

ガザイバ点滴静注1000 mg
（オビヌツズマブ（遺伝子組換え））
〔CD20陽性の B 細胞性濾胞性リンパ腫〕

第2部 （モジュール2）：CTD の概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis	抗体依存性細胞貪食
AUC	area under the serum concentration-time curve	血清中薬物濃度-時間曲線下面積
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	(アポトーシスの負の制御因子)
CD	cluster of differentiation	白血球分化抗原
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CL	clearance	クリアランス
CLL	chronic lymphocytic leukemia	慢性リンパ性白血病
C _{max}	maximum observed serum concentration	最高血清中濃度
EC ₅₀	half-maximal effective concentration	50%有効濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
ePPND	enhanced pre- and post-natal development	拡充型出生前及び出生後の発生
Fc	fragment crystallizable	結晶化フラグメント
FcγR	Fc gamma receptor	Fc ガンマ受容体
FcRn	neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
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
FDA	food and drug administration	食品医薬品局
ICH	international council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL	interleukin	インターロイキン
IRR	infusion-related reaction	—
NHL	non-Hodgkin's lymphoma	非ホジキンリンパ腫
NK	natural killer	ナチュラルキラー
PK	pharmacokinetics	薬物動態
t _{1/2}	terminal half-life	消失半減期
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha	腫瘍壊死因子アルファ
V _{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態での分布容積

目次

	頁
2.4 非臨床試験の概括評価	4
2.4.1 非臨床試験計画概略	4
2.4.1.1 緒言	4
2.4.1.2 試験計画の概略	4
2.4.1.3 薬理試験	4
2.4.1.4 薬物動態試験	5
2.4.1.5 毒性試験	6
2.4.1.6 ガイドラインへの適合性	6
2.4.2 薬理試験	6
2.4.2.1 オビヌツズマブの作製と抗 CD20 抗体としての基本特性	6
2.4.2.2 <i>In vitro</i> 生物活性	8
2.4.2.3 B 細胞減少作用	8
2.4.2.4 <i>In vivo</i> における抗腫瘍活性	9
2.4.2.5 化学療法薬との併用効果	10
2.4.2.6 副次的薬理試験	10
2.4.2.7 安全性薬理試験	10
2.4.3 薬物動態試験	10
2.4.3.1 測定法	10
2.4.3.2 単回投与試験	11
2.4.3.3 反復投与試験	11
2.4.3.4 その他の薬物動態試験	12
2.4.4 毒性試験	12
2.4.4.1 急性毒性試験	12
2.4.4.2 反復投与毒性試験	12
2.4.4.3 遺伝毒性試験及びがん原性試験	13
2.4.4.4 生殖発生毒性試験	13
2.4.4.5 局所刺激性試験	14
2.4.4.6 その他の毒性試験	14
2.4.4.7 新添加物の安全性評価	15
2.4.5 総括及び結論	16
2.4.6 参考文献	17

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

2.4.1.1 緒言

オビヌツズマブ（遺伝子組換え）は、マウス抗ヒト CD20モノクローナル抗体 B-Ly1¹⁾をヒト化して作製したヒト化抗 CD20モノクローナル抗体（IgG1）である²⁾。抗ヒト CD20抗体は、CD20分子との結合様式及び細胞傷害作用機序に基づいて二つのタイプに分類され³⁾、リツキシマブ等の国内で上市済みの抗 CD20抗体はタイプ I 抗体に属するが、本抗体は、タイプ II 抗 CD20抗体であり、リツキシマブ等のタイプ I 抗体よりも、抗体単独で直接的に細胞死を誘導する活性に優れている。更に Fc 領域の糖鎖を改変したことにより、免疫系エフェクター細胞による細胞傷害活性が増強されており、本抗体は新規の作用メカニズムを有する抗ヒト CD20抗体である。

オビヌツズマブは、以下の特徴を示す。

- タイプ II 抗 CD20抗体であることにより、直接的な細胞死の誘導活性が優れており、補体依存性細胞傷害（CDC）活性は低下している²⁾。また、Fab 領域のフレキシビリティーに關与するエルボーヒンジ部⁴⁾を改変したことで、細胞死の誘導活性は更に増強されている。オビヌツズマブによる細胞死の誘導は、カスパーゼ活性化による典型的なアポトーシスではなく、他のタイプ II 抗体と同様、アクチン依存的でリソソームにより誘発されるタイプの細胞死である⁵⁾⁻⁷⁾。
- Fc 領域の糖鎖を改変し、免疫系エフェクター細胞であるナチュラルキラー（NK）細胞、単球/マクロファージに発現している FcγRIIIa 及び好中球に発現している FcγRIIIb との親和性が向上したことにより²⁾、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性及び抗体依存性細胞貪食（ADCP）活性が強化されている^{2),8)}。

このような生物活性の結果として、オビヌツズマブは、リツキシマブよりも優れた B 細胞減少作用及び抗腫瘍活性を示すことが期待される。

2.4.1.2 試験計画の概略

オビヌツズマブの薬理、薬物動態（PK）及び毒性の特性を明らかにするため、ICH ガイドラインに則り、包括的な非臨床試験を実施した。

本申請におけるオビヌツズマブの投与経路が静脈内投与であるため、主な毒性試験は静脈内投与にて実施した。また、皮下投与での開発可能性について、薬物動態及び毒性試験において検討したため、本申請資料概要中にも試験結果を記載した。

オビヌツズマブは、カニクイザルの CD20分子に結合し、ヒト CD20分子と同程度の結合親和性を示すこと、カニクイザルにおいてもヒトと同様に ADCC 活性を惹起することから、毒性、PK、及び薬理活性を評価するために適切な動物種としてカニクイザルを選択した。

2.4.1.3 薬理試験

抗 CD20抗体として、リツキシマブ及びオファツムマブが既に非ホジキンリンパ腫（NHL）あるいは慢性リンパ性白血病（CLL）の治療薬として承認を取得していることから、これらのタイプ I 抗 CD20抗体を含めて検討することにより、オビヌツズマブの生物活性、抗腫瘍効果を明らかにした。

- オビヌツズマブの抗 CD20抗体としての特性を明らかにするため、タイプ II 抗 CD20抗体としての基本的な特性、抗原である CD20分子との結合活性、エピトープについて検討した。

- オビヌツズマブの生物活性として、CDC 活性、直接的な細胞死の誘導活性、並びに、NK 細胞、単球/マクロファージ、好中球による ADCC 及び ADCP 活性を評価した。
- ADCC 及び CDC 活性、直接的な細胞死誘導活性による B 細胞傷害活性を、統合的に評価するため、全血サンプルを用いた B 細胞減少作用試験 (*ex vivo*) を実施した。
- ヒト CD20遺伝子導入マウス及びカニクイザルにオビヌツズマブを投与することにより、*in vivo* での B 細胞減少作用及び外来抗原に対する免疫応答について検討した。
- びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫等に由来するヒト NHL 細胞株をマウス皮下に移植したモデル及びマウス尾静脈に移入して作製した播種性増殖モデルを用いて、オビヌツズマブの腫瘍増殖抑制効果を評価した。
- ヒト NHL 細胞株のマウス皮下移植モデルを用いて、既に臨床で用いられている代表的な化学療法薬（シクロホスファミド、ビンクリスチン、ベンダムスチン、フルダラビン、クロラムブシル等）とオビヌツズマブの併用時における抗腫瘍効果について検討した。

オビヌツズマブでは独立した安全性薬理試験は実施していない。ICH S6(R1)（バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価）及び ICH S7A（安全性薬理試験ガイドライン）に従い、中枢神経系、呼吸器系及び心血管系への影響について反復投与毒性試験で検討した。

2.4.1.4 薬物動態試験

オビヌツズマブの非臨床薬物動態（PK）は、マウス及びカニクイザルにおける単回投与試験とカニクイザルにおける反復投与毒性／トキシコキネティクス（TK）試験で評価した。マウスはヒト腫瘍を移植する宿主として抗腫瘍効果を評価するために使用した動物種であり、カニクイザルは毒性試験で使用した動物種である。

PK 及び TK 評価はノンコンパートメント解析を用いて実施した。すべての TK 試験は GLP に準拠して実施したが、PK 試験は非 GLP 下で実施した。

オビヌツズマブの PK 及び TK を評価するために試料測定法として、下記の酵素免疫測定法（ELISA）を開発し、カニクイザル血清を用いてバリデーションを実施した。

- カニクイザル血清中オビヌツズマブ測定法
マウス血清試料及びカニクイザル乳汁試料についてバリデーションは行っていないが、この測定法に準ずる方法にて測定した。
- カニクイザル血清中抗薬物抗体（ADA）測定法
別途、カニクイザル血清中のオビヌツズマブ-ADA 免疫複合体を探索的に検討するための測定法を開発した。

また、下記の試験において PK/TK を評価した。

- マウス単回静脈内投与試験（PK）
- カニクイザル単回静脈内及び皮下投与試験（PK）
- カニクイザル反復静脈内投与（13週間及び26週間）及び皮下投与（4週間）毒性試験（TK）
- カニクイザル拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）毒性試験（TK）

すべての TK 試験において ADA を測定し、試験ごとにその影響を評価した。また、一部のカニクイザルの試験においては血清中オビヌツズマブ濃度推移と末梢血 B 細胞数（主要な薬力学的指標）との関係を調べた。

分布、代謝、排泄のための動物での試験は ICH S6(R1)ガイドラインに基づき実施していない。

分布に関しては、オビヌツズマブの血中動態及び組織交差反応性試験（2.6.6.8.1），並びに標的である CD20 の発現が B 細胞に限定されていること⁹⁾から、オビヌツズマブの組織への分

布は制限されていると考えられた。

代謝や排泄に関しては、一般的にモノクローナル抗体や内因性の IgG は低分子ペプチドやアミノ酸に分解され (ICH S6(R1)) , その一部は尿中に排泄され则认为られている。また IgG のクリアランスはターゲットを介する特異的な機構と異化経路による非特異的な機構の両方があり、胎児性 Fc 受容体 (FcRn) が IgG の異化を調節するサルベージレセプターの役割を果たしているとされている¹⁰⁾。オビヌツズマブはヒトとカニクイザルの FcRn に対して同程度の親和性を有しており (2.6.3.2.4) , カニクイザルとヒトにオビヌツズマブを投与後いずれも長い半減期を示すのは、FcRn によってオビヌツズマブが体循環にリサイクルされているためだと考えられる。

2.4.1.5 毒性試験

毒性試験はオビヌツズマブの臨床投与経路である静脈内反復投与における安全性を評価するよう計画された。また、皮下投与での開発の可能性について、薬物動態及び毒性試験で検討したことから、本申請資料概要中にも試験結果を含めた。CD20の結合エピトープ相当領域の配列相同性、オビヌツズマブと CD20との親和性及び Fc 受容体を介するエフェクター機能がヒトとカニクイザルにおいて同様であることから、オビヌツズマブの安全性を評価する唯一の適切な動物種としてカニクイザルを選択した。一方、げっ歯類の CD20はヒト CD20との相同性が低いことからオビヌツズマブはげっ歯類の CD20には結合しないと推察され、げっ歯類はオビヌツズマブの安全性評価において適切なモデルではないと考えられた (2.6.3.2.4) 。

オビヌツズマブでは以下の毒性試験を実施した。

- カニクイザルを用いた反復静脈内投与 (2週間、13週間及び26週間) 及び皮下投与 (4週間) 試験
- カニクイザルを用いた ePPND 試験
- ヒト組織及びカニクイザル組織を用いた組織交差反応性試験
- *In vitro* サイトカイン放出試験
- 溶血性及び血液適合性試験

ICH S6(R1)及び ICH S9 (抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン) に従い、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。急性毒性、雌雄受胎能に対する影響及び局所刺激性は反復投与毒性試験で評価した。

2.4.1.6 ガイドラインへの適合性

安全性試験の一環として実施された主要な毒性試験及び TK 試験は ICH ガイドラインに則り、米国 FDA の GLP を遵守して実施した。

また、GLP 非適合 *in vivo* 及び *in vitro* 毒性試験、*in vivo* 及び *in vitro* 薬理試験、並びに薬物動態試験についても十分な科学性をもって実施した。

2.4.2 薬理試験

オビヌツズマブについて実施した薬理試験の概要を示す。タイプ II 抗 CD20抗体としての特性、CD20分子との結合活性及びエピトープ等の抗体としての基本特性、*in vitro* 生物活性、*ex vivo* 及び *in vivo* における B 細胞減少作用、並びに、オビヌツズマブ単独投与及び化学療法薬との併用による *in vivo* 抗腫瘍活性等に関して薬理試験を実施した。

2.4.2.1 オビヌツズマブの作製と抗 CD20抗体としての基本特性

オビヌツズマブは、マウス抗ヒト CD20モノクローナル抗体 B-Ly1の相補性決定領域を、ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖遺伝子のフレームワークに組み込むことによりヒト化し、細胞死誘導

活性を増強するためエルボーヒンジ部を改変することで作製した。更に、Fc 領域に結合する糖鎖を低フコース化することを目的として、 β -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 III 及び α -マンノシダーゼ II を同時に発現させたチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いて生産し、糖鎖を改変した。

(1) タイプ II 抗 CD20抗体としての特性

抗 CD20抗体は、タイプ I 及びタイプ II に分類することができる（表 2.4.2.1-1）³⁾。タイプ I 抗体では、細胞膜上の CD20に結合した後、CD20-抗体複合体が細胞膜の脂質ラフトに局在するため、細胞膜上でのクラスタリングにより、補体のリクルートと活性化が容易に誘導される。一方、タイプ II 抗体では、CD20-抗体複合体が脂質ラフトに局在せず、タイプ I 抗体に比べ CDC 活性の減弱が認められる。また、タイプ II 抗体では、1細胞当たりで結合可能な抗体分子数がタイプ I 抗体の約1/2である。その理由は、両タイプの CD20結合様式が異なるためと考えられ、タイプ I 抗体では CD20分子4量体の全分子に抗体が結合可能であるが、タイプ II 抗体では、CD20分子4量体間を跨いで結合することが出来ず、4量体に対し抗体1分子しか結合できないものと推定されている（図 2.6.1.2-1）。

表 2.4.2.1-1 タイプ I 抗 CD20抗体とタイプ II 抗 CD20抗体の特性

	タイプ I 抗体	タイプ II 抗体
CD20-抗体複合体の脂質ラフト局在性	局在する。	局在しない。
CDC 活性	強い	弱い
ADCC 活性	有（タイプに依存しない）	
細胞膜上に発現する CD20分子四量体との結合	CD20分子4量体の全分子に抗体が結合すると推定される。	CD20分子4量体に1分子の抗体（CD20としては2分子）が結合すると推定される。
細胞凝集能	弱い	強い
直接的な細胞死誘導能	弱い	強い
CD20分子の細胞内移行（細胞表面での発現量低下）	誘導する（FcγRIIb 依存的）。	細胞内移行率は低い。
代表的な抗体	リツキシマブ オフアツムマブ	オビヌツズマブ tositumomab

tositumomab：タイプ II 抗 CD20抗体のプロトタイプとして報告された抗体

[4.3-11¹⁰⁾ Table 1 を改変，追記]

オビヌツズマブがタイプ I、タイプ II 抗体のいずれに属するか検討し、以下の試験結果が得られた。オビヌツズマブは、タイプ II 抗 CD20抗体の特性を示すことが明らかになった。

- 1細胞あたりの抗体分子結合数が、リツキシマブ等のタイプ I 抗体の約1/2であった。
- タイプ I 抗体と異なり、CD20-抗体複合体の脂質ラフトへの局在が認められなかった。
- タイプ I 抗体と異なり、B 細胞の凝集誘導能が強かった。
- タイプ I 抗体に比べ、直接的な細胞死の誘導活性が強く、CDC 活性は弱かった。

(2) CD20分子との結合に関する基本特性

オビヌツズマブの抗原であるヒト CD20分子との結合活性とエピトープ、CD20-抗体複合体の細胞内インターナリゼーションなどについて検討した。

オビヌツズマブは、CD20陽性のヒト NHL 細胞株選択的に結合性を示し、CD20陰性細胞株

には結合しなかった。また、スキッチャード解析による解離定数は4.0 nmol/L であり、リツキシマブ (4.5 nmol/L) と同程度であった。オビヌツズマブとリツキシマブは、CD20分子との結合において競合し、両抗体のエピトープは重複しているが、オビヌツズマブのエピトープの方が C 末側にあると推定された。CD20分子内の172-178番のアミノ酸残基がオビヌツズマブの主たるエピトープを形成し、リツキシマブとの結合に重要な171番アスパラギンは必須ではなかった。オビヌツズマブでは、172番プロリンと173番セリンが重要なアミノ酸残基であり、174番グルタミン酸から176番アスパラギンまで含めて水素結合を形成していると推察される。

リツキシマブ及びオフアツムマブでは、CD20分子との結合後、CD20-抗体複合体の細胞内インターナリゼーションが認められるが、オビヌツズマブでは、細胞表面に留まる CD20分子の比率が高く、細胞内への移行率は低いと考えられた。

2.4.2.2 *In vitro* 生物活性

オビヌツズマブの CDC 活性、直接的な細胞死の誘導活性、ADCC 及び ADCP 活性について評価した。

オビヌツズマブの CDC 活性は、低濃度域において、タイプ I 抗体であるリツキシマブよりも著しく弱く、通常の培養条件下での50%有効濃度 (EC₅₀) に基づく比較では、リツキシマブの1/100~1/10,000であった。オフアツムマブと比べても同様に弱かった。一方、高濃度域での CDC 活性の強さは、3抗体とも同程度であった。また、生理的濃度 (10 mg/mL) の非特異的ヒト IgG 存在下で検討したところ、リツキシマブの CDC 活性は、弱くなるものの有意な活性を示したが (EC₅₀ = 5.1 µg/mL) 、オビヌツズマブの効力は減退した (EC₅₀ = 200 µg/mL) 。生化学的な試験では、オビヌツズマブと補体 C1q との結合活性が、リツキシマブ等に比べ低下していることが示されており、CDC 活性低下の一因と推定される。

オビヌツズマブの直接的な細胞死の誘導活性は、リツキシマブ及びオフアツムマブよりも優れていた。オビヌツズマブによる細胞死は、カスパーゼ非依存的であり、典型的なアポトーシスとは異なる様式であった。この細胞死の機序については、Alduaij らにより詳細に研究され、アクチン依存性でリソソームを介した反応であること、Bcl-2及びカスパーゼ非依存性であることが報告されている⁶⁾。

オビヌツズマブは、ADCC 活性の増強を目的として、Fc 領域の糖鎖が GlycoMab 技術を用いて改変されており、N 型糖鎖の低フコース化により、FcγRIIIa 及び FcγRIIIb との親和性が強化されている。そのため、FcγRIIIa を発現する NK 細胞による ADCC 活性、マクロファージ/単球による ADCC 及び ADCP 活性が増強され、FcγRIIIb を発現する好中球による ADCP 活性も認められた。

2.4.2.3 B 細胞減少作用

(1) ヒト全血中 B 細胞減少作用 (*ex vivo*)

ADCC 活性、CDC 活性及び直接的な細胞死誘導活性に基づく B 細胞傷害活性を、統合的に評価するため、全血サンプルを用いた B 細胞減少試験 (*ex vivo*) を実施した。

健康な供血者から採取した全血を用いた B 細胞減少作用試験において、オビヌツズマブは、リツキシマブ、オフアツムマブに比べて強い B 細胞減少作用を示した。EC₅₀は、リツキシマブの約1/10~1/25、最大活性は1.3~2.5倍であった。また、遺伝子型が異なる3種の FcγRIIIa (IgG に対し低、中及び高親和性) の供血者検体を用いて検討したところ、オビヌツズマブは、いずれのタイプに対しても、リツキシマブ及びオフアツムマブよりも強い B 細胞減少作用を示した。CLL 患者から採取した全血を用いた試験も実施し、オビヌツズマブはリツキシマブよりも強い B 細胞減少作用を示した。

B 細胞減少作用における直接的な細胞死誘導作用の寄与について検討するため、N 型糖鎖を欠如し ADCC 活性が著しく減退しているオビヌツズマブ N297D 変異体 (直接的な細胞死誘導活性は維持) を用いて比較したところ、N297D 変異体は、オビヌツズマブよりも弱いものの、

依然として強い B 細胞減少作用を示した。したがって、オビヌツズマブの B 細胞減少作用には、直接的な細胞死の誘導活性が寄与していることが示された。

(2) *In vivo* における B 細胞減少作用

ヒト CD20遺伝子導入マウス及びカニクイザルを用いて、*in vivo* での B 細胞減少作用及び外来抗原に対する免疫応答について検討した。

ヒト CD20遺伝子導入マウスにオビヌツズマブ (10 mg/kg) を単回投与することにより、末梢血及びリンパ組織 (脾臓及びリンパ節) の B 細胞数が減少し、長期間持続した。その効果は、同用量のリツキシマブよりも強く持続的であった。カニクイザルにオビヌツズマブ (10 mg/kg) を1週間に1回、計2回投与した場合も同様であり、カニクイザルにおける末梢血及びリンパ組織 (脾臓及びリンパ節) の B 細胞数は長期間にわたり著しく減少し、その効果は、同用量のリツキシマブよりも強く持続的であった。

ヒト CD20遺伝子導入マウス及びカニクイザルを用いて、外来抗原に対する液性免疫応答を検討したところ、オビヌツズマブ投与により、新規の外来抗原に対する *de novo* 応答は強く抑制されたが、防御的に作用するメモリー応答には影響を及ぼさず保持された。

2.4.2.4 *In vivo* における抗腫瘍活性

ヒト NHL 細胞株のマウス皮下移植モデル及び NHL 細胞株を静脈内に直接移入した播種性増殖モデルを用いて、オビヌツズマブの腫瘍増殖抑制効果を検討した。

オビヌツズマブは、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫細胞株 SU-DHL-4、マントル細胞リンパ腫細胞株 Z-138、濾胞性リンパ腫細胞株 RL の皮下移植モデルにおいて、リツキシマブ及びオフアツムマブよりも強く腫瘍増殖を抑制し、用量の増加に伴って、より強い抑制活性を示した。また、多くの皮下移植モデルにおいて、オビヌツズマブは、腫瘍の完全退縮をもたらした。更に、Z-138細胞株の播種性増殖モデルにおいては、同用量のリツキシマブ投与群に比べ有意な生存期間の延長効果を示した。ヒト CD16 (FcγRIIIa) 遺伝子導入マウスに Z-138細胞株を移植した播種性増殖モデル、及びバーキットリンパ腫細胞株 Raji の播種性増殖モデルにおいても、オビヌツズマブ投与群では、対照群に比べ有意な生存期間の延長が認められた。

リツキシマブ抵抗性腫瘍に対する2次治療のモデルとして、SU-DHL-4細胞株の皮下移植モデルに先ずリツキシマブ (1週間に1回、30 mg/kg) を投与し、リツキシマブ抵抗性となった段階から、2次治療としてオビヌツズマブ (1週間に1回、30 mg/kg) 投与を開始し、リツキシマブ継続投与群と比較した。リツキシマブ継続投与群では、腫瘍増殖が進行したのに対し、オビヌツズマブ投与群では、腫瘍体積の増加を抑制した。したがって、リツキシマブ抵抗性腫瘍に対する2次治療においても、オビヌツズマブ投与の有効性が示唆された。

オビヌツズマブの *in vivo* における抗腫瘍効果に対し、直接的な細胞死の誘導活性が寄与しているかを検討するため、N 型糖鎖を欠如し ADCC 活性が著しく減退しているオビヌツズマブ N297D 変異体 (直接的な細胞死誘導活性は維持) を用い、SU-DHL-4細胞株の皮下移植モデルに投与して腫瘍増殖抑制効果を評価した。オビヌツズマブ N297D 変異体投与群 (1週間に1回、30 mg/kg) は、同用量のオビヌツズマブ投与群には劣るものの、リツキシマブ投与群と同程度の腫瘍増殖抑制活性を示したことから、*in vivo* においても、直接的な細胞死の誘導活性が腫瘍増殖の抑制に寄与していることが裏付けられた。また、オビヌツズマブ及びその糖鎖未改変体投与群では、全例で腫瘍の完全退縮が認められたことから、本モデルにおける腫瘍の完全退縮には、エフェクター細胞を介した ADCC/ADCP 活性の寄与が必要と考えられた。

オビヌツズマブに対する感受性は、NHL 細胞株の各移植モデル間で差があるものの、腫瘍増殖阻害率50%を達成するには、血中トラフ濃度として概ね10 µg/mL 以上、投与量として週1回1 mg/kg 以上が必要であった。また、SU-DHL-4細胞株の皮下移植モデルにおいて全例で腫瘍の完全退縮が認められた30 mg/kg 投与時の血中トラフ濃度は、312 µg/mL であった。

カニクイザル血清中の ADA 測定のための ELISA (4.2.2.1-3) を開発し使用した。この測定法では、ビオチン標識及びジゴキシゲン標識したオビヌツズマブをそれぞれ捕捉抗体及び検出用抗体として使用した。ADA 測定は2段階で実施し、まずスクリーニング試験により ADA 陽性試料を検出し、次にその陽性試料に対してオビヌツズマブ競合下の確認試験を実施した。

2.4.3.2 単回投与試験

マウス及びカニクイザルでの単回投与試験における PK パラメータ平均値を表 2.4.3.2-1 に示す。

マウス及びカニクイザルに1あるいは10 mg/kg の用量で単回静脈内投与した際のオビヌツズマブのクリアランス (CL) は小さく、消失半減期 ($t_{1/2}$) は長かった。また定常状態での分布容積 (V_{ss}) は小さく、マウス及びサルの血漿量文献値¹²⁾のそれぞれ約2倍及び1.3倍相当であった。

表 2.4.3.2-1 オビヌツズマブ単回投与試験における PK パラメータ (平均値)

動物種, 投与経路 投与量	CL (mL/h/kg)	V_c (mL/kg)	V_{ss} (mL/kg)	C_{max} (μ g/mL)	AUC_{0-216h} (μ g $\cdot$ h/mL)	AUC_{inf} (μ g $\cdot$ h/mL)	$t_{1/2}$ (h)
マウス, IV							
1 mg/kg	0.648	45.3	89.4	21.2	NA	1540	125
10 mg/kg	0.281	42.1	107	232	NA	35600	288
カニクイザル, IV							
1 mg/kg	0.275	34.1	63.2	28.8	2250	3640	172
10 mg/kg	0.246	31.3	58.9	324	27600	40800	194
カニクイザル, SC							
3.1 mg/kg	NA	NA	NA	17.4	3230	5120	NA

IV: 静脈内, SC: 皮下, V_c : 中央コンパートメントの分布容積, C_{max} : 最高血清中濃度, AUC_{0-216h} : 0時間から216時間までの血清中薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC), AUC_{inf} : 0時間から無限大時間までの AUC, NA: 対応データなし

マウスは各時点2例の濃度平均値を用いて算出した PK パラメータを示す。

カニクイザルは各投与群2例の PK パラメータの平均値を示す。ただし、静脈内投与した4例のうち1 mg/kg 群の1例及び10 mg/kg 群の2例は投与後216時間 (ADA 産生によると思われる消失の加速が認められない時点) まで、それ以外の1例では投与後672時間までの血清中濃度を解析に使用した。

[4.2.2.2-1 Table 3, 4.2.2.2-2 Table 3及び Table 4, 4.2.2.2-3 Table 2より作成]

以上のマウス及びカニクイザルにおけるオビヌツズマブの薬物動態は、公表されている IgG タイプの抗体薬の特徴 (CL 及び V_{ss} が小さく、 $t_{1/2}$ が長い) と一致している¹³⁾⁻¹⁵⁾。また、カニクイザルにおいては単回投与量範囲 (1~10 mg/kg) において用量に比例した薬物動態が認められた。

薬力学的な指標である末梢血中の B 細胞割合の推移とオビヌツズマブの血清中濃度を比較したところ、オビヌツズマブの投与直後よりほぼ完全に枯渇した B 細胞は、オビヌツズマブの血清中濃度が十分に低下したのち回復し始めることが認められた (図2.6.4.3.1.2-2)。

単回皮下投与後のバイオアベイラビリティは43~50%であった (AUC_{0-216h} 値を1 mg/kg 単回静脈内投与後の AUC_{0-216h} 値と比較)。

2.4.3.3 反復投与試験

カニクイザルにおける反復投与毒性試験 (13週間及び26週間静脈内投与 5~100 mg/kg/週, 4週間皮下投与30~120 mg/body/週) での TK 評価を実施した。

いずれの試験においても、用いた投与量範囲において全身曝露量は概ね用量比例的に増加し、明らかな雌雄差は認められなかった。反復投与後の曝露量は初回投与時の2～3倍であった。

4週間皮下投与試験での30 mg/body/週群初回投与時のオビヌツズマブのバイオアベイラビリティは約59%であった（AUC_{0-168h} 値を13週間静脈内投与試験の10 mg/kg/週群初回投与時のAUC_{0-168h} 値と比較）。

薬力学的な観点からは、オビヌツズマブの投与後、期待する末梢血 B 細胞の急速な減少（枯渇）が認められた。いずれの反復投与試験においても ADA の産生が認められ、26週間静脈内投与試験では、薬物投与群の ADA 陽性率は19%であった。それらの個体の一部ではオビヌツズマブの消失の加速とそれに引き続く早期の末梢血 B 細胞の回復も認められた。すなわち、血清中オビヌツズマブ濃度が末梢血 B 細胞数に影響を与えていること、また、ADA 産生は血清中オビヌツズマブ濃度（急激な低下）及び末梢血 B 細胞数推移（早期回復）に影響を与えていることが示唆された。

2.4.3.4 その他の薬物動態試験

妊娠カニクイザルを用いた ePPND 試験において、投与期間中の薬物投与群での母動物におけるオビヌツズマブの曝露量を確認した。非妊娠雌カニクイザル（26週間静脈内投与試験）と比較して、C_{max} 及び AUC は同様であることから、妊娠はオビヌツズマブの薬物動態に影響を与えないことが示唆された。母動物の乳汁中オビヌツズマブ濃度は血清中濃度の0.5%未満であり、オビヌツズマブの乳汁への移行性は極めて低いことが推察された。一方、出産後28日目における出生児と母動物の血清中オビヌツズマブ濃度は同様な範囲にあり、妊娠中に母動物に投与されたオビヌツズマブが血液－胎盤関門を通過することが示唆された。ADA 陽性率は母動物及び出生児でほぼ同じ（14～15%）であり、これは、26週間静脈内投与試験でみられたものと同程度であった。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 急性毒性試験

オビヌツズマブでは独立した急性毒性試験は実施していない。ICH M3(R2)（医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス）に従い、オビヌツズマブの急性毒性に関する情報はカニクイザルを用いた反復投与毒性試験（最大100 mg/kg までの用量で投与）から得た。オビヌツズマブの初回投与後に顕著な毒性は認められなかった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

オビヌツズマブの反復投与毒性試験として週1回静脈内投与によるカニクイザル2週間（投与量：1, 10 mg/kg/週，回復試験：4又は8週間），13週間（投与量：0, 10, 30, 100 mg/kg/週，回復試験：37週間）及び26週間静脈内投与試験（投与量：0, 5, 25, 50 mg/kg/週，回復試験：37週間）を実施した。また、これらの試験に加えて週1回皮下投与によるカニクイザル4週間皮下投与試験（0, 30, 120 mg/body/週，回復期間：28週間）を実施した。表 2.4.4.2-1に13週間及び26週間静脈内投与試験の曝露量及び臨床用量（1000 mg）投与時と比較した曝露量比を示した。反復静脈内投与毒性試験の高用量における曝露量比は、C_{max} ではおよそ3～6倍、AUC ではおよそ3～4倍であった。また、各試験における無毒性量は、13週間静脈内投与試験では30 mg/kg/週、26週間静脈内投与試験では5 mg/kg/週未満であった。

表 2.4.4.2-1 カニクイザル反復静脈内投与毒性試験の曝露量及び曝露量比（動物/ヒト）

動物種	投与量 (mg/kg, 週1回)	C _{max} (µg/mL)	AUC _{0-168h} (µg•h/mL)	曝露量比 ^a	
				C _{max}	AUC
13週間静脈内 投与試験 (投与78日目)	10	469	35400	0.50	0.31
	30	1540	147000	1.7	1.3
	100	5160	466000	5.6	4.1
26週間静脈内 投与試験 (投与176日目)	5	377	39800	0.41	0.35
	25	1530	183000	1.7	1.6
	50	2920	344000	3.2	3.0

a JO29737試験で、1000 mg を3週間ごとに投与したときのヒト曝露量（cycle 2の Day 1に投与し、Day 8までの血清中オビヌツズマブ濃度で算出した C_{max} (925 µg/mL) 及び AUC_{last} (114480 µg•h/mL)) を基に計算。

反復投与毒性試験では、1 mg/kg/週以上の静脈内投与及び30 mg/body/週以上の皮下投与で末梢血 B 細胞が減少し、それに一致した B 細胞枯渇がリンパ組織で認められた。B 細胞の枯渇はオビヌツズマブの薬理作用と一致したものであった。37週間の回復期間終了時までにはリンパ組織の B 細胞は回復又は回復傾向を示したが、末梢血の B 細胞の回復には個体差がみられた。

NK 細胞減少が5 mg/kg/週以上の静脈内投与及び30 mg/body/週以上の皮下投与で認められ、オビヌツズマブの薬理作用機序である FcγRIIIa 結合性及び ADCC に関連したものと考えられた¹⁶⁾。

26週間静脈内投与試験ではアナフィラキシー反応／アナフィラキシー様反応（5 mg/kg/週以上）、免疫複合体を介する過敏反応に一致した全身性の炎症反応及び細胞浸潤、動脈炎／動脈周囲炎、糸球体腎炎及び漿膜／外膜炎の出現率の増加が認められ（5 mg/kg/週以上）、投与期間及び回復期間を通じて6例が瀕死状態から安楽死処置された。カニクイザルにおいてはヒト化 IgG である本薬が異種蛋白として認識されることから、カニクイザルで認められた免疫原性はヒトにおける免疫原性を予測するものではないと考える。

4週間皮下投与試験及び13週間静脈内投与試験では3例（4週間皮下投与試験：120 mg/body/週の1例、13週間静脈内投与試験：100 mg/kg/週の2例）が瀕死状態から安楽死処置された。瀕死状態は B 細胞枯渇の二次的影響である日和見感染によるものと推察されたが、26週間静脈内投与試験の安楽死例との病理組織学的所見の類似性を考慮すると、これら3例で過敏反応が起こっていた可能性も考えられる。

2.4.4.3 遺伝毒性試験及びがん原性試験

ICH S6(R1)及び ICH S9ガイドラインに従い、オビヌツズマブの遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施していない。

2.4.4.4 生殖発生毒性試験

オビヌツズマブでは生殖発生毒性試験として、カニクイザルを用いた ePPND 試験を実施した。表 2.4.4.4-1に ePPND 試験の曝露量及び臨床用量（1000 mg）投与時と比較した曝露量比を示した。ePPND 試験の高用量における曝露量比は、C_{max} ではおよそ3倍、AUC ではおよそ2倍であった。

表 2.4.4.4-1 カニクイザル ePPND 試験の曝露量及び曝露量比(動物/ヒト)

動物種	投与量 (mg/kg/週)	C _{max} (µg/mL)	AUC _{0-168h} (µg•h/mL)	曝露量比 ^a	
				C _{max}	AUC
カニクイザル (妊娠139日目)	25	1220	125000	1.3	1.1
	50	2470	250000	2.7	2.2

a JO29737試験で、1000 mg を3週間ごとに投与したときのヒト曝露量 (cycle 2の Day 1に投与し、Day 8までの血清中オビヌツズマブ濃度で算出した C_{max} (925 µg/mL) 及び AUC_{last} (114480 µg•h/mL)) を基に計算。

雌雄受胎能に対する影響は、成熟カニクイザルを用いた26週間静脈内投与試験において評価した。この試験において、オビヌツズマブを50 mg/kg までの用量で週1回、26週間にわたり静脈内投与したとき、雄では精巣容積、精子形成、精子数、精子運動性及び形態に影響はみられず、雌でも月経周期、プロラクチン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、エストラジオールあるいはプロゲステロンに対する影響はみられなかった。また、雌雄の生殖器の器官重量及び病理組織学的所見にも影響は認められなかった。これらの結果から、オビヌツズマブが雌雄受胎能に影響する可能性は低いと考えられた。

ePPND 試験では、妊娠カニクイザルに妊娠20日目から出産までオビヌツズマブを週1回、50 mg/kg まで静脈内投与した。母動物の体重、一般症状及び出産に薬物に直接起因した変化はなかった。胚・胎児毒性及び催奇形性は認められなかったが、出生児で B 細胞が完全に枯渇した。50 mg/kg の出生児では軽度の体重増加抑制がみられたが、正常な変動範囲内の値であり、本所見の毒性学的意義は低いと考えられた。出産後28日目の出生児血清中のオビヌツズマブの濃度はほぼ母動物の血清中濃度の範囲内であった。同日の乳汁中オビヌツズマブ濃度は非常に低く、出生児への曝露は妊娠中に起きたと考えられた。出生児の B 細胞数は出産後6カ月間以内に正常レベルまで戻り、免疫機能 (T 細胞依存性抗体産生) に影響は認められなかった。

本試験で安楽死処置されたあるいは死亡した投薬群の母動物 (6/37例) 及び出生児 (3/21例) の死因は、日和見感染、薬物に対する免疫反応、あるいはその両方に関連したものと推察された。

2.4.4.5 局所刺激性試験

オビヌツズマブの局所刺激性は、臨床製剤と同じ処方の製剤を用いて実施した静脈内投与又は皮下投与による反復投与毒性試験で評価した。オビヌツズマブの局所忍容性は良好であった。

2.4.4.6 その他の毒性試験

ヒト組織において、オビヌツズマブの結合性は、リンパ組織 (小腸及び胃の腸管関連リンパ組織、リンパ節、脾臓、胸腺及び扁桃腺) の常在性リンパ球、乳腺のリンパ球、骨髄のリンパ球又は造血細胞、その他の組織内 (甲状腺) の遊走リンパ球で認められた。同様の結合パターンがカニクイザル組織においてもみられた。

ヒト全血アッセイでは、陰性対照であるセツキシマブに比べてオビヌツズマブは顕著なサイトカイン放出 (IL-6, IL-8及び TNF-α) を誘導し、抗 CD20抗体であるリツキシマブ及びオファツムマブよりも強くサイトカイン放出、好中球の活性化並びに B 細胞の枯渇を誘導した。これらのことは、オビヌツズマブが患者において初回投与に関連したサイトカイン放出を誘発する可能性を示唆しており、臨床試験で観察された一過性のサイトカインの変化 (IRR) と一致すると考えられた (2.5.5.6.1)。

オビヌツズマブは5 mg/mL までの濃度において、ヒト全血に対して溶血作用を示さず、ヒト血漿に対して凝集作用を示さなかった。

2.4.4.7 新添加物の安全性評価

L-ヒスチジン塩酸塩水和物及びトレハロース水和物は、オビヌツズマブの点滴静注用製剤（1バイアル40 mL にオビヌツズマブ1000 mg 含有）に含まれる添加物である。オビヌツズマブの臨床推奨用量（1日投与量：1000 mg）においては、L-ヒスチジン塩酸塩水和物（1日投与量：1.5 mg/kg、体重60 kg 換算、以下同じ。）及びトレハロース水和物（1日投与量：60.5 mg/kg）は医薬品添加物としての使用前例を上回り（L-ヒスチジン塩酸塩水和物の1日最大使用量：0.83 mg/kg、トレハロース水和物の1日最大使用量：3.6 mg/kg）、新添加物に該当することから、安全性評価を行った。

なお、L-ヒスチジン塩酸塩水和物は、水溶液中で L-ヒスチジン及び塩酸塩（塩化水素）の各成分に解離すると考えられるが、L-ヒスチジン並びに塩酸塩（塩化水素）については、医薬品添加物としての静脈内投与における使用前例の範囲内であった。

(1) L-ヒスチジン塩酸塩水和物

L-ヒスチジン塩酸塩水和物を含有する溶媒を用いたオビヌツズマブの毒性試験として、カニクイザルの26週間静脈内投与試験（2.6.6.3.3）及び ePPND 試験（2.6.6.6.1）が実施された。

カニクイザルを用いた26週間静脈内投与試験の溶媒群では、L-ヒスチジン塩酸塩水和物として4.48 mg/kg（臨床における1日投与量の3倍）が週1回26週間まで投与されたが、死亡例はなく、一般症状、体重、摂餌量、臨床検査、剖検所見、病理組織学的検査に L-ヒスチジン塩酸塩水和物の投与に関連した毒性は認められなかった。また、雌雄生殖器及び生殖パラメータに影響は認められなかった。カニクイザルを用いた ePPND 試験の溶媒群では、L-ヒスチジン塩酸塩水和物として4.48 mg/kg（臨床における1日投与量の3倍）が週1回妊娠20日から出産まで投与されたが、胚・胎児発生、出産、出生後の生存、出生児の成長及び発達に影響は認められなかった。

このように、L-ヒスチジン塩酸塩水和物の非臨床データは限られているが、以下に基づき考察すると、臨床において L-ヒスチジン塩酸塩水和物を1.5 mg/kg の用量で静脈内投与した時の安全性に問題はないと考えられた。

- ① 水溶液中で解離した L-ヒスチジンと塩酸塩（塩化水素）の各成分については医薬品添加物としての使用前例の範囲内にあること。
- ② オビヌツズマブ投与時の L-ヒスチジン塩酸塩水和物の1日投与量は、既承認の必須アミノ酸製剤『ハイ・プレアミン注-10%』に、有効成分として含有される L-ヒスチジン塩酸塩水和物の1回最大投与量のおよそ1/30であること（ハイ・プレアミン注-10%：1日あたり2500 mg、体重60 kg あたりで換算すると41.7 mg/kg）¹⁷⁾。
- ③ L-ヒスチジン塩酸塩水和物の1日投与量の3倍（4.48 mg/kg）を投与した、オビヌツズマブ反復投与毒性試験及び ePPND 試験の溶媒群では、L-ヒスチジン塩酸塩水和物に起因した所見は認められないこと。

(2) トレハロース水和物

トレハロース水和物の静脈内投与による毒性試験として、マウス及びラットの単回投与試験^{18),19)}、マウスの連日投与による2週間投与試験²⁰⁾及び遺伝毒性試験^{18),19)}（復帰突然変異試験、染色体異常試験及び小核試験）が行われている。また、トレハロース水和物を含有する溶媒を用いたオビヌツズマブの毒性試験として、カニクイザルの26週間投与試験（2.6.6.3.3）及び ePPND 試験（2.6.6.6.1）が実施された。

単回投与試験における概略の致死量は1000 mg/kg より上であり、遺伝毒性試験は陰性であった。トレハロース水和物の静脈内投与による毒性試験では、投与可能最高用量である1000 mg/kg（臨床における1日投与量の16.5倍）でマウスに2週間連日投与が行われ、全身性の毒性は認められなかった。カニクイザルを用いた26週間静脈内投与試験の溶媒群ではトレハロース水和物として181.6 mg/kg（臨床における1日投与量の3倍）の用量で週1回26週間

まで投与されたが、死亡例はなく、一般症状、体重、摂餌量、臨床検査、剖検所見、病理組織学的検査にトレハロース水和物投与に関連した毒性は認められなかった。また、雌雄生殖器及び生殖パラメータに影響は認められなかった。トレハロース水和物として181.6 mg/kg（臨床における1日投与量の3倍）の用量で週1回妊娠20日から出産まで投与されたePPND試験の溶媒群において胚・胎児発生、出産、出生後の生存、出生児の成長及び発達に影響は認められなかった。

これらの結果及び静脈内投与においてはトレハロース水和物の生体内での蓄積性が低いと予想されることに基づいて考察すると、臨床においてトレハロース水和物を60.5 mg/kgの用量で静脈内投与した時の安全性に問題はないと考えられた。

2.4.5 総括及び結論

オビヌツズマブは、糖鎖改変が施された新規のタイプ II 抗 CD20抗体である。非臨床薬理試験では、タイプ I 抗体であるリツキシマブ又はオフアツムマブと比較することにより、直接的な細胞死誘導活性、ADCC/ADCP 活性において、オビヌツズマブが優れていること、一方、CDC 活性は、両抗体に比べ低下していることを種々のヒト NHL 細胞株を用いて示した。また、健康な供血者及び CLL 患者から採取した全血を用いて、*ex vivo* での B 細胞減少作用を検討したところ、オビヌツズマブはリツキシマブよりも優れた効果を示した。

このようなオビヌツズマブの効果は、本抗体が有する2つの作用によるものと考えられる。

1) タイプ II 抗 CD20抗体としての機能に基づく作用

- タイプ I 抗体よりも、B 細胞に対する直接的な細胞死の誘導活性に優れている。この細胞死は、典型的なアポトーシスに基づくものではなく、他のタイプ II 抗体と同様、リソソームを介する機序による細胞死である^{5)~7)}。
- タイプ I 抗体よりも、CDC 活性が低下している。NK 細胞の活性化に対し、補体の影響を受けにくいこととの関係が示唆される²¹⁾。
- タイプ I 抗体よりも、CD20抗体の細胞内インターナリゼーションを誘導する活性が低く、細胞表面での CD20発現がより持続すると考えられるため、エフェクター細胞と結合しやすい可能性がある。

2) 糖鎖改変による FcγRIIIa 及び FcγRIIIb との親和性向上に基づく作用

- FcγRIIIa を発現している細胞（NK、単球及びマクロファージ）による ADCC 活性が、糖鎖未改変の抗体に比べ増強されている。
- FcγRIIIa を発現している細胞（単球及びマクロファージ）並びに FcγRIIIb を発現している細胞（好中球）による ADCP 活性が、糖鎖未改変の抗体に比べ増強されている。

このような B 細胞に対する直接的な細胞死の誘導活性及び ADCC 活性等の増強により、オビヌツズマブはヒト NHL 細胞株のマウス皮下移植モデル及び播種性増殖モデルにおいて、リツキシマブよりも優れた抗腫瘍活性を示した。また、オビヌツズマブでは、皮下移植モデルにおいて、腫瘍が完全に退縮した個体の割合が高く、播種性増殖モデルでは生存期間の延長効果を示した。ヒト NHL 細胞株の移植モデルにおいて、オビヌツズマブが、このような強い効果を示す投与量は、10~100 mg/kg であった。更に、オビヌツズマブとベンダムスチン等の化学療法薬との併用により、腫瘍増殖抑制効果が増強され、オビヌツズマブとの併用投与による抗腫瘍効果は、リツキシマブとの併用時よりも優れていた。

B 細胞減少作用を指標として、ヒト CD20遺伝子導入マウス及びカニクイザルにオビヌツズマブを投与した試験では、末梢血及びリンパ組織（脾臓辺縁帯を含む）の B 細胞を著しく減少させる効果を示した。また、外来抗原に対する免疫応答試験では、新規外来抗原に対する抗

体産生応答が抑制され、B 細胞減少作用が優れていることとの関係が推察されたが、既に抗原に感作されたメモリー応答については、損なうことなく保持された。

一連の非臨床薬理試験の結果から、オビヌツズマブは、タイプ II 抗体としての機能と糖鎖改変による ADCC/ADCP 活性の向上とが相まって、臨床においても優れた抗腫瘍効果を示すことが期待される。

マウス及びカニクイザルにおけるオビヌツズマブの薬物動態は公表されている IgG タイプの抗体薬の特徴（CL 及び V_{ss} が小さく、 $t_{1/2}$ が長い）と一致している。試験した投与量範囲において、カニクイザルでの曝露量は概ね用量比例的であった。血清中オビヌツズマブ濃度は末梢血 B 細胞の枯渇や回復に影響を与えていること、また、ADA 産生は血清中オビヌツズマブ濃度（急激な低下）及び末梢血中 B 細胞数推移（早期回復）に影響を与えていることが示唆された。

In vivo 毒性試験はオビヌツズマブの安全性評価において唯一の適切な動物種であるカニクイザルを用いて実施した。臨床推奨用量（1000 mg）のおよそ3倍高い曝露量を示す50 mg/kg までの用量で、週1回26週間までオビヌツズマブを投与したときに認められた所見の多くは、薬理作用あるいは免疫原性に関連したものであった。オビヌツズマブの薬理作用に一致して末梢血及びリンパ組織の B 細胞が枯渇したが、休薬により回復又は回復傾向を示した。オビヌツズマブ投与動物で散見された日和見感染は B 細胞枯渇の二次的な影響と推察された。感染症については添付文書等で注意を喚起する。初回投与後に認められた NK 細胞の減少は、ADCC 後に NK 細胞のアポトーシスが生じたことによる可能性が高いと考えられた¹⁶⁾。

オビヌツズマブは生殖パラメータ、胚・胎児発生、出産、出生後の生存、出生児の成長及び発達に影響を及ぼさなかった。しかしながら、IgG は胎盤を通過すること、オビヌツズマブの乳汁移行がわずかではあるが認められていること、及び出生児で B 細胞の枯渇が認められていることから、妊娠中及び授乳中の投与については添付文書等で注意を喚起する。26週間静脈内投与試験及び ePPND 試験では過敏反応に関連した変化（免疫複合体性糸球体腎炎、全身性の炎症／細胞浸潤など）が全投薬群で観察された。これらの所見は、カニクイザルではヒト化 IgG であるオビヌツズマブが異種蛋白と認識されることによるものと考えられ、ヒトにおける免疫原性を予測するものではない。*In vitro* サイトカイン放出試験の結果から、オビヌツズマブが患者において初回投与時にサイトカイン放出を誘発する可能性があることが予想された。オビヌツズマブ投与患者で高頻度に観察された有害事象が IRR であることも考慮し、IRR については添付文書等で注意を喚起する。

このように、オビヌツズマブは種々の CD20陽性の血液腫瘍に対して有効性を示した。毒性試験において認められた所見は薬理作用又は異種蛋白投与による免疫原性に関連したものであったが、これらの所見は可逆的であり、モニター可能であるなど本薬の安全性プロファイルは許容可能であると考えられた。また、PK プロファイルも IgG タイプのモノクローナル抗体において予想されるものであった。以上の非臨床試験の成績から、オビヌツズマブが CD20陽性の血液腫瘍の有効な治療薬になると考えられた。

2.4.6 参考文献

- 1) Poppema S, Visser L. Preparation and application of monoclonal antibodies: B cell panel and paraffin tissue reactive panel. Biotest Bull 1987;3:131-9.
- 2) Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. Blood 2010;115:4393-402.

- 3) Beers SA, Chan CHT, French RR, Cragg MS, Glennie MJ. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol* 2010;47:107-14.
- 4) Stanfield RL, Zemla A, Wilson IA, Rupp B. Antibody elbow angles are influenced by their light chain class. *J Mol Biol* 2006;357:1566-74.
- 5) Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, Honeychurch J, Alduaij W, Cox KL, et al. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest* 2009;119:2143-59.
- 6) Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, et al. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* 2011;117:4519-29.
- 7) Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, Cheadle EJ, Pelicano H, Ivanov A, et al. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood* 2012;119:3523-33.
- 8) Herter S, Herting F, Mundigl O, Waldhauer I, Weinzierl T, Fauti T, et al. Preclinical activity of the type II CD20 antibody GA101 (obinutuzumab) compared with rituximab and ofatumumab *in vitro* and in xenograft models. *Mol Cancer Ther*. 2013;12:2031-42.
- 9) Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, Liang Y, Bradney A, Oliver JA, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol* 2004;16:119-29.
- 10) Tabrizi MA, Tseng CM, Roskos LK. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discov Today* 2006;11:81-8.
- 11) Klein C, Lammens A, Schäfer W, Georges G, Schwaiger M, Mössner E, et al. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs* 2013;5:22-33.
- 12) Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res* 1993;10:1093-5.
- 13) Deng R, Iyer S, Theil FP, Mortensen DL, Fielder PJ, Prabhu S. Projecting human pharmacokinetics of therapeutic antibodies from nonclinical data: what have we learned? *MAbs* 2011;3:61-6.
- 14) Deng R, Jin F, Prabhu S, Iyer S. Monoclonal antibodies: what are the pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drug development? *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012;8:141-60.
- 15) Dirks NL, Meibohm B. Population pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet* 2010;49:633-59.
- 16) Warren HS. Target-induced natural killer cell loss as a measure of NK cell responses. *J Immunol Methods* 2011;370:86-92.
- 17) 必須アミノ酸製剤 ハイ・プレアミン注-10%：扶桑薬品工業株式会社. 添付文書，2011年9月改訂（第9版）.
- 18) Bär A. Trehalose produced by a novel enzymatic process. UK Advisory Committee on Novel Foods and Processes, 2000.
- 19) Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 871-98.
- 20) Dickrel L. 2-week intravenous toxicity study with trehalose in mice. Genentech Study No. 96-014-1450, Corning Hazleton Inc., Report CHW 6281-366, 1996.
- 21) Kern DJ, James BR, Blackwell S, Gassner C, Klein C, Weiner GJ. GA101 induces NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity more effectively than rituximab when complement is present. *Leuk Lymphoma* 2013;54:2500-5.