

目次

2.6.1	緒言	3
-------	----------	---

略号一覧表

略号又は略称	名称及び内容
HuMab-CD38	a human IgG1 mAb that specifically binds human and cynomolgus monkey CD38 (ヒトモノクローナル抗体-CD38)
IgG	immunoglobulin G (免疫グロブリン G)
mAb	monoclonal antibody (モノクローナル抗体)
MM	multiple myeloma (多発性骨髄腫)

2.6.1 緒言

ダラツムマブ（遺伝子組換え）は、2本の同一のH鎖及び2本の同一のL鎖が結合したヘテロダイマー構造を有する分子量が約148 kDaのヒト免疫グロブリンG1κ（IgG1κ）モノクローナル抗体（mAb）である【CTD 2.3.S.3.1参照】。

ダラツムマブは、CD38分子中に存在するエピトープに特異的に結合する。CD38は形質細胞及び多発性骨髄腫（MM）細胞で高発現している45 kDaのII型膜貫通糖タンパク質であり、受容体であるとともにヌクレオチド代謝物の生成に関与する多機能酵素でもある^{1), 2), 3)}。ダラツムマブは、MMを含む造血器悪性腫瘍の腫瘍細胞表面に発現するCD38抗原に対して特異的に結合することにより、腫瘍細胞に対して補体依存性細胞傷害作用、抗体依存性細胞傷害作用及び抗体依存性細胞貪食作用を誘導する。

本邦での本剤の医薬品製造販売承認申請における効能・効果（案）及び用法・用量（案）は、以下のとおりとした。

【効能・効果（案）】

再発又は難治性の多発性骨髄腫

【用法・用量（案）】

通常、成人にはダラツムマブ（遺伝子組換え）として、1回 16 mg/kg を以下の投与間隔で点滴静注する。

レナリドミド及びデキサメタゾン併用の場合：

1週間間隔（1～8週目）、2週間間隔（9～24週目）及び4週間間隔（25週目以降）

ボルテゾミド及びデキサメタゾン併用の場合：

1週間間隔（1～9週目）、3週間間隔（10～24週目）及び4週間間隔（25週目以降）

2.6.1.1 参考文献

- 1) Quarona V, et al. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84:207-17.
- 2) Lee HC, et al. Structures and activities of cyclic ADP-ribose, NAADP and their metabolic enzymes. *Mol Cell Biochem.* 1999;193:89-98.
- 3) Bertheliev V, et al. Human CD38 is an authentic NAD(P)⁺ glycohydrolase. *Biochem J.* 1998;330:1383-90.

目次

2.6.2	薬理試験の概要文.....	4
2.6.2.1	まとめ.....	4
2.6.2.2	効力を裏付ける試験.....	7
2.6.2.3	副次的薬理試験.....	31
2.6.2.4	安全性薬理試験.....	35
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	36
2.6.2.6	考察及び結論.....	37
2.6.2.7	図表.....	39
2.6.2.8	参考文献.....	39
2.6.3	薬理試験概要表.....	1

略号一覧表

略号又は略称	名称及び内容
7-AAD	7-amino-actinomycin D (7-アミノアクチノマイシン D)
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) [2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)]
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (抗体依存性細胞傷害)
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis (抗体依存性細胞貪食)
ADP	adenosine diphosphate (アデノシン二リン酸)
cADPR	cyclic adenosine diphosphate ribose (サイクリックアデノシン二リン酸リボース)
CDC	complement-dependent cytotoxicity (補体依存性細胞傷害)
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester (カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル)
cGDP	cyclic guanosine diphosphate ribose (サイクリックグアノシン二リン酸リボース)
CHO	Chinese Hamster Ovary (チャイニーズハムスター卵巣)
CI	confidence interval (信頼区間)
CNS	central nervous system (中枢神経系)
DP	double positive (二重陽性)
EC ₅₀	50% effective concentration (50%作用濃度)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (酵素結合免疫吸着測定法)
FITC	fluorescein isothiocyanate (フルオレセインイソチオシアネート)
GFP	green fluorescent protein (緑色蛍光タンパク質)
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)
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)
HEK	human embryonic kidney (ヒト胎児腎細胞)
HPLC	high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
HRP	horseradish peroxidase (西洋ワサビペルオキシダーゼ)
HuMab-KLH	human anti-keyhole limpet hemocyanin (ヒト抗 KLH 抗体)
Ig	immunoglobulin (免疫グロブリン)
IHC	immunohistochemistry (免疫組織化学)
IVIG	intravenous immunoglobulin (静注用ヒト免疫グロブリン製剤)
k _a	association constant (結合速度定数)
k _d	dissociation rate constant (解離速度定数)
K _D	dissociation constant (解離定数)
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin (スカシガイヘモシアニン)
LOS	lipooligosaccharide (リポオリゴサッカライド)
LPS	lipopolysaccharide (リポポリサッカライド)
mAb	monoclonal antibody (モノクローナル抗体)
MFI	mean fluorescent intensity (平均蛍光強度)
MM	multiple myeloma (多発性骨髄腫)
NGD	nicotin amide guanine dinucleotide (ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド)
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (末梢血単核球)
PBS	phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩液)
PI	propidium iodide (ヨウ化プロピジウム)
SCID	severe combined immunodeficiency (重症複合型免疫不全)
SD	standard deviation (標準偏差)

略号又は略称	名称及び内容
SEM	standard error of the mean (標準誤差)
TLC	thin layer chromatography (薄層クロマトグラフィー)
TNF- α	tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子- α)

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

再発又は難治性の多発性骨髄腫（MM）患者の治療におけるダラツムマブ（遺伝子組換え，以下，ダラツムマブ）の有用性を明らかにするため，ダラツムマブの効力を裏付ける試験を *in vitro* 及び *in vivo* で実施した。安全性薬理試験は ICH S6（R1）及び S7A ガイドラインに準じて，心血管系，呼吸系及び中枢神経系（CNS）に及ぼすダラツムマブの影響を反復投与毒性試験に組み入れ，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）下で評価した。

ダラツムマブはヒト及びチンパンジー以外の CD38 に結合しない。非臨床試験で用いた，カニクイザルの CD38 に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38（ヒト及びカニクイザル CD38 に結合するサロゲート抗体）の特性についても検討した。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

ダラツムマブは，CD38 に特異的に結合するヒト免疫グロブリン G1κ（IgG1κ）モノクローナル抗体（mAb）である。CD38 は，45 kDa の II 型膜貫通糖タンパク質であり，受容体であるとともにヌクレオチド代謝物の生成に関与する多機能酵素でもある^{1), 2), 3)}。形質細胞及びその腫瘍細胞である MM 細胞では CD38 が高度に発現していることが報告されており，そのため，CD38 とともに患者骨髄中の悪性骨髄腫細胞の表面マーカーとして広く用いられている^{4), 5)}。MM において CD38 が高度に発現することから，CD38 は有用な治療標的として期待される。

2.6.2.1.1.1 作用機序

ダラツムマブの効力を裏付ける試験として，結合特性，補体依存性細胞傷害（CDC）作用，抗体依存性細胞傷害（ADCC）作用，抗体依存性細胞貪食（ADCP）作用，アポトーシス誘導，CD38 酵素活性の阻害，ヒトにおける組織交差反応性及び異種間組織交差反応性を検討した。これらの試験の結果から，CD38 を発現する悪性腫瘍に対するダラツムマブの有用性が示唆された。

Biacore 解析の結果，精製ヒト CD38 タンパク質に対するダラツムマブの結合親和性は高かった〔解離定数（ K_D ）値； 4.36×10^{-9} mol/L〕。また，酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）での解析において，ダラツムマブは精製ヒト CD38 タンパク質に濃度依存的に結合し，その 50%作用濃度（ EC_{50} ）値は 55.2 ng/mL であった。さらに，ダラツムマブは，細胞表面に発現する CD38 に対しても特異的な結合を示した。

腫瘍細胞表面に発現する CD38 に結合したダラツムマブの Fc 領域は，CDC 作用，ADCC 作用，ADCP 作用，腫瘍細胞のアポトーシス誘導及び CD38 酵素活性の調節といった様々な生物学的作用を誘導した。

CD38 を発現する Daudi 細胞にルシフェラーゼを導入した細胞（Daudi-luc 細胞）又はヒト CD38 を発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（CHO-CD38 細胞）を用いた *in vitro* 試験の結果から，ハイブリドーマから 1 及び 2 段階の限界希釈で得られたクローン由来及び一過性発現により得た遺伝子組換えダラツムマブはいずれも強い CDC 作用を誘導した。また，ダラツムマブは，陽性対照として用いたリツキシマブより低い EC_{50} 値で CDC 作用を誘導した。

さらに、ダラツムマブは検討した大部分の新鮮分離 MM 細胞（8/12 例）に対して CDC 作用を誘導し、全新鮮分離 MM 細胞に対する最大 CDC 作用は 56.92%であった。

ダラツムマブはエフェクター細胞による ADCC 作用、マクロファージによる ADCP 作用を誘導することにより腫瘍細胞に対する細胞介在性傷害を誘導することが示された。Daudi-luc 細胞に対してダラツムマブは強い ADCC 作用を示し（EC₅₀ 値；20.9 ng/mL），MM 患者の骨髓由来新鮮分離 MM 細胞 4 株に対しても ADCC 作用を示した。*In vitro* 及び *in vivo* 試験において、ダラツムマブにより腫瘍細胞に対する貪食作用が示された。また、変異により補体活性化を欠損する又はアイソタイプスイッチにより貪食能を欠損した変異型ダラツムマブを用いることにより、貪食能誘導の特異性が示された。

リンパ腫又は MM 細胞上の CD38 に結合したダラツムマブが抗 Fc 抗体又は FcγR を介して架橋することにより、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することが示された。*In vitro* 試験の結果、大部分の細胞で効果的にアポトーシスを誘導した。*In vivo* 試験では、活性化型及び抑制型 FcγR が、腫瘍細胞上でのダラツムマブの架橋形成を仲介することによりアポトーシスを誘導する可能性が示されたが、*in vivo* では作用が弱く、アポトーシスが誘導された細胞は 15%未満であった。

CD38 は、シクラーゼ及びヒドロラーゼ活性を有している。*In vitro* での検討から、ダラツムマブはシクラーゼ活性を抑制し、ヒドロラーゼ活性を亢進することにより、CD38 酵素活性を調節することが示された。

リンパ組織及び非リンパ組織に対するダラツムマブの結合特異性を明らかにするため、非 GLP 試験を実施した。免疫組織化学（IHC）染色の解析の結果、ダラツムマブはリンパ球（T 及び B リンパ球並びに形質細胞）、マクロファージ、リンパ管内皮細胞へ結合した。蛍光二重免疫染色の結果、ダラツムマブは横紋筋、分化した上皮細胞の一部並びに肺の細胞質及び細胞膜で染色が陽性であった。

各動物種（ブタ、ウサギ、ラット、マウス、カニクイザル及びアカゲザル）のリンパ組織における CD38 に対するダラツムマブの結合を、IHC 染色により検討した。検討したいずれの動物種においても、リンパ組織に対する反応性はみられなかった。ヒトとチンパンジーの CD38 に対するダラツムマブの作用を比較したところ、結合親和性、血小板以外の末梢血単核球（PBMC）への結合及び酵素活性に対する作用はすべて同様であったことから、チンパンジーは試験に用いる動物種として適切であると考えられた。

カニクイザル及びアカゲザル CD38 に結合可能なサロゲート抗体 HuMab-CD38 の特性を検討したところ、ヒト CD38 発現細胞における CDC 作用及びシクラーゼ活性阻害並びにカニクイザル末梢血由来の種々の細胞に対する高い結合性はダラツムマブと異なっていたが、ヒト CD38 に対する結合親和性及び生物学的特性はダラツムマブと同程度であった。ダラツムマブと HuMab-CD38 の間には差異があることから、カニクイザルにおける HuMab-CD38 を用いたダラツムマブの評価には限界があると考えられる。

2.6.2.1.1.2 抗腫瘍効果

重症複合型免疫不全（SCID）マウスに Daudi-luc 細胞を静脈内移植後、ダラツムマブを同日に投与（予防的投与）又は 7 若しくは 14 日後に投与（治療的投与）する *in vivo* 異種移植モデルにおいて、CD38 発現腫瘍細胞に対するダラツムマブの抗腫瘍効果を検討した。ダラツムマブは予

防的及び治療的投与のいずれの投与方法でも、SCID マウスにおけるヒト腫瘍細胞の増殖を阻害した。予防的投与における推定 ED₅₀ 値は 0.065 µg/kg であった。治療的投与において、治療効果は 10 µg/匹（約 0.5 mg/kg に相当）で認められた。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

CD38 が T 細胞を直接刺激するという報告はないため、ダラツムマブが T 細胞を直接活性化する可能性は低い。しかしながら、抗体薬の潜在的な懸念であるアゴニスト活性の可能性を明らかにするため、ダラツムマブによる PBMC の増殖及びサイトカイン放出作用について検討した。また、ヒト及びチンパンジーの血小板に対する結合、並びにヒト赤血球の溶血に対する作用についても検討した。

ヒト PBMC 及び全血を用いた試験より、ダラツムマブは標的特異的な T 細胞増殖及びサイトカイン放出を誘導しないことが示された。別の試験においてダラツムマブにより少量のサイトカイン放出が誘導されたが、これは標的に関連した作用ではなく、主にダラツムマブの Fc 領域を介した作用であり、対照の IgG 又は標的の異なる国内外既承認の抗体医薬品による作用と同程度であった。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

ICH S6 (R1) 及び ICH S7A ガイドラインに準じて、心血管系、呼吸系及び CNS に関する安全性薬理試験評価項目を反復投与毒性試験に組み入れて実施した。これらの試験結果より、ダラツムマブを投与したチンパンジー6週間反復静脈内投与毒性試験又は HuMab-CD38 を投与したカニクイザル2週間反復静脈内投与毒性試験における安全性薬理試験のパラメータに、ダラツムマブ又は HuMab-CD38 の投与に関連した有害な影響は認められなかった。

2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験

様々な MM 治療薬とダラツムマブの併用による相互作用の可能性について、*ex vivo* 培養試験で検討した。レナリドミド単独、レナリドミド及びボルテゾミブの併用、並びにメルファラン、プレドニゾロン及びボルテゾミブの併用にダラツムマブを併用しても、ヒト MM 細胞株及び MM 患者由来の新鮮分離細胞に対するダラツムマブの細胞傷害作用に、併用による薬理効果の減弱はみられなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 作用機序

2.6.2.2.1.1 結合特性

【評価資料 4.2.1.1.1】

ヒト CD38 に対するダラツムマブと HuMab-CD38 の結合特性を Biacore 法及び ELISA 法により検討した。

(1) Biacore 法

精製ヒト CD38 タンパク質に対するダラツムマブと HuMab-CD38 の結合を Biacore 法にて測定した。

精製ヒト CD38 に対するダラツムマブの K_D 値は 4.36×10^{-9} mol/L であった (表 2.6.2-1)。

表 2.6.2-1 ヒト CD38 に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合親和性

化合物	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (mol/L)
ダラツムマブ	$1.24 \times 10^5 \pm 3.33 \times 10^4$	$5.08 \times 10^{-4} \pm 7.51 \times 10^{-5}$	$4.36 \times 10^{-9} \pm 1.47 \times 10^{-9}$
HuMab-CD38	$2.71 \times 10^5 \pm 1.23 \times 10^5$	$2.00 \times 10^{-4} \pm 1.63 \times 10^{-5}$	$8.18 \times 10^{-10} \pm 2.61 \times 10^{-10}$

結果は平均値±標準偏差 (SD) で示す (n=3)。

*ダラツムマブ及び HuMab-CD38 はそれぞれ異なる 2 種のバッチを用いた。

(2) ELISA 法

精製ヒト CD38 タンパク質に対するダラツムマブと HuMab-CD38 の結合を、ヘマグルチニン (HA) 又はヒスチジン (His) 標識 CD38 を用いた ELISA 法にて測定した。

HA 標識 CD38 を用いた検討において、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 はともに、ヒト CD38 に対して濃度依存的な結合を示した (図 2.6.2-1)。His 標識 CD38 に対するダラツムマブの結合の EC_{50} 値は 55.2 ng/mL であった (図 2.6.2-2)。

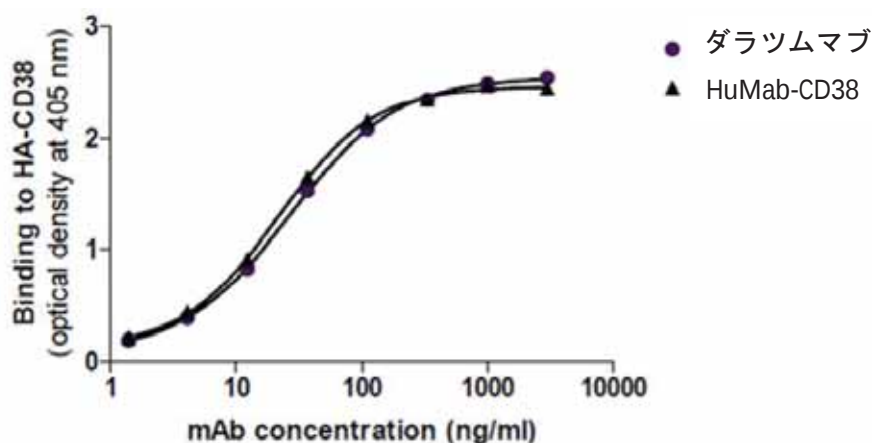


図 2.6.2-1 ヒト CD38 に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合

(HA 標識 CD38 を用いた ELISA 法)

抗 HA mAb を ELISA プレートにコートし、翌日にブロッキングした。HA-CD38 を添加後にプレートを洗浄し、ダラツムマブ又は HuMab-CD38 (3000~1.4 ng/mL) を加え、更に洗浄した後にプレートを西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ヒト IgG Fcγ 特異抗体とインキュベーションした。抗体結合量は 2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) を基質として発色させ、405 nm の吸光度を検出することにより測定した。

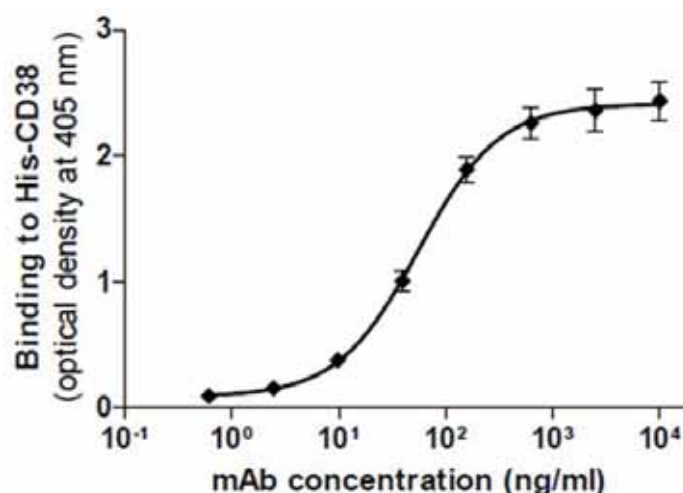


図 2.6.2-2 ヒト CD38 に対するダラツムマブの結合 (His 標識 CD38 を用いた ELISA 法)

His 標識 CD38 を ELISA プレートにコート後、翌日にブロッキングし、ダラツムマブ (10000~0.61 ng/mL) を加えた。結合したダラツムマブ量は HRP 標識マウス抗ヒト IgG Fcγ 特異抗体とインキュベーション後、ABTS を基質として発色させ、405 nm の吸光度を検出することにより測定した。結果は平均値±SD で示す (n=3)。

(3) 細胞表面 CD38 に対する結合特性

細胞表面に発現する CD38 に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合特性を、Daudi 細胞及びヒト CD38 を発現させた CHO 細胞 (CHO-CD38 細胞) を用い、フローサイトメトリー法にて測定した。

ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は、Daudi 細胞及び CHO-CD38 細胞表面に発現する CD38 に対し、特異的かつ濃度依存的に結合した (図 2.6.2-3)。Daudi 細胞及び CHO-CD38 細胞に対するダ

ラツムマブの結合の EC_{50} 値は、それぞれ 0.26 及び 0.47 $\mu\text{g/mL}$ 、HuMab-CD38 の EC_{50} 値はそれぞれ 0.99 及び 0.96 $\mu\text{g/mL}$ であった。

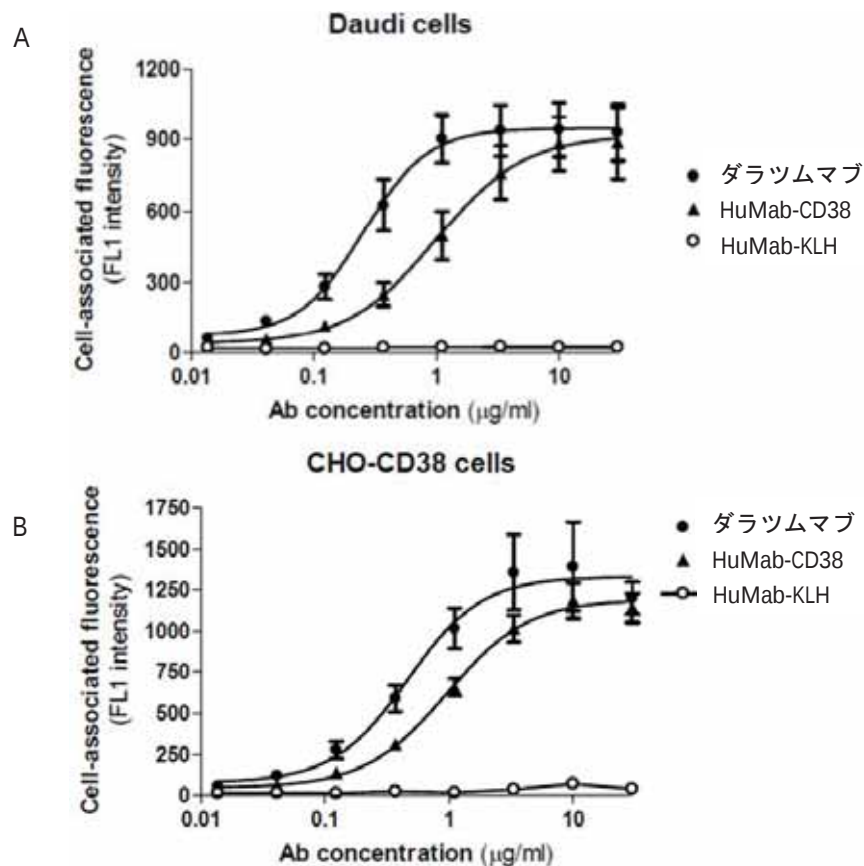


図 2.6.2-3 Daudi 細胞及び CHO-CD38 細胞上の CD38 に対する
ダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合

細胞上のヒト CD38 に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合は、Daudi 細胞及び CHO-CD38 細胞を用いて測定した。10⁵ 個の Daudi 細胞又は CHO-CD38 細胞に、0.01~30 $\mu\text{g/mL}$ のダラツムマブ、HuMab-CD38 又は HuMab-KLH（陰性対照）を加え、細胞を洗浄後にフルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体を添加し、フローサイトメーターにて細胞の蛍光強度を測定した。結果は平均値±標準誤差（SEM）で示す（n=3）。

MM 患者由来の細胞に発現する CD38 に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合について、7 種の MM 患者由来細胞株（UM9, L363, RPMI8226, UM6, XG1, U266 及び UM3），並びに MM 患者骨髄から新鮮分離した MM 細胞を用いて検討した。MM 細胞は、抗 CD138 抗体での対比染色により骨髄腫細胞であることを確認した CD138 陽性細胞を用いた。結合試験は、FITC 標識したダラツムマブ及び HuMab-CD38 を用い、結合量をフローサイトメトリー法にて測定した。

ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は、U266 を除く MM 患者由来細胞株に対して特異的かつ濃度依存的に結合した。各細胞株により CD38 発現量が異なることから、染色強度は細胞株により差があった。RPMI8226 細胞に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合の EC_{50} 値はそれぞれ 0.89 及び 4.86 $\mu\text{g/mL}$ であった。

新鮮分離した 7 例すべての MM 細胞に対し、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は特異的かつ濃度依存的な結合を示した。ダラツムマブは HuMab-CD38 と比較して高い親和性を示した。7 例中 1 例のダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合を図 2.6.2-4 に示す。

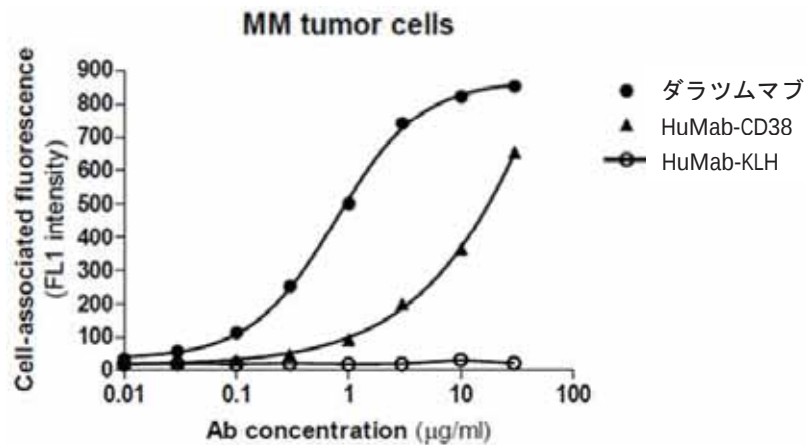


図 2.6.2-4 新鮮分離 MM 腫細胞上の CD38 に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合
患者骨髄より採取した MM 細胞からマウス抗ヒト CD138 抗体での染色により選択した腫瘍細胞を、FITC 標識ダラツムマブ又は HuMab-CD38 で染色し、抗体結合量をフローサイトメトリーにて検出した。

以上より、精製ヒト CD38 タンパク質及び複数の細胞上に発現する CD38 に対し、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は特異的かつ濃度依存的に結合することが示された。

2.6.2.2.1.2 エピトープマッピング

【評価資料 4.2.1.1.2】

ヒト CD38 におけるダラツムマブの結合エピトープは、PEPSCAN 法にて決定した。ヒト CD38 の C 末端 138 残基のアミノ酸配列に対して、重複した直鎖状又はループ状ペプチドを PEPSCAN 法で合成し、これら合成ペプチドとダラツムマブ及び HuMab-CD38 との結合を ELISA 法にてスクリーニングした。また、ヒト CD38 の部位特異的突然変異を作製し、ダラツムマブ又は HuMab-CD38 との結合特異性を ELISA 法にて測定することにより、エピトープマッピングを実施した。

PEPSCAN 法での検討の結果、ダラツムマブはヒト CD38 の C 末端 138 残基のうち、SKRNIQFSCKNIYR 配列 (267~280 位) と EKVQTLEAWVIHGG 配列 (233~246 位) との組合せに対して結合し、特に KRN (268~270 位) と VQTL (235~238 位) を強く認識することが示された。一方、HuMab-CD38 は LEAWVIH (238~244 位) 及び SKRNIQFSCKNIY (267~279 位) に結合した。

ヒト CD38 の部位特異的突然変異は、5 箇所 (199, 202, 237, 272 及び 274 位) のアミノ酸をそれぞれに相当するカニクイザルのアミノ酸に置換し、それぞれの変異体との結合を検討した。ダラツムマブは A199T 及び T237A 変異に対して結合能が低下せず、D202G 及び Q272R 変異に対して顕著に結合能が低下し、S274F 変異では完全に結合能が消失した。HuMab-CD38 のヒト CD38 に対する結合は、いずれの変異にも影響されなかった。

以上の結果から、ダラツムマブと HuMab-CD38 は、ヒト CD38 の C 末端 138 残基の類似した部位に結合するものの、同部位内での結合エピトープは異なっていた。さらに、部位特異的突然変

異による検討から、ダラツムマブの結合には CD38 の 202, 272 及び 274 位のアミノ酸が重要であることが示された。

2.6.2.2.1.3 補体依存性細胞傷害

【評価資料 4.2.1.1.3】

ダラツムマブ及び HuMab-CD38 の CDC 作用について、Daudi-luc, CHO-CD38 細胞及び MM 細胞を用いて検討した。検討に用いたダラツムマブは、親細胞となるハイブリドーマから 1 及び 2 段階の限界希釈で得られたクローン由来の抗体（それぞれ **クローンA*** 及び **クローンB*** ），並びに 2 段階限界希釈クローンの cDNA をヒト胎児腎細胞（HEK）に一過性発現させて得た遺伝子組換え抗体（**クローンC***）を用いた。CDC 作用は、補体含有ヒト血清の存在下で CD38 発現細胞とダラツムマブをインキュベーションし、細胞死の指標であるヨウ化プロピジウム（PI）の取込みにより検討した。

(1) Daudi-luc 細胞を用いた検討

ルシフェラーゼを導入した Daudi 細胞（Daudi-luc 細胞）を用いて検討したところ、ダラツムマブ（**クローンA***）は CDC 作用を誘導し、最大 CDC 作用の平均値は 60%であった。ダラツムマブの平均最大 CDC 作用は陽性対照であるリツキシマブ（84%）より弱かったものの、EC₅₀ 値を比較すると有意に低かった（Student's t-test；P<0.001）（表 2.6.2-2）。HuMab-CD38（**クローンD***）の CDC 作用は弱く、高濃度においてのみ認められた。

表 2.6.2-2 Daudi-luc 細胞に対するダラツムマブ、HuMab-CD38 及びリツキシマブの CDC 作用

試験番号	ダラツムマブ (クローンA*) 最大 CDC 作用 ^a (EC ₅₀) ^b	HuMab-CD38 (クローンD*) 最大 CDC 作用 ^a (EC ₅₀) ^b	リツキシマブ 最大 CDC 作用 ^a (EC ₅₀) ^b
0578-117 DJA	64 (0.15)	63 (59.09)	91 (0.50)
0449-096 DJA	71 (0.15)	58 (47.95)	89 (1.91)
0449-104 DJA	56 (0.44)	—	81 (3.43)
0449-105 DJA	48 (0.34)	—	77 (2.80)
0449-106 DJA	62 (0.19)	—	76 (1.50)
0576-006 KGE	56 (0.21)	56 (90.84)	92 (1.64)
平均値	60* (0.25) [#]	59 (65.96)	84 (1.96)
SD	8 (0.12)	4 (22.26)	7 (1.03)

^a；最大 CDC 作用は、全細胞のうち傷害された細胞の割合を%で示した。

^b；EC₅₀ 値は µg/mL で示した。

結果は平均値±SD で示す（n=6 又は 3）。

*P<0.001 vs リツキシマブ（Student's t-test），[#]P<0.001 vs リツキシマブ（Student's t-test）

ダラツムマブ； **クローンA***，HuMab-CD38； **クローンD***

同様に Daudi-luc 細胞を用い、ダラツムマブのサブクローン（**クローンA*** 及び **クローンB***）間の CDC 作用を比較した。

クローンA* 及び **クローンB*** は同様に CDC 作用を誘導し、EC₅₀ 値も同程度であった（図 2.6.2-5，表 2.6.2-3）。**クローンA*** 及び **クローンB*** の EC₅₀ 値は、同一試験内で検討したリツキシマブと比べて低かった。遺伝子組換え抗体（**クローンC***）も同様に、Daudi-luc 細胞に対し

で強い CDC 作用を誘導した。一方、HuMab-CD38 の遺伝子組換え抗体（**クローンE***）は、Daudi-luc 細胞に対して CDC 作用を示さなかった（表 2.6.2-3）。

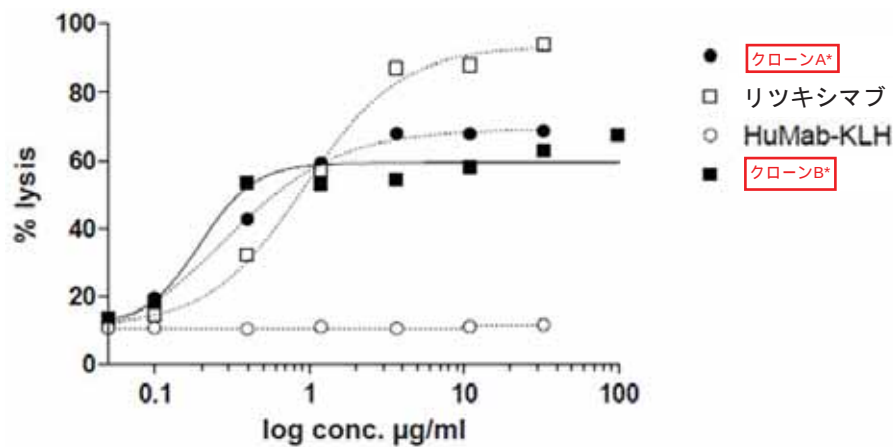


図 2.6.2-5 Daudi-luc 細胞に対するダラツムマブサブクローン間の CDC 作用の比較

Daudi-luc 細胞に希釈した抗体（ダラツムマブ、リツキシマブ及び HuMab-KLH）、補体を含むプールしたヒト血清を加えてインキュベーション後、細胞を PI で染色した。フローサイトメトリーにて死細胞の割合を測定した。サブクローン間の比較は、同一試験（EX3003-0578-127 DJA）内で直接比較した。

ダラツムマブサブクローン； **クローンA***（1 段階限界希釈クローン由来抗体）及び **クローンB***（2 段階限界希釈クローン由来抗体）、HuMab-KLH；ヒト抗 KLH 抗体

表 2.6.2-3 Daudi-luc 細胞に対する CDC 作用におけるダラツムマブサブクローン間の比較

試験番号	ダラツムマブ 最大 CDC 作用 ^a (EC ₅₀) ^b			HuMab-CD38 最大 CDC 作用 ^a (EC ₅₀) ^b	リツキシマブ 最大 CDC 作用 ^a (EC ₅₀) ^b
	クローンA*	クローンB*	クローンC*	クローンE*	-
0578-127 DJA	69 (0.28)	59 (0.20)			93 (0.93)
0578-159 DJA		60 (2.63)	120 (18.91)	n.d.	
0650-021 LUO			100 (0.94)	n.d.	
0650-023 LUO			99 (0.72)	n.d.	
0650-026 LUO		76 (0.17)	65 (0.10)	n.d.	
平均値	69 (0.28)	65 (1.00)	96 (5.17)		93 (0.93)
SD		9 (1.42)	23 (9.17)		

^a；最大 CDC 作用は、全細胞のうち傷害された細胞の割合を%で示した。

^b；EC₅₀ 値は µg/mL で示した。

n.d.；検出限界以下，SD；標準偏差

ダラツムマブサブクローン； **クローンA***（1 段階限界希釈クローン由来抗体），**クローンB***（2 段階限界希釈クローン由来抗体），**クローンC***（遺伝子組換え抗体）

HuMab-CD38； **クローンE***（遺伝子組換え抗体）

(2) CHO-CD38 細胞を用いた検討

CHO-CD38 細胞を用いて同様に検討したところ、ダラツムマブ（**クローンA***）は強い CDC 作用を誘導した（表 2.6.2-4）。HuMab-CD38（1 段階限界希釈クローン由来抗体；**クローンD***）

も同様に CHO-CD38 細胞に対する CDC 作用を誘導したが（EC₅₀ 値；3.65 µg/mL），その EC₅₀ 値はダラツムマブ（EC₅₀ 値；0.21 µg/mL）の約 18 倍であった。

表 2.6.2-4 CHO-CD38 細胞に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の
CDC 作用

試験番号	1 段階限界希釈クローン由来抗体 最大 CDC 作用 ^a (EC ₅₀) ^b		遺伝子組換え抗体 最大 CDC 作用 ^a (EC ₅₀) ^b	
	ダラツムマブ (クローンA*)	HuMab-CD38 (クローンD*)	ダラツムマブ (クローンC*)	HuMab-CD38 (クローンE*)
0449-099 DJA	89 (0.04)	84 (2.421)		
0576-005 KGE	67 (0.37)	50 (4.89)		
0650-021 LUO			76.9 (0.167)	58.1 (2.93)
平均値	78 (0.21)	67 (3.66)		

a ; 最大 CDC 作用は、全細胞のうち傷害された細胞の割合を%で示した。

b ; EC₅₀ 値は µg/mL で示した。

(3) 新鮮分離 MM 細胞を用いた検討

限界希釈クローン由来又は遺伝子組換え抗体のダラツムマブ及び HuMab-CD38 を用い、MM 患者（13 名）の血液から分離した新鮮分離 MM 細胞に対する CDC 作用を検討した。

ダラツムマブの全サブクローンを併合して算出した最大 CDC 作用の平均値（±SD）は、56.92%（±27.87%）であった。評価可能な 12 例の MM 細胞のうち 8 例において、ダラツムマブによる最大 CDC 作用は 48%を超え、残り 4 例の MM 細胞に対する CDC 作用は低かった。

HuMab-CD38 の全クローンを併合して算出した最大 CDC 作用の平均値（±SD）は、13.20%

（±10.81%）であり、検討した MM 細胞のうち 2 例のみが約 30%の CDC 作用を示した。ダラツムマブ及び HuMab-CD38 の作用のばらつきが大きかったことから、EC₅₀ 値は算出できなかった。さらに、CD38 の発現量を測定しなかったことから、MM 細胞間でみられた CDC 作用の違いの原因は不明である。

以上の結果より、CD38 を発現する Daudi-luc 細胞及び CHO-CD38 細胞に対し、クローン由来抗体及び遺伝子組換え抗体のいずれの場合もダラツムマブは強力に CDC 作用を誘導した。さらに、ダラツムマブは検討した大部分の MM 細胞に対して CDC 作用を誘導し、検討した全新鮮分離 MM 細胞での最大 CDC 作用は 56.92%であった。カニクイザル CD38 に反応するサロゲート抗体である HuMab-CD38 は、MM 細胞に対して CDC 作用を誘導するものの弱かった。

2.6.2.2.1.4 抗体依存性細胞傷害

【評価資料 4.2.1.1.4】

ダラツムマブ（ クローンA* ）及び HuMab-CD38（ クローンD* ）の抗体依存性細胞傷害（ADCC）作用について、複数の細胞を用い、*in vitro* 試験で検討した。ADCC 作用は、⁵¹Cr で標識した標的細胞をダラツムマブ及び HuMab-CD38 並びにエフェクター細胞とインキュベーションし、傷害された標的細胞から遊離した ⁵¹Cr 量を測定することにより検討した。

(1) Daudi-luc 細胞を用いた検討

Daudi-luc 細胞を用いて検討したところ、ダラツムマブは ADCC 作用を示した（図 2.6.2-6）。最大 ADCC 作用はエフェクター細胞のドナーに依存したが、ダラツムマブ及び陽性対照である

リツキシマブとの間で同様の反応性を示した（図 2.6.2-6）。EC₅₀ 値の平均は、ダラツムマブで 20.9 ng/mL, HuMab-CD38 で 52.5 ng/mL, リツキシマブで 55.3 ng/mL であった（表 2.6.2-5）。

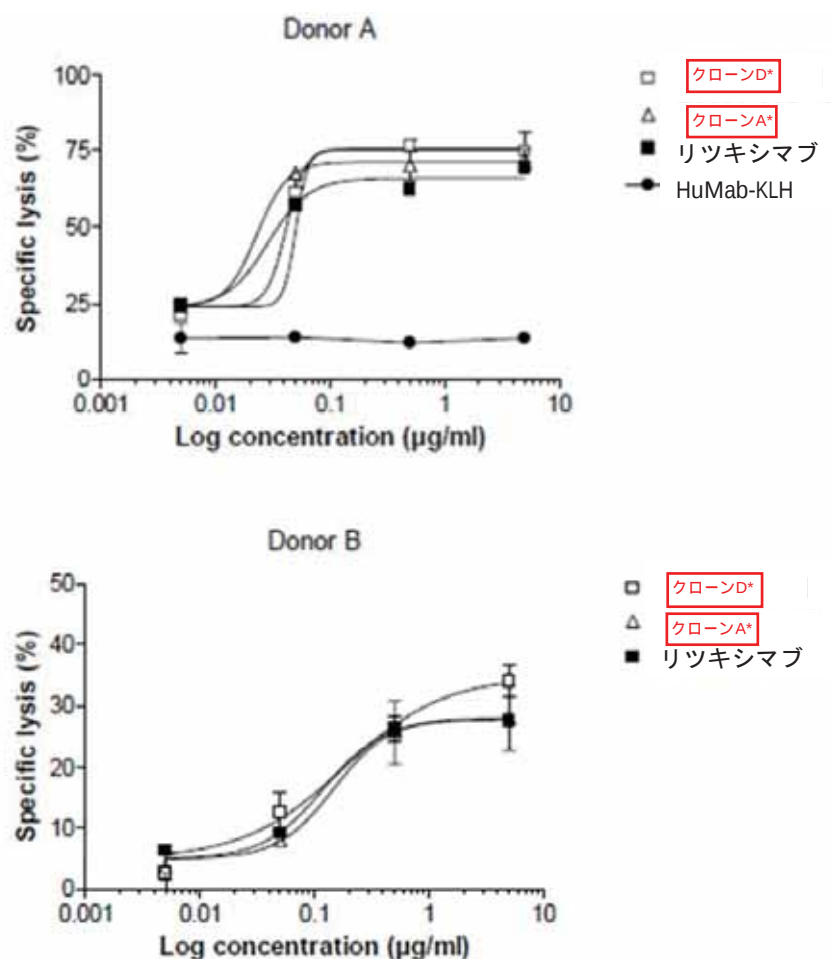


図 2.6.2-6 Daudi-luc 細胞に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の ADCC 作用

エフェクター細胞として、健康成人 2 例の全血より分離した PBMC を用いた（Donor A 及び B）。結果は平均値 ±SD で示す（n=3）。

ダラツムマブ； クローンA* ， HuMab-CD38 ； クローンD*

表 2.6.2-5 Daudi-luc 細胞に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の ADCC 作用

試験番号	最大 ADCC 作用（%特異的傷害）			EC ₅₀ (ng/mL)		
	ダラツムマブ	HuMab-CD38	リツキシマブ	ダラツムマブ	HuMab-CD38	リツキシマブ
578-118 DJA-A	36	42	55	Nc ^a	68	624
578-118 DJA-B	30	31	25	20	102	57
578-122 DJA-A	71	76	66	23	41	29
578-122 DJA-B	28	35	28	147	179	118
449-091 DJA-A	54	56	43	8	37	38
449-091 DJA-B	50	70	51	8	80	53
幾何平均値	36.3	40.2	36.2	20.9	52.5	55.3
信頼区間	27.5～46.8	30.6～51.5	26.9～47.3	5.5～51.1	35.2～74.4	24.8～102.6

^aNc = 非線形回帰は収束しなかった。

(2) MM 由来細胞株を用いた検討

MM 由来細胞株である JK6L 及び AMO-1 細胞を用い、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 の ADCC 作用を検討した。

ダラツムマブ及び HuMab-CD38 はともに、JK6L 細胞に対して濃度依存的に ADCC 作用を誘導した。両抗体間で最大 ADCC 作用に差はみられなかったが、ダラツムマブの EC₅₀ 値

(14 ng/mL) は、HuMab-CD38 (95 ng/mL) に比べて低かった (Student's *t*-test ; *p*<0.001) 。 AMO-1 細胞を用いた検討においても、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は ADCC 作用を示し、ダラツムマブの最大 ADCC 作用 (36.3%) は HuMab-CD38 (25.7%) と比べて強く、ダラツムマブの EC₅₀ 値 (50.5 ng/mL) は HuMab-CD38 (～454.8 ng/mL) と比べて低かった。AMO-1 細胞と比べて JK6L 細胞に対する EC₅₀ 値が低かったのは、JK6L 細胞上の CD38 発現量がより多いためと考えられる。

(3) 新鮮分離 MM 細胞を用いた検討

MM 患者の骨髄より採取した新鮮分離 MM 細胞を用い、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 の ADCC 作用を検討した。

検討した 4 例すべての MM 細胞に対し、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は ADCC 作用を示したが (それぞれ 16.1 及び 20.8%) , 最大 ADCC 作用は細胞間で異なり、また、エフェクター細胞のドナーによっても影響を受けた。

以上の結果より、ダラツムマブが MM 由来の腫瘍細胞を含む血液腫瘍細胞に対して ADCC 作用を有することが示された。

2.6.2.2.1.5 抗体依存性細胞貪食作用

【評価資料 4.2.1.1.5】

In vivo での腫瘍細胞に対するダラツムマブの抗体依存性細胞貪食 (ADCP) 作用を評価するため、Fc 領域の 1 アミノ酸残基を置換することにより補体活性化を欠損した変異型 (DARA-K322A) , 更に IgG2 へアイソタイプスイッチすることにより貪食能を欠損した変異型 (DARA-IgG2-K322A) のダラツムマブを作製した。変異型の機能の喪失を *in vitro* で確認するため、ダラツムマブ又は変異型ダラツムマブ存在下でのマウスマクロファージ (F4/80 陽性細胞) による Daudi 細胞 (CD19 陽性細胞にカルセインで標識) の貪食をフローサイトメトリー法にて測定した。

これら変異型ダラツムマブのマウスマクロファージによる ADCP 作用を確認したところ、DARA-IgG2-K322A は ADCP 作用を欠損していた (図 2.6.2-7) 。

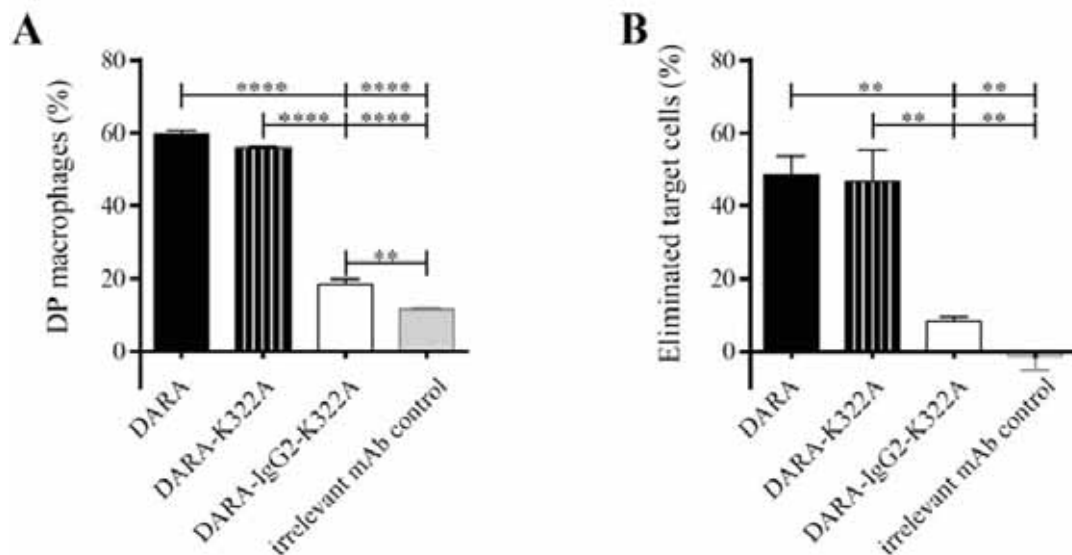


図 2.6.2-7 ダラツムマブ及び変異型ダラツムマブのマクロファージ介在性貪食能

ダラツムマブ及び変異型ダラツムマブ（DARA-K322A 及び DARA-IgG2-K322A）存在下（各 1 µg/mL）でのマウスマクロファージによる Daudi 細胞の貪食を測定。エフェクター細胞と標的細胞比は 1:1 とした。F4/80 はマウスマクロファージのマーカー、カルセインは標的細胞の標識、CD19 は標的細胞のマーカーとして用いた。

A；貪食率；Daudi 細胞を貪食したマクロファージとして、二重陽性（DP; double positive）マクロファージ（F4/80 陽性、カルセイン陽性及び CD19 陰性）を検出した。

B；標的細胞除去率； $100 - (\text{抗体存在下での F4/80 陰性細胞数} / \text{抗体非存在下での F4/80 陰性細胞数} \times 100\%)$ により算出した。

結果は平均値±SEM（n=3）で示す。**P<0.01, ****P<0.0001, Bonferroni's multiple comparison test

Daudi-luc 細胞を皮下移植したマウスモデルにおいて、補体活性化を欠損した DARA-K322A 変異型は、更に貪食能も欠損した DARA-IgG2-K322A 変異型と比べ、有意に強い抗腫瘍効果を示した（図 2.6.2-8A）。また、Daudi-luc 細胞を静脈内移植したマウスモデルにおいて、細胞移植日に変異型ダラツムマブを腹腔内投与したところ、同様に DARA-K322A 変異型は DARA-IgG2-K322A 変異型と比べて有意な抗腫瘍効果を示した（図 2.6.2-8B）。

以上の結果より、ダラツムマブの *in vivo* 抗腫瘍効果に ADCP 作用が寄与していることが示唆された。

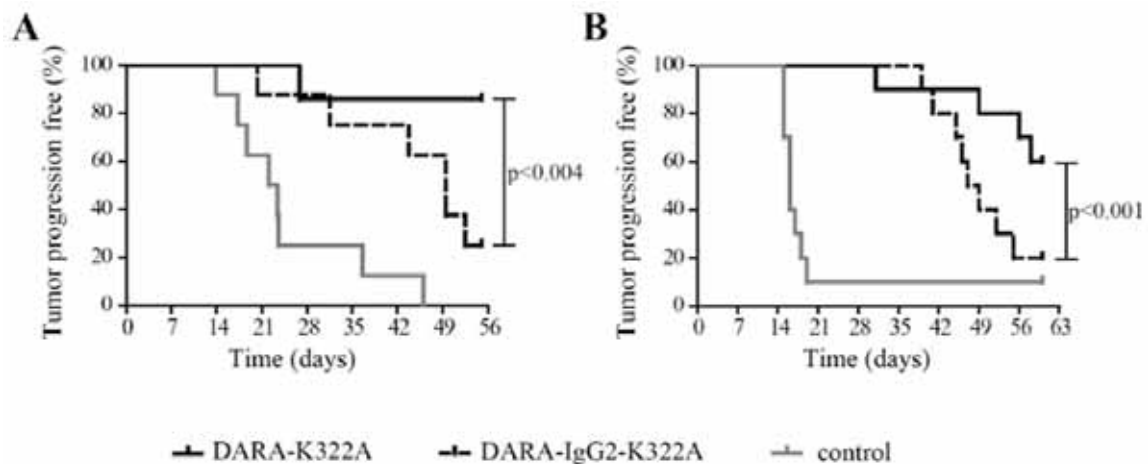


図 2.6.2-8 *In vivo* 抗腫瘍効果に対するダラツムマブの食食能の関与

A ; Daudi-luc 細胞を SCID-BEIGE マウス（各群 8 例）の皮下に移植したモデルにおける腫瘍無増悪期間（カットオフ値は腫瘍容積 $>800 \text{ mm}^3$ に設定）を示す Kaplan-Meier プロット。細胞移植日に変異型ダラツムマブ又は対照として IgG1-b12 を $250 \mu\text{g}/\text{匹}$ （ $\sim 12.5 \text{ mg/kg}$ ）腹腔内投与した。DARA-IgG2-K322A と比べ、DARA-K322A は有意に腫瘍増殖を抑制した（ $P<0.004$ ，無増悪期間の Mantel-Cox ログランク検定）。

B ; Daudi-luc 細胞を SCID-BEIGE マウス（各群 10 例）に静脈内移植したモデルにおける腫瘍無増悪期間（カットオフ値は生物発光 $>50,000 \text{ cpm}$ に設定）を示す Kaplan-Meier プロット。細胞移植日に変異型ダラツムマブ $10 \mu\text{g}/\text{匹}$ （ $\sim 0.5 \text{ mg/kg}$ ）又は対照としてリン酸緩衝生理食塩液（PBS）を腹腔内投与した。

IgG1-b12 ; HIV-1 の gp120 エンベロープ糖タンパク質特異的 mAb

これらのマウスで得られた結果をヒトの細胞で確認するため、MM 患者由来細胞を用い、ダラツムマブによるヒト単球由来マクロファージを介した ADCP 作用を *in vitro* で検討した。

検討した 12 例のうち 11 例の MM 患者由来細胞に対し、ダラツムマブはヒトマクロファージを介した食食作用を誘導した（図 2.6.2-9A）。ダラツムマブによる ADCP 作用は MM 患者の細胞間でばらつきがあったが、CD38 発現量が低い MM 細胞（ $\sim 35,000$ 分子/細胞，患者番号 11）に対しても ADCP 作用がみられた（図 2.6.2-9B）。CD38 発現量と ADCP 作用との相関性は明らかではなかったが、CD38 発現量が顕著に低い 1 例（ $\sim 10,000$ 分子/細胞，患者番号 6）は、ダラツムマブによる ADCP 作用がみられなかった（図 2.6.2-9B）。

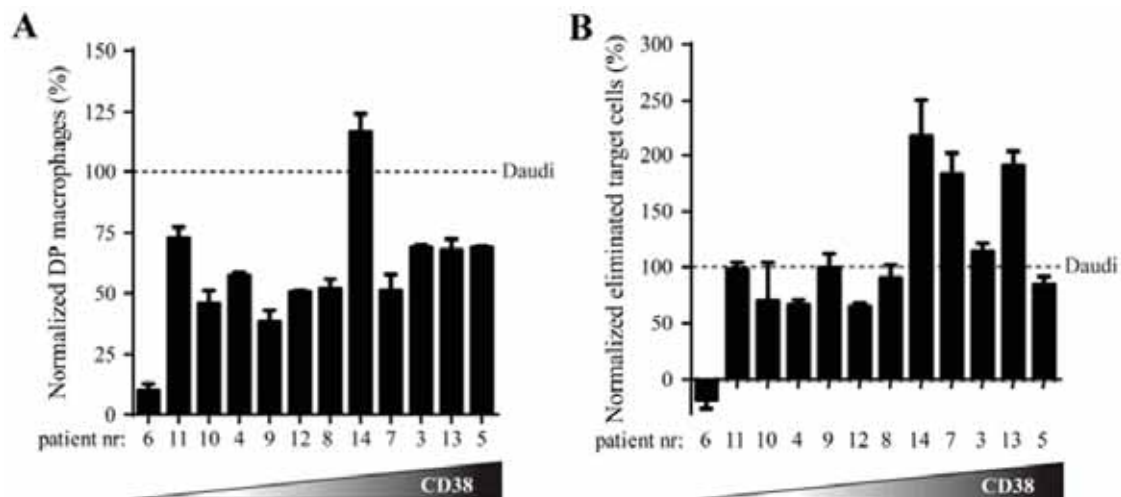


図 2.6.2-9 ダラツムマブによるヒトマクロファージを介した

MM 患者由来細胞に対する貪食作用

ダラツムマブ (1 $\mu\text{g/mL}$) 存在下で、健康成人より採取したヒトマクロファージと MM 患者由来細胞をインキュベーションした (エフェクター細胞と標的細胞比は 2:1)。異なるドナーから採取したヒトマクロファージのバッチ間の力価を補正するため、内部標準として同一試験で測定した Daudi-luc 細胞と MM 患者由来細胞の比を算出することにより結果を標準化した。12 例の患者より採取した細胞は、CD38 発現量の順に患者番号 6 (最低発現量; 10,000 分子/細胞) から患者番号 5 (最高発現量; 550,000 分子/細胞) まで並べた。

A; 標準化 DP マクロファージの割合 (%), B; 標準化標的細胞除去の割合 (%)

結果は平均値 $\pm$ SEM で示す (n=3)。DP; CD11b 及びカルセインに二重陽性, patient nr; 患者番号

以上の結果より、マクロファージを介した腫瘍細胞に対する ADCP 作用がダラツムマブの作用機序の一つであり、MM 及び他の血液腫瘍に対するダラツムマブの臨床効果を示唆するものと考えられる。

2.6.2.2.1.6 CD38 酵素活性に対する作用

【評価資料 4.2.1.1.6】

組換え CD38 タンパク質又は CD38 発現細胞を用い、CD38 の酵素活性であるシクラーゼ活性及びヒドロラーゼ活性に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の作用を検討した。

シクラーゼ活性: CD38 の有するアデノシン二リン酸 (ADP) リボシルシクラーゼ活性は、酵素源として組換え CD38 タンパク質又は CHO-CD38 細胞を、基質としてニコチンアミドグアニンジヌクレオチド (NGD) 又は 8 アミノ-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (8NH₂-NAD) を用いて測定した。基質として NGD を用いた試験系では、産生されるサイクリックグアノシン二リン酸リボース (cGDPR) を蛍光プレートリーダーにて測定した。基質として 8NH₂-NAD を用いた試験系では、産生される 8 アミノ-サイクリックアデノシン二リン酸リボース (8NH₂-cADPR) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。

NGD を基質として用いた試験系において、ダラツムマブは組換え CD38 タンパク質 (図 2.6.2-10A) 及び CHO-CD38 細胞 (図 2.6.2-10B) のシクラーゼ活性を濃度依存的に阻害した。一方、HuMab-CD38 はシクラーゼ活性を阻害しなかった。8NH₂-NAD を基質として用いた試験系におい

でも、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は $8\text{NH}_2\text{-cADPR}$ の産生を濃度依存的に阻害した。検討した最高濃度 ($30\text{ }\mu\text{g/mL}$) のダラツムマブ及び HuMab-CD38 は、 $8\text{NH}_2\text{-cADPR}$ の産生をそれぞれ約 40 及び 25% 阻害した (図 2.6.2-11)。

ヒドロラーゼ活性：CD38 の有する cADPR ヒドロラーゼ活性は、酵素源として組換え CD38 タンパク質を用い、cADPR を基質として産生される ADPR を HPLC にて、 $^{32}\text{P}\text{-cADPR}$ を基質として産生される $^{32}\text{P}\text{-ADPR}$ を薄層クロマトグラフィー (TLC) にて測定した。

両測定系での結果は同様で、ダラツムマブは cADPR の加水分解を促進する一方で、HuMab-CD38 は cADPR の加水分解を阻害した (図 2.6.2-12)。ダラツムマブは $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ でヒドロラーゼ活性を 65% 亢進し、HuMab-CD38 は $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ で最大ヒドロラーゼ活性を 35% 阻害した。これらの作用は濃度依存的であり、ダラツムマブの促進作用 (EC_{50} 値) は $1.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、HuMab-CD38 の阻害作用 (IC_{50} 値) は $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ であった。

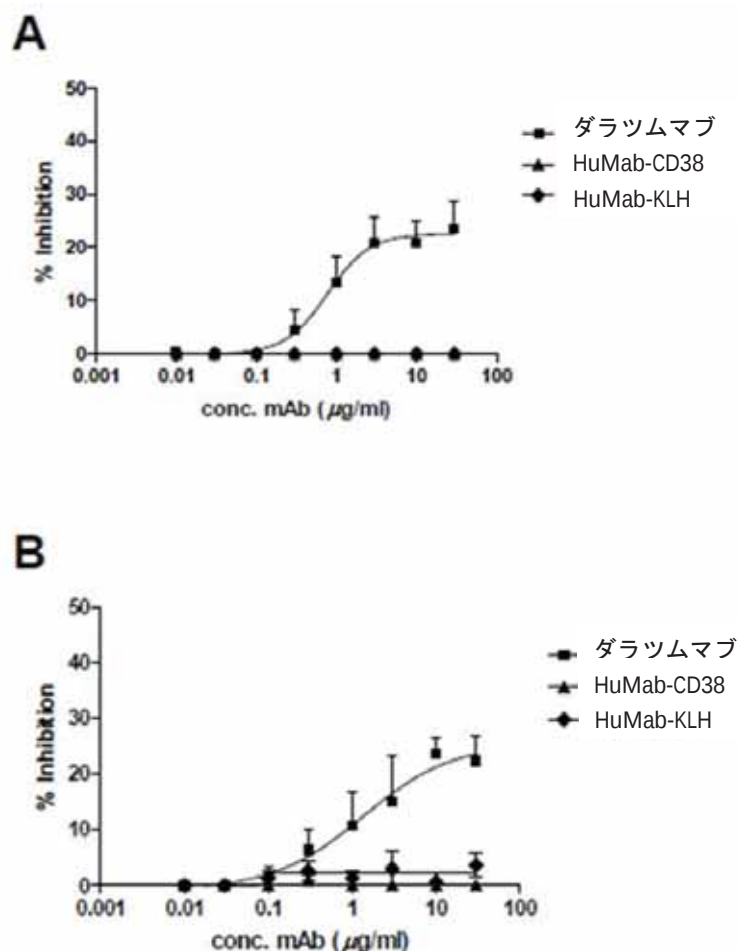


図 2.6.2-10 CD38 シクラーゼ活性に対するダラツムマブの濃度依存的阻害作用

His 標識組換え CD38 タンパク質 (A) 又は CHO-CD38 細胞 (B) とダラツムマブ又は HuMab-CD38 (最終濃度 0.03, 0.3, 3 及び $30\text{ }\mu\text{g/mL}$) をインキュベーション後、基質として NGD (80 mmol/L) を添加し、NGD より産生した cGDPR を Envision 蛍光プレートリーダーにて測定した (励起波長; 340 nm , 蛍光波長; 430 nm)。結果は平均値 $\pm$ SEM で示す ($n=3$, 2 回の反復試験結果)。

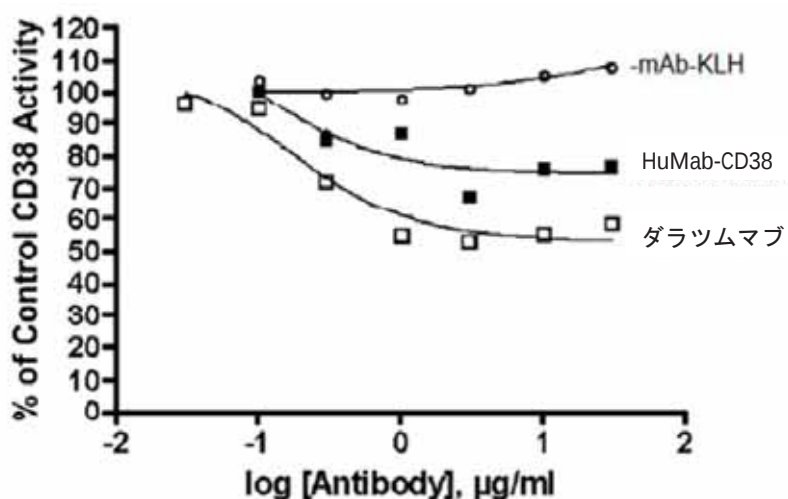


図 2.6.2-11 8NH₂-cADPR 産生に対するダラツムマブの濃度依存的阻害作用

組換え CD38 タンパク質とダラツムマブ又は HuMab-CD38（最終濃度 0.03, 0.3, 3 及び 30 μg/mL）をインキュベーション後、8NH₂-NAD の添加によりシクラーゼ反応を開始した。フィルター濾過により反応停止後、反応液を逆相 HPLC にて測定した。

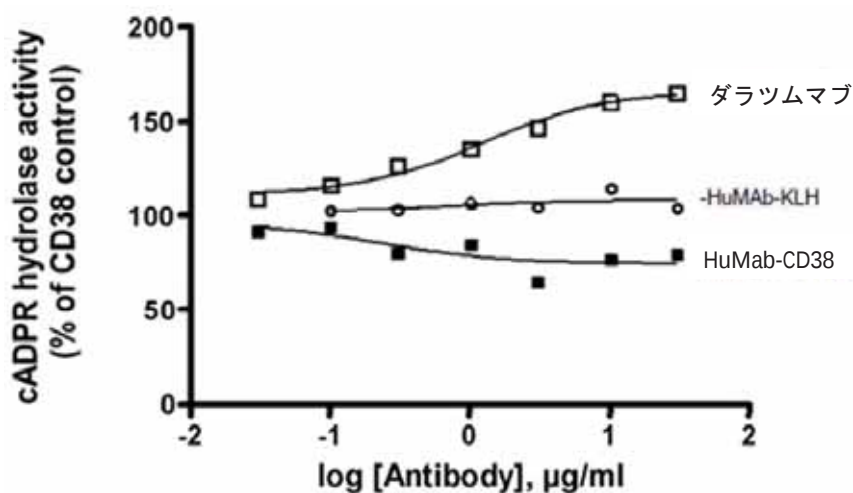


図 2.6.2-12 cADPR 産生に対するダラツムマブの濃度依存的促進作用

cADPR ヒドロラーゼ反応は、組換え CD38 タンパク質とダラツムマブの混合液 40 μL に 4.3 mmol/L の cADPR を添加することにより開始した。インキュベーション後、ADPR 産生量を HPLC にて定量した。

2.6.2.2.1.7 アポトーシス誘導

【評価資料 4.2.1.1.7, 評価資料 4.2.1.1.8】

ダラツムマブの CD38 発現細胞に対する直接的なアポトーシス誘導について、各種細胞及びマウスを用いて検討した。

(1) *In vitro* での検討

遺伝子組換えダラツムマブ (P273934) 及びクローン由来の HuMab-CD38 を用いた検討において、Ramos 細胞にダラツムマブ若しくは HuMab-CD38 を単独又は抗ヒト IgG 抗体とともに添加し、24 時間後に annexin-V/PI 染色又は caspase-3 活性染色によりアポトーシス誘導を検出した。

いずれの抗体も単独では annexin-V/PI 陽性細胞を誘導しなかったが、抗ヒト IgG 抗体を添加した場合、陰性対照抗体と比べ、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は annexin-V/PI 強陽性細胞を増加させた。陽性細胞率は、ダラツムマブで $72 \pm 18\%$ (平均値 $\pm$ SD, $p=0.002$ vs 溶媒対照), HuMab-CD38 で $84 \pm 13\%$ であった (図 2.6.2-13A)。同様に、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は caspase-3 活性陽性細胞の割合を上昇させた (平均値 $\pm$ SD は、それぞれ $46 \pm 10\%$ 及び $38 \pm 9\%$, $p < 0.0001$ vs 陰性対照抗体, 図 2.6.2-13B)。

Fc γ に特異的な抗ヒト IgG 抗体により架橋されたダラツムマブのアポトーシス誘導作用は、3 種類の細胞株 (Ramos, OPM-1 及び Daudi-luc 細胞) を用いても検討した (表 2.6.2-6)。

これらの検討から、ダラツムマブ ($1 \mu\text{g/mL}$) は細胞上の CD38 への結合によりアポトーシスを誘導し、この作用には Fc 領域の架橋形成が必要であることが示唆された。

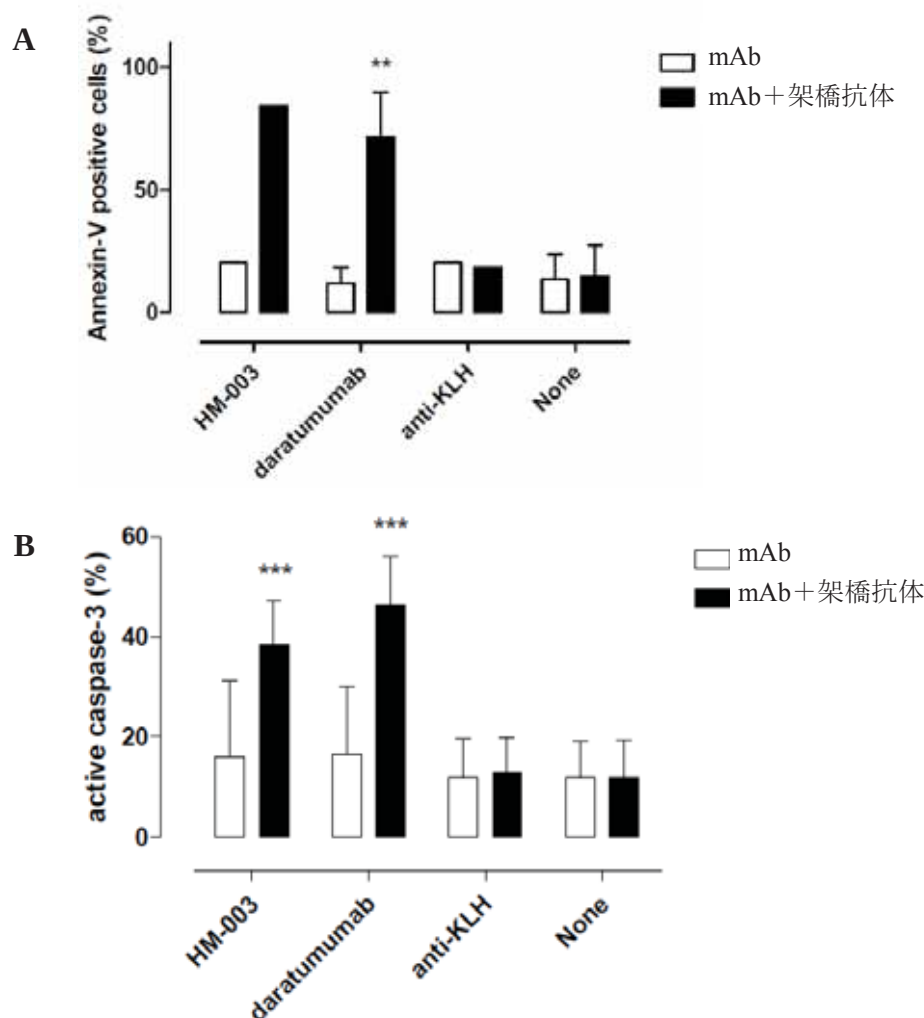


図 2.6.2-13 二次抗体による架橋形成後のアポトーシス誘導

ダラツムマブ, HuMab-CD38 又は陰性対照抗体である HuMab-KLH 単独 (1 µg/mL), 若しくはこれらを架橋抗体 (抗ヒト IgG 抗体, 10 µg/mL) とともに Ramos 細胞に添加した。

A ; FITC 標識 annexin V 及び PI で染色。ダラツムマブ及び溶媒対照の結果は平均値±SD (n=5) で示し, HuMab-CD38 及び HuMab-KLH の結果は平均値 (n=2) で示す。

B ; caspase-3 活性を測定。結果は陽性細胞率の平均値±SD (n=3) で示す。

p = 0.002, ダラツムマブ vs 溶媒対照 (Student's t-test) ; *p < 0.0001, vs HuMab-KLH 又は溶媒対照 (Repeated Measures ANOVA, post hoc Tukey test)

HM-003 ; HuMab-CD38, daratumumab ; ダラツムマブ, None ; 溶媒対照, mAb ; モノクローナル抗体, FITC ; フルオレセインイソチオシアネート, PI ; ヨウ化プロピジウム

ダラツムマブ ; XXXXXXXXXX, HuMab-CD38 ; クローンD*

表 2.6.2-6 CD38 発現細胞に結合したダラツムマブの架橋によるアポトーシスの誘導

試験番号	Annexin V / PI ^a			Caspase-3 ^a		
	Ramos	OPM-1	Daudi-luc	Ramos	OPM-1	Daudi-luc
3003-2050-350	39.6	13.8	17.3	24.1	7.8	7.5
3003-2050-352	40.6	10.5	24.0	46.5	23.1	22.1
3003-2050-365	49.6	19.9	23.8	39.6	21.4	19.3
平均値 (SD)	43.3 (5.5)	14.7 (4.8)	21.7 (3.8)	36.7 (11.5)	17.4 (8.4)	16.3 (7.7)

^a ; 結果は (ダラツムマブ投与群のアポトーシス誘導率) - (対照群のアポトーシス誘導率) で示した。

さらに、遺伝子導入によりヒト CD38 発現を増強した MM 細胞株（L363-CD38 及び UM9-CD38 細胞）においても、ダラツムマブによるアポトーシス誘導における Fc 領域架橋の関与を検討した。

Ramos, OPM-1 及び Daudi-luc 細胞株においてみられたのと同様に、L363-CD38 及び UM9-CD38 細胞においてもダラツムマブと抗ヒト IgG 抗体の添加により、annexin-V 陽性、ミトコンドリア膜電位の消失及び 7-アミノアクチノマイシン D（7-AAD）染色陽性細胞数の増加を指標としたアポトーシスの誘導がみられた。

ダラツムマブによるアポトーシス誘導をより生理的な条件下で検討するために、Fcγ 受容体（FcγR）を発現する細胞を用い、標的細胞上に結合したダラツムマブの Fc 領域の架橋形成を検討した。この検討では、FcγR 発現細胞としてマウス B 細胞リンパ腫の細胞株にヒト FcγRI を導入した IIA1.6-hFcγRI 細胞（ADCC 誘導能無し）を用いた。

ダラツムマブを細胞表面に結合してオプソニン化された L363-CD38 又は UM9-CD38 細胞と IIA1.6-hFcγRI 細胞を共培養したところ、annexin-V 陽性細胞数が増加（図 2.6.2-14A）し、ミトコンドリア膜電位の消失（図 2.6.2-14B）、7-AAD 染色陽性細胞数の増加（図 2.6.2-14C）がみられた。ダラツムマブによりオプソニン化された L363-CD38 及び UM9-CD38 細胞とヒト FcγRI 陰性の IIA1.6 細胞との共培養では、アポトーシスの誘導はみられなかった（データ示さず）ことから、ダラツムマブを介したアポトーシス誘導は Fc 領域の架橋形成に依存することが確認された。

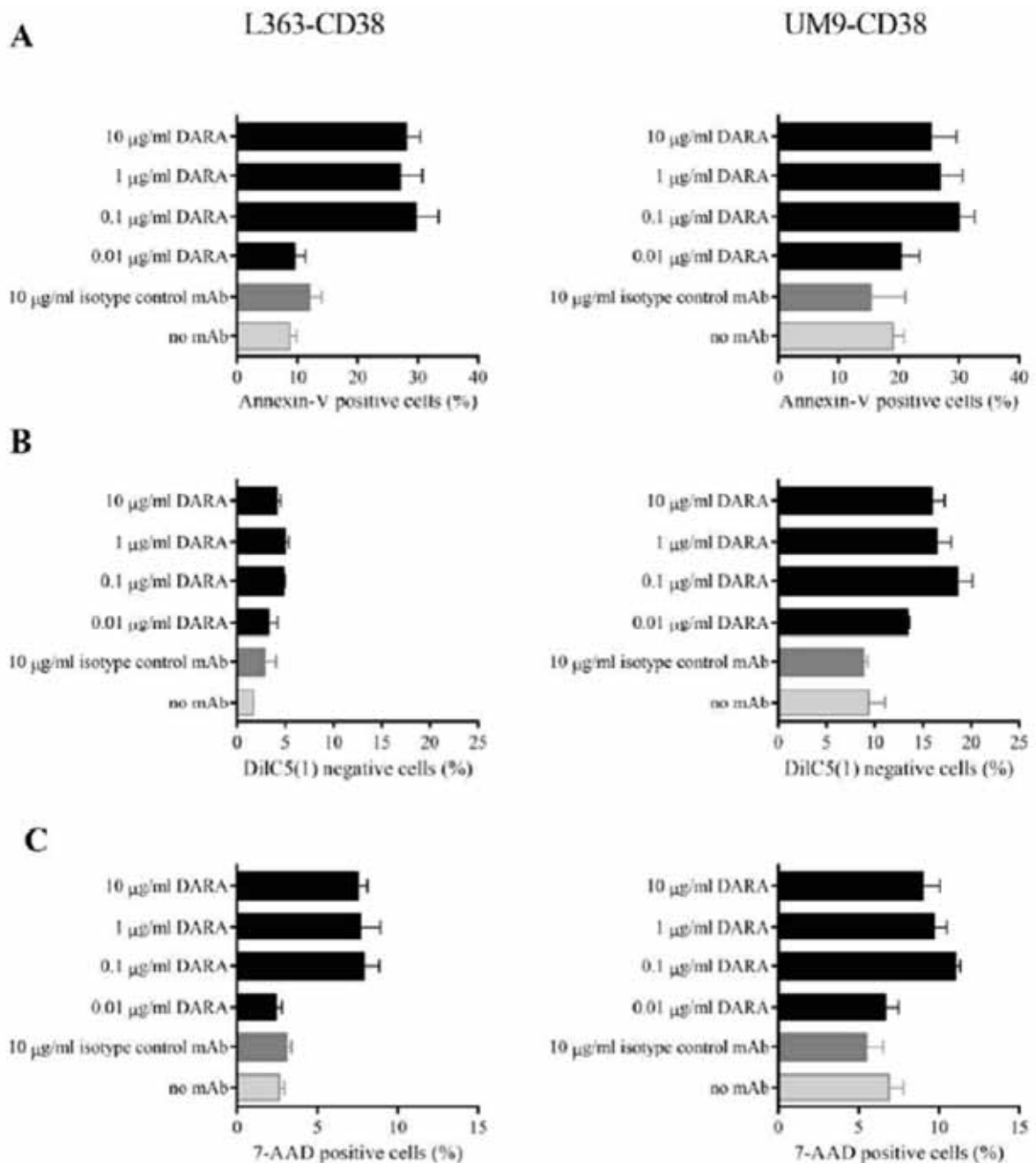


図 2.6.2-14 細胞上の FcγR を介した架橋形成によるアポトーシスの誘導

GFP 導入 L363-CD38 細胞 (左パネル) 又は CFSE 標識 UM9-CD38 細胞 (右パネル) を、各種抗体存在下で IIA1.6-hFcγRI 細胞と 1:1 の割合で 24 時間共培養した。

A ; Flow cytometry 解析による annexin-V 陽性細胞率, B ; ミトコンドリア膜電位の消失, C ; 7-AAD 陽性細胞 (すなわち死細胞) 率

結果は平均値±SD で示す (n=3)。

DARA ; ダラツムマブ, isotype control mAb ; HIV-1 gp120 エンベロープ糖タンパク質特異的モノクローナル抗体 (IgG1 b12) で、陰性対照抗体として用いた。7-AAD ; 7-アミノアクチノマイシン D, CFSE ; カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル, GFP ; 緑色蛍光タンパク質

(2) *In vivo* での検討

FcγR を介する抗体の架橋形成は、FcγR を発現する様々な細胞 (多形核白血球, NK 細胞, 単球, マクロファージ又は内皮細胞など) により形成される可能性があるため, NOTAM マウス及び FcRγ 鎖ノックアウト (FcRγ^{-/-}) マウスの同種腹膜腫瘍モデルを用い, *in vivo* 試験を実施した。

FcR $\gamma^{-/-}$ マウスの白血球は、すべての活性化型 Fc γ R を発現せず、抑制型 Fc γ RIIb だけを発現している。NOTAM マウスは、すべての活性化型 Fc γ R が細胞表面で正常に発現しているが、FcR と会合する γ 鎖のシグナル伝達を欠損している⁶⁾ (図 2.6.2-15A)。そのため、NOTAM マウスの白血球は Fc γ R を介した抗体との架橋形成は可能であるものの、ADCC 又は貪食を介した細胞傷害作用を誘導しない。また、CDC 作用を欠損する DARA-K322A【CTD 2.6.2.2.1.5 参照】を用いることにより、ドラツムマブの CDC 誘導作用も排除した。マウスリンパ腫細胞 (EL4) に CD38 を導入した EL4-CD38 細胞を CFSE で標識し、NOTAM マウス及び FcR $\gamma^{-/-}$ マウスの腹腔内に移植後、ただちに 1 匹あたり 2 μ g の DARA-K322A (~ 0.1 mg/kg) を腹腔内投与した。投与 4 時間後に CFSE 標識 EL4-CD38 細胞を腹腔内洗浄により採取し、annexin-V 及び 7-AAD 染色陽性細胞をフローサイトメトリー法にて解析した (図 2.6.2-15B)。

FcR $\gamma^{-/-}$ マウスにおいて DARA-K322A は、annexin-V 陽性細胞の増加及び 7-AAD 陽性細胞数の有意な増加を誘導した (図 2.6.2-15C 及び D, 各図の上段) ことから、抑制型 Fc γ RIIb を介した DARA-K322A の架橋形成は、*in vivo* における腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するために十分であることを示している。NOTAM マウスにおいても、DARA-K322A 投与は annexin-V 及び 7-AAD 陽性細胞の有意な増加を示した (図 2.6.2-15C 及び D, 各図の下段)。

さらに、いずれの Fc γ R がアポトーシス誘導に重要であるかを探索するため、Fc γ RIIb を特異的に阻害する mAb K9.361 の F(ab')₂ フラグメントをマウスに前投与して検討した (図 2.6.2-15A 右)。FcR $\gamma^{-/-}$ マウスにおいて、Fc γ RIIb の阻害により、DARA-K322A によるアポトーシス誘導は消失した (図 2.6.2-15E 及び F, 各図の上段)。一方、NOTAM マウスにおいては、Fc γ RIIb を阻害した場合でもアポトーシスが誘導されたことから、*in vivo* でのドラツムマブの架橋形成を介したアポトーシスの誘導には、抑制型 Fc γ RIIb に加え、マウス活性化型 Fc γ R (Fc γ RI, Fc γ RIII 及び Fc γ RIV) も関与することが示された (図 2.6.2-15E 及び F, 各図の下段)。

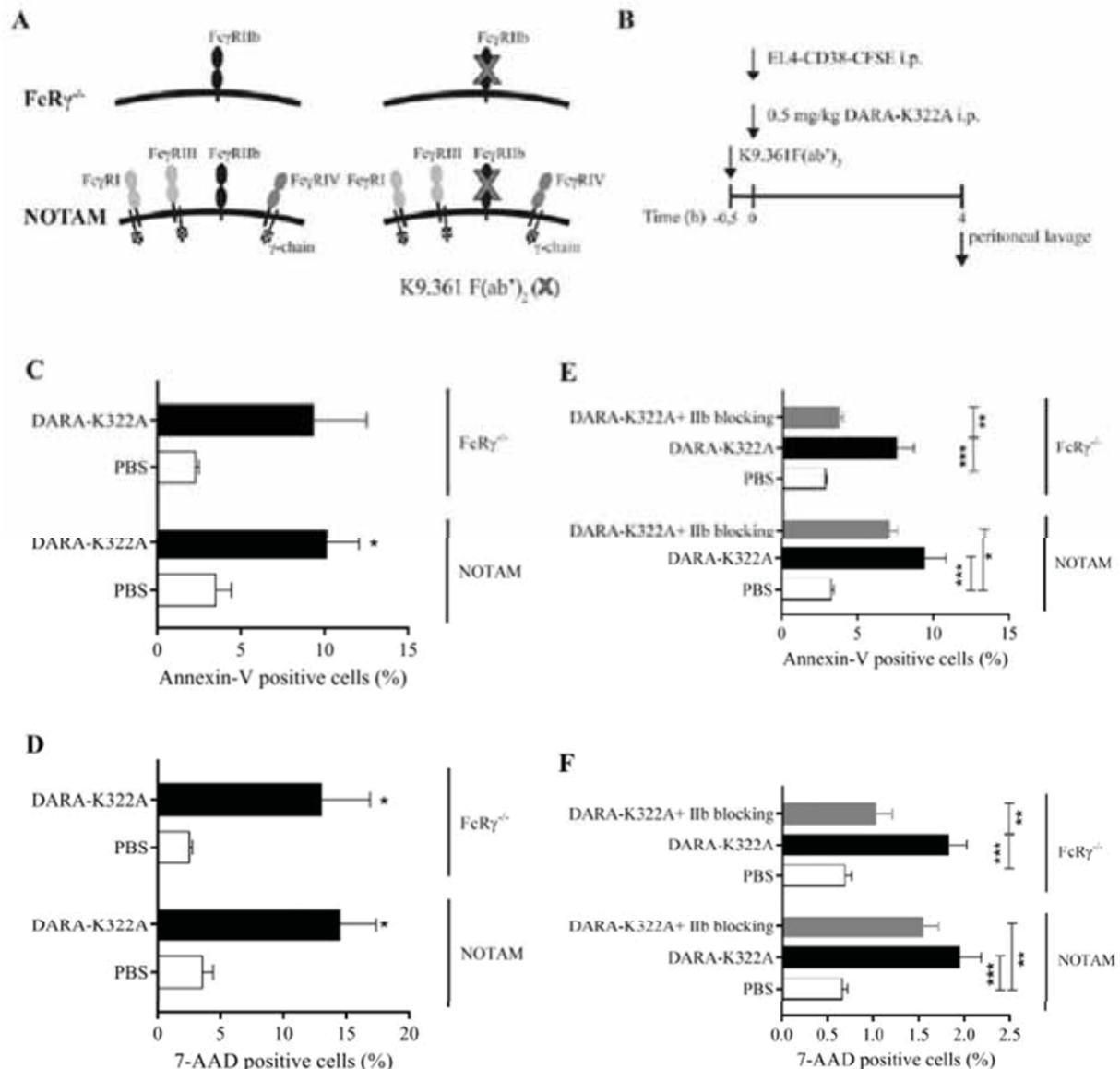


図 2.6.2-15 活性化型及び抑制型 FcγR によるドラツムマブの架橋形成を介した *in vivo* での腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導

A ; 異なるマウスモデルにおける FcγRs 発現の概要

B ; 同種腹膜腫瘍マウスモデルの試験デザイン ; 腫瘍細胞の移植 30 分前に, FcγRIIb を阻害する F(ab')₂ フラグメント (K9.361 F(ab')₂) を NOTAM 及び FcRγ^{-/-} マウスに投与した。続いて CFSE 標識 EL4-CD38 細胞 5×10^6 個を腹腔内に移植後, DARA-K322A (2 μg/匹) 又は PBS を投与した。4 時間後に腹膜洗浄液中の腫瘍細胞をフローサイトメトリーにより解析した。

C 及び E ; annexin-V 陽性細胞率, D 及び F ; 7-AAD 陽性細胞率

結果は平均値±SD で示す (n=4~6), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, [unpaired t-test (C, E), Bonferroni's multiple comparison test (D, F)]

CFSE ; カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル, PBS ; リン酸緩衝生理食塩液, 7-AAD ; 7-アミノアクチノマイシン D

以上の *in vitro* 及び *in vivo* 試験より, CD38 発現リンパ腫細胞又は MM 細胞に結合したドラツムマブが, 抗 Fc 抗体又は FcγR を介して架橋を形成し, 腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することが示された。さらに, 抑制型 FcγRIIb 及び活性化型 FcγR はいずれも, 腫瘍細胞に結合したドラツムマブによる架橋形成を仲介し, その結果, アポトーシスをもたらすことが示された。したがっ

て、FcγR を介した架橋形成によるアポトーシスの誘導がダラツムマブの抗腫瘍効果に寄与する可能性が示唆された。

2.6.2.2.2 抗腫瘍効果

ダラツムマブのヒトリンパ腫細胞に対する *in vivo* での抗腫瘍効果について、マウス異種移植モデルを用いて予防及び治療効果を検討した。

2.6.2.2.2.1 予防効果

【評価資料 4.2.1.1.9, 評価資料 4.2.1.1.10】

SCID マウスに Daudi-luc 細胞（バーキットリンパ腫由来細胞株である Daudi 細胞にルシフェラーゼを導入）を静脈内に移植後、同日にダラツムマブ、HuMab-CD38 又は対照のアイソタイプ抗体（HuMab-KLH）を腹腔内投与（100 µg/匹、各群 6 例）して予防効果を検討した（GMB3003-007）。ルシフェリンを腹腔内投与し、ルシフェラーゼ発現リンパ腫の増殖を生物発光イメージング法にて測定した。

ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は腫瘍増殖を完全に抑制した。

予防効果の用量反応性を検討するため、SCID マウスに Daudi-luc 細胞を移植後、同日にダラツムマブを腹腔内投与（10, 1, 0.1 及び 0.01 µg/匹、各群 6 又は 8 例）し、抗腫瘍効果に必要な最小用量を算出した（GMB3003-017）。

対照の HuMab-KLH と比べ、ダラツムマブはすべての用量で有意な抗腫瘍効果を示した（ $p < 0.001$ ）。また、すべての試験日で用量反応性がみられ、50%有効用量は 0.0013 µg/匹 [95% 信頼区間 (CI) : 0.00036 µg ~ 0.0043 µg] であり、これは 0.065 µg/kg に相当する（95% CI : 0.018 µg/kg ~ 2.15 µg/kg）。

2.6.2.2.2.2 治療効果

【評価資料 4.2.1.1.9】

ダラツムマブ及び HuMab-CD38 の治療効果は、各抗体の投与量及び投与時期の異なる 2 試験を実施して検討した。

最初の試験では、SCID マウスに Daudi-luc 細胞を静脈内移植した 7 日後、ダラツムマブ、HuMab-CD38 又は HuMab-KLH（300 µg/匹、各群 4 又は 5 例）を腹腔内に投与し、同様に腫瘍の増殖を生物発光イメージング法にて測定した。

試験 28 及び 34 日目において、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 はいずれも、対照の HuMab-KLH と比べて腫瘍増殖を有意に抑制した（図 2.6.2-16A）。試験 55 日目に HuMab-CD38 の腫瘍増殖はダラツムマブより軽度には減少したが、いずれも陽性対照抗体であるリツキシマブ投与と差はなかった。

次の試験では、SCID マウスに Daudi-luc 細胞を静脈内移植した 14 日後、ダラツムマブ、HuMab-CD38 又は対照抗体（10 µg/匹、各群 6 例）を腹腔内に投与し、同様に腫瘍の増殖を測定した。

試験終了時（試験 49 日）に、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は対照の HuMab-KLH と比べて腫瘍増殖を有意に減少させ、リツキシマブ投与とは有意差はみられなかった（図 2.6.2-16B）。

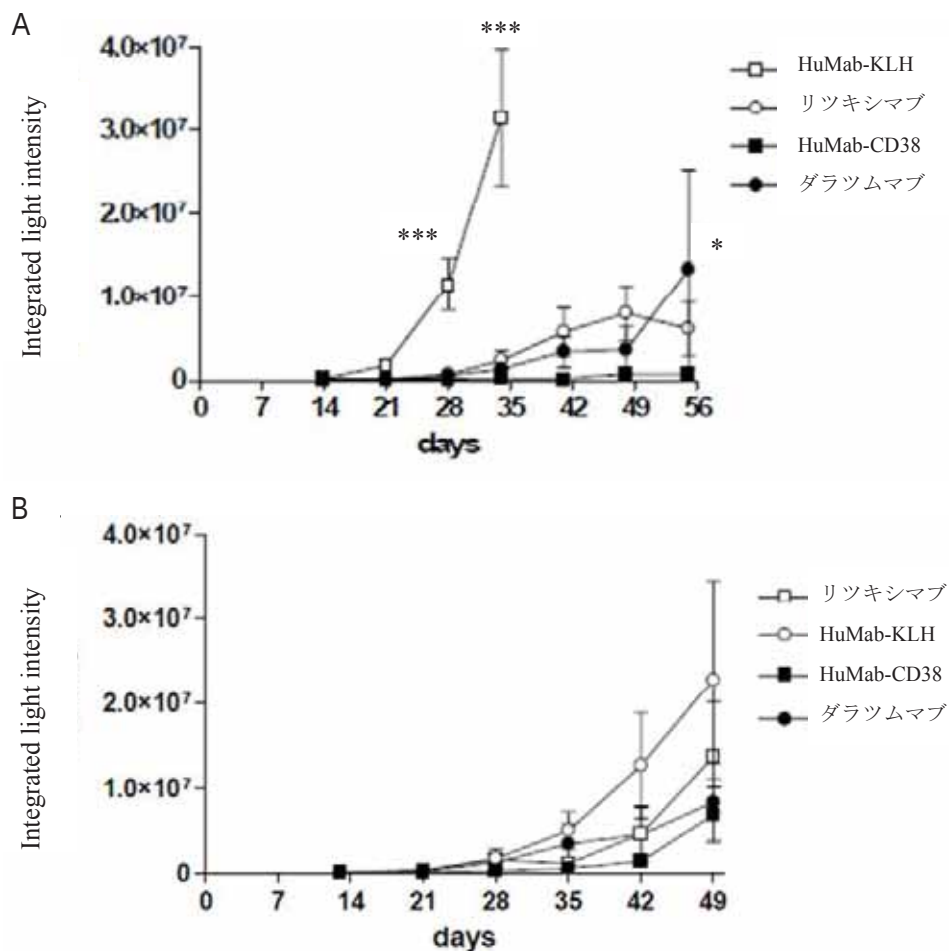


図 2.6.2-16 ヒトリンパ腫細胞異種移植マウスモデルにおけるダラツムマブの抗腫瘍効果
(*in vivo* 試験)

SCID マウスに Daudi-luc 細胞 (2.5×10^6 個) を静脈内移植し、腫瘍量を示す積分光強度を測定した。結果は平均値 $\pm$ SEM (n=4~6) で示す。

A；各種抗体は移植 7 日後に腹腔内投与した (300 μ g/匹, 各群 4 又は 5 例)。*** P<0.001：試験 28 及び 34 日における HuMab-KLH との比較 (one-way ANOVA)。* P<0.01：試験 55 日におけるダラツムマブと HuMab-CD38 との比較 (two-way ANOVA)。

B；各種抗体は移植 14 日後に腹腔内投与した (10 μ g/匹, 各群 6 例)。試験 49 日目、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は HuMab-KLH と比べて腫瘍体積を有意に減少させた (p<0.05, two-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test)。

以上の結果より、SCID マウス異種移植モデルにおいて、ダラツムマブは予防的及び治療的投与のいずれの投与方法でもヒトリンパ腫細胞の増殖を抑制することが示された。また、治療効果は 10 μ g/匹 (約 0.5 mg/kg に相当) の低用量で認められた。

2.6.2.2.3 組織交差反応性

2.6.2.2.3.1 ヒト及びヒト以外の動物種における組織交差反応性

ダラツムマブのヒトの各組織に対する結合、並びにヒト以外の霊長類及び他の動物種の CD38 への反応性を解析した。本試験の結果は、ダラツムマブの非臨床安全性試験に適した動物種の裏付けとなる【CTD 2.6.6.3.1 参照】。

(1) ヒトのリンパ組織及び非リンパ組織への結合

【評価資料 4.2.1.1.11】

ヒトのリンパ組織及び非リンパ組織に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合特異性について、IHC 染色及び蛍光二重免疫染色を用いて検討した。

IHC 染色での解析の結果、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は、T 及び B リンパ球、形質細胞、マクロファージ並びにリンパ管内皮細胞に結合した。さらに、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 とともに横紋筋細胞及び肺の分化した上皮細胞の一部にも結合した。HuMab-CD38 は前立腺及び卵管の分化した上皮細胞に結合した。

蛍光二重免疫染色の結果、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は横紋筋細胞における細胞質及び細胞膜の両方で染色陽性であった。肺ではダラツムマブにより細胞質に強染色性がみられ、E-カドヘリンとの共局在から細胞膜への局在も示唆された。

以上の結果から、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 はともにヒトのリンパ組織に結合することが示されたことに加え、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 は横紋筋及び肺上皮に、HuMab-CD38 は前立腺及び卵管上皮にも結合することが示された。

(2) ヒト以外の動物種のリンパ組織への結合

【評価資料 4.2.1.1.12】

各動物種（ブタ、ウサギ、ラット、マウス、カニクイザル及びアカゲザル）のリンパ組織の CD38 に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合について、IHC 染色により検討した。陽性対照として、ヒトのリンパ組織（扁桃、脾臓又はリンパ節）を用いた。

ダラツムマブは、ヒト以外の動物種のリンパ組織の CD38 に対して結合しなかった。HuMab-CD38 は、カニクイザル及びアカゲザルの脾臓のリンパ細胞に対して特異的に結合した。

(3) サルのリンパ組織及びリンパ球に対する結合

【評価資料 4.2.1.1.13】

アカゲザル及びカニクイザルのリンパ組織及び白血球に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合について、フローサイトメトリー法及び IHC 染色で検討した。

フローサイトメトリー法を用いた検討において、ダラツムマブは高濃度においてのみアカゲザルの単球に弱い結合を示したが、その結合は陰性対照抗体である HuMab-KLH と同程度であり、リンパ球に対する特異的な結合は認められなかった。ダラツムマブはカニクイザルのリンパ球に対しても結合しなかった。一方、HuMab-CD38 は、アカゲザルの単球及びリンパ球に特異的に結

合した。カニクイザルのリンパ球 [CD3 陽性 (T リンパ球に相当) 及び CD3 陰性リンパ球 (B リンパ球に相当)] にも結合し、顆粒球に対しては高濃度でのみ弱い結合を示した。

IHC 染色を用いた検討で、アカゲザル又はカニクイザルの脾臓に対し、ダラツムマブはそれぞれ 1 又は 5 µg/mL まで特異的な結合はみられなかった。一方、HuMab-CD38 (0.01 及び 0.1 µg/mL) では、アカゲザル及びカニクイザルの脾臓に対する特異的な結合が認められた。

以上の結果は、カニクイザル又はアカゲザルの非臨床試験において、HuMab-CD38 がサロゲート抗体として適切であることを示している。

(4) ヒト及びカニクイザルの血球に対する結合

【評価資料 4.2.1.1.14】

ヒト及びカニクイザルの血球 (B リンパ球, T リンパ球, 赤血球及び顆粒球) に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の結合について、フローサイトメトリー法にて検討した。B 及び T リンパ球は、それぞれ CD20 及び CD3 抗体で二重染色することにより確認した。赤血球及び顆粒球は散乱光の特性により確認した。

カニクイザルの B 及び T リンパ球に対し、ダラツムマブは結合せず、HuMab-CD38 は濃度依存的に結合した [100 µg/mL の平均蛍光強度 (MFI) ; 1000~3000 units, 3 例]。ヒトの B 及び T リンパ球に対し、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 はともに弱い結合を示した (100 µg/mL の MFI ; 30~250 units, 2 例)。ヒト及びカニクイザルの顆粒球に対し、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 はともに特異的な結合を示さなかった。ヒトの赤血球に対してダラツムマブは弱い結合を示し (陰性対照抗体で MFI が 10 units であったところ、ダラツムマブ 100 µg/mL の 1 例で MFI が 15 units), カニクイザルの赤血球に対しては結合しなかった。一方、HuMab-CD38 はヒトの赤血球に特異的に結合せず、カニクイザルの赤血球に結合した (> 3 µg/mL の MFI ; 175 units)。

以上より、ヒトの血球に対するダラツムマブと HuMab-CD38 の結合能は同程度であったが、HuMab-CD38 のヒトとカニクイザルの血球に対する結合能には差がみられた。これはヒトの血球に比べてカニクイザルの血球で CD38 の発現量が多いためと考えられた。

2.6.2.2.3.2 チンパンジーにおける組織交差反応性

チンパンジーの CD38 に対するダラツムマブの反応性を非 GLP 試験で解析した。本試験の結果は、ダラツムマブの非臨床安全性試験に適した動物種の裏付けとなる【CTD 2.6.6.3.1 参照】。

(1) ヒト及びチンパンジーCD38 に対するダラツムマブの相互作用の比較

【評価資料 4.2.1.1.15】

チンパンジーCD38 のアミノ酸配列を解析し、ヒト CD38 と比較した。ヒト及びチンパンジー CD38 に対するダラツムマブの相互作用は、CD38 に対する結合及び CD38 の酵素活性に対する阻害を検討することにより比較した。チンパンジーCD38 のアミノ酸配列は、エプスタイン・バーウイルスにより形質転換されたチンパンジーB 細胞株である Pan EBV3 細胞の RNA を用いて解析し、Pan EBV3 細胞におけるタンパク質発現はウェスタンブロッティング法により解析した。

チンパンジー及びヒト CD38 の cDNA は類似性が高く、挿入配列はなく、ダラツムマブの結合エピトープ領域以外で 4 個のアミノ酸が異なるのみであった。チンパンジー CD38 の分子量はヒト CD38 と同じであり、チンパンジーの CD38 タンパク質は Pan EBV3 細胞の細胞溶解液及びペレット中で検出された。精製した CD38 タンパク質に対する結合は ELISA 法により、Pan EBV3 細胞及びヒト B 細胞に対する結合はフローサイトメトリー法により測定したところ、ダラツムマブはヒト及びチンパンジーの CD38 に対して同程度に結合することが示された。さらに、表面プラズモン共鳴 (Biacore) による解析の結果、ダラツムマブのヒト及びチンパンジー CD38 に対する結合親和性 (K_D 値) はそれぞれ $3.50 \times 10^{-9} \pm 1.66 \times 10^{-9}$ 及び $4.46 \times 10^{-9} \pm 1.66 \times 10^{-9}$ mol/L であり、有意な差はなかった。NGD を基質としたシクラーゼ活性の測定の結果、ダラツムマブはヒト及びチンパンジー CD38 のシクラーゼ活性を同程度に阻害した (最大阻害約 30%)。

以上のことから、ヒトとチンパンジーの CD38 は類似性が高く、ダラツムマブはヒト及びチンパンジーの CD38 に対し、結合及び酵素阻害活性について同様の相互作用を示した。

(2) チンパンジーの末梢血単核球における交差反応性

【評価資料 4.2.1.1.16】

チンパンジー CD38 に対するダラツムマブの結合特性について、チンパンジー PBMC を用い、ダラツムマブが結合した PBMC の割合をフローサイトメトリー法にて測定した。

ダラツムマブのチンパンジー CD38 に対する結合は、市販の抗ヒト CD38 抗体 (HIT2) による結合と同様であったことから、ダラツムマブがチンパンジー PBMC に対して特異的に結合することが確認された。また、ダラツムマブ及び HIT2 を同じチンパンジー血液試料に同時に添加すると、単独で添加したときより結合が低下し、結合の干渉がみられた。ダラツムマブの結合は、ヒト及びチンパンジーいずれの PBMC においても、CD4、CD8 又は CD56 陽性リンパ球で認められた。これらの各リンパ球サブセットにおけるダラツムマブ陽性細胞の割合はヒトとチンパンジーの間で同程度であり、チンパンジーのこれらの細胞に発現している CD38 にダラツムマブが結合することが示された。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 ヒト PBMC の増殖及びサイトカイン放出に対する作用

【評価資料 4.2.1.2.1, 評価資料 4.2.1.2.2, 評価資料 4.2.1.2.3, 評価資料 4.2.1.2.4】

ヒトの血球細胞の増殖及びサイトカイン放出に対するダラツムマブの作用を検討するため、独立した 4 試験を実施した。

第 1 試験 (4.2.1.2.1) では、PBMC の増殖及びサイトカイン放出 [インターロイキン-6 (IL-6) 及びインターフェロン- γ (IFN- γ)] に対するダラツムマブ及び HuMab-CD38 の作用を検討した。健康成人の全血から分離した PBMC にダラツムマブ又は HuMab-CD38 (増殖 ; 1.1~30 μ g/mL, サイトカイン放出 ; 20 μ g/mL) を添加後、4 日目に 3 H 標識チミジンの取込み量を測定することにより増殖に対する作用を、18 時間後に ELISA 法にて IL-6 及び IFN- γ 量を測定することによりサイトカイン放出に対する作用を確認した。

ダラツムマブは、PBMCの増殖を誘導しなかった。また、ダラツムマブは、IL-6及びIFN- γ 放出を誘導しなかった。HuMab-CD38もダラツムマブと同様の結果であった。陽性対照として用いたリポポリサッカライド（LPS）及びOKT3（抗CD3抗体）はそれぞれIL-6及びIFN- γ 放出を誘導した。

第2試験（4.2.1.2.2）では、PBMCのサイトカイン放出〔IL-6, IL-1 β , IFN- γ , 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）, 腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）及びgranzyme A〕に対するダラツムマブの作用を更に検討した。健康成人の全血から分離したPBMCにダラツムマブ

（20 μ g/mL）を添加後、ELISA法にて各種サイトカイン放出量を測定した。IL-6及びIL-1 β は1晩インキュベーション後、IFN- γ 及びGM-CSFは3日間インキュベーション後、granzyme A及びTNF- α は1晩及び3日間インキュベーション後にそれぞれ測定した。また、この試験では、可溶性IgG全長構造を有するダラツムマブに加え、ダラツムマブの可溶性F(ab')₂フラグメント及び固相化したF(ab')₂フラグメントも用いて検討した。

ダラツムマブは、いずれのサイトカイン放出も誘導しなかったことから、標的特異的なアゴニスト作用は持たないことが示された。また、可溶性及び固相化したF(ab')₂フラグメント部分のみであってもサイトカイン放出に影響せず、抗体の形態は影響しないことが示された。一方、陽性対照として用いた抗CD3抗体はすべてのサイトカイン放出を誘導し、リポオリゴサッカライド（LOS）も1日後のIL-6, TNF- α 及びIL-1 β , 並びに3日後のGM-CSF及びTNF- α の放出を誘導した。

第3試験（4.2.1.2.3）では、全血及び分離したPBMCを用い、ダラツムマブの標的特異的な細胞増殖作用及びサイトカイン放出（1日後；IL-1 β , IL-6及びTNF- α , 3日後；TNF- α , IFN- γ 及びgranzyme A）を検討した。この試験では、プレートに5種類の方法でダラツムマブ（0.1, 1, 10及び100 μ g/mL）又は対照抗体を提示した〔溶液中に可溶化（提示1）, wetコートによりプレートに固相化（提示2）, dryコートによりプレートに固相化（提示3）, dryコートによりプレートに固相化した抗Fc抗体上にwetコート（提示4）, 単層内皮細胞上に可溶化（提示5）, 図2.6.2-17〕。提示1~4では8例のドナーより採取したPBMCを4例ずつの群に分け（ドナーA~D及びE~H）, 独立した2試験を実施した。提示5では新たな8例のドナー由来のPBMCを1群として試験を実施した。陰性対照抗体としてHuMab-KLHを用い、陽性対照として抗CD3抗体及びLPSを用いた。

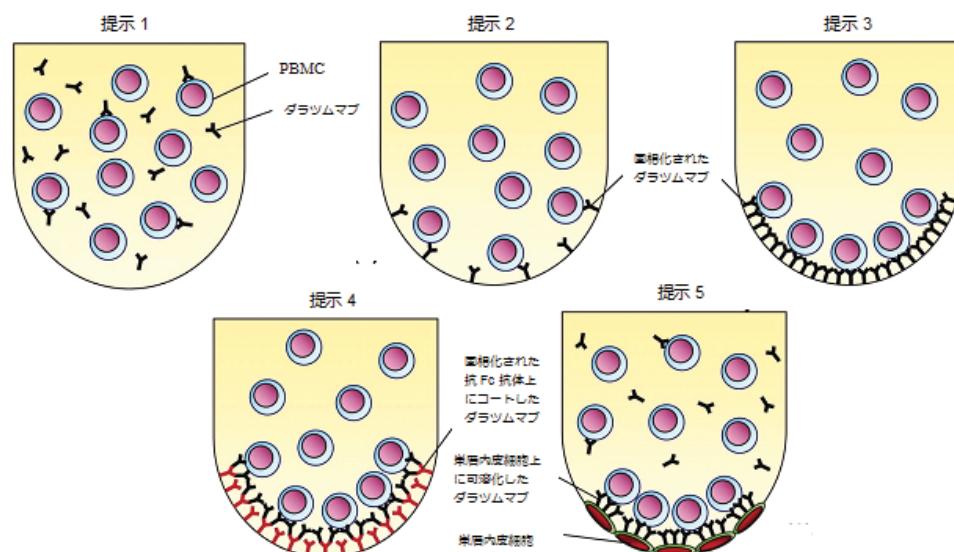


図 2.6.2-17 抗体提示方法の概要

提示 1；溶液中に可溶化，提示 2；wet コートによりプレートに固相化，提示 3；dry コートによりプレートに固相化，提示 4；dry コートによりプレートに固相化した抗 Fc 抗体上に wet コート，提示 5；単層内皮細胞上に可溶化

すべての陽性対照抗体は，すべての抗体提示方法において強い細胞増殖作用及びサイトカイン放出を示した。ダラツムマブは，いずれの抗体提示方法においても細胞増殖作用は示さなかったが，提示 1 の 100 $\mu\text{g/mL}$ における 8 例中 4 例のみ，陰性対照抗体と比べてわずかながら有意な細胞増殖がみられた ($p < 0.01$)。

陰性対照抗体と比べ，ダラツムマブは最高濃度 (100 $\mu\text{g/mL}$) で IL-1 β ，IL-6 及び IFN- γ の放出量を有意に増加させ，TNF- α (3 日後) 及び IFN- γ で検出限界をわずかに上回る増加がみられたが，全般的に陰性対照抗体とダラツムマブに差はみられなかった。

さらに，Fc を介した作用がサイトカイン放出に及ぼす影響を検討するため，培地のみを添加した場合と比較した。提示 2 では 8 例中 4 例で，ダラツムマブによる TNF- α (1 日後；約 50 pg/mL) 及び granzyme A (約 150 units/mL) の放出量の有意な増加がみられた。提示 3 では，ドナー A～D でダラツムマブによる IL-6 及び TNF- α (1 及び 3 日後) 放出量の有意な増加がみられた。ドナー E～H でもダラツムマブによるサイトカイン放出量の増加がみられたが，これは 1 例の感受性の高いドナー G による影響であった。ドナー E，F 及び H においても，IL-1 β ，IL-6 及び TNF- α (3 日後) 放出量の増加がみられたが，ダラツムマブが高値を示した事例では陰性対照抗体も高値を示しており，Fc に関連する作用と一致した。

第 4 試験 (4.2.1.2.4) では，ダラツムマブの標的特異的なサイトカイン放出に対する作用を，国内外で既承認の他の抗体医薬品 (リツキシマブ，daclizumab，バシリキシマブ，ベバシズマブ，セツキシマブ，トラスツズマブ及びナタリズマブ) と比較して検討した。検討には健康成人の全血又は分離した単核球を用い，ダラツムマブ (0.1，1，10 及び 100 $\mu\text{g/mL}$) 及び他の抗体を 3 種の方法 [溶液中に可溶化 (提示 1)，dry コートによりプレートに固相化 (提示 2)，dry コートによりプレートに固相化した抗 Fc 抗体上に wet コート (提示 3)] で提示した。陽性対照として

LOS 及び抗 CD3 抗体を、陰性対照として HuMab-KLH 及び健康成人由来の静注用免疫グロブリン製剤 (IVIG) を用いた。

サイトカイン放出が有意に増加した抗体処置 (陽性対照を除く) を表 2.6.2-7 に示す。提示 2 又は提示 3 (組織培養ウェルあたりの抗体量を増加させる抗体提示法) で抗体を提示した場合のみ、培地群と比べてダラツムマブ又は既承認抗体医薬品による IL-6 及び TNF- α 放出の有意な増加がみられた。ダラツムマブによりサイトカイン放出の有意な影響がみられた場合はすべて、他の抗体医薬品でも同様の影響がみられていた。例外として、提示 3 ではダラツムマブ

(1 $\mu\text{g/mL}$) のみが単核球からの IL-6 放出を有意に増加させたが、この影響は LOS と比較して小さかった。ナタリズマブ以外のすべての抗体医薬品は、複数の試験条件下でサイトカイン放出の有意な増加を示した。複数の健康成人由来ポリクローナル IgG の混合である IVIG も、サイトカイン放出を有意に促進した。

ナタリズマブ以外の抗体医薬品がすべて IgG1 であることから、これら抗体によって誘導されるサイトカインの放出は、標的分子に対する抗体の特異的な結合ではなく、共通にもつ Fc 領域が関与していると考えられ、これは第 3 試験 (GMB3003-018) の結果と一致する。さらに、IgG4 抗体医薬品であるナタリズマブの影響が他の IgG1 抗体と比べて非常に弱く、有意な影響を示したのが 1 つの試験条件下のみであったことから示唆される。

以上のことから、ダラツムマブは標的特異的なアゴニスト活性を示さず、観察されたサイトカインの放出は主に IgG1 の Fc 領域が関与していることが示された。

表 2.6.2-7 培地群と比較してサイトカイン放出の有意な増加を示した抗体の一覧

サイトカイン	抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	可溶化 (提示 1)		dry コート (提示 2)		抗 Fc 抗体上に wet コート (提示 3)	
		単核球	全血	単核球	全血	単核球	全血
IL-1 β	1						
	100		KLH	KLH/IVIG		KLH	
IL-6	1			<u>ダラツムマブ</u> リツキシマブ セツキシマブ KLH	KLH	<u>ダラツムマブ</u>	<u>ダラツムマブ</u> ベバシズマブ KLH, IVIG
	100	KLH	KLH	<u>ダラツムマブ</u> ナタリズマブを除く抗体医薬品, KLH	<u>ダラツムマブ</u> ナタリズマブ及びベバシズマブを除く抗体医薬品, KLH	<u>ダラツムマブ</u> バシリキシマブ KLH	<u>ダラツムマブ</u> ベバシズマブ KLH, IVIG
TNF- α	1			<u>ダラツムマブ</u> ナタリズマブ及び Daclizumab を除く抗体医薬品, KLH			
	100	KLH	KLH	<u>ダラツムマブ</u> すべての抗体医薬品, KLH		KLH	

IVIG ; 静注用ヒト免疫グロブリン製剤, KLH ; HuMab-KLH

2.6.2.3.2 ヒト及びチンパンジー血小板に対する結合

【評価資料 4.2.1.2.5, 評価資料 4.2.1.2.6】

ヒト及びチンパンジー血小板に対するダラツムマブの結合について、ヒト及びチンパンジーの血液試料を用い、フローサイトメトリー法でダラツムマブ及び抗 CD61 抗体に二重陽性の分画を解析した。

ヒトとチンパンジーの血小板に対するダラツムマブの結合には種差が認められた。チンパンジー血小板に対するダラツムマブの結合は、1.23~100 µg/mL で約 70%, 0.05 µg/mL では約 8%であった。これに対し、ヒト血小板に対するダラツムマブの結合は、100 µg/mL で約 43%, 3.7 µg/mL で約 28%であったが、0.05 µg/mL の低濃度においてもヒト血小板に対するダラツムマブの結合はそれ以上減少しなかった。

以上の結果より、チンパンジーの血小板にはダラツムマブの結合部位があり、その結合親和性 (EC₅₀ 値) は約 1 µg/mL 付近であることが明らかとなった。一方、検討したダラツムマブの濃度範囲では結合が飽和しなかったことから、ヒトの血小板に対するダラツムマブの EC₅₀ 値は算出できなかった。

2.6.2.3.3 補体依存性細胞傷害を介したヒト赤血球の溶血

【評価資料 4.2.1.2.7】

ヒト赤血球の溶血に対するダラツムマブの作用について、健康成人 2 例から採取した赤血球を用いて検討した。これらの試験では、ヒト赤血球と補体供給源であるヒト AB 血清及び各種抗体をインキュベーション後、上清中のヘモグロビン濃度を吸光法 (405 nm) で測定することにより溶血の有無を確認した。陰性対照として 56°C で非働化したヒト AB 血清又は HuMab-KLH, 陽性対照として P 関連血液型抗原に対する抗体を含むヒト血清を用いた。検討は供血者ごとに実施した。

1 例目の検討では、2 種類のバッチの血清 (4 又は -80°C で保管) を用いた。水を添加することによる最大溶血を 100%としたとき、陽性対照の血清は 60~70%の溶血を示した。この溶血は非働化した血清存在下で認められないことから、補体を介した作用と考えられる。この試験系において、ダラツムマブ及び HuMab-CD38 による溶血はみられなかった。

2 例目の検討では、異なるドナー由来の赤血球を用いた。陽性対照の血清は 25%の溶血を示した。同様に非働化した血清存在下では溶血がみられなかったことから、補体を介した溶血と考えられる。この試験系においてもダラツムマブ及び HuMab-CD38 による溶血はみられず、陰性対照である HuMab-KLH と同程度であった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

【評価資料 4.2.3.2.2, 参考資料 4.2.3.2.1】

ダラツムマブの心血管系、呼吸系及び CNS に及ぼす影響は、チンパンジー 6 週間反復静脈内投与毒性試験 (GLP 試験, 回復期間 ; 91~105 日間) の中で評価した【CTD2.6.6.3.2 参照】。心血管系の評価では心電図, 血圧, 脈拍数を, 呼吸系の評価では呼吸数を測定した。CNS の評価では,

1 日 2 回のケージサイドでの一般状態観察及び体温測定により評価した。各評価は、試験前 1 回、投与日（投与 30 分後及び 24 時間後）及び回復期（約 6 回）に実施した。

HuMab-CD38 の心血管系及び CNS に対する作用は、カニクイザル 2 週間反復静脈内投与毒性試験（非 GLP 試験、回復期間；2 カ月間）の中で評価した【CTD2.6.6.3.1 参照】。心血管系の評価は、試験前 1 回、並びに試験 1 及び 8 日目（投与 30 分後及び 24 時間後）に心電図及び心拍数を測定することにより行った。CNS に及ぼす作用は、1 日 1 回のケージサイドでの一般状態観察及び試験期間中（試験-7 日から試験 56 日まで）週 1 回の体温測定により評価した。

これらの試験結果より、ダラツムマブ又は HuMab-CD38 をそれぞれ投与したチンパンジー 6 週間及びカニクイザル 2 週間反復静脈内投与毒性試験における安全性薬理試験のパラメータに、投与に関連した有害な影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.5.1 他の MM 治療薬との併用による抗腫瘍効果

【評価資料 4.2.1.4.1, 評価資料 4.2.1.4.2】

既存の MM 治療薬とダラツムマブの併用効果を評価するため、2 種類の試験を実施した。

第 1 試験では、免疫調節薬であるレナリドミドとの併用によるダラツムマブの MM 細胞に対する効果を検討した。新鮮分離 MM 細胞及び骨髓腫細胞株（UM-9）に対する ADCC を介したダラツムマブの細胞傷害作用は、エフェクター細胞である PBMC をレナリドミドで前処理することにより、ダラツムマブ単独と比べて約 2 倍と有意に増強した（新鮮分離 MM 細胞で $p < 0.05$, UM-9 で $p < 0.001$ ）。さらに、MM 患者より採取した骨髓単核球をエフェクター細胞として、同様にこれら標的細胞に対する作用を検討したところ、レナリドミドの前処理によりダラツムマブの細胞傷害作用は相乗的效果を示した。また、レナリドミドの投与を受けた 3 例の MM 患者より採取した PBMC をエフェクター細胞として用いた試験においても、レナリドミド投与前の PBMC を用いた場合と比べ、レナリドミド投与中の PBMC を用いることにより、UM-9 細胞株に対する ADCC を介したダラツムマブの細胞傷害作用が有意に増強した。

第 2 試験では、MM 患者より採取した新鮮分離骨髓単核球細胞に対する直接的な細胞傷害作用について、多剤併用化学療法とダラツムマブの併用の有用性を検討した。レナリドミド又はボルテゾミブの単独、並びに併用群にダラツムマブを更に併用したところ、ダラツムマブを併用したいずれの組合せの群でも MM 細胞に対する傷害作用が 2 倍以上に増加し（ $p < 0.001$ ）、レナリドミド及びボルテゾミブ治療に抵抗性を示した患者から採取した細胞においても同様の効果がみられた。さらに、レナリドミド、ボルテゾミブ及びデキサメタゾンの三剤併用療法又はメルファラン、プレドニゾロン及びボルテゾミブの三剤併用療法とダラツムマブの併用は、それぞれの三剤併用療法と比べ、MM 細胞に対する傷害作用が有意に増加した。

以上の結果から、MM 細胞に対するダラツムマブの傷害作用は、MM 患者の治療に広く使用されている他の薬剤とダラツムマブの併用が有用であり、併用による薬理効果の減弱はみられないことが示唆される。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 作用機序

ダラツムマブは、CD38 に特異的に結合するヒト IgG1 κ mAb である。Biacore 解析の結果、精製ヒト CD38 に対するダラツムマブの結合親和性 (K_D 値) は 4.36×10^{-9} mol/L であった。また、ELISA 法及び CD38 を発現する細胞を用いた解析においても親和性が確認された【CTD2.6.2.2.1.1 参照】。

In vitro 試験から、検討した MM 患者由来の新鮮分離 MM 細胞の大部分に対し、ダラツムマブは CDC 作用を示した【CTD2.6.2.2.1.3 参照】。この結果から、ダラツムマブが補体カスケードを活性化し、ダラツムマブの抗腫瘍効果に CDC 作用が寄与する可能性が示唆された。

In vitro 及び *in vivo* 試験の結果から、ダラツムマブはエフェクター細胞を介した ADCC 作用及びマクロファージを介した ADCP 作用を誘導することが示された【CTD2.6.2.2.1.4 及び CTD2.6.2.2.1.5 参照】。両作用機序により腫瘍細胞は効果的に除去される。IgG1 アイソタイプ抗体は Fc 領域を介した細胞傷害作用を発揮すると予想されるが、Fc 機能を欠く抗 CD38 抗体を用いた臨床的評価はされていないため、臨床効果に対する ADCC 又は ADCP 作用の直接的な関与は不明である。ダラツムマブ単剤療法の臨床試験において、ダラツムマブ 16 mg/kg の初回投与後速やかに末梢血中の総 NK 細胞数は減少し、投与期間中総 NK 細胞数の低値が持続した

【CTD2.7.2.5.3 参照】。そのため、ダラツムマブ初回投与後の効果に、エフェクター細胞のうち NK 細胞を介した ADCC 作用が果たす役割は不明である。NK 細胞の減少又はベースラインの NK 細胞数と臨床効果の間に関連性は認められなかった。さらに、ADCC 又は ADCP 作用を誘導可能な好中球及び単球の数は、ダラツムマブの投与期間で維持されていた。

In vitro 及び *in vivo* 試験の結果から、ダラツムマブは CD38 を発現するリンパ腫細胞又は MM 細胞に結合後、抗 Fc 抗体又は Fc γ R を介した架橋形成を通じて、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することが示された【CTD2.6.2.2.1.7 参照】。*In vitro* 試験の結果、ダラツムマブは大部分の腫瘍細胞に対して効果的にアポトーシスを誘導した。*In vivo* 試験では、活性化型及び抑制型 Fc γ R は、腫瘍細胞に結合したダラツムマブを架橋形成することによりアポトーシスを誘導することが示されたが、*in vivo* では作用が弱く、アポトーシスを誘導した細胞は 15%未満であった。これらの結果から、Fc γ R を介した架橋形成によるアポトーシスの誘導がダラツムマブの抗腫瘍効果に寄与していることが示唆された。

ダラツムマブはシクラーゼ活性を抑制し、ヒドロラーゼ活性を亢進させることにより、CD38 酵素活性を調節することが示された【CTD2.6.2.2.1.6 参照】。CD38 シクラーゼ活性の生成物は Ca^{2+} 放出のためのセカンドメッセンジャーの役割を果たすことが報告されているが⁷⁾、CD38 酵素活性に対するダラツムマブの作用が抗腫瘍効果に及ぼす影響は明らかではない。

以上の作用機序に関する試験の結果から、腫瘍細胞上の CD38 にダラツムマブが結合すると、結合したダラツムマブの Fc 領域が関与する CDC 作用、ADCC 作用、ADCP 作用、腫瘍細胞のアポトーシス及び CD38 酵素活性の調節が誘導された。これらすべての作用がダラツムマブの抗腫瘍効果に寄与すると考えられるが、それぞれが寄与する正確な割合を明らかにすることは困難である。

2.6.2.6.2 PBMC の増殖及びサイトカイン放出に対する作用

抗 CD28 IgG4 mAb である TGN1412 は、T 細胞受容体の活性化を必要とせずに T 細胞を直接刺激するスーパーアゴニストであるが⁸⁾、第 1 相臨床試験においてサイトカイン放出の副作用がみられた⁹⁾。TGN1412 がアゴニストとして作用するのに対し、ダラツムマブは CD38 陽性の B 細胞及び形質細胞を標的とし、上述の作用機序によって、これらの細胞を除去する。CD38 は T 細胞を直接刺激しないため、ダラツムマブが T 細胞を直接活性化する可能性は低い。このような T 細胞の活性化を介した毒性を有する可能性を調べるために開発された試験方法¹⁰⁾を用いて、ダラツムマブの詳細な検討を実施した。

ヒト PBMC 及び全血を用いた増殖及びサイトカイン放出に関する試験より、ダラツムマブは標的特異的な T 細胞増殖及びサイトカインの放出を誘導しないことが示された【CTD2.6.2.3.1 参照】。第 4 試験において、ダラツムマブにより誘導された少量のサイトカイン放出は、HuMab-KLH、IVIg 及び既承認の抗体医薬品による放出と同程度であった。これは標的特異的な作用ではなく、抗体の Fc 領域が関与すると考えられる。

2.6.2.6.3 ダラツムマブの種特異性及び HuMab-CD38 との特性比較

非臨床試験で用いた動物種のうち、ダラツムマブが結合したのはチンパンジーの CD38 のみであった。ヒトとチンパンジーの CD38 に対するダラツムマブの作用を比較したところ、結合親和性、血小板以外の PBMC への結合及び酵素活性に対する作用はすべて同様であったことから、試験に用いる動物種にチンパンジーが適切であると考えられた【CTD2.6.2.3.2 参照】。

カニクイザル及びアカゲザル CD38 に結合可能なサロゲート抗体 HuMab-CD38 の特性を解析したところ、CDC 作用、シクラーゼ活性阻害及びカニクイザル末梢血由来の種々の細胞に対する高い結合性はダラツムマブと異なっていたが、ヒト CD38 に対する結合親和性、ADCC 作用、アポトーシス誘導及び抗腫瘍効果についてはダラツムマブと同程度であった【表 2.6.2-8】ことから、カニクイザル及びアカゲザルを用いた試験において HuMab-CD38 が適切なサロゲート抗体であることが示唆された。しかしながら、ダラツムマブと HuMab-CD38 の間には差異もあることから、カニクイザルにおける HuMab-CD38 を用いたダラツムマブの評価には限界があると考えられる。

表 2.6.2-8 HuMab-CD38 とダラツムマブの特性比較（要約）

ヒト CD38 に対する生物活性	HuMab-CD38	ダラツムマブ
ヒト CD38 に対する結合親和性（Biacore 法）	K _D ; 8.18×10 ⁻¹⁰ mol/L	K _D ; 4.36×10 ⁻⁹ mol/L
腫瘍細胞における CDC 作用	有り（弱）	有り（強）
腫瘍細胞における ADCC 作用	有り（EC ₅₀ ; 52.5 ng/mL）	有り（EC ₅₀ ; 20.9 ng/mL）
腫瘍細胞における ADCP 作用	検討せず ^a	有り
アゴニスト活性	なし	なし
（PBMC 増殖及びサイトカイン放出）		
シクラーゼ活性阻害	弱	有り
架橋形成後のアポトーシス誘導	有り（84 ± 13%）	有り（72 ± 18%）
（Annexin V/PI 陽性）		
抗腫瘍効果	有り	有り
（Daudi-luc 細胞を用いた <i>in vivo</i> 試験）		
エピトープマッピング	238～244, 267～279, アミノ酸置換による影響なし	233～246, 267～280
（ヒト CD38 分子中のアミノ酸配列番号）		
カニクイザル及びアカゲザルでの組織交差反応性	有り	なし
（IHC 染色及びフローサイトメトリー法）		

2.6.2.6.4 薬理試験の結論

薬理試験から得られた結論を下記にまとめる。

- ダラツムマブの薬理試験の結果から、ダラツムマブは CD38 を発現する腫瘍細胞上に結合し、ダラツムマブの Fc 領域を介して、*in vitro* で CDC 作用、ADCC 作用、ADCP 作用及び腫瘍細胞のアポトーシス誘導並びに *in vivo* で抗腫瘍効果を有することが示された。これらの作用はダラツムマブの抗腫瘍効果に寄与すると考えられ、再発又は難治性の MM 患者の治療におけるダラツムマブの有用性が示唆される。
- チンパンジー6週間反復静脈内投与毒性試験から、心血管系、呼吸系及び CNS に対して、ダラツムマブの投与に関連した有害な影響は認められなかった。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

- 1) Quarona V, et al. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84:207-17.
- 2) Lee HC, et al. Structures and activities of cyclic ADP-ribose, NAADP and their metabolic enzymes. *Mol Cell Biochem.* 1999;193:89-98.
- 3) Bertheliev V, et al. Human CD38 is an authentic NAD(P)⁺ glycohydrolase. *Biochem J.* 1998;330:1383-90.
- 4) Konopleva M, et al. CD38 in hematopoietic malignancies. *Chem Immunol.* 2000;75:189-206.
- 5) Lin P, et al. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol.* 2004;121:482-8.
- 6) de Haij S, et al. *In vivo* cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer Res.* 2010;70:3209-17.
- 7) Aarhus R, et al. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem.* 1995;270:30327-33.
- 8) Lühder F, et al. Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med.* 2003;197(8):955-66.
- 9) Suntharalingam G, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med.* 2006;355:1018-28.
- 10) Stebbings R, et al. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol.* 2007;179:3325-31.

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: Daratumumab

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/ Formulation) ^a	GLP Compliance	Testing Facility	Study No. / Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Characteristics of daratumumab and HuMab-CD38 binding to human CD38	Biacore; ELISA; flow cytometry	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-002/ 4.2.1.1.1
Binding epitopes of daratumumab and HuMab-CD38	PEPSCAN; ELISA; Site-directed mutagenesis	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-008/ 4.2.1.1.2
Induction of complement-dependent cytotoxicity of CD38-specific antibodies daratumumab and HuMab-CD38	Flow cytometry (PI labeling)	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-003/ 4.2.1.1.3
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity mediated by HuMab-CD38 and daratumumab	⁵¹ Cr Release	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V., ██████████	GMB3003-004/ 4.2.1.1.4
Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of daratumumab in lymphoma and multiple myeloma	Flow cytometry SCID mice, SC or IV tumor injection	<i>in vitro</i> IP; 250 µg/mouse (~12.5 mg/kg; SC model), 10 µg/mouse (~0.5 mg/kg; IV model) DARA-K322A, DARA-IgG2-K322A; Single dose of antibody or control (IgG1-b12 or PBS) IP at Day 0.	No	Genmab B.V.	GMB3003-115/ 4.2.1.1.5
Capacity of daratumumab and HuMab-CD38 to affect CD38 enzyme activity	Fluorescent substrate conversion; HPLC; ³² P-cADPR TLC	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-013/ 4.2.1.1.6

^a Sterile phosphate-buffered saline (pH 7.4) used as vehicle, unless otherwise specified.
cADPR = cyclic adenosine diphosphate ribose; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; HPLC = high performance liquid chromatography; IgG = immunoglobulin G; IP = intraperitoneal; IV = intravenous ; PBS = phosphate buffered saline; PI = propidium iodide; SC = subcutaneous; SCID = ; severe combined immunodeficiency; TLC; thin layer chromatography
(Continued)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab					
Type of Study	Test System	Route (Vehicle/ Formulation) ^a	GLP Compliance	Testing Facility	Study No. / Location in CTD
Primary Pharmacodynamics (Continued)					
Induction of B cell apoptosis by daratumumab and HuMab-CD38	Flow Cytometry (annexin-V, PI, active caspase-3)	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-011/ 4.2.1.1.7
Daratumumab induces programmed cell death <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> via Fc gamma receptor-mediated crosslinking	Flow Cytometry (annexin-V, loss of mitochondrial membrane potential, 7-AAD staining)	<i>in vitro</i>			
	Fcγ ^{-/-} mice and NOTAM mice bearing CFSE-labeled EL4-CD38 cells inoculated IP; Cell death analyzed by flow cytometry for annexin-V and 7-AAD staining	DARA-K322A IP treatment immediately post-tumor inoculation with 2 μg/mouse (~0.1 mg/kg). To block FcγRIIb, 50 μg of F(ab') ₂ fragments of anti-FcγRIIb mAb (K9.361) injected IP 30 min prior to tumor cell inoculation.	No	Genmab B.V.	GMB3003-116/ 4.2.1.1.8
Evaluation of therapy with daratumumab and HuMab-CD38 in a human lymphoma xenograft model in SCID mice using optical imaging	SCID mice bearing Daudi-luc cells injected IV; optical imaging	Daratumumab, HuMab-CD38, single IP dose of antibody or controls at Day 0 (100 μg/mouse, prophylactic model), Day 7 (300 μg/ mouse, therapeutic model I) or Day 14 (10 μg/ mouse, therapeutic model II)	No	Genmab B.V.	GMB3003-007/ 4.2.1.1.9
<i>In vivo</i> dose finding: Assessment of minimal daratumumab dose required to inhibit outgrowth of a xenograft of human lymphoma cells in SCID mice, using optical imaging	SCID mice bearing Daudi-luc cells injected IV; optical imaging	Daratumumab, single IP dose of antibody or isotype control at Day 0 following tumor cells (10 μg, 1 μg, 0.1 μg, or 0.01 μg/mouse)	No	Genmab B.V.	GMB3003-017/ 4.2.1.1.10
Immunohistochemical analysis of binding of HuMab-CD38 and daratumumab to human lymphoid and non-lymphoid tissue	Immunohistochemistry	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-006/ 4.2.1.1.11

^a Sterile phosphate-buffered saline (pH 7.4) used as vehicle, unless otherwise specified.
7-AAD = 7-amino-actinomycin D; CFSE = carboxyfluorescein succinimidyl ester; IP = intraperitoneal; IV = intravenous; PI = propidium iodide; SCID = severe combined immunodeficiency
(Continued)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab					
Type of Study	Test System	Route (Vehicle/ Formulation)	GLP Compliance	Testing Facility	Study No. / Location in CTD
Primary Pharmacodynamics (Continued)					
Immunohistochemical analysis of binding of HuMab-CD38 and daratumumab to lymphoid tissue of various species	Immuno-histochemistry	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-010/ 4.2.1.1.12
Examination of cynomolgus and rhesus monkey cross-reactivity of daratumumab and HuMab-CD38	Flow cytometry; immuno-histochemistry	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-005/ 4.2.1.1.13
Binding of HuMab-CD38 and daratumumab to cynomolgus monkey and human blood cells	Flow cytometry	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	SR3003-06-31/ 4.2.1.1.14
Comparison of human and chimpanzee CD38 and interaction with daratumumab	Western blot; ELISA; flow cytometry; Biacore; fluorescent substrate conversion	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-014/ 4.2.1.1.15
Cross-reactivity of daratumumab to PBMCs from chimpanzees	Flow cytometry	<i>in vitro</i>	No		BKV00001/ 4.2.1.1.16
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; PBMC = ; peripheral blood mononuclear cell					
(Continued)					

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab					
Type of Study	Test System	Route (Vehicle/ Formulation)	GLP Compliance	Testing Facility	Study No. / Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics					
Studies on possible agonistic effects of daratumumab and HuMab-CD38 on proliferation, IL-6 and IFN- γ production by human PBMCs	³ H-thymidine incorporation; ELISA	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-012/ 4.2.1.2.1
Investigation of the potential agonistic effect of daratumumab on cytokine release by human PBMCs	ELISA	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-016/ 4.2.1.2.2
Studies on the capacity of daratumumab to mediate proliferation and cytokine release of human blood cells: <i>ex vivo</i> treatment of whole blood samples and isolated PBMCs	³ H-thymidine incorporation	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	GMB3003-018/ 4.2.1.2.3
	ELISA	<i>in vitro</i> Antibody presentation by solution, wet-coating, dry-coating, wet coating onto dry-coated anti Fc, endothelial monolayer			
Capacity of daratumumab to mediate cytokine release of <i>ex vivo</i> treated human blood cells	ELISA	<i>in vitro</i> Antibody presentation by solution, dry-coating, wet-coating onto dry-coated anti-Fc	No	Genmab B.V.	GMB3003-020/ 4.2.1.2.4
Binding of daratumumab to chimpanzee and human PBMCs	Flow cytometry	<i>in vitro</i>	No		BKV00013/ 4.2.1.2.5
Binding of daratumumab to chimpanzee and human platelets at 4°C and at room temperature	Flow cytometry	<i>in vitro</i>	No		BKV00015/ 4.2.1.2.6
Antibody induced complement mediated lysis of human erythrocytes	Absorbance at 405 nm	<i>in vitro</i>	No	Genmab B.V.	SR3003-06-67/ 4.2.1.2.7
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; PBMC = peripheral blood mononuclear cell					
(Continued)					

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab					
Type of Study	Test System	Route (Vehicle/ Formulation)	GLP Compliance	Testing Facility	Study No. / Location in CTD
Safety Pharmacology					
Daratumumab Multiple Dose Safety Study in Chimpanzees with a 2-month Recovery Period	Chimpanzee	IV (30 min. infusion) ^a IV (1 h infusion) ^b (Vehicle: 25 mmol/L sodium acetate, 60 mmol/L sodium chloride, 140 mmol/L mannitol, 0.006% polysorbate 20, pH 5.5; Daratumumab: 21.1 mg/mL in Sterile pyrogen free 0.9% NaCl 125 mL dilution).	Yes	[REDACTED]	8754-0701/ 4.2.3.2.2
HuMab-CD38 ([REDACTED]): Pilot Toxicology and Pharmacokinetic Study in Cynomolgus Monkeys with a Two Month Recovery Period	Cynomolgus monkey	IV (30 min. infusion) (Vehicle: 12.6 mmol/L sodium phosphate and 140 mmol/L sodium chloride, pH 7.4;HuMab-CD38 ^c : 11.16 mg/mL in 12.6 mmol/L sodium phosphate and 140 mmol/L sodium chloride, pH 7.2-7.4)	No	[REDACTED]	509809/ 4.2.3.2.1
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Ex vivo evaluation of a combination treatment of MM cells with lenalidomide and the human CD38 mAb daratumumab	⁵¹ Cr release; flow cytometry	in vitro	No	[REDACTED]	GMB3003-069/ 4.2.1.4.1
Evaluation of a combination treatment of newly emerging multi-drug therapies for MM with daratumumab in MM cells ex vivo	Flow cytometry	in vitro	No	[REDACTED]	GMB3003-070/ 4.2.1.4.2

^a Animals assigned to Group 1 were administered the vehicle on Day 0, followed by a 5 mg/kg IV infusion (30 min.) of daratumumab on Day 7; dosing occurred weekly for 6 weeks until Day 42.

^b Animals assigned to Group 2 were administered the vehicle on Day 7. In order to prevent exaggerated cytokine release, animals received a 10 mg pre-dose of daratumumab via IV injection on Day 21, followed by a 25 mg/kg IV infusion (1 h) of daratumumab administered 24 h later on Day 22; infusion (30 min.) occurred weekly for 6 weeks until Day 56.

^c The supportive study was conducted with HuMab-CD38, a human IgG1 mAb that specifically binds to human and cynomolgus monkey CD38.

IV = intravenous; mAb = monoclonal antibody; MM = multiple myeloma

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の詳細は概要文中に記載した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験の詳細は概要文中に記載した。

2.6.3.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験の詳細は概要文中に記載した。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験の詳細は概要文中に記載した。