP228）のいずれかを添加し、被験濃度を順次上昇させた。

マイトマイシン C で処理した CHO クローン 37 細胞と初代ヒト CD3 陽性 T 細胞との共培養を行った結果、CD3 陽性 T 細胞のみ又は CHO クローン 37 細胞のみの培養に比べて、T 細胞の増殖が促進された（図 3）。アイソタイプの対照抗体である NIP228 を T 細胞と CHO クローン 37 細胞の共培養系に添加したところ、いずれの被験濃度でも 8 名の個別の健康ドナーから採取した T 細胞の増殖に影響はみられなかった。これに対して、デュルバルマブを同共培養系に添加した場

合には、8 名のいずれのドナーから採取した T 細胞でも濃度依存的に T 細胞の増殖が促進した（図 3）。

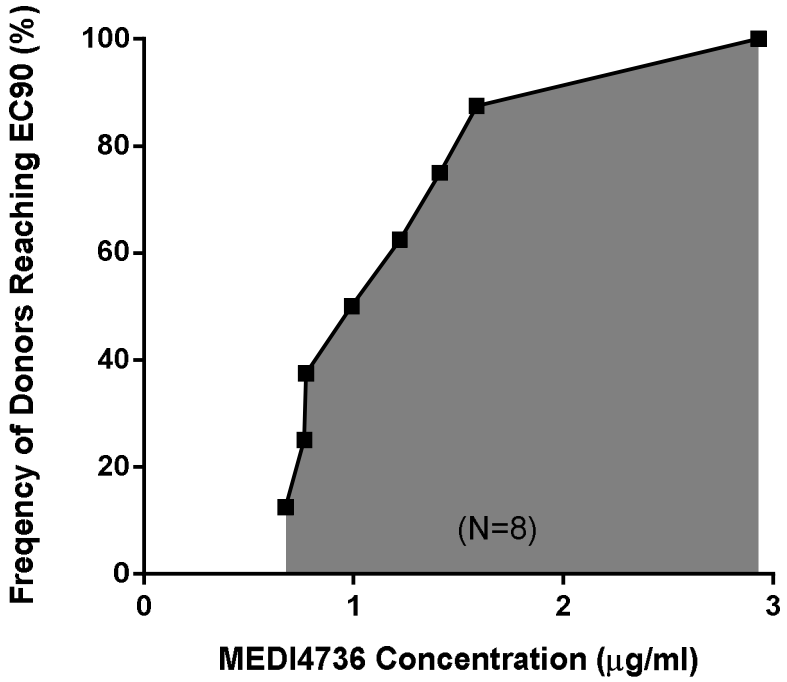
図 3　　CHO クローン 37 細胞と共培養した CD3 陽性 T 細胞の増殖



マイトマイシン C で処理した CHO クローン 37 細胞と初代ヒト CD3 陽性 T 細胞との共培養を行った結果、T 細胞の増殖が認められた。10 μg/mL を開始濃度として、1:2 希釈の試料溶液を用いて用量-反応曲線（濃度-反応曲線）を作成した。これらの共培養系にデュルバルマブを添加すると、PD-L1 による抑制作用からの濃度依存的な回復が認められた。アイソタイプ対照抗体の NIP228 hIgG1-TM ではこのような作用は認められなかった。非線形回帰法にて用量反応曲線（シグモイド曲線、可変傾斜）を作成し、データを当てはめて EC_{50} 値を求めた結果、0.99 μg/mL と特定された。各実験はそれぞれ 3 ウェルずつ実施した。エラーバーは平均値の標準誤差を示している。上記の結果は、8 名の健康ドナーから採取した T 細胞をそれぞれ用いて別々に 8 回実施した実験の代表的な結果である。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

デュルバルマブによる T 細胞増殖促進作用の EC_{90} において、ドナー間で個体間変動が認められたが、ドナー全例の EC_{90} 値の累積頻度分布（図 4）に基づくと、3 μg/mL 以上の被験濃度では、ドナー全例（100%）において最大効果の 90%に達した。この結果から、患者にデュルバルマブを投与する場合、3 μg/mL 以上の血清中濃度を維持すれば、実際に効果が得られる可能性を最大限高められることが示唆された。

図 4　　8 名の個別の健康ドナーから採取した T 細胞を用いたアッセイで示されたデュルバルマブの T 細胞増殖促進作用の 90%有効濃度（EC_{90}）の累積頻度分布



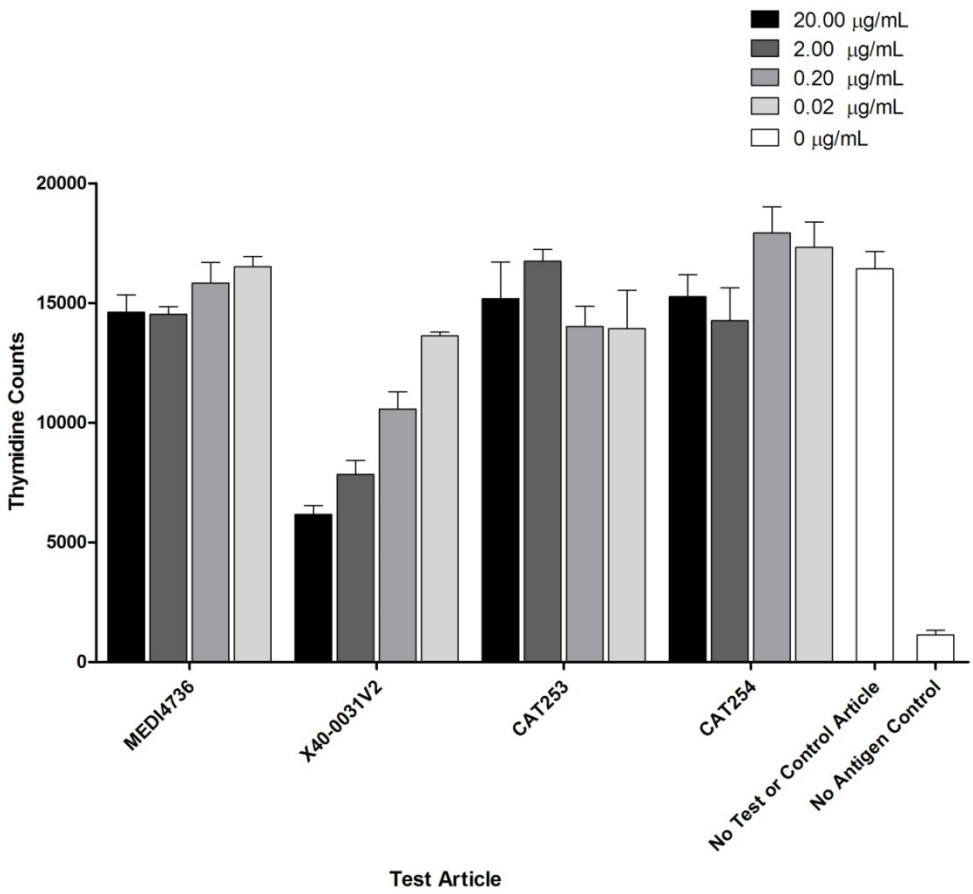
累積分布図は、いずれかの濃度のデュルバルマブで EC_{90} 値以上を達成した健康ドナー（n=8）の割合を示している（詳細については試験 ONC4736-00[redacted]の報告書参照）。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

2.6.2.2.1.5　デュルバルマブの抗原提示細胞に及ぼす影響及びエフェクター機能の評価（試験 ONC4736-00[redacted]、試験 ONC4736-00[redacted]）

公表された研究で、PD-L1 を介するシグナリングは APC 活性を阻害する可能性があることが示唆されている（Kuipers et al 2006）。APC 活性に及ぼすデュルバルマブの影響について評価した。

デュルバルマブは、PD-L1 と結合時に PD-L1 からのシグナルを伝達することにより APC の活性を阻害する可能性もある。このことはデュルバルマブの望ましくない作用になると考えられる。そこで、抗原提示プロセスと抗原提示プロセスに及ぼすデュルバルマブの影響を検討するため、*in vitro* 抗原リコールアッセイ法を開発した（試験 ONC4736-00[redacted]）。この試験法では、PBMC の増殖に基づいて抗原リコール反応を評価する。溶液添加又は架橋処理抗体の培養プレート表面への固定化（plate-bound cross-linking antibody）により、デュルバルマブを PBMC に添加して培養した結果、抗原リコール反応に対するデュルバルマブの顕著な影響は認められなかった。架橋処理抗体の培養プレート表面への固定化によりデュルバルマブの培養への添加を行った場合の結果を図 5に示す。この試験法に基づくと、デュルバルマブは結合時の PD-L1 からのシグナル伝達を介して APC による抗原の提示に影響を及ぼすことはないと考えられる。

図 5　　破傷風毒素及び架橋処理した被験物質又は対照物質の存在下に培養したヒト PBMC によるチミジン取込み量

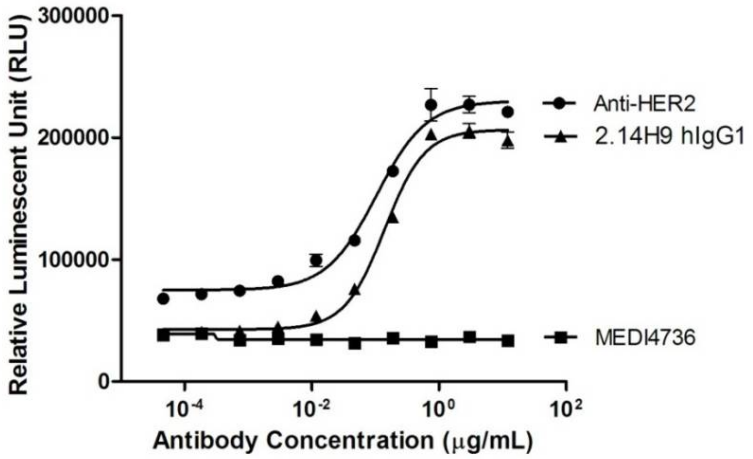


ヒト PBMC を、架橋処理した被験物質の存在下又は非存在下に破傷風毒素と共に、37°C で 5 日間、インキュベーションした。インキュベーション終了後、PBMC の増殖の指標として 18 時間にわたりチミジン取込み量を測定した。破傷風毒素の存在下（被験物質無添加）では、培地のみ（対照抗原無添加）での PBMC 培養時に比べて、PBMC の増殖が顕著に促進された。一方、陽性対照の X40-0031V2（抗 OX40L 抗体）存在下では、増殖反応が濃度依存的に抑制された。対照的に、デュルバルマブは PBMC の増殖に影響を及ぼさなかった。
実験は各 3 ウェルずつ又は 6 ウェルずつ実施した。エラーバーは平均値の標準誤差を示している。
PBMC = 末梢血単核細胞、CAT254 = 3 箇所変異を有するヒト免疫グロブリン G1（IgG1）アイソタイプ対照抗体、CAT253 = ヒト免疫グロブリン G2（IgG2）アイソタイプ対照抗体。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

IgG1 アイソタイプの抗体は、ADCC や CDC 等のエフェクター機能を惹起する能力を有する。一方、デュルバルマブは、IgG1 重鎖の定常領域に 3 箇所変異を導入されているため、補体タンパク C1q への結合の低下と共に、ADCC を惹起する Fcγ 受容体と結合する Fc 領域への親和性が低下している（Oganesyan et al 2008）。これらの変異導入により、デュルバルマブがエフェクター機能を惹起しないことを確認するため、ADCC 及び CDC 作用評価試験を実施した（試験 ONC4736-00[redacted]）。レポーター遺伝子アッセイを用いて、デュルバルマブ及び 2.14H9 hIgG1（野生型の IgG1 Fc 領域を有する抗 PD-L1 抗体）の ADCC 作用を評価した。本試験では、高親和性 FcγRIIIa-158V 及び NFAT 応答レポーターレシフェラーゼを過剰発現する細胞株

NK92/CD16/NFAT-ルシフェラーゼクローン 8 細胞株を使用した。この細胞株では、ADCC に関与する受容体である FcγRIIIa-158V を介したシグナルが伝達されると、ルシフェラーゼ活性が上昇する。本試験では、ルシフェラーゼ活性を ADCC の代用マーカーとして使用した。hPD-L1 及びヒト上皮増殖因子受容体 2 型（HER2）を発現する SKBR3 細胞株を標的細胞株として使用した。抗 HER2 抗体を陽性対照抗体として使用し、デュルバルマブ及び 2.14H9 hIgG1 の ADCC 作用を評価した。2.14H9 hIgG1 は濃度依存的に ADCC 作用を示したが、定常領域に 3 箇所変異を有するデュルバルマブは ADCC 作用を示さなかった（図 6）。また、陽性対照抗体である抗 HER2 抗体も濃度依存的に ADCC 作用を示したことから（図 6）、本試験系の妥当性が確認された。

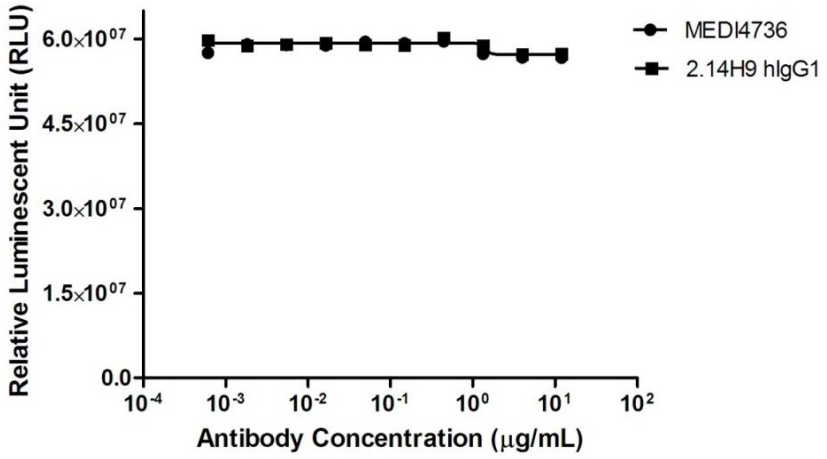
図 6　　デュルバルマブ、2.14H9 hIgG1 及び抗 HER2 抗体の抗体依存性細胞傷害の評価



NK92/CD16/NFAT-ルシフェラーゼクローン 8 細胞株における FcγRIIIa-158V からの発光シグナルを、標的細胞株 SKBR3 に対する抗体依存性細胞傷害の代用マーカーとして使用した。2.14H9 hIgG1 及び抗 HER2 陽性対照抗体は、濃度依存的に発光量を増加させた。一方、デュルバルマブは発光量を増加させなかった。
測定は duplicate で行った。エラーバーは、平均値の標準誤差を示す。
hIgG1 = ヒト免疫グロブリン G1、HER2 = ヒト上皮増殖因子受容体 2 型。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

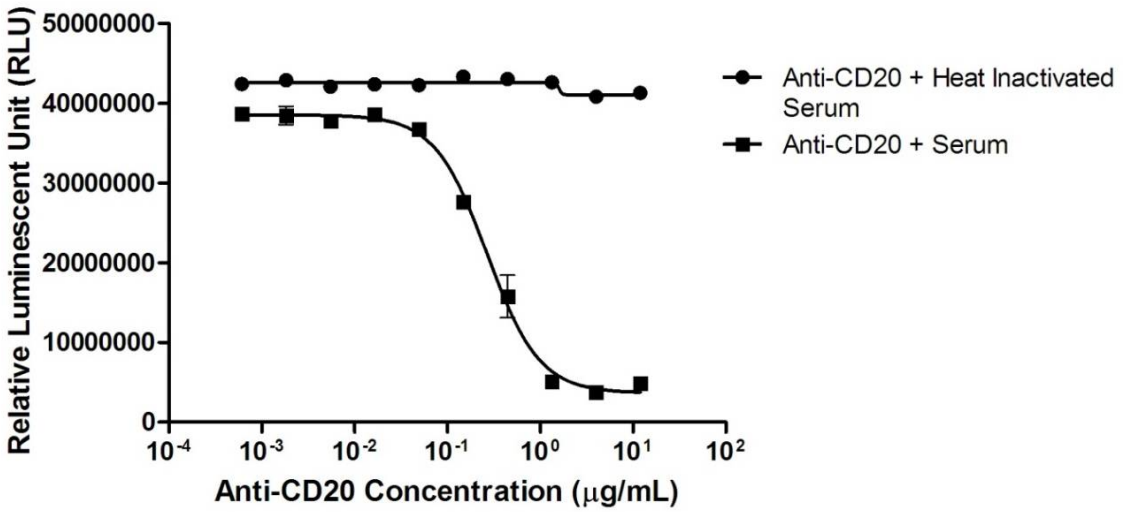
ヒト血清を補体源とし、SKBR3 細胞株を標的細胞とした CDC 作用評価試験を用いて、デュルバルマブ及び 2.14H9 hIgG1 の評価も実施した。被験物質（デュルバルマブ）と補体含有ヒト血清を共にインキュベーションした後の生存標的細胞数を、Cell-Titer Glo を添加することで推定した。Cell-Titer Glo は各ウェルに存在する生細胞数に比例して発光シグナルを生成する。CDC 作用が惹起されると、生細胞数が減少するため発光シグナルは低下する。デュルバルマブ及び 2.14H9 hIgG1 は、いずれの試験濃度においても CDC 作用を示さなかった（図 7）。なお、試験に用いたヒト血清が機能的な補体を含んでいることを確認するため、CDC 作用評価試験において活性を示す抗 CD20 抗体を陽性対照として使用した。抗 CD20 抗体は、10%ヒト血清存在下、hCD20 を高発現する標的細胞株 Daudi に対して濃度依存的な CDC 作用を示した（図 8）。一方、機能的な補体を欠失する加熱不活性化した血清存在下では CDC 作用は認められなかった（図 8）。これらの結果から本試験系の妥当性が確認された。

図 7　　デュルバルマブ及び 2.14H9 hIgG1 の補体依存性細胞傷害の評価



補体含有ヒト血清存在下、デュルバルマブ又は 2.14H9 hIgG1 と共にインキュベーションした後の生存 SKBR3 細胞数を、Cell-Titer Glo を添加することで推定した。Cell-Titer Glo は各ウェルに存在する生細胞数に比例して発光シグナルを生成する。CDC 作用が惹起されると生細胞数が減少するため、発光シグナルは低下する。デュルバルマブ及び 2.14H9 hIgG1 のいずれも、生細胞数に対して影響を及ぼさなかった。
測定は duplicate で行った。エラーバーは平均値の標準誤差を示す。
hIgG1 = ヒト免疫グロブリン G1、CDC =補体依存性細胞傷害。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

図 8　　ヒト血清及び加熱不活性化したヒト血清存在下での補体依存性細胞傷害の評価



補体含有ヒト血清又は加熱不活性化したヒト血清存在下、抗 CD20 抗体と共にインキュベーションした後の生存 Daudi 細胞数を、Cell-Titer Glo を添加することで推定した。Cell-Titer Glo は各ウェルに存在する生細胞数に比例して発光シグナルを生成する。CDC 活性が惹起されると、生細胞数が減少するため、発光シグナルは低下する。抗 CD20 抗体を添加すると、濃度依存的に生細胞数が減少した。一方、加熱不活性化したヒト血清を用いると、生細胞数の減少が認められなかったことから、この細胞数減少が補体依存性細胞傷害を介することが確認された。
CDC =補体依存性細胞傷害。
測定は duplicate で行った。エラーバーは平均値の標準誤差を示す。

以上の結果から、デュルバルマブは PD-L1 を介した T 細胞活性化抑制に対して拮抗作用を示し（試験 ONC4736-00[redacted]）、その際、APC の活性を阻害しないことが確認された（試験 ONC4736-00[redacted]）。さらに、デュルバルマブは ADCC 及び CDC 作用を惹起しないことも確認された（試験 ONC4736-00[redacted]）。

2.6.2.2.1.6　　ヒト全血を用いたデュルバルマブのサイトカインの放出に及ぼす影響の評価（試験 ONC4736-00[redacted]）

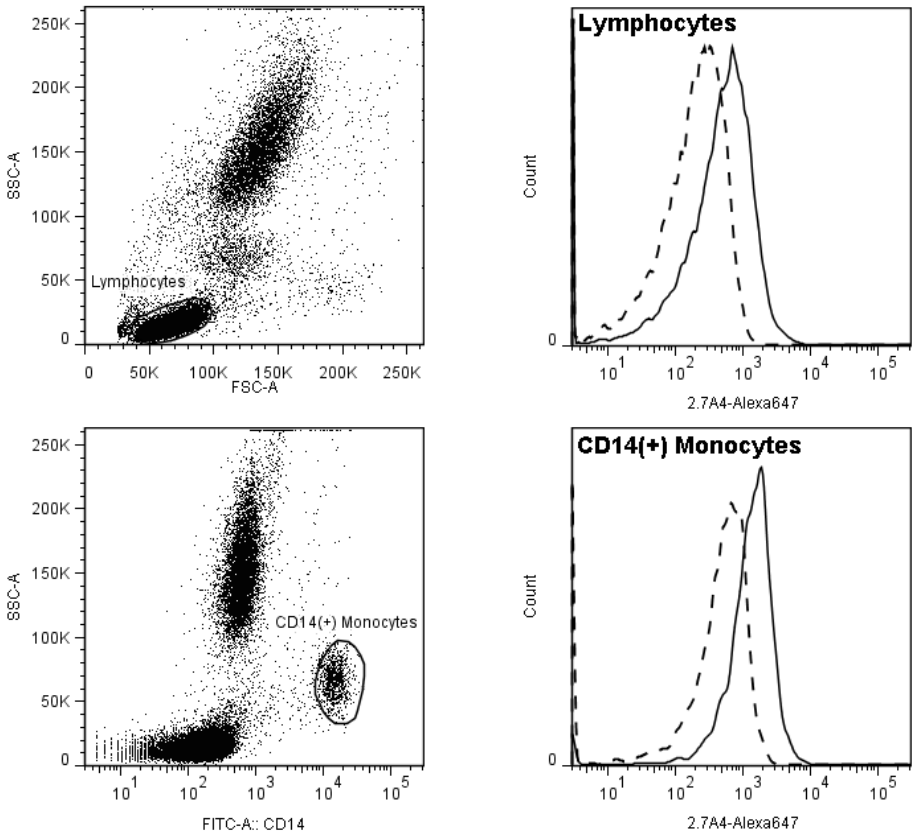
デュルバルマブによる免疫細胞の非特異的活性化は望ましくない作用をもたらす可能性があるため、14 名の健康ドナーから採取した全血を用い、デュルバルマブのサイトカイン放出に及ぼす影響を検討する目的で、*in vitro* サイトカイン放出試験を実施した（試験 ONC4736-00[redacted]）。

血漿を除去したヒト全血（plasma-depleted human whole blood）の培養試料をデュルバルマブ又は陽性対照のヒト CD3 抗体の存在下で 24 時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、培養上清中の IFN-γ、インターロイキン（IL）-2、IL-6 及び腫瘍壊死因子α（TNF-α）の産生量を測定した。なお、これまでの複数の研究で、被験物質の培養への添加方法がサイトカイン放出試験の結果に大きく影響することが示唆されている（Stebbings et al 2007）。そこで、デュルバルマブ及び抗ヒト CD3 抗体の培養への添加条件を溶液添加、並びに培養プレート表面へのウェットコーティング及びドライコーティングによる固定化とした。本試験の条件は抗ヒト CD3 抗体を陽性対照とする予備実験を実施して確立したものである（社内資料）。デュルバルマブの被験濃度は 3～300 μg/mL の範囲とした。これらの濃度は、ヒトへの初回投与における用量を点滴静注にて投与したときのデュルバルマブの最高血清中濃度の予測値に基づいて設定したもので

ある。また、末梢血血球（CD14 陽性単球及びリンパ球）上の PD-L1 発現はフローサイトメトリーにて確認した（図 9）。

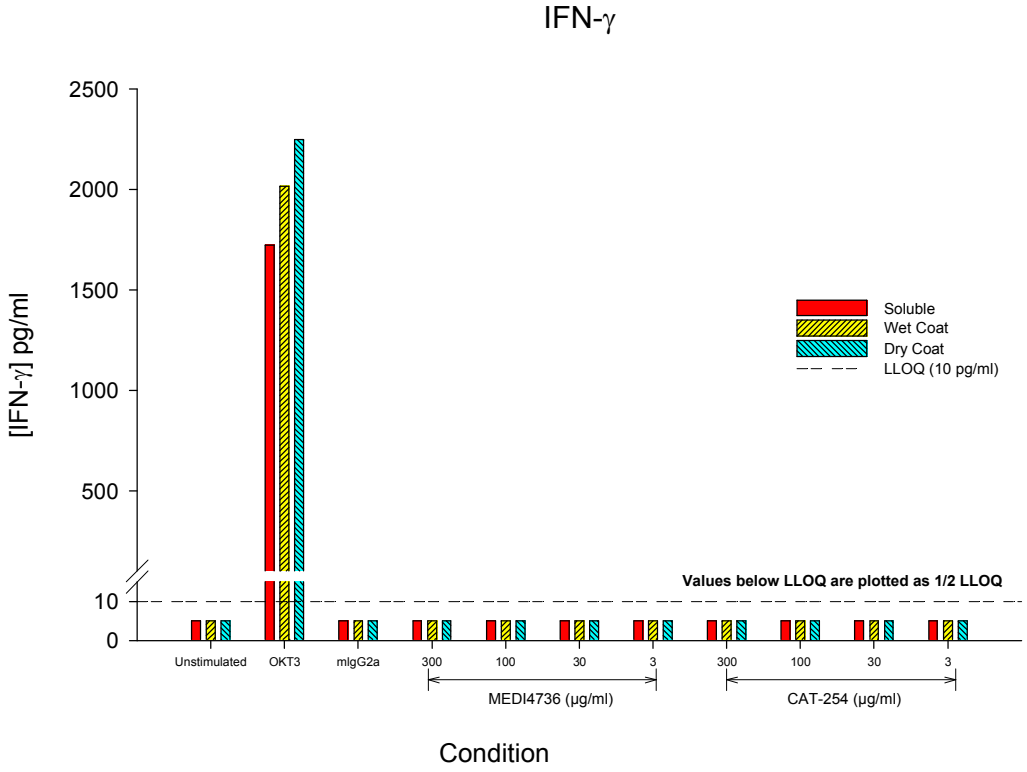
予測された通り、抗ヒト CD3 抗体の添加により、24 時間のインキュベーション後、検討した上記サイトカインのすべてが高濃度で検出された。サイトカインの放出は 3 つの試験条件のすべてで認められた。上清中の IFN-γの濃度は 31.3～2868.7 pg/mL（図 10）、IL-2 の濃度は 103.3～3257.9 pg/mL（図 11）、IL-6 の濃度は 10.5～1195.8 pg/mL（図 12；但し、1 名のドナーは例外で、IL-6 の濃度は定量下限を下回っていた）、及び TNF-αの濃度は 99.9～3486.0 pg/mL（図 13）の範囲であった。これに対して、デュルバルマブはいずれのドナーから採取した血液を用いていずれの濃度で検討した場合も、上記サイトカインの放出を全く誘導しなかった（図 10、図 11、図 12及び図 13）。

図 9　　ヒト全血中のリンパ球及び CD14 陽性単球上における PD-L1 の発現



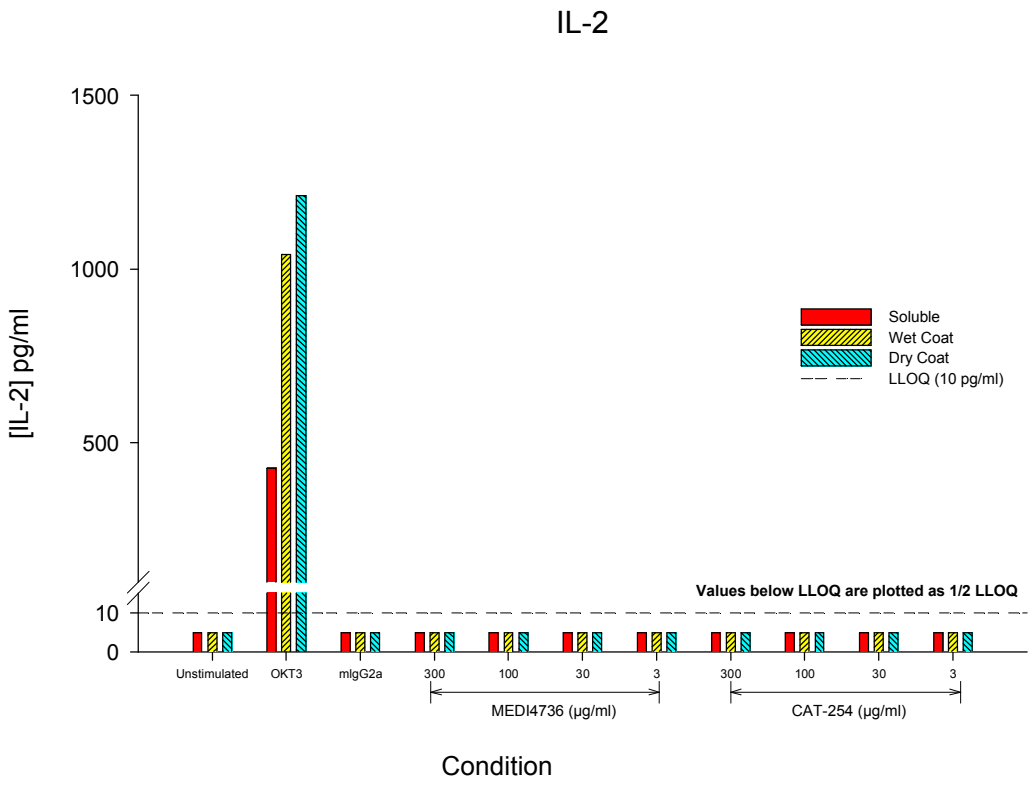
ヒト全血から分離したリンパ球及び CD14 陽性単球を、競合的阻害抗体 2.14H9 の存在下及び非存在下に、Alexa Fluor 647 標識抗 PD-L1 抗体 2.7A4 で免疫染色した。リンパ球及び単球集団をゲーティングした結果をドットのプロットとして示している。また、リンパ球及び単球の各集団への 2.7A4 抗体の結合について、2.14H9 の存在下（破線）及び非存在下（実線）における相対的な平均蛍光強度をヒストグラムに重ねて示している。
上図にはドナー6 名のうち、1 名のドナーから得られた代表的なデータを示している。

図 10　　ヒト全血における IFN-γ産生の誘導



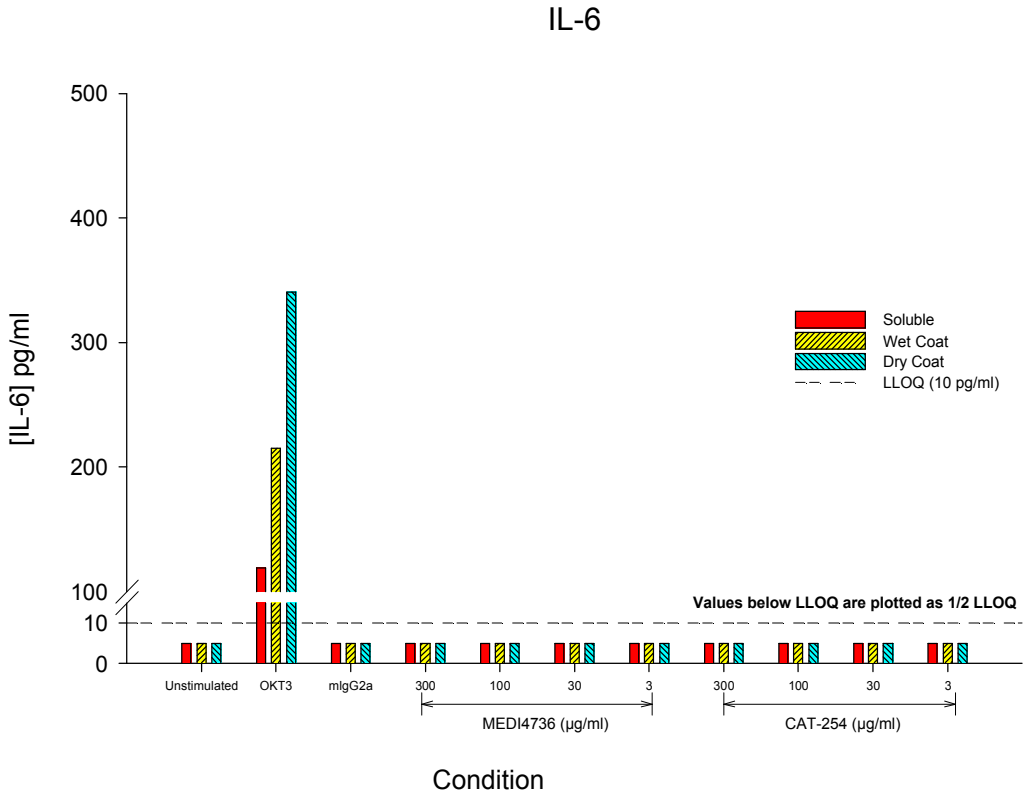
血漿を除去したヒト全血を抗ヒト CD3 抗体（抗体クローン：OKT3）及びデュルバルマブと共に 24 時間インキュベーションした。なお、培養への添加は、溶液添加又はウェットコーティング若しくはドライコーティングによる培養プレート表面への固定化にて行った。陰性対照は、無関連アイソタイプ適合マウス IgG2a（mIgG2a）及びヒト IgG1TM（CAT-254）抗体とした。ヒト全血上清中の IFN-γの濃度を測定した。
データは各 2 ウェルずつ計測した平均値で、ドナー14 名のうち 1 名から得られた代表的なデータを示している。
IFN-γ = インターフェロン-γ、LLOQ = 定量下限。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

図 11　　ヒト全血における IL-2 産生の誘導



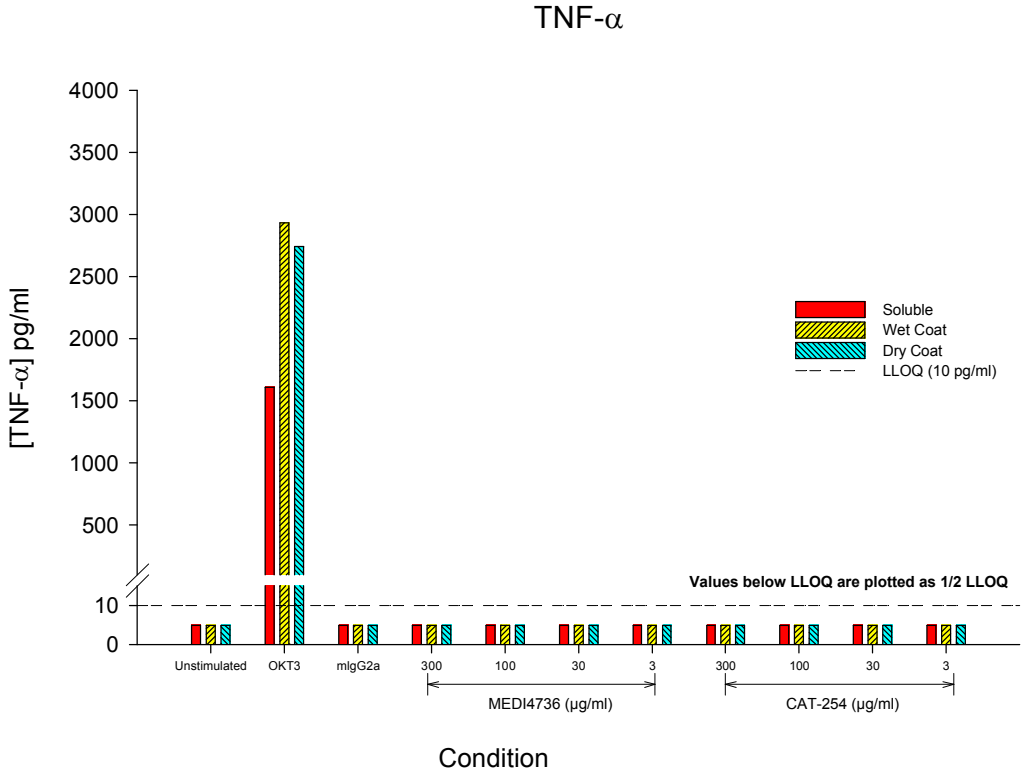
血漿を除去したヒト全血を抗ヒト CD3 抗体（抗体クローン：OKT3）及びデュルバルマブと共に 24 時間インキュベーションした。なお、培養への添加は、溶液添加又はウェットコーティング若しくはドライコーティングによる培養プレート表面への固定化にて行った。陰性対照は、無関連アイソタイプ適合マウス IgG2a（mIgG2a）及びヒト IgG1TM（CAT-254）抗体とした。ヒト全血上清中の IL-2 の濃度を測定した。
データは各 2 ウェルずつ計測した平均値で、ドナー14 名のうち 1 名から得られた代表的なデータを示している。
IL-2 = インターロイキン 2、LLOQ = 定量下限。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

図 12　　ヒト全血における IL-6 産生の誘導



血漿を除去したヒト全血を抗ヒト CD3 抗体（抗体クローン：OKT3）及びデュルバルマブと共に 24 時間インキュベーションした。なお、培養への添加は、溶液添加又はウェットコーティング若しくはドライコーティングによる培養プレート表面への固定化にて行った。陰性対照は、無関連アイソタイプ適合マウス IgG2a（mIgG2a）及びヒト IgG1TM（CAT-254）抗体とした。ヒト全血上清中の IL-6 の濃度を測定した。
データは各 2 ウェルずつ計測した平均値で、ドナー14 名のうち 1 名から得られた代表的なデータを示している。
IL-6 = インターロイキン 6、LLOQ = 定量下限。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

図 13　　ヒト全血における TNF-α産生の誘導



血漿を除去したヒト全血を抗ヒト CD3 抗体（抗体クローン：OKT3）及びデュルバルマブと共に 24 時間インキュベーションした。なお、培養への添加は、溶液添加又はウェットコーティング若しくはドライコーティングによる培養プレート表面への固定化にて行った。陰性対照は、無関連アイソタイプ適合マウス IgG2a（mIgG2a）及びヒト IgG1TM（CAT-254）抗体とした。ヒト全血上清中の TNF-αの濃度を測定した。
データは各 2 ウェルずつ計測した平均値で、ドナー14 名のうち 1 名から得られた代表的なデータを示している。
TNF-α = 腫瘍壊死因子-α、LLOQ = 定量下限。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

以上の結果から、デュルバルマブは PD-L1 に対するアンタゴニストとしての作用機序を有することから、臨床において急激なサイトカイン放出を惹起しないという推測が裏付けられた。

2.6.2.2.1.7　様々なヒト悪性腫瘍における膜結合型 PD-L1 及び可溶性 PD-L1 の発現の評価（試験 ONC4736-00[redacted]及び試験 ONC4736-00[redacted]）

複数の研究で、PD-L1 は複数臓器の悪性腫瘍で高頻度に異常発現していることが報告されている（Dong et al 2002）。そこで、ヒトの腫瘍組織検体を用い、PD-L1 の発現について検討した。

ヒト原発悪性腫瘍の凍結組織切片における膜結合型 PD-L1 の発現について、2.14H9 mIgG1 を用いて免疫組織化学的染色法により評価した（試験 ONC4736-00[redacted]）。なお、2.14H9 mIgG1 はデュルバルマブの抗原結合領域とマウス IgG1 の定常領域から作製した。この定常領域の変更は、試験計画書に規定されている確立された検出用試薬の抗マウス抗体を使用可能にする目的で導入した。以下に示すヒト腫瘍組織について免疫組織化学的染色を行った：前立腺癌、肝臓癌、腎臓

癌、膵臓癌、結腸直腸癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、胃癌及び膀胱癌。2.14H9 mIgG1 の添加により染色陽性と判定された腫瘍組織検体数を表 2に示す。高度に染色された腫瘍組織は、胃癌（6 検体中 6 検体、100%）、結腸直腸癌（8 検体中 7 検体、88%）、腎臓癌（10 検体中 9 検体、90%）及び肺癌（9 検体中 7 検体、78%）であった。腫瘍組織に浸潤している単核球及び間質細胞を含む一部の非腫瘍細胞においても、PD-L1 の発現を示す細胞膜及び細胞質の染色が認められた。

表 2　2.14H9 mIgG1 の添加により染色の細胞内局在が認められ、染色陽性と判定された腫瘍組織サンプル数

腫瘍の種類	検体数	染色陽性を示した検体数	細胞膜染色が認められた検体数	細胞質染色が認められた検体数
前立腺癌	8	2	0	2
肝臓癌	10	7	3	7
腎臓癌	10	9	5	7
膵臓癌	9	7	3	5
結腸直腸癌	8	7	7	3
卵巣癌	8	4	0	4
乳癌	9	4	0	4
肺癌	9	7	2	7
胃癌	6	6	3	5
膀胱癌	4	3	2	3

健康ドナーから採取した血漿中、並びに、癌患者から採取した血漿中及び腫瘍組織内の可溶性 PD-L1（sPD-L1）の濃度も評価した（試験 ONC4736-00[redacted]）。その結果、sPD-L1 の血漿中濃度は健康ドナーに比べて癌患者で明らかに上昇していた。

以上の結果から、sPD-L1 及び膜結合型 PD-L1 は共に、広範なヒト腫瘍組織に発現していることが確認された。この結果は、デュルバルマブの癌治療薬としての開発を支持するものである。

2.6.2.2.1.8　10F.9G2 のマウス PD-L1 との結合親和性、並びにマウス PD-L1 と PD-1 及び CD80 との結合相互作用に対する 10F.9G2 の阻害作用（試験 ONC4736-00[redacted]、試験 ONC4736-00[redacted]）

2.6.2.2.1.2項で先述したとおり、デュルバルマブは mPD-L1 に対して交差反応を示さない（試験 ONC4736-00[redacted]）。そこで、デュルバルマブの臨床開発を裏付けるための *in vivo* 非臨床試験の実施を可能にするため、抗 mPD-L1 抗体 10F.9G2 を代替抗体とした。この代替抗体とデュルバルマブの特性について比較検討を行った。

Kinetic Exclusion Assay（KinExA®）の label-free 技術を用い、組換えマウス PD-L1（rmPD-L1）に対する 10F.9G2 の結合親和性（K_D 値で表示）を検討した（試験 ONC4736-00[redacted]）。10F.9G2 と rmPD-L1 との結合の K_D 値は 7.66 pM となり、デュルバルマブと組換えヒト PD-L1（rhPD-L1）との結合の K_D 値の 3 倍以内であった（2.6.2.2.1.2項参照）。

rmPD-L1 と rmPD-1 及び rmCD80 との結合相互作用に対する 10F.9G2 の阻害作用を検討するため、HTRF 法による競合結合試験を実施した（試験 ONC4736-00[redacted]）。その結果、10F.9G2 は rmPD-L1 と rmPD-1 及び rmCD80 との結合相互作用をそれぞれ 2.0 及び 0.3 nM の IC_{50} 値で効果的に阻害することが示された。

以上の結果から、10F.9G2 の rmPD-L1 に対する特性は、デュルバルマブの rhPD-L1 に対する特性と同様であることが示されたため、マウスにおいてデュルバルマブの適切な代替抗体として使用できることが確認された。

2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験

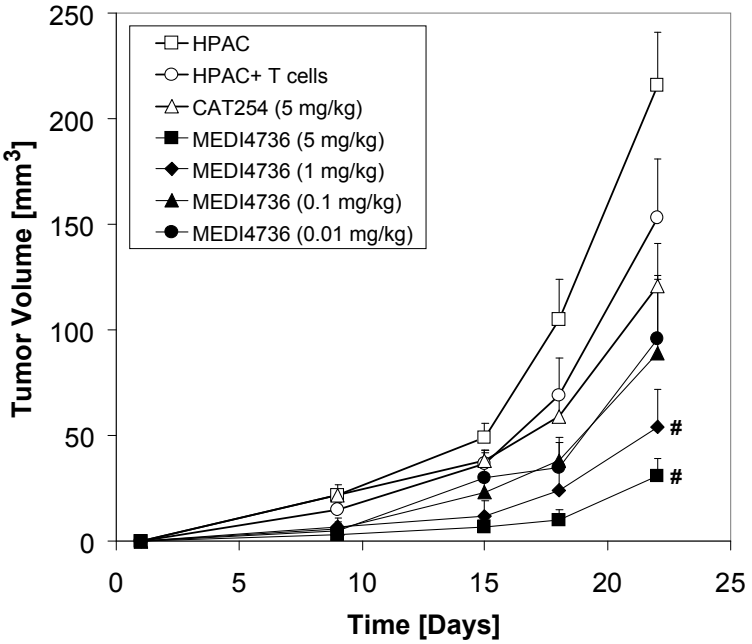
初期の *in vitro* での生化学試験で、デュルバルマブは PD-L1 に対する結合特異性を有し、PD-L1 と PD-1 及び CD80 との相互作用に対する阻害作用を示すことが確認された（試験 ONC4736-00[redacted]、試験 ONC4736-00[redacted] 及び試験 ONC4736-00[redacted]）。その後の細胞を用いた *in vitro* 試験において、デュルバルマブはこれらの特性により、PD-L1 を介した T 細胞活性化抑制作用に拮抗し、T 細胞の活性化を増強することが確認された（試験 ONC4736-00[redacted]）。このような *in vitro* で認められたデュルバルマブの作用が、*in vivo* において抗腫瘍効果をもたらすか、ヒト癌組織を移植したマウスモデルを用いて検討した。

2.6.2.2.2.1 マウスにおける免疫反応による殺腫瘍作用を介したデュルバルマブのヒト腫瘍増殖に対する阻害作用（試験 ONC4736-00[redacted]）

マウスに移植したヒト癌細胞株の増殖に対するデュルバルマブの影響を検討した（試験 ONC4736-00[redacted]）。健康ドナーから PBMC を単離した。ヒト膵臓癌由来細胞株 HPAC 及びヒト悪性黒色腫由来細胞株 A375 に対する初代 CD4 陽性及び CD8 陽性細胞株を作製した。試験 1 日目に、PD-L1 を発現する細胞株 HPAC 又は A375 を単独又は予め作成した T 細胞株と共に NOD/SCID マウスに移植した。移植 1 時間後及び 3、5、8、10 日目にデュルバルマブを腹腔内投与した。

デュルバルマブは、アイソタイプ対照抗体と比較して HPAC の増殖を有意に（最大 74%）阻害した（図 14及び表 3）。

図 14　　ヒト T 細胞を移入したマウスモデルにおけるヒト膵臓癌細胞株 HPAC の増殖に対するデュルバルマブの作用



試験 1 日目、各群 6 例の NOD/SCID マウスに細胞株 HPAC を単独又はアロ反応性ヒト CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞株と混合して（エフェクター：ターゲット（E：T）比＝1：6）皮下移植した。移植 1 時間後及び 3、5、8、10 日目に、HPAC 及び T 細胞を移植した動物に被験物質（デュルバルマブ又は CAT-254［3 箇所変異を有する抗ドキソルビシン免疫グロブリン G1（IgG1）アイソタイプ対照抗体］）を腹腔内投与した。腫瘍体積の平均値を示す。デュルバルマブ投与群と CAT-254 投与群の動物を比較し、Mann-Whitney 順位和検定を用いて投与群間の統計学的有意差を検定した。エラーバーは、平均値の標準誤差を示す。
#：50%超の腫瘍増殖抑制率（TGI）、アイソタイプ対照抗体と比較して P≤0.05。
CAT-254 = 3 箇所変異を有するヒト IgG1 アイソタイプ対照抗体、CD = 白血球分化抗原、HPAC = ヒト膵臓癌細胞株、NOD/SCID = 非肥満性糖尿病／重症複合免疫不全症。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

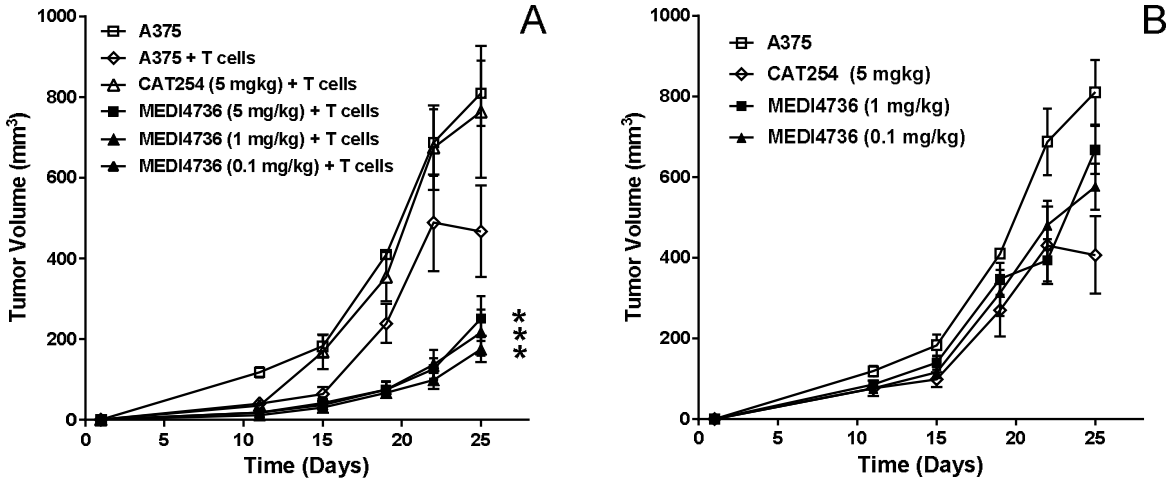
表 3　　ヒト T 細胞を移入したマウスモデルにおけるヒト膵臓癌細胞株 HPAC の増殖に対するデュルバルマブの作用

試験群	被験薬	投与量 (mg/kg)	%TGI
1	非投与；T 細胞非移入	NA	NA
2	非投与	NA	NA
3	CAT254	5	NA
4	MEDI4736	5	74
5	MEDI4736	1	55
6	MEDI4736	0.1	26
7	MEDI4736	0.01	21

例数は 1 群 6 例とした。特に記載のない場合、腫瘍細胞は T 細胞と共に移植した。いずれのマウスにも試験 1、3、5、8 及び 10 日目に被験薬液 200 μL を腹腔内に投与した。
%TGI = [1 - (投与群の平均腫瘍 V) ÷ (対照群の平均腫瘍 V)] x 100
TGI = 腫瘍増殖抑制率、NA = 該当せず、V = 体積、CAT254 = 3 箇所変異を有するヒト IgG1 アイソタイプ対照抗体。表中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

同様に、アイソタイプ対照抗体と比較して、デュルバルマブはヒト悪性黒色腫細胞株 A375 細胞の増殖を最大 77%阻害した（図 15A 及び表 4）。ヒト T 細胞を同時に移植せずに同様の試験を実施すると、デュルバルマブの抗腫瘍効果は認められなかった（図 15B 及び表 4）。

図 15　　マウスモデルにおけるヒト T 細胞に依存したヒト悪性黒色腫細胞株 A375 の増殖に対するデュルバルマブの作用



試験 1 日目、各群 6 例の NOD/SCID マウスに細胞株 A375 を単独（T 細胞なし、パネル B）又はアロ反応性ヒト CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞株と細胞株 A375 を混合して（E：T 比＝1：4.5）（パネル A）皮下移植した。1、3、5、8 及び 10 日目に、被験物質（デュルバルマブ又は CAT-254［アイソタイプ対照抗体］）を腹腔内投与した。平均腫瘍体積を示す。デュルバルマブ投与群と CAT-254 投与群の動物を比較し、Mann-Whitney 順位和検定を用いて投与群間の統計学的有意差を検定した。エラーバーは、平均値の標準誤差を示す。
*：アイソタイプ対照抗体と比較して P≤0.05。
A375＝ ヒト悪性黒色腫細胞株、NOD/SCID＝ 非肥満性糖尿病／重症複合免疫不全症、E:T＝ エフェクター／ターゲット細胞比、TGI＝ 腫瘍増殖抑制率、CAT254＝3 箇所変異を有するヒト IgG1 アイソタイプ対照抗体。
図中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

表 4　　ヒト T 細胞を移入したマウスモデルにおけるヒト悪性黒色腫細胞株 A375 の増殖に対するデュルバルマブの作用

試験群 [a]	被験薬	投与量 [b] (mg/kg)	% TGI [c]
1	非投与；T 細胞非移入	NA	NA
2	非投与	NA	NA
3	CAT254	5	NA
4	CAT254；T 細胞非移入	5	NA
5	MEDI4736	5	67 [d]
6	MEDI4736	1	77 [d]
7	MEDI4736	0.1	72 [d]
8	MEDI4736；T 細胞非移入	1	13
9	MEDI4736；T 細胞非移入	0.1	25

例数は 1 群 6 例とした。特に記載のない場合、腫瘍細胞は T 細胞と共に移植した。いずれのマウスにも、試験 1、3、5、8 及び 10 日目に被験薬液 200 µL を腹腔内に投与した。
%TGI = [1 - (投与群の平均腫瘍 V) ÷(対照群の平均腫瘍 V)] x 100
50%超の TGI、アイソタイプ対照抗体と比較して P≤0.05。
TGI＝ 腫瘍増殖抑制率、NA＝ 該当せず、V＝ 体積、CAT254＝3 箇所変異を有するヒト IgG1 アイソタイプ対照抗体。表中、デュルバルマブは MEDI4736 と表示している。

以上の結果から、マウス異種移植モデルにおいて、デュルバルマブがヒト腫瘍細胞の増殖を有意に阻害することが確認された。この活性が腫瘍特異的ヒト T 細胞に依存していたことから、デュルバルマブが免疫反応を介した殺腫瘍作用を増強するというメカニズムが裏付けられた。

2.6.2.2.2.2 マウス結腸直腸癌細胞株 CT26 同系移植モデルで認められた抗マウス PD-L1 抗体による用量依存的な抗腫瘍効果（試験 ONC4736-00[redacted]）

デュルバルマブは、マウス異種移植モデルへの単独投与により有意な抗腫瘍効果を示した（試験 ONC4736-00[redacted]）。しかし、免疫不全マウスを用いて作製した異種移植モデルでは、抗 PD-L1 抗体のような免疫療法の効果を繰り返し再現することは不可能である。そのため、抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果を検討する際には、正常な免疫能のあるマウスで作製した癌細胞株同系移植モデルを用いることとした。

デュルバルマブは mPD-L1 に対して交差反応を示さないため（2.6.2.2.1.2項参照）、抗 mPD-L1 抗体 10F.9G2 を代替抗体とし、マウス結腸直腸癌同 3 箇所変異モデルを用いることで（試験 ONC4736-00[redacted]）、正常免疫能のあるマウスの同系移植モデル系において抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果を評価し、抗腫瘍効果と用量との相関性を明らかにすることとした。

BALB/c 系マウスにマウス結腸直腸癌細胞株 CT26 を皮下移植し、4 日後にこれらのマウスに 10F.9G2 を 1、5、10 又は 20 mg/kg の投与量で週 2 回、計 8 回腹腔内投与した。なお、対照群にはアイソタイプ対照抗体（ラット抗 NIP 抗体）を同一の投与スケジュールで投与した。

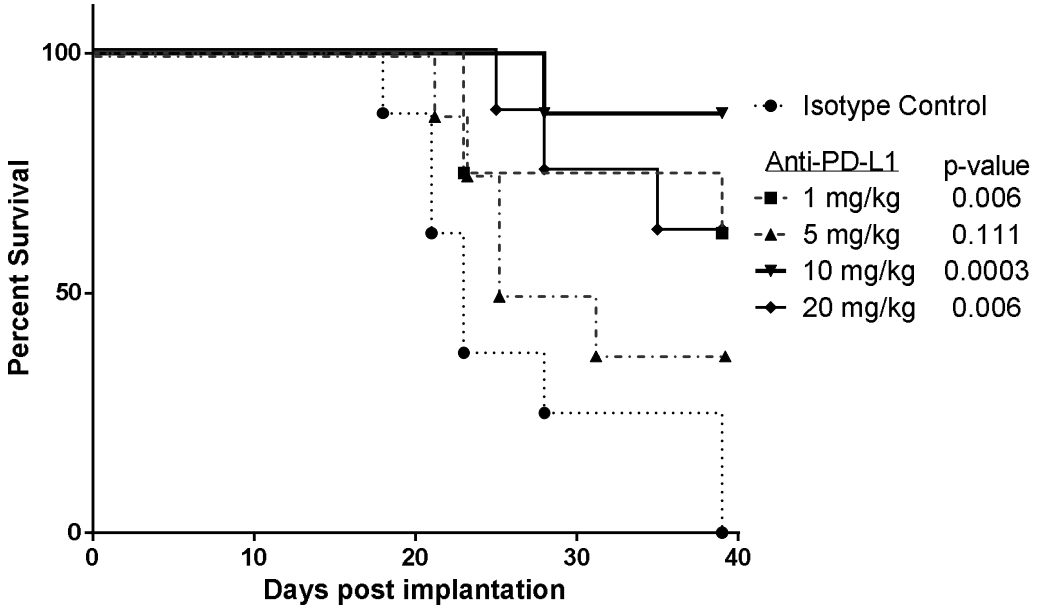
試験 ONC4736-00[redacted]に記載する人道的エンドポイントを適用し、試験開始から 39 日目までに対照群のマウス全例を安楽死処置した。その他のマウスは以下のいずれかに該当した。

- 被験薬の投与効果なし。これに該当するのは、人道的エンドポイント適用により安楽死処置したマウス、又は活発な腫瘍増殖がみられ腫瘍体積が 500 mm^3 を超えていたマウスであった。
- 被験薬の投与効果あり。これに該当するのは、測定可能な腫瘍病変が認められないマウス、又は腫瘍が安定し腫瘍体積が 200 mm^3 未満であるマウスであった。

本試験では、マウスへの被験薬投与効果の判定能を考慮し、上記の時点で終了することとなった。全被験マウスの Kaplan-Meier 生存曲線のプロットを図 16に示す。生存期間及び生存率の算定にあたり、試験終了時点で腫瘍体積が 500 mm^3 を超えていたマウスは 39 日目まで生存していたとみなした。一方、測定可能な腫瘍病変が認められないマウス又は腫瘍体積が 200 mm^3 未満と安定していたマウスは、試験終了時点を過ぎても生存していると判断し、右側打ち切りとした。

ラット抗 NIP 抗体（アイソタイプ対照抗体）投与群の生存期間中央値は 23 日で、生存率は 0%であった（図 16）。10F.9G2 投与群では、すべての用量群において生存率に改善が認められたが、対照抗体投与群と比較して生存率の差が有意であったのは 1 mg/kg 群（p=0.006）、10 mg/kg 群（p=0.0003）、及び 20 mg/kg 群（p=0.006）に限られ、生存率が最も高かったのは 10 mg/kg 群（87.5%）であった。1 mg/kg 群及び 20 mg/kg 群の生存率はいずれも 62.5%であった。これらの投与群と異なり、10F.9G2 を 5 mg/kg の用量で投与した群では生存率は 37.5%にすぎず、これにより生存期間中央値も 28 日となり、対照抗体投与群との有意差はなかった（p=0.111）。

図 16　　抗マウス PD-L1 抗体 10F.9G2 投与によるマウスの生存率



雌性 BALB/c 系マウス（1 群 8 例）にマウス結腸直腸癌細胞株 CT26 を皮下注射にて移植した。移植後 4 日目より、10F.9G2（抗 mPD-L1 抗体）を 1、5、10 又は 20 mg/kg の投与量で週 2 回、計 8 回、腹腔内投与した。アイソタイプ対照抗体（ラット抗 NIP 抗体）は投与量を 20 mg/kg とし、同一の投与スケジュールで投与した。
Kaplan-Meier プロットはマウス生存率の経時変化を示すものである。マウスは試験 ONC4736-00[redacted]に記載する人道的エンドポイントを適用し、試験から除外した。各被験薬投与群の生存曲線について、対照群と比較した統計学的有意差をログランク検定にて検討し、得られた p 値を図中に示した。
PD-L1 = programmed cell death ligand 1。

10F.9G2 10 mg/kg 未満の投与群（1 及び 5 mg/kg 群）の平均生存率は 50%であった。これに対して、10F.9G2 10 mg/kg 以上の投与群（10 及び 20 mg/kg 群）では平均生存率が 75%であった。この結果から、平均すると、10 mg/kg 以上の用量レベルの投与により、10 mg/kg 未満投与時に比べて生存効果が増大することが示唆された。

2.6.2.2.2.3　マウス結腸直腸癌細胞株 CT26 同系移植モデルにおける抗マウス PD-L1 抗体とオキサリプラチンとの併用効果（試験 ONC4736-00[redacted]）

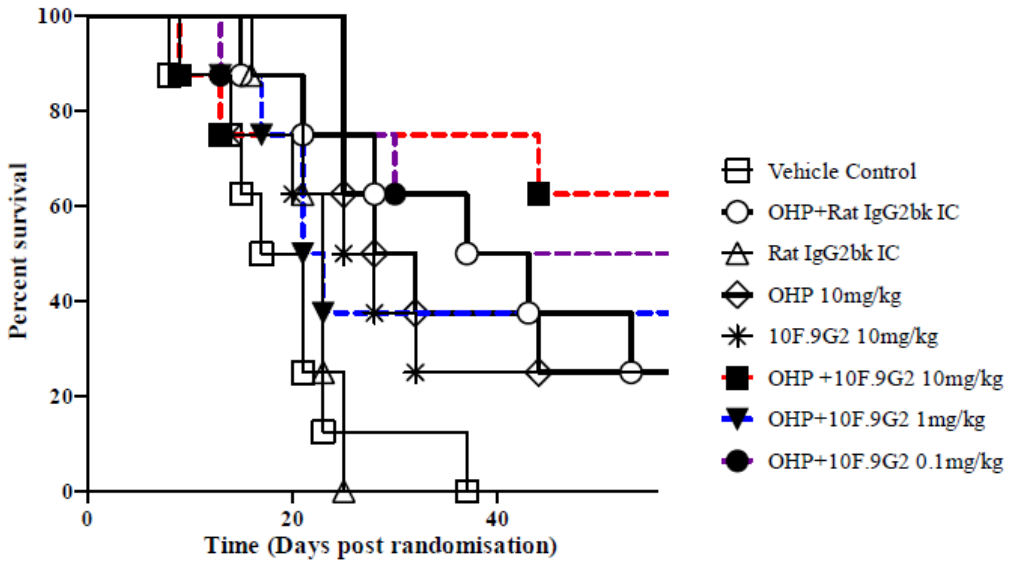
治療効果を増大させるには、抗 PD-L1 抗体と他の治療薬を併用する方が単独の治療薬よりも良好な効果が得られる可能性があるため、正常免疫能のあるマウスの同系移植モデル系において抗 PD-L1 抗体と他の治療薬との併用効果を検討した。

10F.9G2 を単独又は化学療法剤オキサリプラチンと併用で投与し、抗 PD-L1 抗体と白金製剤ベースの化学療法との併用効果の可能性を検討した。

Balb/c マウス（1 群 8 例）に、マウス結腸直腸癌細胞株 CT26 を移植した（試験 ONC4736-00[redacted]）。10F.9G2 若しくはオキサリプラチンを単独投与、又は 10F.9G2 とオキサリプラチンを併用にて投与した。溶媒投与対照群の生存期間中央値は 19 日であった（図 17）。一方、10F.9G2

及びオキサリプラチンの単独投与群ではいずれも、生存期間中央値がそれぞれ 26.5 日及び 30 日に延長された（図 17）。オキサリプラチンと 10F.9G2 を併用投与した群では生存期間中央値が 57 日まで、さらに延長された（図 17）。

図 17　　マウス結腸直腸癌細胞株 CT26 同系移植モデルにおける 10F.9G2 とオキサリプラチン併用投与群の生存率



雌性 BALB/c 系マウス 80 例にマウス結腸直腸癌細胞株 CT26 細胞を移植した。移植から 11 日後に投与を開始した。投与開始当日に測定可能な腫瘍病変を確認できなかったマウスは試験から除外した。残ったマウスを 1 群 8 例として投与群に割り付けた。オキサリプラチン（OHP）は 10 mg/kg の投与量で試験 0 日目に 1 回腹腔内投与した。10F.9G2 は 0.1、1 又は 10 mg/kg の投与量で試験 0 日目とその後は週 2 回、計 6 回腹腔内投与した。アイソタイプ対照抗体（ラット IgG2bκ）も 10 mg/kg の投与量で試験 0 日目とその後は週 2 回、計 6 回腹腔内投与した。

以上の結果から、抗 PD-L1 抗体とオキサリプラチンとの併用投与により、抗 PD-L1 抗体単独投与に比較して良好な効果が得られることが確認された。

2.6.2.3　副次的薬理試験

デュルバルマブの副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.4　安全性薬理試験

デュルバルマブの独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、カニクイザルを用いた 4 週間及び 13 週間反復投与毒性試験で（試験番号：VMM0008 及び VMM0033）、デュルバルマブ投与後に神経学的（臨床的観察による評価）、心血管系（心電図及び血圧）並びに呼吸数等の安全性薬理学的パラメータについて評価した。評価したパラメータでデュルバルマブの投与に関連した有害作用は認められなかった（毒性試験の概要文 2.6.6.3 項参照）。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

デュルバルマブの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

デュルバルマブは、hPD-L1 に対する IgG1κのヒト型モノクローナル抗体であり、IgG1 重鎖の定常領域に 3 箇所変異を有するため、補体タンパク C1q への結合能の低下と共に、ADCC を惹起する Fcγ 受容体に対する Fc 領域の親和性が低下している（Oganesyan et al 2008）。*In vitro* 生化学試験において、デュルバルマブは rhPD-L1 に特異的に高親和性に結合し、この結合により、hPD-L1 と hPD-1 及び hCD80 との相互作用を阻害することが確認された。デュルバルマブと rcynoPD-L1 との結合親和性が高いことも確認された。

細胞を用いた *in vitro* 試験で、デュルバルマブは初代ヒト T 細胞に対する PD-L1 の作用を阻害することにより、T 細胞の増殖が回復して IFN-γの産生が増加することが示された。これに対して、デュルバルマブは APC の機能には影響を及ぼさず、ADCC 及び CDC も惹起しない。デュルバルマブは抑制性受容体 PD-1 のリガンドである PD-L1 に結合して PD-L1 を中和するため、抗原特異的な T 細胞受容体によるシグナル伝達がなければ、PD-L1 の作用を阻害した場合にもサイトカイン放出等の反応は生じないと考えられる。このことは、T 細胞受容体刺激の非存在下では抗 PD-L1 抗体による影響は認められなかったという研究報告（Dong et al 2003）によって裏付けられている。さらに、14 名の健康ドナーから採取した全血試験系において、デュルバルマブは最高 300 μg/mL の濃度でも、3 つの試験条件（溶液添加、ウェットコーティング又はドライコーティングによる培養プレート表面への固定化）のいずれにおいてもサイトカイン放出を誘導しないことから明らかとなった。これらの結果から、デュルバルマブは PD-L1 に対するアンタゴニストとしての機序を有することが示唆され、臨床において急激なサイトカインの放出が起きる可能性は低いと考えられた。

In vivo において、腫瘍特異的ヒト T 細胞と共にヒト悪性腫瘍由来細胞株 A375 又は HPAC を移植した NOD/SCID マウスにデュルバルマブを投与した結果、ほぼ用量依存性の有意な抗腫瘍効果が認められた。重要なこととして、デュルバルマブが抗腫瘍効果を発現するには、移植した癌細胞株に反応するヒト T 細胞の移入が不可欠であった。このように抗腫瘍効果の発現が T 細胞の存在に依存していたことから、デュルバルマブが免疫反応を介した殺腫瘍作用を増強するという作用機序が裏付けられた。また、マウス結腸直腸癌細胞株 CT26 同系移植モデルで、抗 mPD-L1 抗体と化学療法剤オキサリプラチンを併用投与した場合も、それぞれの単独投与時と比較して著明な抗腫瘍効果が認められた。なお、ヒト原発悪性腫瘍組織検体について免疫組織化学的染色を行った結果、10 種類の腫瘍において PD-L1 の発現が確認されている。

以上、デュルバルマブに関する非臨床薬理試験の結果は、癌治療薬としてのデュルバルマブの臨床開発を裏付けるものと考えられた。

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

Dong et al 2002

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(8):793-800.

Dong et al 2003

Dong H, Strome SE, Matteson EL, Moder KG, Flies DB, Zhu G, et al. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. J Clin Invest. 2003;111:363-70.

Hamanishi et al 2007

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 USA. 2007;104(9):3360-5.

Hirano et al 2005

Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity. Cancer Res. 2005;65(3):1089-96.

Iwai et al 2002

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 USA. 2002;99(19):12293-7.

Keir et al 2008

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2008;26:677-704.

Krambeck et al 2007

Krambeck AE, Dong H, Thompson RH, Kuntz SM, Lohse CM, Leibovich BC, et al. Survivin and B7-H1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2007;13(6):1749-56.

Kuipers et al 2006

Kuipers H, Muskens F, Willart M, Hijdra D, van Assema FB, Coyle AJ, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. Eur Jour Immunology. 2006;36(9):2472-82.

Lin et al 2008

Lin DY, Tanaka Y, Iwasaki M, Gittis AG, Su HS, Mikami B, et al. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(8):3011-16.

Loos et al 2008

Loos M, Giese NA, Kleeff J, Giese T, Gaida MM, Bergmann F, et al. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. Cancer Lett. 2008;268(1):98-109.

Mu et al 2011

Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. Med Oncol. 2011;28(3):682-8.

Nomi et al 2007

Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(7):2151-7.

Oganesyan et al 2008

Oganesyan V, Gao C, Shirinian L, Wu H, Dall'Acqua WF. Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008;64(6):700-4.

Okudaira et al 2009

Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, Okada Y, Komoto S, Watanabe C, et al. Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. Int J Oncol. 2009;35(4):741-9.

Park et al 2010

Park J, Omiya R, Matsumura Y, Sakoda Y, Kuramasu A, Augustine MM, et al. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. Blood. 2010;116(8):1291-8.

Stebbings et al 2007

Stebbings R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, et al. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. J Immunol. 2007;179(5):3325-31.

Stewart et al 2015

Stewart R, Morrow M, Hammond SA, Mulgrew K, Marcus D, Poon, E, et al. Identification and characterization of MEDI4736, an antagonist anti-PD-L1 monoclonal antibody. Cancer Immunol Res. 2015;3(9):1052-62.

Thompson et al 2005

Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. Cancer. 2005;104(10):2084-91.

Thompson et al 2006

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(7):3381-5.

Wang et al 2010

Wang L, Ma Q, Chen X, Guo K, Li J, Zhang M. Clinical significance of B7-H1 and B7-1 expressions in pancreatic carcinoma. World J Surg. 2010;34(5):1059-65.

Zhang et al 2008

Zhang C, Wu S, Xue X, Li M, Qin X, Li W, et al. Anti-tumor immunotherapy by blockade of the PD-1/PD-L1 pathway with recombinant human PD-1-IgV. Cytotherapy. 2008;10(7):711-9.

Zou and Chen 2008

Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol. 2008;8(6):467-77.

2.6.3　薬理試験概要表

デュルバルマブ

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

頁

目次 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 13
2.6.3.4 安全性薬理試験 13
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 13

表目次

表 1 効力を裏付ける試験一覧：デュルバルマブ 3
表 2 *In silico* 又は *in vitro* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ 4
表 3 *In vivo* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ 11

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表

表 1　　効力を裏付ける試験一覧：デュルバルマブ

Study Number	Study Type	Study Title	GLP Compliance	Testing Facility	Module Number
ONC4736-00[redacted]	*In silico*	Analysis of Sequence Homology of Human, Mouse, Rat, and Cynomolgus Monkey B7-H1	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-1
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Binding of MEDI4736 to Recombinant Human B7-H1 Depends on Arginine at Position 95 in B7-H1	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-2
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Affinity for Binding of MEDI4736 to Recombinant Human and Recombinant Cynomolgus Monkey B7-H1	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-3
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Determination of the Binding Specificity of MEDI4736 for Recombinant Human B7-H1 Compared to Related Human and Mouse Proteins	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-4
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Determination of the Ability of MEDI4736 to Inhibit Binding of Recombinant Human B7-H1 to Recombinant Human Programmed Death 1 and CD80	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-5
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Determination of the Ability of MEDI4736 to Overcome the B7-H1-mediated Inhibition of Primary Human T Cells *In Vitro*	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-6
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Evaluation of MEDI4736 *In Vitro* Potency in Primary Human T Cells	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-7
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Inhibition of Activity of Antigen-presenting Cells by MEDI4736	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-8
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Determination of the Ability of MEDI4736 to Trigger Effector Function	No	MedImmune, Gaithersburg	4.2.1.1-9
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	*In Vitro* Assessment of MEDI4736-mediated Cytokine Release in Human Whole Blood	No	MedImmune, Hayward	4.2.1.1-10
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Assessment of Expression of B7-H1 in Cancerous Tissues	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-11

表 1　効力を裏付ける試験一覧：デュルバルマブ

Study Number	Study Type	Study Title	GLP Compliance	Testing Facility	Module Number
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Detection of Soluble B7-H1 in Matched Samples of Human Tumors and Plasma	No	MedImmune, Gaithersburg	4.2.1.1-12
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Affinity of Binding of Anti-mouse B7-H1 Antibody 10F.9G2 to Recombinant Mouse B7-H1	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-13
ONC4736-00[redacted]	*In vitro*	Determination of the Ability of Anti-mouse B7-H1 Antibody 10F.9G2 to Inhibit Binding of Recombinant Mouse B7-H1 to Recombinant Mouse Programmed Death 1 and CD80	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-14
ONC4736-00[redacted]	*In vivo*	Activity of MEDI4736 in Mouse Models of Human Cancers	No	MedImmune, Gaithersburg	4.2.1.1-15
ONC4736-00[redacted]	*In vivo*	The Antitumor Activity of an Anti-mouse PD-L1 Antibody is Dependent on Dose Level in a Syngeneic Mouse Colorectal Cancer Model	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-16
ONC4736-00[redacted]	*In vivo*	Combination of Anti-mouse B7-H1 Antibody with Oxaliplatin Inhibits the Growth of Mouse Colorectal Cancer in a Syngeneic Model	No	MedImmune, Cambridge	4.2.1.1-17

In this table, PD-L1 is referred to as B7-H1, and durvalumab is referred to as MEDI4736.

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

表 2　*In silico* 又は *in vitro* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ

Study Number	Study Objectives	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
ONC4736-00[redacted]	To assess the aa sequence homology between the ECD of hB7-H1 and mB7-H1,	hB7-H1 and mB7-H1 sequences from the UniProt database rB7-H1 sequence from NCBI cynoB7-H1 consensus sequence	Sequence alignment and comparison using Clustal W algorithm	The identity of the aa sequences of the ECD between: hB7-H1 and cynoB7-H1 was 95.9% hB7-H1 and mB7-H1 was 73.5%

表 2 *In silico* 又は *in vitro* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ

Study Number	Study Objectives	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
	rB7-H1, or cynoB7-H1	obtained by sequencing the B7-H1 gene in 54 individual animals		hB7-H1 and rB7-H1 was 74.4%
ONC4736-00[redacted]	To determine if I36 and R95 are necessary for binding of MEDI4736 to rhB7-H1	unlabeled *wt*, I36A, R95A rhB7-H1 (339 nM to 0.0175 pM) Flag-tagged *wt* rhB7-H1 (1.25 nM) MEDI4736 and Dylight 649-conjugated MEDI4736 2.7A4 and Dylight 649-conjugated 2.7A4	HTRF	Unlabeled *wt* rhB7-H1 inhibited binding of: MEDI4736 to *wt* Flag-tagged rhB7-H1 with IC_{50} of 0.76 nM; 2.7A4 to *wt* Flag-tagged rhB7-H1 with IC_{50} of 2.79 nm I36A rhB7-H1 inhibited binding of: MEDI4736 to *wt* Flag-tagged rhB7-H1 with IC_{50} of 1.48 nM; 2.7A4 to *wt* Flag-tagged rhB7-H1 with IC_{50} of 1.94 nM R95A rhB7-H1: did not inhibit binding of MEDI4736 to *wt* Flag-tagged rhB7-H1; inhibited binding of 2.7A4 to *wt* Flag-tagged rhB7-H1 with IC_{50} of 4.6 nM
ONC4736-00[redacted]	To determine the binding affinity of MEDI4736 for rhB7-H1 and rcynoB7-H1	rhB7-H1 (3.05 to 50 pM) and MEDI4736 (20 and 100 pM) and rcynoB7-H1 (1.53 pM to 50 nM) and MEDI4736 (20 and 250 pM)	KinExA label-free technology	Binding of MEDI4736 to: rhB7-H1 with K_D of 22 pM; rcynoB7-H1 with K_D of 78 pM
ONC4736-00[redacted]	To assess the specificity of MEDI4736 for hB7-H1 relative to	rmB7-H1, rhB7-H1, rhPD-L2, rhB7-H3, rhB7-H2, rhCD28, rhCTLA-4, rhPD-1 coated onto plates (at a concentration of	ELISA	MEDI4736 did not bind to rmB7-H1, rhPD-L2, rhB7-H3, rhB7-H2, rhCD28, rhCTLA-4, rhPD-1.

表 2 *In silico* 又は *in vitro* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ

Study Number	Study Objectives	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
	mB7-H1 and human proteins of related aa sequence or function	5 μg/mL) and Biotinylated MEDI4736 or biotinylated CAT254 (isotype-control)		
ONC4736-00[redacted]	To determine the ability of MEDI4736 to inhibit the interaction between rhB7-H1 and rhPD-1 or rhCD80	Biotinylated rhPD-1 (1 nM) and streptavidin XL665 (4 nM), europium cryptate-conjugated rhB7-H1 or 2.7A4 (control anti-B7-H1; 1000 nM), and MEDI4736 (0.02 pM to 1537 nM) or NIP228 (isotype-control) or Biotinylated rhCD80 (8 nM) and streptavidin XL665 (20 nM), europium cryptate-conjugated rhB7-H1 or 2.9D10 (control anti-B7-H1; 100 nM), and MEDI4736 (0.01 pM to 100 nM) or CAT254 (isotype-control)	HTRF	MEDI4736 inhibited the interaction between: rhB7-H1 and rhPD-1 in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of 0.1 nM; rhB7-H1 and rhCD80 in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of 0.04 nM
ONC4736-00[redacted]	To determine the ability of MEDI4736 to overcome the inhibition of T-cell activation mediated by B7-H1	Primary human T cells and Beads coated with anti-CD3, anti-CD28, and either B7-H1 or CAT004 (an irrelevant control protein) and MEDI4736 (0.02, 0.20, 2.00, 20.00 μg/mL) or CAT254 (isotype	*In vitro* activation of primary human T cells measured as proliferation (thymidine incorporation) and release of IFN-γ	Incubation of primary human T cells with: anti-CD3, anti-CD28, and CAT004 caused an increase of T-cell proliferation and release of IFN-γ; anti-CD3, anti-CD28, and B7-H1 decreased T-cell proliferation and release of IFN-γ Addition of MEDI4736 to cultures of

表 2 *In silico* 又は *in vitro* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ

Study Number	Study Objectives	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
		control; 0.02, 0.20, 2.00, 20.00 μg/mL)		primary T cells, anti-CD3, anti-CD28, and B7-H1 increased T-cell proliferation and release of IFN-γ.
ONC4736-00[redacted]	To determine the potency of MEDI4736 in primary human T cell activation assays	Primary human T cells and Mitomycin C-treated CHO clone 37 cells expressing anti-CD3 (OKT3) and PD-L1 and MEDI4736 (10.00, 5.00, 2.50, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08, 0.04, or 0.02 μg/mL) or NIP228 (isotype control; 10.00, 5.00, 2.50, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08, 0.04 or 0.02 μg/mL)	*In vitro* activation of primary human T cells measured as proliferation (thymidine incorporation)	Coculture of primary human T cells with CHO clone 37 cells resulted in increased proliferation of T cells. Addition of NIP228 to cocultures had no effect on proliferation at any concentration tested. Addition of MEDI4736 to cocultures increased T-cell proliferation in a concentration dependent manner. The potency of MEDI4736 varied across individuals. 100% of donors tested reached 90% maximal in vitro response to MEDI4736 (EC_{90}) at a concentration of 3 μg/mL or less.
ONC4736-00[redacted]	To assess the ability of MEDI4736 to inhibit activity of APCs	Human PBMCs incubated with tetanus toxoid (1 μg/mL) and MEDI4736 or X40-0031V2 (anti-OX40L; positive control) or CAT254 (negative control) or CAT253 (negative control)	*In vitro* antigen recall assay Human PBMCs incubated with tetanus toxoid and MEDI4736, X40-0031V2, CAT254 or CAT253; then, their proliferation measured by incorporation of tritiated thymidine	Incubation of human PBMCs with tetanus toxoid resulted in significant increase of thymidine incorporation. Addition of MEDI4736 had no effect on thymidine incorporation. Addition of X40-0031V2 resulted in concentration-dependent inhibition of thymidine incorporation. Addition of CAT254 and CAT253 had no significant effect on thymidine incorporation.

表 2　　*In silico* 又は *in vitro* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ

Study Number	Study Objectives	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
		Presentation of MEDI4736, X40-0031V2, CAT254, and CAT253: soluble (0.02, 0.2, 2.00, and 20.00 μg/mL) cross-linked (0.02, 0.2, 2.00, and 20.00 μg/mL)		
ONC4736-00[redacted]	To assess the ability of MEDI4736 to trigger ADCC and CDC against cells expressing B7-H1	SKBR3 cell line expressing hB7-H1 or Daudi cell line MEDI4736, 2.14H9 hIgG1, and, anti-HER2 and anti-CD20 antibodies (6.1×10^{-4} to 12 μg/mL) Human serum and heat-inactivated human serum or NK92/CD16/NFAT Luciferase clone 8	Chemiluminescence (luminescent signal used as a surrogate for CDC and ADCC)	**CDC assay**: MEDI4736 and 2.14H9 hIgG1 did not cause increase in luminescent signal; Anti-CD20 caused concentration-dependent increase in luminescent signal in presence of human serum but not heat-inactivated human serum. **ADCC assay**: MEDI4736 did not cause increase in luminescent signal; 2.14H9 hIgG1and anti-HER2 antibody caused concentration-dependent increase in luminescent signal
ONC4736-00[redacted]	To assess the potential of MEDI4736 to induce cytokine release in a whole blood assay system using whole blood from healthy human	Human whole blood from 14 healthy donors and MEDI4736 or CAT-254 (negative control for MEDI4736)	Plasma-depleted human whole blood incubated with MEDI4736, or OKT3 and the respective negative controls for 24 hours Levels of IFN-γ, IL-2, IL-6,	Levels of cytokines induced by MEDI4736 (wet- and dry-coated and in solution): IFN-γ: below LLOQ IL-2: below LLOQ IL-6: below LLOQ TNF-α: below LLOQ

表 2 *In silico* 又は *in vitro* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ

Study Number	Study Objectives	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
	donors	or OKT3 (anti-human CD3; positive control) or mIgG2a (negative control for OKT3) Presentation methods: wet- and dry-coated: OKT3 and mIgG2a at 10 µg/mL, MEDI4736 and CAT-254 at 3, 30, 100, and 300 µg/mL in solution: OKT3 and mIgG2a at 1 µg/mL, MEDI4736 and CAT-254 at 3, 30, 100, and 300 µg/mL	and TNF-α measured in supernatant by Luminex Plasma-depleted human whole blood cells cultured in RPMI1640	Levels of cytokines induced by OKT3 (wet- and dry-coated and in solution): IFN-γ: 31.3 to 2868.7 pg/mL IL-2: 103.3 to 3257.9 pg/mL IL-6: 10.5 to 1195.8 pg/mL TNF-α: 99.9 to 3486.0 pg/mL
ONC4736-00[redacted]	To assess the expression of B7-H1 in human colorectal, ovarian, breast, lung, prostatic, gastric, liver, renal, pancreatic, and bladder tumors	Multi-tumor tissue microarrays and tissue sections stained with 2.14H9 mIgG1 (0.5 µg/mL or 1.5 µg/mL) or CAT004 (isotype-control)	Immunohistochemistry	The tumor types with the highest number of positively stained samples: gastric (100%), colorectal (88%), renal (90%), and lung (78%) Positive membranous and cytoplasmic staining for B7-H1 also observed in nontumor cells, including infiltrating mononuclear cells and stromal cells
ONC4736-00[redacted]	To quantitate levels of sB7-H1 in plasma and tumor extracts from a single donor To explore the relationship between	Human plasma and tumor extracts anti-hB7-H1 antibody 2.7A4 (1.0 µg/mL or 25 ng/well) coated onto plates	ECL	sB7-H1 was detectable in human plasma and tumor extracts. sB7-H1 appeared to be elevated in the plasma of patients with cancer. Possible correlation between levels of sB7-H1 in tumor extracts and plasma in

表 2 *In silico* 又は *in vitro* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ

Study Number	Study Objectives	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
	levels of sB7-H1 in plasma and tumor extracts obtained from the same donor	Sulfo-Tag labeled mouse anti-B7-H1 antibody (1.0 μg/mL)		NSCLC ADC.
ONC4736-00[redacted]	To determine the binding affinity of 10F.9G2 for rmB7-H1	rmB7-H1 (1.53 pM to 50 nM) 10F.9G2 (5 pM)	KinExA label-free technology	Binding of_10F.9G2 to: rmB7-H1 with K_D of 7.66 pM
ONC4736-00[redacted]	To determine the ability of 10F.9G2 to inhibit the interaction between rmB7-H1 and rmPD-1 or rmCD80	Biotinylated rmPD-1 (4 nM) and streptavidin XL665 (4 nM), europium cryptate-conjugated rmB7-H1, and 10F.9G2 (3 pM to 200 nM) or Dylight 649-conjugated rmCD80 (44 nM), europium cryptate-conjugated rmB7-H1, and 10F.9G2 (0.08 pM to 833 nM)	HTRF	10F.9G2 inhibited the interaction between: rmB7-H1 and rmPD-1 in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of 2.0 nM; rmB7-H1 and rmCD80 in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of 0.3 nM

aa = amino acid; ADCC = antibody-dependent cell-mediated toxicity; APC = antigen-presenting cell; cyno = cynomolgus monkey; CDC = complement-dependent cytotoxicity; CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; ECD = extracellular domain; ECL = electrochemiluminescence; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay;-h = human; HTRF = homogeneous time resolved fluorescence; IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration; IFN-γ = interferon gamma; IL = interleukin; I36 = isoleucine at position 36; I36A = isoleucine at position 36 replaced with alanine; K_D = equilibrium dissociation constant; LLOQ = lower limit of quantitation; m = mouse; NSCLC ADC = non-small cell lung adenocarcinoma; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; PD-1 = programmed death 1; r = rat; rcyno = recombinant cynomolgus monkey; rh = recombinant human; rm = recombinant mouse; R95 = arginine at position 95; R95A = arginine at position 95 replaced with alanine; sB7-H1 = soluble B7-H1; TNF-α = tumor necrosis factor alpha; *wt* = wild-type.
In this table, PD-L1 is referred to as B7-H1, and durvalumab is referred to as MEDI4736.

表 3 *In vivo* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ

Study Number	Study Objectives	Species/No. per Group	Dose/ROA	Noteworthy Findings
ONC4736-00[redacted]	To evaluate anticancer activity of MEDI4736 in xenograft mouse models of human melanoma and pancreatic cancer	NOD/SCID mice (6/group) Implanted with human melanoma (A375) or pancreatic (HPAC) cancerous cell lines or Implanted with A375 or HPAC cancer cell lines and alloreactive human T cells	Untreated or MEDI4736: 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, or 10 mg/kg IP 1 hour after implantation and up to 4 additional doses on Days 3, 5, 8, and/or 10 or CAT254 (isotype control): 1, 5, or 10 mg/kg IP 1 hour after implantation and up to 4 additional doses on Days 3, 5, 8, and/or 10 or rhIL-2: 10^5 U IP on Days 1 to 5	MEDI4736 inhibited the growth of A375 and HPAC cancerous cell lines by up to 95% and 74% as compared to the isotype-control group, respectively. Inhibition of growth by MEDI4736 depended: on the presence of alloreactive human T cells on dose level (no more than 1 mg/kg for the HPAC, and 0.01 mg/kg for A375) on the schedule of dosing for A375 cell line (no more than 2 doses within a 10-day period)
ONC4736-00[redacted]	To evaluate anticancer activity of 10F.9G2 and its dependency on dose level in a syngeneic mouse model of colon cancer	BALB/c mice (8/group) Implanted subcutaneously with mouse (CT26) colorectal cancer cell line	10F.9G2: 1, 5, 10 or 20 mg/kg IP 2-times a week for 4 weeks starting 4 days after implantation or Rat IgG2b isotype-control (anti-NIP): 20 mg/kg IP 2-times a week for 4 weeks starting 4 days after implantation	In the mouse (CT26) colorectal cancer model, treatment with 10F.9G2 over 39 days resulted in a maximum improved survival of 87.5% as compared to 0% observed in an isotype control group. This maximal effect was observed when mice were treated with 10 mg/kg 10F.9G2 2-times a week for 4 weeks. The average survival rate in mice receiving less than 10 mg/kg 10F.9G2 was 50%. The average survival rate in mice receiving greater than or equal to 10 mg/kg 10F.9G2 was 75%. This suggests that, on average, dose levels at or above 10 mg/kg support a greater level of activity than those below 10 mg/kg.

表 3 *In vivo* における効力を裏付ける試験：デュルバルマブ

Study Number	Study Objectives	Species/No. per Group	Dose/ROA	Noteworthy Findings
ONC4736-00[redacted]	To evaluate anticancer activity of 10F.9G2 as a monotherapy or in combination with oxaliplatin in a syngeneic mouse model of colon cancer	BALB/c mice (8/group) Untreated or Implanted with mouse (CT26) colorectal cancer cell line	10F.9G2: 10 mg/kg IP 2-times a week for 3 weeks starting 7 days after randomization or Oxaliplatin: 10 mg/kg IP once on the day of randomization or Rat IgG2b (isotype-control): 10 mg/kg IP 2-tmes a week for 3 weeks starting 7 days after randomization or 10F.9G2: 0.1, 1 or 10 mg/kg in combination with oxaliplatin as described above or Rat IgG2b given as described above in combination with oxaliplatin given as described above or 5% glucose given IP once on the day of randomization in combination with saline given IP 2-times a week for 3 weeks starting 7 days after randomization	Anticancer activity of combination treatment of 10F.9G2 with oxaliplatin: was greater than when 10F.9G2 was used as monotherapy. did not depend on dose level of 10F.9G2.

IP = intraperitoneal; No. = number; NOD/SCID = nonobese diabetic/severe combined immunodeficient; rh = recombinant human; ROA = route of administration; U = unit.
In this table, PD-L1 is referred to as B7-H1, and durvalumab is referred to as MEDI4736.

2.6.3.3　副次的薬理試験

デュルバルマブの副次的薬理試験は実施していない。

2.6.3.4　安全性薬理試験

デュルバルマブに関する独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、中枢神経系（一般状態による評価）、心血管系（心電図及び血圧）並びに呼吸数を含めた安全性薬理学的パラメータは、カニクイザルを用いた 4 週間及び 13 週間の反復投与毒性試験（試験 VMM0008 及び試験 VMM0033、毒性試験の概要文 2.6.6.3 項参照）においてデュルバルマブ投与後に評価を行った。評価パラメータにおいてデュルバルマブ投与に関連した有害な作用は認められなかった。

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

デュルバルマブに関する薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。