サノフィ株式会社

セミプリマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.4 非臨床試験の概括評価

Total number of pages: 32

目　　次

2.4 非臨床試験の概括評価 1

目　　次 2

表　目　次 4

図　目　次 5

略号と用語の定義 6

1　　非臨床試験計画概略 9

1.1　　腫瘍免疫回避におけるPD-1の役割に関する背景の概説 9

1.2　　セミプリマブ 10

1.3　　非臨床試験計画 11

2　　薬理試験 13

2.1　　効力を裏付ける試験 13

2.2　　安全性薬理試験 17

2.2.1　　中枢神経系 17

2.2.2　　心血管系 17

2.2.3　　呼吸系 18

3　　薬物動態試験 19

3.1　　サルを用いたセミプリマブの薬物動態及びトキシコキネティクス試験 19

4　　毒性試験 21

4.1　　反復投与毒性試験 22

4.2 生殖発生毒性試験 22

4.3 セミプリマブの曝露量及びADA形成 23

4.4 その他の毒性試験 24

5 総括及び結論 26

6 参考文献一覧 29

7 付録1：データ欠如の理由 31

表　目　次

表 1 - セミプリマブ、REGN1672及びREGN2626と遺伝子組換えPD-1タンパク質との結合における25°Cでの結合動態パラメータの要約 14

表 2 - セミプリマブ毒性試験プログラムの概要 21

表 3 - サルで到達した曝露量とヒト曝露量との比較によるセミプリマブ曝露量比 28

図　目　次

図 1 - 免疫応答は免疫シナプスの複数の位置でPD-1により調節される 10

略号と用語の定義

略号	定義
ADA	抗セミプリマブ抗体（Anti-drug antibody）
ADCC	抗体依存性細胞傷害（Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）
APC	抗原提示細胞（Antigen-presenting cell）
AUC	濃度－時間曲線下面積（Area under the concentration-time curve）
AUC_{tau}	投与間隔内の濃度-時間曲線下面積（Area under the concentration-time curve during a dosing interval）
C1q	補体活性化の古典的経路の C1 酵素複合体サブユニット（Subunit of the C1 enzyme complex for the classical pathway of complement activation）
CDC	補体依存性細胞傷害（Complement-dependent cytotoxicity）
CDR	相補性決定領域（Complementarity-determining region）
CNS	中枢神経系（Central nervous system）
CSCC	皮膚有棘細胞癌（Cutaneous squamous cell carcinoma）
C_{max}	最高（血清中）濃度［Maximum concentration (in serum)］
C_{trough}	（血清中）トラフ濃度［Trough concentration (in serum)］
DALA	薬物乱用性評価（Drug abuse liability assessment）
DTL	Drug tolerance limit
EC_{50}	50%有効濃度（Half-maximal effective concentration）
ECG	心電図（Electrocardiogram）
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay）
E_{max}	最大効果（Maximum effect）
Fcγ	IgG の結晶化可能断片（Fragment crystallizable region of IgG）
FIH	ヒト初回投与（First-in-human）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
h	ヒト（接頭辞として使用）［Human (when used as a prefix)］
HEK293	ヒト胎児腎臓細胞株（Human Embryonic Kidney 293 cell line）

略号	定義
$IgG4^P$	2 つの重鎖間のジスルフィド結合を安定化させるために、ヒト IgG4 定常領域のヒンジ領域におけるアミノ酸をセリンからプロリンに置換し（S228P、EU ナンバリング）、ヒト IgG1 のヒンジ配列（CPPC）と同一にしたもの［Human IgG4 constant domain with a serine to proline amino acid substitution (S228P, EU numbering) in the hinge region that reconstructs the human IgG1 hinge sequence (CPPC) to promote stabilization of disulfide bonds between the two heavy chains］
IC_{50}	50%阻害濃度（Half-maximal inhibitory concentration）
ICH	医薬品規制調和国際会議（International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use）
IgG	免疫グロブリン G（Immunoglobulin G）
IL	インターロイキン（Interleukin）
IP	腹腔内（Intraperitoneal）
ITIM	免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif）
ITSM	免疫受容体チロシンベーススイッチモチーフ（Immunoreceptor tyrosine-based switch motif）
IV	静脈内（Intravenous）
Jurkat	ヒト白血病 T 細胞株（Human leukemia T cell line）
KLH	キーホールリンペットヘモシアニン（Keyhole limpet hemocyanin）
LLOQ	定量下限（Lower limit of quantification）
mAb	モノクローナル抗体（Monoclonal antibody）
MC38.Ova	遺伝子組換えによりニワトリのオボアルブミンを発現させたマウス結腸腺癌細胞（Mouse colon adenocarcinoma cells engineered to express chicken ovalbumin）
Mf	カニクイザル（*Macaca fascicularis*, cynomolgus monkey）
MHC	主要組織適合遺伝子複合体（Major histocompatibility complex）
mIgE	膜結合型 IgE（Membrane-bound IgE）
NK	ナチュラルキラー（Natural killer）
NMDA	N-メチル-D-アスパラギン酸（N-methyl-D-aspartate）
NOAEL	無毒性量（No-observed-adverse-effect-level）
PBMC	末梢血単核細胞（Peripheral blood mononuclear cell）
PD-1	Programmed cell death-1
PD-L1	Programmed cell death-ligand 1
PD-L2	Programmed cell death-ligand 2
PK	薬物動態（Pharmacokinetics）
Raji	バーキットリンパ腫由来ヒト B 細胞株（Human B cell line derived from Burkitt’s lymphoma）

略号	定義
REGN1672	ニボルマブと同じ一次配列を有する抗 PD-1 モノクローナル抗体（Anti-PD-1 monoclonal antibody with primary sequence identical to nivolumab）
REGN1979	T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体［T cell-activating bispecific antibody (CD3xCD20)］
REGN2281	T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体［T cell-activating bispecific antibody (CD3xCD20)］
REGN2626	ペムブロリズマブと同じ一次配列を有する抗 PD-1 モノクローナル抗体（Anti-PD-1 monoclonal antibody with primary sequence identical to pembrolizumab）
SC	皮下（Subcutaneous）
SPR	表面プラズモン共鳴法（Surface plasmon resonance）
TGN1412	抗 CD28 スーパーアゴニストモノクローナル抗体（CD28 superagonist monoclonal antibody）
TK	トキシコキネティクス（Toxicokinetics）
TMC	標的分子を介した消失（Target-mediated clearance）
TNFα	腫瘍壊死因子 α（Tumor necrosis factor alpha）

1　非臨床試験計画概略

本資料には、ヒト及びカニクイザルの受容体 programmed cell death-1（PD-1）に特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体（mAb）であるセミプリマブ（遺伝子組換え）（以下、セミプリマブ、開発コード REGN2810）を用いて実施した非臨床試験全体を要約する。セミプリマブは受容体 PD-1 と programmed cell death-ligand 1（PD-L1）及び programmed cell death-ligand 2（PD-L2）との相互作用を阻害することにより、免疫細胞における抑制シグナル伝達を阻害し、腫瘍による免疫抑制を軽減する。

非臨床試験において、PD-L1 誘導性抑制シグナル伝達に対するセミプリマブの阻害能を評価した。セミプリマブはマウス及びラットの PD-1 には結合しないため、遺伝子組換えによりマウス PD-1 遺伝子産物の代わりにヒト PD-1 の細胞外ドメインとマウス PD-1 の膜貫通及び細胞内部分とを融合して発現させた PD-1 ヒト化（PD-1$^{hum/hum}$）マウスを用いてセミプリマブの抗腫瘍免疫誘導能を評価した。PD-1 ヒト化マウスは機能的 PD-1/PD-L1 シグナル伝達及び免疫応答を保持していることが示された。

PD-1 の抑制シグナル伝達経路が腫瘍を介した免疫抑制に重要な役割を果たしているがんの治療にセミプリマブを使用することをサポートするため、動物を用いてセミプリマブの薬理、薬物動態（PK）及び非臨床安全性プロファイルを評価した。薬理、PK 及び毒性試験の詳細な結果及び考察をそれぞれ Module 2.6.2 薬理試験の概要文、Module 2.6.4 薬物動態試験の概要文及び Module 2.6.6 毒性試験の概要文に示す。

非臨床毒性試験プログラムは、医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン、すなわちバイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価（ICH S6 (R1), 2012 (1)）及び抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9, 2010 (2)）に一致するものであり、必要に応じて医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）下で試験を実施した。

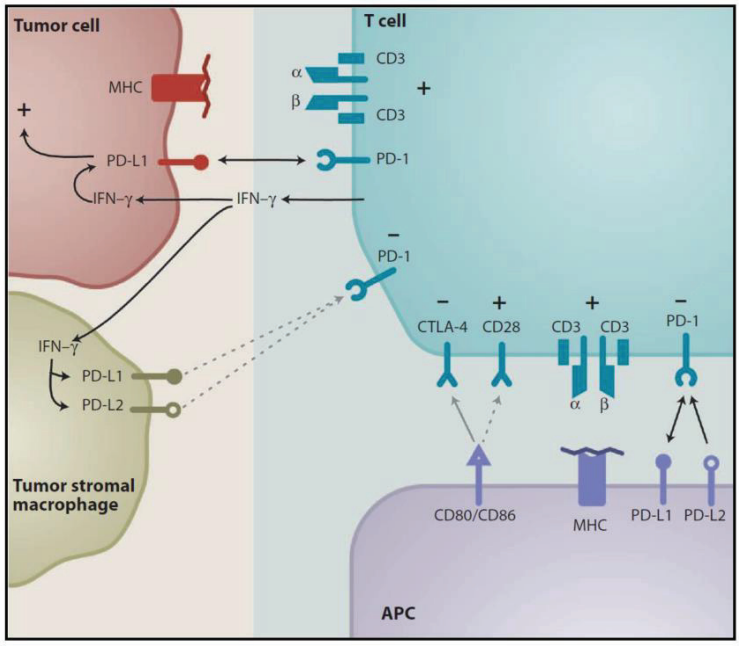
1.1　腫瘍免疫回避における PD-1 の役割に関する背景の概説

PD-1 は、CD28 ファミリーメンバーの抑制性チェックポイント受容体であり、活性化 T 及び B 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞並びに骨髄系細胞に発現しており、そこで免疫調節に極めて重要な役割を果たしている（図 1）。2 つの PD-1 リガンド、すなわち PD-L1 及び PD-L2 は、免疫制御分子の B7 ファミリーに属する(3)。PD-L1 は PD-1 の主要なリガンドであり、活性化 T 及び B 細胞、骨髄系細胞、内皮細胞及び上皮細胞といった造血系及び非造血系の多くの細胞型に広範に発現している。重要なこととして、PD-L1 は複数のヒトがん種の腫瘍細胞及び腫瘍微小環境にも発現している。一方、PD-L2 は樹状細胞及びマクロファージといった抗原提示細胞（APC）に限局的に発現している。

T 細胞が慢性的に活性化されると、PD-1 のアップレギュレーションが誘導される。PD-L1 の存在下では、その細胞質ドメインの免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（ITIM）及び免疫受容体チ

ロシンベーススイッチモチーフ（ITSM）を介して、CD28 及び T 細胞受容体下流シグナル伝達が抑制されることにより末梢免疫寛容が発現する(4)(5)。免疫抑制性 PD-1/PD-L1 シグナル伝達経路を腫瘍に対する免疫応答下で阻害すると、ヘルパーT 細胞及び細胞傷害性 T 細胞の両方の機能の回復が促進され、腫瘍細胞を認識して攻撃するエフェクターT 細胞の数が増加する(6)(7)。

図 1 - 免疫応答は免疫シナプスの複数の位置で PD-1 により調節される



ナイーブ T 細胞は、APC の MHC により提示されたペプチドと T 細胞受容体との特異的な相互作用により APC に結合する。APC の CD80/CD86 と T 細胞の CD28 との相互作用により第 2 の共刺激シグナルが伝達され、CTLA-4 の細胞内移行や T 細胞の PD-1 のアップレギュレーションが引き起こされる。活性化 T 細胞は腫瘍微小環境で抗原を認識する。腫瘍微小環境では、IFN-γ などのエフェクターサイトカインの産生により腫瘍細胞の PD-L1 や腫瘍浸潤細胞の PD-L1/PD-L2 がアップレギュレートされ、PD-1／リガンド経路を介した適応免疫耐性が促進される。刺激性（+）及び抑制性（-）T 細胞シグナル伝達経路。図は(8)から引用。

略号：APC = 抗原提示細胞、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、MHC = 主要組織適合遺伝子複合体、PD-1 = programmed cell death-1、PD-L1 = programmed cell death-ligand 1、PD-L2 = programmed cell death-ligand 2

1.2 セミプリマブ

Regeneron Pharmaceuticals, Inc.（以下、Regeneron 社）は、PD-1 シグナル伝達経路が腫瘍を介した免疫抑制に関与している複数の腫瘍型の治療を目的として完全ヒト抗 PD-1 mAb のセミプリマブを開発した。セミプリマブはヒト及びカニクイザルの PD-1 に高い親和性で結合し、PD-L1 を介した T 細胞の抑制シグナル伝達を阻害することにより、抗腫瘍免疫応答を回復させる。

セミプリマブは Regeneron 社の VelocImmune®プラットフォームを用いて製造された(9)(10)。チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株を用いて抗体を産生するため、選択された抗 PD-1 ハイブリドーマから得られたヒト可変領域を、ヒト定常領域を含む発現ベクターにクローニングした。その結

果産生される mAb は完全にヒトの配列に由来するものである。セミプリマブは共有結合性ヘテロ四量体であり、ジスルフィド結合で結合した 2 つの同一のヒト重鎖がそれぞれヒト κ 軽鎖にジスルフィド結合で共有結合している。重鎖間のジスルフィド結合を安定化させるために、各セミプリマブ重鎖の結晶化可能断片（Fc）ドメインのヒンジ領域内におけるアミノ酸をセリンからプロリンに置換し（S228P、EU ナンバリング、IgG4^{P} と表す）、ヒト IgG1 のヒンジ配列（CPPC）と同一にしている (11)。重鎖及び軽鎖可変ドメイン内の相補性決定領域（CDR）が結合してセミプリマブのその標的 PD-1 への結合部位を形成する。

表 1 に示すように、*in vitro* 結合試験においてセミプリマブはカニクイザル及びヒトの単量体及び二量体 PD-1 に高い親和性で結合したが、マウス及びラットの PD-1 には検出可能な結合を示さなかった。セミプリマブはサルとヒトの標的抗原に対して同程度の結合親和性を示したことから、セミプリマブの生物学的に重要な薬理、PK／トキシコキネティクス（TK）及び毒性情報を得るのに適した動物種としてサルを使用することが支持された。

1.3　非臨床試験計画

非臨床薬理試験の主目的は、*in vitro* の受容体 PD-1 抑制シグナル伝達に対するセミプリマブのアンタゴニスト活性及びそれによって得られる PD-1 ヒト化マウス腫瘍モデルにおける *in vivo* 抗腫瘍効果を評価することであった。これらの試験の副次目的は、セミプリマブの免疫抑制（PD-1 アゴニスト）活性及びスーパーアゴニスト活性（サイトカインストーム）誘導の有無を評価することであった。特別な安全性薬理試験は実施しなかったが、代わりに、サルを用いた毒性試験に安全性薬理評価を組み込んだ。

GLP 非適用の試験でサルにセミプリマブを単回静脈内（IV）投与及び皮下（SC）投与したときの PK プロファイルを評価する一方、サルを用いた GLP 適用の反復 IV 投与毒性試験の一部として、TK プロファイルを評価した。全ての GLP 非適用試験は、GLP の一般原則の下で実施した。GLP 試験の実施中に記録された逸脱は軽微なものであり、試験の完全性及び結果の解釈に悪影響を及ぼすことはなかったと考えられる。全ての薬理試験は、試験実施施設の社内作業過程及び手順に従って実施され、結果の信頼性及び解釈に影響を及ぼした可能性のある予期せぬ状況は認められなかった。サルを用いた GLP 適用の反復投与毒性試験の一部として、呼吸器系、中枢神経系（CNS）及び心血管系（QTc 間隔延長作用に関する評価を含む）に関する評価を実施した。この手法は、ICH ガイドラインのバイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価（ICH S6 (R1), 2012 (1)）及び抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9, 2009 (2)）に合致している。

カニクイザルを用いて 3 つの異なる反復 IV 投与毒性試験を実施した。その内訳は、4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験、26 週間反復投与毒性試験及び 12 週間回復性試験並びに 13 週間受胎能評価試験及び 12 週間回復性試験である。4 及び 26 週間反復投与毒性試験では、いずれも特異的な免疫毒性の評価項目を検討した。これらの試験では、セミプリマブの臨床投与に採用されている IV 投与経路を選択した。また、毒性試験において抗セミプリマブ抗体（ADA）を測定し、ADA がセ

ミプリマブの曝露量に及ぼす影響の有無又は ADA 形成に関連した毒性の有無を評価した。最後に、正常なヒト及びカニクイザルの組織を用いた *in vitro* 組織交差反応性試験を実施し、両動物種における組織結合特性を検討及び比較した。

セミプリマブの依存性又は乱用性を示唆するエビデンスは、動物の毒性試験及び薬理試験では認められず、PD-1 阻害抗体についての過去の臨床使用経験においても認められなかった。毒性試験において CNS に関する行動変化及び病理学的変化は認められなかったことから、薬物乱用性評価（DALA）試験を実施しなかった理由が支持された。更に、セミプリマブが乱用性に関連する受容体及びトランスポーターに結合するとのエビデンスはない。また、セミプリマブは親水性の性質を有し、高分子量（約 150 kDa）であるため、本薬が問題となる程度に血液脳関門を通過する可能性は極めて低いと考えられる。最後に、mAb は分解により異化され、明らかな生物学的活性のない小さなペプチド及び各アミノ酸になるため、薬物依存性及び乱用性のリスクを有する可能性は低いことが一般に認識されている。その他の特定の非臨床試験（薬物間相互作用試験、代謝及び排泄試験、遺伝毒性試験等）は、目的とする適応症を対象としたセミプリマブの登録には該当しないか又は必要ないものであるため実施しなかった。これらの試験を実施しなかった理由を4.4項に示す。

セミプリマブのがん原性試験は実施しなかった。このことは、現時点で把握されている本薬の作用機序及び進行悪性腫瘍の患者を対象とした本薬の使用に一致している（ICH S9, 2009 (2)）。

2 薬理試験

2.1 効力を裏付ける試験

薬理試験プログラムの主目的は、セミプリマブの標的抗原 PD-1 に対する *in vitro* での親和性及び特異性をマウス、サル及びヒトで評価することであった。副次目的は、セミプリマブによる免疫抑制活性又はエフェクター機能活性及び無制御な免疫応答の誘導の有無を評価することであった。マウス *Pdcd1* 遺伝子座由来ヒト／マウス PD-1 キメラ受容体（ヒト PD-1 の細胞外ドメインとマウス PD-1 の膜貫通及び細胞質ドメインとを融合させたもの）を発現する PD-1 ヒト化（PD-1$^{hum/hum}$）マウスを用いて、セミプリマブによる受容体 PD-1 阻害の薬力学を評価した（Module 2.6.2 薬理試験の概要文）。

セミプリマブはヒト及びカニクイザルの PD-1 に高い親和性で結合するヒト IgG4^{P} 抗体であり、T 細胞を用いたバイオアッセイにおいて PD-1/PD-L1 を介した抑制シグナル伝達を阻害したが、非特異的な T 細胞の活性化は誘導しなかった。

Biacore™結合技術を用いた表面プラズモン共鳴法（SPR）によりセミプリマブが PD-1 に結合することが示された。セミプリマブはカニクイザル及びヒトの単量体 PD-1 に結合し（K_D 値はそれぞれ 7.61 及び 5.61 nmol/L）、これらの動物種の二量体 PD-1 にも結合した（K_D 値はそれぞれ 499 及び 577 pmol/L）（表 1）。セミプリマブはマウス及びラットの PD-1 には結合しなかった [REGN2810-MX-14078]。酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）により検討したところ、セミプリマブはヒト PD-L1 に対する遺伝子組換えサル PD-1（2 nmol/L）及びヒト PD-1（1.5 nmol/L）の結合を阻害し（IC_{50} 値はそれぞれ 0.97 及び 0.60 nmol/L）、ヒト PD-L2 に対するこれらの受容体タンパク質の結合も阻害した（IC_{50} 値はそれぞれ 0.22 及び 0.13 nmol/L）[REGN2810-MX-14079]。抗 PD-1 対照抗体 REGN1672（一次配列がニボルマブと同一）及び REGN2626（一次配列がペムブロリズマブと同一）は、ヒト及びカニクイザルの PD-1 タンパク質に対してセミプリマブと同程度の結合親和性を示した。

表 1 - セミプリマブ、REGN1672 及び REGN2626 と遺伝子組換え PD-1 タンパク質との結合における 25°C での結合動態パラメータの要約

タンパク質	抗体	結合動態パラメータ			
		k_a (mol^{-1} L s^{-1})[a]	k_d (s^{-1})[b]	K_D (mol/L)[c]	$t_{1/2}$ (分)[d]
hPD-1.mmH[e]	セミプリマブ	$1.37x10^5$	$7.68x10^{-4}$	$5.61x10^{-9}$	15.0
	REGN1672	$2.58x10^5$	$2.42x10^{-3}$	$9.39x10^{-9}$	4.8
	REGN2626	$5.22x10^5$	$6.20x10^{-3}$	$1.19x10^{-8}$	1.9
hPD-1.mFc[f]	セミプリマブ	$2.37x10^5$	$1.37x10^{-4}$	$5.77x10^{-10}$	84.4
	REGN1672	$4.57x10^5$	$2.02x10^{-4}$	$4.42x10^{-10}$	57.1
	REGN2626	$5.64x10^5$	$1.70x10^{-4}$	$3.00x10^{-10}$	68.1
MfPD-1.mmH[g]	セミプリマブ	$1.09x10^5$	$8.28x10^{-4}$	$7.61x10^{-9}$	14.0
	REGN1672	$1.69x10^5$	$1.52x10^{-3}$	$9.02x10^{-9}$	7.6
	REGN2626	$3.71x10^5$	$1.26x10^{-3}$	$3.38x10^{-9}$	9.2
MfPD-1.mFc[h]	セミプリマブ	$2.64x10^5$	$1.32x10^{-4}$	$4.99x10^{-10}$	87.8
	REGN1672	$4.41x10^5$	$1.98x10^{-4}$	$4.48x10^{-10}$	58.5
	REGN2626	$5.92x10^5$	$1.52x10^{-4}$	$2.57x10^{-10}$	75.9
rPD-1.mmH[i]	セミプリマブ	NB[j]			
	REGN1672	NB			
	REGN2626	NB			
mPD-1.mmH[k]	セミプリマブ	NB			
	REGN1672	NB			
	REGN2626	NB			

a 結合速度定数
b 解離速度定数
c 平衡解離定数
d 解離半減期（結合したPD-1の50%が結合部位から解離するのに必要な時間）
e ヒト単量体PD-1；mmH = myc-myc-ヘキサヒスチジン
f ヒト二量体PD-1；mFc = マウスFcγドメイン
g カニクイザル単量体PD-1
h カニクイザル二量体PD-1
i ラット単量体PD-1
j 結合が検出されず
k マウス単量体 PD-1

遺伝子組換え細胞を用いた 2 種類のアッセイで、セミプリマブの PD-1 アンタゴニスト（免疫刺激）作用（PD-L1 を介した受容体 PD-1 からのシグナル伝達に対する阻害作用）効力及び PD-1 アゴ

ニスト（免疫抑制）活性誘導の有無を評価した（[REGN2810-MX-14079]）。これらのサロゲートアッセイ（シグナル／ノイズ比を増加させるためにキメラタンパク質を使用）は、抗 PD-1 抗体を評価する適切かつ頑健な方法を提供することにより、この分野での既存のアッセイの欠点を克服するよう構築された。

第 1 のアッセイでは、PD-1 キメラ受容体（ヒト PD-1 の細胞外ドメインとヒト免疫細胞抑制性受容体 CD300a の膜貫通及び細胞質ドメインとを融合させたもの）を導入した Jurkat エフェクターT 細胞を使用した。このキメラ受容体では 完全長 PD-1 よりも強い阻害反応が得られ、アッセイのシグナル／ノイズ比が高い（[REGN2810-MX-14079]）。更にこの Jurkat 細胞に AP-1（応答配列）ールシフェラーゼレポーター遺伝子を導入した（Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc）。完全長 PD-L1 を導入した Raji 細胞を APC 様細胞株として使用した。本アッセイにおける T 細胞活性化は、CD20 発現 Raji 細胞と CD3 発現 Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞（遺伝子導入 Jurkat 細胞）とを架橋する抗 CD3×CD20 二重特異性抗体（REGN2281）の存在に依存する。PD-L1 を発現していない野生型 Raji 細胞の存在下では、REGN2281 は遺伝子導入 Jurkat 細胞のシグナル伝達を活性化し、EC_{50} は 35 pmol/L であった。しかし、PD-L1 発現 Raji 細胞の存在下では、EC_{50} が約 5 倍の 163 pmol/L に増加し、最大シグナルも約 3 分の 1 に減少した。この試験系にセミプリマブを添加すると、T 細胞のシグナル伝達が亢進し（EC_{50} は 1.37 nmol/L）、T 細胞の最大シグナルが約 75%回復した。

セミプリマブの PD-L1 アンタゴニスト作用効力を評価する第 2 のアッセイにおいて、T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体は必要なかった。代わりに、本アッセイは遺伝子導入により抗 CD3 可変ドメインを有する膜結合型 IgE（mIgE）を発現させた HEK293 細胞に依存しており、これをサロゲート APC として使用し、細胞表面で CD3 のクラスターを形成させることにより遺伝子導入 Jurkat 細胞を活性化した。この HEK293 細胞に更に PD-L1 を導入すると、遺伝子導入 Jurkat 細胞に発現している受容体 PD-1 と結合することにより、遺伝子導入 Jurkat 細胞のシグナル伝達が抑制された。本アッセイにおけるその他の改善点は、第 1 のアッセイでは PD-1-CD300a キメラ受容体を使用したのに対して、完全長受容体 PD-1 を導入した Jurkat 細胞（Jurkat/PD-1/AP-1-Luc）を使用したことであり、第 1 のアッセイと同様に、Jurkat 細胞には AP-1（応答配列）ールシフェラーゼレポーター遺伝子も導入した。本アッセイ系において、PD-L1 発現 HEK293 細胞の存在下で、セミプリマブは遺伝子導入 Jurkat 細胞のシグナル伝達を促進し、EC_{50} は 3.3 nmol/L であった。抗 PD-1 対照抗体の REGN1672 及び REGN2626 も遺伝子導入 Jurkat 細胞のシグナル伝達を促進し、EC_{50} 値はそれぞれ 5.0 及び 2.0 nmol/L であった。全体として、セミプリマブ及び 2 つの抗 PD-1 対照抗体により PD-1 を阻害すると、Jurkat 細胞のシグナル伝達が、抗 CD3×CD20 二重特異性抗体で得られる E_{max} の約 60～75%まで回復した。非結合性アイソタイプ対照抗体はシグナル伝達に作用を示さなかった。

上記の両アッセイにおいてセミプリマブの免疫抑制活性の有無を検討した（[REGN2810-MX-14079]）。第 1 のアッセイにおいて、野生型（PD-L1 非発現）Raji 細胞及び REGN2281（抗 CD3×CD20 二重特異性抗体）の存在下で、セミプリマブは T 細胞のシグナル伝達を阻害し、IC_{50} は 0.40 nmol/L、非結合性アイソタイプ対照抗体と比較した最大減少率は約 11%であった。2 つの抗 PD-1 対照抗体 REGN1672 及び REGN2626 も本試験系で T 細胞のシグナル伝達を抑制し、IC_{50} はそれぞれ

0.26 及び 0.16 nmol/L、非結合性アイソタイプ対照抗体と比較した最大減少率はそれぞれ 21%及び 29%であった。特記すべきこととして、免疫抑制作用はアッセイ間でばらつきがあり、抗 PD-1 抗体により単に PD-1 の二量体化が生じた結果ではなく、抗 PD-1 抗体が Raji 細胞の Fcγ 受容体に結合することにより遺伝子導入 Jurkat 細胞で受容体 PD-1 のクラスター形成が生じた結果認められたと考えられる。第 2 のアッセイにおいて、PD-L1 も Fcγ 受容体も発現していない HEK293 細胞の存在下で遺伝子導入 Jurkat 細胞を用いて検討したところ、3 つの抗 PD-1 抗体のいずれも免疫抑制活性を示さなかったことから、T 細胞抑制シグナル伝達を誘導するのに抗体を介した PD-1 の二量体化では不十分であることが示唆された。

PD-L1 により阻害されたヒト初代培養活性化 T 細胞の増殖に対する PD-1 阻害剤の回復能を *in vitro* で検討した（[REGN2810-MX-14082]）。hCD20 を導入した HEK293 細胞の存在下において及びその後の hCD20 及び PD-L1 を導入した HEK293 細胞とのインキュベーションにおいて、セミプリマブ並びに抗 PD-1 対照抗体 REGN1672 及び REGN2626 は、抗 CD3×CD20 二重特異性抗体（REGN1979）により活性化されたヒト初代培養 $CD4^+$細胞の増殖を濃度依存的に促進した。本試験において、PD-1 の阻害では、最初に REGN1979 及び hCD20 のみを導入した HEK293 細胞で刺激したときと同程度にしか T 細胞増殖が回復しなかった。

アゴニストにより誘導される IL-2 及び IFNγ の放出は、CD28 共刺激受容体経路によるサイトカインストーム誘導の有無を予測する信頼できる因子であることが示されている(12)。セミプリマブがスーパーアゴニスト活性を有するか否かを評価する *in vitro* アッセイを構築した（[REGN2810-MX-14082]）。本アッセイは、過去に確立され、スーパーアゴニストである抗 CD28 抗体（TGN1412）及び抗 CD3 抗体（Biolegend OKT3 クローン）（いずれもセミプリマブの評価に使用した実験条件下で強いサイトカイン放出を誘導する）により誘導されるサイトカイン放出の測定に有効であることが立証された(12)条件下で実施した。本アッセイにおいて、セミプリマブはヒトドナーから採取したヒト末梢血単核細胞（PBMC）からの IL-2 及び IFNγ の放出を刺激しなかった。更に、セミプリマブの非常に高い濃度（10 μg/mL）のみで認められた TNFα の放出を除くと、サイトカイン（IL-12p70、IL-4、IL-10 及び IL-13）産生の亢進は認められなかった。

セミプリマブによる無制御な免疫応答の誘導の有無を評価する更なる *in vitro* 試験を実施した。抗 CD28 アゴニスト抗体でヒト初代培養 T 細胞を活性化するアッセイにおいて、セミプリマブ＋抗 CD3 抗体でコートしたエポキシビーズでは、hIgG4 アイソタイプ対照抗体＋抗 CD3 抗体でコートしたビーズ（増殖を促進した）と比較して T 細胞の増殖（^{3}[H]-チミジン取込みにより測定）が抑制された。陰性対照ビーズ（hIgG4 アイソタイプ対照抗体のみでコート）は本試験系における T 細胞の増殖に対して作用を示さなかった。セミプリマブは本試験系における T 細胞の増殖を促進せず、抗 CD28 アゴニスト抗体の有無による影響は認められなかった。

ヒト初代培養 $CD8^+$ T 細胞に対する FcγR1 を介したセミプリマブの架橋による増殖への作用の有無を、抗 CD3 抗体又は抗 CD3 抗体＋FcγR1 を導入した HEK293 細胞の存在下で検討した。本アッセイにおいて、遺伝子導入により細胞表面結合型抗 CD3 抗体のみを発現させた HEK293 細胞及び抗 CD3 抗体+ FcγR1 を発現させた HEK293 細胞のいずれも T 細胞の低度の増殖を誘導し、いずれの細胞の作

用も抗 CD28 スーパーアゴニスト抗体により大幅に促進された。本試験系において、抗 CD3 抗体の細胞表面への結合により、その FcγR1 への結合は生じないため、PD-1 の FcγR1 への結合によるいかなる障害も予防された。一方、これらの試験系において、抗 CD28 スーパーアゴニスト抗体の代わりにセミプリマブを使用したとき、T 細胞増殖の誘導及び促進は認められなかった。これらの所見により、セミプリマブは抗 CD3 抗体を介した $CD8^+$ T 細胞活性化を促進する共刺激シグナルを誘導しないとの結論が更に裏付けられた。

In vitro の細胞を用いた抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）アッセイにおいて、セミプリマブに関連する検出可能な Fc エフェクター機能活性は認められず、セミプリマブは 250 及び 500 nmol/L までの濃度でそれぞれ ADCC 及び CDC を媒介しなかった。また、セミプリマブは補体 C1q タンパク質に測定可能な結合を示さず、その作用は可溶性の遺伝子組換えヒト PD-1 の存在に影響されなかった。これらの *in vitro* データを総合すると、セミプリマブの主な薬理作用発現機序が受容体 PD-1 への結合及びそれによる PD-L1 を介した受容体シグナル伝達の阻害であることが裏付けられた。

PD-1 ヒト化（$PD\text{-}1^{hum/hum}$）マウスにおいて、セミプリマブ及び 2 つの抗 PD-1 対照抗体のいずれも同系結腸直腸腫瘍（MC38.Ova）の増殖を有意かつ強力に阻害した。腫瘍担癌マウスにセミプリマブを 2.5～10 mg/kg の用量範囲で腹腔内（IP）投与したとき、アイソタイプ対照抗体と比較して、用量に関連した統計学的に有意な腫瘍増殖の阻害が認められた。これらの作用（腫瘍容積の減少～完全な腫瘍退縮）は抗 PD-1 対照抗体の REGN1672 及び REGN2626 でも認められた。

2.2 安全性薬理試験

安全性薬理評価項目は、サルを用いた反復投与毒性試験に組み込み、これらの試験ではセミプリマブを 2～50 mg/kg/週の用量範囲で 30 分間の点滴静注により最長 26 週間投与し、最長 12 週間の回復期間を設けた（Module 2.6.6 毒性試験の概要文）。

心電図（ECG）及び血圧、呼吸数並びに CNS 機能に、セミプリマブに関連する変化は認められなかった。実施した毒性試験において、心血管系、呼吸系及び CNS の障害を示す機能的及び解剖学的エビデンスは認められなかった。

2.2.1 中枢神経系

サルを用いたセミプリマブの反復投与毒性試験において、被験物質に関連する CNS 関連の一般状態観察の変化及び体温の変化は認められなかった（Module 2.6.6 毒性試験の概要文）。これらの試験では生死及び瀕死状態の有無を 1 日 2 回以上観察した。一般状態の観察を投与期間に 1 日 1 回以上、詳細な身体検査を週 1 回以上行った。

2.2.2 心血管系

サルを用いたいずれの反復投与毒性試験においても、セミプリマブに関連する心拍数、血圧及び QTc 間隔延長を示唆する ECG パラメータの変化は認められなかった（Module 2.6.6 毒性試験の概要

文）。4 週間試験において、血圧及び心拍数を、投与開始前並びに 4 及び 12 週目に 1 回ずつ測定した。改変 II 誘導を用いた ECG 検査を、試験前、22 日目及び 12 週目に 1 回行った。26 週間試験では、血圧及び心拍数を、投与前期間に 2 回、92 日目、並びに投与及び回復期間終了時剖検前 1 週間以内に測定した。改変 II 誘導を用いた ECG 検査を、24 時間の投与前期間に 1 回、投与開始 3 時間前、85 及び 162 日目の投与約 24 時間後並びに回復期間中の剖検前 1 週間以内に行った。

2.2.3 呼吸系

サルを用いた反復投与毒性試験において、被験物質に関連する呼吸関連の一般状態の変化は認められなかった（Module 2.6.6 毒性試験の概要文）。評価は2.2.1項に記載の一般状態観察と同時に行った。

3　薬物動態試験

非臨床 PK 試験の目的は、カニクイザルにセミプリマブを投与したときの *in vivo* での PK について、治療用量及び毒性量の両方で検討するとともに、ADA 発現率及びこれに伴うセミプリマブの消失速度に対する影響を評価することであった（2.6.4 薬物動態試験の概要文）。

非臨床試験で使用したセミプリマブ製剤とヒト初回投与（FIH）試験（REGN2810-ONC-1423）用の臨床試験用製剤で組成は類似しており、10 mmol/L ヒスチジン、10%（w/v）精製白糖（[REGN2810-PK-14065]試験及び[REGN2810-TX-14059]試験では 5%（w/v）精製白糖）及び 0.1%（w/v）ポリソルベート 80 を含有し、pH 6.0 に調整したセミプリマブ水性緩衝液であった。

サル血清中のセミプリマブ濃度は、バリデートされた ELISA を用いて測定した。なお、この方法の未希釈サル血清中での定量下限（LLOQ）は 78 ng/mL であった。内因性の標的である PD-1 は、膜結合型受容体である。ヒト血液中に可溶性 PD-1 が検出されるが、その血清中濃度は非常に低い（0.038～100 ng/mL）と報告されている(13)(14)。そのため、非結合型又は部分結合型のいずれか、つまり PD-1 との結合部位のうち 1 つ以上が占有されていない結合能を有した形（機能性セミプリマブ）で存在すると推定される。したがって ELISA を用いた本分析法の標的捕捉様式では、血中の全てのセミプリマブを検出可能と考えられる。サル血清中の ADA は、バリデートされた非定量的ブリッジングイムノアッセイ法を用いて検出した。この分析法の感度は、薬物非存在下、未希釈サル血清中で約 1.3 ng/mL であった。未希釈サル血清において、陽性対照（500 ng/mL）試料のシグナルがプレートカットポイント値にまで低下する薬物濃度を表す drug tolerance limit（DTL）は約 1284 µg/mL であった。

3.1　サルを用いたセミプリマブの薬物動態及びトキシコキネティクス試験

雌カニクイザルに用量 1～15 mg/kg のセミプリマブを単回 IV 又は SC 投与したときの PK を評価した（3.1項）。血清中濃度－時間推移は、短い分布相（IV 投与後）又は吸収相（SC 投与後）と、これに続く線形消失相（β 相）及び最終消失相によって特徴づけられる。ADA 陽性による影響が小さかった少数動物で得られた PK プロファイルに基づくと、血清中セミプリマブ濃度が約 5 未満～20 µg/mL であった用量 5 mg/kg 以下の単回 IV 投与時には、非線形性の標的分子を介した消失（TMC）が顕著であった。しかし、この試験で高い ADA 陽性率が認められたことから、これら少数動物での消失過程における ADA の関与を無視できない。用量 15 mg/kg では、8 週間の試料採取期間終了時の濃度が標的分子を介した経路を飽和させるのに十分高い濃度に維持されていたことから、線形性の動態が認められた。SC 投与後のセミプリマブのバイオアベイラビリティは 86.5%と推定された。用量 1～15 mg/kg のセミプリマブを単回 IV 投与した全てのサル（100%）及び用量 1～15 mg/kg のセミプリマブを単回 SC 投与した大部分のサル（93%）で、投与後 28 日までに ADA 反応が認めら

れた。ADA の存在に関連して、ADA 陰性動物に比べて、セミプリマブ濃度が低下したことから、ADA を介したセミプリマブ消失の促進が示唆された。

雌雄のカニクイザルを用いて実施した毒性試験の一部として、用量 2～50 mg/kg/週のセミプリマブを週 1 回、4～26 週間投与した後、最長 12 週間の回復期間を設けて、セミプリマブの血清中 TK プロファイルを評価した。

週 1 回反復 IV 投与後、2 mg/kg/週投与群の 45%の動物、並びに 10 及び 50 mg/kg/週投与群のそれぞれ 65%及び 79%の動物で投与期間を通して持続的な曝露が認められた。曝露が持続的ではなかった例のほとんどは、ADA を介したセミプリマブ消失の促進によるものであった。8～12 週間の回復期間を通して、用量 10 mg/kg/週以上のセミプリマブ投与群の 63%以上の動物で血清中セミプリマブ濃度が検出可能であった。

投与期間中、血清中セミプリマブ濃度が用量に比例して上昇したことから、標的分子を介した経路が飽和することが示された。回復期間中、用量 10 mg/kg/週以上で線形動態が認められたが、2 mg/kg/週投与後には、TMC が顕著であった。用量 10 mg/kg/週以上のセミプリマブを 4～6 ヵ月間投与したとき、蓄積が認められ、蓄積比は 2.3～3.9 であった。週 1 回投与したとき、約 8 回目投与後に定常状態に達した。

これらの試験のいずれにおいても、セミプリマブの曝露量（TK プロファイル）及び免疫原性に性差は認められなかった。

全ての試験を通して、全用量群で免疫原性は中等度～高度（33～100%）であり、ADA の発現率と用量の間に逆相関関係が認められた（2 mg/kg/週で 92%以上、10 及び 50 mg/kg/週以上でそれぞれ、70%以下及び 60%以下）。

4 毒性試験

In vitro 薬理試験により、セミプリマブはカニクイザルの受容体 PD-1 にヒトの受容体 PD-1 と同程度の親和性で結合することが示されたことから、臨床試験開始前にカニクイザルを用いてセミプリマブの毒性プロファイルを検討することが支持された。セミプリマブはマウス及びラットの PD-1 に結合しなかったため、これらの動物種はいずれも毒性試験に使用できなかった（Module 2.6.6 毒性試験の概要文）。

セミプリマブについて、カニクイザルを用いた週 1 回 IV 投与による最長 6 ヵ月間の毒性試験を実施した。これらの試験では TK プロファイル、ADA 反応並びに免疫毒性及び受胎能のパラメータを検討するとともに、安全性薬理パラメータ（心血管系、CNS 及び呼吸系）も評価した。また、ビオチン標識セミプリマブを用いて、正常なヒト及びカニクイザルの組織における *in vitro* 組織交差反応性試験を実施した。全ての試験は GLP に従って実施した。非臨床安全性評価に使用した毒性試験の一覧を表 2に示す。

表 2 - セミプリマブ毒性試験プログラムの概要

試験の種類及び期間（GLP適用の有無）	用量[a]（mg/kg/週）	投与経路	投与頻度	動物種	試験番号
反復投与毒性試験					
4週間反復IV投与毒性及びTK試験並びに8週間回復性試験（GLP適用）	0、2、10、**50**	IV（30分間）	週1回、連続4週間	カニクイザル	REGN2810-TX-14059
26週間反復IV投与毒性及びTK試験並びに12週間回復性試験（GLP適用）	0、2、10、**50**	IV（30分間）	週1回、連続26週間	カニクイザル	REGN2810-TX-14153
生殖発生毒性試験					
13週間IV投与受胎能評価及びTK試験並びに12週間回復性試験（GLP適用）	0、10、**50**	IV（30分間）	週1回、連続13週間	カニクイザル	REGN2810-TX-15151
その他の毒性試験					
正常なヒト及びサルの組織を用いた*ex vivo*組織交差反応性試験（GLP適用）	N/A	*Ex vivo*	N/A	ヒト及びカニクイザルの組織	REGN2810-TX-14073

略号：GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；TK = トキシコキネティクス；N/A = 該当せず；NOAEL = 無毒性量

a 太字は NOAEL を示す。

4.1　反復投与毒性試験

セミプリマブの毒性プロファイルを評価するため、雌雄のカニクイザルに 2～50 mg/kg の用量で週 1 回、最長 26 週間反復 IV 投与し、最終投与後に最長 12 週間の回復期間をおいた（Module 2.6.6 毒性試験の概要文）。

全ての毒性試験において、セミプリマブの血清中濃度が、10 mg/kg/週以上の群の大半の動物で投与期間を通して検出され、これらの動物では最長 12 週間の回復期間を通して曝露量が維持された（Module 2.6.4 薬物動態試験の概要文）。ADA 反応の発現頻度にはセミプリマブの用量との逆相関がみられ、その結果、特に 2 mg/kg/週群でセミプリマブの消失が加速されたが、いずれの場合も毒性試験結果の解釈が不明確になることはなかった。週 1 回 IV 投与後のセミプリマブの体内動態の特徴は、用量に比例した曝露量及び 10 mg/kg/週以上の用量での線形動態であった。

いずれの毒性試験においても、50 mg/kg/週までの用量で、セミプリマブの薬理作用に直接起因する毒性変化は認められなかった。26 週間反復投与毒性試験では、ADA 形成に一致する一般状態の変化（免疫複合体沈着及び関連する組織損傷）による途中死亡が、10 及び 50 mg/kg/週群の各 1 例にみられ、死因はいずれも肺出血及び肺水腫であった。この場合、ADA の発現は異種ヒトタンパク質のサルへの投与によるものであり、必ずしもセミプリマブに対するヒトの反応を予測するものではない。

26 週間反復投与毒性試験では、ADA 形成及びそれに続く免疫複合体沈着に起因する 2 例の途中死亡を除いて、体重、摂餌量、眼科学的検査、QTc 間隔延長を示唆する心血管系評価項目、血圧、ECG パラメータ、心拍数、体温、呼吸数及びヘモグロビン飽和度、神経学的検査、受胎能並びに臨床検査パラメータにおけるセミプリマブ関連の変化は認められなかった。いずれの毒性試験においても、セミプリマブに起因する心血管系、呼吸系並びに CNS 障害の機能的及び解剖学的エビデンスは認められなかった。

その目的とする薬理作用に一致して、セミプリマブへの曝露により、増殖中の細胞傷害性 T 細胞及びヘルパーT 細胞の頻度及び絶対数が、非用量依存的かつ可逆的に増加した。また、4 週間反復投与毒性試験において、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）抗原に対する二次免疫応答の増強がみられたことから、セミプリマブ投与による抗 KLH 抗体反応の低下はないことが示された。26 週間反復投与毒性試験において、セミプリマブに関連した T リンパ球、細胞傷害性 T リンパ球、ヘルパーT リンパ球、単球、B リンパ球及び NK 細胞集団の変化は認められなかった。剖検時にセミプリマブに起因する肉眼所見はみられず、セミプリマブの IV 投与による注射部位反応も認められなかった。

セミプリマブを週 1 回、最長 26 週間反復投与したときの無毒性量（NOAEL）は、最高投与量の 50 mg/kg/週と判断された。セミプリマブの各試験における NOAEL での全身曝露量を表 3に示す。

4.2　生殖発生毒性試験

PD-1/PD-L1 シグナル伝達経路は免疫寛容により妊娠の維持において役割を果たし、過去の試験において、受容体 PD-1 阻害の結果として妊娠の早期終了が生じることが示されている。そのため、催奇形性はないことから、セミプリマブの正式な生殖発生毒性試験を実施しても、セミプリマブのヒト

におけるリスク評価の助けとなる追加の有用な情報が得られる可能性は低いと考えられたことから、実施しなかった(15)。

受胎能への影響の有無を評価するため、性成熟した雌雄のカニクイザル（約 5〜7 歳）に、セミプリマブを 10 及び 50 mg/kg の用量で週 1 回、13 週間、IV 投与（30 分間）し、その後 12 週間の回復期間をおいた（Module 2.6.6 毒性試験の概要文）。10 及び 50 mg/kg/週群のそれぞれ 12 例中 7 例及び 12 例中 10 例で、セミプリマブへの持続的な曝露が、投与期間を通して維持された（Module 2.6.4 薬物動態試験の概要文）。回復期間中、10 及び 50 mg/kg/週群のそれぞれ 4 例中 2 例及び 4 例中 3 例で、セミプリマブの血清中濃度が検出された。セミプリマブの体内動態は線形で、曝露量（C_{max} 及び AUC）は用量比例的であり、いずれの用量においても、定常状態に到達した 8 回の週 1 回投与後に、約 3.3 倍の蓄積が認められた。ADA 形成の発現頻度は雄の方が高く、セミプリマブの用量と逆相関しており、ほとんどの場合にセミプリマブの消失を加速させた。

雌雄の生殖組織の病理組織学的所見及び受胎能パラメータには、セミプリマブ関連の変化は認められなかった。

雄では、いずれの投与群においても、投与期間中及び回復期間中の平均総精子数、精子密度、精子運動能、精子形態及び精巣測定値に、セミプリマブ関連の変化は認められなかった。全ての雄における精巣の特徴として、精子形成周期段階の正常な進行、精細管における正常な細胞会合及び予想（主観的）される正常な精子形成の種々の段階の比率が認められた。

雌では、投与期間中及び回復期間中における月経周期の回数及び平均持続時間にセミプリマブ関連の差はみられず、全ての雌で卵巣及び月経周期の正常な形態学的特徴が認められた。

毒性変化がみられなかったことから、本試験での受胎能に関する NOAEL は、雌雄ともに最高投与量の 50 mg/kg/週と判断された。

4.3　セミプリマブの曝露量及び ADA 形成

セミプリマブの同程度の用量での投与を受けた ADA 陰性のサルと比較して、ADA 検査が陽性であった動物の大半では、血清中セミプリマブ濃度低下が認められたことから、ADA を介したセミプリマブ消失の加速が示唆された。セミプリマブはヒト抗体であるため、サルへのセミプリマブ投与後に ADA が認められたことは予想外ではない。サルで認められたこの免疫原性が、ヒトにおける免疫原性を予測するものではないことに留意すべきである。これらの動物における ADA の発現は、セミプリマブの薬物動態試験及び安全性試験の解釈を不明確にするものではなかった。

バリデートされた非定量的な電気化学発光に基づくブリッジングイムノアッセイにより、サル血清中のセミプリマブに対する ADA が検出された。免疫原性は全ての試験を通して中等度から高度であり、ADA の発現頻度及び反応の強度はセミプリマブの用量と逆相関していた。陽性の ADA 反応に伴って、ほとんど常に同じ用量群の ADA 陰性動物と比較した血清中セミプリマブ濃度低下が認められた。

セミプリマブの単回投与 PK 試験では、セミプリマブの 1 又は 15 mg/kg の用量での単回 IV 投与を受けたサルの全例で ADA 反応が発現し、同程度の用量での SC 投与後には、セミプリマブに曝露された動物の 93%で ADA が認められた。

4、13 及び 26 週間の毒性試験において週 1 回反復 IV 投与したときの ADA の発現頻度には、投与群間及び試験間で大きなばらつきが認められた。全ての試験を通して、2 mg/kg 群における ADA の発現頻度は 92%以上であり、10 及び 50 mg/kg 群ではそれぞれ 70%以下及び 60%以下に低下した。3 試験のいずれにおいても、10 mg/kg 以上の群の大半の動物で、投与期間中の全ての検体採取時に検出可能なセミプリマブの血清中濃度が認められた。全体として、ADA の発現頻度に性差は認められなかった。

4.4　その他の毒性試験

ビオチン標識セミプリマブ（REGN2810-Bio）及び 1 動物種当たり 3 例のドナーから採取した 36 種類の異なる正常なヒト及びカニクイザルの組織パネルを用いて、*ex vivo* 組織交差反応性試験を実施した（Module 2.6.6 毒性試験の概要文）。REGN2810-Bio を組織凍結切片に適用し、ビオチン標識抗ヒト IgG4 二次抗体を用いた免疫組織化学染色により結合を検出した。

本試験で REGN2810-Bio により染色された全ての組織は予想された標的－抗原反応性を反映しており、予想外の染色は認められなかった。組織染色パターンはヒトとカニクイザルで類似しており、違いがあったとしても軽度で、恐らく切片のばらつき、ドナーの年齢差若しくは疾患状態、染色過程又は未特定の違いによるものであった。

リンパ球における既知の PD-1 発現に基づいて予想されたとおり、REGN2810-Bio による染色が、ヒト及びカニクイザルの組織パネルを通して、単核白血球の膜又は細胞質に認められた。REGN2810-Bio による染色は、ヒト及びサルの脳（小脳、大脳）、眼、脊髄及び下垂体における膠細胞の細胞質／細胞質突起にもみられたが、セミプリマブのようなモノクローナル抗体は *in vivo* で細胞質にアクセスできないため、この細胞質染色には毒性学的意義はないと考えられる。

全ての試験において、陽性対照検体は、REGN2810-Bio のいずれの濃度とともにインキュベートした場合にも、中等度から顕著な染色強度を示した。遺伝子組換え hPD-1 と共有結合させたセファロースクロマトグラフィービーズ又はマウス Fc モノマーと融合させたサルエクトドメインを陽性対照検体とした。いかなる試験においても REGN2810-Bio のいずれの濃度でも染色がみられなかった陰性対照検体は、遺伝子組換えヒト DLL4.hFc に共有結合させたセファロースビーズであった。

セミプリマブについてがん原性試験及び遺伝毒性試験は実施しなかった。このことは、進行悪性腫瘍の患者を対象とした本薬の使用に一致している（ICH S9, 2009 (2)）。

IV 投与による局所刺激性を、サルを用いた反復投与毒性試験の一環として評価し、SC 投与による刺激性を単回投与 PK 試験で評価した。IV 及び SC 投与のいずれにおいても、注射部位に観察された軽微な局所所見は、偶発的又は処置関連であり、セミプリマブへの曝露の直接的な結果ではないと考えられた。

カニクイザルの CNS にはセミプリマブ関連の変化のエビデンスはみられず、動物を用いた毒性試験及び薬理試験においてセミプリマブの依存性及び乱用性を示唆するその他のエビデンスは認められなかったことから、DALA に特化した試験は実施しなかった。更に、物理化学的特性（高分子量及び親水性）により血液脳関門の通過が容易でないこと及び活性代謝物を形成する可能性が低いことに加えて、セミプリマブが乱用性に関連する CNS 受容体及びトランスポーター（オピエート、ドパミン作動性、ノルアドレナリン作動性、セロトニン作動性、NMDA 作動性、シグマ、GABA 作動性等）に結合するとのエビデンスはない。

5　総括及び結論

免疫チェックポイントの阻害による抗腫瘍免疫の活性化が、種々のがんに対する最も有望な治療法の 1 つと考えられている(16)。免疫チェックポイントは、正常な組織の障害を最小限にするために自己免疫寛容を維持し、免疫応答を調節するのに極めて重要かつ多様な抑制経路で構成される。PD-1 は、活性化 T 細胞が発現するそのような免疫チェックポイント受容体の 1 つであり、感染への応答時に自己免疫及び末梢組織の T 細胞活性を制限する働きを有する。重要なこととして、PD-1 は、主要な PD-1 リガンドである PD-L1 を発現している腫瘍の主な免疫耐性メカニズムを構成することが明らかになっている。これらの症例で、PD-1 を mAb により阻害すると、持続的な腫瘍退縮が誘導され、持続的な奏効が認められる場合もある。

セミプリマブは PD-1 に結合する強力な完全ヒト mAb であり、ヘルパーT 細胞及び細胞傷害性 T 細胞における PD-L1 を介した抑制シグナル伝達を阻害することにより抗腫瘍免疫応答を回復させる。セミプリマブを様々な非臨床試験でセミプリマブの広範な評価を行ったところ、*in vitro* で T 細胞の免疫応答性に対する回復能が確認され、*in vivo* の PD-1 ヒト化マウスを用いた同系腫瘍モデルにおいて抗腫瘍効果が確認された。カニクイザルを用いた更なる試験でセミプリマブの薬物動態及び毒性プロファイルが特徴づけられた。

セミプリマブはカニクイザル及びヒトの単量体 PD-1 に結合し（K_D 値はそれぞれ 7.61 及び 5.61 nmol/L）、これらの動物種の二量体 PD-1 にも結合した（K_D 値はそれぞれ 499 及び 577 pmol/L）。ELISA 阻害アッセイにおいて、セミプリマブはヒト PD-L1 に対するサル及びヒト PD-1 の結合を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 0.97 及び 0.60 nmol/L であった。セミプリマブはマウス及びラットの PD-1 には結合しなかった。

In vitro のヒト初代培養 $CD4^+$ T 細胞及び複数の遺伝子組換え細胞株において、セミプリマブは PD-L1 誘導性 T 細胞抑制シグナル伝達を強力かつ濃度依存的に阻害し、T 細胞活性化を回復させた。これらのアッセイにおいて、セミプリマブ及び 2 つの抗 PD-1 対照抗体のいずれも免疫抑制（PD-1 アゴニスト）活性を示さなかった。

セミプリマブは、免疫刺激活性を示すことなく、遺伝子組換え PD-L1 発現 HEK293 細胞により抑制された T 細胞の増殖を回復させた。セミプリマブは、単独及び抗 CD28 抗体の存在下で、ヒト初代培養 $CD4^+$ T 細胞の非特異的な活性化を誘導せず、抗 CD3 抗体を介した T 細胞の増殖を抑制した。

セミプリマブは、複数の *in vitro* アッセイにおいて内因性免疫刺激活性を示さず、ヒト初代培養 T 細胞増殖誘導能も示さなかった。抗 CD28 スーパーアゴニスト抗体によるサイトカインストーム誘導能を評価するために過去に確立された条件下で *in vitro* アッセイを実施したところ、セミプリマブはヒト PBMC の刺激による IL-2 及び IFNγ の放出（サイトカインストーム誘導の有無を予測する有用な因子であることが過去に示されている）を誘導しなかった。

ADCC 及び CDC の有無を評価するようデザインされた *in vitro* アッセイにおいて、セミプリマブは Fc エフェクター機能活性を誘導しなかった。更に、セミプリマブは補体 C1q タンパク質に結合せず、その作用は可溶性ヒト PD-1 タンパク質の存在に影響されなかった。これらのデータからセミプリマブの主な作用機序が受容体 PD-1 における PD-L1 結合の阻害であることが裏付けられた。

内因性マウス遺伝子産物の代わりにヒト PD-1 の細胞外ドメインとマウス PD-1 の膜貫通及び細胞内部分とを融合して発現させた PD-1 ヒト化（PD-1$^{hum/hum}$）マウスにおいて、セミプリマブは同系腫瘍増殖を効果的に阻害した。

雌カニクイザルにセミプリマブを投与したときの PK の特徴として非線形性動態を示し、クリアランス及び半減期は用量に依存し、二相性の消失推移を示した。ADA 陽性による影響が小さかった少数動物で得られた PK プロファイルに基づくと、血清中セミプリマブ濃度が約 5 未満～20 μg/mL であった用量 5 mg/kg 以下の単回 IV 投与時には、TMC が顕著であった。しかし、この試験で高い ADA 陽性率が認められたことから、これら少数動物での消失過程における ADA の関与を無視できない。SC 投与後のセミプリマブのバイオアベイラビリティは 86.5%であり、β 相での消失半減期は約 10～16 日であった。

サルを用いて 50 mg/kg までの用量での週 1 回 IV 投与を最長 26 週間実施し、最長 12 週間の回復期間をおいた反復投与毒性試験において、セミプリマブの薬理作用に直接起因する毒性変化は認められなかった。26 週間反復投与毒性試験で発現した 2 例の途中死亡は、ADA 形成及びそれに続く免疫複合体形成に起因するものであった。いずれの毒性試験においても、心血管系、呼吸系及び CNS 障害の機能的及び解剖学的エビデンスはみられず、注射部位反応も認められなかった。セミプリマブを週 1 回、最長 26 週間反復 IV 投与したときの NOAEL は、最高投与量の 50 mg/kg/週と判断された。

性成熟したカニクイザルを用いて実施した 13 週間受胎能評価毒性試験では、雌雄の生殖組織にセミプリマブ関連の病理組織学的所見はみられず、雌雄のいずれにおいても受胎能パラメータにセミプリマブ曝露の影響は認められなかった。本試験の受胎能に関する NOAEL は、雌雄のいずれにおいても最高投与量の 50 mg/kg/週と判断された。

先に実施した毒性試験における 10 mg/kg/週以上の用量でのセミプリマブの C_{trough} 値は、セミプリマブ初回投与から少なくとも最終投与 8 週間後まで TMC を飽和するのに必要な濃度（20 μg/mL 超）を大幅に上回っていたことから、投与期間全体及び回復期間の大部分を通した PD-1 標的の飽和が示唆された。

毒性試験において、セミプリマブへの曝露は、サルの免疫系に有害な影響を及ぼさなかった。その目的とする薬理作用に一致して、セミプリマブは増殖中の細胞傷害性 T 細胞及びヘルパーT 細胞の頻度及び絶対数の非用量依存的かつ可逆的な増加を誘導し、KLH 抗原に対する二次免疫応答を増強した。T リンパ球、細胞傷害性 T リンパ球、ヘルパーT リンパ球、単球、B リンパ球及び NK 細胞集団には、セミプリマブ関連の変化は認められなかった。

PK 試験及び 3 つの異なる毒性試験のいずれにおいても、セミプリマブへの曝露による ADA の発現頻度は中等度ないし高く、毒性試験では用量との逆相関が認められた。陽性 ADA 反応は、ほとんど常に、同じ用量の ADA 陰性動物と比較して、セミプリマブ消失を増加させ、血清中薬物濃度を低

下させた。しかし、高用量で到達した曝露量では、ADA の存在による薬物動態プロファイルの評価及び PD-1 阻害作用の安全性評価への悪影響は認められなかった。サルで観察された免疫原性は、必ずしもヒトにおける免疫原性を予測するものではない。

正常なヒト及びカニクイザルの組織を用いたセミプリマブの *ex vivo* 組織交差反応性試験では、いずれの動物種においても同様の染色パターンが得られ、正常組織における既知の PD-1 発現に基づいて予想される組織－抗原反応性を反映していた。

セミプリマブの FIH 試験（R2810-ONC-1423）が、皮膚有棘細胞癌（CSCC）を含む複数の種類の腫瘍を有する患者を対象として、1～10 mg/kg の用量又はフラット用量での 2 週に 1 回（Q2W）IV 投与により実施された。患者にセミプリマブを単剤投与又は放射線若しくは化学療法との併用で投与した。本試験におけるセミプリマブの忍容性は概して良好で、用量制限毒性（DLT）は特定されなかった。腫瘍縮小効果の予備的評価に基づくと、CSCC 患者を対象とした第 II 相試験（R2810-ONC-1540）における単剤投与での更なる評価のため、3 mg/kg の用量での 2 週ごとの IV 投与が推奨された。

表 3に示したように、第 II 相試験でのシミュレーションによるヒトの曝露量と比較して、NOAEL の 50 mg/kg/週で到達したサルの曝露量は、26 週間反復投与毒性試験では 11.3 倍、13 週間反復投与受胎能試験では 19.7 倍であった。

表 3 - サルで到達した曝露量とヒト曝露量との比較によるセミプリマブ曝露量比

参照毒性試験[a]（カニクイザル）	**サルにおけるセミプリマブのAUC_{tau}[b] (µg•day/mL)**	**シミュレーションによるヒト曝露量と比較したサルでの曝露量比[c]**
26週間反復投与毒性試験（REGN2810-TX-14153）	12,800	11.3
13週間受胎能試験（REGN2810-TX-15151）	22,300	19.7

a セミプリマブをNOAELの50 mg/kgで週1回、30分間かけてIV投与した。

b セミプリマブの最終投与後14日間（336時間）の間隔でのAUC_{tau}を求めた。

c 曝露量比は、サルの毒性試験で求めた AUC_{tau} 値と、ヒトに 3 mg/kg の用量で 2 週ごとに 12 回 IV 投与した最終投与後 14 日間（336 時間）の間隔で推定された定常状態におけるセミプリマブの AUC_{tau} 値である 1130 day*µg/mL との比率を用いて算出した。この用量でのヒト AUC_{tau} 値（ヒトで PD-1 標的を飽和するのに必要な濃度を超えていた）は、セミプリマブを 1～10 mg/kg の用量で 2 週ごとに IV 投与した成人患者の予備的曝露量データからシミュレートした（R2810-ONC-1423-CP-MEMO-01V01）。

以上、最大標的結合を得るのに十分な濃度を大幅に上回るセミプリマブの血清中濃度において、PD-1 阻害に関連したいかなる安全性上の懸念も認められなかった。セミプリマブについて実施した非臨床試験からのデータにより、臨床試験プログラムの実施は支持され、更にセミプリマブの販売承認申請も支持される。全ての試験は適切な ICH ガイダンス及び国際的ガイダンスに従って実施した。

6　参考文献一覧

1. ICH S6(R1) バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価, 2012
2. ICH S9 抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン, 2010
3. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol. 2008;8:467-77.
4. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. Front Immunol. 2016;7:1-13.
5. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. Science. 2017;355:1428-33.
6. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. Nature Immunol. 2013;14:1212-8.
7. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. J Clin Oncol. 2014;32:1020-30.
8. Lesokhin AM, Callahan, MK, Postow MA, Wolchok JD. On being less tolerant: Enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. Sci Transl Med. 2015;7: 1-12.
9. Macdonald LE, Karow M, Stevens S, Auerbach W, Poueymirou WT, Yasenchak J, et al, Precise and in situ genetic humanization of 6Mb of mouse immunoglobulin genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:5147-52.
10. Murphy AJ, Macdonald LE, Stevens S, Karow M, Dore AT, Pobursky K, et al. Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:5153-8.
11. Yang X, Ambrogelly A. Enlarging the repertoire of therapeutic monoclonal antibodies platforms: domesticating half molecule exchange to produce stable IgG4 and IgG1 bispecific antibodies. Curr Opin Biotechnol. 2014;30:225–9.
12. 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;179:3325-31.
13. Kruger S, Legenstein ML, Rösgen V, Haas M, Modest DP, Westphalen CB, et al. Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer. Oncoimmunol. 2017;6:e1310358.

14. Liu C, Jiang J, Gao L, Wang X, Hu X, Wu M, et al. Soluble PD-1 aggravates progression of collagen-induced arthritis through Th1 and Th17 pathways. Arthritis Res Ther. 2015;17:340.
15. Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, Habicht A, Azuma M, Yagita H, et al. A critical role for the programmed death-ligand 1 in fetomaternal tolerance. J Exp Med. 2005;202:231-7.
16. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. Science. 2013;342:1432-3.

7　付録 1：データ欠如の理由

CTDの項	理由
薬理	
4.2.1.3 安全性薬理試験	独立した安全性薬理試験は実施しなかった。心血管系、呼吸系及び中枢神経系の評価はカニクイザルを用いた反復投与毒性試験の一部として実施した。
4.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験	非臨床の薬力学的薬物相互作用試験は、有用なデータが得られないと考えられたため、実施しなかった。
薬物動態	
4.2.2.3 分布	セミプリマブの組織内分布試験は実施していない。それはモノクローナル抗体についてこれらの試験の実施に関する規制上の要求がないからである。[a]
4.2.2.4 代謝	医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインS6 (R1)によると、モノクローナル抗体について一般的な代謝試験は必要ない。その理由として、モノクローナル抗体は分解されて小さなペプチド及び各アミノ酸になると予想され、その代謝経路は全体的に把握されていることが挙げられる。[a]
4.2.2.5 排泄	モノクローナル抗体は排泄により消失しないと予想される。そのため、排泄試験は実施しなかった。[a]
4.2.2.6 薬物動態学的薬物相互作用	本薬及びモノクローナル抗体のADMEプロファイルに基づくと、薬物動態学的薬物相互作用試験は必要ないと考えられたため実施しなかった。
毒性試験	
4.2.3.1 単回投与毒性試験	モノクローナル抗体では急性毒性の所見はまれであるため、最初の毒性試験は反復投与毒性試験とした。急性毒性についての評価は、これらの試験の初回投与後に実施できる。
4.2.3.3 遺伝毒性試験 4.2.3.3.1 *In vitro* 4.2.3.3.2 *In vivo*	モノクローナル抗体が細胞に侵入してDNAに結合することはないと予想される。そのため、遺伝毒性試験は実施しなかった。[a]
4.2.3.4 がん原性試験 4.2.3.4.1 長期試験 4.2.3.4.2 短期試験 4.2.3.4.3 その他の試験	セミプリマブについてがん原性試験は実施しなかったが、このことは進行悪性腫瘍の患者を対象とした本薬の使用に一致している。[b]

CTDの項	理由
4.2.3.5.2 胚・胎児発生に関する試験 4.2.3.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	セミプリマブの作用機序は既知であるため、正式な出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験や胚・胎児発生に関する試験は無益であると考えられたことから実施しなかった。セミプリマブについて性成熟サルを用いた受胎能評価試験を実施した。このことは進行悪性腫瘍患者を対象とした使用前の推奨される安全性評価に一致している。*b*
4.2.3.6 局所刺激性試験	一般的な局所刺激性試験は実施しなかった。局所刺激性の評価は、薬物動態試験及び反復投与毒性試験で投与を受けた動物の点滴静注部位及び皮下注射部位の評価（目視、肉眼病理所見及び病理組織学的所見）により実施した。点滴静注部位及び皮下注射部位のいずれにおいても、セミプリマブ関連の毒性所見は認められなかった。
4.2.3.7.1 抗原性試験 4.2.3.7.3 機序解明試験 4.2.3.7.4 依存性試験 4.2.3.7.5 代謝物の試験 4.2.3.7.6 不純物の試験	これらの試験は実施しなかった。その理由として、試験結果の解釈を助けるためにそのような試験が必要となるような所見は一般毒性試験で認められなかったこと又はセミプリマブがバイオテクノロジー応用医薬品であることが挙げられる。

a ICH S6 (R1), 2012 (1)
b ICH S9, 2010 (2)