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

2.6.1 緒言

Total number of pages: 11

目　　次

2.6.1 緒言 1

目　　次 2

表　目　次 3

図　目　次 4

略号と用語の定義 5

1　　緒言 6

参 考 文 献 11

表　目　次

表 1 - 原薬の名称 6

図　目　次

図 1 -セミプリマブの構造の模式図 7
図 2 - セミプリマブのアミノ酸配列 8

略号と用語の定義

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 cellular cytotoxicity）
CDC	補体依存性細胞傷害（Complement-dependent cytotoxicity）
CDR	相補性決定領域（Complementarity-determining region）
IgG	免疫グロブリンG（Immunoglobulin G）
IV	静脈内（Intravenous）
KLH	キーホールリンペットヘモシアニン（Keyhole limpet hemocyanin）
NK	ナチュラルキラー（Natural killer）
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
PK	薬物動態（Pharmacokinetic）
TMC	標的分子を介した消失（Target-mediated clearance）

1　緒言

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）は Programmed cell death-1（PD-1）に結合し、programmed cell death-ligand 1（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ヒトモノクローナル抗体である。*In vitro* において、T 細胞の免疫応答性に対するセミプリマブの回復能を評価し、*in vivo* において、PD-1 ヒト化マウス同系腫瘍モデルを用いてセミプリマブの抗腫瘍効果を評価した。セミプリマブは子宮頸癌の治療に用いる静脈内（IV）投与製剤である。

原薬の名称を表 1に示す。

表 1 - 原薬の名称

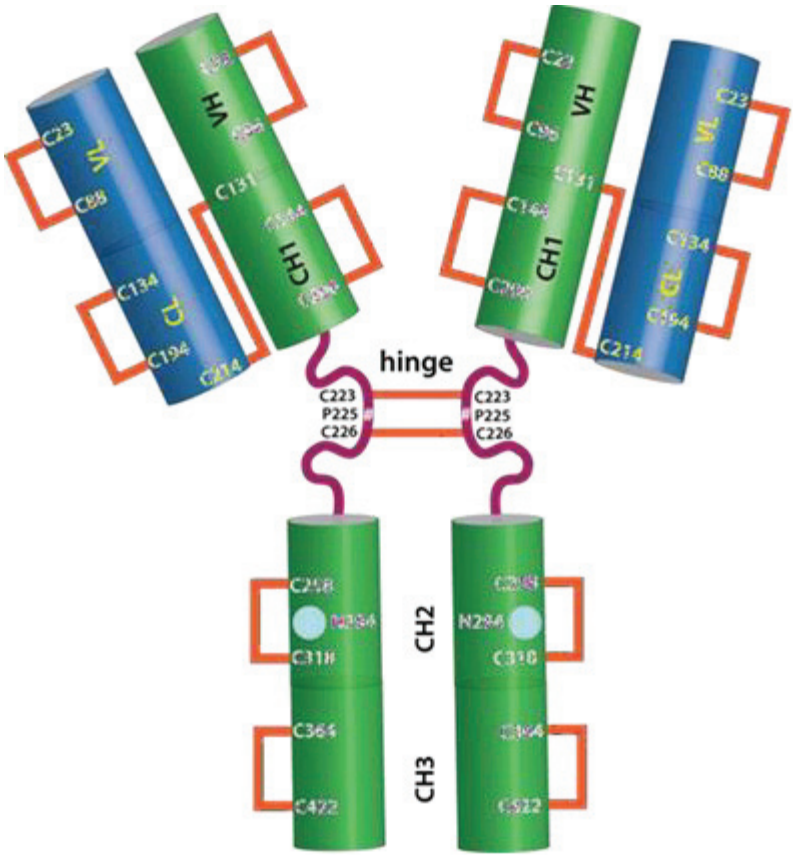
種類	名称
推奨される国際一般名（INN）	cemiplimab
公定名	該当なし
化学名 1. ケミカルアブストラクト索引名 2. USAN 3. WHO	1. Immunoglobulin G4, anti-(human programmed cell death protein 1) (human monoclonal REGN2810 heavy chain), disulfide with human monoclonal REGN2810 κ-chain, dimer 2. Immunoglobulin G4, anti-(human programmed cell death protein 1) (human monoclonal REGN2810 heavy chain), disulfide with human monoclonal REGN2810 κ-chain, dimer 3. Immunoglobulin G4, anti-(human programmed cell death protein 1) (human monoclonal REGN2810 heavy chain), disulfide with human monoclonal REGN2810 κ-chain, dimer
社内又は開発コード	REGN2810
米国一般名（USAN）	cemiplimab
その他の一般名	該当なし
ケミカルアブストラクトサービス（CAS）登録番号	1801342-60-8

セミプリマブ（IgG4 アイソタイプ）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。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、各重鎖の Fc ドメインのヒンジ領域内における 225 番目の

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。各重鎖には Fc 定常領域の CH2 ドメイン内に N 結合型糖鎖付加部位が 1 ヵ所ある（Asn^{294}）。一次配列（N 結合型糖鎖付加なし）に基づくと、16 個のジスルフィド結合の形成及び各重鎖末端からの Lys^{444} の除去を考慮した本抗体の分子量は 143,567.1 Da（化学式：$C_{6380}H_{9808}N_{1688}O_{2000}S_{44}$）である。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。

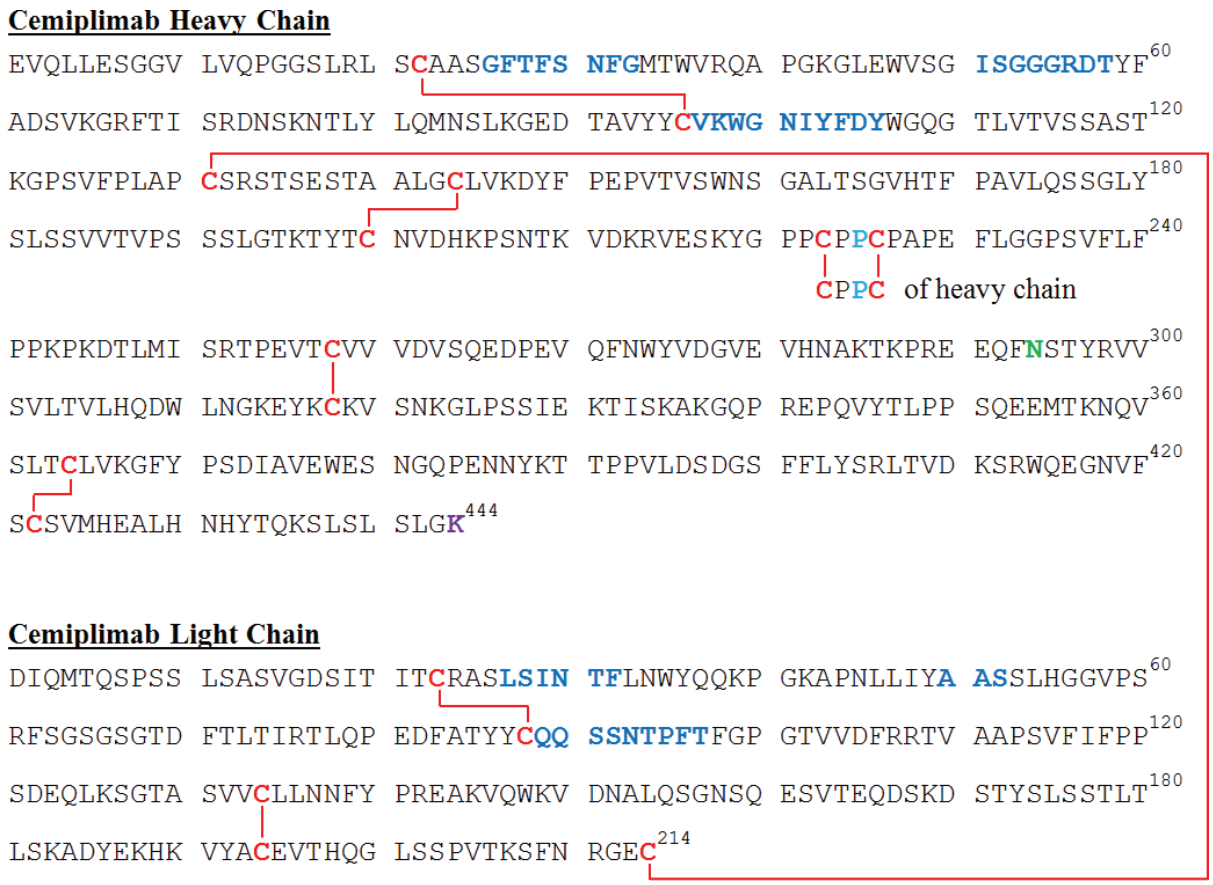
N 結合型糖鎖付加部位及びジスルフィド結合構造の位置を含むセミプリマブの模式図を図 1に示す。セミプリマブのアミノ酸配列を図 2に示す。

図 1 -セミプリマブの構造の模式図



CH = 重鎖定常領域、CL = 軽鎖定常領域、VH = 重鎖可変領域、VL = 軽鎖可変領域
各鎖内及び鎖間ジスルフィド結合（橙色）の位置を示したセミプリマブの構造の模式図。重鎖（緑色）と軽鎖（青色）は鎖間ジスルフィド結合で結合している。重鎖は、ヒンジ領域内にある 2 つの重鎖間ジスルフィド結合により二量体化している。Fc ドメインの糖鎖付加部位も示す（水色）。各重鎖のヒンジ領域における置換（Ser^{225} から Pro^{225}）は、ヒンジ領域の 2 つのジスルフィド結合の間に位置しており、#で示す。

図 2 - セミプリマブのアミノ酸配列



セミプリマブの重鎖及び軽鎖の CDR の配列を青色で示す。予想されるジスルフィド結合を形成することが確認されたシステイン残基（赤色）を赤線で結んでいる。Fc ドメインの Asn^{294} における N 結合型糖鎖付加部位を緑色で示す。重鎖 C 末端 Lys^{444}（紫色）は主にタンパク質発現の過程で除去される。IgG4 分子であるセミプリマブを安定化させるため、重鎖ヒンジ領域内の Ser^{225}（野生型 IgG4）は Pro^{225}（水色の P）に置換されている。この置換により 2 つの重鎖の鎖間ジスルフィド結合が安定化し、ハーフ抗体が生成される可能性が低くなる。

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(1)。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。

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）、カニクイザル及びヒトの二量体 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 に対する一定濃度 2.0 nmol/L のサル PD-1 及び一定濃度 1.5 nmol/L のヒト 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阻害し、T 細胞活性化を回復させた。また、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。これらのアッセイにおいて、セミプリマブ及び評価した 2 つの抗 PD-1 対照抗体（配列がニボルマブ及びペムブロリズマブと同一）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末梢血単核細胞（PBMC）の刺激による IL-2 及び IFNγ の放出を誘導しなかったことから、有害なサイトカイン放出を誘導する可能性は低いことが示された。

抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）の有無を評価する *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作用機序が受容体 PD-1 への結合による PD-L1 活性の阻害であることが裏付けられた。

In vivo では、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（$PD\text{-}1^{hum/hum}$）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。

雌カニクイザルにおけるセミプリマブの薬物動態（PK）プロファイルの特徴は、用量依存的なクリアランス及び半減期並びに二相性の消失プロファイルを有する非線形の動態であった。セミプリマブを 5 mg/kg 以下の用量で単回 IV 投与したとき、約 5 µg/mL 未満～20 µg/mL の血清中セミプリマブ濃度において、標的分子を介した消失（TMC）が認められた。しかし、この試験では抗セミプリマブ抗体（ADA）の発現頻度が高かったため、セミプリマブの消失動態に対する ADA の影響は除外できない。皮下投与時のバイオアベイラビリティは 86.5%であり、IV 投与時の β 相での消失半減期は約 10～16 日の範囲であった。

サルを用いた最長 26 週間の反復投与毒性試験において、50 mg/kg までの用量を週 1 回 IV 投与したとき、セミプリマブの薬理作用に直接起因すると考えられるいかなる毒性変化も認められなかった。いずれの毒性試験においてもセミプリマブに起因すると考えられる心血管系、呼吸系及び中枢神経系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ず、いかなる注射部位反応も認められなかった。その標的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及びヘルパーT 細胞の割合及び絶対数を用量依存的かつ可逆的に増加させ、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を増加させた。T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、ヘルパーT 細胞、単球、B 細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞集団に、セミプリマブに関連する変化は認められなかった。被験物質に関連する毒性変化が認められなかったことに基づき、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、投与した最高用量の 50 mg/kg/週 IV と判断された。

性的に成熟したカニクイザルを用いて 13 週間反復投与毒性試験を実施したところ、雌雄の生殖組織及び受胎能パラメータに、セミプリマブに関連する病理組織学的所見は認められなかった。したがって、この試験での受胎能に関する NOAEL は、雌雄ともに投与した最高用量の 50 mg/kg/週 IV と判断された。

セミプリマブの毒性試験において、セミプリマブの 10 mg/kg/週以上の用量における C_{trough} 値は、TMC が認められないことから明らかなように、初回投与から少なくとも最終投与 8 週後まで、利用可能な PD-1 を飽和させるのに必要な濃度よりも大幅に高かった。

ADA の発現頻度は高かったものの、PD-1 阻害剤の PK プロファイル及び安全性の評価に ADA の存在が影響を及ぼすことはなかった。

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において、両動物種で同様の染色パターンが認められ、正常組織における既知の PD-1 発現から予想される標的ー抗原反応が反映された。

要約すると、セミプリマブは PD-1 に結合する強力なヒトモノクローナル抗体であり、細胞を用いた *in vitro* アッセイで PD-1 シグナル伝達を阻害し、マウス腫瘍モデルで腫瘍増殖を阻害した。本モジュールに示す様々な非臨床薬理、PK 及び毒性試験でセミプリマブの広範な検討を行った。セミプリマブの非臨床試験データから、臨床試験プログラムの実施及びセミプリマブの販売承認申請が支持される。

参 考 文 献

1. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. Science. 2013;342:1432-3.

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

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 46

目　　次

2.6.2 薬理試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 4

図　目　次 5

略号と用語の定義 6

1　　まとめ 9

2　　効力を裏付ける試験 14

2.1　　結合親和性 14

2.2　　*In vitro*薬理 16

2.2.1　　セミプリマブはヒトPD-L1及びPD-L2に対するヒト及びサル二量体PD-1タンパク質の結合を強力に阻害する 16

2.2.2　　第1世代PD-1バイオアッセイにおいてセミプリマブはヒトT細胞株のPD-1/PD-L1を介したシグナル伝達を阻害する 18

2.2.2.1　　第1世代PD-1バイオアッセイにおけるT細胞活性化に対するPD-1/PD-L1シグナル伝達の作用 20

2.2.2.2　　T細胞／APCを用いた第1世代PD-1バイオアッセイにおけるセミプリマブのアンタゴニスト活性 21

2.2.2.3　　T細胞／APCを用いた第1世代PD-1バイオアッセイにおけるPD-L1 発現細胞非存在下でのセミプリマブのアゴニスト活性の評価 22

2.2.2.4　　第2世代PD-1バイオアッセイにおいてセミプリマブはPD-1/PD-L1を介した抑制シグナル伝達を阻害する 24

2.2.2.5　　第2世代PD-1バイオアッセイにおけるセミプリマブのアゴニスト及びアンタゴニスト活性の測定 26

2.2.3 セミプリマブのFcエフェクター機能の評価 27
2.2.3.1 *In vitro*機能アッセイ - ADCC 28
2.2.3.2 *In vitro*機能アッセイ - CDC 28
2.2.3.3 *In vitro*機能アッセイ - CIC C1q 28
2.2.4 ヒト初代培養T細胞活性化バイオアッセイにおけるセミプリマブの評価 29
2.2.4.1 ヒト初代培養CD4+ T細胞バイオアッセイにおいて、セミプリマブはPD-1/PD-L1の抑制シグナル伝達を阻害する 29
2.2.4.2 ヒトPBMCサイトカイン放出アッセイにおけるセミプリマブのスーパーアゴニスト活性の有無の検討 30
2.2.4.3 初代培養CD4+ T細胞イムノビーズアッセイにおけるT細胞活性化に対するセミプリマブコートビーズの作用 32
2.2.4.4 ヒト初代培養CD8+ T細胞／遺伝子組換えAPCバイオアッセイにおけるT細胞活性化に対する可溶性セミプリマブ及びFcγR1で架橋されたセミプリマブの作用 33
2.3 *In vivo*薬理 34
2.3.1 PD-1ヒト化マウスにセミプリマブを5及び10 mg/kgの用量で投与したときの抗腫瘍効果 34
2.3.2 PD-1ヒト化マウスにセミプリマブを2.5及び5 mg/kgの用量で投与したときの抗腫瘍効果 37
3 副次的薬理試験 40
4 安全性薬理試験 41
4.1 中枢神経系 41
4.2 心血管系 41
4.3 呼吸系 41
5 薬力学的薬物相互作用試験 42
6 考察及び結論 43
参 考 文 献 45

表　目　次

表 1 - セミプリマブ、REGN1672及びREGN2626と遺伝子組換えPD-1タンパク質との相互作用における25°Cでの結合動態パラメータの要約 15

表 2 - 第1世代機能的PD-1バイオアッセイで得られた抗PD-1抗体のRLU最大値、RLU最小値及び効力 24

表 3 - セミプリマブは5及び10 mg/kgの用量でPD-1ヒト化マウスにおけるMC38.Ova腫瘍の増殖を阻害する 35

表 4 - セミプリマブは2.5及び5 mg/kgの用量でPD-1ヒト化マウスにおけるMC38.Ova腫瘍の増殖を阻害する 38

図　目　次

図 1 - 受容体PD-1によるT細胞の免疫応答の制御 10

図 2 - ヒト、カニクイザル、マウス及びラットPD-1のアミノ酸配列アラインメント 16

図 3 - セミプリマブはヒトPD-L1及びPD-L2に対するヒト及びサルPD-1の結合を阻害する 17

図 4 - ルシフェラーゼベース第1世代PD-1バイオアッセイの模式図 19

図 5 - 第1世代PD-1バイオアッセイでの二重特異性抗体REGN2281による濃度依存的なT細胞活性化 20

図 6 - 第1世代PD-1バイオアッセイにおいてPD-L1発現細胞存在下でセミプリマブ及び対照抗体はT細胞活性化を回復させる 22

図 7 - 第1世代PD-1バイオアッセイにおいてPD-L1発現細胞非存在下でセミプリマブ及び対照抗体はT細胞活性化を部分的に阻害する 23

図 8 - ルシフェラーゼベース第2世代PD-1バイオアッセイの模式図 25

図 9 - 第2世代PD-1バイオアッセイにおいて、セミプリマブはアゴニスト活性ではなくアンタゴニスト活性を示す 27

図 10 - ヒト初代培養CD4^{+}T細胞／遺伝子組換えAPCバイオアッセイにおいて、抗PD-1抗体はPD-1/PD-L1の抑制シグナル伝達を阻害する 30

図 11 - ヒトPBMCをセミプリマブ、REGN2329（TGN1412）及び抗CD3抗体（OKT3）に曝露したときのサイトカイン放出 31

図 12 - ヒト初代培養CD4^{+} T細胞の抗CD3／抗PD-1イムノビーズアッセイ 32

図 13 - ヒト初代培養CD4^{+} T細胞／イムノビーズバイオアッセイにおけるT細胞の活性化 33

図 14 - セミプリマブは5及び10 mg/kgの用量でPD-1ヒト化マウスにおけるMC38.Ova腫瘍の増殖を阻害する 36

図 15 - セミプリマブは2.5及び5 mg/kgの用量でPD-1ヒト化マウスにおけるMC38.Ova腫瘍の増殖を阻害する 39

略号と用語の定義

略号	定義
ADCC	抗体依存性細胞傷害（Antibody-dependent cellular cytotoxicity）
APC	抗原提示細胞（Antigen-presenting cell）
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 of the classical pathway of complement activation）
CDC	補体依存性細胞傷害（Complement-dependent cytotoxicity）
CIC	循環性免疫複合体（Circulating immune complex）
CNS	中枢神経系（Central nervous system）
CSCC	皮膚有棘細胞癌（Cutaneous squamous cell carcinoma）
CTLA-4	細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4）
ECG	心電図（Electrocardiogram）
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay）
Fcγ	IgG の結晶化可能断片（Fragment crystallizable region of IgG）
h（接頭辞）	ヒト（Human）
HAGG	熱凝集ヒトγグロブリン（Heat-aggregated human gamma globulin）
HEK293	ヒト胎児腎臓細胞株（Human embryonic kidney cell line）
hIgG4^{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］
huPD-1	ヒト化 PD-1（Humanized PD-1）
IC_{50}	50%阻害濃度（Inhibitory concentration at 50% activity）
Ig	免疫グロブリン（Immunoglobulin）
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）

略号	定義
IV	静脈内（Intravenous）
JET	体外ジャケット式テレメトリー（Jacketed external telemetry）
J.RT3-T3.5	Jurkat 白血病細胞株由来変異細胞株（T 細胞抗原受容体の β 鎖欠如）［Cell line is a derivative mutant of the Jurkat leukemia cell line (lacks the beta chain of the T cell antigen receptor)］
Jurkat	ヒト白血病 T 細胞株（Human leukemia T cell line）
k_a	結合速度定数（Association rate constant）
k_d	解離速度定数（Dissociation rate constant）
K_D	平衡解離定数（Equilibrium dissociation constant）
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)］
mFc	マウス Fc（Mouse Fc）
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）
mmH	Myc-myc-ヘキサヒスチジン（Myc-myc-hexahistidine）
mPD-1	マウス PD-1（Mouse PD-1）
PBMC	末梢血単核細胞（Peripheral blood mononuclear cells）
PD-1	Programmed cell death-1
PD-L1	Programmed cell death-ligand 1
PD-L2	Programmed cell death-ligand 2
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）
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)］
REGN2329	TGN1412 と同じ一次配列を有する陽性対照抗 CD28 スーパーアゴニスト抗体（サイトカイン放出アッセイで使用）（Positive control superagonist anti-CD28 antibody, with primary sequence identical to TGN1412, used in cytokine release assays）
RLU	相対発光量（Relative luminescence units）
rPD-1	ラット PD-1（Rat PD-1）
SPR	表面プラズモン共鳴法（Surface plasmon resonance）
$t_{1/2}$	解離半減期（Dissociative half-life）
TCR	T 細胞受容体（T cell receptor）

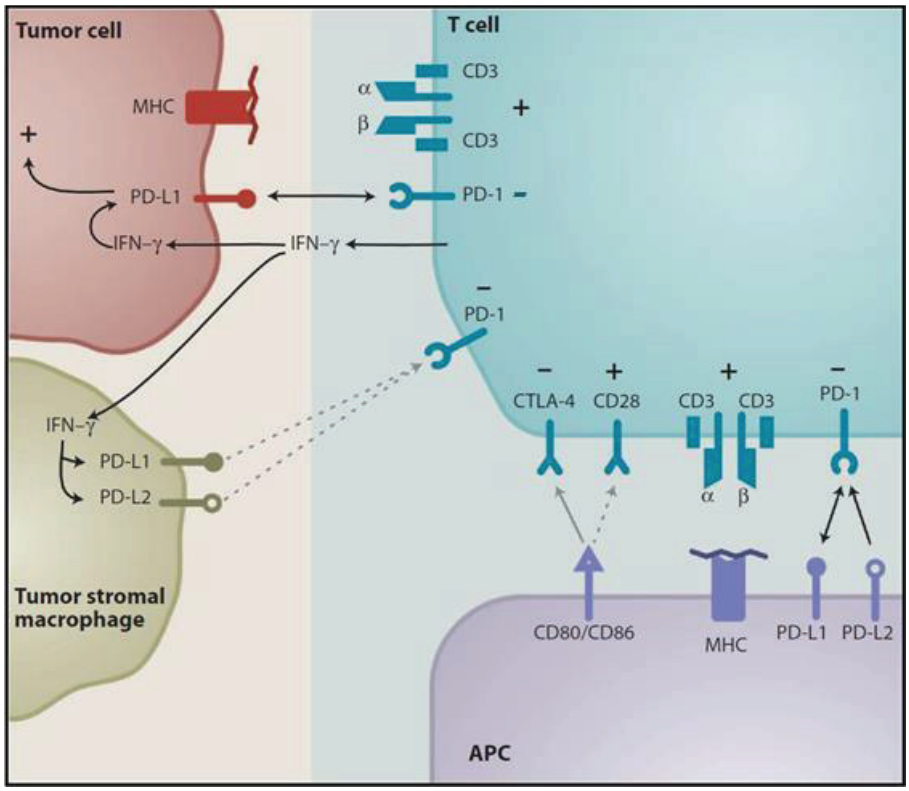
略号	定義
TNFα	腫瘍壊死因子 α（Tumor necrosis factor alpha）
UV	紫外線（Ultraviolet）

1　まとめ

免疫系を利用して腫瘍と闘うがん免疫療法は、多数の臨床試験が成功したことから、過去にサイエンス誌のブレイクスルー・オブ・ザ・イヤーに選ばれている(1)。これらの治療法の臨床有効性から、免疫応答の刺激によるがん治療の全般的な効力及び有望性が示されている(2)。がん免疫療法では、腫瘍細胞を直接標的化するのではなく、免疫系を解除して腫瘍細胞を攻撃させるが、この過程は腫瘍進行の制御に極めて重要な役割を果たすことが以前から知られている。しかし、がん細胞は、免疫細胞及び間質細胞における免疫抑制性受容体（抑制性チェックポイント受容体など）への結合といった複数のメカニズムで抗腫瘍反応を阻害することにより、免疫による致死を回避する。T 細胞における抑制性チェックポイント受容体の標的化は、複数のがん種に対する新たな治療パラダイムと考えられている。

Programmed cell death-1（PD-1）は免疫調節に極めて重要な役割を果たす抑制性チェックポイント受容体である（図 1）。PD-1 は活性化 T 及び B 細胞、NK 細胞並びに骨髄系細胞に発現している CD28 ファミリーメンバーである。2 つの PD-1 リガンド、すなわち programmed cell death-ligand 1（PD-L1）及び programmed cell death-ligand 2（PD-L2）は、免疫制御分子の B7 ファミリーに属する。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。PD-L1 は複数のヒトがん種の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。

図 1 - 受容体 PD-1 による T 細胞の免疫応答の制御



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(3)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

PD-1/PD-L1 シグナル伝達経路は T 細胞活性化、免疫寛容及び免疫を介した組織障害の間のバランスを制御している。活性化 T 細胞において慢性抗原刺激で誘導される PD-1 のアップレギュレーションにより、末梢免疫寛容が促進される。PD-1 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、T 細胞受容体（TCR）及び CD28 の下流シグナル伝達を抑制することにより、T 細胞の機能を負に調節する(4)(5)。腫瘍細胞における PD-L1 の発現は、腫瘍に対する免疫系の寛容に寄与し、過去に予後不良との関連が示されている(4)(6) が、その存在が治療の機会も提供している。すなわち、免疫抑制性 PD-1/PD-L1 経路を PD-1 又は PD-L1 に特異的な抗体で阻害すると、免疫を介した腫瘍の制御が改善し、複数のがん種で臨床効果が得られると考えられる(7)(8)。

免疫チェックポイント阻害剤及びその他の免疫調節剤では、免疫抑制性シグナル伝達経路の基礎的な阻害以外に、特定のがん種の臨床的及び免疫学的特性に応じた治療活性が認められる。体細胞変異量が多い腫瘍では、腫瘍免疫監視を媒介する免疫細胞によって認識されるネオ抗原の発現が増加している(9)。実際、変異頻度が高い腫瘍では、PD-1 及び PD-L1 阻害剤の効果が強かった(10)(11)。したがって、T 細胞浸潤型のがん種や免疫調節療法で良好な効果がみられるがん種も PD-1 阻害剤の有望な治療候補と考えられる。例えば、皮膚有棘細胞癌（CSCC）などの紫外線（UV）誘導性悪性腫瘍は、UV により DNA 損傷が生じているため変異量が多く、腫瘍浸潤リンパ球も多い(12)。したがって、PD-1 の標的化による抗腫瘍免疫の回復は、CSCC 患者にとって効果的な治療法と考えられる。

ヒト（h）IgG4^{P} 抗 PD-1 抗体セミプリマブ（遺伝子組換え）（以下、セミプリマブ、開発コード REGN2810）は Regeneron Pharmaceuticals, Inc によって開発された。この hIgG4^{P} アイソタイプは、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、IgG4 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）と同一にしたものである(13)(14)。セミプリマブの薬理作用を評価するため、セミプリマブの PD-1 に対する結合、PD-1／リガンド相互作用に対する阻害活性及び T 細胞シグナル伝達に対する作用を *in vitro* で分析した。また、遺伝子組み換えによりヒト PD-1 を発現させたマウスの同系（MC38.Ova）腫瘍モデルを用いて、セミプリマブの抗腫瘍効果を *in vivo* で分析した。

表面プラズモン共鳴法（SPR）-Biacore™アッセイにおいて、セミプリマブはヒト及びカニクイザルの単量体及び二量体 PD-1 に高い親和性で結合したが、ラット及びマウスの単量体 PD-1 には結合せず、これはヒト PD-1 とラット及びマウス PD-1 との間のアミノ酸配列相同性が低いことに一致していた（2.1項）。

酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）による阻害アッセイにおいて、セミプリマブは、プレートにコートされたヒト PD-L1 及び PD-L2 に対するヒト及びサル PD-1 の結合をいずれも阻害し、IC_{50} 値は同程度であった（2.2.1項）。

TCR シグナル伝達に対する PD-1 阻害剤の作用を評価する 2 つの遺伝子組換え T 細胞バイオアッセイにおいて、セミプリマブは TCR 活性を回復させた。第 1 世代のアッセイ（2.2.2項）では、遺伝子組換えにより PD-1-CD300a キメラ受容体及び AP-1（応答配列）- ルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現させた Jurkat T 細胞並びに遺伝子組換えにより PD-L1 を発現させた Raji B 細胞を使用した。このアッセイでは、T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体により CD3 発現 Jurkat 細胞と CD20 発現 Raji 細胞とを架橋する。次に実施した第 2 世代バイオアッセイ（2.2.2.4項）では、遺伝子組換えにより PD-L1 及び抗 CD3 膜結合型 IgE（mIgE）を発現させた APC 様 HEK293 細胞株を使用し、Jurkat T 細胞で CD3 のクラスターを形成させることにより TCR シグナル伝達を誘導したため、T 細胞活性化二重特異性抗体は必要なかった。第 2 世代アッセイにおけるその他の変更点は、第 1 世代アッセイでは PD-1-CD300a キメラ受容体を使用したのに対して、完全長 PD-1 を発現させた Jurkat 細胞を使用したことであった（図 8）。

ヒト末梢血単核細胞（hPBMC）から単離したヒト初代培養 T 細胞において、セミプリマブは PD-L1 により抑制されたヒト CD4^{+} T 細胞の増殖を濃度依存的に回復させた（2.2.4.1項）。第 1 世代バイ

オアッセイでアゴニスト活性が認められたが（2.2.2.3項）、これはFcγ受容体を発現しているがPD-L1は発現していないAPCの存在下でセミプリマブによりPD-1のクラスターが形成されたことを反映したものと考えられた。しかし、第2世代アッセイ（2.2.2.5項）をFcγ受容体及びPD-L1を発現していないAPC様細胞の存在下で実施したところ、アゴニスト活性は認められなかった。

サイトカイン放出がREGN2329（アミノ酸配列が抗CD28スーパーアゴニスト抗体TGN1412と同一）で容易に検出できる条件下で、セミプリマブはhPBMCからのサイトカイン放出を誘導しなかった。hPBMCを非結合性アイソタイプ対照抗体とインキュベートしたときと比較して、IL-2、IFNγ、IL-12p70、IL-4、IL-10及びIL-13の明らかな増加は認められなかった（2.2.4.2項）。しかし、検討したセミプリマブの最高濃度（10 μg/mL）において、TNFα濃度の増加が認められた。

ヒト初代培養 T 細胞において、セミプリマブの結合による非特異的な活性化は認められなかった。可溶性抗CD28 mAbの存在下で、セミプリマブを抗CD3 mAbコートビーズに添加したところ、$CD4^+$ T細胞活性化が阻害された。これらの結果から、セミプリマブコートビーズと受容体PD-1との結合により、抗CD3 mAb及び抗CD28 mAbによるT細胞活性化が阻害されることが示された（2.2.4.3項）。特記すべきこととして、溶液相のセミプリマブ又はFcγR1を介してHEK293/anti-CD3/FcγR1細胞表面に架橋されているセミプリマブはヒト初代培養 $CD8^+$ T細胞の活性化を誘導しなかった（2.2.4.4項）。これらの結果から、セミプリマブは抗CD3 mAbを介したT細胞活性化を共刺激する共シグナルを誘導しないことが示された。全体として、これらの結果から、セミプリマブがヒトT細胞を非特異的に活性化することはないと考えられた。

セミプリマブはエフェクター機能活性も喪失していることが、細胞を用いた *in vitro* アッセイで示された。これらのアッセイにおいて、セミプリマブは測定可能な抗体依存性細胞傷害（ADCC）（2.2.3.1項）及び補体依存性細胞傷害（CDC）（2.2.3.2項）を媒介しなかった。また、セミプリマブは単独及び遺伝子組換えヒトPD-1タンパク質との複合体で、C1qに結合しなかった（2.2.3.3項）

セミプリマブはげっ歯類のPD-1に結合しないことから、効力を裏付ける試験を実施するためにヒトPD-1の細胞外ドメインとマウスPD-1の膜貫通及び細胞質ドメインとを融合させたヒト／マウスキメラ受容体を発現する遺伝子組換えマウスを作製した。セミプリマブは、2.5～10 mg/kgの用量範囲において、ヒト化PD-1（huPD-1）マウスにおけるマウス同系結腸直腸癌（MC38.Ova）同種移植腫瘍の増殖に対して強い阻害効果を示した（2.3項）。huPD-1マウスを用いた2つの独立した実験において、セミプリマブは全ての用量で生存期間の延長を含む強力な抗腫瘍効果を示した。

セミプリマブの活性を、臨床で使用されている2つの既承認抗PD-1抗体と比較評価した。いずれの対照抗体も公表されている配列に基づき社内で製造した。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）について上記の *in vitro* 及び *in vivo* アッセイを実施した。いずれの試験においてもセミプリマブの活性はREGN1672及びREGN2626と同程度であった。

安全性薬理評価項目は、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験に組み込んだ（4項）。これらの試験において、セミプリマブを2、10又は50 mg/kg/週の用量で最長6か月間静脈内（IV）投与した

とき、心血管系、呼吸系及び中枢神経系（CNS）機能に、薬物に関連する毒性変化は認められず、これらの器官系に関連する組織の病理組織学的検査でも毒性変化は認められなかった。

要約すると、セミプリマブは *in vitro* においてヒト受容体 PD-1 に高い親和性で結合し、その内因性リガンド PD-L1 及び PD-L2 との相互作用を阻害し、PD-L1 を介した TCR シグナル伝達を阻害した。更なる *in vitro* 試験において、セミプリマブは ADCC 及び CDC 活性を増加させず、循環性免疫複合体（CIC）形成、非特異的な T 細胞増殖及びサイトカイン放出症候群に対する誘導能を示さなかった。huPD-1 マウスを用いた *in vivo* 試験において、セミプリマブは同系 MC38.Ova 腫瘍増殖を阻害することが示された。

2　効力を裏付ける試験

2.1　結合親和性

[REGN2810-MX-14078] 試験（Module 4.2.1.1-1）

セミプリマブと複数の動物種由来遺伝子組換え PD-1 タンパク質との相互作用における結合動態パラメータを SPR-Biacore™法により 25°C 及び pH 7.4 で測定した（表 1）。セミプリマブは、ヒト及びカニクイザルの myc-myc-ヘキサヒスチジン（mmH）タグ単量体 PD-1 タンパク質（それぞれ hPD-1.mmH 及び MfPD-1.mmH）に同程度の結合親和性を示し、平衡解離定数（K_D）はそれぞれ 5.61 及び 7.61 nmol/L であった。ヒト及びカニクイザルの二量体 PD-1 タンパク質（それぞれ hPD-1.mFc 及び MfPD-1.mFc）に対するセミプリマブの結合親和性は約 10 倍高く、K_D 値はそれぞれ 577 及び 499 pmol/L であった。

セミプリマブの親和性を、臨床で使用されている 2 つの既承認抗 PD-1 抗体と比較評価した。いずれの対照抗体も公表されている配列に基づき社内で製造した。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 タンパク質との相互作用における 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	セミプリマブ	1.37×10^{5}	7.68×10^{-4}	5.61×10^{-9}	15.0
	REGN1672	2.58×10^{5}	2.42×10^{-3}	9.39×10^{-9}	4.8
	REGN2626	5.22×10^{5}	6.20×10^{-3}	1.19×10^{-8}	1.9
hPD-1.mFc	セミプリマブ	2.37×10^{5}	1.37×10^{-4}	5.77×10^{-10}	84.4
	REGN1672	4.57×10^{5}	2.02×10^{-4}	4.42×10^{-10}	57.1
	REGN2626	5.64×10^{5}	1.70×10^{-4}	3.00×10^{-10}	68.1
MfPD-1.mmH	セミプリマブ	1.09×10^{5}	8.28×10^{-4}	7.61×10^{-9}	14.0
	REGN1672	1.69×10^{5}	1.52×10^{-3}	9.02×10^{-9}	7.6
	REGN2626	3.71×10^{5}	1.26×10^{-3}	3.38×10^{-9}	9.2
MfPD-1.mFc	セミプリマブ	2.64×10^{5}	1.32×10^{-4}	4.99×10^{-10}	87.8
	REGN1672	4.41×10^{5}	1.98×10^{-4}	4.48×10^{-10}	58.5
	REGN2626	5.92×10^{5}	1.52×10^{-4}	2.57×10^{-10}	75.9
rPD-1.mmH	セミプリマブ	NB[e]			
	REGN1672	NB			
	REGN2626	NB			
mPD-1.mmH	セミプリマブ	NB			
	REGN1672	NB			
	REGN2626	NB			

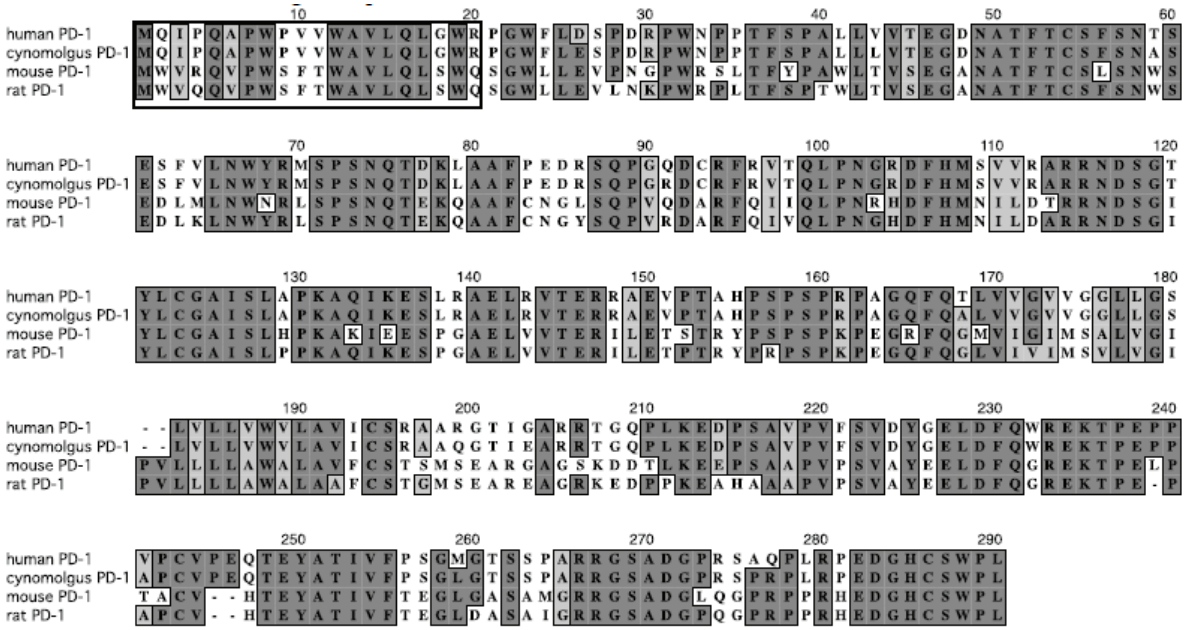
a 結合速度定数
b 解離速度定数
c 平衡解離定数
d 解離半減期（$t_{1/2}$）：結合した PD-1 の 50%が抗体から解離するのに必要な時間
e 使用したアッセイ条件下で検出可能な結合なし
略号：hPD-1.mmH = C末端にmyc-myc-ヘキサヒスチジンタグを付加したヒトPD-1（単量体）、
hPD-1.mFc = マウスFcドメインと融合させたヒトPD-1（二量体）、MfPD-1 = カニクイザルPD-1、
rPD-1 = ラット PD-1、mPD-1 = マウス PD-1

一方、ラット及びマウスの単量体 PD-1（それぞれ rPD-1.mmH 及び mPD-1.mmH）に対してはセミプリマブ及び対照抗体のいずれも同一のアッセイ条件下で結合しなかった。これらの結果は、ヒト PD-1 とラット及びマウス PD-1 との間でアミノ酸配列一致率が低い（図 2）（ヒト PD-1 細胞外ドメイン配列の P21～V170 とカニクイザル PD-1 細胞外ドメイン配列との一致率は 94%であるのに対して、

マウス及びラット PD-1 細胞外ドメイン配列との一致率はそれぞれ 61%及び 65%にすぎない）ことと相関していた。

図 2 - ヒト、カニクイザル、マウス及びラット PD-1 のアミノ酸配列アラインメント

予測されるシグナル配列



ヒト、カニクイザル、マウス及びラット PD-1 のアミノ酸配列アラインメントを示す。ヒト PD-1 の細胞外ドメイン配列（P21～V170）とサル、マウス及びラット PD-1 細胞外ドメイン配列とのアミノ酸配列一致率はそれぞれ 94%、61%及び 65%であった。

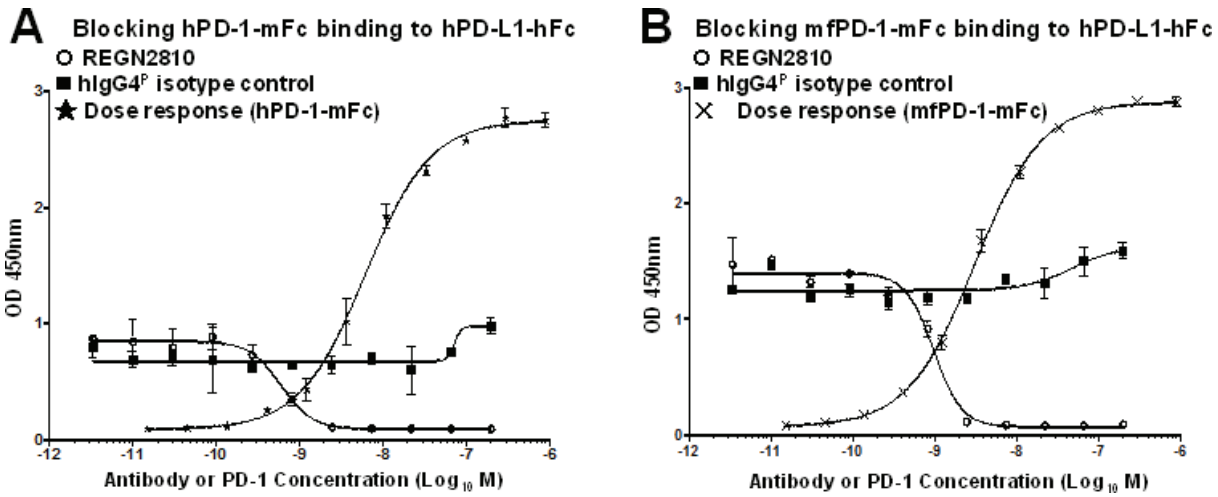
2.2 *In vitro* 薬理

2.2.1 セミプリマブはヒト PD-L1 及び PD-L2 に対するヒト及びサル二量体 PD-1 タンパク質の結合を強力に阻害する

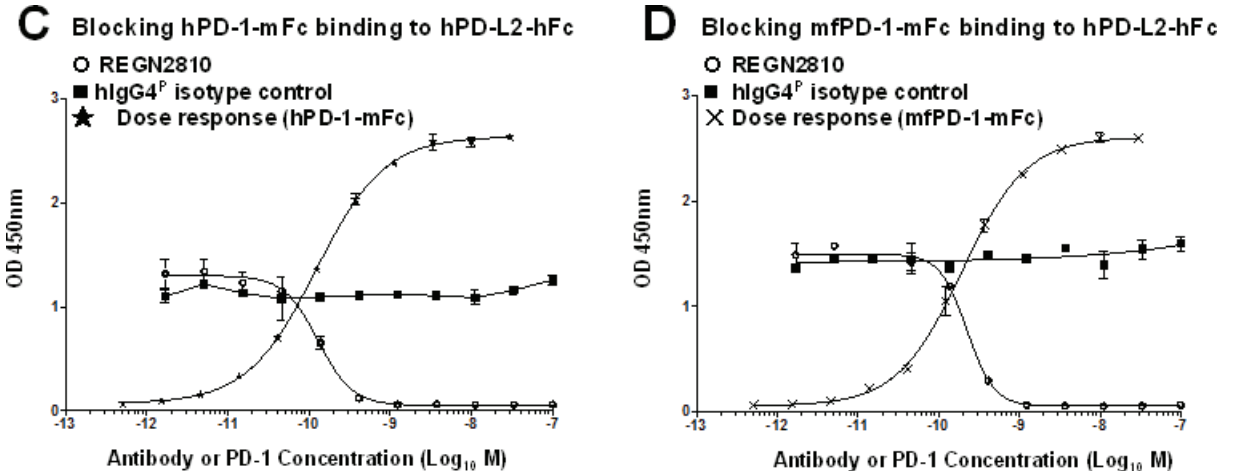
[REGN2810-MX-14079] 試験（Module 4.2.1.1-2）

プレートに結合させたヒト PD-L1（hPD-L1.hFc）及びヒト PD-L2（hPD-L2.hFc）へのヒト二量体 PD-1（hPD-1.mFc）の結合に対するセミプリマブの阻害能を検討する ELISA を構築した。セミプリマブは、プレートにコートされた hPD-L1.hFc に対する一定濃度の遺伝子組換え PD-1 タンパク質（1.5 nmol/L hPD-1.mFc 及び 2.0 nmol/L mfPD-1.mFc）の結合を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 0.60 及び 0.97 nmol/L であった（図 3の A 及び B）。PD-L2 をリガンドとして用いた時も同様に、セミプリマブは、プレートにコートされた hPD-L2.hFc に対する 0.1 nmol/L の hPD-1.mFc 及び 0.25 nmol/L の mfPD-1.mFc の結合を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 0.13 及び 0.22 nmol/L であった（図 3の C 及び D）。いずれのアッセイにおいても $hIgG4^P$ アイソタイプ対照抗体（REGN1945）による阻害は認められなかった。

図 3 - セミプリマブはヒト PD-L1 及び PD-L2 に対するヒト及びサル PD-1 の結合を阻害する



パネル A）プレートにコートされたヒト PD-L1 に対するヒト PD-1（hPD-1.mFc）の結合の濃度反応曲線（EC_{50}：6.19 nmol/L）(**星印**)。セミプリマブはヒト PD-L1（hPD-L1.hFc）に対するヒト PD-1（1.5 nmol/L hPD-1.mFc）の結合を阻害し、IC_{50} は 0.6 nmol/L であった（**白丸**）。hIgG4^P アイソタイプ対照は同一のアッセイ条件下で阻害作用を示さなかった（**黒四角**）。**パネル B）**プレートにコートされたヒト PD-L1 に対するカニクイザル PD-1（mfPD-1.mFc）の結合の濃度反応曲線（EC_{50}：3.08 nmol/L）（**×印**）。セミプリマブはヒト PD-L1 に対するカニクイザル PD-1（2.0 nmol/L mfPD-1.mFc）の結合を阻害し、IC_{50} は 0.97 nmol/L であった（**白丸**）。hIgG4^P アイソタイプ対照は同一のアッセイ条件下で阻害作用を示さなかった（**黒四角**）。



パネル C）プレートにコートされたヒト PD-L2 に対するヒト PD-1（hPD-1.mFc）の結合の濃度反応曲線（EC_{50}：0.12 nmol/L）（**星印**)。セミプリマブは、プレートにコートされたヒト PD-L2（hPD-L2.hFc）に対するヒト PD-1（0.1 nmol/L hPD-1.mFc）の結合を阻害し、IC_{50} は 0.13 nmol/L であった（**白丸**）。hIgG4^P アイソタイプ対照は同一のアッセイ条件下で阻害作用を示さなかった（**黒四角**）。**パネル D）**プレートにコートされたヒト PD-L2 に対するカニクイザル PD-1（mfPD-1.mFc）の結合の濃度反応曲線（EC_{50}：0.19 nmol/L）（**×印**）。セミプリマブは、プレートにコートされたヒト PD-L2（hPD-L2.hFc）に対するカニクイザル PD-1（0.25 nmol/L mfPD-1.mFc）の結合を阻害し、IC_{50} は 0.22 nmol/L であった（**白丸**）。hIgG4^P アイソタイプ対照は同一のアッセイ条件下で阻害作用を示さなかった（**黒四角**）。

感度がより高い第 2 の ELISA 法を用いて、セミプリマブを 2 つの抗 PD-1 対照抗体とともに評価した。本アッセイにおいて、ビオチン標識ヒト PD-1（biotin-hPD-1.hFc）は、プレートにコートされた hPD-L1.mFc に濃度依存的に結合し、EC_{50} 値は 0.15 nmol/L であった。セミプリマブは、プレートにコートされた hPD-L1.mFc に対する一定濃度のビオチン標識ヒト PD-1（0.2 nmol/L biotin-hPD-1.hFc）の結合を阻害し、IC_{50} 値は 85 pmol/L であり、これは対照抗体 REGN1672（IC_{50}=72 pmol/L）及び REGN2626（IC_{50}=39 pmol/L）の阻害効力の 2 倍以内であった。本アッセイにおいて $hIgG4^P$ アイソタイプ対照抗体による阻害は認められなかった。

2.2.2 第 1 世代 PD-1 バイオアッセイにおいてセミプリマブはヒト T 細胞株の PD-1/PD-L1 を介したシグナル伝達を阻害する

[REGN2810-MX-14079] 試験（Module 4.2.1.1-2）

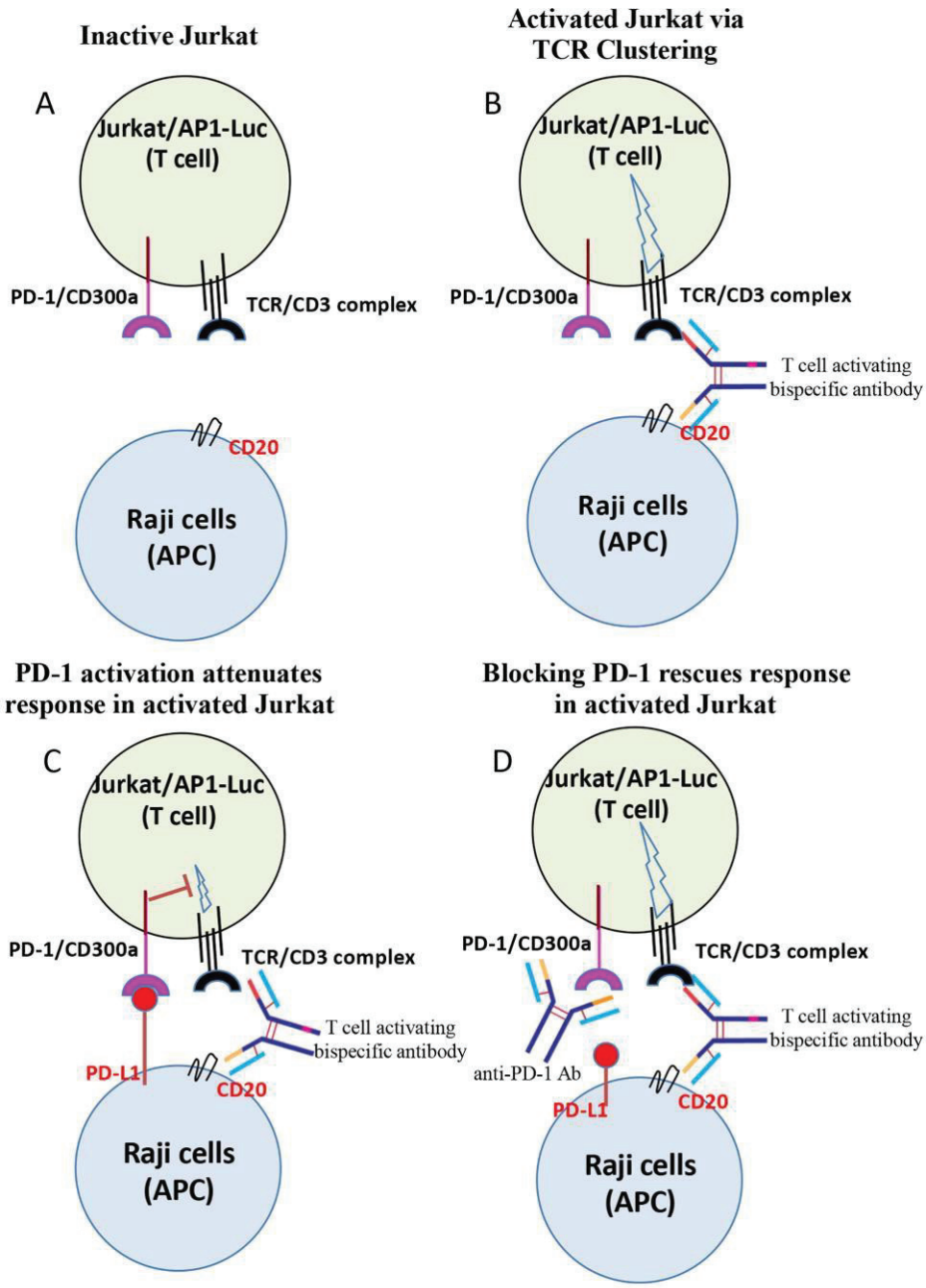
TCR/APC 相互作用を模倣し、PD-1/PD-L1 シナプスを介した PD-1 シグナル伝達モデルが得られるようデザインされた遺伝子組換え細胞を用いて、セミプリマブ及び 2 つの抗 PD-1 対照抗体の PD-1 アンタゴニスト作用効力を評価した。遺伝子組換え細胞を用いた 2 種類のアッセイで、セミプリマブの PD-1 アンタゴニスト（免疫刺激）作用（PD-L1 を介した受容体 PD-1 からのシグナル伝達に対する阻害作用）効力及び PD-1 アゴニスト（免疫抑制）活性誘導の有無を評価した（REGN2810-MX-14079 試験）。これらのサロゲートアッセイ（シグナル／ノイズ比を増加させ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 世代バイオアッセイ（図 4）では、PD-1 キメラ受容体及びレポーター遺伝子 AP-1（応答配列）ールシフェラーゼを導入した Jurkat T 細胞（ヒト白血病 T 細胞株）（Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc）を使用した。PD-1 キメラ受容体は、ヒト PD-1 の細胞外ドメインとヒト CD300a（免疫細胞に発現している抑制性受容体）の膜貫通及び細胞質ドメインとを融合させたものであり、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 試験）。Raji 細胞（ヒト B 細胞株）には完全長 PD-L1 を導入し（Raji/PD-L1）、APC 様細胞株として使用した。フローサイトメトリー試験において、セミプリマブは Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞に結合し、抗 PD-L1 抗体（Abcam）は Raji/PD-L1 に結合することが確認された。

このアッセイデザインは、CD20 発現 Raji 細胞と CD3 発現 Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞とを架橋する抗 CD3 及び抗 CD20 アームを有する T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体（REGN2281）に依存する。フローサイトメトリー試験において、REGN2281 が Raji/PD-L1 細胞、Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞及び野生型 Raji 細胞に結合することが確認された。Raji/PD-L1 細胞非存在下では、REGN2281 により Jurkat 細胞表面で CD3 のクラスターが形成され、その結果、TCR が活性化し、AP-1 シグナル伝達が誘導された（図 4の B）。しかし、Raji/PD-L1 細胞存在下では、PD-1/PD-L1 相互作用で誘導された T 細胞抑制シグナル伝達により、遺伝子組換え Jurkat 細胞における AP-1 シグナル伝達が抑制された（図 4の C）。セミプリマブ及び抗 PD-1 対照抗体は、この抑

制シグナル伝達を阻害し、遺伝子組換え Jurkat 細胞における AP-1 シグナル伝達を濃度依存的に増加させた（図 4の D）。

図 4 - ルシフェラーゼベース第 1 世代 PD-1 バイオアッセイの模式図

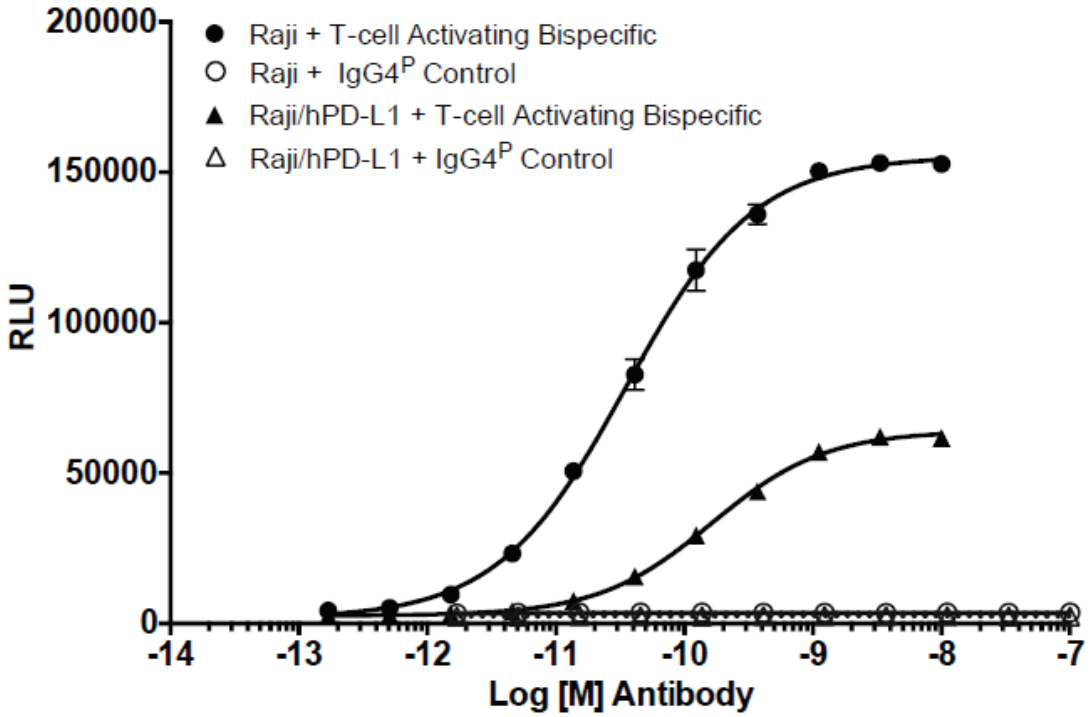


パネル A）不活性な Jurkat 細胞。**パネル B**）Jurkat 細胞の CD3 及び Raji 細胞の CD20 に結合する T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体を用いた TCR のクラスター形成により、Jurkat 細胞が活性化される。**パネル C**）PD-1 の活性化により活性化 Jurkat 細胞での応答が減弱する。**パネル D**）PD-1 を阻害すると活性化 Jurkat 細胞での応答が回復する。

2.2.2.1 第 1 世代 PD-1 バイオアッセイにおける T 細胞活性化に対する PD-1/PD-L1 シグナル伝達の作用

第 1 世代 PD-1 バイオアッセイにおいて、Raji 細胞又は Raji/PD-L1 細胞のいずれかの存在下で、T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体（REGN2281）を用いて Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞を活性化した。PD-L1 を発現していない野生型 Raji 細胞の存在下では、REGN2281 は T 細胞のシグナル伝達を濃度依存的に活性化し、EC_{50} は 35 pmol/L であった（図 5、黒丸）。しかし、Raji 細胞表面に PD-L1 が発現していると、REGN2281 を介した TCR 活性化が抑制され、REGN2281 の EC_{50} が 5 倍に増加した（163 pmol/L）（図 5、黒三角）。また、Raji/PD-L1 細胞存在下で検討したとき、PD-L1 を発現していない野生型 Raji 細胞存在下（図 5、黒丸）と比較して、Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞における最大シグナル強度が約 3 分の 1 に減少した。

図 5 - 第 1 世代 PD-1 バイオアッセイでの二重特異性抗体 REGN2281 による濃度依存的な T 細胞活性化

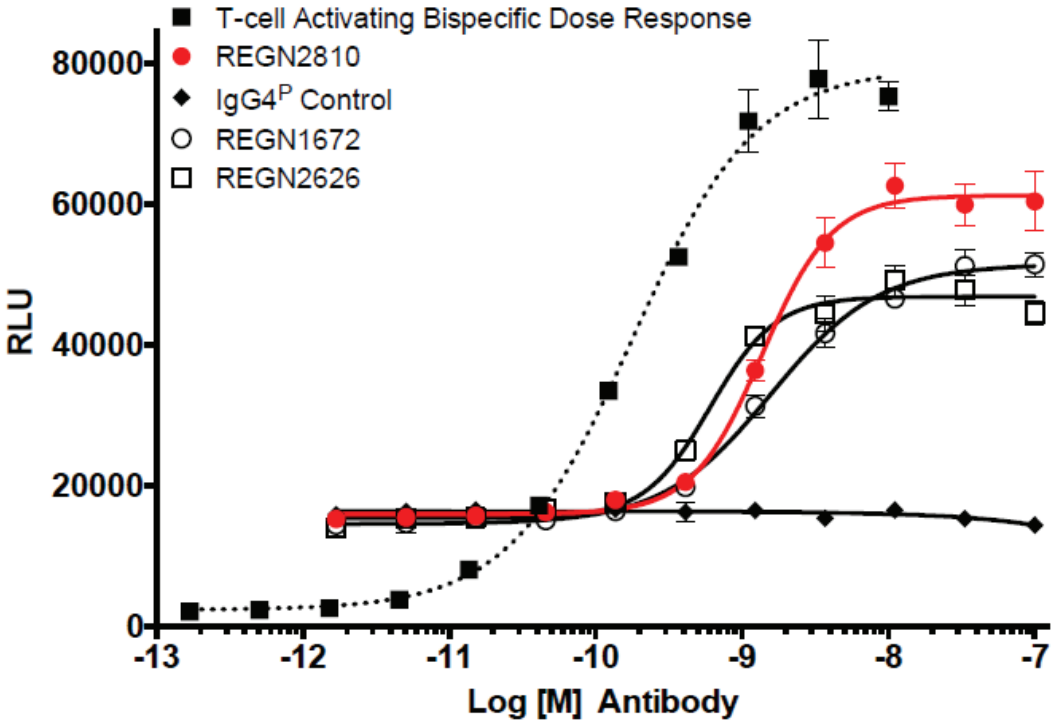


Raji 細胞存在下で漸増濃度の T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体 REGN2281 を添加したときの Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞の濃度依存的な活性化（**黒丸**）。一方、Raji/PD-L1 細胞存在下では、PD-L1/受容体 PD-1 を介した抑制シグナル伝達の誘導により、REGN2281 による濃度依存的な Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞シグナル伝達活性化が抑制された（**黒三角**）。hIgG4^{P} アイソタイプ対照抗体では、Raji 細胞（**白丸**）又は Raji/PD-L1 細胞（**白三角**）のいずれの存在下においても Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞活性化は認められなかった。TCR 活性は、AP1－ルシフェラーゼレポーター遺伝子発現の誘導及び発光量を指標とするシグナル強度［相対発光量（RLU）］によりモニタリングした。

2.2.2.2 T 細胞／APC を用いた第 1 世代 PD-1 バイオアッセイにおけるセミプリマブのアンタゴニスト活性

セミプリマブ及び 2 つの抗 PD-1 対照抗体（REGN1672 及び REGN2626）について、PD-1/PD-L1 を介した T 細胞抑制シグナル伝達の阻害による T 細胞活性化促進能を評価した（図 6）。Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞及び Raji/PD-L1 細胞を T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体で活性化した。一定濃度（30 pmol/L）の REGN2281 の存在下で、セミプリマブは T 細胞活性化を最大値の約 75%まで回復させ、EC_{50} 値は 1.37 nmol/L であり、対照抗体 REGN1672 及び REGN2626 の EC_{50} 値はそれぞれ 1.58 及び 0.60 nmol/L であった（表 2）。本アッセイにおいて $hIgG4^{P}$ アイソタイプ対照抗体は作用を示さなかった。

図 6 - 第 1 世代 PD-1 バイオアッセイにおいて PD-L1 発現細胞存在下でセミプリマブ及び対照抗体は T 細胞活性化を回復させる



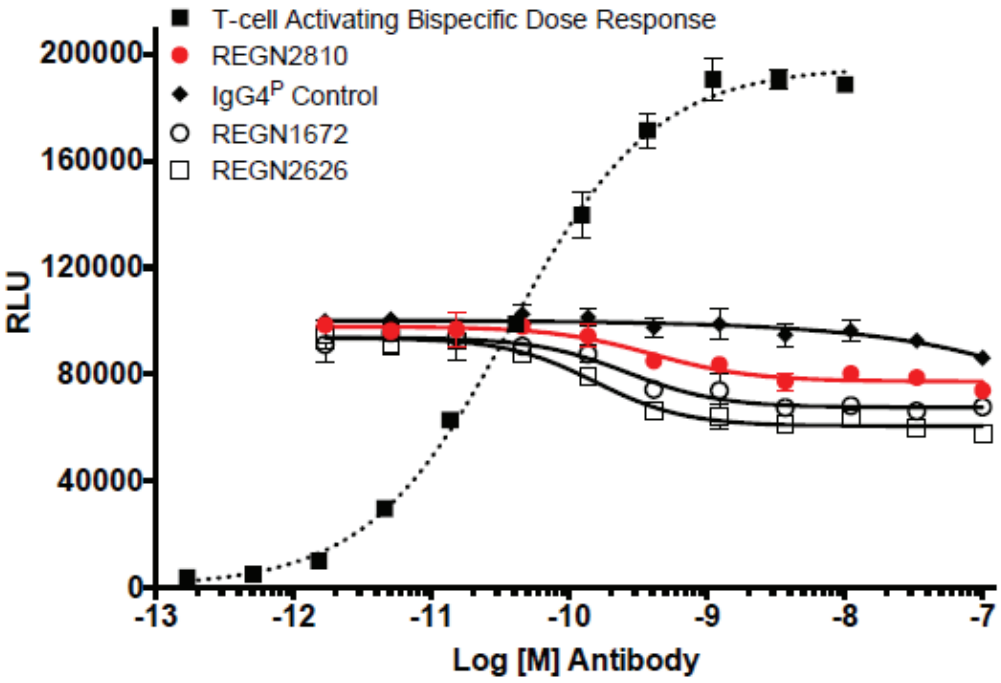
T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体、Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞及び CD20 発現 Raji/PD-L1 細胞を使用したとき、Jurkat 細胞表面での CD3 のクラスター形成により濃度依存的に T 細胞が活性化された（**黒四角**）。REGN2810（セミプリマブ）、REGN1945（hIgG4^{P} アイソタイプ対照抗体）又はいずれかの抗 PD-1 対照抗体（REGN1672 及び REGN2626）の 1.7 pmol/L～100 nmol/L の希釈系列を Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞及び Raji/PD-L1 細胞とともにインキュベートした後、REGN2281 を添加することにより、PD-L1 を介した PD-1 の抑制シグナル伝達に対する抗体の阻害能を評価した。TCR シグナル伝達を活性化する一定濃度 30 pmol/L の REGN2281 及び Raji/PD-L1 細胞の存在下で、REGN2810（**赤丸**）は PD-1/PD-L1 相互作用を阻害することにより、Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞における T 細胞活性化を濃度依存的に促進した。一方、hIgG4^{P} アイソタイプ対照抗体（**黒菱形**）では濃度依存的な活性の増加は認められなかった。本アッセイ系において、REGN1672（**白丸**）及び REGN2626（**白四角**）は REGN2810（**赤丸**）と同程度のアンタゴニスト作用を示したが、PD-1 の抑制シグナル伝達を阻害することにより得られる最大シグナル強度は REGN2810 が最も高かった。TCR 活性は AP-1ールシフェラーゼレポーター遺伝子によりモニタリングし、シグナル強度を相対発光量（RLU）で表した。

2.2.2.3 T 細胞／APC を用いた第 1 世代 PD-1 バイオアッセイにおける PD-L1 発現細胞非存在下でのセミプリマブのアゴニスト活性の評価

第 1 世代 PD-1 バイオアッセイにおいて、セミプリマブ及び抗 PD-1 対照抗体の免疫抑制（PD-1 アゴニスト）活性の有無を評価した（図 7）。PD-L1 を発現していない野生型 Raji 細胞の存在下で Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞をインキュベートし、一定濃度（30 pmol/L）の T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体で TCR シグナル伝達を刺激した。本アッセイデザインにおいて、野生型 Raji 細胞は PD-L1 を発現していないため、受容体 PD-1 を介した PD-L1 による抑制シグナル伝達は生

じない。したがって、観察される PD-1 の抑制シグナル伝達及びシグナル強度の減少はいずれも抗 PD-1 抗体の PD-1 アゴニスト作用に起因するものと考えられる。本アッセイにおいてセミプリマブで処理したとき、非結合性アイソタイプ対照抗体処理時と比較して、シグナル強度（RLU）が約 11%減少し、IC_{50} は 0.40 nmol/L であった（表 2）。抗 PD-1 対照抗体 REGN1672（RLU が 21%減少、IC_{50}=0.26 nmol/L）及び REGN2626（RLU が 29%減少、IC_{50}=0.16 nmol/L）でもアゴニスト活性が認められた。アゴニスト活性は認められたがアッセイ間でばらつきがあり、一部のアッセイではアゴニスト活性が認められなかった。アゴニスト活性が認められたときには、活性のパターンは 3 つの全ての抗体で一致していた。このアゴニスト活性は、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 Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 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。

図 7 - 第 1 世代 PD-1 バイオアッセイにおいて PD-L1 発現細胞非存在下でセミプリマブ及び対照抗体は T 細胞活性化を部分的に阻害する



Raji 細胞存在下において漸増濃度の T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体により Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞表面で CD3 のクラスターが形成され、T 細胞が濃度依存的に活性化した（**黒四角**）。REGN2810（セミプリマブ）（**赤丸**）、hIgG4^P アイソタイプ対照抗体（**黒菱形**）又はいずれかの抗 PD-1 対照抗体［REGN1672（**白丸**）又は REGN2626（**白四角**）］の 1.7 pmol/L～100 nmol/L の希釈系列を Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc 細胞及び PD-L1 を発現していない野生型 Raji 細胞とともにインキュベートすることにより、これらの抗体のアゴニスト活性を評価した。30 pmol/L の T 細胞活性化二重特異性抗体で TCR シグナル伝達を活性化した。TCR 活性は AP1ールシフェラーゼレポーター遺伝子によりモニタリングし、シグナル強度を相対発光量（RLU）で表した。

表 2 - 第 1 世代機能的 PD-1 バイオアッセイで得られた抗 PD-1 抗体の RLU 最大値、RLU 最小値及び効力

	PD-1アンタゴニストアッセイ（細胞表面PD-L1存在下）		PD-1アゴニストアッセイ（細胞表面PD-L1非存在下）		
抗体	EC_{50} [nmol/L]	RLU[a] 最大値 (30 pmol/L REGN2281)[b]	IC_{50} [nmol/L]	RLU[a] 最小値 (30 pmol/L REGN2281)[b]	RLU減少率 (%)[c]
hIgG4[P]対照	> 100	約16,000	> 100	約86,000	-
セミプリマブ	1.37	約61,000	0.40	約77,000	約11
REGN1672	1.58	約51,000	0.26	約68,000	約21
REGN2626	0.60	約47,000	0.16	約61,000	約29

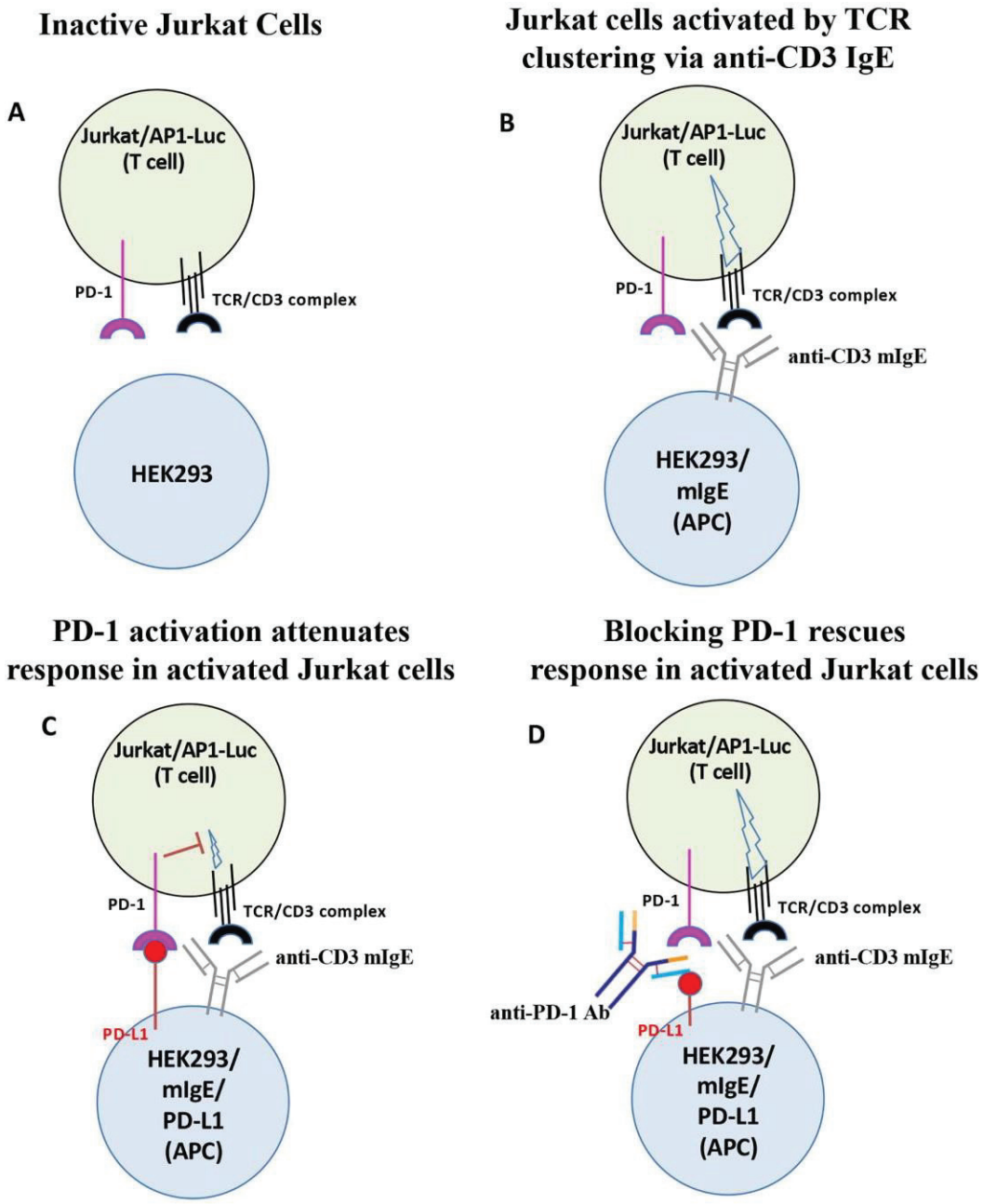
a RLU 最大値及び RLU 最小値は 3 例の概略値を示す
b いずれのアッセイフォーマットでも一定濃度 30 pmol/L の REGN2281 を用いて T 細胞を活性化した。
c $\%=100-(RLU_{Test\ Ab}/RLU_{REGN1945})\times100$
略号：RLU = 相対発光量

2.2.2.4 第 2 世代 PD-1 バイオアッセイにおいてセミプリマブは PD-1/PD-L1 を介した抑制シグナル伝達を阻害する

[REGN2810-MX-14079] 試験（Module 4.2.1.1-2）

T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体を必要としない第 2 世代バイオアッセイを構築した（図 8）。本アッセイでは、第 1 世代アッセイで使用した PD-1-CD300a キメラ受容体とは異なり、完全長受容体 PD-1 を Jurkat T 細胞に導入したが、AP-1（応答配列）- ルシフェラーゼレポーター遺伝子は第 1 世代アッセイと同じものを使用した（Jurkat/PD-1/AP-1-Luc）。遺伝子組み換えにより抗 CD3 mIgE を発現させた HEK293 細胞（HEK293/mIgE）を、完全長 PD-L1 の有無に関係なく、APC 様細胞として使用した。HEK293/mIgE 細胞に完全長 PD-L1（NP_054862.1）を導入して HEK293/mIgE/PD-L1 細胞を作製し、フローサイトメトリーを用いて Jurkat/PD-1/AP-1-Luc 細胞に対するセミプリマブの結合並びに HEK293/mIgE/PD-L1 細胞に対する FITC 標識抗 PD-L1 抗体及び APC 標識抗 IgE 抗体の結合を確認した。本アッセイにおいて、HEK293/mIgE 細胞表面に発現させた抗 CD3 mIgE により Jurkat 細胞表面で内因性 CD3 のクラスターが形成されると T 細胞が活性化し、それを反映して AP-1 シグナル伝達が誘導された（図 8の B）。しかし、遺伝子組み換えにより PD-L1 を発現させた HEK293/mIgE 細胞（HEK293/mIgE/PD-L1）の存在下では、PD-1/PD-L1 相互作用で生じた T 細胞抑制シグナル伝達により AP-1 シグナル伝達が抑制された（図 8の C）。セミプリマブ及び 2 つの抗 PD-1 対照抗体により PD-1 活性を阻害すると、濃度依存的にこの抑制シグナル伝達が阻害され、AP-1 シグナル伝達が促進された（図 8の D）。

図 8 - ルシフェラーゼベース第 2 世代 PD-1 バイオアッセイの模式図



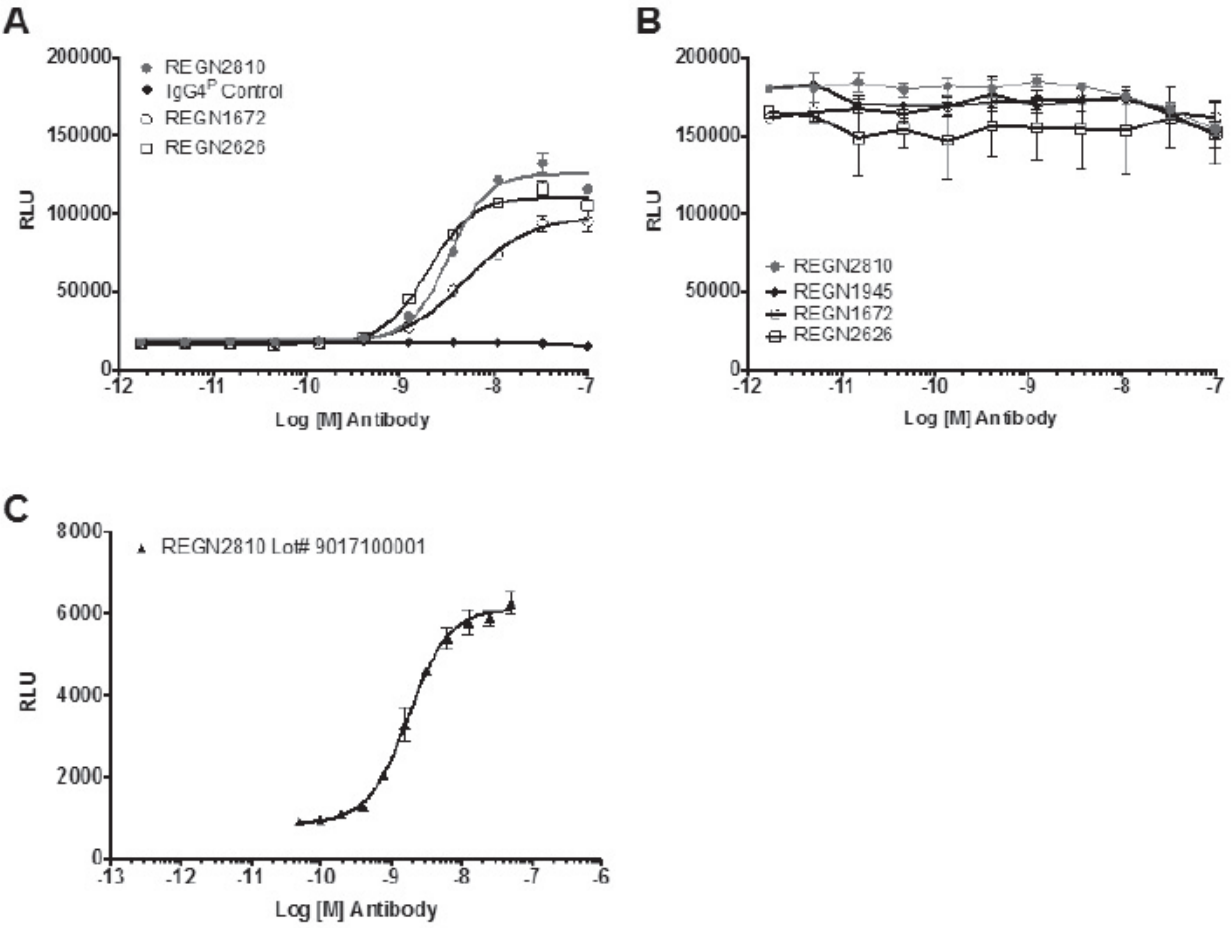
パネル A）不活性な Jurkat 細胞。**パネル B**）抗 CD3 抗体を発現している HEK293/mIgE 細胞を介した TCR のクラスター形成により Jurkat 細胞が活性化される。**パネル C**）HEK293/mIgE/PD-L1 細胞の PD-L1 に Jurkat 細胞の PD-1 が結合すると、活性化 Jurkat 細胞における T 細胞応答が減弱する。**パネル D**）抗 PD-1 抗体は PD-1/PD-L1 の抑制シグナル伝達を阻害することにより、活性化 Jurkat 細胞の TCR シグナル伝達を促進する。

2.2.2.5 第 2 世代 PD-1 バイオアッセイにおけるセミプリマブのアゴニスト及びアンタゴニスト活性の測定

第 2 世代 PD-1 バイオアッセイにおいて、T 細胞活性化に対するセミプリマブの作用を更に評価した。HEK293/mIgE/PD-L1 細胞を添加することにより、Jurkat/PD-1/AP-1-Luc 細胞を活性化した。セミプリマブは非結合性アイソタイプ対照抗体と比較して T 細胞活性化を促進し、EC_{50} は 3.3 nmol/L であった（図 9の A）。REGN1672 及び REGN2626 も T 細胞活性化を促進し、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。本アッセイにおいて、$hIgG4^P$ アイソタイプ対照抗体は T 細胞活性を増加させなかった。セミプリマブの毒性試験用ロット番号[redacted]も第 2 世代 PD-1 バイオアッセイで評価したところ、T 細胞活性化を促進し、EC_{50} は 1.8 nmol/L であった（図 9の C）。

第 2 世代 PD-1 バイオアッセイにおいて、PD-L1 発現 APC 細胞非存在下で、セミプリマブ及び対照抗体の PD-1 アゴニスト活性を更に評価した（図 9の B）。PD-L1 非発現 HEK293/mIgE 細胞とともに Jurkat/PD-1/AP-1-Luc 細胞をインキュベートした。インキュベーションによるセミプリマブ、REGN1672 及び REGN2626 による AP-1 Luc 活性の減少は認められなかった。アゴニスト活性が認められなかったのは、HEK293 細胞に Fcγ 受容体が発現していないためと考えられることから、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。

図 9 - 第 2 世代 PD-1 バイオアッセイにおいて、セミプリマブはアゴニスト活性ではなくアンタゴニスト活性を示す



第 2 世代 PD-1 バイオアッセイにおいて、REGN2810（セミプリマブ）（赤丸）、REGN1672（白丸）、REGN2626（白四角）又は hIgG4P アイソタイプ対照抗体（REGN1945）（黒菱形）のアンタゴニスト活性（パネル A）及びアゴニスト活性（パネル B）を評価した。パネル A）アンタゴニスト活性を評価するため、抗体の希釈系列（1.7 pmol/L～100 nmol/L）を Jurkat/PD-1/AP-1-Luc 細胞及び HEK293/mIgE/PD-L1 細胞とともにインキュベートした。TCR 活性は AP1－ルシフェラーゼレポーター遺伝子によりモニタリングし、相対発光量（RLU）で表した。**パネル B）アゴニスト活性を評価するため、抗体の希釈系列**（1.7 pmol/L～100 nmol/L）を Jurkat/PD-1/AP-1-Luc 細胞及び HEK293/mIgE 細胞とともにインキュベートした。**パネル C）REGN2810 の GLP 適用毒性試験用ロット番号 [redacted]（黒三角）も、第 2 世代 PD-1 バイオアッセイにおいて、抗体の希釈系列**（49 pmol/L～50 nmol/L）を Jurkat/PD-1/AP-1-Luc 細胞及び HEK293/mIgE/PD-L1 細胞とともにインキュベートすることにより評価した。本アッセイにおける REGN2810 の T 細胞活性化作用の EC_{50} は 1.8 nmol/L であった。

2.2.3 セミプリマブの Fc エフェクター機能の評価

[REGN2810-MX-14080] 試験（Module 4.2.1.1-3）

細胞を用いた *in vitro* 薬理試験において、セミプリマブは PD-1 に対する PD-L1 の結合を阻害することにより T 細胞における PD-1 の抑制シグナル伝達を効果的に阻害することが示された（2.2項）。しかし、*in vivo* では CIC の形成による補体活性化又はセミプリマブ Fc ドメインを介したエフェクタ

一機能活性といったその他のメカニズムが影響を及ぼし、CDC や ADCC を誘導する可能性がある。CDC 及び ADCC は病原物質及び腫瘍細胞の根絶に利用される重要なメカニズムである。この活性は一部の抗体アイソタイプ、主に IgG1 及び IgG3 の定常領域を有する抗体の Fc ドメインにより媒介される(15)。一般的に、Fc エフェクター機能活性媒介作用は、抗体 Fc ドメインの抗原誘導性多量体化による補体タンパク質及び低親和性 Fcγ 受容体への結合アビディティの増加によって刺激される。

2.2.3.1 *In vitro* 機能アッセイ - ADCC

細胞を用いたアッセイにおいて、セミプリマブの ADCC 活性誘導能を *in vitro* で評価した。簡潔に述べると、野生型 Jurkat 細胞、CD3/CD28 刺激 Jurkat 細胞及び HEK293/PD-1 細胞の表面には PD-1 が存在し、HEK293 陰性対照細胞には PD-1 が存在しないことをフローサイトメトリーで確認した。次に、各細胞株において、セミプリマブが ADCC エフェクター機能活性を媒介するか否かを検討した。エフェクター細胞として hPBMC を使用したとき、セミプリマブは標的の Jurkat 細胞、CD3/CD28 刺激 Jurkat 細胞、HEK293/PD-1 細胞及び HEK293 細胞で ADCC を誘導しなかった。本アッセイで使用した hPBMC の ADCC 誘導能は、陽性対照の抗 EGFR 抗体（REGN171）で確認された。hIgG4^{P} アイソタイプ対照抗体とともにインキュベートしたとき、これらの標的細胞のいずれにおいても ADCC は誘導されなかった。

2.2.3.2 *In vitro* 機能アッセイ - CDC

ヒト血清中補体とともにインキュベートした標的細胞株におけるセミプリマブの CDC 活性増加能についても評価した。陽性対照抗体（リツキシマブ）を Raji 細胞とともにインキュベートしたとき、顕著かつ濃度依存的な CDC 反応が引き起こされ、最高濃度（100 nmol/L）で 90%を超える細胞傷害が認められた。この結果は公表文献(16)と一致している。一方、セミプリマブは Jurkat 細胞、CD3/CD28 刺激 Jurkat 細胞、HEK293/PD-1 細胞及び HEK293 細胞において CDC を媒介しなかった。また、hIgG4^{P} アイソタイプ対照抗体とともにインキュベートしたとき、これらの標的細胞株のいずれにおいても CDC は誘導されなかった。

2.2.3.3 *In vitro* 機能アッセイ - CIC C1q

組織内での抗体及び可溶性抗原の多量体化により CIC が形成され、それによって免疫複合体が形成された後、沈着部位で炎症反応及び組織障害が生じる可能性がある。大型の免疫複合体により血清中の補体成分 C1q タンパク質が活性化する可能性もある。これらの可能性について、セミプリマブ及び遺伝子組換え PD-1 タンパク質を用いて検討した。セミプリマブ + PD-1.mmH 溶液又は hIgG4^{P} アイソタイプ対照抗体 + PD-1.mmH 溶液のいずれにおいても C1q 結合は認められなかったが、対照の熱凝集ヒトγグロブリンの値は予想された範囲内であった。

2.2.4　ヒト初代培養 T 細胞活性化バイオアッセイにおけるセミプリマブの評価

[REGN2810-MX-14082] 試験（Module 4.2.1.1-4）

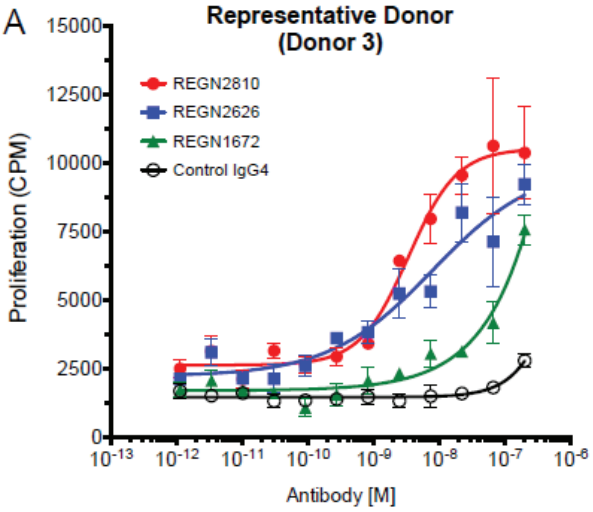
PD-L1 結合により誘導された受容体 PD-1 シグナル伝達に対するセミプリマブ及び対照抗体の機能的阻害能を評価するため、ヒト初代培養 T 細胞を用いた PD-1/PD-L1 バイオアッセイを構築した。hPBMC から新鮮単離したヒト初代培養 T 細胞を用いて受容体 PD-1 シグナル伝達阻害作用を評価した。ヒト初代培養 T 細胞バイオアッセイは、サイトカイン放出アッセイ、イムノビーズアッセイ及び FcγR1 を介した架橋時において、セミプリマブによる非特異的な T 細胞活性化の可能性を除外するためにも使用した。

2.2.4.1　ヒト初代培養 $CD4^+$ T 細胞バイオアッセイにおいて、セミプリマブは PD-1/PD-L1 の抑制シグナル伝達を阻害する

8 名の健康ドナー由来 hPBMC からヒト初代培養 $CD4^+$ T 細胞を単離し、あらかじめ活性化させて PD-1 発現を誘導した。ヒト $CD4^+$ T 細胞を HEK293/hCD20/hPD-L1 細胞及び抗 PD-1 抗体又は対照抗体の希釈系列（3.4 pmol/L～200 nmol/L）とともにインキュベートし、T 細胞を T 細胞活性化抗 CD3×CD20 二重特異性抗体（REGN1979）で刺激した。いずれの抗 PD-1 抗体もアイソタイプ対照抗体と比較して T 細胞の増殖を濃度依存的に促進し（図 10の A、代表的なドナー1 名のデータ）、EC_{50} の平均値及び中央値は同程度であった（図 10の B、ドナー全 8 名の表）。特記すべきこととして、PD-1 の阻害では、$CD4^+$ T 細胞を REGN1979 及び hPD-L1 非発現 HEK293/hCD20 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ことから、サイトカインストームが誘導される可能性は低いことが示唆された。

図 10 - ヒト初代培養 CD4+T 細胞／遺伝子組換え APC バイオアッセイにおいて、抗 PD-1 抗体は PD-1/PD-L1 の抑制シグナル伝達を阻害する

A



B

EC_{50} nM

Donor	REGN1672	REGN2626	REGN2810
1	2.5	2.5	0.82
2	7.4	2.5	2.5
3	7.4	2.5	2.5
4	7.4	2.5	2.5
5	7.4	2.5	2.5
6	2.5	7.4	0.82
7	7.4	2.5	2.5
8	2.5	2.5	0.82
Average	**5.56**	**3.11**	**1.87**
Median	**7.4**	**2.5**	**2.5**

96 ウェルプレートの各ウェルにおいて、1 × 10^5 個のヒト初代培養 $CD4^+$ T 細胞及び 5 × 10^4 個の HEK293/hCD20/hPD-L1 細胞に抗 PD-1 抗体の希釈系列を添加することにより、抗 PD-1 抗体の濃度反応曲線を作成した。RPMI + 10%ヒト血清培地を添加したプレートに細胞を播種した。次に REGN1979（T 細胞活性化二重特異性抗体）を一定濃度 2 nmol/L で添加し、プレートを 37°C で 72 時間インキュベートした。最後の 6～12 時間の増殖を ^{3}[H]-チミジン取込みにより測定した。T 細胞の増殖は各抗 PD-1 抗体により濃度依存的に亢進した。REGN2810（セミプリマブ）（**赤丸**）は PD-L1 の PD-1 への結合により阻害された T 細胞の活性化を回復させ、EC_{50} 値は対照抗体の REGN1672（一次配列がニボルマブと同一、**緑三角**）及び REGN2626（一次配列がペムブロリズマブと同一、**青四角**）と同程度であった。アイソタイプ対照抗体（**白丸**）では増殖の亢進は認められなかった。

2.2.4.2 ヒト PBMC サイトカイン放出アッセイにおけるセミプリマブのスーパーアゴニスト活性の有無の検討

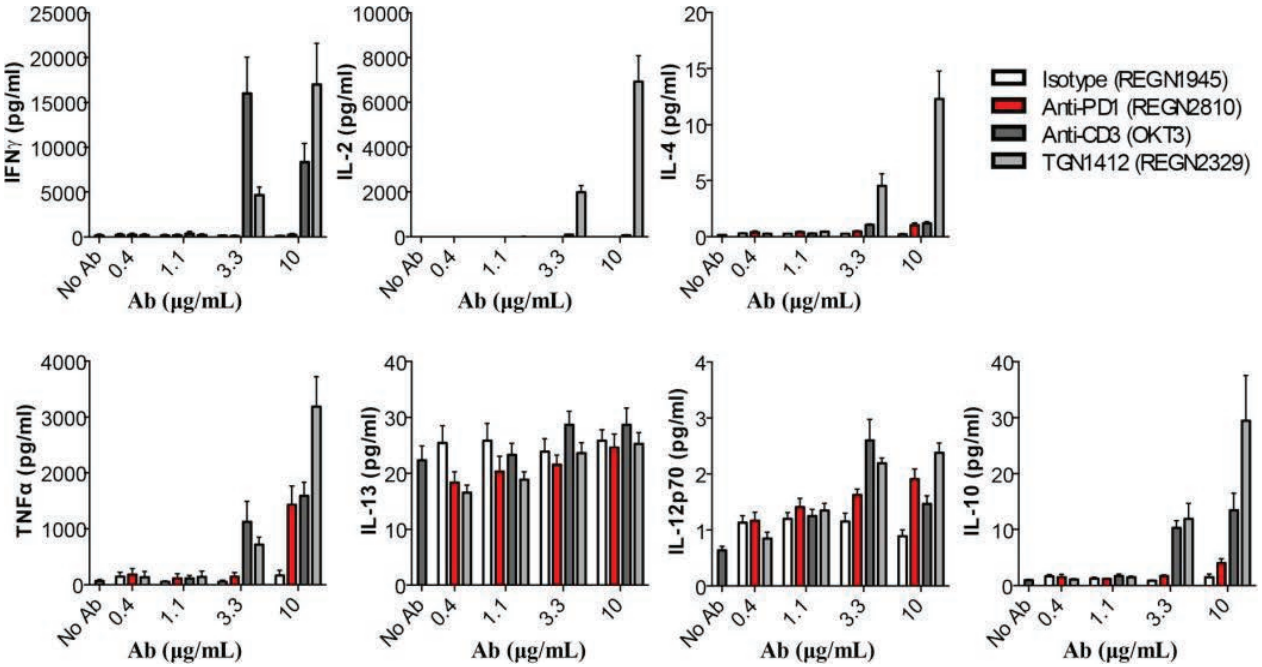
健康ドナー集団由来末梢血から単離した hPBMC とともにセミプリマブをインキュベートし、本抗体がスーパーアゴニスト活性を誘導するか否かを *in vitro* で検討した。インキュベーション条件は、過去に確立され、スーパーアゴニストである抗 CD28 mAb（TeGenero TGN1412）及び抗 CD3 mAb（OKT3 クローン）により誘導されるサイトカイン放出の測定に有効であることが立証されたものである(17)。最大反応を誘導するために、過去に確立された空気乾燥法を用いて、REGN2329（アミノ酸配列が $hIgG4^P$ 抗 CD28 スーパーアゴニスト抗体の TeGenero TGN1412 と同一）、抗 CD3 抗体（OKT3）及びセミプリマブをマイクロタイタープレートのウェルに固相化した。本アッセイにおいて REGN2329 及び抗 CD3 抗体（OKT3）の両方を陽性対照として使用した。

図 11に示すように、サイトカイン放出アッセイにおいて、セミプリマブ及びアイソタイプ対照抗体（REGN1945）のいずれも健康ヒトドナー由来 PBMC からの IL-2 及び IFNγ の放出を誘導しなかった。IL-2 及び IFNγ は、抗 CD28 スーパーアゴニスト抗体 TGN1412 の結合による T 細胞での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(17)。同様に、セミプリマブ又は REGN1945 で

コートしたウェルで hPBMC をインキュベートしたとき、TNFα、IL-12p70、IL-4、IL-10 及び IL-13 産生の亢進は認められなかった（10 µg/mL のセミプリマブによる TNFα 誘導を除く）。これらの結果から、セミプリマブは非特異的な T 細胞活性化及びサイトカイン放出を引き起こさないことが示された。本アッセイフォーマットで得られた値は、固相化した陽性対照抗体 REGN2329（一次配列が抗 CD28 スーパーアゴニスト抗体 TGN1412 と同一）及び抗 CD3 抗体（OKT3）で刺激したときに得られた値と同程度であった。

結論として、10 µg/mL での TNFα の誘導を除くと、セミプリマブでは検討した最高濃度においてもインキュベーションによるサイトカイン濃度の増加は認められなかったが、陽性対照スーパーアゴニスト抗体の抗 CD28 抗体（REGN2329）及び抗 CD3 抗体（OKT3）では強いサイトカイン反応が認められた。

図 11 - ヒト PBMC をセミプリマブ、REGN2329（TGN1412）及び抗 CD3 抗体（OKT3）に曝露したときのサイトカイン放出

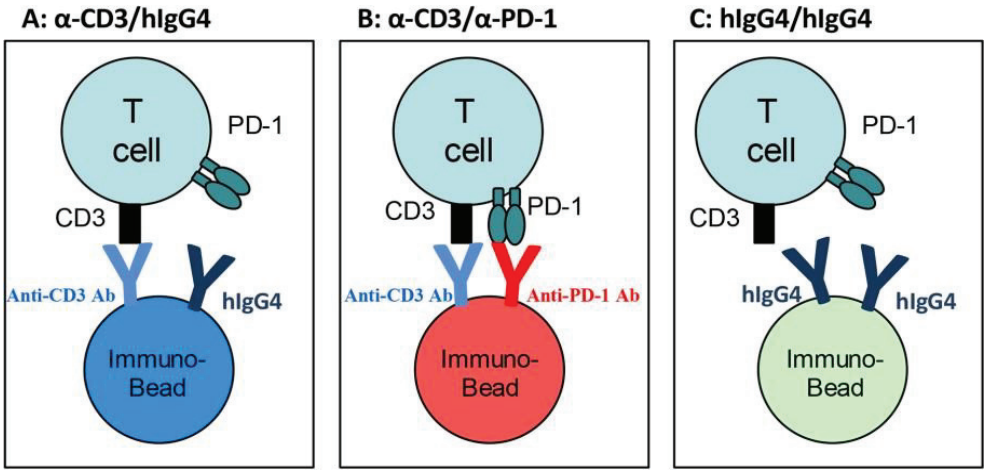


12 名の健康ドナー由来末梢血の白血球パック（NY Blood Center）から PBMC を、Ficoll-Paque PLUS（GE Healthcare 17-1440-03）を用いた密度勾配遠心法により単離した。ウェルに抗体を固相化した 96 ウェルマイクロタイタープレートにおいて PBMC（125,000 細胞/ウェル）を 37°C、5% CO_2 で 18 時間インキュベートした。REGN2810（セミプリマブ）（抗 PD-1 抗体、hIgG4^P）、REGN2329（TGN1412、陽性対照）、抗 CD3 抗体（Biolegend OKT3 クローン、陽性対照）及び REGN1945（同じ hIgG4^P アイソタイプの陰性対照）を既報(17)のように空気乾燥法を用いて固相化した。PBMC を抗体とともに 18 時間インキュベートした。IL-2、IFNγ、TNFα、IL-12p70、IL-4、IL-10 及び IL-13 の値（pg/mL）は、12 名のドナー由来 PBMC の平均値 ± SEM を示す。

2.2.4.3 初代培養 CD4+ T 細胞イムノビーズアッセイにおける T 細胞活性化に対するセミプリマブコートビーズの作用

非特異的な T 細胞活性化に対するセミプリマブの作用を検討するため、図 12に要約する PD-1 イムノビーズアッセイを構築した。Dynabeads M-450 Tosylactivated（Invitrogen）を等量の抗 CD3 抗体（R&D、クローン UCHTI）＋セミプリマブ又は抗 CD3 抗体＋hIgG4P アイソタイプ対照抗体（REGN1945）のいずれかでコートした。陰性対照として、Dynabeads を REGN1945 のみでコートした。漸増濃度の溶液相抗 CD28 mAb（BD クローン 28.2）の存在下で、イムノビーズを新鮮単離ヒト初代培養 CD4+ T 細胞とともに 37°C で 72 時間インキュベートしたときの細胞増殖を指標として T 細胞の活性化を測定した。細胞増殖は ^{3}[H]-チミジン取込みによりモニタリングした。

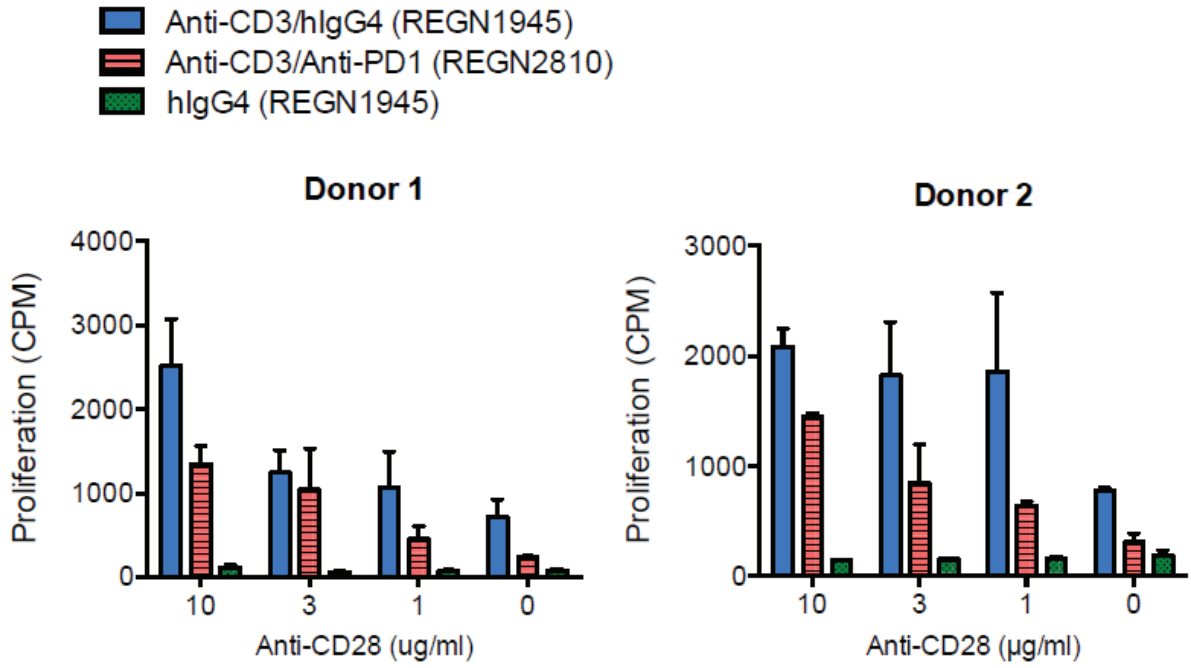
図 12 - ヒト初代培養 CD4+ T 細胞の抗 CD3／抗 PD-1 イムノビーズアッセイ



イムノビーズ：Dynabeads M-450 Tosylactivated（Invitrogen）を製造業者の手順書に従って同じ濃度の抗体でコートした。**パネル A**：抗 CD3 抗体（R&D クローン UCHTI）+ hIgG4P アイソタイプ対照抗体（REGN1945）。**パネル B**：抗 CD3 抗体（R&D クローン UCHTI）+ 抗 PD-1 抗体（セミプリマブ）。**パネル C**：hIgG4P アイソタイプ対照抗体のみ（陰性対照）。

図 13に示すように、溶液相抗 CD28 抗体は、抗 CD3 抗体コートビーズにより誘導される CD4+ T 細胞の増殖を濃度依存的に促進した。抗 CD3 抗体コートビーズ上にセミプリマブが存在すると、抗 CD3 抗体＋アイソタイプ対照抗体でコートしたビーズと比較して、T 細胞活性化が抑制された。可溶性抗 CD28 mAb の非存在下及び存在下において、セミプリマブは T 細胞の増殖を誘導及び促進しなかった。

図 13 - ヒト初代培養 CD4+ T 細胞／イムノビーズバイオアッセイにおける T 細胞の活性化



イムノビーズ（Dynabeads M-450 Tosylactivated、Invitrogen）を抗 CD3 抗体（R&D クローン UCHTI）+ hIgG4^{P} アイソタイプ対照抗体 REGN1945（**青色棒**）、抗 CD3（R&D クローン UCHTI）+ 抗 PD-1 セミプリマブ（**横線模様の赤色棒**）又は hIgG4^{P} アイソタイプ対照抗体 REGN1945 のみ(陰性対照、**緑色棒**)でコートした。ビーズを PBS で洗浄した後、2 名の健康ドナー由来初代培養 CD4+ T 細胞とともにインキュベートした。グラフに示すように、培地中において漸増濃度の可溶性抗 CD28 mAb（BD クローン 28.2）の存在下でビーズと T 細胞を 1:1 の比で混合した。72 時間のインキュベーションにおいて最後の 6～12 時間の増殖を ^{3}[H]-チミジン取込みにより 37°C で測定した。可溶性抗 CD28 mAb は T 細胞活性化を濃度依存的に促進した。

2.2.4.4 ヒト初代培養 CD8+ T 細胞／遺伝子組換え APC バイオアッセイにおける T 細胞活性化に対する可溶性セミプリマブ及び FcγR1 で架橋されたセミプリマブの作用

架橋を形成しているセミプリマブの作用を評価するため、第 2 世代バイオアッセイ（2.2.2.4項）用に遺伝子組換えにより膜結合型抗 CD3 抗体を発現させた HEK293 細胞（HEK293/anti-CD3）について、更に遺伝子組換えを行い、高親和性 FcγR1 を発現させた（HEK293/anti-CD3/FcγR1）。FcγR1 の組込みにより、試験抗体と CD8+ T 細胞が架橋を形成する。CD8+ T 細胞の活性化を ^{3}[H]-チミジン取込みにより測定するため、精製した初代培養 CD8+ T 細胞とのインキュベーションを行う前に、HEK293 細胞株（HEK293、HEK293/anti-CD3、HEK293/anti-CD3/FcγR1）をマイトマイシン C で処理した。2 nmol/L のセミプリマブ、REGN2329（一次配列が抗 CD28 スーパーアゴニスト抗体 TGN1412 と同一）又は REGN1945 の存在下で細胞をインキュベートした。陰性対照として、各抗体の存在下で、4 名のドナー由来ヒト初代培養 CD8+ T 細胞を野生型 HEK293 親細胞と混合して測定したところ、予想どおり CD8+ T 細胞の増殖は認められなかった。HEK293 細胞（HEK293/anti-CD3）における膜結合型抗 CD3 抗体の発現により低度の増殖が誘導され、REGN2329 はこれを大幅に促進した。一方、セミ

プリマブはこれらの条件下で $CD8^+$ T 細胞の増殖を誘導及び促進しなかった。同様に、膜結合型抗 CD3 抗体及び高親和性 FcγR1 を共発現している HEK293 細胞（HEK293/anti-CD3/FcγR1）は $CD8^+$ T 細胞の増殖を誘導し、REGN2329 はこれを促進したが、セミプリマブは促進しなかった。総合すると、これらの結果から、陽性対照（REGN2329）とは異なり、セミプリマブは非特異的な T 細胞増殖を誘導しないことが示された。

2.3 *In vivo* 薬理

セミプリマブはマウス PD-1 には結合しないため（2.1項）、遺伝子組換えによりマウス *Pdcd1* 遺伝子座由来ヒト／マウス PD-1 キメラ受容体を発現させた huPD-1 マウスを用いて同系結腸直腸癌腫瘍（MC38.Ova）の増殖に対するセミプリマブの作用を検討した（REGN2810-MX-14081）。このヒト／マウス PD-1 キメラ受容体は、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である。huPD-1 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。huPD-1 を用いた 2 つの独立した試験において、MC38.Ova 異種移植腫瘍の増殖及びマウスの生存に対するセミプリマブ並びに抗 PD-1 対照抗体の 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）の作用を、2.3.1項（セミプリマブ及び REGN1672）では 5 及び 10 mg/kg の用量で、2.3.2項（セミプリマブ、REGN1672 及び REGN2626）では 2.5 及び 5 mg/kg の用量で検討した。両試験において、対照マウスにはアイソタイプ対照抗体（REGN1945）を腹腔内（IP）投与した。抗体は 3、7、10、13（1 回目試験）、14（2 回目試験）及び 17 日目に IP 投与した。

2.3.1 PD-1 ヒト化マウスにセミプリマブを 5 及び 10 mg/kg の用量で投与したときの抗腫瘍効果

[REGN2810-MX-14081] 試験（Module 4.2.1.1-5）

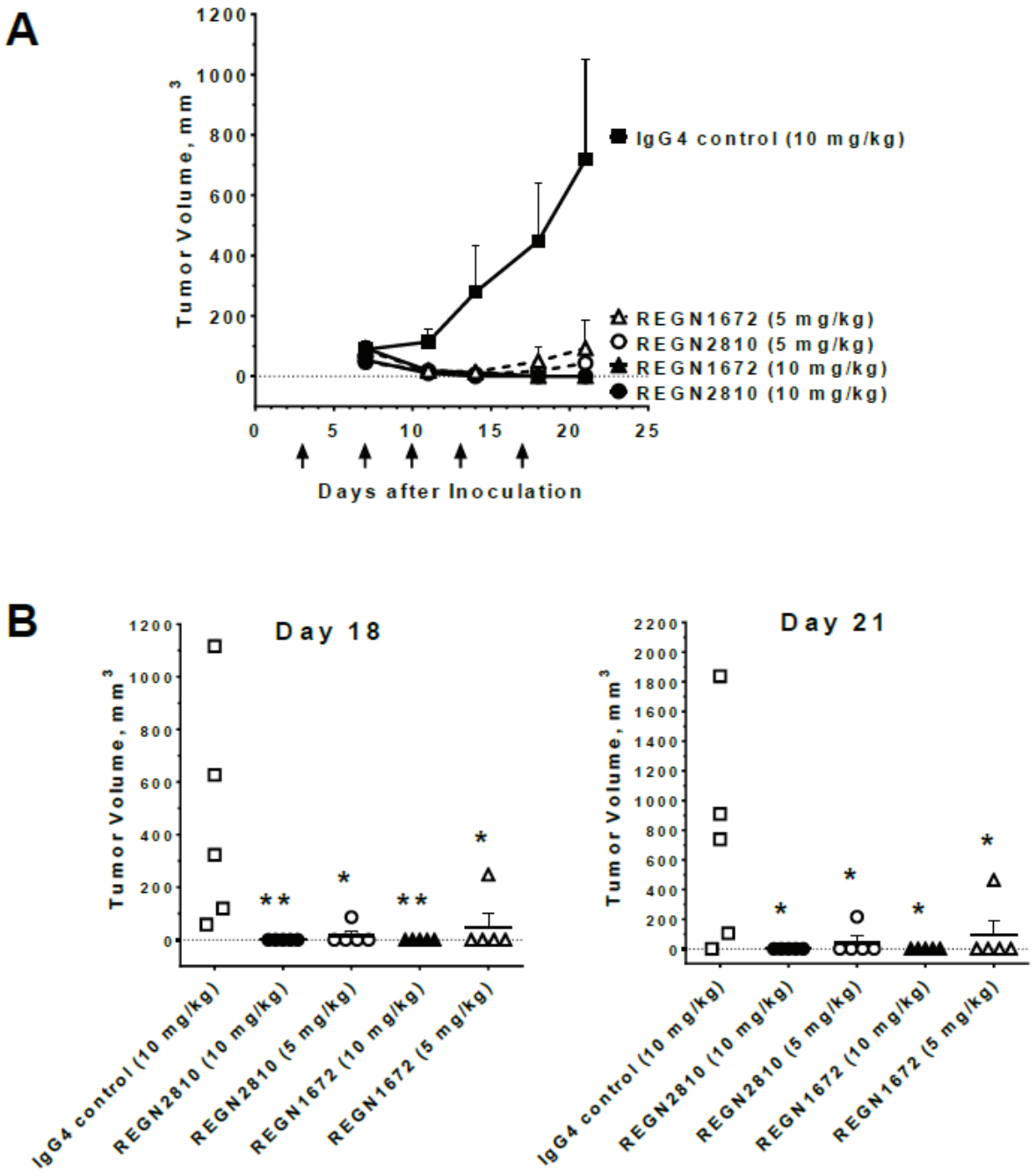
セミプリマブは huPD-1 マウスにおける MC38.Ova 腫瘍の増殖を強力に阻害した。セミプリマブ又は REGN1672 の 10 mg/kg 群では投与期間中に 5 例中 5 例（100%）で完全な腫瘍退縮が認められたが、$IgG4^P$ アイソタイプ対照抗体群で腫瘍が認められなかったのは 5 例中 1 例（20%）のみであり、この 1 例では腫瘍が自然に退縮した（表 3、図 14）。セミプリマブ及び REGN1672 の 5 mg/kg 群でも腫瘍退縮促進効果が認められた。両 5 mg/kg 群で 21 日目に腫瘍が認められなかったのは 5 例中 4 例（80%）であった（表 3）。REGN1945 投与群と比較して、セミプリマブ及び REGN1672 投与群の腫瘍容積に統計学的に有意な差が認められた（18 日目に 5 mg/kg 群で $p<0.05$、10 mg/kg 群で $p<0.01$、21 日目に 4 つの全ての投与群で $p<0.05$）（それぞれ図 14の B 及び C）。

表 3 - セミプリマブは 5 及び 10 mg/kg の用量で PD-1 ヒト化マウスにおける MC38.Ova 腫瘍の増殖を阻害する

抗体	腫瘍容積平均値(SEM[a])(mm^3)				腫瘍が認められないマウス (n/N)	
	18日目		21日目		21日目	
	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
REGN1945	NT[b]	449 (194)	NT	718 (330)	NT	1/5 (20%)
セミプリマブ	17 (17)	0 (0)	43 (43)	0 (0)	4/5 (80%)	5/5 (100%)
REGN1672	50 (50)	0 (0)	93 (93)	0 (0)	4/5 (80%)	5/5 (100%)

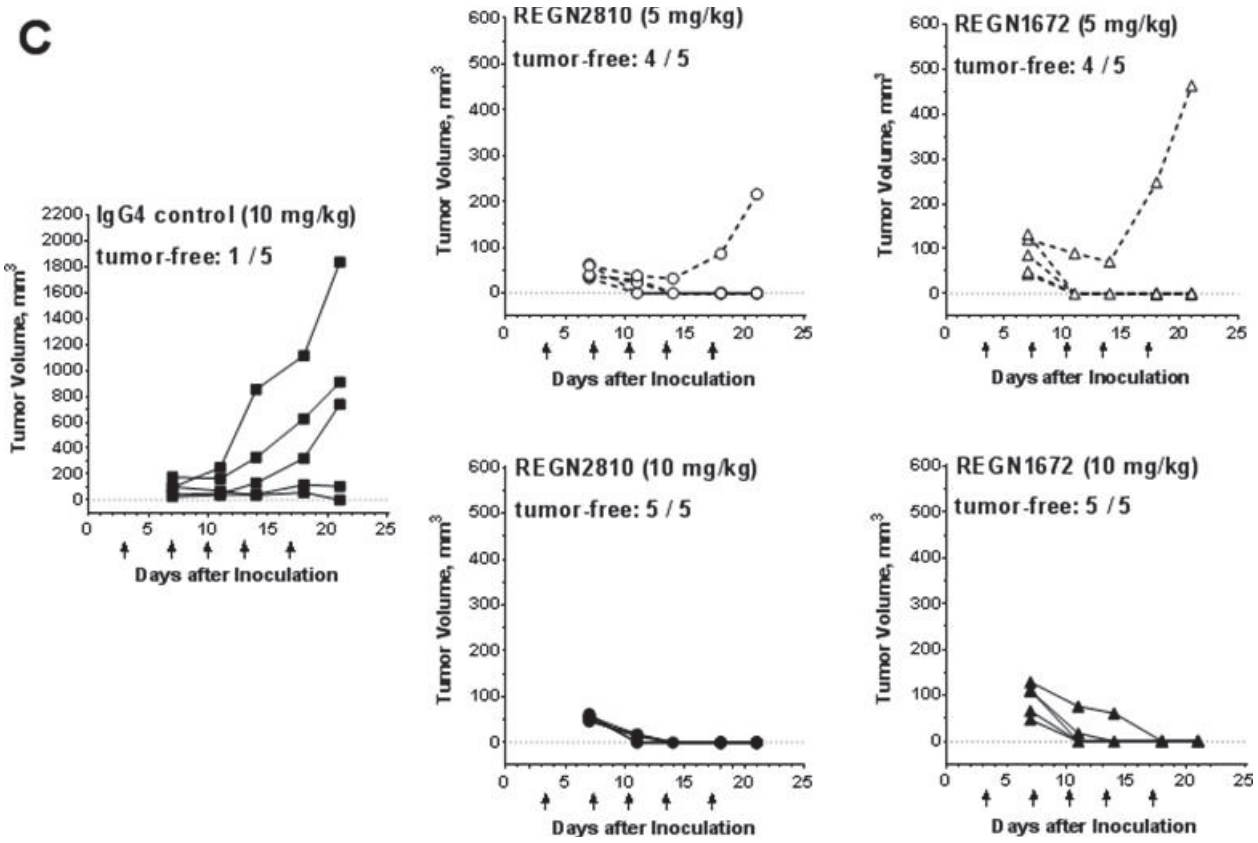
a 平均値の標準誤差
b 検討せず

図 14 - セミプリマブは 5 及び 10 mg/kg の用量で PD-1 ヒト化マウスにおける MC38.Ova 腫瘍の増殖を阻害する



パネル A）腫瘍移植後の複数の時点における各投与群のマウスの平均腫瘍容積（mm^3±SEM）を示す。3、7、10、13 及び 17 日目に抗体の腹腔内投与を行い、これを矢印で示す。**パネル B）**移植後 18 及び 21 日目に測定された各投与群の各マウスの個体別腫瘍容積を示す。統計学的有意性は一元配置 ANOVA 後の Dunnett の多重比較検定で検討した（*p<0.05、**p<0.01）。**パネル A 及び B）**REGN2810（セミプリマブ）：5 mg/kg（**白丸**）、10 mg/kg（**黒丸**）；REGN1672：5 mg/kg（**白三角**）、10 mg/kg（**黒三角**）；10 mg/kg アイソタイプ対照抗体 REGN1945（**パネル A は黒四角、パネル B は白四角**）。

図 14 - セミプリマブは 5 及び 10 mg/kg の用量で PD-1 ヒト化マウスにおける MC38.Ova 腫瘍の増殖を阻害する（続き）



パネル C）21 日間の投与期間における各群の各マウスの個体別腫瘍容積を示す。各群において 21 日目に腫瘍が認められなかったマウスの数（n/N）を示す。REGN2810（セミプリマブ）：5 mg/kg（**白丸**）、10 mg/kg（**黒丸**）；REGN1672：5 mg/kg（**白三角**）、10 mg/kg（**黒三角**）；10 mg/kg アイソタイプ対照抗体 REGN1945（**黒四角**）。

2.3.2 PD-1 ヒト化マウスにセミプリマブを 2.5 及び 5 mg/kg の用量で投与したときの抗腫瘍効果

[REGN2810-MX-14081] 試験（Module 4.2.1.1-5）

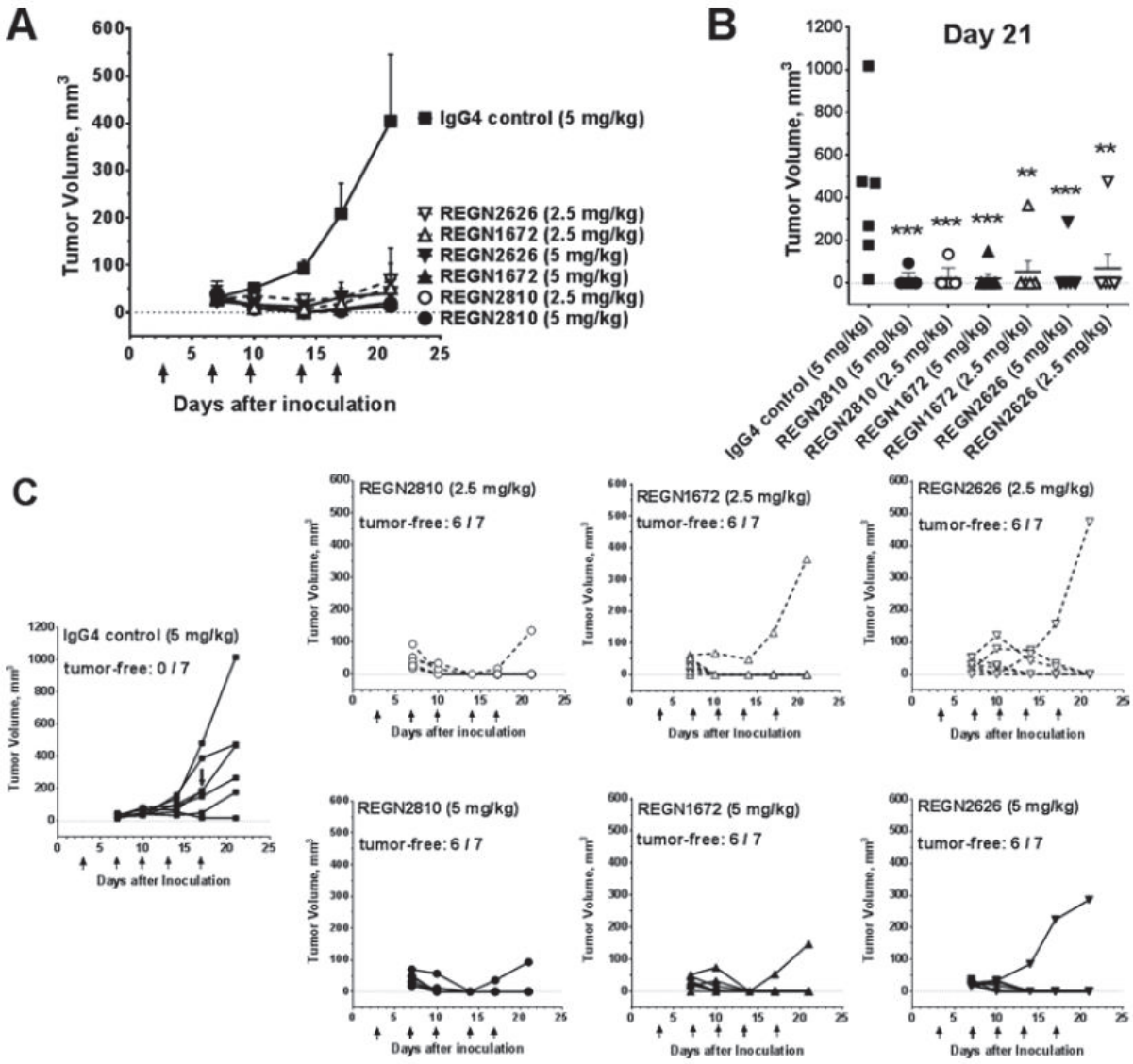
セミプリマブは huPD-1 マウスにおける MC38.Ova 腫瘍の増殖を強力に阻害し、2.5 及び 5 mg/kg の両用量で同程度の効果が認められた。セミプリマブ、REGN1672 又は REGN2626 の 2.5 mg/kg 群では投与期間中に 7 例中 6 例（85.7%）で完全な腫瘍退縮が認められた。3 つの全ての抗体について、5 mg/kg 群でも 7 例中 6 例（85.7%）で完全な腫瘍退縮が認められた。一方、5 mg/kg のアイソタイプ対照群で腫瘍が認められなかったのは 7 例中 0 例（0%）であった（図 15の C、表 4）。アイソタイプ対照群と比較して、セミプリマブ、REGN1672 及び REGN2626 投与群の腫瘍容積に有意な減少が認められた。p 値（投与群対対照群）は、REGN1672 及び REGN2626 の 2.5 mg/kg 群で $p<0.01$ であったのを除き、$p<0.001$ であった（図 15の B）。

表 4 - セミプリマブは 2.5 及び 5 mg/kg の用量で PD-1 ヒト化マウスにおける MC38.Ova 腫瘍の増殖を阻害する

抗体	**腫瘍容積平均値(SEM[a])(mm^3)**		**腫瘍が認められないマウス (n/N)**	
	21日目		21日目	
	2.5 mg/kg	5 mg/kg	2.5 mg/kg	5 mg/kg
REGN1945	NT[b]	405 (142)	NT	0/7 (0%)
セミプリマブ	19 (19)	13 (13)	6/7 (85.7%)	6/7 (85.7%)
REGN1672	52 (52)	21 (21)	6/7 (85.7%)	6/7 (85.7%)
REGN2626	68 (68)	41 (41)	6/7 (85.7%)	6/7 (85.7%)

a 平均値の標準誤差
b 検討せず

図 15 - セミプリマブは 2.5 及び 5 mg/kg の用量で PD-1 ヒト化マウスにおける MC38.Ova 腫瘍の増殖を阻害する



パネル A）腫瘍移植後の複数の時点における各投与群のマウスの平均腫瘍容積（mm^3±SEM）を示す。3、7、10、13 及び 17 日目に抗体の腹腔内投与を行い、これを矢印で示す。**パネル B）**移植後 21 日目に測定された各投与群の各マウスの個体別腫瘍容積を示す。統計学的有意性は一元配置 ANOVA 後の Dunnett の多重比較検定で検討した（**p<0.01、***p<0.001）。**パネル C）**21 日間の投与期間における各群の各マウスの個体別腫瘍容積を示す。各群において 21 日目に腫瘍が認められなかったマウスの数（n/N）を示す。アイソタイプ対照抗体投与群の 1 例は 17 日目（矢印で示す）に死亡発見された。**パネル A～C）**REGN2810（セミプリマブ）：2.5 mg/kg（**白丸**）、5 mg/kg（**黒丸**）；REGN1672：2.5 mg/kg（**白三角**）、5 mg/kg（**黒三角**）；REGN2626：2.5 mg/kg（**逆白三角**）、5 mg/kg（**逆黒三角**）；5 mg/kg アイソタイプ対照抗体（**黒四角**）。

3　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

4 安全性薬理試験

セミプリマブの独立した安全性薬理試験は実施しなかった。代わりに、カニクイザルを用いたセミプリマブ（2、10 又は 50 mg/kg/週）の 4 週間反復 IV 投与毒性試験及び 8 週間回復性試験並びに 26 週間反復 IV 投与毒性試験及び 12 週間回復性試験に安全性薬理評価項目を組み込んだ（Module [2.6.6.3]）。これには、体外ジャケット式テレメトリー（JET）による（ECG での）心伝導及び血行動態（心拍数及び血圧）の評価（4.2項）、呼吸数（回/分）の評価（4.3項）並びに神経学的検査による CNS 評価（4.1項）が含まれた。毒性試験において、摂餌量及び体重に、本薬に関連する影響は認められなかった。

4.1 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 関連の一般状態の変化及び体温の変化は認められなかった（Module 2.6.6.3）。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。一般状態の観察は投与期間に 1 日 1 回以上行った。試験期間中、詳細な身体検査を週 1 回以上行った。

4.2 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 ECG パラメータの変化は認められなかった（Module 2.6.6.3）。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。

4.3 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の変化は認められなかった（Module 2.6.6.3）。評価は4.1項に記載の一般状態観察と同時に行った。

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ていない。

6　考察及び結論

PD-1 は活性化 T 細胞に存在する抑制性チェックポイント受容体であり、PD-L1 又は PD-L2 リガンドへの結合によって刺激されると免疫応答を下方調節する。PD-1 による免疫応答の下方調節は、通常、持続的な抗原刺激の存在下で起こり、T 細胞活性化、免疫寛容及び免疫を介した組織障害の間のバランスを制御している。PD-1/PD-L1 シグナル伝達経路の阻害により抗腫瘍免疫応答が増強することが複数のがん種で示されている(7)(8)。

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、プレートにコートされたヒト PD-L1 又はヒト PD-L2 に対する PD-1 の結合を同程度の IC_{50} 値で阻害する。セミプリマブはラット及びマウスの PD-1 には結合しない。T 細胞を用いた *in vitro* バイオアッセイにおいて、セミプリマブは PD-1/PD-L1 を介した抑制シグナル伝達を阻害することにより TCR 活性を回復させ、ヒト初代培養 T 細胞／遺伝子組換え APC アッセイにおいて、非特異的な T 細胞活性化を引き起こすことなく、T 細胞の増殖を回復させた。遺伝子組換え huPD-1 マウスを用いた予防的同系腫瘍モデルにおいて、セミプリマブは 2.5～10 mg/kg の用量範囲で腫瘍退縮を効果的に促進した。

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示さなかった。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。

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 hPBMC 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信頼できる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。抗 CD28 アゴニスト抗体により T 細胞を活性化する第 2 のアッセイにおいて、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、抗 CD3 抗体（セミプリマブなし）コートビーズ（増殖を促進した）と比較して T 細胞の増殖が抑制された。本アッセイにおいて、セミプリマブは、単独及び抗 CD28 アゴニスト抗体の存在下で T 細胞増殖に対する作用を示さず、ヒト初代培養 $CD4^+$ T 細胞の非特異的な活性化を誘導しなかった。

遺伝子組換えにより CD20 及び PD-L1 を発現させた HEK293 細胞の存在下で抗 CD3×CD20 二重特異性抗体の使用により T 細胞を活性化する *in vitro* アッセイにおいて、セミプリマブは T 細胞の増殖を濃度依存的に回復させたが、PD-L1 を発現していない CD20 発現 HEK293 細胞の存在下で実施したときと同程度にしか回復させなかった。

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、50 mg/kg/週までの用量で週 1 回最長 6 か月間投与したとき、血圧及び ECG に、セミプリマブに関連する変化は認められず、心血管系、呼吸系及び CNS の障害を示すいかなる機能的及び解剖学的エビデンスも認められなかった。

要約すると、セミプリマブはヒト及びカニクイザルの両方の PD-1 に高い親和性で結合し、PD-1/PD-L1 による T 細胞の抑制シグナル伝達を阻害した。セミプリマブの PD-1 に対する結合親和性はカニクイザルとヒトで同程度であったことから、サルを用いて安全性を検討することが支持され、サルに本薬を反復投与したときの忍容性は良好であった。セミプリマブは非特異的な T 細胞活性化を誘導せず、hPBMC からのサイトカイン放出にほとんど影響を及ぼさず、huPD-1 マウスを用いた同系腫瘍モデルにおいて MC38.Ova 腫瘍の増殖を強力かつ用量依存的に阻害したことから、がん患者を対象として臨床で評価することが支持される。

参 考 文 献

1. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. Science. 2013;342:1432-3.
2. Lohmueller J, Finn OJ. Current modalities in cancer immunotherapy: Immunomodulatory antibodies, CARs, and vaccines. Pharmacol Ther. 2017;178:31-47.
3. 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.
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. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol. 2008;8:467-77.
7. Balar AV, Weber JS. PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer:current status and future directions. Cancer Immunol Immunother. 2017;66:551-64.
8. Bersanelli M, Buti S. From targeting the tumor to targeting the immune system: Transversal challenges in oncology with the inhibition of the PD-1/PD-L1 axis. World J Clin Oncol. 2017;8:37-53.
9. Tran E, Robbins PF, Rosenberg SA.' Final common pathway' of human cancer immunotherapy: targeting random somatic mutations. Nature Immunol. 2017;18:255-62.
10. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science. 2015;348:124-8.
11. Yarchoan M, Johnson III BA, Lutz ER, Laheru DA, Jaffee EM. Targeting neoantigens to augment antitumor immunity. Nat Rev Cancer. 2017;17:209-22.
12. Freeman AN, Bridge JA, Maruthayanar P, Overgaard NH, Jung JW, Simpson F, et al. Comparative immune phenotypic analysis of cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Intraepidermal Carcinoma in immune-competent individuals: proportional representation of CD8+ T-cells but not FoxP3+ Regulatory T-cells is associated with disease stage. PloS ONE. 2014;9:e110928.
13. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. N Engl J Med. 2013;369:122-33.
14. 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.

15. Janeway CJ, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: The immune system in health and disease. New York: Garland Science; 2001.
16. Gazzano-Santoro H, Ralph P, Ryskamp TC, Chen AB, Mukku VR. A non-radioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody. J Immunol Meth. 1997;202:163-71.
17. 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.

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

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 17

目　　次

2.6.3 薬理試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　薬理試験一覧表 4

2　　効力を裏付ける試験 - Binding Affinity (SPR-Biacore) 8

3　　効力を裏付ける試験 - In Vitro Pharmacology 10

4　　効力を裏付ける試験 - In Vivo Pharmacology 13

5　　副次的薬理試験 15

6　　安全性薬理試験 16

7　　薬力学的薬物相互作用試験 17

表　目　次

表2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program 4

表2.6.3.2 - Primary pharmacodynamics - Binding Affinity (SPR-Biacore) 8

表2.6.3.3 - Primary pharmacodynamics - In Vitro Pharmacology 10

表2.6.3.4 - Primary pharmacodynamics - In Vivo Pharmacology..... 13

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Test Article: RGEN2810

Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics			
Determination of the equilibrium binding constant for the interaction of REGN2810 with PD-1 from human and non-human species	Using surface plasmon resonance (SPR)-Biacore™, REGN2810 was captured onto an immobilized anti-human Fcγ antibody sensor chip surface and recombinant C-terminal myc-myc-hexahistidine tagged human PD-1(hPD-1.mmH), hPD-1.mFc and MfPD-1m.Fc were injected over the REGN2810-captured surface. Similar versions of PD-1 from cynomolgus monkey (*M. fascicularis*), rat and mouse were also analyzed. Studies were conducted at pH 7.4 and 25°C. Using identical assay conditions, the binding parameters were determined for comparator PD-1 antibodies REGN1672 (primary sequence identical to nivolumab) and REGN2626 (primary sequence identical to pembrolizumab) generated in-house based on publicly available sequences.	[redacted]	[REGN2810-MX-14078] (Module 4.2.1.1-1)
Determination of the ability of REGN2810 to block binding of human and monkey PD-1 to human PD-L1 and PD-L2 by ELISA	A blocking ELISA was used to demonstrate that REGN2810 can prevent binding of human (hPD-1.mFc) and cynomologus monkey (mfPD-1.mFc) recombinant PD-1 proteins to either human PD-L1 or human PD-L2 coated onto the surface of microtiter plates. A second ELISA format was used to compare REGN2810 alongside REGN1672 and REGN2626 for blocking the binding of biotin-hPD-1.hFc to plate-coated human PD-L1.	[redacted]	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)
Determination of the ability of REGN2810 to antagonize PD-1/PD-L1 signaling in a T cell/PD-1/AP-1 Luc and Raji/PD-L1 cell-based bioassay	A first generation PD-1 bioassay was developed using Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1- Luc and Raji/PD-L1 cells to measure the ability of REGN2810 to antagonize PD- 1/PD-L1 signaling and rescue T cell activation following addition of a T cell activating bispecific antibody, REGN2281.	[redacted]	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)
Evaluation of the agonist activity of REGN2810 in a cell-based bioassay using T cell/PD-1/AP-1 Luc and native Raji cells that do not express PD-L1	To determine if REGN2810 binding produced an agonist effect on PD-1, Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1-Luc and native Raji cells were stimulated with REGN2281. Native Raji cells do not express PD-L1, so any PD-1 signaling observed results from an agonist effect on PD-1. Under identical assay conditions, comparator antibodies REGN1672 and REGN2626 were tested alongside REGN2810.	[redacted]	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program（続き）

Test Article: RGEN2810

Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number
Evaluation of REGN2810 to antagonize PD-1/PD-L1 signaling in a second- generation cell-based PD-1 bioassay using Jurkat/PD-1/AP-1-Luc cells and HEK293 cells expressing PD-L1 and a membrane-bound IgE with anti-CD3 variable domains, Igα and Igβ (HEK293/mIgE/PD-L1)	A second-generation PD-1 bioassay was developed that better mimics the TCR/MHC interaction that subsequently triggers TCR activation and signaling. The assay was used to measure the ability of REGN2810 to antagonize PD-1/PD-L1 signaling. The assay uses Jurkat/PD-1/AP-1-Luc cells that express a full-length PD- 1 receptor. HEK293 cells were modified to generate an APC-like cell line (HEK293/mIgE/PD-L1). These cells express both PD-L1 and a membrane bound IgE antibody (mIgE) with anti-CD3 variable domains via transduction with anti- CD3 mIgE heavy chain, anti-CD3 kappa light chain, Igα (CD79a) and Igβ (CD79b). The anti-CD3 mIgE on HEK293 clusters CD3 on Jurkat cells resulting in TCR activation.	[redacted]	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)
Evaluation of PD-1 agonist activity of REGN2810 in a second-generation PD-1 bioassay using Jurkat/PD-1/AP-1 Luc and HEK293/mIgE cells that do not express PD-L1. HEK293/mIgE cells express a membrane-bound IgE with anti-CD3 variable domains, Igα and Igβ	To determine if REGN2810 binding produced an agonist effect on PD-1, Jurkat/PD-1/AP-1-Luc cells were incubated with HEK293/mIgE cells that do not express PD- L1. HEK293/mIgE cells express a membrane-bound IgE with anti-CD3 variable domains, Igα and Igβ. Following REGN2810 binding to PD-1 in this assay, any agonist effect would induce PD-1 inhibitory signaling and produce a decrease in cell-based luciferase activity.	[redacted]	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)
Evaluation of circulating immune complex (CIC) formation for REGN2810	Soluble recombinant C-terminal myc-myc-hexahistidine tagged human PD-1 (PD-1.mmH) incubated with REGN2810 was analyzed for CIC activity by monitoring for immune complex binding to C1q by ELISA.	[redacted]	[REGN2810-MX-14080] (Module 4.2.1.1-3)
Evaluation of Fc effector functions for REGN2810	In vitro cell-based assays were developed for measurement of ADCC and CDC using HEK293 cells engineered to express PD-1 (HEK293/PD-1). Surface expression of PD-1 on HEK293/PD-1 cells was confirmed by flow cytometry.	[redacted]	[REGN2810-MX-14080] (Module 4.2.1.1-3)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program（続き）

Test Article: RGEN2810

Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number
Effect of 5 mg/kg and 10 mg/kg REGN2810 antibody treatment on MC38.Ova mouse colorectal carcinoma tumor growth in PD-1 humanized mice	Immunocompetent PD-1$^{hum/hum}$ mice (PD-1 humanized mice) were generated using VelociGene® technology. The effect of 5 mg/kg and 10 mg/kg doses of REGN2810 administered by IP injection on MC38.Ova tumor growth in humanized PD-1 mice was evaluated for 21 days. Tumor volumes were evaluated twice weekly by caliper measurement and REGN2810 results were statistically compared to 10 mg/kg REGN1945 isotype control antibody treated mice. Evaluation of REGN1672 (was also completed at both dosages.	[redacted]	[REGN2810-MX-14081] (Module 4.2.1.1-5)
Effect of 2.5 mg/kg and 5 mg/kg REGN2810 antibody treatment on MC38.Ova mouse colorectal carcinoma tumor growth in PD-1 humanized mice	Immunocompetent PD-1$^{hum/hum}$ mice (PD-1 humanized mice) were generated using VelociGene® technology. The effect of 2.5 mg/kg and 5 mg/kg REGN2810 administered by IP injection on MC38.Ova tumor growth in humanized PD-1 mice was evaluated for 21 days. Tumor volumes were evaluated twice weekly by caliper measurement and REGN2810 results were statistically compared to 5 mg/kg REGN1945 isotype control antibody treated mice. Comparator antibodies, REGN1672 and REGN2626, were evaluated alongside REGN2810 at the same dosages.	[redacted]	[REGN2810-MX-14081] (Module 4.2.1.1-5)
Determine the ability of REGN2810 to block PD-1/PD-L1 inhibitory signaling in a primary human CD4$^+$ T cell/engineered APC bioassay for T cell proliferation	Human CD4$^+$ T cells were isolated from healthy human PBMC donors and CD4$^+$ T cells were pre-activated with human T-activator CD3/CD28 beads to induce PD-1 expression. HEK293 cells were engineered to express human CD20 and full-length human PD-L1. HEK293/hCD20/hPD-L1 cells were incubated with primary CD4$^+$ T cells plus varying concentrations of anti-PD-1 antibody and 2nM bispecific (CD3xCD20) antibody (REGN1979). T cell activation was measured by proliferation based on incorporation of tritiated thymidine.	[redacted]	[REGN2810-MX-14082] (Module 4.2.1.1-4)
Investigate the potential agonist activity of immobilized REGN2810 in a human PBMC cytokine release assay using dry- coated antibody	Varying concentration of anti-PD-1 antibodies were immobilized to wells of a microtiter plate using the air-dry method. PBMCs from 12 individual donors were added to wells and cultured for 18 hours. PBMC culture supernatants were collected and IL-2, IFNγ, TNFα, IL-12p70, IL-4, IL-10 and IL-13 cytokines were measured using MSD-Spot Assay System Proinflammatory Panel 1 kit.	[redacted]	[REGN2810-MX-14082] (Module 4.2.1.1-4)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program（続き）

Test Article: RGEN2810

Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number
Determine the effect of bead-coated REGN2810 on T cell activation in a primary human CD4+ T cell/immune-bead bioassay	To determine if cross-linking of REGN2810 to primary human CD4+ T cells induces a non-specific T cell activation in an immune-bead assay. Dynabeads M-450 Tosyl activated beads were coated with equivalent amounts of anti-CD3 and anti-PD-1 antibody or anti-CD3 and isotype control antibody. Freshly isolated CD4+ T cells from 2 different donors were incubated with dynabeads in the presence of increasing concentrations of soluble anti-CD28 mAb. T cell activation was measured by proliferation based on incorporation of tritiated thymidine.	[redacted]	[REGN2810-MX-14082] (Module 4.2.1.1-4)
To evaluate the effect of solution phase and cross-linked REGN2810 on T cell activation in a human primary CD8+ T cell/engineered APC bioassay	Human CD8+ T cells were isolated from healthy human donors and were pre- activated with Human T-activator CD3/CD28 beads to induce PD-1 expression. HEK293 cells were engineered to express a membrane-bound anti-CD3 antibody plus or minus co-expression of the FcγR1 receptor to cross-link test antibodies via their Fc receptors. HEK293, HEK293/anti-CD3, or HEK293/anti-CD3/FcγR1 were incubated with primary CD8+ T cells in the presence of anti-PD-1, anti-CD28 (TGN1412), or isotype control. T cell activation was measured by proliferation based on incorportation of tritiated thymidine.	[redacted]	[REGN2810-MX-14082] (Module 4.2.1.1-4)
Secondary Pharmacodynamics	Not conducted.		
Safety Pharmacology			
Independent safety pharmacology studies were not conducted with REGN2810. Instead, safety pharmacology endpoints were integrated into the IND-enabling repeat-dose cynomolgus monkey toxicology studies. These included an evaluation of cardiovascular conductance (ECG's) by Jacketed External Telemetry (JET), hemodynamics (heart rate and blood pressure), respiratory rates (breaths/minute) and central nervous system (CNS) evaluation by neurological exams. There were no drug-related effects observed in cardiovascular, respiratory, or CNS function, nor were there any deleterious microscopic changes observed in tissues associated with these systems following REGN2810 dosing. No drug-related effects on heart rate, respiration rate, body temperature, or oxygen saturation (as assessed by pulse oximetry) were noted at dosing or recovery phase assessments following treatment with REGN2810 (see [Module 2.6.6.3]).			
Pharmacodynamic Drug Interactions	Not conducted.		

APC=antigen presenting cell; hPD-1=human programmed cell death 1; hPD-L1=human programmed death ligand 1; mmH=myc-myc-hexahistidine; SPR=surface plasmon resonance; CIC=circulating immune complex; ADCC=antibody-dependent cellular cytotoxicity; CDC=complement-dependent cytotoxicity; IP=intraperitoneal; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; CNS=central nervous system; MHC=major histocompatibility complex; TCR=T cell receptor; Mf= *Macaca fascicularis* (cynomolgus monkey); mFc=mouse Fc

2　効力を裏付ける試験 - Binding Affinity (SPR-Biacore)

表 2.6.3.2 - Primary pharmacodynamics - Binding Affinity (SPR-Biacore)

Test Article: REGN2810					
Test Ligand	**Binding Parameters Measured at 25°C and pH 7.4**				**Study Number**
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	**k_d (s^{-1})**	**K_D (M)**	**$t_{1/2}$ (min)**	
hPD-1.mmH	$1.37x10^{5}$	$7.68x10^{-4}$	$5.61x10^{-9}$	15	[REGN2810-MX-14078] (Module 4.2.1.1-1)
hPD-1.mFc	$2.37x10^{5}$	$1.37x10^{-4}$	$5.77x10^{-10}$	84.4	
MfPD-1.mmH	$1.09x10^{5}$	$8.28x10^{-4}$	$7.61x10^{-9}$	14	
MfPD-1.mFc	$2.64x10^{5}$	$1.32x10^{-4}$	$4.99x10^{-10}$	87.8	
rPD-1.mmH	NB[a]				
mPD-1.mmH	NB[a]				
Test Article: REGN1672 (primary sequence identical to nivolumab)					
Test Ligand	**Binding Parameters Measured at 25°C and pH 7.4**				**Study Number**
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	**k_d (s^{-1})**	**K_D (M)**	**$t_{1/2}$ (min)**	
hPD-1.mmH	$2.58x10^{5}$	$2.42x10^{-3}$	$9.39x10^{-9}$	4.8	[REGN2810-MX-14078] (Module 4.2.1.1-1)
hPD-1.mFc	$4.57x10^{5}$	$2.02x10^{-4}$	$4.42x10^{-10}$	57.1	
MfPD-1.mmH	$1.69x10^{5}$	$1.52x10^{-3}$	$9.02x10^{-9}$	7.6	
MfPD-1.mFc	$4.41x10^{5}$	$1.98x10^{-4}$	$4.48x10^{-10}$	58.5	
rPD-1.mmH	NB[a]				
mPD-1.mmH	NB[a]				

表 2.6.3.2 - Primary pharmacodynamics - Binding Affinity (SPR-Biacore)（続き）

Test Article: REGN2626 (primary sequence identical to pembrolizumab)					
Test Ligand	**Binding Parameters Measured at 25°C and pH 7.4**				**Study Number**
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	**k_d (s^{-1})**	**K_D (M)**	**$t_{1/2}$ (min)**	
hPD-1.mmH	$5.22x10^5$	$6.20x10^{-3}$	$1.19x10^{-8}$	1.9	[REGN2810-MX-14078] (Module 4.2.1.1-1)
hPD-1.mFc	$5.64x10^5$	$1.70x10^{-4}$	$3.00x10^{-10}$	68.1	
MfPD-1.mmH	$3.71x10^5$	$1.26x10^{-3}$	$3.38x10^{-9}$	9.2	
MfPD-1.mFc	$5.92x10^5$	$1.52x10^{-4}$	$2.57x10^{-10}$	75.9	
rPD-1.mmH	NB[a]				
mPD-1.mmH	NB[a]				

a. No binding detectable under assay conditions tested.

k_a=association rate constant, k_d=dissociation rate constant, K_D=equilibrium dissociation constant, t½=dissociative half-life, mmH=myc-myc-hexahistidine tag, mFc=mouse Fc, hPD-1=human PD-1, Mf-PD-1=*Macaca fascicularis* (cynomolgus monkey) PD-1, rPD-1=rat PD-1, mPD-1= mouse PD-1, NB=no detectable binding interaction observed under the assay conditions used.

3 効力を裏付ける試験 - In Vitro Pharmacology

表 2.6.3.3 - Primary pharmacodynamics - In Vitro Pharmacology

Determination of REGN2810 to block binding of human and monkey PD-1 to human PD-L1 and human PD-L2		
Parameter measured	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Effect of REGN2810 on binding of human PD-1 (hPD-1.mFc) and cynomolgus monkey PD-1 (mfPD-1.mFc) to plate coated human PD-L1 (hPD-L1.hFc) by ELISA	REGN2810 blocked the binding of both human PD-1 and cynomolgus monkey PD-1 to human PD-L1 by ELISA with IC_{50} values of 0.60 nM and 0.97 nM, respectively.	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)
Effect of REGN2810 on binding of human PD-1 (hPD-1.mFc) and cynomolgus monkey PD-1 (mfPD-1.mFc) to plate coated human PD-L2 (hPD-L2.hFc) by ELISA	REGN2810 blocked the binding of both human PD-1 and cynomolgus monkey PD-1 to human PD-L2 by ELISA with IC_{50} values of 0.13 nM and 0.22 nM, respectively.	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)
Effect of REGN2810, REGN1672, and REGN2626 on binding of biotinylated human PD-1 (biot-hPD-.hFc) to plate coated human PD-L1 (hPD-L1.mFc) by ELISA	REGN2810, REGN1672, and REGN2626 blocked the binding of human PD-1 (biotin-hPD-1.hFc) to human PD-L1 by ELISA with IC_{50} values of 85pM, 72pM, and 39pM, respectively.	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)
REGN2810 Blocks PD-1/PD-L1 signaling in a cell-based bioassay		
Parameter measured	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
The antagonist effect of REGN2810 on PD-1 was assessed in a cell-based bioassay that measures PD-1/PD-L1 signaling	REGN2810 blocked PD-1/PD-L1 signaling in a cell-based assay using Jurkat/PD-1-CD300a/AP-1 Luc and Raji/PD-L1 cells with an EC_{50} of 1.37nM and subsequently restoring TCR-stimulation and downsteam events. REGN1672 and REGN2626 blocked PD-1/PD-L1 signaling with EC_{50} values of 1.58 nM and 0.60 nM, respectively.	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)
The agonist effect of REGN2810 on PD-1 was determined in a cell-based bioassay using native Raji cells that do not express PD-L1 and Jurkat/PD-1-300a/AP-1-Luc cell/Raji cells	REGN2810 had a slight agonist effect on PD-1 in a cell- based bioassay using unmodified Raji cells that do not express PD-L1 and Jurkat/PD-1-300a/AP-1-Luc cells; however, agonist effects were not consistently observed. REGN2810 produced ~11% reduction in signal (RLU), whereas REGN1672 and REGN2626 produced ~21% and ~29% reduction in signal indicative of PD-1 agonist activity resulting in the inhibition of TCR-mediated activation and downstream events.	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)

表 2.6.3.3 - Primary pharmacodynamics - In Vitro Pharmacology (SPR-Biacore)（続き）

The antagonist effect of REGN2810 on PD-1/PD-L1 interaction was assessed in a second-generation cell-based PD- 1 bioassay that measures PD-1/PD-L1 signaling. This assay design more closely mimics a TCR/MHC interaction with subsequent TCR activation and signaling	REGN2810 blocked PD-1/PD-L1 signaling in a cell-based assay using Jurkat/PD-1/AP-1-Luc and HEK293/PD- L1/mIgE cells with an EC_{50} of 3.3 nM, subsequently restoring TCR-stimulation and downsteam signaling. REGN1672 and REGN2626 blocked PD-1/PD-L1 signaling in this assay with EC_{50} values of 5.0 nM and 2.0 nM, respectively.	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)
The agonist effect of REGN2810 on PD-1 was determined in a second-generation PD-1 cell-based bioassay using Jurkat/PD- 1/AP-1 Luc-1 and HEK293/mIgE cells	REGN2810, REGN1672, and REGN2626 were evaluated for agonist effects on PD-1 using APC cells that do not express PD-L1. All three PD-1 antibodies had no effect on AP-1 Luc activity. The absence of agonistic activity could be due to the lack of Fc gamma receptor expression on HEK293, suggesting antibody-mediated dimerization of PD- 1 is not sufficient to induce PD-1 mediated T-cell inhibitory signaling.	[REGN2810-MX-14079] (Module 4.2.1.1-2)
Evaluation of Fc Effector Function for REGN2810		
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
The ability of REGN2810 to elicit both CDC and ADCC activity mediated through the Fc domain was evaluated in vitro	REGN2810 did not elicit either CDC or ADCC activity when measured using multiple target cells expressing different amounts of PD-1.	[REGN2810-MX-14080] (Module 4.2.1.1-3)
The ability of REGN2810 to form CIC with soluble PD-1 and activate the C1q complement component was evaluated by ELISA	REGN2810 did not exhibit any in vitro CIC complement activating activity.	[REGN2810-MX-14080] (Module 4.2.1.1-3)
Evaluation of REGN2810 in Human Primary T cell Activation Bioassays		
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
The ability of REGN2810 to block PD-1/PD-L1-mediated inhibitory signaling in a primary human $CD4^+$ T cell/engineered APC bioassay	REGN2810, REGN1979, and REGN2626 were able to inhibit PD-1/PD-L1-mediated inhibitory signaling resulting in a dose-dependent increase in human $CD4^+$ T cell proliferation with a similar average and median EC_{50} value.	[REGN2810-MX-14082] (Module 4.2.1.1-4)

表 2.6.3.3 - Primary pharmacodynamics - In Vitro Pharmacology (SPR-Biacore)（続き）

The potential superagonist activity of REGN2810 was analyzed in a human PBMC cytokine release assay using dry-coated antibody	REGN2810 is not a superagonist antibody that causes T cell activation and cytokine release. Incubation of dry-coated REGN2810 with PBMC did not increase IFNγ, IL-12p70, IL-2, IL-4, IL-10, or IL-13 cytokine levels up to the highest concentration of REGN2810 tested (10 µg/mL); however, an increase in TNFα levels was observed at 10µg/mL REGN2810. In contrast, robust cytokine release was observed with positive control antibodies, superagonist anti- CD28 (REGN2329) and anti-CD3 (OKT3).	[REGN2810-MX-14082] (Module 4.2.1.1-4)
The effect of bead-coated REGN2810 on human primary $CD4^+$ T cell activation was investigated in a immuno-bead assay	The presence of REGN2810 on anti-CD3 (clone UCHTI) antibody-coated beads reduced T cell activation compared to beads coated with anti-CD3 antibody plus the isotype control antibody (REGN1945) in the presence of solution phase anti-CD28 mAb (BD clone 28.2). These results indicate that ligation of PD-1 by bead-coated REGN2810 inhibits T cell activation mediated by anti-CD3 and anti-CD28 mAbs.	[REGN2810-MX-14082] (Module 4.2.1.1-4)
The effect of soluble and FcγR1 cross-linked REGN2810 on human primary $CD8^+$ T cell activation was investigated in a primary $CD8^+$ T cell/engineered APC bioassay	Solution-phase REGN2810 or REGN2810 cross-linked via FcγR1 on the surface of HEK293/anti-CD3/FcγR1 cells did not induce $CD8^+$ T cell activation supporting the finding REGN2810 is not a T cell agonist antibody.	[REGN2810-MX-14082] (Module 4.2.1.1-4)

APC=antigen presenting cell; hPD-1=human programmed cell death 1; hPD-L1=human programmed death ligand 1; CIC=circulating immune complex; ADCC=antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; CDC=complement-dependent cytotoxicity; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; MHC=major histocompatibility complex; TCR=T cell receptor; mAb=monoclonal antibody; PBMC=peripheral blood mononuclear cells

4 効力を裏付ける試験 - In Vivo Pharmacology

表 2.6.3.4 - Primary pharmacodynamics - In Vivo Pharmacology

Type of Study	**Mouse strain (#/group)**	**Route of Admin**	**Dose**	**Parameters Measured**	**Noteworthy Findings**			**Study Number**
Analysis of REGN2810 ability to inhibit MC38.Ova colorectal carcinoma cells in vivo: **Experiment 1**	5 mice/group PD-1*hum/hum* mice	IP[a]	Mice received individual doses of antibody on days 3, 7, 10, 13, 17 REGN2810: 5 mg/kg 10 mg/kg REGN1945: 10 mg/kg	Tumor volumes were measured by caliper 2x weekly	Antibody	Tumor Vol mm3 (SEM)	Tumor-free n/N (%) Day 21	[REGN2810 - MX-14081] (Module 4.2.1.1-5)
					REGN 2810 5 mg/kg	Day 18: 17 (17) Day 21: 43 (43)	4/5 (80%)	
					REGN2810 10 mg/kg	Day 18: 0 (0) Day 21: 0 (0)	5/5 (100%)	
					REGN1945 10 mg/kg	Day 18: 449 (194) Day 21: 718 (330)	1/5 (20%)	
	5 mice/group PD-1*hum/hum* mice	IP[a]	REGN1672[b]: 5 mg/kg 10 mg/kg	Tumor volumes were measured by caliper 2x weekly	REGN1672 5 mg/kg	Day 18: 50 (50) Day 21: 93 (93)	4/5 (80%)	
					REGN1672 10 mg/kg	Day 18: 0 (0) Day 21: 0 (0)	5/5 (100%)	

表 2.6.3.4 - Primary pharmacodynamics - In Vivo Pharmacology（続き）

Type of Study	Mouse strain (#/group)	Route of Admin	Dose	Parameters Measured	Noteworthy Findings			Study Number
Analysis of REGN2810 ability to inhibit MC38.Ova mouse colorectal carcinoma cells in vivo: **Experiment 2**	7 mice/group PD-1h$^{um/hum}$ mice	IP[a]	Individual doses of antibody on days 3, 7, 10, 14, 17 REGN2810: 2.5 mg/kg 5 mg/kg REGN1945: 5 mg/kg REGN1672: 2.5 mg/kg 5 mg/kg REGN2626[c]: 2.5 mg/kg 5 mg/kg	Tumor volumes were measured by caliper 2x weekly	REGN2810 2.5 mg/kg	Day 21: 19 (19)	6/7 (86%)	[REGN2810-MX-14081] (Module 4.2.1.1-5)
					REGN2810 5 mg/kg	Day 21: 13 (13)	6/7 (86%)	
					REGN1945 5 mg/kg	Day 21: 405 (142)	0/7 (0%)	
					REGN1672 2.5 mg/kg	Day 21: 52 (52)	6/7 (86%)	
					REGN1672 5 mg/kg	Day 21: 21 (21)	6/7 (86%)	
					REGN2626 2.5 mg/kg	Day 21: 68 (68)	6/7 (86%)	
					REGN2626 5 mg/kg	Day 21: 41(41)	6/7 (86%)	

a. Intraperitoneal
b. Primary Sequence Identical to Nivolumab
c. Primary Sequence Identical to Pembrolizumab SEM = standard error of the mean
SEM = standard error of the mean

5　副次的薬理試験

該当なし。

6　安全性薬理試験

該当なし。

7　薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。