目次

略号一覧 2
1. 試験薬の情報 3
1.1. 製剤組成 3
2. 作用機序 3
3. 効能・効果 4
4. 用法・用量 4
5. 参考文献 5

図一覧

Figure 1: Amino Acid Sequence of Retifanlimab 4

略号一覧

略号	定義	
CDR	complementarity determining region	相補性決定領域
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
Da	Dalton	ダルトン
DP	drug product	製剤
DTT	dithiothreitol	ジチオトレイトール
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
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IV	intravenous(ly)	静脈内
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MCC	Merkel cell carcinoma	メルケル細胞癌
MW	molecular weight	分子量
PD-1	programmed cell death protein 1	プログラム細胞死タンパク 1
PD-L1	programmed death ligand 1	プログラム細胞死-リガンド 1
PD-L2	programmed death ligand 2	プログラム細胞死-リガンド 2
Q4W	every 4 weeks	4 週毎

1. 試験薬の情報

レチファンリマブ（遺伝子組換え）［INCMGA00012、MGA012、AEX1188、hMG13.78(1.3)］（以下、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、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で産生され、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、PD-1 を発現する細胞を標的として、PD-1 とその 2 つのリガンドであるプログラム細胞死-リガンド 1（PD-L1）及びプログラム細胞死-リガンド 2（PD-L2）との抑制的に働くチェックポイント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するように設計されている。

1.1. 製剤組成

レチファンリマブ製剤（DP）は静脈内投与用溶液である。レチファンリマブ製剤は、単回使用のガラス製バイアルで供給される無色～微黄色の液体である。容器施栓系は、クロロブチルゴム栓、アルミニウム製シール及びプラスチック製オーバーシールで密封されたガラス製バイアルで構成される。

バイアルから 20 mL（500 mg に相当）を確実に抜き取れるようにするため、0.6 mL の過量仕込みを行う。

レチファンリマブは、pH 5.1 の 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液を用いて濃度 25 mg/mL で調製する。酢酸ナトリウム三水和物と酢酸のモル比により目標 pH を達成する。浸透圧を約 315 mOsm/kg とするため、精製白糖及び界面活性剤ポリソルベート 80 をそれぞれ 9%及び 0.01 w/v%の濃度で用いている。

2. 作用機序

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 PD-1 に高い親和性で結合する【モジュール 2.6.2、2.1 項】。PD-1 とそのリガンドである PD-L1 及び PD-L2 は、免疫応答の制御において重要な役割を果たしている。PD-1 は T 細胞（CD4 陽性及び CD8 陽性）、B 細胞、ナチュラルキラー細胞及び骨髄由来細胞上に発現する。生理的環境において、PD-L1 及び PD-L2 は受容体に結合して T 細胞の活性化を調節しているが、腫瘍微小環境中では腫瘍細胞によって異常に発現することが分かっている。大規模な研究により、癌細胞は、腫瘍抗原に特異的な T 細胞に対する免疫回避／抵抗性の主な機序として、PD-1–PD-L1/L2 経路を含む特定の免疫チェックポイント経路を利用することが示されている（Pardoll 2012）。PD-1 受容体とリガンドの相互作用を阻害する抗体を含むこの経路を阻害するものは、マウスを用いたモデルにおいて抗腫瘍活性を誘導することが示されている（Wong et al 2007、Pentcheva-Hoang et al 2009、Hodi et al 2010、Chen et al 2013、Yao et al 2013、Powles et al 2014、Rizvi et al 2015、Topalian et al 2015）。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）。また、レチファンリマブは、PD-1 を発現する細胞を標的として、抑制的に働く PD-1 及びそのリガンドとの相互作用を阻害するように設計されている。レチファンリマブは、固形癌の治療薬候補として開発中である。

レチファンリマブは、ヒンジ結合の鎖間ジスルフィドの不安定性を大きく軽減又は排除するため、セリンからプロリンへの変異（S227P/S228P；Kabat et al 1991）を含むヒト IgG4 Fc 領域を有している。この変異体の表記は特定の配列番号付けに基づいているが、別の表記も Kabat（1991）法により提供されている。

レチファンリマブの相補性決定領域（CDR）の配列は、His で標識したヒト PD-1 の細胞外ドメイン分子で免疫化したマウスから、標準的なハイブリドーマ技術を用いて作成されたマウス mAb クローン（MG13.78）から得られる。CDR1 にある N 結合グリコシル化部位を除くため、可変領域の軽鎖（VL）に単一変異の N26S を導入した【モジュール 3.2.S.2.3 Control of Materials－Cell Substrate】。

アミノ酸配列（Figure 1）に基づき、レチファンリマブには、16 のジスルフィド結合［-32.0 ダルトン（Da）］、2 つの N-結合型グリカン（例：G0F/G0F グリコフォームを想定した場合、+2×1445.3）及び 2 つの N-末端重鎖ピログルタミン酸残基（グルタミンの環化、-2×17.0 Da）を有する。配列及び予測される修飾に基づくと、グリコシル化された完全長分子の理論的な分子量（MW）は 148,235.7 Da である。N-結合型グリカンを除去したレチファンリマブタンパクの予測 MW は 145,347.1 Da である。最後に、ジチオトレイトール（DTT）が異なるポリペプチド鎖間の鎖間ジスルフィド結合のみを還元すると想定した場合、還元脱グリコシル化軽鎖及び重鎖の理論的 MW はそれぞれ 23,656.0 Da 及び 49,021.5 Da である。重鎖の鎖内ジスルフィド結合はそのまま維持されると予測される【モジュール 3.2.S.3.1、Table 3】。

Figure 1: Amino Acid Sequence of Retifanlimab

INCMGA00012 Light Chain

```
1    EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGMSFMNWFQQKPGQPPKL
51   LIHAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYFCQQSKEVPY
101  TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
151  QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
201  THQGLSSPVTKSFNRGEC
```

INCMGA00012 Heavy Chain

```
1    qVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGV
51   IHPSDSETWLDQKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREH
101  YGTSPFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
151  YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY
201  TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
251  MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
301  VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
351  PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
401  GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
```

*N-terminal glutamine of Heavy Chain is primarily cyclized (q). Site of N-linked glycosylation is shown in **bold-orange**. Site of N26S and hinge S227P (S228P Kabat) mutation is shown in **bold-green**.*

3. 効能・効果

切除不能な進行・再発の肛門管扁平上皮癌

4. 用法・用量

パクリタキセル及びカルボプラチンとの併用において、通常、成人には、レチファンリマブ（遺伝子組換え）として、1 回 500mg を 4 週間間隔で 30 分間かけて点滴静注する。

5. 参考文献

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity. 2013;39(1):1-10.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010;363(8):711-723.

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottessmann KS, Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. Fifth Edition: US Department of Health and Human Services; National Institutes of Health Publication No. 91-3242; 1991.

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

Pentcheva-Hoang T, Corse E, Allison JP. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. Immunol Rev. 2009;229(1):67-87.

Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. Nature. 2014;515(7528):558-562.

Rizvi NA, Mazieres J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. Lancet Oncol. 2015;16(3):257-265.

Sun L, Zhang L, Yu J, Zhang Y, Pang X, Ma C, Shen M, Ruan S, Wasan HS, Qiu S. 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 Feb 7;10(1):2083.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. Cancer Cell. 2015;27(4):450-461.

Wong RM, Scotland RR, Lau RL, Wang C, Korman AJ, Kast WM, et al. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. Int Immunol. 2007;19(10):1223-1234.

Yao S, Zhu Y, Chen L. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. Nat Rev Drug Discov. 2013;12(2):130-146.

目次

略号一覧 3
1. まとめ 5
1.1. 緒言 5
1.2. 非臨床薬理試験 6
2. 効力を裏付ける試験 8
2.1. In Vitro 試験 9
2.1.1. Retifanlimab の PD-1 に対する結合（SPR による評価） 9
2.1.1.1. *In vitro* におけるレチファンリマブの生物学的活性の評価 9
3. 副次的薬理試験 19
3.1. レチファンリマブの血液適合性評価 20
3.2. 抗体依存性細胞傷害又は補体依存性細胞傷害に関する評価 20
3.2.1. 抗体依存性細胞傷害の評価 20
3.2.2. 補体依存性細胞傷害の評価 21
3.3. ヒト PBMC 培養後のレチファンリマブの内因性マイトジェン活性の評価 22
3.4. In vitro サイトカイン放出 23
3.4.1. 可溶状態又は固定状態のレチファンリマブによるヒト PBMC からのサイトカイン産生の評価 23
3.5. *In vivo* サイトカイン放出 25
3.5.1. カニクイザルにおける単回投与後のサイトカイン産生の評価（非 GLP） 25
3.5.2. カニクイザルにおける 3 週間反復投与後のサイトカイン産生の評価（非 GLP） 25
3.5.3. カニクイザルにおける 13 週間反復投与後のサイトカイン産生の評価（GLP） 25
4. 安全性薬理試験 26
5. 薬力学的薬物相互作用 26
6. 考察及び結論 26
7. 参考文献 29

表一覧

Table 1: Retifanlimab Pharmacology Program Overview 6
Table 2: Summary of Test and Positive Control Articles Used in Retifanlimab Pharmacology Studies 8
Table 3: Equilibrium Dissociation Constants (K_D) for Binding of Human or Cynomolgus Monkey PD-1 Protein to Captured Retifanlimab 9
Table 4: EC_{50} and EC_{90} Values of Anti-PD-1 mAb Binding to NS0/PDCD1 Cells 11
Table 5: IC_{50} and IC_{90} Values of anti-PD-1 mAb-mediated Inhibition of sPD-L1 and sPD-L2 Binding to NS0/PDCD1 Cells 16
Table 6: EC_{50} and EC_{90} Values of Anti-PD-1 mAb Inhibition of PD-1/PD-L1 Signaling 17

図一覧

Figure 1: Binding of Retifanlimab to PD-1-Expressing NS0 Cell Line (NS0/PDCD1)....10
Figure 2: Binding of Retifanlimab to Unstimulated or SEB-stimulated Human PBMCs....11
Figure 3: Binding of Retifanlimab to $CD4^+$ and $CD8^+$ T Cells Isolated from Unstimulated or SEB-stimulated Human PBMCs....12
Figure 4: Binding of Retifanlimab to Unstimulated or SEB-Stimulated Cynomolgus or Rhesus Monkey PBMCs....14
Figure 5: Retifanlimab-mediated Inhibition of Soluble PD-L1 or PD-L2 Binding to a PD-1-positive Cell Line (NS0/PDCD1)....15
Figure 6: Retifanlimab-mediated Reversal of PD-1/PD-L1 Inhibitory Signaling as Measured by Luciferase Gene Expression in a Co-culture Reporter Assay System....17
Figure 7: PD-1 Expression on Hematopoietic Lineage Cells Present in Human PBMCs....18
Figure 8: Evaluation of Retifanlimab to Enhance IFN-γ Signaling Following SEB Stimulation of Human PBMCs....19
Figure 9: No Hemolysis with Retifanlimab in Purified RBCs or Whole Blood....20
Figure 10: No ADCC Activity Mediated by Retifanlimab in NS0/PDCD1 (PD-1-Expressing Cells) or Activated Primary Human T cells Target Cells....21
Figure 11: No CDC Activity Mediated by Retifanlimab in Activated Primary Human T cells Target Cells....22
Figure 12: Evaluation of Intrinsic Mitogenicity of Retifanlimab....23
Figure 13: Mean Cytokine Induction in Normal Human PBMCs by Soluble or Immobilized Retifanlimab....24

略号一覧

略号	定義	
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
AEX1188	retifanlimab	レチファンリマブ（遺伝子組換え）
AEX1197	nivolumab replica	ニボルマブのレプリカ抗体
AEX1198	pembrolizumab replica	ペムブロリズマブのレプリカ抗体
APC	antigen presenting cells	抗原提示細胞
BCR	B-cell receptor	B 細胞受容体
CD	cluster of differentiation	表面抗原分類
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CNS	central nervous system	中枢神経系
DC	dendritic cells	樹状細胞
E:T	effector to target (cell ratio)	エフェクター細胞とターゲット細胞の比（細胞比）
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）
EOI	end of infusion	投与終了時
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
FITC	fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
Fv	fragment variable	可変部位
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
hMG13.78(1.3)	retifanlimab	レチファンリマブ（遺伝子組換え）
IC_{50}	mean half-maximal inhibitory concentration	平均 50%阻害濃度
ICH	International Council 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
IL	interleukin	インターロイキン
INCMGA00012	retifanlimab	レチファンリマブ（遺伝子組換え）
IV	intravenous(ly)	静脈内

略号	定義	
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
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
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
MGA012	retifanlimab	レチファンリマブ（遺伝子組換え）
MK-3475	authentic pembrolizumab	純正のペムブロリズマブ
NA	not applicable	該当せず
NK	natural killer (cells)	ナチュラルキラー（細胞）
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
PD-1	programmed cell death protein 1	プログラム細胞死タンパク 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
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
RBC	red blood cell	赤血球
RLU	relative light units	相対発光量
SD	standard deviation	標準偏差
SEB	staphylococcal enterotoxin B	ブドウ球菌エンテロトキシン B
SEM	standard error of the mean	平均値の標準誤差
sPD-L1/L2	soluble PD-L1/L2	可溶性 PD-L1/L2
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
TCR	T-cell receptor	T 細胞受容体
TIL	tumor infiltrating lymphocytes	腫瘍浸潤リンパ球
TNF-α	tumor necrosis factor alpha	腫瘍壊死因子 α

1. まとめ

1.1. 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する。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、Table 3】。

当初アポトーシス細胞に確認された PD-1（CD279 としても知られる）は、T 細胞（CD4 陽性及び CD8 陽性）、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細胞表面受容体である（Ishida et al 1992）。PD-1 は、プログラム細胞死リガンド 1（PD-L1）及びプログラム細胞死リガンド 2（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数々の末梢組織上に発現しており、PD-L1 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）に限られており（Latchman et al 2001、Okazaki and Honjo 2006）、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 細胞又は B 細胞上の PD-1 がそのリガンド（PD-L1 又は PD-L2）に結合すると、T 細胞受容体（TCR）又は B 細胞受容体（BCR）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-XL の活性化等、TCR 及び BCR の正の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（又は B 細胞）の活性化及び増殖が抑制される（Latchman et al 2001）。

T 細胞では、PD-1 とそのリガンドとの相互作用により、抑制的に作用するシグナル伝達経路が形成されることが分かっている（Latchman et al 2001、Chen and Mellman 2013、Freeman et al 2000、Parry et al 2005）。慢性的なウイルス感染後の T 細胞上又は腫瘍浸潤リンパ球（TIL）上に PD-1 が発現すると、結果として、免疫系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。一方 PD-1 シグナル伝達経路の阻害は、T 細胞の増殖を亢進し、免疫応答を回復させることが示されている（Parry et al 2005、Barber et al 2006、Blackburn et al 2009、Fourcade et al 2010、Gros et al 2014、Norde et al 2011、Pardoll 2012、Sharma and Allison 2015）。

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「免疫チェックポイント」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。大規模な研究により、癌細胞は、腫瘍抗原に特異的な T 細胞に対する免疫回避／抵抗性の主な機序として、PD-1－PD-L1/L2 経路を含む特定の免疫チェックポイント経路を利用することが示されている。PD-1 受容体とリガンドの相互作用を阻害する抗体を含むこの経路を阻害するものは、マウスを用いたモデルにおいて腫瘍増殖の効果的な阻害剤となることが示されている（Wong et al 2007、Pentcheva-Hoang et al 2009、Hodi et al 2010、Chen and Mellman 2013、Yao et al 2013、

Powles et al 2014、Rizvi et al 2015、Topalian et al 2015）。更に臨床評価により、これらの分子は癌免疫療法と総称され、新たな抗悪性腫瘍剤の分類として確立された。抗 PD-1 mAb 及び抗 PD-L1 mAb 等、この経路を標的とする幾つかの分子は、幾つかの癌を適応として製造販売承認を取得した（Sun et al 2020）。レチファンリマブは、PD-1 を発現する細胞を標的として、チェックポイントにおいて PD-1 とその 2 つのリガンドである PD-L1 及び PD-L2 との抑制的な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／復元するように設計されている。レチファンリマブの非臨床薬理プログラムは、レチファンリマブの結合能及び生物学的活性を明らかにするためにデザインされており、以下に要約する。

1.2. 非臨床薬理試験

レチファンリマブの非臨床薬理試験の簡潔な概要を Table 1 に示す。

Table 1: Retifanlimab Pharmacology Program Overview

試験の種類	**試験系**	**試験番号**
主要薬力学：*In vitro*		
ヒト及びカニクイザルの PD-1 に対するレチファンリマブの結合能の解析	表面プラズモン共鳴	【IN VITRO-20.05 試験】
In vitro におけるレチファンリマブの生物学的活性の評価：PD-1 発現細胞に対する結合、PD-1 の結合の阻害、PD-1－PD-L1 シグナル伝達の阻害、SEB 再刺激後の IFN-γ の分泌増加	ヒト、カニクイザル及びアカゲザルの PD-1 発現 PBMC、ヒト T 細胞	【IN VITRO-20.06 試験】
副次的薬力学		
レチファンリマブの血液適合性評価	ヒト RBC 又は全血	【IN VITRO-20.07 試験】
レチファンリマブの ADCC 及び CDC の評価	PD-1 を発現する標的細胞と共に、エフェクター細胞として精製した NK 細胞（ADCC）又は 10%ヒト血清補体（CDC）	【IN VITRO-20.08 試験】
In vitro における内因性マイトジェン活性の評価	ヒト PBMC	【IN VITRO-20.06 試験】
In vitro におけるレチファンリマブを介したサイトカイン誘導の評価	ヒト PBMC	【IN VITRO-20.09 試験】
In vivo におけるサイトカイン放出の評価	カニクイザル	【T15-06-12 試験】 【T15-08-05 試験】 【T18-02-10 試験】
安全性薬理試験		
安全性薬理試験は特に行われていない。4 週間の GLP 毒性試験【T19-01-03 試験】の評価項目に安全性薬理試験の選定した評価項目が含まれている（4 項を参照）。		

略語：ADCC = 抗体依存性細胞傷害、CDC = 補体依存性細胞傷害、IFN-γ = インターフェロン γ、NA = 該当せず、NK = ナチュラルキラー（細胞）、PBMCs = 末梢血単核球、PD-1 = プログラム細胞死タンパク 1、RBC = 赤血球、SEB = ブドウ球菌エンテロトキシン B

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を 2.1 項に示す。レチファンリマブは、ヒトの PD-1 に平衡解離定数（K_D）0.6 ± 0.06 nM で結合し、カニクイザルの PD-1 に K_D 3.6 ± 0.46 nM で結合する（2.1.1 項）。ヒトの PD-1 に対する結合親和性が約 6 倍であるのは、結合速度定数（k_a）が高く解離速度定数（k_d）が低いためである。

レチファンリマブの機能的生物学的活性は、PD-1 に結合してその阻害性リガンドの PD-L1 及び PD-L2 との相互作用を阻害することにより、PD-1 を発現するヒト T 細胞のエフェクター機能を維持／復元させるレチファンリマブの効力を評価した一連の *in vitro* 試験で示されている（2.1.1.1 項）。レチファンリマブが異所的に発現した PD-1 タンパクに結合することを確認するため、PD-1 をコードするヒト PDCD1 遺伝子を NS0 細胞に発現させ（NS0/PDCD1 細胞）、フローサイトメトリーにより細胞表面の結合状態を判定した。レチファンリマブの 50%効果濃度（EC_{50}）の平均は 0.14 µg/mL であった。

ブドウ球菌エンテロトキシン B（SEB）の存在下で 48 時間刺激したヒト T 細胞を用いて、T 細胞上に発現した天然 PD-1 に対するレチファンリマブの結合能を評価した（2.1.1.1.1.2 項）。レチファンリマブは、カニクイザル及びアカゲザルの末梢血単核球（PBMC）に発現した PD-1 と交差反応性を示す。ヒト PBMC の SEB 刺激時には、PD-1 発現の 2～2.5 倍の増加が認められた（レチファンリマブの結合に基づき測定）。カニクイザル及びアカゲザルの PBMC の SEB 刺激時にも、ほぼ同じ結果が観察された（2.1.1.1.1.3 項）。

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レチファンリマブの評価を行った（2.1.1.1.2 項及び 2.1.1.1.3 項）。可溶性 PD-L1（sPD-L1）及び可溶性 PD-L2（sPD-L2）の阻害について、レチファンリマブの平均 50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 0.010 µg/mL 及び 0.021 µg/mL であった。以上のデータから、レチファンリマブが sPD-L1 及び sPD-L2 の PD-1 発現（NS0/PDCD1）細胞への結合を阻害できることが示された。また、PD-1/PD-L1 抑制経路に対するレチファンリマブの直接阻害能を、免疫療法の開発のために PD-1/PD-L1 治療用抗体を評価するようデザインされた共培養レポーターアッセイを用いて評価した。レチファンリマブは用量依存的に PD-1/PD-L1 の抑制経路を阻害し、ルシフェラーゼの発現を増強させた。ルシフェラーゼの発現の増強について、レチファンリマブの平均 EC_{50} は 0.090 µg/mL であった。

ヒト PBMC を SEB で刺激した後の、インターフェロン γ（IFN-γ）等のサイトカイン分泌の増強能についてレチファンリマブの機能を評価した（2.1.1.1.4 項）。レチファンリマブは、ほとんどの濃度で、PBMC を用いて検討した他の抗 PD-1 抗体と比較して IFN-γ の分泌を増強又は同等となることが示された。

副次的薬力学試験を 3 項に要約する。レチファンリマブの血液適合性を評価するため、健康な提供者から得られた精製赤血球（RBC）又は全血を、レチファンリマブと共に培養し、溶血の有無を検討した。レチファンリマブを用いた場合、検討したいずれの濃度でも（最高 100 µg/mL）、溶血は観察されなかった。

抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）の活性に対するレチファンリマブの媒介能を *in vitro* で評価した（3.2 項）。NS0/PDCD1 細胞又は活性化ヒト初代 T 細胞（PD-1 発現）を標的細胞とし、精製したヒト NK 細胞をエフェクター細胞として使用して、ADCC 活性を評価した。最高 10 µg/mL の濃度では、NS0/PDCD1 細胞又は活性化ヒト初代 T 細胞に対するレチファンリマブを介した ADCC 活性は認められなかった。CDC 活性に対するレチファンリマブの媒介能を、補体の供給源として 10%ヒト血清を使用し、活性化ヒト初代 T 細胞を用いて評価した。評価を行った全てのレチファンリマブ濃度（最高 10 µg/mL）で、レチファンリマブを介した CDC 活性は検出されなかった。

In vitro では、PBMC 中のレチファンリマブの内因性マイトジェン活性を測定した。2 日間の培養後に、レチファンリマブは PBMC の増殖を誘導しないことが確認された（3.3 項を参照）。

ヒト PBMC 単独にレチファンリマブ処理を行った後のサイトカイン産生を評価するため、ドライコート法、ウェットコート法及び可溶法による処理を用いて、一連の *in vitro* 試験を行った（3.4 項）。10 µg/mL 及び 100 µg/mL の濃度｛陽性対照の抗 CD3 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、サイトカイン産生［IFN-

γ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 及び腫瘍壊死因子 α（TNF-α）］は認められなかった。また、非 GLP 試験（2 試験）の一環として、レチファンリマブを投与したカニクイザルのサイトカイン産生を評価した（3.5 項を参照）。これらの試験では、レチファンリマブを投与したサルにサイトカイン産生が全く或いはほとんど認められなかった。サイトカイン評価では IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及び TNF-α を評価した。レチファンリマブ 1 mg/kg 又は 100 mg/kg を 3 週間にわたり週 1 回投与したところ、通常 IL-6 で僅かな（100 pg/mL 未満）一過性の増加が、投与から 3 時間後及び 6 時間後に認められたが、投与から 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。しかし、溶媒対照の投与後にも同じ程度の IL-6 の増加が見られたため、この変化はレチファンリマブと関連するものとは考えられなかった（3.5 項を参照）。また、100 mg/kg を投与したサル 1 例では、初回投与から 3 時間後に IL-6 の有意な単発の増加（1946 pg/mL）が認められたが、6 時間後までに回復し（8 pg/mL に戻った）、関連する臨床的影響を伴うことはなかった。溶媒対照を投与した動物にも同程度の IL-6 の増加が見られた。

In vitro におけるサイトカイン産生の評価（レチファンリマブの安全性評価に関連）に加え、中枢神経系（CNS）、心血管系及び呼吸器系に対する影響を評価するために安全性薬理試験の多くの評価項目をカニクイザルを用いた 4 週間の GLP 毒性試験【T19-01-03 試験】に含めた。評価した安全性薬理項目には、神経学的検査、体温、血圧、心拍数、ECG、呼吸数の評価、臨床所見、肉眼所見及び組織学的所見が含まれた。これらの評価項目で、レチファンリマブに関連する有害な所見は認められなかった。

2.　効力を裏付ける試験

以下に記載する薬理試験を通して、複数の抗 PD-1 分子をレチファンリマブの陽性対照として使用した。これらの陽性対照には、ニボルマブ及びペムブロリズマブの公表されている配列情報に基づき[redacted]が作成した 2 つの抗体のレプリカ（それぞれ AEX1197 及び AEX1198）並びに純正のペムブロリズマブ（キイトルーダ®、Merck）を含めた。AEX1197、AEX1198 及びペムブロリズマブは、レチファンリマブと同様のヒンジ結合により安定化させたヒト IgG4κ Fc ドメインからなる。これらの分子の説明を以下の Table 2 に参考として示す。

Table 2:　Summary of Test and Positive Control Articles Used in Retifanlimab Pharmacology Studies

被験物質又は対照物質	機能	説明／用途
レチファンリマブ（AEX1188）	ヒト化可変部位（Fv）領域及びヒンジ結合により安定化させた[1]ヒト IgG4κ Fc ドメインを有する抗 PD-1 mAb	治療薬候補
ニボルマブのレプリカ（AEX1197）	ヒンジ結合により安定化させた[1]ヒト IgG4κ Fc ドメインを有する既承認の抗 PD-1 mAb の公表されている配列情報に基づき作成したニボルマブのレプリカ	レチファンリマブと同じ IgG4 Fc ドメインを含むレチファンリマブの陽性対照抗 PD-1 mAb
ペムブロリズマブのレプリカ（AEX1198）	ヒンジ結合により安定化させた[1]ヒト IgG4κ Fc ドメインを有する既承認の抗 PD-1 mAb の公表されている配列情報に基づき作成したペムブロリズマブのレプリカ	レチファンリマブと同じ IgG4 Fc ドメインを含むレチファンリマブの陽性対照抗 PD-1 mAb
ペムブロリズマブ（MK-3475）	純正のペムブロリズマブ（キイトルーダ、Merck）：ヒンジ結合により安定化させた[1]ヒト IgG4κ Fc ドメインを含む既承認の抗 PD-1 mAb	レチファンリマブと同じ IgG4 Fc ドメインを含むレチファンリマブの陽性対照抗 PD-1 mAb。*In vivo* 試験【T15-06-12 試験】で使用

1 ヒンジ安定化変異は S228P であり、IgG4 分子で生じる自然解離を防ぐ働きをする。

2.1. In Vitro 試験

表面プラズモン共鳴（SPR）によりヒト及びカニクイザルの可溶性抗原に対する結合を評価することにより、レチファンリマブの標的（PD-1）に対する結合能を確認した（2.1.1 項）。また、フローサイトメトリーにより、レチファンリマブの T 細胞上の PD-1 に対する結合能を評価した（2.1.1.1.1 項）。PD-L1 及び PD-L2 と PD-1 の相互作用がレチファンリマブを介して阻害され、SEB による PBMC の再刺激後に IFN-γ 分泌が増強されることを示すために複数の *in vitro* 試験を実施した（2.1.1.1.2 項～2.1.1.1.4 項）。

2.1.1. Retifanlimab の PD-1 に対する結合（SPR による評価）

SPR 技術（Biacore™）を用いて、ヒト及びカニクイザルの PD-1 に対するレチファンリマブの結合能を評価した【IN VITRO-20.05 試験】。SPR 解析では、様々な濃度（0、6.25、12.5、25、50 及び 100 nM）のヒト又はカニクイザルの PD-1 タンパクの、F(ab')2 ヤギ抗ヒト IgG Fc 特異的表面に捕捉されたレチファンリマブへの結合を測定した。平衡解離定数（K_D）は、Langmuir 1：1 結合への結合曲線の全体的な適合により決定した。Table 3 に要約する。ヒト及びカニクイザルの PD-1 に対するレチファンリマブの K_D は、それぞれ 0.6 及び 3.6 nM であった。k_a が高く k_d が低いため、レチファンリマブのヒトの PD-1 に対する結合親和性がカニクイザルの PD-1 に対する結合親和性の約 6 倍であった。

Table 3: Equilibrium Dissociation Constants (K_D) for Binding of Human or Cynomolgus Monkey PD-1 Protein to Captured Retifanlimab

抗原	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)[a]	k_d (s^{-1})[a]	K_D (nM)[a]
ヒトの PD-1	4.3 (± 0.06) × 10^5	2.4 (± 0.30) × 10^{-4}	0.6 (± 0.06)
カニクイザルの PD-1	1.8 (± 0.1) × 10^5	6.4 (± 0.46) × 10^{-4}	3.6 (± 0.46)

[a] データは、独立して 3 回行われた実験（duplicate）結果の平均値（±標準偏差）である。
略語：k_a = 結合速度定数、k_d = 解離速度定数、K_D = 平衡解離定数

2.1.1.1. *In vitro* におけるレチファンリマブの生物学的活性の評価

レチファンリマブは、PD-1 を発現する T 細胞を標的として、PD-1 に結合し、抑制的に働くリガンドである PD-L1 及び PD-L2 との結合を阻害することにより、そのエフェクター機能を維持／復元するように設計されている。レチファンリマブはカニクイザル及びアカゲザルの抗原と交差反応性を示すが、マウス、ラット又はイヌの PD-1 タンパクとは交差反応性を示さない（社内資料）。*In vitro* 試験【IN VITRO-20.06 試験】の目的は以下のとおりであった。

1. （A）改変ヒト PD-1 発現細胞株、（B）免疫細胞活性化後に PD-1 を自然発現したヒト、カニクイザル及びアカゲザルの PBMC 並びに（C）T 細胞（CD3 陽性／CD4 陽性又は CD3 陽性／CD8 陽性）、B 細胞（CD19 陽性）、単球（CD14 陽性）及び NK 細胞（CD56 陽性）を含むヒト免疫細胞サブセットに対するレチファンリマブの細胞表面結合を評価する（2.1.1.1.1 項）。
2. PD-1 発現標的細胞への可溶性 PD-L1 及び PD-L2 の結合に対するレチファンリマブの阻害能を評価する（2.1.1.1.2 項）。
3. レポーター細胞アッセイ系での PD-1/PD-L1 経路に対するレチファンリマブの機能的阻害能を評価する（2.1.1.1.3 項）。
4. SEB で再刺激したヒト PBMC において IFN-γ 分泌を増強させるレチファンリマブの機能活性を評価する（2.1.1.1.4 項）。

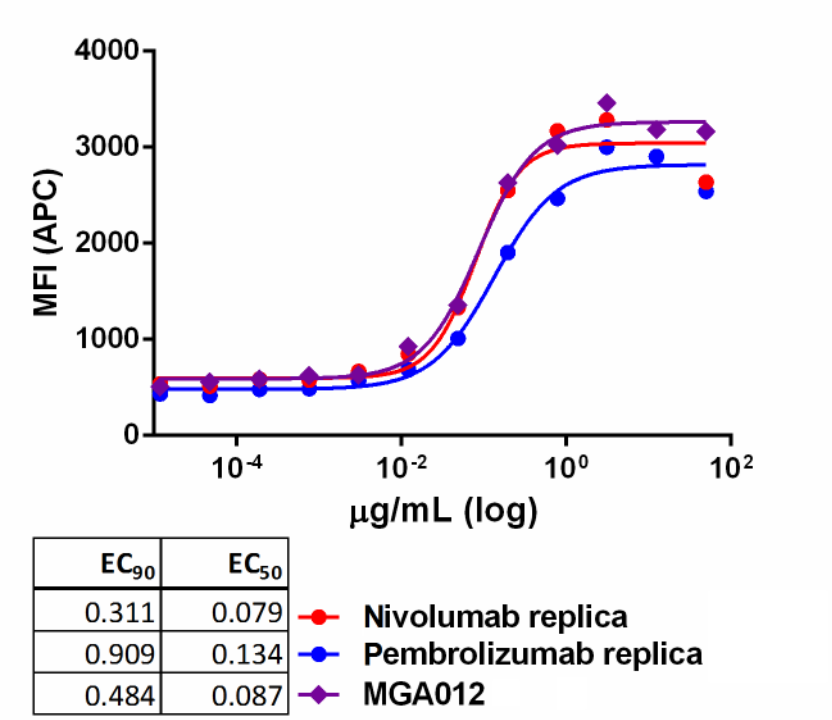
2.1.1.1.1. PD-1 発現細胞に対するレチファンリマブの結合能の評価

2.1.1.1.1.1. PD-1 陽性細胞株に対するレチファンリマブの結合

レチファンリマブの異所的に発現した PD-1 に対する結合能を評価するため、ヒト PDCD1 遺伝子が発現するように NS0 細胞を作製し（NS0/PDCD1 細胞）、フローサイトメトリーにより細胞表面の結合状態を判定した。

Figure 1 に記載の代表的な実験により、抗 PD-1 mAb が NS0/PDCD1 細胞に用量依存的に結合することが示された。具体的には、NS0/PDCD1 細胞に対するレチファンリマブの結合能は、既承認の抗 PD-1 mAb であるニボルマブ及びペムブロリズマブのレプリカの結合能と同等である。レチファンリマブの 4 回の実験の平均 EC_{50} は 0.14 µg/mL であり、ニボルマブ及びペムブロリズマブのレプリカで得られた EC_{50} 値（それぞれ 0.16 µg/mL 及び 0.14 µg/mL）と同等であった（Table 4）。

Figure 1: Binding of Retifanlimab to PD-1-Expressing NS0 Cell Line (NS0/PDCD1)



PD-1 を発現する NS0 細胞株（NS0/PDCD1）に対する抗 PD-1 mAb の結合状態を示す用量-飽和曲線。ニボルマブのレプリカ（赤線）、ペムブロリズマブのレプリカ（青線）又はレチファンリマブ（紫線）を含む未標識の抗 PD-1 mAb で、50 µg/mL の濃度から 1：4 の連続希釈系列を調製し、NS0/PDCD1 細胞と共に培養した。培養後に、二次抗体としてヤギ抗ヒト Fc APC コンジュゲートを用いて結合状態を検出した。示したデータは、抗 PD-1 mAb 濃度に由来する APC の平均蛍光強度（MFI）を、片対数目盛り上にプロットしたものである。別々に実施した 4 試験のうちの 1 試験から得られた代表的データ。

Table 4:　　EC_{50} and EC_{90} Values of Anti-PD-1 mAb Binding to NS0/PDCD1 Cells

	EC_{50}値（μg/mL）			EC_{90}値（μg/mL）		
	ニボルマブのレプリカ	ペムブロリズマブのレプリカ	レチファンリマブ	ニボルマブのレプリカ	ペムブロリズマブのレプリカ	レチファンリマブ
平均	0.158	0.140	0.138	1.546	1.162	0.661
SD	0.116	0.095	0.093	1.769	1.268	0.344
SEM	0.058	0.048	0.046	0.884	0.634	0.172

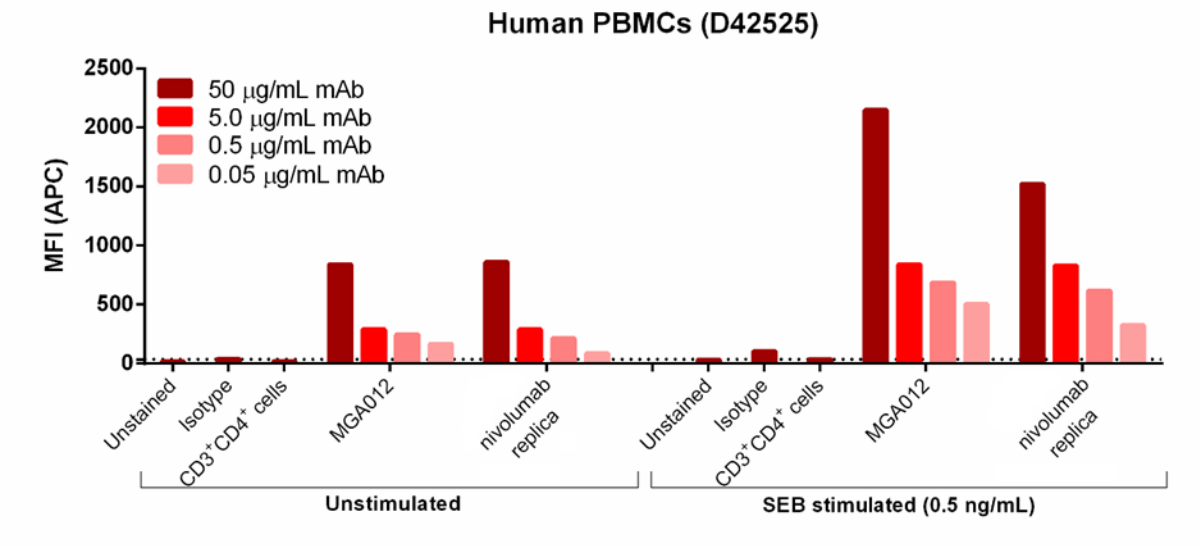
略語：EC_{50} = 50%効果濃度、EC_{90} = 90%効果濃度、SD = 標準偏差、SEM = 平均値の標準誤差

2.1.1.1.1.2. ヒト PBMC の SEB 刺激後のヒト T 細胞に対するレチファンリマブの結合

ナイーブ T 細胞の表面上には PD-1 が比較的低レベルで発現するが、慢性的なウイルス感染後、腫瘍浸潤免疫細胞中又は SEB による刺激後では、発現の増強が認められている（Okazaki and Honjo 2006、Selenko-Gebauer et al 2003、Chen and Mellman 2013）。0.5 ng/mL の SEB の存在下で 48 時間刺激したヒト T 細胞又は未刺激の T 細胞を用いたフローサイトメトリーにより、T 細胞上に自然発現した PD-1 に対するレチファンリマブの結合能を評価した。

レチファンリマブ又はニボルマブのレプリカにより、基準レベルで PD-1 を発現する未刺激の PBMC も同様に、濃度依存的（0.05～50.0 μg/mL）な結合が検出された（Figure 2）。SEB 刺激時には、PBMC で PD-1 発現の 2～2.5 倍の増加が認められた。PD-1 発現の増加は、PD-1 mAb によっても濃度依存的に検出された。陰性対照として、未染色のヒト PBMC、染色 PBMC のアイソタイプ対照及び抗 PD-1 mAb を添加せず CD3 陽性 CD4 陽性によるゲーティングのみを行った細胞を用いた。この、PD-1 に対する用量依存的な結合能は、未刺激及び SEB 刺激後の PBMC 集団中に存在する CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞において共に明らかであった（Figure 3）。

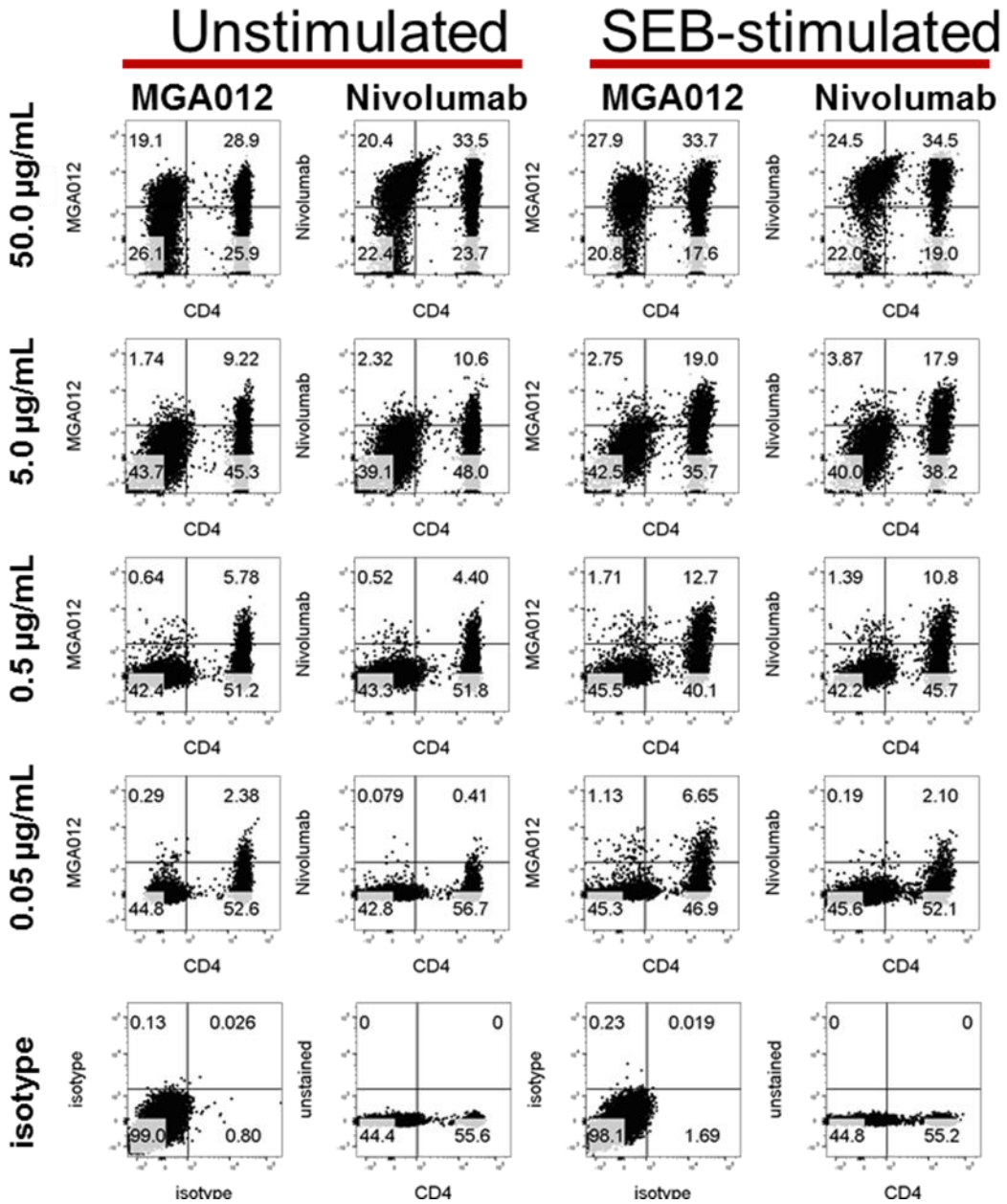
Figure 2:　　Binding of Retifanlimab to Unstimulated or SEB-stimulated Human PBMCs



未刺激又は SEB 刺激後のヒト PBMC に対する抗 PD-1 mAb（レチファンリマブ又はニボルマブのレプリカ）の 10 倍連続希釈系列。50.0～0.05 μg/mL の未標識の抗 PD-1 mAb の結合が検出された。二次抗体はヤギ抗ヒト Fc APC コンジュゲートを用いた。示したデータは、抗 PD-1 mAb 濃度による MFI（APC）を、グループ毎に棒グラフとしてプロットしたものである。陰性対照として、未染色のヒト PBMC、染色 PBMC のアイソタイプ対照及び抗 PD-1 mAb を添加せず CD3 陽性 CD4 陽性によるゲーティングのみを行った細胞を用いた。

Figure 3: Binding of Retifanlimab to CD4⁺ and CD8⁺ T Cells Isolated from Unstimulated or SEB-stimulated Human PBMCs

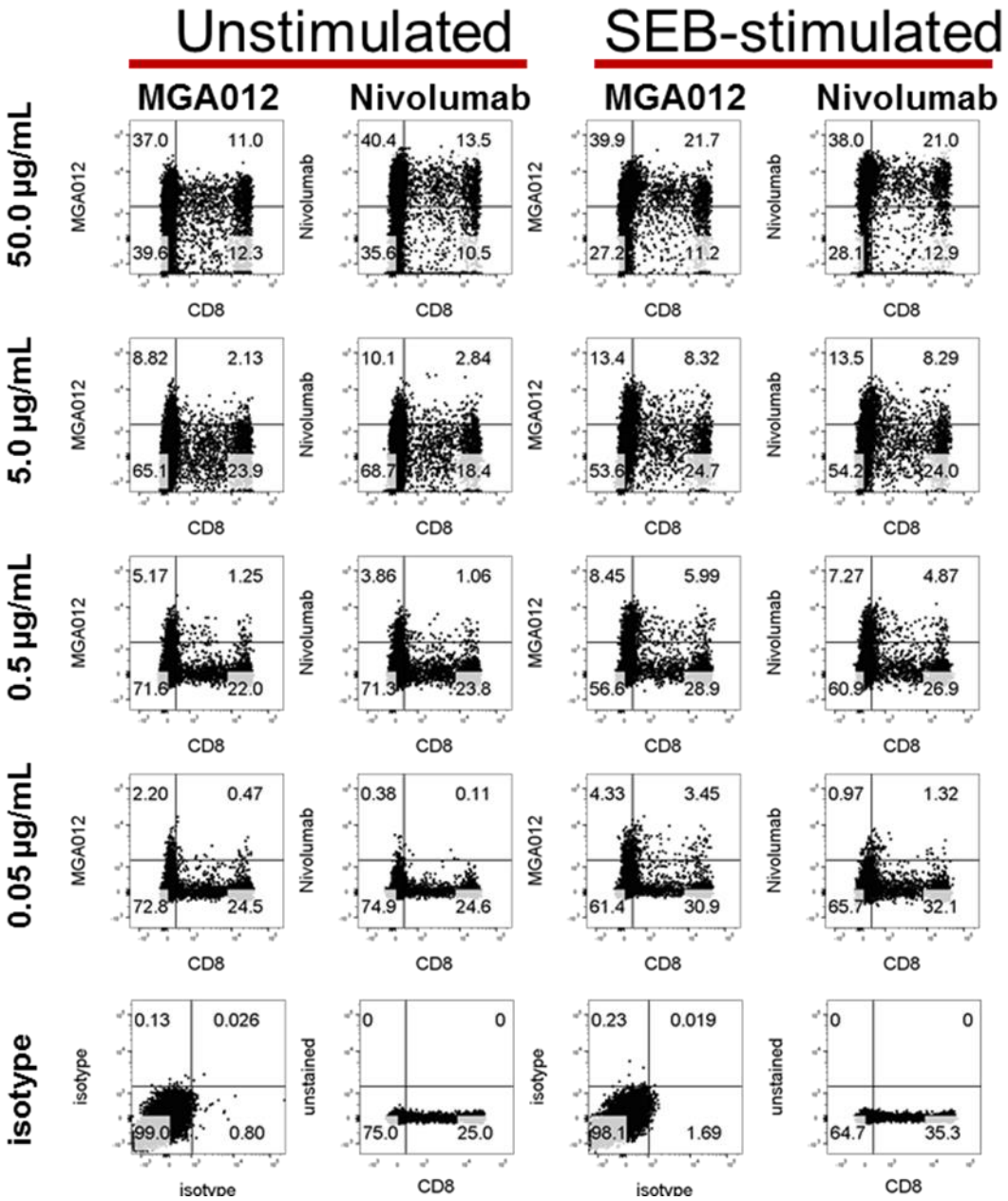
CD4 陽性細胞



未刺激（左側のグループ）又は SEB 刺激後（右側のグループ）のヒト PBMC の CD4 陽性 T 細胞に対するレチファンリマブ又はニボルマブのレプリカの結合。データは、CD4 陽性 T 細胞に対する 10 倍連続希釈（縦）したレチファンリマブ又はニボルマブ（50.0～0.05 µg/mL）の結合能を示す蛍光活性化細胞選別（FACS）プロットとして提示及び整理した。抗 PD-1 mAb の CD4 細胞に対する結合は、ヤギ抗ヒト Fc-APC コンジュゲート（二次抗体）及び PE 標識した抗ヒト CD4 mAb を用いて検出した。

Figure 3: Binding of Retifanlimab to CD4⁺ and CD8⁺ T Cells Isolated from Unstimulated or SEB-stimulated Human PBMCs (Continued)

CD8 陽性細胞



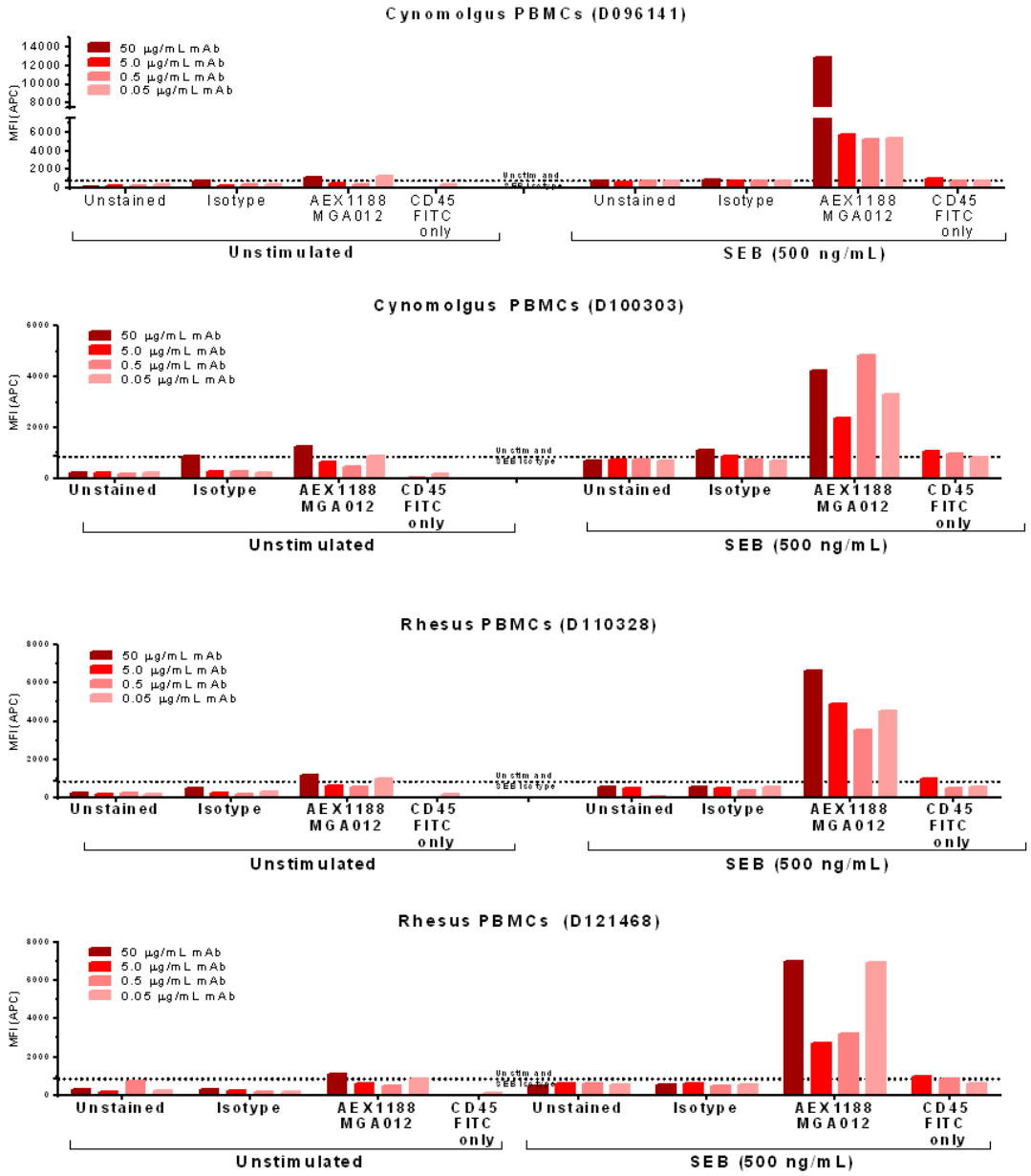
未刺激（左）又は SEB 刺激後（右）のヒト PBMC の CD8 陽性 T 細胞に対するレチファンリマブ又はニボルマブのレプリカの結合。データは、CD8 陽性 T 細胞に対する 10 倍連続希釈（縦）したレチファンリマブ又はニボルマブ（50.0～0.05 µg/mL）の結合能を示す FACS プロットとして提示及び整理した。抗 PD-1 mAb の CD8 細胞に対する結合は、ヤギ抗ヒト Fc-APC コンジュゲート（二次抗体）及び FITC 標識した抗ヒト CD8 mAb を用いて検出した。

2.1.1.1.1.3. SEB 刺激後のカニクイザル又はアカゲザルの PBMC に対するレチファンリマブの結合

レチファンリマブのヒト以外の霊長類との交差反応性について、フローサイトメトリーにより評価を行った。Figure 4 に示すように、レチファンリマブは SEB 刺激後のカニクイザル及びアカ

ゲザルの PBMC の両方に結合した。対照的に、レチファンリマブで処理しなかったアイソタイプ、未染色又はヒト以外の霊長類の CD45 染色細胞では、PD-1 に特異的な結合はほとんど認められず、未刺激のカニクイザル又はアカゲザルの PBMC に認められたレチファンリマブの結合能と同等であった。

Figure 4: Binding of Retifanlimab to Unstimulated or SEB-Stimulated Cynomolgus or Rhesus Monkey PBMCs

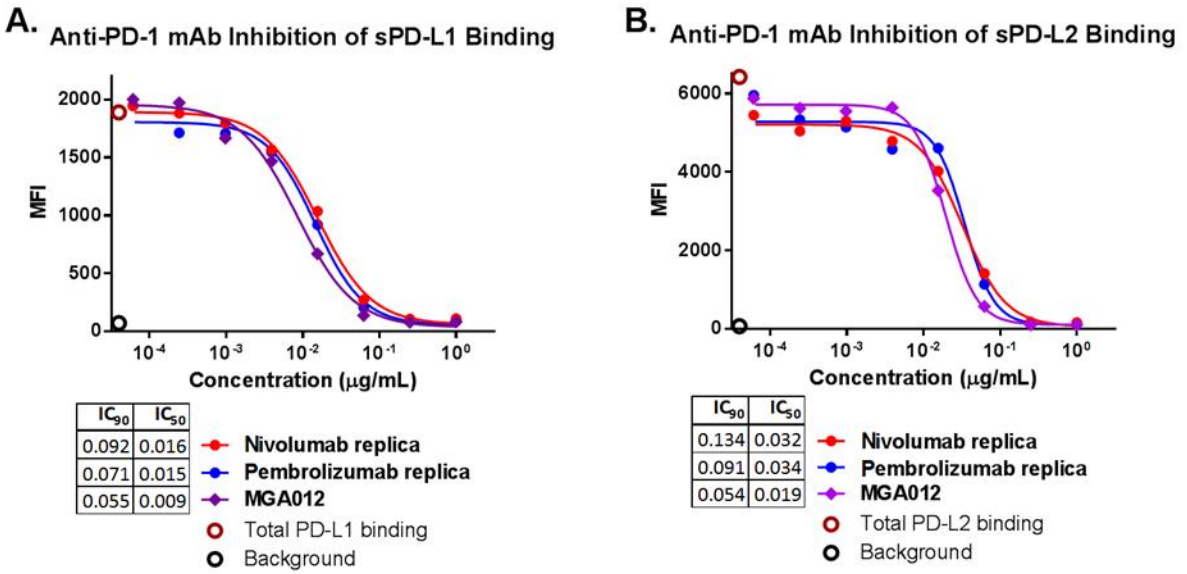


未刺激又は SEB 刺激後のヒト以外の霊長類の PBMC に対するレチファンリマブの結合。カニクイザルのドナー2 頭（上 2 つのグラフ）及びアカゲザルのドナー2 頭（下 2 つのグラフ）を未刺激のまま（各グラフの左側のグループ）又は 500 ng/mL の SEB（各グラフの右側のグループ）で 48 時間刺激した。その後、10 倍連続希釈（50 µg/mL から 0.05 µg/mL まで）したレチファンリマブを適切な培養物に添加し、ヒト以外の霊長類の FITC 結合型 CD45 mAb 及びヤギ抗ヒト Fc-APC 結合型二次試薬を用いて、ヒト以外の霊長類の CD45 陽性系統細胞に対する結合を検出した。

2.1.1.1.2. レチファンリマブによる可溶性 PD-L1 又は PD-L2 と PD-1 陽性細胞株との結合阻害

PD-1 とその対応する 2 つのリガンドの PD-L1 及び PD-L2 との相互作用に対するレチファンリマブの阻害能の評価を行った。具体的には、一連の連続希釈した抗 PD-1 mAb を可溶性ヒト PD-L1 又は PD-L2 の存在下で NS0/PDCD1 細胞と共に培養し、ヤギ抗ヒト Fc-APC コンジュゲートを二次抗体として用いて抗 PD-1 mAb の結合を検出した。Figure 5 に示すように、レチファンリマブは可溶性の PD-L1 及び PD-L2 の PD-1 発現細胞への結合を用量依存的に阻害した。これはニボルマブのレプリカ及びペムブロリズマブのレプリカで認められた阻害と同等であった。sPD-L1 の阻害に関して、3 つの実験にわたる抗 PD-1 mAb の平均 IC_{50} は、0.010 µg/mL（レチファンリマブ）、0.016 µg/mL（ニボルマブのレプリカ）及び 0.014 µg/mL（ペムブロリズマブのレプリカ）であった（Table 5）。sPD-L2 の阻害に関して、3 つの実験にわたる抗 PD-1 mAb の平均 IC_{50} は、0.021 µg/mL（レチファンリマブ）、0.028 µg/mL（ニボルマブのレプリカ）及び 0.028 µg/mL（ペムブロリズマブのレプリカ）であった。以上をまとめると、レチファンリマブは、レプリカと同程度の濃度で、PD-1 発現（NS0/PDCD1）細胞に対する sPD-L1 及び sPD-L2 の結合を阻害できる。

Figure 5: Retifanlimab-mediated Inhibition of Soluble PD-L1 or PD-L2 Binding to a PD-1-positive Cell Line (NS0/PDCD1)



PD-1 を発現する NS0 細胞（NS0/PDCD1）への sPD-L1（A）又は sPD-L2（B）の結合に対する、抗 PD-1 mAb による阻害効果を示した代表的な用量-阻害曲線。ニボルマブのレプリカ（赤線）、ペムブロリズマブのレプリカ（青線）又はレチファンリマブ（紫線）を含む未標識の抗 PD-1 mAb について、1:4 の連続希釈系列（開始濃度は 10 µg/mL）を調製し、0.1 µg の sPD-L1 又は sPD-L2 を含む NS0/PDCD1 細胞と共に培養した。リガンド結合の陽性対照及び陰性対照として、sPD-L1 又は sPD-L2 結合の総量（赤線の白丸）及び背景レベル（黒線の白丸）を示す。抗 PD-1 mAb の結合は、ヤギ抗ヒト Fc-APC コンジュゲートを二次抗体に用いて検出した。示したデータは、抗 PD-1 mAb 濃度に由来する APC の MFI をプロットしたものである。別々に実施した 3 試験のうちの 1 試験から得られた代表的データ。

Table 5: IC_{50} and IC_{90} Values of anti-PD-1 mAb-mediated Inhibition of sPD-L1 and sPD-L2 Binding to NS0/PDCD1 Cells

	IC_{50}値（μg/mL）			IC_{90}値（μg/mL）		
	ニボルマブのレプリカ	ペムブロリズマブのレプリカ	レチファンリマブ	ニボルマブのレプリカ	ペムブロリズマブのレプリカ	レチファンリマブ
sPD-L1	0.016 ± 0.005	0.014 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.078 ± 0.012	0.080 ± 0.014	0.052 ± 0.002
sPD-L2	0.028 ± 0.004	0.028 ± 0.003	0.021 ± 0.001	0.159 ± 0.067	0.092 ± 0.004	0.062 ± 0.004

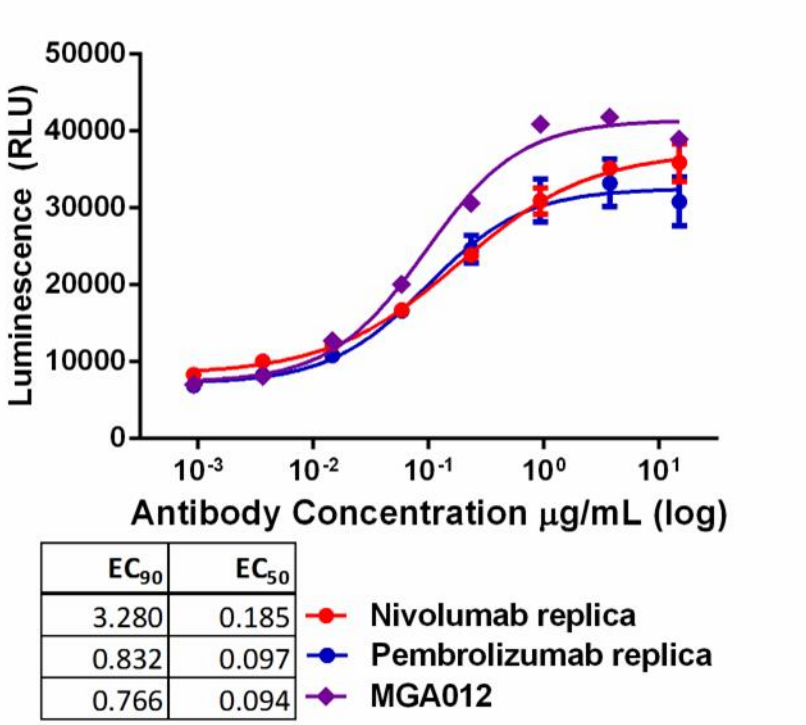
データは平均値 ± 平均値の標準誤差で示した。参考報告書：IN VITRO-20.06 試験

2.1.1.1.3. レポーターアッセイ系におけるレチファンリマブによる PD-1/PD-L1 シグナル伝達の阻害

PD-1/PD-L1 抑制経路に対するレチファンリマブの直接阻害能を、免疫療法の開発のために PD-1/PD-L1 治療用抗体を評価するようデザインされた共培養レポーターアッセイ（Promega, Corp）を用いて評価した（Chen and Flies 2013）。このアッセイ系では、TCR 刺激を介した活性化 T 細胞核内因子（NFAT）シグナル伝達の PD-1/PD-L1 介在性阻害の機能的介入を、以下の 2 種類の細胞株の共培養下で測定した：（1）TCR 活性化により誘発される NFAT プロモーターの制御下で PD-1 及びルシフェラーゼレポーター遺伝子を恒常的に発現するように設計された CD3 陽性の Jurkat レポーター細胞株、及び（2）PD-L1 及び TCR 活性化因子（抗 CD3）を安定して発現する CHO 刺激細胞株。共培養する際は、Jurkat と CHO/PD-L1 の細胞株間に存在する PD-1/PD-L1 の相互作用により、NFAT シグナル伝達は（TCR が関与したとしても）強く阻害された。抗 PD-1 mAb 又は抗 PD-L1 mAb の存在下では、この抑制経路が用量依存的に阻害され、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の転写を介して光学的に測定される NFAT シグナル伝達が増加した。

Figure 6 に示すように、レチファンリマブ、ニボルマブのレプリカ及びペムブロリズマブのレプリカは、PD-1/PD-L1 抑制経路を同等に阻害し、ルシフェラーゼ発現を用量依存的に増加させた。ルシフェラーゼ発現の増加に関して、3 つの実験にわたる抗 PD-1 mAb の平均 EC_{50} は、0.090 μg/mL（レチファンリマブ）、0.171 μg/mL（ニボルマブのレプリカ）及び 0.103 μg/mL（ペムブロリズマブのレプリカ）であった（Table 6）。

Figure 6: Retifanlimab-mediated Reversal of PD-1/PD-L1 Inhibitory Signaling as Measured by Luciferase Gene Expression in a Co-culture Reporter Assay System



共培養レポーターアッセイ系（Promega）における、抗 PD-1 mAb による PD-1/PD-L1 抑制経路の解除を介した、ルシフェラーゼ発現増強を評価した代表例。ニボルマブのレプリカ（赤線）、ペムブロリズマブのレプリカ（青線）、レチファンリマブ（紫線）を含む未標識抗 PD-1 mAb について、1:5 の連続希釈系列（開始濃度は 20 nM）を調製し、PD-1 及び CD3/TCR を発現する Jurkat レポーター細胞（NFAT-luc2/PD-1 Jurkat 細胞）及び PD-L1 と TCR 活性化分子を発現する CHO 刺激細胞（CHO-PD-L1 細胞）を共に培養した。抗 PD-1 mAb による PD-1/PD-L1 を介した抑制の解除は、TCR による NFAT シグナルの調節下にある発光強度の増強によって測定する。各ウェル（duplicate）の光学密度は、相対発光量（RLU）をリードアウトとして 450 nm で読み取る。データは濃度に対する平均 RLU をプロットしたもので、log（アゴニスト）vs. 反応-可変傾斜（4 パラメータ）関数を用いて適合した。別々に実施した 3 試験のうちの 1 試験から得られた代表的データ。

Table 6: EC_{50} and EC_{90} Values of Anti-PD-1 mAb Inhibition of PD-1/PD-L1 Signaling

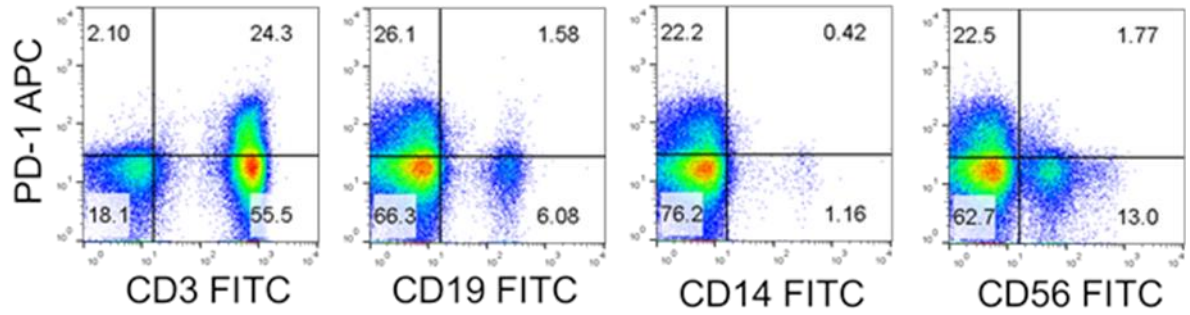
EC_{50} 値（µg/mL）			**EC_{90} 値（µg/mL）**		
ニボルマブのレプリカ	ペムブロリズマブのレプリカ	レチファンリマブ	ニボルマブのレプリカ	ペムブロリズマブのレプリカ	レチファンリマブ
0.171 ± 0.017	0.103 ± 0.016	0.090 ± 0.008	2.127 ± 0.610	0.825 ± 0.118	0.651 ± 0.120

データは平均値 ± 平均値の標準誤差で示した。
略語：EC_{50} = 50%効果濃度、EC_{90} = 90%効果濃度、SEM = 平均値の標準誤差

2.1.1.1.4. レチファンリマブによる SEB 刺激後のヒト PBMC の IFN-γ 分泌増強の評価

SEB でヒト PBMC を刺激した後の IFN-γ 等のサイトカイン分泌増強能についてレチファンリマブの機能を評価した。T 細胞上の PD-1 発現を誘導／増強するために 0.5 ng/mL の SEB で 48 時間ヒト PBMC を刺激し、これをフローサイトメトリーにより確認した。SEB 刺激後に PD-1 を発現する細胞の系統の過半は CD3 陽性 T 細胞であったが、CD19 陽性 B 細胞及び CD56 陽性 NK 細胞上でも PD-1 の発現が検出された（Figure 7）。

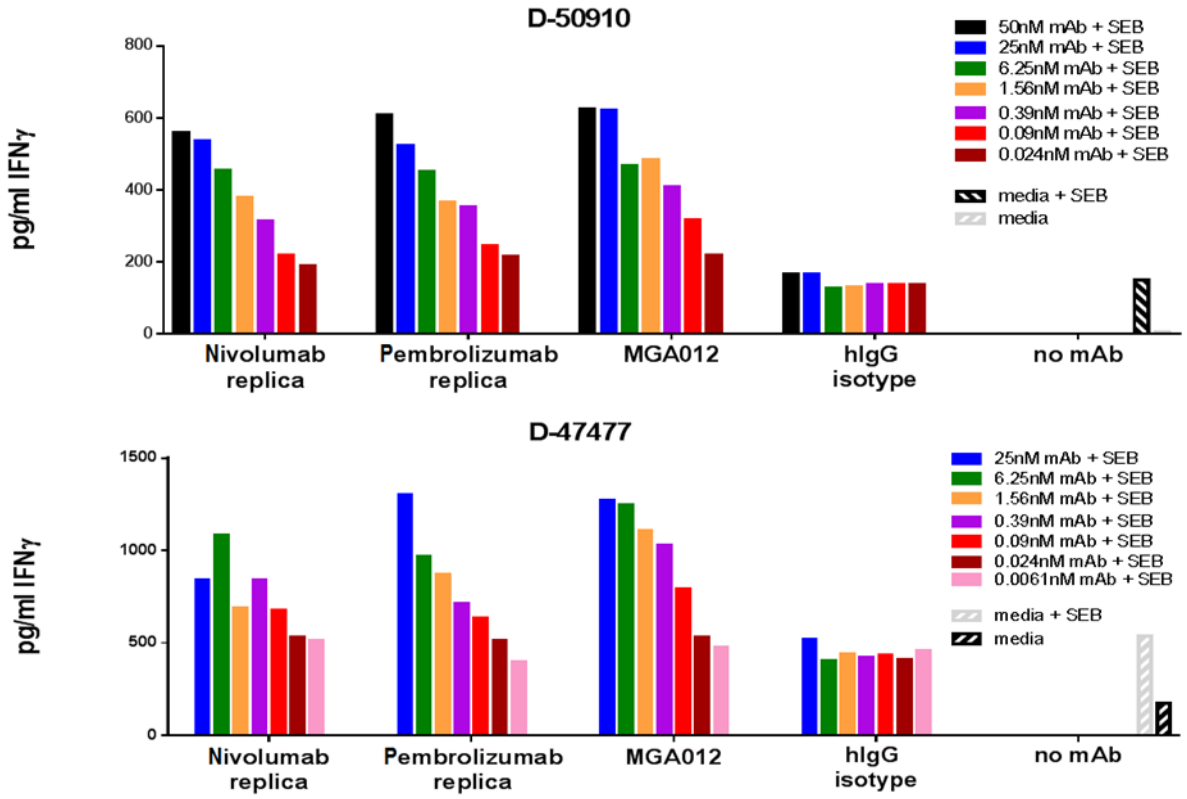
Figure 7: PD-1 Expression on Hematopoietic Lineage Cells Present in Human PBMCs



SEB 刺激後のヒト PBMC 由来の細胞集団上における PD-1 発現。CD3 陽性 T 細胞、CD19 陽性 B 細胞、CD14 陽性骨髄系細胞及び CD56 陽性 NK 細胞上の PD-1 発現レベルは、0.5 ng/mLSEB により 48 時間刺激した PBMC 中のフローサイトメトリーにより判定した。その代表例を示した。7-AAD 除外により判定した生細胞の割合（%）を、FACS プロットの四分割した各枠内に示した。

SEB 刺激後に PBMC を 2 回洗浄し、連続希釈した抗 PD-1 mAb の存在下で、0.5 ng/mL の SEB で再刺激した。2 日後に上清を回収し、分泌された IFN-γ 量を酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）により測定した。評価した 8 名の提供者の PBMC のいずれにおいても IFN-γ 発現の増強が認められた（Figure 8）。全ての提供者の PBMC において、抗 PD-1 mAb との培養後の IFN-γ 分泌はヒト IgG アイソタイプの対照と比較して増強した。各提供者から取得した PBMC を培地のみで培養又は 0.5 ng/mL の SEB と共に培養した。各提供者の PBMC で認められた最大反応はばらつきがあり、SEB と相互作用可能な Vβ ファミリーの可変部を含む TCR を発現する T 細胞の頻度に起因する可能性が高かった。このような T 細胞は提供者のレパートリーに存在する SEB 刺激に対してより大きな反応を起こすことが知られている（Krakauer 1999）。レチファンリマブを用いた場合、ほとんどの濃度で、ニボルマブのレプリカ及びペムブロリズマブのレプリカと比較して IFN-γ の分泌が増強する又は同等となることが示された（8 名中 7 名の提供者の PBMC）。

Figure 8: Evaluation of Retifanlimab to Enhance IFN-γ Signaling Following SEB Stimulation of Human PBMCs



SEB で刺激したヒト PBMC からの IFN-γ 分泌（患者 8 名の中から代表的な 2 名の例を示す）。ヒト PBMC を 0.5 ng/mL の SEB で 2 日間刺激し、2 回の洗浄後、各抗 PD-1 mAb（レチファンリマブ、ニボルマブのレプリカ、ペムブロリズマブのレプリカ）の存在下又は非存在下で再度 SEB により刺激した。ヒト PBMC を培地中で単独培養又は SEB による再刺激又は対照のヒト IgG アイソタイプを SEB と共に培養し、IFN-γ 分泌の基準レベルを確立した。IFN-γ 分泌は ELISA で判定した。各ウェルの光学密度は、RLU をリードアウトとして 450 nm で読み取り、標準曲線を用いた線形回帰により濃度（pg/mL）に変換した。

3. 副次的薬理試験

ヒトにおける IV 投与が適切であることを裏付けるため、精製ヒト RBC 又は全血を用いてレチファンリマブの血液適合性を検討した（3.1 項）。ADCC 及び CDC の活性に対するレチファンリマブの媒介能を *in vitro* で評価した（3.2 項）。*In vitro* で PBMC 中のレチファンリマブの内因性マイトジェン活性を評価した（3.3 項）。最後に、ヒト PBMC 単独にレチファンリマブ処理を行った後のサイトカイン産生を評価するため、可溶法並びにウェット及びドライコート法を用いて一連の *in vitro* 試験を実施し（3.4 項）、カニクイザルにレチファンリマブを投与した後のサイトカイン放出を *in vivo* で評価した（3.5 項）。

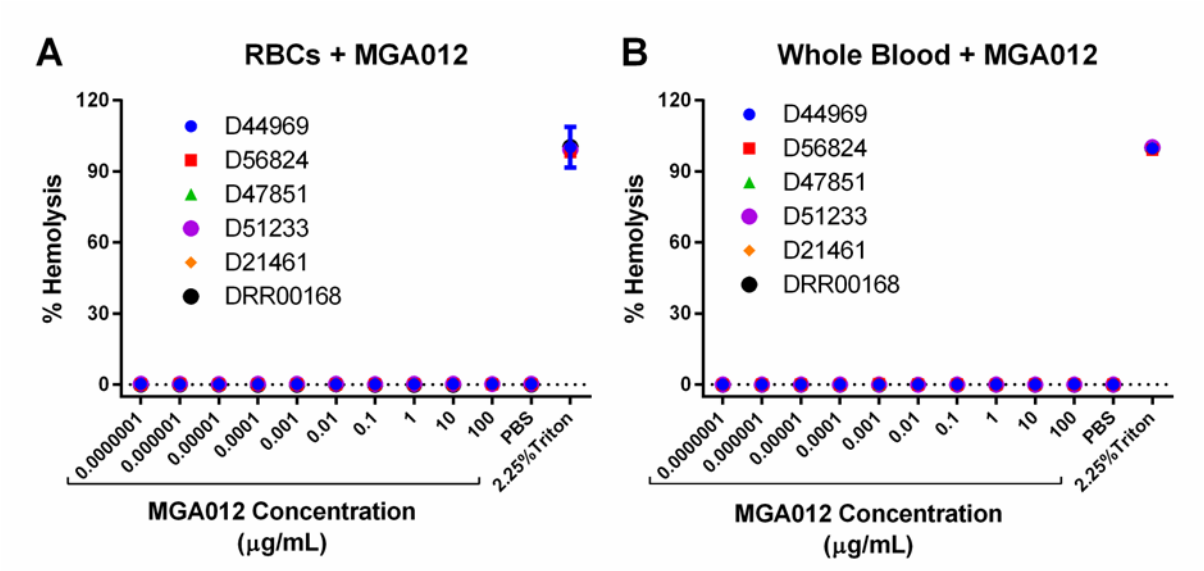
正常ヒト組織におけるレチファンリマブの交差反応性を評価するため組織交差反応性試験を実施した【T16-02-22 試験】、【モジュール 2.6.6、8.1 項】を参照）。

3.1. レチファンリマブの血液適合性評価

レチファンリマブの血液適合性を評価するため、健康な提供者 6 名から個別に得られた精製ヒト RBC 又は全血を、レチファンリマブ（濃度は最高 100 µg/mL）と共に培養し、溶血の有無を検討した【IN VITRO-20.07 試験】。全血は血液中に存在する他の種類の細胞から受ける影響の可能性を考慮しているが、精製 RBC を用いることで測定のリードアウトがヒト血漿から干渉を受ける可能性を回避できる。

レチファンリマブを用いた場合、検討したいずれの濃度でも、評価を行ったいずれの精製 RBC や全血検体でも、溶血活性は認められなかった（Figure 9）。対照的に陽性対照（2.25% Triton X-100）を用いた処理では、全ての検体でほぼ完全な（94%超）溶血が示された。

Figure 9: No Hemolysis with Retifanlimab in Purified RBCs or Whole Blood



所定の濃度のレチファンリマブ又は 2.25% Triton X-100（陽性対照）により 2 時間、37°C で処理した、6 名の提供者から個別に得られた精製ヒト RBC（約 1.5×10^8 細胞/ウェル）（A）又は全血（B）を対象に評価した溶血率。

3.2. 抗体依存性細胞傷害又は補体依存性細胞傷害に関する評価

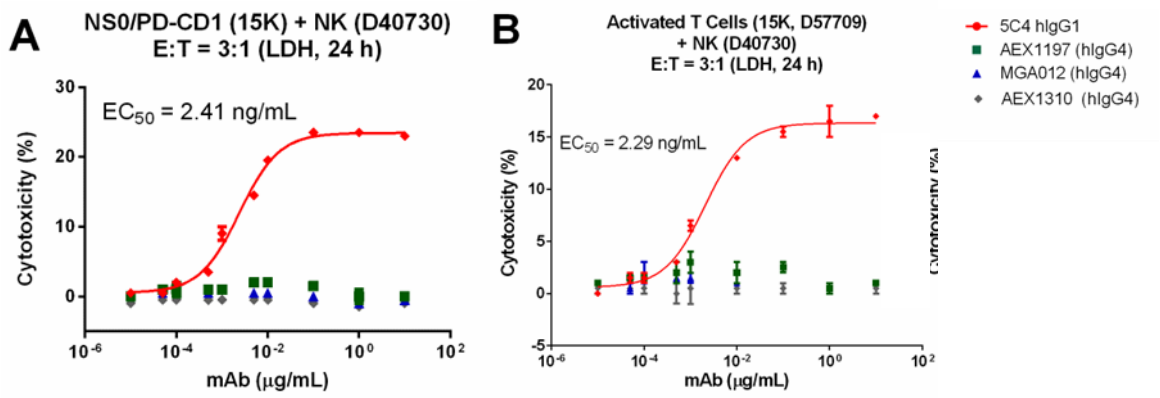
3.2.1. 抗体依存性細胞傷害の評価

ADCC 活性に対するレチファンリマブの媒介能を、NS0/PDCD1 細胞や、3 名の提供者から個別に得られた活性化ヒト初代 T 細胞を標的細胞に用いて評価した。エフェクター細胞には精製したヒト NK 細胞を使用し、E：T 細胞比は 3：1 とした【IN VITRO-20.08 試験】。この比率は、最終的な E：T 細胞比を 30：1 とした PBMC を用いた標準的な細胞毒性評価における NK 細胞と標的細胞の効果の高い比率を反映させたものである。

NS0/PDCD1 細胞を用いた乳酸脱水素酵素（LDH）測定から得られた ADCC データを Figure 10 A に示す。また、3 名の提供者（NS0/PDCD-1 標的細胞を用いた評価と同じ提供者を 2 名含む）から個別に得られた活性化ヒト初代 T 細胞を標的細胞、NK 細胞をエフェクター細胞として用いた LDH 測定から得られた ADCC データを Figure 10 B に示す。最高 10 µg/mL（評価を行った最高濃度）の濃度において、NS0/PDCD1 細胞又は活性化ヒト初代 T 細胞に対するレチファンリマブを介した細胞溶解活性は認められなかった。同様に、ニボルマブのレプリカや、関連性の無い対照抗体［抗 RS ウイルス（RSV）抗体のパリビズマブのレプリカ］を用いた場合も、細胞溶解活性は認められなかった。一方、野生型ヒト IgG1 Fc ドメインを持つ対照の抗 PD-1 抗体である

5C4 hIgG1 は、NS0/PDCD1 細胞及び活性化ヒト初代 T 細胞に対して濃度依存的な ADCC 活性を示した。EC_{50} の値は、NS0/PDCD-1 細胞では 0.17～2.41 ng/mL、活性化ヒト初代 T 細胞では 2.29～12.74 ng/mL となった。

Figure 10: No ADCC Activity Mediated by Retifanlimab in NS0/PDCD1 (PD-1-Expressing Cells) or Activated Primary Human T cells Target Cells



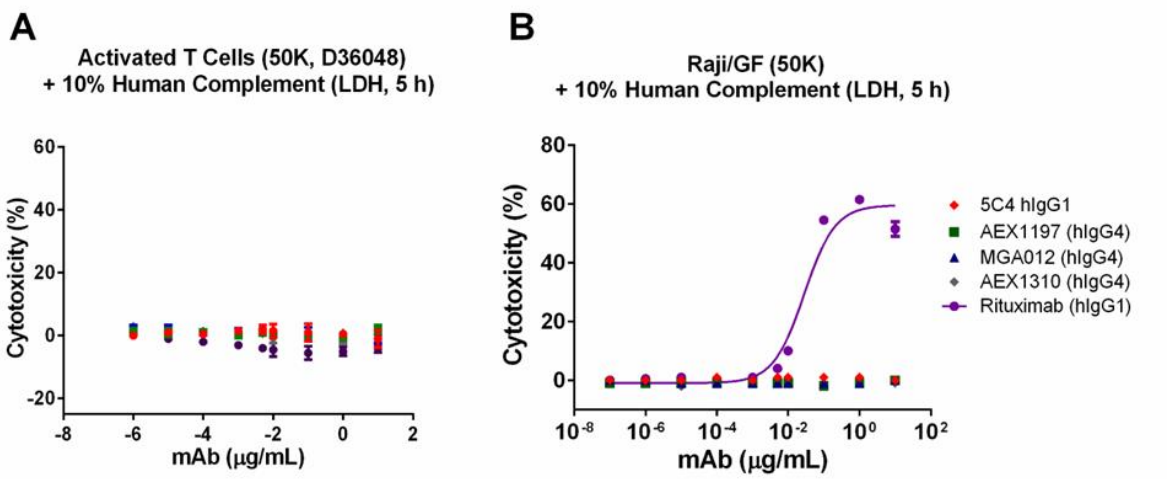
ADCC に対するレチファンリマブの媒介能を、NS0/PDCD1（Panel A）又は活性化ヒト初代 T 細胞（Panel B）を標的細胞に用いて評価した。エフェクター細胞には精製したヒト NK 細胞を使用し、E：T 細胞比は 3：1 とした。レチファンリマブの活性を、抗 PD-1 mAb、それぞれヒト IgG1 及び IgG4 Fc ドメインを有する 5C4 hIgG1 及び AEX1197（ニボルマブのレプリカ）並びにヒト IgG4 Fc ドメインを有する AEX1310（パリビズマブのレプリカ）（関連性の無い対照抗体）と比較した。3 名の健康な提供者から個別に得られた精製 NK 細胞を使用し、各種類の標的細胞について 1 名の代表的な提供者から得られたデータを示した。Panel A 及び Panel B に示した細胞傷害率は、24 時間培養した後の標的細胞（NS0/PDCD1 及び活性化初代ヒト T 細胞）からの LDH 放出測定値から算出した。

3.2.2. 補体依存性細胞傷害の評価

CDC 活性に対するレチファンリマブの媒介能を、補体の供給源として 10%ヒト血清を用いて、PD-1 陽性活性化ヒト初代 T 細胞を用いて評価した【IN VITRO-20.08 試験】。レチファンリマブを介した PD-1 陽性活性化ヒト初代 T 細胞に対する CDC 活性は、評価を行ったレチファンリマブ濃度（最高 10 µg/mL）では検出されなかった（Figure 11 A を参照）。10%ヒト血清補体濃度は、リンパ腫の標的細胞に対するリツキシマブの細胞毒性の測定を目的として、様々な濃度のヒト血清補体を用いて実施した測定の最適化に基づき選択したものであり、他のリツキシマブの CDC 測定で用いられた濃度範囲と一致する（Ishida et al 1992）。

陽性対照として、Raji/GF 細胞（ヒトのバーキットリンパ腫由来の細胞株）における CDC 活性に対するリツキシマブ（hIgG1）の媒介能を、同様の測定系を用いて確認した（Figure 11 B を参照）。IgG4 の Fc 部分には C1q に対する結合能がないことから、またこれまでに報告されたように抗 PD-1 抗体であるニボルマブにレチファンリマブと同一の IgG4 の Fc ドメインがあることから、レチファンリマブを介した CDC 活性は欠如している（Muhlbauer et al 2006）。これらのデータから、レチファンリマブの IgG4 Fc ドメインを介した CDC 活性はないことが示唆される。

Figure 11: No CDC Activity Mediated by Retifanlimab in Activated Primary Human T cells Target Cells

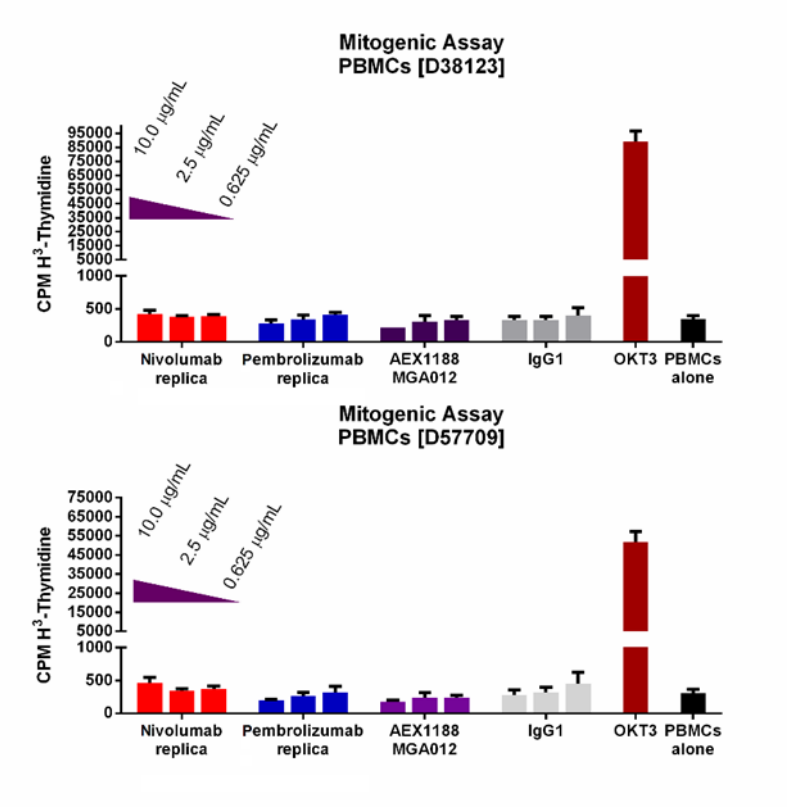


LDH 測定で 5 時間培養した標的細胞（活性化初代ヒト T 細胞）を用いて、CDC に対するレチファンリマブの媒介能を評価した。レチファンリマブの活性を、抗 PD-1 mAb、それぞれヒト IgG1 及び IgG4 Fc ドメインを有する 5C4 hIgG1 及びニボルマブのレプリカ（AEX1197）ヒト IgG4 Fc ドメインを有するパリビズマブのレプリカ（AEX1310）（関連性の無い対照抗体）並びにリツキシマブ（抗 CD20 IgG1 抗体）と比較した。ヒト血清補体を 10%の濃度で使用した。2 件の独立した試験のうち 1 件のデータを示す（2 件目の試験のデータについては【IN VITRO-20.08 試験】を参照）。

3.3. ヒト PBMC 培養後のレチファンリマブの内因性マイトジェン活性の評価

休止期 PBMC に対するレチファンリマブの内因性マイトジェン活性の欠如を確認するため、各抗 PD-1 mAb（レチファンリマブ、ニボルマブのレプリカ又はペムブロリズマブのレプリカ）をヒト PBMC と共に 2 日間培養し、その増殖能を ^{3}H-チミジン取込み測定により判定した【IN VITRO-20.06 試験】。Figure 12 に示すように、提供者 2 名の PBMC では、検討した抗体のいずれも、2 日間の培養後に PBMC の増殖誘導は認められなかった。その増殖レベルは、陰性対照とした PBMC 単独の培養又はヒト IgG1 アイソタイプの存在下の培養で認められたものと一致していた。一方、抗 CD3 mAb（OKT3 クローン）を介したアゴニストである CD3 の刺激は、活発な増殖を誘導した。

Figure 12: Evaluation of Intrinsic Mitogenicity of Retifanlimab



抗 PD-1 mAb の内因性マイトジェン活性の評価。レチファンリマブ（紫）、ニボルマブのレプリカ（赤）又はペムブロリズマブのレプリカ（青）を 10.0、2.5 又は 0.625 µg/mL の濃度で培養した。ヒト PBMC 単独の培養（黒）又は対照の IgG1 アイソタイプ（灰色）存在下の培養は、陰性対照として使用し、抗 CD3 抗体（OKT3 クローン）（えび茶色）存在下の培養は、陽性対照として使用した。その後、放射性同位元素の取込みを、Packard TopCount NXT のマイクロプレート用シンチレーション及び蛍光カウンター（PerkinElmer 社）を用いて、カウント毎分（CPM）で検出した。

3.4. In vitro サイトカイン放出

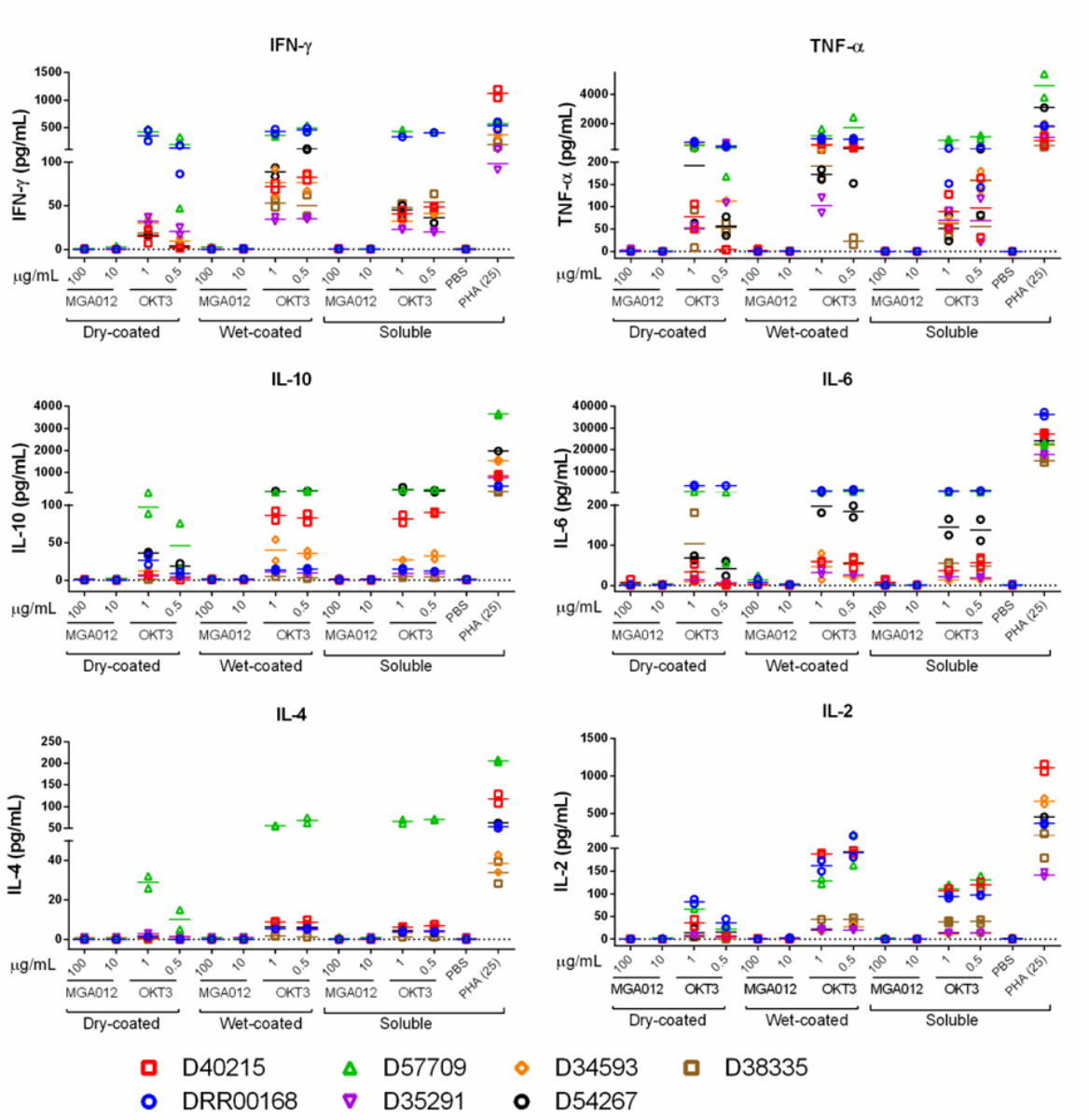
レチファンリマブ処理後の *in vitro* におけるサイトカイン産生について、ヒト PBMC を用いて種々の条件下で検討した。レチファンリマブは可溶状態又は Stebbings et al（2007）によるウェット又はドライコート法により、アッセイプレート上に固定した状態で用いた【IN VITRO-20.09 試験】。抗 CD3 mAb、OKT3、T 細胞マイトジェン、フィトヘマグルチニン（PHA）を測定の陽性対照とした。培養上清を回収し、6 種類のサイトカイン（IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 及び TNF-α）の値を、BD™ Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine キットを用いて、製造メーカーの指示書に従い測定した。

3.4.1. 可溶状態又は固定状態のレチファンリマブによるヒト PBMC からのサイトカイン産生の評価

7 名の健康な提供者から個別に得られた PBMC を、段階的濃度の可溶性又はプレート固定化（すなわちウェット又はドライコート法）のレチファンリマブ（100 及び 10 µg/mL）と共に 24 時間培養し、上清中に蓄積した IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 及び TNF-α の値を測定した。並行して評価した 3 通りの測定条件下でレチファンリマブ処理を行い、7 名の提供者から検出された各サイトカイン別の平均濃度を Figure 13 に示す。フィトヘマグルチニン（可溶型のみ）及び OKT3 誘導サイトカイン放出が、各測定で各提供者の PBMC の応答で確認された。

10 µg/mL 及び 100 µg/mL の濃度（陽性対照の OKT3 抗体より 10～200 倍高い濃度）のレチファンリマブに 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、サイトカイン産生は認められなかった。また、PBMC を 1 µg/mL 未満の濃度のレチファンリマブに曝露させた場合、サイトカイン放出は認められなかった。並行して評価した上述の 3 通りの条件下で、100 µg/mL 又は 10 µg/mL のレチファンリマブを添加した 7 名の提供者のヒト PBMC において認められた個々のサイトカインの値を Figure 13 に示す【IN VITRO-20.09 試験、Appendices】。

Figure 13:　Mean Cytokine Induction in Normal Human PBMCs by Soluble or Immobilized Retifanlimab



健康な提供者の PBMC（n = 7）について、レチファンリマブがドライコートされたプレート、レチファンリマブがウェットコートされたプレート又は可溶状態のレチファンリマブが入ったプレート内で、24 時間培養した後に測定された上清中のサイトカイン濃度。対照の OKT3 についてもアッセイプレート上にドライ及びウェットコートを行い、可溶性の実験系についても検討した。対照の PHA については、可溶性の実験系のみで評価を行った。グラフ上のシンボルは、各提供者について duplicate で測定した値を示す。それぞれの水平線は、duplicate で測定した検体の平均値を示す。各サイトカインで Y 軸のスケールが異なることに留意する。

3.5. *In vivo* サイトカイン放出

カニクイザルにレチファンリマブを投与した後のサイトカイン放出についても（1）選択した毒性評価項目を検討する単回投与薬物動態（PK）試験【T15-06-12 試験】、（2）反復投与パイロット毒性試験【T15-08-05 試験】及び（3）13 週間反復投与毒性試験【T18-02-10 試験】の一環として評価した。

3.5.1. カニクイザルにおける単回投与後のサイトカイン産生の評価（非 GLP）

カニクイザルを対象に、選択した毒性評価項目を検討する単回投与 PK 試験を行った【T15-06-12 試験】。この試験では、レチファンリマブを他の 2 種類の抗 PD-1 IgG4κ mAb［ペムブロリズマブ（MK-3475）及びニボルマブのレプリカ］と比較した。2 頭のカニクイザル（雄 1、雌 1）に 10 mg/kg の各抗体を 1 時間かけて IV 投与し、65 日間のモニタリングの後に群に戻した。この試験の毒性評価項目の詳細な説明については、【モジュール 2.6.6、2.1 項】を参照する。

レチファンリマブ又はニボルマブのレプリカを投与したカニクイザルの血清検体では、サイトカイン（IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及び TNF-α）は誘導されなかったが、ペムブロリズマブ投与後には IL-5 の増加が認められた。

3.5.2. カニクイザルにおける 3 週間反復投与後のサイトカイン産生の評価（非 GLP）

レチファンリマブ又は溶媒は 1 時間の IV 持続投与を週 1 回の頻度で 3 週間行った【T15-08-05 試験】。2 頭（雄 1、雌 1）が溶媒、4 頭（雄 2、雌 2）がレチファンリマブ 1 又は 100 mg/kg の投与を受けたため、レチファンリマブの投与を受けたのは計 8 頭であった。この試験の毒性評価項目の詳細な説明については、【モジュール 2.6.6、3.1 項】を参照する。

レチファンリマブの投与の結果、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10 及び TNF-α の血清中濃度に注目すべき変化は見られなかった。IL-6 で僅かな一過性の増加（100 pg/mL 未満）が、投与から 3 時間後及び 6 時間後に認められたが、投与から 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。しかし、溶媒対照の投与後にも同程度の IL-6 の増加が見られたため、この変化はレチファンリマブと関連するものとは考えられなかった。100 mg/kg のレチファンリマブを投与した 1 頭のカニクイザルにおいて、投与 1 日目の投与から 3 時間後に最大 1946 pg/mL の IL-6 の孤発の一過性の増加が生じたが、投与から 6 時間後までにベースライン（8 pg/mL）に近い値に戻った。その後、このカニクイザルの 8 日目及び 15 日目の投与では、投与後の IL-6 の増加はごく僅か（10 pg/mL 未満）であった。このカニクイザルについて、試験中に注目すべき臨床所見は認められなかった。

3.5.3. カニクイザルにおける 13 週間反復投与後のサイトカイン産生の評価（GLP）

カニクイザル（5 頭/性/群）にレチファンリマブを 0、5、20 又は 100 mg/kg の用量で 13 週間にわたり週 1 回、30 分間かけて IV 持続投与した【T18-02-10 試験】。この試験の毒性評価項目の詳細な説明については、【モジュール 2.6.6、3.3 項】を参照する。

投与 1 日目及び 85 日目の投与前並びに投与 1、4 及び 24 時間後にサイトカイン分析用の血液検体を採取した。全群の全ての評価時点で、サイトカイン／ケモカイン濃度の過半が定量下限未満（BLQ）であった。

全群を通して数例の動物（対照動物を含む）で、投与後に測定可能濃度の IL-6 が散発的に認められたが、用量反応性は認められなかった。少なくとも部分的には、レチファンリマブとの関連性を否定できなかった。

投与 1 日目（投与 4 及び 24 時間後）及び投与 86 日目（投与 24 時間後）に、5 mg/kg を投与した雌 1 頭に IL-12 濃度の上昇が認められた。この動物では投与後にのみ IL-12 が検出されたが、低用量の 1 頭にのみ発現したことから、この事象がレチファンリマブに関連する可能性は低いと考えられた。

4. 安全性薬理試験

レチファンリマブの安全性薬理学的検討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めており、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】において、CNS、心血管系及び呼吸器系の安全性薬理コアバッテリー評価に関連する項目には、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。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、評価したどの用量（10～150 mg/kg）でも認められなかった。4 週間の GLP 毒性試験に関する詳細情報は、【モジュール 2.6.6、3.2 項】及び【T19-01-03 試験】を参照する。

また、*in vitro*（3.4 項）及び *in vivo*（3.5 項）におけるサイトカイン産生の評価から、レチファンリマブの安全性薬理評価に関する情報が得られている。

5. 薬力学的薬物相互作用

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

レチファンリマブは、PD-1 に結合し、そのリガンドである PD-L1 及び PD-L2 との相互作用を阻害するよう設計された、ヒンジ結合により安定化させたヒト化 IgG4κ mAb である。PD-1 は T 細胞（CD4 陽性及び CD8 陽性）、B 細胞、NK 細胞及び骨髄由来細胞上に発現する（Ishida et al 1992）。T 細胞では、PD-1 とそのリガンドとの相互作用により、抑制的に作用するシグナル伝達経路が形成されることが知られている（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「免疫チェックポイント」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。大規模な研究により、がん細胞は、腫瘍抗原に特異的な T 細胞に対する免疫回避／抵抗性の主な機序として、PD-1－PD-L1/L2 経路を含む特定の免疫チェックポイント経路を利用することが示されている。PD-1 受容体とリガンドの相互作用を阻害する抗体を含むこの経路を阻害するものは、マウスを用いたモデルにおいて腫瘍増殖の効果的な阻害剤となることが示されている（Chen and Flies 2013、Hodi et al 2010、Pentcheva-Hoang et al 2009、Powles et al 2014、Rizvi et al 2015、Topalian et al 2015、Wong et al 2007、Yao et al 2013）。更に臨床評価により、これらの分子はチェックポイント阻害剤と総称される、新たな抗悪性腫瘍剤の分類として確立された。抗 PD-(L)1 mAb 等、この経路を標的とする幾つかの分子は、幾つかの癌を適応として製造販売承認を取得した（Sun et al 2020）。レチファンリマブは、T 細胞等の PD-1 を発現する細胞を標的として、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ている。

レチファンリマブの望ましい結合特性及びその作用機序の実証並びにレチファンリマブの機能活性の評価等、本書に要約した非臨床薬理試験のデータは、固形癌の治療薬候補としてレチファンリマブの開発が適切であることが裏付けている。また、非臨床開発プログラムでは、レチファンリマブが、純正のペムブロリズマブ並びに公表されている抗体の配列情報に基づき [redacted] が作成したペムブロリズマブ及びニボルマブの 2 つのレプリカを含む他の抗 PD-1 mAb と類似した生物学的活性を示すことが明らかにされた。

SPR 解析及びフローサイトメトリーにより、ヒト PD-1 に対するレチファンリマブの特異的結合が *in vitro* で評価されている。遺伝子組換え可溶性ヒト抗原を用いた SPR 解析により、レチファンリマブが PD-1 に結合し、K_D 値は 0.6 nM であることが明らかになった。フローサイトメトリー解析により、レチファンリマブがヒト PBMC、T 細胞（CD4 陽性及び CD8 陽性の両方）並びに NS0 細胞及びヒト以外の霊長類の PBMC に異所的に発現する PD-1 に対する結合能を有することが確認された。PD-1 発現細胞株を用いた実験により、レチファンリマブの細胞表面 PD-1 に対する結合能が、ペムブロリズマブ及びニボルマブのレプリカの両方で得られた結合曲線と同様であることが示された。また、レチファンリマブは、基準レベル及び刺激時の増強レベルで PD-1 を発現するヒト PBMC 並びに CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞に用量依存的に結合することが示された。レチファンリマブのヒト PBMC 及び T 細胞に対する結合能は、ニボルマブのレプリカの結合能と同等であった（この実験ではペムブロリズマブのレプリカの結合能は検討しなかった）。

カニクイザルがレチファンリマブの非臨床毒性評価に適した動物種であることを裏付けるため、複数の *in vitro* 薬理試験を実施し、カニクイザルの標的抗原及び細胞に対するレチファンリマブの結合能並びにその生物学的活性を評価した。レチファンリマブはカニクイザルの PD-1 に結合することが示されたが、結合親和性はヒト PD-1 に対する結合親和性の約 6 分の 1 であった（K_D 値はそれぞれ 3.6 nM 及び 0.6 nM）。また、レチファンリマブは SEB 刺激後のカニクイザル及びアカゲザルの PBMC の両方に結合した。これらのデータから、カニクイザルがレチファンリマブの非臨床毒性試験に適した動物モデルであることが裏付けられた【モジュール 2.6.6、1 項】。

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、細胞表面発現 PD-1 に対するリガンドである PD-L1 及び PD-L2 の結合を阻害し、用量依存的に TCR を介した NFAT 誘導ルシフェラーゼシグナル伝達を増強させた。レチファンリマブは PD-1/PD-L1（IC_{50} = 0.010 μg/mL）及び PD-1/PD-L2（IC_{50} = 0.021 μg/mL）の相互作用を阻害し、阻害率はニボルマブ（PD-L1 及び PD-L2 でそれぞれ IC_{50} = 0.016 μg/mL 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 μg/mL 及び 0.028 μg/mL）のレプリカで観察された阻害率と同等以上であった。また、PD-1 又は PD-L1 を発現するよう設計した共培養細胞株間に起こる PD-1/PD-L1 の相互作用に対するレチファンリマブによる阻害能（EC_{50} = 0.090 μg/mL）は、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。可溶性 PD-L1 及び PD-L2 の PD-1 発現 NS0 細胞（NS0/PDCD1）に対する結合阻害を示す上述の観察結果と併せて、レチファンリマブはニボルマブ及びペムブロリズマブのレプリカと同等の生物物理学的及び機能的阻害を示した。最後に、SEB の刺激を受けたヒト PBMC においてレチファンリマブは概して用量依存的な IFN-γ 分泌の増強を示したことから、レチファンリマブが *in vitro* で機能活性を有することが示された。

また、レチファンリマブの薬理活性は、カニクイザルを用いたレチファンリマブの非臨床毒性試験の一環として評価し、これには 10 mg/kg の用量を評価した非 GLP 単回投与試験、1 又は 100 mg/kg の用量を 3 週間にわたり週 1 回投与した非 GLP 反復投与試験並びに 10、40 及び 150 mg/kg の用量を週 1 回 4 週間投与した GLP 反復投与試験が含まれた。レチファンリマブの投与後、2 件の非 GLP 試験では、末梢血免疫サブセット（T 細胞サブセット、活性化 T 細胞、分化 T 細胞、B 細胞、NK 細胞又は単球）の総数及び分布に変化は認められなかった【モジュール 2.6.6、2.1 項】【モジュール 2.6.6、3.1 項】。ただし、4 週間の GLP 試験では、レチファンリマブを投与したカニクイザルでは対照群と比較し、総白血球、T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を含む

循環免疫細胞集団の一過性の用量非依存的な低下が、投与終了から 23 時間後に認められた。最大の変化は投与 1 日目の初回投与後に認められ、その後投与 8、15 又は 22 日目の投与後はより小さな一過性の変化が認められた。概して免疫細胞集団は投与終了から 72 時間まで及び回復期間全体を通じて、ベースラインの値又はそれに近い値まで回復した。レチファンリマブを投与したカニクイザルでは対照群と比較して、循環単球に変化は認められなかった【モジュール 2.6.6、3.2 項】。同様に、一過性のリンパ球減少が 13 週間試験の投与 2 日目に認められた【モジュール 2.6.6、3.3 項】。

また、レチファンリマブの副次的薬力学的特性を評価し、これにはレチファンリマブの ADCC 又は CDC の媒介能、細胞増殖の誘導能及び赤血球結合能／溶血能の評価を含めた。IgG4 ベースの抗体と同様に、最高 10 µg/mL のレチファンリマブ濃度において、NS0/PDCD1 細胞及び PD-1 を発現する活性化ヒト初代 T 細胞のいずれにも ADCC 活性は認められなかった。また、IgG4 の Fc ドメインには C1q に対する結合能がないことから、またこれまでに報告されたように抗 PD-1 抗体のニボルマブにレチファンリマブと同一の IgG4 の Fc ドメインがあることから予想されるように、レチファンリマブは CDC 活性を介さなかった。レチファンリマブの処理は、2 日間の培養後に PBMC 増殖を誘導しなかったことから、内因性マイトジェン活性はないことが示された。マイトジェン作用の欠如は、ニボルマブ又はペムブロリズマブのレプリカで認められた観察結果と一致していた。最後に、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。健康な提供者の精製 RBC 又は全血を *In vitro* でレチファンリマブを処理したところ、溶血は認められなかった。

可溶性レチファンリマブ又はプレート固定（ドライコート又はウェットコート）レチファンリマブにより、*in vitro* で健康な提供者のヒト PBMC を用いて、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 OKT3 抗体より 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、3 通りのレチファンリマブの存在全条件で、サイトカイン産生（IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 及び TNF-α）は認められなかった。また、毒性試験プログラムの一環として、カニクイザルを用いて *in vivo* でサイトカイン産生を評価した。レチファンリマブ 10 mg/kg を単回 IV 投与したカニクイザルの血清検体には、サイトカイン（IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及び TNF-α）の誘導はなかった。また、レチファンリマブを週 1 回 3 週間 1 又は 100 mg/kg を IV 投与したところ、全体として血清中サイトカイン産生は認められなかった。ただし、100 mg/kg を投与したサル 1 頭では、初回投与から 3 時間後に IL-6 の顕著な単発の増加（1946 pg/mL）が認められたが、6 時間後までに回復し（8 pg/mL に戻った）、対応する臨床的影響は伴わなかった。対照を投与した動物にも同様の程度の IL-6 の増加が見られた。13 週間投与試験では、全群の全ての評価時点で、サイトカイン濃度又はケモカイン濃度の過半が定量下限未満であった。全群を通して数例の動物（対照動物を含む）で、投与後に非用量反応性の測定可能濃度の IL-6 がしばしば認められたが、少なくとも部分的には、レチファンリマブとの関連性を否定できなかった。投与 1 日目（投与 4 及び 24 時間後）及び投与 86 日目（投与 24 時間後）に、10 mg/kg を投与した雌 1 頭に IL-12 濃度の上昇が認められた。この動物では投与後にのみ IL-12 が検出されたが、低用量の 1 頭にのみ発現したことから、この事象がレチファンリマブに関連する可能性は低いと考えられた。

カニクイザルを用いて実施した 4 週間の GLP 毒性試験の一環として、安全性薬理試験で選定した評価項目を評価したが【モジュール 2.6.6、3.2 項】、CNS、心血管系又は呼吸器系の機能に対するレチファンリマブと関連する安全性薬理所見は認められなかった。レチファンリマブを用いた薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

結論として、レチファンリマブは *in vitro* で PD-1 に結合し、チェックポイントにおいて PD-1 とその 2 つのリガンドとの抑制的相互作用を阻害することが示された。更に、その生物学的活性は、既承認の抗 PD-1 mAb であるペムブロリズマブ及びニボルマブの配列情報に基づいて作成された他の抗 PD-1 mAb のレプリカと類似していた。非臨床の薬理試験のデータは、レチファンリマブが固形癌の治療薬として適切であることを示す強力な科学的根拠となるものである。

7. 参考文献

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

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

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity. 2013;39(1):1-10.

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

Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. J Exp Med. 2010;207(10):2175-2186.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, 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.

Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. J Clin Invest. 2014;124(5):2246-2259.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010;363(8):711-723.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH S6(R1) Guideline: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. 12 June 2011.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH S7A Guideline: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. 08 November 2000.

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.

Krakauer T. Immune response to staphylococcal superantigens. Immunol Res. 1999;20(2): 163 173.

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

Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, Weiss T, Froh M, Blank 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, Korman A, Quigley M, Kester MG, 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, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. Mol Cell Biol. 2005;25(21):9543-9553.

Pentcheva-Hoang T, Corse E, Allison JP. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. Immunol Rev. 2009;229(1):67-87.

Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. Nature. 2014;515(7528):558-562.

Rizvi NA, Mazieres J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. Lancet Oncol. 2015;16(3):257-265.

Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, Hofler G, Guthann E, Korthauer U, 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.

Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. Science. 2015;348(6230): 56 61.

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(5):3325-3331.

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;10:2083.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. Cancer Cell. 2015;27(4):450-461.

Wong RM, Scotland RR, Lau RL, Wang C, Korman AJ, Kast WM, et al. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. Int Immunol. 2007;19(10):1223-1234.

Yao S, Zhu Y, Chen L. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. Nat Rev Drug Discov. 2013;12(2):130-146.

1. 薬理試験：一覧表

試験の種類	GLP[a]	試験系	投与方法	試験施設	試験番号	CTD の該当箇所
主要薬理学						
In Vitro 薬力学						
ヒト及びカニクイザルの PD-1 に対するレチファンリマブの結合能の解析	No	表面プラズモン共鳴	NA	MacroGenics, Inc.	【IN VITRO-20.05】(MGA012-15-1002)	4.2.1.1
In vitro におけるレチファンリマブの生物学的活性の評価：PD-1 発現細胞に対する結合、PD-1 の結合の阻害、PD-1－PD-L1 シグナル伝達の阻害、SEB 再刺激後の PBMC による IFN-γ の分泌増加	No	ヒト、カニクイザル及びアカゲザルの PD-1 発現 PBMC、ヒト T 細胞	NA	MacroGenics, Inc.	【IN VITRO-20.06】(MGA012-15-1001)	4.2.1.1
副次薬理学						
レチファンリマブの血液適合性評価	No	ヒト RBC 又は全血	NA	MacroGenics, Inc.	【IN VITRO-20.07】(MGA012-15-1007)	4.2.1.2
レチファンリマブの ADCC 及び CDC の評価	No	PD-1 を発現する標的細胞と共に、エフェクター細胞として精製した NK 細胞（ADCC）又は 10%ヒト血清補体（CDC）	NA	MacroGenics, Inc.	【IN VITRO-20.08】(MGA012-15-1006)	4.2.1.2
In vitro におけるレチファンリマブを介したサイトカイン誘導の評価	No	ヒト PBMC	NA	MacroGenics, Inc.	【IN VITRO-20.09】(MGA012-15-1003)	4.2.1.2
安全性薬理試験						
安全性薬理試験は特に行われていない。4 週間の GLP 毒性試験（【T19-01-03】/ 20082892）の評価項目に安全性薬理試験の選定した評価項目が含まれている【モジュール 2.6.2、4 項】。また、*in vivo* でのサイトカイン産生の評価（【T15-06-12】/ [redacted]20077288-15-1002 and【T15-08-05】/ [redacted]20079545-15-1002）は、レチファンリマブの安全性薬理試験に関連する【モジュール 2.6.2、3.4 項】。						
薬力学的薬物相互作用：試験は実施していない						

[a] 「Yes」の場合、当該試験が GLP 適合性に関する陳述を含むことを示す。

略語：ADCC = 抗体依存性細胞傷害、CDC = 補体依存性細胞傷害、CTD = コモン・テクニカル・ドキュメント、GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、IFN-γ = インターフェロン γ、NA = 該当せず、NK = ナチュラルキラー（細胞）、PBMCs = 末梢血単核球、PD-1 = プログラム細胞死タンパク質 1、RBC = 赤血球