目次

略号一覧 2
1. 緒言 5
1.1. PD-1 を標的とする根拠 5
1.2. レチファンリマブの非臨床試験戦略の概括評価 6
2. 薬理試験 7
2.1. 効力を裏付ける試験 7
2.1.1. *In vitro* 試験 7
2.1.2. *In vivo* 試験 8
2.2. 副次的薬理学 8
2.2.1. 安全性薬理試験 9
3. 薬物動態試験 9
3.1. 要約 9
3.2. 分析方法 10
3.3. IV 投与後の薬物動態 10
3.4. 抗薬物抗体 11
3.5. 分布 11
3.6. 代謝 11
3.7. 排泄 11
4. 毒性試験 11
4.1. 単回投与毒性試験 12
4.2. 反復投与毒性試験 12
4.3. 遺伝毒性 14
4.4. がん原性 14
4.5. 生殖毒性 14
4.6. 組織交差反応性試験 15
4.7. T 細胞依存性抗体産生試験 15
5. 総合的な概括評価及び結論 15
6. 参考文献 16

表一覧

Table 1: Retifanlimab Toxicology Program Overview 7
Table 2: Study Design and Mean PK parameters[a] of Toxicology Studies Conducted for Retifanlimab in Cynomolgus Monkeys with TK Evaluation 10

略号一覧

略号	定義	
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
APC	antigen presenting cells	抗原提示細胞
AUC	area under the curve	血中濃度-時間曲線下面積
B7-H1	B7-homologue 1	B7 ホモログ 1
BALT	bronchus associated lymphoid tissue	気管支関連リンパ組織
BCR	B-cell receptor	B 細胞受容体
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CD	cluster of differentiation	表面抗原分類
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CL	clearance	クリアランス
CL_{D2}	intercompartmental clearance	コンパートメント間のクリアランス
CL_{pred}	predicted clearance	予測クリアランス
C_{max}	maximum serum concentration	最高血清中濃度
$C_{max,obs}$	observed maximum serum concentration	観察された最高血清中濃度
$C_{max,pred}$	predicted maximum serum concentration	予測される最高血清中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
[redacted]	[redacted]	[redacted]
CRS	cytokine release syndrome	サイトカイン放出症候群
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4	細胞傷害性 T リンパ球抗原 4
DC	dendritic cells	樹状細胞
DS	drug substance	原薬
EC_{50}	effective concentration at 50% of maximal activity	50%効果濃度（最大効果の 50%を得るために必要な濃度）
ECG	electrocardiogram	心電図
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着検定法
EOI	end-of-infusion	投与終了
F	female	雌
FACS	fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化細胞選別
Fc	fragment crystallizable	フラグメント結晶化可能領域
FcRn	neonatal Fc receptor	新生児 Fc 受容体

略号	定義	
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
Fv	fragment variable	可変領域
GFR	glomerular filtration rate	糸球体濾過量
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
IC_{50}	mean half-maximal inhibitory concentration	平均 50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IFN-γ	interferon-gamma	インターフェロン γ
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学検査
IL	interleukin	インターロイキン
IV	intravenous(ly)	静脈内
k_a	association rate constant	結合速度定数
K_D	equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
k_d	dissociation rate constant	解離速度定数
kDa	kilodalton	キロダルトン
LUC	large unclassified cell	大型未分類細胞
M	male	雄
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MFI	mean fluorescence intensity	平均蛍光強度
MRT	mean residence time	平均滞留時間
$MRT_{inf,pred}$	predicted mean residence time to infinity	無限大時間までの予測平均滞留時間
NA	not applicable	該当せず
NCA	noncompartmental analysis	ノンコンパートメント解析
NK	natural killer (cells)	ナチュラルキラー（細胞）
NOAEL	no-observed-adverse-effect level	無毒性量
OKT®3	muromonab-CD3 (anti-CD3 monoclonal antibody)	ムロモナブ-表面抗原分類 3（CD3）（抗 CD3 モノクローナル抗体）
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核球
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PD-1	programmed cell death protein 1	プログラム細胞死タンパク 1
PD-L1/L2	programmed cell death ligand 1/2	プログラム細胞死リガンド 1/2

略号	定義	
PI3K	phosphatidylinositol-3 OH kinase	ホスファチジルイノシトール 3 OH キナーゼ
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PTI	prior to infusion	投与前
RBC	red blood cell	赤血球
RSV	respiratory syncytial virus	RS ウイルス
SEB	staphylococcal enterotoxin B	ブドウ球菌エンテロトキシン B
TCR	T-cell receptor	T 細胞受容体
TIL	tumor infiltrating lymphocytes	腫瘍浸潤リンパ球
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	time to maximum serum concentration	最高血清中濃度到達時間
TMB	3,3’5,5’-tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン
TNF-α	tumor necrosis factor alpha	腫瘍壊死因子 α
V_1	volume of distribution for the central compartment	中心コンパートメントの分布容積
V_2	volume of distribution for the peripheral compartment	末梢コンパートメントの分布容積
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態での分布容積
$V_{ss,pred}$	predicted volume of distribution at steady state	定常状態での予測分布容積

1. 緒言

レチファンリマブ（遺伝子組換え）（以下、レチファンリマブ）［INCMGA00012、MGA012、AEX1188、hMG13.78(1.3)］は、ヒンジ結合により安定化させたヒト化免疫グロブリン G4κ（IgG4κ）からなるモノクローナル抗体（mAb）であり、ヒトプログラム細胞死タンパク 1（PD-1）を認識する。レチファンリマブは、ヒト IgG4 のフラグメント結晶化可能（Fc）領域を含むためにエフェクター機能が制限される一方、新生児 Fc 受容体（FcRn）結合能が保持されていることにより、循環血中半減期が延長している。レチファンリマブは、ヒト及びカニクイザルの双方の PD-1 に結合する。レチファンリマブの分子量はグリカンを除いた状態で約 145 キロダルトン（kDa）であり、グリコシル化された完全長分子の分子量は約 148 kDa である【モジュール 3.2.S.3.1、1 項】を参照。

PD-1－プログラム細胞死リガンド 1（PD-L1）／プログラム細胞死リガンド 2（PD-L2）抑制性シグナル伝達経路は、癌細胞の、特に腫瘍抗原に特異的な T 細胞に対する免疫回避／抵抗性の主な機序である。レチファンリマブは、PD-1 に結合して PD-1－PD-L1/L2 抑制性シグナル伝達経路を調節することで、免疫系による腫瘍細胞の認識及び排除を促進するように設計されている。

レチファンリマブは、進行固形癌の治療に関する複数の臨床試験で評価中である。

1.1. PD-1 を標的とする根拠

現時点で治療選択肢がいくつか存在するが、進行固形癌患者は依然として、疾患コントロールの改善及び長期生存のベネフィットが得られる新たな治療法に対する大きなニーズをかかえている。細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（CTLA-4）、PD-1 及び PD-L1 を標的とするモノクローナル抗体は、肺癌、黒色腫、腎癌及びその他の癌で高い活性を示している（Baumeister et al 2016、Robert et al 2015a、Robert et al 2015b、Borghaei et al 2015、Motzer et al 2015、Rizvi et al 2015、Ribas et al 2015、Ansell et al 2015、Herbst et al 2016）。

PD-1（CD279 としても知られる）は、CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞並びに B 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞及び骨髄由来細胞の細胞表面上に発現する抑制性の細胞表面の受容体である（Ishida et al 1992）。PD-1 は、PD-L1 及び PD-L2 という、発現様式が異なる 2 種類のリガンドに結合する。PD-L1［B7 ホモログ 1（B7-H1）又は CD274 としても知られる］は、T 細胞、B 細胞、樹状細胞（DC）及びマクロファージ等の造血細胞並びに腫瘍細胞を含む数々の末梢組織上に発現しており、その発現レベルは各種インターフェロンによって誘導可能である（Muhlbauer et al 2006）。対照的に、PD-L2（B7-DC 又は CD273 としても知られる）の発現は、プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）に限られている（Latchman et al 2001、Okazaki and Honjo 2006）。また、PD-L2 の発現はインターロイキン（IL）-4 及び IL-10 によって誘導可能であるが、これは APC の系統に依存する（Selenko-Gebauer et al 2003）。

T 細胞上の PD-1 が、他の細胞上に発現した PD-L1 又は PD-L2 に結合すると、PD-1 は T 細胞受容体（TCR）と共にクラスターを形成し、Src 相同領域 2 ドメイン含有チロシンホスファターゼ 2 と一時的に結合し、表面抗原分類（CD）28 を介したホスファチジルイノシトール 3OH キナーゼ（PI3K）並びにその後の Akt、グルコース代謝及び生存促進性タンパク $Bcl\text{-}X_L$ の活性化等、正の TCR シグナル伝達を誘導するエフェクター分子を脱リン酸化することにより、負のシグナルを誘導する。その結果、T 細胞の活性及び増殖が抑制される（Latchman et al 2001、Chen and Flies 2013、Freeman et al 2000、Parry et al 2005）。

この PD-1 と PD-L1/L2 による抑制性シグナル伝達経路は、幾つか知られているチェックポイントの 1 つであり、免疫系が自己免疫寛容を維持し、末梢組織における生理的な免疫応答の期間と規模を調節して、付随する組織ダメージを最小に抑えるために利用される。腫瘍浸潤リンパ球（TIL）又は慢性的なウイルス感染後の T 細胞の表面に PD-1 が発現すると、結果として、T 細胞

が疲弊した状態の免疫機能障害に至ることが示されている。PD-1－PD-L1/L2 抑制性経路は、癌細胞の、特に腫瘍抗原に特異的な T 細胞に対する免疫回避／抵抗性の機序である。更に、PD-1 シグナル伝達を阻害することで、T 細胞の増殖が促進され、免疫応答が回復することが示されている（Latchman et al 2001、Chen and Flies 2013、Freeman et al 2000、Parry et al 2005、Barber et al 2006、Blackburn et al 2009、Norde et al 2011、Pardoll 2012）。非臨床癌モデルにおける評価の際に、抗 PD-1 mAb により抗腫瘍効果が示された（Iwai et al 2005、Curran et al 2010、Pilon-Thomas et al 2010、Zhang et al 2009）。PD-1－PD-L1/L2 経路の阻害は臨床的に妥当性が示されており、複数の癌を適応とする治療薬として抗 PD-(L)1 抗体の製造販売承認が複数取得されている（Sun et al 2020）。

レチファンリマブは、PD-1 を発現する細胞、特に「疲弊した」T 細胞を標的として、チェックポイントにおいて抑制的に働く PD-1 とその 2 つのリガンドである PD-L1 及び PD-L2 との相互作用を阻害することにより、そのエフェクター機能を維持又は復元するように設計された PD-1 抗体である。レチファンリマブの非臨床プログラムは、*in vitro* でレチファンリマブの結合及び生物学的活性を明らかにし、*in vivo*（ヒト以外の霊長類）で薬物動態（PK）及び安全性を評価するためにデザインされた。

1.2. レチファンリマブの非臨床試験戦略の概括評価

レチファンリマブの非臨床毒性プログラムは、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S9（2009）及び ICH S6 (R1)（2011）ガイドラインの推奨事項に従って実施し、進行固形癌患者を対象とした臨床試験におけるレチファンリマブの反復静脈内（IV）投与を支持するためにデザインされた。レチファンリマブを用いて実施した毒性試験を Table 1 に要約する。

レチファンリマブの非臨床毒性プログラムは、カニクイザルのみを対象に実施された。レチファンリマブの非臨床安全性の評価に最も適切な動物モデルとして、カニクイザルが選択された。これはカニクイザルとヒトの PD-1 タンパクの配列に相同性が認められることやヒト及びカニクイザルの PD-1 タンパクに対するレチファンリマブの結合親和性が類似している（6 倍以内）こと、レチファンリマブは特に PD-1 発現を誘導するためのブドウ球菌エンテロトキシン B（SEB）による刺激後にヒト及びカニクイザルの末梢血単核球（PBMC）に結合すること、及びレチファンリマブはヒト及びカニクイザルのリンパ組織にあるリンパ球には結合するが、非リンパ組織の実質には結合しないこと［免疫組織化学検査（IHC）で示されている］による。

レチファンリマブの主要な非臨床薬理プログラムは、レチファンリマブの生物学的活性及び作用機序を明らかにするためにデザインされた。

レチファンリマブの PK は単回投与及び反復投与毒性試験の一環として、カニクイザルを用いて評価した。カニクイザルを用いた反復投与毒性試験で、レチファンリマブ投与後の抗薬物抗体を評価した。医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠しないカニクイザルを用いた 3 週間反復投与試験で採取された特定の組織を用いて、限定的な薬物分布試験を実施した。

申請者は、全ての主要な非臨床試験（以降、GLP の下で実施されているものを指す）が、1987 年 10 月 5 日付の米国食品医薬品局、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する規制（US FDA GLP Regulations；21 CFR パート 58）を遵守し、経済協力開発機構（OECD）規制が適用される国家における相互承認の下で、米国で実施されたことを確認した。非臨床 PK 及び抗薬物抗体（ADA）データの要約については 3 項を参照する。

13 週間反復投与毒性試験で使用した原薬は、第 1 相及び第 2 相臨床試験で使用したものと同一である。

Table 1: Retifanlimab Toxicology Program Overview

試験の種類 試験番号	期間	GLP 適合状況	投与経路及び投与頻度	動物種 （群毎の動物数）
単回投与毒性				
【T15-06-12】	単回投与 （9 週間の回復期間）	非 GLP	1 時間 IV 持続投与	カニクイザル （1M/1F）
反復投与毒性				
【T15-08-05】	3 週間	非 GLP	1 時間 IV 持続投与 週 1 回	カニクイザル （1M/1F）
【T19-01-03】	4 週間 （10 週間の回復期間）	GLP	1 時間 IV 持続投与 週 1 回	カニクイザル （5M/5F）
【T18-02-10】	13 週間	GLP	30 分 IV 持続投与 週 1 回	カニクイザル （5M/5F）
その他の試験：				
組織交差反応性				
【T16-02-22】	該当せず	GLP	該当せず	ヒト（N = 3）
T 細胞依存性抗体産生試験				
【T22-05-01】	9 週間	GLP	30 分 IV 持続投与 週 1 回	カニクイザル （2M/2F）

略語：F = 雌、GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、IV = 静脈内、M = 雄

2. 薬理試験

2.1. 効力を裏付ける試験

レチファンリマブの非臨床薬理プログラムは、*in vitro* でレチファンリマブの結合親和性及び生物学的活性を明らかにするためにデザインされ、詳細を以下に簡潔に要約する【モジュール 2.6.2、2 項】。

レチファンリマブの *in vitro* 薬理試験では、ニボルマブ（オプジーボ®、Bristol Myers Squibb）及びペムブロリズマブ（キイトルーダ®、Merck）の抗体レプリカを対照分子として使用した。抗 PD-1 mAb の抗体レプリカ（AEX1197 及び AEX1198 として知られる）はそれぞれ公表されている抗体のアミノ酸配列情報に基づき [redacted] が作成したものであり、レチファンリマブと同じヒンジ結合により安定化させたヒト IgG4κ 抗体アイソタイプを含んでいる。

2.1.1. *In vitro* 試験

レチファンリマブを用いて実施した *in vitro* 薬理試験の全ての結果の要約は【モジュール 2.6.2、2.1 項】に示す。

レチファンリマブはヒト及びカニクイザルの PD-1 に結合し、平衡解離定数（K_D）はそれぞれ 0.6 nM 及び 3.6 nM である。ヒトの PD-1 に対する結合親和性はカニクイザルの PD-1 に対する結合親和性の約 6 倍であるが、結合速度定数（k_a）が高く解離速度定数（k_d）が低いことによる。フローサイトメトリー解析により、ヒト PBMC、T 細胞（CD4 陽性及び CD8 陽性の両方）、ヒト PD-1 を異所的に発現するよう設計した NS0 細胞及びカニクイザル PBMC の表面に対するレチファンリマブの結合能が確認された。レチファンリマブのヒト PBMC、CD4 陽性及び CD8 陽

性 T 細胞並びにカニクイザル及びアカゲザルの PBMC に対する結合は用量依存的であり、スーパー抗原である SEB による PBMC の刺激時に増強した。レチファンリマブの細胞表面結合特性は、ニボルマブ及びペムブロリズマブのレプリカと同等であった。

一連の *in vitro* 薬理試験で、レチファンリマブの生物学的活性が示されている。レチファンリマブは、その特異的結合特性及び作用機序と一致して、細胞表面に発現した PD-1 とリガンドである PD-L1 及び PD-L2 の結合を阻害した。レチファンリマブは PD-1/PD-L1［平均 50%阻害濃度（IC_{50}）= 0.010 µg/mL］及び PD-1/PD-L2（IC_{50} = 0.021 µg/mL）の相互作用を強力に阻害する。更に、レチファンリマブを介した阻害は、ニボルマブ（PD-L1 及び PD-L2 でそれぞれ IC_{50} = 0.016 及び 0.028 µg/mL）及びペムブロリズマブ（PD-L1 及び PD-L2 でそれぞれ IC_{50} = 0.014 及び 0.028 µg/mL）のレプリカを介した阻害と同等であった。また、レチファンリマブにより、PD-1 又は PD-L1 を発現するよう設計した共培養細胞株間の PD-1/PD-L1 の遮断が阻害された。このことは、TCR を介した活性化 T 細胞核内因子（NFAT）によるルシフェラーゼシグナルが PD-1 発現細胞株により増強されたことで確認された。レチファンリマブによるこの抑制系の阻害能［50%効果濃度（EC_{50}）= 0.090 µg/mL］も、ニボルマブ（EC_{50} = 0.171 µg/mL）及びペムブロリズマブ（EC_{50} = 0.103 µg/mL）のレプリカと同等であった。最後に、レチファンリマブにより、SEB の刺激を受けたヒト PBMC におけるインターフェロン（IFN）-γ 分泌が用量依存的に増強し、この活性はニボルマブ及びペムブロリズマブのレプリカで認められた活性と同等であったことが示された。

結論として、*in vitro* におけるレチファンリマブの生物学的活性は PD-1 経路の阻害と一致しており、レチファンリマブの機能的活性はニボルマブ及びペムブロリズマブのレプリカと同等である。

2.1.2. *In vivo* 試験

レチファンリマブはカニクイザル及びアカゲザルの PD-1 と交差反応性を示すが、霊長類以外の動物種の PD-1 とは交差反応性を示さない。そのため、*in vivo* 試験は、カニクイザルに対してレチファンリマブの IV 投与を行う試験に限定された。サルを用いたこれらの試験では、薬力学評価項目を評価した（末梢 T 細胞に対するレチファンリマブの結合のフローサイトメトリーによる評価）。この結合データは単回投与 PK 試験【モジュール 2.6.6、2.1 項】、反復投与パイロット毒性試験【モジュール 2.6.6、3.1 項】及び 4 週間の反復投与 GLP 毒性試験【モジュール 2.6.6、3.2 項】の項に要約する。

2.2. 副次的薬理学

レチファンリマブの安全性プロファイルに影響を及ぼす可能性のある機能活性がないことを確認するため、一連の実験でレチファンリマブを評価した。IgG4 ベースの抗体と同様に、レチファンリマブは PD-1 発現 NS0/PDCD1 細胞又は活性化ヒト初代 T 細胞に対する抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性や補体依存性細胞傷害（CDC）活性を仲介しなかったため、*in vivo* でレチファンリマブにより PD-1 発現細胞が排除される可能性は低いことが示された。レチファンリマブは、2 日間の培養中に新たに単離した PBMC の増殖を誘導しなかったことから、内因性のマイトジェン活性がないことが示された。ニボルマブ及びペムブロリズマブのレプリカでもマイトジェン活性は認められなかった。レチファンリマブの臨床での予定投与経路は IV 投与であることを考慮し、レチファンリマブが溶血性を示さないことを確認するための試験を実施した。*In vitro* では、健康人提供者の精製赤血球（RBC）又は全血をレチファンリマブで処理したところ、溶血は認められなかった。*In vitro* で可溶性レチファンリマブ又はドライコート又はウェットコート処理によるプレート固定したレチファンリマブを用いて、健康人提供者のヒト PBMC で、レチファンリマブを介したサイトカイン産生を評価した。10 µg/mL 及び 100 µg/mL の濃度｛陽性対照の抗体［ムロモナブ-CD3、抗 CD3 モノクローナル抗体（OKT3）］より 10～200 倍高い濃度｝のレチファンリマブへ PBMC を曝露させたところ、提示したレチファンリマブの 3 通りの

全条件で、サイトカイン［IFN-γ、腫瘍壊死因子（TNF）-α、IL-2、IL-4、IL-6 及び IL-10］産生は認められなかった。カニクイザルにレチファンリマブを IV 投与した後、in vivo でサイトカイン産生を評価したが、レチファンリマブと関連した顕著なサイトカイン産生は認められなかった。

副次的薬力学試験を【モジュール 2.6.2、3 項】に要約する。

2.2.1. 安全性薬理試験

レチファンリマブの安全性薬理のみを目的とした試験は行われていない。安全性薬理試験の評価項目は毒性試験及び／又は薬力学試験に含まれており、その計画はバイオ医薬品に関する ICH S6 (R1)（2011）及び ICH S7A（2000）の両ガイドライン並びにがん治療法に関する ICH S9 ガイドライン（2009）の推奨事項に沿っている。カニクイザルを用いた 4 週間の GLP 毒性試験【T19-01-03 試験】で評価した項目には、神経学的検査（一般的態度、行動、運動機能、脳神経、固有受容及び姿勢反射並びに脊髄神経）、体温、血圧、心拍数、心電図（ECG）及び呼吸数の評価並びに臨床所見、肉眼所見及び組織学的所見が含まれた。中枢神経系（CNS）、心血管系又は呼吸系に対する有害作用を示唆するような、レチファンリマブと関連する所見は、4 週間投与試験で評価したどの用量（10～150 mg/kg）でも認められなかった。また、13 週間投与試験では、臨床所見、ECG、肉眼所見及び組織学的所見に基づき評価したところ、CNS、心血管系又は呼吸系に対する有害作用は認められなかった【T18-02-10 試験】。GLP 毒性試験の詳細については、【モジュール 2.6.6、3.2 項】を参照する。

3. 薬物動態試験

3.1. 要約

毒性試験の一環として、カニクイザルを用いてレチファンリマブの PK を評価した。サルを用いた試験ではいずれも、レチファンリマブを IV 投与した。これは臨床試験での投与経路と同じである。カニクイザルを用いて実施した毒性試験の要約を PK 評価及び測定された平均 PK パラメータと共に Table 2 に示す。これらの PK 試験の結果を以下の項に要約する。

Table 2:　Study Design and Mean PK parameters[a] of Toxicology Studies Conducted for Retifanlimab in Cynomolgus Monkeys with TK Evaluation

試験の種類	SD	3 週間 MD	4 週間 MD[b]	13 週間 MD[b]
試験施設	[redacted]			[redacted]
試験番号	【T15-06-12】	【T15-08-05】	【T19-01-03】	【T18-02-10】
ロット番号	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
用量（mg/kg）	10	1、100	10、40、150	5、20、100
レジメン	単回投与	週 1 回 × 3 回	週 1 回 × 4 回	週 1 回 × 13 回
投与経路	1 時間 IV 持続投与	1 時間 IV 持続投与	1 時間 IV 持続投与	30 分 IV 持続投与
動物数	2（1M/1F）	8（2M/2F/用量）	30（5M/5F/用量）	30（5M/5F/用量）
CL（mL/h/kg）	0.345	0.262 ± 0.06	0.213 ± 0.02	0.259 ± 0.03
V_{ss}（mL/kg）	85.8	54.2 ± 7.8	68.4 ± 2.9	70.5 ± 3.3
$t_{1/2}$（時間）	68.6	155 ± 29	242 ± 21	209 ± 22
MRT（時間）	261	216 ± 43	335 ± 31	288 ± 30
BA 及び TK 報告書番号	【DMB-20.46】	【DMB-20.47】	【DMB-20.48】 【DMB-20.49】	【DMB-18.151】 【DMB-18.152】 【DMB-18.146】

[a] NCA から算出した平均（N>2 の場合、± 標準偏差）PK パラメータ。
[b] 報告書には GLP 適合状況に関する記述が含まれている。
SD：単回投与、MD：反復投与、M：雄、F：雌

3.2.　分析方法

カニクイザルを用いて実施した GLP 毒性試験でレチファンリマブの血清中濃度及び ADA を評価するために用いた測定法をそれぞれ【モジュール 2.6.4、2.1 項】及び【モジュール 2.6.4、2.2 項】に記載する。検証済みのサンドイッチ酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）を使用し、可溶性ヒト PD-1 タンパクを捕捉試薬として、ビオチン標識ヤギ抗ヒト IgG4 Fc を検出試薬として、レチファンリマブの血清中濃度を定量した。血清検体を対象に、検証済みのブリッジング ELISA を使用し、レチファンリマブを捕捉試薬、ビオチン標識レチファンリマブを検出試薬として、レチファンリマブに対する ADA を評価した。スクリーニング検査で陽性である可能性が確認された検体は、この陽性の結果を確認するため結合阻害測定で更に検証した。

3.3.　IV 投与後の薬物動態

2 つの非 GLP 毒性試験及び 2 つの GLP 毒性試験で検討した 1～150 mg/kg の用量全域で、最高血清中濃度（C_{max}）及び血中濃度-時間曲線下面積（AUC）は用量に比例して増加し、クリアランス（CL）及び分布容積（V_d）を含む主要な PK パラメータは用量に依存しなかった【モジュール 2.6.4、3 項】を参照。そのため、レチファンリマブの PK は、検討した用量範囲では線形を示している。全試験で得られたレチファンリマブの PK パラメータはいずれも、雌雄のサルの間で差が 1.5 倍以内であったことから、サルにレチファンリマブを IV 投与した場合の性差は軽微である。

全試験を対象にノンコンパートメント解析（NCA）により求めた平均 CL 値は 0.213～0.345 mL/h/kg であり、カニクイザルの糸球体濾過量（GFR）（約 125 mL/h/kg）よりも大幅に低かったが、このことは分子量の大きいタンパク（約 145 kDa）について予測されるように、尿中クリアランスが軽微であることを示している。全試験を対象に NCA により求めた定常状態での

分布容積（V_{ss}）の平均は 54.2～85.8 mL/kg であった。この値は血漿空間（約 45 mL/kg）の約 1 倍から 2 倍であるが、レチファンリマブの血管コンパートメントから組織の細胞外腔への浸出及び／又は細胞又は組織への結合を示唆するものである。全試験を対象に NCA により求めた平均滞留時間（MRT）は、216～335 時間（約 9～14 日間）であった【モジュール 2.6.4、3 項】を参照。

3.4. 抗薬物抗体

サルを用いた単回投与毒性試験で ADA は評価されなかった。ヒト化タンパクをヒト以外の霊長類に投与する場合、予測されるように（ICH S6(R1) 2011）、反復投与後にレチファンリマブに対する中等度の ADA 反応が検出された。レチファンリマブを投与したサルにおける全体的な ADA 陽性の発現割合は、3 週間投与の非 GLP 試験、4 週間投与の GLP 試験及び 13 週間投与の GLP 試験でそれぞれ 38%（3/8）、47%（14/30）及び 33%（10/30）であった【モジュール 2.6.4、3 項】。一部の動物では、ADA 評価のための検体採取時に高濃度レチファンリマブの存在により干渉を受け、生成した ADA が検出されなかった可能性がある点に注意が必要である。

3.5. 分布

非 GLP 反復投与試験においてカニクイザルから採取された特定の組織を用いて、限定的な薬物分布試験を実施した【モジュール 2.6.4、4 項】。予測されたとおり、血管内液及び血管周囲間質中にレチファンリマブが検出された。これは分布の血管相と一致している。レチファンリマブは、リンパ節、脾臓、扁桃、胸腺等、検討したリンパ組織にあるリンパ球の細胞膜及び細胞質でも検出された。検討した組織におけるレチファンリマブの局在は、マウスの抗 PD-1 IgG1 mAb（MG13.78、レチファンリマブの前駆抗体であり、レチファンリマブと同一のエピトープ特異性を有する）を用いた溶媒対照サルの同じ組織で実施した IHC 評価により判定された PD-1 発現と一致していた。

3.6. 代謝

レチファンリマブはヒト IgG4 の Fc 領域を有し、分子量は約 148 kDa である。一般に免疫グロブリンの代謝は、ピノサイトーシス又は受容体を介したエンドサイトーシスによる非特異的取込み後の、細胞内異化作用によって行われると考えられている（Lobo et al 2004）。レチファンリマブの代謝を評価するための試験は行われていない。

3.7. 排泄

カニクイザルにおけるレチファンリマブの平均 CL は 0.213～0.345 mL/h/kg であった。これはカニクイザルの GFR（約 125 mL/h/kg）よりも低いが、このことは本抗体の分子量（約 148 kDa）から予測されたように、腎排泄がレチファンリマブの主なクリアランス経路でないことを示している。レチファンリマブの排泄を評価するための試験は行われていない。

4. 毒性試験

レチファンリマブの非臨床毒性プログラムは、ICH S9（2009）及び ICH S6 (R1)（2011）ガイドラインに従い実施した。以下のようにヒトと薬理活性が類似していることに基づき、レチファンリマブの非臨床安全性の評価に最も適切な動物モデルとして、カニクイザルが選択された。

- カニクイザルとヒトの PD-1 の細胞外ドメインのアミノ酸配列に高い配列相同性が認められる（96%が一致）。
- ヒト及びカニクイザルの PD-1 タンパクに対するレチファンリマブの結合親和性が類似している（6 倍以内）。

- レチファンリマブは SEB による PD-1 発現刺激後のヒト及びカニクイザルの PBMC に結合する。
- レチファンリマブはカニクイザルのリンパ組織から採取したリンパ球には結合するが、非リンパ組織の実質には結合しない。

霊長類以外の動物種については、PD-1 の細胞外ドメインのアミノ酸配列の相同性が著しく低い（一致率 72%以下）という事実に一致して、レチファンリマブはマウス、ラット及びイヌの PD-1 タンパクには結合しないため（社内資料）、毒性試験で検討されなかった。

本申請を支持する主要な反復投与毒性試験は、カニクイザルを用いた 10 週間の回復期間を設けた 4 週間反復投与 GLP 試験【T19-01-03 試験】及び 13 週間反復投与 GLP 試験【T18-02-10 試験】である。更に、2 つの非 GLP 試験［カニクイザルを用いて限定的な毒性評価項目を検討した単回投与 PK 試験【T15-06-12 試験】及びカニクイザルを用いた 3 週間反復投与パイロット毒性試験【T15-08-05 試験】］を行った。これらにはレチファンリマブの薬物分布及び PD-1 発現に関する限定的な IHC 評価も含まれていた。レチファンリマブは、これら全ての試験で 1～150 mg/kg の用量範囲で IV 投与した。レチファンリマブは、KLH 免疫による T 細胞依存性抗体産生に影響を及ぼさなかった【T22-05-01 試験】。また、ヒトの正常組織パネルに対するレチファンリマブの組織交差反応性を検討した GLP 試験【T16-02-22 試験】を実施した。

4.1. 単回投与毒性試験

カニクイザル（1 例/性）に 10 mg/kg を単回 IV 投与（1 時間）した場合のレチファンリマブの忍容性、PK 及び PD を MK-3475［ペムブロリズマブ（キイトルーダ®、Merck）］及び AEX1197［ニボルマブ（オプジーボ®、Bristol-Myers Squibb）の公表されている配列情報に基づき作成された抗 PD-1 抗体。以降はニボルマブのレプリカと称する］と比較した。これらの試験の詳細な概要については、【モジュール 2.6.6、2 項】を参照する。

3 つの抗体はいずれも忍容性が良好であり、被験物質に関連した臨床徴候並びに体重、摂餌量又は免疫細胞の変化は認められなかった（免疫表現型分類により評価）。レチファンリマブ及びニボルマブのレプリカはサイトカインの変化と関連しなかったが、ペムブロリズマブ投与後には IL-5 の増加が認められた。レチファンリマブ及びペムブロリズマブの投与により、CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞表面上の PD-1 に対する結合時間が延長したが（80%以上が 28 日間以上維持）、ニボルマブのレプリカの結合時間は短縮した（80%以上が 21 日間以下維持）。各抗 PD-1 抗体について、T 細胞上の PD-1 への結合データは、抗体の血清中濃度と関連していた。レチファンリマブとペムブロリズマブの血清中濃度-時間プロファイルは概ね同等であったが、ニボルマブのレプリカを投与した動物では C_{max} が低く、クリアランスが速かった。

4.2. 反復投与毒性試験

カニクイザルにレチファンリマブを投与したピボタル反復投与毒性試験には、10 週間の回復期間を設けた 4 週間投与試験（用量：0、10、40 又は 150 mg/kg）【T19-01-03 試験】及び 13 週間投与試験（用量：0、5、20、100 mg/kg）【T18-02-10 試験】がある。両試験とも、レチファンリマブを週 1 回 IV 投与（4 週間投与試験では 1 時間かけて持続投与、13 週間投与試験では 30 分かけて持続投与）した。これらの試験の詳細な概要については【モジュール 2.6.6、3 項】を参照する。

両試験とも、レチファンリマブの忍容性は良好で、有害な臨床徴候も、体重、摂餌量、眼所見又は心電図所見に対する影響も認められなかった。4 週間投与試験の神経学的評価及び呼吸器系評価で影響は認められなかった。

13 週間投与試験では、レチファンリマブに関連するサイトカインの明らかな変化は生じなかった（4 週間投与試験では評価せず）。全ての評価時点で、サイトカイン／ケモカイン濃度の過半が定量下限未満であった。ただし、数例の動物では、投与後に測定可能濃度の IL-6 が散見され

た（対照動物を含む）が、用量反応性は認められなかった。また、予備的な用量設定試験【T15-08-05 試験】で 1 回当たり 100 mg/kg を投与した動物 1 例に、投与後に IL-6 濃度の一過性の増加が認められたが、24 時間以内にベースライン値又はそれに近い値に戻った。上述の所見とレチファンリマブとの明確な関連性はないと考えられた。

両試験とも、投与 2 日目（初回投与後）にリンパ球の一過性の減少（程度は一定しない）が認められた。4 週間投与試験の一部の動物に、以降の投与後にも一過性の減少が認められた。4 週間投与試験では上述の所見がフローサイトメトリーによる免疫細胞集団の評価（免疫表現型分類）の結果と相関し、総白血球、T 細胞、B 細胞及び NK 細胞の一過性の用量非依存的な低下が投与 23 時間後に認められ、投与 72 時間後までに回復した。変化の程度が最大となったのは初回投与後であった。

13 週間投与試験では、レチファンリマブ投与群で投与 2 日目にフィブリノゲンの軽微から中等度の増加が生じたが、外来性タンパクに対する非特異的反応であった可能性がある。5 mg/kg 超を投与した個々の動物に、投与 28 日目又は 88 日目にフィブリノゲンの散発的増加が認められたが、レチファンリマブとの関連性は確かでなかった。レチファンリマブに関連するグロブリン又は白血球の増加は併発しなかったことから、炎症反応が維持されたことが示唆される。

4 週間投与試験では、抗ヒト IgG4 抗体を用いて CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞と結合したレチファンリマブを検出することにより、T 細胞占有率を評価した。いずれの用量でも、投与期間中に PD-1 陽性／CD4 陽性細胞及び PD-1 陽性／CD8 陽性細胞に対するレチファンリマブの結合率が最大となった。ADA が認められない回復期間の動物では、10 週間の回復期間を通して PD-1 陽性／CD4 陽性 T 細胞及び PD-1 陽性／CD8 陽性 T 細胞に対するレチファンリマブの結合率が維持され、血清中濃度と相関した。

4 週間投与試験では、レチファンリマブと関連する顕微鏡的変化が IV 投与部位に認められたが、その変化は表皮内血管周囲の微小な多巣性単核細胞浸潤であった（40 mg/kg 以上の雄、10 mg/kg 以上の雌）。この所見は外来性タンパク（mAb）の反復投与で予想される反応である。発現が（用量と関連しない）散発性のものであったことを踏まえ又は頻度／重症度は低いが対照動物にも発現したことから、混合細胞及び／又は単核細胞の投与部位、CNS、甲状腺、心臓、消化器、気管、肺、膀胱への浸潤と被験物質との関連性は確かではないと考えられた。13 週間投与試験では、レチファンリマブの投与に起因することを示す病理組織学的所見は認められなかった。

予備的な 3 週間の用量設定試験（用量：0、1、100 mg/kg、2 例/性）【T15-08-05 試験】では、レチファンリマブを投与した動物に、脾臓重量の増加及び赤脾髄における用量依存性の軽度から中等度のリンパ組織球性浸潤が明白に認められた。ただし、同程度以上の用量を用いた主要な長期投与試験では、同様の所見が認められなかった。

4 週間投与試験及び 13 週間投与試験ではいずれも、全用量群の動物に反復投与後のレチファンリマブの血清中濃度低下が認められ、用量が低い程その頻度が高かった。これは ADA の存在と相関しており、ほとんどの動物に ADA が確認された。これらの動物では、レチファンリマブの曝露量が高かったこと（特に高用量群）が ADA の検出に干渉した可能性がある点に注意することが必要である。

レチファンリマブのトキシコキネティクスの性差は軽微であった。13 週間投与試験におけるトキシコキネティクス解析により、曝露量が用量に比例することが示された。推定半減期は約 8 日であった。曝露量又は分布に明白な性差は認められなかった。

要約すると、カニクイザルにレチファンリマブを最長 13 週間週 1 回 IV 投与した場合の忍容性は良好であった。リンパ球集団の一過性の減少及びフィブリノゲンの増加が認められ、初回投与後に最も顕著であった。13 週間の投与後に、無毒性量（NOAEL）は 1 回当たり 100 mg/kg（評価した最高用量）と考えられた（雌雄を統合した平均 C_{max} は 4.88 mg/mL、AUC は 237 h·mg/mL）。

4.3. 遺伝毒性

レチファンリマブは 148.2 kDa の抗体タンパクであり、デオキシリボ核酸（DNA）及び他の染色体構成物との直接の相互作用が予測されないため、遺伝毒性試験は行われていない。そのため、標準的な遺伝毒性試験の実施が適切とは考えられない（ICH S6(R1) 2011）。

4.4. がん原性

ICH S6(R1)（2011）及び ICH S9（2009）ガイドラインの推奨事項に従い、レチファンリマブを用いたがん原性試験は実施されていない。

4.5. 生殖毒性

レチファンリマブについて、標準的な受胎能及び初期胚発生試験、胚・胎児発生毒性試験、出生前及び出生後発生試験は実施されていない。進行癌の治療薬では、受胎能及び初期胚発生試験、出生前及び出生後発生試験は要求されていない（ICH S9 2009）。作用機序及び文献に基づく生殖毒性評価（FDA 2019）を踏まえ、レチファンリマブは以下に要約するように妊娠の維持に影響を及ぼすと考えられる。そのため、カニクイザルを用いた胚・胎児発生試験を実施しても有益な情報が得られる可能性は低い。

文献によると、PD-1/PD-L1 経路は妊娠中の胎児に対する母体免疫寛容で重要な役割を果たすことが示唆されている。PD-L1 は、妊娠中のヒト胎盤並びにヒト胎児絨毛の栄養膜合胞体層及び栄養膜細胞層における母体-胎児界面に発現する（Petroff et al 2003、Miko et al 2019）。妊娠の同種異系マウスモデル（CBA x C57BL/6）では、受胎後早くて 10.5 日で胎盤の子宮胎盤界面にて PD-L1 の発現が検出された（Guleria et al 2005、La Rocca et al 2014、Tripathi and Guleria 2015、Miko et al 2019）。受胎後 6.5 日、8.5 日、10.5 日及び 12.5 日に 250 µg から 500 µg のマウス抗 PD-L1 mAb を同種異系妊娠マウスの腹腔内に投与すると、吸収の発生率がアイソタイプ対照（18%）と比較して高くなった（86% ; Guleria et al 2005）。本実験では、同種異系胎児の拒絶反応は T 細胞依存性であった。また、雌の PD-L1 ホモ接合ノックアウト（PD-L1 -/-）マウスでは、雌の PD-L1 ヘテロ接合ノックアウトマウスに比べて吸収の発生率が高くなった（Guleria et al 2005）。妊娠 PD-L1 -/-マウス並びに抗 PD-L1 抗体を投与したマウスでは、当該の対照と比較して母体-胎児界面に IFN-γ 産生 Th1 細胞が多く認められた（Guleria et al 2005）。

他の非臨床試験では、制御性 T 細胞（Tregs）の枯渇により PD-L1 の遮断の胎児吸収への影響及び妊娠 C57BL/6 マウスの生存率が抑制され、他方で野生型マウスから PD-L1 -/-マウスへ Treg を養子移植すると胎児の生存率が上昇したことから（Habicht et al 2007）、PD-L1 発現 Treg が胎児の同種抗原に対する免疫寛容に関与していることが示唆されている。これとは逆に、妊娠 CBA/J x DBA/2J マウスモデルでは、PD-1 の遮断により Treg の防御効果が抑制され、対照と比較して流産傾向のマウスでの流産率が高くなった（Wafula et al 2009）。PD-L1 -/-マウス又は抗 PD-1/PD-L1 抗体を介した PD-1/PD-L1 シグナル伝達の遮断により、出生児に明らかな異常が認められなかった点は注目に値する（Guleria et al 2005、Habicht et al 2007、Wafula et al 2009）。マウスの母体-胎児界面はヒトのものと類似しており、同種異系妊娠のマウスモデルから得られた知見はヒトにも適応できることが示唆される。したがって、その作用機序及び妊娠マウスモデルから得られた知見に基づくと、レチファンリマブの投与により正常妊娠の維持が阻害される可能性が高い。この仮説のとおり、妊娠したカニクイザルに器官形成期から分娩時までの期間にニボルマブを投与したところ、流産及び新生児の死亡が認められている（Poulet et al 2016）。

これらの報告に基づくと、妊娠中のレチファンリマブ投与に伴う潜在的リスクには流産及び死産の発生率の上昇が含まれる。更に、PD-1 -/-マウスでは遅発性の自己免疫表現型を発生することから（Okazaki and Honjo 2006、Miko et al 2019）、レチファンリマブの胎児曝露により正常な免疫反応が変化するか又は免疫関連疾患発症のリスクが上昇する可能性がある。

4.6. 組織交差反応性試験

ビオチン化したレチファンリマブ（レチファンリマブ-Bio）との培養後に、広範なヒト組織パネルに対するレチファンリマブの特異的結合を IHC により評価した【T16-02-22 試験】。この試験は ICH S6 (R1) ガイドライン（2011）に従い実施した。この試験全体の概要については、【モジュール 2.6.6、8.1 項】を参照する。

レチファンリマブ-Bio による染色は、多くの組織で血漿及び単核細胞（リンパ球）の細胞質に限定された。レチファンリマブで染色されたリンパ球はリンパ器官（リンパ節、脾臓、扁桃）の胚中心で最も高頻度に見られたが、ただし主に髄質にある胸腺及び結腸、食道、小腸、尿管、子宮頸部、子宮、肺（BALT）等のいくつかのヒト組織やリンパ球が存在する組織（腎、前立腺等）の粘膜下のリンパ球集簇巣は除かれた。この染色は、リンパ器官の濾胞内のリンパ球において T 細胞上に発現した PD-1 に関する文献報告（Breitfeld et al 2000、Schaerli et al 2000、Yang et al 2015、Kim et al 2001）から予測されたとおりと判断された。レチファンリマブでは、想定外の組織染色は見られなかった。

4.7. T 細胞依存性抗体産生試験

KLH 免疫後の T 細胞依存性の抗体産生に対するレチファンリマブの影響が検討された【T22-05-01 試験】。カニクイザルにレチファンリマブ 0（溶媒）又は 20 mg/kg/週が週 1 回 9 週間点滴静注された。

対照群及びレチファンリマブ投与群に割り付けられた全ての動物は、16 日目の免疫後に一次抗 KLH IgM 及び IgG 反応を示し、44 日目の免疫後に二次抗 KLH IgG 反応を示した。抗 KLH IgM 及び IgG にレチファンリマブ投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。溶媒又はレチファンリマブを投与した動物では、レチファンリマブの全身曝露が確認されたが、ADA 陽性反応は認められなかった。

レチファンリマブは KLH による免疫後に一次及び二次免疫応答の産生に影響を及ぼさず、T 細胞依存性の抗体産生に影響を及ぼさなかった。

5. 総合的な概括評価及び結論

レチファンリマブは、ヒンジ結合により安定化させたヒト化 IgG4κ mAb であり、ヒト PD-1 を認識する。ヒト IgG4 Fc 領域はエフェクター機能を制限する一方、FcRn 結合能が保持されていることにより、循環血中半減期が延長している。レチファンリマブは、PD-1 に結合して PD-1－PD-L1/L2 抑制性シグナル伝達経路を阻害することで、免疫系による腫瘍細胞の認識及び排除を促進するように設計されている。レチファンリマブは、癌治療薬の候補として開発中である。

レチファンリマブの *in vitro* 試験では、PD-1 に対する高い結合親和性が示され、ヒト PD-1 に対する K_D 値は 0.6 nM であった。また、ヒト PBMC、ヒト T 細胞（CD4 陽性及び CD8 陽性の両方）、ヒト PD-1 が細胞表面に発現するように設計した NS0 細胞、並びにカニクイザル及びアカゲザルの PBMC の細胞表面に発現する PD-1 に用量依存的に結合することが示された。

また、レチファンリマブは PD-1/PD-L1 シグナル伝達経路の遮断に機能活性を示した。例えば、PBMC を SEB で刺激して PD-1 発現を誘導し、PD-L1 及び PD-L2 の細胞表面発現 PD-1 に対する結合を阻害して、PD-1 発現細胞株による TCR を介した NFAT 誘導ルシフェラーゼシグナル伝達が増強すると、ヒト及びヒト以外の霊長類の PBMC に対する結合が増強された。また、レチファンリマブは、SEB で刺激したヒト PBMC による IFN-γ 分泌の増強能を示した。更に、レチファンリマブの結合特性及び機能特性は、ニボルマブ及びペムブロリズマブのレプリカを介するものと同等であった。両レプリカは、公表されている配列情報に基づき [redacted] が IgG4κ

分子として作成したものであり、並行して解析した。詳細は【モジュール 2.6.2、2.1 項】を参照する。

ヒト IgG4 Fc 領域を有する抗体の特性と一致して、レチファンリマブは PD-1 発現標的細胞に対する ADCC 又は CDC を仲介しなかった。また、レチファンリマブは、新たに単離した PBMC で内因性のマイトジェン活性を示さず、精製 RBC 又は全血による溶血を仲介しなかった。

レチファンリマブは、*in vivo* 及び *in vitro* の非臨床安全性試験で、PD-(L)1 阻害剤クラスと一致する許容可能な安全性プロファイルを示した。4 週間及び 13 週間の主要な GLP 反復投与毒性試験では、レチファンリマブ（最高 150 mg/kg）を週 1 回 IV 投与した場合の忍容性は良好であった。4 週間投与毒性試験では、全ての用量で CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞表面の PD-1 に対するレチファンリマブの結合が飽和し、10 週間の回復期間全体を通して PD-1 陽性／CD4 陽性及び PD-1 陽性／CD8 陽性 T 細胞に対するレチファンリマブの最大結合が維持された。

ヒト化 mAb の投与により ADA の産生が誘導される可能性があり、また場合によっては毒性試験の過程で ADA が曝露量に悪影響を及ぼす（曝露量を減少させる）可能性がある。毒性試験では、全ての用量で ADA の産生が認められ、それに伴い曝露量が減少したが、低用量の方が頻度が高かった。ただし、少なくとも一部の動物の全用量群で、試験期間を通して毒性の可能性の頑健な評価を裏付けるのに十分な曝露量が維持された。

mAb、特に免疫系を調節する mAb の使用に伴うよくある懸念はサイトカイン放出症候群（CRS）である。4 週間の GLP 試験では、血清中サイトカイン濃度に顕著な変化は認められなかった。13 週間の GLP 毒性試験では、サイトカイン／ケモカイン濃度の過半が定量下限未満であった。ヒト PBMC を用いた CRS の *in vitro* 試験では、レチファンリマブを介したサイトカイン産生（IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10）の所見は認められなかった。

ヒト組織パネルを用いた *in vitro* 組織交差反応性試験では、レチファンリマブの交差反応性（染色）は多くの組織で血漿及び単核細胞（リンパ球）の細胞質に限定された。この交差反応性のパターンは、リンパ器官の濾胞内のリンパ球において T 細胞上に発現した PD-1 に関する報告と完全に一致していた（Breitfeld et al 2000、Schaerli et al 2000、Yang et al 2015、Kim et al 2001）。

レチファンリマブは、KLH による免疫に伴う T 細胞依存性抗体反応に影響を及ぼさなかった。

要約すると、レチファンリマブの非臨床試験では、*in vitro* で PD-1 に対する高い結合親和性及び PD-1－PD-L1/L2 抑制系の強力な破綻が示され、これは他の抗 PD-1 抗体で認められるものと同等であった。レチファンリマブをカニクイザルに 1～150 mg/kg の用量範囲で週 1 回 IV 投与したところ、良好な安全性プロファイルが示され、CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞の表面の PD-1 に対する飽和した持続的な結合が示された。レチファンリマブの投与により、*in vitro* 及び *in vivo* のいずれでもサイトカイン放出の所見は認められず、組織交差反応性試験でオフターゲット結合の所見は認められなかった。以上をまとめると、非臨床薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験のデータから、提案する患者集団におけるレチファンリマブの使用に対して、強力な科学的根拠及び許容可能な安全性プロファイルが示されている。

6. 参考文献

Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 2015;372(4):311-319.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature 2006;439(7077):682-687.

Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer Annu Rev Immunol 2016;34:539-573.

Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. Nat Immunol 2009;10(1):29-37.

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2015;373(17):1627-1639.

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. J Exp Med 2000;192(11):1545-1552.

Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Nat Rev Immunol 2013;13(4):227-242.

Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107(9):4275-4280.

Food and Drug Administration (FDA). Oncology Pharmaceuticals: Reproductive Toxicity Testing and Labeling Recommendations. Guidance for Industry. May 2019.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med 2000;192(7):1027-1034.

Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. J Exp Med 2005;202:231-237.

Habicht, A, Dada S, Jurewicz M, et al. A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance. J Immunol. 2007;179(8):5211-5219.

Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. Lancet 2016;387(10027):1540-1550.

International Council for Harmonisation (ICH). ICH Harmonised Tripartite Guideline. S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. 8 November 2000.

International Council for Harmonisation (ICH). ICH Harmonised Tripartite Guideline. S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals. 29 October 2009.

International Council for Harmonisation (ICH). ICH Harmonised Tripartite Guideline. S6(R1): Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. 12 June 2011.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 1992;11(11):3887-3895.

Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. Int Immunol. 2005;17(2):133-144.

Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, et al. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. J Exp Med. 2001;193(12):1373-1381.

La Rocca C, Carbone F, Longobardi S, Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. Immunol Lett. 2014 Nov;162(1 Pt A):41-48.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat Immunol 2001;2(3):261-268.

Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. J Pharm Sci 2004;93(11):2645-2668.

Miko E, Meggyes M, Doba K, et al. Immune Checkpoint Molecules in Reproductive Immunology. Front Immunol. 2019;10:846.

Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2015;373(19):1803-1813.

Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, et al. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. J Hepatol. 2006;45(4):520-528.

Norde WJ, Maas F, Hobo W, et al. PD-1/PD-L1 interactions contribute to functional T-cell impairment in patients who relapse with cancer after allogeneic stem cell transplantation. Cancer Res. 2011;71(15):5111-5122.

Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. Trends Immunol. 2006;27(4):195-201.

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 2012;12(4):252-264.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, t al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. Mol Cell Biol 2005;25(21):9543-9553.

Petroff MG, Chen L, Phillips TA, et al. B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. Biol Reprod 2003;68(5):1496-1504.

Pilon-Thomas S, Mackay A, Vohra N, Mule JJ. Blockade of programmed death ligand 1 enhances the therapeutic efficacy of combination immunotherapy against melanoma. J Immunol 2010;184(7):3442-3449.

Poulet FM, Wolf JJ, Herzyk DJ, DeGeorge JJ. An evaluation of the impact of PD-1 pathway blockade on reproductive safety of therapeutic PD-1 inhibitors. Birth Def Res (Part B) 2016; 107:108-119.

Ribas A, Puzanov I, Dummer R, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. Lancet Oncol 2015;16(8):908-918.

Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science 2015;348(6230):124-128.

Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. N Engl J Med 2015a;372(4):320-330.

Robert C, Schachter J, Long GV, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. N Engl J Med 2015b;372(26):2521-2532.

Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. J Exp Med. 2000;192(11):1553-1562.

Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, et al. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. J Immunol 2003;170(7):3637-3644.

Sun L, Zhang L, Yu J, et al. Clinical efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 inhibitors for the treatment of advanced or metastatic cancer: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep 2020;10(1):2083.

Tripathi S, Guleria I. Role of PD1/PDL1 pathway, and TH17 and Treg cells in maternal tolerance to the fetus. Biomed J 2015;38(1):25-31.

Wafula PO, A Teles, A Schumacher, et al. PD-1 but not CTLA-4 blockade abrogates the protective effect of regulatory t cells in a pregnancy murine model. Am J Reprod Immunol. 2009;62(5):283-292.

Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, et al. PD-1 expression defines two distinct T-cell sub-populations in follicular lymphoma that differentially impact patient survival. Blood Cancer J 2015;5:e281.

Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. Blood 2009;114(8):1545-1552.