サノフィ株式会社

サークリサ点滴静注 100mg／同点滴静注 500mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.1 緒言

Total number of pages: 7

目　　次

2.6.1 緒言 1

目　　次 2

図　目　次 3

略号と用語の定義 4

1　　イサツキシマブの構造と薬理学的性質 5

2　　イサツキシマブの臨床適応 7

図　目　次

図 1 - イサツキシマブの構造図.....5

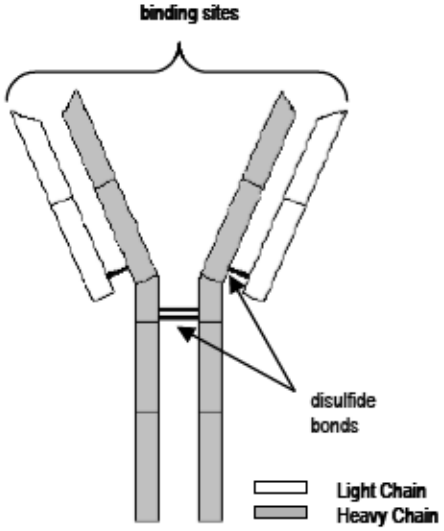
略号と用語の定義

ADCC:	抗体依存性細胞傷害（Antibody-dependent cellular cytotoxicity）
ADCP:	抗体依存性細胞貪食（Antibody-dependent cellular phagocytosis）
C1:	サイクル 1（Cycle 1）
[redacted]	[redacted]
CD:	分化抗原群（Cluster of differentiation）
CDC:	補体依存性細胞傷害（Complement-dependent cytotoxicity）
Da:	ダルトン（Dalton）
IgG1:	免疫グロブリン G1（Immunoglobulin G1）
IV:	静脈内（Intravenous）
KD:	解離定数（Dissociation constant）
MM:	多発性骨髄腫（Multiple myeloma）
NK:	ナチュラルキラー（Natural killer）
PBMC:	末梢血単核球（Peripheral blood mononuclear cells）
Q2W:	2 週間に 1 回（Once biweekly）
QW:	1 週間に 1 回（Once weekly）

1　イサツキシマブの構造と薬理学的性質

イサツキシマブ（SAR650984）のタンパク質の構造は、分子量が約 [redacted]kDa のκ型Ｌ鎖２本及び分子量が約 [redacted]kDa（糖鎖非修飾での分子量）の IgG1 Ｈ鎖２本からなり、これらはジスルフィド架橋で結合している。各Ｌ鎖は 214 個のアミノ酸残基で、各Ｈ鎖は 450 個のアミノ酸残基で構成されている。イサツキシマブの分子量は約 150000 Da である（糖鎖修飾体での分子量）。

図 1 - イサツキシマブの構造図



イサツキシマブは非経口投与用製剤として、無菌で発熱性物質を含まない無色～微黄色の静脈内投与用 20 mg/mL 濃縮液（申請製法*）注射剤として供給される。

イサツキシマブは分化抗原群 38（CD38）を標的とする。 CD38 は血液悪性腫瘍において様々な頻度及びレベルで発現することが見出されている。多発性骨髄腫（MM）細胞は、全ての血液悪性腫瘍中で CD38 を最も高く発現する。イサツキシマブは腫瘍細胞上の CD38 に結合するが、フローサイトメトリーで測定した見かけの解離定数（KD）は 0.12 nmol/L であった。

イサツキシマブは、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞貪食（ADCP）、補体依存性細胞傷害（CDC）、及び直接的アポトーシスを含むいくつかの機序により、*in vitro* で CD38 発現腫瘍細胞を破壊することができる。イサツキシマブ非臨床モデルでの *in vitro* 及び *in vivo* 抗腫瘍活性及び原発性がん細胞に対するその *ex vivo* 抗腫瘍活性は、MM 患者での臨床評価の結果を支持している。

＊新薬承認情報提供時に置換

CD38 は、B 細胞、T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞及び単球を含む正常な免疫細胞においても発現している。イサツキシマブは、試験したいかなる条件下でも、正常ヒト末梢血単核球（PBMC）によるサイトカインの有意な放出を誘導しなかった。

イサツキシマブ単独又は固定化抗 CD3 抗体（1 及び 10 µg/mL）の存在下では、チミジン取り込みによって測定した PBMC の増殖に有意な作用は認められなかった。イサツキシマブの *in vitro* での PBMC の細胞減少に対する影響は、あったとしてもごく僅かであった。PBMC を調べたところ、イサツキシマブは、3 人のドナーのうち 2 人の NK 細胞のアポトーシスを誘導したが、B 細胞、T 細胞及び単球は影響を受けなかった。

2　イサツキシマブの臨床適応

イサツキシマブは、少なくともプロテアソーム阻害剤及びレナリドミドの 2 つを含む治療歴を有する多発性骨髄腫患者の治療でポマリドミド及びデキサメタゾンと併用して用いる。

イサツキシマブの投与経路は、医療施設で実施する必要のある静脈内（IV）注入である。イサツキシマブの投与スケジュールは、10 mg/kg を最初の治療サイクル（C1）は週 1 回（QW）で 1 日目、8 日目、15 日目、22 日目に、以降のサイクル（C2+）では 2 週間に 1 回（Q2W）の 1 日目及び 15 日目に投与する。

サノフィ株式会社

サークリサ点滴静注 100mg／同点滴静注 500mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 69

目　　次

2.6.2 薬理試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 5

図　目　次 6

略号と用語の定義 8

1　　まとめ 10

2　　効力を裏付ける試験 13

2.1　　イサツキシマブの選択理由及び生化学的特性 13

2.2　　腫瘍細胞株に対するイサツキシマブの *in vitro* 活性 13

2.2.1　　抗体依存性貪食 13

2.2.2　　抗体依存性細胞傷害 14

2.2.3　　補体依存性細胞傷害 14

2.2.4　　アポトーシス 15

2.3　　MM 患者由来初代細胞に対するイサツキシマブの *ex vivo* 活性 16

2.4　　イサツキシマブ／ポマリドミド併用による抗 MM 活性 17

2.4.1　　In vitro 17

2.4.2　　In vivo 18

2.4.2.1　　イサツキシマブ単剤での薬理活性 18

2.4.2.2　　イサツキシマブとポマリドミドを併用したときの薬理活性 19

2.5　　イサツキシマブの免疫調節活性 20

2.5.1　　NK 細胞及び単球 20

2.5.2 制御性 T 細胞 23

2.6 イサツキシマブの 製法 I＊ 製剤と 申請製法＊ 製剤の比較 25

2.6.1 In vitro 25

2.6.2 In vivo 27

2.7 イサツキシマブとダラツムマブの比較 28

2.7.1 イサツキシマブとダラツムマブのアミノ酸配列の比較 28

2.7.2 イサツキシマブとダラツムマブのエピトープの比較 29

2.7.3 イサツキシマブとダラツムマブの ADCC 活性の比較 30

2.7.4 イサツキシマブとダラツムマブの CDC 活性の比較 31

2.7.5 イサツキシマブとダラツムマブの赤血球への結合の比較 31

2.7.6 イサツキシマブとダラツムマブのアポトーシス促進活性の比較 32

2.7.7 イサツキシマブとダラツムマブの CD38 酵素活性阻害作用の比較 33

3 副次的薬理試験 36

3.1 正常ヒト組織におけるヒト CD38 タンパク質発現及びイサツキシマブの組織交差反応性 36

3.1.1 正常ヒト組織におけるイサツキシマブの GLP 適用組織交差反応性試験 36

3.1.2 正常ヒト組織におけるイサツキシマブの GLP 非適用組織交差反応性試験 37

3.2 CD38 及びヒト血液細胞 39

3.2.1 イサツキシマブの正常末梢血細胞への結合 39

3.2.2 正常末梢血単核球における CD38 発現量の測定 41

3.3 ヒトの正常血液細胞におけるイサツキシマブの作用の評価 41

3.3.1 正常ヒト末梢血細胞によるサイトカイン放出に対するイサツキシマブの作用の評価 41

3.3.2 末梢血単核球の増殖に対するイサツキシマブの作用の評価 44

3.3.2.1 CFDA アッセイ（フルオレセイン由来色素） 44

3.3.2.2 固定化イサツキシマブを用いたトリチウムチミジンアッセイ 45

3.3.2.3 可溶性イサツキシマブを用いたトリチウムチミジンアッセイ 46

3.3.3 末梢血単核球減少及びアポトーシスに対するイサツキシマブの作用の評価 46

＊新薬承認情報提供時に置換

3.4 イサツキシマブの非臨床評価に適していると考えられる動物種の特定 49
3.4.1 CD38 相同分子種の検討及びヒト配列との比較 49
3.4.2 サル及びマウスの細胞を用いたイサツキシマブの親和性試験 50
3.4.2.1 カニクイザル末梢血単核球におけるイサツキシマブの親和性試験 50
3.4.2.2 マウス脾臓細胞におけるイサツキシマブの親和性試験 51
3.4.3 動物組織におけるイサツキシマブの組織交差反応性試験（IHC 法） 52
3.4.4 トランスジェニックモデルを用いたアプローチ 54
3.4.5 可能性のあるサル反応性サロゲート抗体の作製 54
3.4.5.1 カニクイザルの細胞への ch38SB25 及び chOKT10 の結合の評価、並びにヒト腫瘍細胞株に対するそれらの *in vitro* 活性の評価 55
3.4.5.2 サル組織における ch38SB25 及び chOKT10 を用いた CD38 抗原の組織交差反応（IHC 法） 59

4 安全性薬理試験 62

5 薬力学的薬物相互作用試験 63

6 考察及び結論 64

7 図表 67

参 考 文 献 68

表 目 次

表 1 - 細胞株 LP-1、MOLP-8 及び NCI-H929 に対するイサツキシマブの *in vitro* 活性 16

表 2 - 細胞株 Ramos、SU-DHL-8 及び DND-41 に対するイサツキシマブの *in vitro* 活性 16

表 3 - イサツキシマブ 製法Ⅰ* 製剤及び 申請製法* 製剤週 2 回投与の SU-DHL-8 ヒトリンパ腫移植 SCID マウスにおける抗腫瘍活性比較 27

表 4 - イサツキシマブとダラツムマブの OCI-LY19.CD38、U266.CD38 及び DND-41 細胞株に対する CDC 活性の比較 31

表 5 - イサツキシマブで評価したヒト組織（GLP 適用組織交差反応性試験） 36

表 6 - イサツキシマブで評価したヒト組織（GLP 非適用組織交差反応性試験） 38

表 7 - 新鮮凍結正常ヒト組織におけるイサツキシマブ結合（リンパ組織以外） 39

表 8 - 正常ヒト PBMC の 1 細胞あたりに結合する CD38 及び CD20 抗体数 41

表 9 - 異なる動物種におけるオーソログデータ 50

表 10 - カニクイザル PBMCs におけるイサツキシマブ及び ch38SB25v 染色 51

表 11 - マウス脾臓リンパ球におけるイサツキシマブ染色 52

表 12 - イサツキシマブの組織交差反応性試験（IHC 法）を実施した動物組織一覧 53

表 13 - ヒト腫瘍細胞株に対するイサツキシマブ、ch38SB25 及び chOKT10 の *in vitro* 活性 58

表 14 -カニクイザル組織における ch38SB25 及び chOKT10 の組織交差反応性（IHC 法）及び正常ヒト組織におけるイサツキシマブ染色結果との比較 60

表 15 - 新鮮凍結正常ヒト組織におけるイサツキシマブ染色（リンパ組織以外） 66

＊新薬承認情報提供時に置換

図　目　次

図 1 - IMiDs と併用した場合のイサツキシマブの抗 MM 活性 18

図 2 - 腫瘍体積中央値 19

図 3 - MOLP-8 腫瘍を皮下移植した雌 NSG マウスにイサツキシマブ単独（40 mg/kg を週 2 回）あるいはポマリドミド併用（10 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間）投与した場合の効果 20

図 4 - イサツキシマブに誘導され 初代 NK 細胞から放出された IFN-γ 及び TNF-α 21

図 5 - NK-92 細胞（上図）及び健康ドナーの血液から単離した初代 NK 細胞（下図）による K562 細胞溶解活性へのイサツキシマブの作用 22

図 6 - ヒト単球 M1/M2 極性化に対するイサツキシマブの作用 23

図 7 - 健康ドナー由来 Treg と Tcon 細胞における $CD38^{high}$ サブセット発現割合（左図）及び MM 患者と健康ドナーにおける $CD38^{high}$ Treg 細胞の割合（右図） 24

図 8 - Treg 細胞による Tcon 細胞増殖抑制に対するイサツキシマブの作用 24

図 9 - イサツキシマブ 製法Ⅰ* 製剤及び 申請製法* 製剤の LP-1 細胞に対する ADCC 活性比較 26

図 10 - イサツキシマブ 製法Ⅰ* 製剤及び 申請製法* 製剤（1 µg/mL）の LP-1、MOLP-8 及び SU-DHL-8 細胞に対する ADCP 活性比較 26

図 11 - イサツキシマブ 製法Ⅰ* 製剤及び 申請製法* 製剤の MOLP-8 細胞における NAD から cADPR への変換阻害活性比較 27

図 12 - イサツキシマブとダラツムマブの L 鎖可変領域（上図）及び H 鎖可変領域（下図）のアミノ酸配列比較（一致アミノ酸残基を灰色背景、相補性決定領域アミノ酸残基を下線付き太字で示した） 29

図 13 - CD38 タンパク質表面のイサツキシマブ（青）、ダラツムマブ（赤）及び共通（赤紫）のエピトープ 30

図 14 - イサツキシマブとダラツムマブの LP-1 細胞に対する ADCC 活性の比較 30

図 15 - イサツキシマブとダラツムマブの CD38 発現がん細胞株への結合比較 32

図 16 - イサツキシマブとダラツムマブの 3 名のドナー由来赤血球への結合比較 32

図 17 - イサツキシマブとダラツムマブの CD38 発現 RPMI-8226.CD38 細胞に対するアポトーシス促進活性の比較 33

＊新薬承認情報提供時に置換

図 18 - イサツキシマブとダラツムマブの CD38 酵素活性に対する作用の比較（LP-1 細胞[上図]及び RPMI-8226 細胞[下図]による cADPR 合成） 35

図 19 - 正常ヒト CD14+単球及び CD3+T 細胞に対するイサツキシマブ結合親和性 40

図 20 - 正常ヒト WBC による IFN-γ、TNF-α 及び IL-6 放出の ELISpot アッセイ 43

図 21 - 正常ヒト PBMC による IFN-γ、TNF-α 及び IL-6 放出の ELISpot アッセイ 43

図 22 - 5 日間の抗体処理による PBMC 活性化 45

図 23 - ドナーKP083411 の WBC を用いた 1 時間細胞減少アッセイ 47

図 24 - ドナーKP083411 の全血を用いた 1 時間細胞減少アッセイ 47

図 25 - PBMC から単離したサブポピュレーション細胞又は Ramos 細胞を用いたアネキシン V アッセイ 48

図 26 - カニクイザル CB1 細胞株及び Ramos 細胞株に対する抗 CD38 抗体の結合 55

図 27 - 3 種類の CD38+ヒト腫瘍細胞株に対する抗 CD38 抗体の ADCC 活性用量反応曲線 56

図 28 - 3 種類の CD38+ヒト腫瘍細胞株に対する抗 CD38 抗体の CDC 活性用量反応曲線 57

図 29 - 3 種類の CD38+ヒト腫瘍細胞株に対する抗 CD38 抗体のアポトーシス促進活性 57

略号と用語の定義

Ab:	抗体（Antibody）
ABC:	1 細胞あたりに結合する抗体数（Antibodies bound per cell）
ADCC:	抗体依存性細胞傷害（Antibody-dependent cellular cytotoxicity）
ADCP:	抗体依存性細胞貪食（Antibody-dependent cellular phagocytosis）
ADPR:	アデノシン二リン酸リボース（Adenosine diphosphate ribose）
AF488:	Alexafluor 488
B-ALL:	B 細胞性急性リンパ性白血病（B-acute lymphocytic leukemia）
B-CLL:	B 細胞性慢性リンパ性白血病（B-chronic lymphocytic leukemia）
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
cADPR:	環状アデノシン二リン酸リボース（Cyclic adenosine diphosphate ribose）
CBA:	サイトメトリックビーズアレイ（Cytometry bead array）
CDC:	補体依存性細胞傷害（Complement-dependent cytotoxicity）
CFDA:	カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル（5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate）
cGDPR:	環状グアノシン二リン酸リボース（Cyclic guanosine diphosphate ribose）
cnt:	対照（Control）
conc:	濃度（Concentration）
cpm:	１分あたりカウント数（Count per minute）
DLBCL:	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（Diffuse large B-cell lymphoma）
E:T :	エフェクター：標的細胞比（Effector to target cell ratio）
E:	エフェクター（Effector）
EC_{50} :	50%効果濃度（Half maximal effective concentration）
ECG:	心電図（Electrocardiogram）
FITC:	フルオレセインイソチオシアネート（Fluorescein isothiocyanate）
GLP:	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practices）
hIgG:	ヒト免疫グロブリン G（Human immunoglobulin G）
ICH:	医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonization）
IFN-γ:	インターフェロンγ（Interferon-γ）

IgG1:	免疫グロブリン G1（Immunoglobulin G1）
IHC:	免疫組織化学（Immunohistochemistry）
IL:	インターロイキン（Interleukin）
IMiDs:	免疫調節薬（Immunomodulatory imide drugs）
IV:	静脈内（Intravenous）
KD:	解離定数（Dissociation constant）
len:	レナミリドミド（Lenalidomide）
mAb:	モノクローナル抗体（Monoclonal antibody）
MM:	多発性骨髄腫（Multiple myeloma）
NAD:	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（Nicotinamide adenine dinucleotide）
NGD:	ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド（Nicotinamide guanine dinucleotide）
NHL:	非ホジキンリンパ腫（Non-Hodgkin's lymphoma）
NK:	ナチュラルキラー（Natural killer）
NSG:	NOD SCID gamma
PBLs:	末梢血リンパ球（Peripheral blood lymphocytes）
PBMCs:	末梢血単核球（Peripheral blood mononuclear cells）
PBS:	リン酸緩衝生理食塩液（Phosphate buffered saline）
pom:	ポマリドミド（Pomalidomide）
RBCs:	赤血球（Red blood cells）
SCID:	重症複合免疫不全（Severe combined immunodeficient）
SEM:	標本平均の標準誤差（Standard error of mean）
T:	標的（Target）
T-ALL:	T 細胞性急性リンパ性白血病（T-acute lymphoblastic leukemia）
T/C:	腫瘍増殖抑制率（Tumor growth inhibition）
Tcon	通常型 T 細胞（conventional T cells）
TNF-α:	腫瘍壊死因子 α（Tumor necrosis factor alpha）
Treg:	制御性 T 細胞（Regulatory T cells）
VH:	H 鎖可変領域（Variable heavy）
VL:	L 鎖可変領域（Variable light）
WBC:	白血球（White blood cell）

1　まとめ

CD38 はグリコシル化された II 型膜タンパク質であり、受容体及び外酵素として機能する。受容体として、CD38 は CD31 リガンドと結合し、細胞接着及びシグナル伝達に関与する。シグナル伝達における CD38 の機能は、細胞系統や分化段階のほか、恐らく種々のコレセプターとの関連に応じて多岐にわたると考えられる(1)。外酵素として、CD38 は環状アデノシン二リン酸リボース（cADPR）のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）からの合成及びアデノシン二リン酸リボース（ADPR）への加水分解を触媒する(2)。これらの反応生成物は、カルシウム動員及び細胞内シグナル伝達に関与する。

ヒト CD38 は、通常、形質細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、マクロファージ、T 細胞、B 細胞及び樹状細胞といった種々の免疫細胞に発現する。また、CD38 は、多発性骨髄腫（MM）(3)を含むいくつかの B 細胞、T 細胞及び骨髄由来の血液悪性腫瘍に発現する。

イサツキシマブを MM 細胞に処理すると、直接的殺細胞、ヒト補体活性化による溶解（補体依存性細胞傷害［CDC］）、NK 細胞を介した溶解（抗体依存性細胞傷害［ADCC］）、マクロファージを介した溶解（抗体依存性貪食［ADCP］）及び CD38 発現腫瘍細胞のアポトーシスといった複数のメカニズムで細胞が死滅する。また、イサツキシマブは、CD38 の外酵素活性も阻害し、ニコチンアミドグアニンジクヌレオチド（NGD）及び NAD がそれぞれ環状グアノシン二リン酸リボース（cGDPR）及び cADPR に変換されるのを抑制する。

免疫細胞上に発現している CD38 にイサツキシマブが結合すると、免疫調節機能が誘導される。例えば、イサツキシマブによって NK 細胞が活性化され、溶解作用が促進される。また、イサツキシマブによって単球の M1 表現型への極性化が誘導されるとともに、制御性 T 細胞（Treg）で抑制されていた通常型 T 細胞（Tcon）の増殖能が回復する。

イサツキシマブは、免疫調節薬（IMiD）及びプロテアソーム阻害薬といった MM の標準治療薬の活性を増強させる。初代 MM 細胞及び MM 動物モデルの両方において、イサツキシマブとポマリドミドの併用投与により、各薬物の単独投与と比較して抗 MM 活性が増強した。

イサツキシマブの最初に開発された製剤バッチ「[redacted]、[redacted]、[redacted]」（製法 I＊、[redacted]mg/mL）と市販予定製剤バッチ「[redacted]、[redacted]、[redacted]」（申請製法＊、20 mg/mL）で生物学的活性を比較したところ、全ての *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験で同程度の作用が認められた。

＊新薬承認情報提供時に置換

イサツキシマブとダラツムマブ（ダラザレックス®）は、アミノ酸配列、エピトープ及びメカニズムに違いがあることが明らかになっている。具体的には、両剤は、CD38 発現腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導作用及び CD38 の外酵素活性に対する阻害作用の点で異なっている。

非臨床安全性評価を *in vivo* で行う際、事前に適切な動物種を特定する必要がある。したがって、イサツキシマブの非臨床安全性評価に適した動物種を特定するためいくつかの試験を実施した。これらの試験には、ヒトとさまざまな動物種との間のイサツキシマブ標的配列相同性の比較、並びにセルベースアッセイによる定性的（免疫組織化学［IHC］）及び定量的（フローサイトメトリー）種間比較がある。これらのアッセイで特定されたイサツキシマブの毒性評価に適した動物種は、チンパンジーのみであった。しかし、倫理的及び技術的理由により、チンパンジーは毒性評価に適した動物種ではないと考えられる。非臨床安全性評価に適した動物種が特定できなかったことから、トランスジェニックマウスモデル又は適切なサロゲート抗体の使用について検討した。イサツキシマブの非臨床開発時点において、適切なトランスジェニックマウスモデルは得られていなかった。したがって、そのようなモデルを用いた非臨床安全性試験は実施していない。その後、可能性のある 2 つのサルサロゲート抗体（ch38SB25 及び chOKT10）を作製したが、イサツキシマブと比較して生物学的作用が異なっており、また CD38 抗原分布はヒトとカニクイザルで異なることが示された。これらのことから、カニクイザルで ch38SB25 又は chOKT10 を使用して、ヒトにおけるイサツキシマブの安全性評価に適した予測データを得ることは難しいと結論された。

可能性のある標的器官を特定するため、正常ヒト組織を用いた GLP 適用組織交差反応性試験を実施した結果、イサツキシマブに特異的な結合が予想どおりリンパ組織（脾臓、胸腺、リンパ節及び扁桃）及び骨髄に検出されるとともに、下垂体（内皮細胞）及び前立腺（腺上皮細胞）にも検出された。また、イサツキシマブに特異的な結合は、多くの組織の浸潤又は常在円形細胞（肝臓のクッパー細胞を含む）にも検出された。イサツキシマブの別のバッチを用いた過去の GLP 非適用組織交差反応性試験では、脳（星状膠細胞）及び肺（気管支上皮）にも染色が認められたが、この GLP 試験では再現されなかった。また、気管支上皮の染色について追加試験を実施したところ、染色が認められたものの全てのドナーにではなく、CD38 タンパク質は主に腫瘍又は炎症環境で発現することが示唆された。非リンパ組織成分（前立腺、下垂体、肺、脳）の染色は交差反応性を示す証拠と解釈され、意図しない標的部位が存在する可能性が示唆された。

正常ヒト末梢血単核球（PBMC）を用いた *in vitro* アッセイにおいて、イサツキシマブはサイトカイン放出、細胞活性化及び細胞減少に対して有意な作用を示さなかった（ただし、検討した 3 名の健康ドナーのうち 2 名で精製 NK 細胞のアポトーシスを若干誘導した）。したがって、患者にイサツキシマブを投与しても重大なサイトカイン放出症候群が引き起こされる可能性は低いと考えられる。

最後に、カニクイザルは薬理反応を示す動物種ではないものの、一部の安全性薬理評価項目は、カニクイザルを用いたイサツキシマブの GLP 適用週 1 回反復静脈内投与毒性試験で評価した。この試験において、イサツキシマブに関連する心電図（ECG）パラメータ、血圧、肉眼的行動プロファイル（体温を含む）及び呼吸機能の変化は、試験最高用量の 100 mg/kg/週まで認められなかった。

2　効力を裏付ける試験

[Module 2.6.3 の 2 項]

2.1　イサツキシマブの選択理由及び生化学的特性

IMV23-011 試験 [Module 4.2.1.1-1]
IMV23-009 試験 [Module 4.2.1.1-2]

イサツキシマブは SAR650984 とも呼ばれ、マウス抗 CD38 抗体 mu38SB19 由来のものであるが、ヒト CD38 に特異的に結合し、見かけの解離定数（K_D）は 0.12 nmol/L であった。mu38SB19 の CD38 発現腫瘍細胞株に対する直接的アポトーシス促進活性（pro-apoptotic activity）は、過去に同定された抗 CD38 抗体よりも優れていることが確認された。そのキメラ型であるイサツキシマブ（hu38SB19 v1.00）は、ヒト免疫グロブリン G1（IgG1）の定常領域を有しており、ヒト CD38 にマウス型と同程度の親和性（K_D）で結合し、アポトーシス促進活性を保持しており、CDC 及び ADCC 活性を示した。イサツキシマブをリード抗体として選択した（IMV23-011 試験及び(4)）。

イサツキシマブは CD38 酵素活性を阻害することが示された。NGD から cGDPR の産生に対するイサツキシマブの作用を *in vitro* で測定した。cGDPR の産生は、20 nmol/L のイサツキシマブ存在下で対照の約 12%に減少した（IMV23-009 試験）。

2.2　腫瘍細胞株に対するイサツキシマブの *in vitro* 活性

ONVT0117 試験 [Module 4.2.1.1-3]
IMV23-012 試験 [Module 4.2.1.1-4]

表面 CD38 量が 233000～790000 抗原/細胞とさまざまである MM 細胞株（LP-1、MOLP-8 及び NCI-H929）（表 1）及びその他の種々の血液悪性腫瘍に由来する細胞株（非ホジキンリンパ腫［NHL］由来 Ramos、Daudi、Raji、SU-DHL-8、Namalwa 及び WSU-DLCL2、B 細胞性慢性リンパ性白血病［B-CLL］由来 JVM-13、B 細胞性急性リンパ性白血病［B-ALL］由来 NALM-6、並びに T 細胞性急性リンパ性白血病［T-ALL］由来 DND−41、TALL-1、MOLT-4、CCRF-CEM）を含む一連の細胞株に対するイサツキシマブの ADCP、ADCC、CDC 又はアポトーシス誘導による殺腫瘍細胞作用を *in vitro* で評価した（ONVT0117 試験及び IMV23-012 試験）。

2.2.1　抗体依存性貪食

ONVT0117 試験 [Module 4.2.1.1-3]

緑色蛍光色素 PKH67 で標識した MM 細胞株 LP-1 及び MOLP-8 並びに NHL 細胞株 SU-DHL-8（標的）の単球細胞株 THP-1（エフェクター）による貪食を評価するため、エフェクター：標的比（E:T）

3:1、標的細胞 5×10^4 cells/well でイサツキシマブとともに 1～2 時間インキュベートした後、フローサイトメトリーで測定し、PKH67 と CD14 の二重標識陽性細胞の百分率を算出した（ONVT0117 試験）。

イサツキシマブ（製法 I＊ 製剤：バッチ番号 [redacted]、標準条件の 5°C で保管、申請製法*製剤：バッチ番号 [redacted]、5°C で保管又は 25°C の苛酷条件で 3 ヵ月間保管）は 1 µg/mL で THP-1 細胞による ADCP を誘導し、LP-1、MOLP-8 及び SU-DHL-8 に対する殺細胞率は、対照がそれぞれ 9.5、10.9 及び 6.3%であったのに対し、それぞれ 33.9～35.0%、54.1～58.6%及び 55.1～56.2%であった。

2.2.2 抗体依存性細胞傷害

IMV23-012 試験 [Module 4.2.1.1-4]
IMV23-014 試験 [Module 4.2.1.1-5]

新鮮精製ヒト NK 細胞（エフェクター）による ADCC の誘導を、乳酸脱水素酵素の放出を測定することにより評価した。腫瘍細胞（標的）を E:T 比 3:1 又は 4:1 でイサツキシマブとともに 4 時間インキュベートした（IMV23-012 試験）。

イサツキシマブは、検討したほとんどの腫瘍細胞株に対して精製ヒト NK 細胞を介した ADCC 活性を示した。イサツキシマブによる NK 細胞を介した最大溶解率は細胞株に応じて 27～100%であり、EC_{50} 値は 0.7～50.8 pmol/L（0.10～7.61 ng/mL）であった。

MM 細胞株 LP-1、MOLP-8 及び NCI-H929 でのイサツキシマブによる NK 細胞を介した最大溶解率はそれぞれ 37、28 及び 27%であり、EC_{50} 値はそれぞれ 13.5、1.1 及び 50.8 pmol/L（2.02、0.16 及び 7.61 ng/mL）であった。

イサツキシマブによる ADCC 活性に対して最も感受性が高かった細胞株は NHL 細胞株 Ramos であり、NK 細胞を介した最大溶解率は 97%、EC_{50} 値は 3.2 pmol/L（0.48 ng/mL）であった（表 2）。この細胞株を保持し、その後の *in vitro* MABEL 算出に使用した（IMV23-014 試験、及び 2.6.4 薬物動態試験の概要文 [Module 2.6.4 の 9.1.1 項]）。

2.2.3 補体依存性細胞傷害

IMV23-012 試験 [Module 4.2.1.1-4]
IMV23-014 試験 [Module 4.2.1.1-5]

イサツキシマブの CDC 活性を、ヒト補体存在下で細胞をイサツキシマブとともに 2 時間インキュベートした後、生存細胞の百分率を測定することにより評価した。生存細胞は Alamar blue 試薬を用いて検出した。溶解率は 100 から生存率を減じることにより算出した（IMV23-012 試験）。

＊新薬承認情報提供時に置換

検討した 3 種類の MM 細胞株 LP-1、MOLP-8 及び NCI-H929 のうち、LP-1 及び MOLP-8 の 2 種類でイサツキシマブによるヒト補体を介した細胞溶解が認められ、細胞溶解率はそれぞれ 82 及び 62%、EC_{50} 値はそれぞれ 0.18 及び 1.53 nmol/L（27.3 及び 228.2 ng/mL）であった（表 1）。

イサツキシマブによる CDC 作用に対して最も感受性が高かった細胞株は T-ALL 細胞株 DND-41 であり、ヒト補体を介した最大細胞溶解率は 93%、EC_{50} 値は 0.11 nmol/L（16 ng/mL）であった（表 2）。この細胞株を保持し、その後の *in vitro* MABEL 算出に使用した（IMV23-014 試験、及び 2.6.4 薬物動態試験の概要文 [Module 2.6.4 の 9.1.1 項]）。

2.2.4 アポトーシス

IMV23-012 試験 [Module 4.2.1.1-4]
IMV23-011 試験 [Module 4.2.1.1-1]
IMV23-014 試験 [Module 4.2.1.1-5]

腫瘍細胞株を 10^{-8} mol/L のイサツキシマブとともに 20 時間以上インキュベートした後、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識アネキシン V（早期アポトーシスのマーカー）を用いてフローサイトメトリーでイサツキシマブによるアポトーシスの誘導（アポトーシス促進活性）を測定した（IMV23-012 試験）。この濃度では、抗原結合が飽和状態にある（IMV23-011 試験）。

イサツキシマブは検討した計 15 種類の細胞株のうち 7 種類に対してアポトーシス促進活性を示した。その活性は、アネキシン V^+細胞が 10%を超える場合に陽性と判断した。イサツキシマブが活性を示した細胞株は、検討した 6 種類の NHL 細胞株のうち Daudi、Ramos、SU-DHL-8、Raji 及び Namalwa の 5 種類、並びに T-ALL 細胞株 DND-41 であった。また、イサツキシマブは B-CLL 細胞株 JVM-13 に対して弱い活性を示した。これらの細胞株におけるアポトーシス促進活性の EC_{50} 値を算出するため、イサツキシマブの濃度 10^{-7}～10^{-13} mol/L でアッセイを行った。

検討した 3 種類の MM 細胞株 LP-1、MOLP-8 及び NCI-H929 のうち、イサツキシマブによるアポトーシスがみられたのは MOLP-8 の 1 種類のみであり、アネキシン V^+細胞百分率は 29%であった（表 1）。

イサツキシマブによるアポトーシス促進活性に対して最も感受性が高かった細胞株は、NHL 細胞株 SU-DHL-8 及び T-ALL 細胞株 DND-41 であり、アネキシン V^+細胞百分率はそれぞれ 88 及び 56%、EC_{50} 値はそれぞれ 0.03 及び 0.10 nmol/L であった（表 2）。この細胞株を保持し、その後の *in vitro* MABEL 算出に使用した（IMV23-014 試験、及び 2.6.4 薬物動態試験の概要文 [Module 2.6.4 の 9.1.1 項]）。

表 1 - 細胞株 LP-1、MOLP-8 及び NCI-H929 に対するイサツキシマブの *in vitro* 活性

	CD38 expression[a]	ADCP[b]	ADCC[a]		CDC[a]		Pro-apoptotic activity[a]	
Cell line	ABC in 1,000	Max % phagocytosis	EC_{50} in pmol/L	Max % lysis	EC_{50} in nmol/L	Max % lysis	EC_{50} in nmol/L	Max %Ann. $V+^{c\ d}$
LP-1	487	33.9	13.5	37	0.18	82	-	-
MOLP-8	790	58.2	1.1	28	1.53	62	ND	29
NCI-H929	233	ND	50.8	27	-	-	-	-

Abbreviations: ABC: antibodies bound per cell, ADCP: antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; CDC: complement-dependent cytotoxicity, MM: multiple myeloma, ND: not determined

-: denotes absence of activity, half maximal effective concentration (EC_{50}) could not be calculated

Pro-apoptotic activity is considered positive above 10% of Annexin-V-positive cells.

a IMV23-012 study

b ONVT0117 study (製法 I＊ formulation stored at +5°C)

c Maximum percentage of Annexin-V-positive cells

d Pro-apoptotic activity is considered positive above 10% of Annexin-V-positive cells

表 2 - 細胞株 Ramos、SU-DHL-8 及び DND-41 に対するイサツキシマブの *in vitro* 活性

	CD38 expression[a]	ADCC		CDC		Pro-apoptotic activity	
Cell line	ABC in 1,000	EC_{50} in pmol/L	Max % lysis	EC_{50} in nmol/L	Max % lysis	EC_{50} in nmol/L	Max %Ann. $V+^{b\ c}$
Ramos	255	**3.2**[d]	97	0.17	23	0.01	30
SU-DHL-8	220	2.1	82	1.61	27	0.03	88
DND-41	612	1.5	58	0.11	93	0.1	56

Abbreviations: ABC: antibodies bound per cell, ADCP: antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCC: antibody-dependent celluler cytotoxicity; CDC: complement-dependent cytotoxicity

a IMV23-012 study

b Maximum percentage of Annexin-V positive cells

c Pro-apoptotic activity is considered positive above 10% of Annexin-V-positive cells

d In bold, data used for in vitro MABEL determination

2.3 MM 患者由来初代細胞に対するイサツキシマブの *ex vivo* 活性

IVT0058 試験 [Module 4.2.1.1-6]

再発 MM 患者及び新たに診断された MM 患者から採取した骨髄穿刺液を用いて、自己血漿又は自己マクロファージの存在下又は非存在下でイサツキシマブのアポトーシス促進作用を評価した（IVT0058 試験）。

＊新薬承認情報提供時に置換

単核細胞を密度勾配（Ficoll）により単離し、24 ウェル培養プレートに 2 測定分移した（1×10^6 cells/well）。細胞を 100 µg/mL イサツキシマブの存在下又は非存在下で 18 時間インキュベートした。$CD38^+/CD138^+$細胞集団におけるアネキシン V^+細胞の百分率をフローサイトメトリーで測定することにより、殺細胞作用を評価した。アネキシン V^+細胞百分率がベース時と比較して 20%以上増加する場合を陽性とし、10%以上 20%未満増加する場合を中等度陽性とした。

自己血漿及び自己マクロファージの非存在下において、イサツキシマブは検討した 7 検体のうち 4 検体で抗 MM 作用（アネキシン V^+細胞が 28～40%増加）を示し、その他の 3 検体で中等度陽性反応（アネキシン V^+細胞が 14～16%増加）を示した。

自己血漿及び自己マクロファージの存在下において、イサツキシマブは MM 検体 2 検体のうち 1 検体で殺細胞促進作用を示した。これらのデータから、イサツキシマブは細胞への直接結合又はエフェクターメカニズムを介した作用によって患者の腫瘍細胞の死を誘導することが示唆された。

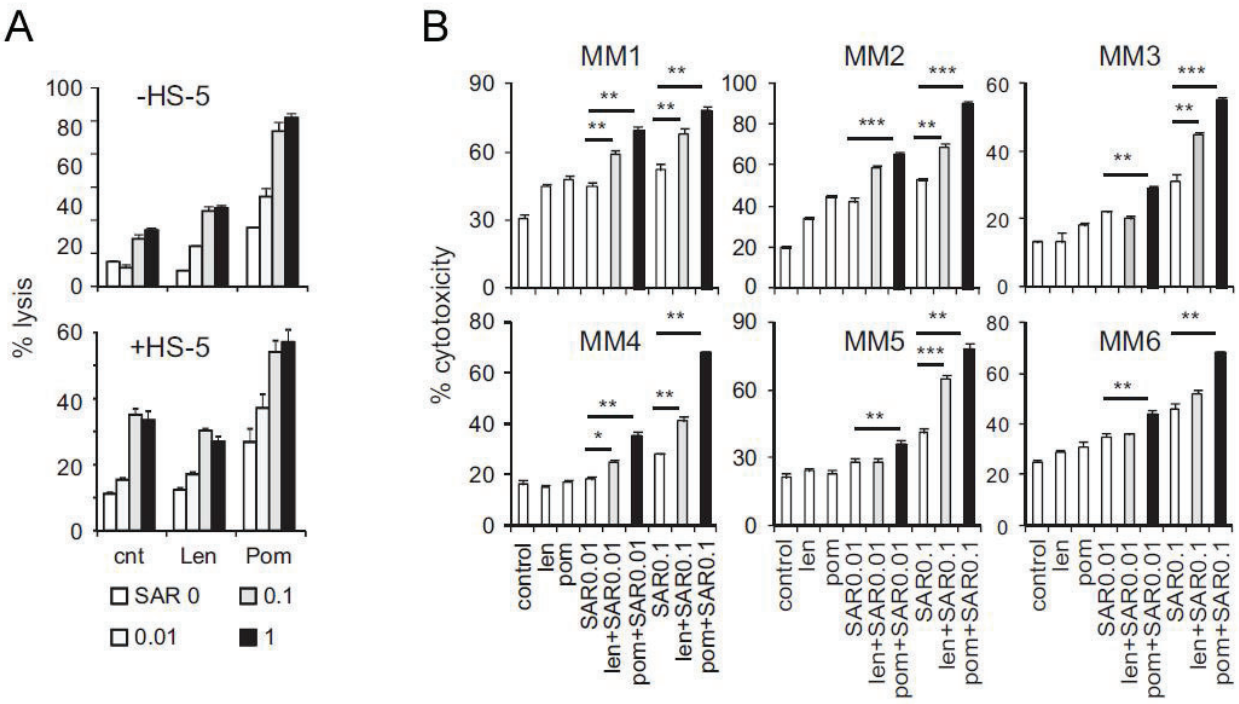
2.4　イサツキシマブ／ポマリドミド併用による抗 MM 活性

2.4.1　In vitro

Jiang H ら（2016）(5)

In vitro 実験において、イサツキシマブとポマリドミドの併用により、イサツキシマブ単剤投与時と比較して、直接的な細胞傷害及びエフェクター細胞による $CD38^+$ MM 細胞の溶解（ADCC）が促進されることが示された(5)。例えば、PBMC を 2 µmol/L ポマリドミドで前処理すると、イサツキシマブにより誘導される MM1S 細胞の溶解率が、HS-5 間質細胞の存在下又は非存在下で 40%未満からそれぞれ 50%超又は 80%超に増加した（図 1 A）。ポマリドミド又はレナリドミドに感受性又は耐性を示す患者由来 MM 細胞のいずれにおいても、イサツキシマブによる細胞毒性がポマリドミド存在下で有意に増強した（図 1 B）。

図 1 - IMiDs と併用した場合のイサツキシマブの抗 MM 活性



A) Lysis of MM1S cells by PBMCs pretreated with lenalidomide or pomalidomide in the presence (+) or absence (−) of HS-5 stromal cells and isatuximab (0.01, 0.1 and 1 µg/mL)
B) Lysis of CD138+ cells in bone marrow aspirates from MM patients sensitive (n = 2, MM1,2) or resistant (n = 4, MM3-6) to lenalidomide/pomalidomide with isatuximab (SAR; 0.01, 0.1 µg/mL) and 2 µM lenalidomide or pomalidomide
From Jiang et al.(5)

Abbreviations: cnt=control, len=lenalidomide, MM=multiple myeloma, PBMC=peripheral blood mononuclear cells, pom=pomalidomide, SAR=isatuximab, SEM=standard error of mean
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

2.4.2 In vivo

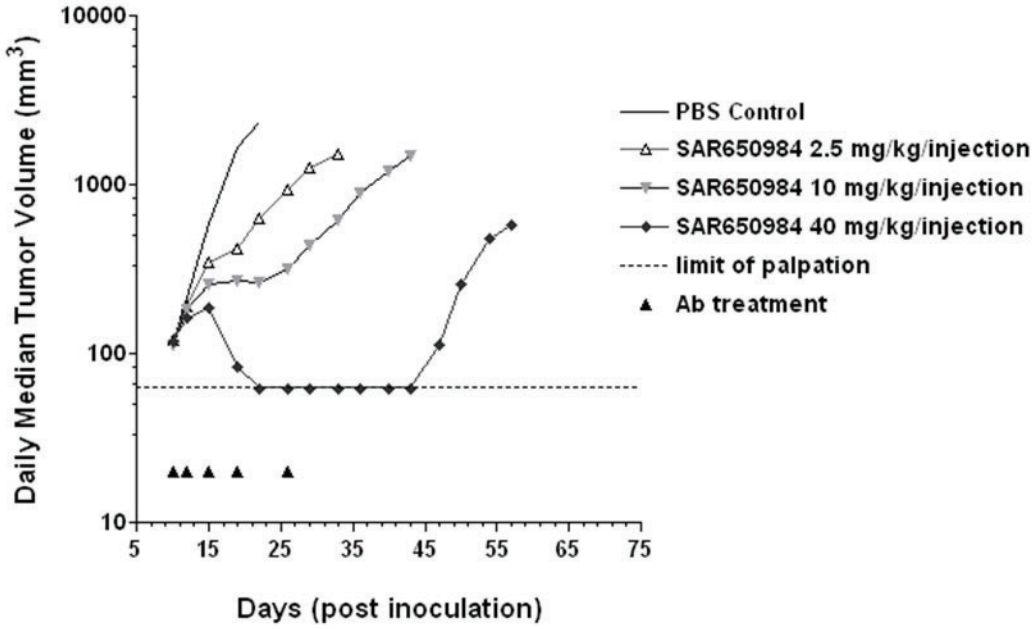
2.4.2.1 イサツキシマブ単剤での薬理活性

IMP23-018 試験 [Module 4.2.1.1-22]

SU-DHL-8 腫瘍担がん重症複合免疫不全（SCID）マウスを用いて、イサツキシマブの薬理学的抗腫瘍活性を検討した。マウスを 4 つの投与群に分け、対照として溶媒（リン酸緩衝生理食塩液［PBS］）を投与するか、又はイサツキシマブを 2.5、10 又は 40 mg/kg の用量で計 5 回、腫瘍細胞移植後 11、14、18、21 及び 26 日に静脈内投与した。最低用量の 2.5 mg/kg は、活性を全く又はわずかしか示さない用量を得るために設定した。各投与群について腫瘍体積中央値を算出し、結果を移植後日数に対して片対数プロットしたところ、図 2 に示すように明らかな用量反応が認められた。イサツキシマブは検討したすべての用量で活性を示し、40、10 及び 2.5 mg/kg の用量における log cell kill は全体でそれぞれ 4.9、2.6 及び 1.2 であり、19 日目の腫瘍増殖抑制率（T/C）（［薬物投与群の各試

験日における腫瘍体積中央値］/［対照群の各試験日における腫瘍体積中央値］×100）はそれぞれ 5.0、14.6 及び 25.1%であった。

図 2 - 腫瘍体積中央値



Abbreviations: PBS=phosphate buffered saline, SAR650984=isatuximab, Ab=antibody (isatuximab)

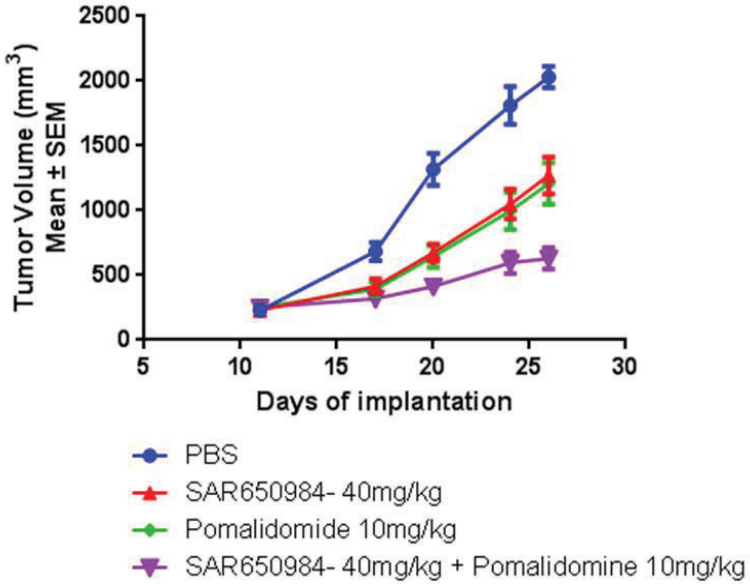
2.4.2.2 イサツキシマブとポマリドミドを併用したときの薬理活性

ONVV0145 試験 [Module 4.2.1.1-23]

MOLP-8 MM マウス異種移植モデルを用いた *in vivo* 実験において、イサツキシマブとポマリドミドを併用したところ、イサツキシマブ単剤（T/C=56%）及びポマリドミド単剤（T/C=46%）と比較して、体重への影響なく抗腫瘍活性が増強した（T/C=22%）（図 3）。

これらの実験では、MOLP-8 腫瘍（50%マトリゲル基底膜マトリックスで調製した細胞 3×10^6 cells）を皮下移植した雌 NOD SCIDγ（NSG）マウス（8 匹/群）に、溶媒（PBS）、イサツキシマブ（20 又は 40 mg/kg を週 2 回、計 5 回静脈内投与）若しくはポマリドミド（5 又は 10 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間腹腔内投与）の投与又はそれら両剤の併用投与を行った。試験期間中、腫瘍体積を定期的に測定した。体重は毎日測定した。

図 3 - MOLP-8 腫瘍を皮下移植した雌 NSG マウスにイサツキシマブ単独（40 mg/kg を週 2 回）あるいはポマリドミド併用（10 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間）投与した場合の効果



Abbreviations: PBS=phosphate buffered saline, SAR650984=isatuximab, NSG= NOD SCIDγ, SEM=standard error of mean

2.5　イサツキシマブの免疫調節活性

2.5.1　NK 細胞及び単球

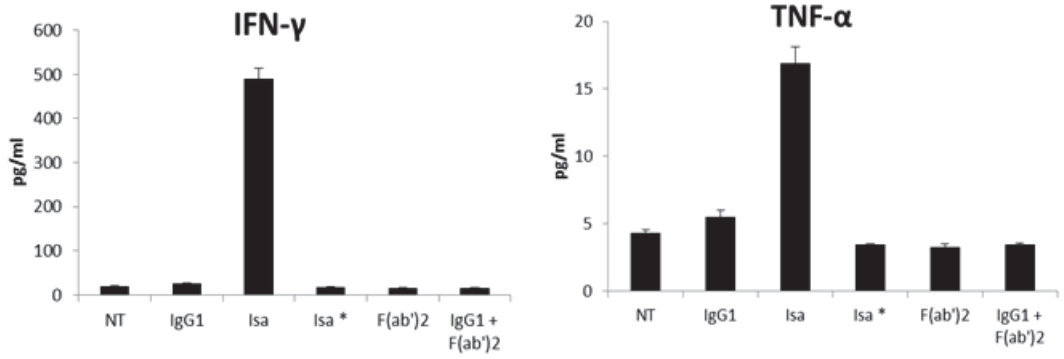
ONVT0152 試験 [Module 4.2.1.1-7]
ONVT0154 試験 [Module 4.2.1.1-8]
ONVT0150 試験 [Module 4.2.1.1-9]

CD38 は多くの免疫細胞の表面に発現している。ヒト PBMC においては、NK 細胞及び単球で CD38 発現量が高い(6)。これら 2 種類の細胞でのイサツキシマブ処理による作用を、標的細胞として NK-92 ヒト細胞株と健康ドナーの末梢血から新鮮単離した初代 NK 細胞を用いて評価した。

健康ドナーの末梢血から新鮮単離したヒト NK 細胞をイサツキシマブで 24 時間処理した後、インターフェロン γ（IFN-γ）および腫瘍壊死因子 α（TNF-α）の放出を定量することにより、NK 細胞に対するイサツキシマブの効果を分析した。Isa*（H 鎖可変領域［VH］に Y101K 及び Y102E のアミノ酸置換を有する CD38 に結合できないイサツキシマブ変異体）、F(ab')2（CD16 に結合できないイサツキシマブ変異体）及び IgG1 を対照として用いた。イサツキシマブにより誘導された IFN-γ 及び TNF-α の放出量は、非処理又は IgG 処理 NK 細胞の放出量よりも高かった。F(ab')2 単独ではサイトカイン放出を誘発しなかった。これらのデータから、イサツキシマブは $CD38^{+}$標的腫瘍細胞非存在下

で NK 細胞を活性化することが示され、イサツキシマブの Fc 部分が活性化に必要である可能性が示唆された（ONVT0152 試験）（図 4）。

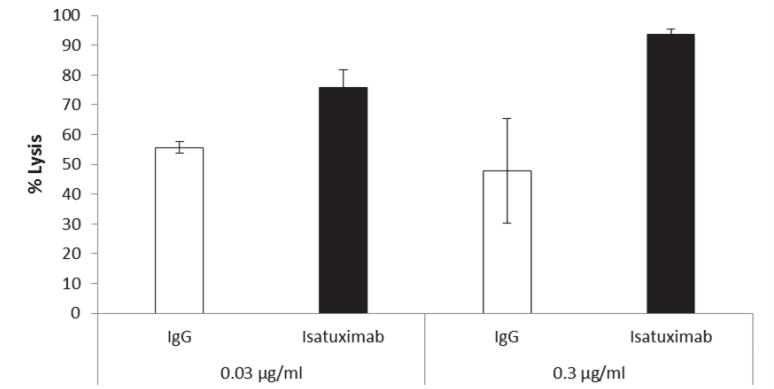
図 4 - イサツキシマブに誘導され 初代 NK 細胞から放出された IFN-γ 及び TNF-α

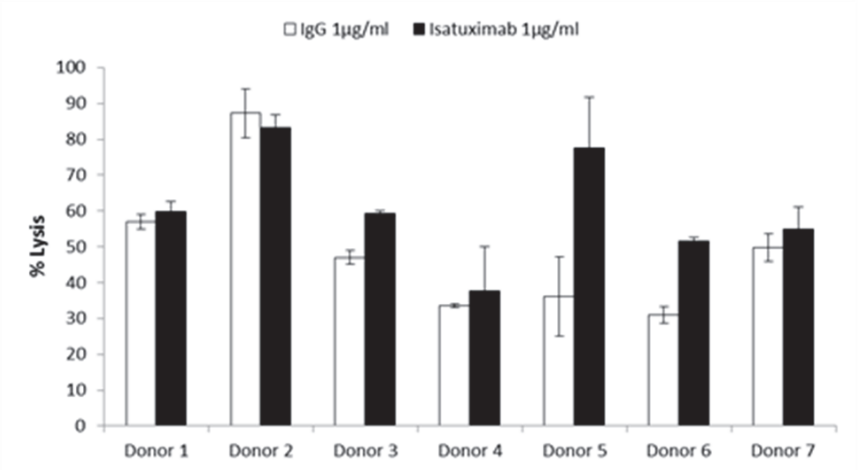


Abbreviations: NK: Natural killer; IFN-γ: Interferon-γ; Isa: Isatuximab; TNF-α: Tumor necrosis factor-α
Isa *: Isatuximab variant unable to bind CD38

K562（$CD38^-$）腫瘍細胞に対する NK 細胞の細胞溶解活性に対するイサツキシマブの影響を、カルセイン放出法で定量した。0.3 μg/mL のイサツキシマブとともに 3 時間プレインキュベートした NK-92 細胞を K562 細胞に添加すると、添加 30 分後に K562 細胞の 90%超が溶解した。一方、IgG で前処理した NK-92 細胞による溶解率は 50%未満であった（図 5、上図）。イサツキシマブの作用を 7 人の健康ドナーから単離した初代 NK 細胞でも調べた。初代 NK 細胞を 1 μg/mL のイサツキシマブとプレインキュベートした場合、1 μg/mL の IgG とプレインキュベートした場合と比べ、ドナー由来 NK 細胞による K562 の平均細胞溶解はドナー3 で 12.12%、ドナー5 で 41.44%、ドナー6 で 20.50%増加した（図 5、下図）（ONVT0154 試験）。

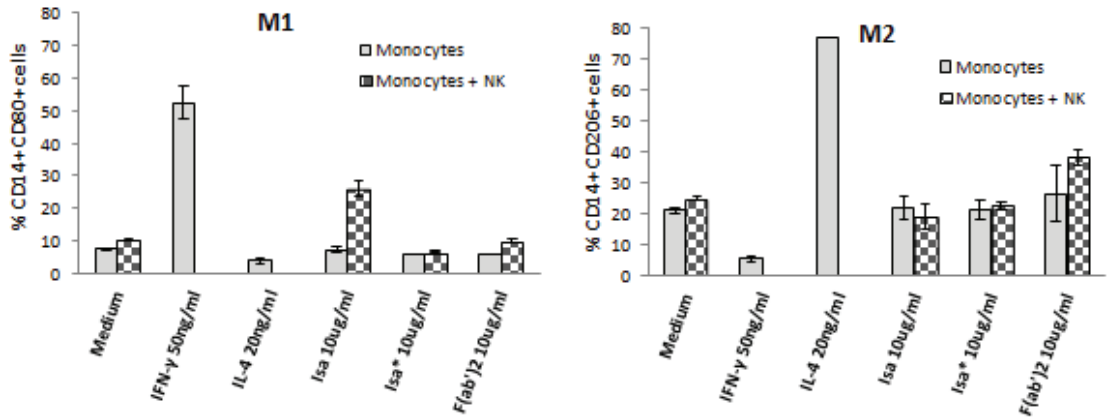
図 5 - NK-92 細胞（上図）及び健康ドナーの血液から単離した初代 NK 細胞（下図）による K562 細胞溶解活性へのイサツキシマブの作用





ヒト初代単球のみをイサツキシマブで処理したとき、M1 極性化マーカーである CD80 は増加しなかった。しかし、初代単球と、同じドナー由来の NK 細胞を共培養して 10 µg/mL のイサツキシマブで処理すると、$CD80^{+}$単球の百分率が増加し、これは NK 細胞による IFN-γ 放出に起因するものと考えられた（図 6、左図）。単球を単独又は NK 細胞存在下で培養したときのいずれにおいても、イサツキシマブは M2 極性化マーカーである CD206 を誘導しなかった（図 6、右図）（ONVT0150 試験）。

図 6 - ヒト単球 M1/M2 極性化に対するイサツキシマブの作用



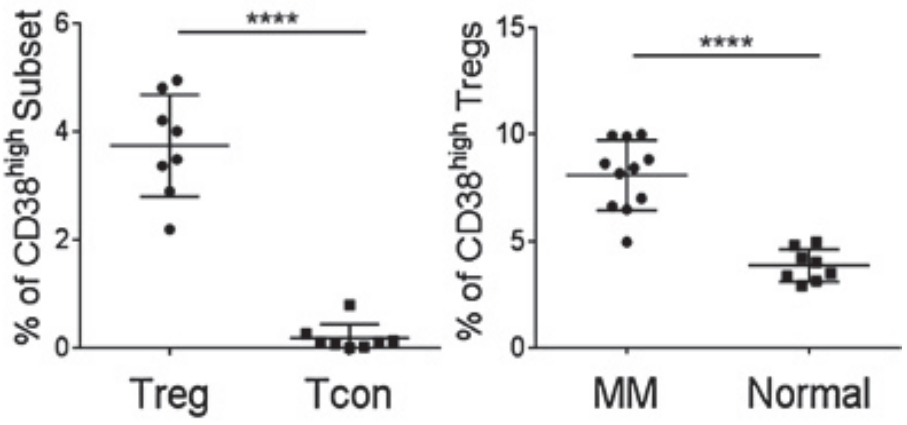
Abbreviations: IFN-γ = interferon-γ; IL-4 = interleukin-4; Isa* = Isatuximab variant unable to bind CD38

2.5.2 制御性 T 細胞

Feng X ら（2017）(7)

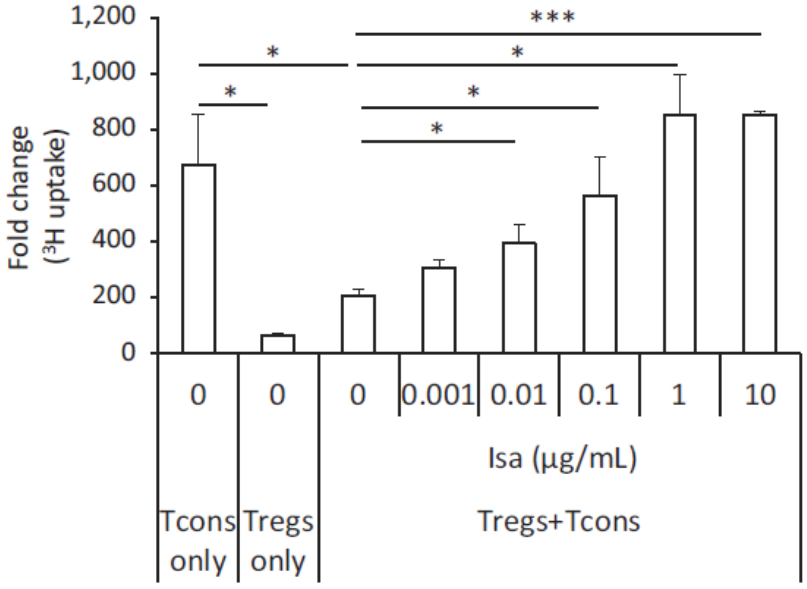
Treg（$CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$）及び Tcon（$CD4^+CD25^-$）細胞はいずれも CD38 を発現する。健康ドナー由来 PBMC（n = 8）において、Tcon より Treg の方が $CD38^{high}$ サブセットの占める割合が大きかった（図 7、左図）。MM 患者由来 PBMC（n = 11）では、正常ドナー由来 PBMC（n = 8）と比較して $CD38^{high}$ Treg がより多かった（図 7、右図）。MM 患者由来 Treg は自己 Tcon の増殖を抑制した。イサツキシマブは Tcon の増殖を用量依存的に回復させた（図 8）(7)。

図 7 - 健康ドナー由来 Treg と Tcon 細胞における CD38^{high} サブセット発現割合（左図）及び MM 患者と健康ドナーにおける CD38^{high} Treg 細胞の割合（右図）



Abbreviations: MM: multiple myeloma; Treg : regulatory T-cell; Tcon: conventional T-cell
**** p<0.0001

図 8 - Treg 細胞による Tcon 細胞増殖抑制に対するイサツキシマブの作用



Abbreviations: Tregs: regulatory T-cells; Tcons: conventional T-cells
* p<0.05; *** p<0.001

結論として、イサツキシマブは末梢血由来正常免疫細胞の CD38 に結合することによって種々の免疫調節メカニズムを誘導した：1）NK 細胞を活性化し、その溶解活性を増強させた、2）NK 細胞存在下でマクロファージを M1 へ極性化させた、及び 3）Treg により抑制された Tcon の増殖を回復させた。

2.6 イサツキシマブの 製法 I＊ 製剤と 申請製法* 製剤の比較

化学、製造及び品質管理の評価を補完するため、イサツキシマブの 製法 I＊ 製剤バッチと 申請製法* 製剤バッチを *in vitro* 及び *in vivo* で直接比較評価した。 製法 I＊ 製剤は標準条件の 5°C で保管した。 申請製法*製剤は、5°C で保管するか、又は苛酷条件の 25°C で 3 ヵ月間保存した。

2.6.1 In vitro

ONVT0115 試験 [Module 4.2.1.1-10]
ONVT0116 試験 [Module 4.2.1.1-11]
ONVT0117 試験 [Module 4.2.1.1-3]
ONVT0118 試験 [Module 4.2.1.1-12]
ONVT0119 試験 [Module 4.2.1.1-13]

イサツキシマブの 製法 I＊ 製剤及び 申請製法*製剤の生物学的活性を、CDC、ADCC、ADCP、アポトーシス及び NAD から cADPR への変換阻害について種々の細胞株で評価した。

保管条件に関係なく、検討したすべての細胞株において、 製法 I＊ 製剤と 申請製法*製剤は同等の CDC 活性、ADCC 活性（図 9）、ADCP 活性（図 10）、アポトーシス促進活性及び CD38 外酵素阻害活性（図 11）を示した（ONVT0115 試験、ONVT0116 試験、ONVT0117 試験、ONVT0118 試験、ONVT0119 試験）。

＊新薬承認情報提供時に置換

図 9 - イサツキシマブ 製法Ⅰ* 製剤及び 申請製法* 製剤の LP-1 細胞に対する ADCC 活性比較

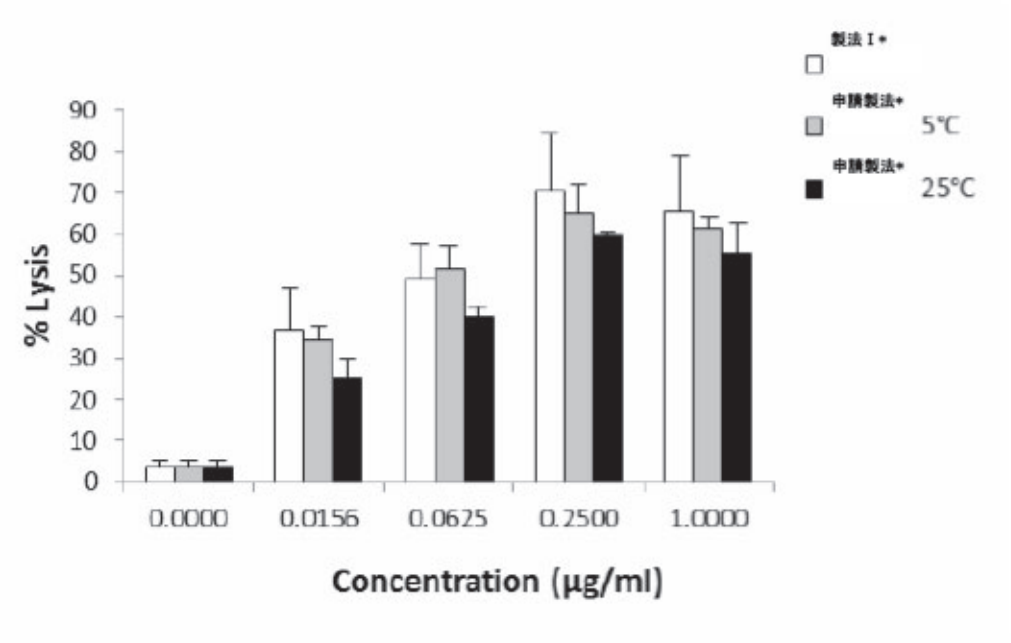
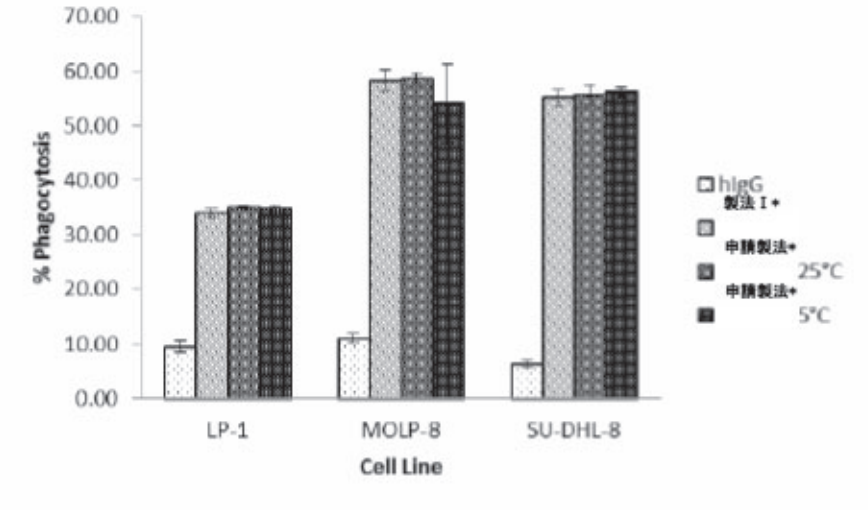
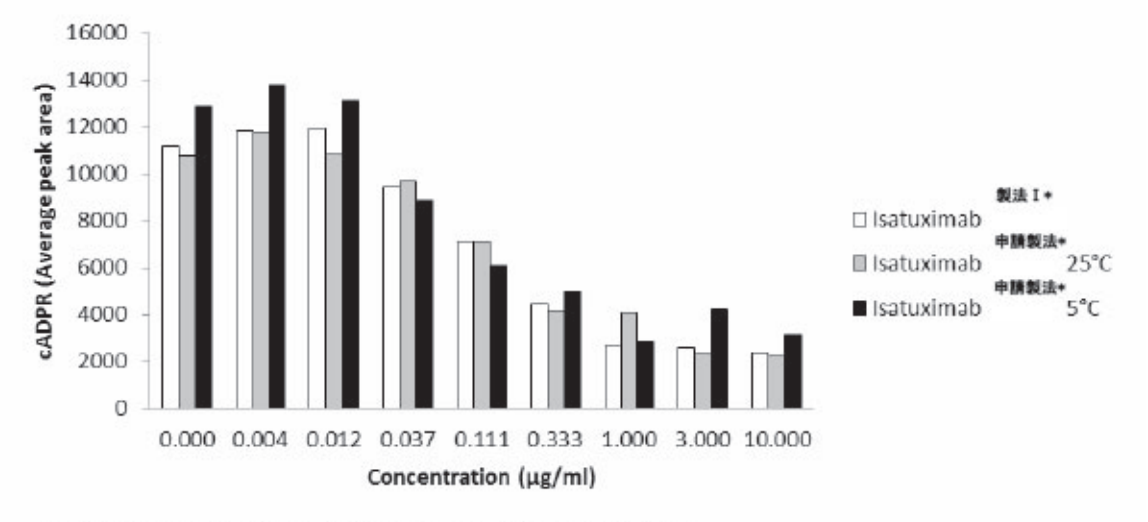


図 10 - イサツキシマブ 製法Ⅰ* 製剤及び 申請製法* 製剤（1 µg/mL）の LP-1、MOLP-8 及び SU-DHL-8 細胞に対する ADCP 活性比較



＊新薬承認情報提供時に置換

図 11 - イサツキシマブ 製法Ⅰ* 製剤及び 申請製法* 製剤の MOLP-8 細胞における NAD から cADPR への変換阻害活性比較



Abbreviations: cADPR: Cyclic adenosine diphosphate ribose

2.6.2 In vivo

ONVV0095 試験 [Module 4.2.1.1-24]

イサツキシマブの臨床用 製法Ⅰ* （バッチ [redacted]、[redacted] mg/mL）及び 申請製法*（バッチ [redacted]、20 mg/mL）を、SU-DHL-8 ヒトリンパ腫異種移植 SCID マウスモデルで検討した。

SU-DHL-8 異種移植モデルにおいて、 製法Ⅰ* 製剤と 申請製法*製剤の間に有意な抗腫瘍活性の差は認められなかった（表 3）。両バッチともに忍容性は良好で、毒性は認められず、同程度の有効性プロファイルを示し、10、20 及び 40 mg/kg の用量で抗腫瘍活性が認められ、2.5 mg/kg の用量では生物学的活性が認められなかった。

表 3 - イサツキシマブ 製法Ⅰ* 製剤及び 申請製法* 製剤週 2 回投与の SU-DHL-8 ヒトリンパ腫移植 SCID マウスにおける抗腫瘍活性比較

Dosage (mg/kg)	*ΔT/ΔC (Day 22)*	
	製法Ⅰ*	申請製法*
40	29	31
20	28	34
10	33	35
2.5	45	66

ΔT/ΔC = ratio of medians of tumor volume changes from baseline between treated and control groups

臨床用の 製法Ⅰ* 製剤バッチと 申請製法*製剤バッチの間で、試験全体及び各試験日におけるベースラインからの腫瘍体積の変化に有意な差は認められなかった。

＊新薬承認情報提供時に置換

2.7　イサツキシマブとダラツムマブの比較

ONVT0122 試験 [Module 4.2.1.1-14]
ONVT0121 試験 [Module 4.2.1.1-15]
ONVT0124 試験 [Module 4.2.1.1-16]
ONVT0125 試験 [Module 4.2.1.1-17]
ONVT0147 試験 [Module 4.2.1.1-18]

ヒト IgG1κ モノクローナル抗体（mAb）であるダラツムマブは、米国 FDA によって MM への臨床使用が承認された最初の naked CD38 mAb である。

イサツキシマブとダラツムマブの薬理活性の比較を、ADCC（ONVT0122 試験）、CDC（ONVT0121 試験）、アポトーシス誘導（ONVT0124 試験）及び CD38 外酵素活性阻害（ONVT0125 試験）のほか、主要分子構造特性（パラトープ及び標的結合エピトープ）及び赤血球（RBC）への結合について行った（ONVT0147 試験）。

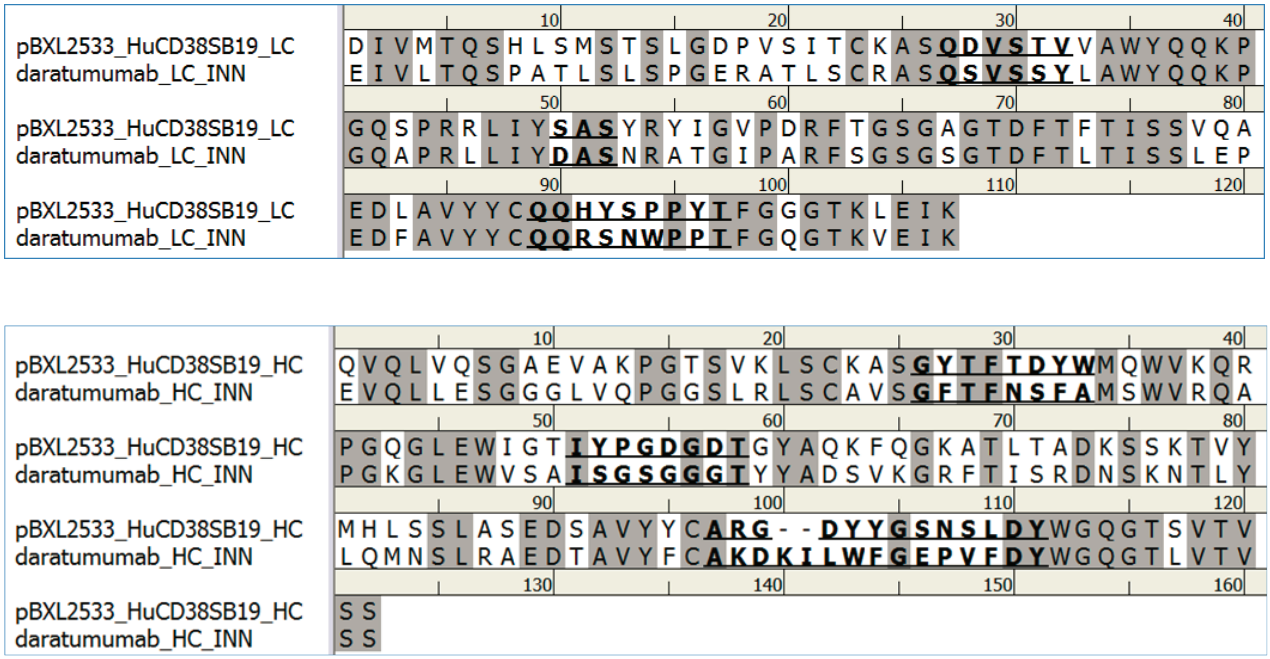
イサツキシマブとダラツムマブでは、主要分子構造特性（パラトープ及び標的結合エピトープ）が異なっていた。メカニズム検討では、2 つの抗体は CD38 発現細胞株に対して同程度の ADCC を誘導した（ONVT0122 試験）。2 つの抗体は CDC 誘導作用についても同程度の効力を示したが、補体を介した溶解の程度はダラツムマブの方が大きかった（ONVT0122 試験）。イサツキシマブとダラツムマブでは、直接腫瘍殺細胞誘導作用及び CD38 酵素活性阻害作用に差がみられた（ONVT0124 試験及び ONVT0125 試験）。

2.7.1　イサツキシマブとダラツムマブのアミノ酸配列の比較

ONVT0130 試験 [Module 4.2.1.1-19]

BIOVIA Discovery Studio 2017 ツール一式を用いたイサツキシマブとダラツムマブのアミノ酸配列の比較により、2 剤で配列が異なっていることが示された。L 鎖可変領域（VL）で一致していたのはアミノ酸残基 107 個のうち 66 個、H 鎖可変領域（VH）で一致していたのはアミノ酸残基 122 個のうち 58 個で、一致率はそれぞれ 61.7 及び 47.5%であった。これらの配列比較に基づきイサツキシマブとダラツムマブは異なる配列及びパラトープを有すると結論された（図 12）。

図 12 - イサツキシマブとダラツムマブの L 鎖可変領域（上図）及び H 鎖可変領域（下図）のアミノ酸配列比較（一致アミノ酸残基を灰色背景、相補性決定領域アミノ酸残基を下線付き太字で示した）



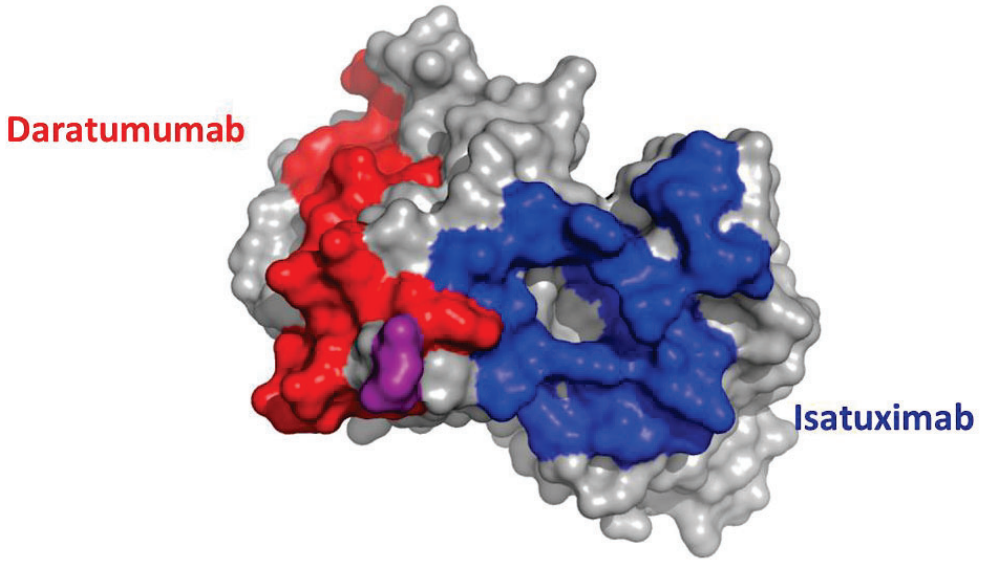
2.7.2 イサツキシマブとダラツムマブのエピトープの比較

ONVT0131 試験 [Module 4.2.1.1-20]

ヒト CD38 と Fab-イサツキシマブの複合体の三次元構造を、タンパク質の X 線結晶構造解析により決定した。2 つのタンパク質間の相互作用からエピトープ及びパラトープの残基を決定し、ヒト CD38 における結合部位をイサツキシマブとダラツムマブで比較した。比較に用いたダラツムマブのエピトープ情報は変異導入解析によって得られたものである(8)。

2 つのエピトープを比較した結論は、それらが異なるというものであった。イサツキシマブ及びダラツムマブは、それぞれヒト CD38 の 23 及び 27 個のアミノ酸を認識していた。2 つのエピトープに共通してみられたアミノ酸残基は 1 個のみ（Glu233）であった。ヒト CD38 における各抗体のエピトープが異なることを図 13 に示す。

図 13 - CD38 タンパク質表面のイサツキシマブ（青）、ダラツムマブ（赤）及び共通（赤紫）のエピトープ

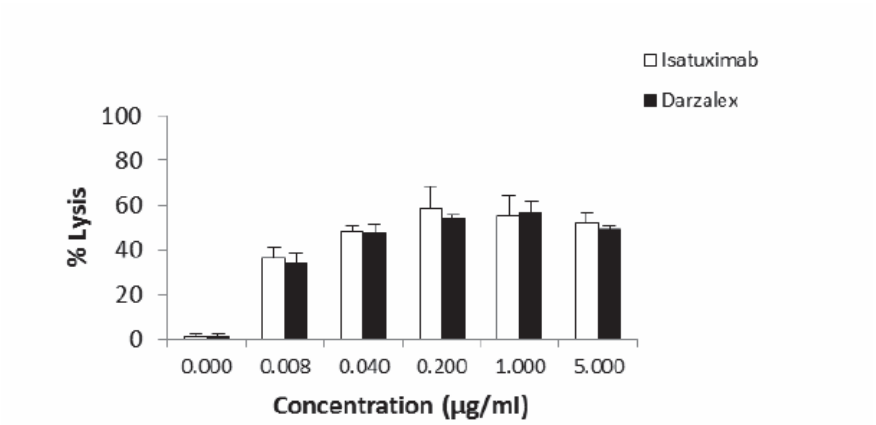


2.7.3　イサツキシマブとダラツムマブの ADCC 活性の比較

ONVT0122 試験 [Module 4.2.1.1-14]

CD38 発現 MM 細胞株 LP-1 及びびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）細胞株 SU-DHL-8 に対して、2 つの抗体は、0.008～5.000 µg/mL の範囲で検討したいずれの濃度においても、カルセイン AM アッセイにおける溶解を指標とした ADCC を同程度に誘導した（図 14）。

図 14 - イサツキシマブとダラツムマブの LP-1 細胞に対する ADCC 活性の比較



Darzalex = daratumumab

2.7.4　イサツキシマブとダラツムマブの CDC 活性の比較

ONVT0121 試験 [Module 4.2.1.1-15]

OCI-LY19.CD38（CD38 を過剰発現している DLBCL 細胞株）、U266.CD38（CD38 を過剰発現している MM 細胞株）及び DND-41（ヒト T 細胞性白血病細胞株）において、2 つの抗体の CDC 誘導作用の効力（用量反応実験で推定された相対 EC_{50} 値）は同程度であった。しかし、特に OCI-LY19.CD38 及び U266.CD38 において、ダラツムマブの方が補体を介した溶解の程度（最大細胞傷害率）が大きかった（表 4）。

表 4 - イサツキシマブとダラツムマブの OCI-LY19.CD38、U266.CD38 及び DND-41 細胞株に対する CDC 活性の比較

Cell Line	Antibody	EC_{50} rel (µg/mL)	Remaining Viable Cells (%)
OCI-LY19.CD38	Isatuximab	8.28E-02	36.53
	Daratumumab	4.35E-02	9.55
U266.CD38	Isatuximab	1.86E-01	56.09
	Daratumumab	1.44E-01	7.75
DND-41	Isatuximab	5.17E-02	57.89
	Daratumumab	3.08E-02	43.50

2.7.5　イサツキシマブとダラツムマブの赤血球への結合の比較

ONVT0128 試験 [Module 4.2.1.1-21]

ONVT0147 試験 [Module 4.2.1.1-18]

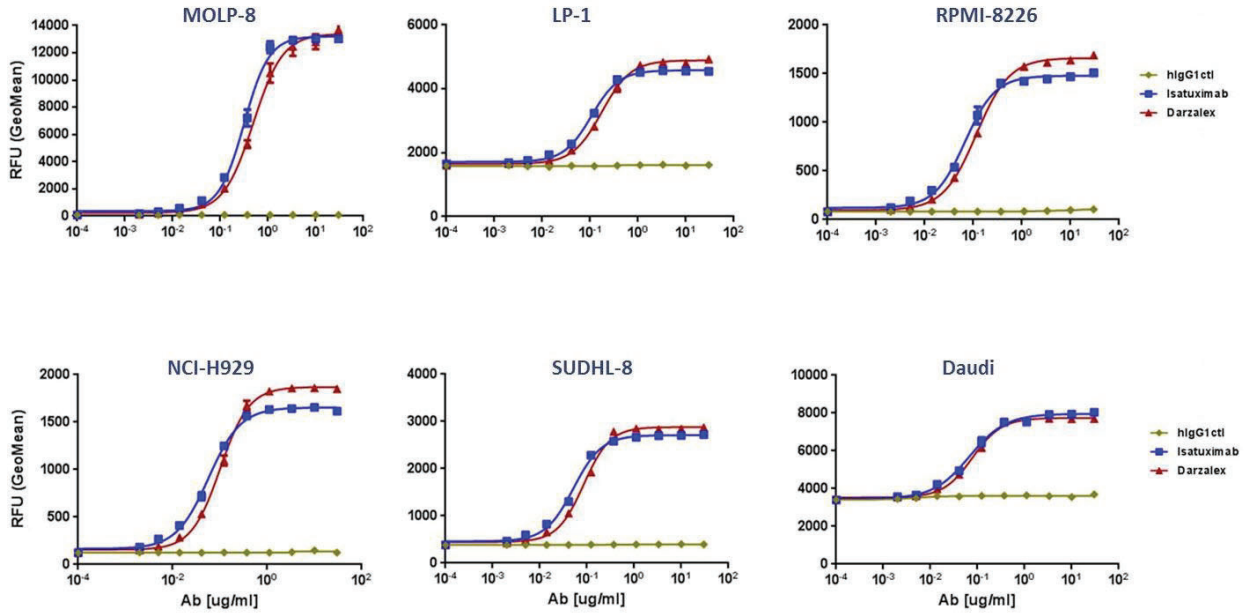
ダラツムマブの添付文書 (9) によると、ダラツムマブ投与患者に輸血が必要となった場合、実施する血液適合性検査（抗体スクリーニング）への干渉が問題となる。この干渉の原因として、RBC は CD38 を発現しているため、患者血漿中のダラツムマブが試薬の RBC の CD38 に結合して凝集が起こり、患者血漿中の抗 RBC 抗体について偽陽性の結果が得られると考えられる。

輸血前抗体スクリーニングに対してイサツキシマブが干渉する可能性があることから、イサツキシマブも RBC に結合するか否かを評価した。3 名の健康ドナー由来精製 RBC を漸増濃度のイサツキシマブ又はダラツムマブで処理し、抗体結合をフローサイトメトリーで評価した（ONVT0128 試験）。

複数の MM 細胞株及びリンパ腫細胞株に対して 2 つの抗体が同程度に結合した（図 15、ONVT0147 試験）こととは異なり、3 名の健康ドナー由来 RBC とダラツムマブをインキュベートしたときには用量依存的な蛍光強度の僅かな増加がみられ、ダラツムマブの RBC への結合が示唆され

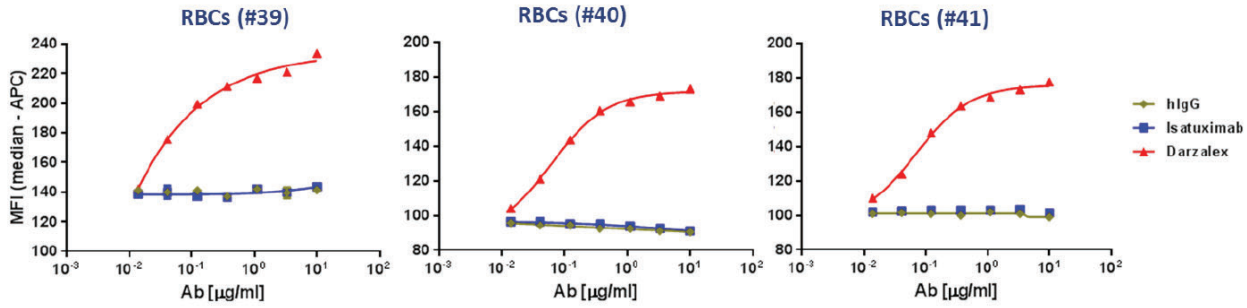
たが、RBC とイサツキシマブをインキュベートしたときにはヒト IgG 対照と比較してシグナルの増加が認められず、イサツキシマブは RBC に結合しないことが示唆された（図 16）。

図 15 - イサツキシマブとダラツムマブの CD38 発現がん細胞株への結合比較



Darzalex = daratumumab

図 16 - イサツキシマブとダラツムマブの 3 名のドナー由来赤血球への結合比較



Darzalex = daratumumab

2.7.6 イサツキシマブとダラツムマブのアポトーシス促進活性の比較

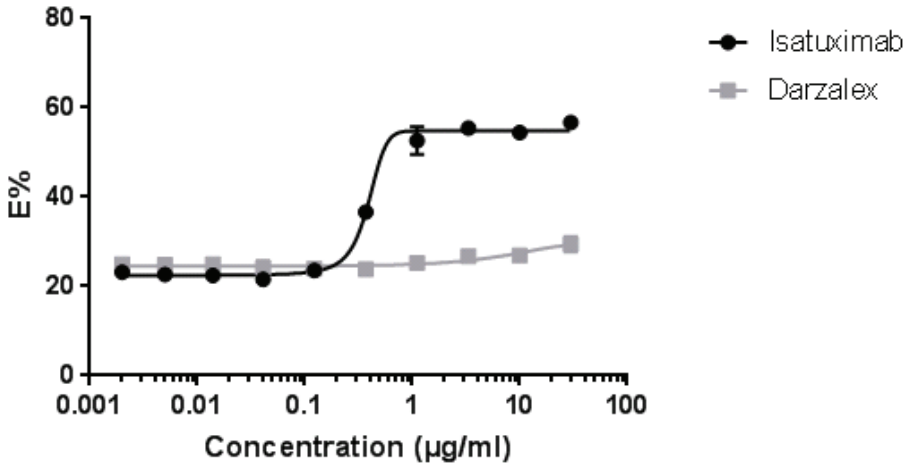
ONVT0124 試験 [Module 4.2.1.1-16]

イサツキシマブは、CD38 発現がん細胞でアポトーシス細胞／死細胞をダラツムマブより増加させたことから、ダラツムマブより強力な直接殺細胞活性を示した。

CD38 発現細胞株 SU-DHL-8（NHL）、JJN3.CD38（MM）及び RPMI-8226.CD38（MM）をイサツキシマブで処理すると、アネキシン V^+アポトーシス細胞が用量依存的にそれぞれの細胞株で 36.54、31.53 及び 33.20%増加した。SU-DHL-8 細胞、JJN3.CD38 細胞及び RPMI-8226.CD38 細胞で算出された相対 EC_{50} 値は、それぞれ 30、245 及び 417 ng/mL であった。

一方、ダラツムマブは、SU-DHL-8 細胞、JJN3.CD38 細胞及び RPMI-8226.CD38 細胞において用量依存的アポトーシス細胞／死細胞を誘導せず、その増加はそれぞれ 10.61、14.94 及び 7.53%であった。ダラツムマブでは相対 EC_{50} 値は算出できなかった。CD38 発現細胞株に対するイサツキシマブとダラツムマブのアポトーシス促進活性の例を以下に示した（図 17）。

図 17 - イサツキシマブとダラツムマブの CD38 発現 RPMI-8226.CD38 細胞に対するアポトーシス促進活性の比較



E%: percentage of apoptotic/dead cells after antibody treatment
Darzalex = daratumumab

2.7.7　イサツキシマブとダラツムマブの CD38 酵素活性阻害作用の比較

ONVT0125 試験 [Module 4.2.1.1-17]

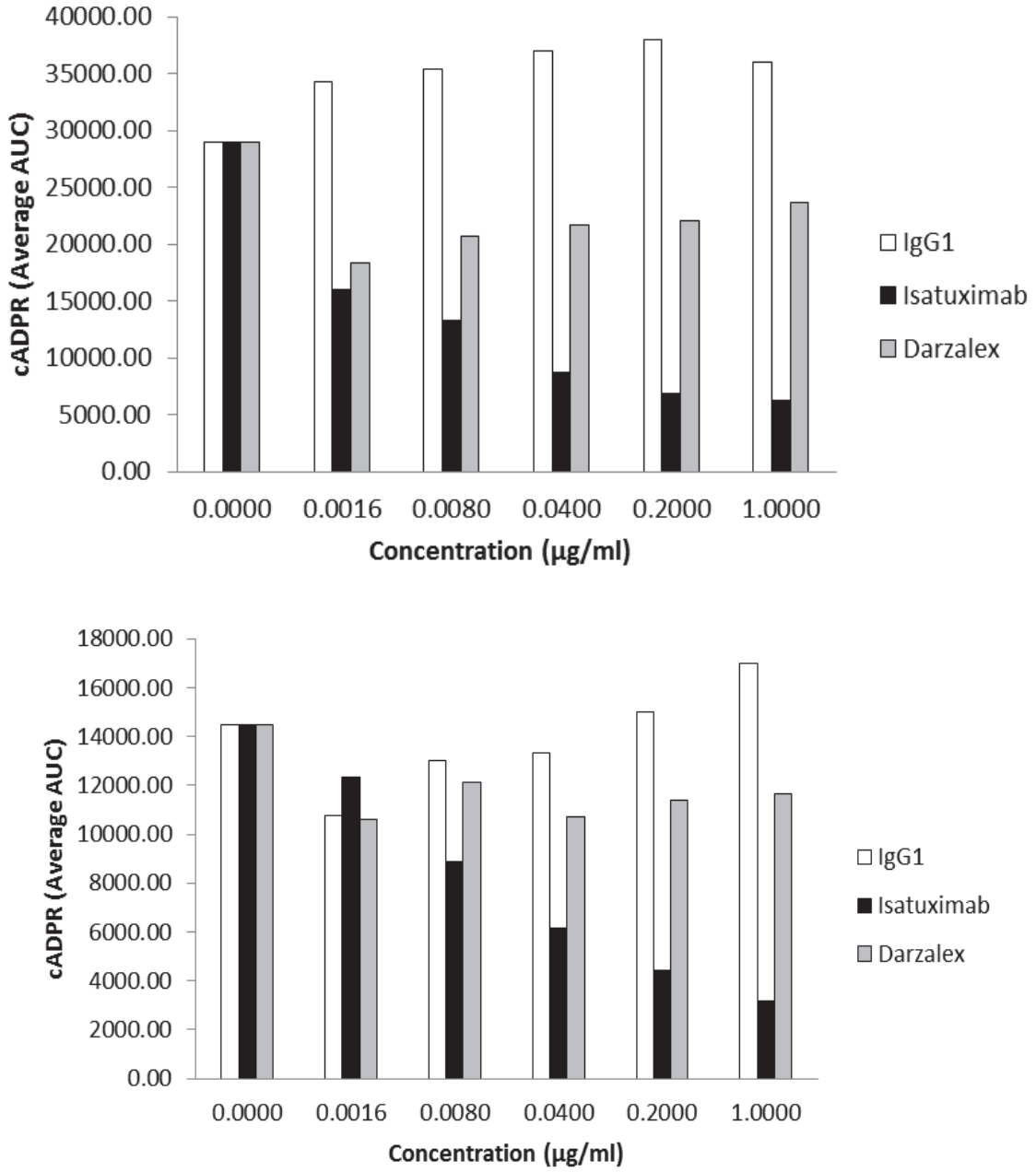
CD38 発現細胞株をイサツキシマブで処理すると、ダラツムマブより強力な CD38 酵素活性阻害作用が誘導された。

CD38 発現細胞株では、CD38 によって NAD が cADPR 及び ADPR に変換される。経時変化及び用量反応の実験において、$CD38^+$ MM 細胞株の LP-1 細胞及び RPMI-8226 細胞をイサツキシマブで処理したところ、質量分析法によって測定される cADPR 合成が阻害された。経時変化の実験では、終濃

度 1 μg/mL のイサツキシマブ又はダラツムマブとともに細胞を 10 分から最長 2 時間にわたり培養した。用量反応の実験では、終濃度範囲 0.0016～1.0 μg/mL のイサツキシマブ又はダラツムマブとともに細胞を培養した（LP-1 細胞は 10 分、RPMI-8226 細胞は 15 分）。

いずれの細胞株においても、漸増濃度のイサツキシマブにより、NAD から cADPR への変換が用量依存的に阻害された（図 18）。同じ実験条件下において、LP-1 細胞及び RPMI-8226 細胞をダラツムマブで処理したときの cADPR 合成阻害作用は、弱く、非用量依存的であった。

図 18 - イサツキシマブとダラツムマブの CD38 酵素活性に対する作用の比較（LP-1 細胞[上図]及び RPMI-8226 細胞[下図]による cADPR 合成）



Abbreviations: cADPR: cyclic adenosine diphosphate ribose
Darzalex = daratumumab

3　副次的薬理試験

[Module 2.6.3 の 3 項]

3.1　正常ヒト組織におけるヒト CD38 タンパク質発現及びイサツキシマブの組織交差反応性

3.1.1　正常ヒト組織におけるイサツキシマブの GLP 適用組織交差反応性試験

IHX0003 試験 [Module 4.2.1.2-1]

IHC 法を用いた正常ヒト組織における GLP 適用組織交差反応性試験を実施した。本試験の目的は、ジゴキシゲニン標識イサツキシマブ（VAB.UEH2.15）の正常ヒト組織凍結切片との交差反応性の有無を評価することであった。試験系として使用したヒト組織パネルは、1997 年の FDA/CBER ガイダンス文書「Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use」(10) で推奨されている組織一覧に基づいて選択した（表 5）。結合を検出するため、ジゴキシゲニン標識イサツキシマブを 2.1 及び 21.1 µg/mL の濃度で凍結切片に添加した。同様に、陰性対照として、イサツキシマブと同じアイソタイプのジゴキシゲニン標識 IgG mAb を、24.8 µg/mL の濃度でヒト組織凍結切片に添加した。眼（2 名のドナー）を除く各器官は 3 名のドナー（男性及び女性）で検討した。陽性対照組織として CD38 発現細胞株（Ramos 細胞）を使用した。イサツキシマブの結合を光学顕微鏡で評価した。

表 5 - イサツキシマブで評価したヒト組織（GLP 適用組織交差反応性試験）

重要器官	造血／リンパ	消化	生殖	内分泌	その他
脳（大脳と小脳） 心臓 腎臓／尿管／膀胱 肝臓 肺	骨髄 リンパ節 脾臓 胸腺 扁桃	耳下腺 食道 胃 小腸（十二指腸、空腸、回腸） 大腸（結腸、盲腸、直腸） 胆嚢 膵臓（外分泌）	卵巣／卵管 子宮（頸部及び内膜） 胎盤 乳腺 精巣 前立腺	副腎 膵臓（ランゲルハンス島） 副甲状腺 下垂体 甲状腺	眼と視神経 末梢神経 脊髄 骨格筋 皮膚 血液細胞 [a] 内皮細胞 [a]

Abbreviation: GLP: Good Laboratory Practices
a　他の組織の一部として評価（血液細胞は主に脾臓）

検討したジゴキシゲニン標識イサツキシマブの両濃度において、イサツキシマブに特異的な結合がリンパ組織（脾臓、胸腺、リンパ節及び扁桃）、骨髄、下垂体及び前立腺で検出された。また、多くの組織の浸潤又は常在円形細胞にもイサツキシマブに特異的な結合が検出された。

脾臓、胸腺、リンパ節及び扁桃におけるイサツキシマブ特異的染色は中等度から強度で、評価したすべてのドナーで認められた。これらのリンパ組織における染色パターンは、リンパ系細胞（B 細胞球及び T 細胞又はそのいずれか）及びマクロファージの解剖学的分布に一致していた。

骨髄では、3 名すべてのドナーにおいて、散在性細胞塊に軽微から中等度のイサツキシマブ特異的染色が認められた。

評価した多くの組織において、イサツキシマブ特異的染色は、分離した円形細胞又は円形細胞群に認められた。これらの所見は、浸潤／循環又は常在しているリンパ球又はマクロファージへのイサツキシマブの結合を示すものと考えられた。肝臓では、染色された円形細胞の解剖学的分布がクッパー細胞に一致したが、染色細胞数は通常みられるクッパー細胞数よりも少なかった。このことから、クッパー細胞の亜集団にイサツキシマブが結合することが示唆された。

下垂体では、3 名すべてのドナーにおいて、類洞血管内皮細胞に中等度から強度のイサツキシマブ特異的染色が認められた。前立腺では、3 名のうち 2 名のドナーにおいて、強度のイサツキシマブ特異的染色が腺上皮細胞（細胞質及び膜の染色）に認められた

3.1.2　正常ヒト組織におけるイサツキシマブの GLP 非適用組織交差反応性試験

IMH23-001 試験 [Module 4.2.1.2-2]

別のバッチのジゴキシゲニン標識イサツキシマブ（dig-38SB19-v1.0-1-06）を用いて GLP 非適用試験を実施した。正常ヒト組織凍結切片（1 組織あたり独立した 1～6 検体を使用）を、ジゴキシゲニン標識一次抗体を用いて評価した。評価した組織一覧を表 6 に示す。適切なアッセイ条件を特定するため、$CD38^{+}$腫瘍細胞株ペレットから切り出した凍結切片（陽性対照）で抗体価測定を実施した。イサツキシマブ及び非結合性アイソタイプ対照抗体を終濃度 0.32 µg/mL で使用した。

表 6 - イサツキシマブで評価したヒト組織（GLP 非適用組織交差反応性試験）

重要器官	造血／リンパ	消化	生殖	内分泌	その他
中枢神経系 腎臓 肝臓 肺	骨髄 リンパ節 脾臓 扁桃 胸腺	唾液腺 食道 胃 小腸 結腸 膵臓 胆嚢	卵巣 子宮／頸部 前立腺 精巣 乳腺	甲状腺 副腎	皮膚 眼 末梢神経系

Abbreviation: GLP: Good Laboratory Practices

予想されたように、イサツキシマブによる強度の染色が、リンパ組織（胸腺及びリンパ節の T 細胞領域、胚中心、並びに扁桃の T 細胞領域と胚中心）、赤脾髄及び骨髄細胞に認められた。リンパ節の B 細胞領域及び白脾髄はイサツキシマブ染色陰性であった。前立腺上皮の強度の染色及び肺の気管支上皮の染色も認められた。肝臓の検体でクッパー細胞に一致する限局性の中等度染色が認められ、脳（星状膠細胞）でも染色が認められた。乳腺、食道、胃、結腸、腸、卵巣及び子宮内膜では、粘膜の浸潤炎症細胞のみが染色され、残りの組織では染色が認められなかった。視神経の染色は非常に弱く、3 検体のうち 1 検体のみで認められた。評価したその他の組織では、イサツキシマブとの特異的な反応性は認められなかった。

正常ヒト組織における組織交差反応性試験の結論

正常ヒト組織における GLP 適用組織交差反応性試験（IHX0003 試験）では、イサツキシマブに特異的な結合が予想どおりリンパ組織（脾臓、胸腺、リンパ節及び扁桃）及び骨髄に検出されたのに加え、下垂体（PVT0002 試験[Module 4.2.1.2-3]で内皮細胞であることを CD31 結合との結合の共局在により確認）及び前立腺（腺上皮細胞）にも検出された。また、イサツキシマブに特異的な結合は、多くの組織の浸潤又は常在円形細胞（肝臓のクッパー細胞を含む）にも検出された。イサツキシマブの別のバッチを用いた過去の GLP 非適用組織交差反応性試験（IMH23-001 試験）では、脳（星状膠細胞）及び肺（気管支上皮）にも染色が認められたが、上記 GLP 試験では再現されなかった。2 つの試験で違う結果が得られた理由として、検討したイサツキシマブの 2 つのバッチ間の違い、またより可能性の高いものとして、GLP 試験ではバックグラウンドの染色が最適となるように、より高濃度のアイソタイプ対照抗体が用いられたことによるものと考えられる。気管支上皮の染色について IHC 法による PVT0001 試験[Module 4.2.1.2-4] を追加実施したところ、染色が認められたものの全てのドナーにではなく、CD38 タンパク質は主に腫瘍又は炎症環境で発現していることが示唆された。これらの異なる試験でみられた染色の多くは、ヒトにおける CD38 タンパク質の既知の発現 (11)(12) と概

して一致していた。非リンパ組織成分の染色は交差反応性を示す証拠と解釈され、意図しない標的部位が存在する可能性が示唆された。結果を表 7 に要約する。

表 7 - 新鮮凍結正常ヒト組織におけるイサツキシマブ結合（リンパ組織以外）

ヒト組織	結合部位
前立腺	腺房上皮細胞
下垂体	類洞を覆う内皮細胞
気管支 [a]	上皮細胞
脳 [a]	星状膠細胞

a GLP 適用組織交差反応性試験では染色が認められていない

3.2 CD38 及びヒト血液細胞

ヒト血液細胞における CD38 発現特性を検討し、種々のヒト血液細胞に対するイサツキシマブの生物学的作用を評価する *in vitro* 試験を実施した。

3.2.1 イサツキシマブの正常末梢血細胞への結合

IMV23-006 試験 [Module 4.2.1.2-5]

数名の健康ドナーから採取した細胞を用いて、正常ヒト末梢血細胞への Alexa Fluor® 488（AF488）標識イサツキシマブの結合量を測定した（IMV23-006 試験）。

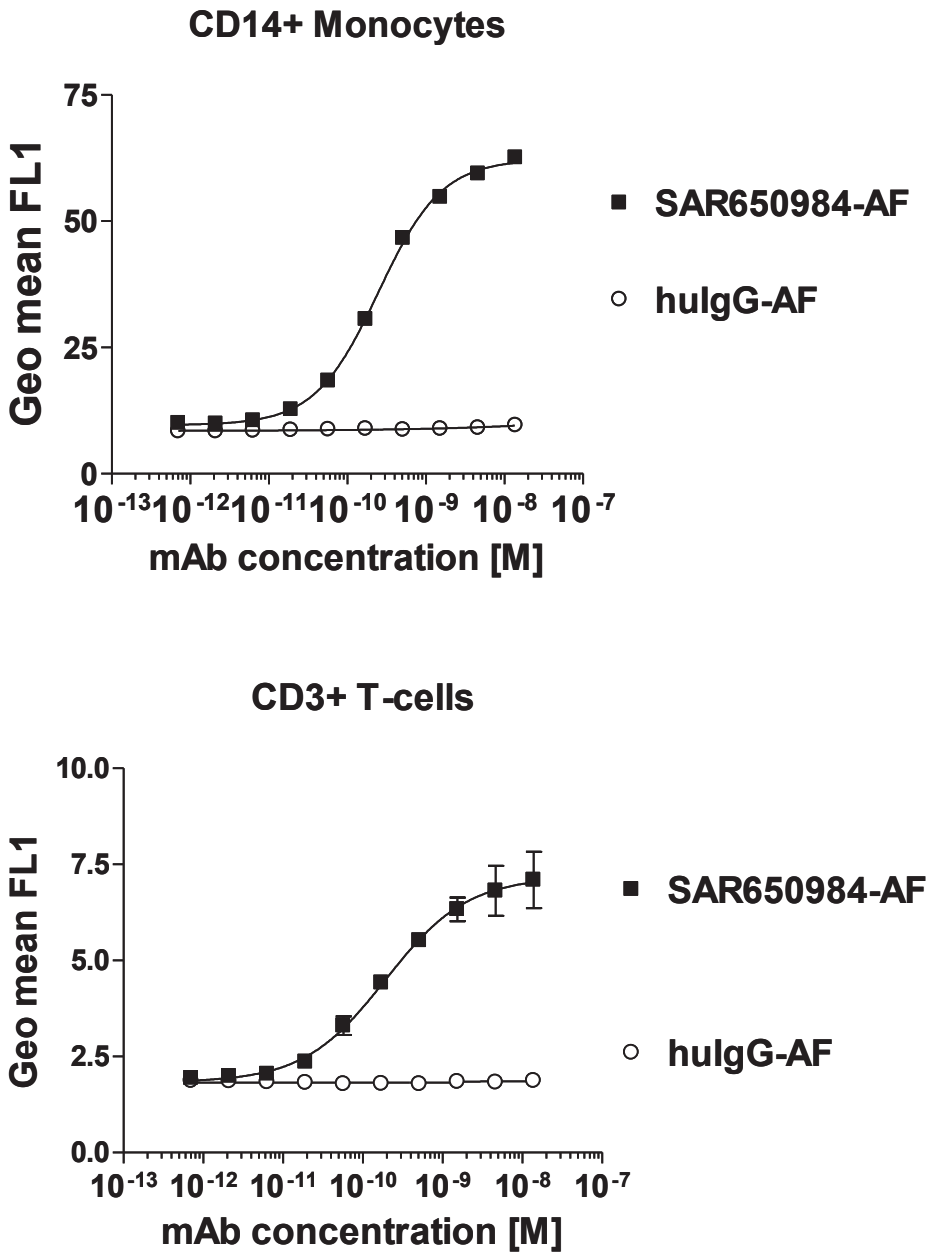
すべての試験において、飽和のみられる抗体濃度 2 µg/mL（12.5 nmol/L に相当）を使用した。

イサツキシマブによる染色を、抗 CD52 mAb のアレムツズマブ、抗 CD28 mAb の TGN1412、抗 CD20 mAb のリツキシマブ及び AF488 標識ヒト IgG アイソタイプ対照 mAb（huIgG-AF）による染色と比較した。

イサツキシマブは $CD3^+$ T 細胞の 22～40%、$CD19^+$ B 細胞の 24～67%、NK 細胞の 37～65%、$CD14^+$単球の 31～97%に特異的に結合した。予想されたように、アレムツズマブはリンパ球及び単球の大部分に一様に結合した。リツキシマブは $CD19^+$ B 細胞のみに結合し、TGN1412 は主に $CD3^+$ T 細胞に結合した。イサツキシマブの顆粒球への結合はわずかであった。イサツキシマブは 3 名のドナー由来血小板及び RBC には結合しなかった。

イサツキシマブは $CD3^+$ T 細胞及び $CD14^+$ 単球に結合し、見かけの解離定数 K_D はそれぞれ 0.19 及び 0.45 nmol/L であった（図 19）。結合量は 5 nmol/L（0.8 µg/mL に相当）で飽和した。

図 19 - 正常ヒト CD14⁺単球及び CD3⁺T 細胞に対するイサツキシマブ結合親和性



Abbreviations: mAb = monoclonal antibody; [M] = molar concentration; AF: Alexafluor488; FL: fluorescence

3.2.2 正常末梢血単核球における CD38 発現量の測定

IMV23-005 試験 [Module 4.2.1.2-6]

正常 PBMC における CD38 の発現量を、市販の QuantiBRITE システムの抗 CD38 抗体 HB7（BD Biosciences）を用いて評価した。

すべての試験において、飽和のみられる抗体濃度 2.5 µg/mL（17 nmol/L に相当）を使用した。結果は 1 細胞あたりに結合する抗体数（ABC）で表した。種々の細胞表面マーカーを用いて亜集団を特定した。すなわち $CD3^+$細胞を T 細胞、$CD19^+$細胞を B 細胞、$CD56^+$細胞を NK 細胞、$CD14^+$細胞を単球とした。

3 名のドナー由来細胞を用いたとき、正常ヒト PBMC における CD38 発現量は低かった。CD38 発現量が最も高かったのは、$CD56^+$ NK 細胞（14336 ABC）及び $CD14^+$ 単球（9116 ABC）であった。$CD3^+$ T 細胞における CD38 発現量は低く（3712 ABC）、$CD19^+$ B 細胞でも同様に低かった（2874 ABC）。公表されている知見と同様に、CD20 の発現は $CD19^+$ B 細胞のみに認められ、その発現量（85919 ABC）は CD38 よりもはるかに高かった（表 8）。

表 8 - 正常ヒト PBMC の 1 細胞あたりに結合する CD38 及び CD20 抗体数

	PBMC samples	
	Antibodies bound per cell[a]	
Cell type	**CD38**	**CD20**
$CD3^+$ T-cells	3712	141
$CD19^+$ B-cells	2874	85919
$CD56^+$ NK cells	14336	142
$CD14^+$ Monocytes	9116	422

Abbreviation: PBMC: peripheral blood mononuclear cell.
a CD38 ABC values are derived from three independent donors and CD20 ABC values from a single donor.

3.3 ヒトの正常血液細胞におけるイサツキシマブの作用の評価

3.3.1 正常ヒト末梢血細胞によるサイトカイン放出に対するイサツキシマブの作用の評価

IMV23-003 試験 [Module 4.2.1.2-7]

In vitro での正常 PBMC によるサイトカイン放出に対するイサツキシマブの作用を検討した。同時に、OKT3（抗 CD3 抗体、陽性対照として使用）、リツキシマブ（抗 CD20 抗体）及びアレムツズマ

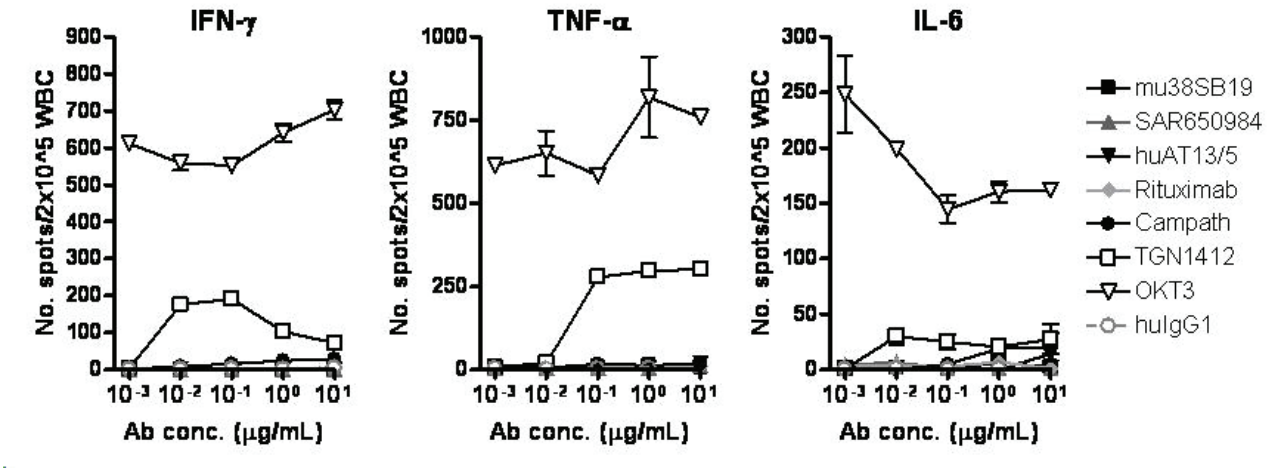
ブ（抗 CD52 抗体）を使用し、現在臨床で使用されているこれらの抗体の作用とイサツキシマブの作用を比較した。また、スーパーアゴニスト抗体 TGN1412 の作用とも比較した。

サイトカイン放出は、14 名の健康ヒトドナー由来末梢血細胞を用いて ELISpot（IFN-γ、TNF-α 及びインターロイキン［IL］-6 の測定）及びサイトメトリービーズアレイ（CBA）アッセイ（IFN-γ、TNF-α、IL-12p70、IL-10、IL-8、IL-6、IL-4、IL-2 及び IL-1β の測定）により測定した。ELISpot 法では、抗体のインキュベーション期間全体にわたりサイトカインをアッセイプレートに捕捉することにより、サイトカイン分泌細胞数を測定した。一方、CBA 法では抗体インキュベーション終了時に細胞培養上清中に存在するサイトカインレベルを測定した。ELISpot 法では、可溶性抗体を 1 ng/mL から 250 µg/mL までの濃度で検討した。試験に用いた抗体濃度は、*in vitro* においていくつかの CD38 発現腫瘍細胞株でイサツキシマブの直接的アポトーシス促進活性、並びに ADCC 及び CDC 活性を確認するために使用した条件を反映するように選択した。1.5 µg/mL（10 nmol/L に相当）の濃度は、抗原結合及びこれらの *in vitro* 活性が共に飽和する濃度である。最高濃度の 250 µg/mL は、患者にリツキシマブ（抗 CD20 抗体）を初回注入したときの最高血漿中濃度に相当する。CBA 法では、可溶性抗体を 0.1 µg/mL から 100 µg/mL までの濃度、固定化抗体を 10、1 及び 0.1 µg/well、風乾抗体を 0.1 及び 1 µg/well で検討した。すべてのアッセイにおいて、陽性対照抗体 OKT3 及び陰性非結合性アイソタイプ対照抗体を使用した。

14 名のドナーから調製した正常 PBMC 又は白血球（WBC）において、イサツキシマブ処理後のサイトカイン放出を評価した。いずれのアッセイにおいても、陽性対照抗体 OKT3 は、各ドナーで検討したすべてのサイトカインの強い放出を誘導した（IL-12p70 を除く）。一部のドナーでは、可溶性アレムツズマブ及び TGN1412 mAb もサイトカイン（IFN-γ、TNF-α 及び IL-6）放出を刺激した。また、風乾 TGN1412 は IL-2 を高レベルで放出した（2 名のドナーでの検討）。一方、種々のアッセイのいずれにおいても、使用した条件及び検討したドナーにかかわらず、イサツキシマブとのインキュベーション後にサイトカインの有意な放出はみられなかった。風乾型を用いたときでも、検討した 2 名のドナーでイサツキシマブ処理による有意なサイトカイン放出はみられなかった。

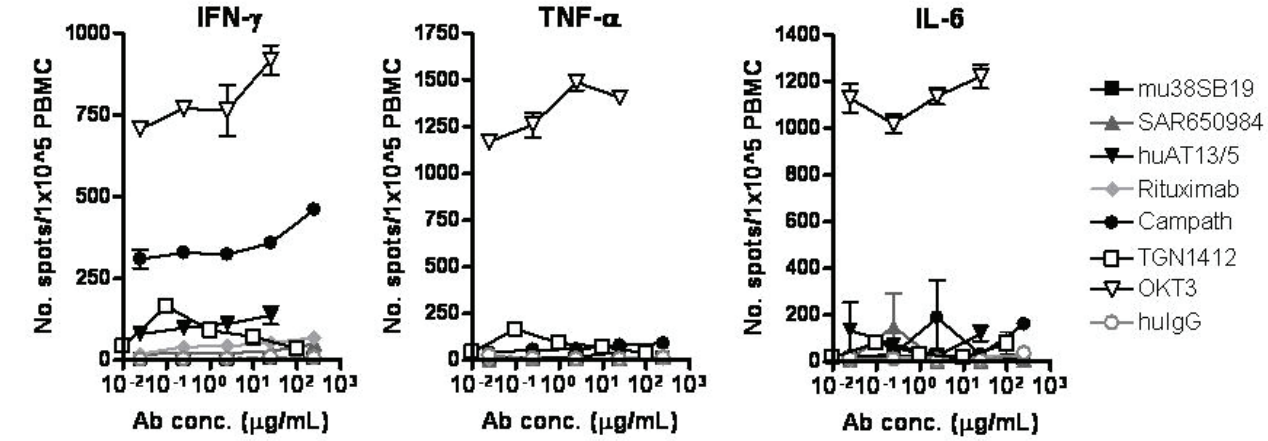
正常 WBC 及び PBMC において可溶性 mAb による IFN-γ、TNF-α 及び IL-6 の放出を ELISpot で測定したときの結果の代表例をそれぞれ図 20 及び図 21 に示す。

図 20 - 正常ヒト WBC による IFN-γ、TNF-α 及び IL-6 放出の ELISpot アッセイ



Abbreviations: Ab = antibody; conc. = concentration; IFN-γ = Interferon- γ; IL = Interleukin; TNF-α = Tumor necrosis factor- α; WBC = white blood cell; Campath = Alemtuzumab

図 21 - 正常ヒト PBMC による IFN-γ、TNF-α 及び IL-6 放出の ELISpot アッセイ



Abbreviations: Ab=antibody; conc.= concentration; IFN-γ = Interferon- γ; IL = Interleukin; PBMC= peripheral blood mononuclear cell; TNF-α = Tumor necrosis factor- α; Campath = Alemtuzumab

3.3.2　末梢血単核球の増殖に対するイサツキシマブの作用の評価

3.3.2.1　CFDA アッセイ（フルオレセイン由来色素）

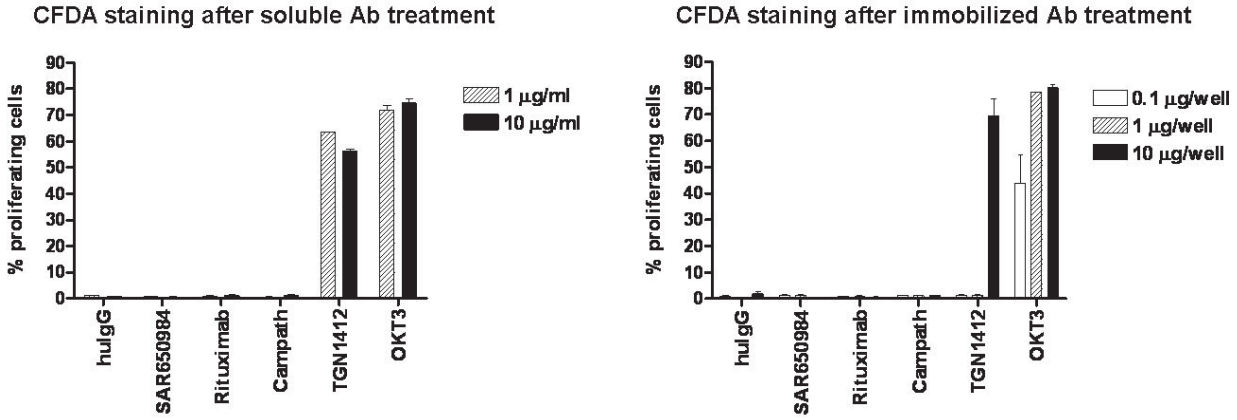
IMV23-004 試験 [Module 4.2.1.2-8]

イサツキシマブが *in vitro* で正常血液細胞の増殖を誘導するか否かを検討した。同時に、OKT3（抗 CD3 抗体、陽性対照）、リツキシマブ（抗 CD20 抗体）及びアレムツズマブ（抗 CD52 抗体）を使用し、現在臨床で使用されているこれらの抗体の作用とイサツキシマブの作用を比較した。また、スーパーアゴニスト抗体 TGN1412 の作用とも比較した。

増殖の測定には、5-(及び-6)-カルボキシフルオレセイン二酢酸（CFDA）スクシンイミジルエステルであらかじめ染色した細胞を用いた。細胞分裂した細胞は、色素が娘細胞間で希釈されるため、CFDA 染色強度が低下する。薬物処理検体の CFDA プロファイルをアイソタイプ対照抗体処理検体とフローサイトメトリー分析で比較することにより、抗体処理に反応して増殖している細胞の百分率を求めた。使用した抗体は、可溶型（濃度 1 又は 10 µg/mL）又は固定化型（濃度 0.1、1 又は 10 µg/well）のいずれかであった。標的細胞として 2 名の健康ドナーから採取した PBMC を用い、細胞を 4〜5 日間インキュベートした。抗体濃度は、イサツキシマブの *in vitro* 活性を確認するために使用した条件を反映し、*in vitro* で測定された抗原結合が飽和する条件（10^{-8} mol/L = 1.5 µg/mL）を含むように選択した。

予想されたように、抗 CD3 対照抗体（OKT3）は、これらの条件下でいずれのドナーについても PBMC を大幅に増殖させた（1 名のドナーについての結果を図 22 に示す）。この結果から、いずれのドナー由来の PBMC においても、PBMC 中に存在する T 細胞が活性化刺激に反応したことが示された。これらの実験において、リツキシマブとアレムツズマブは、いずれのドナーについても増殖細胞の平均百分率を増加させなかった。TGN1412 で処理したときには、可溶型及び固定化型のいずれの TGN1412 抗体でも、検討した 2 名のうち 1 名のドナーで PBMC の有意な増殖が認められた。一方、細胞をイサツキシマブとインキュベートしたときには、2 名の正常ドナー由来 PBMC の増殖に対する測定可能な作用はみられなかった。

図 22 - 5 日間の抗体処理による PBMC 活性化



Abbreviations: Ab: Antibody, CFDA: 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells, Campath: Alemtuzumab

3.3.2.2 固定化イサツキシマブを用いたトリチウムチミジンアッセイ

GVT0107 試験 [Module 4.2.1.2-9]

新鮮単離ヒト PBMC の増殖に対する固定化イサツキシマブの作用を、チミジン取込みを指標として評価した。

イサツキシマブ、リツキシマブ（抗 CD20 抗体）、アレムツズマブ（抗 CD52 抗体）を PBS で終濃度 1.0、10 及び 100 µg/mL に調整し、96 ウェルプレートに固定化した。同じ実験において、抗 CD3 抗体をイサツキシマブの存在下又は非存在下でプレートに固定化した（各抗体の終濃度は 1.0 又は 10 µg/mL）（各 4 測定分）。イサツキシマブの濃度範囲には飽和のみられる濃度を含めた。ヒトの非アトピー性ドナーから採取した PMBC を、固定化抗体を含むプレートに添加した。プレートを 24 時間インキュベートした後、[^{3}H]-チミジン（1 µCi/well）を添加し、一晩振盪した。取込みを毎分カウント数（cpm）で測定した。

固定化イサツキシマブは、陽性対照（固定化抗 CD3 抗体単剤で刺激した PBMC）と比較して、PBMC の増殖を引き起こさなかった。固定化アレムツズマブ又はリツキシマブも単剤でヒト PBMC の増殖を引き起こさなかった。固定化抗 CD3 抗体（1.0 又は 10 µg/mL）+ イサツキシマブ（1.0 又は 10 µg/mL）に曝露した細胞のチミジン取込みは、抗 CD3 抗体のみで処理した細胞と同程度であった。

3.3.2.3　可溶性イサツキシマブを用いたトリチウムチミジンアッセイ

GVT0107 試験 [Module 4.2.1.2-9]

新鮮単離ヒト PBMC の増殖に対する可溶性イサツキシマブの作用についても、チミジン取込みを指標として評価した。

ヒトの非アトピー性ドナーから採取した PBMC を、96 ウェル平底プレートで培養した。ウェルに可溶性抗体イサツキシマブ、TGN1412（抗 CD28 抗体）、リツキシマブ（抗 CD20 抗体）及びアレムツズマブ（抗 CD52 抗体）を終濃度 0.3、1.0、3.0、10 及び 30 µg/mL で添加した（各 3 測定分）。同じ実験において、可溶性抗 CD3 抗体（10 ng/mL）を単剤又はイサツキシマブ（0.3、1.0、3.0、10 及び 30 µg/mL）とともに PBMC に添加した（各 3 測定分）。イサツキシマブの濃度範囲には飽和のみられる濃度を含めた。陰性対照ウェルには、抗 CD3 抗体を添加せず、PBMC のみを添加した。プレートを 24 時間インキュベートした後、各ウェルに[^{3}H]-チミジン（1 µCi/well）を添加し、一晩インキュベートした。取り込まれた[^{3}H]-チミジンを測定し、cpm で表した。

陽性対照である可溶性抗 CD3 抗体の添加により、PBMC の増殖が誘導された。可溶性イサツキシマブを単剤で添加したとき、及び検討したその他の抗体を添加したときには、検討した濃度において、ヒト PBMC の増殖はみられなかった。可溶性抗 CD3 抗体で刺激されたヒト PBMC に可溶性イサツキシマブを添加したとき、抗 CD3 抗体単剤と比較して、PBMC の増殖が亢進することはなかった。

3.3.3　末梢血単核球減少及びアポトーシスに対するイサツキシマブの作用の評価

IMV23-001 試験 [Module 4.2.1.2-10]

イサツキシマブに関連した正常 PBMC のアポトーシス及び細胞減少を *in vitro* で検討した。同時に、リツキシマブ（抗 CD20 抗体）及びアレムツズマブ（抗 CD52 抗体）を用いて公表されている試験(13)(14) を再現し、現在臨床で使用されているこれらの抗体の作用とイサツキシマブの作用を比較した。

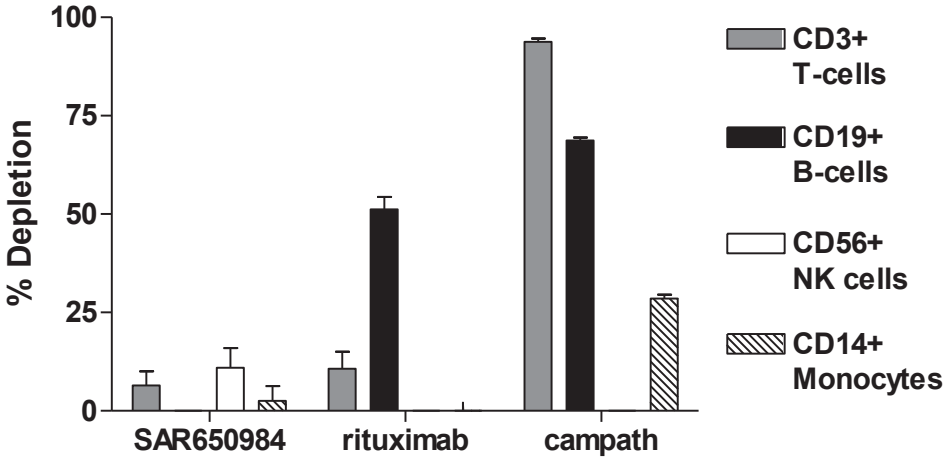
細胞減少試験では、細胞を 10 µg/mL の抗体と 37°C で 1 時間インキュベートした。抗体濃度 10 µg/mL は、イサツキシマブによる抗原結合が飽和する濃度の 66 nmol/L に相当する。

次に、標識抗体で細胞を染色した後、血液細胞の亜集団の存在をフローサイトメトリーで分析した。抗 CD3 抗体を T 細胞、抗 CD19 抗体を B 細胞、抗 CD56 抗体を NK 細胞、抗 CD14 抗体を単球の特定に用いた。アイソタイプ対照抗体処理検体との比較により、抗体処理後の細胞減少率を求めた。

全血検体及び全血から調製した WBC 検体を、RBC 溶解後に用いた。これらの実験条件は、リツキシマブにより B 細胞が減少することが *in vitro* で示された 2 つの公表されている試験(14)(15) に従った。

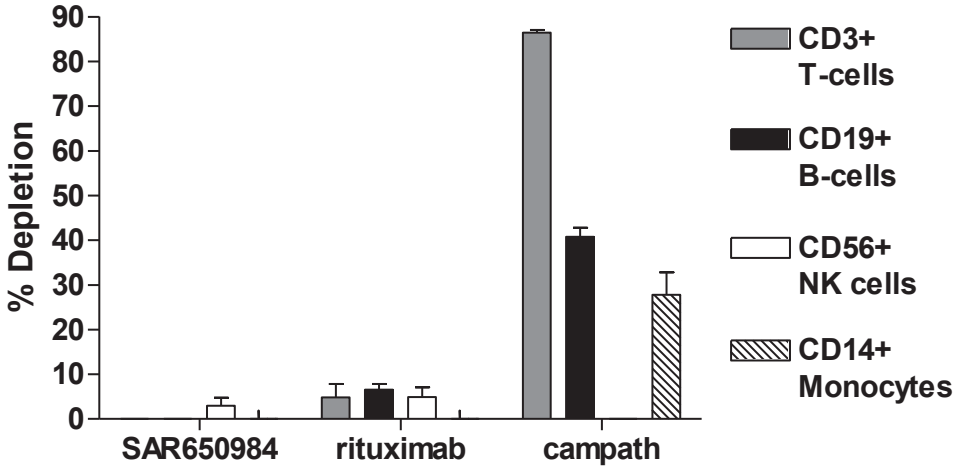
検討した 2 名のドナーから採取したいずれの細胞においても、1 時間インキュベーション後のイサツキシマブによる細胞減少率は 10%未満であった。同じ条件下で、リツキシマブによる B 細胞の減少率は 40～50%であった。アレムツズマブによる減少率は大きく、T 細胞で 80～90%、B 細胞で 40～80%であった。WBC 及び全血を用いて測定した PBMC 減少率データの例を図 23 及び図 24 に示す。全血には競合する血清 IgG が存在しているため、全血を用いたときの減少率の重要性はより低いと考えられる。

図 23 - ドナーKP083411 の WBC を用いた 1 時間細胞減少アッセイ



Abbreviations: NK: Natural Killer, campath: Alemtuzumab

図 24 - ドナーKP083411 の全血を用いた 1 時間細胞減少アッセイ

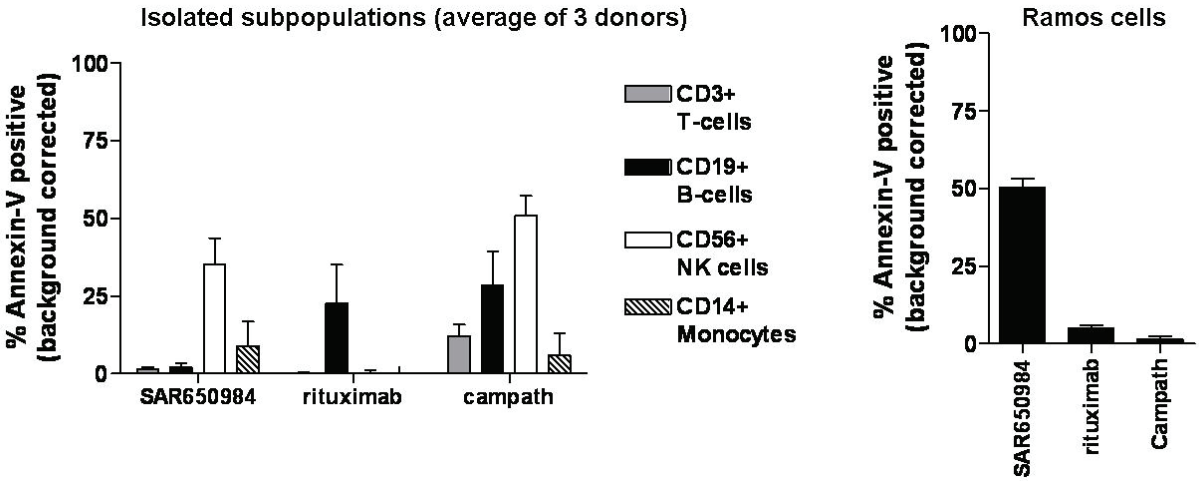


Abbreviations: NK: Natural Killer, campath = Alemtuzumab

別の実験において、イサツキシマブのアポトーシス促進活性を、B 細胞、T 細胞、NK 細胞及び単球を用いて評価した。3 名の健康ドナー由来 PBMC から細胞を単離し、抗体で処理した。イサツキシマブの濃度は、飽和がみられる 10 µg/mL を使用した。

これらの細胞集団を種々の抗体で処理した後、アポトーシス細胞を測定するため、アネキシン V 染色を行った。これらの 4 種類の単離細胞を別々にイサツキシマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ又はアイソタイプ対照抗体と 37°C で 4 時間インキュベートした。アッセイの精度を評価するため、対照として、Ramos 細胞も同じ条件下で同じ抗体とインキュベートした。3 名のドナーについてアネキシン V^+細胞百分率を平均し、アイソタイプ対照抗体処理検体で得られたバックグラウンド値で補正した。得られた値を図 25 に示す。

図 25 - PBMC から単離したサブポピュレーション細胞又は Ramos 細胞を用いたアネキシン V アッセイ



Abbreviations: PBMC: peripheral blood mononuclear cell, NK: Natural Killer. Campath = Alemtuzumab

イサツキシマブは PBMC から単離した T 細胞、B 細胞及び単球の亜集団のアポトーシス細胞百分率に影響を及ぼさなかった。イサツキシマブは、3 名のうち 2 名のドナーで単離 NK 細胞のアポトーシス細胞百分率を増加させた。アレムツズマブは、それと比べてより多く NK 細胞アポトーシスを増加させた。また、アレムツズマブは、3 名すべてのドナーで B 細胞アポトーシスを増加させ、3 名のうち 2 名のドナーで T 細胞アポトーシスを増加させた。リツキシマブは 3 名すべてのドナーで B 細胞アポトーシスを顕著に増加させた。イサツキシマブの *in vitro* での PBMC 減少に対する作用は、非常に軽度であった。PBMC から単離した亜集団を検討したとき、イサツキシマブは NK 細胞のアポトーシス細胞数を増加させたが、B 細胞、T 細胞及び単球には作用を示さなかった。同じ条件下で、イサツキシマブは Ramos 腫瘍細胞のアポトーシス細胞百分率を 50%増加させたが、他の抗体は作用を示さなかった。

3.4　イサツキシマブの非臨床評価に適していると考えられる動物種の特定

3.4.1　CD38 相同分子種の検討及びヒト配列との比較

ヒト CD38 の 3 つのアイソフォームの配列を、核酸及びタンパク質の配列データベース（Genbank データベース バージョン 163 及び Swissprot 55.4）から入手した。2 つのタンパク質アイソフォーム NP_001766 及び g1911101 は、それぞれ塩基配列 NM_001775 及び g1911100 に相当する。第 3 のタンパク質アイソフォームは、塩基配列 g5057572 から翻訳されたものに相当する。アイソフォーム g1911101 及び g5057572 の翻訳産物は C 末端が切断されたタンパク質であり、恐らく ADP-リボシルシクラーゼ活性が欠如していると考えられる(16)。したがって、CD38 の最も長い 300 アミノ酸からなるタンパク質アイソフォーム（NP_001766）を相同分子種配列検索に使用した。この配列は、一般的な白人集団に最も多い型でもある。

最も長いタンパク質配列 NP_001766 を用いた相同分子種検索を以下の動物種について実施した：アカゲザル（*Macaca mulatta*）、チンパンジー（*Pan troglodytes*）、カニクイザル（*Macaca fascicularis*）、イヌ（*Canis lupus familiaris*）、ラット（*Rattus norvegicus*）、マウス（*Mus musculus*）、ウサギ（*Oryctolagus cuniculus*）、マーモセット（*Callithrix jacchus*）、ブタ（*Sus scrofa*）。

CD38 相同分子種に相当する実験的配列が得られなかった場合、配列を予測した（表 9 の「予測配列」）。これらの予測は、ヒト CD38 タンパク質の配列及び検討動物種のゲノムデータに基づいて実施した。以下の動物種については相同分子種の配列が特定されなかった：フェレット、ハムスター及びモルモット。

ヒトの配列との一致率は、53%（ウサギ）～99%（チンパンジー）であった。ヒト CD38 と比較したときのサル（チンパンジー以外）における一致率／類似率の結果から、サル（すなわち、毒性試験で一般的に使用される動物種であるカニクイザル）を毒性評価に使用できる可能性が示唆された(17)。

表 9 - 異なる動物種におけるオーソログデータ

動物種	配列の種類 （予測あるいは実験的）	ヒト CD38（NP_001766）配列 との一致率／類似率
Pan troglodytes （チンパンジー）	予測配列 XP_001160669	全長の 99%一致／100%類似
Macaca mulatta （アカゲザル）	予測配列 XP_001099851	全長の 92.7%一致／95.7%類似
Macaca fascicularis （カニクイザル）	実験的配列 AAT36330	全長の 92.7%一致／95.7%類似(18)
Callithrix jacchus （マーモセット）	部分予測配列 (in house sequence)	81.5%一致／88.8%類似 （不完全配列）
Mus musculus （マウス）	実験的配列 NP_031672	全長の 59%一致／74%類似
Rattus norvegicus （ラット）	実験的配列 NP_037259	全長の 58%一致／75.5%類似
Oryctolagus cuniculus （ウサギ）	実験的配列 NP_001076152	全長の 53%一致／72%類似
Canis lupus familiaris （イヌ）	実験的配列 NP_001003141	全長の 57.5%一致／73%類似
Sus scrofa（ブタ）	mRNA AJ236934 の翻訳 部分配列	全長の 52.7%一致／72.3%類似 （C 末端の部分配列）

Abbreviation: mRNA = messenger ribonucleic acid

3.4.2 サル及びマウスの細胞を用いたイサツキシマブの親和性試験

非臨床安全性評価に通常使用される 2 つの動物種［非げっ歯類 1 種（カニクイザル）、げっ歯類 1 種（マウス）］とヒトの間で CD38 に対するイサツキシマブの結合親和性をフローサイトメトリー分析により比較した。

3.4.2.1 カニクイザル末梢血単核球におけるイサツキシマブの親和性試験

IVT0060 試験 [Module 4.2.1.2-11]

3 例のカニクイザルドナー由来正常 PBMC における種々の細胞集団に対する イサツキシマブの結合をフローサイトメトリーで評価した。

イサツキシマブ又は非特異的ヒト IgG chKTI（陰性アイソタイプ対照抗体）及び陽性対照 ch38SB25v（サル CD38 と交差反応性を示す抗 CD38 抗体）を用いてフローサイトメトリー分析を実施した。試験に用いたすべての抗体は、蛍光標識（AF488 標識）されたものであり、ヒトにおいてイサツキシマブによる抗原結合が飽和するとともに、ヒト及びサルの細胞で ch38SB25v も飽和する条

件が得られるように、濃度 10 µg/mL（6.7×10^{-8} mol/L）で使用した。ヒト CD38 への結合をチェックするため、Ramos 細胞の AF488 標識抗体による染色も実施した。

各細胞集団（$CD3^+$細胞を T 細胞、$CD20^+$細胞を B 細胞、$CD16^+$細胞を NK 細胞、$CD14^+$細胞を単球とした）で、イサツキシマブ及び ch38SB25v の染色陽性細胞百分率をそれぞれ求めた。各細胞集団の染色陽性細胞百分率は、陰性アイソタイプ対照抗体によるバックグラウンド染色を減じた値で表した。結果を表 10 に要約する。

表 10 - カニクイザル PBMCs におけるイサツキシマブ及び ch38SB25v 染色

Cell type	Marker	Cell type frequency	Isatuximab	ch38SB25v
T-lymphocytes	$CD3^+$	54-67% of PBLs	0-2% of PBLs	92-97% of PBLs
B-lymphocytes	$CD20^+$	19-24% of PBLs	0-2% of PBLs	92-97% of PBLs
NK cells	$CD16^+$	7-23% of PBLs	0-4% of PBLs	70-97% of PBLs
Monocytes	$CD14^+$	5-17% of PBMCs	0-1% of PBMCs	74-100% of PBMCs

Abbreviations: PBLs: peripheral blood lymphocytes, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, NK: natural killer

これらの条件下で、イサツキシマブによって染色された細胞は 0～4%であったが、ch38SB25v によって染色された細胞は 70～97%であった。イサツキシマブの濃度を 100 µg/mL まで増加させても染色陽性細胞は全リンパ球集団の 10%を超えなかったが、陽性対照の抗 CD38 抗体 ch38SB25v では 90%の細胞が染色された。結論として、イサツキシマブはカニクイザル PBMC の代表的な細胞集団に結合しないと考えられたことから、サルはイサツキシマブの毒性評価に適した動物種ではないと判断された。

3.4.2.2　マウス脾臓細胞におけるイサツキシマブの親和性試験

IVT0059 試験 [Module 4.2.1.2-12]

3 例の BALB/c マウス（チャールスリバーの BALB/cAnNCrl）由来脾臓リンパ球に対するイサツキシマブの結合についてもフローサイトメトリーで評価した。

イサツキシマブ又は非特異的ヒト IgG chKTI（陰性アイソタイプ対照抗体）及び陽性対照 muCD38-FITC（マウス CD38 と交差反応性を示す市販の抗 CD38 抗体）を用いてフローサイトメトリー分析を実施した。イサツキシマブ及び chKTI は、ヒトにおいてイサツキシマブによる抗原結合が飽和する条件が得られるように、濃度 10 µg/mL（66 nmol/L に相当）で使用し、muCD38-FITC は 2 µg/mL（13 nmol/L に相当）で使用した。

各細胞集団（$CD3^+$細胞を T 細胞、$CD19^+$細胞を B 細胞、$CD49^+$細胞を NK 細胞とした）で、イサツキシマブ及び muCD38-FITC の染色陽性細胞百分率をそれぞれ求めた。各細胞集団の染色陽性細胞百分率は、陰性アイソタイプ対照抗体によるバックグラウンド染色を減じた値で表した。結果を表 11 に要約する。

表 11 - マウス脾臓リンパ球におけるイサツキシマブ染色

Cell type	Marker	Cell type frequency	Isatuximab	muCD38
T-lymphocytes	$CD3^+$	22-28% of lymphocytes	0-1%	9-18%
B-lymphocytes	$CD19^+$	59-63% of lymphocytes	0%	93-97%
NK cells	$CD49^+$	5-8% of lymphocytes	0-3%	15-33%

Abbreviations: NK: natural killer

イサツキシマブでは特異的な染色は認められず、muCD38-FITC では約 70%の細胞が染色された。結論として、イサツキシマブは BALB/c マウスリンパ球の代表的な細胞集団に結合しないと考えられたことから、マウスはイサツキシマブの毒性評価に適した動物種ではないと判断された。

3.4.3 動物組織におけるイサツキシマブの組織交差反応性試験（IHC 法）

DIV1196 試験 [Module 4.2.1.2-13]

種々の実験動物種の代表的な組織パネルに対するイサツキシマブの結合を IHC 法で評価した。

IHC 法では、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、フェレット及びミニブタの前立腺、肺／気管支、脾臓、下垂体、心臓、肝臓、脳及び腎臓の凍結切片に、一次抗体としてイサツキシマブ又は非特異的ヒト IgG（陰性アイソタイプ対照抗体）を添加した。チンパンジーの前立腺及びリンパ節、ヒヒの前立腺、アカゲザルの膵臓、マーモセットの膀胱、ヒトの前立腺、脾臓及びリンパ節（陽性対照）、並びに Ramos 細胞（CD38 認識のバリデーション用）についても評価を行った。イサツキシマブの結合を光学顕微鏡により評価した（表 12）。

表 12 - イサツキシマブの組織交差反応性試験（IHC 法）を実施した動物組織一覧

	前立腺	肺/気管支	脾臓	下垂体	心臓	肝臓	脳	腎臓	膵臓	膀胱	リンパ節
マウス	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
ラット	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
ハムスター	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
ウサギ	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
モルモット	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
フェレット	-	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
イヌ	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
ミニブタ	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
マーモセット	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	-
カニクイザル	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
アカゲザル	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-
ヒヒ	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
チンパンジー	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X

Abbreviations: X: 試験実施; -: 実施していない

イサツキシマブによる中等度～強度の染色が、ヒトの脾臓及びリンパ節（リンパ系細胞）、前立腺（腺上皮細胞）、並びに Ramos 細胞にみられたことから、イサツキシマブによって CD38 が予想どおり認識されることが裏付けられた。

動物の組織において、イサツキシマブ特異的染色がチンパンジーの前立腺及びリンパ節で一貫して認められた（ヒト組織と同じパターン）。その他の 2 つの動物種における散発的な染色として、ハムスターで前立腺のみ（上皮表面及び分泌物のみ）が、フェレットで肺気管支腺のみ（上皮細胞の細胞質）が染色された。

その他の動物組織ではイサツキシマブ特異的な IHC 染色は認められなかった。マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ミニブタ、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット及びヒヒの前立腺、肺／気管支、脾臓、下垂体、心臓、肝臓、脳及び腎臓の免疫染色において、イサツキシマブはこれらの動物種と *in vitro* で組織交差反応性を示さないことが明らかになった。使用した一次抗体及び検討した動物種に関係なく、細胞外マトリックス線維に非特異的染色が高頻度に認められた。

結論として、ヒト及び広範な実験動物種の代表的な組織をイサツキシマブで IHC 染色したところ、イサツキシマブはヒトの脾臓、前立腺及びリンパ節に特異的に結合するとともに、チンパンジーにお

いても前立腺及びリンパ節に特異的に結合し、ヒトと同様の染色パターンを示すことが確認された。検討したその他の動物種の組織では、ハムスター（前立腺）及びフェレット（肺気管支腺）で散発的な結合が認められたことを除き、イサツキシマブの結合が認められなかった。

イサツキシマブの非臨床評価に適していると考えられる動物種の特定の結論

ヒト CD38 の配列との一致率が高かったのは、チンパンジー、アカゲザル及びカニクイザルのみであった。評価した他の動物種（マーモセット、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びブタ）では CD38 の一致率が低かった。バイオ医薬品の安全性評価に通常使用される 2 つの動物種（カニクイザル及びマウス）で結合親和性を評価した。サル PBMC 及びマウス脾臓細胞における CD38 の結合親和性を FACS 分析で検討したところ、イサツキシマブはいずれの動物種においても結合を示さなかった。最後に、IHC 法によるイサツキシマブの組織交差反応性試験を 13 の動物種（マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、フェレット、ミニブタ、イヌ、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、ヒヒ及びチンパンジー）の種々の組織で実施したところ、ヒト組織と同様の染色パターンを示す動物種はチンパンジーのみであった。

上記のこれらのデータに基づくと、チンパンジーのみが毒性評価に適した動物種と考えられた。しかし、倫理的理由により、従来の毒性試験はチンパンジーを用いて実施できない。

結論として、毒性評価に適した動物種が特定できなかったことから、ICH S6 (R1)ガイドラインで推奨されているように、非臨床安全性評価に代替法としてトランスジェニック動物又は特定の動物種で安全性情報を得るための適切なサロゲート mAb を使用することを検討することとした(19)。

3.4.4　トランスジェニックモデルを用いたアプローチ

イサツキシマブの非臨床開発時点において、適切なトランスジェニックマウスモデルは得られていなかった。したがって、そのようなモデルを用いた非臨床安全性試験は実施していない。

3.4.5　可能性のあるサル反応性サロゲート抗体の作製

2 つのサル反応性抗体（ch38SB25 及び chOKT10）を作製し、サルでの毒性評価に使用できる可能性のある反応性サロゲート抗体として評価した。サルにおける各サロゲート抗体の妥当性の評価に 3 つの評価基準（結合親和性、*in vitro* 機能活性及び組織交差反応性）を使用した。

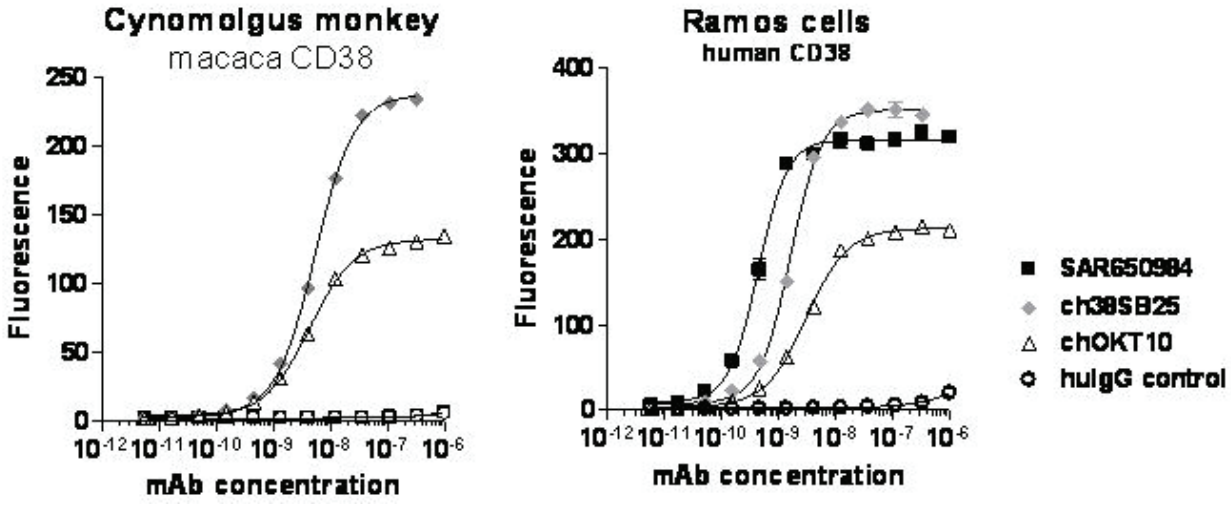
3.4.5.1 カニクイザルの細胞への ch38SB25 及び chOKT10 の結合の評価、並びにヒト腫瘍細胞株に対するそれらの *in vitro* 活性の評価

IMV23-013 試験 [Module 4.2.1.2-14]

カニクイザルから採取した初代サル血液細胞にヘルペスウイルスパピオを導入して細胞を不死化することによりカニクイザル B 細胞株を作製した。得られた細胞株（CB1）において、B 細胞由来であることを確認するため CD20 の発現を評価するとともに、SUN-4B7 mAb で CD38 の発現を評価した。AF488 標識抗体を用いて、これらの細胞への抗 CD38 抗体の結合を検討した。AF488 標識抗体は、いずれも 10^{-7} mol/L（15 µg/mL に相当）～10^{-12} mol/L（0.15 ng/mL に相当）の広範な濃度範囲で使用した。この濃度範囲は、ヒト腫瘍細胞株に発現しているヒト CD38 に対するイサツキシマブの結合が 10^{-8} mol/L で飽和し、見かけの K_D が 2×10^{-10} mol/L であることに基づいて選択した（図 26）。

AF488 標識 ch38SB25（ch38SB25-AF）及び AF488 標識 chOKT10（chOKT10-AF）の両方が、カニクイザル CD38 抗原にヒト CD38 抗原と同程度の親和性で結合した。ch38SB25-AF のヒト及びカニクイザルの CD38 に対する結合親和性は、それぞれ 0.9 nmol/L 及び 5.5 nmol/L であった。chOKT10-AF のヒト及びカニクイザルの CD38 に対する結合親和性は、それぞれ 1.5 nmol/L 及び 4.4 nmol/L であった。前述したように、AF488 標識イサツキシマブ（イサツキシマブ-AF）は、ヒト CD38 に対する結合親和性が 0.21 nmol/L であり、サル CD38 には結合しなかった。これらを総合すると、ch38SB25-AF 及び chOKT10-AF のヒト及びサルの CD38 に対する結合親和性はいずれもイサツキシマブ-AF のヒト CD38 抗原に対する結合親和性と同程度であった。

図 26 - カニクイザル CB1 細胞株及び Ramos 細胞株に対する抗 CD38 抗体の結合

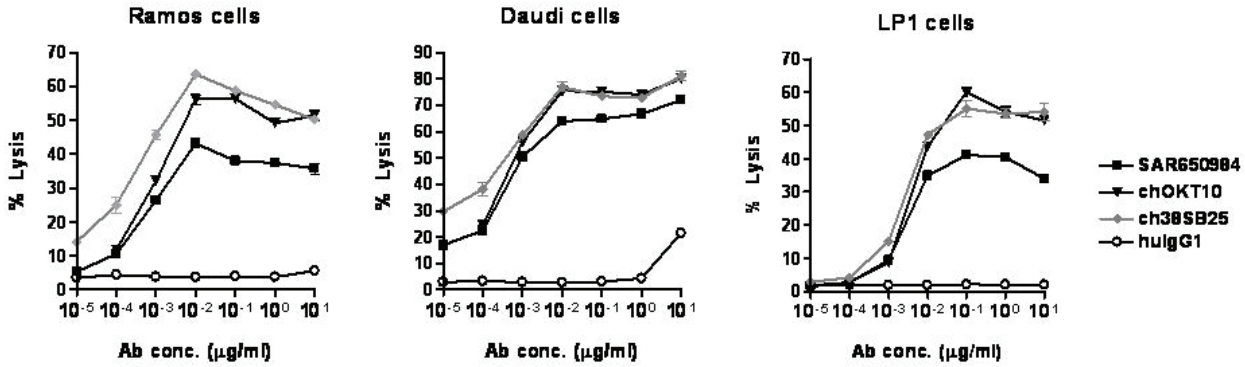


Abbreviations: mAb: monoclonal antibody

生物学的活性（ADCC、CDC、アポトーシス）を完全に評価するのに適したサルのアッセイ（$CD38^+$腫瘍細胞）は得られていないため、ch38SB25、chOKT10 及びイサツキシマブの *in vitro* 生物学的活性を、$CD38^+$ヒト腫瘍細胞株を用いて比較した。これらのサロゲート抗体はヒトとカニクイザルの CD38 タンパク質の両方に同程度の親和性で結合するため、一連の $CD38^+$ヒト腫瘍細胞で両 mAb の *in vitro* 機能活性を評価し、イサツキシマブと比較した。

3 つの $CD38^+$ヒト腫瘍細胞株（Ramos、Daudi 及び LP-1 細胞株）において、ch38SB25 及び chOKT10 はイサツキシマブと同程度の ADCC 活性を示した。結果を図 27 に示す。

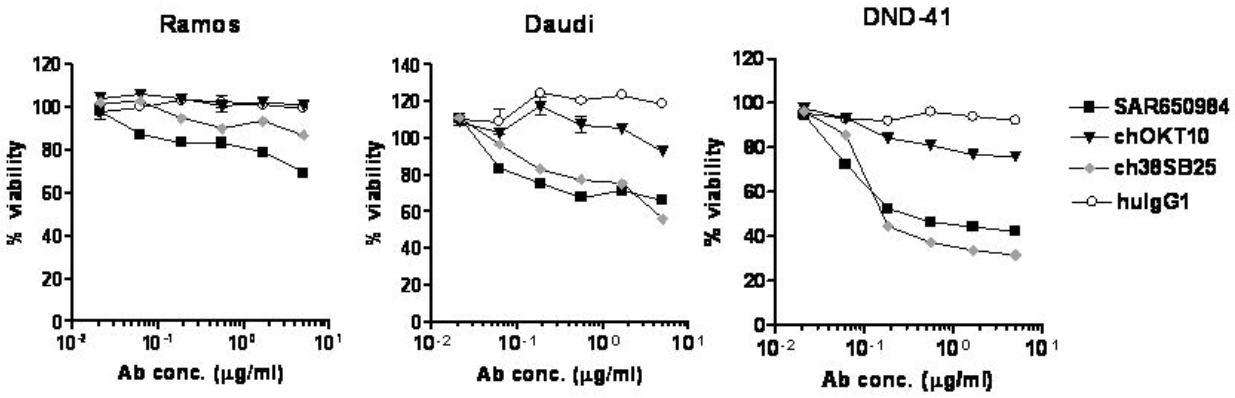
図 27 - 3 種類の $CD38^+$ヒト腫瘍細胞株に対する抗 CD38 抗体の ADCC 活性用量反応曲線



Abbreviations: Ab: antibody; ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; conc.: concentration

ch38SB25 は Daudi 及び DND-41 細胞株においてイサツキシマブと同程度の CDC 活性を示したが、Ramos 細胞に対する活性はわずかに弱かった。chOKT10 の Daudi 及び DND-41 細胞株に対する CDC 活性は軽微であった。結果を図 28 に示す。

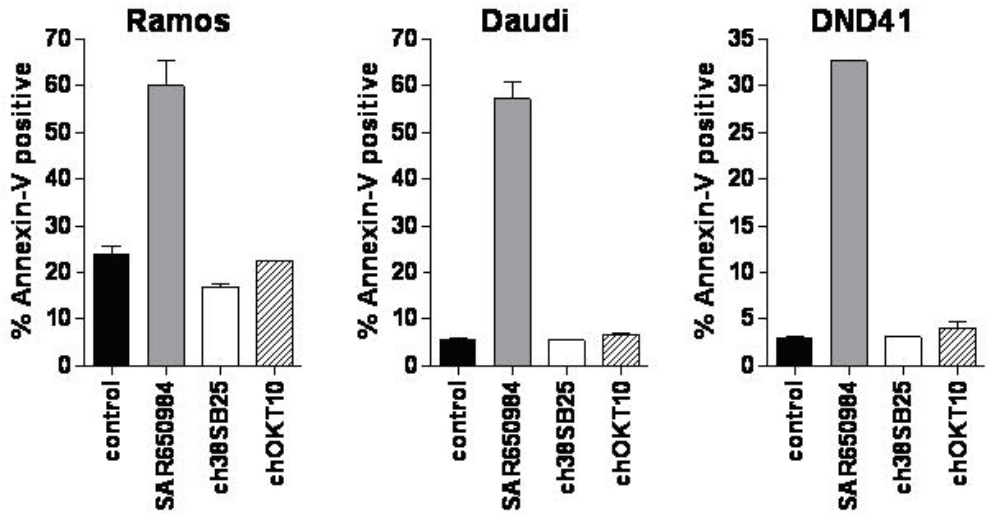
図 28 - 3 種類の CD38⁺ヒト腫瘍細胞株に対する抗 CD38 抗体の CDC 活性用量反応曲線



Abbreviations: Ab: antibody; CDC: complement-dependent cytotoxicity; conc.: concentration

イサツキシマブとは異なり、ch38SB25 及び chOKT10 はいずれも CD38⁺ヒト腫瘍細胞株に対して直接的なアポトーシス促進活性を示さなかった。結果を図 29 に示す。

図 29 - 3 種類の CD38⁺ヒト腫瘍細胞株に対する抗 CD38 抗体のアポトーシス促進活性



結論として、ch38SB25 及び chOKT10 は、ヒト及びカニクイザルの両方の CD38 抗原に同程度の親和性で結合した。これらのサロゲート抗体の CD38 への親和性はイサツキシマブと比較してわずかに低いものの同程度であった。ヒト腫瘍細胞株において、両抗体はイサツキシマブと同程度かつ強度の ADCC 活性を示したが、CDC 活性はイサツキシマブよりわずかに（ch38SB25）又ははるかに（chOKT10）弱かった。また、アポトーシス促進活性はイサツキシマブのみが示した。これらのデータをすべて表 13 に要約する。

表 13 - ヒト腫瘍細胞株に対するイサツキシマブ、ch38SB25 及び chOKT10 の *in vitro* 活性

Antibody	K_D human CD38	K_D monkey CD38	ADCC activity	CDC activity	Pro-apoptotic activity
Isatuximab	2.9×10^{-10}	-	41-72%	29-79%	30-52%
ch38SB25	8.4×10^{-10}	3.1×10^{-9}	55-81%	12-86%	-
chOKT10	1.2×10^{-9}	4.4×10^{-9}	56-80%	0-53%	-

Abbreviations: - denotes absence; ADCC: antibody-dependent cellular mediated cytotoxicity; CDC: complement-dependent cytotoxicity;
K_D : dissociation constant; -: denotes absence of activity
ADCC and CDC activities are expressed by maximum % of the cell lysis; Pro-apoptotic activity is expressed by maximum % of Annexin-V positivity

3.4.5.2 サル組織における ch38SB25 及び chOKT10 を用いた CD38 抗原の組織交差反応（IHC 法）

DIV1197 試験 [Module 4.2.1.2-15]

ヒト以外の霊長類動物種、マウス、ラット及びヒトの組織に対する ch38SB25 及び chOKT10 の結合を IHC 法で評価した。その結果を、ヒト組織においてイサツキシマブで得られた染色パターンと比較した。交差反応性を示す可能性は低かったが、可能性のあるこれら 2 つのサロゲート抗体を用いた毒性評価にマウス及びラットが適していないことを確認するため、これら 2 つの動物種についても検討した。

IHC 法では、カニクイザル、アカゲザル（前立腺を除く）、マウス及びラットの前立腺、肺／気管支、脾臓、下垂体、心臓、肝臓、脳及び腎臓の凍結切片に、一次抗体として ch38SB25、chOKT10 又は非特異的ヒト IgG（陰性アイソタイプ対照抗体）を添加した。ヒヒの前立腺、ヒトの前立腺、脾臓及びリンパ節、並びに Ramos 細胞（CD38 認識のバリデーション用）についても評価を行った。ch38SB25 及び chOKT10 の結合を光学顕微鏡により評価した。

ch38SB25 又は chOKT10 による中等度～強度の特異的染色が、ヒトの脾臓及びリンパ節（リンパ系細胞）、前立腺（腺上皮細胞）、並びに Ramos 細胞にみられたことから、イサツキシマブを用いた別の試験で述べたように、CD38 が予想どおり認識されることが裏付けられた。

マウス及びラットの組織では、ch38SB25 及び chOKT10 のいずれを用いたときも特異的な IHC 染色は認められなかったことから、これらの動物種がこれら 2 つの抗体を用いた毒性評価に適していないことが裏付けられた。

他の動物種（非ヒト霊長類）の組織では、カニクイザル（表 14）、アカゲザル及びヒヒの検討した多くの器官で ch38SB25 又は chOKT10 に特異的な染色が一貫して認められた。ch38SB25 による染色は、chOKT10 よりも強度で、脾臓のリンパ系細胞、多くの器官の血管内皮細胞、肝臓のクッパー細胞及び脳の白質で認められた。

表 14 -カニクイザル組織における ch38SB25 及び chOKT10 の組織交差反応性（IHC 法）及び正常ヒト組織におけるイサツキシマブ染色結果との比較

組織	染色部位	ch38SB25	chOKT10	正常ヒト組織でのイサツキシマブ染色
脾臓	リンパ球	+++	++	陽性
下垂体	血管内皮	+++	++	陽性
前立腺	上皮細胞 血管内皮	- ++	- ++	陽性 陰性
肝臓	クッパー細胞 血管内皮	+++ +++	++ ++	陽性 陰性
肺／気管支	気管支細胞 血管内皮	- +++	- ++	陽性 [a] 陰性
脳	星状膠細胞 白質 血管内皮	- ++ ++	- + +	陽性 [a] 陰性 陰性
心臓	血管内皮	++	+	陰性
腎臓	血管内皮	+++	+	陰性

Abbreviations: IHC: immunohistochemistry; GLP: Good Laboratory Practices; - = absence; + = minimal; ++ = moderate; +++ = marked

a GLP 適用組織交差反応性試験では染色が認められていない

正常ヒト組織においてイサツキシマブでみられた結合と比較して、カニクイザル組織での ch38SB25 又は chOKT10 による IHC 染色結果は以下のとおりであった。

- 脾臓、肝臓（クッパー細胞）、下垂体内皮細胞で同様の染色が認められた。
- 前立腺、肝臓、肺、脳、心臓及び腎臓の血管内皮細胞、並びに脳の白質は、サルの組織で陽性であったが、ヒトの組織ではイサツキシマブによる染色結果が陰性であった。
- 前立腺の上皮細胞、肺の気管支細胞及び脳の星状膠細胞は、サルの組織では陰性であったが、ヒトの組織ではイサツキシマブによる染色結果が陽性であった。

結論として、サルの組織におけるサロゲート抗体 ch38SB25 及び chOKT10 の組織交差反応性のパターンは、いずれもヒトの組織においてイサツキシマブでみられた組織交差反応性のパターンとは著しく異なっており、特に、いくつかの器官で内皮細胞の染色が認められた点が異なっていた。

サルの複数の組織でのサロゲート抗体による血管への結合を更に検討するため、追加の IHC アッセイを、下垂体、心臓及び腎臓由来の正常凍結ヒト組織においてサロゲート抗体 ch38SB25 を用いて

実施した。IHC 法での結果において、ヒト下垂体の血管に ch38SB25 による染色が認められた。ヒトの心臓及び腎臓の血管内皮には、ch38SB25 による免疫染色は認められなかった。これらのデータから、サルとヒトでそれぞれの相同抗体を使用したときにみられた染色パターンの違いは、サルとヒトの間で CD38 抗原の分布が異なることに関連すると考えられた。

4　安全性薬理試験

[Module 2.6.3 の 4 項]

TSK0154 試験 [Module 4.2.3.2-2]

ICH S9 ガイドライン (20) (21) に従い、また適切な動物種がないため（3.4 項）、イサツキシマブを用いた *in vitro* 又は *in vivo* 安全性薬理試験は特に実施しなかった。

ただし、カニクイザルは薬理反応を示す動物種ではないものの、一部の安全性薬理評価項目は、カニクイザルを用いたイサツキシマブの GLP 適用週 1 回反復静脈内投与毒性試験で評価した。この試験において、イサツキシマブに関連する ECG パラメータ、血圧、肉眼的行動プロファイル（体温を含む）及び呼吸機能の変化は、試験最高用量の 100 mg/kg/週まで認められなかった（TSK0154 試験）。

5　薬力学的薬物相互作用試験

2.4 項「イサツキシマブ／ポマリドミド併用による抗 MM 活性」を参照。

6　考察及び結論

イサツキシマブはMM細胞のCD38に結合し、複数のメカニズムを誘導して標的がん細胞の死滅を引き起こす。これらのメカニズムの一部は本抗体のFc部分によって媒介されており、ヒト補体を固定化してCDCを誘導するとともに、エフェクターであるNK細胞及びマクロファージに発現しているFcγRに結合してADCC及びADCPを誘導する。また、イサツキシマブは、Fcとは関係なく直接的に細胞死を誘導する。

上記のメカニズムのほかに、イサツキシマブは免疫細胞の活性を*in vitro*で調節する。例えば、イサツキシマブはNK細胞及び単球を活性化し、その溶解活性及び貪食活性をCD38発現標的細胞の非存在下で増強させる。イサツキシマブは、恐らくTregからの免疫抑制シグナルを阻害することにより、T細胞の活性も増強させる。

イサツキシマブは、IMiDであるレナリドミド及びポマリドミドといったMMの標準治療薬の活性を増強させる。イサツキシマブとポマリドミドを*in vitro*で併用したところ、MM細胞の死が有意に促進された。イサツキシマブとポマリドミドの併用による非臨床MM動物モデルでも抗腫瘍活性が増強した。

イサツキシマブの2つの臨床製剤 製法I＊ と 申請製法＊を*in vitro*及び*in vivo*で直接比較したところ、生物学的活性に差は認められなかった。

イサツキシマブをダラツムマブと*in vitro*で比較したところ、CD38の結合エピトープの違いによると考えられるいくつかのメカニズムの違いが認められた。*In vitro*実験で両抗体を直接比較すると、直接アポトーシス誘導作用及びCD38外酵素活性阻害作用に差が認められた。

イサツキシマブの非臨床安全性評価に適した動物種を特定するためいくつかの試験を実施した。ヒトとのCD38配列の一致率が高かったのはチンパンジー、アカゲザル及びカニクイザルであったが、イサツキシマブの評価に用いる非臨床試験動物種を特定するための標的結合試験（フローサイトメトリー）及び組織交差反応性試験（IHC法）では、チンパンジーのみが可能性のある適切な動物種であると特定された。しかし、一般的に、チンパンジーは毒性試験に適切な動物種ではないとされているため、ICH S6 (R1)ガイドラインで推奨されているように、イサツキシマブの非臨床安全性評価のために他の代替法、すなわち、トランスジェニック動物の使用、又は1つの動物種で安全性情報を得るために適切なサロゲートmAbを使用することを検討した(19)。

＊新薬承認情報提供時に置換

イサツキシマブの非臨床開発時点において、適切なトランスジェニックマウスモデルは得られていなかった。したがって、そのようなモデルを用いた非臨床安全性試験は実施していない。

可能性のある 2 つのサルサロゲート抗体（ch38SB25 及び chOKT10）を作製した。いずれのサロゲート抗体もカニクイザルの $CD38^+$細胞に結合し、その親和性はイサツキシマブのヒト $CD38^+$細胞への結合親和性と同程度であった。しかし、ch38SB25 及び chOKT10 を用いた検討において、それらの組織交差反応性のパターン（サルでは複数の組織で血管の染色が認められたが、ヒトでは認められなかった）は、ヒトの細胞及び組織でイサツキシマブによって得られたものと一致しないことが示された。これらの抗体の生物学的活性は、サルの $CD38^+$腫瘍細胞株を用いて評価することができないため、ヒトの $CD38^+$細胞株を用いて評価した。その結果、いずれのサロゲート抗体も ADCC 及び CDC の生物学的活性は示すが、イサツキシマブがヒト腫瘍細胞株で示したアポトーシス促進活性は欠如していることが示された。これらの結果から、サルの毒性評価に ch38SB25 及び chOKT10 を使用して得られたデータは、主に組織交差反応性パターンが大きく異なることにより、ヒトでのイサツキシマブの安全性評価における予測性が極めて低いことが示唆された。

可能性のある標的器官を特定するため、正常ヒト組織を用いた GLP 適用組織交差反応性試験を実施した結果、イサツキシマブに特異的な結合が予想どおりリンパ組織（脾臓、胸腺、リンパ節及び扁桃）及び骨髄に検出されるとともに、下垂体（内皮細胞）及び前立腺（腺上皮細胞）にも検出された。また、イサツキシマブに特異的な結合は、多くの組織の浸潤又は常在円形細胞（肝臓のクッパー細胞を含む）にも検出された。イサツキシマブの別のバッチを用いた過去の GLP 非適用組織交差反応性試験では、脳（星状膠細胞）及び肺（気管支上皮細胞）にも染色が認められたが、上記 GLP 試験では再現されなかった。2 つの試験で違う結果が得られた理由として、2 つの試験で使用したイサツキシマブのバッチ間の違い、またより可能性の高いものとして、GLP 試験ではバックグラウンドの染色が最適となるように、より高濃度のアイソタイプ対照抗体が用いられたことによるものと考えられる。また、気管支上皮の染色について IHC 法による追加試験を実施したところ、染色が認められたものの全てのドナーにではなく、CD38 タンパク質は主に腫瘍又は炎症環境で発現することが示唆された。非リンパ組織成分の染色は交差反応性を示す証拠と解釈され、意図しない標的部位が存在する可能性が示唆された。これらの組織を表 15 に要約する。

表 15 - 新鮮凍結正常ヒト組織におけるイサツキシマブ染色（リンパ組織以外）

ヒト組織	結合部位
前立腺	腺上皮細胞
下垂体	類洞内皮細胞
肺 [a]	気管支上皮細胞
脳 [a]	星状膠細胞

a GLP 適用組織交差反応性試験では染色が認められていない

正常ヒト PBMC を用いた *in vitro* アッセイにおいて、イサツキシマブはサイトカイン放出及び細胞活性化に対して有意な作用を示さなかった。したがって、患者にイサツキシマブを投与しても重大なサイトカイン放出症候群及び大幅な細胞減少が引き起こされる可能性は低いと考えられる。

最後に、カニクイザルは薬理反応を示す動物種ではないものの、一部の安全性薬理評価項目は、カニクイザルを用いたイサツキシマブの GLP 適用週 1 回反復静脈内投与毒性試験で評価した。この試験において、イサツキシマブに関連する ECG パラメータ、血圧、肉眼的行動プロファイル（体温を含む）及び呼吸機能の変化は、試験最高用量の 100 mg/kg/週まで認められなかった。

7　図表

本文中に記載した。

参 考 文 献

1. Campana D, Suzuki T, Todisco E, and Kitanaka A. CD38 in hematopoiesis. Chem Immunol 2000;75:169-88.
2. Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RM, et al. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. Science. 1993;262(5136):1056-9.
3. Lin P, Owens R, Tricot G, and Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. Am J Clin Pathol 2004;121:482-8.
4. Deckert J, Wetzel MC, Bartle LM, Skaletskaya A, Goldmacher VS, Vallee F, et al. SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies. Clin Cancer Res. 2014;20(17):4574-83.
5. Jiang H, Acharya C, An G, Zhong M, Feng X, Wang L, et al. SAR650984 directly induces multiple myeloma cell death via lysosomal-associated and apoptotic pathways, which is further enhanced by pomalidomide. Leukemia. 2016;30(2):399-408.
6. Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, Verbist B, Bald J, Plesner T, et al. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. Blood. 2016 21;128(3):384-94.
7. Feng X, Zhang L, Acharya C, An G, Wen K, Qiu L, et al. Targeting CD38 Suppresses Induction and Function of T Regulatory Cells to Mitigate Immunosuppression in Multiple Myeloma. Clin Cancer Res. 2017;23(15):4290-300.
8. de Weers M, Tai Y-T, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DCH, et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. J Immunol. 2011;186(3):1840-8.
9. Daratumumab (Darzalex®) label [Internet]. 2016 [cited 2 November 2018]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/761036s004lbl.pdf. Last access day: 19-Dec-2018.
10. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use (1997). U.S. Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. J Immunother. 1997;20(3):214-43.
11. The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2018 Feb 22]. Available from: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000004468-CD38/tissue. Last access on 05-Jul-2018. Last access day: 19-Dec-2018.
12. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, et al. Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology. Physiol Rev. 2008 July; 88:841-86.

13. Vugmeyster Y, Howell K, Bakshl A, Flores C, Canova-Davis E. Effect of Anti-CD20 Monoclonal Antibody, Rituxan, on Cynomolgus Monkey and Human B Cells in a Whole Blood Matrix. Cytometry 2003;52A:101-9.
14. Vugmeyster Y and Howell K. Rituximab-mediated depletion of Cynomolgus monkey B cells in vitro in different matrices: possible inhibitory effect of IgG. Int Immunopharmacol 2004;4:1117-24.
15. Hale G, Bright S, Chumbley G, Hoang T, Metcalf D, Munro AJ, et al. Removal of T cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement. Blood 1983;62(4):873-82.
16. Nata K, Takamura T, Karasawa T, Kumagai T, Hashioka W, Tohgo A, et al. Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): organization, nucleotide sequence and alternative splicing. Gene 1997;186:285-92.
17. Devaud C. Prades C. SAR650984 - CD38 orthologs study and sequence alignments with the Human sequence. Sanofi nonclinical pharmacology memo. 2018 Jul 17.
18. Ferrero E, Orciani M, Vacca P, Ortolan E, Crovella S, Titti F, et al. Characterization and phylogenetic epitope mapping of CD38 ADPR cyclase in the Cynomolgus macaque. BMC Immunol 2004;5(21).
19. ICH S6(R1) guideline: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; 12 June 2011.
20. ICH S9 guidance: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals; 29 October 2009.
21. ICH S9 guideline: Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals. Questions and Answers; 12 June 2018.

サノフィ株式会社

サークリサ点滴静注 100mg／同点滴静注 500mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 29

目　　次

2.6.3 薬理試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　薬理試験一覧表 4

2　　効力を裏付ける試験 11

3　　副次的薬理試験 21

4　　安全性薬理試験 28

5　　薬力学的薬物相互作用試験 29

表　目　次

表 2.6.3.1.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program 4

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings 11

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics – noteworthy findings 21

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology - study program 28

表 2.6.3.5.1 - Pharmacodynamic drug interactions overview - study program 29

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Primary pharmacodynamics **In vitro**					
Generation of the murine anti-CD38 antibody 38SB19 and in vitro comparison of other versions	Murine hybridoma cells, human tumor cell lines	In vitro	[redacted] USA	IMV23-011	[4.2.1.1-1]
SAR650984 inhibition of the enzymatic activity of CD38 in vitro	In vitro fluorescence assay	In vitro	[redacted] USA	IMV23-009	[4.2.1.1-2]
Comparative antibody-dependent cellular phagocytosis activity of isatuximab batches 製法Ⅰ* and 申請製法*	LP-1, MOLP-8 (multiple myeloma human cell lines), SU-DHL-8 and THP-1 human cancer cell lines	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0117	[4.2.1.1-3]
In vitro activity of SAR650984 on human tumor cells lines: apoptosis induction, CDC and ADCC activity	15 human tumor cell lines : Ramos, Daudi, Raji, SU-DHL-8, Namalwa, WSU-DLCL-2, LP-1, MOLP-8, NCI-H929, JVM-13, NALM-6, DND-41, TALL-1, MOLT-4 and CCRF-CEM	In vitro	[redacted] USA	IMV23-012	[4.2.1.1-4]
Determination of the in vitro Minimal Anticipated Biological Effect Level (MABEL) of SAR650984	Ramos, SU-DHL-8 and DND-41 human tumor cell lines	In vitro	[redacted] USA	IMV23-014	[4.2.1.1-5]

Abbreviations: ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; CDC: complement-dependent cytotoxicity; [redacted]

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.3.1.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program （続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Primary pharmacodynamics In vitro (continued)					
Evaluation of SAR650984 pro-apoptotic effect on fresh patient tumor samples	Fresh tumor samples (MM, AML, ALL, CLL, MZL, WD)	In vitro	[redacted] France	IVT0058	[4.2.1.1-6]
Effect of isatuximab on cytokine release by natural killer (NK) cells	Human buffy coat (n=1)	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0152	[4.2.1.1-7]
Effect of isatuximab on CD38 negative tumor cell lysis mediated by natural killer (NK) cells	NK-92 cell line or primary NK cells isolated from human buffy coats (n=7) plus K562 cell line	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0154	[4.2.1.1-8]
Effects of Isatuximab on M1 versus M2 polarization of macrophages	Human buffy coat (n=1)	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0150	[4.2.1.1-9]
Comparative complement-dependent cellular cytotoxicity activity of isatuximab batches 製法Ⅰ* and 申請製法*	OCI-LY19.CD38, U266.CD38, DND-41 and LP-1 human tumor cell lines	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0115	[4.2.1.1-10]
Comparative antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity of isatuximab batches 製法Ⅰ* and 申請製法*	LP-1 and SU-DHL-8 human cancer cell lines	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0116	[4.2.1.1-11]
Comparative pro-apoptotic activity of isatuximab batches 製法Ⅰ* and 申請製法*	SU-DHL-8 human cancer cell line	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0118	[4.2.1.1-12]

Abbreviations: MM: multiple myeloma; AML: acute Myeloid leukemia; ALL: acute lymphocytic leukemia; CLL: chronic lymphocyte leukemia; MZL: marginal zone lymphoma; WD: Waldenström disease; [redacted]

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.3.1.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program （続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Primary pharmacodynamics In vitro (continued)					
Comparative CD38 enzyme inhibition by isatuximab batches 製法 I * and 申請製法*	MOLP-8 CD38 expressing human cancer cell line	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0119	[4.2.1.1-13]
Comparative antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity of isatuximab and Darzalex®	LP-1 and SU-DHL-8 human cancer cell lines	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0122	[4.2.1.1-14]
Comparative complement-dependent cellular cytotoxicity activity of isatuximab and Darzalex®	OCI-LY19.CD38, U266.CD38 and DND-41 human cancer cell lines	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0121	[4.2.1.1-15]
Comparative pro-apoptotic activity of isatuximab and Darzalex®	SU-DHL-8, JJN3.CD38 and RPMI-8226.CD38 human cancer cell lines	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0124	[4.2.1.1-16]
Comparative CD38 enzyme inhibition by isatuximab and Darzalex®	LP-1 and RPMI8226 human MM cell lines	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0125	[4.2.1.1-17]
Comparative binding of isatuximab and Darzalex® to CD38 expressing tumor cells	MOLP-8, LP-1, RPMI-8226, NCI-H929, SUDHL-8 and Daudi human cancer cell lines	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0147	[4.2.1.1-18]
Antibody sequence differences between the anti-CD38 antibodies isatuximab and daratumumab	N/A	N/A	Sanofi-aventis recherche & développement 13 quai Jules Guesde 94403 Vitry-sur-Seine, France	ONVT0130	[4.2.1.1-19]

Abbreviations: [redacted]MM: multiple myeloma; N/A: not applicable

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.3.1.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program （続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Primary pharmacodynamics In vitro (continued)					
Structure-based analysis of epitopes on CD38 recognized by anti-CD38 antibodies isatuximab and daratumumab	Purified complex (batch VAB.QDJ1.159C) between the human CD38 (45-300)-N100D-N164A-N209DN219D and the human Fab-SAR650984	N/A	Sanofi-aventis recherche & développement 13 quai Jules Guesde 94403 Vitry-sur-Seine, France	ONVT0131	[4.2.1.1-20]
Isatuximab and Darzalex® differential binding to human red blood cells	Human buffy coat samples from healthy donors (n=3)	In vitro	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVT0128	[4.2.1.1-21]
Primary pharmacodynamics In vivo					
Pharmacodynamics of intravenous SAR650984 antibody (hu38SB19) in SCID mice bearing subcutaneous SU-DHL-8 tumors	CB.17 SCID mice	Intravenous	[redacted] USA	IMP23-018	[4.2.1.1-22]
Efficacy evaluation of isatuximab (SAR650984) and pomalidomide combination in the human multiple myeloma cell line MOLP-8 xenograft tumor model in NSG mice	NSG (NOD.Cg- Prkdc^{scid} Il2^{rgtm1Wjl}/SzJ; NOD SCID gamma) mice	Intravenous	Sanofi Research & Development 640 Memorial drive Cambridge MA 02139, USA	ONVV0145	[4.2.1.1-23]
Phase I and Phase II clinical batches efficacy comparability in SU-DHL-8 lymphoma xenograft model in SCID mice	CB17/Icr-Prkdcscid mice/crl SCID mice	Intravenous	Sanofi-aventis recherche & développement 13, quai Jules Guesde 94403 Vitry-sur-Seine, France	ONVV0095	[4.2.1.1-24]

Abbreviations: SCID: Severe combined immunodeficient

表 2.6.3.1.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program （続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Secondary pharmacodynamics **In vitro**					
Evaluation by immunohistochemistry of the binding of isatuximab to representative normal human tissues	Normal human tissues	In vitro	sanofi-aventis recherche & développement Drug Safety Evaluation 3 digue d'Alfortville 94140 Alfortville, France	IHX0003	[4.2.1.2-1]
Evaluation by immunohistochemistry of the binding of isatuximab and huAT13/5 to representative normal human tissues	Normal human tissues	In vitro	[redacted] USA	IMH23-001	[4.2.1.2-2]
Evaluation of CD38 protein expression and localization in human pituitary gland	Human pituitary gland	In vitro	Sanofi-aventis recherche & développement 13, quai Jules Guesde 94403 Vitry-sur-Seine, France	PVT0002	[4.2.1.2-3]
Evaluation of CD38 protein expression and localization in human lung tissue samples	Human bronchial epithelium	In vitro	Sanofi-aventis recherche & développement 13, quai Jules Guesde 94403 Vitry-sur-Seine, France	PVT0001	[4.2.1.2-4]
Evaluation of isatuximab binding to normal human peripheral blood cells	Human peripheral blood cells	In vitro	[redacted] USA	IMV23-006	[4.2.1.2-5]
Quantitation of CD38 expression on human tumor cell lines and normal human peripheral blood cells	Human peripheral blood cells and human tumor cell lines	In vitro	[redacted] USA	IMV23-005	[4.2.1.2-6]
Evaluation of isatuximab effects on cytokine release by normal human peripheral blood cells	Human peripheral blood cells	In vitro	[redacted] USA	IMV23-003	[4.2.1.2-7]

Abbreviations:

表 2.6.3.1.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program （続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Secondary pharmacodynamics In vitro (continued)					
Evaluation of isatuximab effects on normal human peripheral blood cell activation	Human peripheral blood cells	In vitro	[redacted] USA	IMV23-004	[4.2.1.2-8]
Evaluation of isatuximab effects on normal human peripheral blood cell activation	Human PBMCs	In vitro	sanofi-aventis, US Inc. 1041 Route 202-206 Bridgewater, NJ 08807, USA	GVT0107	[4.2.1.2-9]
Evaluation of isatuximab effects on human peripheral blood mononuclear cell depletion and apoptosis	Human PBMCs	In vitro	[redacted] USA	IMV23-001	[4.2.1.2-10]
Evaluation of isatuximab binding on cynomolgus monkey peripheral blood mononuclear cells	Cynomolgus monkey peripheral blood mononuclear cells	In vitro	Sanofi-aventis recherche & développement 13, quai Jules Guesde 94403 Vitry-sur-Seine, France	IVT0060	[4.2.1.2-11]
Evaluation of isatuximab binding on mouse splenocytes	Murine splenocytes	In vitro	Sanofi-aventis recherche & développement 13, quai Jules Guesde 94403 Vitry-sur-Seine, France	IVT0059	[4.2.1.2-12]
Evaluation of the binding and in vitro activity of 2 anti-CD38 antibodies, ch38SB25 and chOKT10 with cross-reactivity to human and monkey CD38	Human tumor cell lines	In vitro	[redacted] USA	IMV23-013	[4.2.1.2-14]

Abbreviations: PBMCs: peripheral blood mononuclear cells

表 2.6.3.1.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program （続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Secondary pharmacodynamics **In vitro (continued)**					
Evaluation of the binding of isatuximab on a representative list of tissues from various laboratory animals	Different animal species and tissues	In vitro	sanofi-aventis recherche & développement Groupe sanofi-aventis Drug Safety Evaluation 13 quai Jules Guesde 94400 Vitry sur Seine, France	DIV1196	[4.2.1.2-13]
Evaluation of the binding by immunohistochemistry of 2 anti-CD38 antibodies, ch38SB25 and chOKT10 with cross-reactivity to human and monkey CD38	Different monkey tissues	In vitro	sanofi-aventis recherche & développement Groupe sanofi-aventis Drug Safety Evaluation 13 quai Jules Guesde 94400 Vitry sur Seine, France	DIV1197	[4.2.1.2-15]
Safety pharmacology					
Toxicity study using weekly administration for 3 weeks with safety pharmacology endpoints: ECG Blood pressure Central Nervous System Body temperature Respiratory function	Monkey (cynomolgus)	Intravenous (0.5-hour infusion)	sanofi-aventis recherche & développement Preclinical Safety Global Operations France - Montpellier 371 rue du Pr. J. Blayac 34184 Montpellier Cedex 04 France	TSK0154	[4.2.3.2-2]
Pharmacodynamic drug interactions					
Not applicable, no study performed.					

Abbreviations: ECG: electrocardiogram

2　効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Generation of the murine anti-CD38 antibody 38SB19 and in vitro comparison of other versions	Murine hybridoma cells, human tumor cell lines	In vitro	N/A	N/A	A high affinity murine anti-CD38 Ab 38SB19 was identified (with K_D of 0.12 nM), which has potent pro-apoptotic activity against CD38 positive tumor cells in vitro. hu38SB19 v1.00 (ultimately renamed SAR650984), derived from it retained CD38 binding and pro-apoptotic activity. In addition, it can mediate strong CDC and ADCC activity against human tumor cell lines in vitro.	IMV23-011	[4.2.1.1-1]
SAR650984 inhibition of the enzymatic activity of CD38 in vitro	In vitro fluorescence assay	In vitro	0.2, 2, 20, and 200 nM (batches [redacted] and [redacted])	N/A	SAR650984 (isatuximab) is the only anti-CD38 Ab tested in our in vitro assay which has very potent inhibition of the enzymatic activity of recombinant CD38 as measured by cGDPR production (reduced up to approximately 12% of controls in the presence of 20 or 200 nM isatuximab)	IMV23-009	[4.2.1.1-2]

Abbreviations: Ab: antibody; ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; CDC: complement-dependent cytotoxicity; cGDPR: cyclic guanosine diphosphate-ribose; N/A: not applicable

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Comparative antibody-dependent cellular phagocytosis activity of isatuximab batches 製法Ⅰ* and 申請製法*	LP-1, MOLP-8 (MM), SU-DHL-8 (NHL) and THP-1 (AML) cell lines	In vitro	1 µg/mL (製法Ⅰ* batch: [redacted] 申請製法* batch: [redacted])	N/A	Isatuximab batches 製法Ⅰ* stored at +5°C (standard conditions), 申請製法* stored at +5°C or stressed for 3 months at +25°C exhibited no significant difference in ADCP activity at 1 µg/ml in LP-1, MOLP-8 and SU-DHL-8 cell lines (all Bonferroni p values ≥0.05)	ONVT0117	[4.2.1.1-3]
In vitro activity of SAR650984 on human tumor cell lines: apoptosis induction, CDC and ADCC activity	MM: LP-1, MOLP-8, NCI-H929 NHL: Ramos, Daudi, Raji, SU-DHL-8, Namalwa, WSU-DLCL-2 B-CLL: JVM-13 B-ALL: NALM-6 T-ALL: DND-41, TALL-1, MOLT-4 and CCRF-CEM	In vitro	0.001 ng/mL to 5 µg/mL (batchs [redacted] and [redacted])	N/A	SAR650984 mediates: - CDC (EC_{50} calculable for 7/15 cell lines: between 0.05 and 1.61 nM or 8 and 241.2 ng/mL) - ADCC (EC_{50} calculable for 15/15 cell lines; between 0.7 and 50.8 pM or 0.10 and 7.61 ng/mL) - Pro-apoptotic activity (EC_{50} assessed for 5/15 cell lines; between 0.01 and 0.10 nM) against a panel of CD38 positive cells lines derived from various hematologic malignancies	IMV23-012	[4.2.1.1-4]

Abbreviations: [redacted]MM: multiple myeloma; NHL: Non-Hodgkin's lymphoma; AML: acute Myeloid leukemia; ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCP: antibody-dependent cellular phagocytosis; CDC: complement-dependent cytotoxicity; B-ALL: B-acute lymphoblastic leukemia; B-CLL: B-chronic lymphocytic leukemia; T-ALL: T acute lymphoblastic leukemia; N/A: not applicable

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Determination of the in vitro Minimal Anticipated Biological Effect Level (MABEL) of SAR650984	Ramos, SU-DHL-8 and DND-41 human tumor cell lines	In vitro	Pro-apoptotic activity and ADCC: 0.01 ng/mL to 10 µg/mL CDC: 2.3 ng/mL to 5 µg/mL (batchs [redacted])	N/A	Wide range of sensitivity between different in vitro assays. The ADCC activity had the lowest EC_{20} of $9.98x10^{-13}$ M (rounded to 1 pM, 0.15 ng/mL). The next sensitive assay was apoptosis induction with an EC_{20} of $7.54x10^{-12}$ M, (rounded at 7.5 pM, 1.13 ng/mL). Finally, the CDC activity had the highest EC_{20} value of $1.27x10^{-10}$ M (rounded to 127 pM, 19.08 ng/mL)	IMV23-014	[4.2.1.1-5]
Evaluation of SAR650984 pro-apoptotic effect on fresh patient tumor samples	Fresh tumor samples (MM, AML, ALL, CLL, MZL, WD)	In vitro	100 µg/mL (batch [redacted])	N/A	SAR650984 can induce apoptosis in patient tumor cells either by direct binding to the cells or by acting through effector mechanisms such as complement or macrophage effector cells	IVT0058	[4.2.1.1-6]

Abbreviations: ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; CDC: complement-dependent cytotoxicity; MM: multiple myeloma; AML: acute Myeloid leukemia; ALL: acute lymphocytic leukemia; CLL: chronic lymphocyte leukemia; MZL: marginal zone lymphoma; WD: Waldenström disease; N/A: not applicable

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Efficacy evaluation of isatuximab (SAR650984) and pomalidomide combination in the human multiple myeloma cell line MOLP-8 xenograft tumor model in NSG mice	NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ; NOD SCID gamma) mice	SAR650984: intravenous (10 mL/kg) Pomalidomide: intraperitoneal (10 mL/kg)	SAR650984: 20 or 40 mg/kg Pomalidomide: 5 or 10 mg/kg	8F	SAR650984 at 20 mg/kg or at 40 mg/kg in combination with Pomalidomide at 5 mg/kg or at 10 mg/kg induced significant anti-tumor efficacy in the MOLP-8 multiple myeloma tumor xenograft model in NSG mice	ONVV0145	[4.2.1.1-23]
Effect of isatuximab on cytokine release by natural killer (NK) cells	Human buffy coat (n=1)	In vitro	0.5 µg/mL	N/A	The release of IFN-γ and TNF-α induced by isatuximab was higher than that of non-treated or IgG treated NK cells isolated from PBMCs.	ONVT0152	[4.2.1.1-7]
Effect of isatuximab on CD38 negative tumor cell lysis mediated by natural killer (NK) cells	NK-92 cell line or primary NK cells isolated from human buffy coats (n=7) plus K562 cell line	In vitro	0.03 µg/ml and 0.3 µg/ml for NK-92 cells and 1 µg/ml for primary NK cells	N/A	Pre-incubating NK-92 cells with isatuximab at 0.3 µg/mL lysed over 90% of the K562 cells while preincubation with IgG lysed less than 50%. Pre-incubating primary NK cells with isatuximab at 1 µg/mL versus IgG at 1 µg/mL, increases the average cytolysis of K562 in donor 3 by 12.12%, in donor 5 by 41.44% and in donor 6 by 20.50%.	ONVT0154	[4.2.1.1-8]

Abbreviations: F: female; SCID: Severe combined immunodeficient; N/A: not applicable

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Effects of isatuximab on M1 versus M2 polarization of macrophages	Human buffy coat (n=1)	In vitro	10 µg/mL	N/A	Treatment of monocytes alone with 10 µg/mL isatuximab does not increase M1 polarization marker CD80 in human primary monocytes. However, treatment of co-cultured primary monocytes and autologous NK cells with 10 µg/mL isatuximab results in increased percentage of CD80+ monocytes, likely due to the IFN-γ released by NK cells. Isatuximab does not induce M2 polarization marker CD206 on monocytes cultured alone or in the presence of NK cells.	ONVT0150	[4.2.1.1-9]
Comparative complement-dependent cellular cytotoxicity activity of isatuximab batches 製法Ｉ＊ and 申請製法＊.	OCI-LY19.CD38, U266.CD38, DND-41 and LP-1 human tumor cell lines	In vitro	0.005, 0.14, 0.041, 0.123, 0.370, 1.111, 3.333 and 10.000 µg/mL (製法Ｉ＊ batch: [redacted]; 申請製法＊ batch: [redacted])	N/A	Isatuximab batches 製法Ｉ＊ stored at +5°C (standard conditions), 申請製法＊ stored at +5°C or stressed for 3 months at +25°C exhibited comparative CDC activity based on the fact that their estimated EC_{50}rel values and maximum estimated effect in OCI-LY19.CD38, U266.CD38, DND-41 and LP-1 cell lines, are comparable	ONVT0115	[4.2.1.1-10]

Abbreviations: NK: Natural Killer; [redacted] N/A: not applicable

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per Group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Comparative antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity of isatuximab batches 製法Ⅰ* and 申請製法*	LP-1 and SU-DHL-8 human cancer cell lines	In vitro	0.0156, 0.0625, 0.2500 and 1.000 µg/mL (製法Ⅰ* batch: [redacted] 申請製法* batch: [redacted])	N/A	Isatuximab batches 製法Ⅰ* stored at +5°C (standard conditions), 申請製法* stored at +5°C or stressed for 3 months at +25°C exhibited no significant difference in ADCC activity at all concentrations tested in LP-1 and SU-DHL-8 cell lines (all Bonferroni p values ≥0.05)	ONVT0116	[4.2.1.1-11]
Comparative pro-apoptotic activity of isatuximab batches 製法Ⅰ* and 申請製法*	SU-DHL-8	In vitro	0.0005, 0.0014, 0.0041, 0.0123, 0.0370, 0.1111, 0.3333 and 1.0000 µg/mL (製法Ⅰ* batch: [redacted] 申請製法* batch: [redacted])	N/A	Isatuximab batches 製法Ⅰ* stored at +5°C (standard conditions), 申請製法* stored at +5°C or stressed for 3 months at +25°C exhibited comparative pro-apoptotic activity with comparable estimated EC_{50}rel values and maximum estimated effect in SU-DHL-8 cells	ONVT0118	[4.2.1.1-12]
Comparative CD38 enzyme inhibition by isatuximab batches 製法Ⅰ* and 申請製法*	MOLP-8 CD38 expressing cell line	In vitro	0.004, 0.012, 0.037, 0.111, 0.333, 1, 3 and 10 µg/mL (製法Ⅰ* batch: [redacted] 申請製法* batch: [redacted])	N/A	Isatuximab batches 製法Ⅰ* stored at +5°C (standard conditions), 申請製法* stored at +5°C or stressed for 3 months at +25°C induced a similar dose-dependent inhibition of cADPR synthesis from NAD	ONVT0119	[4.2.1.1-13]

Abbreviations: ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; [redacted] formulation 2.; EC_{50}rel: relative EC_{50}; N/A: not applicable; cADPR: cyclic adenosine diphosphate ribose; NAD: nicotinamide adenine dinucleotide;

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per Group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Phase I and Phase II clinical batches efficacy comparability in SU-DHL-8 lymphoma xenograft model in SCID mice	CB17/Icr-Prkdcscid mice/crl SCID mice	Intravenous (10 mL/kg)	2.5, 10, 20, 40 mg/kg/injection twice weekly on Days 11, 14, 18, 21 (製法Ｉ＊ batch: [redacted] 申請製法＊ batch: [redacted])	8F	The 製法Ｉ＊ and申請製法＊ clinical batches showed the same efficacy profile with activity at 10, 20 and 40 mg/kg and no biological activity at 2.5 mg/kg in a SU-DHL-8 lymphoma xenograft model. No significant differences for the tumor volume changes from baseline between both clinical batches were observed globally and at each day.	ONVV0095	[4.2.1.1-24]
Comparative antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity of isatuximab and Darzalex®	LP-1 and SU-DHL-8 cancer cell lines	In vitro	0.008, 0.040, 0.200, 1.000 and 5.000 µg/mL (isatuximab batch: [redacted] Darzalex® batch: [redacted])	N/A	Isatuximab and Darzalex® exhibited no significant difference in ADCC activity at all concentrations tested in LP-1 and SU-DHL-8 cell lines (all comparison p-values ≥0.05)	ONVT0122	[4.2.1.1-14]

Abbreviations: F: female; SCID: Severe combined immunodeficient; ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; [redacted]N/A: not applicable

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Comparative complement-dependent cellular cytotoxicity activity of isatuximab and Darzalex®	OCI-LY19.CD38, U266.CD38 and DND-41 cells	In vitro	0.005, 0.014, 0.041, 0.123, 0.370, 1.111, 3.333 and 10.000 µg/mL (isatuximab batch: [redacted] Darzalex® batch: [redacted])	N/A	Although Isatuximab and Darzalex® exhibited similar estimated EC50rel values in OCI-LY19.CD38, U266.CD38 and DND-41 cell lines, Darzalex® exhibited stronger CDC activity as measured by the maximum estimated effect in all three cell lines	ONVT0121	[4.2.1.1-15]
Comparative pro-apoptotic activity of isatuximab and Darzalex®	SU-DHL-8, JJN3.CD38 and RPMI-8226.CD38	In vitro	0.002, 0.005, 0.014, 0.041, 0.123, 0.370, 1.111, 3.333, 10.000, and 30.000 µg/mL	N/A	Isatuximab exhibited more potent direct killing activity than Darzalex® based on a greater increase in apoptotic/dead cells in SU-DHL-8, JJN3.CD38 and RPMI-8226.CD38 cell lines	ONVT0124	[4.2.1.1-16]
Comparative CD38 enzyme inhibition by isatuximab and Darzalex®	LP-1 and RPMI8226 human MM cell lines	In vitro	0.0016, 0.0080, 0.0400, 0.2000 and 1.0000 µg/mL (isatuximab batch: [redacted] Darzalex® batch: [redacted])	N/A	Isatuximab treatment of CD38 expressing cell lines induced a stronger inhibition of cADPR synthesis from NAD than Darzalex® in both time-course and dose - response experiments	ONVT0125	[4.2.1.1-17]

Abbreviations: CDC: complement-dependent cytotoxicity; EC50rel: relative EC_{50}; cADPR: cyclic adenosine diphosphate ribose; MM: multiple myeloma; NAD: nicotinamide adenine dinucleotide; N/A: not applicable

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Comparative binding of isatuximab and Darzalex® to CD38 expressing tumor cells	MOLP-8, LP-1, RPMI-8226, NCI-H929, SU-DHL-8 and Daudi human cancer cell lines	In vitro	0.002, 0.005, 0.014, 0.041, 0.123, 0.370, 1.111, 3.333, 10.000 and 30.000 µg/mL	N/A	Incubation of CD38 expressing cancer cell lines with isatuximab or Darzalex® showed a similar dose-dependent increase in the fluorescence intensity as well as maximal fluorescence intensity, indicating similar binding affinities of the two antibodies	ONVT0147	[4.2.1.1-18]
Antibody sequence differences between the anti-CD38 antibodies isatuximab and daratumumab	N/A	N/A	N/A	N/A	Isatuximab and daratumumab are two different antibodies in term of protein sequence composed of amino acid residues	ONVT0130	[4.2.1.1-19]
Structure-based analysis of epitopes on CD38 recognized by anti-CD38 antibodies isatuximab and daratumumab	Purified complex (batch VAB.QDJ1.159C) between the human CD38 (45-300)-N100D-N164A-N209DN219D and the human Fab-SAR650984	N/A	N/A	N/A	The structure-mapped epitope of huCD38 recognized by SAR650984 is different from epitope mapped by mutagenesis for daratumumab	ONVT0131	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: N/A: not applicable

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Isatuximab and Darzalex® differential binding to human red blood cells.	Human buffy coat samples from healthy donors (n=3)	In vitro	0.014, 0.041, 0.123, 0.370, 1.111, 3.333 and 10.000 µg/mL	N/A	Incubation with Darzalex® showed a dose-dependent increase in the fluorescence intensity on the surface of RBCs, indicating binding of Darzalex to the RBCs, while incubation of RBCs with isatuximab showed no increase in signal relative to hIgG control.	ONVT0128	[4.2.1.1-21]
Pharmacodynamics of intravenous SAR650984 antibody (hu38SB19) in SCID mice bearing subcutaneous SU-DHL-8 tumors	CB.17 SCID mice	Intravenous (bolus, 200-280 µL/mouse) on Days 11, 14, 18, 21 and 26	2.5, 10, 40 mg/kg/injection (batch [redacted])	10F	SAR650984 was active at all doses tested with a log cell kill (LCK) of 4.9, 2.6 and 1.2 at 40, 10 and 2.5 mg/kg/injection, respectively (activity being declared for a LCK ≥0.7). A clear dose response was seen for the activity of SAR650984	IMP23-018	[4.2.1.1-22]

Abbreviations: hIgG: human immunoglobulin G; N/A: not applicable; RBCs: red blood cells; F: female; SCID: Severe combined immunodeficient

3　副次的薬理試験

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics – noteworthy findings

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Evaluation by immunohistochemistry of the binding of isatuximab to representative normal human tissues	Normal human tissues	In vitro	2.1 and 21.1 µg/mL Batch [redacted] Isotypic negative control concentration: 24.8 µg/mL	3 unrelated donors per tissue when possible (at least 1M and 1F when possible)	Immunohistochemical staining using digoxigenin labeled isatuximab on a representative list of human tissues (43 tissues evaluated) demonstrated in vitro binding of isatuximab in the lymphoid tissues (spleen, thymus, lymph node and tonsil), bone marrow, pituitary gland (endothelial cells) and prostate gland (epithelial cells) and on infiltrating or resident round cells (lymphocytes and/or macrophages) in most tissues	IHX0003	[4.2.1.2-1]

Abbreviations: F: female, M: male

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics – noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Evaluation by immunohistochemistry of the binding of isatuximab and huAT13/5 to representative normal human tissues	Normal human tissues	In vitro	0.32 µg/mL SAR650984 batch: [redacted] HuAT13/5 batch: [redacted]	1-6 independent samples per tissue	Isatuximab-dig stained lymphoid tissues as expected. Staining in very few non-lymphoid normal tissues, such as prostate epithelium, bronchial epithelium and scattered liver cells was observed. Faint staining was seen in brain cells. The tissue distribution of the isatuximab and huAT13/5 staining pattern is virtually identical. The AT13/5 antibody has been used in patients without any reported toxicities. All these observation together suggest minimal concern for isatuximab toxicities directed towards normal human tissues	IMH23-001	[4.2.1.2-2]
Evaluation of CD38 protein expression and localization in human pituitary gland	Human pituitary gland	In vitro	5.7 µg/mL Batch [redacted]	N/A	The data demonstrated that the high expression of CD38 protein was essentially observed in vascular structures of anterior pituitary gland (37/37 donors) while only low to moderate expression was observed in similar structure of posterior pituitary gland (11/24 donors)	PVT0002	[4.2.1.2-3]

Abbreviations: N/A: not applicable

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics – noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Evaluation of CD38 protein expression and localization in human lung tissue samples	Human bronchial epithelium	In vitro	5.7 µg/mL Batch [redacted]	N/A	CD38 protein was shown to be expressed in human bronchial epithelial cells. This expression was mainly observed in conditions of inflammation and in tumor environment. CD38 protein expression was found to be heterogeneous, but not related to the age and size of bronchus	PVT0001	[4.2.1.2-4]
Evaluation of isatuximab binding to normal human peripheral blood cells	Human peripheral blood cells	In vitro	2 µg/mL Batch SAR650984-AF488: [redacted]	4 donors for binding on T- and B-lymphocytes, NK cells and monocytes 3 donors for binding on platelets 3 donors for binding on red blood cells 3 donors for binding on granulocytes 2 donors for binding affinity measurement	SAR650984-AF binds to normal human peripheral B-cells, T-cells, natural killer (NK) cells and monocytes. There is minimal binding to granulocytes. In contrast, SAR650984-AF does not bind specifically to platelets or red blood cells	IMV23-006	[4.2.1.2-5]

Abbreviations: F: female, M: male, N/A: not applicable NK: natural killer, AF: Alexafluor 488

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics – noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study number	Location
Quantitation of CD38 expression on human tumor cell lines and normal human peripheral blood cells	Human peripheral blood cells and human tumor cell lines	In vitro	0.0031 to 6.25 µg/mL for CD38-PE 0.0244 to 50 µg/mL for CD20-PE	3 PBMCs donor tested 17 cell lines tested	The CD38 expression in normal PBMCs is low. Moderate levels can be found in CD14+ monocytes and CD56+ NK cells, while peripheral B-and T-cell express low levels of CD38. In comparison, CD20 expression in normal CD19+ B-cells is higher. In tumor cell lines the CD38 expression is highest in MM cells, which are CD20 negative. CD38 is expressed in all 7 Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) cell lines tested, while CD20 was expressed in 6 NHL lines. CD38 was also expressed in B-ALL and T-ALL cell lines, which are CD20 negative	IMV23-005	[4.2.1.2-6]
Evaluation of isatuximab effects on cytokine release by normal human peripheral blood cells	Human peripheral blood cells	In vitro	1 ng/mL to 250 µg/mL SAR650984 batch: [redacted]	Conditions tested in duplicate 14 donors tested	Isatuximab only induces very minor cytokine release by normal human peripheral blood cells, under any of the conditions tested for 14 independent donors	[IMV23-003]	[4.2.1.2-7]
Evaluation of isatuximab effects on normal human peripheral blood cell activation	Human peripheral blood cells	In vitro	1 to 10 µg/mL 0.1 to 10 µg/well SAR650984 batch: [redacted]	Conditions tested in duplicate 2 donors tested 3 assays performed	Isatuximab does not induce normal PBMC activation or proliferation as measured by CFDA staining, when tested in either soluble or immobilized form	[IMV23-004]	[4.2.1.2-8]

Abbreviations: PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, CFDA: 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, NK: natural killer, MM: multiple myeloma, NHL: non-Hodgkin's lymphoma; PE: phycoerythrin; ALL: acute lymphocytic leukemia

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics – noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Evaluation of isatuximab effects on normal human peripheral blood cell activation	Human PBMCs	In vitro	0.3 µg/mL to 30 µg/mL, immobilized: 1 to 100 µg/mL Batch [redacted]	Conditions tested in triplicate	Soluble or immobilized SAR650984 alone did not cause biologically relevant proliferation of human PBMC. Addition of soluble SAR650984 to human PBMC stimulated with soluble anti-CD3 did not increase the proliferation of PBMC compared to anti-CD3 alone. Immobilized SAR650984 in combination with immobilized anti-CD3 shows no dose dependence in human PBMC proliferation assay	GVT0107	[4.2.1.2-9]
Evaluation of isatuximab effects on human peripheral blood mononuclear cell depletion and apoptosis	Human PBMCs	In vitro	10 µg/mL Batch [redacted]	Conditions tested in duplicate 2 donors tested for depletion 3 donors tested for apoptosis	SAR650984 has a very minor effect on PBMC depletion in vitro. When PBMCs are examined as isolated subpopulation, SAR650984 causes an increase in the number of apoptotic NK cells, while B-cells, T-cell and monocytes are unaffected	IMV23-001	[4.2.1.2-10]
Evaluation of isatuximab binding on cynomolgus monkey peripheral blood mononuclear cells	Cynomolgus monkey peripheral blood mononuclear cells	In vitro	10 µg/mL Batch [redacted] Isotypic negative control concentration: 10 µg/mL	3 donors	SAR650984 does not bind to a representative population of cynomolgus monkey PBMCs and therefore cannot be used for animal toxicity study in this species	IVT0060	[4.2.1.2-11]

Abbreviations: F: female, M: male, PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells, NK: Natural killer

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics – noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Evaluation of isatuximab binding on mouse splenocytes	Murine splenocytes	In vitro	10 µg/mL Batch [redacted] Isotypic negative control concentration: 10 µg/mL	3 donors	SAR650984 does not bind to murine splenocytes and therefore cannot be used for animal toxicity study in this species	IVT0059	[4.2.1.2-12]
Evaluation of the binding of isatuximab on a representative list of tissues from various laboratory animals	Different animal species and tissues	In vitro	2.85 µg/mL Batch [redacted] Isotypic negative control concentration: 2.85 µg/mL	3 donors from each species except for the chimpanzee and rhesus monkey (n<3)	Immunohistochemical labeling using SAR650984 on a representative list of tissues from a wide range of laboratory animal species and man confirmed the specific binding of SAR650984 on human spleen, prostate gland and lymph node and demonstrated specific binding of SAR650984 to prostate gland and lymph node from the chimpanzee with a comparable staining pattern as in human. There was no observed SAR650984 binding in tissues from other tested species except sporadically in the hamster (prostate gland) and ferret (bronchial glands)	DIV1196	[4.2.1.2-13]
Evaluation of the binding and in vitro activity of 2 anti-CD38 antibodies, ch38SB25 and chOKT10 with cross-reactivity to human and monkey CD38	Human tumor cell lines	In vitro	0.15 ng/mL to 15 µg/mL SAR650984 batch: [redacted] ch38SB25 batch: [redacted] chOKT10 batch: [redacted]	2 to 3	While the binding affinity of the potential surrogate antibodies 38SB25 and OKT10 is similar to SAR650984, the in vitro activity is only partially replicated. Both antibodies lack the pro-apoptotic activity of SAR650984	IMV23-013	[4.2.1.2-14]

Abbreviations:

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics – noteworthy findings（続き）

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Evaluation of the binding by immunohistochemistry of 2 anti-CD38 antibodies, ch38SB25 and chOKT10 with cross-reactivity to human and monkey CD38	Different monkey tissues	In vitro	ch38SB25: 0.75 µg/mL Batch [redacted] chOKT10: 2.87 µg/mL Batch [redacted] Isotypic negative control concentration: 2.85 µg/mL	3 donors from each species except for the baboon and rhesus monkey (n <3)	Immunohistochemical labeling using ch38SB25 and/or chOKT10 on a representative list of tissues from non-human primates, rat, mouse and man demonstrated specific binding of ch38SB25 and chOKT10 on prostate gland, lung/bronchus, spleen, pituitary gland, heart, liver, brain and/or kidney from the cynomolgus monkey, rhesus monkey and/or baboon (lymphoid cells, endothelial cells, Kupffer's cells and cerebral white matter), as well as on human tissues (lymphoid cells and prostate gland epithelial cells only). Immunostaining of prostate gland, lung/bronchus, spleen, pituitary gland, heart, liver, brain and/or kidney from mouse and rat did not demonstrate in vitro cross-reactivity of ch38SB25 or chOKT10 in these animal species	DIV1197	[4.2.1.2-15]

Abbreviations: F: female, M: male

4　安全性薬理試験

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology - study program

Test Article: isatuximab

Organ system evaluated	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number	Location
Toxicity study using weekly administration for 3 weeks with safety pharmacology endpoints: ECG Blood pressure Central nervous system Body temperature Respiratory function	Monkey (cynomolgus)	Intravenous (0.5-hour infusion)	20, 50, 100 mg/kg/week Batch [redacted] + 100 mg/kg/week Batch [redacted]	3 M and 3 F	No isatuximab-related effects were noted in this study on electrocardiogram parameters (ECG), blood pressure, gross behavior profile (including body temperature) and respiratory function up to the highest dose tested of 100 mg/kg/week	Yes	TSK0154	[4.2.3.2-2]

Abbreviations: ECG: electrocardiogram, F: female; M: male; GLP: Good Laboratory Practice

5　薬力学的薬物相互作用試験

表 2.6.3.5.1 - Pharmacodynamic drug interactions overview - study program

Test Article: isatuximab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
See "Efficacy evaluation of isatuximab (SAR650984) and pomalidomide combination in the human multiple myeloma cell line MOLP-8 xenograft tumor model in NSG mice.", ONVV0145 [4.2.1.1-23]							

Abbreviations: