テビムブラ点滴静注 100 mg

2.6.1　緒言
（根治切除不能な進行・再発の食道癌）

BeiGene Japan 合同会社
Confidential
BeiGene Japan 合同会社の許可を得ることなく
使用，漏洩，公表，又はその他の方法で開示することを禁じます。

目　次

略号一覧 3
1 緒言 7
2 化学構造 7
3 薬理学的特性 10
4 効能効果・用法用量 10
5 参考文献 11

表 一 覧

Table 2-1 チスレリズマブの物理化学的特性 9

図 一 覧

Figure 2-1 チスレリズマブの一次構造 8
Figure 2-2 チスレリズマブ（Fab）の三次構造と PD-1 への結合部位 9

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
Ab	antibody	抗体
ADA	anti-drug or tislelizumab antibody	抗薬物又は抗チスレリズマブ抗体
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	antibody dependent cellular phagocytosis	抗体依存性細胞貪食
$AUC_{0-\infty}$	area under the drug serum concentrationtime curve from time 0 to infinity	投与後 0 時間から無限大時間までの血清中薬物濃度-時間曲線下面積
AUC	area under the drug serum concentration-time curve	血清中薬物濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-Xh}	area under the drug serum concentration-time curve from time 0 to X hours	投与後 0 時間から X 時間までの血清中薬物濃度-時間曲線下面積
AUC_{last}	area under the drug serum concentration-time curve from time 0 to the last quantifiable time	投与後 0 時間から最終測定可能時点までの血清中薬物濃度-時間曲線下面積
BGB-A317 (VDT482)	tislelizumab `	チスレリズマブ
BI	Boehringer Ingelheim	-
BLQ	below limit of quantitation	定量限界未満
C1q	the initiating component of complement complex formation	補体第 1 成分（C1）の亜成分
CD	cluster of differentiation antigen	表面抗原分子
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CGE	capillary gel electrophoresis	キャピラリーゲル電気泳動
CL	clearance	クリアランス
Clq	subcomponent of complement C1	補体第 1 成分（C1）の亜成分
C_{max}	maximum drug serum concentration	最高血清中薬物濃度
CMV	cytomegalovirus	サイトメガロウイルス
conc.	concentrations	濃度
CRA	cytokine release assay	サイトカイン放出アッセイ
CRS	cytokine release syndrome	サイトカイン放出症候群
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	Dulbecco リン酸緩衝生理食塩液
EC_{50}	50% effective dose	50%有効濃度
ECD	extracellular domain	細胞外ドメイン
ECL	electrochemiluminescence	電気化学発光
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酵素結合免疫測定法

EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
Fab	antigen-binding fragment	抗原結合性フラグメント
FACS	fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化セルソーター
FBS	fetal bovine serum	ウシ胎児血清
Fc	crystallizable fragment	結晶性フラグメント
FcγR	Fc gamma receptor	Fcγ 受容体
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
His	histidine	ヒスチジン
hPD-1	human PD-1	ヒト PD-1
HRP	horse radish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
huIgG	human immunoglobulin G	ヒト免疫グロブリン G
i.p.	intraperitoneal	腹腔内
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IFN-γ	interferon γ	インターフェロン γ
IFN	interferon	インターフェロン
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL	interleukin	インターロイキン
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif	免疫受容体チロシン依存性抑制モチーフ
ITSM	immune receptor tyrosine switch motif	免疫受容体チロシン依存性スイッチモチーフ
IV	intravenous	静脈内
JHL	JHL Biotech Inc., Taiwan	-
KD	dissociation constant	解離定数
KLH	keyhole limpet hemocyanin	スカシガイ由来キーホールリンペットヘモシアニン
Koff	dissociation rate constant	解離速度定数
Kon	association rate constant	結合速度定数
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限

mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MFI	mean fluorescence intensity	平均蛍光強度
mGMCSF	murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合性複合体
MRT	mean residence time	平均滞留時間
NA	not applicable	該当なし
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NMPA	National Medical Products Administration	中国国家薬品監督管理局
NOAEL	non observed adverse effect level	無毒性量
OD	optical density	吸光度
OD_{450}	optical density 450 nm	吸光度 450 nm
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PD-1	programmed cell death-1	プログラム細胞死 1
PD-L1	programmed cell death ligand 1	プログラム細胞死リガンド 1
PD-L2	programmed cell death ligand 2	プログラム細胞死リガンド 2
PHA	phytohemagglutinin	フィトヘマグルチニン
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
Q2W	once every 2 weeks	2 週間に 1 回
Q3W	once every 3 weeks	3 週間に 1 回
QW	once per week	週 1 回
R_{max}	maximal response	最大レスポンス
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
RU	response unit	レスポンスユニット
RV	relative variance	相対分散
SC	subcutaneous	皮下
SD	standard deviation	標準偏差
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis	ポリアクリルアミドゲル電気泳動法
SEM	standard error of the mean	標準誤差

SPEAD	Solid-phase extraction with acid dissociation	酸解離を伴う固相抽出法
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
$T_{1/2}$	terminal half-life	終末相消失半減期
TCR	T-cell receptor	T 細胞受容体
TDAR	T-cell-dependent antibody responses	T 細胞依存性抗体産生反応
TG	transgenic	トランスジェニック（遺伝子改変）
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	time to reach Cmax	最高血清中薬物濃度到達時間
Treg	regulatory T cell	制御性 T 細胞
TREML1	triggering receptor expressed on myeloid cells-like protein 1	-
ULOQ	upper limit of quantification	定量上限
UV	ultraviolet	紫外
Vd	volume of distribution	分布容積
WT	wild type	野生型

1 緒言

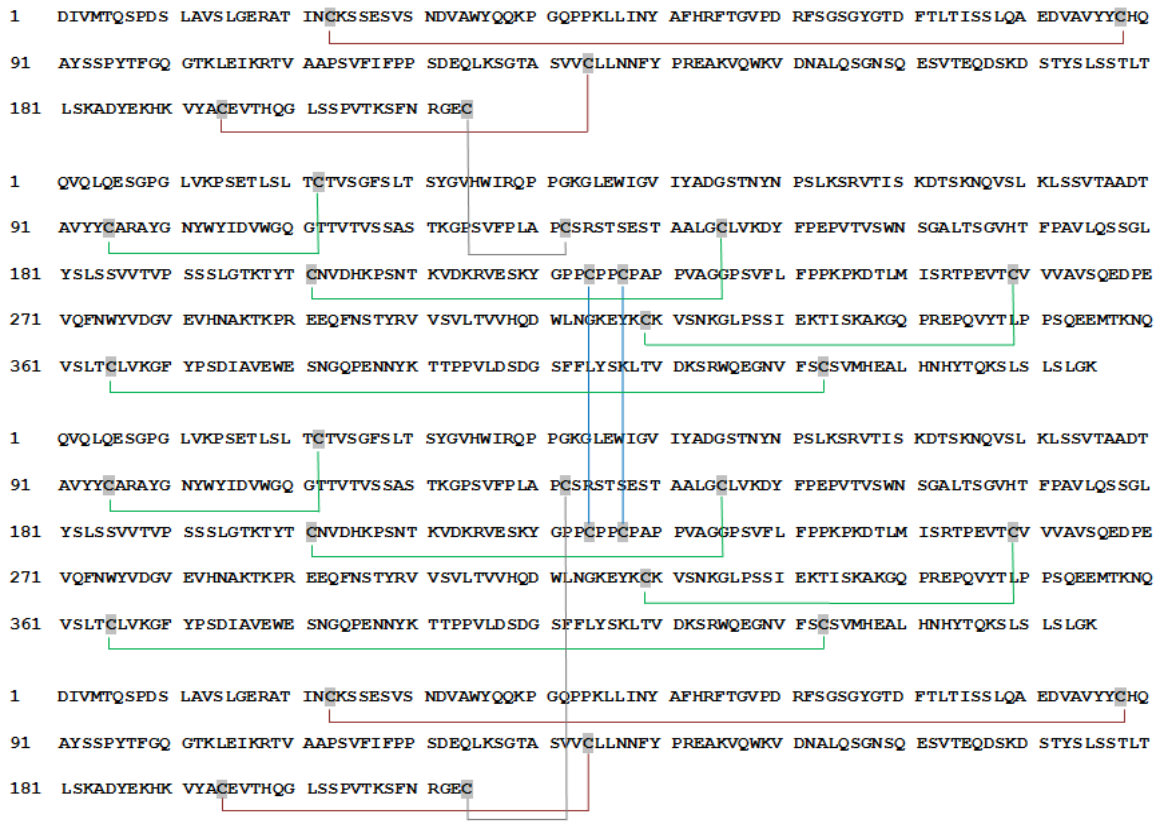
チスレリズマブは，マウスハイブリドーマ由来のヒト化 IgG4 モノクローナル抗体である。プログラム細胞死 1（PD-1）の細胞外ドメイン（ECD）で免疫した BALB/c マウスの細胞からハイブリドーマを作製した。PD-1 の ECD を固相化した ELISA によりマウス親抗体のクローンを選択し，以下に示すとおり標準的な手法によりヒト化した。

BALB/c マウス由来抗体の重鎖と軽鎖の可変領域を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）で増幅し，その塩基配列を確認した。マウス抗体のフレームワーク領域をヒト IgG のフレームワークに置き換えて，ヒト IgG の塩基配列と 97.5%の相同性を得た。さらに，超可変領域と定常領域を対応するヒト IgG4 の超可変領域と定常領域に置き換えて完全長抗体を構築した。以上より，安定的かつ機能活性の高い，エフェクター機能やタンパク結合性を除去したヒト化抗体を得た。

2 化学構造

チスレリズマブの一次構造と全長抗体の塩基配列を Figure 2-1 に，またチスレリズマブ（Fab）の三次元構造を PD-1 への結合部位とともに Figure 2-2 に示した。

Figure 2-1　　チスレリズマブの一次構造

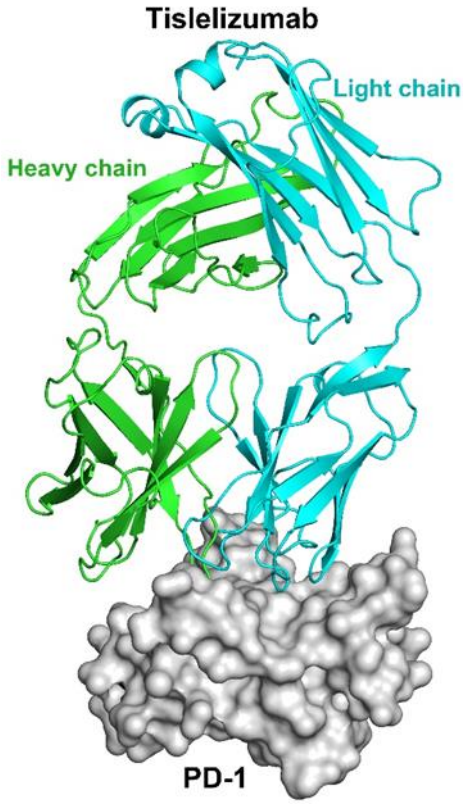


上段と下段に軽鎖を，中二段に重鎖のアミノ酸配列を示す。

赤線は軽鎖内でのジスルフィド結合を，また，緑線は重鎖内でのジスルフィド結合を示す。グレーの線は軽鎖と重鎖を繋ぐジスルフィド結合を，また，青線は 2 本の重鎖を繋ぐジスルフィド結合を示す。ジスルフィド結合部位のシステイン残基をすべて灰色で示す。これらのジスルフィド結合は報告されているヒト IgG4 の構造に基づいて構築されている（Ramsland and Farrugia 2002，Liu and May 2012）。

A：アラニン，G：グリシン，M：メチオニン，S：セリン，C：システイン，D：アスパラギン酸，E：グルタミン酸，F：フェニルアラニン，H：ヒスチジン，I：イソロイシン，K：リジン，L：ロイシン，N：アスパラギン，P：プロリン，Q：グルタミン，R：アルギニン，T：トレオニン，V：バリン，W：トリプトファン，Y：チロシン

Figure 2-2　　チスレリズマブ（Fab）の三次構造と PD-1 への結合部位



チスレリズマブ（Fab）をリボン（重鎖が緑，軽鎖が青），PD-1 をグレーの構造物で示す。

チスレリズマブの物理化学的特性を Table 2-1 に示す。

Table 2-1　　チスレリズマブの物理化学的特性

薬理学的分類	抗 PD-1 抗体
構成サブユニット	4 箇所のジスルフィド結合を有する同一の IgG4 重鎖可変領域 2 本及び同一の軽鎖（κ 鎖）2 本
構成アミノ酸	重鎖は 445 個のアミノ酸，軽鎖は 214 個のアミノ酸より構成
分子量	すべての構成アミノ酸を基に算出された分子量：144,044 Da 質量分析による分子量：146,976 Da（共有結合により完全長抗体に結合した 2 本の A2FG1 糖鎖を含む）
等電点及びチャージバリアント	平均等電点：7.65（主要なチャージバリアントの範囲：7.5～7.8，等電点（IEF）ゲル電気泳動法）
電気泳動パターン	IgG 重鎖及び軽鎖に相当する 2 本のバンドが検出（非還元 SDS-PAGE 法）
コード名	BGB-A317
USAN/INN	Tislelizumab
化学名	Anti-human PD-1 monoclonal antibody, humanized IgG4 variant antibody

3 薬理学的特性

チスレリズマブのヒト PD-1 に対する結合特性，結合強度，及び機能活性について，種々の *in vitro* 試験で検討した。

チスレリズマブは，表面プラズモン共鳴法を用いた結合親和性の検討で，ヒト PD-1 の ECD に対し高い親和性と緩やかな解離特性を示し，解離定数 K_D 値は 0.15 nmol/L，解離速度定数 K_{off} 値は 3.83×10^{-5} [1/s]であった。チスレリズマブは PD-L1（プログラム細胞死リガンド-1）及び PD-L2（プログラム細胞死リガンド-2）の PD-1 への結合を競合的に阻害し，また，T 細胞において PD-1 を介するシグナル伝達を阻害することで T 細胞や活性化初代培養末梢血単核細胞（PBMC）の機能活性を亢進させた。

ヒト類表皮癌細胞株 A431[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-126]，ヒト大腸癌患者由来腫瘍組織 BCCO-028[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-127]，及びヒト非小細胞肺癌患者由来腫瘍組織 BCLU-054[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-128]等のさまざまなヒト癌細胞株又は腫瘍組織を用いた異種移植モデルにおいて，チスレリズマブは優れた抗腫瘍効果を示した。チスレリズマブは，mGMCSF 発現マウス悪性黒色腫細胞株（B16F10/GMCSF）を移植したヒト PD-1 導入トランスジェニックマウスにおいても優れた抗腫瘍効果を発揮した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-135]。さらに，本薬のサロゲート抗体として用いた抗マウス PD-1 抗体（Ch15mt）は，マウス大腸癌細胞株を用いた同種移植モデルに対し優れた抗腫瘍効果を示した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-125]。

従来の IgG4 サブクラスの PD-1 抗体（$IgG4_{S228P}$）では Fcγ 受容体（FcγR）I への非常に弱い結合がみられたが，チスレリズマブでは各種 FcγR や Clq への結合はみられず，チスレリズマブにより抗体依存性細胞傷害（ADCC）や補体依存性細胞傷害（CDC）が誘導される可能性は非常に低いと考えられた。

チスレリズマブがサルの PD-1 に対して結合親和性を示し，ヒト PD-1 と同様の反応性を示したこと，また，ヒト PD-1 とサルの PD-1 の相同性から，チスレリズマブの安全性評価にはサルが適していることが確認された[Table 2.6.3.1-BLGC-020]。チスレリズマブの安全性薬理は，サルを用いた単回投与毒性試験[2.6.6-2.2 項]及び 13 週間反復投与毒性試験[2.6.6-3.1 項]において評価された。

4 効能効果・用法用量

チスレリズマブが PD-1 に強く結合し，PD-1 シグナルを阻害することで T 細胞を活性化して抗腫瘍効果を発揮することが *in vitro* 及び *in vivo* 試験で示された。さらに FcγR に結合しないようチスレリズマブの Fc 領域は設計されているため，抗体依存性細胞貪食（ADCP）を介した腫瘍浸潤リンパ球への殺細胞活性は誘導されない。チスレリズマブの非臨床試験成績から，本薬の作用機序に基づく進行がんへの適応が支持された。

チスレリズマブは，食道がん，肝細胞がん，非小細胞肺がんを含む進行性の固形癌及び血液悪性腫瘍への適応で，単剤及び/又は他剤との併用で開発中である。

一連の非臨床試験，及び食道扁平上皮癌を対象とした臨床試験成績において，チスレリズマブの有効性，及び安全性が確認されたことから，以下の内容にて本承認申請を行う。

【申請品目】テビムブラ点滴静注 100 mg
【一般名】チスレリズマブ（遺伝子組換え）
【効能又は効果】根治切除不能な進行・再発の食道扁平上皮癌
【用法及び用量】他の抗悪性腫瘍剤との併用において，通常，成人にはチスレリズマブ（遺伝子組換え）として，1 回 200 mg を 3 週間間隔で点滴静注する。がん化学療法後に増悪した根治切除不能な進行・再発の食道扁平上皮癌に対しては，本剤を単独投与する。

5 参考文献

[Liu H and May K (2012)] Disulfide bond structures of IgG molecules, Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. mAbs 4; 1: 17-23.

[Ramsland PA and Farrugia W (2002)] Crystal structures of human antibodies: a detailed and unfinished tapestry of immunoglobulin gene products. J Mol Recognit. 15(5); 248-59.

テビムブラ点滴静注 100 mg

2.6.2　薬理試験の概要文
（根治切除不能な進行・再発の食道癌）

BeiGene Japan 合同会社
Confidential
BeiGene Japan 合同会社の許可を得ることなく
使用，漏洩，公表，又はその他の方法で開示することを禁じます。

目　次

1 薬理試験の概要文 4
1.1 まとめ 4
2 効力を裏付ける試験 5
2.1 *In vitro* 薬理試験 5
2.1.1 ヒト PD-1 に対する結合親和性，特異性，及び種差の解析 6
2.1.2 交差反応性の確認による安全性評価用の動物種の選択 9
2.1.3 ヒト PD-1/His を用いた表面プラズモン共鳴（SPR）法による解析 10
2.1.4 チスレリズマブの結合に重要な PD-1 のエピトープ 11
2.1.5 細胞を用いた機能活性試験 11
2.2 *In vivo* 薬理試験 17
2.2.1 ヒト類表皮癌細胞株 A431 異種移植モデルに対する効果 18
2.2.2 ヒト大腸癌 BCCO-028 異種移植モデルに対する効果 19
2.2.3 ヒト非小細胞肺癌 BCLU-054 異種移植モデルに対する効果 20
2.2.4 hPD-1 ヒト化マウスを用いた抗腫瘍効果の検討 21
2.2.5 野生型マウスの大腸癌同種移植モデルに対する抗マウス PD-1 抗体の効果 23
2.3 作用機序 24
3 副次的薬理試験 24
3.1 Fcγ 受容体及び C1q タンパクへの結合 25
3.2 細胞を用いた ADCC 及び CDC 活性の検討 26
4 安全性薬理試験 28
5 薬力学的薬物相互作用試験 28
6 考察及び結論 28
7 参考文献 29

表 一 覧

Table 2-1 *In vitro* 薬理試験一覧 5
Table 2-2 FBS 存在下又は非存在下での PD-1 に対する結合親和性 8
Table 2-3 完全長チスレリズマブのヒト PD-1 に対する結合・解離速度定数（SPR 法） 10
Table 2-4 チスレリズマブと PD-1 のエピトープマッピング（ELISA 法） 11
Table 2-5 HuT78/P3Z 細胞における PD-1 阻害作用 14
Table 2-6 抗 PD-1 抗体の IL-2 分泌亢進作用の比較 15
Table 2-7 *In vivo* 効力を裏付ける薬理試験の一覧 18
Table 2-8 A431 細胞異種移植マウスにチスレリズマブを投与したときの腫瘍増殖抑制効果と血清中薬物濃度 19
Table 2-9 BCCO-028 異種移植マウスモデルに対するチスレリズマブの効果 20

Table 2-10 BCLU-054 異種移植マウスモデルに対するチスレリズマブの効果 21
Table 2-11 B16F10/GMCSF 細胞移植 hPD-1 ヒト化マウスモデルに対するチスレリズマブの効果 23
Table 2-12 CT26.WT 細胞同種移植モデルに対する抗マウス PD-1 抗体の効果 24
Table 3-1 副次的薬理試験の一覧 25

図 一 覧

Figure 2-1 野生型 PD-1 に対するチスレリズマブの結合親和性 6
Figure 2-2 PD-1 固相化プレートを用いた ELISA 法による結合親和性の検討 7
Figure 2-3 FBS 混合 PD-1 固相化プレートを用いた ELISA 法による結合親和性の検討 8
Figure 2-4 ヒト，サル及びマウスの PD-1 に対するチスレリズマブの結合親和性 9
Figure 2-5 サル PD-1 へのヒト PD-L1 結合に対するチスレリズマブの競合的阻害作用 10
Figure 2-6 ヒト PD-1 と PD-L1（A）及び PD-L2（B）との結合に対するチスレリズマブの競合的阻害作用 12
Figure 2-7 キメラ PD-1（P3Z）発現 HuT78/P3Z 細胞に対するチスレリズマブの IL-2 分泌抑制作用 13
Figure 2-8 HuT78/PD-1 細胞に対するチスレリズマブの IL-2 分泌亢進作用 15
Figure 2-9 抗 CD3 抗体刺激により発現したヒト PMBC 上の PD-1 16
Figure 2-10 ヒト PBMC に対するチスレリズマブの IFN-γ 分泌促進作用 17
Figure 2-11 スフェロイド培養でのヒト PMBC に対するチスレリズマブの増殖促進作用 17
Figure 2-12 A431 細胞異種移植マウスモデルに対するチスレリズマブの腫瘍増殖抑制効果 19
Figure 2-13 BCCO-028 異種移植マウスモデルに対するチスレリズマブの腫瘍増殖抑制効果 20
Figure 2-14 BCLU-054 異種移植マウスモデルに対するチスレリズマブの腫瘍増殖抑制効果 21
Figure 2-15 hPD-1 ヒト化マウスに移植した mGMCSF 発現マウス悪性黒色腫細胞（B16F10/GMCSF）の増殖に及ぼすチスレリズマブの影響 22
Figure 2-16 B16F10/GMCSF 細胞移植マウスの腫瘍増殖曲線 22
Figure 2-17 CT26.WT 細胞同種移植モデルに対する抗マウス PD-1 抗体の腫瘍増殖抑制効果 23
Figure 2-18 CT26.WT 細胞移植マウスの腫瘍増殖曲線 24
Figure 3-1 FcγR I への結合親和性の比較 25
Figure 3-2 C1q への結合親和性の比較 26
Figure 3-3 ADCC 誘発活性の検討 27
Figure 3-4 CDC 誘発活性の検討 28

1 薬理試験の概要文

1.1 まとめ

チスレリズマブ（BGB-A317）のヒトプログラム細胞死-1（PD-1）に対する結合特性，結合強度，及び機能活性について，種々の *in vitro* 試験で検討した。PD-1 阻害によりもたらされる効果については，さまざまな *in vivo* モデルを用いて評価した。これらの成績から，チスレリズマブは PD-1 に特異的かつ強力な阻害薬であることが示された。また，表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いた解析で，チスレリズマブは PD-1 の細胞外ドメイン（ECD）に対して高い親和性と緩やかな解離特性を示した（Table 2-3）。本薬は PD-1 へのリガンド結合を阻害し，T 細胞における PD-1 を介したシグナル伝達を抑制することにより，ヒト T 細胞及び末梢血単核細胞（PBMC）の機能活性を濃度依存的に亢進させた。ニボルマブ及びペムブロリズマブとの比較試験において，チスレリズマブはヒト PD-1 に対してより高い親和性（ニボルマブ又はペムブロリズマブの 7～10 倍）[Table 2.6.3.1-BLGC-004(02) Table 3]とより強力な阻害活性（チスレリズマブ：98%，ニボルマブ又はペムブロリズマブ：68%～78%）を示し，生化学的結合試験及び細胞活性試験においてより強い活性を示した[Table 2.6.3.1-BLGC-002]，[Table 2.6.3.1-BLGC-003(02)]，[Table 2.6.3.1-BLGC-004(02)]，[Table 2.6.3.1-BLGC-006]，[Table 2.6.3.1-BLGC-007(02)]，[Table 2.6.3.1-BLGC-008(02)]，[Table 2.6.3.1-BLGC-009(02)]，[Table 2.6.3.1-BLGC-014]。エフェクター機能を増強する受容体への結合（Bruhns 2012）を考慮して，がん治療において最適な治療効果を得るため Fcγ 受容体（FcγR）に結合しないようチスレリズマブは設計されている（Dahan et al. 2015）。事実，チスレリズマブの 7 種の FcγR に対する結合は検出されなかった。さらに，補体複合体形成を開始させる C1q に対してもほとんど結合しなかったことから，チスレリズマブは抗体依存性細胞傷害（ADCC）又は補体依存性細胞傷害（CDC）を誘導しないものと考えられた[Table 2.6.3.1-BLGC-010(02)]，[Table 2.6.3.1-BLGC-021]。

ヒト PD-1 に対する結合特性の検討から，プログラム細胞死リガンド 1（PD-L1）やプログラム細胞死リガンド 2（PD-L2）等のリガンド結合に必要な PD-1 の 2 つのアミノ酸残基（K45 及び I93）がチスレリズマブの結合に重要であることが示された（Lázár-Molnár et al. 2008，Lin et al. 2008）。この結合特性はニボルマブやペムブロリズマブとは異なる[Table 2.6.3.1-BLGC-005]。チスレリズマブは，カニクイザル及びヒト PD-1 に同様の親和性で結合するが，マウス PD-1 には結合しないことから，本薬の毒性試験に用いる動物種としてカニクイザルを選択した[Table 2.6.3.1-BLGC-003(02)]，[Table 2.6.3.1-BLGC-020]。

チスレリズマブは，ヒト類表皮癌細胞株 A431，ヒト大腸癌患者由来腫瘍組織 BCCO-028，及びヒト非小細胞肺癌患者由来腫瘍組織 BCLU-054 を用いた異種移植モデルにおいて優れた抗腫瘍効果を示した。A431 モデルでは免疫不全マウスに A431 細胞を移植する際に，また，BCCO-028 及び BCLU-054 モデルでは移植時に，ヒト PBMC を同時注入した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-126]，[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-127]，[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-128]。マウス顆粒球マクロファージコロニ

一刺激因子（mGMCSF）を過剰発現しているマウス悪性黒色腫細胞株（B16F10/GMCSF）をhPD-1 ヒト化マウスに移植し，チスレリズマブの効果を検討したところ，チスレリズマブは本モデルに対しても優れた抗腫瘍効果を示した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-135]。さらに，本薬のサロゲート抗体として用いた抗マウス PD-1 抗体（Ch15mt）は，マウス大腸癌細胞株を用いた同種移植モデルに対して優れた抗腫瘍効果を示した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-125]。

チスレリズマブの独立した安全性薬理試験は実施しなかった。カニクイザルを用いた単回投与毒性試験及び13週間反復投与毒性試験では，それぞれ100 mg/kg及び60 mg/kgの用量まで静脈内投与したとき，心血管系，呼吸系，及び中枢神経系への影響を示唆する変化は認められなかった。

2 効力を裏付ける試験

2.1 *In vitro* 薬理試験

チスレリズマブの薬理学的特性について，生化学的結合試験（結合特性）及び*in vitro*細胞活性試験（機能活性）で検討した。効力を裏付ける薬理試験として実施された*in vitro*薬理試験の一覧を以下に示す（Table 2-1）。

Table 2-1 *In vitro* 薬理試験一覧

Type of Study / Description	Test System	Method of Administration	Study Number
BGB-A317 binding activity to PD-1	PD-1-ECD/His, ELISA and HuT78/PD1 cells, Flow cytometry	*In vitro*	BLGC-002
BGB-A317 binding specificity analyses: species specificity and non-specific binding check-up	Human, monkey & mouse PD-1-ECD/His, ELISA and HuT78/huPD1 or monkey PD-1 cells, Flow cytometry	*In vitro*	BLGC-003(02)
Characterization of BGB-A317 binding affinities to antigen by SPR	PD-1-ECD/His & SPR assay	*In vitro*	BLGC-004(02)
BGB-A317 critical binding epitopes on PD-1	PD-1 mutant and wild type proteins, ELISA and Western blot	*In vitro*	BLGC-005(02)
BGB-A317 competitively blocks both PD-L1 and L2 binding to PD-1	HuT78/PD-1 cells, biotinylated PD-L1 or PD-L2 and Flow cytometry	*In vitro*	BLGC-006
BGB-A317 inhibits PD-1 function in a reverse signaling assay	HuT78/P3Z and HEK293/OS8-PD-L1 cells, ELISA	*In vitro*	BLGC-007(02)
BGB-A317 activates IL-2 secretion from HuT78/PD-1cells by inhibiting PD-1 signaling	HuT78/PD-1 and HEK293/OS8-PD-L1 cells, ELISA	*In vitro*	BLGC-008(02)
BGB-A317 activates PBMC in coculture with stimulator cells	PBMC and HEK293/OS8-PD-L1 cells, ELISA	*In vitro*	BLGC-009(02)
BGB-A317 binding activity to PD-1 on activated PBMCs	Biotinylated-BGB-A317 and huIgG-biotin-Flow cytometry	*In vitro*	BLGC-014

Type of Study / Description	Test System	Method of Administration	Study Number
Cross-species functional activity and species selection for *in vivo* pharmacology and safety evaluation	Human, monkey and mouse PD-1-ECD/His protein and HuT78/mkPD1V3 cells, ELISA, competition with PD-L1, affinity assay by SPR	*In vitro*	BLGC-020

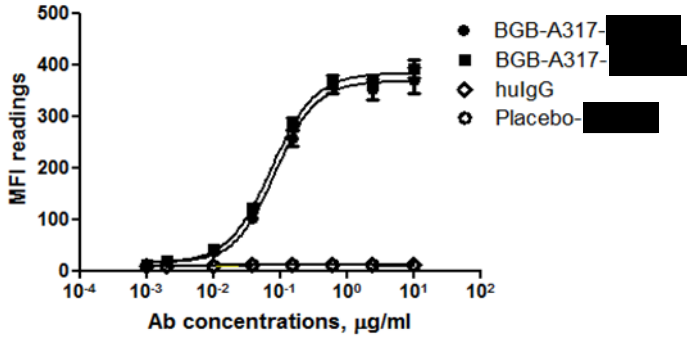
2.1.1 ヒト PD-1 に対する結合親和性，特異性，及び種差の解析

チスレリズマブの PD-1 に対する結合親和性及び特異性並びに結合親和性の種差について無細胞系［ヒスチジン（His）標識 PD-1 を用いた酵素結合免疫測定法（ELISA）法］又は細胞系（PD-1 発現細胞を用いた結合又は機能活性試験）で検討した。

2.1.1.1 野生型 PD-1 に対する結合

チスレリズマブの PD-1 に対する結合親和性について，完全長のヒト PD-1 遺伝子（*PD-1*）を安定的に発現させた T 細胞性リンパ腫細胞株 HuT78（HuT78/PD-1）を用い，蛍光活性化セルソーター（FACS）を用いて検討した（Gootenberg et al. 1981）。その結果，HuT78/PD-1 細胞上の野生型（WT）PD-1 に対するチスレリズマブの結合量は濃度に応じて増加し，2 つの臨床試験用バッチ（[redacted] 及び [redacted]）の 50%有効濃度（EC_{50}）値は，86 ng/mL（0.57 nmol/L）及び 75 ng/mL（0.5 nmol/L）であった（Figure 2-1）[Table 2.6.3.1-BLGC-002]。

Figure 2-1 野生型 PD-1 に対するチスレリズマブの結合親和性



HuT78/PD-1 細胞をチスレリズマブ（BGB-A317-[redacted] 又は BGB-A317-[redacted]）又は対照抗体（ヒト IgG 又はチスレリズマブのプラセボである Placebo-[redacted]）とインキュベーションした後，蛍光標識ヒト IgG Fc 抗体で染色し，細胞固定後，蛍光強度をフローサイトメータで測定した。

MFI：平均蛍光強度，huIgG：ヒト IgG

値は MFI，横軸は各抗体の濃度を表す。

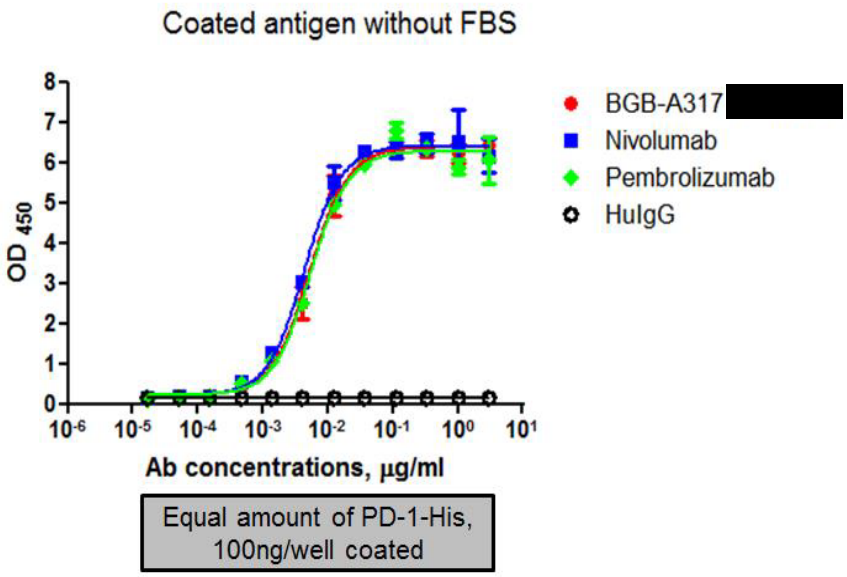
Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-002]

2.1.1.2 PD-1 に対する結合特異性

チスレリズマブの PD-1 に対する結合特異性について，ヒスチジン標識 PD-1 細胞外ドメイン（PD-1-ECD/His）固相化プレートを用いた ELISA 法で検討した。ウシ胎児血清（FBS）存在下又

は非存在下で PD-1 に対する結合親和性を検討し，抗 PD-1 抗体のニボルマブ及びペムブロリズマブと PD-1 に対する結合特異性を比較した[Table 2.6.3.1-BLGC-003(02)]。その結果，FBS 非存在下で PD-1（100 ng PD-1-ECD/His/ウェル）に対するチスレリズマブの結合量は濃度に応じて増加し（Figure 2-2），チスレリズマブ，ニボルマブ，及びペムブロリズマブの EC_{50} 値は，各々，5.3，4.3，及び 5.4 ng/mL とほぼ同等であった（Figure 2-2）。一方，PD-1-ECD/His の濃度勾配（0.06～1000 ng/ウェル）を設けたプレートを用い，5%FBS 存在下で PD-1 に対する結合量を測定した際（Figure 2-3）のチスレリズマブの EC_{50} 値は 62.8 ng/mL と約 12 倍に上昇した。同条件下でのニボルマブ及びペムブロリズマブの EC_{50} 値は，それぞれ 211.9（約 49 倍）及び 181.7 ng/mL（約 34 倍）に上昇した（Figure 2-2）。非特異的タンパク質である FBS 存在下において，チスレリズマブの EC_{50} 値はニボルマブやペムブロリズマブより低値であったことから，チスレリズマブは PD-1 に対してニボルマブやペムブロリズマブより優れた結合特異性を有すると考えられる。

Figure 2-2　　PD-1 固相化プレートを用いた ELISA 法による結合親和性の検討

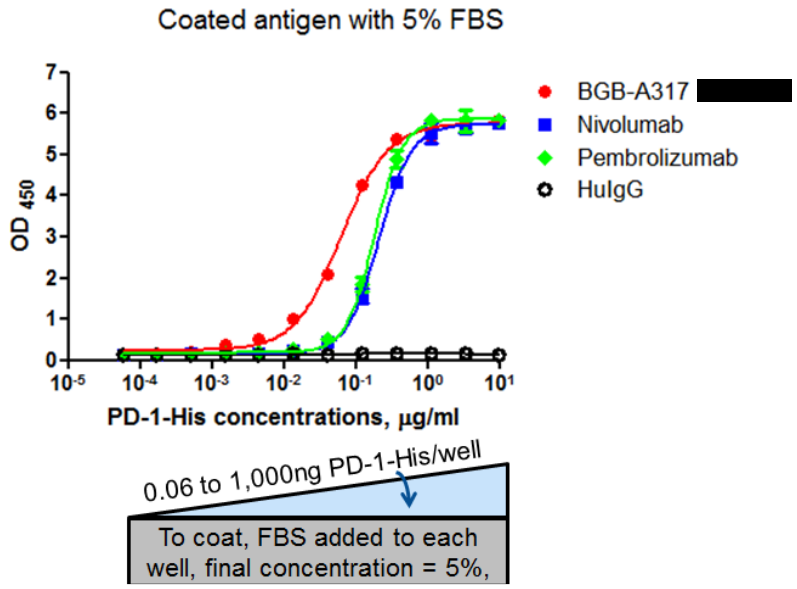


ヒスチジン標識ヒト PD-1 細胞外ドメイン（PD-1-ECD/His）100 ng/ウェルを ELISA プレートに固相化し，各濃度の抗 PD-1 抗体とインキュベーションした。洗浄後，HRP 標識抗ヒト IgG 抗体で染色してマイクロプレートリーダーで吸光度（OD450）を測定した。

BGB-A317-[redacted]：チスレリズマブ，huIgG：ヒト IgG，PD-1-His：PD-1-ECD/His

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-003(02)]

Figure 2-3　　FBS 混合 PD-1 固相化プレートを用いた ELISA 法による結合親和性の検討



PD-1-His の濃度勾配（0.06～1000 ng/ウェル）を設けたプレートを用い，5% FBS 存在下で PD-1 に対する結合量を上図（Figure 2-2）同様の ELISA 法で測定した。

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-003(02)]

Table 2-2　　FBS 存在下又は非存在下での PD-1 に対する結合親和性

抗原 / EC_{50}（ng/mL，倍）	チスレリズマブ	ニボルマブ	ペムブロリズマブ
PD-1（FBS 非存在下）EC_{50}（ng/mL）	5.3	4.3	5.4
PD-1（FBS 存在下）EC_{50}（ng/mL）	62.8	211.9	181.7
EC_{50} 比（倍）	12	49	34

ヒスチジン標識ヒト PD-1 細胞外ドメイン（PD-1-ECD/His）100 ng/ウェル又は 5% FBS 存在下 PD-1-His の濃度勾配（0.06～1000 ng/ウェル）を設けた ELISA プレートを用い，各抗 PD-1 抗体と PD-1 との結合親和性を評価し，4 係数ロジスティック曲線（[redacted]）から EC_{50} 値を算出した。

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-003(02)]

なお，HuT78/PD-1 細胞，その親株である HuT78 細胞，及び HEK293 細胞を用いた FACS 法でチスレリズマブの PD-1 に対する結合特性を評価した。その結果，チスレリズマブは HuT78/PD-1 細胞上に発現した WT PD-1 に対し結合親和性を示したが，HuT78 細胞や HEK293 細胞ではタンパク質への結合はほとんどみられなかった[Table 2.6.3.1-BLGC-003(02)]。

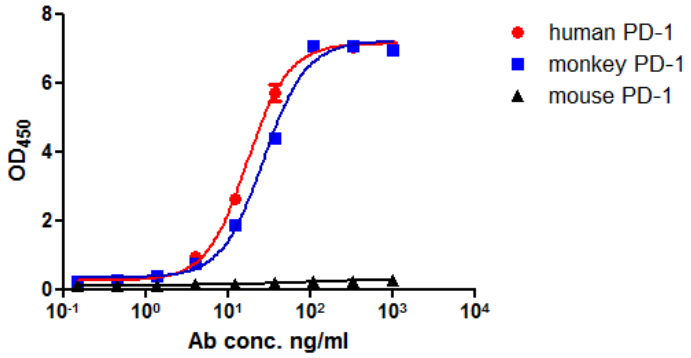
2.1.1.3　結合親和性の種差

ヒト PD-1 タンパク質 ECD のアミノ酸配列は，マウス及びラットの PD-1 と各々 62.4%及び 66.4%の相同性しか示さない。しかしながら，ヒト PD-1 の ECD はサル PD-1 の ECD と高い相同性（96.6%）を示す。ECD を構成するアミノ酸残基の比較で，ヒトとサルでは 6 個の違いしかみられなかったが，ヒトとマウスでは 56 個の違いが認められている。

チスレリズマブの各種動物由来 PD-1 に対する結合親和性を確認する目的で，ヒト，サル，及びマウスの PD-1 に対するチスレリズマブの結合親和性を PD-1-His 固相化プレートを用いた ELISA 法で検討した[Table 2.6.3.1-BLGC-003(02)]。その結果，チスレリズマブはヒト PD-1［EC_{50}：17.3 ng/mL（0.12 nmol/L）］及びサル PD-1［EC_{50}：27.4 ng/mL（0.18 nmol/L）］に結合したが，マウス PD-1 への結合は検出できなかった（Figure 2-4）。なお，本試験においてヒト PD-1 に対する EC_{50} 値が前項の試験（Figure 2-2，Figure 2-3）よりやや高かったのは固相化した PD-1-His や二次抗体の量の違いによるものと考えられる。

以上，チスレリズマブはヒトとサルの PD-1 にほぼ同等に結合し，マウス PD-1 への結合は認められなかった。この結果は，ヒト PD-1 がサルの PD-1 と高い相同性を有するがマウス PD-1 との相同性は非常に低いことと一致する。これらの結果から，本薬の非臨床安全性評価に適する動物種はサルであると考えられた。

Figure 2-4　　ヒト，サル及びマウスの PD-1 に対するチスレリズマブの結合親和性



ヒト，サル又はマウス由来のヒスチジン標識 PD-1-His 160 ng/ウェルを ELISA プレートに固相化し，各濃度のチスレリズマブとインキュベーションした。洗浄後，HRP 標識抗ヒト IgG 抗体で染色してマイクロプレートリーダーで吸光度（OD450）を測定した。

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-003(02)]

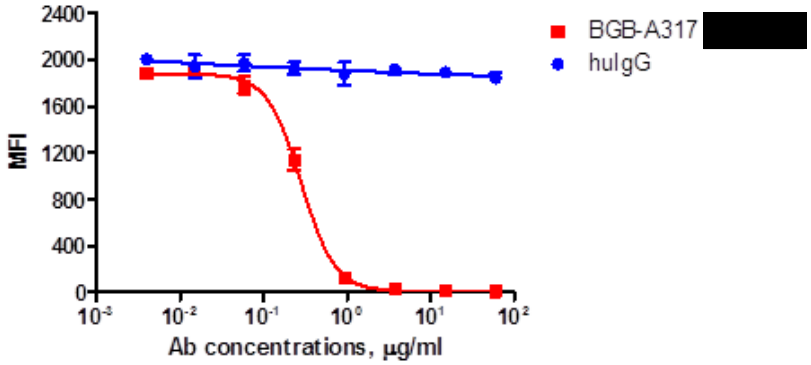
2.1.2　　交差反応性の確認による安全性評価用の動物種の選択

ELISA による検討で，チスレリズマブはヒトとサルの PD-1 にほぼ同等に結合したがマウス PD-1 への結合は認められなかった（2.1.1 項）。この結果は，ヒト PD-1 との相同性（サル：96.6%，マウス：62.4%）と一致した。

サルがチスレリズマブの安全性評価に適する動物種であることを確認する目的で，チスレリズマブとヒト PD-L1 とのサル PD-1 への競合的結合実験を実施し，チスレリズマブの機能活性について検討した[Table 2.6.3.1-BLGC-020]。PD-L1 ECD はヒトとサルとで相同性が高く（96.0%），ヒト PD-L1 はサル PD-1 に結合すると考えられたことから，リガンドはヒト PD-L1 を用いた。その結果，チスレリズマブはヒト PD-L1 のサル PD-1 への結合を濃度依存的に阻害した。一方，対照として用いたヒト IgG（huIgG）は PD-L1 のサル PD-1 への結合を阻害しなかった（Figure 2-5）。

本試験において，チスレリズマブがサルの PD-1 に対してもヒト PD-1 と同様の反応性を示したことから，チスレリズマブの安全性評価にはサルが適していることが確認された。

Figure 2-5　　サル PD-1 へのヒト PD-L1 結合に対するチスレリズマブの競合的阻害作用



サル PD-1 を発現させた HuT78 細胞（HuT78/mkPD-1）をチスレリズマブ（BGB-A317[redacted]）又は対照抗体（huIgG）存在下でビオチン化ヒト PD-L1 とインキュベーションし，蛍光標識ストレプトアビジン処理，細胞固定後，細胞の蛍光強度をフローサイトメータで測定した。

MFI：平均蛍光強度，huIgG：ヒト IgG

値は MFI，横軸は各抗体の濃度を表す。

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-020]

2.1.3　　ヒト PD-1/His を用いた表面プラズモン共鳴（SPR）法による解析

ヒト PD-1 に対するチスレリズマブの結合親和性を SPR 法により測定した。センサーチップ上にヒト PD-1/His 標識リガンドを固相化した後，チスレリズマブ（完全長抗体又は Fab）を流してリガンドに結合するチスレリズマブ量を測定し，解離定数等の反応速度論的パラメータを算出した。なお，センサーチップ上に固相化するリガンドを低密度と高密度の 2 条件で検討した。

その結果，ヒト PD-1 に対するチスレリズマブ（完全長抗体）の解離定数（K_D）値はリガンド低密度の条件下で 0.15 nmol/L であった（Table 2-3）。また，同条件下でのチスレリズマブ（Fab）の K_D 値は 0.23 nmol/L で，完全長の値よりやや高かった。これは，完全長抗体が二価であることに起因するものと考えられる。

Table 2-3　　完全長チスレリズマブのヒト PD-1 に対する結合・解離速度定数（SPR 法）

PD-1 の密度	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (mol/L)	Rmax (RU)
低	2.64×10^{5}	3.83×10^{-5}	1.5×10^{-10}	23
高	3.42×10^{5}	3.77×10^{-6}	1.1×10^{-11}	118

解析には完全長チスレリズマブ（[redacted] DS）を用いた。

K_{on}：結合速度定数，K_{off}：解離速度定数，K_D：解離定数，Rmax：最大レスポンス，RU：レスポンスユニット

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-004(02)]

2.1.4 チスレリズマブの結合に重要な PD-1 のエピトープ

PD-1 のリガンドとして PD-L1 と PD-L2 が知られている。PD-1/PD-L1 及び PD-1/PD-L2 複合体の分子構造について X 線結晶構造解析を実施したところ，PD-L1 及び PD-L2 と PD-1 の結合には PD-1 の 6 つのアミノ酸残基（K45，I93，L95，P97，I101，及び E103）が重要であることが確認された（Lin et al. 2008，Lázár-Molnár et al. 2008）。6 つのアミノ酸残基のうちいずれの残基にチスレリズマブが結合するかを評価するため，6 つのアミノ酸残基を各々アラニンに変異させた PD-1 変異体を作成した。各変異体へのチスレリズマブの結合活性について ELISA 及びウエスタンブロット法で検討し，WT PD-1 への結合活性と比較した[Table 2.6.3.1-BLGC-005(02)]。対照抗体として抗 PD-1 抗体（Ref-Ab）を用いた。

その結果，ELISA 及びウエスタンブロットのいずれの方法においても，K45 及び I93 の変異（K45A 及び I93A）によりチスレリズマブの結合が低下したことから，K45 及び I93 がチスレリズマブの PD-1 への結合に重要なエピトープであることが示唆された。なお，Ref-Ab ではチスレリズマブとは異なるエピトープ（P97）の変異により PD-1 への結合が低下した（Table 2-4）。

Table 2-4 チスレリズマブと PD-1 のエピトープマッピング（ELISA 法）

野生型又は変異型 PD-1	チスレリズマブ	Ref-Ab	huIgG
WT			***
K45A	***		***
I93A	**		***
L95A			***
P97A		***	***
I101A			***
E103A			***

：50%～75%の結合低下，*：75%以上の結合低下，空欄は 50%を超える結合低下なし。
Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-005(02)]

2.1.5 細胞を用いた機能活性試験

PD-1 は I 型膜タンパクで，その機能活性はリガンドの結合により誘発される。

PD-1 の細胞内 C-末端領域は immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif（ITIM）及び immunoreceptor tyrosine switch motif（ITSM）を有し，両者はそれぞれ抑制性シグナルを伝達する。

ITIM はチロシン残基を含むアミノ酸配列モチーフであり，抑制型受容体の細胞内領域に存在する。PD-1 リガンド刺激に伴い ITIM のチロシン残基がリン酸化されると，ホスファターゼがリン酸化された ITIM に結合して活性化シグナルを抑制する。ITSM は SH-2 領域を動員することによりホスファターゼを供与する。ITIM と ITSM の働きにより，活性化 T 細胞受容体が PD-1 の活性化により脱リン酸化され，T 細胞の増殖やサイトカイン分泌が抑制される（Freeman 2008，Riley 2009）。チスレリズマブの機能活性について細胞を用いた種々の *in vitro* モデルで検討した。

2.1.5.1 ヒト PD-1 とヒト PD-1 リガンド（PD-L1 及び PD-L2）との結合に対する競合的阻害作用

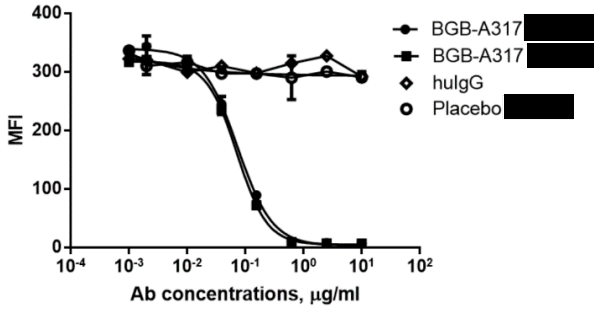
T 細胞性リンパ腫細胞 HuT78/PD-1 に発現したヒト PD-1 とヒト PD-1 リガンド（PD-L1 及び PD-L2）の結合に対するチスレリズマブの阻害作用について FACS により評価した。

チスレリズマブ（10^{-3}～10 µg/mL）又は対照抗体（huIgG 又はプラセボ）を HuT78/PD-1 細胞に添加し，静置した後，ビオチン標識ヒト PD-L1 Fc（PD-L1 の Fc 融合タンパク）又はビオチン標識ヒト PD-L2 Fc（PD-L2 の Fc 融合タンパク）を添加した。その後，蛍光標識ストレプトアビジンを添加し，HuT78/PD-1 細胞上に発現する PD-1 に結合したヒト PD-L1 Fc 及びヒト PD-L2 Fc を検出した[Table 2.6.3.1-BLGC-006]。

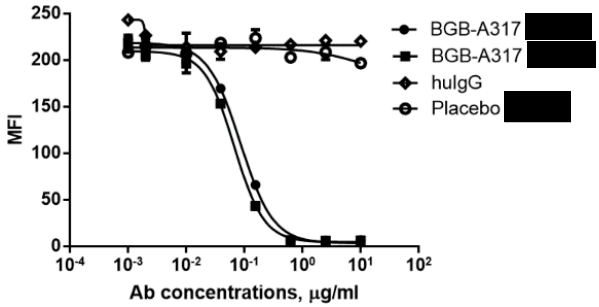
その結果，チスレリズマブはヒト PD-1 とヒト PD-L1 Fc，及びヒト PD-1 とヒト PD-L2 Fc との結合をいずれも阻害し（最大阻害率はいずれも 100%），その 50%阻害濃度（IC_{50}）値は，各々72～74 ng/mL（0.48～0.49 nmol/L）及び 67～86 ng/mL（0.45～0.57 nmol/L）であった（Figure 2-6）。チスレリズマブは，PD-L1 及び PD-L2 の PD-1 への結合を競合的に阻害し，PD-1 リガンドによって誘発される抑制性のシグナル伝達を阻害することによって，T 細胞増殖活性化とサイトカイン分泌を促すものと考えられる。

Figure 2-6　ヒト PD-1 と PD-L1（A）及び PD-L2（B）との結合に対するチスレリズマブの競合的阻害作用

A



B



HuT78/PD-1 細胞をチスレリズマブ（BGB-A317-[redacted] 又は BGB-A317-[redacted]）又は対照抗体（huIgG 又はチスレリズマブのプラセボである Placebo-[redacted]）存在下でビオチン化 PD-L1（A）又は PD-L2（B）とインキュベーションし，蛍光標識ストレプトアビジン処理，細胞固定後，蛍光強度をフローサイトメータで測定した。

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-006]

2.1.5.2 チスレリズマブの PD-1 機能阻害活性のニボルマブ及びペムブロリズマブとの比較

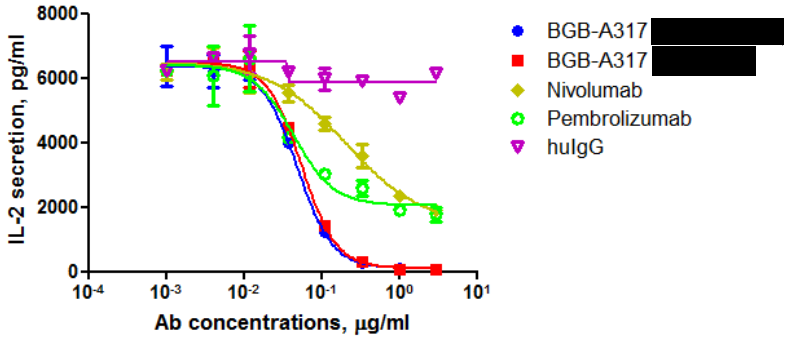
T 細胞性リンパ腫細胞株 HuT78 にキメラ PD-1（P3Z）を発現させた HuT78/P3Z 細胞を用いてチスレリズマブの機能活性について検討した。P3Z では PD-1 細胞質ドメインが CD3ζ 鎖に置換されている。このため，通常 PD-1 刺激により HuT78/PD-1 細胞では抑制性シグナルが伝達され IL-2 分泌が抑制されるが，HuT78/P3Z 細胞では CD3 が関与する活性化シグナルが伝達され IL-2 が分泌されることから，PD-1 を阻害すると IL-2 分泌は低下する。

HuT78/P3Z 細胞から分泌される IL-2 の低下を指標として，チスレリズマブの機能活性について検討した。HuT78/P3Z 細胞を，PD-L1 を発現している HEK293/PD-L1 細胞と共培養し，PD-1 刺激を行った。共培養前に，チスレリズマブ（0.0009～2 μg/mL），同濃度のニボルマブ，ペムブロリズマブ，又は対照抗体（huIgG）を添加した。PD-1 刺激により培養液中に分泌される IL-2 を ELISA 法で測定し，被験薬の影響について検討した。なお，チスレリズマブは完全長のもの以外に，Fc 領域に改変を加え，ニボルマブやペムブロリズマブと同一の Fc 領域にしたもの（チスレリズマブ/IgG4$_{S228P}$）を用いた[Table 2.6.3.1-BLGC-007(02)]。

HEK293/PD-L1 細胞との共培養により HuT78/P3Z 細胞から IL-2 が分泌された。チスレリズマブ及びチスレリズマブ/IgG4$_{S228P}$ は，いずれも濃度依存的に HuT78/P3Z 細胞からの IL-2 分泌を抑制し，IC$_{50}$ 値は，各々，0.049 及び 0.056 μg/mL であり，最大効果はいずれも 98.4 及び 98.5%であった。一方，ニボルマブ及びペムブロリズマブも IL-2 分泌を抑制したが，IC$_{50}$ 値は，各々，0.208 及び 0.044 μg/mL であり，その最大効果は 78.1%及び 68.0%であった（Figure 2-7，Table 2-5）。なお，huIgG 添加の影響はみられなかった。

以上より，チスレリズマブの PD-1 の機能阻害様式はニボルマブ及びペムブロリズマブとは異なることが示唆された。

Figure 2-7 キメラ PD-1（P3Z）発現 HuT78/P3Z 細胞に対するチスレリズマブの IL-2 分泌抑制作用



HuT78/P3Z 細胞を，PD-L1 を発現している HEK293/PD-L1 細胞と共培養し，PD-1 刺激を行った。PD-1 刺激の 15 分前にチスレリズマブ（BGB-A317 [redacted]，0.0009～2 μg/mL），同濃度のチスレリズマブ/IgG4$_{S228P}$，ニボルマブ，ペムブロリズマブ，又は対照抗体（huIgG）を添加した。17 時間のインキュベーションで HuT78/P3Z 細胞から培養液中に分泌される IL-2 を ELISA 法で測定した。

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-007(02)]

Table 2-5 HuT78/P3Z 細胞における PD-1 阻害作用

パラメータ	チスレリズマブ	チスレリズマブ /IgG4$_{S228P}$	ニボルマブ	ペムブロリズマブ
Max inhibition,%	98.4	98.5	78.1	68.0
RV* of max inhibition,%	100	100	79	69
IC_{50}, μg/mL	0.049	0.056	0.208	0.044
RV of IC_{50},%	100	88	23	111

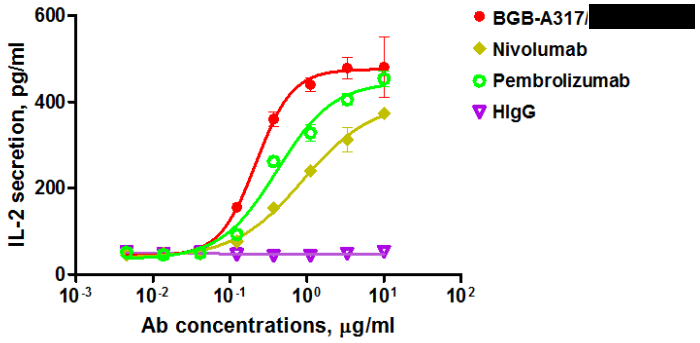
*RV（相対分散）はチスレリズマブの値を 100%として算出した。

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-007(02)]

2.1.5.3 HuT78/PD-1 細胞における IL-2 分泌亢進作用

T 細胞では PD-1 による抑制性シグナルにより IL-2 分泌が抑制される。チスレリズマブの PD-1 阻害作用について HuT78/PD-1 細胞からの IL-2 分泌を指標に検討した。PD-1 シグナルは HEK293/OS8-PD-L1 細胞と共培養することにより誘発した。なお，HEK293/OS8-PD-L1 細胞は，PD-L1 と OS8 を発現している。OS8 はその細胞外ドメインに抗ヒト CD3 抗体である OKT3 の可変領域を持つタンパク質であり，T cell engager と呼ばれ T 細胞活性化能を持つ。CD3 は T 細胞において T 細胞受容体（TCR）と会合して活性化シグナルを伝達することから，HEK293/OS8-PD-L1 細胞上の OS8 により HuT78/PD-1 細胞の CD3 が刺激され活性化する。共培養前の HuT78/PD-1 細胞に，チスレリズマブ（0.005～10 mg/mL），同濃度のニボルマブ，ペムブロリズマブ，又は対照抗体（huIgG）を添加した[Table 2.6.3.1-BLGC-008(02)]。その結果，チスレリズマブは，HuT78/PD-1 細胞からの IL-2 分泌を濃度依存的に亢進し，IL-2 分泌亢進作用の EC_{50} 値は 1.47 nmol/L であった。一方，ニボルマブ及びペムブロリズマブでも IL-2 分泌亢進がみられたが，その EC_{50} 値（ニボルマブ：5.98 nmol/L，ペムブロリズマブ：2.74 nmol/L）はチスレリズマブより高値であった（Figure 2-8，Table 2-6）。

Figure 2-8　　HuT78/PD-1 細胞に対するチスレリズマブの IL-2 分泌亢進作用



HuT78/PD-1 細胞を，チスレリズマブ（BGB-A317/[redacted]，0.005～10 µg/mL），同濃度のニボルマブ，ペムブロリズマブ，又は対照抗体（HIgG：ヒト IgG）存在下で HEK293/OS8-PD-L1 細胞と 17 時間共培養し，培養液中の IL-2 濃度を ELISA 法で測定した。

Table 2-6　　抗 PD-1 抗体の IL-2 分泌亢進作用の比較

パラメータ	チスレリズマブ	ニボルマブ	ペムブロリズマブ
Top, pg/mL	476	400	447
RV of top,%	100	84	94
EC_{50}, µg/mL	0.220	0.897	0.411
EC_{50}, nmol/L	1.47	5.98	2.74
RV of EC_{50},%	100	25	53

HuT78/PD-1 細胞を，チスレリズマブ（BGB-A317/[redacted]，0.005～10 µg/mL），同濃度のニボルマブ，ペムブロリズマブ，又は対照抗体（huIgG）存在下で HEK293/OS8-PDL1 と 17 時間共培養し，培養液中の IL-2 濃度を ELISA 法で測定した。

Top：プラトー到達時の IL-2 濃度，RV：相対分散

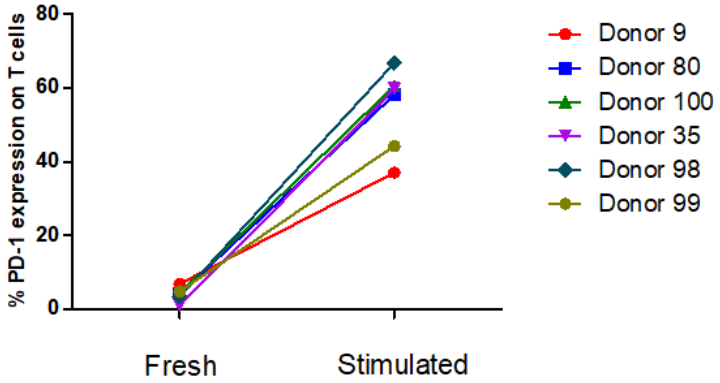
Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-008(02)]

2.1.5.4　活性化 PBMC における PD-1 の発現亢進

健康成人由来初代培養 PMBC を抗 CD3 抗体（OKT3）刺激により活性化し，誘導される PD-1 発現亢進を確認した。PD-1 の発現は，$CD3^+PD\text{-}1^+$細胞の割合を FACS で測定することにより評価した[Table 2.6.3.1 BLGC-014]。

OKT3 刺激前では $PD\text{-}1^+$ PBMC はほとんどみられなかった。一方，OKT3 刺激後の PBMC では PD-1 の発現が速やかに誘導された（Figure 2-9）。CD3 は TCR と直接会合することから，PD-1 発現亢進は TCR を介するものと考えられる。これらの成績は過去の報告例（Keir et al. 2008，Kinter et al. 2008）と一致した。

Figure 2-9　　抗 CD3 抗体刺激により発現したヒト PMBC 上の PD-1



無処置 PBMC（Fresh）を抗 CD3 抗体（OKT3）で刺激（Stimulated）し，$CD3^{+}PD\text{-}1^{+}$ 細胞を FACS で検出して各 PBMC の PD-1 発現レベルを確認した。

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-014]

2.1.5.5　TCR を介した IFN-γ 分泌に及ぼすチスレリズマブの影響

チスレリズマブは，上述したように T 細胞株 HuT78/PD-1 を用いた検討において，PD-1 と PD-L1 の相互作用を阻害した（Table 2-5）。このことから，本試験では健康ドナーから得られた PBMC を用いて本薬の PD-1 阻害作用を検討した。本試験では HEK293/OS8-PD-L1 細胞を PBMC とともに用いた。2.1.5.3 項で述べたように HEK293/OS8-PD-L1 細胞は HuT78/PD-1 細胞に対して OS8 を介して活性化を誘導し，PD-L1 を介して PD-1 シグナル伝達により細胞機能を抑制する。

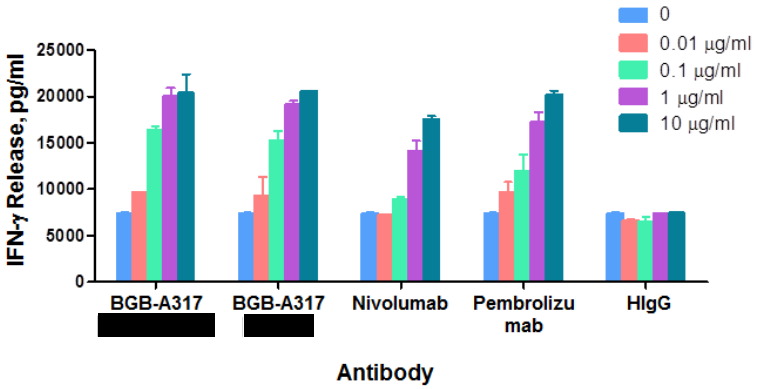
OKT3 により前処理を施した初代培養 PBMC をチスレリズマブ（0.01～10 mg/mL）存在下で HEK293/OS8-PD-L1 細胞と共培養し，PBMC から分泌される IFN-γ を ELISA 法で測定した。また，スフェロイド（凝集塊）培養系で両細胞を共培養し，顕微鏡下で細胞塊の形状・大きさを観察して PBMC の増殖活性を評価した。

その結果，チスレリズマブ（完全長のもの，並びに Fc 領域がニボルマブ，及びペムブロリズマブと同一の S228P 変異を有するもの）は濃度依存的に PBMC からの IFN-γ 分泌を亢進し，その効力はニボルマブやペムブロリズマブとほぼ同等であった（Figure 2-10）。なお，チスレリズマブの効果は複数のドナー由来 PBMC で一貫していた[Table 2.6.3.1-BLGC-009(02)]。

また，HEK293/OS8-PD-L1 細胞及び PBMC は，単独培養時にはスフェロイド状又は球状を示した（Figure 2-11 A，B）。両細胞を 7 日間共培養すると，PD-L1 リガンドを発現する HEK293/OS8-PD-L1 細胞凝集塊の周囲に PBMC が集簇し，ドーナツ状の集合体を形成した（Figure 2-11 C）。チスレリズマブ存在下では対照抗体（IgG）存在下と比較して HEK293/OS8-PD-L1 凝集塊周囲に集簇する PBMC は増加し，ドーナツ状集合体の増大がみられ PMBC の増殖亢進が示唆された（Figure 2-11 D）。

以上より，チスレリズマブは PBMC からの IFN-γ 分泌を促進するだけでなく，PBMC の増殖を亢進することが示された。

Figure 2-10　　ヒト PBMC に対するチスレリズマブの IFN-γ 分泌促進作用

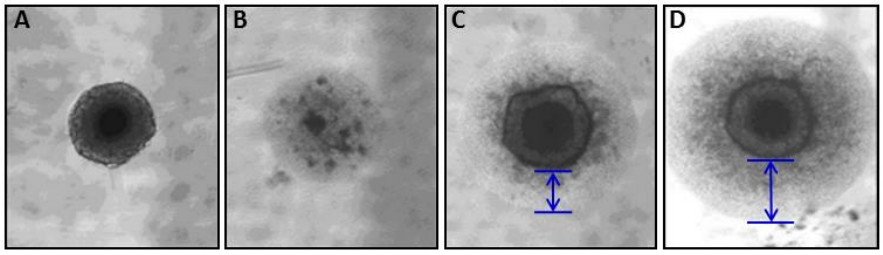


活性化処理を施した初代培養ヒト PBMC をチスレリズマブ（完全長チスレリズマブ：BGB-A317 [redacted]，Fc 領域がニボルマブ，及びペムブロリズマブと同一の S228P，0.01～10 μg/mL），同濃度のニボルマブ，ペムブロリズマブ又はヒト IgG（HIgG）存在下で PD-L1 発現細胞（HEK293/OS8-PD-L1）と共培養し，PBMC から分泌される IFN-γ を ELISA 法で測定した。

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-009(02)]

Figure 2-11　　スフェロイド培養でのヒト PMBC に対するチスレリズマブの増殖促進作用

	A	B	C	D
Sensor cell	—	PBMC	PBMC	PBMC
Signal sending cell	H293/OS8-PD-L1	—	H293/OS8-PD-L1	H293/OS8-PD-L1
Antibody	—	—	huIgG	BGB-A317



HEK293/OS8-PD-L1 細胞及び活性化処理を施した初代培養ヒト PBMC をスフェロイド培養にてそれぞれ単独（A，B），又は，対照抗体（huIgG，C）及びチスレリズマブ（D）存在下で共培養し，7 日後に撮影した。矢印は PBMC のドーナツ状集合体の厚さを示す。

BGB-A317：チスレリズマブ，huIgG：ヒト IgG

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-009(02)]

2.2　　*In vivo* 薬理試験

チスレリズマブの抗腫瘍効果について，さまざまなヒトがん細胞を用いた異種移植モデルで検討した（ヒト類表皮癌細胞株 A431[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-126]，ヒト大腸癌患者由来腫瘍組織 BCCO-028[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-127]，及びヒト非小細胞肺癌患者由来腫瘍組織 BCLU-054[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-128]）。チスレリズマブは，mGMCSF 発現マウス悪性黒色腫細胞株（B16F10）を移植したヒト PD-1 導入トランスジェニックマウスにおいても優れた抗腫瘍効果を発揮した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-135]。さらに，本薬のサロゲートとして用いた抗マウス PD-1 抗

体（Ch15mt）は，マウス大腸癌細胞を用いた同種移植モデルに対し優れた抗腫瘍効果を示した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-125]。これらの成績において，チスレリズマブは優れた腫瘍増殖抑制効果を示したが，試験期間を通じて体重に有意な影響を及ぼさなかった。

効力を裏付ける薬理試験として実施された *in vivo* 薬理試験の一覧を以下に示す（Table 2-7）。

Table 2-7 *In vivo* 効力を裏付ける薬理試験の一覧

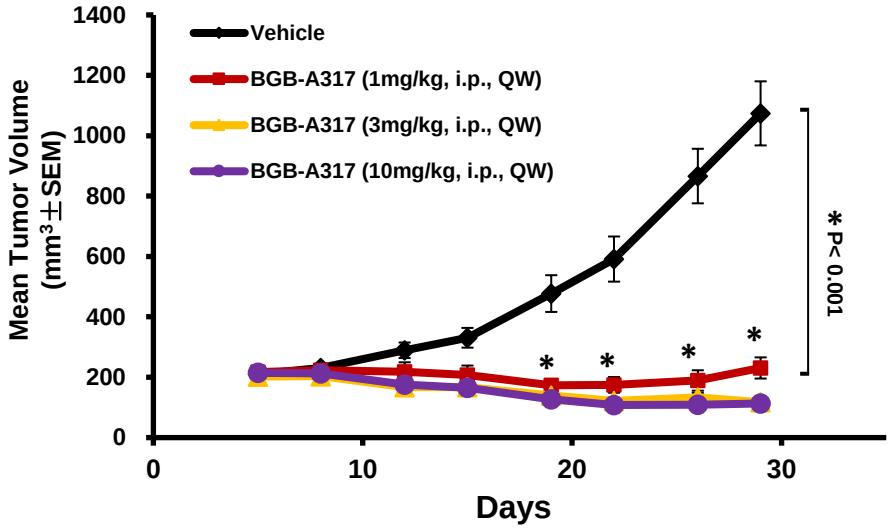
Type of Study / Description	Test System	Method of Administration	Study Number
Efficacy study of BGB-A317 in A431 allogeneic xenograft model	Female NOD/SCID mice	i.p., *in vivo*	R01-VIVO-126
Efficacy study of BGB-A317 in BCCO-028 allogeneic xenograft model	Female NOD/SCID mice	i.p., *in vivo*	R01-VIVO-127
Efficacy study of BGB-A317 in BCLU-054 allogeneic xenograft model	Female NOD/SCID mice	i.p., *in vivo*	R01-VIVO-128
Efficacy study of BGB-A317 on B16F10/GMCSF in hPD-1 transgenic mouse model	Female B-hPD-1 C57BL/6J mice	i.p., *in vivo*	R01-VIVO-135
Efficacy study of anti-mouse PD-1 surrogate antibody Ch15mt in CT26.WT syngeneic model	Female BALB/c mice	i.p., *in vivo*	R01-VIVO-125

2.2.1 ヒト類表皮癌細胞株 A431 異種移植モデルに対する効果

重度免疫不全マウス（NOD/SCID マウス）の A431 細胞異種移植モデルを用いて薬物動態／薬力学試験を実施した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-126]。A431 細胞をヒト PBMC とともにマウス皮下に移植した翌日（Day 1）からチスレリズマブ（1，3，及び 10 mg/kg）を週 1 回（QW）5 週間腹腔内（i.p.）投与して経時的に腫瘍体積を測定した。初回投与日（Day 1）と 5 回目の投与日（Day 29）に採血し，血清中チスレリズマブ濃度を測定した。

その結果，チスレリズマブ（1，3，及び 10 mg/kg）は有意な腫瘍増殖抑制効果を示し，Day 29 での抑制率は，各々，78%，89%，及び 89%であった（Figure 2-12，Table 2-8）。チスレリズマブの血清中薬物濃度-時間曲線下面積（AUC）及び最高血清中薬物濃度（C_{max}）は，Day 1 及び定常状態に達した Day 29 のいずれにおいても用量に比例して増加した。Day 1 と Day 29 の AUC 又は C_{max} の比較で約 2 倍の蓄積がみられた（Table 2-8）。試験期間を通じてチスレリズマブ投与による体重への影響はみられなかった。

Figure 2-12 A431 細胞異種移植マウスモデルに対するチスレリズマブの腫瘍増殖抑制効果



A431 細胞（2.5×10^6 個）をヒト PBMC（5×10^6 個）とともに NOD/SCID マウスの皮下に移植した翌日（Day 1）から，チスレリズマブ（1，3，及び 10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回 5 週間腹腔内投与し，週 2 回経時的に腫瘍体積を測定した（n = 10～12）。腫瘍体積（mm^3）は，腫瘍の長径 ×（短径）$^2 \times 1/2$ の式から求めた。縦軸は腫瘍体積（mm^3）（平均値 ± 標準誤差），横軸は A431 細胞移植後の日数を示す。

溶媒対照群に対する有意差，*：$p < 0.001$（Student の t 検定）

Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-126]

Table 2-8 A431 細胞異種移植マウスにチスレリズマブを投与したときの腫瘍増殖抑制効果と血清中薬物濃度

被験物質	用量（mg/kg）	例数	腫瘍増殖抑制率（%）	腫瘍体積（mm^3，平均値 ± 標準誤差）	単回投与時（Day 1）		定常状態（Day 29）	
					Cmax (μg/mL)	AUC0-168h (μg·h/mL)	Cmax (μg/mL)	AUC0-168h (μg·h/mL)
溶媒	-	12	-	1074 ± 106	-	-	-	-
チスレリズマブ	1	11	78	231 ± 35	8.2	998	19.2	2468
	3	11	89	117 ± 11	25.0	3115	45.1	5593
	10	10	89	113 ± 16	84.1	11009	157.7	18437

A431 細胞をヒト PBMC とともにマウス皮下に移植した翌日（Day 1）から，チスレリズマブ（1，3，及び 10 mg/kg）を週 1 回 5 週間腹腔内投与し，経時的に腫瘍体積を測定した。Day1 及び Day 29 に採血し，血清中チスレリズマブ濃度を測定した。値は，Day 29 における腫瘍増殖抑制率及び腫瘍体積の平均値 ± 標準誤差，又は Day 1 及び Day 29 での血清中チスレリズマブ濃度を示す。

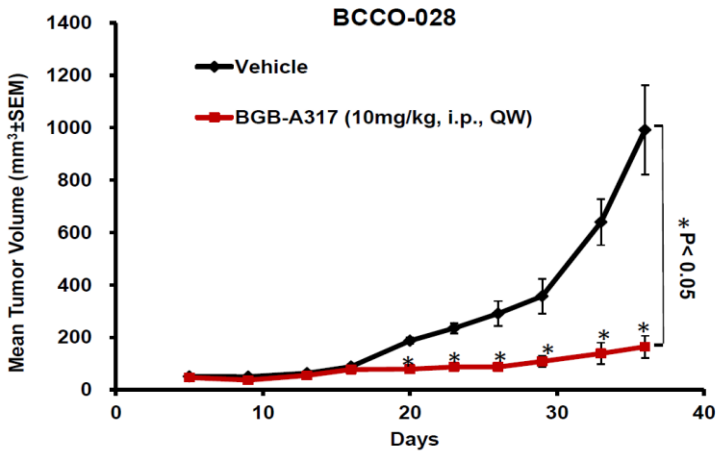
Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-126]

2.2.2 ヒト大腸癌 BCCO-028 異種移植モデルに対する効果

ヒト大腸癌患者由来腫瘍組織 BCCO-028 をヒト PBMC とともに皮下移植した NOD/SCID マウスを用いてチスレリズマブの抗腫瘍効果を検討した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-127]。チスレリズマブ（10 mg/kg）の週 1 回 5 週間腹腔内投与により有意な腫瘍増殖抑制効果がみられ，Day 36（最終

投与の 1 週間後）での抑制率は 83%であった（Figure 2-13，Table 2-9）。試験期間を通じてチスレリズマブ投与による体重への影響はみられなかった。

Figure 2-13　BCCO-028 異種移植マウスモデルに対するチスレリズマブの腫瘍増殖抑制効果



ヒト大腸癌患者由来腫瘍組織 BCCO-028（3 × 3 × 3 mm^3）を新鮮ヒト PBMC（5 × 10^6 個）とともに NOD/SCID マウスに皮下移植した。移植翌日からチスレリズマブ（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回 5 週間腹腔内投与し，週 2 回経時的に腫瘍体積を測定した（n = 8）。縦軸は腫瘍体積（mm^3）（平均値 ± 標準誤差），横軸は細胞移植後の日数を示す。

溶媒対照群に対する有意差，*：p < 0.05（Student の t 検定）

Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-127]

Table 2-9　BCCO-028 異種移植マウスモデルに対するチスレリズマブの効果

被験物質	用量（mg/kg）	例数	腫瘍増殖抑制率（%）	腫瘍体積（mm^3，平均値 ± 標準誤差）
溶媒	-	8	-	992 ± 258
チスレリズマブ	10	8	83	164 ± 52

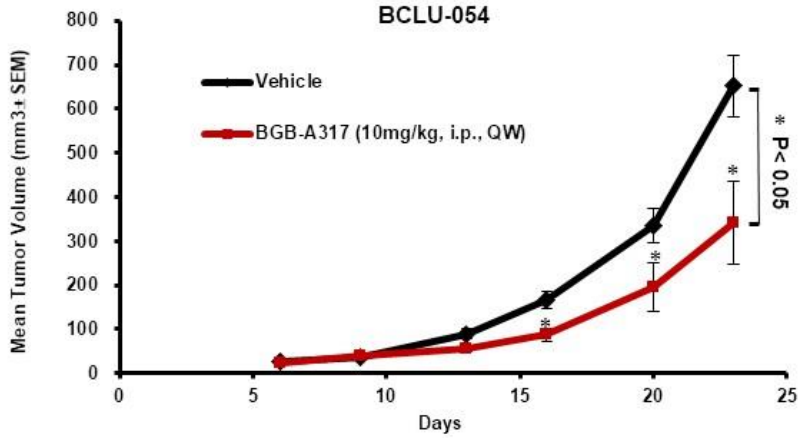
ヒト大腸癌患者由来腫瘍組織 BCCO-028（3 × 3 × 3 mm^3）を新鮮ヒト PBMC（5 × 10^6 個）とともに NOD/SCID マウスに皮下移植（Day 0）した。移植翌日からチスレリズマブ（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回 5 週間腹腔内投与し，週 2 回経時的に腫瘍体積を測定した。値は，Day 36 における腫瘍増殖抑制率及び腫瘍体積の平均値 ± 標準誤差を示す。

Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-127]

2.2.3　ヒト非小細胞肺癌 BCLU-054 異種移植モデルに対する効果

ヒト非小細胞肺癌患者由来腫瘍組織 BCLU-054 をヒト PBMC とともに皮下移植した NOD/SCID マウスを用いてチスレリズマブの抗腫瘍効果を検討した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-128]。チスレリズマブ（10 mg/kg）の週 1 回 3 週間腹腔内投与により有意な腫瘍増殖抑制効果がみられ，Day 23（4 回目の投与の翌日）での抑制率は 45%であった（Figure 2-14，Table 2-10）。試験期間を通じてチスレリズマブ投与による体重への影響はみられなかった。

Figure 2-14 BCLU-054 異種移植マウスモデルに対するチスレリズマブの腫瘍増殖抑制効果



ヒト非小細胞肺癌患者由来腫瘍組織 BCLU-054（3 × 3 × 3 mm^3）を新鮮ヒト PBMC（4 × 10^6 個）とともに NOD/SCID マウスに皮下移植（Day 0）した。移植翌日からチスレリズマブ（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回（Day 1，8，15，及び 22）腹腔内投与し，経時的に腫瘍体積を測定した（n = 10）。縦軸は腫瘍体積（mm^3）（平均値 ± 標準誤差），横軸は移植後の日数を示す。

溶媒対照群に対する有意差，*：$p < 0.05$（Student の t 検定）

Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-128]

Table 2-10 BCLU-054 異種移植マウスモデルに対するチスレリズマブの効果

被験物質	用量（mg/kg）	例数	腫瘍増殖抑制率（%）	腫瘍体積（mm^3，平均値 ± 標準誤差）
溶媒	-	10	-	652 ± 79
チスレリズマブ	10	10	45	357 ± 105

ヒト非小細胞肺癌患者由来腫瘍組織 BCLU-054（3 × 3 × 3 mm^3）を新鮮ヒト PBMC（4 × 10^6 個）とともに NOD/SCID マウスに皮下移植（Day 0）した。移植翌日からチスレリズマブ（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回（Day 1，8，15，及び 22）腹腔内投与し，経時的に腫瘍体積を測定した。値は，Day 23 での腫瘍増殖抑制率及び腫瘍体積の平均値 ± 標準誤差を示す。

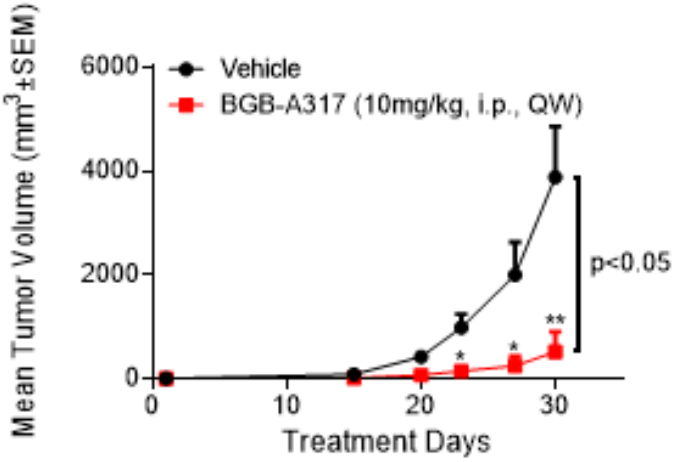
Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-128]

2.2.4 hPD-1 ヒト化マウスを用いた抗腫瘍効果の検討

ヒト PD-1 遺伝子導入トランスジェニックマウス（hPD-1 ヒト化マウス，B-hPD-1 C57BL/6J）を用いてチスレリズマブの抗腫瘍効果を検討した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-135]。B-hPD-1 C57BL/6J マウスに mGMCSF 発現マウス悪性黒色腫細胞株（B16F10/GMCSF）を皮下移植し，チスレリズマブ（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回 5 週間腹腔内投与した。

チスレリズマブ（10 mg/kg）の投与により有意な腫瘍増殖抑制効果がみられ，Day 30（最終投与の 2 日後）での抑制率は 86.7%であった（Figure 2-15，Table 2-11）。チスレリズマブ投与群では，溶媒投与群と比較し，腫瘍増殖開始までの潜時の延長と増殖速度の遅延がみられた（Figure 2-16）。試験期間を通じてチスレリズマブ投与による体重への影響はみられなかった。

Figure 2-15 hPD-1 ヒト化マウスに移植した mGMCSF 発現マウス悪性黒色腫細胞（B16F10/GMCSF）の増殖に及ぼすチスレリズマブの影響

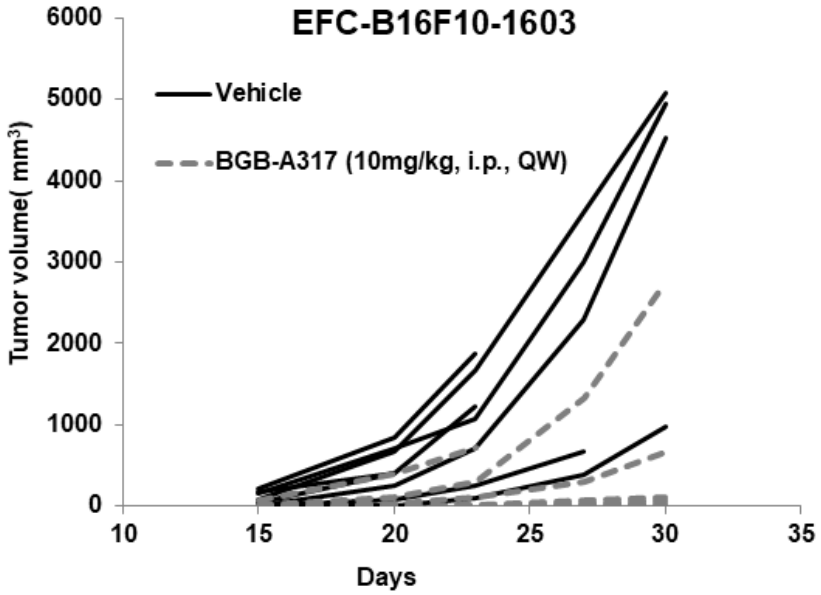


B16F10/GMCSF 細胞（5 × 10^4 個）を B-hPD-1 C57BL/6J マウスに皮下移植した。移植翌日からチスレリズマブ（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回 5 週間腹腔内投与し，経時的に腫瘍体積を測定した（n = 8）。縦軸は腫瘍体積（mm^3）（平均値 + 標準誤差），横軸は細胞移植後の日数を示す。

溶媒対照群に対する有意差，*：p < 0.05，**：p < 0.01（Student の t 検定）

Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-135]

Figure 2-16 B16F10/GMCSF 細胞移植マウスの腫瘍増殖曲線



B16F10/GMCSF 細胞（5 × 10^4 個）を B-hPD-1 C57BL/6J マウスに皮下移植した。移植翌日からチスレリズマブ（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回（QW）5 週間腹腔内投与（i.p.）し，経時的に腫瘍体積を測定した（n = 8）。縦軸は各々のマウスの腫瘍体積（mm^3），横軸は細胞移植後の日数を示す。

Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-135]

Table 2-11 B16F10/GMCSF 細胞移植 hPD-1 ヒト化マウスモデルに対するチスレリズマブの効果

被験物質	用量（mg/kg）	例数	腫瘍増殖抑制率（%）	腫瘍体積（mm^3，平均値 ± 標準誤差）
溶媒	-	8	-	3885 ± 974
チスレリズマブ	10	8	86.7	518 ± 383

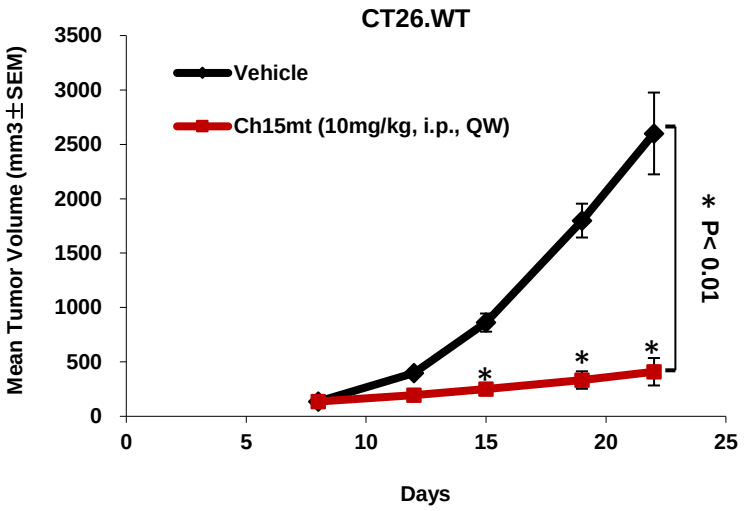
B16F10/GMCSF 細胞（5×10^4 個）を B-hPD-1 C57BL/6J マウスに皮下移植した。移植翌日からチスレリズマブ（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回 5 週間腹腔内投与し，経時的に腫瘍体積を測定した（n = 8）。値は，Day 30 での腫瘍増殖抑制率と腫瘍体積の平均値 ± 標準誤差を示す。

Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-135]

2.2.5 野生型マウスの大腸癌同種移植モデルに対する抗マウス PD-1 抗体の効果

チスレリズマブのサロゲートとして抗マウス PD-1 抗体（Ch15mt）を用い，正常な免疫能を有する WT マウスを用いた同種移植モデルで Ch15mt の抗腫瘍効果を検討した[Table 2.6.3.1-R01-VIVO-125]。WT マウス大腸癌細胞株（CT26.WT）を BALB/c マウスに皮下移植した翌日から Ch15mt（10 mg/kg）を週 1 回 3 週間腹腔内投与した結果，有意な腫瘍増殖抑制効果がみられ，Day 22（最終投与の 7 日後）における抑制率は 84%であった（Figure 2-17，Figure 2-18，Table 2-12）。Ch15mt 投与群の大部分で投与期間終了後においても持続的な腫瘍退縮が認められた（Figure 2-18）。Day 68（最終投与 53 日後）では Ch15mt 投与群の 8 例中 4 例で腫瘍が消失した。試験期間を通じて Ch15mt 投与による体重への影響はみられなかった。

Figure 2-17 CT26.WT 細胞同種移植モデルに対する抗マウス PD-1 抗体の腫瘍増殖抑制効果

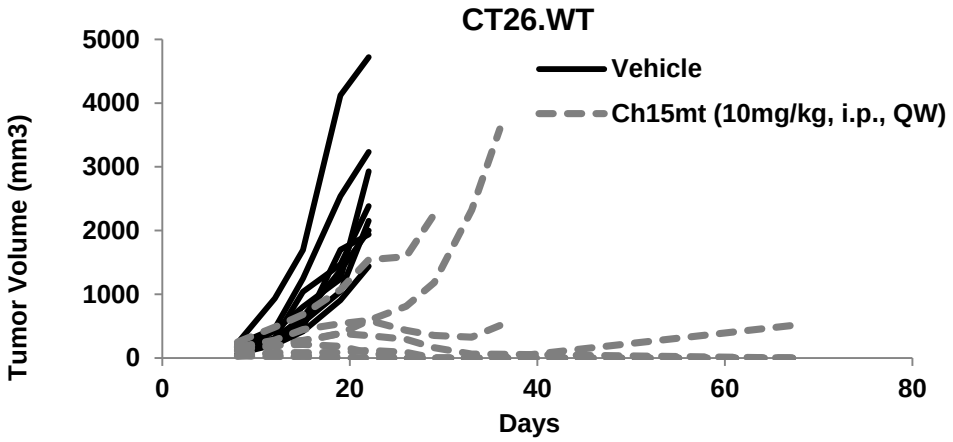


CT26.WT 細胞（3×10^5 個）を BALB/c マウスに皮下移植した。移植翌日から抗マウス PD-1 抗体の Ch15mt（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回（QW）3 週間腹腔内投与（i.p.）し，経時的に腫瘍体積を測定した（n = 8）。縦軸は腫瘍体積（mm^3）（平均値 ± 標準誤差），横軸は細胞移植後の日数を示す。

溶媒対照群に対する有意差，*：$p < 0.01$（Student の t 検定）

Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-125]

Figure 2-18 CT26.WT 細胞移植マウスの腫瘍増殖曲線



CT26.WT 細胞（3×10^5 個）を BALB/c マウスに皮下移植した翌日から Ch15mt（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回（QW）3 週間腹腔内投与（i.p.）し，経時的に腫瘍体積を測定した（n = 8）。縦軸は各々のマウスの腫瘍体積（mm^3），横軸は細胞移植後の日数を示す。

Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-125]

Table 2-12 CT26.WT 細胞同種移植モデルに対する抗マウス PD-1 抗体の効果

被験物質	用量（mg/kg）	例数	腫瘍増殖抑制率（%）	Day 22 における腫瘍体積（mm^3，平均値 ± 標準誤差）	Day 68 における腫瘍消失例（%）
溶媒	-	8	-	2600 ± 363	-
Ch15mt	10	8	84	410 ± 183	4 (50%)

CT26.WT 細胞（3×10^5 個）を BALB/c マウスに皮下移植した翌日（Day 1）から Ch15mt（10 mg/kg）又は溶媒（PBS）を週 1 回 3 週間腹腔内投与し，経時的に腫瘍体積を測定した。値は，Day 22 における平均腫瘍体積（± 標準誤差）と Day 68 における腫瘍消失例数と割合を示す。

Source: [Table 2.6.3.1-R01-VIVO-125]

2.3 作用機序

チスレリズマブは，ヒト PD-1 に対する抗体であり，PD-1 とそのリガンドである PD-L1 及び PD-L2 との結合を阻害し，腫瘍特異的な T 細胞の増殖，活性化，及び細胞傷害活性の増強等により，腫瘍増殖を抑制すると考えられる。

3 副次的薬理試験

一般に，抗体は可変領域の抗原結合部位で可溶性又は細胞表面の抗原に結合して抗原抗体複合体を形成し，Fc 部位は Fc 受容体や補体成分 C1q といった免疫応答を誘導するタンパク質と結合する（Bruhns 2012）。Fc 部位がこれらと結合すると，抗原の排除，標的細胞の抑制，ADCC，CDC，及び抗体依存性細胞貪食（ADCP）といったさまざまな免疫応答が誘導される（Ravetch

2001）。チスレリズマブは Fc 部位の IgG4 を改変して Fc 部位が FcγR や補体成分 C1q に結合しないように設計されている。この結合特性について ELISA 及び FACS 法で検討した。

副次的薬理試験の一覧を以下に示す（Table 3-1）。

Table 3-1 副次的薬理試験の一覧

Type of Study / Description	Test System	Method of Administration	Study Number
BGB-A317 has diminished binding activities to Fc gamma receptors and C1q protein	FACS and ELISA	*In vitro*	BLGC-010(02)
BGB-A317 does not induce ADCC and CDC activity	Cellular assays for ADCC & CDC	*In vitro*	BLGC-021

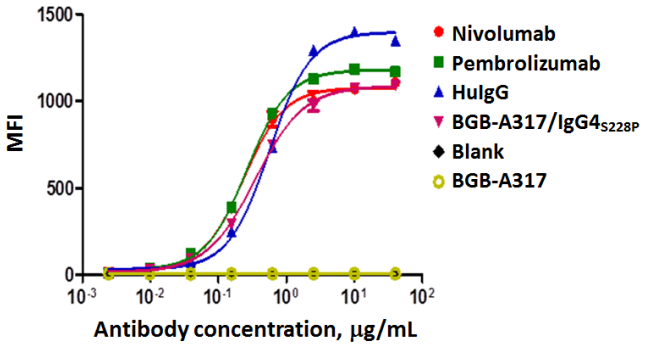
3.1 Fcγ 受容体及び C1q タンパクへの結合

7 種の FcγR（FcγRI，FcγRIIA$_{H131}$，FcγRIIA$_{R131}$，FcγRIIB，FcγRIIIA$_{V158}$，FcγRIIIA$_{F158}$，及び FcγRIIIB）に対するチスレリズマブの結合について，ELISA 及び FACS 法で検討した。また，C1q への結合についても ELISA 法で検討した。チスレリズマブは完全長チスレリズマブを，陰性対照にはチスレリズマブの溶媒等のプラセボを，陽性対照には Fc 領域をニボルマブやペムブロリズマブと同一の Fc 領域にしたチスレリズマブ/IgG4$_{S228P}$ 及びチスレリズマブの Fab 領域を IgG1 の Fc に融合させたチスレリズマブ/ヒト IgG1 を用い，また比較対照薬としてニボルマブ及びペムブロリズマブを用いた。

ELISA 法による検討で，チスレリズマブの 7 種の FcγR に対する結合は検出されなかった。FACS 法においても同様で，平均蛍光強度（MFI）はプラセボと同様であった。

FACS 法において，陽性対照のチスレリズマブ/IgG4$_{S228P}$ 及びチスレリズマブ/ヒト IgG1 で MFI の上昇がみられ，ニボルマブ及びペムブロリズマブでも同様の上昇がみられた（Figure 3-1）。

Figure 3-1 FcγR I への結合親和性の比較

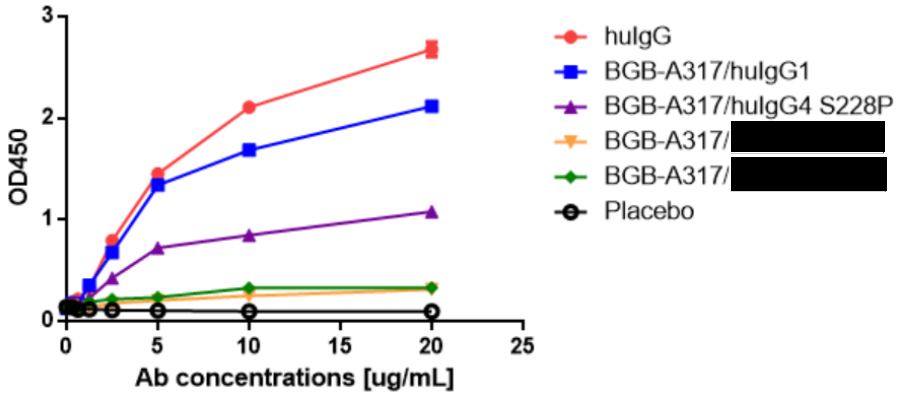


FcγRI を発現している HEK293/FcγRI 細胞をチスレリズマブ（BGB-A317），チスレリズマブ/IgG4$_{S228P}$，ニボルマブ及びペムブロリズマブ，又は huIgG とインキュベーションした後，蛍光標識ヒト IgG (F(ab')2)二次抗体で染色し，洗浄後，蛍光強度をフローサイトメータで測定した。HuIgG：ヒト IgG

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-010(02)]

C1q は古典的補体経路の最も上流に位置するタンパクで，C1 補体複合体形成を開始させる（Kenawy et al. 2015）。ELISA による検討で，チスレリズマブ（2 つのバッチ [redacted] 及び [redacted]）では C1q への結合はほとんどみられなかった（Figure 3-2）。一方，陽性対照抗体のヒト IgG，チスレリズマブ/ヒト IgG1，及びチスレリズマブ/huIgG4$_{S228P}$ では C1q への結合がみられた。これらの成績から，チスレリズマブが *in vivo* において CDC を誘発する可能性は低いと考えられる。

Figure 3-2　　C1q への結合親和性の比較



各濃度のチスレリズマブ（[redacted] 及び [redacted]），チスレリズマブ/huIgG1，及びチスレリズマブ/huIgG4$_{S228P}$，huIgG，又はプラセボ（チスレリズマブの溶媒）を固相化したプレートに C1q（2 µg/mL）を添加し，インキュベーションした。洗浄後，抗 C1q 抗体と反応させた後，HRP 標識二次抗体で染色してマイクロプレートリーダーで吸光度（OD450）を測定した。huIgG: ヒト IgG

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-010(02)]

他のヒト IgG 抗体とは異なり，チスレリズマブはエフェクター効果を避けるため FcγRI，FcγRIIA$_{H131}$，FcγRIIA$_{R131}$，FcγRIIB，FcγRIIIA$_{V158}$，FcγRIIIA$_{F158}$，及び FcγRIIIB を含むヒト FcγR に結合しないように設計されている。さらに，CDC を誘発しないよう C1q との結合も低下させている。チスレリズマブとは対照的に，ニボルマブやペムブロリズマブで使用されている従来型の IgG4（IgG4$_{S228P}$）を採用したチスレリズマブ/IgG4$_{S228P}$ では FcγRI への結合がみられた。同様の IgG4$_{S228P}$ を採用しているニボルマブ及びペムブロリズマブは FcγRI への強い結合がみられた。

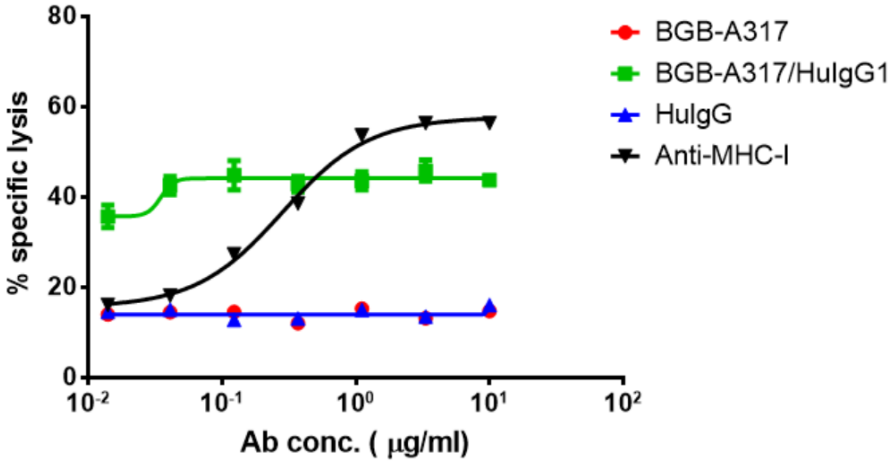
3.2　　細胞を用いた ADCC 及び CDC 活性の検討

ADCC には FcγRIIIA（CD16）への抗体結合によるナチュラルキラー（NK）細胞の活性化が含まれる。CD16 発現 NK 細胞株（NK92MI/CD16）を，チスレリズマブ存在下で PD-1 発現 T 細胞性リンパ腫細胞株（HuT78/PD-1）と共培養し，HuT78/PD-1 細胞由来の乳酸脱水素酵素（LDH）を測定することで ADCC 活性を評価した[Table 2.6.3.1-BLGC-021]。陽性対照として抗主要組織適合性複合体（MHC）-I 抗体を，陰性対照としてヒト IgG（huIgG）を，また，比較対照としてチスレリズマブの Fc 領域をヒト IgG1 に置換したチスレリズマブ/IgG1 を用いた。その結果，抗 MHC-I 抗体添加では濃度依存的な ADCC 活性が確認された。一方，チスレリズマブ添加ではヒト IgG

同様，ADCC は誘発されなかったが，チスレリズマブ/IgG1 では ADCC が誘発された（Figure 3-3）。

CDC 活性の検討では，フィトヘマグルチニン（PHA）で刺激した健康成人由来の PBMC を，チスレリズマブ存在下で新鮮自家血清と反応させ，生細胞数を測定した。陽性対照として抗 MHC-I 抗体を用い，陰性対照としてヒト IgG を用いた。その結果，抗 MHC-I 抗体添加では濃度依存的な CDC 活性が確認された。一方，チスレリズマブ添加ではチスレリズマブ/IgG1 やヒト IgG 同様，CDC は誘発されなかった（Figure 3-4）。

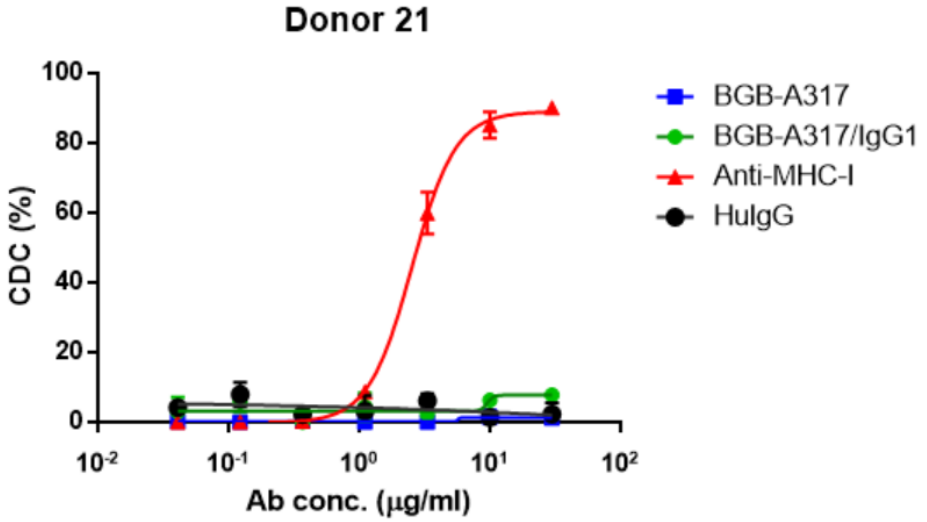
Figure 3-3　　ADCC 誘発活性の検討



チスレリズマブ（0.01～10 μg/mL）存在下でエフェクター細胞（NK92MI/CD16）を標的細胞（HuT78/PD-1）と 1：1 で 5h 共培養した後，培養液中の LDH を測定した。対照としてチスレリズマブ/huIgG1 を，陽性対照として抗 MHC-I 抗体を，また，陰性対照として huIgG を用いた。縦軸は被験物質添加により誘発される標的細胞の溶解率（被験物質添加時の LDH 濃度を，エフェクター細胞と標的細胞から自発的に分泌される LDH，及び標的細胞の LDH の最大値で補正した値）を示す。huIgG1：ヒト IgG

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-021]

Figure 3-4 CDC 誘発活性の検討



CDC 活性の検討では，PHA で刺激した標的細胞（健康成人由来の PBMC）を，チスレリズマブ（0.04～30 μg/mL）存在下で新鮮自家血清（終濃度 15%）と反応させ，生細胞数を測定した。陽性対照として抗 MHC-I 抗体を，また，陰性対照として huIgG を用いた。縦軸の CDC 活性（%）は，反応前の生細胞数に対する反応後の生細胞数の割合を算出し，さらにその逆数で示した。生細胞数は生細胞由来のアデノシン三リン酸量を測定することで概算した。huIgG1：ヒト IgG

Source: [Table 2.6.3.1-BLGC-021]

4 安全性薬理試験

ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」に基づき，チスレリズマブの独立した安全性薬理試験は実施していない。カニクイザルを用いた単回投与毒性試験 [2.6.6-2.2 項] 及び 13 週間反復投与毒性試験 [2.6.6-3.1 項]，[2.6.6-3.2 項] において，チスレリズマブの心血管系，呼吸系，及び中枢神経系へ及ぼす影響を評価した。

単回投与毒性試験では，チスレリズマブを 100 mg/kg までの用量で持続静脈内投与した結果，心電図パラメータに投薬に関連した影響は認められなかった。同様に，13 週間反復投与毒性試験（2 週間に 1 回投与）では，チスレリズマブを 60 mg/kg までの用量で静脈内投与した結果，心電図パラメータに変化は認められず，心血管系，呼吸系，及び中枢神経系への影響を示唆する変化は認められなかった。

5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用の検討は実施していない。

6 考察及び結論

抗 PD-1 抗体であるチスレリズマブは，生化学的結合試験（結合特性），免疫細胞を用いた機能活性試験，及び *in vivo* 薬理試験において PD-1 に対して高い結合親和性（K_D 値：0.15 nmol/L）

を示し，PD-1 を介したシグナル伝達を効果的に阻害して免疫細胞の機能を亢進し，*in vivo* で腫瘍増殖抑制効果を示した。

チスレリズマブはヒト化 IgG4 モノクローナル抗体で，エフェクター機能を示さないようにヒンジ領域と Fc 領域が改変されている。一方，ニボルマブ及びペムブロリズマブは，単球やマクロファージ上に発現する FcγRI 及び FcγRIIB に結合することが示されており[Table 2.6.3.1-BLGC-010 (02)]，この結果は過去の報告例と一致した（Bruhns et al. 2009）。従来型の IgG4 Fc 領域を有する抗 PD-1 抗体は，PD-1 発現 T 細胞と FcγRI 発現単球又はマクロファージを架橋する可能性が報告されている（Swisher et al. 2014）。これらの抗 PD-1 抗体と Fc 受容体の相互作用により ADCC が生じ，T 細胞が傷害を受けると抗がん治療の効果が減弱する（Dahan et al. 2015）。事実，ヒト癌細胞とヒト PBMC を用いたマウスの異種移植モデルにおいて，チスレリズマブは有意な腫瘍増殖抑制効果を示したが，ニボルマブやペムブロリズマブと同一の Fc 領域を有するチスレリズマブ/$IgG4_{S228P}$ では有意な効果はみられなかった（Zhang et al. 2018）。チスレリズマブは各種 FcγR や C1q に結合しないことから ADCC や CDC を誘導しないと考えられる。

チスレリズマブは，ヒト類表皮癌細胞株 A431，ヒト大腸癌患者由来腫瘍組織 BCCO-028，及びヒト非小細胞肺癌患者由来腫瘍組織 BCLU-054 を用いた異種移植モデルにおいて優れた抗腫瘍効果を示した。

チスレリズマブはカニクイザル及びヒトの PD-1 に同様の親和性で結合したが，マウスの PD-1 には結合しないことから，毒性試験の適切な動物種としてカニクイザルを選択した。

カニクイザルを用いた単回投与毒性試験及び 13 週間反復投与毒性試験では，それぞれ 100 mg/kg 及び 60 mg/kg の用量まで，心血管系，呼吸系，及び中枢神経系への影響を示唆する変化は認められなかった。

以上，一連の非臨床試験成績から，チスレリズマブの悪性腫瘍に対する有効性及び安全性が確認され，治療薬として本薬を使用することは妥当であると判断した。

7 参考文献

[Bruhns P (2012)] Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. Blood; 119(24): 5640-9.

[Bruhns P, Iannascoli B, England P, et al. (2009)] Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. Blood; 113: 3716-25.

[Dahan R, Sega E, Engelhardt J, et al. (2015)] FcγRs modulate the anti-tumor activity of antibodies targeting the PD-1/PD-L1 axis. Cancer Cell; 28: 285-95.

[Freeman GJ (2008)] Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. Proc Natl Acad Sci USA; 105(30): 10275-6.

[Gootenberg JE, Ruscetti FW, Mier JW, et al. (1981)] Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor. J Exp Med; 154: 1403-18.

[Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. (2008)] PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol; 26: 677-704.

[Kenawy HI, Boral I, Bevington A (2015)] Complement-coagulation cross-talk: a potential mediator of the physiological activation of complement by low pH. Front Immunol; 6: 215.

[Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, et al. (2008)] The common γ-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. J Immunol; 181: 6738-46.

[Lázár-Molnár E, Yan Q, Cao E, et al. (2008)] Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. Proc Natl Acad Sci U S A; 105: 10483-8.

[Lin DY, Tanaka Y, Iwasaki M, et al. (2008)] The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. Proc Natl Acad Sci U S A; 105: 3011-6.

[Ravetch JV and Bolland S (2001)] IgG Fc receptors. Annu Rev Immunol; 19: 275-90.

[Riley JL (2009)] PD-1 signaling in primary T cells. Immunol Rev; 229(1): 114-25.

[Swisher JF, Haddad DA, McGrath AG, et al. (2014)] IgG4 can induce an M2-like phenotype in human monocyte-derived macrophages through FcγRI. mAbs; 6: 1377-84.

[Zhang T, Song X, Xu L, et al. (2018)] The binding of an anti-PD-1 antibody to FcγRI has a profound impact on its biological functions. Cancer Immunol Immunother; 67: 1079-90.

テビムブラ点滴静注 100 mg

2.6.3　薬理試験概要表
（根治切除不能な進行・再発の食道癌）

BeiGene Japan 合同会社
Confidential
BeiGene Japan 合同会社の許可を得ることなく
使用，漏洩，公表，又はその他の方法で開示することを禁じます。

目　次

2.6.3.1 薬理試験一覧表 3
2.6.3.2 薬効を裏付ける試験 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 5
2.6.3.4 安全性薬理試験 5

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Type of Study / Description	Test System	Method of Administration	Study Number
効力を裏付ける試験			
> *In vitro* 薬理試験			
BGB-A317 binding activity to PD-1	PD-1-ECD/His, ELISA and HuT78/PD-1 cells, FACS	*In vitro*	[BLGC-002]
BGB-A317 binding specificity analyses: species specificity and non-specific binding check-up	Human, monkey & mouse PD-1-ECD/His, ELISA and HuT78/huPD-1 or monkey PD-1 cells, FACS	*In vitro*	[BLGC-003(02)]
Characterization of BGB-A317 binding affinities to antigen by SPR	PD-1-ECD/His & SPR assay	*In vitro*	[BLGC-004(02)]
BGB-A317 critical binding epitopes on PD-1	PD-1 mutant and wt proteins, ELISA and Western blot	*In vitro*	[BLGC-005(02)]
BGB-A317 competitively blocks both PD-L1 and L2 binding to PD-1	HuT78/PD-1 cells, biotinylated PD-L1 or PD-L2 and FACS	*In vitro*	[BLGC-006]
BGB-A317 inhibits PD-1 function in a reverse signaling assay	HuT78/P3Z and HEK293/OS8-PD-L1 cells, ELISA	*In vitro*	[BLGC-007(02)]
BGB-A317 activates IL-2 secretion from HuT78/PD-1 cells by inhibiting PD-1 signaling	HuT78/PD-1 and HEK293/OS8-PD-L1 cells, ELISA	*In vitro*	[BLGC-008(02)]
BGB-A317 activates PBMC in coculture with stimulator cells	PBMCs and HEK293/OS8-PD-L1 cells, ELISA	*In vitro*	[BLGC-009(02)]
BGB-A317 binding activity to PD-1 on activated PBMCs	Biotinylated-BGB-A317 and HuIgG-Biotin, FACS	*In vitro*	[BLGC-014]
Cross-species functional activity and species selection for *in vivo* pharmacology and safety evaluation	Human, monkey and mouse PD-1-ECD/His protein and HuT78/mkPD1V3 cells, ELISA, competition with PD-L1, affinity assay by SPR	*In vitro*	[BLGC-020]
> *In vivo* 薬理試験			
Efficacy study of BGB-A317 in A431 allogeneic xenograft model	Female NOD/SCID mice	i.p., *in vivo*	[R01-VIVO-126]
Efficacy study of BGB-A317 in BCCO-028 allogeneic xenograft model	Female NOD/SCID mice	i.p., *in vivo*	[R01-VIVO-127]
Efficacy study of BGB-A317 in BCLU-054 allogeneic xenograft model	Female NOD/SCID mice	i.p., *in vivo*	[R01-VIVO-128]
Efficacy study of BGB-A317 on B16F10/GMCSF in hPD-1 transgenic mouse model	Female B-hPD-1 C57BL/6J mice	i.p., *in vivo*	[R01-VIVO-135]
Efficacy study of anti-mouse PD-1 surrogate antibody Ch15mt in CT26.WT syngeneic model	Female BALB/c mice	i.p., *in vivo*	[R01-VIVO-125]

Type of Study / Description	Test System	Method of Administration	Study Number
副次的薬理試験			
BGB-A317 has diminished binding activities to Fc gamma receptors and C1q protein	HEK293 cell line	*In vitro*	[BLGC-010(02)]
BGB-A317 does not induce ADCC and CDC activity	Cellular assays for ADCC & CDC	*In vitro*	[BLGC-021]
安全性薬理試験			
Safety Pharmacology: Safety pharmacology assessments were conducted as part of the single dose and 13-week repeat dose toxicology studies in monkeys. Reference is made to Module 2.6.6 Study No: P14-057-JD, P14-057-CD and 2270246.			
薬力学的薬物相互作用試験			
Pharmacodynamic Drug Interactions: No studies were conducted.			

2.6.3.2 薬効を裏付ける試験

2.6.3.1 に記載

2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.1 に記載

2.6.3.4 安全性薬理試験

ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」に基づき，チスレリズマブの独立した安全性薬理試験は実施していない。サルを用いた単回投与毒性試験[Table 2.6.7.5-P14-057-JD]及び 13 週間反復投与毒性試験[Table 2.6.7.7-P14-057-CD][Table 2.6.7.7-2270246]において本薬の安全性薬理を評価した。単回投与毒性試験において，チスレリズマブを 100 mg/kg までの用量で持続静脈内投与した結果，心電図パラメータに投薬による影響は認められなかった。同様に，13 週間反復投与毒性試験（2 週間に 1 回投与）において，チスレリズマブを 60 mg/kg までの用量で静脈内投与した結果，心電図パラメータに変化は認められず，心血管系，呼吸系，及び中枢神経系への毒性を示唆する変化は認められなかった。