**第 2 部　CTD の概要**

トレメリムマブ

版番号：[redacted]

# 2.6.1　緒言
# トレメリムマブ

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

標題ページ ..... 1
目次 ..... 2
略語及び専門用語一覧表 ..... 3
2.6.1.1 緒言 ..... 4
2.6.1.1.1 一般的な情報 ..... 6
2.6.1.1.1.1 名称 ..... 6
2.6.1.1.1.2 一般的特性 ..... 6
2.6.1.2 参考文献 ..... 7

# 図目次

図 1 T 細胞が活性化される際の主要なシグナル ..... 4

# 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。

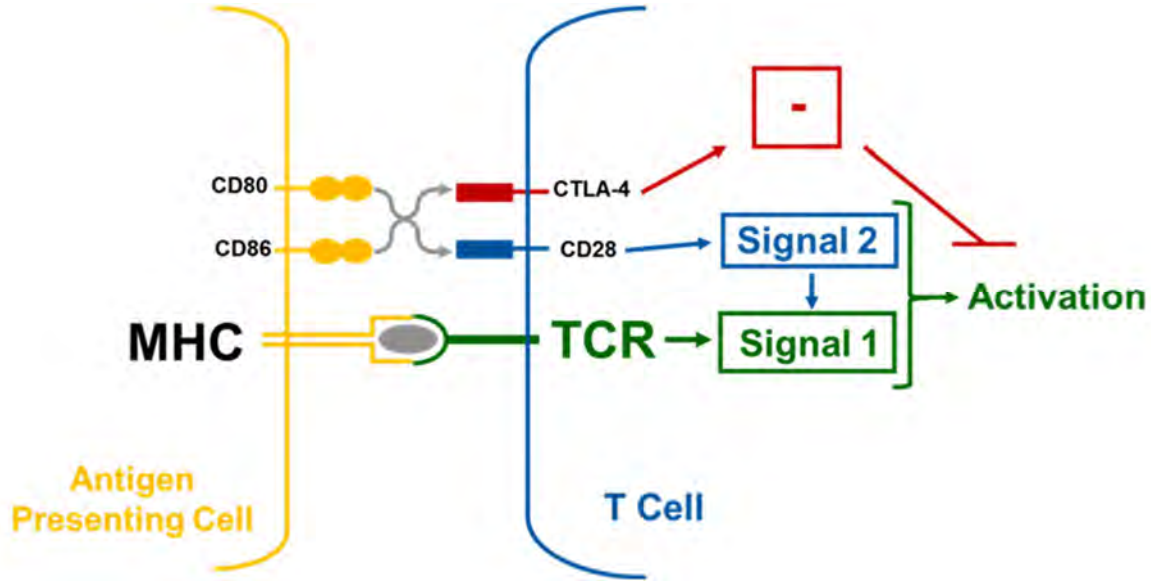
| 略語及び専門用語 | 用語の説明 |
|---|---|
| CTLA-4 | Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4：細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 |
| HCC | Hepatocellular carcinoma：肝細胞癌 |
| IFN | Interferon：インターフェロン |
| INN | International Nonproprietary Name：国際一般的名称 |
| JAN | Japanese Accepted Name：一般的名称 |
| mAb | Monoclonal antibody：モノクローナル抗体 |
| NSCLC | Non-small cell lung cancer：非小細胞肺癌 |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核細胞 |
| Treg | Regulatory T cells：制御性 T 細胞 |

## 2.6.1.1　緒言

トレメリムマブは、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（CTLA-4）に対するヒトモノクローナル抗体（mAb）であり、Pfizer 社によって（旧名称 CP675,206 として）開発されていた。アストラゼネカ社は 20[redacted] 年にファイザー社とのライセンス契約の下、トレメリムマブを導入した。トレメリムマブは他のいずれの国でも承認されていない。

トレメリムマブは、主として活性化された T 細胞表面に発現している CTLA-4 に結合する。CTLA-4 は T 細胞活性化の制御に関与するリガンドと受容体の複雑なシステムの一部を成すものである（図 1）。CTLA-4 がその標的リガンドである CD80（B7.1）及び CD86（B7.2）と結合すると、主に同じく CD80/86 に結合しようとする CD28 と競合することにより、T 細胞の活性化が抑えられる（Walker and Sansom 2015）。

**図 1　　T 細胞が活性化される際の主要なシグナル**




T 細胞は 2 つのシグナルを受けて活性化される。シグナル 1 は T 細胞受容体（TCR）が抗原提示細胞（APC）上の主要組織適合性抗原複合体（MHC）分子により提示された抗原を認識した際に伝達される最初の活性化シグナルである。シグナル 2 は T 細胞上の CD28 が APC 上の 2 つのリガンド CD80 又は CD86 のうちの 1 つに結合した際に伝達されるシグナルである。シグナル 1 とシグナル 2 が同時に伝達されることにより、T 細胞の完全な活性化が生じる。この活性化は T 細胞の活性化を阻害する一連の受容体により制御される。細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（CTLA-4）はこのような受容体の 1 つである。CTLA-4 は T 細胞が活性化されるとアップレギュレーションされ、CD80 及び CD86 と結合して CD28 のシグナル伝達能を制限し、それにより T 細胞機能を抑制する。

*In vitro* でトレメリムマブ存在下にヒトの全血又は末梢血単核細胞を培養すると、サイトカイン（IL-2、IFN-γ）産生が増加したことから、トレメリムマブは CTLA-4 とリガンド CD80 及び CD86 との結合を阻害してヒト T 細胞の活性化を亢進することが明らかとなった（Tarhini and Kirkwood 2008）。さらに、癌の動物モデルにおいても、抗マウス CTLA-4 抗体によって CD80/86 と CTLA-4 の結合を阻害すると、T 細胞の活性化が著明に亢進し、抗腫瘍活性も著明に増大することが認められている。

免疫療法に基づくレジメンにより、転移性非小細胞肺癌（NSCLC）の臨床現場の治療は大きな進歩を遂げており、転移性 NSCLC 患者層における予後は改善を示している（NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Version 1.2020）。臨床診療における治療法の選択は、通常 PD-L1 発現又は組織型に基づいて行われる。現在のところ、PD-L1 高発現の患者にはペムブロリズマブ単剤が推奨されている一次治療薬である（腫瘍細胞の 50%以上で PD-L1 発現、Reck et al [KEYNOTE-024] 2016、Mok et al [KEYNOTE-042] 2019、NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Version 2.2021）。また、ペムブロリズマブ単独投与は PD-L1 発現が 1～49%の患者にも承認されている。さらに、PD-L1 発現又は組織型に関わらず一次治療の選択肢として推奨されているペムブロリズマブ／化学療法（Gandhi et al [KEYNOTE-189] 2018）及びアテゾリズマブ／化学療法（Socinski et al [Impower150] 2018）といった、組織型による化学療法と免疫療法との組み合わせでも生存期間の延長が示されている。

免疫療法は新しい治療ストラテジーとして発展を続け、この致死的な疾患の予後を改善する治療薬を選択する評価が行われる。それらの治療法のうち、チェックポイント阻害の併用及びチェックポイント阻害と既存の化学療法との併用がある。CTLA-4 と PD-1/PD-L1 の阻害の特異的であるが相補的な作用メカニズムを考慮すると、チェックポイント阻害の併用により相乗的な抗腫瘍活性が示される可能性がある。また、化学療法とチェックポイント阻害の併用により、免疫療法の最初の数週間に初期の疾患コントロールが得られ、長期間の臨床的ベネフィットを増強すると仮定される。PD-1/CTLA-4 阻害薬の併用であるニボルマブ／イピリムマブは、進行した NSCLC 及び PD-L1 発現 1%超の患者における一次治療として、生存期間の延長及び持続的反応を示した（Hellmann et al [CheckMate-227] 2019）。さらに近年、ニボルマブ／イピリムマブの併用に化学療法を追加することにより、全ての PD-L1 発現レベルで早期の病勢コントロールに関して化学療法単独よりも優れた有効性が示された（Paz-Ares et al [Checkmate 9LA] 2021）。

肝細胞癌（HCC）は癌による死亡原因で世界で 4 番目に多く、年間約 782,000 例の死亡を占めており、世界の癌関連全死亡数の 8.2%に相当する（Bray et al 2018）。

HCC は炎症に関連する癌であるので、HCC では PD-1/PD-L1 及び CTLA-4 が重要な役割を果たしている可能性がある。正常な肝臓は免疫抑制環境であり、非毒性食料及び環境的抗原に本質的に寛容原性を示し、異常な炎症とそれに続く臓器障害を防止する（Pardee and Butterfield 2012）。このような免疫抑制的環境は HCC に関連する可能性がある。すなわち、HCC では、制御性 T 細胞（Treg）及び骨髄由来抑制細胞等の免疫抑制細胞集団や PD-1 等の抑制性シグナル伝達分子の発現が増加している（Gao et al 2009、Hato et al 2014、Pardee and Butterfield 2012）。さらに、B 及び C 型肝炎ウイルス感染に関連した Treg 並びに PD-L1 及び PD-1 の発現のアップレギュレーションにより HCC に対する免疫抑制環境が影響を受ける可能性がある（Golden-Mason et al 2007、Miroux et al 2010、Pardee and Butterfield 2012、Peng et al 2008）。HCC 患者における腫瘍の悪性度の高いこと、疾患の進行及び高い死亡率は PD-L1 の過剰発現と関連している（Gao et al 2009、Jung et al 2017、Klein et al 2007）。

CTLA-4 は樹状細胞の機能を妨げるだけでなく Treg の活性及び分化を増強することにより腫瘍内微小環境における免疫抑制も促進するので、HCC では CTLA-4 の役割は増大する（Han et al 2014）。慢性肝炎を発症した患者では、肝臓は、CTLA-4 及び他の免疫抑制分子のアップレギュレーションを伴う Treg が多数浸潤しているような強力な免疫抑制環境と関連している。さらに、CTLA-4 や PD-1 等の種々の抑制性受容体がエフェクターT 細胞に発現されると機能疲弊が起こり、持続的なウイルスの複製が促進される（Cho et al 2017、Riezu-Boj et al 2011）。以上のことから、HCC における PD1/PD-L1 と CTLA-4 の両方の経路の重要性が強く支持された。したがって、PD-L1 経路及び CTLA-4 経路を阻害する治療薬があれば、HCC の免疫抑制環境を反転させ、HCC に対する宿主免疫を促進することで臨床転帰が改善される可能性がある。

以上のデータに基づき、トレメリムマブはヒト免疫システムの活性化を導き、固形がん患者における抗腫瘍免疫を増強することが期待される。

## 2.6.1.1.1 一般的な情報

### 2.6.1.1.1.1 名称

本剤の一般的名称（JAN）の日本名及び英名は、それぞれ「トレメリムマブ（遺伝子組換え）」及び「Tremelimumab（Genetical Recombination）」であり、国際一般的名称（INN）は「tremelimumab」である。MEDI1123 は本剤の開発コードであり、CP-675,206 としても知られている。

### 2.6.1.1.1.2 一般的特性

トレメリムマブは、ヒト CTLA-4 に対する遺伝子組換えヒト IgG2 モノクローナル抗体である。トレメリムマブは、マウスミエローマ（NS0）細胞により産生される。トレメリムマブは、451 個のアミノ酸残基からなる H 鎖（γ2 鎖）2 本及び 214 個のアミノ酸残基からなる L 鎖（κ 鎖）2 本で構成される糖タンパク質（分子量：約 149,000［オリゴ糖を含む］）である。

## 2.6.1.2 参考文献

Bray et al 2018

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2018;68(6):394-424.

Cho et al 2017

Cho H, Kang H, Lee HH, Kim CW. Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 (CTLA-4) in Viral Hepatitis. Int J Mol Sci. 2017;18(7):1517.

Gandhi et al [KEYNOTE-189] 2018

Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2018; 378 (22): 2078-2092.

Gao et al 2009

Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, 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):971-979.

Golden-Mason et al 2007

Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. J Virol 2007;81(17):9249-9258.

Han et al 2014

Han Y, Chen Z, Yang Y, Jiang Z, Gu Y, Liu Y, et al. Human CD14+CTLA-4+ regulatory dendritic cells suppress T-cell response by cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-dependent IL-10 and indoleamine-2,3-dioxygenase production in hepatocellular carcinoma. Hepatology 2014;59:567-579.

Hato et al 2014

Hato T, Goyal L, Greten TF, Duda DG, Zhu AX. Immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma: current progress and future directions. Hepatology 2014;60(5):1776-1782.

Hellmann et al [CheckMate-227] 2019

Hellmann M, Paz-Ares L, Caro R, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2019 Nov 21;381(21):2020-2031.

Jung et al 2017

Jung HI, Jeong D, Ji S, Ahn TS, Bae SH, Chin S, et al. Overexpression of PD-L1 and PD-L2 Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. Cancer Res Treat 2017;49(1):246-254.

Klein et al 2007

Klein JP, Logan B, Harhoff M, Andersen PK. Analyzing survival curves at a fixed point in time. Stat Med 2007;26(24):4505-4519.

Miroux et al 2010

Miroux C, Vausselin T, Delhem N. Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response. Expert Opin Biol Ther 2010;10(11):1563-1572.

Mok et al [KEYNOTE-042] 2019

Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, et al; KEYNOTE-042 Investigators. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. Lancet. 2019; 393 (10183): 1819-1830.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Version 1.2020

Ettinger DS, Wood DE, Aggarwal C et al. Non-Small Cell Lung cancer, Version 1.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw 2019; 17 (12): 1464-1472.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Version 2.2021

Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL et al. Non-Small Cell Lung cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw 2021; 19 (3): 254-266.

Pardee and Butterfield 2012

Pardee AD, Butterfield LH. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma: Unique challenges and clinical opportunities. Oncoimmunology 2012;1(1):48-55.

Paz-Ares et al [Checkmate 9LA] 2021

Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (Checkmate 9la): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2021; 22 (2): 198-211.

Peng et al 2008

Peng G, Li S, Wu W, Tan X, Chen Y, Chen Z. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. Mol Immunol 2008;45(4):963-970.

Reck et al [KEYNOTE-024] 2016

Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al, KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2016; 375 (19): 1823-1833.

Riezu-Boj et al 2011

Riezu-Boj J-I, Larrea E, Aldabe R, Guembe L, Casares N, Galeano E, et al. Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection. J Hepatol 2011;54:422-431.

Socinski et al [Impower150] 2018

Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. N Engl J Med. 2018; 378 (24): 2288-2301.

Tarhini and Kirkwood 2008

Tarhini AA, Kirkwood JM. Tremelimumab (CP-675,206): a fully human anticytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody for treatment of patients with advanced cancers. Expert opinion on biological therapy. 2008;8(10):1583-1593.

Walker and Sansom 2015

Walker LS, Sansom DM. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. Trends in immunology. 2015;36(2):63-70.

**第 2 部　CTD の概要**

トレメリムマブ

版番号：[redacted]

# 2.6.2　薬理試験の概要文
# トレメリムマブ

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

標題ページ ..... 1
目次 ..... 2
略語及び専門用語一覧表 ..... 4
2.6.2.1 まとめ ..... 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 ..... 7
2.6.2.2.1 *In vitro* 試験 ..... 7
2.6.2.2.1.1 トレメリムマブの選択性の評価、様々な動物種由来の活性化 T 細胞及びリンパ球に対する結合の評価、並びに遺伝子組換えヒト及びカニクイザル CTLA-4 に対する結合親和性 ..... 7
2.6.2.2.1.2 CTLA-4 の CD80 及び CD86 への結合に対するトレメリムマブの阻害作用、並びにそれによる IL-2 及び IFN-γ 産生増強作用の評価 ..... 7
2.6.2.2.1.3 ブドウ球菌エンテロトキシン A スーパー抗原アッセイの CD80/86 依存性、並びに健康ドナー由来ヒト PBMC 又は全血、がん患者由来全血及びカニクイザル血液をスーパー抗原で刺激したときの IL-2 放出に対するトレメリムマブの増強作用 ..... 9
2.6.2.2.1.4 ヒト制御性 T 細胞による通常型 T 細胞の抑制に対するトレメリムマブの作用 .. 12
2.6.2.2.1.5 プレートに結合させたトレメリムマブの活性 ..... 13
2.6.2.2.1.6 *In vitro* のヒト全血におけるサイトカイン放出及び血小板数に対するトレメリムマブの作用 ..... 13
2.6.2.2.1.7 ヒト又はカニクイザル Fc 受容体に対するトレメリムマブの結合及び抗体依存性細胞傷害に対するトレメリムマブの作用の評価 ..... 14
2.6.2.2.1.8 *In vitro* のヒト全血におけるデュルバルマブとトレメリムマブ併用処置によるサイトカイン放出に対する作用の評価 ..... 15
2.6.2.2.2 *In vivo* 試験 ..... 20
2.6.2.2.2.1 マウス線維肉腫モデルにおけるハムスター抗マウス CTLA-4 mAb の有効性 ..... 20
2.6.2.2.2.2 同系マウス腫瘍移植マウスにおける抗マウス CTLA-4 抗体、抗マウス PD-L1 抗体、又はそれらの併用の有効性及び薬力学的活性 ..... 22
2.6.2.3 副次的薬理試験 ..... 27
2.6.2.4 安全性薬理試験 ..... 27
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 27
2.6.2.6 考察及び結論 ..... 27
2.6.2.7 図表 ..... 28
2.6.2.8 参考文献 ..... 28

# 表目次

表 1 トレメリムマブの非臨床薬理試験の一覧 ..... 6

表 2　腫瘍面積平均値、平均差及び平均値の並べ替え検定 ..... 21
表 3　同系腫瘍モデル EMT6、CT26 又は MCA205 を用いた抗腫瘍効果試験における完全奏効率 ..... 27

# 図目次

図 1　CTLA-4 の CD80（B7.1）及び CD86（B7.2）への結合に対するトレメリムマブの阻害作用 ..... 8
図 2　トレメリムマブは T 細胞による IL-2 及び IFN-γ の放出に対する CTLA-4 の阻害作用を抑制する ..... 9
図 3　スーパー抗原で刺激した健康ドナー由来培養 PBMC 及び全血からの IL-2 の放出 ..... 11
図 4　スーパー抗原で刺激した培養カニクイザル全血からの IL-2 の放出 ..... 12
図 5　ヒト全血の IFN-γ 放出に及ぼすデュルバルマブ及びトレメリムマブの影響 ..... 16
図 6　ヒト全血の IL-2 放出に及ぼすデュルバルマブ及びトレメリムマブの影響 ..... 17
図 7　ヒト全血の IL-6 放出に及ぼすデュルバルマブ及びトレメリムマブの影響 ..... 18
図 8　ヒト全血の TNF-α 放出に及ぼすデュルバルマブ及びトレメリムマブの影響 ..... 19
図 9　ハムスター抗マウス CTLA-4 mAb のマウスモデルにおける線維肉腫の増殖阻害 ..... 21
図 10　EMT6 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の腫瘍増殖曲線－Experiment 1 ..... 23
図 11　EMT6 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の生存期間曲線－Experiment 1 ..... 23
図 12　CT26 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の腫瘍増殖曲線－Experiment 1 ..... 24
図 13　CT26 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の生存期間曲線－Experiment 1 ..... 24
図 14　MCA205 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の腫瘍増殖曲線－Experiment 1 ..... 25
図 15　MCA205 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の生存期間曲線－Experiment 1 ..... 25
図 16　抗 PD-L1 mAb 若しくは抗 CTLA-4 mAb を単独投与、又は抗 PD-L1 mAb と抗 CTLA-4 mAb を併用投与した（A-B）EMT6、（C）CT26 又は（D）MCA205 腫瘍移植マウスから採取した腫瘍における Ki67+（増殖性［マーカー］）CD8 又は CD4T 細胞の割合（%） ..... 26

# 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 |
|---|---|
| Ab | Antibody：抗体 |
| ADCC | Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害 |
| CD | Cluster of differentiation：白血球分化抗原 |
| CFSE | Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester：カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル |
| $C_{max}$ | Maximum observed concentration：最高血漿（清）中濃度 |
| cyno | Cynomolgus：カニクイザル |
| cpm | Counts per minute：カウント毎分 |
| CR | Complete response：完全奏効 |
| CTLA-4 | Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4：細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 |
| ELISA | Eenzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定法 |
| Fc | Constant fragment of antibodies：抗体の定常領域 |
| GLP | GLP Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 |
| h | Human：ヒト |
| $IC_{50}$ | Half-maximal inhibitory concentration：50%阻害濃度 |
| IFN | Interferon：インターフェロン |
| Ig | Immunoglobulin：免疫グロブリン |
| IgG2 | Immunoglobulin G2：免疫グロブリン G2 |
| IL | Interleukin：インターロイキン |
| KLH | Keyhole limpet hemocyanin：キーホールリンペットヘモシアニン |
| mAb | Monoclonal antibody：モノクローナル抗体 |
| NK | Natural killer：ナチュラルキラー細胞 |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核細胞 |
| r | Recombinant：遺伝子組換え |
| SEA | Staphylococcal enterotoxin A：ブドウ球菌エンテロトキシン A |
| SEM | Standard error of mean：標準誤差 |
| TNF | Tumor necrosis factor：腫瘍壊死因子 |
| Tregs | Regulatory T cells：制御性 T 細胞 |
| Tremelimumab-FITC | Fluoresceinated form of tremelimumab：トレメリムマブ蛍光標識体 |

## 2.6.2.1 まとめ

細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（CTLA-4）に結合するモノクローナル抗体（mAb）であるトレメリムマブ（旧称 CP-675,206）について、以下に示す一連の *in vitro* 及び *in vivo* 非臨床薬理試験を実施し、その機能的特性を評価した。

- ヒト細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（hCTLA-4）に対するトレメリムマブの結合特異性
- hCTLA-4 及びカニクイザル（cyno）CTLA-4 に対するトレメリムマブの結合親和性
- 様々な動物種由来の活性化 T 細胞及びリンパ球に対するトレメリムマブの結合
- hCTLA-4 と hCD80 及び hCTLA-4 と hCD86 の相互作用に対するトレメリムマブの阻害作用
- Raji 細胞による T 細胞活性化に対するトレメリムマブの増強作用
- ヒト末梢血単核細胞（hPBMC）又は全血によるスーパー抗原反応には、CD80（B7.1）/CD86（B7.2）が必要であること
- 健康ドナー及びがん患者から採取した hPBMC 及び全血をスーパー抗原で刺激したときのサイトカイン放出に対するトレメリムマブの増強作用
- cynoPBMC 及び全血をスーパー抗原で刺激したときのサイトカイン放出に対するトレメリムマブの増強作用
- プレートに結合させたトレメリムマブはスーパー抗原に対する反応を阻害しないこと
- 健康ドナーから採取した全血を用いたサイトカイン放出アッセイにおいて、トレメリムマブが他の刺激がない場合でもサイトカイン放出を誘導するか否か
- 健康ドナーから採取した全血を用いたサイトカイン放出アッセイにおいて、トレメリムマブが血小板数に影響を及ぼすか否か
- ヒト又はカニクイザル白血球由来標識抗体の置換を測定することにより、トレメリムマブがヒト又はカニクイザルの Fc 受容体に結合しないこと
- トレメリムマブはナイーブ又は活性化 T 細胞に対する抗体依存性細胞傷害（ADCC）を惹起しないこと
- ヒト制御性 T 細胞（Tregs）による CD4+ CD25- T 細胞の抑制に対するトレメリムマブの作用
- 健康ドナーから採取した全血を用い、サイトカイン産生試験法にて、デュルバルマブとの併用によりトレメリムマブが、他の刺激に影響されることなくサイトカイン産生を誘導する可能性
- トレメリムマブはマウス CTLA-4 と交差反応しないため、ハムスター抗マウス CTLA-4 モノクローナル抗体（mAb）の 9H10 を用いた、マウス線維肉腫モデルにおける抗腫瘍効果
- 乳癌、結腸癌又は線維肉腫の同系細胞株を皮下移植したマウスに、エフェクター機能を欠くマウス抗マウス CTLA-4 mAb を単独投与、又は抗マウス PD-L1 抗体と併用投与したときの抗腫瘍活性及び薬力学的活性

トレメリムマブの非臨床薬理試験の一覧を表 1 に示す。

**表 1　　トレメリムマブの非臨床薬理試験の一覧**

| 試験番号 | 試験の種類 | 試験表題 | GLP 適用 |
|---|---|---|---|
| 06-CP-675,206 | *In vitro* | CP-675,206 の CTLA-4 に対する結合と比較した選択性 | 非適用 |
| 15-CP-675,206 | *In vitro* | 活性化 T 細胞又はリンパ球に対する CP-675,206 の結合 | 非適用 |
| 14-CP-675,206 | *In vitro* | Biacore 法を用いた CP-675,206 の遺伝子組換えヒト CTLA-4-Ig 及び遺伝子組換えカニクイザル CTLA-4-Ig に対する結合親和性の比較 | 非適用 |
| 03-CP-675,206 | *In vitro* | CTLA-4 の B7 への結合に対する CP-675,206 の阻害作用 | 非適用 |
| 02-CP-675,206 | *In vitro* | ヒト T 細胞芽球を Raji 細胞で刺激したときの IL-2 及び IFN-γ 産生に対する CP-675,206 の増強作用 | 非適用 |
| 08-CP-675,206 | *In vitro* | SEA スーパー抗原アッセイの B7 依存性 | 非適用 |
| 01-CP-675,206 | *In vitro* | 培養ヒト PBMC 又は血液をスーパー抗原で刺激したときの IL-2 産生に対する CP-675,206 の増強作用 | 非適用 |
| 13-CP-675,206 | *In vitro* | がん患者由来培養ヒト PBMC 又は血液をスーパー抗原で刺激したときの IL-2 産生に対する CP-675,206 の増強作用 | 非適用 |
| 04-CP-675,206 | *In vitro* | カニクイザル血液をスーパー抗原で刺激したときの IL-2 産生に対する CP-675,206 の増強作用 | 非適用 |
| 11-CP-675,206 | *In vitro* | ヒト制御性 T 細胞による $CD4^+$ $CD25^-$ T 細胞の抑制に対する CP-675,206 の作用 | 非適用 |
| 07-CP-675,206 | *In vitro* | プレートに結合させた CP-675,206 の活性 | 非適用 |
| 05-CP-675,206 | *In vitro* | ヒト全血において自然に誘導されたサイトカイン放出に対する CP-675,206 の作用 | 非適用 |
| 10-CP-675,206 | *In vitro* | *In vitro* ヒト全血アッセイにおける血小板数に対する CP-675,206 の作用 | 非適用 |
| 16-CP-675,206 | *In vitro* | ヒト又はカニクイザル Fc 受容体に対する CP-675,206 の結合 | 非適用 |
| 09-CP-675,206 | *In vitro* | ヒトのナイーブ及び活性化 T 細胞の抗体依存性細胞傷害に対する CP-675,206 の作用 | 非適用 |
| ONC4736-0017 | *In vitro* | *In vitro* のヒト全血におけるデュルバルマブとトレメリムマブ併用処置によるサイトカイン放出に対する作用の評価 | 非適用 |
| 12-CP-675,206 | *In vivo* | マウス CTLA-4 モノクローナル抗体（9H10）はマウス線維肉腫の増殖を阻害する | 非適用 |
| ONC1123-0001 | *In vivo* | 同系マウス腫瘍移植マウスモデルにおけるトレメリムマブのマウス代替抗体単独投与又は抗マウス PD-L1 抗体との併用による有効性 | 非適用 |

CP-675,206 = トレメリムマブ、CTLA-4 = 細胞傷害性 T リンパ球抗原 4、GLP = 医薬品の安全性試験の実施に関する基準、PBMC = 末梢血単核細胞、IFN-γ = インターフェロン-γ、IL-2 = インターロイキン-2

## 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

### 2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

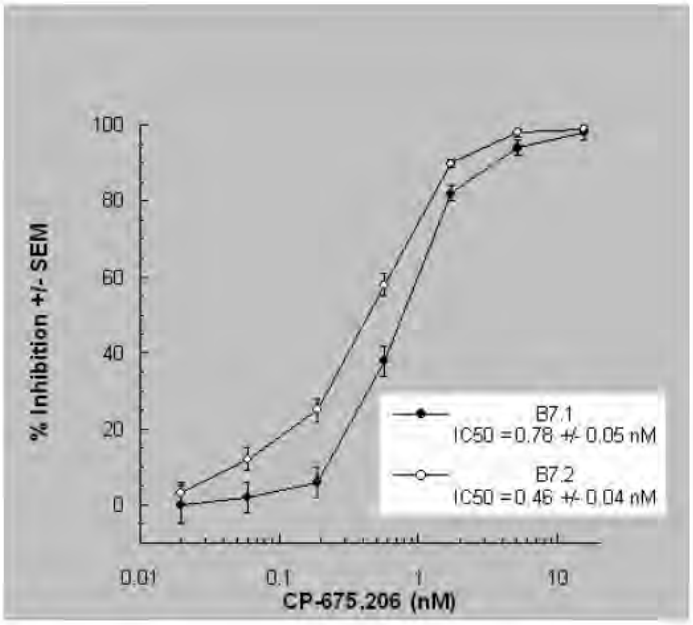
#### 2.6.2.2.1.1 トレメリムマブの選択性の評価、様々な動物種由来の活性化 T 細胞及びリンパ球に対する結合の評価、並びに遺伝子組換えヒト及びカニクイザル CTLA-4 に対する結合親和性

トレメリムマブについて、関連蛋白質の hCD28-Ig、hCD86-Ig 及び hIgG1 と比較したときの hCTLA-4-Ig 選択性を ELISA で評価した。トレメリムマブの遺伝子組換え（r）hCTLA-4-Ig への結合は、他の関連蛋白質への結合の 500 倍を上回った。この結果から、トレメリムマブは CTLA-4 に高い選択性を示すことが裏付けられた（試験 06-CP-675,206）。トレメリムマブは、フィトヘマグルチニン（PHA）で活性化させたヒト、カニクイザル及びアカゲザル T 細胞に発現する CTLA-4 に結合することがフローサイトメトリーで確認された（試験 15-CP-675,206）。一方、トレメリムマブはマウス、ラット、ウサギ及びハムスターの活性化 T 細胞には結合しなかった（試験 15-CP-675,206）。固定化 rhCTLA-4 及び rcynoCTLA-4 に対するトレメリムマブの親和性（平衡解離定数［$K_D$］で表す）を表面プラズモン共鳴法を用いて測定した（試験 14-CP-675,206）。トレメリムマブの rhCTLA-4 及び rcynoCTLA-4 への結合に関する $K_D$ 値はそれぞれ 0.28 及び 0.98 nM であった。

#### 2.6.2.2.1.2 CTLA-4 の CD80 及び CD86 への結合に対するトレメリムマブの阻害作用、並びにそれによる IL-2 及び IFN-γ 産生増強作用の評価

トレメリムマブは rhCTLA-4 の rhCD80 及び rhCD86 への結合を阻害することが、競合 ELISA ベースの結合アッセイで確認された（試験 03-CP-675,206）。トレメリムマブは rhCTLA-4 の rhCD80 及び rhCD86 への結合をいずれも効果的に阻害し、その 50%阻害濃度は（$IC_{50}$）それぞれ 0.78 ± 0.05 及び 0.46 ± 0.04 nM であった（図 1）。この結果に基づくと、トレメリムマブは CTLA-4 のそのリガンドへの結合をいずれも強力に阻害する。

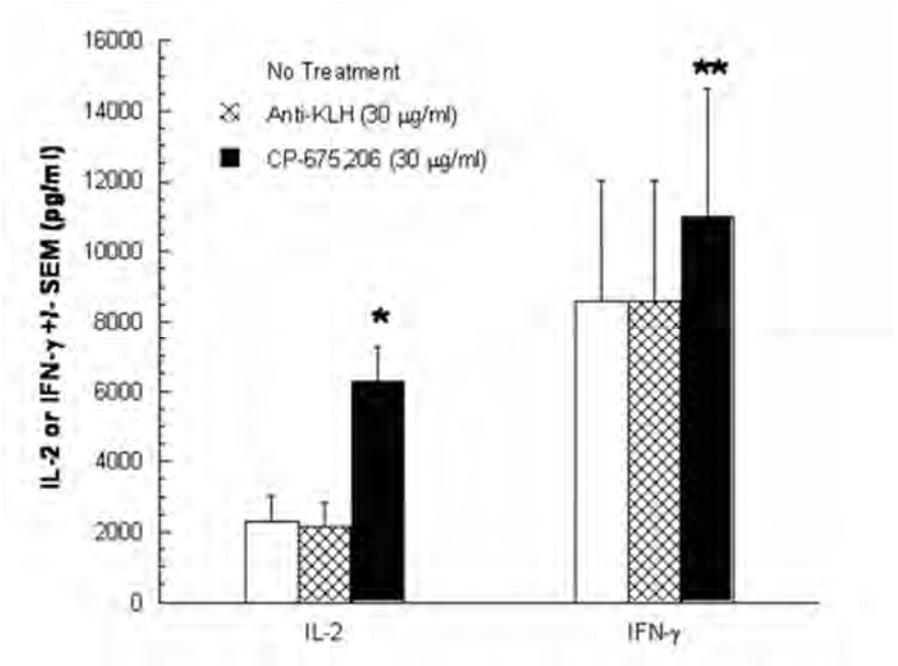
図 1　　CTLA-4 の CD80（B7.1）及び CD86（B7.2）への結合に対するトレメリムマブの阻害作用




遺伝子組換えヒト CTLA-4 は固定化 CD80（B7.1）及び CD86（B7.2）に結合した。トレメリムマブ（CP-675,206）で処理するとこの結合が濃度依存的に阻害され、その $IC_{50}$ は、CD80 及び CD86 に対してそれぞれ 0.78 ± 0.05 及び 0.46 ± 0.04 nM であった。データは 10 回（CD80）及び 12 回（CD86）の反復測定の平均値及びその標準誤差を表す。
CTLA-4 = 細胞傷害性 T リンパ球抗原 4。

T 細胞表面の CTLA-4 に CD80 又は CD86 が結合すると T 細胞活性化が阻害される。トレメリムマブが CTLA-4 とそのリガンドの相互作用を阻害することにより CTLA-4 のこの機能に影響を及ぼすか否かを、セルベースの *in vitro* T 細胞活性化アッセイを用いて検討した（試験 02-CP-675,206）。初代ヒト T 細胞を PHA で 48 時間活性化した後、Raji 細胞とともに培養した。Raji 細胞株は CD80 及び CD86 の両方を発現する B 細胞株である。T 細胞を Raji 細胞と共培養したとき、この刺激に反応してインターロイキン（IL）-2 及びインターフェロン γ（IFN-γ）の両方が細胞培養上清中に放出された。放出される IL-2 及び IFN-γ の量は、30 μg/mL のトレメリムマブを添加したとき有意に増加したが（$P < 0.001$、Student's t-Test for paired data）、アイソタイプマッチ対照 Ab である抗キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）を添加したときには変化しなかった（図 2）。

図 2 トレメリムマブは T 細胞による IL-2 及び IFN-γ の放出に対する CTLA-4 の阻害作用を抑制する




PHA で 48 時間活性化した初代ヒト T 細胞を Raji 細胞とともに培養すると IL-2 及び IFN-γ が放出された。この IL-2 及び IFN-γ の放出は、30 µg/mL のトレメリムマブ（CP-675,206）を添加したとき有意に増加したが、抗 KLH アイソタイプマッチ対照 Ab を添加したときには変化しなかった。エラーバーは 10 回の反復測定の平均値の標準誤差を表す。Student's t-Test for paired data を用いて統計学的分析を行った。

* 抗 KLH アイソタイプ対照と比較したときの平均 IL-2 増加量：4.11 ± 0.53 ng/mL（$P < 0.001$）

** 抗 KLH アイソタイプ対照と比較したときの平均 IFN-γ 増加量：2.39 ± 0.47 ng/mL（$P \leq 0.001$）

CTLA-4 = 細胞傷害性 T リンパ球抗原 4；IFN-γ = インターフェロン γ；IL-2 = インターロイキン 2；KLH = キーホールリンペットヘモシアニン；PHA = フィトヘマグルチニン。

IL-2 or IFN-γ：IL-2 又は IFN-γ、No Treatment：未処理、Anti-KLH：抗 KLH

したがって、本試験の結果からトレメリムマブは機能アッセイにおいて CTLA-4 の T 細胞阻害作用を抑制することが示された（試験 02-CP-675,206）。

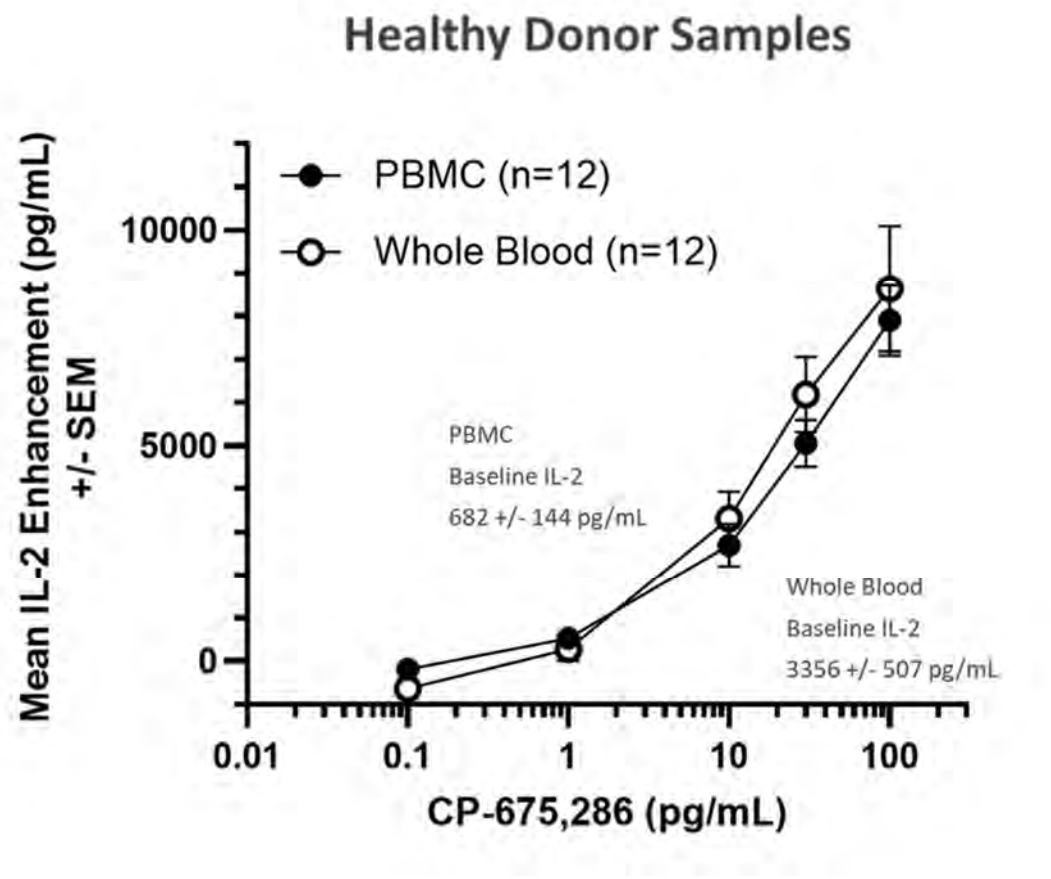
### 2.6.2.2.1.3 ブドウ球菌エンテロトキシン A スーパー抗原アッセイの CD80/86 依存性、並びに健康ドナー由来ヒト PBMC 又は全血、がん患者由来全血及びカニクイザル血液をスーパー抗原で刺激したときの IL-2 放出に対するトレメリムマブの増強作用

生理学的アッセイにおけるトレメリムマブの活性を検討するため、ブドウ球菌エンテロトキシン A（SEA）を用いてスーパー抗原刺激アッセイを確立した（試験 08-CP-675,206）。3 例の健康ヒトドナー由来 PBMC 又は全血を SEA 及び固定化抗 CD3 存在下で培養した。それにより誘発された IL-2 の細胞培養上清中への放出を ELISA で測定した。30 µg/mL の CTLA-4-Ig、抗ヒト CD80 又は抗ヒト CD86 を添加したところ、PBMC からの IL-2 放出がそれぞれ 94%、49%及び 94%抑制

され、全血からの IL-2 放出がそれぞれ 35%、25%及び 78%抑制された。アッセイに 30 μg/mL のトレメリムマブを添加すると、PBMC からの IL-2 放出が 8 倍増加し、全血からの IL-2 放出が 3 倍増加した。全血及び PBMC からの IL-2 放出に対するトレメリムマブの作用は、いずれも CTLA-4-Ig、抗ヒト CD80 又は抗ヒト CD86 の添加により抑制された。抗ヒト CD80 及び抗ヒト CD86 の両方を添加すると、トレメリムマブの IL-2 放出に対する作用が PBMC では完全に消失し、全血では 94%抑制された。これらの結果から、本アッセイにおいてトレメリムマブは IL-2 の放出を増強し、トレメリムマブの作用は CD80 及び CD86 に依存することが示され、CD80/CD86 経路が T 細胞活性化に重要であることが裏付けられた。

上述した次の一連のスーパー抗原刺激アッセイを用いた実験（試験 01-CP-675,206）において、15 例の健康ヒトドナー由来培養 PBMC 及び全血に 30 μg/mL のトレメリムマブを添加すると IL-2 放出がそれぞれ平均 400%及び 120%増加した。一方、アイソタイプマッチ対照 Ab の抗 KLH を添加したときには変化がみられなかった。最後の一連の実験（試験 13-CP-675,206）において、別の 12 例の健康ヒトドナー及び 80 例を超える様々ながん患者（黒色腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、前立腺がん、腎臓がん、結腸がん、直腸がん及び卵巣がん）由来培養 PBMC 及び全血をスーパー抗原で刺激したときの IL-2 放出に対するトレメリムマブの作用を 0.1～100 μg/mL の濃度で評価した。トレメリムマブ処理により、健康ドナー由来 PBMC 及び全血からの IL-2 放出が濃度依存的に増加した（図 3）。がん患者由来 PBMC では 87 例中 84 例、がん患者由来全血では 93 例中 85 例で IL-2 放出の濃度依存的な増加が認められた。IL-2 放出のベースライン値及びトレメリムマブによる IL-2 放出増強の程度はドナーによって異なっていた。健康ドナーとがん患者の全血及び PBMC の間で反応の変動及び反応の程度は同様であり、がんのステージや種類によって変化することはなかった。

図 3　　スーパー抗原で刺激した健康ドナー由来培養 PBMC 及び全血からの IL-2 の放出




健康ヒト PBMC 又は全血を SEA 及び固定化抗 CD3 存在下 37°C で 72 時間培養した。IL-2 の細胞培養上清中への放出を ELISA で測定した。トレメリムマブ（CP-675,206）を 0.1～100 μg/mL の濃度で添加したところ、IL-2 放出量が濃度依存的に増加した。

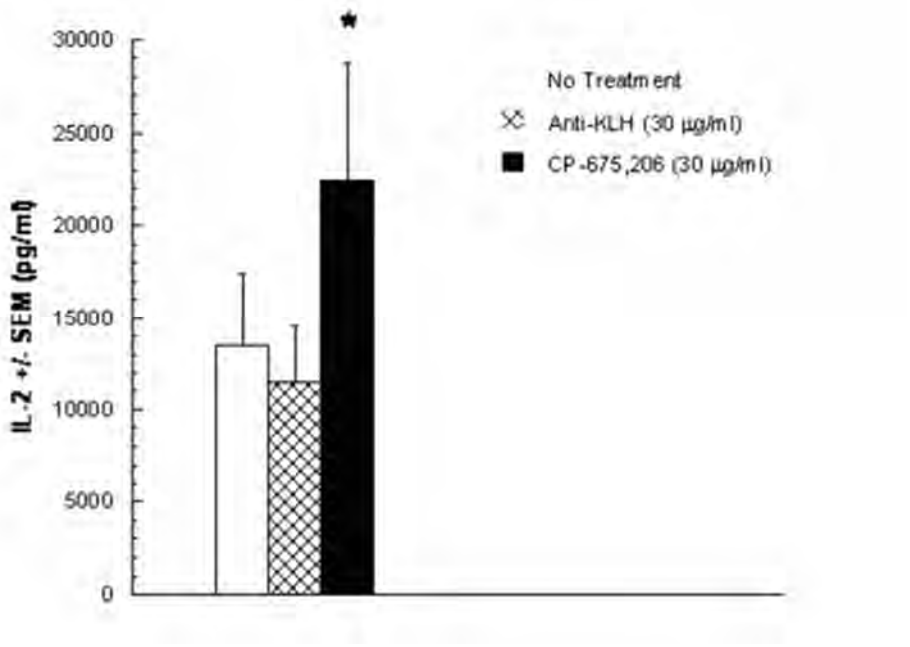
試験は異なる 12 例のドナーで実施した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。

IL-2 = インターロイキン 2；PBMC = 末梢血単核細胞；SEA = ブドウ球菌エンテロトキシン A。

Healthy Donor Samples：健康ドナー試料、Mean IL-2 Enhancement：平均 IL-2 増加量、Baseline IL-2：IL-2 ベースライン値、Blood：血液

異なる 5 例のカニクイザル由来培養全血からの IL-2 放出に対する 30 μg/mL のトレメリムマブの作用を、スーパー抗原刺激アッセイを用いて評価した（試験 04-CP-675,206）。培養ヒト全血で得られた結果と同様に、トレメリムマブは IL-2 産生を最大 91%増強し、抗 KLH Ab は作用を示さなかった（図 4）。

図 4　　スーパー抗原で刺激した培養カニクイザル全血からの IL-2 の放出




カニクイザル全血を SEA 及び固定化抗 CD3 存在下 37°C で 72 時間培養した。IL-2 の細胞培養上清中への放出を ELISA で測定した。30 µg/mL のトレメリムマブ（CP-675,206）を添加したところ、IL-2 放出量が増加した。アイソタイプマッチ抗 KLH 対照 Ab は作用を示さなかった。実験は異なる 5 例のサル由来血液を用いて反復した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。Student's t-Test for paired data を用いて統計学的分析を行った。

* $P < 0.05$

IL-2 = インターロイキン 2；KLH = キーホールリンペットヘモシアニン；SEA = ブドウ球菌エンテロトキシン A。

No Treatment：未処理、Anti-KLH：抗 KLH

これらの試験の結果から、ヒト及びカニクイザルの血液から単離した免疫細胞に発現している生理学的に適切な量の CD80 及び CD86 を用いたアッセイにおいて、トレメリムマブは CTLA-4 の阻害作用を抑制することが裏付けられた。

### 2.6.2.2.1.4　ヒト制御性 T 細胞による通常型 T 細胞の抑制に対するトレメリムマブの作用

Tregs は他の T 細胞集団の活性化を抑制する。この抑制に対するトレメリムマブの作用を評価した（試験 11-CP-675,206）。

hPBMC からヒト通常型 T 細胞（CD4+ CD25-）及び Tregs（CD4+ CD25+）をそれぞれ CD25 陰性及び陽性を指標として単離した。フローサイトメトリー分析により、単離した Tregs の 84% ± 5%は $FoxP3^+$であることが示された。通常型 T 細胞は、単独又は Tregs との培養（Tregs：通常型 T 細胞 = 2:1）時に、固定化抗 CD3 Ab 及び可溶性抗 CD28 Ab を添加することによって活性化された。別の対照として、制御性 T 細胞単独での培養も行った。T 細胞の活性化は、5 日後に細胞培養上清中の IFN-γ 量を ELISA で定量し、[$^3$H]-チミジンとともに一晩インキュベートした後の試験 7 日目に T 細胞増殖を推定することにより測定した。本アッセイ系における通常型 T 細

胞の活性化に対するトレメリムマブ及びアイソタイプマッチ対照 Ab の抗 KLH の作用を、3 例のドナー由来 T 細胞を用いて 30 及び 100 μg/mL で検討した。

Tregs を通常型 T 細胞と共培養したとき、通常型 T 細胞単独と比較して IFN-γ 産生量が平均 97 ± 2%減少し（1752 ± 467 pg/mL に対して 59 ± 32 pg/mL）、[$^3$H]-チミジン取込みが平均 92 ± 4%減少した（3959 ± 1119 カウント/分［cpm］に対して 260 ± 28 cpm）。30 又は 100 μg/mL のトレメリムマブ又は抗 KLH Ab を添加したとき、有意な変化はみられなかった。したがって、刺激されたヒト末梢血通常型 T 細胞の活性及び増殖に対するヒト末梢血 Tregs の抑制作用をトレメリムマブは抑制しない。

### 2.6.2.2.1.5 プレートに結合させたトレメリムマブの活性

プレートに結合させたトレメリムマブが CTLA-4 の高度な凝集により T 細胞活性化を阻害するか否かを検討した（試験 07-CP-675,206）。3 例の健康ドナーの血液からヒト PBMC を単離した。それらを SEA 及び 0.01～100 μg/mL の濃度の固定化トレメリムマブ又はアイソタイプマッチ対照 Ab の抗 KLH とともに 37°C で 72 時間培養した。細胞培養上清中への IL-2 の放出を ELISA で測定した。トレメリムマブ及び抗 KLH Ab による IL-2 放出量の有意な変化はみられなかった（Student's t-Test for paired data）。これらの結果から、凝集又は表面に結合したトレメリムマブは T 細胞を抑制しないことが示唆される。

### 2.6.2.2.1.6 *In vitro* のヒト全血におけるサイトカイン放出及び血小板数に対するトレメリムマブの作用

*In vitro* サイトカイン放出アッセイ（試験 05-CP-675,206）において、トレメリムマブがサイトカイン放出を誘導するか否かを検討した。6 例の健康ドナー由来培養ヒト全血をトレメリムマブ又は陽性対照として使用した抗ヒト CD3 Ab の存在下でインキュベートした。5 時間インキュベーション後に、細胞培養上清中の IL-6 及び腫瘍壊死因子 α（TNF-α）の放出を ELISA で測定した。IL-1β の放出を 48 時間インキュベーション後に測定した。過去の試験（Wing et al 1995）において、本アッセイはヒトにおける Ab 介在性サイトカイン放出と相関することが示されている。抗 CD3 Ab を 100 μg/mL の濃度で使用したとき、細胞培養上清中の TNF-α、IL-6 及び IL-1β の平均濃度はそれぞれ 1184、1358 及び 540 pg/mL であった。一方、100 μg/mL のトレメリムマブとともに培養したとき、TNF-α 及び IL-1β の濃度は 6 例全てのドナーにおいて信頼できる検出濃度より低い値であり（それぞれ< 30 及び< 8 pg/mL）、IL-6 濃度は 3 例のドナーで信頼できる検出濃度より低い値であり（< 6 pg/mL）、残り 3 例のドナーでは平均 22 pg/mL であった。抗 CD3 Ab を 10 μg/mL の濃度で使用したとき、細胞培養上清中の TNF-α、IL-6 及び IL-1β の平均濃度はそれぞれ 1120、350 及び 513 pg/mL であった。10 μg/mL のトレメリムマブとともに培養したときも、3 種類全てのサイトカイン濃度が信頼できる検出濃度と同程度かそれより低い値であった。したがって、トレメリムマブは *in vitro* でサイトカイン放出を誘導しない。

血小板数に対するトレメリムマブの作用を検討した（試験 10-CP-675,206）。最初に、5 例の健康ヒトドナー由来全血試料における血小板数を測定した。次に、その試料を 30 μg/mL のトレメリムマブ、血小板減少を引き起こすことが示されており陽性対照として使用した抗 CTLA-4 mAb の CP-642,570、抗 KLH アイソタイプマッチ対照 Ab の抗 KLH Ab、又はリン酸緩衝生理食塩液（PBS）の存在下、室温で 30 分間培養した。培養の 0.25、1.5、4 及び 24 時間後にも血小板数を測定した。投与前の平均血小板数は 213,000/μL であった。PBS とともに培養した試料では、培養後の全ての時点で血小板数の有意（P < 0.01～0.03、Student's t-Test for paired data）な 10%～21%の減少が認められた。抗 KLH Ab とともに培養した試料では、PBS とともに培養した試料と比較して血小板数が更に 3%～13%減少した。トレメリムマブとともに培養した試料では、抗 KLH Ab

とともに培養した試料と比較して血小板数に更なる変化はみられなかった。一方、抗 CTLA-4 mAb の CP-642,570 とともに培養した試料では、抗 KLH Ab とともに培養した試料と比較して血小板数が速やかに 72%減少した。抗 CTLA-4 mAb の CP-642,570 との培養 24 時間後までに、抗 KLH Ab とともに培養した試料と比較した血小板数の減少率が 40%まで回復した。これらの結果から、トレメリムマブはヒト全血中血小板数に有意な影響を及ぼさないことが裏付けられた。

### 2.6.2.2.1.7 ヒト又はカニクイザル Fc 受容体に対するトレメリムマブの結合及び抗体依存性細胞傷害に対するトレメリムマブの作用の評価

4 例のドナー由来ヒト末梢血細胞に放射性ヨード標識トレメリムマブを結合させ、500 倍過剰な非標識トレメリムマブと競合させることにより、Fc 受容体に対するトレメリムマブの結合を評価した（試験 16-CP-675,206）。対照として、ヒト IgG1 mAb を用いて同様の実験を実施した。受容体に結合した血清免疫グロブリンの解離させるため、実験前に血液細胞を完全に洗浄した。また、Fc 受容体のインターナリゼーションを抑制するために、アジ化ナトリウムの存在下 4°C で実験を実施した。実験終了時にスクロースクッションを介した遠心分離法を用いて結合型及び遊離型 Ab を分離した。

Fc 受容体に対する[$^{125}$I]-IgG1 対照 Ab の結合は、500 倍過剰な非標識 IgG1 の添加により一貫して減少した。平均すると総結合の 53%に減少した（総結合の平均 ± SEM は 5660 ± 420 cpm）。予想されたように、このことからヒト IgG1 は Fc 受容体に結合することが示された。一方、Fc 受容体に対する[$^{125}$I]-トレメリムマブの結合は、500 倍過剰な非標識トレメリムマブを添加しても減少しなかった（総結合の平均 ± SEM は 2390 ± 349 cpm）。

前立腺がん患者の血液及びカニクイザルから得られた白血球に対する結合についても同様の結果が得られた。これらの結果から、トレメリムマブは Fc 受容体を有するヒト白血球への特異的結合能をほとんど有さないことが示された。

トレメリムマブの ADCC 誘発作用をフローサイトメトリーベースアッセイで評価した（試験 09-CP-675,206）。ヒトのナイーブ又は抗 CD3/CD28 で活性化した T 細胞（標的細胞）の表面をカルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル（CFSE）で標識し、100 µg/mL の抗ヒト CD3 Ab（陽性対照 Ab；マウス IgG2a）、抗ヒトエリスロポエチン Ab（陰性対照 Ab；マウス IgG2a）、又はトレメリムマブ（ヒト IgG2）と混合した。次に、IL-2 で活性化した同じドナー由来のナチュラルキラー（NK）細胞を、エフェクター：標的細胞比が 0:1、1:1、10:1 又は 25:1 となるように添加し、4 時間インキュベートした。その後培養細胞をフローサイトメトリーで分析した。標的 T 細胞は CFSE 陽性で同定し、To-Pro-3 ヨウ化物染色法を用いて細胞傷害の程度を定量した。

フローサイトメトリーによる測定では、単離されたヒトナイーブ T 細胞の 0.2%のみが細胞表面に CTLA-4 を発現していた。ナイーブ T 細胞をトレメリムマブ又は抗エリスロポエチン Ab とともに培養し、IL-2 で活性化した NK エフェクター細胞を添加したとき、ADCC の有意な増加はみられなかった（1%～3%の細胞傷害）。一方、ナイーブ標的細胞を抗ヒト CD3 Ab とともに培養したとき、ADCC の顕著な増加が認められた。ADCC はエフェクター：標的細胞比が増加するにつれて増加し、25:1 のときに最大の 37%に達した。

標的 T 細胞として使用した抗 CD3/CD28 活性化ヒト T 細胞の 29%が細胞表面に CTLA-4 を発現していた。Ab の非存在下で標的 T 細胞に対する細胞傷害が認められ、培地に添加した IL-2 活性化 NK 細胞数が増加するにつれて漸増し、エフェクター：標的細胞比が 25:1 のときに最大の 18%に達した。トレメリムマブ又は抗エリスロポエチン Ab を添加したとき、検討したいずれのエ

フェクター：標的細胞比においても ADCC の有意な増加はみられなかった。標的 T 細胞を抗 CD3 Ab とともに培養したとき ADCC は顕著に増加し、エフェクター：標的細胞比が 25:1 のときに最大の 48%に達した。

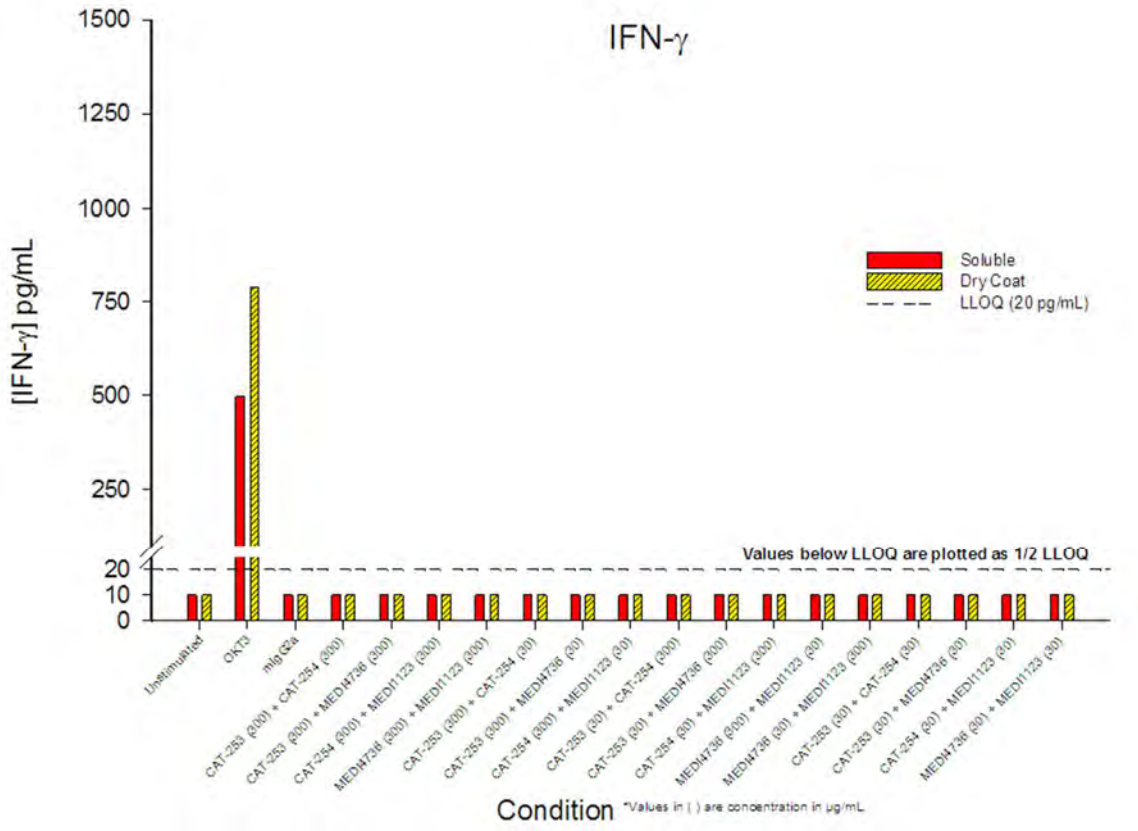
これらの結果から、CTLA-4 を発現している T 細胞に対して、トレメリムマブは ADCC を誘発しないことが示された。

### 2.6.2.2.1.8　*In vitro* のヒト全血におけるデュルバルマブとトレメリムマブ併用処置によるサイトカイン放出に対する作用の評価

追加の *in vitro* サイトカイン放出試験を、前述 2.6.2.2.1.6 項の試験 ONC4736-0004 に関する項に記載した方法と同様の方法で、6 名の健康ドナーから採取した全血を用いて実施した（試験 ONC4736-0017）。この試験では、デュルバルマブがトレメリムマブ併用下でサイトカイン放出を誘導するか否かを検討した。デュルバルマブ及びトレメリムマブは被験濃度を 30 及び 300 μg/mL とし、これら 2 被験薬の併用処置、又は適切なアイソタイプの対照抗体（CTA-254 及び CTA-253）との併用処置を行った。陽性対照は抗ヒト CD3 抗体（OKT3）及びリポ多糖（LPS）とした。被験薬及び抗ヒト CD3 抗体の培養への添加は、溶液添加及び培養プレート表面への固定化（風乾）の両方で行った。リポ多糖については溶液添加のみとした。

陽性対照の抗ヒト CD3 抗体（OKT3）は、検討した全ての条件下でヒト全血との 24 時間の培養により、検討対象の各サイトカイン（IFN-γ、IL-2、IL-6 及び TNF-α）が高濃度で検出された。IFN-γ の濃度は 497.3～1829.4 gp/mL（図 5）、IL-2 の濃度は 725.5～3104.0 pg/mL（図 6）、IL-6 の濃度は 31.6～1319.6 pg/mL（図 7）、及び TNF-α の濃度は 384.3～2347.7 pg/mL（図 8）の範囲であった。また、別の陽性対象である LPS を溶液添加した場合は、高濃度の IL-6（1226.5～2708.4 pg/mL）及び TNF-α（1273.8～2100.1 pg/mL）が放出されたが、IL-2 及び IFN-γ の放出はみられなかった。これに対して、それぞれ 300 μg/mL の濃度のデュルバルマブとトレメリムマブとの併用処置では、6 例のドナーから採取したいずれの全血においてもサイトカイン放出は誘導されなかった。

図 5　　ヒト全血の IFN-γ 放出に及ぼすデュルバルマブ及びトレメリムマブの影響

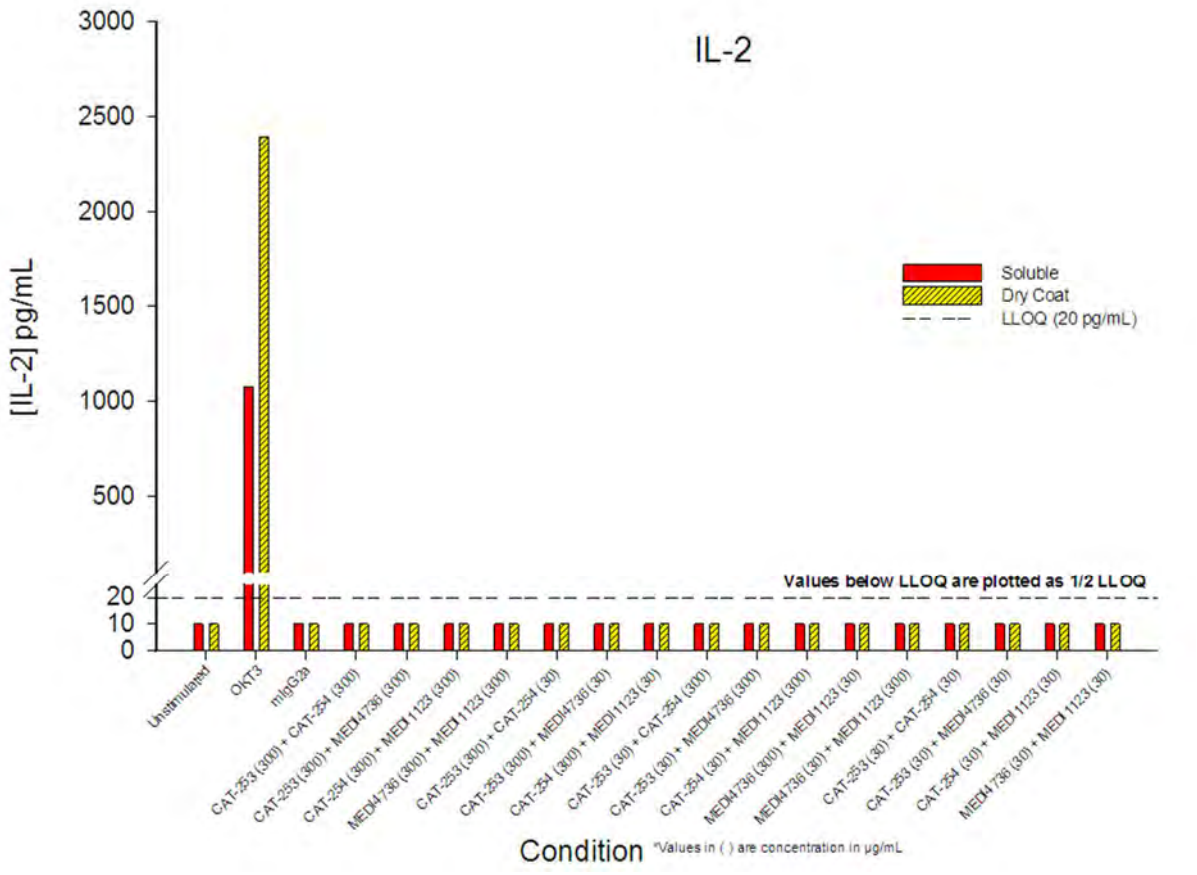



血漿除去（洗浄）したヒト全血を抗ヒト CD3 抗体（OKT3）、デュルバルマブ、トレメリムマブ又はデュルバルマブとトレメリムマブ併用処置にて 24 時間インキュベートした。抗体は溶液又はプレート表面での風乾により固相化することで、ヒト全血に曝露した。各抗体に関連のないアイソタイプ対照抗体である mIgG2a、triple mutation を有するヒト IgG1（CAT-254）、及びヒト IgG2（CAT-253）を陰性対照として使用した。上清中の IFN-γ を測定した。データは各 2 ウェルずつ計測した平均値で、ドナー6 名のうち 1 名（[redacted]）から得られた代表的なデータを示している。

CD = 白血球分化抗原、IgG = 免疫グロブリン G、LLOQ = 検出下限、mIgG2a = マウス免疫グロブリン 2a、IFN-γ = インターフェロンガンマ。

なお、図中、デュルバルマブは MEDI4736、トレメリムマブは MEDI1123 と表示している。

図 6　　ヒト全血の IL-2 放出に及ぼすデュルバルマブ及びトレメリムマブの影響

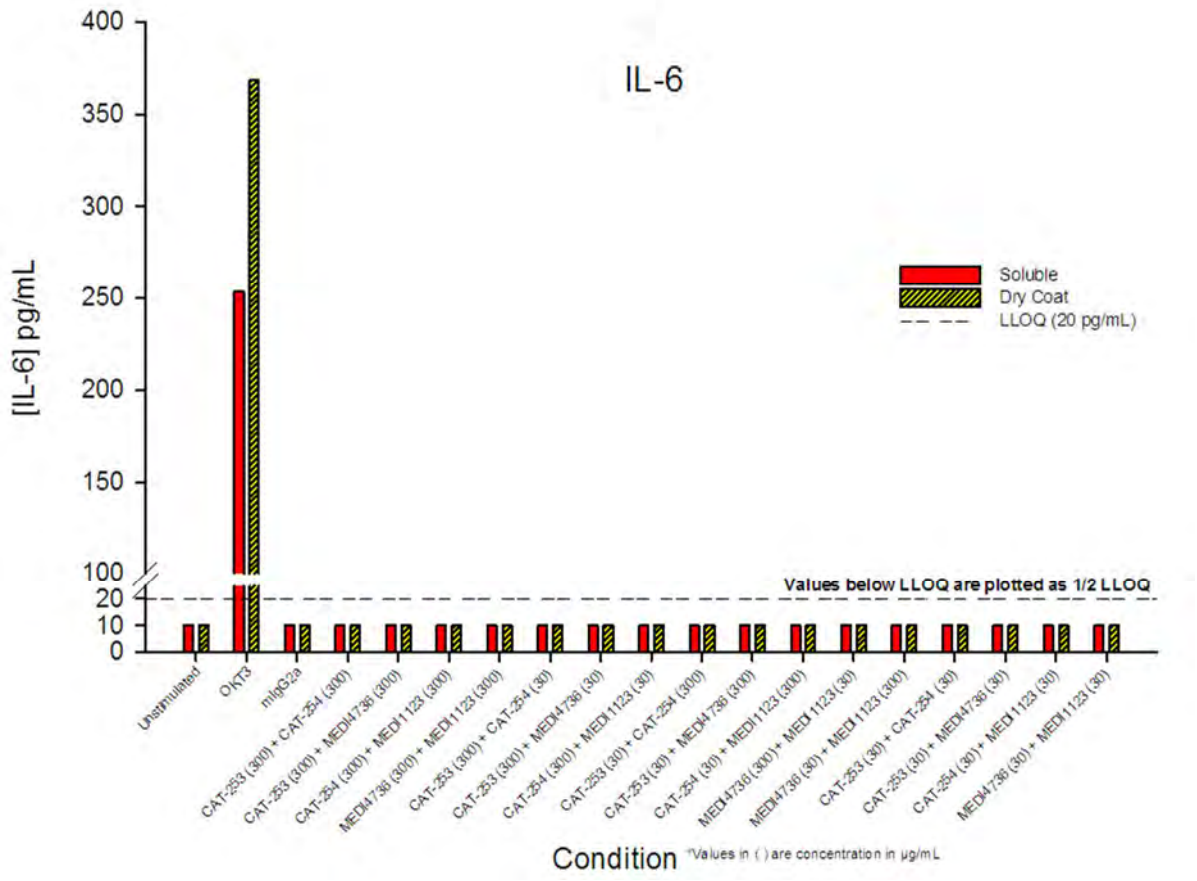



血漿除去（洗浄）したヒト全血を抗ヒト CD3 抗体（OKT3）、デュルバルマブ、トレメリムマブ又はデュルバルマブとトレメリムマブ併用処置にて 24 時間インキュベートした。抗体は溶液又はプレート表面での風乾により固相化することで、ヒト全血に曝露した。各抗体に関連のないアイソタイプ対照抗体である mIgG2a、triple mutation を有するヒト IgG1（CAT-254）、及びヒト IgG2（CAT-253）を陰性対照として使用した。上清中の IL-2 を測定した。データは各 2 ウェルずつ計測した平均値で、ドナー6 名のうち 1 名（[redacted]）から得られた代表的なデータを示している。

CD = 白血球分化抗原、IgG = 免疫グロブリン G、LLOQ = 検出下限、mIgG2a = マウス免疫グロブリン 2a、IL-2 = インターロイキン 2。

なお、図中、デュルバルマブは MEDI4736、トレメリムマブは MEDI1123 と表示している。

図 7　　ヒト全血の IL-6 放出に及ぼすデュルバルマブ及びトレメリムマブの影響

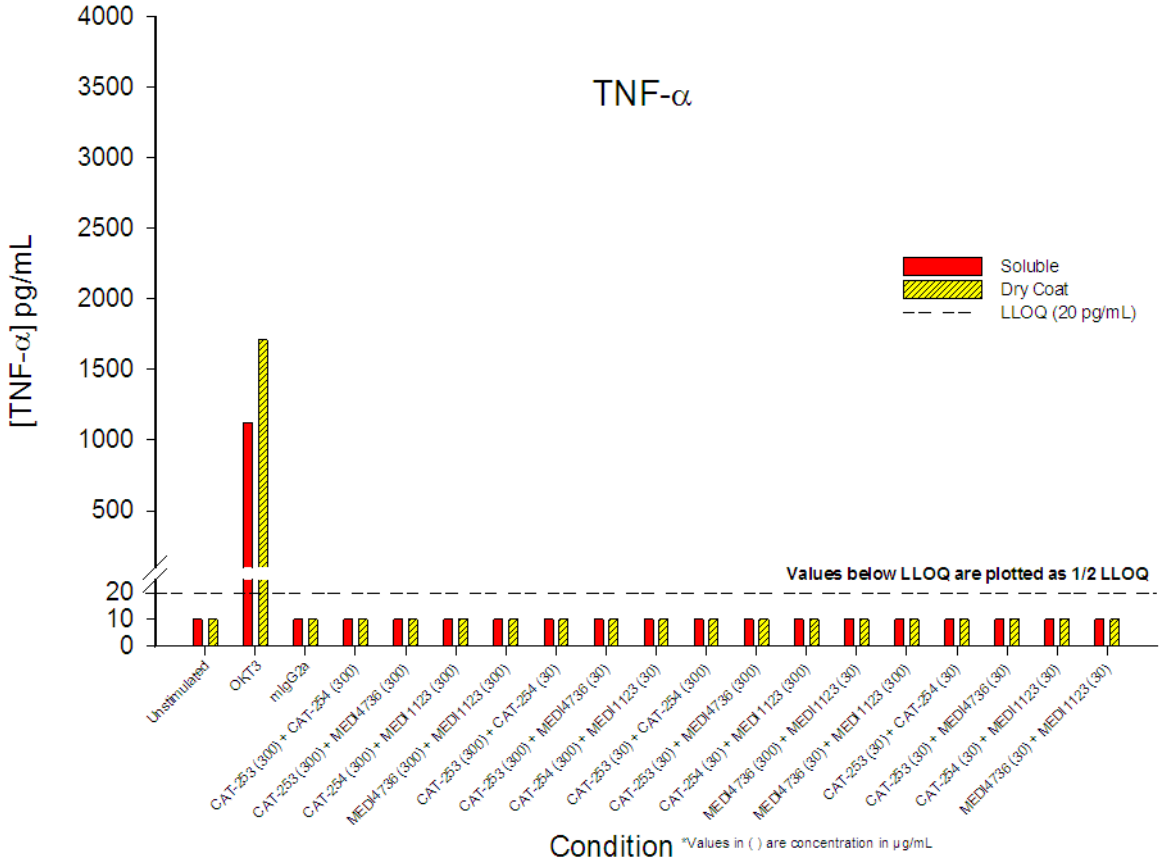



血漿除去（洗浄）したヒト全血を抗ヒト CD3 抗体（OKT3）、デュルバルマブ、トレメリムマブ又はデュルバルマブとトレメリムマブ併用処置にて 24 時間インキュベートした。抗体は溶液又はプレート表面での風乾により固相化することで、ヒト全血に曝露した。各抗体に関連のないアイソタイプ対照抗体である mIgG2a、triple mutation を有するヒト IgG1（CAT-254）、及びヒト IgG2（CAT-253）を陰性対照として使用した。上清中の IL-6 を測定した。データは各 2 ウェルずつ計測した平均値で、ドナー6 名のうち 1 名（[redacted]）から得られた代表的なデータを示している。

CD = 白血球分化抗原、IgG = 免疫グロブリン G、LLOQ = 検出下限、mIgG2a = マウス免疫グロブリン 2a、IL-6 = インターロイキン-6。

なお、図中、デュルバルマブは MEDI4736、トレメリムマブは MEDI1123 と表示している。

図 8　　ヒト全血の TNF-α 放出に及ぼすデュルバルマブ及びトレメリムマブの影響




血漿除去（洗浄）したヒト全血を抗ヒト CD3 抗体（OKT3）、デュルバルマブ、トレメリムマブ又はデュルバルマブとトレメリムマブ併用処置にて 24 時間インキュベートした。抗体は溶液又はプレート表面での風乾により固相化することで、ヒト全血に曝露した。各抗体に関連のないアイソタイプ対照抗体である mIgG2a、triple mutation を有するヒト IgG1（CAT-254）、及びヒト IgG2（CAT-253）を陰性対照として使用した。上清中の TNF-α 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6 名のうち 1 名（[redacted]）から得られた代表的なデータを示している。

CD＝ 白血球分化抗原、IgG＝ 免疫グロブリン G、LLOQ＝ 検出下限、mIgG2a＝ マウス免疫グロブリン 2a、TNF-α＝腫瘍壊死因子 α。

なお、図中、デュルバルマブは MEDI4736、トレメリムマブは MEDI1123 と表示している。

以上のデータから、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、臨床において単剤又はトレメリムマブとの併用のいずれにおいても、急激なサイトカイン放出を惹起することはないと予測されるという結論が裏付けられる。

## 2.6.2.2.2 *In vivo* 試験

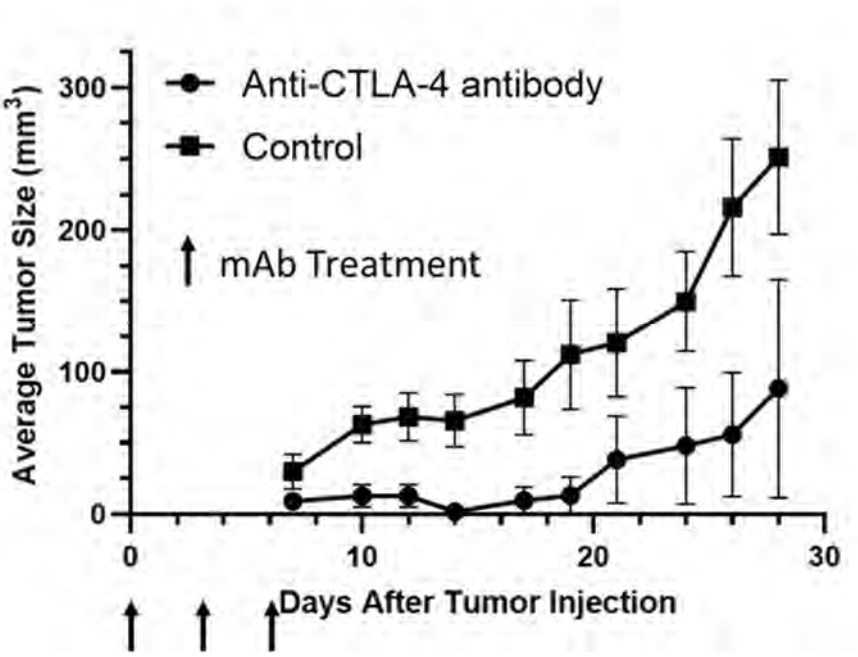
### 2.6.2.2.2.1 マウス線維肉腫モデルにおけるハムスター抗マウス CTLA-4 mAb の有効性

トレメリムマブはマウス CTLA-4 と交差反応しないため、免疫応答性マウス腫瘍モデルでトレメリムマブの活性を検討することはできなかった。代替法として、ハムスター抗マウス CTLA-4 mAb（9H10）を用いてこれらのモデルで抗 CTLA-4 mAb の抗腫瘍活性を評価した（試験 12-CP-675,206）。

試験 0 日目に、A/J マウス（5 例/群）に同系の SA1N 線維肉腫細胞を皮下注射した。試験 0、3 及び 6 日目に 9H10 又はアイソタイプ対照 Ab を 200 µg の用量で腹腔内（IP）投与した。9H10 の投与により、アイソタイプ対照 Ab を投与したときと比較して、試験 28 日目の平均腫瘍サイズが 65%減少した（図 9）。さらに、60 日間観察したところ、9H10 投与群の 5 例中 3 例で検知可能な腫瘍が認められなくなり、腫瘍再移植に対する抵抗性がみられた。9H10 200 µg 群における平均値のノンパラメトリック法の並べ替え検定を行い、検定を実施したところ、抗 CTLA-4 抗体群とアイソタイプコントロール群の腫瘍平均の差はほぼ全ての測定ポイントで p 値 <0.05、全測定ポイントで p 値 <0.10 であった（表 2）。投与 24 時間後の血漿中 9H10 濃度は 102 µg/mL であり、3 日後に 34 µg/mL に減少した。試験 3 日目における 9H10 の第 2 回目の投与は薬物濃度低下を防ぐために必要であった。

同じモデルを用いた別の試験では、試験 0、3 及び 6 日目に 9H10 を 25、50、100 又は 200 µg の用量で IP 投与した。200 µg の用量では 70%～100%の動物で検知可能な腫瘍が認められないか、又は腫瘍サイズが有意に減少した。50 又は 100 µg の用量では 20%～50%の動物で検知可能な腫瘍が認められないか、又は腫瘍サイズが有意に減少した。一方、25 µg の用量では腫瘍サイズの変化がみられなかった。

図 9　　ハムスター抗マウス CTLA-4 mAb のマウスモデルにおける線維肉腫の増殖阻害




試験 0 日目に、1 群 5 例の AJ マウスに SA1N 細胞株を皮下移植した。移植時、並びに試験 3 及び 6 日目にハムスター抗 CTLA-4 mAb（9H10）を 200 µg の用量で IP 投与した。腫瘍サイズ（長径×短径、電子ノギス）を毎日測定した。データを平均腫瘍サイズ ± SEM で示す。

CTLA-4 = 細胞傷害性 T リンパ球抗原 4；mAb = モノクローナル抗体；SEM = 平均値の標準誤差 = (standard deviation)/$\sqrt{n}$ and SE(Diff) = $\sqrt{SE_{antiCTLA4}^2 + SE_{Isotype}^2}$.

Average Tumor Size：平均腫瘍サイズ、Days After Tumor Injection：腫瘍移植後日数、Control：対照、anti-CTLA4：抗 CTLA-4、mAb Treatment：mAb 投与

表 2　　腫瘍面積平均値、平均差及び平均値の並べ替え検定

| Day | Mean (SEM) anti-CTLA-4 | Mean (SEM) Isotype Control | Difference (SE) | Permutation p-value |
|---|---|---|---|---|
| 7 | 9.2 (5.6) | 29.8 (12.4) | 20.6 (13.6) | 0.064 |
| 10 | 12.8 (8.0) | 62.9 (12.6) | 50.1 (15.0) | 0.003 |
| 12 | 10.6 (6.7) | 68.5 (16.9) | 57.9 (18.2) | < 0.001 |
| 14 | 1.8 (1.8) | 65.6 (18.4) | 63.8 (18.5) | 0.004 |
| 17 | 9.6 (9.6) | 81.8 (26.1) | 72.2 (27.8) | 0.003 |
| 19 | 13.1 (13.1) | 112.2 (38.7) | 99.1 (40.9) | 0.003 |
| 21 | 38.4 (30.6) | 120.5 (38.4) | 82.1 (49.1) | 0.053 |
| 24 | 48.0 (40.9) | 149.9 (35.1) | 102.0 (53.9) | 0.034 |
| 26 | 55.9 (43.7) | 215.9 (48.2) | 160.0 (65.1) | 0.015 |
| 28 | 88.3 (76.9) | 251.1 (54.1) | 162.8 (94.0) | 0.058 |

SEM = standard error of the mean = (standard deviation)/$\sqrt{n}$ and SE(Diff) = $\sqrt{SE_{antiCTLA4}^2 + SE_{Isotype}^2}$.

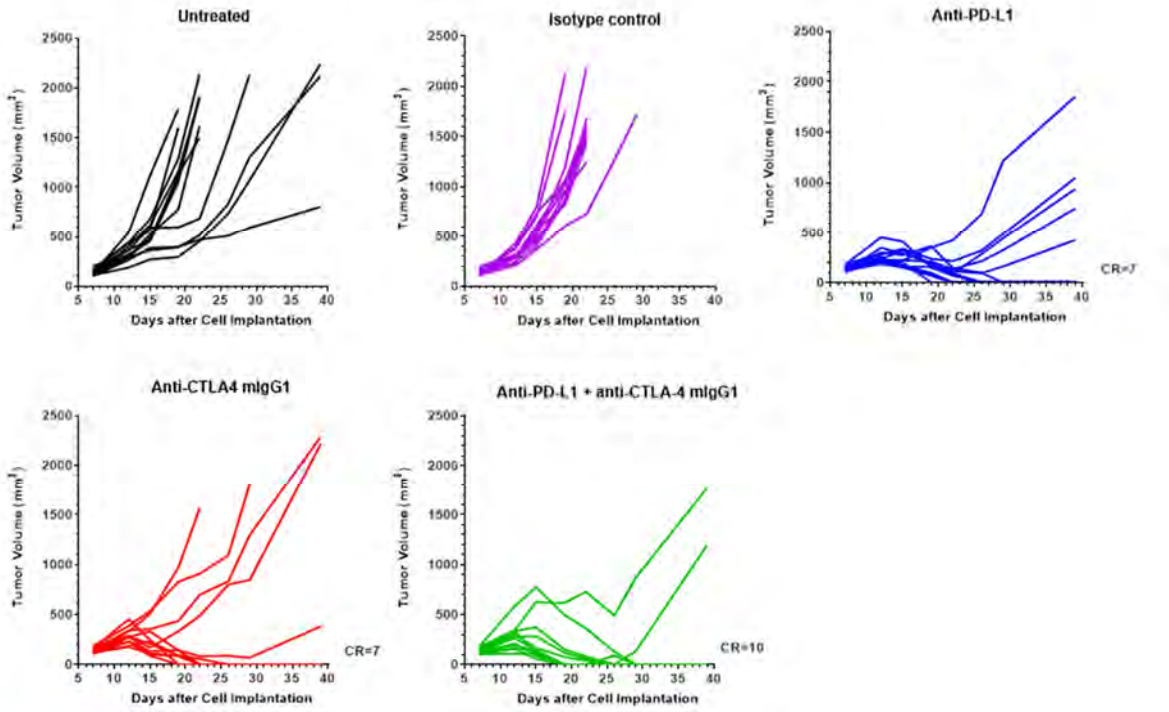
### 2.6.2.2.2.2　同系マウス腫瘍移植マウスにおける抗マウス CTLA-4 抗体、抗マウス PD-L1 抗体、又はそれらの併用の有効性及び薬力学的活性

トレメリムマブはマウス CTLA-4 に対して交差反応を示さず、デュルバルマブはマウス PD-L1 に対して交差反応を示さないことから、免疫応答性のあるマウス腫瘍モデルでこれらの活性を検討することはできなかった。そこで、トレメリムマブ及びデュルバルマブにとって、それぞれ適切な代替抗体であるマウス化抗マウス CTLA-4 mAb（9D9 mIgG1）及びマウス化抗マウス PD-L1 mAb（Clone 80 mIgG1 D265A）を用い、CTLA-4 阻害及び PD-L1 阻害の抗腫瘍活性について評価した（試験 ONC1123-0001）。試験対象モデルは、EMT6 マウス乳癌、CT26 マウス結腸癌及び MCA205 マウス線維肉腫のモデルであり、いずれも皮下移植した。腫瘍体積が中央値で 100～150 $mm^3$ になった時点でマウスを投与群に無作為に割り付け（Experiment 1 及び 2）、被験物質を 20 mg/kg の用量で週に 2 回（計 4 回：腹腔内）投与した。

その結果、各モデルにおいて抗 CTLA-4 抗体又は抗 PD-L1 抗体の単独投与、並びに両者の併用投与で活性が認められた。Experiment 1 の各モデルにおける腫瘍増殖体積及び生存率を図 10～図 15 に示した。Experiment 1 の全モデル及び Experiment 2 の EMT6 マウス乳癌及び CT26 マウス結腸癌のモデルにおいて、併用投与群の完全奏効は、単独群と比較して多かった（表 3）。また、これらの試験に用いたモデルそれぞれで、抗 CTLA-4 抗体単独投与、及び抗 CTLA-4 抗体と抗 PD-L1 抗体併用の両方とも薬力学的活性を示し、Ki67+（増殖性［マーカー］）CD4+又は CD8+腫瘍内 T 細胞を測定したところ、投与群で対照群より高値であった（図 16）。

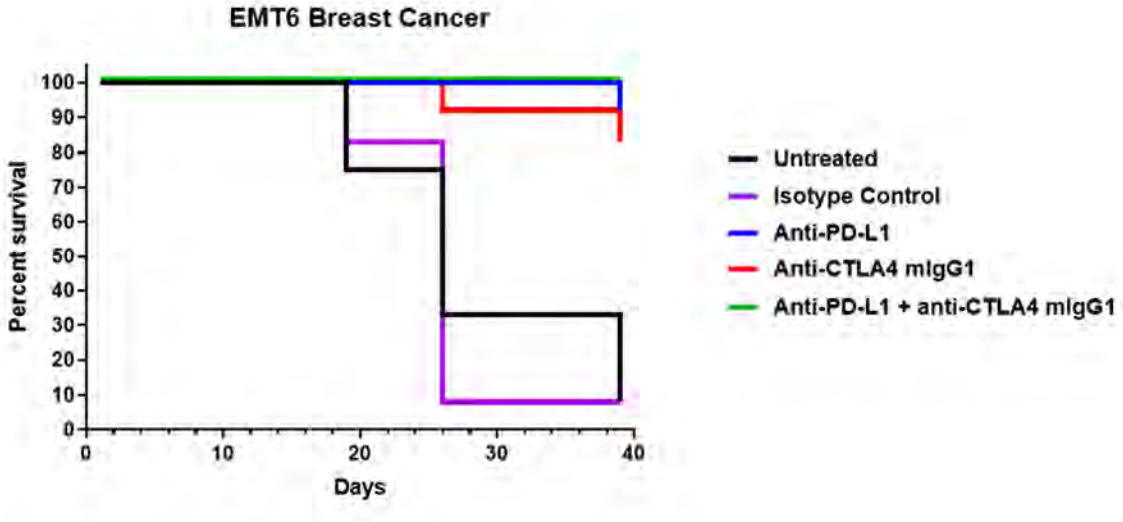
9D9 mIgG1 抗 CTLA-4 mAb には Fc 介在性のエフェクター機能による Tregs を含めた CTLA-4+細胞の枯渇能はなかった。このことから、完全ヒト IgG2 抗体で予想されるように、薬剤を投与した患者で腫瘍内の Tregs を含む CTLA-4+細胞の枯渇能を示さないトレメリムマブにとって、9D9 mIgG1 抗 CTLA-4 mAb が適切なマウス代替抗体であることが確認された。

図 10　　EMT6 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の腫瘍増殖曲線－Experiment 1



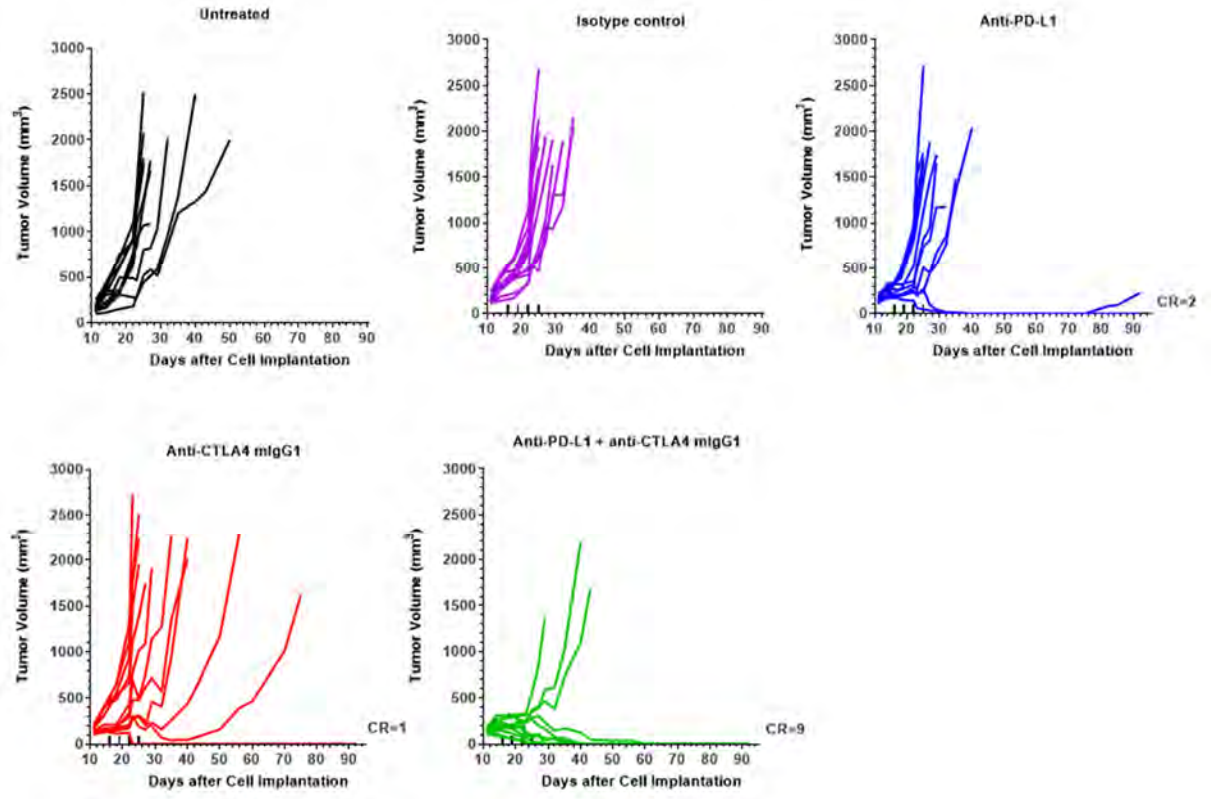

n = 12. CR = complete response.

図 11　　EMT6 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の生存期間曲線－Experiment 1



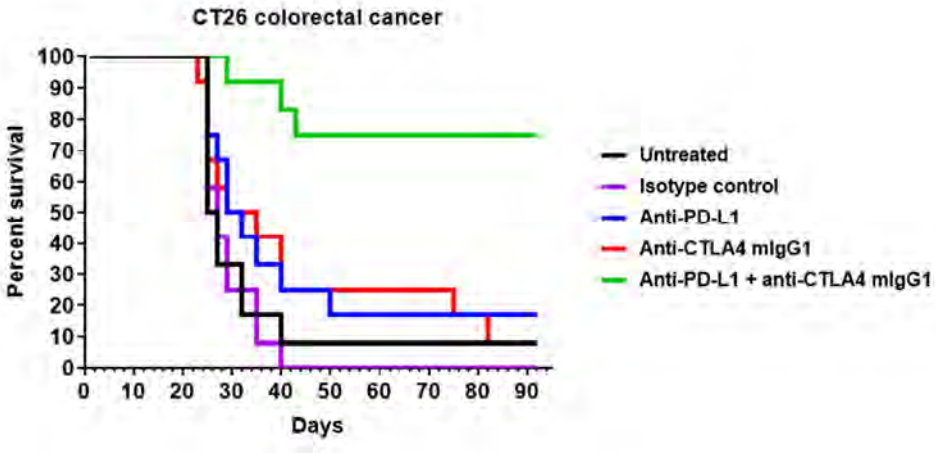

Statistical analysis of survival differences between treatment groups in animal studies was determined using the log-rank (Mantel-Cox) test using Prism software ([redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted] USA, [redacted]).

図 12　　CT26 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の腫瘍増殖曲線－Experiment 1



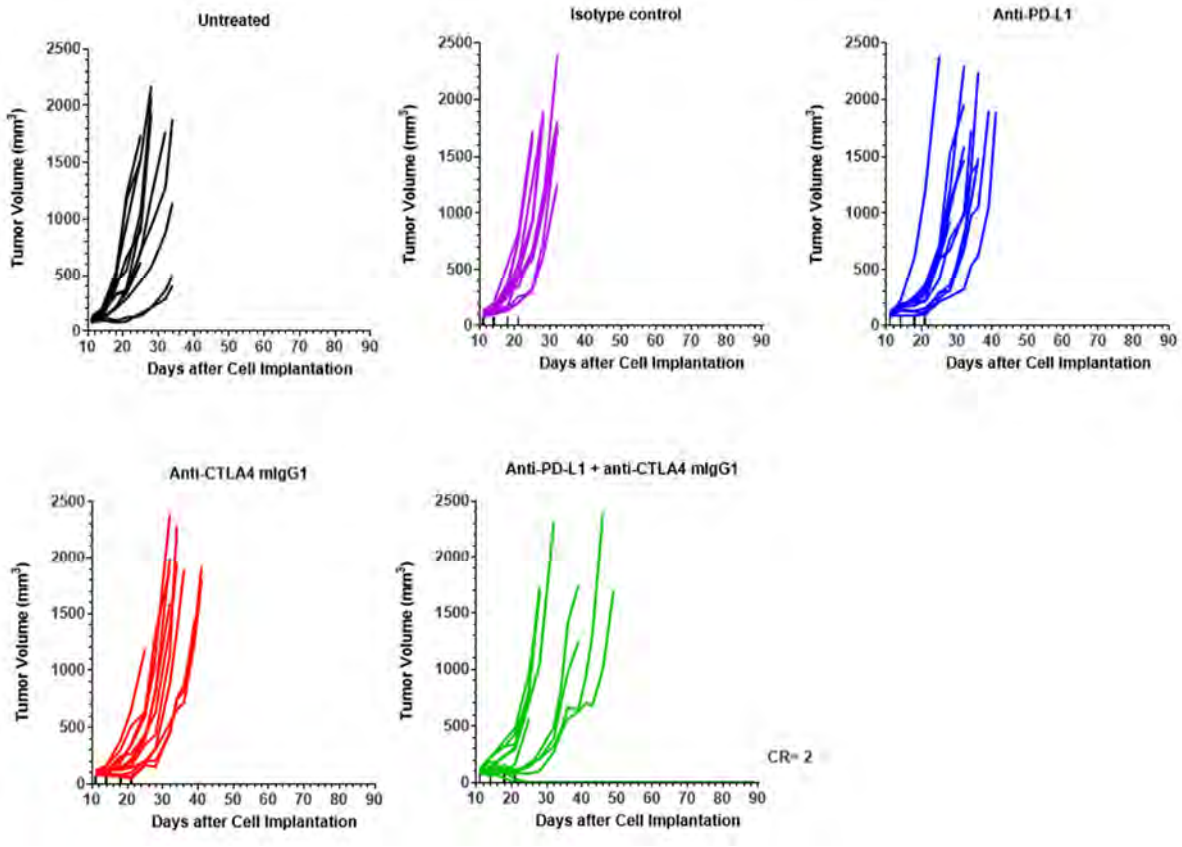

n = 12. CR = complete response.

図 13　　CT26 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の生存期間曲線－Experiment 1



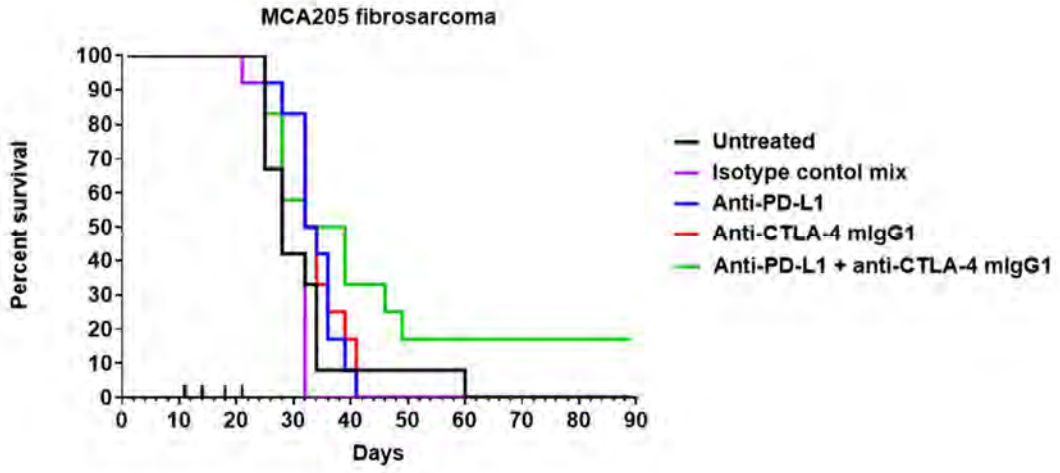

Statistical analysis of survival differences between treatment groups in animal studies was determined using the log-rank (Mantel-Cox) test using Prism software ([redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted] USA, [redacted]).

図 14　　MCA205 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の腫瘍増殖曲線－Experiment 1



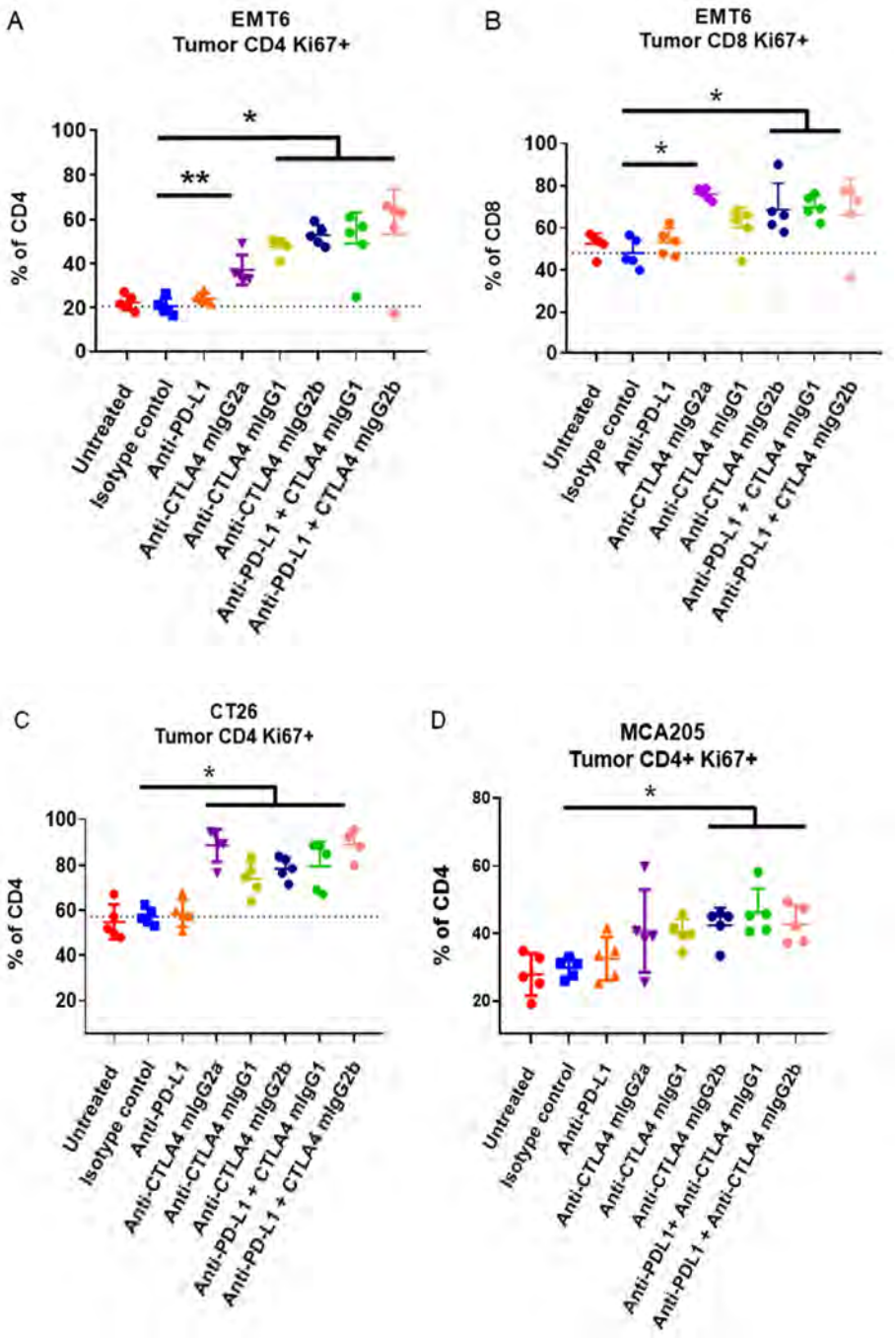

n = 12. CR = complete response

図 15　　MCA205 モデルを用いた抗腫瘍効果試験の生存期間曲線－Experiment 1




Statistical analysis of survival differences between treatment groups in animal studies was determined using the log-rank (Mantel-Cox) test using Prism software ([redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted] USA, [redacted]).

図 16　抗 PD-L1 mAb 若しくは抗 CTLA-4 mAb を単独投与、又は抗 PD-L1 mAb と抗 CTLA-4 mAb を併用投与した（A-B）EMT6、（C）CT26 又は（D）MCA205 腫瘍移植マウスから採取した腫瘍における Ki67+（増殖性［マーカー］）CD8 又は CD4T 細胞の割合（%）




*P<0.05 (one-way analysis of variance followed by Dunnett's correction for multiple comparisons using Prism software). n = 5/group.

表 3　同系腫瘍モデル EMT6、CT26 又は MCA205 を用いた抗腫瘍効果試験における完全奏効率

| Tumor model | Mouse strain | Anti-mouse PD-L1 clone 80 | | Anti-mouse CTLA-4 clone 9D9 mIgG1 | | Anti-PD-L1 clone 80 + Anti-mouse CTLA-4 clone 9D9 mIgG1 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Experiment 1 | Experiment 2 | Experiment 1 | Experiment 2 | Experiment 1 | Experiment 2 |
| EMT6 breast cancer | Balb/c | 7 of 12 (58%) | 10 of 12 (83%) | 7 of 12 (58%) | 7 of 12 (58%) | 10 of 12 (83%) | 11 of 12 (92%) |
| CT26 colon cancer | Balb/c | 2 of 12 (17%) | 2 of 12 (17%) | 1 of 12 (8.3%) | 2 of 12 (17%) | 9 of 12 (75%) | 6 of 12 (50%) |
| MCA205 sarcoma | C57BL/6 | 0 of 12 (0%) | 4 of 11 (36%) | 0 of 12 (0%) | 0 of 11 (0%) | 2 of 12 (17%) | 4 of 11 (36%) |

これらの試験結果から、抗 CTLA-4 mAb は、単独投与及び抗 PD-L1 mAb との併用のいずれにおいてもがんのマウスモデルで顕著な抗腫瘍効果を示すことが確認された。また、抗 CTLA-4 mAb と抗 PD-L1 mAb との併用投与により、抗 PD-L1 mAb 又は抗 CTLA-4 mAb 単独投与に比較して抗腫瘍効果が増強することが示された。さらに、これらの結果から、がん治療における抗 CTLA-4 mAb のプルーフ・オブ・プリンシプルも得られた。

## 2.6.2.3　副次的薬理試験

トレメリム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

トレメリムマブの独立した安全性薬理評価は実施していない。しかし、カニクイザルを用いた急性の単回投与毒性試験（試験 99-1985-01）、並びに 1 カ月間（試験 00-1985-04）及び 6 カ月間（試験 2004-0150）反復投与毒性試験において、トレメリムマブを静脈内投与し、神経系（一般状態観察により評価）、心血管系（心電図［PR、QRS、QT 及び QT(c) 間隔］及び血圧）及び呼吸数を含む安全性薬理パラメータを評価した。検討したいずれの用量及びいずれのパラメータについても、トレメリムマブの投与に関連した生物学的に問題となる変化はみられなかった。

## 2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

トレメリム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

トレメリムマブは rhCTLA-4 に高い親和性で特異的に結合し、その結合により CTLA-4 と CD80 及び CD86 との相互作用が阻害されることが *in vitro* 生化学的試験で立証された。トレメリムマブは rcynoCTLA-4 にも高い親和性で結合することが示された。

*In vitro* セルベースアッセイにおいて、トレメリムマブは初代ヒト T 細胞に対する CTLA-4 の作用を阻害することにより、健康ドナー由来活性化 PBMC 及び全血、並びにがん患者由来活性化

PBMC 及び全血からの IL-2 放出を増加させることが示された。一方、トレメリムマブは Tregs の活性には影響を及ぼさず、プレートに結合した状態では T 細胞活性化を阻害しない。また、トレメリムマブは免疫細胞表面の Fc 受容体に結合せず、ナイーブ及び活性化 T 細胞に対する ADCC を誘発しない。ヒト全血を用いたサイトカイン放出アッセイにおいて、トレメリムマブがサイトカインの放出を誘導するか否かを検討した。トレメリムマブは 100 µg/mL までの濃度において、明らかなサイトカインの放出を誘導しなかった。したがって、トレメリムマブは、その CTLA-4 アンタゴニストとしての作用機序と一致して、ヒトで急性のサイトカイン放出を誘導しないと考えられた。また、デュルバルマブがトレメリムマブ併用下でサイトカイン放出を誘導するか否かを検討するため、追加の *in vitro* サイトカイン放出試験を実施した。これら 2 剤の併用処置、又は適切なアイソタイプの対照抗体との併用処置を行った。その結果、いずれの試験条件下でデュルバルマブ及びトレメリムマブによる単独処置及び併用処置を行った場合も、いずれのドナーから採取した全血からもサイトカインの放出は認められなかった。これらの結果から、デュルバルマブは、臨床において単剤又はトレメリムマブとの併用のいずれにおいても急激なサイトカイン放出を惹起することはないとの予測が裏付けられた。最後に、トレメリムマブはヒト全血の血小板数に影響を及ぼさなかった。

*In vivo* では、SA1N マウス線維肉腫モデルに抗マウス CTLA-4 mAb を投与したとき、有意かつ用量依存的な抗腫瘍活性が認められた。最も強い活性は 200 µg/マウスの用量で得られた。この用量では血漿中抗マウス CTLA-4 mAb 濃度が 30 µg/mL 以上に維持されていた。EMT6 マウス乳癌、CT26 マウス結腸癌及び MCA205 マウス線維肉腫の同系マウス腫瘍移植モデルにおいて、抗 CTLA-4 mAb 又は抗 PD-L1 mAb の単独投与、並びに両者の併用投与により、腫瘍内 T 細胞増殖の誘導を伴う抗腫瘍活性が認められた。抗 CTLA-4 mAb と抗 PD-L1 mAb との併用投与により、抗 CTLA-4 mAb 又は抗 PD-L1 mAb の単独投与に比較して抗腫瘍活性は増強した。

非臨床薬理試験結果を総合すると、ヒトのがん治療薬として、トレメリムマブ単独投与又はデュルバルマブとの併用投与でトレメリムマブを開発することが支持された。*In vitro* 及び *in vivo* 両方の非臨床データから、抗 CTLA-4 mAb は幅広い濃度範囲で有効性を示す可能性が示されている。この濃度範囲の下限（血漿中濃度が約 10 µg/mL）は、SEA スーパー抗原アッセイで IL-2 放出がベースライン値を上回って有意に一貫して増強させる濃度である。本アッセイで検討したほとんど全てのドナーで IL-2 放出の強い増強が一貫して得られた濃度は 30 µg/mL であり、この濃度は *in vivo* で抗腫瘍活性が得られた抗マウス CTLA-4 mAb のトラフ濃度でもあった。

## 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

Wing et al 1995

Wing M, Waldmann H, Isaacs J, Compston D, Hale G. Ex-vivo whole blood cultures for predicting cytokine-release syndrome: dependence on target antigen and antibody isotype. Therapeutic immunology. 1995;2(4):183-90.

**第 2 部　CTD の概要**

トレメリムマブ

版番号：[redacted]

# 2.6.3　薬理試験概要表
# トレメリムマブ

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

標題ページ ..... 1
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 ..... 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 ..... 12
2.6.3.4 安全性薬理試験 ..... 12
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 12

# 表目次

表 1 トレメリムマブの効力を裏付ける試験 ..... 3
表 2 トレメリムマブの効力を裏付ける試験：*In vitro* 試験 ..... 5
表 3 トレメリムマブの効力を裏付ける試験：*In vivo* 試験 ..... 11

## 2.6.3.1　　薬理試験：一覧表

表 1　　トレメリムマブの効力を裏付ける試験

| Study Number | Study Type | Study Title | GLP Compliance | Study Site | Module Number |
|---|---|---|---|---|---|
| 06-CP-675,206 | *In vitro* | Selectivity of CP-675,206 Relative to CTLA-4 Binding | No | [redacted] | 4.2.1.1.1 |
| 15-CP-675,206 | *In vitro* | Binding of CP-675,206 to Activated T Cells or Lymphocytes | No | [redacted] | 4.2.1.1.2 |
| 14-CP-675,206 | *In vitro* | Comparison of CP-675,206 Binding Affinities to Recombinant Human and Recombinant Cynomolgus Monkey CTLA-Ig Using Biacore Technology | No | [redacted] | 4.2.1.1.3 |
| 03-CP-675,206 | *In vitro* | Inhibition of CTLA-4 Binding to B7 by CP-675,206 | No | [redacted] | 4.2.1.1.4 |
| 02-CP-675,206 | *In vitro* | Enhancement of IL-2 and Interferon-Gamma (IFN-γ) Production by CP-675, 206 in Human T Cell Blasts Stimulated with Raji cells | No | [redacted] | 4.2.1.1.5 |
| 08-CP-675,206 | *In vitro* | B7 Dependence of the SEA Superantigen Assay | No | [redacted] | 4.2.1.1.6 |
| 01-CP-675,206 | *In vitro* | Enhancement of Interluekin-2 (IL-2) Production by CP-675,206 in Superantigen Stimulated Human PBMC or Blood Cultures | No | [redacted] | 4.2.1.1.7 |
| 13-CP-675,206 | *In vitro* | Enhancement of IL-2 Production by CP-675,206 in superantigen Stimulated Human PBMC or Blood Cultures from Cancer Patients | No | [redacted] | 4.2.1.1.8 |
| 04-CP-675,206 | *In vitro* | Enhancement of IL-2 production by CP-675,206 in Superantigen Stimulated Cynomolgus Monkey Blood | No | [redacted] | 4.2.1.1.9 |
| 11-CP-675,206 | *In vitro* | Effects of CP-675,206 on Suppression of $CD4^+$ $CD25^-$ T Cells by Human T Regulatory Cells | No | [redacted] | 4.2.1.1.10 |
| 07-CP-675,206 | *In vitro* | Activity of Plate-Bound CP-675,206 | No | [redacted] | 4.2.1.1.11 |
| 05-CP-675,206 | *In vitro* | Effects of CP-675,206 on Spontaneously Induced Cytokine Release in Human Whole Blood | No | [redacted] | 4.2.1.1.12 |
| 10-CP-675,206 | *In vitro* | Effects of CP-675,206 on Platelet Counts in an *in Vitro* Human Whole Blood Assay | No | [redacted] | 4.2.1.1.13 |
| 16-CP-675,206 | *In vitro* | Binding of CP-675,206 to Human of Cynomolgus Monkey Fc Receptors | No | [redacted] | 4.2.1.1.14 |

表 1　　トレメリムマブの効力を裏付ける試験

| Study Number | Study Type | Study Title | GLP Compliance | Study Site | Module Number |
|---|---|---|---|---|---|
| 09-CP-675,206 | *In vitro* | Effects of CP-675,206 on Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity of Naive and Activated Human T Cells | No | [redacted], [redacted], | 4.2.1.1.15 |
| ONC4736-0017 | *In vitro* | *In Vitro* Assessment of MEDI4736/tremelimumab-mediated Cytokine Release in Human Whole Blood | No | MedImmune, Hayward, CA | 4.2.1.1.16 |
| 12-CP-675,206 | *In vivo* | A Murine CTLA-4 Monoclonal Antibody (9H10) Inhibits the Growth of a Murine Fibrosarcoma in Mice | No | [redacted], [redacted], | 4.2.1.1.17 |
| ONC1123-0001 | *In vivo* | Activity of Tremelimumab murine surrogate as monotherapy or in combination with anti-mouse PD-L1 in mouse syngeneic tumor models | No | AstraZeneca, Gaithersburg, MD | 4.2.1.1.18 |

CP-675,206 = tremelimumab; CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; GLP = Good Laboratory Practice; IFN = interferon; IL = interleukin.

## 2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2 トレメリムマブの効力を裏付ける試験：*In vitro* 試験

| Study Number | Study Objective(s) | Test System | Test Methods | Noteworthy Findings |
|---|---|---|---|---|
| 06-CP-675,206 | To determine the selectivity of binding of tremelimumab to rhCTLA-4-Ig relative to rhCD28-Ig, rhCD86 (B7.2)-Ig, and hIgG1 | rhCTLA-4-Ig, rhCD28-Ig, rhCD86-Ig, and hIGg1 coated onto plates (at a concentration of 1 μg/mL)<br>and<br>Tremelimumab and HRP-conjugated anti-human IgG2 | ELISA | Tremelimumab demonstrated > 500-fold higher selectivity for rhCTLA-4-Ig over rhCD28-Ig, rhCD86-Ig, and hIgG1 |
| 15-CP-675,206 | To determine binding of tremelimumab to activated lymphocytes and T cells | Human, cynomolgus monkey, rhesus monkey, mouse, rat, hamster and rabbit PBMCs<br>and<br>PHA<br>and<br>Anti-CD3 or anti-CD4 or anti-CD45 and biotinylated tremelimumab or anti-KLH and SA-conjugated PE | Flow Cytometry | Tremelimumab bound to activated human, cynomolgus monkey and rhesus monkey T cells.<br>Tremelimumab did not bind to activated mouse, rat, hamster or rabbit T cells. |
| 14-CP-675,206 | To determine the binding affinity of tremelimumab for rhCTLA-4 and rcynoCTLA-4 | rhCTLA-4 or rcynoCTLA-4 (at a concentration of 50 μg/mL)<br>and<br>Tremelimumab (666 nM to 0.01 nM) | SPR | Binding of tremelimumab to:<br>rhCTLA-4 with $K_D$ of 0.28 nM<br>• rcynoCTLA-4 with $K_D$ of 0.98 nM |
| 03-CP-675,206 | To determine the ability of tremelimumab to inhibit the binding of rhCTLA-4-Ig to rhCD80 (B7.1)-Ig and rhCD86 (B7.2)-Ig | rhCD80-Ig (4 nM) and rhCD86-Ig (3 nM)<br>and<br>rhCTLA-4-Ig (0.3 nM)<br>and<br>Tremelimumab (15.5 to 0.02 nM)<br>and<br>HRP-conjugated anti-human IgG4 | ELISA | Tremelimumab inhibits the binding of rhCTLA-4-Ig to:<br>rhCD80 in a concentration-dependent manner with an $IC_{50}$ of 0.78 nM<br>• rhCD86 in a concentration-dependent manner with an $IC_{50}$ of 0.46 nM |

表 2　　トレメリムマブの効力を裏付ける試験：*In vitro* 試験

| Study Number | Study Objective(s) | Test System | Test Methods | Noteworthy Findings |
|---|---|---|---|---|
| 02-CP-675,206 | To determine the ability of tremelimumab to overcome the inhibition of T-cell activation mediated by CTLA-4 | Primary human T cells<br>and<br>PHA<br>and<br>Raji B cells<br>and<br>Tremelimumab or anti-KLH (at a concentration of 30 μg/mL) | *In vitro* activation of primary human T cells measured as release of IFN-γ and IL-2 | Tremelimumab enhanced average release of IFN-γ and IL-2 by 54% and 510%, respectively, compared to anti-KLH |
| 08-CP-675,206 | To determine the dependence of the SEA superantigen stimulation of healthy human PBMCs or whole blood on CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) | Human whole blood or PBMCs<br>and<br>anti-human CD3 coated onto plates (0.5 μg/mL)<br>and<br>SEA (100 ng/mL)<br>and<br>Anti-human CD80 (B7.1), anti-human CD86 (B7.2), rhCTLA-4-Ig, tremelimumab, or anti-KLH (at a concentration of 30 μg/mL) | *In vitro* activation of human PBMCs and whole blood measured as release of IL-2 | In PBMC cultures:<br>CTLA-4-Ig and anti-CD86 inhibited release of IL-2 by > 90%<br>Anti-CD80 inhibited release of IL-2 by 49%<br>Tremelimumab enhanced release of IL-2 by > 8-fold<br>In whole blood:<br>Anti-CD86 inhibited release of IL-2 by > 75%.<br>Anti-CD80 inhibited release of IL-2 by 25%<br>CTLA-4-Ig inhibited release of IL-2 by 35%<br>• Tremelimumab enhanced release of IL-2 by 3-fold |

表 2　　トレメリムマブの効力を裏付ける試験：*In vitro* 試験

| Study Number | Study Objective(s) | Test System | Test Methods | Noteworthy Findings |
|---|---|---|---|---|
| 01-CP-675,206 | To determine the effect of tremelimumab on SEA superantigen stimulation of human PBMCs or whole blood from healthy donors | Human blood or PBMCs<br>and<br>anti-human CD3 coated onto plates (0.5 μg/mL)<br>and<br>SEA (100 ng/mL)<br>and<br>Tremelimumab or anti-KLH (at a concentration of 30 μg/mL) | *In vitro* activation of human PBMCs and whole blood measured as release of IL-2 | In PBMC cultures:<br>Tremelimumab enhanced release of IL-2 by 400% relative to anti-KLH<br>In whole blood<br>• Tremelimumab enhanced release of IL-2 by 120% relative to anti-KLH |
| 13-CP-675,206 | To determine the effect of tremelimumab on SEA superantigen stimulation of PBMCs or whole blood from healthy donors and patients with cancer | Human blood or PBMCs<br>and<br>anti-human CD3 coated onto plates (0.5 μg/mL)<br>and<br>SEA (100 ng/mL)<br>and<br>Tremelimumab or anti-KLH (0.1, 1, 10, 30, and 100 μg/mL) | *In vitro* activation of human PBMCs and whole blood measured as release of IL-2 | Tremelimumab enhanced release of IL-2 in a concentration-dependent manner in human PBMCs and whole blood from healthy human donors and from patients with melanoma, Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, and renal, prostate, colon, rectal, and ovarian carcinomas.<br>The response to tremelimumab did not depend upon the type or stage of cancer. |
| 04-CP-675,206 | To determine the effect of tremelimumab on SEA superantigen stimulation of cynomolgus monkey whole blood | Cynomolgus monkey whole blood<br>and<br>Anti-human CD3 coated onto plates (0.5 μg/mL)<br>and<br>SEA (100 ng/mL)<br>and<br>Tremelimumab or anti-KLH (30 μg/mL) | *In vitro* activation of cynomolgus monkey whole blood measured as release of IL-2 | Tremelimumab enhanced release of IL-2 in cynomolgus monkey whole blood by 91% |

表 2　　トレメリムマブの効力を裏付ける試験：*In vitro* 試験

| Study Number | Study Objective(s) | Test System | Test Methods | Noteworthy Findings |
|---|---|---|---|---|
| 11-CP-675,206 | To determine the effect of tremelimumab on the activity of T-regs | CD4+CD25- responder T cells<br>and<br>CD4+CD25+ Tregs<br>and<br>Anti-human CD3 coated onto plates (0.41 μg/mL) and anti-human CD28 (42 ng/mL)<br>and<br>Tremelimumab or anti-KLH (30, and 100 μg/mL) | *In vitro* activation of responder T cells measured as release of IFN-γ and proliferation measured by incorporation of tritium labelled thymidine | Tremelimumab did not affect the activity of Tregs |
| 07-CP-675,206 | To determine the effect of plate-bound tremelimumab on activation of PBMCs | Human PBMCs<br>and<br>SEA (100 ng/mL)<br>and<br>Tremelimumab or anti-KLH coated onto plates (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, and 100 μg/mL) | *In vitro* activation of PBMCs measured as release of IL-2 | Tremelimumab did not inhibit the release of IL-2 by PBMCs in response to SEA |
| 05-CP-675,206 | To assess the potential of tremelimumab to induce spontaneous cytokine release in human whole blood | Human whole blood<br>and<br>Anti-human CD3 or tremelimumab (10 and 100 μg/mL) | Levels of IL-6 and TNF-α measured by ELISA after 5 hours<br>Levels of IL-1β measured by ELISA after 48 hours | Average levels of cytokines induced by 100 μg/mL tremelimumab:<br>IL-1β: < 8 pg/mL<br>IL-6: < 6 pg/mL to 22 pg/mL<br>TNF-α: < 30 pg/mL<br>Average levels of cytokines induced by anti-human CD3:<br>IL-1β: 540 pg/mL<br>IL-6: 1358 pg/mL<br>• TNF-α: 1184 pg/mL |

表 2　　トレメリムマブの効力を裏付ける試験：*In vitro* 試験

| Study Number | Study Objective(s) | Test System | Test Methods | Noteworthy Findings |
|---|---|---|---|---|
| 10-CP-675,206 | To determine the effect of tremelimumab on platelet counts in human whole blood | Human whole blood<br>and<br>Tremelimumab or anti-KLH or CP-642, 570 (30 μg/mL) | Platelet counts at 0.25, 1.5, 4, and 24 hours | Tremelimumab did not reduce platelet count significantly compared to an anti-KLH.<br>Incubation with CP-642, 570 resulted in a significant decrease in platelet counts relative to an anti-KLH with 72% reduction |
| 16-CP-675,206 | To determine the binding of tremelimumab to human and cynomolgus monkey Fc receptors | Human or cynomolgus monkey leukocytes<br>and<br>$^{125}$I-labeled tremelimumab (270 ng/mL) or tremelimumab (140 μg/mL) together with $^{125}$I-labeled tremelimumab (270 ng/mL)<br>and<br>$^{125}$I-labeled IgG1 (270 ng/mL) or IgG1 (140 μg/mL) together with $^{125}$I-labeled IgG1 (270 ng/mL) | Gamma counting of cell pellets following incubation with antibodies | Human IgG1 demonstrated significant specific binding to human and cynomolgus monkey leukocytes.<br>Tremelimumab demonstrated minimal specific binding to human and cynomolgus monkey leukocytes. |
| 09-CP-675,206 | To assess the ability of tremelimumab to trigger ADCC against cells expressing CTLA-4 | Naïve human T cells or human T cells activated with anti-CD3 (10 μg/mL) and anti-CD28 (0.3 μg/mL)<br>and<br>Human NK cells activated with rhIL-2 (1 ng/mL)<br>and<br>Tremelimumab or anti-human CD3 or anti-human CD25 or anti-EPO (at a concentration of 100 μg/mL) | Flow cytometric determination of target cell viability | In naïve T cells:<br>Anti-CD3 increased ADCC to a maximum of 37%<br>Tremelimumab, anti-CD25, and anti-EPO had no significant effect<br>In T cells activated with anti-CD3 and anti-CD28:<br>Anti-CD3 increased ADCC to a maximum of 48%<br>Anti-CD25 increased ADCC to a maximum of 23%<br>• Tremelimumab and anti-EPO had no significant effect |

表 2　　トレメリムマブの効力を裏付ける試験：*In vitro* 試験

| Study Number | Study Objective(s) | Test System | Test Methods | Noteworthy Findings |
|---|---|---|---|---|
| ONC4736-0017 | To assess the potential of MEDI4736 and tremelimumab in combination to induce cytokine release in a whole blood assay system using whole blood from healthy human donors | Human whole blood from 6 healthy donors<br>and<br>MEDI4736 with tremelimumab<br>or<br>MEDI4736 with CAT-253<br>(negative control for tremelimumab)<br>or<br>tremelimumab with CAT-254<br>(negative control for MEDI4736)<br>or<br>CAT-253 with CAT-254<br>or<br>anti-human CD3 antibody<br>(OKT3; positive control)<br>or<br>mIgG2a<br>(negative control for OKT3)<br>or<br>LPS (positive control)<br>Presentation methods:<br>dry-coated: OKT3 and mIgG2a at 10 µg/mL, MEDI4736, tremelimumab, CAT-253 and CAT 254 at 30 and 300 µg/mL<br>in solution: OKT3 and mIgG2a at 1 µg/mL, LPS at 10 ng/ml, MEDI4736, tremelimumab, CAT-253, and CAT-254 at 30 and 300 µg/mL | Plasma-depleted human whole blood incubated with MEDI4736, tremelimumab, or anti human CD3, LPS, and the respective negative controls for 24 hours<br><br>Levels of IFN-γ, IL-2, IL 6, and TNF-α measured in supernatant using Luminex<br><br>Plasma-depleted human whole blood cells cultured in RPMI1640 | Levels of released cytokines induced by MEDI4736 in combination with tremelimumab or CAT-253 and tremelimumab in combination with CAT 254 (dry-coated and in solution):<br>• IFN-γ: below LLOQ<br>• IL-2: below LLOQ<br>• IL-6: below LLOQ<br>• TNF-α: below LLOQ<br>Levels of released cytokines induced by OKT3 (dry coated and in solution):<br>• IFN-γ: 497.3 to 1829.4 pg/mL<br>• IL-2: 725.5 to 3104.0 pg/mL<br>• IL-6: 31.6 to 1319.6 pg/mL<br>• TNF-α: 384.3 to 2347.7 pg/mL<br>Levels of released cytokines induced by LPS (in solution):<br>• IFN-γ: below LLOQ<br>• IL-2: below LLOQ<br>• IL-6: 1226.5 to 2708.4 pg/mL<br>• TNF-α: 1273.8 to 2100.1 pg/mL |

ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; cyno = cynomolgus monkey; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; EPO = erythropoietin; h = human; HRP = horse radish peroxidase; $IC_{50}$ = half-maximal inhibitory concentration; IFN-γ = interferon gamma; IL = interleukin; $K_D$ = equilibrium dissociation constant; KLH = keyhole limpet hemocyanin; NK = natural killer; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; PE = phycoerythrin; PHA = phytohemagglutinin; SA = streptavidin; SEA = staphylococcal enterotoxin A; SPR = surface plasmon resonance; T-reg = regulatory T cell; TNF-α = tumor necrosis factor alpha.

表 3　　トレメリムマブの効力を裏付ける試験：*In vivo* 試験

| Study No. | Study Objectives | Species/No. per Group | Test System | Dose/ROA | Noteworthy Findings |
|---|---|---|---|---|---|
| 12-CP-675,206 | To evaluate anticancer activity of anti-mouse CTLA-4 mAb as a monotherapy in a syngeneic mouse model of fibrosarcoma | AJ mice (5/group) | Animals implanted with mouse fibrosarcoma (SA1N) cancerous cell line | Anti-mouse CTLA-4: 200, 100, 50, 25 µg/ IP on Days 0, 3, and 6<br>or<br>Anti-KLH: 200, 100, 50, 25 µg/ IP on Days 0, 3, and 6 | The average tumor size decreased by more than 90% at Day 28 in animals treated with 200 µg anti-mouse CTLA-4 compared to anti-KLH.<br>The effect of anti-mouse CTLA-4 was dose-dependent:<br>• At 200 µg: 70% to 100% of animals had no tumor<br>• At 50 or 100 µg: 20% to 50% of the animals had no tumor<br>• At 25 µg: all animals showed tumor growth<br>The dose of 200 µg anti-mouse CTLA-4 resulted in a plasma concentration of 102 µg/mL at 24 hours decreasing to 34 µg/mL by Day 3.<br>Animals cured of tumor by anti-mouse CTLA-4 mAb were immune to rechallenge with SA1N cells. |

表 3　　トレメリムマブの効力を裏付ける試験：*In vivo* 試験

| Study No. | Study Objectives | Species/No. per Group | Test System | Dose/ROA | Noteworthy Findings |
|---|---|---|---|---|---|
| ONC1123-0001 | To evaluate antitumor and pharmacodynamic activity of anti-mouse CTLA-4 mAb as a monotherapy and in combination with an anti-PD-L1 mAb in syngeneic mouse tumour models | BALB-c or C57BL/6 (11-12/group for efficacy and 5/group for pharmacodynamic studies) | Animals engrafted with mouse breast (EMT6), colorectal (CT26) or fibrosarcoma (MCA205) tumours | Anti-mouse CTLA-4 monotherapy, anti-mouse PD-L1 monotherapy or anti-mouse CTLA-4 plus anti-mouse PD-L1 combination at 20 mg/kg each administered IP twice weekly after randomization at tumor volumes of 100-150 $mm^3$ | Monotherapy anti-CTLA-4 and anti-PD-L1 show efficacy in three independent mouse syngeneic tumor models. Likewise, the combination of the two shows additive or greater efficacy.<br><br>In each model, anti-tumor activity is accompanied by evidence of pharmacodynamic activity (increased intra-tumoral CD4 or CD8 T cell proliferation).<br><br>The anti-mouse CTLA-4 surrogate was confirmed to lack *in vivo* Treg depletion function, a characteristic shared by tremelimumab |

CD = cluster of differentiation; CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; IP = intraperitoneal/intraperitoneally; KLH = keyhole limpet hemocyanin; mAb = monoclonal antibody; PD-L1 = programmed death ligand-1.

## 2.6.3.3　　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

## 2.6.3.4　　安全性薬理試験

安全性薬理に関して、GLP 非適用及び GLP 適用の毒性試験（試験 99-1985-01、試験 00-1985-04 及び試験 2004-0150）で評価し、その結果は毒性試験の概要文 2.6.6 項及び毒性試験概要表 2.6.7 項に要約した。

## 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。