

**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)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
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
CD	cluster of differentiation	白血球分化抗原
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
Fc	fragment crystallizable	結晶化フラグメント
Fc γ R	Fc gamma receptor	Fc ガンマ受容体
FcRn	neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
NHL	non-Hodgkin's lymphoma	非ホジキンリンパ腫

目次

	<u>頁</u>
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表.....	4
2.6.1 緒言.....	4
2.6.1.1 オビヌツズマブの構造.....	4
2.6.1.2 抗ヒト CD20 抗体としての特性.....	4
2.6.1.3 オビヌツズマブの薬理学的特性.....	5
2.6.1.4 承認申請の概要.....	6
2.6.1.5 参考文献.....	6

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 オビヌツズマブの構造

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⁾の相補性決定領域にヒト IgG1フレームワークを組み合わせて作製した組換え型ヒト化モノクローナル抗体である²⁾。本抗体は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性等の生物活性を向上させるため、糖鎖改変が施されている。また、細胞死誘導活性を増強するためエルボーヒンジ部が改変されている。糖鎖を含まないペプチド鎖部分の分子量は、146,321である。

2.6.1.2 抗ヒト CD20抗体としての特性

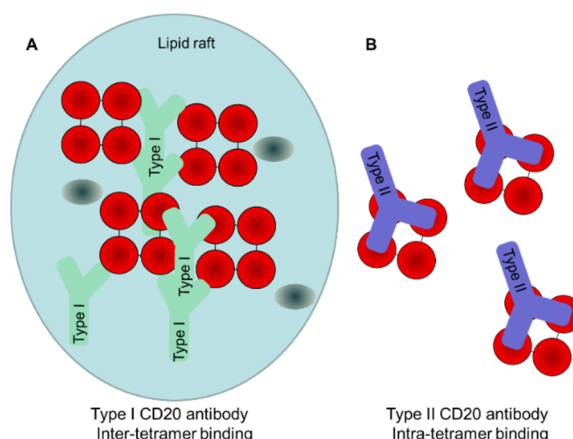
(1) 抗ヒト CD20抗体におけるタイプ I とタイプ II

抗 CD20抗体は、CD20分子との結合様式及び CD20陽性細胞に対する傷害作用機序に基づき、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⁾⁻⁶⁾。

タイプ I 抗体とタイプ II 抗体では、1細胞あたりで結合可能な抗体分子数が異なり、タイプ II 抗体はタイプ I 抗体の約1/2である^{7),8)}。これは、CD20分子との結合配座が、両抗体間で立体的に異なり、タイプ I 抗体は、CD20分子の四量体間を架橋して結合することで、四量体当たり2分子の抗体が結合できるが、タイプ II 抗体では四量体間を架橋できず、四量体当たり1分子の抗体（CD20としては2分子）しか結合できないと考えられている（図 2.6.1.2-1）^{6),9)}。リツキシマブ、オファツムマブ等のタイプ I 抗体の場合、CD20分子と抗体が結合した複合体は、細胞膜の脂質ラフトに移行することが知られており、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、補体依存性細胞傷害（CDC）が惹起される。一方、オビヌツズマブ、tositumomab 等のタイプ II 抗体は、CD20-抗体複合体の脂質ラフトへの移行を誘導しないため、タイプ I 抗体に比べ CDC 活性は減弱している⁸⁾。

オビヌツズマブ等のタイプ II 抗体では、B 細胞に結合した後、細胞凝集を誘導する活性がタイプ I 抗体に比べて強く、直接的な細胞死の誘導能も高い。この細胞死は、カスパーゼ活性化と DNA 断片化を伴う典型的なアポトーシスではなく、アクチン依存性で活性酸素の産生を伴うことが明らかになっている¹⁰⁾⁻¹²⁾。タイプ I 抗体及びタイプ II 抗体は、いずれも ADCC 活性及び抗体依存性細胞貪食（ADCP）活性を示すが、リツキシマブ等のタイプ I 抗体は、CD20分子との結合後に細胞内に移行し CD20の発現低下を誘導することが報告されており^{13),14)}、薬理的な効果を発現する上で制限要因になる可能性が示されている¹⁵⁾。このようなタイプ I 抗体による CD20分子の細胞内移行は FcγRIIb 介在性とされている¹⁶⁾、オビヌツズマブ等のタイプ II 抗体における細胞内移行率は低く¹⁴⁾、CD20分子と抗体が結合する際の立体配座との関係が示唆される。

図 2.6.1.2-1 CD20分子四量体とタイプ I 抗体及びタイプ II 抗体との結合様式に関するモデル



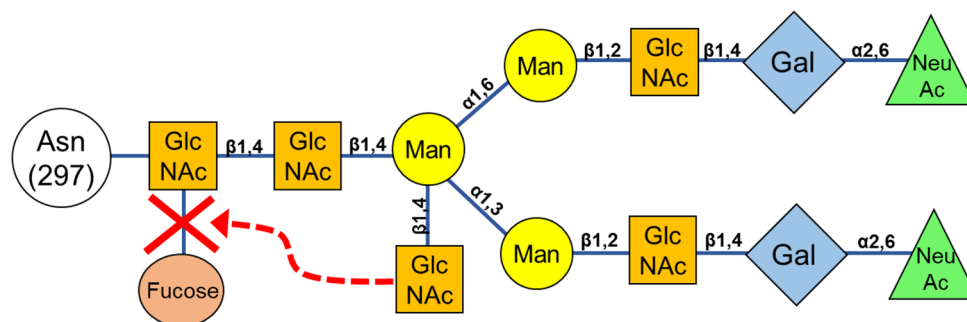
タイプ I 抗 CD20 抗体 (A) は、CD20 分子 (赤色、円) の四量体間を跨いで結合することができるが、タイプ II 抗体 (B) では、四量体に対し抗体 1 分子しか結合できないと推定される。FcγRIIIb (灰色、楕円)

[4.3-11⁶ Figure 2再掲]

(2) 糖鎖改変による ADCC 活性の増強

オビヌツズマブは、GlycoArt biotechnology AG による糖鎖改変技術 (GlycoMab) を用いており、 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ている^{2),17),18)}。本技術により、抗体の糖鎖におけるバイセクティング N-アセチルグルコサミンの付加率が増加することにより、フコース付加率が低下する (図 2.6.1.2-2)。このため、オビヌツズマブは、通常の IgG1 抗体に比べ、FcγRIIIa 及び FcγRIIIb に対し高親和性を示し、ADCC 活性及び ADCP 活性が増強されている。糖鎖改変技術による低フコース化により FcγRIIIa との親和性が向上することについては、X 線構造解析の試験結果からも明らかにされている¹⁹⁾。一方、FcγRIII と構造的に類似している FcγRII との親和性に対する糖鎖改変の影響はほとんど認められないが¹⁸⁾、これは FcγRIII と FcγRII では、IgG との結合様式が異なるためと考えられる^{19),20)}。更に、FcRn と IgG との結合様式は、FcγR と異なるため、糖鎖改変による FcRn 結合性の明らかな変化は示さず、抗体の体内動態に対する影響は認められていない。

図 2.6.1.2-2 GlycoMab 技術による Fc 領域の糖鎖改変



GlcNAc : N-アセチルグルコサミン, Man : マンノース, Gal : ガラクトース,
NeuAc : N-アセチルノイラミン酸

[4.3-32¹⁸⁾ Figure 1に基づいて作図]

2.6.1.3 オビヌツズマブの薬理学的特性

オビヌツズマブは、B 細胞の分化過程において pre-B 細胞から成熟 B 細胞に発現する CD20

を抗原として、特異的に結合する遺伝子組換え型ヒト化モノクローナル抗体である。

本抗体は、タイプ II 抗 CD20抗体であり、リツキシマブ及びオファツムマブ等のタイプ I 抗体と比較し、直接的な細胞死の誘導活性が強く、CDC 活性は弱い。また、糖鎖改変技術を用いることで Fc 領域に結合する糖鎖が低フコース化されているため、ナチュラルキラー細胞、単球/マクロファージ等に発現する FcγRIIIa 及び好中球に発現する FcγRIIIb に対する結合親和性が増強されており、リツキシマブよりも強い ADCC 活性及び ADCP 活性を誘導することができる。

ADCC 活性、CDC 活性及び直接的な細胞死誘導活性を統合的に評価するため、健康な供血者から得た全血を用いた B 細胞減少作用を検討したところ、本薬は、リツキシマブ及びオファツムマブよりも強い効果を示した。また、*in vivo* における本薬の B 細胞減少作用を評価するため、カニクイザル及びヒト CD20遺伝子導入マウスに投与したところ、末梢血とリンパ組織（脾臓、リンパ節）において、強く持続的な B 細胞減少作用を示した。

濾胞性リンパ腫を含む数種のヒト非ホジキンリンパ腫（NHL）細胞株を用いたマウス皮下移植モデル及び播種性増殖モデルに本薬を投与したところ、リツキシマブ及びオファツムマブよりも腫瘍増殖抑制活性が優れており、腫瘍の完全寛解を誘導し、生存期間の有意な延長をもたらした。また、NHL 細胞株を移植したマウス皮下移植モデルに、本薬と化学療法薬（シクロホスファミド、ビンクリスチン、ベンダムスチン、フルダラビン等）を併用投与することにより、抗腫瘍効果を増強し、併用効果を示した。

2.6.1.4 承認申請の概要

本申請で予定している効能・効果及び用法用量については、2.2に記載した。

2.6.1.5 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) Alduaij W, Illidge TM. The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? *Blood* 2011;117:2993-3001.
- 4) 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.
- 5) Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 2007;44:3823-37.
- 6) 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.
- 7) Chan HTC, Hughes D, French RR, Tutt AL, Walshe CA, Teeling JL, et al. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res* 2003;63:5480-9.
- 8) Cragg MS, Morgan SM, Chan HTC, Morgan BP, Filatov AV, Johnson PWM, et al. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 2003;101:1045-52.
- 9) Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M, et al. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 2011;118:358-67.
- 10) 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.
- 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) Beers SA, French RR, Chan HTC, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 2010;115:5191-201.
 - 14) Lim SH, Vaughan AT, Ashton-Key M, Williams EL, Dixon SV, Chan HTC, et al. Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood* 2011;118:2530-40.
 - 15) Vaughan AT, Cragg MS, Beers SA. Antibody modulation: Limiting the efficacy of therapeutic antibodies. *Pharmacol Res* 2015;99:269-75.
 - 16) Vaughan AT, Iriyama C, Beers SA, Chan CHT, Lim SH, Williams EL, et al. Inhibitory FcγRIIb (CD32b) becomes activated by therapeutic mAb in both cis and trans and drives internalization according to antibody specificity. *Blood* 2014;123:669-77.
 - 17) Ferrara C, Brünker P, Suter T, Moser S, Püntener U, Umaña P. Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: Influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous β1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi α-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng* 2006;93:851-61.
 - 18) Ferrara C, Stuart F, Sondermann P, Brünker P, Umaña P. The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J Biol Chem* 2006;281:5032-6.
 - 19) Ferrara C, Grau S, Jäger C, Sondermann P, Brünker P, Waldhauer I, et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:12669-74.
 - 20) Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-FcγRIII complex. *Nature* 2000;406:267-73.

**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)

2.6.2 薬理試験の概要文

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
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 concentration-time curve	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
CHOP	cyclophosphamide + hydroxydaunorubicin + vincristine + prednisolone	シクロホスファミド/ドキシソルビシン/ビンクリスチン/プレドニゾロン併用療法
CI	confidence interval	信頼区間
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
CV	cyclophosphamide + vincristine	シクロホスファミド/ビンクリスチン併用療法
CVP	cyclophosphamide + vincristine + prednisolone	シクロホスファミド/ビンクリスチン/プレドニゾロン併用療法
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
EC ₅₀	half-maximal effective concentration	50%有効濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
Fab	antigen-binding fragment	抗原結合性フラグメント
Fc	fragment crystallizable	結晶化フラグメント
FC	fludarabine + cyclophosphamide	フルダラビン/シクロホスファミド併用療法
FcγR	Fc gamma receptor	Fc ガンマ受容体
FcRn	neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
FL	follicular lymphoma	濾胞性リンパ腫
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	顆粒球単球コロニー刺激因子
GPI	glycosylphosphatidylinositol	グリコシルホスファチジルイノシトール
IFN-γ	interferon gamma	インターフェロンガンマ
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL	interleukin	インターロイキン
IQR	interquartile range	四分位範囲
K _D	dissociation constant	解離定数
KLH	keyhole limpet hemocyanin	スカシ貝ヘモシアニン
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
MCL	mantle cell lymphoma	マントル細胞リンパ腫
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
NO	nitric oxide	一酸化窒素
NP	4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl	4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチル

略語	英名	和名
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核細胞
PI	propidium iodide	ヨウ化プロピジウム
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	ホスホイノシチド3-キナーゼ
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合免疫不全症
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
PS	phosphatidylserine	ホスファチジルセリン
TCR	treatment-to-control ratio (tumor control ratio)	(対照群に対する各薬物投与群の腫瘍体積の比率)
tg	transgenic	遺伝子導入
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖阻害

目次

	頁
2.6.2 薬理試験の概要文.....	5
2.6.2.1 まとめ.....	5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....	8
2.6.2.2.1 オビヌツズマブの作製とタイプ II 抗 CD20 抗体としての基本特性.....	8
2.6.2.2.1.1 オビヌツズマブの作製.....	8
2.6.2.2.1.2 タイプ II 抗 CD20 抗体としての特性.....	8
2.6.2.2.1.3 CD20 結合活性及びエピトープ.....	10
2.6.2.2.2 <i>In vitro</i> 生物活性.....	14
2.6.2.2.2.1 CDC 活性.....	14
2.6.2.2.2.2 直接的な細胞死の誘導活性.....	15
2.6.2.2.2.3 糖鎖改変と ADCC 活性.....	18
2.6.2.2.3 全血中 B 細胞減少作用 (<i>ex vivo</i>).....	24
2.6.2.2.4 <i>In vivo</i> における B 細胞減少作用.....	27
2.6.2.2.4.1 ヒト CD20 遺伝子導入マウスにおける B 細胞減少作用.....	27
2.6.2.2.4.2 カニクイザルにおける B 細胞減少作用.....	31
2.6.2.2.5 <i>In vivo</i> 抗腫瘍活性.....	35
2.6.2.2.5.1 びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果.....	35
2.6.2.2.5.2 マントル細胞リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果.....	43
2.6.2.2.5.3 濾胞性リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果.....	47
2.6.2.2.5.4 バーキットリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果.....	50
2.6.2.3 副次的薬理試験.....	50
2.6.2.4 安全性薬理試験.....	50
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	51
2.6.2.5.1 共存する化学療法薬の影響 (<i>in vitro</i>).....	51
2.6.2.5.2 <i>In vivo</i> における化学療法薬との併用効果.....	52
2.6.2.6 考察及び結論.....	62
2.6.2.7 図表.....	63
2.6.2.8 参考文献.....	63

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

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-Ly1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。本抗体は、タイプ II 抗 CD20抗体であり、タイプ I 抗 CD20抗体であるリツキシマブよりも、直接的な細胞死の誘導活性が強く、補体依存性細胞傷害（CDC）作用が低下している。また、Fc 領域に結合している糖鎖とエルボーヒンジ部に改変を施すことにより、免疫エフェクター細胞による細胞傷害活性及び直接的な細胞死の誘導活性が強化されている。

抗 CD20抗体としては、リツキシマブとオフアツムマブが、非ホジキンリンパ腫（NHL）あるいは慢性リンパ性白血病（CLL）の治療薬として既に承認を取得していることから、薬効薬理試験では、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。

なお、本抗体は、オビヌツズマブ以外に GA101, GA101 GE, RO5072759とも称されており、2.6.2項の図中データでは、これらの呼称を使用した。

(1) オビヌツズマブの作製とタイプ II 抗 CD20抗体としての基本特性

ヒト化抗 CD20モノクローナル抗体であるオビヌツズマブを作製し、タイプ II 抗 CD20抗体としての基本的な特性、抗原結合活性、エピトープについて検討した。

- 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（Fab 領域のフレキシビリティーに関与）を改変した。更に、 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から産生することで糖鎖を改変し、オビヌツズマブを作製した。
- オビヌツズマブは、タイプ II 抗 CD20抗体としての基本的な特性を示した。すなわち、1) 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、2) タイプ I 抗体と異なり、CD20-抗体複合体は、細胞膜の脂質ラフトへの局在が認められなかった、3) リツキシマブと比べ、B 細胞の凝集誘導能が強かった、4) 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。
- オビヌツズマブは、CD20陽性の細胞株に対し選択的に結合性を示し、スキッチャード解析による解離定数 K_D は、4.0 nmol/L 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。オビヌツズマブとの結合では、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、オフアツムマブは、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たが、オビヌツズマブでは、細胞表面に留まる CD20分子の割合が高く、細胞内に移行する比率は小さいことが示唆された。

(2) *In vitro* での生物活性

オビヌツズマブによる生物活性について、CDC 活性、直接的な細胞死の誘導活性、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性及び抗体依存性細胞貪食（ADCP）活性を検討した。

- オビヌツズマブの CDC 活性は、リツキシマブの1/100~1/10,000（通常の培養条件での50%有効濃度（EC₅₀）に基づく比較）であり、オフアツムマブと比べても同様に弱かった。また、生理的濃度（10 mg/mL）の非特異的ヒト IgG の存在下で、リツキシマブは有意な CDC 活性を示したが、オビヌツズマブの CDC 活性は減退した。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た。
- オビヌツズマブは、直接的な細胞死の誘導活性において、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。
- GlycoMab 技術を用いて Fc 領域の糖鎖を改変した結果、FcγRIIIa 及び FcγRIIIb との親和性が向上することにより、FcγRIIIa を発現するナチュラルキラー（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 活性が認められた。

(3) 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に基づく B 細胞に対する傷害活性を、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 (*ex vivo*) を検討した。

- 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 (*ex vivo*) 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優れた B 細胞減少作用を示した。
- 遺伝子型が異なる3種の FcγRIIIa (IgG に対し低, 中, 高親和性) の内、いずれの検体であっても、オビヌツズマブは、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。
- N 型糖鎖を欠如したオビヌツズマブ変異体 (ADCC 活性が著しく低下, 直接的な細胞死の誘導活性は維持) は、オビヌツズマブよりも B 細胞減少作用が減退するものの、強い B 細胞減少作用を示した。したがって、オビヌツズマブによる 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。

(4) *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への作用について検討した。

- 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。オビヌツズマブの効果は、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回投与することにより、カニクイザルの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。オビヌツズマブの効果は、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、オビヌツズマブは、新規の外来抗原に対する抗体反応を強く抑制したが、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。

(5) *In vivo* 抗腫瘍効果

ヒト NHL 細胞株のマウス皮下移植モデル及び NHL 細胞株を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 (DLBCL) 細胞株 SU-DHL-4, マントル細胞リンパ腫 (MCL) 細胞株 Z-138, 濾胞性リンパ腫 (FL) 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ァ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。これら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。

- オビヌツズマブ（1週間に1回，10，30 mg/kg）は，Z-138細胞株の播種性増殖モデルにおいて，同用量のリツキシマブに比べ有意な生存期間の延長効果を示した。Z-138細胞株をヒトCD16（FcγRIIIa）遺伝子導入マウスに移植した播種性増殖モデルにおいても，オビヌツズマブ（1週間に1回，30 mg/kg）は，対照群に比べ有意な生存期間の延長効果を示した。また，バーキットリンパ腫細胞株 Raji の播種性増殖モデルでは，生存期間の延長が認められた。
- SU-DHL-4細胞株の皮下移植モデルにリツキシマブ（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投与（1週間に1回，30 mg/kg）を開始した試験において，オビヌツズマブは腫瘍の増殖を抑制した。
- オビヌツズマブのN型糖鎖を欠如したN297D変異体（ADCC活性が著しく低下，直接的な細胞死の誘導活性は維持，1週間に1回，30 mg/kg）は，SU-DHL-4細胞株の皮下移植モデルにおいて，同用量のオビヌツズマブには劣るもののリツキシマブと同程度以上の腫瘍増殖抑制活性を示した。
- SU-DHL-4細胞株の皮下移植モデルにおいて，オビヌツズマブ（1週間に1回，30 mg/kg）及び同用量のオビヌツズマブ糖鎖未改変体は，いずれも強い腫瘍増殖抑制活性を示し，全例で腫瘍が完全に退縮した。
- NHL細胞株の各移植モデル間でオビヌツズマブ感受性には差があるものの，腫瘍増殖阻害率（TGI）50%を達成するには，血中トラフ濃度は概ね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。

(6) 安全性薬理試験

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を行った。

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において，初回投与後及びそれに続く慢性曝露後に，中枢神経系，呼吸器系及び心血管系に対する薬物の影響は認められなかった。

(7) 化学療法薬との併用効果

ヒト NHL細胞株のマウス皮下移植モデルを用いて，既に国内あるいは海外の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。

- 臨床において抗CD20抗体と併用されているプレドニゾン及びクロラムブシルは，オビヌツズマブのADCC活性に対し，臨床上問題となる影響はないことが，*in vitro*での試験結果から示唆された。
- オビヌツズマブ（1週間に1回，30 mg/kg）とシクロホスファミド + ビンクリスチンの併用は，DLBCL細胞株WSU-DLCL2の皮下移植モデルにおいて併用効果を示した。
- オビヌツズマブ（1週間に1回，30 mg/kg）とシクロホスファミドの併用は，FL細胞株RLの皮下移植モデルにおいて併用効果を示した。
- オビヌツズマブ（1週間に1回，1 mg/kg）とベンダムスチン又はフルダラビンの併用は，MCL細胞株Z-138の皮下投与移植モデルにおいて併用効果を示した。
- いずれの*in vivo*試験においても，オビヌツズマブと化学療法薬との併用投与における腫瘍増殖抑制効果は，リツキシマブと化学療法薬との併用投与よりも強い傾向を示した。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 オビヌツズマブの作製とタイプ II 抗 CD20抗体としての基本特性

2.6.2.2.1.1 オビヌツズマブの作製

(1) ヒト化抗体の作製

(資料番号4.2.1.1-1)

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 (IgG1)¹⁾をヒト化することにより作製した。マウス抗体である B-Ly1 の遺伝子から H 鎖及び L 鎖に各3箇所ある complementarity determining region (相補性決定領域) に相当する部分を切り出し、アクセプターとなるヒト抗体の H 鎖及び L 鎖遺伝子のフレームワーク部分に組み込むことでヒト化した。種々のフレームワークを用いてヒト化抗体を作製し、ヒトリンパ腫細胞の CD20 に対し高親和性を示す候補抗体を選んだ。

(2) 直接的な細胞死誘導活性の増強

(資料番号4.2.1.1-1)

タイプ II 抗 CD20抗体として、直接的な細胞死誘導活性が向上した抗体を得るため、候補抗体の変異体を作製し Annexin V/PI (propidium iodide) 試験を用いて細胞死誘導活性を評価した。Fab 領域のフレキシビリティーに関与するエルボーヒンジ部²⁾の H 鎖11位ロイシンをバリンに変換することにより、顕著な細胞死誘導活性の増強が認められ、目的とする抗体遺伝子を取得した。

(3) GlycoMab 技術による糖鎖改変

(資料番号4.2.1.1-2, 4.2.1.1-3)

オビヌツズマブは、Fc 領域に結合している糖鎖のフコース含有率を低下させるため、 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産生している^{3,4)}。糖鎖改変により、オビヌツズマブの Fc γ RIIIa 及び Fc γ RIIIb に対する結合親和性が増強されている。

2.6.2.2.1.2 タイプ II 抗 CD20抗体としての特性

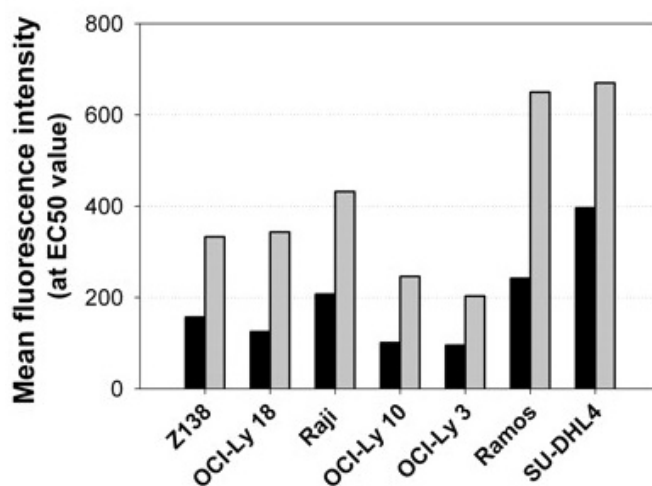
(資料番号4.2.1.1-4, 4.2.1.1-5, 4.2.1.1-6, 4.2.1.1-7, 4.2.1.1-8, 4.2.1.1-9, 4.2.1.1-10)

抗 CD20抗体は、抗原との結合様式、生物活性等の違いに基づいて、タイプ I 及びタイプ II の2種類に分類することができる(表2.4.2.1-1)^{5,6)}。リツキシマブ等のタイプ I 抗 CD20抗体は、ADCC 活性と CDC 活性を強く誘導する。一方、タイプ II 抗 CD20抗体は、直接的な細胞死の誘導活性に優れ、ADCC 活性も強く誘導するが、CDC 活性はほとんど惹起しない^{5,6)}。オビヌツズマブの特性をリツキシマブと比較したところ、オビヌツズマブはタイプ II 抗 CD20抗体として、以下の特性を示した。

- CD20陽性の NHL 細胞株に結合する1細胞あたりの抗体分子数をフローサイトメーターを用いて計測したところ、オビヌツズマブの結合数は、リツキシマブの約1/2であった(図2.6.2.2.1.2-1)。
- CD20陽性の NHL 細胞株にオビヌツズマブ及びリツキシマブを結合させ、CD20-抗体複合体の挙動を調べたところ、リツキシマブとの複合体は、脂質ラフト (Triton X-100等の界面活性剤に抵抗性を示す膜画分) に局在したが、オビヌツズマブとの複合体は Triton X-100可溶性画分に存在し、オビヌツズマブは脂質ラフト中への移動を誘導しなかった。Ramos 細胞の例を図2.6.2.2.1.2-2A に示す。また、両抗体を蛍光標識し、コレラトキシンサブユニット B を脂質ラフトのマーカーとして、細胞内での局在を検討したところ、リツキシマブは、コレラトキシンサブユニット B と同様の局在性を示したが、オビヌツズマブは挙動が一致せ

- ず、異なる局在性を示した (図 2.6.2.2.1.2-B, C)。
- タイプ I 抗 CD20抗体では、CD20-抗体複合体が脂質ラフト中に集積することで、強い CDC 活性が惹起されるが、タイプ II 抗 CD20抗体では、このような集積は起こらないため、タイプ I 抗体に比べ CDC 活性が弱いと考えられる⁶⁾。オビヌツズマブの CDC 活性は、EC₅₀に基づいた比較で、リツキシマブよりも著しく弱く、タイプ II 抗 CD20抗体としての特性を示す。
 - オビヌツズマブは、リツキシマブと比べ、*in vitro* における B 細胞の凝集誘導能が強い (図 2.6.2.2.1.2-3)。
 - オビヌツズマブは、リツキシマブと比べ NHL 細胞株に対する直接的な細胞死の誘導活性が優れている (図 2.6.2.2.2.2-1)。

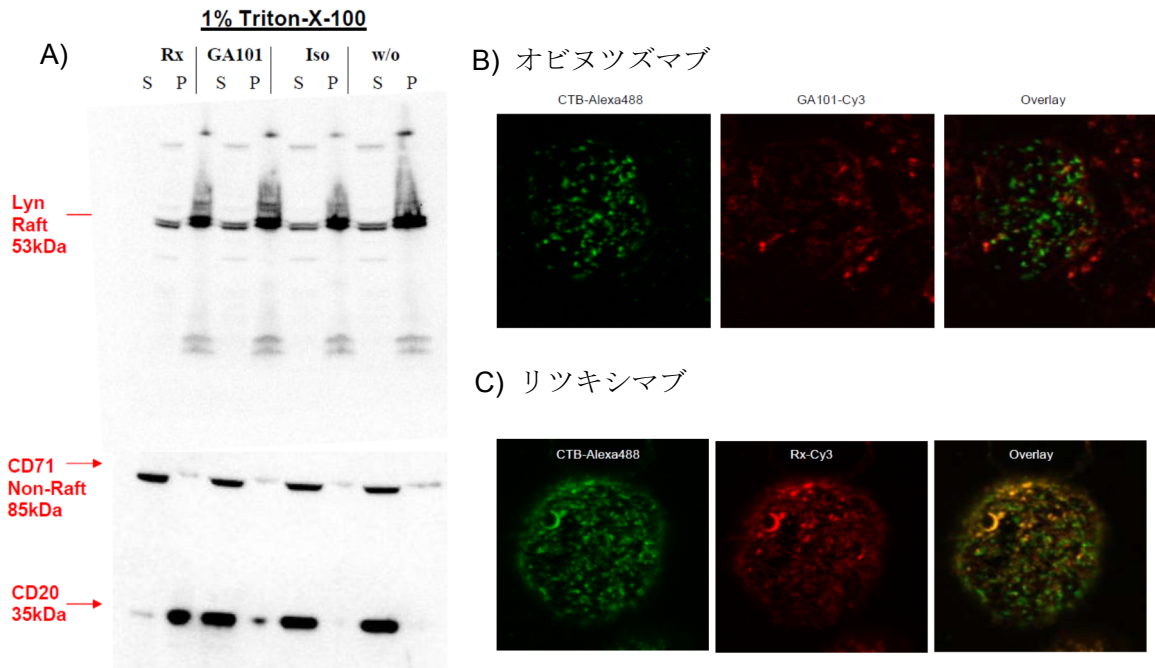
図 2.6.2.2.1.2-1 タイプ II 抗 CD20抗体としてのオビヌツズマブの特性(1)



Cy5標識オビヌツズマブ (■) Cy5標識リツキシマブ (□)
 両抗体の最大結合量の50%結合時における蛍光強度を示した。

[4.3-2³⁾ Figure 2A 再掲, 4.2.1.1-4 Figure 3を改変]

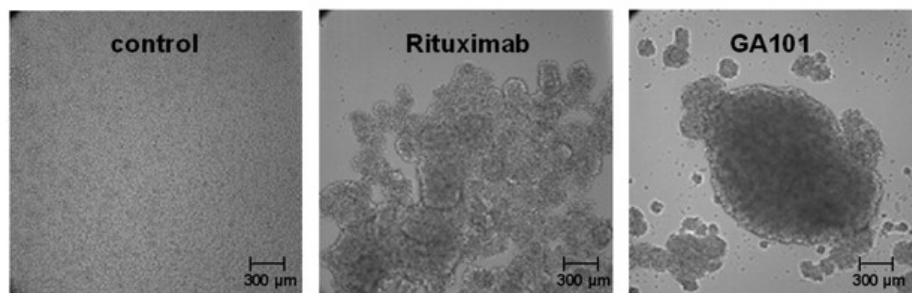
図 2.6.2.2.1.2-2 タイプ II 抗 CD20抗体としてのオビヌツズマブの特性 (2)



A) オビヌツズマブ処理した Ramos 細胞を溶解し、1%Triton X-100可溶性画分 (S) と不溶性画分 (P) に回収される CD20分子をウエスタンブロットにて検出した。脂質ラフトのマーカーとして Lyn, 非ラフト分画のマーカーとして CD71を用いた。B 及び C) Cy3標識したオビヌツズマブ又はリツキシマブ (赤い蛍光), 並びに Alexa 488標識したコレラトキシンサブユニット B (脂質ラフトのマーカー, 緑の蛍光) を用いて Ramos 細胞を処理し、37°C30分培養後に共焦点顕微鏡を用いて観察した。Overlay により、局在が一致する箇所は黄色に見える。

[4.2.1.1-5 Figure 1, Figure 4及び Figure 5を改変]

図 2.6.2.2.1.2-3 タイプ II 抗 CD20抗体としてのオビヌツズマブの特性 (3)



SU-DHL-4細胞をオビヌツズマブ又はリツキシマブと24時間培養した時の細胞凝集

[4.2.1.1-7 Figure 1を改変]

2.6.2.2.1.3 CD20結合活性及びエピトープ

(1) ヒト CD20分子との結合親和性

(資料番号4.2.1.1-11, 4.2.1.1-12)

9種のヒト NHL 細胞株 (DLBCL 5株, Burkitt lymphoma 3株, MCL 1株) を用いて、蛍光色素 Cy5あるいは FITC で標識したオビヌツズマブとの結合性について検討したところ、いずれの細胞株に対しても結合性を示した。一方、CD20をほとんど発現していない Namalwa 株に対する結合性は認められなかった。

Europium 標識したオビヌツズマブ及びリツキシマブと NHL 細胞株 SU-DHL-4上のヒト CD20

分子との結合について、スキッチャード解析を用いて解離定数 K_D を算出したところ、オビヌツズマブは4.0 nmol/L、リツキシマブは4.5 nmol/L であった。

(2) ヒト CD20分子との結合における競合

(資料番号4.2.1.1-13)

ヒト CD20分子との結合において、オビヌツズマブとリツキシマブが競合性を示すか検討した。NHL 細胞株 SU-DHL-4と蛍光色素 Cy5標識したリツキシマブとの結合に対し、非標識のオビヌツズマブは競合的な阻害活性を示した。また、Cy5標識したオビヌツズマブと非標識のリツキシマブを用いた場合も、同様に競合性を示した。したがって、両抗体のヒト CD20分子に対する結合は競合的であり、両抗体が認識する結合部位（エピトープ）は分子内で重複あるいは近傍に位置する可能性が示唆された。

(3) ヒト CD20分子の細胞内インターナリゼーション

(資料番号4.2.1.1-10)

オビヌツズマブ及びリツキシマブについて、CD20-抗体複合体の細胞内移行性を検討した。

SU-DHL-4細胞あるいは CLL 患者由来血液⁷⁾を Alexa-488標識したオビヌツズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブと培養し、抗 Alexa-488抗体を用いたクエンチング試験を行った。SU-DHL-4細胞における培養開始30分後と7時間後を比較し、細胞内に移行した CD20分子を調べたところ、オビヌツズマブでは8%であったが、リツキシマブは18%、オフアツムマブは22%であった⁷⁾。CLL 患者検体 (n = 2) においては、培養開始30分後と5時間後を比較し、オビヌツズマブ2.5%、リツキシマブ43%、オフアツムマブ27%であった⁷⁾。したがって、リツキシマブ、オフアツムマブとの結合では、明らかな CD20分子の細胞内インターナリゼーションが認められたが、オビヌツズマブ処理ではほとんどの CD20分子は細胞表面に留まり、細胞内に移行する比率は小さいことが示唆された。

抗 CD20抗体による CD20分子の細胞内インターナリゼーションについては、種々の NHL 及び CLL 患者由来サンプルを用いてクエンチング試験を実施した結果が報告されており^{8,9)}、リツキシマブ及びオフアツムマブでは、CD20に結合後、細胞内に移行する比率が高いが、オビヌツズマブ（糖鎖未改変体）及び tositumomab（タイプ II 抗 CD20抗体）ではほとんど認められていない。両報告の結果は、上記の試験結果を支持するものと考えられる。

(4) ヒト CD20分子との結合におけるエピトープ

(資料番号4.2.1.1-14, 4.2.1.1-15, 4.2.1.1-16)

オビヌツズマブがヒト CD20分子と結合する時のエピトープ及び分子間相互作用について、CD20分子の細胞外ループ部分を用いた Pepscan エピトープマッピング、点突然変異体を発現させた細胞との結合活性、X 線による結晶構造解析等を用いて検討した。CD20分子上のエピトープについて、タイプ I 抗 CD20抗体（リツキシマブ、オフアツムマブ、2H7及び LT20）、他のタイプ II 抗 CD20抗体である B1 (tositumomab) と比較した結果を図 2.6.2.2.1.3-1に示した。

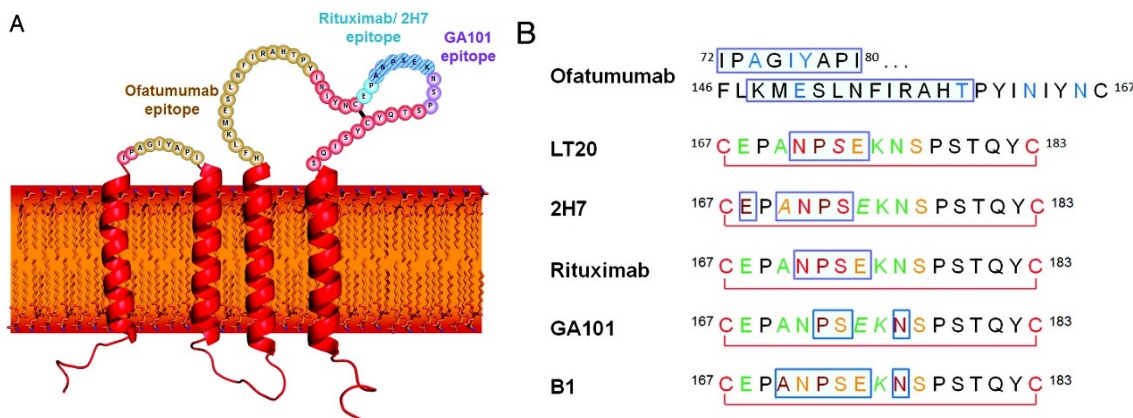
オビヌツズマブのエピトープは、リツキシマブのエピトープ^{10,11)}と重複しているが、リツキシマブよりも CD20分子の C 末端側に寄っており、タイプ II 抗体に共通した特性との関係が推測される176番アスパラギン残基を含んでいた。CD20分子とリツキシマブとの結合において、171番アスパラギン残基が不可欠であることは、結晶構造解析からも確認されたが、本アミノ酸残基のオビヌツズマブとの結合に対する寄与は小さかった。CD20分子とオビヌツズマブとの結合では、172番プロリンと173番セリンが重要であり、174番グルタミン酸から176番アスパラギンまで含めて水素結合を形成することで、高親和性を示すと考えられた。

更に、オビヌツズマブは、CD20分子と結合する角度がタイプ I 抗体とは異なる。リツキシマブと2H7（いずれもタイプ I 抗体）は、同様の立体配置で CD20エピトープペプチドと結合するが、オビヌツズマブは、両抗体と比べ70度傾いて CD20エピトープと結合し、抗体分子の中

心軸も約90度回転していることが明らかになっている (図 2.6.2.2.1.3-2)。このような結合様式の違いが、リツキシマブ-CD20複合体とオビヌツズマブ-CD20複合体のコンフォメーションにおける差となり¹²⁾、非臨床及び臨床における活性の差異を部分的に説明できるのではないかと考えられる¹³⁾。

更に、共焦点顕微鏡とタンパク質トモグラフィーを用いた分析では、抗体と結合した CD20 分子の局在及びコンフォメーションが、オビヌツズマブとリツキシマブで異なる可能性が示唆されている¹²⁾。

図 2.6.2.2.1.3-1 オビヌツズマブを含む各抗 CD20抗体のエピトープ

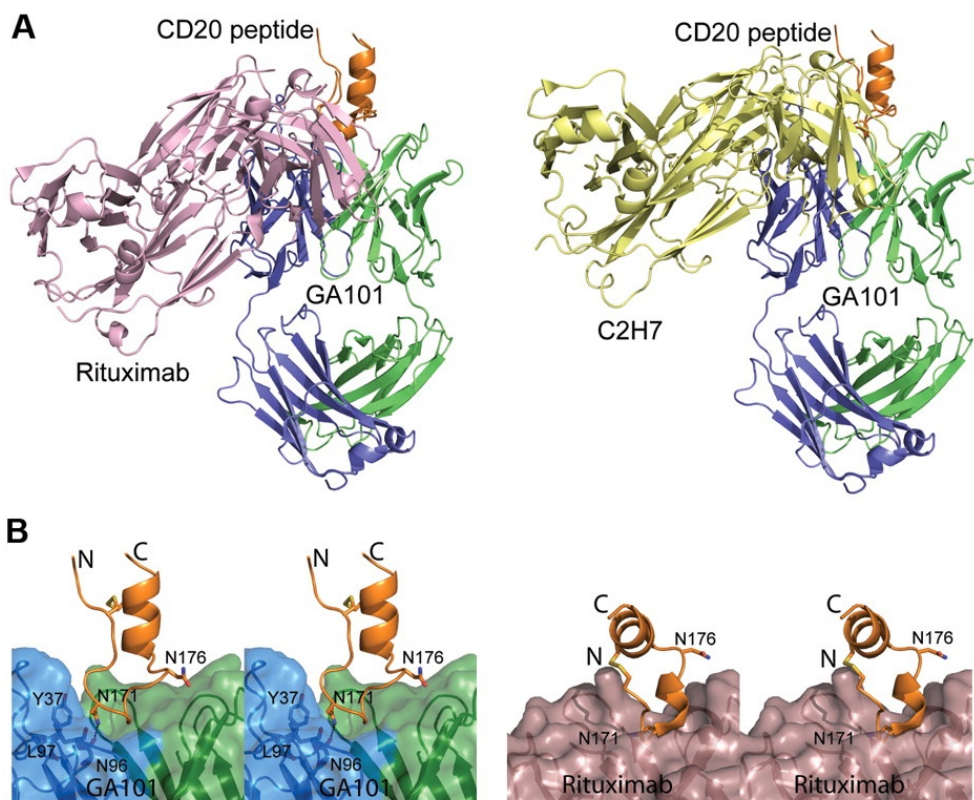


A) CD20分子の構造と各抗 CD20抗体のエピトープ

B) 各抗 CD20抗体が認識するエピトープのアミノ酸配列、水色のボックスは、エピトープのコアとなる特に重要なアミノ酸残基を示す。オフアツムマブ以外は、Pepscan エピトープマッピング及び点突然変異体発現細胞との結合活性に基づいて判定した結果を示す。緑：他のアミノ酸に置換可能、茶：非保存的アミノ酸置換において、結合活性が減退、オレンジ：保存的なアミノ酸置換において、結合活性を保持、赤：保存的なアミノ酸置換においても結合活性が減退、黒：未検討のアミノ酸残基

[4.3-11¹³⁾ Figure 1再掲]

図 2.6.2.1.3-2 CD20ペプチド-抗 CD20抗体複合体の立体構造 (X線結晶構造解析)



A) CD20エピトープペプチドと抗 CD20抗体 (オビヌツズマブ, リツキシマブ及び C2H7) Fab フラグメントとの結合, CD20エピトープペプチドはオレンジ, オビヌツズマブ (GA101) Fab の軽鎖は青色, 重鎖は緑色, リツキシマブ Fab はピンク, C2H7 Fab は黄色で示した。

C2H7: キメラ型2H7

B) CD20エピトープペプチドとオビヌツズマブ (左) 及びリツキシマブ (右) との結合のステレオ図, N171及びN176の位置を明示した。

[4.3-26¹²⁾ Figure 4, 4.2.1.1-15 Figure 3A 再掲]

2.6.2.2.2 *In vitro* 生物活性

2.6.2.2.2.1 CDC 活性

(資料番号4.2.1.1-6, 4.2.1.1-10)

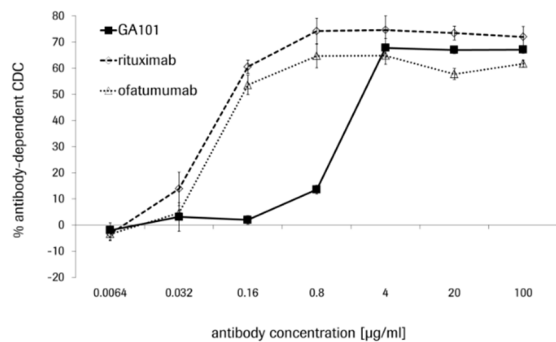
オビヌツズマブの補体活性化能について、CD20及び補体耐性因子の発現量が異なる NHL 細胞株を用い、リツキシマブと比較して検討した。

オビヌツズマブの CDC 活性は、低濃度域においてリツキシマブよりも著しく弱く、通常の培養条件下での EC₅₀に基づく比較では、標的細胞等の試験条件により、リツキシマブの1/100~1/10,000であった。一方、高濃度域における CDC 活性の強さは、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, 標的細胞 Z-138), オビヌツズマブの効力は減退した (EC₅₀ = 200 µg/mL, 同)。リツキシマブ及びオフアツムマブとオビヌツズマブを比較した試験では、両抗体に比べ、オビヌツズマブでは Z-138及び SU-DHL-4 細胞に対する CDC 活性の効力が弱いことが確認された (図 2.6.2.2.2.1-1)。

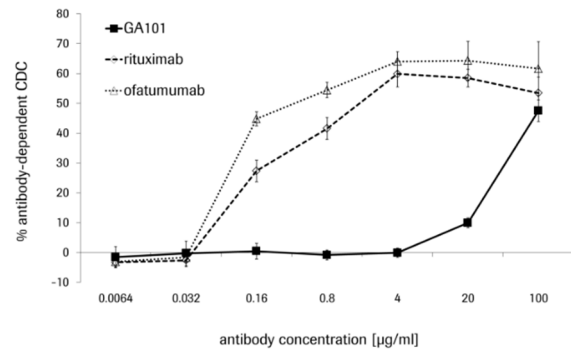
細胞を用いた試験に加え生化学的にも検討するため、オビヌツズマブと補体 C1q との結合活性について、リツキシマブ及びオフアツムマブと比較した。オビヌツズマブは、両抗体に比べて C1q 結合活性が弱いことが示された。

図 2.6.2.2.2.1-1 オビヌツズマブ, リツキシマブ, オファツムマブの CDC 活性及び C1q 結合活性

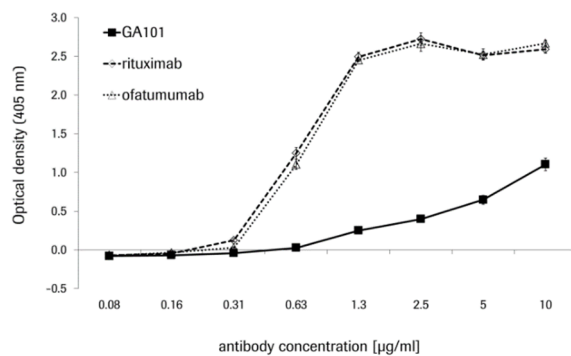
A) SU-DHL-4



B) Z-138



C) C1q 結合活性



SU-DHL-4 (A) 又は Z-138 (B) を標的細胞とし、オビヌツズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブとウサギ補体を添加して2時間培養することにより CDC 活性を測定した。C) 各抗体をプレートに固相化した後、ヒト C1q を添加して90分間室温にて反応させ、結合した C1q を抗ヒト C1q ウサギポリクローナル抗体を用いて検出した。表示は、平均値 ± 標準偏差である。

[4.2.1.1-10 Figure 2再掲]

2.6.2.2.2 直接的な細胞死の誘導活性

リツキシマブのような抗 CD20抗体は、NHL 細胞株の増殖を阻害するとともに細胞死を誘導することができる。特にタイプ II の抗 CD20抗体は、タイプ I 抗体よりも優れた細胞死誘導能を示すことが知られている^{6,14}。そこで、オビヌツズマブとリツキシマブの細胞死誘導能を検討した。

(1) 非ホジキンリンパ腫細胞株を用いた解析

(資料番号4.2.1.1-8, 4.2.1.1-9, 4.2.1.1-10, 4.2.1.1-17, 4.2.1.1-18)

SU-DHL4及び Z-138細胞株の増殖に対する作用を調べたところ、オビヌツズマブはリツキシマブに比べ優れた腫瘍増殖阻害活性を示した。また、細胞周期の進行が鈍化し、細胞死の指標である断片化した細胞の残骸が増加した。

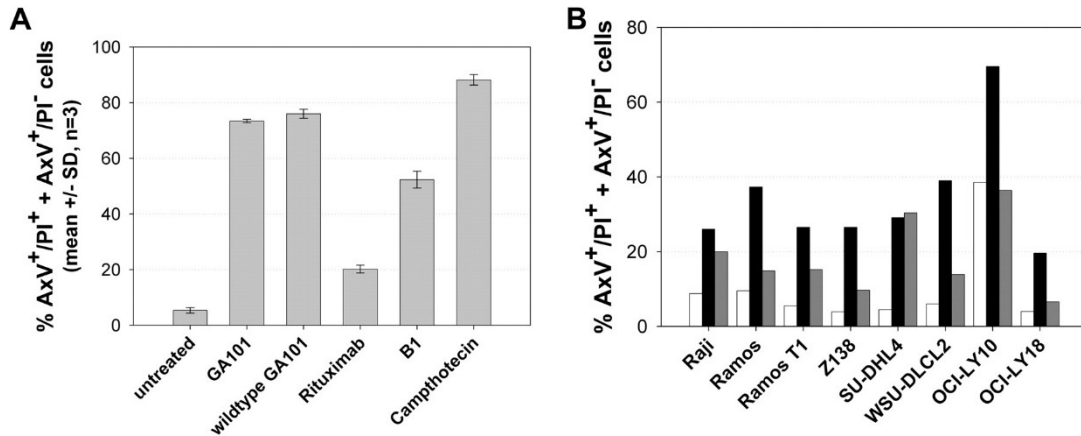
次に、細胞死の誘導について、アポトーシスの初期段階で示される反応を指標として検討した。Phosphatidylserine (PS) は、生細胞では細胞膜の裏側に局在しているが、アポトーシス開始とともに細胞膜の表側に露出する。この反応を PS に結合する Annexin V を指標として調べたところ、オビヌツズマブは、Z-138細胞の Annexin V 陽性細胞比率を増加させ、細胞死を誘導した。その活性は、リツキシマブよりも優れており、また、Fc 領域の糖鎖改変とは無関係であった (図 2.6.2.2.2-1A)。

数種の NHL 細胞株をオビヌツズマブあるいはリツキシマブで処理し、細胞死の誘導活性について両抗体を比較したところ、ほとんどの細胞株に対し、オビヌツズマブはリツキシマブよりも優れた細胞死誘導活性を示した (図 2.6.2.2.2-1B)。また、オフアツムマブも含めて検討したところ、オビヌツズマブは、リツキシマブ及びオフアツムマブよりも優れた細胞死誘導活性を示した (図 2.6.2.2.2-2)。

オビヌツズマブによる細胞死誘導活性のカイネティクスとメカニズムを明らかにするため、共焦点タイムラプスイメージング法を用いて検討した。Z-138細胞をオビヌツズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブ存在下で培養し、3分ごとに観察したところ、1.5時間以内にオビヌツズマブ群で PS の表出を示す Annexin V 陽性細胞が検出された。この時、リツキシマブ群及びオフアツムマブ群は対照群 (溶媒添加) とほとんど変わらなかった。5時間培養後において、オビヌツズマブ群では、細胞死を示す PI 陽性細胞がはっきりと認められるようになるが、リツキシマブ群、オフアツムマブ群及び対照群では、わずかに PI 陽性細胞が検出されるにすぎなかった (図 2.6.2.2.2-3)。オビヌツズマブは、生きた腫瘍細胞を用いたイメージングにおいて、リツキシマブ及びオフアツムマブよりも速やかに強い直接的な細胞死の誘導活性を示した。

オビヌツズマブによる細胞死は、Fab 断片では誘導することができず、F(ab')₂断片による2価での結合が必要であるものの、Fc 領域は必須ではなかった。更に、カスパーゼ阻害剤では細胞死を阻止できないことから、オビヌツズマブにより誘導される細胞死は、典型的なアポトーシスとは異なり、カスパーゼに依存しないタイプの細胞死であると考えられた。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¹⁵。

図 2.6.2.2.2-1 オビヌツズマブ及びリツキシマブによる直接的な細胞死誘導活性

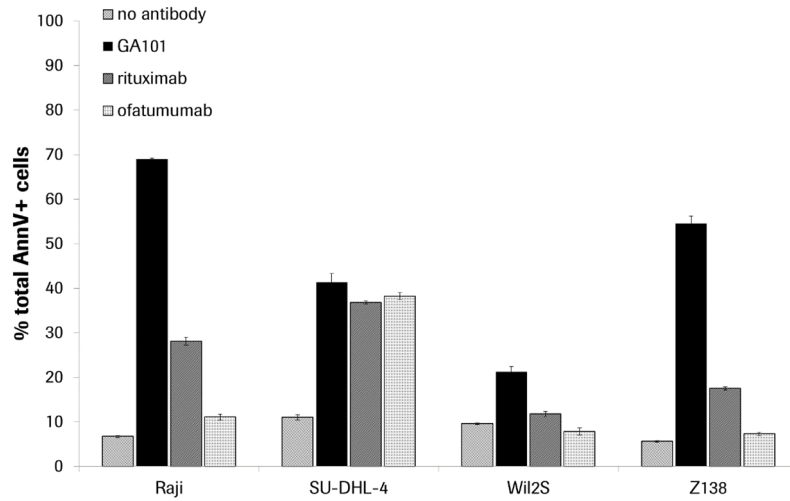


AxV : Annexin V, PI : propidium iodide

A) Z-138細胞を各抗体 (10 µg/mL) 及び camptothecin (コントロール) と24時間培養後, Annexin V 及び PI にて染色し, フローサイトメーターにて計測した。B) 各 NHL 細胞株を抗体存在下で72時間培養後, Annexin V 及び PI で染色し, フローサイトメーターにて計測した。各バーは, 未処理群 (白色), オビヌツズマブ群 (黒色), リツキシマブ群 (灰色) である。

[4.3-2³⁾ Figure 3A, B 再掲, 4.2.1.1-8 Figure 2b 及び4.2.1.1-9 Figure 3を改変]

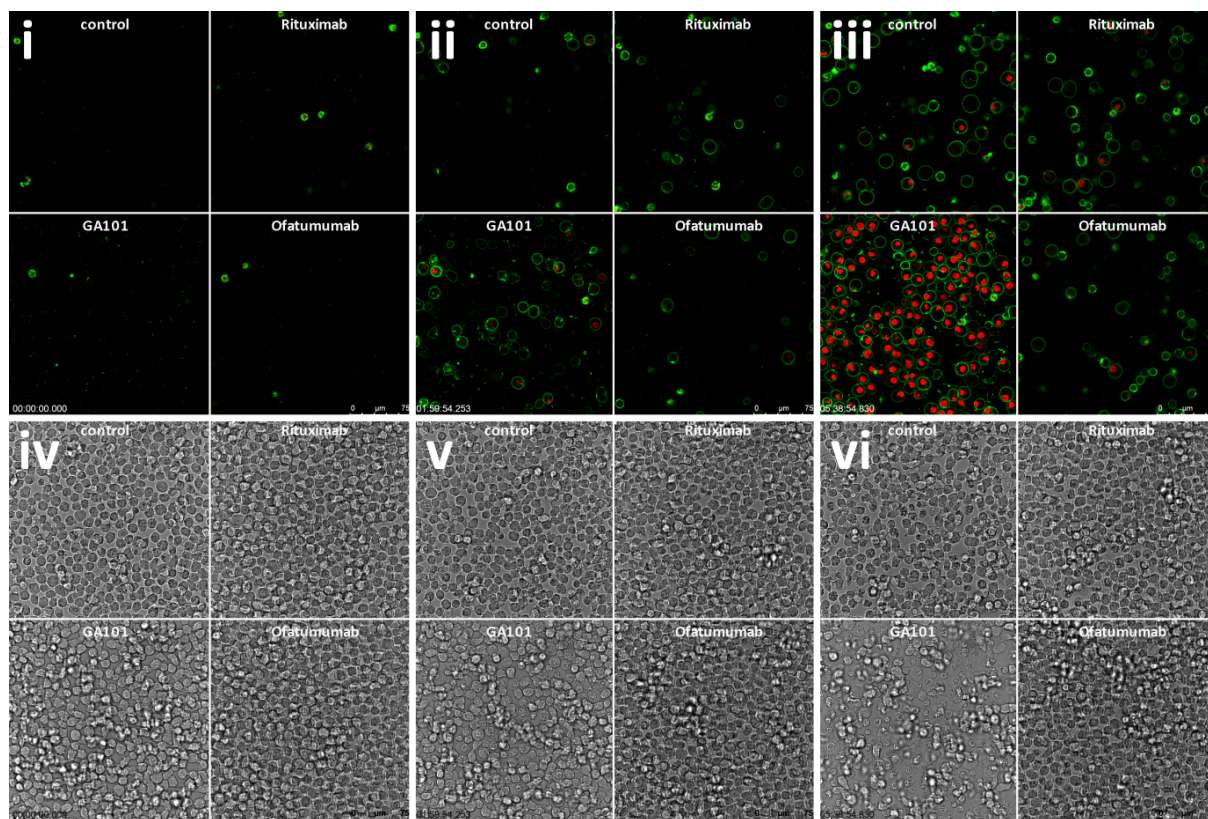
図 2.6.2.2.2-2 オビヌツズマブ, リツキシマブ, オファツムマブによる直接的な細胞死誘導活性



各 CD20陽性細胞を各抗体 (10 µg/mL) 存在下で24時間培養後, Annexin V 陽性細胞をフローサイトメーターにて計測した。表示は, 平均値 ± 標準偏差である。

[4.2.1.1-10 Figure 3A 再掲]

図 2.6.2.2.2-3 オビヌツズマブ, リツキシマブ, オファツムマブによる直接的な細胞死誘導のタイムラプスイメージング



Z-138細胞を各抗体存在下で処理し、共焦点タイムラプスイメージングにより、経時的に Annexin V/PI 染色像と光顕像を観察した。Annexin V で緑色、PI では赤色に染まる。i 及び iv は培養開始時、ii 及び v は2時間培養後、iii 及び vi は5.5時間培養後である。

[4.2.1.1-10 Figure 3B 再掲, 4.2.1.1-18 Figure 2再掲]

(2) 非ホジキンリンパ腫及び CLL 患者検体に対する細胞死の誘導

(資料番号4.2.1.1-19)

ヒト NHL 細胞株を用いて得られた知見が、NHL 患者検体においても成立するか検証するため、白血病期にある NHL, CLL 等の患者から得た血液サンプル (末梢血単核球画分, $n = 7$) を用いて、*ex vivo* 試験を実施した。

患者由来末梢血単核細胞 (PBMC) をオビヌツズマブ又はリツキシマブと培養し、PS 陽性細胞の割合を比較したところ、72時間以上のオビヌツズマブ ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 処理により、顕著に PS 露出が誘導された。リツキシマブでは、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ であっても PS 露出は乏しく、オビヌツズマブは患者検体においても細胞死誘導活性がリツキシマブよりも優れていることが示された。

2.6.2.2.2.3 糖鎖改変と ADCC 活性

(1) GlycoMab 技術による糖鎖改変と FcγRIII 結合活性

(資料番号4.2.1.1-2, 4.2.1.1-3, 4.2.1.1-20, 4.2.1.1-21)

オビヌツズマブは、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産生していることから、Fc 領域に結合している糖鎖のフコース含有率が低下し、FcγRIIIa 及び FcγRIIIb に対する結合親和性が高くなると考えられる。

オビヌツズマブのヒト FcγRIIIa に対する K_D 値を表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) により測定したところ、高親和性 FcγRIIIa (158位のアミノ酸残基がバリン) では0.055 μmol/L, 低親和性 FcγRIIIa (158位のアミノ酸残基がフェニルアラニン) では0.27 μmol/L であった。一方、リツキシマブにおける K_D 値は、高親和性 FcγRIIIa では0.66 μmol/L, 低親和性 FcγRIIIa では2.0 μmol/L であった (表 2.6.2.2.2.3-1)。オビヌツズマブは、低親和性及び高親和性 FcγRIIIa のいずれに対しても、リツキシマブに比べ高い結合親和性を示したことから、患者の FcγRIIIa が、いずれの遺伝子型であったとしても、オビヌツズマブはリツキシマブよりも優れた ADCC 及び ADCP 活性を惹起することが示唆された。

FcγRIIIb は、主に好中球に発現する低親和性の受容体であり、細胞外ドメインのアミノ酸配列は FcγRIIIa と高い相同性を示す。本受容体は、好中球による免疫複合体の貪食に関わると考えられている^{16,17}。3種の対立遺伝子 (NA1, NA2, 及び SH) が報告されているが、IgG 親和性に大きな差は認められていない¹⁸。この内、FcγRIIIb-NA2に対する K_D 値を SPR 法により測定した (表 2.6.2.2.2.3-1)。オビヌツズマブはリツキシマブと比較し、約8倍高い親和性を示した。FcγRIIIa と相同性が高いことから、糖鎖改変により FcγRIIIb との結合活性も向上したと考えられる。

抑制性受容体であるヒト FcγRIIb に対する結合親和性についても SPR 法を用いて測定したところ、オビヌツズマブとリツキシマブは同程度の親和性を示した。

表 2.6.2.2.2.3-1 オビヌツズマブとリツキシマブの FcγR 親和性

	低親和性 FcγRIIIa (158F)	高親和性 FcγRIIIa (158V)	FcγRIIIb-NA2*	FcγRIIb
オビヌツズマブ	0.27 μmol/L	0.055 μmol/L	0.93 μmol/L	6.93 μmol/L
リツキシマブ	2.0 μmol/L	0.66 μmol/L	7.4 μmol/L	5.65 μmol/L
親和性の差	7倍	12倍	8倍	同程度

*オビヌツズマブ糖鎖未改変体の FcγRIIIb-NA2に対する親和性は、6.5 μmol/L であった。

[4.2.1.1-2 Table 2, 4.2.1.1-3 Table 3及び4.2.1.1-20 Table 2を改変]

抗体の体内動態と深く関わっている胎児性 Fc 受容体 (FcRn) との結合性についても検討したところ、糖鎖改変による影響は認められなかった。

(2) NK 細胞による ADCC 活性

(資料番号4.2.1.1-10, 4.2.1.1-22, 4.2.1.1-23, 4.2.1.1-24, 4.2.1.1-25)

オビヌツズマブ及びリツキシマブの ADCC 活性を比較するため、標的細胞としてヒト NHL 細胞株 (SU-DHL-4, Raji, Z-138, Ramos, Namalwa), エフェクター細胞としてヒト NK 細胞株 NK-92又はヒト PBMC を用いて、2時間 (NK-92) あるいは4時間 (PBMC) 培養し、細胞傷害活性を評価した。エフェクター細胞の条件、標的細胞の CD20発現量などに影響されるものの、オビヌツズマブは、リツキシマブと比べ、抗体濃度として5~50倍強い ADCC 活性を示した。図 2.6.2.2.2.3-1A に、中親和性 FcγRIIIa (158F/158V) を発現するヒト PBMC をエフェクター細胞とし、Raji 細胞を標的として ADCC 活性を測定した例を示す。また、生理的な濃度の非特異的ヒト IgG (最終濃度20 mg/mL) を添加した条件下での ADCC 活性についても検

討した。非特異的な IgG 共存下においても、オビヌツズマブは有意な ADCC 活性を示したが、同じ条件下でリツキシマブの ADCC 活性は認められなかった (図 2.6.2.2.2.3-1B)。また、オビヌツズマブによる ADCC 反応に伴って、NK 細胞における脱顆粒マーカーである細胞表面 CD107a の発現上昇及び CD16発現のダウンレギュレーションが認められたことから、NK 細胞の活性化も確認された。

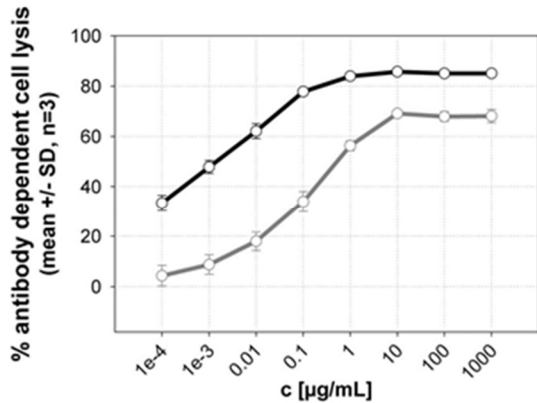
オビヌツズマブ、リツキシマブにオフアツムマブも加えた3種の抗 CD20抗体による ADCC 活性を比較した試験も実施した。標的細胞としてヒト NHL 細胞株 (SU-DHL-4, Z-138)、エフェクター細胞として高親和性 FcγRIIIa (158V/158V) を発現しているヒト PBMC を用いて、細胞傷害活性を評価した。オビヌツズマブは、特に低濃度領域においてリツキシマブ及びオフアツムマブよりも優れた ADCC 活性を示した (図 2.6.2.2.2.3-2A, B)。また、オビヌツズマブでは、標的細胞あたりの結合量が約1/2であるにもかかわらず、高濃度領域においても両抗体に対する優位性を維持した (図 2.6.2.2.2.3-2C)。

更に、ヒト NHL 細胞株 (Raji, SU-DHL-4, Z-138) とヒト PBMC から分離した NK 細胞を用いてスフェロイドを作製し、抗体存在下で72時間培養することで、NK 細胞が媒介する ADCC 活性と直接的な細胞死誘導に基づく作用を総合的に評価した。オビヌツズマブでは NHL 細胞株に対する致死的作用がリツキシマブよりも強いことが確認された。

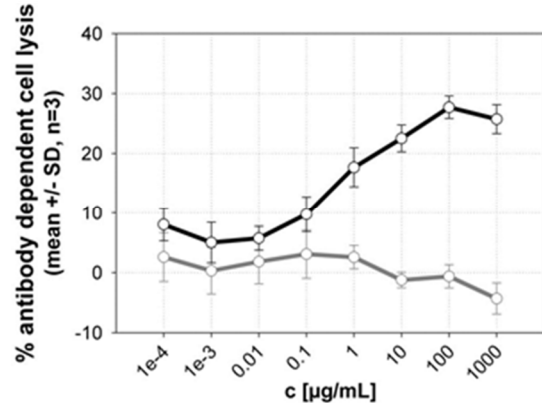
リツキシマブでは、補体 C3b フラグメントの結合による ADCC 活性の抑制が報告されていることから^{19),20)}、オビヌツズマブの ADCC 活性に対する補体の影響について検討した。オビヌツズマブ又はリツキシマブ存在下でヒト PBMC と Raji 細胞を培養し、NK 細胞 (CD3⁺CD56⁺) における CD54発現の促進程度を活性化の指標とする試験系に、新鮮自己血清又は非働化自己血清を添加して評価した。リツキシマブは非働化血清存在下では NK 活性化を誘導したものの、新鮮自己血清 (補体含む) 存在下で NK を活性化することはできなかった。一方、オビヌツズマブは補体による抑制作用を受けず、NK 細胞の CD54発現を促進し、NK 活性化を誘導した (図 2.6.2.2.2.3-3A, B)。更に、補体 C5除去血清 (C3を含有するが、C5を欠くため CDC は惹起されない) 存在下での ADCC 活性を検討したところ、オビヌツズマブはほとんど影響を受けなかったのに対し、リツキシマブの ADCC 活性は阻害された (図 2.6.2.2.2.3-3C)。これは、C5活性化の上流で起こる補体結合反応により、リツキシマブの ADCC 活性は阻害されたが、オビヌツズマブは影響を受けないことを示している。オビヌツズマブでは補体活性化能が低いことが、生理的条件下における NK 細胞活性化能と ADCC 活性の増強に係る関係が示唆される。

図 2.6.2.2.3-1 オビヌツズマブ及びリツキシマブの ADCC 活性
-非特異的 IgG 共存による影響-

A) 非特異的 IgG 非添加



B) 非特異的 IgG (20 mg/mL) 共存下

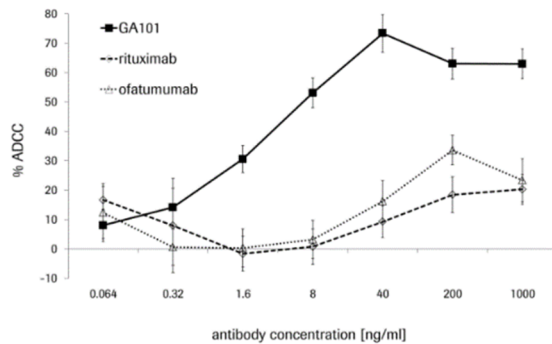


非特異的 IgG 非添加条件 (A) 及び生理的濃度 (20 mg/mL) の IgG 存在下 (B) における ADCC 活性。NHL 細胞株 Raji を標的細胞とし、ヒト PBMC をエフェクター細胞として、E/T 比20:1におけるオビヌツズマブ (黒色線) 及びリツキシマブ (灰色線) の ADCC 活性を測定した。

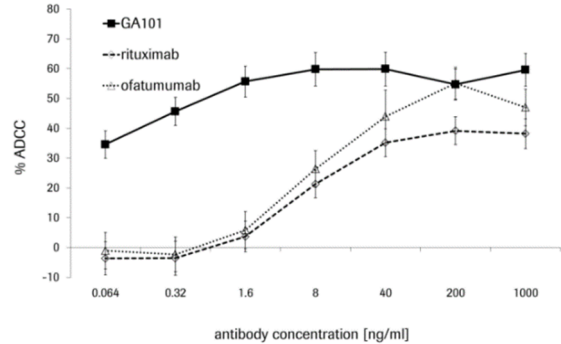
[4.3-2³) Figure 4A, B 再掲, 4.2.1.1-22 Figure 2C を改変]

図 2.6.2.2.3-2 オビヌツズマブ, リツキシマブ及びオファツムマブの ADCC 活性

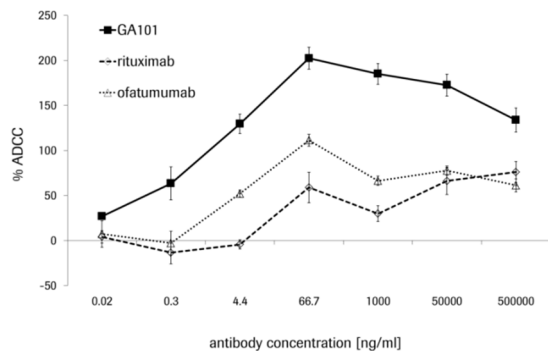
A) Z-138



B) SU-DHL-4



C) Z-138 (抗体高濃度)

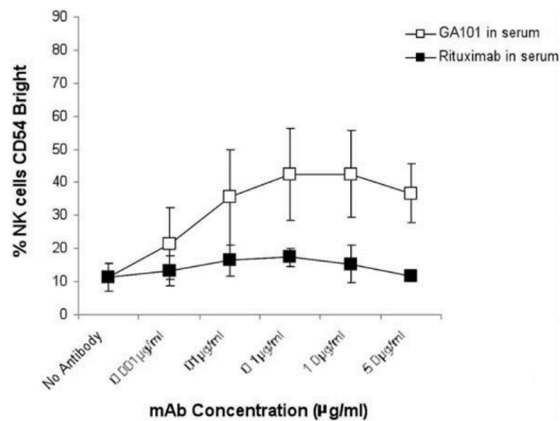


NHL 細胞株 Z-138又は SU-DHL-4を標的細胞とし、ヒト PBMC をエフェクター細胞として、E/T 比25:1におけるオビヌツズマブ (実線), リツキシマブ (破線) 及びオファツムマブ (点線) の ADCC 活性を測定した。表示は、平均値 ± 標準偏差である。

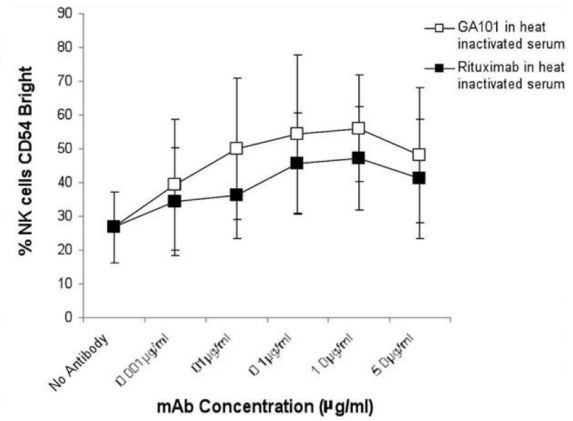
[4.2.1.1-10 Figure 4再掲]

図 2.6.2.2.2.3-3 補体成分共存下におけるオビヌツズマブ及びリツキシマブの ADCC 活性

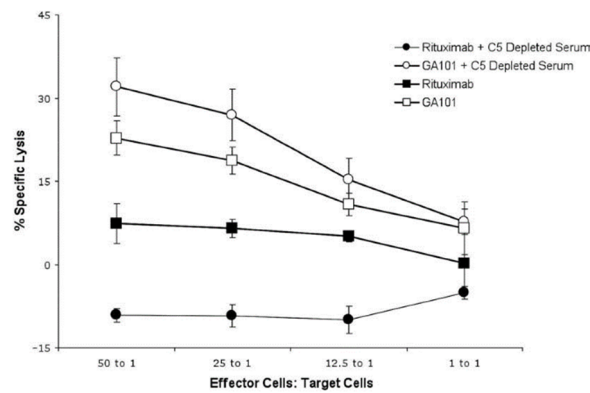
A) CD54発現 (ヒト血清存在下)



B) CD54発現 (熱処理ヒト血清存在下)



C) ヒト補体 C5除去血清存在下での ADCC 活性



A), B) NHL 細胞株 Raji とヒト PBMC を1:1の細胞数でヒト血清 (熱処理又は未処理) 及び抗 CD20抗体存在下で16~20時間培養し, フローサイトメーターを用いて NK 細胞 (CD3⁺, CD56⁺) における CD54の発現を測定した。C) NHL 細胞株 Raji を標的細胞とし, ヒト PBMC 由来 NK 細胞をエフェクター細胞として, C5 除去血清添加及び非添加下条件での ADCC 活性を測定した。表示は, 平均値 ± 標準偏差である。

[4.2.1.1-25 Figure 4及び Figure 5再掲]

(3) マクロファージ/単球による ADCC/ADCP 活性

(資料番号4.2.1.1-26, 4.2.1.1-27)

オビヌツズマブは, FcγRIIIa に対する親和性が向上していることから, マクロファージ/単球により惹起される ADCC 及び ADCP 活性も増強すると考えられる。ヒト PBMC から採取した単球を IFN-γ + LPS あるいは IL-10刺激することで, M1及び M2c 型マクロファージを誘導し, 細胞傷害活性及び貪食能 (ADCP 活性) に対するオビヌツズマブの作用を検討した。また, SCID ベージュマウスの腹腔内から単球を採取し, GM-CSF, IL-3を添加することで活性化単球を誘導し, 細胞傷害活性を検討した。

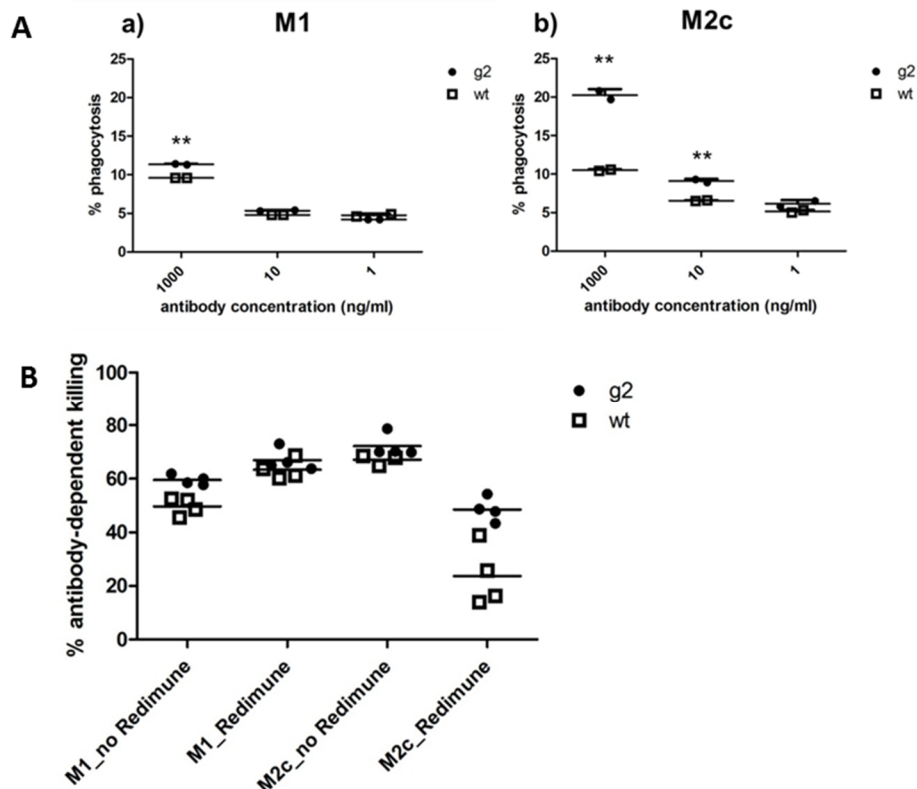
- 抗体の糖鎖を改変することによる M1及び M2c 型ヒトマクロファージとの結合性について, オビヌツズマブ, オビヌツズマブ糖鎖未改変体, リツキシマブ, オファツムマブを用いて検討した。非特異的な免疫グロブリン非存在下では, 糖鎖改変の有無による明らかな結合性の差は認められなかったが, 生理的濃度 (10 mg/mL) の非特異的な免疫グロブリンの共存下では, いずれのタイプのマクロファージに対してもオビヌツズマブの結合活性が優れていた。
- Raji 細胞を標的細胞とした M1及び M2c 型ヒトマクロファージによる ADCP 活性について, オビヌツズマブとオビヌツズマブ糖鎖未改変体を比較したところ, 非特異的な免疫グロブ

リン非存在下における両抗体の活性は同程度であったが、非特異的な免疫グロブリン存在下 (10 mg/mL) では、糖鎖未改変体よりもオビヌツズマブの方が、強い ADCP 活性を示した (図 2.6.2.2.3-4A)。

- マクロファージが *in vivo* で示す抗腫瘍活性は、貪食能と細胞傷害活性を併せたものである。そこで、Raji 細胞とヒトマクロファージを共培養することにより、両作用メカニズムを考慮した *in vitro* 試験を実施し、マクロファージによる殺腫瘍細胞活性を評価した。本試験においても、生理的濃度の免疫グロブリン存在下において、オビヌツズマブは糖鎖未改変体よりも優れた活性を示した (図 2.6.2.2.3-4B)。また、共培養中に産生される一酸化窒素 (NO) を検討したところ、培養上清中に含まれる NO 量は、免疫グロブリン存在下、非存在下のいずれにおいても、オビヌツズマブの方が糖鎖未改変体よりも多かった。
- SU-DHL-4を標的細胞として活性化マウス単球による細胞傷害活性を検討したところ、オビヌツズマブは、リツキシマブよりも低濃度で SU-DHL-4細胞の生存率を低下させた。

以上の結果から、糖鎖改変を施すことにより、FcγRIIIa を介するマクロファージ結合活性が向上し、生理的な条件に類似した環境における細胞傷害活性及び貪食能の増強が示された。したがって、オビヌツズマブは、非特異的な免疫グロブリンの存在下でマクロファージ/単球の FcγRIIIa と結合し、リツキシマブよりも効率的に腫瘍細胞を排除できる可能性が示唆される。

図 2.6.2.2.3-4 オビヌツズマブ及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体による ADCP 活性及び殺腫瘍細胞活性



A) Raji 細胞と M1及び M2c マクロファージを E/T 比3:1で抗 CD20抗体とヒト抗体 (10 mg/mL) 存在下4時間培養し、ADCP 活性を測定した。B) Raji 細胞と M1及び M2c マクロファージを E/T 比1:1で抗 CD20抗体存在下24時間培養し、細胞傷害活性を測定した。両図とも個別値 (シンボル) と平均値 (ライン) を示す。g2 : オビヌツズマブ, wt : オビヌツズマブ糖鎖未改変体, **: P < 0.005 (Student t test)

[4.2.1.1-26 Figure 2及び Figure 3再掲]

(4) 好中球による ADCC 活性

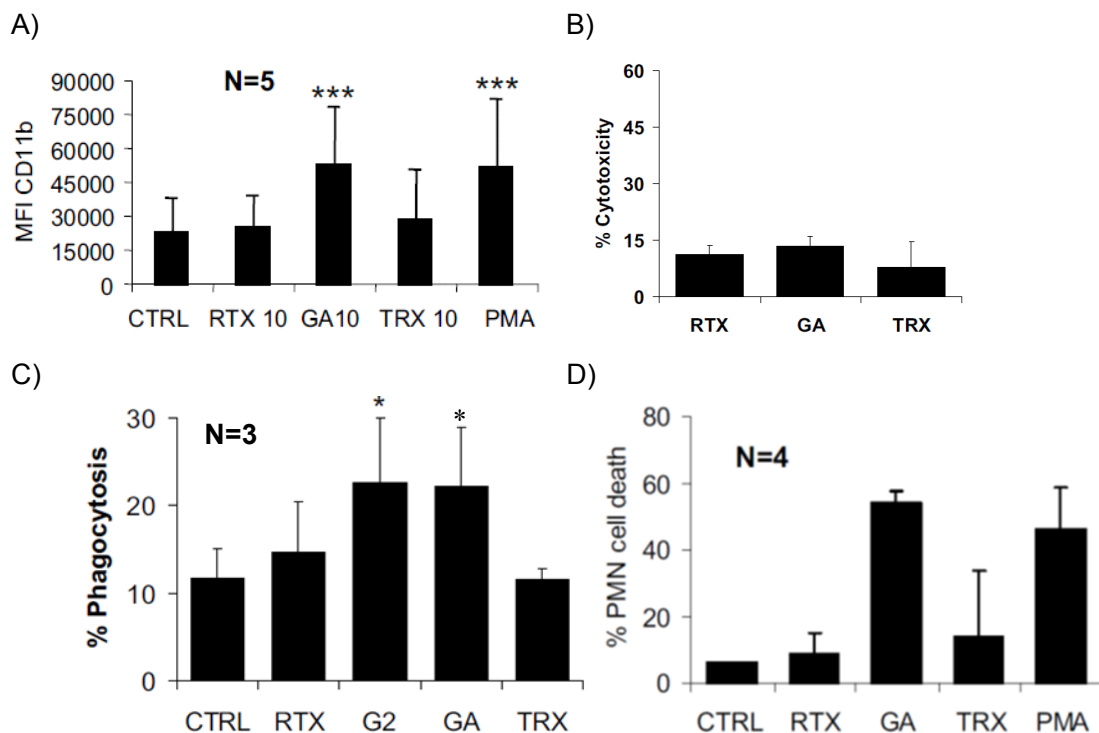
(資料番号4.2.1.1-28)

ヒト好中球には、FcγRIIIa (CD16A) は発現していないものの、GPI アンカー型の FcγRIIIb (CD16B) が発現している。FcγRIIIb 分子は、好中球の貪食作用、活性化に関与する可能性が示唆されており^{16,21)}、オビヌツズマブは、リツキシマブに比べ、FcγRIIIb に対し約8倍高い親和性を示すことから、ヒト好中球の活性化能について検討した。

ヒト末梢血 (全血) にオビヌツズマブを添加して培養することにより、好中球が活性化されて CD11b 発現の促進 (図 2.6.2.2.3-5A) 及び CD62L 発現の低下が誘導されたが、リツキシマブは明確な作用を示さなかった。また、抗 CD20抗体を結合させることでオプソニン化した B-CLL 細胞を標的として、全血あるいは精製した好中球の貪食能を調べたところ、オビヌツズマブでは好中球による貪食作用が有意に増強された (図 2.6.2.2.3-5C)。一方、好中球による ADCC 活性は、オビヌツズマブにおいても認められなかった (図 2.6.2.2.3-5B)。好中球は活性化後速やかに細胞死することから、オビヌツズマブ処理後の好中球生存率について、全血を用いて検討したところ、オビヌツズマブ添加の24時間後には45~50%の好中球が細胞死していた (図 2.6.2.2.3-5D)。

これらの結果は、オビヌツズマブによりオプソニン化された B 細胞は、好中球に貪食されることを示しており、オビヌツズマブの作用メカニズムとして機能する可能性が示唆された。

図 2.6.2.2.3-5 オビヌツズマブによるヒト好中球の活性化及び貪食作用の増強



A) ヒト末梢血全血に各抗体 (10 µg/mL) を添加し、24時間培養後に CD15⁺好中球の CD11b をフローサイトメーターにより計測した。B) ヒト末梢血から精製した好中球をエフェクター細胞とし、Calsein-AM 標識した BJAB を標的細胞として、E/T 比10:1における各抗体 (10 µg/mL) の ADCC 活性を測定した。C) ヒト末梢血全血に PKH26標識した患者由来 B-CLL 細胞を添加し、各抗体 (10 µg/mL) による貪食作用を検討した。D) ヒト末梢血に、各抗体を添加し、24時間培養後における CD15⁺好中球の死細胞率を7-AAD 染色性により計測した。ヒト末梢血はいずれも、健康な供血者から採取した。

RTX: リツキシマブ, GA: オビヌツズマブ, TRX: トラスツズマブ, G2: リツキシマブの糖鎖改変体, PMA: ホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート

*: P < 0.05, ***: P < 0.001 (Student t test)²²⁾

[4.2.1.1-28 Figure 2A, Figure 3B 及び Figure 5再掲, Figure 4C を改変]

2.6.2.2.3 全血中 B 細胞減少作用 (ex vivo)

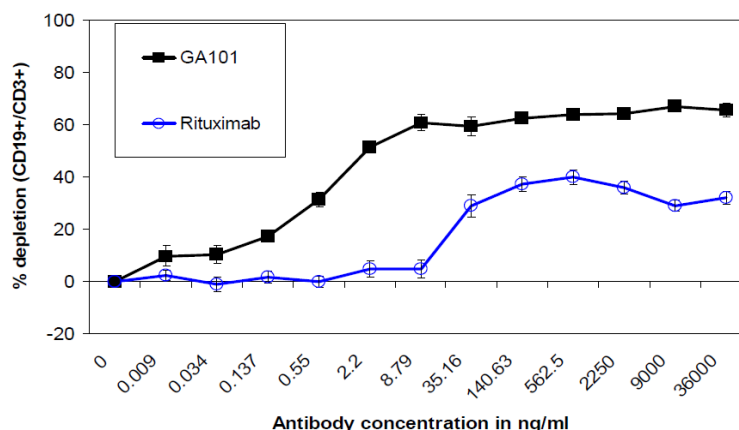
オビヌツズマブは複合的な作用メカニズムを有していることから、これらを統合的に検討するため、健康な供血者の全血を用いて *ex vivo* での自己 B 細胞減少作用を評価した。全血中には、NK 等のエフェクター細胞、ヒト補体及び生理的濃度のヒト IgG が含まれていることから、ADCC 活性、CDC 活性、及び直接的な細胞死の誘導活性等複数の作用メカニズムを併せた効果が検出できるとともに、末梢血中の生体内環境での活性を反映すると考えられる。

(1) リツキシマブとの比較

(資料番号4.2.1.1-29, 4.2.1.1-30)

本試験では、健康な10人の供血者から採取した全血をオビヌツズマブあるいはリツキシマブ共存下で24時間培養した後、フローサイトメーターを用いて CD19陽性 B 細胞数の減少程度を計測した。オビヌツズマブとリツキシマブを比較したところ、オビヌツズマブの B 細胞減少作用 (最大活性) は、リツキシマブよりも1.3~2.5倍強く、EC₅₀はリツキシマブの約1/10~1/25であり、オビヌツズマブは、リツキシマブよりも強い全血中 B 細胞減少作用を示した。代表的な例を図 2.6.2.2.3-1に示した。また、B-CLL 患者から採取した全血を用いた試験においても、オビヌツズマブ、リツキシマブのいずれも B 細胞減少作用を示さなかった3例を除く8検体で、リツキシマブよりも強い B 細胞減少作用を示した。

図 2.6.2.2.3-1 オビヌツズマブ及びリツキシマブによる全血中 B 細胞減少作用



健康な供血者 (158F/158F) から採取したヒト末梢血に抗体を添加し、37°C24時間反応後の B 細胞 (CD19⁺) / T 細胞 (CD3⁺) にもとづいて、オビヌツズマブ (黒色) 及びリツキシマブ (青色) の B 細胞減少率を算出した。表示は、平均値 ± 標準偏差である。

[4.2.1.1-29 Figure 1を改変]

(2) リツキシマブ, オファツムマブとの比較, FcγRIIIa 遺伝子型

(資料番号4.2.1.1-10, 4.2.1.1-31)

本試験では、健康な供血者から採取した全血を用いて、オビヌツズマブによる B 細胞減少作用をリツキシマブ及びオファツムマブと比較した。遺伝子型の異なる3種の FcγRIIIa, すなわち高親和型 (158V/158V), 中親和型 (158F/158V) 及び低親和型 (158F/158F) の供血者検体を用いて比較したところ、オビヌツズマブは、最大活性, EC₅₀のいずれの指標においても、FcγRIIIa 遺伝子型に関わらず最も優れた B 細胞減少作用を示した (表 2.6.2.2.3-1)。

更に、全血サンプルの血漿を分離し、56°C45分間熱処理 (非働化) 後、血球成分に戻すことで、各抗体の B 細胞減少作用に対する影響を検討した。オビヌツズマブの B 細胞減少作用 (最大活性) は、非働化処理により60%から40%程度になったものの影響は小さかった。しかし、リツキシマブ及びオファツムマブでは、非働化処理により B 細胞減少作用が45~50%から10%程度以下に著しく低下した。したがって、オビヌツズマブの全血中 B 細胞減少作用は CDC 活性に対する依存性が低いが、オファツムマブ及びリツキシマブによる B 細胞減少作用は、CDC 活性に依存していることが示唆された。

表 2.6.2.2.3-1 オビヌツズマブ, リツキシマブ, オファツムマブによる B 細胞減少作用

FcγRIIIa 遺伝子型	抗体	EC ₅₀ (ng/mL)	最大活性 (%)
低親和型 (F/F)	オビヌツズマブ	2.2	71.9
	リツキシマブ	26.8	36.1
	オファツムマブ	7.4	54.4
中親和型 (F/V)	オビヌツズマブ	2.7	79.9
	リツキシマブ	25.6	46.2
	オファツムマブ	8.1	56.6
高親和型 (V/V)	オビヌツズマブ	1.6	75.1
	リツキシマブ	40.5	55.2
	オファツムマブ	8.2	67.5

[4.2.1.1-10 Supplemental Table 1を改変]

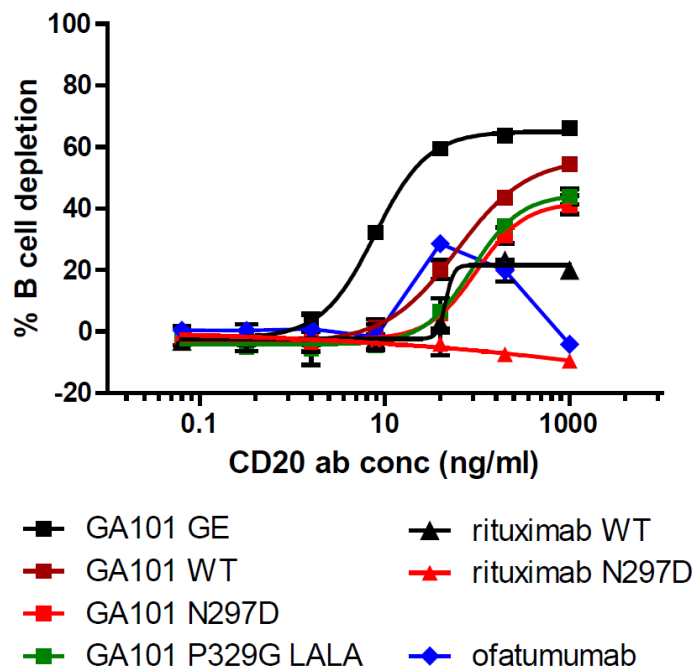
(3) N 型糖鎖を欠如した変異体による活性

(資料番号4.2.1.1-32)

オビヌツズマブが示す直接的な細胞死の誘導活性が、全血中 B 細胞減少作用に寄与しているか検討するため、N 型糖鎖が結合するアミノ酸残基を変えることで ADCC 活性が著しく減退した変異体 (オビヌツズマブ N297D) 及び Fc 受容体を介する生物活性がほとんど失われた変異体 (オビヌツズマブ P329G LALA) を作製した (いずれも直接的な細胞死の誘導活性は維持)。両変異体の他、オビヌツズマブ, 及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体 (WT), リツキシマブ及びリツキシマブ N297D 変異体, 並びにオファツムマブを用いて、全血中 B 細胞減少作用を比較した。

オビヌツズマブは、オビヌツズマブ糖鎖未改変体に比べ B 細胞減少作用が強く、糖鎖改変に伴うオビヌツズマブの ADCC/ADCP 活性の増強は、B 細胞減少作用に寄与していることが示唆された。また、オビヌツズマブ N297D 変異体及び P329G LALA 変異体の B 細胞減少作用は、オビヌツズマブよりも弱いものの、オビヌツズマブ糖鎖未改変体に比べてわずかに劣る程度の強い作用を示した (図 2.6.2.2.3-2) このことから、直接的な細胞死の誘導活性は、ADCC/ADCP 活性と同様に B 細胞減少作用に寄与していることが示された。一方、リツキシマブ N297D 変異体は、ほとんど B 細胞減少作用を示さなかったことから、リツキシマブの B 細胞減少作用に対する ADCC/ADCP 活性の寄与が推察された。

図 2.6.2.2.3-2 オビヌツズマブ, リツキシマブ, オファツムマブ及び各変異体による B 細胞減少作用



健康な供血者から採取したヒト末梢血を用いて、各抗体及び変異体による全血中 B 細胞減少作用を検討した。

[4.2.1.1-32 Figure 8再掲]

2.6.2.2.4 *In vivo*におけるB細胞減少作用

(資料番号4.2.1.1-33)

オビヌツズマブによる *in vivo* での B 細胞の減少作用について、ヒト CD20 遺伝子を導入したマウス及びカニクイザルを用いて検討した。マウス及びラットとヒトの間で CD20 のアミノ酸配列は相同性が低く、オビヌツズマブのエピトープ相当部位も保存されていないことから、ヒト CD20 遺伝子を導入したマウスを用いた。本マウスは、BALB/c の遺伝子背景を有しており、正常な免疫反応を惹起することができる。一方、カニクイザルとヒトの間では、CD20 のアミノ酸配列は相同性が高く、オビヌツズマブは、カニクイザルの CD20 分子に対し、ヒトと同程度の親和性を示す。また、カニクイザルの FcγRIIIa 及び FcRn に対してもヒトと同程度の親和性で結合し、ADCC を惹起できることから、*in vivo* における B 細胞減少作用を検討する上で適切な動物種と考えられる。

2.6.2.2.4.1 ヒト CD20 遺伝子導入マウスにおける B 細胞減少作用

(1) オビヌツズマブ、リツキシマブ、2H7 による B 細胞減少作用

(資料番号4.2.1.1-34, 4.2.1.1-35)

ヒト CD20 遺伝子導入マウスの雌に、オビヌツズマブ、リツキシマブ又はマウス抗ヒト CD20 抗体 2H7 を 10 mg/kg、単回腹腔内投与し、2日後 (day 2)、7日後 (day 7)、35日後 (day 35) に安楽死させ、末梢血、鼠蹊部リンパ節、脾臓を採取した。対照群には、IgG2b 抗体を投与した。

各抗ヒト CD20 抗体を投与後の末梢血、脾臓、リンパ節の B 細胞減少率を表 2.6.2.2.4.1-1 に示した。オビヌツズマブは day 2 から末梢血、脾臓、リンパ節の B 細胞数を著しく減少させた。リツキシマブ及び 2H7 についても、day 2 から末梢血及び脾臓の B 細胞数減少が示されたものの、リンパ節において著しい B 細胞数減少が認められたのは、day 7 以降であった。抗 CD20 抗体はいずれも、day 35 まで B 細胞減少作用を示したが、リンパ節と脾臓における減少作用の強度はオビヌツズマブが他の抗 CD20 抗体よりも優れていた。

同様に、ヒト CD20 遺伝子導入マウスの雌に、オビヌツズマブ、リツキシマブ又は 2H7 を 10 mg/kg、単回腹腔内投与した後、末梢血 B 細胞数の推移を 100 日間観察する試験を実施した。

末梢血中の B 細胞 (B220⁺細胞) の推移を T 細胞 (CD4⁺細胞) との比で示した (図 2.6.2.2.4.1-1)。投与後初期における末梢血 B 細胞の減少は、3種の抗ヒト CD20 抗体間で大きな差は認められず、いずれも 30 日以上持続した。リツキシマブ及び 2H7 投与群では、day 35 を過ぎると徐々に B 細胞数が増加し始め、2H7 投与群では day 63、リツキシマブ投与群では day 77 にほぼ正常レベルにまで回復した。オビヌツズマブ投与群では day 77 頃から B 細胞が増加し始め、正常レベルに戻ったのは day 100 であった。

ヒト CD20 遺伝子導入マウスにオビヌツズマブ又はリツキシマブを種々の用量 (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40 mg/kg) 投与し、抗体投与 7 日後に残存する末梢血、脾臓、及びリンパ節の B 細胞数を計測した。溶媒を投与した対照群との比を (図 2.6.2.2.4.1-2) に示す。

両抗体の全投与量群において、末梢血、脾臓、及びリンパ節の B 細胞数は、対照群に比べ低下した。また、オビヌツズマブは、末梢血、脾臓、リンパ節のいずれにおいても、すべての投与量でリツキシマブよりも強い B 細胞減少作用を示した。オビヌツズマブは、末梢血及びリンパ節では 0.5 mg/kg、脾臓では 1-2 mg/kg で最大活性に達したが、リツキシマブでは、それぞれ 1 mg/kg 及び 10-20 mg/kg であり、最大活性は、オビヌツズマブと同じレベルに達しなかった。

また、脾臓の辺縁帯 B 細胞サブセット (B220⁺ CD21^{hi} CD23^{lo}) に対する作用を検討するため、ヒト CD20 遺伝子導入マウスの雌にオビヌツズマブ、リツキシマブ又は 2H7 を 10 mg/kg 投与する試験を実施した。オビヌツズマブ投与群では、day 2 において対照群の 5.5% にまで減少し、day 7 においても減少作用を維持した (表 2.6.2.2.4.1-2)。一方、リツキシマブ及び 2H7 投与群では、day 2 において対照群に比べ 20% 程度の減少が認められたものの、day 7 には、ほぼ対照群のレベルに戻った。オビヌツズマブは、リツキシマブ及び 2H7 に比べ、辺縁帯 B 細胞に対す

る減少作用に優れていることが示された。

以上の結果から、オビヌツズマブは、ヒト CD20遺伝子導入マウスのリンパ組織中 B 細胞減少作用において、リツキシマブよりも優れていることが示された。

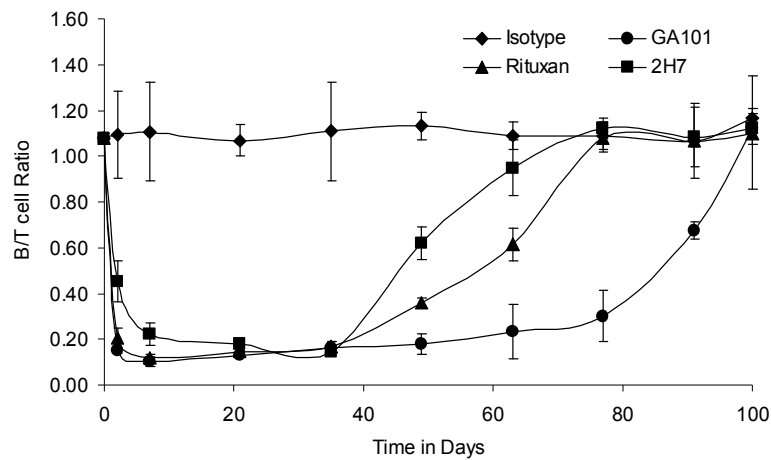
表 2.6.2.2.4.1-1 オビヌツズマブ、リツキシマブ及び2H7投与による末梢血、脾臓、リンパ節の B 細胞減少作用

	抗体	Day 2	Day 7	Day 35
末梢血	リツキシマブ	81.3%	89.3%	85.2%
	2H7	62.9%	79.7%	87.2%
	オビヌツズマブ	85.5%	91.1%	84.8%
脾臓	リツキシマブ	39.6%	57.9%	56.2%
	2H7	34.4%	55.2%	30.5%
	オビヌツズマブ	83.7%	95.1%	89.7%
リンパ節	リツキシマブ	10.9%	61.0%	65.1%
	2H7	22.5%	65.1%	49.7%
	オビヌツズマブ	74.8%	89.8%	91.1%

末梢血及びリンパ節は B 細胞/T 細胞比、脾臓は B 細胞数を指標とした。各抗体投与群において、対照群と比べた各指標の減少率（平均値，n = 2）を示した。

[4.2.1.1-34 Figure 1, Figure 3及び Figure 4に基づいて作成]

図 2.6.2.2.4.1-1 オビヌツズマブ、リツキシマブ及び2H7単回投与後の末梢血 B 細胞数 (B/T 細胞比) の推移

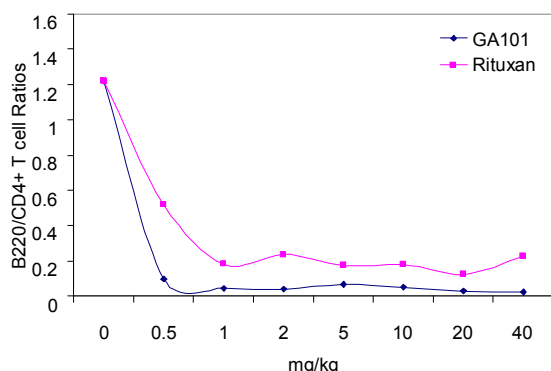


マウス眼窩より経時的に末梢血を採取し、B 細胞/T 細胞比を算出した。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 3)。

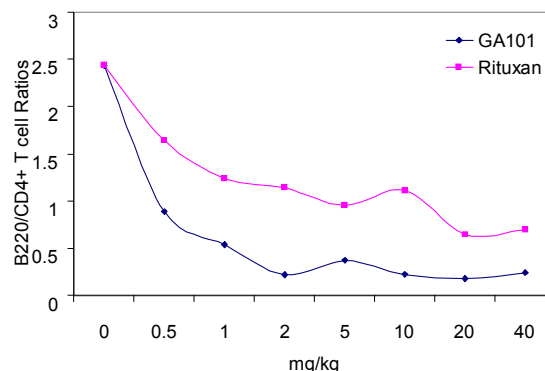
[4.2.1.1-35 Figure 1再掲]

図 2.6.2.2.4.1-2 オビヌツズマブ, リツキシマブ投与7日後の B 細胞数 (B/T 細胞比)

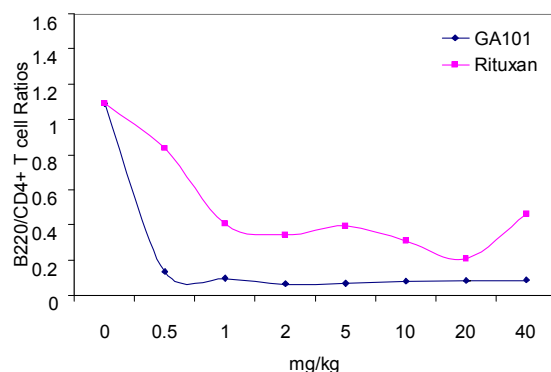
A) 末梢血



B) 脾臓



C) リンパ節



各組織の B 細胞/T 細胞比を算出し、平均値 (n = 2) を表示した。

[4.2.1.1-35 Figure 2, Figure 3 及び Figure 4 を改変]

表 2.6.2.2.4.1-2 オビヌツズマブ, リツキシマブ及び2H7投与による脾臓辺縁帯 B 細胞数に対する影響 (残存する B 細胞数を対照群と比較)

	Day 2	Day 7
対照群	100%	100%
リツキシマブ	77.6%	95.9%
2H7	81.3%	94.6%
オビヌツズマブ	5.5%	3.9%

フローサイトメーターを用いて脾臓細胞の内、辺縁帯 B 細胞サブセット (B220⁺ CD21^{hi} CD23^{lo}) に属する細胞数を測定し、対照群と比較して抗体投与後に生存している辺縁帯 B 細胞数 (平均値, n = 2) を算出した。

[4.2.1.1-35 Figure 5 に基づいて作成]

(2) ヒト CD20遺伝子導入マウスにおける免疫応答

(資料番号4.2.1.1-35)

ヒト CD20遺伝子導入マウスを用いて、オビヌツズマブ、リツキシマブ及び2H7による B 細胞減少作用が、外来抗原に対する液性免疫応答に与える影響について評価した。抗原には、NP (4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl) ハプテンを結合させた KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) を用い、オビヌツズマブあるいはリツキシマブを投与後に抗原を投与して、一次免疫反応を観察した *de novo* 応答と、抗体投与前にあらかじめ免疫し抗体投与後に二次応答を惹起させたメモリー応答について免疫応答を検討した。

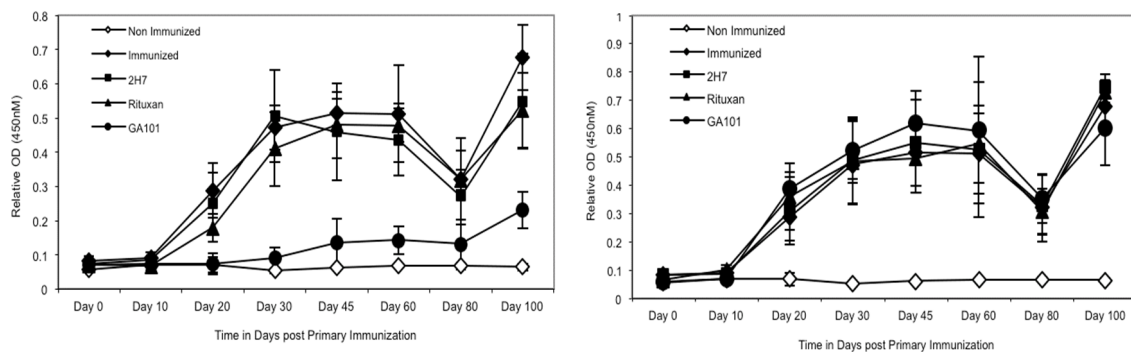
NP-KLH による抗原感作は day 0, day 21, day 81の3回実施し、*de novo* 応答群では、初回感作の2, 4, 6日前に抗体 (オビヌツズマブ, リツキシマブ, 2H7又は IgG2b コントロール抗体) を4 mg/kg ずつ計3回静脈内投与した。メモリー応答群では、3回目感作の2, 4, 6日前に同様に抗体を投与した。経時的にマウス眼窩から採血し、血清中の NP 特異的 IgG 抗体の力価を ELISA を用いて計測した。

リツキシマブ, 2H7投与群の NP 特異的 IgG 抗体価の推移は、*de novo* 応答群, メモリー応答群のいずれにおいても、コントロール抗体投与群と類似しており、抗体投与による影響はほとんど認められなかった。しかし、オビヌツズマブ投与群では、*de novo* 応答群における NP 特異的 IgG 抗体価は、対照群に比べ著しく低かった (図 2.6.2.2.4.1-3A)。一方、メモリー応答については、オビヌツズマブも他の抗 CD20抗体と同様、対照群と同程度の NP 特異的 IgG 力価が検出された (図 2.6.2.2.4.1-3B)。以上より、オビヌツズマブは、新規の外来抗原に対する抗体反応を強く抑制したが、防御的に作用する液性免疫応答 (メモリー応答) には影響を及ぼさなかった。

図 2.6.2.2.4.1-3 オビヌツズマブ, リツキシマブ, 2H7投与の液性免疫応答に対する影響

A) 一次免疫反応 (*de novo* 応答)

B) 二次免疫反応 (メモリー応答)



マウス眼窩より経時的に末梢血を採取し、血清中の NP 特異的 IgG 力価を測定した。

表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 4)。

[4.2.1.1-35 Figure 6及び Figure 7再掲]

オビヌツズマブは、ヒト CD20遺伝子導入マウスでのリンパ節及び脾臓などの末梢リンパ組織における B 細胞減少作用において、リツキシマブよりも強い効果を示した。優れた B 細胞減少作用は、末梢血及びリンパ組織での長期にわたる薬学的な効果発現との関係が認められる。また、本試験では、オビヌツズマブが辺縁帯 B 細胞を傷害することも示された。免疫応答に関する試験では、オビヌツズマブにおいて強化された B 細胞減少作用が、新規の抗体応答に対しては強い抑制作用として発現することが明らかになったが、既に抗原感作されたメモリー応答には作用せず、維持されることが示された。

2.6.2.2.4.2 カニクイザルにおける B 細胞減少作用

非臨床における薬物動態及び毒性試験では、カニクイザルが適切な動物種と考えられたことから、カニクイザルを用いて、オビヌツズマブによる B 細胞減少作用とその後の B 細胞の回復性について検討した。薬物動態試験においては、カニクイザルにオビヌツズマブ1及び10 mg/kg を単回静脈内投与することで、末梢血 B 細胞が急速に減少し、ほぼ完全に枯渇した。その後、血清中オビヌツズマブ濃度の低下に伴って、B 細胞数の回復が始まった。また、毒性試験では、カニクイザル13及び26週間静脈内投与試験、及び4週間皮下投与試験において、末梢血及びリンパ組織（脾臓、リンパ節など）での強い B 細胞減少作用が示された。オビヌツズマブは、毒性試験において検討したすべての投与量群において、腸間膜及び下顎リンパ節における B 細胞減少、リンパ節における胚中心の消失を伴う特徴的な組織学的変化を示した。薬効薬理試験では、カニクイザルにおけるオビヌツズマブの B 細胞減少作用について、リツキシマブと比較して評価した。

(1) オビヌツズマブ、リツキシマブによる B 細胞減少作用

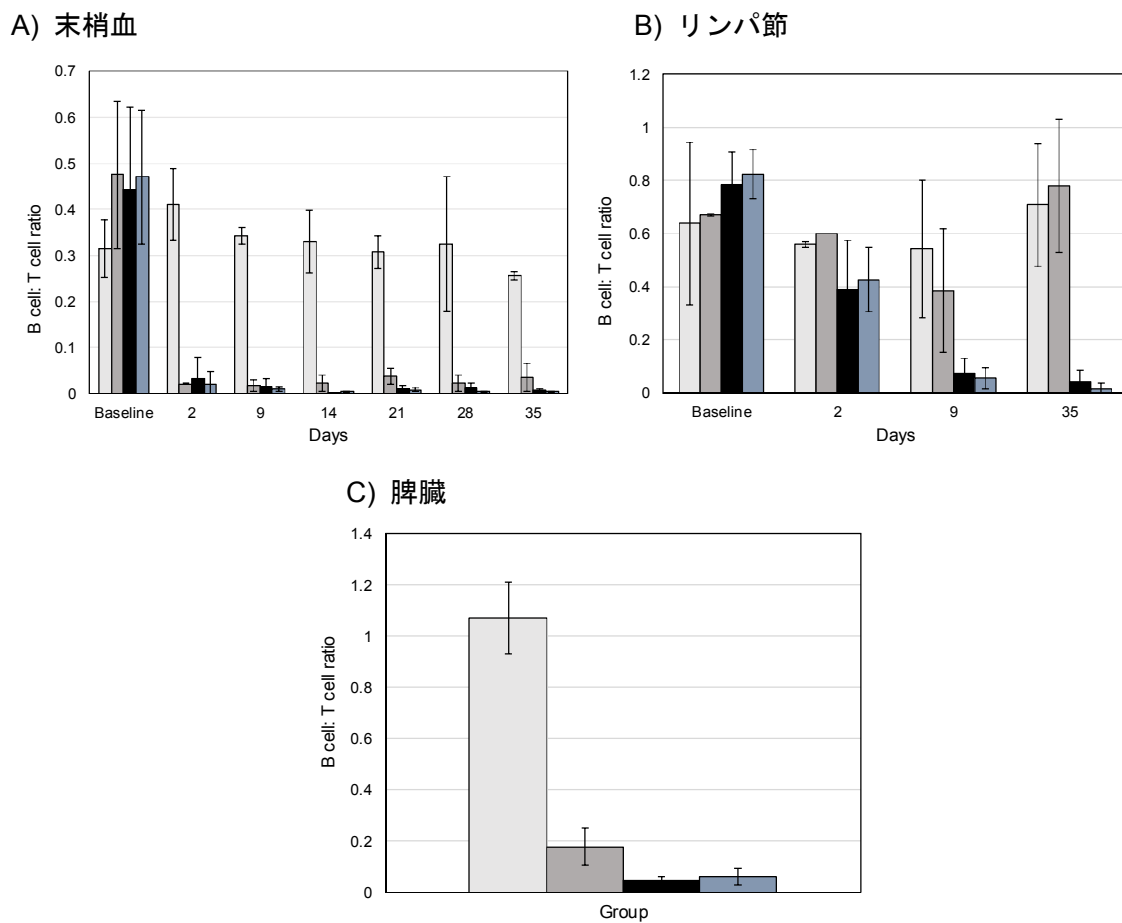
(資料番号4.2.1.1-36, 4.2.1.1-37)

カニクイザル（1群3例、雌1雄2）に、オビヌツズマブ（10 mg/kg, 30 mg/kg）、リツキシマブ10 mg/kg を day 0 と day 7 の2回静脈内投与し、経時的に末梢血を採取するとともに、baseline（day -7）、day 2, 9, 35に鼠蹊部リンパ節組織を採取し、細胞検査に供した。対照群には、溶媒を投与し、抗 CD20抗体投与による薬力学的作用について検討した。

末梢血 B 細胞は、リツキシマブ投与群では、day 9に投与前と比較し94%減少し、以降 day 35まで90%以上の減少を示した。両オビヌツズマブ投与群では、day 9以降はいずれの測定日においても99%以上減少した。リンパ節の B 細胞数は、リツキシマブ投与群では、day 9で投与前の42%に減少し、day 35で対照群とほぼ同等に戻った。オビヌツズマブ投与群では、対照群と比べ有意な減少が認められ（Dunnett's test $P < 0.05$ ）、day 9及びday 35では、90%以上減少した。オビヌツズマブ30 mg/kg 投与群では、10 mg/kg 投与群よりも強い減少作用が示された。本試験において、オビヌツズマブは、リンパ節 B 細胞に対しリツキシマブよりも強い減少作用を示した。また、day 35で採取した脾臓においても、オビヌツズマブの方がリツキシマブよりも強い B 細胞減少作用を示した（[図 2.6.2.2.4.2-1](#)）。

オビヌツズマブ投与群（10 mg/kg 及び30 mg/kg）における血清中オビヌツズマブ濃度は、初回投与後216時間で最大値 C_{max} に達し、それぞれ217, 631 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、 AUC_{0-864h} は、それぞれ72.1, 267 $\text{mg}\cdot\text{h/mL}$ であった。リツキシマブ投与群（10 mg/kg）の C_{max} 及び AUC_{0-864h} は、それぞれ204, 64.5 $\text{mg}\cdot\text{h/mL}$ であった。両抗体の曝露量は、ほぼ同程度であった。なお、オビヌツズマブ 10 mg/kg 投与群及びリツキシマブ10 mg/kg 投与群において、それぞれ1例ずつ抗薬物抗体が検出され、投与抗体のクリアランス促進が認められた。

図 2.6.2.2.4.2-1 オビヌツズマブ及びリツキシマブ投与による末梢血, リンパ節, 脾臓のB細胞減少作用



A), B), C) 各測定日ごとに, 左から溶媒投与群, リツキシマブ10 mg/kg 投与群, オビヌツズマブ 10 mg/kg 投与群, オビヌツズマブ30 mg/kg 投与群 表示は, 平均値 ± 標準偏差。

[4.2.1.1-36 Appendix 2に基づいて作成]

(2) オビヌツズマブ、オビヌツズマブ糖鎖未改変体及びリツキシマブによる B 細胞減少作用

(資料番号4.2.1.1-38, 4.2.1.1-39)

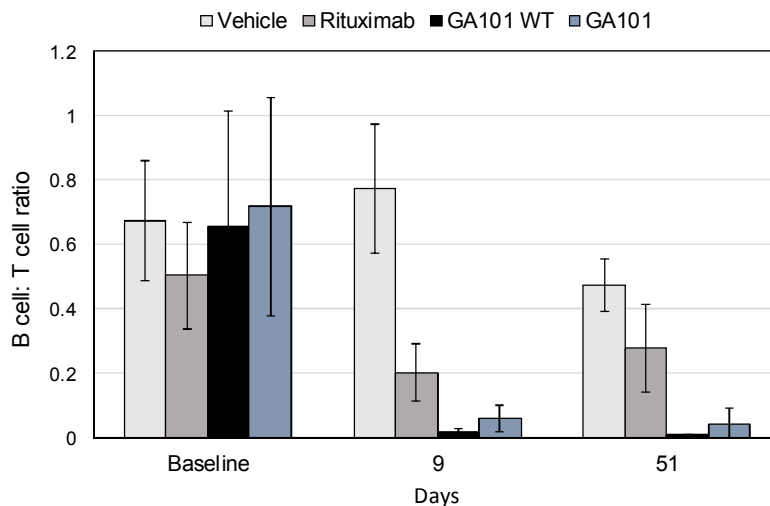
カニクイザルにおけるオビヌツズマブの B 細胞減少作用について、オビヌツズマブの糖鎖未改変体及びリツキシマブと比較した。

雌カニクイザル (1群4例, 対照群のみ3例) に、オビヌツズマブ、オビヌツズマブ糖鎖未改変体及びリツキシマブ各30 mg/kg を day 0 と day 7 の2回静脈内投与し、経時的に末梢血を採取するとともに、baseline (day -6), 9, 51 に鼠蹊部リンパ節組織を採取し、細胞検査に供した。対照群には、溶媒を投与し、抗 CD20 抗体投与による薬力学的作用について検討した。

末梢血 B 細胞は、いずれの抗体投与群においても、投与後初期 (day 2~day 23) から減少したが、B 細胞数減少の程度と B 細胞数が低値を維持した期間は、リツキシマブよりもオビヌツズマブ及び糖鎖未改変体が優れていた。また、day 9 におけるリンパ節 B 細胞の減少は、リツキシマブを含むいずれの抗体投与群においても認められたが、オビヌツズマブ及び糖鎖未改変体投与群では、day 51 においても B 細胞数が90%以上減少した状態を維持した (図 2.6.2.2.4.2-2)。

オビヌツズマブ投与群、オビヌツズマブ糖鎖未改変体投与群、リツキシマブ投与群における血清中濃度の C_{max} は、それぞれ742, 613, 594 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、 $AUC_{0-2352h}$ は、それぞれ261, 229, 125 $\text{mg}\cdot\text{h/mL}$ であった。オビヌツズマブ投与群と糖鎖未改変体投与群との間では、曝露量に大きな差は認められなかったが、リツキシマブ投与群では曝露量が低かった。リツキシマブ投与群では、全例で抗薬物抗体が検出されており、低曝露との関係が示唆される。オビヌツズマブ投与群及び糖鎖未改変体投与群においても、それぞれ3例、2例において抗薬物抗体が認められ、クリアランスが亢進した例も認められた。

図 2.6.2.2.4.2-2 オビヌツズマブ、オビヌツズマブ糖鎖改変体及びリツキシマブ投与によるリンパ節の B 細胞減少作用



表示は、平均値 \pm 標準偏差。

[4.2.1.1-38 Appendix 2に基づいて作成]

(3) カニクイザルにおける免疫応答

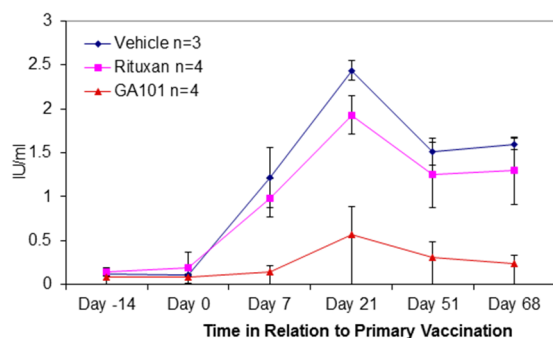
(資料番号4.2.1.1-35)

オビヌツズマブによる B 細胞減少作用が、外来抗原に対する液性免疫反応に与える影響について、カニクイザルを用いて評価した。すなわち、一度も感作されていない抗原（破傷風トキソイド）によりカニクイザルを免疫した場合の *de novo* 応答、又は抗 CD20抗体を投与する前に感作を受けた抗原（麻疹/風疹）を用いて追加免疫した場合のメモリー応答について、抗体投与による影響を調べた。

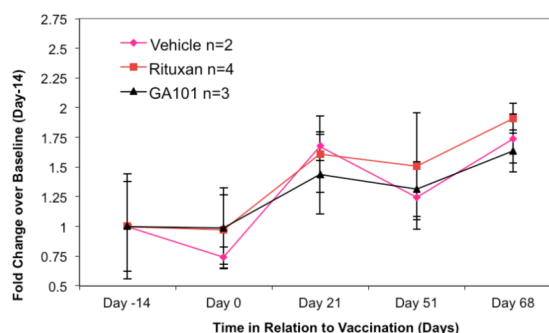
オビヌツズマブ (30 mg/kg) 及びリツキシマブ (30 mg/kg) は、破傷風トキソイド及び麻疹/風疹による抗原感作 (day 0) の7日前及び14日前に静脈内投与し、経時的に血清中の抗原特異的抗体の力価を ELISA を用いて計測した。なお、試験実施前に全例で破傷風トキソイドに対する抗体は認められなかったが、メモリー応答に用いる麻疹/風疹に対する抗体を保持していない個体があったため、メモリー応答の評価では、これらの個体を除外した。

リツキシマブ投与群においては、破傷風トキソイドに対する *de novo* 応答及び麻疹/風疹に対するメモリー応答のいずれに対しても影響は認められなかった。オビヌツズマブ投与群においては、破傷風トキソイドに対する *de novo* 応答を強く抑制するものの、麻疹/風疹に対するメモリー応答には影響を及ぼさなかった (図 2.6.2.2.4.2-3)。オビヌツズマブの *de novo* 応答に対する抑制作用は、B 細胞減少作用が増強されているために生じる可能性が示唆される。

図 2.6.2.2.4.2-3 オビヌツズマブ及びリツキシマブ投与の液性免疫応答に対する影響

A) 一次免疫反応 (*de novo* 応答)

B) 二次免疫反応 (メモリー応答)



カニクイザルから経時的に採血し、破傷風トキソイド及び麻疹/風疹に対する抗体価を測定した。表示は、平均値 ± 標準誤差。

[4.2.1.1-35 Figure 8及び Figure 9再掲]

オビヌツズマブは、カニクイザルでのリンパ節及び脾臓などの末梢リンパ組織における B 細胞減少作用において、リツキシマブよりも強い効果を示した。B 細胞減少作用は、末梢血及びリンパ組織における長期間の薬力学的効果との関係が認められる。オビヌツズマブの糖鎖未改変体においても、リツキシマブよりも優れた B 細胞減少作用が認められたことから、タイプ II 抗 CD20抗体としての特性が寄与している可能性が示唆される。

免疫応答に関する試験では、オビヌツズマブにおいて強化された B 細胞減少作用が、新規の抗体応答に対しては強い抑制作用として発現することが明らかになったが、既に抗原感作されたメモリー応答には作用せず、維持されることが示された。

2.6.2.2.5 *In vivo* 抗腫瘍活性

ヒト NHL 細胞株を SCID マウスあるいは SCID ベージュマウスに移植した xenograft モデルを用いて、オビヌツズマブの腫瘍増殖抑制活性及び生存期間の延長効果を検討した。また、一部の試験では、ヒト CD16遺伝子導入マウスを用いて、ヒト NHL 細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。

オビヌツズマブの *in vivo* 抗腫瘍試験に用いたヒト NHL 細胞株は、SU-DHL-4 (DLBCL) , Z-138 (MCL) , RL (FL) 及び Raji (バーキットリンパ腫) であり、リツキシマブあるいはオフアツムマブとの比較試験も実施した。

2.6.2.2.5.1 びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果

(1) SU-DHL-4細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – オビヌツズマブとリツキシマブ

(資料番号4.2.1.1-40)

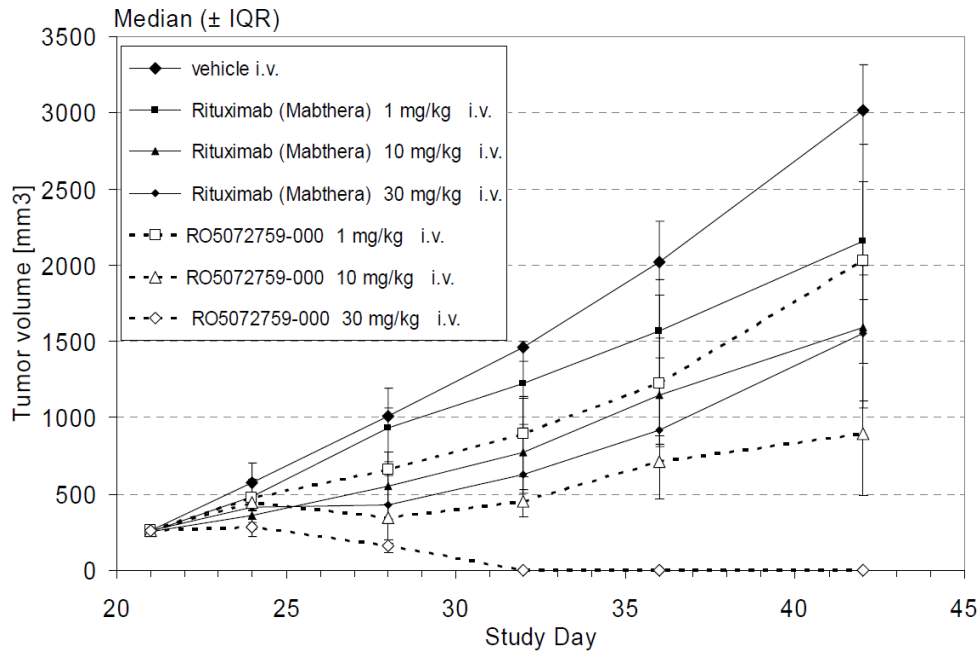
オビヌツズマブとリツキシマブの抗腫瘍効果をヒト DLBCL 由来細胞株 SU-DHL-4の皮下移植モデルを用いて比較した。

SU-DHL-4細胞株を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^6 個移植し (Matrigel 使用) , 21日後に無作為割付後 (1群10匹) , 群分け日からオビヌツズマブ又はリツキシマブを1週間に1回, 1, 10, 30 mg/kg で計3回静脈内投与した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

各投与群の腫瘍体積の推移, 及び腫瘍の完全退縮が認められた個体数を示した (図 2.6.2.2.5.1-1及び表 2.6.2.2.5.1-1) 。オビヌツズマブ1 mg/kg, 10 mg/kg 及び30 mg/kg 投与群における TGI は, それぞれ35.7%, 77.0%, > 100%であり, いずれの投与群においても対照群に比べ有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた (TCR, 95%信頼区間での比較) 。30 mg/kg 投与群では, 全例において腫瘍の完全退縮が認められた。各投与群における平均血清中トラフ濃度 (最終投与日の1週間後) は, 順に11, 109, 312 $\mu\text{g/mL}$ であった。

リツキシマブでは, 1 mg/kg, 10 mg/kg 及び30 mg/kg 投与群における TGI は, それぞれ30.9%, 51.4%, 53.0%であり, 10 mg/kg 以上で有意な増殖抑制効果が認められたが (TCR, 95%信頼区間での比較) , いずれの投与量においても腫瘍が完全退縮した例は認められなかった。また, 各投与群における平均血清中トラフ濃度 (最終投与日の1週間後) は, 順に8, 57, 185 $\mu\text{g/mL}$ であった。

図 2.6.2.2.5.1-1 SU-DHL-4移植モデルにおけるオビヌツズマブとリツキシマブの腫瘍増殖抑制効果



表示は、中央値 ± IQR。

[4.2.1.1-40 Figure 2再掲]

表 2.6.2.2.5.1-1 SU-DHL-4移植モデルにおけるオビヌツズマブとリツキシマブの腫瘍増殖抑制効果

検体	投与量 (mg/kg)	TGI (% , day 42)	TCR (day 42)	TCR 信頼区間	完全退縮 個体比率
溶媒 (対照群)	-	-	-	-	0/10
リツキシマブ	1	30.9	0.72	0.48 – 1.04	0/10
	10	51.4	0.5	0.29 – 0.71	0/10
	30	53.0	0.49	0.31 – 0.71	0/10
オビヌツズマブ	1	35.7	0.58	0.43 – 0.84	0/10
	10	77.0	0.26	0.13 – 0.84	1/10
	30	> 100	0	0	10/10

TGI (%) = 100 - (各投与群の腫瘍体積変化量 / 対照群の腫瘍体積変化量) × 100

腫瘍体積変化量 = (day 42における腫瘍体積中央値) - (群分け日における腫瘍体積中央値)

TCR = (各投与群の腫瘍体積) / (対照群の腫瘍体積)

[4.2.1.1-40 Table 4を改変]

(2) SU-DHL-4細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – オビヌツズマブ, リツキシマブ及び
オファツムマブ

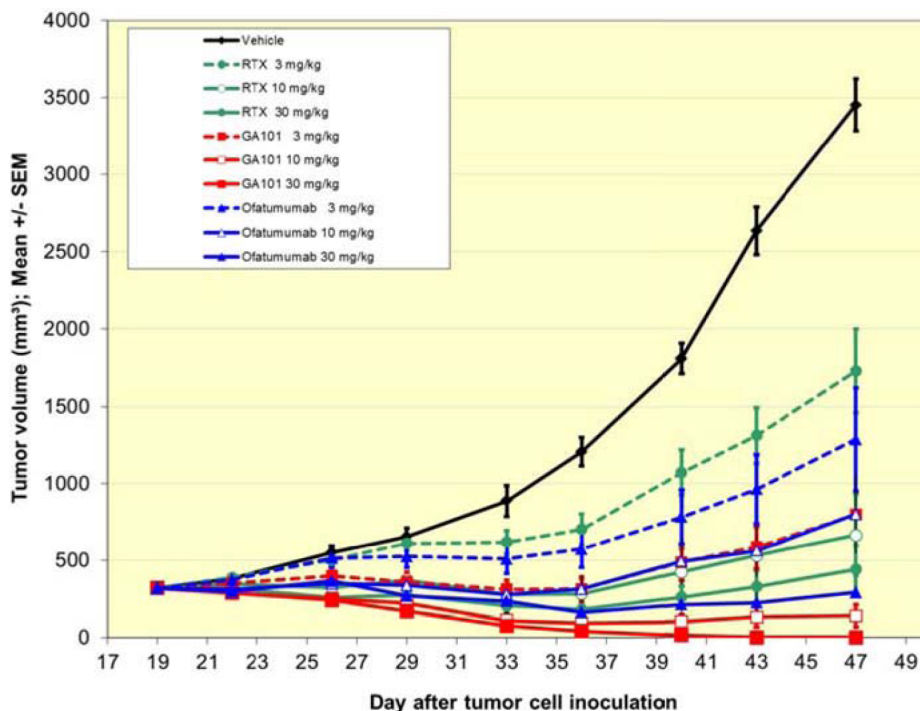
(資料番号4.2.1.1-41)

オビヌツズマブの抗腫瘍効果について、ヒト DLBCL 由来細胞株 SU-DHL-4の皮下移植モデルを用いて、リツキシマブ、オファツムマブと比較した。

SU-DHL-4細胞株を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^6 個移植し (Matrigel 使用), 19日後に無作為割付後 (1群10匹, 各群の平均腫瘍体積は $316 \sim 319 \text{ mm}^3$), 群分け日からオビヌツズマブ, リツキシマブ又はオファツムマブを1週間に1回, 3, 10, 30 mg/kg で計4回腹腔内投与した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

各投与群の腫瘍体積の推移, 及び腫瘍の完全退縮が認められた個体数を示した (図 2.6.2.2.5.1-2及び表 2.6.2.2.5.1-2)。Day 47におけるオビヌツズマブ3, 10 mg/kg 投与群の TGI は, それぞれ85%, 106%であり, 30 mg/kg では全例で腫瘍が完全退縮した。リツキシマブ3, 10, 30 mg/kg 投与群の TGI は, それぞれ55%, 89%, 96%であり, オファツムマブ3, 10, 30 mg/kg 投与群の TGI は, それぞれ69%, 84%, 101%であった。いずれの抗体投与群も対照群と比較し, 統計学的に有意な腫瘍増殖抑制活性を示した (TCR, 95%信頼区間での比較)。最高用量 (30 mg/kg) において, オビヌツズマブ投与群では, 全例 (10/10) で腫瘍が完全に退縮したが, リツキシマブ, オファツムマブ投与群では, それぞれ4/10, 5/9であった。

図 2.6.2.2.5.1-2 SU-DHL-4移植モデルにおけるオビヌツズマブ, リツキシマブ及び
オファツムマブの腫瘍増殖抑制効果



表示は、平均値 ± 標準誤差。

[4.2.1.1-41 Figure 1再掲]

表 2.6.2.2.5.1-2 SU-DHL-4移植モデルにおけるオビヌツズマブ, リツキシマブ
及びオファツムマブの腫瘍増殖抑制効果

検体	投与量 (mg/kg)	TGI (% , day 47)	TCR (day 47)	TCR 信頼区間	完全退縮 個体比率
溶媒 (対照群)	-	-	-	-	0/10
リツキシマブ	3	55	0.50	0.30 – 0.73	1/10
	10	89	0.18	0.03 – 0.35	4/10
	30	96	0.13	0.02 – 0.25	4/10
オファツムマブ	3	69	0.37	0.17 – 0.60	1/10
	10	84	0.22	0.07 – 0.39	3/10
	30	101	0.08	0 – 0.21	5/9
オビヌツズマブ	3	85	0.24	0.05 – 0.44	3/10
	10	106	0.04	0 – 0.20	6/10
	30	-	0	0 – 0.11	10/10

TGI (%) = 100 – (各投与群の腫瘍体積変化量 / 対照群の腫瘍体積変化量) × 100

腫瘍体積変化量 = (day 47における腫瘍体積平均値) – (群分け日における腫瘍体積平均値)

TCR = (各投与群の腫瘍体積) / (対照群の腫瘍体積)

[4.2.1.1-41 Table 6及び Table 7を改変]

(3) SU-DHL-4細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – オビヌツズマブと糖鎖未改変体

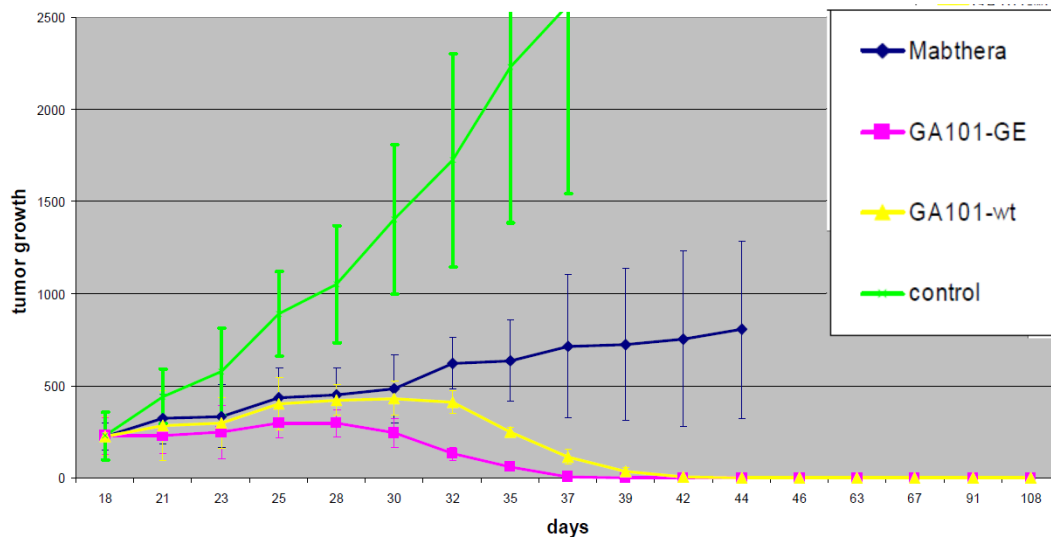
(資料番号4.2.1.1-42)

SU-DHL-4 DLBCL 細胞株移植モデルを用いて、オビヌツズマブとオビヌツズマブ糖鎖未改変体の腫瘍増殖抑制活性について検討した。

SU-DHL-4細胞を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^6 個移植し (Matrigel 使用), 21日後に無作為割付後 (1群10匹), 群分け日からオビヌツズマブ, オビヌツズマブ糖鎖未改変体又はリツキシマブを1週間に1回30 mg/kg で計4回静脈内投与した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

オビヌツズマブ及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体は, いずれも対照群及びリツキシマブ投与群に比べ, 強い腫瘍増殖抑制効果を示した (図 2.6.2.2.5.1-3)。更に, オビヌツズマブ投与群では day 37, オビヌツズマブ糖鎖未改変体投与群では day 42に, 全個体の腫瘍が完全退縮に達した (表 2.6.2.2.5.1-3)。

図 2.6.2.2.5.1-3 SU-DHL-4移植モデルにおけるオビヌツズマブ, オビヌツズマブ糖鎖未改変体, 及びリツキシマブの腫瘍増殖抑制活性



GA101-GE : オビヌツズマブ, GA101-wt : オビヌツズマブ糖鎖未改変体, Mabthera : リツキシマブ
表示は平均値 ± 標準偏差。

[4.2.1.1-42 5項の図を再掲]

表 2.6.2.2.5.1-3 SU-DHL-4移植モデルにおけるオビヌツズマブ, オビヌツズマブ糖鎖未改変体, 及びリツキシマブの腫瘍増殖抑制活性

検体	完全退縮 個体比率	全例が完全退縮に 達した時期
溶媒 (対照群)	0/10	-
リツキシマブ	0/10	-
オビヌツズマブ	10/10	day 37
オビヌツズマブ糖鎖未改変体	10/10	day 42

[4.2.1.1-42 5項の記載に基づいて作成]

(4) SU-DHL-4細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – N 型糖鎖を欠如した変異体を用いた直接的な細胞死誘導活性の寄与の検討

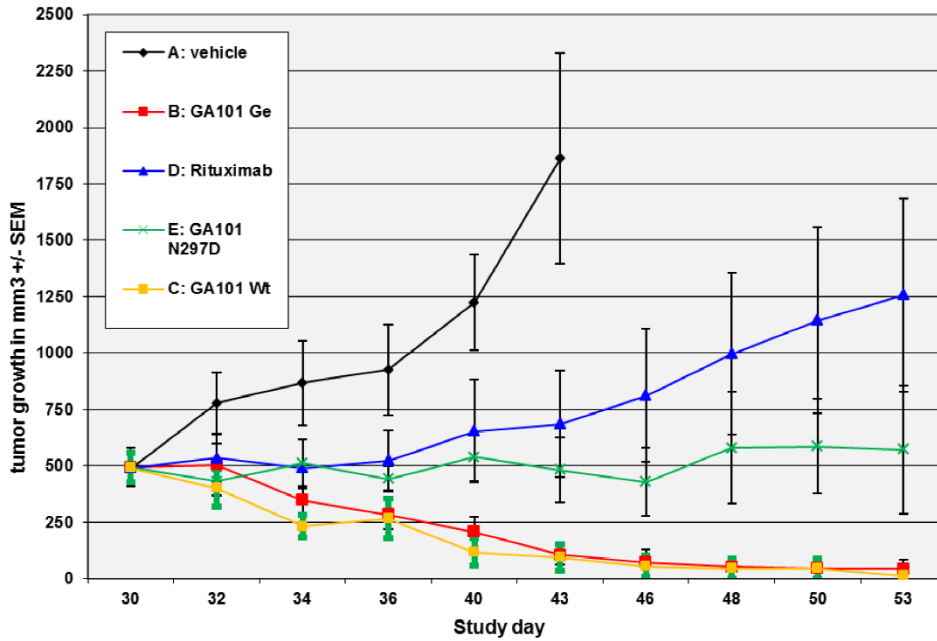
(資料番号4.2.1.1-43)

SU-DHL-4 DLBCL 細胞株移植モデルを用いて、オビヌツズマブ、オビヌツズマブ糖鎖未改変体、N 型糖鎖を欠如しているオビヌツズマブの変異体（オビヌツズマブ N297D）及びリツキシマブの腫瘍増殖抑制活性を比較した。オビヌツズマブ N297D は N 型糖鎖を欠くため、ADCC 活性が著しく減退しているが、オビヌツズマブと同程度の直接的な細胞死誘導活性を維持していることから、本変異体を用いてオビヌツズマブの抗腫瘍活性における直接的な細胞死誘導活性の寄与について検討した。

SU-DHL-4細胞を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^6 個移植し（Matrigel 使用），30日後に無作為割付後（1群8匹，平均腫瘍体積は約 492 mm^3 ），群分け日からオビヌツズマブ，オビヌツズマブ糖鎖未改変体，オビヌツズマブ N297D 又はリツキシマブを1週間に1回 30 mg/kg で計3回静脈内投与した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

Day 43におけるオビヌツズマブ投与群，糖鎖未改変体投与群，N297D 変異体投与群及びリツキシマブ投与群の TGI は，それぞれ128.2%，128.8%，101.0%，85.8%であった。オビヌツズマブ投与群及び糖鎖未改変体投与群は，対照群及びリツキシマブ投与群と比較し，統計学的に有意な腫瘍増殖抑制活性を示すとともに（Dunnett's test $P < 0.05$ ），ほとんどの個体で腫瘍の完全退縮を誘導した（表 2.6.2.2.5.1-4）。ADCC 活性が著しく減退しているオビヌツズマブ N297D 変異体は，オビヌツズマブには劣るものの，リツキシマブと同程度以上の腫瘍増殖抑制活性を示した。この結果は，直接的な細胞死の誘導活性が，オビヌツズマブの腫瘍増殖抑制活性に寄与していることを示すとともに，本モデルにおいて腫瘍を完全退縮させるには，FcR を介した ADCC/ADCP 活性が必要であることを示唆している。

図 2.6.2.2.5.1-4 SU-DHL-4移植モデルにおけるオビヌツズマブ、オビヌツズマブ糖鎖未改変体、オビヌツズマブ N297D 変異体、及びリツキシマブの腫瘍増殖抑制活性



表示は、平均値 ± 標準誤差。

[4.2.1.1-43 Figure 3再掲]

表 2.6.2.2.5.1-4 SU-DHL-4移植モデルにおけるオビヌツズマブ、オビヌツズマブ糖鎖未改変体、オビヌツズマブ N297D 変異体、及びリツキシマブの腫瘍増殖抑制活性

検体	TGI (%, day 43)	完全退縮 個体比率 (day 71)
溶媒 (対照群)	-	-
リツキシマブ	85.8	2/8
オビヌツズマブ	128.2	7/8
オビヌツズマブ糖鎖未改変体	128.8	8/8
オビヌツズマブ N297D 変異体	101.0	2/8

TGI (%) = 100 - (各投与群の腫瘍体積変化量 / 対照群の腫瘍体積変化量) × 100

腫瘍体積変化量 = (day 43における腫瘍体積平均値) - (群分け日における腫瘍体積平均値)

[4.2.1.1-43 4項の記載に基づいて作成]

(5) SU-DHL-4細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – 二次治療での効果

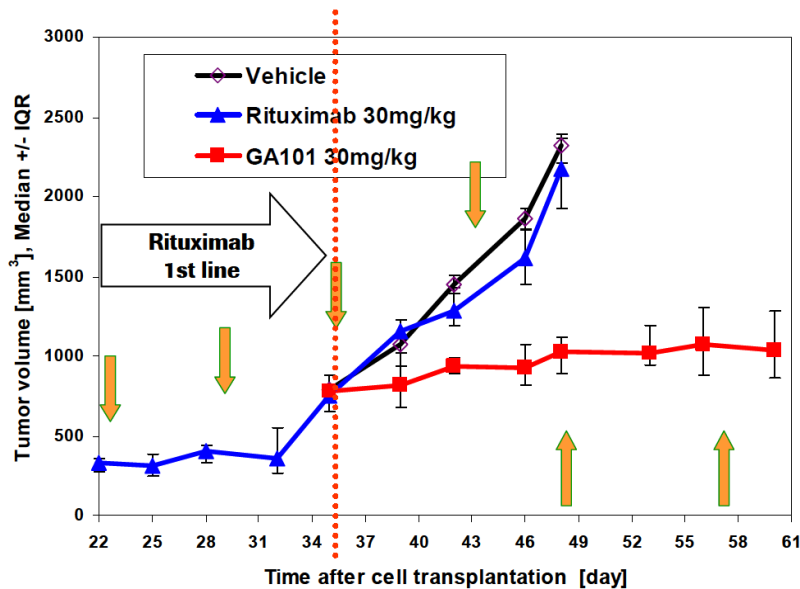
(資料番号4.2.1.1-44)

リツキシマブに対し治療抵抗性を示す NHL モデルにおけるオビヌツズマブの薬効を検討するため、SU-DHL-4を皮下移植した xenograft モデルに一次治療としてリツキシマブ（週1回 30 mg/kg）を投与し、腫瘍増殖性を示した個体に対し、二次治療としてオビヌツズマブを投与して、腫瘍増殖抑制効果を評価した。

SU-DHL-4細胞を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^6 個移植し（Matrigel 使用），移植22日後（day 22）からリツキシマブを1週間に1回30 mg/kg 静脈内投与した。Day 35において腫瘍増殖が認められた個体を用いて、リツキシマブ継続投与群，オビヌツズマブ 30 mg/kg 投与群，対照群に無作為割付（1群10匹）した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

各投与群の腫瘍体積の推移を示した（図 2.6.2.2.5.1-5）。Day 35における平均腫瘍体積は各投与群ともに約760 mm³であったが、リツキシマブ継続投与群では、抗体投与にもかかわらず対照群と同様の腫瘍増殖が認められた。一方、オビヌツズマブ投与群においては、腫瘍増殖が抑制された（表 2.6.2.2.5.1-5）。

図 2.6.2.2.5.1-5 SU-DHL-4皮下移植モデルにおけるオビヌツズマブの二次治療での効果



表示は、中央値 ± IQR。

[4.2.1.1-44 Figure 2再掲]

表 2.6.2.2.5.1-5 SU-DHL-4皮下移植モデルにおけるオビヌツズマブの二次治療での効果

検体	投与量 (mg/kg)	Day 35群分け時 腫瘍体積 (mm ³)	Day 48 腫瘍体積 (mm ³)	TCR	TCR 信頼区間
溶媒（対照群）	-	756 ± 152	2441 ± 505	-	-
リツキシマブ	30	759 ± 165	2102 ± 438	0.82	0.63 – 1.1
オビヌツズマブ	30	762 ± 155	1021 ± 334	0.5	0.38 – 0.67

腫瘍体積は、平均値 ± 標準偏差を表示した。

[4.2.1.1-44 Table 2及び Appendix 1に基づいて作成]

2.6.2.2.5.2 マントル細胞リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果

オビヌツズマブとリツキシマブの腫瘍増殖抑制活性について、マントル細胞由来細胞株 Z-138を SCID ベージュマウスに移植した xenograft モデルを用いて比較した。本細胞株については、皮下移植モデルだけでなく、静脈内に移植し播種性に増殖するモデルも用いた。

(1) Z-138細胞株皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果 – オビヌツズマブとリツキシマブ

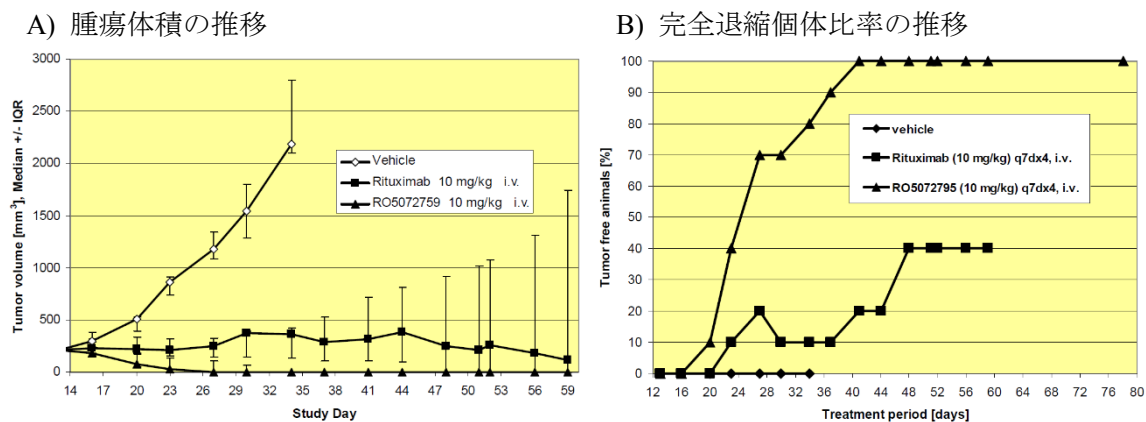
(資料番号4.2.1.1-45)

Z-138細胞株を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^6 個移植し (Matrigel 使用), 13日後 (day 13) に無作為割付後 (1群10匹, 平均腫瘍体積 214 mm^3), 群分け翌日からオビヌツズマブ又はリツキシマブを1週間に1回 10 mg/kg で計4回静脈内投与した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

各投与群の腫瘍体積及び腫瘍の完全退縮が認められた個体比率の推移を示した (図 2.6.2.2.5.2-1)。Day 34におけるオビヌツズマブ投与群の TGI は $> 100\%$, リツキシマブ投与群では 92% であった。オビヌツズマブ投与群では, day 34までに10匹中9匹で腫瘍が完全退縮し, 最後の1例についても経過観察中に腫瘍消失が認められた。一方, リツキシマブ投与群では, day 34における腫瘍の完全退縮例は10匹中1匹であり, 最終的に10匹中4匹で腫瘍の消失が認められた。

各投与群における平均血清中トラフ濃度 (3回目投与日の1週間後) は, オビヌツズマブ投与群では $131 \mu\text{g/mL}$, リツキシマブ投与群では $78 \mu\text{g/mL}$ であった。

図 2.6.2.2.5.2-1 Z-138皮下移植モデルにおけるオビヌツズマブ及びリツキシマブの腫瘍増殖抑制活性



表示は, 中央値 ± IQR。

[4.2.1.1-45 Figure 3及び Figure 4再掲]

(2) Z-138細胞株皮下移植モデルにおける血清中濃度と抗腫瘍効果

(資料番号4.2.1.1-46)

Z-138細胞株を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^6 個移植し (Matrigel 使用), 20日後 (day 20) に無作為割付後 (1群10匹, 腫瘍体積中央値400 mm³), 群分け日からオビヌツズマブ又はリツキシマブを1週間に1回1, 10, 30, 100 mg/kg で計4回 (day 20, 27, 34, 41) 静脈内投与した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

各投与群の day 31における TGI, day 49において腫瘍の完全退縮が認められた個体比率, 及び血清中オビヌツズマブ濃度 (day 32, day 49) を示した (表 2.6.2.2.5.2-1)。Day 32は, 2回目投与の5日後, day 49は4回目投与の8日後である。

リツキシマブ1, 10, 30, 100 mg/kg 投与群の TGI は, それぞれ54%, 77%, 79%, 89%, オビヌツズマブ投与群では, それぞれ53%, 88%, 95%, > 100%であり, いずれの抗体投与群も対照群と比較し, 統計学的に有意な腫瘍増殖抑制活性を示した。また, オビヌツズマブ100 mg/kg 投与群では, 10例中7例で腫瘍の完全退縮が認められた。オビヌツズマブ10 mg/kg 投与群での血清中濃度は, day 32では $102 \pm 34 \mu\text{g/mL}$, day 49では $98 \pm 35 \mu\text{g/mL}$ であった。TGI 及び腫瘍の完全退縮比率が向上する傾向を示したオビヌツズマブ100 mg/kg 投与群の血清中濃度は, day 32では $751 \pm 97 \mu\text{g/mL}$, day 49では $478 \pm 138 \mu\text{g/mL}$ であり, 概ね500~700 $\mu\text{g/mL}$ と考えられた。

表 2.6.2.2.5.2-1 Z-138皮下移植モデルにおけるオビヌツズマブとリツキシマブの腫瘍増殖抑制効果及び血清中抗体濃度

検体	投与量 mg/kg	TGI (%, day 31)	完全退縮 個体比率 (day 49)	血清中濃度 ($\mu\text{g/mL}$, mean \pm SD)	
				day 32	day 49
リツキシマブ	1	54	0/10	4 ± 1	-
	10	77	0/10	67 ± 15	56 ± 10
	30	79	3/10	164 ± 26	96 ± 24
	100	89	2/10	336 ± 40	186 ± 20
オビヌツズマブ	1	53	1/10	7 ± 3	-
	10	88	5/10	102 ± 34	98 ± 35
	30	95	2/10	524 ± 84	313 ± 50
	100	> 100	7/10	751 ± 97	478 ± 138

TGI (%) = $100 - (\text{各投与群の腫瘍体積変化量} / \text{対照群の腫瘍体積変化量}) \times 100$

腫瘍体積変化量 = (day 31における腫瘍体積中央値) - (群分け日における腫瘍体積中央値)

[4.2.1.1-46 5項及び Appendix 2の記載に基づいて作成]

(3) Z-138細胞株皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果 - 病理組織解析

(資料番号4.2.1.1-47)

Z-138細胞株の皮下移植モデルでは, オビヌツズマブ (10, 30, 100 mg/kg) 単回投与後における腫瘍部位を病理組織学的に評価した。オビヌツズマブ投与の一週間後における腫瘍辺縁部では, 対照群に比べて多くの免疫細胞浸潤が認められた。浸潤している細胞の内, 最も多いのはマクロファージであり, リンパ細胞, 好中球の浸潤も認められた。また, この領域では腫瘍細胞のアポトーシスが増加する傾向を示した。

(4) Z-138細胞株播種性増殖モデルにおける抗腫瘍効果

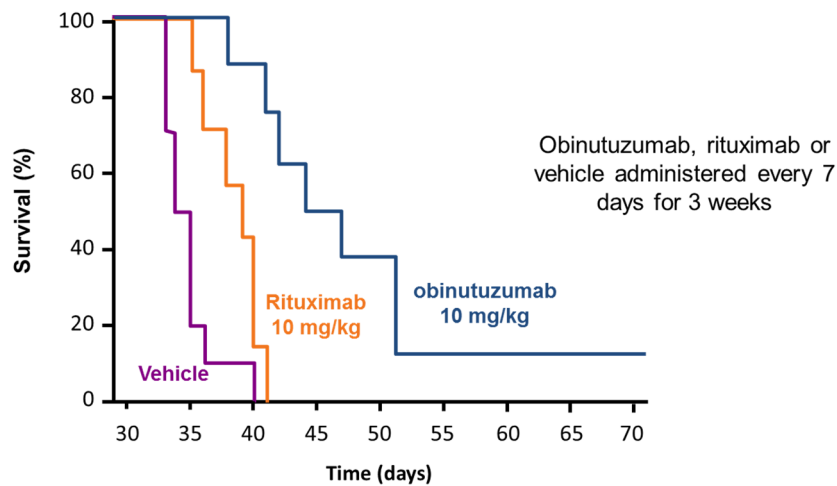
(資料番号4.2.1.1-48, 4.2.1.1-49)

Z-138細胞株を雌 SCID ベージュマウスに1匹あたり 1×10^7 個尾静脈から移植し、29日後 (day 29) に無作為割付後 (対照群10匹, 各抗体投与群1群9匹), 群分け日からオビヌツズマブ又はリツキシマブを1週間に1回10, 30 mg/kg で計6回腹腔内投与した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

オビヌツズマブ及びリツキシマブの各10 mg/kg 投与群における生存曲線及び30 mg/kg 投与群も含めた生存期間中央値を示した (図 2.6.2.2.5.2-2及び表 2.6.2.2.5.2-2)。両抗体投与群は、いずれの投与量においても対照群よりも生存期間が有意に長かった。また、オビヌツズマブ投与群では、同じ投与量のリツキシマブ投与群と比べ統計学的に有意な生存期間の延長が認められた (ANOVA non-parametric one-way, $P < 0.05$)。

同様に、オビヌツズマブ又はリツキシマブを1週間に1回1, 10 mg/kg, 腫瘍移植31日後から5回静脈内投与した試験を実施した。両抗体投与群は、対照群よりも生存期間が統計学的に有意に長く (表 2.6.2.2.5.2-3), オビヌツズマブ10 mg/kg 投与群では、リツキシマブ10 mg/kg 投与群よりも統計学的に有意に長い生存期間の延長が認められた (ANOVA non-parametric one-way, $P < 0.05$)。

図 2.6.2.2.5.2-2 Z-138播種性増殖モデルにおけるオビヌツズマブとリツキシマブの抗腫瘍効果 - 生存期間の Kaplan-Meier 曲線



[4.2.1.1-48 5.1項の図を改変]

表 2.6.2.2.5.2-2 Z-138播種性増殖モデルにおけるオビヌツズマブとリツキシマブの抗腫瘍効果 - 生存期間中央値

検体	投与量 (mg/kg)	生存期間* 中央値 (日)	P 値 (vs 対照群)
溶媒 (対照群)	-	35	-
リツキシマブ	10	40	< 0.01
	30	44.5	< 0.01
オビヌツズマブ	10	46.5	< 0.001
	30	50	< 0.001

*腫瘍移植日から起算。

[4.2.1.1-48 5.1項の表を改変]

表 2.6.2.2.5.2-3 Z-138播種性増殖モデルにおけるオビヌツズマブ, リツキシマブの抗腫瘍効果 - 生存期間の延長

検体	投与量 (mg/kg)	生存期間* 中央値 (日)	P 値 (vs 対照群)
溶媒 (対照群)	-	36	-
リツキシマブ	1	42	< 0.001
	10	40	< 0.01
オビヌツズマブ	1	41	< 0.01
	10	49	< 0.0001

*腫瘍移植日から起算。

[4.2.1.1-49 5.1項の表を改変]

(5) Z-138細胞株播種性増殖モデルにおける抗腫瘍効果 - ヒト CD16遺伝子導入マウス

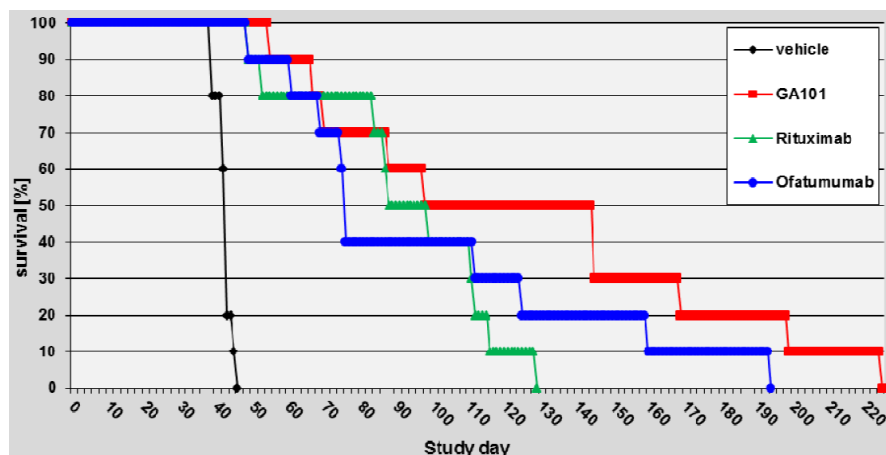
(資料番号4.2.1.1-50)

SCID ベージュマウスでは, NK 細胞が正常に機能しないため, ヒトよりも ADCC 活性の発現が低い可能性がある。そこで, マウス NK にヒト FcγRIIIa を発現させたヒト CD16遺伝子導入マウス (遺伝的背景は SCID マウス, 以下, CD16 tg) を用いて, ヒトに近い条件における各抗ヒト CD20抗体の抗腫瘍効果を比較した。

Z-138細胞株を CD16 tg に1匹あたり 1×10^7 個尾静脈から移植し, 26日後 (day 26) に無作為割付後 (1群10匹), 群分け日からオビヌツズマブ, リツキシマブ又はオフアツムマブを1週間に1回30 mg/kg で計3回静脈内投与した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

各投与群における生存期間中央値は, 対照群では43日, オフアツムマブ投与群76日, リツキシマブ投与群93.5日, オビヌツズマブ投与群121.5日であり, 抗ヒト CD20抗体投与群は, いずれも, 対照群に比較し統計学的に有意な延命効果 (Pairwise Log-Rank Test, いずれも $P < 0.0001$) を示した。なお, オビヌツズマブ投与群の生存期間中央値が最も長かったが, 抗ヒト CD20抗体を投与した3群間に統計学的な有意差は認められなかった。

図 2.6.2.2.5.2-3 Z-138播種性増殖モデル (CD16 tg マウス) におけるオビヌツズマブ, リツキシマブ, 及びオフアツムマブの抗腫瘍効果 - 生存曲線



[4.2.1.1-50 Figure 1再掲]

2.6.2.2.5.3 濾胞性リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果

(1) RL 細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – オビヌツズマブとリツキシマブ

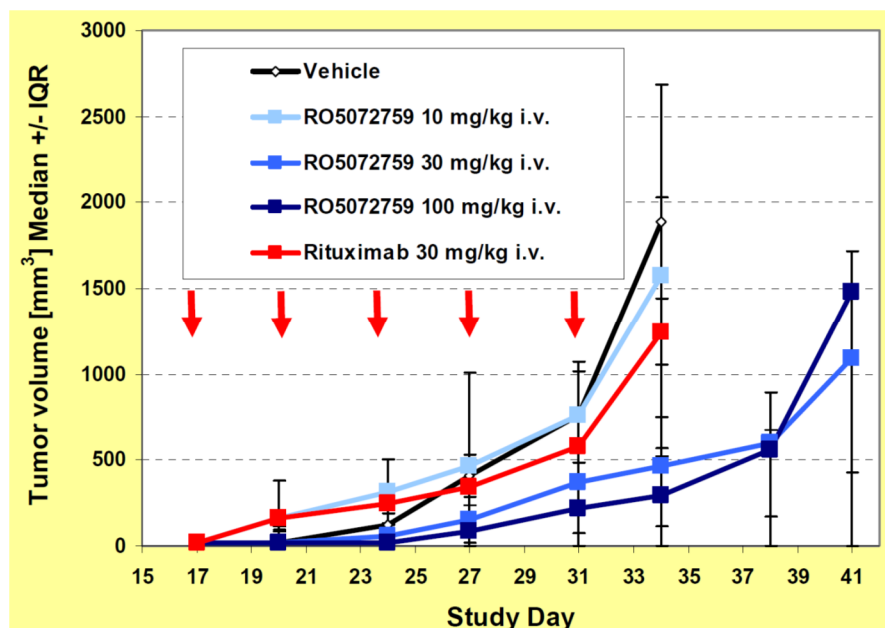
(資料番号4.2.1.1-51)

オビヌツズマブとリツキシマブの腫瘍増殖抑制活性について、FL 細胞株 RL を SCID マウスに移植した xenograft モデルを用いて検討した。

FL 細胞株 RL を雌 SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり 1×10^6 個移植し、17日後 (day 17) に無作為割付後 (1群10匹又は7匹) , 群分け日からオビヌツズマブ, リツキシマブを1週間に2回 (day 17, 20, 24, 27, 31) で計5回静脈内投与した。オビヌツズマブの投与量は、10, 30, 100 mg/kg, リツキシマブは30 mg/kg とし、対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

各投与群の腫瘍体積の推移, 及び day 34における腫瘍増殖抑制効果を図 2.6.2.2.5.3-1及び表 2.6.2.2.5.3-1に示した。Day 34におけるリツキシマブ30 mg/kg 投与群の TGI は43%であった。オビヌツズマブ10, 30, 100 mg/kg 投与群の TGI は、それぞれ25%, 75%, 85%であり、高用量投与群 (30, 100 mg/kg) で強い腫瘍増殖抑制活性が認められた。同じ30 mg/kg 投与群の TGI は、リツキシマブ群の43%に対し、オビヌツズマブ 群は75%であり、後者がより高値であった。また、腫瘍が完全退縮した個体は、オビヌツズマブ30 mg/kg 及び100 mg/kg 投与群で認められた。

図 2.6.2.2.5.3-1 RL 移植モデルにおけるオビヌツズマブとリツキシマブの腫瘍増殖抑制効果



表示は、中央値 ± IQR。
矢印は、抗体の投与日を示す。

[4.2.1.1-51 Figure 2再掲]

表 2.6.2.2.5.3-1 RL 移植モデルにおけるオビヌツズマブとリツキシマブの腫瘍増殖抑制効果

検体	投与量 (mg/kg)	TGI (% , day 34)	TCR (day 34)	TCR 信頼区間	完全退縮 個体比率
溶媒 (対照群)	-	-	-	-	0
リツキシマブ	30	43	0.62	0.33 – 2.35	0
	10	25	0.97	0.41 – 2.98	0
オビヌツズマブ	30	75	0.22	0.00 – 1.21	3/10
	100	85	0.19	0.07 – 0.62	1/10

TGI (%) = 100 – (各投与群の腫瘍体積変化量 / 対照群の腫瘍体積変化量) × 100

腫瘍体積変化量 = (day 34における腫瘍体積中央値) – (群分け日における腫瘍体積中央値)

TCR = (各投与群の腫瘍体積) / (対照群の腫瘍体積)

[4.2.1.1-51 Table 3を改変]

(2) RL 細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – オビヌツズマブ, リツキシマブ及びオファツムマブ

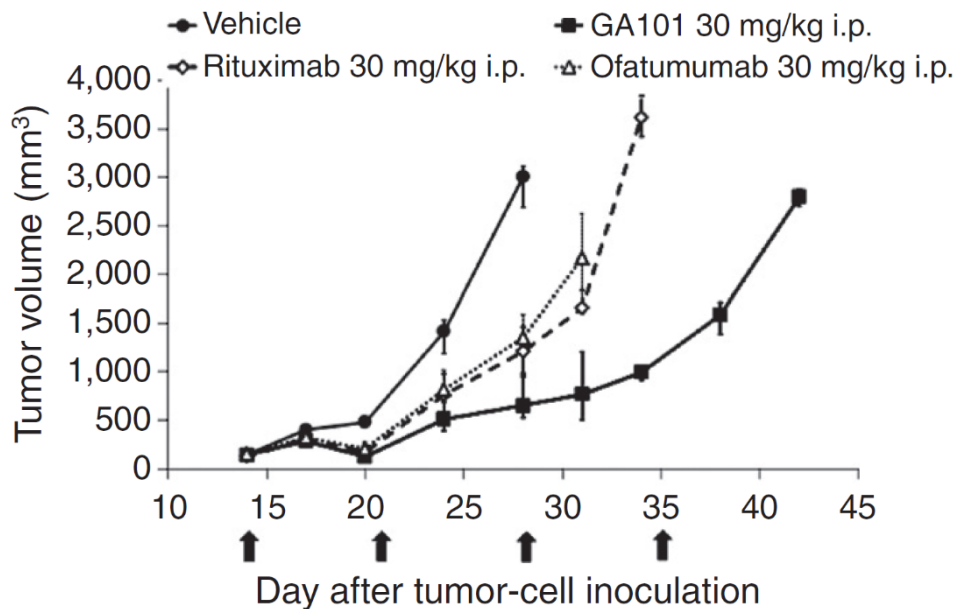
(資料番号4.2.1.1-52)

オビヌツズマブの腫瘍増殖抑制活性について、FL 細胞株 RL 移植モデルを用いて、リツキシマブ及びオファツムマブと比較した。

FL 細胞株 RL を雌 SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり 1×10^7 個移植し、14日後 (day 14) に無作為割付後 (1群10匹), 群分け日からオビヌツズマブ, リツキシマブ又はオファツムマブを1週間に1回30 mg/kg, 4回腹腔内投与した。

各投与群の腫瘍体積の推移, 及び day 28における腫瘍増殖抑制効果を図 2.6.2.2.5.3-2に示した。投与開始後14日目 (day 28) における TGI は, オビヌツズマブ投与群では82%, リツキシマブ投与群では62%, オファツムマブ投与群では58%であった。オビヌツズマブは, リツキシマブ, オファツムマブに比較し, 強い腫瘍増殖抑制活性を示した (表 2.6.2.2.5.3-2)。

図 2.6.2.2.5.3-2 RL 移植モデルにおけるオビヌツズマブ, リツキシマブ, 及びオファツムマブの腫瘍増殖抑制効果



表示は, 中央値 \pm IQR. 矢印は, 抗体の投与日を示す。

[4.3-8⁷⁾ Figure 6C 再掲, 4.2.1.1-52 Figure 2を改変]

表 2.6.2.2.5.3-2 RL 移植モデルにおけるオビヌツズマブ, リツキシマブ, 及びオファツムマブの腫瘍増殖抑制効果

検体	TGI (%, day 28)	TCR (day 28)	TCR 信頼区間
溶媒 (対照群)	-	-	-
リツキシマブ	62	0.46	0.34 – 0.55
オファツムマブ	58	0.45	0.31 – 0.64
オビヌツズマブ	82	0.23	0.16 – 0.34

TGI (%) = $100 - (\text{各投与群の腫瘍体積変化量} / \text{対照群の腫瘍体積変化量}) \times 100$

腫瘍体積変化量 = (day 28における腫瘍体積中央値) - (群分け日における腫瘍体積中央値)

TCR = (各投与群の腫瘍体積) / (対照群の腫瘍体積)

[4.2.1.1-52 Table 3を改変]

2.6.2.2.5.4 バーキットリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果

(資料番号4.2.1.1-53, 4.2.1.1-54)

オビヌツズマブとリツキシマブの腫瘍増殖抑制活性について、バーキットリンパ腫 Raji 細胞株を雌 SCID ベージュマウスに移植した xenograft モデルを用いて検討した。本細胞については、皮下移植モデルだけでなく、静脈内に移植し播種性に増殖するモデルも用いた。

- 播種性増殖モデルに、オビヌツズマブ又はリツキシマブを1週間に2回1, 10, 30 mg/kg で計4回静脈内投与し、各投与群の生存期間中央値を比較した。溶媒を投与した対照群では20.5日であったが、リツキシマブ投与群では、用量の増加に伴って生存期間が延長し、順に40日, 45.5日, 69.5日, オビヌツズマブ投与群では、用量との関係は認められないものの、順に75日, 52.5日, 67.5日であり、オビヌツズマブ及びリツキシマブのいずれでも生存期間の延長が認められた。両抗体の各投与群において、実験最終日に生存していた個体比率は、14%~50%であり投与量との関係は認められなかった。
- 皮下移植モデルに、オビヌツズマブ又はリツキシマブを1週間に1回1, 10, 30 mg/kg で計3回静脈内投与したところ、両抗体は同程度の腫瘍増殖抑制活性を示した。オビヌツズマブの TGI は、順に64%, 99%, 90%であり、リツキシマブでは、50%, 74%, 90%であった。

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当なし。

2.6.2.4 安全性薬理試験

オビヌツズマブは IgG 抗体でありオフターゲットの薬理学的作用を誘発する可能性は低いと推察されるが、中枢神経系、呼吸器系及び心血管系への潜在的影響を、カニクイザルを用いた13週間及び26週間静脈内投与試験の中で評価した。特に、総合的な安全性薬理バッテリー項目である心血管系（心電図、血圧、心拍数）、呼吸器系（呼吸数）、中枢神経系（一般状態、神経行動学的検査）については、カニクイザルを用いた26週間静脈内投与試験の中で評価した。初回及びそれに続く慢性曝露後に薬物の影響は認められなかった（2.6.6.3.3）。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.5.1 共存する化学療法薬の影響 (*in vitro*)

臨床において、抗 CD20抗体と併用される薬剤あるいは今後併用が見込まれる薬剤には、ADCC 活性に対する影響が懸念されるものもある。そこで、プレドニゾロン、クロラムブシル、PI3K (phosphoinositide 3-kinase) 阻害薬、及び Bcl-2阻害薬について、オビヌツズマブの ADCC 活性に及ぼす影響を検討した。

(1) プレドニゾロンの影響

(資料番号4.2.1.4-1)

プレドニゾロンは、炎症、自己免疫疾患治療薬であり、免疫抑制作用を有するため、オビヌツズマブの ADCC 活性に対する影響について、2種の試験を実施した。

- ヒト PBMC をプレドニゾロン (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 存在下で22.5時間培養した後、バーキットリンパ腫細胞株 Raji を標的細胞として、オビヌツズマブによる ADCC 活性を測定した。
- ヒト NK 細胞株 NK-92 LC3 E11 (ヒト Fc γ RIIIa 遺伝子導入 NK-92細胞) をプレドニゾロン (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 存在下で24時間又は48時間培養した後、オビヌツズマブと3時間培養し、エステラーゼ放出を測定した。

高濃度のプレドニゾロンは、オビヌツズマブによる ADCC 活性及びNK 細胞によるエステラーゼ放出に抑制作用を示したが、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での作用は軽微であった。臨床でのプレドニゾロンの血中濃度が1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満であることを考慮すると、NK 細胞による ADCC 活性に対し、問題となる影響はないと考えられる。

(2) 化学療法薬の影響

(資料番号4.2.1.4-2, 4.2.1.4-3, 4.2.1.4-4)

アルキル化剤クロラムブシル、Fc γ RIIIa シグナル伝達に関わる PI3K に対する阻害薬、並びに細胞死誘導に関係する Bcl-2に対する阻害薬を用いて、オビヌツズマブの生物活性に対する影響について検討した。

- ヒト PBMC をクロラムブシル (5 nmol/L, 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 存在下で20時間培養した後、バーキットリンパ腫細胞株 Raji を標的細胞として、オビヌツズマブによる ADCC 活性を測定した。クロラムブシルで前処理した PBMC は、対照 PBMC と同程度の ADCC 活性を示した。
- ヒト PBMC を PI3K 阻害薬 (BEZ-235及び Ly294002, 0~100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 存在下で1時間培養した後、PBMC 中の B 細胞を標的として、オビヌツズマブによる ADCC 活性を測定した。両 PI3K 阻害薬は、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ までの濃度域で B 細胞の生存に影響を及ぼさなかったが、オビヌツズマブによる B 細胞減少作用と CD107a の発現をマーカーとした NK 細胞の活性化を用量依存的に阻害した。
- ヒト NHL 細胞株 (SU-DHL-4, Z-138, Raji) に Bcl-2阻害薬 (ABT-737, ABT-263) とオビヌツズマブを併用し、細胞死を誘導したところ、SU-DHL-4, Z-138細胞では、相加効果ないし相加を上回る傷害活性を示した。Raji 細胞では明確な増強作用は認められなかった。

Patz らは、CLL 患者から採取した CLL 細胞を標的としてオビヌツズマブによる直接的細胞死の誘導活性を検討し、クロラムブシルとの併用による効果増強を示した²³⁾。また、Jak らは、CD40刺激 CLL 細胞を標的として化学療法薬との併用効果について検討し、フルダラビン、クロラムブシル、ベンダムスチン等で効果増強が認められたことを報告している²⁴⁾。

2.6.2.5.2 *In vivo*における化学療法薬との併用効果

リツキシマブは、化学療法との併用により、臨床的な効果が高まるため、化学療法薬と併用投与されることが多く、用いられるレジメンには、CHOP（シクロホスファミド、ドキシソルビン、ビンクリスチン、プレドニゾロン併用療法）、CVP（シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾロン併用療法）、ベンダムスチン、フルダラビン、及びFC（フルダラビン、シクロホスファミド併用療法）などがある。オビヌツズマブについても、化学療法薬との併用による抗腫瘍効果の増強を検討するため、ヒト NHL 細胞株の xenograft モデルを用いて併用試験を実施した²⁵⁾。

(1) シクロホスファミド、ビンクリスチンとの併用

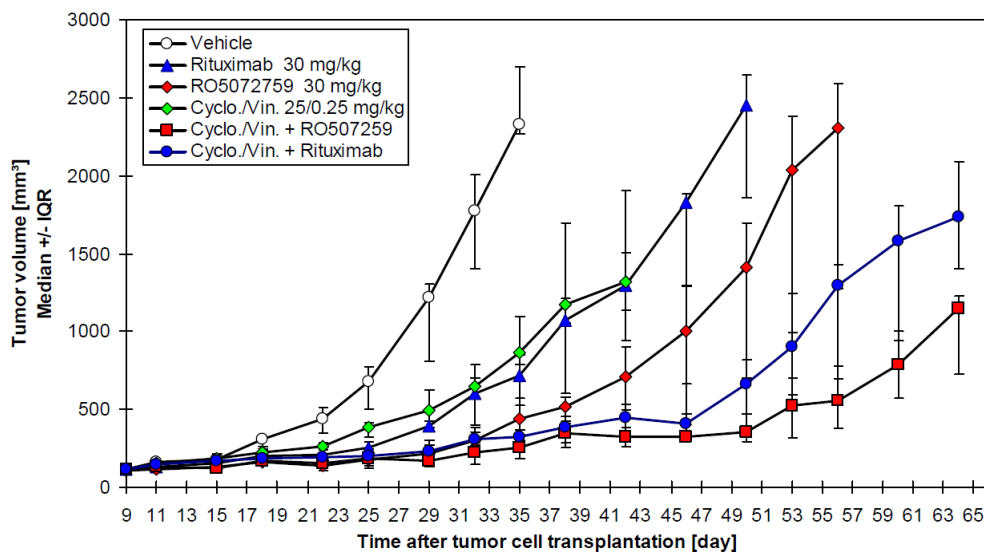
(資料番号4.2.1.4-5)

ヒト DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2の皮下移植モデルを用いて、オビヌツズマブとシクロホスファミド + ビンクリスチン（以下、CV）を併用した時の抗腫瘍効果について検討した。

WSU-DLCL2細胞株を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 2×10^6 個移植し（Matrigel 使用）、9日後（day 9）に無作為割付（1群10匹）した。群分け日からオビヌツズマブ又はリツキシマブを、1週間に1回30 mg/kg で計8回（day 9, 15, 23, 30, 37, 44, 51, 58）静脈内投与、シクロホスファミド25 mg/kg 及びビンクリスチン0.25 mg/kg も同じスケジュールにて静脈内投与した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

各投与群の腫瘍体積の推移、腫瘍増殖の遅延活性、day 35における腫瘍増殖抑制効果を図 2.6.2.5.2-1及び表 2.6.2.5.2-1に示した。腫瘍増殖の遅延活性（T-C days）は、あらかじめ設定した腫瘍体積（1500 mm³）に達するまでの日数を溶媒投与対照群（30.5日）と比較して示した。オビヌツズマブ + CV 併用投与群は、対照群に比較し、腫瘍体積が1500 mm³に達するまでの期間を38日間延長させ、リツキシマブ + CV 併用投与群が示した28日間よりも長かった。Day 35における TCR は、オビヌツズマブ投与群では0.26、リツキシマブ投与群では0.41、CV 投与群では0.49、オビヌツズマブ + CV 投与群では0.22、リツキシマブ + CV 投与群では0.28であり、オビヌツズマブ + CV 投与群の TCR が最も小さかった。

図 2.6.2.5.2-1 WSU-DLCL-2移植モデルにおけるオビヌツズマブとシクロホスファミド + ビンクリスチンとの併用効果



表示は、中央値 ± IQR。

[4.2.1.4-5 Figure 3再掲]

表 2.6.2.5.2-1 WSU-DLCL-2移植モデルにおけるオビヌツズマブとシクロホスファミド + ビンクリスチンとの併用効果

検体	T-C days	TCR (day 35)	TCR 信頼区間
溶媒 (対照群)	-	-	-
オビヌツズマブ 30 mg/kg	19	0.26	0.17 - 0.38
リツキシマブ 30 mg/kg	13	0.41	0.31 - 0.59
シクロホスファミド 25 mg/kg + ビンクリスチン 0.25 mg/kg (CV)	14	0.49	0.39 - 0.66
オビヌツズマブ + CV	38	0.22	0.17 - 0.31
リツキシマブ + CV	28	0.28	0.22 - 0.38

TCR = (各投与群の腫瘍体積) / (対照群の腫瘍体積)

[4.2.1.4-5 Table 4及び Table 5に基づいて作成]

(2) シクロホスファミド，ドキシソルビシンとの併用

(資料番号4.2.1.4-6, 4.2.1.4-7)

ヒト FL 細胞株 RL の皮下移植モデルを用いて、シクロホスファミド及びドキシソルビシンとの併用効果を検討した。

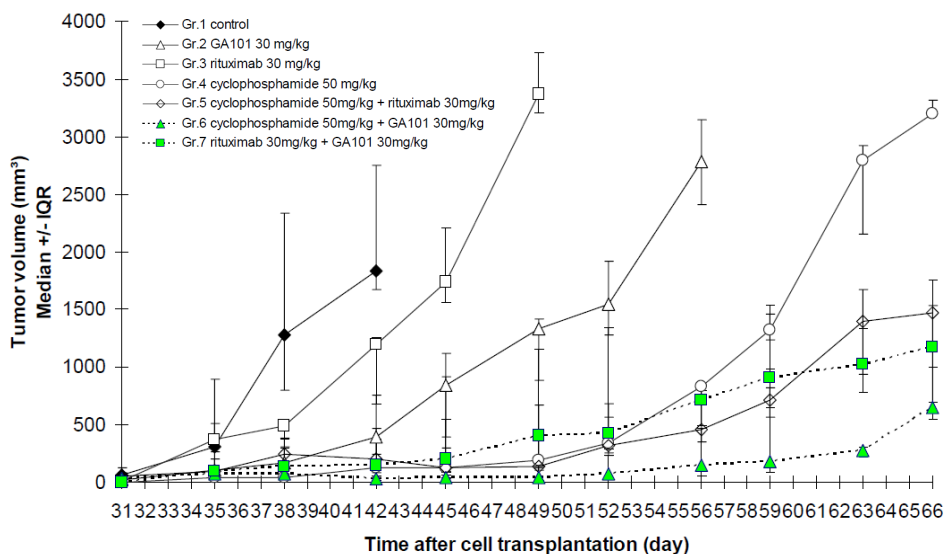
オビヌツズマブ又はリツキシマブとシクロホスファミドを併用する試験では、RL 細胞株を雌 SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり 1×10^6 個移植し、31日後 (day 31) に無作為割付 (1群9匹、シクロホスファミド投与群とリツキシマブ投与群は5匹) した。群分け日からオビヌツズマブ及びリツキシマブを1週間に1回30 mg/kg で計4回 (day 31, 38, 45, 52) 静脈内投与、シクロホスファミドも同じスケジュールにて50 mg/kg を静脈内投与した。対照群には溶媒を同じスケジュールにて投与した。

各投与群の腫瘍体積の推移を図 2.6.2.5.2-2 に示した。各単独投与群の day 42 における溶媒投与群に対する TGI は、オビヌツズマブ30 mg/kg 投与群では79%、リツキシマブ30 mg/kg 投与群では35%、シクロホスファミド50 mg/kg 投与群では93%であった。併用投与群では、day 42 におけるリツキシマブ単独投与群を対照としたリツキシマブ + シクロホスファミド併用群の TGI が83%、day 56 におけるオビヌツズマブ単独投与群を対照としたオビヌツズマブ + シクロホスファミド併用群の TGI が94%であった。また、day 56 におけるシクロホスファミド単独投与群及びオビヌツズマブ + シクロホスファミド併用群の腫瘍体積中央値は、それぞれ830、153 mm³であり、オビヌツズマブ併用による腫瘍増殖抑制効果の増強が示唆された。

オビヌツズマブ及びリツキシマブとドキシソルビシンを併用する試験では、同様に、RL 細胞株を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 1×10^6 個移植し、14日後 (day 14) に無作為割付 (1群10匹) した。オビヌツズマブ及びリツキシマブは1週間に1回30 mg/kg を計5回 (day 14, 21, 28, 36, 42) 静脈内投与、ドキシソルビシンも同じスケジュールにて3 mg/kg を静脈内投与した。

ドキシソルビシン投与群を対照とした時の TGI は、リツキシマブ30 mg/kg 投与群では-7%、オビヌツズマブ30 mg/kg 投与群では71%、リツキシマブ + ドキシソルビシン併用群では78%、オビヌツズマブ + ドキシソルビシン併用群では89%であった (図 2.6.2.5.2-3 及び表 2.6.2.5.2-2)。この4群中でオビヌツズマブ + ドキシソルビシン併用群が最も強い抗腫瘍効果を示したが、リツキシマブ投与群を除いた3群間に有意な差は認められなかった。

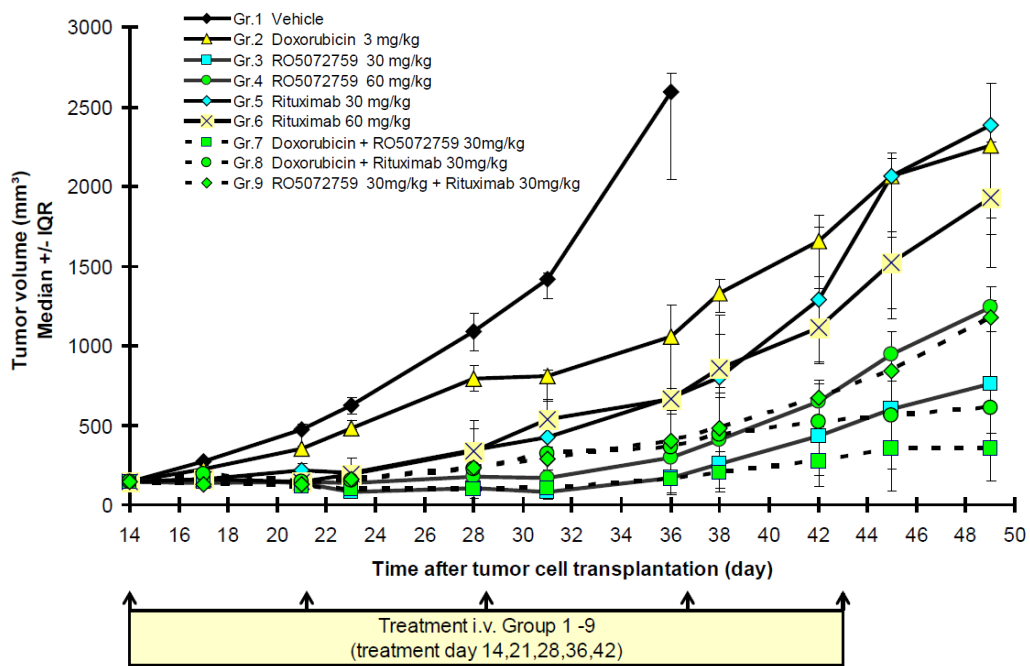
図 2.6.2.5.2-2 RL 移植モデルにおけるオビヌツズマブとシクロホスファミドとの併用効果



表示は、中央値 ± IQR。

[4.2.1.4-6 Figure 2を改変]

図 2.6.2.5.2-3 RL 移植モデルにおけるオビヌツズマブとドキシソルビシンとの併用効果



表示は、中央値 ± IQR。

[4.2.1.4-7 Figure 1を改変]

表 2.6.2.5.2-2 RL 移植モデルにおけるオビヌツズマブとドキシソルビシンとの併用効果

検体	TGI (%, day 49)	TCR (day 49)	TCR 信頼区間
溶媒	-	-	-
ドキシソルビシン 3 mg/kg (Dox)	-	-	-
リツキシマブ 30 mg/kg	-7	1.08	0.67 – 1.46
リツキシマブ 60 mg/kg	15	0.90	0.20 – 1.20
オビヌツズマブ 30 mg/kg	71	0.40	0 – 0.72
オビヌツズマブ 60 mg/kg	48	0.60	0.41 – 0.80
リツキシマブ 30 mg/kg + Dox	78	0.27	0 – 0.55
オビヌツズマブ 30 mg/kg + Dox	89	0.21	0.04 – 0.37
リツキシマブ 30 mg/kg + オビヌツズマブ 30 mg/kg	51	0.59	0.41 – 0.81

TGI (%) = 100 – (各投与群の腫瘍体積変化量 / 対照群の腫瘍体積変化量) × 100

腫瘍体積変化量 = (day 49における腫瘍体積中央値) – (群分け日における腫瘍体積中央値)

TCR = (各投与群の腫瘍体積) / (対照群の腫瘍体積)

[4.2.1.4-7 Table 5及び Table 6を改変]

(3) ベンダムスチンとの併用

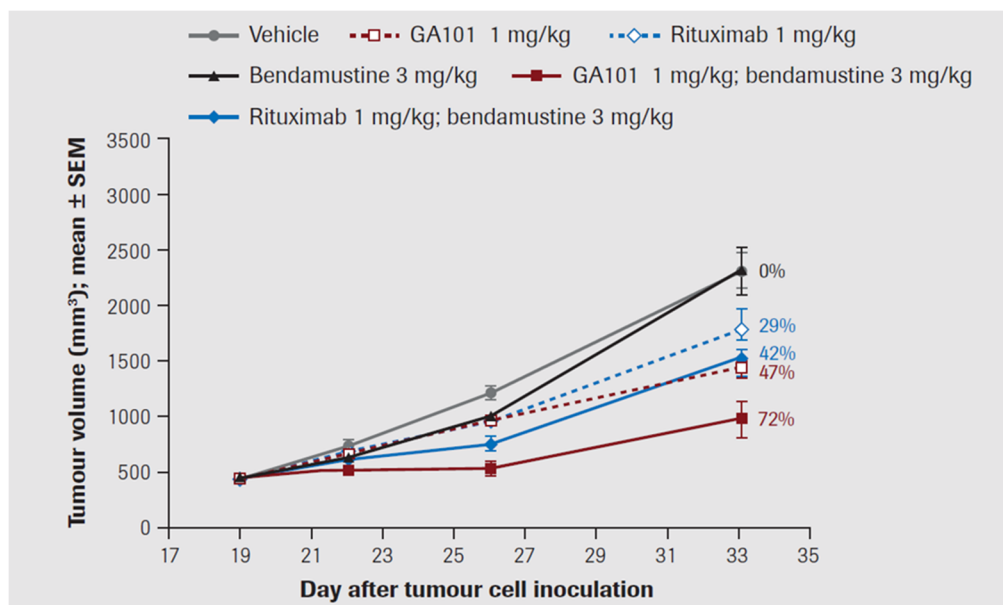
(資料番号4.2.1.4-8)

ヒト MCL 細胞株 Z-138の皮下移植モデルを用いて、オビヌツズマブとベンダムスチンを併用した時の抗腫瘍効果について検討した。

Z-138細胞株を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^6 個移植し (Matrigel 使用), 19日後 (day 19) に無作為割付 (1群10匹) した。群分け日からオビヌツズマブ及びリツキシマブを1週間に1回1 mg/kg で計2回 (day 19, 26) 腹腔内投与, ベンダムスチンは4日間連日 (day 19~22) 3 mg/kg 腹腔内投与した。対照群には溶媒を抗体と同じスケジュールで投与した。

各投与群の腫瘍体積の推移, day 33における腫瘍増殖抑制効果を図 2.6.2.5.2-4及び表 2.6.2.5.2-3に示した。各投与群の TGI は, オビヌツズマブ単独投与群では47%, リツキシマブ単独投与群では29%, ベンダムスチン単独投与群では0%, オビヌツズマブ + ベンダムスチン併用群では72%, リツキシマブ + ベンダムスチン併用群では42%であった。オビヌツズマブ + ベンダムスチン併用群は, オビヌツズマブ単独投与群, ベンダムスチン単独投与群及びリツキシマブ単独投与群に比べ, 統計学的に有意に強い腫瘍増殖抑制効果を示したが (Tukey-Kramer test, $P < 0.05$), リツキシマブ + ベンダムスチン併用群とリツキシマブ及びオビヌツズマブ各単独投与群との間に有意な差は認められなかった。

図 2.6.2.5.2-4 Z-138移植モデルにおけるオビヌツズマブとベンダムスチンとの併用効果



表示は、平均値 ± 標準誤差。

[4.2.1.4-8 Figure 1を改変]

表 2.6.2.5.2-3 Z-138移植モデルにおけるオビヌツズマブとベンダムスチンとの併用効果

検体	TGI (%, day 33)	TCR (day 33)	TCR 信頼区間
溶媒 (対照群)	-	-	-
オビヌツズマブ 1 mg/kg	47	0.72	0.59 – 0.86
リツキシマブ 1 mg/kg	29	0.78	0.65 – 0.93
ベンダムスチン 3 mg/kg (Benda)	0	0.9	0.76 – 1.06
オビヌツズマブ 1 mg/kg + Benda	72	0.46	0.34 – 0.59
リツキシマブ 1 mg/kg + Benda	42	0.67	0.54 – 0.81

TGI (%) = 100 - (各投与群の腫瘍体積変化量 / 対照群の腫瘍体積変化量) × 100

腫瘍体積変化量 = (day 33における腫瘍体積平均値) - (群分け日における腫瘍体積平均値)

TCR = (各投与群の腫瘍体積) / (対照群の腫瘍体積)

[4.2.1.4-8 Table 5を改変]

(4) フルダラビンとの併用

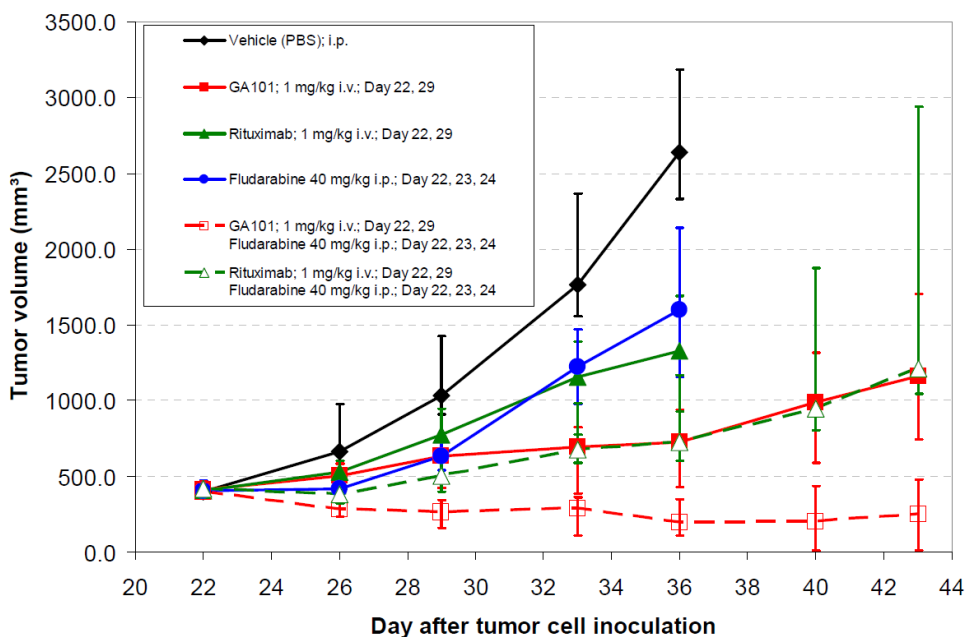
(資料番号4.2.1.4-9)

ヒト MCL 細胞株 Z-138の皮下移植モデルを用いて、オビヌツズマブとフルダラビンを併用した時の抗腫瘍効果について検討した。

Z-138細胞株を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^6 個移植し (Matrigel 使用), 22日後 (day 22) に無作為割付 (1群10匹) した。群分け日からオビヌツズマブ及びリツキシマブを1週間に1回1 mg/kg で計2回 (day 22, 29) 静脈内投与, フルダラビンは3日間連日 (day 22~24) 40 mg/kg 腹腔内投与した。対照群には溶媒を抗体と同じスケジュールで投与した。

各投与群の腫瘍体積の推移, day 36における腫瘍増殖抑制効果を図 2.6.2.5.2-5及び表 2.6.2.5.2-4に示した。各投与群の TGI は, オビヌツズマブ単独投与群では86%, リツキシマブ単独投与群では60%, フルダラビン単独投与群では50%, オビヌツズマブ + フルダラビン併用群では > 100%, リツキシマブ + フルダラビン併用群では85%であった。また, day 43における腫瘍の完全退縮例は, オビヌツズマブ単独投与群で1匹, オビヌツズマブ + フルダラビン併用投与群で3匹であったが, リツキシマブ + フルダラビン併用群には認められなかった。

図 2.6.2.5.2-5 Z-138移植モデルにおけるオビヌツズマブとフルダラビンとの併用効果



表示は、中央値 ± IQR。

[4.2.1.4-9 Figure 1再掲]

表 2.6.2.5.2-4 Z-138移植モデルにおけるオビヌツズマブとフルダラビンとの併用効果

検体	TGI (%, day 36)	TCR (day 36)	TCR 信頼区間
溶媒 (対照群)	-	-	-
オビヌツズマブ 1 mg/kg	86	0.25	0.12 – 0.42
リツキシマブ 1 mg/kg	60	0.45	0.24 – 0.72
フルダラビン 40 mg/kg (FLU)	50	0.59	0.36 – 0.98
オビヌツズマブ 1 mg/kg + FLU	> 100	0.07	0.00 – 0.16
リツキシマブ 1 mg/kg + FLU	85	0.28	0.12 – 0.57

TGI (%) = 100 - (各投与群の腫瘍体積変化量 / 対照群の腫瘍体積変化量) × 100

腫瘍体積変化量 = (day 36における腫瘍体積中央値) - (群分け日における腫瘍体積中央値)

TCR = (各投与群の腫瘍体積) / (対照群の腫瘍体積)

[4.2.1.4-9 Table 6を改変]

(5) クロラムブシルとの併用

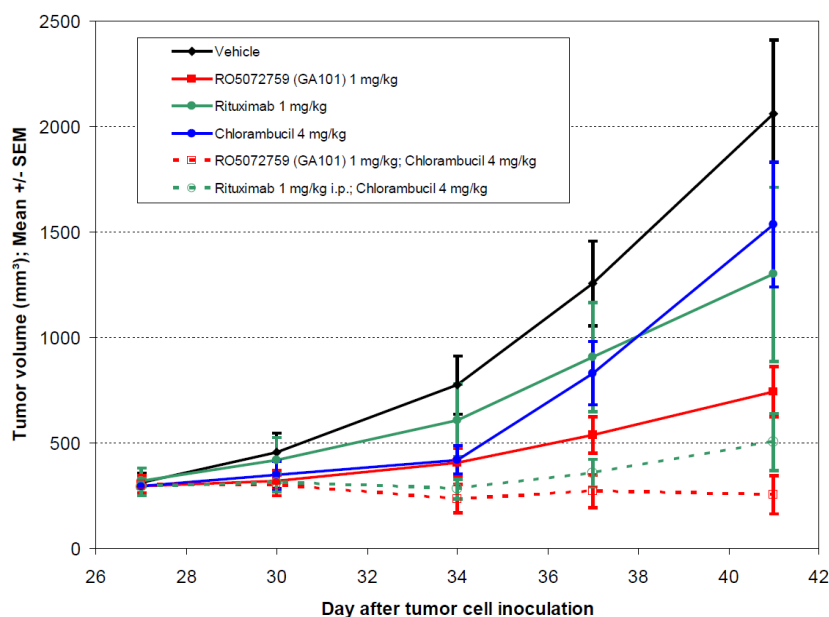
(資料番号4.2.1.4-10)

ヒト MCL 由来細胞株 Z-138の皮下移植モデルを用いて、オビヌツズマブとクロラムブシルを併用した時の抗腫瘍効果について検討した。

Z-138細胞株を雌 SCID ベージュマウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^6 個移植し (Matrigel 使用), 27日後 (day 27) に無作為割付 (1群8匹) した。群分け日からオビヌツズマブ及びリツキシマブを1週間に1回1 mg/kg で計2回 (day 27, 34) 腹腔内投与, クロラムブシルは3日間連日 (day 27~29) 4 mg/kg 腹腔内投与した。対照群には溶媒を抗体と同じスケジュールで投与した。

各投与群の腫瘍体積の推移, day 41における腫瘍増殖抑制効果を図 2.6.2.5.2-6及び表 2.6.2.5.2-5に示した。各投与群の TGI は, オビヌツズマブ単独投与群では74%, リツキシマブ単独投与群では44%, クロラムブシル単独投与群では29%, オビヌツズマブ + クロラムブシル併用群では103%, リツキシマブ + クロラムブシル併用群では88%であった。オビヌツズマブ + クロラムブシル併用群は, リツキシマブ単独投与群及びクロラムブシル単独投与群よりも統計学的に有意に強い抗腫瘍効果を示したが (Tukey-Kramer test, $P < 0.05$), オビヌツズマブ単独投与群及びリツキシマブ + クロラムブシル併用群との間に有意な差は認められなかった。

図 2.6.2.5-2-6 Z-138移植モデルにおけるオビヌツズマブとクロラムブシルとの併用効果



表示は、平均値 ± 標準誤差。

[4.2.1.4-10 Figure 1再掲]

表 2.6.2.5-2-5 Z-138移植モデルにおけるオビヌツズマブとクロラムブシルとの併用効果

検体	TGI (%, day 41)	TCR (day 41)	TCR 信頼区間
溶媒 (対照群)	-	-	-
オビヌツズマブ 1 mg/kg	74	0.39	0.20 – 0.60
リツキシマブ 1 mg/kg	44	0.53	0.34 – 0.76
クロラムブシル 4 mg/kg (CHL)	29	0.77	0.56 – 1.03
オビヌツズマブ 1 mg/kg + CHL	103	0.10	-0.08 – 0.30
リツキシマブ 1 mg/kg + CHL	88	0.23	0.05 – 0.43

TGI (%) = 100 - (各投与群の腫瘍体積変化量 / 対照群の腫瘍体積変化量) × 100

腫瘍体積変化量 = (day 41における腫瘍体積平均値) - (群分け日における腫瘍体積平均値)

TCR = (各投与群の腫瘍体積) / (対照群の腫瘍体積)

[4.2.1.4-10 Table 1を改変]

2.6.2.6 考察及び結論

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。本抗体について実施した *in vitro* 試験の結果から、タイプ I 抗体であるリツキシマブ又はオファツムマブよりも、ヒト NHL 細胞株に対する直接的な細胞死の誘導、エフェクター細胞による ADCC 及び ADCP 活性において、オビヌツズマブが優れていることが示された。一方、CDC 活性については、リツキシマブ及びオファツムマブに比べ低下していた。更に、生体内環境での活性を統合的に検討するため、健康な供血者及び CLL 患者から採取した全血を用いて B 細胞減少作用試験 (*ex vivo*) を実施し、オビヌツズマブは、リツキシマブ及びオファツムマブよりも優れた B 細胞減少作用を有することが明らかになった。

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²⁶⁾⁻²⁷⁾。
- 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。
- 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比率が高く、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、カニクイザル及びヒト CD20遺伝子導入マウス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、損なわれることなく保持された。

オビヌツズマブは、リツキシマブ等の ADCC 活性が増強されていない既存のタイプ I 抗 CD20抗体に比べ、優れた有効性を示した。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。

2.6.2.7 図表

本文中に記載。

2.6.2.8 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) 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.
- 3) 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.
- 4) Ferrara C, Stuart F, Sondermann P, Brünker P, Umaña P. The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J Biol Chem* 2006;281:5032-6.
- 5) Alduaij W, Illidge TM. The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? *Blood* 2011;117:2993-3001.
- 6) 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
- 7) 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.
- 8) Beers SA, French RR, Chan HTC, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 2010;115:5191-201.
- 9) Lim SH, Vaughan AT, Ashton-Key M, Williams EL, Dixon SV, Chan HTC, et al. Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood* 2011;118:2530-40.
- 10) Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M. The epitope recognized by rituximab. *Blood* 2006;108:1975-8.
- 11) Du J, Wang H, Zhong C, Peng B, Zhang M, Li B, et al. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *J Biol Chem* 2007;282:15073-80.
- 12) Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M, et al. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 2011;118:358-67.
- 13) 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.
- 14) Chan HTC, Hughes D, French RR, Tutt AL, Walshe CA, Teeling JL, et al. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res* 2003;63:5480-9.
- 15) 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.
- 16) Rivas-Fuentes S, García-García E, Nieto-Castañeda G, Rosales C. Fcγ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cell Immunol* 2010;263:114-21.
- 17) Nagarajan S, Anderson M, Ahmed SN, Sell KW, Selvaraj P. Purification and optimization of functional reconstitution on the surface of leukemic cell lines of GPI-anchored Fcγ receptor III. *J*

- Immunol Methods 1995;184:241-51.
- 18) Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 2009;113:3716-25.
 - 19) Wang SY, Racila E, Taylor RP, Weiner GJ. NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood* 2008;111:1456-63.
 - 20) Wang SY, Veeramani S, Racila E, Cagley J, Fritzinger DC, Vogel CW, et al. Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an *in vivo* model. *Blood* 2009;114:5322-30.
 - 21) García-García E, Nieto-Castañeda G, Ruiz-Saldaña M, Mora N, Rosales C. FcγRIIA and FcγRIIIB mediate nuclear factor activation through separate signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol* 2009;182:4547-56.
 - 22) Golay J, Da Roit F, Bologna L, Ferrara C, Leusen JH, Rambaldi A, et al. Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood* 2013;122:3482-91.
 - 23) Patz M, Isaeva P, Forcob N, Müller B, Frenzel LP, Wendtner CM, et al. Comparison of the *in vitro* effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2011;152:295-306.
 - 24) Jak M, van Bochove GGW, Reits EA, Kallemeijn WW, Tromp JM, Umana P, et al. CD40 stimulation sensitizes CLL cells to lysosomal cell death induction by type II anti-CD20 mAb GA101. *Blood* 2011;118:5178-88.
 - 25) Herting F, Friess T, Bader S, Muth G, Hölzlwimmer G, Rieder N, et al. Enhanced anti-tumor activity of the glycoengineered type II CD20 antibody obinutuzumab (GA101) in combination with chemotherapy in xenograft models of human lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2014;55:2151-60.
 - 26) 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.
 - 27) 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.

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)

2.6.3 薬理試験概要表

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis	抗体依存性貪食
AUC	area under the concentration-time curve	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)
BrdU	bromodeoxyuridine	ブロモデオキシウリジン
CD	cluster of differentiation	白血球分化抗原
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CLL	chronic lymphocytic leukemia	慢性リンパ性白血病
C _{max}	maxium observed serum concentraion	最高血清中濃度
CMFDA	5-chloromethylfluorescein diacetate	5-クロロメチルフルオレセイン
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
EC ₅₀	half-maximal effective concentration	50%有効濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
Fab	antigen-binding fragment	抗原結合性フラグメント
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
FL	follicular lymphoma	濾胞性リンパ腫
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
HRP	horseradish peroxidase	西洋わさびペルオキシダーゼ
IFNγ	interferon gamma	インターフェロンガンマ
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL	interleukin	インターロイキン
i.p.	intraperitoneal administration	腹腔内投与
i.v.	intravenous administration	静脈内投与
K _D	dissociation constant	解離定数
LDH	lactose dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
MCL	mantle cell lymphoma	マントル細胞リンパ腫
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
NP	4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl	4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチル
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核細胞
PI	propidium iodide	ヨウ化プロピジウム
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	ホスホイノシチド3-キナーゼ
PMN	polymorphonuclear leukocyte	多形核白血球
PS	phosphatidylserine	ホスファチジルセリン
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合免疫不全症
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
tg	transgenic	遺伝子導入
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖阻害

目次

	頁
2.6.3 薬理試験概要表.....	4
2.6.3.1 薬理試験一覧表.....	4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....	7
2.6.3.2.1 オビヌツズマブの作製とタイプ II 抗 CD20 抗体としての基本特性.....	7
2.6.3.2.1.1 オビヌツズマブの作製.....	7
2.6.3.2.1.2 タイプ II 抗 CD20 抗体としての特性.....	7
2.6.3.2.1.3 CD20 結合活性及びエピトープ.....	9
2.6.3.2.2 <i>In vitro</i> 生物活性.....	11
2.6.3.2.2.1 CDC 活性.....	11
2.6.3.2.2.2 直接的な細胞死の誘導活性.....	11
2.6.3.2.2.3 糖鎖改変と ADCC 活性.....	13
2.6.3.2.3 全血中 B 細胞減少作用 (<i>ex vivo</i>).....	18
2.6.3.2.4 <i>In vivo</i> における B 細胞減少作用.....	20
2.6.3.2.4.1 ヒト CD20 遺伝子導入マウスにおける B 細胞減少作用.....	20
2.6.3.2.4.2 カニクイザルにおける B 細胞減少作用.....	23
2.6.3.2.5 <i>In vivo</i> 抗腫瘍活性.....	25
2.6.3.2.5.1 びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果.....	25
2.6.3.2.5.2 マントル細胞リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果.....	28
2.6.3.2.5.3 濾胞性リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果.....	31
2.6.3.2.5.4 バーキットリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果.....	32
2.6.3.3 副次的薬理試験.....	33
2.6.3.4 安全性薬理試験.....	33
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	34
2.6.3.5.1 共存する化学療法薬の影響 (<i>in vitro</i>).....	34
2.6.3.5.2 <i>In vivo</i> における化学療法薬との併用効果.....	35

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

(1) 試験の種類：効力を裏付ける試験

1) オビヌツズマブの基本特性と *in vitro* 生物活性

被験物質：オビヌツズマブ（遺伝子組換え）

試験の種類	細胞, 試験方法	実施施設	試験番号	資料番号
ヒト化抗体の作製, 細胞死誘導活性	ヒト B リンパ腫細胞株	GlycArt biotechnology AG	1025331	4.2.1.1-1
ヒト FcγRIIIa 結合活性	SPR	GlycArt biotechnology AG	1025340	4.2.1.1-2
ヒト FcγRIIIb 結合活性	SPR	Roche Glycart AG	1053422	4.2.1.1-3
CD20発現細胞に対する抗体結存量	フローサイトメトリー	Roche Diagnostics GmbH	1025133	4.2.1.1-4
CD20分子の脂質ラフトへの局在性	ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Diagnostics GmbH	1025127	4.2.1.1-5
CDC 活性	ヒト B リンパ腫細胞株	GlycArt biotechnology AG	1025235	4.2.1.1-6
B 細胞凝集誘導能	ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Diagnostics GmbH	1025128	4.2.1.1-7
B 細胞凝集誘導能, 細胞死誘導活性	ヒト B リンパ腫細胞株	GlycArt biotechnology AG	1025240	4.2.1.1-8
細胞死誘導活性	ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Diagnostics GmbH	1025131	4.2.1.1-9
Clq 結合能, CDC 活性, ADCC 活性, CD20インターナリゼーション, 全血中 B 細胞減少作用	ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Glycart AG	1043692	4.2.1.1-10
CD20結合親和性	フローサイトメトリー	GlycArt biotechnology AG	1025238	4.2.1.1-11
CD20結合親和性	スキヤッチャード解析	Roche Diagnostics GmbH	1025348	4.2.1.1-12
CD20との結合における競合	ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Diagnostics GmbH	1025130	4.2.1.1-13
環状 CD20ペプチドに対する結合性	SPR, 等温滴定カロリメトリー	Roche Diagnostics GmbH	1036297	4.2.1.1-14
エピトープ解析	結晶構造解析	Roche Diagnostics GmbH	1038385	4.2.1.1-15
エピトープ解析	Pepscan, 点特異的突然変異	Roche Diagnostics GmbH	1038386	4.2.1.1-16
細胞増殖抑制	ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Diagnostics GmbH	1025135	4.2.1.1-17
細胞死誘導活性	ヒト B リンパ腫細胞株 イメージング	Roche Diagnostics GmbH	1038406	4.2.1.1-18
細胞死誘導活性	NHL 及び CLL 白血病患者由来 PBMC	GlycArt biotechnology AG	1025237	4.2.1.1-19
ヒト FcγRIIb 結合活性	SPR	Roche Diagnostics GmbH	1034799	4.2.1.1-20
ヒト FcRn 結合活性	カラムクロマトグラフィー	Roche Diagnostics GmbH	1053425	4.2.1.1-21
ADCC 活性	ヒト B リンパ腫細胞株	GlycArt biotechnology AG	1025241	4.2.1.1-22
ADCC 誘導後の NK 細胞性状解析	ヒト PBMC	Roche Glycart AG	1043639	4.2.1.1-23
ADCC 活性	ヒト PBMC, ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Diagnostics GmbH	1029364	4.2.1.1-24
NK 細胞活性化, ADCC 活性 補体の影響	ヒト PBMC, ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Glycart AG	1053171	4.2.1.1-25
ヒト PBMC 由来マクロファージによる ADCP 活性及び ADCC 活性	ヒト PBMC, ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Glycart AG	1053079	4.2.1.1-26
マウス腹腔由来単球による ADCC 活性	マウス腹腔細胞, ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Diagnostics GmbH	1026567	4.2.1.1-27
ヒト好中球の活性化, ADCP 活性	ヒト PBMC	██████████	1053421	4.2.1.1-28

ADCC：抗体依存性細胞傷害, ADCP：抗体依存性貪食, CDC：補体依存性細胞傷害, SPR：表面プラズモン共鳴

2) B 細胞減少作用 (*ex vivo*)

被験物質：オビヌツズマブ（遺伝子組換え）

試験の種類	細胞, 試験方法	実施施設	試験番号	資料番号
B 細胞減少作用	ヒト末梢血	GlycArt biotechnology AG	1025239	4.2.1.1-29
B 細胞減少作用	B-CLL 患者及び健康な供血者の末梢血	Roche Glycart AG	1049394	4.2.1.1-30
B 細胞減少作用	ヒト末梢血	Roche Glycart AG	1043640	4.2.1.1-31
B 細胞減少作用	ヒト PBMC	Roche Glycart AG	1058987	4.2.1.1-32

3) B 細胞減少作用 (*in vivo*)

被験物質：オビヌツズマブ（遺伝子組換え）

試験の種類	動物種	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
動物種の妥当性 (<i>in vitro</i>)	カニクイザル他	-	Roche Glycart AG	1025126	4.2.1.1-33
B 細胞減少作用	hCD20tg マウス	<i>i.p.</i>	Roche Palo Alto	1030200	4.2.1.1-34
B 細胞減少作用, 免疫応答	hCD20tg マウス カニクイザル	<i>i.p., i.v.</i>	Roche Palo Alto	1053638	4.2.1.1-35
B 細胞減少作用	カニクイザル	<i>i.v.</i>	Roche Palo Alto	1030198	4.2.1.1-36
オビヌツズマブの曝露量評価	カニクイザル	<i>i.v.</i>	Roche Basel	1035988	4.2.1.1-37
B 細胞減少作用	カニクイザル	<i>i.v.</i>	Roche Palo Alto	1030199	4.2.1.1-38
オビヌツズマブの曝露量評価	カニクイザル	<i>i.v.</i>	Roche Basel	1035992	4.2.1.1-39

4) *In vivo* 抗腫瘍活性

被験物質：オビヌツズマブ（遺伝子組換え）

移植細胞	移植部位	動物種	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
DLBCL 細胞株 SU-DHL-4	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1024727	4.2.1.1-40
DLBCL 細胞株 SU-DHL-4	皮下	マウス	<i>i.p.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1043605	4.2.1.1-41
DLBCL 細胞株 SU-DHL-4	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	GlycArt biotechnology AG	1029353	4.2.1.1-42
DLBCL 細胞株 SU-DHL-4	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Glycart AG	1058101	4.2.1.1-43
DLBCL 細胞株 SU-DHL-4	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1029348	4.2.1.1-44
MCL 細胞株 Z-138	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1025306	4.2.1.1-45
MCL 細胞株 Z-138	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1025309	4.2.1.1-46
MCL 細胞株 Z-138	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1028082	4.2.1.1-47
MCL 細胞株 Z-138	静脈内	マウス	<i>i.p.</i>	GlycArt biotechnology AG	1025328	4.2.1.1-48
MCL 細胞株 Z-138	静脈内	マウス	<i>i.v.</i>	GlycArt biotechnology AG	1025329	4.2.1.1-49
MCL 細胞株 Z-138	静脈内	hCD16tg マウス	<i>i.v.</i>	Roche Glycart AG	1053047	4.2.1.1-50
FL 細胞株 RL	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	██████████	1025318	4.2.1.1-51
FL 細胞株 RL	皮下	マウス	<i>i.p.</i>	██████████	1049396	4.2.1.1-52
パーキットリンパ腫細胞株 Raji	静脈内	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1025314	4.2.1.1-53
パーキットリンパ腫細胞株 Raji	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1025312	4.2.1.1-54

- (2) 試験の種類：副次的薬理試験
該当なし。

(3) 試験の種類：安全性薬理試験

被験物質：オビヌツズマブ（遺伝子組換え）

試験の種類	試験方法	実施施設	試験番号	資料番号
13週間静脈内投与試験	カニクイザル 0, 10, 30, 100 mg/kg/week	██████████ (██████████, Germany)	1024830	4.2.3.2-2
26週間静脈内投与試験	カニクイザル 0, 5, 25, 50 mg/kg/week	██████████ (██████████ USA)	1036190	4.2.3.2-3

(4) 試験の種類：薬力学的薬物相互作用試験

1) 共存する化学療法薬の影響 (*in vitro*)

被験物質：オビヌツズマブ（遺伝子組換え）

試験の種類	細胞, 試験方法	実施施設	試験番号	資料番号
ADCC 活性	プレドニゾン処理ヒト PBMC, Raji 細胞	GlycArt biotechnology AG	1027588	4.2.1.4-1
ADCC 活性	クロラムブシル処理ヒト PBMC, Raji 細胞	Roche Glycart AG	1050168	4.2.1.4-2
B 細胞減少作用	PI3K 阻害薬処理ヒト PBMC	Roche Glycart AG	1043638	4.2.1.4-3
細胞死誘導活性	ヒト B リンパ腫細胞株	Roche Diagnostics GmbH	1040649	4.2.1.4-4

2) 化学療法薬との併用効果 (*in vivo*)

被験物質：オビヌツズマブ（遺伝子組換え）

移植細胞	移植部位	動物種	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
DLBCL 細胞株 WSU-DLCL2	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1029351	4.2.1.4-5
FL 細胞株 RL	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	██████████	1029347	4.2.1.4-6
FL 細胞株 RL	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1034644	4.2.1.4-7
MCL 細胞株 Z-138	皮下	マウス	<i>i.p.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1033914	4.2.1.4-8
MCL 細胞株 Z-138	皮下	マウス	<i>i.v.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1036132	4.2.1.4-9
MCL 細胞株 Z-138	皮下	マウス	<i>i.p.</i>	Roche Diagnostics GmbH	1043607	4.2.1.4-10

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 オビヌツズマブの作製とタイプII抗CD20抗体としての基本特性

2.6.3.2.1.1 オビヌツズマブの作製

(1) ヒト化抗体の作製及び直接的な細胞死誘導活性の増強

資料番号	4.2.1.1-1
タイトル	Humanization of RO5072759 (GA101) and Elbow-Hinge Mutation
試験方法	抗ヒト CD20マウス抗体 (B-Ly1) の可変領域 cDNA を B-Ly1ハイブリドーマからクローニングし、H鎖及びL鎖それぞれの相補性決定領域をヒトH鎖及びL鎖可変領域フレームワークへ組み込んだ。ヒトCD20に対して高い親和性を有する抗体を複数選抜し、得られた抗体のアミノ酸配列を決定するとともに、細胞死誘導活性をAnnexin V染色を用いて評価した。
結果	ヒト化の過程において、Fab領域のフレキシビリティーに関与するエルボーヒンジ部のロイシン (Kabat 番号11番) をバリンに変換することで、CD20発現細胞 (Z-138細胞株) に対して強い細胞死誘導活性の増強が認められたことから、本変異を有する抗体遺伝子を取得した。

(2) GlycoMab 技術による糖鎖改変

・4.2.1.1-2及び4.2.1.1-3については、[2.6.3.2.2.3\(1\)](#)を参照。

2.6.3.2.1.2 タイプII抗CD20抗体としての特性

(1) 細胞あたりの結合数

資料番号	4.2.1.1-4
タイトル	Half Binding Capacity of Non-Hodgkin's Lymphoma Cells for RO5072759 (GA101) Compared to Rituximab
試験方法	蛍光標識したオビヌツズマブ及びリツキシマブのヒト NHL 細胞株 (SU-DHL-4, Ramos T1, Ramos, OCI-Ly3, OCI-Ly10, Raji, OCI-Ly18及び Z-138) に対する結合量をフローサイトメーターを用いて測定した。
結果	各ヒト NHL 細胞株において、オビヌツズマブの結合数はリツキシマブの約1/2であった。

(2) 脂質ラフトへの局在性

資料番号	4.2.1.1-5
タイトル	Redistribution of CD20 to Lipid Rafts upon Binding of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	ヒト NHL 細胞株 (Ramos, Raji, SU-DHL-4, OCI-Ly18及び Z-138) をオビヌツズマブ、リツキシマブ又はコントロール抗体 (各10 µg/mL) 存在下で30分間培養した。細胞を回収後、界面活性剤 Triton X-100を含む細胞溶解液を用いて、1%Triton X-100可溶性画分と不溶性画分を調製し、ウェスタンブロットにより、CD20-抗体複合体の脂質ラフトへの局在性を検討した。また、標識したオビヌツズマブを用いて細胞を染色し、共焦点顕微鏡で細胞膜上の局在を観察した。
結果	リツキシマブと CD20分子の複合体は、脂質ラフトに局在したが、オビヌツズマブと CD20分子の複合体は、脂質ラフトへの局在性を示さなかった。

(3) CDC 活性

・4.2.1.1-6については、[2.6.3.2.2.1](#)を参照。

(4) B細胞の凝集誘導能

資料番号	4.2.1.1-7
タイトル	Homotypic Aggregation Mediated by RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	オビヌツズマブ又はリツキシマブ存在下で SU-DHL-4, Z-138及び Ramos 細胞を培養し、細胞凝集の誘導能を光学顕微鏡により経時的に観察した。
結果	オビヌツズマブでは、培養開始後数分以内に細胞が凝集し、リツキシマブよりも急速であり、より大きな細胞塊を形成した。このような細胞凝集の誘導は、アクチン重合阻害薬サイトカラシン D の添加により阻害された。

(5) 直接的な細胞死の誘導能

- ・4.2.1.1-8及び4.2.1.1-9については、[2.6.3.2.2.2\(1\)](#)を参照。

(6) 生物活性-リツキシマブ、オファツムマブとの比較

資料番号	4.2.1.1-10
タイトル	Superior <i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i> Activity of the Novel Type II, Glycoengineered Anti-CD20 Antibody Obinutuzumab (GA101) Compared with Rituximab and Ofatumumab
試験方法	<p>C1q 結合活性：オビヌツズマブ、リツキシマブ及びオファツムマブをプレートに固相化した後、補体 C1q を結合させ、抗ヒト C1q 抗体、HRP 標識2次抗体及び HRP 基質を用いた ELISA により測定した。</p> <p>CDC 活性：オビヌツズマブ、リツキシマブ及びオファツムマブと標的細胞 (Z-138及び SU-DHL-4) を補体共存下2時間培養後、LDH アッセイにより測定した。</p> <p>ADCC 活性：オビヌツズマブ、リツキシマブ及びオファツムマブを標的細胞 (Z-138及び SU-DHL-4) 及びエフェクター細胞 (ヒト PBMC) と4時間培養後、上清中の LDH を測定した。</p> <p>細胞死誘導活性：オビヌツズマブ、リツキシマブ及びオファツムマブ (各 10 µg/mL) を標的細胞 (Raji, SU-DHL-4, Wils2及び Z-138) と24時間培養後、Annexin V と PI で染色し、フローサイトメーターを用いて陽性率を測定した。</p> <p>CD20分子の細胞内インターナリゼーション：Alexa488標識したオビヌツズマブ、リツキシマブ及びオファツムマブを SU-DHL-4細胞と培養後、膜表面上に残る CD20 と結合している標識抗体に抗 Alexa488抗体を結合させ、フローサイトメーターにより測定することで、CD20分子のインターナリゼーションを評価した。</p> <p>全血中 B 細胞減少作用：健康人の全血をオビヌツズマブ、リツキシマブ、又はオファツムマブ存在下で24時間培養後、細胞の CD45, CD3及び CD19を抗体を用いて染色し、フローサイトメーターにより B 細胞の割合を測定した。</p>
結果	<p>C1q 結合活性と CDC 活性：オビヌツズマブへの C1q 結合量は、リツキシマブ及びオファツムマブよりも少なかった。また、オビヌツズマブの CDC 活性は、低濃度条件下でリツキシマブ及びオファツムマブよりも弱かった。</p> <p>ADCC 活性及び細胞死誘導活性：オビヌツズマブは、リツキシマブ及びオファツムマブよりも強い ADCC 活性を示した。また、いずれの細胞株に対しても、リツキシマブ及びオファツムマブより強い細胞死誘導活性を示した。</p> <p>CD20分子の細胞内インターナリゼーション：オビヌツズマブでは、オファツムマブ及びリツキシマブよりも細胞内に移行する比率が低かった。</p> <p>全血中 B 細胞減少作用：遺伝子型の異なる3種の FcγRIIIa, 高親和型 (158V/158V), 中親和型 (158F/158V) 及び低親和型 (158F/158F) のいずれにおいても、オビヌツズマブが最も優れた B 細胞減少作用を示した。</p>

2.6.3.2.1.3 CD20結合活性及びエピトープ

(1) ヒト CD20分子との結合親和性

1) ヒトリンパ腫細胞株との結合性

資料番号	4.2.1.1-11
タイトル	CD20 Binding and Competition for Binding on Human NHL Cell Lines of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	ヒト NHL 細胞株 Raji, Z-138, Ramos, SU-DHL-4及び Namalwa 細胞に対する FITC 標識オビヌツズマブ結合量をフローサイトメーターを用いて測定した。また、あらかじめ Raji 細胞にリツキシマブを結合させた後、FITC 標識オビヌツズマブ処理することで、両抗体の競合性をフローサイトメーターを用いて測定した。
結果	オビヌツズマブは、Namalwa 細胞以外の4細胞株に対して結合性を示した。各細胞株における CD20発現量は、SU-DHL-4は非常に高発現、Namalwa 細胞は非常に低発現、他の3細胞株は中程度であった。また、オビヌツズマブは、Raji 細胞との結合においてリツキシマブと競合した。

2) スキャッチャード解析

資料番号	4.2.1.1-12
タイトル	Evaluation of the Affinity of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	Cy5標識したオビヌツズマブ及びリツキシマブを用いて、ヒト NHL 細胞株 (DLBCL 5株, MCL 1株, バーキットリンパ腫3株) に対する結合性を検討した。また、SU-DHL-4細胞と Europium 標識オビヌツズマブ又はリツキシマブを用いて、スキャッチャード解析により解離定数 K_D を求めた。
結果	オビヌツズマブは、いずれの NHL 細胞株に対してもリツキシマブと同様の結合性を示した。また、SU-DHL-4細胞に対する K_D は、オビヌツズマブ4.0 nmol/L, リツキシマブ4.5 nmol/L であった。

(2) ヒト CD20分子との結合におけるリツキシマブとの競合

資料番号	4.2.1.1-13
タイトル	RO5072759 (GA101) and Rituximab Compete for Binding to CD20
試験方法	Cy5標識したオビヌツズマブ及びリツキシマブと非標識抗体を用いて、SU-DHL-4細胞上の CD20との結合に関する競合性を、フローサイトメーターを用いて検討した。
結果	Cy5標識オビヌツズマブと CD20の結合は、非標識リツキシマブと競合した。また、Cy5標識リツキシマブと CD20の結合は、非標識オビヌツズマブと競合した。

(3) ヒト CD20分子のインターナリゼーション

- ・ 4.2.1.1-10については、[2.6.3.2.1.2\(6\)](#)を参照。

(4) ヒト CD20分子との結合におけるエピトープ

1) SPR 法及び等温滴定カロリメトリー

資料番号	4.2.1.1-14
タイトル	Evaluation of the Binding Properties of RO5072759 (GA101) towards the Isolated Extracellular Loop of CD20 in Comparison to Rituximab
試験方法	オビヌツズマブとエピトープ領域を含む細胞外ループに相当する環状 CD20ペプチド (163-187番アミノ酸残基) との相互作用について、SPR 法及び等温滴定カロリメトリーにより検討した。
結果	オビヌツズマブと環状 CD20ペプチドが結合することを、SPR 法及び等温滴定カロリメトリーにより確認した。

2) 結晶構造解析

資料番号	4.2.1.1-15
タイトル	Preclinical Study Report on the Crystal Structure of RO5072759 (GA101)
試験方法	オビヌツズマブ Fab 断片とオビヌツズマブのエピトープ領域環状 CD20ペプチド (163-187番アミノ酸残基) の複合体について、結晶構造を解析し、タイプ I 抗体であるリツキシマブ及び2H7と比較した。
結果	オビヌツズマブとの結合において、CD20分子の172番プロリンと173番セリンが重要であり、更に174番グルタミン酸から176番アスパラギンまで含めてオビヌツズマブと水素結合を形成していた。171番アスパラギンは、リツキシマブとの結合に不可欠であるが、オビヌツズマブとの結合に対する寄与は小さかった。オビヌツズマブのCD20エピトープへの結合様式は、タイプ I 抗体と異なっており、リツキシマブ及び2H7と比較して、Fab 中心軸が90度回転し、70度傾いて CD20ペプチドに結合していた。

3) エピトープマッピング

資料番号	4.2.1.1-16
タイトル	Preclinical Study Report on Epitope Characterization of RO5072759 (GA101) and Other CD20 Antibodies
試験方法	ペプチドライブラリー固相化プレートを使用した Pepscan システム及び site-directed mutagenesis によりオビヌツズマブのエピトープ領域を他のアミノ酸に置換することで、結合に対する各アミノ酸残基の寄与について検討した。
結果	オビヌツズマブは、リツキシマブが CD20を認識する際の中心をなす ANP 領域 (170-172番アミノ酸残基) よりも C 末端側の172-178番アミノ酸残基が主たるエピトープと考えられた。また、ANP 配列中でリツキシマブとの結合に不可欠なアミノ酸残基である171番アスパラギン残基は、オビヌツズマブとの結合では必須ではなかった。

2.6.3.2.2 *In vitro* 生物活性

2.6.3.2.2.1 CDC 活性

資料番号	4.2.1.1-6
タイトル	Evaluation of the CDC (Complement Dependent Cytotoxicity) Properties of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	ヒト NHL 細胞株 (Raji, Namalwa, Ramos, SU-DHL-4, Z-138) をウサギ補体共存下でオビヌツズマブ又はリツキシマブと2時間培養し, LDH アッセイ又はアラマーブルーアッセイにより CDC 活性を測定した。
結果	細胞株によって感受性が異なるものの, オビヌツズマブの CDC 活性は, 低濃度域においてリツキシマブよりも著しく弱く, 通常の培養条件での EC ₅₀ に基づく比較では, リツキシマブの1/100~1/10,000であった。一方, 高濃度域における CDC 活性の強さは, 同程度であった。また, 生理的濃度 (10 mg/mL) の非特異的 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 (EC ₅₀ = 5.1 µg/mL, 標的細胞 Z-138), オビヌツズマブの効力は減退した (EC ₅₀ = 200 µg/mL, 同)。

・ 4.2.1.1-10については, [2.6.3.2.1.2\(6\)](#)を参照。

2.6.3.2.2.2 直接的な細胞死の誘導活性

(1) 非ホジキンリンパ腫細胞株を用いた解析

1) 細胞増殖に対する影響

資料番号	4.2.1.1-17
タイトル	Evaluation of the Inhibition of Cell Proliferation by RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	SU-DHL-4細胞をオビヌツズマブ又はリツキシマブ (各10 µg/mL) 存在下で培養し, 細胞の増殖を crystal violet 染色又は CellTiterGlo (細胞内 ATP 濃度) により測定した。また, BrdU/Hoechst を用いて, 細胞周期の進行について検討した。
結果	オビヌツズマブはリツキシマブよりも強い増殖抑制活性を示した。両抗体の処理により, 細胞周期の進行が鈍化し, 断片化した細胞の残骸の増加が認められた。

2) 細胞死の誘導

資料番号	4.2.1.1-9
タイトル	Phosphatidylserine Exposure and Cell Death Induction of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	ヒト NHL 細胞株 (DLBCL 6株, MCL 1株, バーキットリンパ腫4株) をオビヌツズマブ又はリツキシマブ (各10 µg/mL) 存在下で72時間培養後, PS 露出及びアポトーシス誘導を Annexin V 及び PI 染色によりフローサイトメーターにて測定した。Annexin V 陽性/PI 陰性はアポトーシス初期の細胞, Annexin V 陽性/PI 陽性はアポトーシス後期の細胞と判定した。
結果	検討したほぼすべての細胞株において, オビヌツズマブはリツキシマブよりも強く初期及び後期アポトーシスを誘導した。

3) Fab 及び F(ab)₂による細胞死の誘導活性の違い

資料番号	4.2.1.1-8
タイトル	Induction of Phosphatidylserine Exposure and Homotypic Aggregation of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 Raji をオビヌツズマブ又はリツキシマブ (各10 µg/mL) と一晩培養し、細胞凝集の誘導を光学顕微鏡により観察した。ヒト B リンパ腫細胞株 Z-138をオビヌツズマブ及びその Fab 断片, F(ab) ₂ 断片, 又はリツキシマブ (各10 µg/mL) 存在下で20-24時間培養後, Annexin V 及び PI にて染色し, フローサイトメーターを用いて, 全細胞中の Annexin V 陽性細胞の割合を測定した。オビヌツズマブによる細胞死のカスパーゼ依存性について, SU-DHL-4細胞をオビヌツズマブとカスパーゼ阻害薬 zVAD-fmk 共存下で培養することにより検討した。また, ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 (Z-138, Ramos, SU-DHL-4, Raji) をオビヌツズマブ存在下で24時間培養することにより, 各細胞株に対する細胞死の誘導活性を比較した。
結果	オビヌツズマブ添加後, 数分で細胞凝集が観察されたが, リツキシマブでは数時間後であっても細胞凝集誘導が認められなかった。オビヌツズマブはリツキシマブよりも強く細胞死を誘導した。オビヌツズマブ及びオビヌツズマブ F(ab) ₂ は細胞死を誘導したが, オビヌツズマブ Fab は細胞死を誘導しなかった。カスパーゼ阻害薬により, カンプトテシンによる細胞死誘導は阻止されたが, オビヌツズマブによる細胞死は, ほとんど影響を受けなかった。オビヌツズマブは, いずれの細胞株に対しても細胞死を誘導したが, 活性の強さは, CD20発現量に依存的ではなかった。

4) タイムラプスイメージング

資料番号	4.2.1.1-18
タイトル	Differential Induction of HA and Cell Death by Anti-CD20 Antibodies Analyzed by Confocal Laser Scanning Microscopy
試験方法	Z-138細胞をオビヌツズマブ, リツキシマブ又はオフアツムマブ (20 µg/mL) 存在下で培養し, 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングにより, 3分ごとに6時間観察した。死細胞は Annexin V / PI 染色により検出した。
結果	オビヌツズマブでは, 抗体処理開始1.5時間以内に PS の表出を示す Annexin V 陽性細胞が検出されたが, リツキシマブ, オフアツムマブ処理ではほとんど変化が認められなかった。オビヌツズマブ処理開始5時間後では, ほとんどの細胞は PI 陽性となったが, リツキシマブ, オフアツムマブ及びコントロール抗体処理細胞では, わずかに PI 陽性細胞が検出されるにすぎなかった。

・4.2.1.1-10については, [2.6.3.2.1.2\(6\)](#)を参照。

(2) 非ホジキンリンパ腫及び CLL 患者検体に対する細胞死の誘導

資料番号	4.2.1.1-19
タイトル	Phosphatidylserine Exposure and Cell Death Induction of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab in Leukemic Patient Samples
試験方法	NHL 及び CLL 白血病患者由来 PBMC をオビヌツズマブ又はリツキシマブ存在下で24~192時間培養後, Annexin V 及び PI 染色により PS 露出細胞の割合をフローサイトメーターにより測定した。
結果	72時間以上のオビヌツズマブ (1 µg/mL) 処理により顕著に PS 露出が誘導された。リツキシマブは, 10 µg/mL であっても PS 露出を誘導しなかった。

2.6.3.2.2.3 糖鎖改変と ADCC 活性

(1) GlycoMab 技術による糖鎖改変と FcγRIII 結合活性

1) FcγRIIIa 結合活性

資料番号	4.2.1.1-2
タイトル	FcγRIIIa Receptor Binding Affinity of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	SPR 法を用いて、可溶性ヒト FcγRIIIa 固相化センサーチップとオビヌツズマブ及びリツキシマブとの相互作用を解析した。本試験では、高親和性 FcγRIIIa [V158]及び低親和性 FcγRIIIa [F158]を使用した。
結果	FcγRIIIa [V158]に対するオビヌツズマブ又はリツキシマブの K_D 値は、それぞれ、0.055 $\mu\text{mol/L}$ 及び0.66 $\mu\text{mol/L}$ 、また、FcγRIIIa [F158] に対する K_D 値は、それぞれ、0.27 $\mu\text{mol/L}$ 及び2.0 $\mu\text{mol/L}$ であった。

2) FcγRIIIb 結合活性

資料番号	4.2.1.1-3
タイトル	Enhanced Binding Affinity of GA101 (Obinutuzumab) for FcγRIIIb
試験方法	オビヌツズマブ、オビヌツズマブ糖鎖未改変体、リツキシマブ又はリツキシマブ糖鎖改変体と可溶性ヒト FcγRIIIb-NA2の相互作用を SPR 法により測定した。
結果	オビヌツズマブはオビヌツズマブ糖鎖未改変体と比較して、FcγRIIIb-NA2に対して約7倍強い親和性を示した (K_D 値は、それぞれ0.93及び6.5 $\mu\text{mol/L}$)。また、リツキシマブの糖鎖改変体もリツキシマブ糖鎖未改変体と比較して、約7倍強い親和性を示した (K_D 値は、それぞれ1.1及び7.4 $\mu\text{mol/L}$)。

3) FcγRIIb 結合活性

資料番号	4.2.1.1-20
タイトル	Evaluation of the Binding Properties of RO5072759 (GA101) towards FcγRIIb in Comparison to Rituximab
試験方法	オビヌツズマブ又はリツキシマブとヒト FcγRIIb の相互作用を SPR 法により測定した。
結果	FcγRIIb に対する K_D 値は、6.93 $\mu\text{mol/L}$ (オビヌツズマブ) 及び5.65 $\mu\text{mol/L}$ (リツキシマブ) であり、ほぼ同程度の親和性を示した。

4) FcRn 結合活性

資料番号	4.2.1.1-21
タイトル	Glycoengineering of GA101 (Obinutuzumab) does not affect FcRn Binding
試験方法	ヒト FcRn アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて、オビヌツズマブ及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体の溶出時間を測定した。抗体を pH 5.5において FcRn に結合させた後、pH 8.8までの pH グラジエントにより溶出させた。
結果	オビヌツズマブ及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体の保持時間は同程度であり、FcRn との結合性に糖鎖改変による影響は認められなかった。

(2) NK 細胞による ADCC 活性

1) ADCC 活性

資料番号	4.2.1.1-22
タイトル	ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) Activity of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	ヒト NHL 細胞株 (SU-DHL-4, Raji, Z138, Ramos, Namalwa) に対するオビヌツズマブの ADCC 活性を, エフェクター細胞に NK-92細胞又はヒト PBMC を用いて検討した。2時間 (NK-92) 又は4時間 (PBMC) 培養後の上清中 LDH 量又はカルセイン標識した標的細胞に残存しているカルセイン量を測定し, ADCC 活性を算出した。
結果	オビヌツズマブは各細胞株に対してリツキシマブより (抗体濃度として) 5~50倍程度強い ADCC 活性を示した。生理的濃度 (20 mg/mL) の非特異的ヒト免疫グロブリン存在下においても, オビヌツズマブは ADCC 活性を示したが, リツキシマブの ADCC 活性は認められなかった。

2) NK 細胞の活性化

資料番号	4.2.1.1-23
タイトル	CD16 Down-Regulation after GA101 (RO5072759)-Mediated ADCC
試験方法	エフェクター細胞に PBMC 由来 NK 細胞, 標的細胞に Raji 細胞を用いて, オビヌツズマブによる ADCC を誘導後, NK 細胞の性状を解析するため, CD107a 及び CD16 を染色し, フローサイトメーターにて測定した。
結果	オビヌツズマブによる ADCC により, NK 細胞上の CD107a 発現誘導及び CD16発現のダウンレギュレーションが認められた。

3) スフェロイドでの ADCC 活性

資料番号	4.2.1.1-24
タイトル	Evaluation of Cell Killing Activity of Purified Human NK Cells on Lymphoma Cells in the Presence of CD20 Antibodies (RO5072759; GA101) and Derivatives
試験方法	ヒト NHL 細胞株 (Raji, SU-DHL-4及び Z-138) を標的細胞 (CMFDA 蛍光標識) とし, ヒト PBMC より分離した NK 細胞をエフェクター細胞とした。標的細胞とエフェクター細胞を混合後, V 字底プレートを用いてスフェロイドを作製し, オビヌツズマブ存在下で72時間培養した。スフェロイドを崩して細胞懸濁液とした後, PI 染色し, 死細胞の割合をフローサイトメーターを用いて測定した。
結果	Raji 細胞に対し, オビヌツズマブはリツキシマブより強く細胞死を誘導した。SU-DHL-4細胞及び Z-138細胞では, オビヌツズマブ (1 ng/mL) 処理により, 細胞生存率が約60%減少し, リツキシマブよりも強く細胞死を誘導した。

4) ADCC 活性に対する補体の影響

資料番号	4.2.1.1-25
タイトル	GA101 (RO5072759) Induces NK-cell Activation and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity More Effectively than Rituximab when Complement is Present
試験方法	<p>C1q 結合活性：オビヌツズマブ及びリツキシマブをプレートに固相化した後、C1q を結合させ、抗ヒト C1q 抗体、HRP 標識2次抗体を用いて結合量を測定した。</p> <p>CDC 活性：オビヌツズマブ又はリツキシマブと⁵¹Cr 標識 Raji 細胞をヒト血清存在下で2時間培養し、培養上清中の⁵¹Cr 量を測定することで CDC 活性を検討した。</p> <p>NK 細胞活性化：エフェクター細胞（ヒト PBMC）及び標的細胞（Raji）をオビヌツズマブ又はリツキシマブと自己血清（新鮮又は非働化）共存下で16～20時間培養後、CD54発現をフローサイトメーターにより測定しNK 細胞活性化を検討した。</p> <p>ADCC 活性：ヒト PBMC より分離した NK 細胞をエフェクター細胞とし、⁵¹Cr 標識した Raji 細胞を標的細胞とした。抗体（オビヌツズマブ又はリツキシマブ）及びヒト血清（補体 C5除去）共存下で4時間培養後、培養上清を採取して ADCC 活性を算出した。</p>
結果	<p>C1q 結合活性及び CDC 活性：オビヌツズマブは、リツキシマブと比較し、C1q 結合活性が低下していた。また、リツキシマブは Raji に対して CDC 活性を示したが、オビヌツズマブは CDC 活性を示さなかった（5 µg/mL までの濃度域）。</p> <p>NK 細胞活性化、ADCC 活性：オビヌツズマブ及びリツキシマブいずれも、自己血清非存在下又は非働化自己血清存在下において NK 細胞活性化（CD54発現増強）を誘導した。しかし、新鮮自己血清（補体含む）存在下では、オビヌツズマブが NK 細胞活性化を誘導したのに対し、リツキシマブは誘導しなかった。また、オビヌツズマブによる ADCC 活性は、補体 C5除去血清添加の影響をほとんど受けなかったが、リツキシマブの ADCC 活性は阻害された。</p>

・ 4.2.1.1-10については、[2.6.3.2.1.2\(6\)](#)を参照。

(3) マクロファージ/単球による ADCC/ADCP 活性

1) ヒトマクロファージによる ADCC/ADCP 活性

資料番号	4.2.1.1-26
タイトル	The Glycoengineered Therapeutic Monoclonal Antibody GA101 (RO5072759) Triggers Superior Macrophage-Mediated Phagocytosis and Cytotoxicity
試験方法	<p>マクロファージ結合性：ヒト単球由来マクロファージ（M1及び M2c）に AlexaFluor647標識したオビヌツズマブ、糖鎖未改変型オビヌツズマブ、リツキシマブ及びオファツムマブを結合させ、フローサイトメーターにて測定した。M1及び M2c マクロファージは、ヒト PMBC から分離した単球を IFNγ + LPS 又は IL-10 刺激することで誘導した。</p> <p>ADCP 活性：エフェクター細胞にヒト単球由来マクロファージ（M1及び M2c）、標的細胞に Raji 細胞を使用し、オビヌツズマブ又はオビヌツズマブ糖鎖未改変体（1, 10, 1000 $\mu\text{g/mL}$）存在下で1-24時間培養後、貪食された細胞割合をフローサイトメーターにて測定し ADCP 活性を評価した。</p> <p>殺腫瘍活性：エフェクター細胞にヒト単球由来マクロファージ、標的細胞に Raji 細胞を使用し、オビヌツズマブ又はオビヌツズマブ糖鎖未改変体存在下で48時間共培養後、Raji 細胞を抗 CD22抗体にて染色し、HRP 標識二次抗体を用いて発色させ、細胞傷害活性を測定した。</p> <p>上記の結合性、活性の測定では、通常の培養条件だけでなく、非特異的な免疫グロブリン存在下での評価を実施した。</p>
結果	<p>マクロファージ結合性：非特異的な免疫グロブリン非存在下では、糖鎖改変による結合性の差は認められなかったが、生理的濃度（10 mg/mL）の免疫グロブリン存在下では、いずれのタイプのマクロファージに対してもオビヌツズマブの結合活性が優れていた。</p> <p>ADCP 活性：非特異的な免疫グロブリン存在下において、オビヌツズマブは、オビヌツズマブ糖鎖未改変体と比較して M2c マクロファージによる Raji 細胞貪食を強く誘導し、オビヌツズマブ及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体濃度10 ng/mL 及び 1000 ng/mL では有意な差が認められた（Student t test, $P < 0.005$）。非特異的なヒト免疫グロブリンの非存在下では、両抗体による ADCP 活性は同程度であった。</p> <p>殺腫瘍活性：非特異的ヒト免疫グロブリン存在下において、オビヌツズマブはオビヌツズマブ糖鎖未改変体よりも優れた活性を示した。非特異的ヒト免疫グロブリンの非存在下では、両抗体による殺腫瘍活性は同程度であった。</p>

2) 活性化マウス単球による細胞傷害活性

資料番号	4.2.1.1-27
タイトル	Anti-CD20 Mediated Killing of CD20 Positive Tumor Cells by Differentiated Peritoneal Monocytes - RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	SCID ベージュマウス腹腔由来単球を採取し、サイトカイン（GM-CSF + IL-3）で刺激してエフェクター細胞とした。SU-DHL-4細胞を標的細胞として、オビヌツズマブによる細胞傷害活性をフローサイトメーターを用いて検討した。
結果	オビヌツズマブは、リツキシマブよりも低濃度で SU-DHL-4細胞の生存率を低下させた。また、エフェクター細胞：標的細胞比の低い条件でもリツキシマブよりも強い効果を示した。

(4) 好中球による ADCP 活性

資料番号	4.2.1.1-28
タイトル	Study in Whole Blood Assays of the Role of PMN in the Therapeutic Activity of Rituximab and GA101 (Obinutuzumab)
試験方法	<p>好中球活性化：オビヌツズマブ，リツキシマブ又はトラスツズマブ（コントロール抗体）存在下でヒト末梢血（全血）を2～24時間培養後，CD11b 及び CD62L の発現量をフローサイトメーターを用いて測定した。また，好中球活性化後の細胞死について，7AAD 染色を用いて測定した。</p> <p>ADCC 活性：標的細胞にカルセイン標識した BJAB 細胞，エフェクター細胞としてヒト PBMC 又は PMN を使用し，オビヌツズマブ，リツキシマブ又はトラスツズマブ存在下で4時間培養後，培養上清中の蛍光強度を測定した。</p> <p>貪食能：B-CLL 患者由来細胞を PKH26標識して標的細胞とし，エフェクター細胞にヒト末梢血（全血）又は PMN を使用し，オビヌツズマブ，リツキシマブ又はトラスツズマブ存在下で2-24時間培養後，フローサイトメーターにより全 CD15⁺細胞中の PKH26⁺/CD15⁺/CD19⁻細胞の割合を測定した。</p>
結果	<p>好中球活性化：PMN の CD11b 発現量は，オビヌツズマブによりコントロール抗体と比較して上昇し，CD62L 発現量は減少した。リツキシマブ及びトラスツズマブでは有意な変化を示さなかった。また，オビヌツズマブ添加の24時間後には，45～50%の好中球が細胞死に陥っていた。</p> <p>ADCC 活性：PBMC をエフェクター細胞とした場合，オビヌツズマブは ADCC 活性を誘導したが，リツキシマブはほとんど活性を示さなかった。PMN をエフェクター細胞とした場合，オビヌツズマブ，リツキシマブのいずれも ADCC 活性の誘導は認められなかった。</p> <p>貪食能：全血をエフェクター細胞として使用した場合，オビヌツズマブ及びリツキシマブの糖鎖改変体は，好中球による貪食能を強く誘導した。</p>

2.6.3.2.3 全血中 B 細胞減少作用 (ex vivo)

(1) リツキシマブとの比較, 正常 B 細胞

資料番号	4.2.1.1-29
タイトル	Autologous B Cell Depletion in Fresh Whole Blood and Fate of B Cells by RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	健康な供血者の全血をオビヌツズマブ又はリツキシマブ存在下で24時間培養後, CD3, CD19及びCD45を標識し, フローサイトメーターにより測定した。
結果	オビヌツズマブはリツキシマブに比べ, EC ₅₀ が約1/10~1/25であり, B 細胞減少作用の最大活性は1.3~2.5倍高かった。

(2) リツキシマブとの比較, B-CLL 患者由来 B 細胞

資料番号	4.2.1.1-30
タイトル	The Novel Type II CD20 Antibody RO5072759 (GA101) Mediates Superior B Cell Depletion in Whole Blood from Healthy Volunteers and B-CLL Patients
試験方法	健康な供血者 (10例) 及び B-CLL 患者由来 (11例) の全血をオビヌツズマブ又はリツキシマブ存在下で24時間培養後, CD3, CD19及びCD45を標識し, フローサイトメーターにより測定した。
結果	健常者検体の全例で, オビヌツズマブは, リツキシマブよりも低濃度で B 細胞減少作用を示し, 最大効果も強かった。B-CLL 患者サンプル11例中8例において, オビヌツズマブは B 細胞減少作用を示し, リツキシマブよりも強い効果を示した。

(3) リツキシマブ, オファツムマブとの比較, FcγRIIIa 遺伝型

資料番号	4.2.1.1-31
タイトル	Effects of Blood Anticoagulants on GA101 (RO5072759)-, Ofatumumab- and Rituximab-Mediated B-Cell Depletion
試験方法	健康な供血者の全血をオビヌツズマブ, リツキシマブ又はオファツムマブ存在下で約22時間培養後, CD3, CD19及びCD45を標識し, フローサイトメーターにより測定した。抗凝固剤の種類, 供血者の FcγRIIIa 遺伝子型 ([158V/158V], [158F/158V]及び[158F/158F]) 及び添加する血漿 (非働化の有無) による違いについて検討した。
結果	抗凝固剤の種類, FcγRIIIa 遺伝子型に関わらず, オビヌツズマブは最も強い B 細胞減少作用を示した。また, リツキシマブ及びオファツムマブの B 細胞減少作用は, 非働化血漿を用いた場合に著しく損なわれたが, オビヌツズマブによる B 細胞減少作用に対する影響は小さかった。

・ 4.2.1.1-10については, [2.6.3.2.1.2\(6\)](#)を参照。

(4) N型糖鎖を欠如した変異体による活性

資料番号	4.2.1.1-32
タイトル	Comparison of Fc variants of Type I and Type II CD20 Antibodies in Functional <i>in vitro</i> Assays
試験方法	健康な供血者の全血をオビヌツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ又はオビヌツズマブとリツキシマブの変異体存在下で22時間培養後、CD3、CD19及びCD45を標識し、フローサイトメーターにて測定した。オビヌツズマブの変異体として、ADCC活性が著しく減退したオビヌツズマブ N297D 及び Fc 受容体を介する生物活性がほとんど失われたオビヌツズマブ P329G LALA を用いた。オビヌツズマブ糖鎖未改変体も含め、いずれも直接的な細胞死の誘導活性は維持されている。また、リツキシマブの変異体として、ADCC活性が著しく減退したリツキシマブ N297D を用いた。
結果	オビヌツズマブは、オビヌツズマブ糖鎖未改変体に比べ、強い B 細胞減少作用を示した。オビヌツズマブ N297D 及びオビヌツズマブ P329G LALA の B 細胞減少作用は、オビヌツズマブよりも弱いものの、オビヌツズマブ糖鎖未改変体と比べてわずかに劣る程度の強い作用を示した。一方、リツキシマブ N297D は、ほとんど B 細胞減少作用を示さなかった。

2.6.3.2.4 *In vivo*におけるB細胞減少作用

(1) カニクイザルのCD20分子及びFcγRIIIaとの結合性, ADCC活性

資料番号	4.2.1.1-33
タイトル	Cynomolgus Monkey (<i>M. fascicularis</i>) as Suitable Species for Toxicological Assessment of the CD20 Antibody RO5072759 (GA101)
試験方法	<p>CD20分子： CD20分子（ヒト，カニクイザル等）のアミノ酸配列を比較した。</p> <p>CD20との結合性：ヒト及びカニクイザル末梢血 B 細胞との結合性について，フローサイトメーターを用いて検討した。</p> <p>FcR との結合性：カニクイザル及びヒトの FcγRIIIa 及び FcRn への結合親和性を SPR 法を用いて測定した。</p> <p>ADCC 活性：カニクイザル PBMC 由来 NK 細胞をエフェクター細胞とし，カルセイン標識 Raji を標的細胞として，ADCC 活性を測定した。</p> <p>全血中 B 細胞減少作用：カニクイザル全血を用いて B 細胞減少作用を検討した。</p>
結果	<p>CD20分子： CD20細胞外領域のアミノ酸配列の内，カニクイザルでは Val-157だけが，ヒト（Ala-157）と異なっており，オビヌツズマブのエピトープ相当領域は一致していた。カニクイザルに比べ，マウス及びラットとヒトとの相同性は低く，CD20細胞外領域の内，16アミノ酸がヒトと異なり，エピトープ相当領域のアミノ酸残基も一部が異なっていた。カニクイザルは，マウスやラット等の他動物種と比較し，ヒトとの間でCD20アミノ酸配列が高い相同性を示した。</p> <p>CD20との結合性：オビヌツズマブは，カニクイザル B 細胞の CD20に対しヒト CD20とほぼ同程度の親和性を示した。</p> <p>FcR との結合性：オビヌツズマブは，FcγRIIIa 及び FcRn のそれぞれについて，カニクイザル及びヒトの両種間で同程度の親和性を示した。</p> <p>ADCC 活性：オビヌツズマブは，リツキシマブ及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体よりも強い ADCC 活性を示した。</p> <p>全血中 B 細胞減少作用：オビヌツズマブは，リツキシマブ及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体よりも強いカニクイザル B 細胞減少作用を示した。</p>

2.6.3.2.4.1 ヒト CD20遺伝子導入マウスにおけるB細胞減少作用

(1) オビヌツズマブによるB細胞減少作用

資料番号	4.2.1.1-34
タイトル	B cell Depletion Mediated by RO5072759 (GA101) in Human CD20 Transgenic Mice
試験方法	<p>投与動物：ヒト CD20遺伝子導入マウス</p> <p>投与薬剤：オビヌツズマブ，リツキシマブ，2H7抗体，マウス IgG2b 抗体</p> <p>投与量：10 mg/kg (250 µg/マウス)，単回投与，投与経路：i.p.</p> <p>解析日：抗体投与日を day 0として，day 2, 7, 35</p> <p>測定項目：末梢血，リンパ節，脾臓における B 細胞</p> <p>測定方法：各組織の細胞の B220及び CD4を標識し，フローサイトメーターを用いて計測した。</p>
結果	<p>オビヌツズマブは day 2から末梢血，脾臓，リンパ節の B 細胞数を著しく減少させた。リツキシマブ及び2H7についても，day 2から末梢血及び脾臓の B 細胞数減少が示されたものの，リンパ節において著しい B 細胞数減少が認められたのは，day 7以降であった。抗 CD20抗体は，いずれも day 35まで B 細胞減少作用を示したが，リンパ節と脾臓における B 細胞減少作用の強度は，オビヌツズマブが他の抗 CD20抗体よりも優れていた。</p>

(2) オビヌツズマブによる B 細胞減少作用と免疫応答に対する影響

資料番号	4.2.1.1-35
タイトル	RO5072759 (GA101) Mediates Superior B Cell Depletion including the Ability to Deplete Marginal Zone B Cell Subsets and Translating into Superior Suppression of De Novo Antibody Responses, but Leaving Protective Humoral Memory Responses Intact
試験方法	<p>1) ヒト CD20遺伝子導入マウスにおける B 細胞減少作用 投与動物：ヒト CD20遺伝子導入マウス 測定項目：末梢血，リンパ節，脾臓における B 細胞 測定方法：各組織の細胞を B220及び CD4で標識し，B 細胞数をフローサイトメーターを用いて測定した。また，脾臓における辺縁帯 B 細胞は B220⁺, CD21^{hi}, CD23^{lo} の細胞集団として検出した。</p> <p>1-1) B 細胞減少作用の経時的変化 (1st study) 投与薬剤：オビヌツズマブ，リツキシマブ，2H7抗体，マウス IgG2b 抗体 投与量：10 mg/kg，各群 n = 3，単回投与，投与経路：i.p. 試験期間：day 100まで (抗体投与日を day 0とする)</p> <p>1-2) B 細胞減少作用と投与量との関係 (2nd study) 投与薬剤：オビヌツズマブ，リツキシマブ，2H7抗体，マウス IgG2b 抗体 投与量：0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40 mg/kg，各群 n = 2，単回投与，投与経路：i.p.</p> <p>1-3) 脾臓辺縁帯 B 細胞減少作用 (3rd study) 投与薬剤：オビヌツズマブ，リツキシマブ，2H7抗体，マウス IgG2b 抗体 投与量：10 mg/kg，各群 n = 2，単回投与，投与経路：i.p.</p> <p>2) ヒト CD20遺伝子導入マウスにおける免疫応答 (4th study) 投与動物：ヒト CD20遺伝子導入マウス 投与薬剤：オビヌツズマブ，リツキシマブ，2H7抗体，マウス IgG2b 抗体 投与量：4 mg/kg，3回投与，投与経路：i.v. 抗原感作：NP-KLH を i.p.投与して感作 (day 0, 21, 81) 群構成：各群 n = 4 第1群) コントロール抗体投与，NP-KLH 未感作 第2群) コントロール抗体投与，NP-KLH 感作 第3群～第5群は，<i>de novo</i> 応答検討用，初回感作の2，4，6日前に抗体を投与。 各群の抗体は，順に2H7，リツキシマブ，オビヌツズマブである。 第6群～第8群は，メモリー応答検討用，3回目感作の2，4，6日前に抗体を投与。 各群の抗体は，順に2H7，リツキシマブ，オビヌツズマブである。 試験期間：day 100まで (初回感作日を day 0とする) 測定項目：末梢血中の NP 特異的抗体価</p> <p>3) カニクイザルにおける免疫応答 (5th study) 投与動物：カニクイザル，各群：n = 4 (溶媒投与群のみ n = 3) 投与薬剤：オビヌツズマブ，リツキシマブ，溶媒 投与量：30 mg/kg，2回投与，投与経路：i.v.，投与日：day -14, -7 試験期間：day 84まで 抗原感作：破傷風トキソイド，麻疹/風疹による感作 (day 0) 測定項目：末梢血中の破傷風トキソイド及び麻疹/風疹特異的抗体価</p>

結果	<p>1-1) 末梢血 B 細胞減少作用を経時的に観察した試験では、3種の抗 CD20抗体投与により、いずれも day 21から day 35までほぼ同様の B 細胞減少作用を示したが、リツキシマブ及び2H7投与群では、day 35を過ぎると徐々に B 細胞数が増加し始め、2H7投与群では day 63、リツキシマブ投与群では day 77にほぼ正常レベルにまで回復した。オビヌツズマブ投与群では day 77頃まで B 細胞の増加は認められず、正常レベルに戻ったのは day 100であった。</p> <p>1-2) 抗体投与量との関係を検討した試験では、オビヌツズマブ及びリツキシマブの全投与量群において、day 7での末梢血、脾臓、及びリンパ節の B 細胞数は、対照群に比べ低下した。末梢血、脾臓、リンパ節のいずれにおいても、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。</p> <p>1-3) 抗 CD20抗体を投与し (day 0) , 脾臓を day 2及び day 7に採取して検討したところ、オビヌツズマブ投与群では、day 2において、脾臓の辺縁帯 B 細胞サブセット (B220⁺ CD21^{hi} CD23^{lo}) が対照群の5.5%にまで減少し、day 7においても減少作用を維持したが、リツキシマブ及び2H7投与群では、day 2において対照群に比べ20%程度の減少が認められたものの、day 7には、ほぼ対照群のレベルに戻った。</p> <p>2) リツキシマブ、2H7投与群の NP 特異的 IgG 抗体価は、<i>de novo</i> 応答群において、コントロール抗体投与群と類似しており、抗体投与による影響はほとんど認められなかった。しかし、オビヌツズマブ投与群では、<i>de novo</i> 応答群における NP 特異的 IgG 抗体価は、対照群に比べ著しく低かった。一方、メモリー応答については、オビヌツズマブ投与群も他の抗 CD20抗体と同様、対照群と同程度の NP 特異的 IgG 力価が検出された。</p> <p>3) リツキシマブ投与群においては、破傷風トキソイドに対する <i>de novo</i> 応答及び麻疹/風疹に対するメモリー応答のいずれに対しても影響は認められなかった。オビヌツズマブ投与群においては、破傷風トキソイドに対する <i>de novo</i> 応答を強く抑制するものの、麻疹/風疹に対するメモリー応答には影響を及ぼさなかった。</p>
----	---

2.6.3.2.4.2 カニクイザルにおける B 細胞減少作用

(1) オビヌツズマブ、リツキシマブによる B 細胞減少作用

資料番号	4.2.1.1-36
タイトル	Comparison of B Cell Depletion Mediated by RO5072759 (GA101) and Rituximab in Cynomolgus Monkey
試験方法	<p>投与動物：カニクイザル</p> <p>群構成：各群 n = 3</p> <p>第1群) 溶媒投与, 第2群) リツキシマブ (10 mg/kg) 投与, 第3群) オビヌツズマブ (10 mg/kg) 投与, 第4群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) 投与,</p> <p>投与経路：i.v., 投与日：day 0及び day 7, 試験期間：day 35まで</p> <p>測定項目：</p> <p>末梢血 B 細胞：day -7, 2, 9, 14, 21, 28, 35, リンパ節 B 細胞：day -7, 2, 9, 35 脾臓 B 細胞：day 35, 測定方法：フローサイトメトリー</p>
結果	<p>末梢血 B 細胞数：リツキシマブ投与群では, day 9に投与前と比較し94%減少し, 以降 day 35まで90%以上の減少を示した。両オビヌツズマブ投与群では, day 9以降はいずれの測定日においても99%以上減少した。</p> <p>リンパ節 B 細胞：リツキシマブ投与群では, day 9で投与前の42%に減少し, day 35では溶媒投与群とほぼ同等に戻った。オビヌツズマブ10 mg/kg 投与群では, 投与前に比べ, day 9で94%, day 35で96%減少し, 30 mg/kg 投与群では, day 9で98%, day 35で99%減少した (いずれも P < 0.05, vs 溶媒投与群, Dunnett's test)。</p> <p>脾臓 B 細胞：リツキシマブ投与群よりもオビヌツズマブ投与群 (10 mg/kg 及び 30 mg/kg) では, 脾臓 B 細胞数 (組織重量当たりの細胞数) の減少作用が強かった。また, 両オビヌツズマブ投与群は, 溶媒投与群と比較して脾臓細胞数が有意に少なかった (P < 0.05, Dunnett's test)。</p>

(オビヌツズマブの曝露量)

資料番号	4.2.1.1-37
タイトル	Exposure Assessment in the Study GA101_1 “Comparison of B cell Depletion Mediated by RO5072759 and Rituximab (RO0452294, Mab Thera [®]) in Cynomolgus Monkeys RDR No. 1030198” – Amended Version
試験方法	<p>4.2.1.1-36の方法の項目に記載。</p> <p>採血は投与直前, 初回投与後48, 216, 312, 504, 672, 864時間</p>
結果	<p>オビヌツズマブ投与群 (10 mg/kg 及び30 mg/kg) における血清中濃度は, 初回投与後216時間で C_{max} に達し, それぞれ217, 631 µg/mL であった。また, AUC_{0-864hr} は, それぞれ72.1, 267 mg•hr/mL であった。リツキシマブ投与群 (10 mg/kg) の C_{max} 及び AUC_{0-864hr} は, それぞれ204, 64.5 mg•hr/mL であった。両抗体の曝露量は, ほぼ同程度であった。なお, オビヌツズマブ 10 mg/kg 投与群及びリツキシマブ10 mg/kg 投与群において, それぞれ1匹ずつ抗薬物抗体が検出され, 投与抗体のクリアランス促進が認められた。</p>

(2) オビヌツズマブ, リツキシマブ, オビヌツズマブ糖鎖未改変体による B 細胞減少作用

資料番号	4.2.1.1-38
タイトル	Evaluation of Wildtype and Afucosylated-Variant RO5072759 (GA101) Compared to Rituximab Cynomolgus Monkey: B Cell Depletion Efficacy and Durability
試験方法	<p>投与動物：カニクイザル</p> <p>群構成：</p> <p>第1群) 溶媒投与 (n = 3)</p> <p>第2群) リツキシマブ (30 mg/kg) 投与 (n = 4)</p> <p>第3群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) 投与 (n = 4)</p> <p>第4群) オビヌツズマブ糖鎖未改変体 (30 mg/kg) 投与 (n = 4)</p> <p>投与経路：i.v., 投与日：day 0及び day 7</p> <p>試験期間：day 90まで</p> <p>測定項目：末梢血 B 細胞：day -6, 2, 9, 15, 23, 36, 51, 65, 90</p> <p>リンパ節 B 細胞：day -6, 9, 51</p> <p>測定方法：フローサイトメトリー</p>
結果	<p>末梢血 B 細胞数：いずれの抗 CD20抗体投与群においても、投与後初期 (day 2～day 23) から減少が認められた。リツキシマブ投与群では、day 36以降に、B 細胞数の回復傾向を示した。オビヌツズマブ及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体投与群においては、リツキシマブ投与群よりも長い期間 B 細胞減少を維持した。</p> <p>リンパ節 B 細胞：すべての抗体投与群で、day 9において減少した。更に、オビヌツズマブ投与群及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体投与群では、day 51まで有意な B 細胞減少作用を示した。</p>

(オビヌツズマブの曝露量)

資料番号	4.2.1.1-39
タイトル	Exposure Assessment in the Study GA101_02 “Evaluation of Wild Type and Afucosylated-Variant RO5072759 (GA101) Compared to Rituximab (RO0452294, MabThera®) in Cynomolgus Monkeys: B Cell Depletion Efficacy and Durability, RDR No. 1030199” – Amended Version
試験方法	<p>4.2.1.1-38の実験方法の項に記載。</p> <p>採血は投与直前, 初回投与後24, 48, 216, 360, 552, 696, 864, 1224, 1560, 1920, 1992, 2160, 2352時間。</p>
結果	<p>オビヌツズマブ投与群, オビヌツズマブ糖鎖未改変体投与群, リツキシマブ投与群における血清中濃度の C_{max} は, それぞれ742, 613, 594 µg/mL であった。また, AUC_{0-2352hr} は, それぞれ261, 229, 125 mg•hr/mL であった。オビヌツズマブ投与群と糖鎖未改変体投与群との間では, 曝露量に大きな差は認められなかったが, リツキシマブ投与群では曝露量が低かった。抗薬物抗体の出現頻度は, オビヌツズマブ投与群 (3/4), 糖鎖未改変体投与群 (2/4), リツキシマブ投与群 (4/4) であり, クリアランスが亢進した例も認められた。</p>

(3) カニクイザルにおける免疫応答

- ・ 4.2.1.1-35については, [2.6.3.2.4.1\(2\)](#)を参照。

2.6.3.2.5 *In vivo* 抗腫瘍活性

2.6.3.2.5.1 びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果

(1) SU-DHL-4細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – オビヌツズマブとリツキシマブ

資料番号	4.2.1.1-40
タイトル	Comparison of Antitumor Activity of Anti-CD20 Antibody RO5072759 (GA101) and Rituximab in SUDHL-4 DLBCL SCID Beige Mouse Xenograft
試験方法	腫瘍細胞：SU-DHL-4細胞 細胞移植：1匹あたり 5×10^6 個を腹部皮下に移植 (Matrigel 使用) 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 21 (移植日 day 0) , 平均腫瘍体積 260 mm^3 , 各群 n = 10 第1群) 溶媒投与, 第2~4群) リツキシマブ (順に1, 10, 30 mg/kg) 投与, 第5~7群) オビヌツズマブ (順に1, 10, 30 mg/kg) 投与, 投与経路：i.v., 投与間隔：週1回, 3回投与, 投与日：day 21, 28, 35 試験期間：day 42まで, ただし, 第7群のみ腫瘍再増殖を観察するため試験を継続した。 測定項目：腫瘍体積, 血中薬物濃度 (day 42)
結果	オビヌツズマブを投与した第6群では, 10例のうち1例, 第7群では, すべての個体で腫瘍の完全退縮が認められ (day 42) , 継続観察中の day 94に1例の再増殖が認められたが, 9例は完全退縮を維持した。また, 第5~7群の TGI は, 順に35.7%, 77.0%, >100%であった。リツキシマブ投与群においても腫瘍増殖抑制効果が認められ, 第2~4群の TGI は, 順に30.9%, 51.4%, 53.0%であったが, 腫瘍が完全に退縮した個体は認められなかった。第2~7群の平均血清中トラフ濃度 (最終投与日の1週間後) は, 順に8, 57, 185, 11, 109, 312 $\mu\text{g/mL}$ であった。

(2) SU-DHL-4細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – オビヌツズマブ, リツキシマブ及びオフアツムマブ

資料番号	4.2.1.1-41
タイトル	Antitumor Activity of RO5072759 (GA101) Compared to Rituximab and Ofatumumab against SUDHL-4 Lymphoma Xenografts in Female SCID Beige Mice
試験方法	腫瘍細胞：SU-DHL-4細胞 細胞移植：1匹あたり 5×10^6 個を腹部皮下に移植 (Matrigel 使用) 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 19 (移植日 day 0) , 平均腫瘍体積 $316 - 319 \text{ mm}^3$, 各群 n = 10 第1群) 溶媒投与, 第2~4群) リツキシマブ (順に3, 10, 30 mg/ml) 投与 第5~7群) オビヌツズマブ (順に3, 10, 30 mg/ml) 投与 第8~10群) オファツムマブ (順に3, 10, 30 mg/ml) 投与 投与経路：i.p., 投与間隔：週1回, 計4回投与, 投与日：day 19, 26, 33, 40 試験期間：day 47まで, 測定項目：腫瘍体積
結果	オビヌツズマブを投与した第5~7群の TGI は, 順に85%, 106%, 全例完全退縮であった。リツキシマブを投与した第2~4群は, 順に55%, 89%, 96%, オファツムマブを投与した第8~10群は, 順に69%, 84%, 101%であった。最高用量において, 腫瘍が完全退縮した個体は, オビヌツズマブ投与群では, 全例 (10/10) , リツキシマブ, オファツムマブ投与群では, それぞれ4/10, 5/9であった。

(3) SU-DHL-4細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – オビヌツズマブ糖鎖未改変体

資料番号	4.2.1.1-42
タイトル	Evaluation of the Contribution of Cell Mediated Anti Tumor Activity to the Therapeutic Properties of R5072759 (GA101), GA101-WT, and Rituximab in a S.C. DLCL SUDHL-4 Model
試験方法	<p>腫瘍細胞：SU-DHL-4細胞</p> <p>細胞移植：1匹あたり5×10^6個を腹部皮下に移植（Matrigel 使用）</p> <p>移植動物：SCID ベージュマウス</p> <p>群割り付け日：day 21（移植日 day 0），平均腫瘍体積255 mm^3，各群 n = 10</p> <p>第1群）溶媒投与，第2群）オビヌツズマブ（30 mg/kg）投与</p> <p>第3群）オビヌツズマブ糖鎖未改変体（30 mg/kg）投与</p> <p>第4群）リツキシマブ（30 mg/kg）投与</p> <p>第5群）溶媒投与，第6群）オビヌツズマブ（30 mg/kg）投与</p> <p>第7群）オビヌツズマブ糖鎖未改変体（30 mg/kg）投与</p> <p>第8群）リツキシマブ（30 mg/kg）投与</p> <p>第1～4群は，clodronate liposome を <i>i.p.</i> 投与（マクロファージの寄与を検討）。</p> <p>投与経路：<i>i.v.</i>，投与間隔：週1回，計4回投与，投与日：day 21, 28, 35, 42</p> <p>試験期間：day 108まで，測定項目：腫瘍体積</p>
結果	<p>オビヌツズマブを投与した第6群，及びオビヌツズマブ糖鎖未改変体を投与した第7群は，対照群及びリツキシマブを投与した第8群に比べ，強い腫瘍増殖抑制効果を示した。第6群では day 37，第7群では day 42に全個体の腫瘍が完全退縮に達したが，第8群では，一例も完全退縮例が認められなかった。第1～4群は，第5～8群とほぼ同様の効果を示し，clodronate liposome 処理は，オビヌツズマブの抗腫瘍効果に影響を与えなかった。</p>

(4) SU-DHL-4細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – N型糖鎖を欠如した変異体を用いた直接的な細胞死誘導活性の寄与

資料番号	4.2.1.1-43
タイトル	Evaluation of Antitumor Activity of RO5072759 (GA101) Compared to Rituximab, GA101 WT and a Fc-mutated GA101, GA101 N297D, in a SUDHL-4 Xenograft Model in SCID Beige Mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：SU-DHL-4細胞</p> <p>細胞移植：1匹あたり5×10^6個を腹部皮下に移植（Matrigel 使用）</p> <p>移植動物：SCID ベージュマウス</p> <p>群割り付け日：day 30（移植日 day 0），平均腫瘍体積492 mm^3，各群 n = 8</p> <p>第1群）溶媒投与，第2群）オビヌツズマブ（30 mg/kg）投与</p> <p>第3群）オビヌツズマブ糖鎖未改変体（30 mg/kg）投与</p> <p>第4群）リツキシマブ（30 mg/kg）投与</p> <p>第5群）オビヌツズマブ N297D 変異体（30 mg/kg）投与</p> <p>投与経路：<i>i.v.</i>，投与間隔：週1回，計3回投与，投与日：day 30, 36, 43</p> <p>試験期間：day 71まで，測定項目：腫瘍体積</p>
結果	<p>Day 43における第2～5群の TGI は，順に128.2%，128.8%，85.8%，101.0%であった。第2群と第3群では，ほとんどの個体で腫瘍が完全退縮した（順に7/8，8/8）。オビヌツズマブ N297D 変異体は，オビヌツズマブには劣るものの，リツキシマブと同程度以上の腫瘍増殖抑制活性を示した。</p>

(5) SU-DHL-4細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 – 二次治療での効果

資料番号	4.2.1.1-44
タイトル	Antitumor Activity of Second Line Treatment with RO5072759 (GA101) Following First Line Rituximab Therapy against SU-DHL-4 DLBC Lymphoma Xenografts in Female SCID Beige Mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：SU-DHL-4細胞 細胞移植：1匹あたり5×10^6個を腹部皮下に移植（Matrigel 使用） 移植動物：SCID ベージュマウス 一次治療割り付け：day 22（移植日 day 0），平均腫瘍体積305 mm^3 第1群）溶媒投与，n = 10 第2群）リツキシマブ（30 mg/kg）投与，n = 80 二次治療割り付け：day 35（day 0に移植），腫瘍体積中央値$750 - 790 \text{ mm}^3$ リツキシマブの効果が認められなくなった時点（day 35）で，第2群のマウスを用いて第3～6群（各 n = 10）を割り付けし，二次治療を実施した。 第3群）溶媒投与，第4群）リツキシマブ（30 mg/kg）投与 第5群）オビヌツズマブ（30 mg/kg）投与， 第6群）リツキシマブ（15 mg/kg） + オビヌツズマブ（15 mg/kg）投与 投与経路：<i>i.v.</i>，投与間隔：週1回， 投与日：（一次治療）day 22, 29，（二次治療）day 36, 43, 50, 57, 63 試験期間：day 70まで，測定項目：腫瘍体積</p>
結果	リツキシマブを継続投与した第4群では，抗体投与にもかかわらず対照群と同様の腫瘍増殖が認められたが，二次治療としてオビヌツズマブを投与した第5群及びオビヌツズマブとリツキシマブを併用した第6群では，腫瘍の増殖が抑制された。

2.6.3.2.5.2 マントル細胞リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果

(1) Z-138細胞株皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果 - オビヌツズマブとリツキシマブ

資料番号	4.2.1.1-45
タイトル	Evaluation of the Antitumor Activity of RO5072759 (GA101) and Rituximab (MabThera) in the Human Z138 NHL (MCL) S.C. Xenograft Model in SCID Beige Mice
試験方法	腫瘍細胞：Z-138細胞 細胞移植：1匹あたり 5×10^6 個を腹部皮下に移植（Matrigel 使用） 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 13（移植日 day 0），平均腫瘍体積 214 mm^3 ，各群 n = 10 第1群）溶媒投与，第2群）リツキシマブ（10 mg/kg）投与， 第3群）オビヌツズマブ（10 mg/kg）投与 投与経路： <i>i.v.</i> ，投与間隔：週1回，計4回投与，投与日：day 14, 21, 28, 35 試験期間：day 78まで，測定項目：腫瘍体積
結果	オビヌツズマブを投与した第3群において，day 34に9/10例で腫瘍の完全退縮が認められ，経過観察中に最後の1例を含めた全例で腫瘍が消失した。一方，リツキシマブを投与した第2群において腫瘍の消失が認められたのは，day 34で1/10，day 78では4/10であった。

(2) Z-138細胞株皮下移植モデルにおける血清中濃度と抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-46
タイトル	Dose Related Anti-Tumor Activity of RO5072759 (GA101) and Rituximab (MabThera) in the Human Z138 NHL (MCL) S.C. Xenograft Model in SCID Beige Mice
試験方法	腫瘍細胞：Z-138細胞 細胞移植：1匹あたり 5×10^6 個を腹部皮下に移植（Matrigel 使用） 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 20（移植日 day 0），腫瘍体積中央値 400 mm^3 ，各群 n = 10 第1群）溶媒投与，第2～5群）リツキシマブ（順に1, 10, 30, 100 mg/kg）投与， 第6～9群）オビヌツズマブ（順に1, 10, 30, 100 mg/kg）投与 投与経路： <i>i.v.</i> ，投与間隔：週1回，計4回投与，投与日：day 20, 27, 34, 41 試験期間：day 49まで 測定項目：腫瘍体積，血中薬物濃度（day 32, 49）
結果	リツキシマブを投与した第2～5群の TGI は，順に54%，77%，79%，89%であり，オビヌツズマブを投与した第6～9群では，順に53%，88%，95%，> 100%であった。最高用量を投与した第9群では，10例中7例で腫瘍の完全退縮が認められた（day 49）。オビヌツズマブ10 mg/kg 投与群での血清中濃度は，day 32では $102 \pm 34 \text{ } \mu\text{g/mL}$ （mean \pm SD，以下同じ），day 49では $98 \pm 35 \text{ } \mu\text{g/mL}$ であった。TGI 及び腫瘍の完全退縮比率が向上する傾向を示したオビヌツズマブ100 mg/kg 投与群の血清中濃度は，day 32では $751 \pm 97 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ，day 49では $478 \pm 138 \text{ } \mu\text{g/mL}$ であった。

(3) Z-138細胞株皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果 – 病理組織解析

資料番号	4.2.1.1-47
タイトル	Antitumor Activity of RO5072759 (GA101) after Single Administration at Different Doses against Advanced S.C. Z138 MCL Xenografts in SCID Beige Mice (168 hrs)
試験方法	腫瘍細胞：Z-138細胞 細胞移植：1匹あたり 5×10^6 個を腹部皮下に移植（Matrigel 使用） 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 22（移植日 day 0），各群の腫瘍体積中央値 $409 \sim 423 \text{ mm}^3$ ，各群 n = 10 第1群）溶媒投与，第2～4群）オビヌツズマブ（順に100, 30, 10 mg/kg）投与 投与経路： <i>i.v.</i> ，投与間隔：単回投与，投与日：day 22 試験期間：day 30まで，測定項目：病理解析，フローサイトメトリー，腫瘍体積
結果	オビヌツズマブ投与群の移植腫瘍塊辺縁部にマウス由来免疫細胞の浸潤が認められた。最も多いのは，マクロファージであり，リンパ細胞及び好中球の浸潤も認められた。また，腫瘍の細胞懸濁液を調製し，フローサイトメーターにより第1～4群についてアポトーシス細胞の割合を測定したところ，順に19.9%，26.6%，33.6%及び26.8%であり，オビヌツズマブ投与群におけるアポトーシス細胞の増加が観察された。なお，第2～4群の day 30における TGI は，順に99%，96%，93%であった。

(4) Z-138細胞株播種性増殖モデルにおける抗腫瘍効果

1) リツキシマブとの比較（10 mg/kg 及び30 mg/kg）

資料番号	4.2.1.1-48
タイトル	Evaluation of the Therapeutic Properties of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	腫瘍細胞：Z-138細胞 細胞移植：1匹あたり 1×10^7 個を尾静脈から移植 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 29（移植日 day 0），n = 9（第1群のみ n = 10） 第1群）溶媒投与，第2群）リツキシマブ（10 mg/kg）投与， 第3群）リツキシマブ（30 mg/kg）投与， 第4群）オビヌツズマブ（10 mg/kg）投与， 第5群）オビヌツズマブ（30 mg/kg）投与， 投与経路： <i>i.p.</i> ，投与間隔：週1回，計6回投与，投与日：day 29, 36, 43, 50, 57, 64 試験期間：day 71まで，測定項目：生存率
結果	リツキシマブを投与した第2群及び第3群の生存期間中央値は，それぞれ40日，44.5日，オビヌツズマブを投与した第4群及び第5群は，それぞれ46.5日，50日であり，溶媒投与群（35日）と比べ有意に生存日数を延長した（ANOVA one-parametric One-way, $P < 0.05$ ）。また，オビヌツズマブ投与群は，同用量のリツキシマブ投与群と比較して有意な生存日数中央値の延長が認められた。

2) リツキシマブとの比較 (1 mg/kg 及び10 mg/kg)

資料番号	4.2.1.1-49
タイトル	Evaluation of the Therapeutic Properties of RO5072759 (GA101) in Comparison to Rituximab
試験方法	腫瘍細胞：Z-138細胞 細胞移植：1匹あたり 1×10^7 個を尾静脈から移植 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 31 (移植日 day 0) , 各群 n = 10 第1群) 溶媒投与, 第2群) オビヌツズマブ (10 mg/kg) 投与, 第3群) オビヌツズマブ (1 mg/kg) 投与, 第4群) リツキシマブ (10 mg/kg) 投与, 第5群) リツキシマブ (1 mg/kg) 投与 投与経路：i.v., 投与間隔：週1回, 計5回投与, 投与日：day 31, 38, 45, 52, 59 試験期間：day 104まで, 測定項目：生存率
結果	リツキシマブを投与した第4群及び第5群の生存期間中央値は, それぞれ40日, 42日, オビヌツズマブを投与した第2群及び第3群は, それぞれ49日, 41日であり, 溶媒投与群 (36日) と比べ有意に生存日数を延長した (ANOVA one-parametric One-way, $P < 0.05$)。また, オビヌツズマブ10 mg/kg 投与群は, 同用量のリツキシマブ投与群と比較して有意な生存日数中央値の延長が認められた。

(5) Z-138細胞株播種性増殖モデルにおける抗腫瘍効果 – ヒト CD16遺伝子導入マウス

1) オビヌツズマブ, リツキシマブ及びオファツムマブ

資料番号	4.2.1.1-50
タイトル	Evaluation of Antitumor Activity of RO5072759 (GA101) Compared to Ofatumumab and Rituximab in a Z138 Xenograft I.V. Model in SCID CD16tg Mice
試験方法	腫瘍細胞：Z-138細胞 細胞移植：1匹あたり 1×10^7 個を尾静脈から移植 移植動物：ヒト CD16 (FcγRIIIa) 遺伝子導入 SCID マウス 群割り付け：day 26 (移植日 day 0) , n = 10 第1群) 溶媒投与, 第2群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) 投与, 第3群) リツキシマブ (30 mg/kg) 投与, 第4群) オファツムマブ (30 mg/kg) 投与 投与経路：i.v., 投与間隔：週1回, 計3回投与, 投与日：day 26, 33, 40 試験期間：day 225まで, 測定項目：生存率
結果	各投与群における生存期間中央値は, 対照群が43日, オビヌツズマブを投与した第2群が121.5日, リツキシマブを投与した第3群が93.5日, オファツムマブを投与した第4群が76日であり, 抗体投与群では, いずれも溶媒投与群に比べ有意に生存期間中央値の延長が認められた (Pairwise Log-Rank Test, いずれも $P < 0.0001$)。オビヌツズマブ投与群が最も長い生存期間を示したが, 抗ヒト CD20抗体を投与した3群間に統計学的な有意差は認められなかった。

2.6.3.2.5.3 濾胞性リンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果

(1) RL 細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 - オビヌツズマブとリツキシマブ

資料番号	4.2.1.1-51
タイトル	Anti-Tumor Activity of RO5072759 (GA101), Compared to Rituximab against the Human RL Follicular NHL S.C. Xenograft Model in SCID Mice
試験方法	腫瘍細胞：RL 細胞 細胞移植：1匹あたり 1×10^6 個を腹部皮下に移植 移植動物：SCID マウス 群割り付け：day 17 (移植日 day 0), n = 10 (第5群は n = 7) 第1群) 溶媒投与, 第2~4群) オビヌツズマブ (順に 10, 30, 100 mg/kg) 投与, 第5群) リツキシマブ (30 mg/kg) 投与 投与経路：i.v., 投与間隔：1週間に2回, 計5回, 投与日：day 17, 20, 24, 27, 31 試験期間：day 41まで, 測定項目：腫瘍体積
結果	オビヌツズマブを投与した第2~4群の day 34における TGI は, 順に25%, 75%, 85%であり, 高用量投与群で強い腫瘍増殖抑制活性が認められた。リツキシマブを 30 mg/kg 投与した第5群の TGI は43%であった。また, 腫瘍の完全退縮は, オビヌツズマブを投与した第3群及び第4群において, 各々30%, 10%の個体で認められた。

(2) RL 細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果 - オビヌツズマブ, リツキシマブ及びオフアツムマブ

資料番号	4.2.1.1-52
タイトル	Anti-Tumor Activity of RO5072759 (GA101), Compared to Rituximab or Ofatumumab with or without Normal Human Leucocytes against the Human RL NHL S.C. Xenograft Model Sensitive or Resistant to Rituximab in SCID Mice
試験方法	腫瘍細胞：RL 細胞 細胞移植：1匹あたり 1×10^7 個を腹部皮下に移植 移植動物：SCID マウス 群割り付け：day 14 (移植日 day 0), 各群 n = 10 第1群) 溶媒投与, 第2群) リツキシマブ (30 mg/kg) 投与, 第3群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) 投与 第4群) オフアツムマブ (100 mg/kg) 投与 ヒト白血球添加等を検討した第5群以降は省略 投与経路：i.p., 投与間隔：週1回, 投与日：day 14, 21, 28, 35 試験期間：day 42まで, 測定項目：腫瘍体積
結果	オビヌツズマブ投与群の TGI (day 28) は82%, リツキシマブ投与群では62%, オフアツムマブ投与群では58%であった。オビヌツズマブは, リツキシマブ, オフアツムマブに比べ, 強い腫瘍増殖抑制活性を示した。

2.6.3.2.5.4 バーキットリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果

(1) Raji 細胞株播種性増殖モデル

資料番号	4.2.1.1-53
タイトル	Evaluation of the Anti-Tumor Activity of RO5072759 (GA101) and Rituximab (MabThera) against Raji NHL Cells after I.V. Transplantation into Female SCID Beige Mice (Survival Model)
試験方法	腫瘍細胞：Raji 細胞 細胞移植：1匹あたり 1×10^6 個を尾静脈から移植 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 4（移植日 day 0），各群 n = 14 第1群）溶媒投与，第2～4群）リツキシマブ（順に1, 10, 30 mg/kg）投与， 第5～7群）オビヌツズマブ（順に1, 10, 30 mg/kg）投与 投与経路： <i>i.v.</i> ，投与回数：計4回投与，投与日：day 4, 6, 11, 14 試験期間：day 104まで，測定項目：生存率
結果	リツキシマブを投与した第2～4群での生存期間中央値は，順に40日，45.5日，69.5日であり，用量の増加に伴って生存期間の延長が認められた。オビヌツズマブを投与した第5～7群では，用量との関係は認められないものの，順に75日，52.5日，67.5日であり，生存期間の延長が認められた。両抗体の各投与群において，実験最終日に生存していた個体比率は，14%～50%であり，投与量との関係は認められなかった。

(2) Raji 細胞株皮下移植モデル

資料番号	4.2.1.1-54
タイトル	Evaluation of the Antitumor Activity of Rituximab (MabThera) and RO5072759 (GA101) in the Human Raji NHL Advanced Xenograft S.C. Model in SCID Beige Mice
試験方法	腫瘍細胞：Raji 細胞 細胞移植：1匹あたり 5×10^6 個を腹部皮下に移植 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 14（移植日 day 0），各群の平均腫瘍体積 $265 - 276 \text{ mm}^3$ ， 各群 n = 10 第1群）溶媒投与，第2～4群）リツキシマブ（順に1, 10, 30 mg/kg）投与， 第5～7群）オビヌツズマブ（順に1, 10, 30 mg/kg）投与 投与経路： <i>i.v.</i> ，投与間隔：週1回，計3回投与，投与日：day 14, 21, 27 試験期間：day 28まで，測定項目：腫瘍体積
結果	リツキシマブを投与した第2～4群の day 28における TGI は，順に50%，74%，90%であり，オビヌツズマブを投与した第5～7群の TGI は，順に64%，99%，90%であり，両抗体は，同程度の腫瘍増殖抑制活性を示した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当なし。

2.6.3.4 安全性薬理試験

試験項目	試験系	投与期間/ 投与方法	投与量 (mg/kg/週)	結果	資料番号
中枢神経系					
一般状態	カニクイザル 雌雄各3~5例/群	13週間 静脈内投与	0, 10, 30, 100	影響なし	4.2.3.2-2
一般状態 神経行動 学的検査	カニクイザル 雌雄各6例/群	26週間 静脈内投与	0, 5, 25, 50	影響なし	4.2.3.2-3
心血管系					
心電図 血圧	カニクイザル 雌雄各3~5例/群	13週間 静脈内投与	0, 10, 30, 100	影響なし	4.2.3.2-2
心拍数	カニクイザル 雌雄各6例/群	26週間 静脈内投与	0, 5, 25, 50	影響なし	4.2.3.2-3
呼吸器系					
呼吸数	カニクイザル 雌雄各6例/群	26週間 静脈内投与	0, 5, 25, 50	影響なし	4.2.3.2-3

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.3.5.1 共存する化学療法薬の影響 (*in vitro*)

(1) ADCC 活性に対するプレドニゾロンの影響

資料番号	4.2.1.4-1
タイトル	Preclinical Study Report RO5072759 (GA101) NK Cell Activity after Pre-treatment with Prednisolone
試験方法	プレドニゾロン1, 10, 100 µg/mL 存在下で22.5時間前処理したヒト由来 PBMC をエフェクター細胞とし、カルセイン標識 Raji 細胞を標的細胞として、オビヌツズマブ存在下で4時間培養後、培養上清への LDH 放出及び細胞中残存カルセインを測定した。また、NK92 LC3 E11細胞株 (ヒト FcγRIIIa 遺伝子導入 NK-92細胞) を、プレドニゾロン1, 10, 100 µg/mL 存在下で24時間又は48時間前処理後、オビヌツズマブ固相化プレート中で3時間培養し、エステラーゼ放出量を測定した。
結果	高濃度のプレドニゾロンは、オビヌツズマブによる ADCC 活性及び NK 細胞によるエステラーゼ放出に抑制作用を示した。低濃度 (1 µg/mL) での作用は軽微であった。

(2) ADCC 活性に対するクロラムブシルの影響

資料番号	4.2.1.4-2
タイトル	Chlorambucil does not Impact ADCC Mediated by GA101 (RO5072759) and Rituximab
試験方法	クロラムブシル (5 nmol/L, 5 µmol/L) 存在下で20時間処理したヒト由来 PBMC をエフェクター細胞とし、Raji 細胞を標的細胞として、オビヌツズマブ又はリツキシマブ存在下で4時間培養した後に、培養上清への LDH 放出を測定した。
結果	クロラムブシルで前処理した PBMC は、対照 PBMC と同程度の ADCC 活性を示した。両抗体の ADCC 活性に対するクロラムブシルの影響は認められなかった。

(3) B 細胞減少作用及び NK 細胞活性化に対する PI3キナーゼ阻害薬の影響

資料番号	4.2.1.4-3
タイトル	Investigation of the Effects of PI3K Inhibitors on GA101 (RO5072759)-Mediated B cell Depletion
試験方法	ヒト由来 PBMC を PI3K 阻害薬 BEZ-235又は Ly294002共存下 (0~100 µmol/L) にて1時間前培養後、PI3K 阻害薬存在下で PBMC 中の B 細胞を標的として、オビヌツズマブ (1 µg/mL) の ADCC 活性を測定した。また、CD107a の発現 (脱顆粒) をマーカーとして NK 細胞の活性化に対する影響を検討した。
結果	両 PI3K 阻害薬は、用量依存的にオビヌツズマブによる B 細胞減少作用を抑制した。また、両 PI3K 阻害薬は、CD107a をマーカーとする NK 細胞活性化を用量依存的に抑制した。

(4) 細胞死誘導に対する Bcl-2阻害薬の影響

資料番号	4.2.1.4-4
タイトル	Investigation of Additive/Synergistic Cell Death Induction of GA101 Antibody (RO5072759) and the Bcl-2 Inhibitors ABT-737 and ABT-263
試験方法	ヒト NHL 細胞株 (Raji, Z-138及び SU-DHL-4) を, オビヌツズマブ (0.1, 10 µg/mL) 及び Bcl-2阻害薬 (ABT-737又は ABT-263) 共存下で72時間培養後, Annexin V 及び PI で細胞を標識し, フローサイトメーターを用いて測定した。
結果	オビヌツズマブと Bcl-2阻害薬を併用したところ, Z-138細胞及び SU-DHL-4細胞において, 細胞死誘導活性の増強が認められた。Raji 細胞では明確な増強作用は認められなかった。

2.6.3.5.2 *In vivo* における化学療法薬との併用効果

(1) シクロホスファミド, ビンクリスチン, ドキソルビシンとの併用

資料番号	4.2.1.4-5
タイトル	Antitumor Activity of RO5072759 (GA101) or Rituximab in Combination with Cyclophosphamide/Vincristine against WSU-DLCL2 Lymphoma Xenografts in Female SCID Beige Mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：WSU-DLCL2細胞 細胞移植：1匹あたり2×10^6個を腹部皮下に移植 (Matrigel 使用) 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 9 (移植日 day 0), 各群の平均腫瘍体積$112 - 115 \text{ mm}^3$, 各群 n = 10 第1群) 溶媒投与, 第2群) リツキシマブ (30 mg/kg) 投与, 第3群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) 投与, 第4群) シクロホスファミド (25 mg/kg) + ビンクリスチン (0.25 mg/kg) 投与 第5群) シクロホスファミド (25 mg/kg) + ビンクリスチン (0.25 mg/kg) + オビヌツズマブ (30 mg/kg) 投与 第6群) シクロホスファミド (25 mg/kg) + ビンクリスチン (0.25 mg/kg) + リツキシマブ (30 mg/kg) 投与 第5, 6群の抗体は, 化学療法薬投与の24時間後に投与, 第7~10群 (2次治療効果検討群) に関する記載は省略した。 投与経路：i.v., 投与間隔：週1回, 計8回投与, 投与日：day 9, 15, 23, 30, 37, 44, 51, 58 (各薬物の投与経路, 投与スケジュールは共通), 試験期間：day 64まで, 測定項目：腫瘍体積</p>
結果	あらかじめ設定した腫瘍体積 (1500 mm^3) に達するまでの日数について, 溶媒を投与した第1群 (30.5日) と各投与群を比較したところ, 第2~6群は第1群よりも, それぞれ13日, 19日, 14日, 38日, 28日延長した。

(2) シクロホスファミドとの併用

資料番号	4.2.1.4-6
タイトル	Anti-Tumor Activity of RO5072759 (GA101) or Rituximab Combined to Cyclophosphamide against the Human RL NHL S.C. Xenograft Model in Female SCID Mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：RL 細胞</p> <p>細胞移植：1匹あたり1×10^6個を腹部皮下に移植</p> <p>移植動物：SCID マウス</p> <p>群割り付け：day 31 (移植日 day 0), 各群 n = 9 (第3群及び第4群は n = 5)</p> <p>第1群) 溶媒投与, 第2群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) 投与</p> <p>第3群) リツキシマブ (30 mg/kg) 投与</p> <p>第4群) シクロホスファミド (50 mg/kg) 投与</p> <p>第5群) リツキシマブ (30 mg/kg) + シクロホスファミド (50 mg/kg) 投与</p> <p>第6群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) + シクロホスファミド (50 mg/kg) 投与</p> <p>第7群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) + リツキシマブ (30 mg/kg) 投与</p> <p>投与経路：i.v., 投与間隔：週1回, 計4回投与, 投与日：day 31, 38, 45, 52 (各薬物の投与経路, 投与スケジュールは共通)</p> <p>試験期間：day 70まで, 測定項目：腫瘍体積</p>
結果	<p>第1群を対照とした第2～4群の day 42における TGI は, 順に79%, 35%, 93%であった。また, 第3群を対照とした第5群の day 42における TGI は83%, 第2群を対照とした第6群の day 56における TGI は94%であった。また, day 56での第4群及び第6群の腫瘍体積中央値は, それぞれ830, 153 mm³であった。</p>

(3) ドキソルビシンとの併用

資料番号	4.2.1.4-7
タイトル	Antitumor Activity of RO5072759 (GA101) or Rituximab in Combination with Doxorubicin against RL-NHL Xenografts in Female SCID Beige Mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：RL 細胞</p> <p>細胞移植：1匹あたり1×10^6個を腹部皮下に移植</p> <p>移植動物：SCID ベージュマウス</p> <p>群割り付け：day 14 (移植日 day 0), 腫瘍体積中央値約142 mm³, 各群 n = 10</p> <p>第1群) 溶媒投与, 第2群) ドキソルビシン (3 mg/kg) 投与</p> <p>第3群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) 投与</p> <p>第4群) オビヌツズマブ (60 mg/kg) 投与</p> <p>第5群) リツキシマブ (30 mg/kg) 投与, 第6群) リツキシマブ (60 mg/kg) 投与</p> <p>第7群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) + ドキソルビシン (3 mg/kg) 投与</p> <p>第8群) リツキシマブ (30 mg/kg) + ドキソルビシン (3 mg/kg) 投与</p> <p>第9群) オビヌツズマブ (30 mg/kg) + リツキシマブ (30 mg/kg) 投与</p> <p>投与経路：i.v., 投与間隔：週1回, 計5回投与, 投与日：day 14, 21, 28, 36, 42 (各薬物の投与経路, 投与スケジュールは共通)</p> <p>試験期間：day 49まで, 測定項目：腫瘍体積</p>
結果	<p>ドキソルビシン投与の第2群を対照とした第3～9群の day 49での TGI は, 順に71%, 48%, -7%, 15%, 89%, 78%, 51%であり, オビヌツズマブ + ドキソルビシン併用の第7群が最も強い腫瘍増殖抑制効果を示したが, 第7群, 第3群 (オビヌツズマブ単独投与) 及び第8群 (リツキシマブ + ドキソルビシン併用) の間で有意な差は認められなかった。</p>

(4) ベンダムスチンとの併用

資料番号	4.2.1.4-8
タイトル	Evaluation of Antitumor Activity of CD20 Antibody RO5072759 (GA101) and Bendamustine (Ribomustin®) and their Combination against Z138-NHL Xenografts after S.C. Transplantation in Female SCID Beige Mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：Z-138細胞</p> <p>細胞移植：1匹あたり5×10^6個を腹部皮下に移植（Matrigel 使用）</p> <p>移植動物：SCID ベージュマウス</p> <p>群割り付け：day 19（移植日 day 0），各群の平均腫瘍体積$436 - 444 \text{ mm}^3$，各群 n = 10</p> <p>第1群）溶媒投与，第2群）オビヌツズマブ（1 mg/kg）投与</p> <p>第3群）リツキシマブ（1 mg/kg）投与，第4群）ベンダムスチン（3 mg/kg）投与</p> <p>第5群）オビヌツズマブ（1 mg/kg） + ベンダムスチン（3 mg/kg）投与</p> <p>第6群）リツキシマブ（1 mg/kg） + ベンダムスチン（3 mg/kg）投与</p> <p>薬物投与：オビヌツズマブ及びリツキシマブ（<i>i.p.</i>， day 19, 26投与，計2回）</p> <p>ベンダムスチン（<i>i.p.</i>， day 19, 20, 21, 22連日投与，計4回）</p> <p>試験期間：day 33まで，測定項目：腫瘍体積</p>
結果	<p>第2～6群の day 33における TGI は，第1群を対照として順に47%，29%，0%，72%，42%であった。オビヌツズマブ + ベンダムスチン併用の第5群は，各単独投与群（第2～4群）と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を示した（Turkey-Kramer 検定，$P < 0.05$）。リツキシマブ + ベンダムスチン併用の第6群では，第4群以外の各単独投与群との間に有意な差は認められなかった。</p>

(5) フルダラビンとの併用

資料番号	4.2.1.4-9
タイトル	Antitumor Activity of RO5072759 (GA101) or Rituximab in Combination with Fludarabine (Fludarabinmedac®) against Subcutaneously Implanted Z138 Xenografts in Female SCID Beige Mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：Z-138細胞</p> <p>細胞移植：1匹あたり5×10^6個を腹部皮下に移植（Matrigel 使用）</p> <p>移植動物：SCID ベージュマウス</p> <p>群割り付け：day 22（移植日 day 0），各群の腫瘍体積中央値$399 - 416 \text{ mm}^3$，各群 n = 10，</p> <p>第1群）溶媒投与，第2群）オビヌツズマブ（1 mg/kg）投与</p> <p>第3群）リツキシマブ（1 mg/kg）投与，第4群）フルダラビン（40 mg/kg）投与</p> <p>第5群）オビヌツズマブ（1 mg/kg） + フルダラビン（40 mg/kg）投与</p> <p>第6群）リツキシマブ（1 mg/kg） + フルダラビン（40 mg/kg）投与</p> <p>薬物投与：オビヌツズマブ及びリツキシマブ（<i>i.v.</i>， day 22, 29投与，計2回），フルダラビン（<i>i.p.</i>， day 22, 23, 24連日投与，計3回）</p> <p>試験期間：day 44まで，測定項目：腫瘍体積</p>
結果	<p>第2～6群の day 36における TGI は，第1群を対照として順に86%，60%，50%，> 100%，85%であった。また，day 43における腫瘍の完全退縮例は，第2群に1匹，第5群に3匹であったが，第3群と第6群には認められなかった。</p>

(6) クロラムブシルとの併用

資料番号	4.2.1.4-10
タイトル	Antitumor Activity of RO5072759 (GA101) or Rituximab in Combination with Chlorambucil (Leukeran [®]) against Subcutaneously Implanted Z138 Xenografts in Female SCID Beige Mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：Z-138細胞 細胞移植：1匹あたり5×10^6個を腹部皮下に移植（Matrigel 使用） 移植動物：SCID ベージュマウス 群割り付け：day 27（移植日 day 0），各群の平均腫瘍体積$293 - 319 \text{ mm}^3$，各群 n = 8 第1群）溶媒投与，第2群）オビヌツズマブ（1 mg/kg）投与， 第3群）リツキシマブ（1 mg/kg）投与， 第4群）クロラムブシル（4 mg/kg）投与， 第5群）オビヌツズマブ（1 mg/kg） + クロラムブシル（4 mg/kg）投与 第6群）リツキシマブ（1 mg/kg） + クロラムブシル（4 mg/kg）投与 薬物投与：オビヌツズマブ及びリツキシマブ（<i>i.p.</i>， day 27, 34投与，計2回）， クロラムブシル（<i>i.p.</i>， day 27, 28, 29連日投与，計3回） 試験期間：day 41まで，測定項目：腫瘍体積</p>
結果	<p>第2～6群の day 41における TGI は，第1群を対照として順に74%，44%，29%，103%，88%であった。オビヌツズマブ + クロラムブシル併用の第5群は，リツキシマブ単独投与の第3群及びクロラムブシル単独投与の第4群よりも統計学的に有意に強い腫瘍増殖抑制効果を示したが（Tukey-Kramer 検定, $P < 0.05$），オビヌツズマブ単独投与の第2群及びリツキシマブ + クロラムブシル併用の第6群との間に有意な差は認められなかった</p>