2.6.1 緒言

1 緒言

オファツムマブ（遺伝子組換え）（開発コード：OMB157）は，B 細胞及び一部の T 細胞サブセット表面に発現する CD20 分子エピトープを特異的に認識する遺伝子組換えヒト型免疫グロブリン（Ig）G1κ モノクローナル抗体である。多発性硬化症（MS）の再発予防及び身体的障害の進行抑制の適応取得を目的にオファツムマブ皮下投与製剤の開発が進められた。本邦では，オファツムマブ点滴静注製剤（販売名：アーゼラ点滴静注液 100 mg，1000 mg）が「再発又は難治性の CD20 陽性の慢性リンパ性白血病」の治療薬として承認されている。

MS は中枢神経系における炎症性脱髄疾患である。その病態形成には自己反応性 T 細胞及び B 細胞が重要な役割を担っており，B 細胞は自己抗原を提示して T 細胞を活性化させるほか，自己抗体や炎症性サイトカイン等の産生を介して病態を進展させる。オファツムマブは細胞表面に発現する CD20 に特異的に結合し，補体依存性細胞傷害（CDC）及び抗体依存性細胞傷害（ADCC）により標的細胞を溶解させることで体内から除去し枯渇させる。オファツムマブは自己反応性 B 細胞及び CD20 陽性 T 細胞を枯渇させることで，MS において自己免疫応答を抑制し炎症性脱髄の形成及び進行を抑制すると期待できる。一連の非臨床試験及び再発を伴う MS 患者を対象とした臨床試験において，MS に対するオファツムマブの有効性及び安全性が確認されたことから，以下の内容にて本承認申請を行う。

【申請品目】ケシンプタ皮下注 20 mg ペン

【一般名】オファツムマブ（遺伝子組換え）

【効能又は効果】下記患者における再発予防及び身体的障害の進行抑制

再発寛解型多発性硬化症

疾患活動性を有する二次性進行型多発性硬化症

【用法及び用量】通常，成人にはオファツムマブ（遺伝子組換え）として 1 回 20 mg を初回，1 週後，2 週後，4 週後に皮下注射し，以降は 4 週間隔で皮下注射する。

2.6.2 薬理試験の概要文

目　次

目　次 2
図 一 覧 2
略号一覧 3
1 まとめ 4
2 効力を裏付ける試験 5
2.1 結合特性 5
2.2 潜在性 T 細胞エピトープの検出 6
2.3 *In vitro* 細胞活性 7
2.3.1 補体依存性細胞傷害（CDC） 8
2.3.2 抗体依存性細胞傷害（ADCC） 10
2.3.3 アポトーシスの誘発 11
2.4 *In vivo* 薬理活性 12
2.4.1 CD20 陽性細胞溶解作用（皮下投与） 13
2.4.2 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）に対する治療効果（皮下投与，マウス） 16
2.4.3 皮下投与後の標的組織への分布及び蓄積（静脈内投与との比較，マウス） 16
2.4.4 一次及び二次免疫応答への影響（皮下投与，マウス） 17
2.5 作用機序 18
3 副次的薬理試験 20
4 安全性薬理試験 20
5 薬力学的薬物相互作用試験 20
6 考察及び結論 20
7 参考文献 22

図 一 覧

Figure 2-1 抗 CD20 抗体誘発 CDC（初代培養ヒト B 細胞） 8
Figure 2-2 抗 CD20 抗体誘発 CDC（初代培養ヒト B 細胞，抗体除去 6 時間後） 9
Figure 2-3 抗 CD20 抗体誘発 ADCC（初代培養ヒト B 細胞） 11
Figure 2-4 オファツムマブの末梢血中 CD20 陽性細胞に対する作用 14
Figure 2-5 オファツムマブのリンパ節 CD20 陽性 B 細胞に対する作用 15

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
BAM	biocompatible anchor for cell membrane	-
BBB	blood-brain barrier	血液脳関門
CD	cluster of differentiation	分化抗原群
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CLL	chronic lymphocytic leukemia	慢性リンパ性白血病
CNS	central nervous system	中枢神経系
CO_2	carbon dioxide	二酸化炭素
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
Fc	crystallizable fragment	-
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HLA	human leukocyte antigen	ヒト白血球抗原
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
ka	association rate constant, on-rate	結合速度定数
kd	dissociation rate constant, off-rate	解離速度定数
K_D	equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry	液体クロマトグラフィー質量分析
MAPPs	MHC-associated peptide proteomics	-
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合性複合体
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
NK	natural killer	ナチュラルキラー
Pax5	paired box 5	-
Th1	T helper cell 1	1 型ヘルパーT 細胞
Th17	T helper cell 17	17 型ヘルパーT 細胞

1 まとめ

オファツムマブ（遺伝子組換え）（開発コード：OMB157）はヒト型免疫グロブリン（Ig）G1κ モノクローナル抗体である。B 細胞及び一部の T 細胞サブセット表面に発現する CD20 分子の細胞外小ループ及び大ループに特異的に結合し，補体依存性細胞傷害（CDC）及び抗体依存性細胞傷害（ADCC）により標的細胞を溶解させることで，体内から除去し枯渇させる。多発性硬化症（MS）の病態形成及び再発には自己反応性 T 細胞及び B 細胞が重要な役割を担っており，オファツムマブは自己反応性 B 細胞及び CD20 陽性 T 細胞を溶解し枯渇させることにより，自己免疫応答を抑制し MS に対し治療効果を示す。本邦では，オファツムマブは慢性リンパ性白血病（CLL）の適応取得を目的に点滴静注製剤として開発され，「アーゼラ点滴静注液 100 mg，1000 mg」の販売名で「再発又は難治性の CD20 陽性の慢性リンパ性白血病」の治療薬として承認されている。

先の承認申請において，CD20 陽性の CLL に対するオファツムマブの有効性を支持する薬理試験成績が提出され，CLL 患者由来腫瘍細胞及び各種 B 細胞性腫瘍細胞に対する細胞傷害活性，CD20 に対する結合特性，並びに作用機序は評価済みである。また，オファツムマブの免疫原性の評価として，潜在性 T 細胞エピトープを *in silico* にて解析した試験が提出されている。

本承認申請においては，効力を裏付ける試験として，オファツムマブの結合特性及び潜在性 T 細胞エピトープについてさらに詳細に検討するため，試験条件を変更して新たに実施した。また，初代培養ヒト B 細胞を用いてオファツムマブの細胞傷害（CDC 及び ADCC）活性についての *in vitro* 試験を実施した。さらに *in vivo* 試験として，カニクイザルにオファツムマブを皮下投与したときの末梢血中及び二次リンパ組織における CD20 陽性細胞に対する影響を検討した。また，マウスを用いた *in vivo* の検討として，健常マウス及び実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）マウスに抗マウス CD20 抗体を皮下投与したときの B 細胞溶解作用及び EAE に伴う神経症状の進行抑制効果を検討した。マウス又はヒト化マウスを用いて，抗マウス CD20 抗体又はオファツムマブを皮下及び静脈内投与し，これらの抗体製剤の組織分布及び蓄積を検討した。さらに，マウスを用いて一次及び二次免疫反応に対する抗 CD20 抗体の影響を検討した。なお，オファツムマブは非ヒト霊長類（カニクイザル及びアカゲザル）の CD20 に対して交差反応性を示すが，霊長類以外の動物種（マウス，ラット，ウサギ，イヌ及びブタ）の CD20 には交差反応性を示さない（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.12.2 項）。そのため，これらのマウスの検討ではヒト CD20 を発現するヒト化マウスを除き，オファツムマブの代わりに抗マウス CD20 抗体を用いた。

先の承認申請時において，オファツムマブの安全性薬理試験（心血管系及び腎機能）は，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験の一部として，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.6.2.4 項）。本承認申請では，中枢神経系及び呼吸系に関する安全性薬理評価について，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験の一部として，GLP に準拠して実施した。

MS に対するオファツムマブの有効性及び安全性が一連の非臨床試験成績において確認されたことから，今回その治療薬としての承認申請を行った。以下にそれぞれの試験の詳細を示した。

2 効力を裏付ける試験

オファツムマブの標的分子である CD20 は 4 回膜貫通型のタンパク質であり，細胞外に大ループ（約 44 アミノ酸）及び小ループ（約 7 アミノ酸）が存在する（Riley and Sliwkowski 2000）。CD20 は主として B 細胞に発現しており，CD3 陽性 T 細胞でも低レベルで発現するとの報告もある（Pedersen et al. 2002，Greenfield and Hauser 2018）。ヒト／マウスキメラ抗ヒト CD20 抗体であるリツキシマブはヒト CD20 の A170 及び P172（いずれも大ループに存在）を含むエピトープを認識し（Polyak and Deans 2002），ヒト化抗ヒト CD20 抗体である ocrelizumab はリツキシマブとほぼ同一部位の細胞外大ループを認識する（Genovese et al. 2008）。一方，ヒト型抗体であるオファツムマブは小ループ及び大ループの一部（A170 及び P172 より遠位）をエピトープとして認識する（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.3 項，Ruuls et al. 2008，Cheson 2010）。オファツムマブはこのエピトープを介して CD20 陽性細胞に結合し，CDC 及び ADCC を誘発して細胞を溶解することにより，体内から細胞を除去し枯渇させる。

本承認申請において，効力を裏付ける試験として，オファツムマブの結合特性及び潜在性 T 細胞エピトープをさらに詳細に検討した他，健常人由来の初代培養ヒト B 細胞を用いてオファツムマブの細胞傷害（CDC 及び ADCC）活性についての *in vitro* 試験を実施した。また，Raji 細胞（バーキットリンパ腫由来）を用いて予備的な検討を行いオファツムマブがアポトーシス誘発活性を示さないことを再度確認した。なお，これらの試験では，抗ヒト CD20 抗体である ocrelizumab 又はリツキシマブを対照薬として用いて比較検討した。また，潜在性 T 細胞エピトープの検討については臨床応用されている抗体製剤であるウステキヌマブ及びアダリムマブについても評価した。*In vivo* 試験として，低用量皮下投与によるオファツムマブの CD20 陽性 B 細胞及び CD20 陽性 T 細胞に対する溶解作用についてサルを用いて検討した。その他，マウスを用いて抗 CD20 抗体製剤の B 細胞溶解作用，EAE に伴う神経症状進行の抑制効果，皮下投与したときの抗体製剤の組織移行・蓄積についての静脈内投与との比較，並びに一次及び二次免疫反応に対する影響について公表文献に基づき考察した。

2.1 結合特性

オファツムマブはヒト B 細胞に発現する CD20 に結合し，CD20 からの解離はリツキシマブと比べ遅いことが示されている（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.1 項，Cheson 2010）。オファツムマブの結合特性をさらに詳細に検討するため，CD20 との結合及び解離を LigandTracer®装置を用いてリアルタイムに測定することで平衡解離定数 K_D 値を求めた[Table 2.6.3.1 RD-2019-00356]。

【方法】CD20 を発現するヒトバーキットリンパ腫 B 細胞由来株 BJAB を細胞膜修飾剤である BAM（Biocompatible Anchor for cell Membrane）を用いて，培養皿上に固定した。蛍光色素 Alexa Flour® 488 にて標識したオファツムマブ（終濃度：5 又は 10 nM）を添加し，30 分間のインキュベーションの間に再度添加して濃度を上げ（終濃度：10 又は 20 nM），CD20 への結合を解析装置 LigandTracer® Green（Ridgeview Instruments AB 社）を用いてリアルタイムに測定した。その後，オファツムマブを除去して CD20 からの解離を同様に測定した。測定は n＝3 にて行い，得られたセンサーグラムからメーカーが提供しているソフトウェア（TraceDrawer 1.8.1，抗原抗体結合が 1 対 1 の比であることを前提としたモデル）を用いて結合速度定数 ka 値及び解離速度定数 kd 値を求め，K_D 値を算出した。なお，対照群として細胞表面に CD20 を発現しないヒト白血病細胞株 K562 も同時に測定した。センサーグラムは対照群の値をバックグラウンドとして補正した。ocrelizumab も同様に検討し，比較評価した。

【結果】オファツムマブの K_D 値は ocrelizumab と概ね一致しており，K_D 値はオファツムマブが 167 ± 59 pM（平均値±標準偏差，以下同），ocrelizumab が 206 ± 65 pM であった。

本試験で求めた K_D 値は 2 つ以上の抗原結合部位を持つ抗体分子全体としての結合の強さを意味するアビディティを示す指標であると考えられている。以上，オファツムマブの CD20 に対する結合の強さは ocrelizumab と同等であり，その K_D 値は 167 pM と低かったことから，オファツムマブは CD20 に対し強い結合能を有していると考えられた。

2.2 潜在性 T 細胞エピトープの検出

オファツムマブにおける免疫原性ヘルパーT 細胞が認識するエピトープの存在は，Epibase™ を用いた *in silico* 予測法の解析からリツキシマブに比べ少なく，免疫原性は低いことが示唆されている（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.4 項）。MAPPs（MHC-associated peptide proteomics）は単球由来の樹状細胞において，抗原プロセシングを経て HLA-DR 分子に結合した抗原由来ペプチド断片について，そのペプチドの配列を液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）を用いて同定する技術であり，実際の抗原提示に近い条件で T 細胞エピトープを評価できる（Karle et al. 2016）。MAPPs 技術を用いてオファツムマブの潜在性 T 細胞エピトープを検出し，その免疫原性についてウステキヌマブ，ocrelizumab 及びアダリムマブと比較し評価した[Table 2.6.3.1 RD-2019-00332]。

【方法】オファツムマブ（終濃度 4 nM）を添加しインキュベーションした健常人ドナー（17 例）単球由来の樹状細胞から，抗 HLA-DR モノクローナル抗体を用いた免疫沈降法により HLA-DR 分子及び HLA-DR に結合したペプチド断片複合体を精製した。ペプチド断片は強酸で処理することにより HLA-DR から溶出させ，LC-MS 法により各ペプチド断片に単離の上，マススペクトルを測定した。タンパク質配列解析ツール SEQUEST を用いてデータベース検索を行い，実測されたマススペクトルデータと適合するアミノ酸配列を検索することでその配列を同定した。同定されたペプチド配列はクラスター分析を行い，分類されたクラスター数をカウントして，潜在

性 T 細胞エピトープの評価を行った。なお，ウステキヌマブ，ocrelizumab 及びアダリムマブも同様に試験を行い，オファツムマブとの比較評価を行った。

【結果】カウントされたクラスター数はウステキヌマブが最も少なく，次いで，ocrelizumab，オファツムマブの順であり，アダリムマブで最も多かった。

以上，オファツムマブにおいて免疫原性ヘルパーT 細胞が認識するエピトープの存在が示唆された。そのため，オファツムマブを投与された患者において抗オファツムマブ抗体［抗薬物抗体（ADA）］が産生される可能性は排除できない。なお，MAPPs 技術を用いて検出されたペプチドは，生体内において実際に T 細胞エピトープとして機能するかまでは評価できず，潜在的な T 細胞エピトープとして考慮する必要がある。また，ADA がオファツムマブの薬理活性を中和するかどうかについては，本検討からは評価困難である。

2.3 *In vitro* 細胞活性

各種 B 細胞性腫瘍細胞株を用いた検討から，オファツムマブはリツキシマブと同様に B 細胞の細胞表面に発現する CD20 に結合することにより，細胞傷害（CDC 及び ADCC）を誘発する（オファツムマブの報告：1.13.1-1-CTD2.6.2-2.6.1 項，1.13.1-1-CTD2.6.2-2.7 項，Cheson 2010，リツキシマブの報告：Johnson and Glennie 2003，Taylor and Lindorfer 2008）。また，オファツムマブはリツキシマブとは異なりアポトーシスは誘発しない（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.9 項，Cheson 2010）。

抗 CD20 抗体製剤が誘発する CDC は補体の活性化が関与する。補体活性化は補体制御因子により抑制を受け厳密にコントロールされている。主要な補体制御因子として CD55 及び CD59 が知られているが，抗 CD20 抗体製剤の CDC 活性は，これらの補体制御因子により抑制される（Golay et al. 2000）。しかしながら，オファツムマブはリツキシマブに比べ，CD55 及び CD59 の抑制を受けにくい（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.6.2 項，Cheson 2010）。また，抗 CD20 抗体製剤の CDC 活性は標的細胞上における CD20 発現量に依存するが，オファツムマブはリツキシマブに比べ CD20 発現量に影響を受けにくい。CD20 を発現しないヒト由来 T 細胞株にヒト CD20 をトランスフェクトして種々のレベルの CD20 を発現する細胞パネルを作製し，オファツムマブ及びリツキシマブの CDC 活性を検討した結果，オファツムマブは CD20 発現量の少ない細胞に対しても高い CDC 活性を示した。一方，リツキシマブでは CD20 発現量の少ない細胞に対する CDC 活性は低かった（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.6.4 項，Teeling et al. 2006）。

MS 病態形成に関わる自己反応性 B 細胞に対するオファツムマブの細胞傷害活性を評価するため，健常ドナー由来の初代培養ヒト B 細胞を用いた *in vitro* 試験を新たに実施し，オファツムマブの CDC 及び ADCC 活性を検討した。また，バーキットリンパ腫由来細胞株である Raji 細胞を用いて予備的な検討を行い，オファツムマブのアポトーシスの誘発作用について確認した[Table 2.6.3.1 RD-2018-00361]。

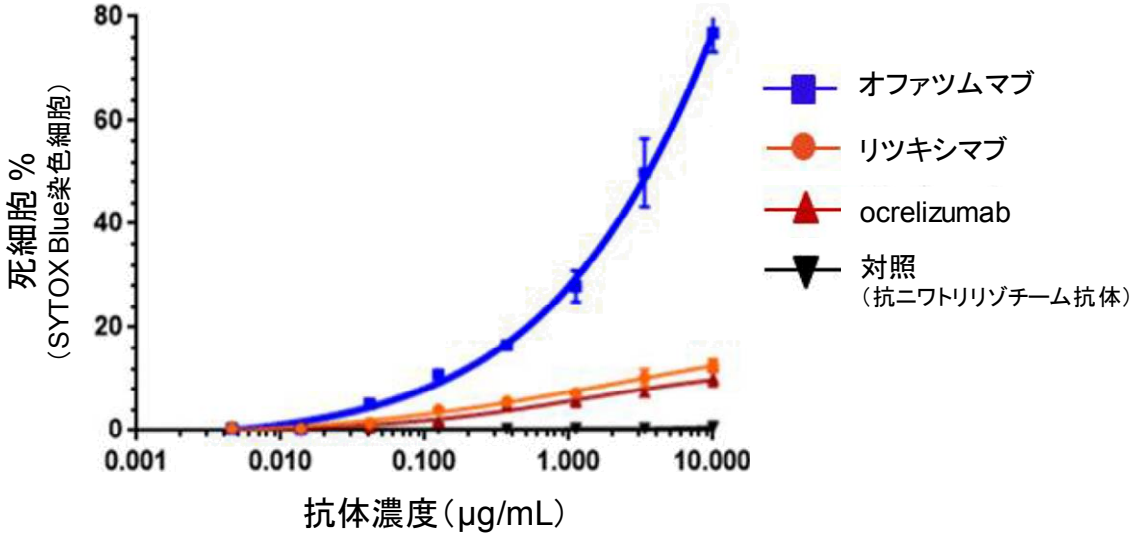
2.3.1 補体依存性細胞傷害（CDC）

初代培養ヒト B 細胞を用いてオファツムマブの CDC 活性を検討した[Table 2.6.3.1 RD-2018-00361]。試験では，細胞にオファツムマブと補体成分を同時に添加してオファツムマブの CDC 活性を評価した他，細胞からオファツムマブを除去し一定時間経過後に補体成分を添加した場合に，CDC が認められるかについても検討した。本検討ではリツキシマブ及び ocrelizumab，並びに対照として抗ニワトリリゾチーム抗体についても同様に測定し，比較評価した。

【方法】健常ドナー末梢血の単核細胞から B 細胞を分離し，2×10^5 細胞／mL の細胞懸濁液を調製した。V 底 96 ウェルプレートで B 細胞にオファツムマブ（3 倍希釈液）及び補体成分の供給源としてヒト血清（30%）を添加し，37°C，5% CO_2 の条件で 2 時間インキュベーションして CDC を誘発させた。細胞を洗浄後，死細胞の検出のため SYTOX Blue（Invitrogen 社）染色剤 0.25 µM を加えた。フローサイトメトリー法にて SYTOX Blue で染色された死細胞を測定し，オファツムマブの CDC を評価した。

【結果】オファツムマブは健常ドナー由来の初代培養 B 細胞に対し用量依存的な CDC を示し，全細胞数に対する死細胞数の割合の最大値は約 80%であった（Figure 2-1）。リツキシマブ及び ocrelizumab では用量依存的な傾向がみられ，死細胞の割合の最大値は共に 10%程度であった。なお，対照抗体として検討した抗ニワトリリゾチーム抗体では CDC はほとんど認められなかった。

Figure 2-1 抗 CD20 抗体誘発 CDC（初代培養ヒト B 細胞）



Source: [4.2.1.1-2-RD-2018-00361-Figure 3-7]

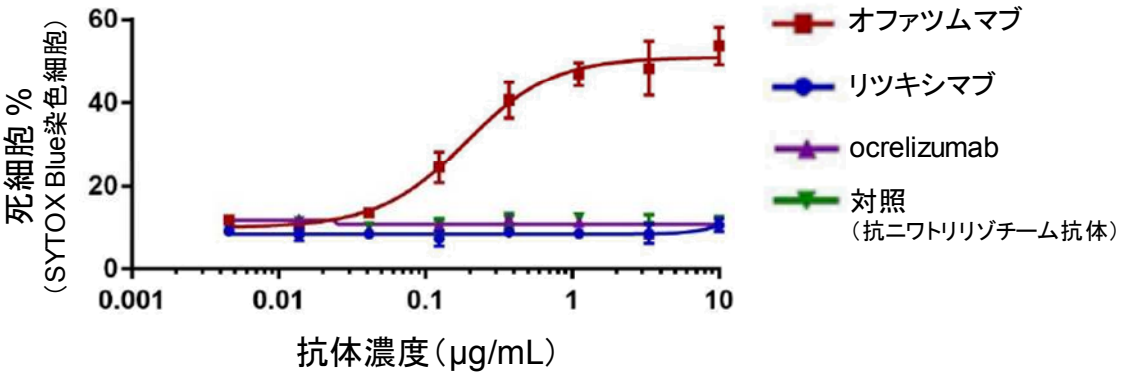
初代培養ヒト B 細胞（1 万個）に抗 CD20 抗体（オファツムマブ，リツキシマブ及び ocrelizumab）又は対照抗体（抗ニワトリリゾチーム抗体）の各濃度（0.0046～10 µg/mL）の 3 倍希釈液及びヒト血清（30%）を添加して 2 時間インキュベーションし CDC を誘発させた。損傷を受けた死細胞の膜を特異的に透過し，核酸を染色する SYTOX Blue を添加し，フローサイトメトリーにて SYTOX Blue 染色死細胞を検出した。縦軸は計数された全細胞数に対する死細胞数の割合を示し，横軸は抗体濃度を示す。平均値±標準偏差，測定は 3 回行った。図は代表例を示す。

次に，初代培養ヒト B 細胞上の CD20 と抗 CD20 抗体を反応させた後，細胞を洗浄することで抗体製剤を除去し，さらに 6 時間経過後に補体成分を添加して CDC を惹起させ，オファツムマブ，リツキシマブ及び ocrelizumab が CDC を誘発するかを検討した。

【方法】同様の方法にて，オファツムマブ，リツキシマブ，ocrelizumab 及び対照抗体とのインキュベーション時間を 1 時間に変更し，細胞を洗浄して抗体製剤を除去した。さらに 6 時間培養後に補体成分の供給源としてヒト血清（30%）を添加し，さらに 2 時間インキュベーションして CDC を惹起させた。

【結果】オファツムマブは，健常ドナー由来の初代培養 B 細胞上の CD20 との 1 時間の反応後，抗体を除去して 6 時間経過後において，用量依存的な CDC を示し，全細胞数に対する死細胞数の割合の最大値は約 50%であった（Figure 2-2）。リツキシマブ及び ocrelizumab での死細胞は対照抗体と同程度（約 10%）であり，CDC は認められなかった。

Figure 2-2　　抗 CD20 抗体誘発 CDC（初代培養ヒト B 細胞，抗体除去 6 時間後）



Source: [4.2.1.1-2-RD-2018-00361-Figure 3-9]

初代培養ヒト B 細胞（1 万個）に抗 CD20 抗体（オファツムマブ，リツキシマブ及び ocrelizumab）又は対照抗体（抗ニワトリリゾチーム抗体）の各濃度（0.0046～10 μg/mL）の 3 倍希釈液を添加して 1 時間インキュベーションした。細胞を洗浄し 6 時間培養後にヒト血清（30%）を添加し，2 時間インキュベーションして CDC を誘発させた。SYTOX Blue を添加し，フローサイトメトリーにて SYTOX Blue 染色死細胞を検出した。縦軸は計数された全細胞数に対する死細胞数の割合を示し，横軸は抗体濃度を示す。平均値±標準偏差，測定は 3 回行った。図は代表例を示す。

以上，オファツムマブは初代培養ヒト B 細胞に対し CDC 活性を示し，その活性はリツキシマブ及び ocrelizumab に比べて高かった。また，初代培養ヒト B 細胞とインキュベーションした後に，抗体製剤を除去しさらに 6 時間経過後に CDC を誘発させたとき，オファツムマブは CDC 活性を示したがリツキシマブ及び ocrelizumab では CDC は見られなかった。このことから，オファツムマブの CDC 活性はリツキシマブ及び ocrelizumab に比べ持続することが示された。

2.3.2 抗体依存性細胞傷害（ADCC）

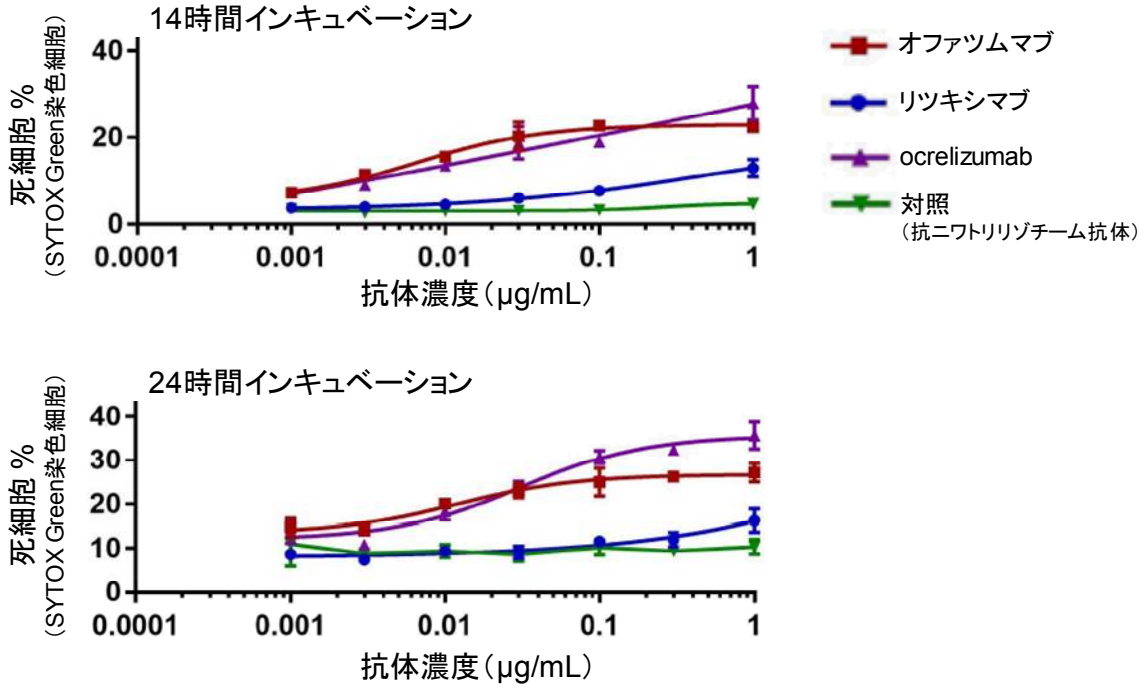
初代培養ヒト B 細胞を用いてオファツムマブの ADCC 活性を検討した[Table 2.6.3.1 RD-2018-00361]。検討では ocrelizumab 及びリツキシマブ，並びに対照として抗ニワトリリゾチーム抗体についても同様に測定し，比較評価した。

【方法】健常ドナー末梢血の単核細胞から B 細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞を単離した。1×10^6 細胞／mL の B 細胞懸濁液に調製し，96 ウェルプレートでオファツムマブ（3 倍希釈液）と 37°C，5% CO_2 の条件で 1 時間インキュベーションした。細胞を洗浄後，2.5×10^4 個／ウェルの B 細胞を新たな 96 ウェルプレートに移し，NK 細胞（2.5×10^5 個／ウェル）を添加して 37°C，5% CO_2 の条件で 14 時間又は 24 時間インキュベーションした。

死細胞の検出のため SYTOX Green（Invitrogen 社）染色剤 2.5 nM を加えた。フローサイトメトリー法にて SYTOX Green で染色された死細胞を測定し，オファツムマブの ADCC を評価した。

【結果】オファツムマブにおいて用量依存的な ADCC が認められ，全細胞数に対する死細胞数の割合の最大値は，NK 細胞とのインキュベーション時間が 14 時間の条件では約 20%であり，24 時間の条件では約 30%であった（Figure 2-3）。ocrelizumab の ADCC 活性はオファツムマブと同等であった。リツキシマブではオファツムマブ及び ocrelizumab と比べ ADCC 活性は弱く，対照抗体と比べ同程度若しくは少し強い程度であった。

Figure 2-3　　抗 CD20 抗体誘発 ADCC（初代培養ヒト B 細胞）



Source: [4.2.1.1-2-RD-2018-00361-Figure 3-2, Figure 3-3]

初代培養ヒト B 細胞（2 万 5 千個）に抗 CD20 抗体（オファツムマブ，リツキシマブ及び ocrelizumab）又は対照抗体（抗ニワトリリゾチーム抗体）の各濃度（0.001～1 μg/mL）の 3 倍希釈液を添加して 1 時間インキュベーションした。NK 細胞（25 万個，初代培養ヒト B 細胞数の 10 倍）を添加して 14 時間（上図）又は 24 時間（下図）インキュベートして ADCC を誘発させた。SYTOX Green を添加し，フローサイトメトリーにて SYTOX Green 染色死細胞を検出した。縦軸は計数された全細胞数に対する死細胞数の割合を示し，横軸は抗体濃度を示す。平均値±標準偏差，測定は 3 回行った。図は代表例を示す。

以上，オファツムマブは初代培養ヒト B 細胞に対し ADCC 活性を示した。本検討ではオファツムマブは ADCC を介して最大約 30%の細胞を殺傷した。初代培養ヒト B 細胞に対するオファツムマブの CDC 活性の検討では，オファツムマブは CDC を介して最大 80%の細胞を殺傷した。このことから，オファツムマブの細胞傷害活性は主として CDC によるものであり，ADCC 活性の程度は CDC 活性と比較すると低いと考えられた。

2.3.3　　アポトーシスの誘発

Daudi 細胞及び Raji 細胞（いずれもバーキットリンパ腫由来）を用いて Annexin V 及びヨウ素化プロピジウムによりアポトーシス細胞を評価した試験では，オファツムマブはアポトーシス誘発活性を示さないことが確認されている（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.9 項）。一方，リツキシマブは CDC 及び ADCC に起因しないアポトーシス誘発活性を示す（Johnson and Glennie 2003）。そのため，予備的な検討として Raji 細胞を用いてオファツムマブのアポトーシス誘発活性を再度確認した[Table 2.6.3.1 RD-2018-00361]。本試験では，試験条件及び方法を変更し，オファツムマブとよ

り長時間インキュベートし（20 時間から 40～42 時間に変更），アポトーシス細胞をより高精度に検出するため，Annexin V（BD 社）及び SYTOX Green（Thermofischer 社）を用いた。なお，ocrelizumab 及びリツキシマブ，対照抗体として抗ニワトリリゾチーム抗体，及び陽性対照としてアポトーシス誘発活性を有するスタウロスポリンも同様に検討した。その結果，オファツムマブ，ocrelizumab 及びリツキシマブいずれにおいても明らかなアポトーシス誘発活性は認められなかった。

以上，オファツムマブは初代培養ヒト B 細胞に対し CDC 及び ADCC を誘発した。特に CDC 活性は高く，かつ持続することが示された。なお，Raji 細胞を用いた検討から，アポトーシスは誘発しないことが確認された。これらのことから，オファツムマブの細胞傷害活性は主として CDC によるものであり，ADCC 活性の程度は CDC 活性に比べると低い。

オファツムマブはリツキシマブ及び ocrelizumab と異なる CD20 エピトープを認識し，リツキシマブ及び ocrelizumab は細胞外大ループに存在するアミノ酸配列を認識するのに対し，オファツムマブは細胞外大ループ及び小ループに結合する。この結合特性から，オファツムマブは細胞の形質膜により近接して CD20 に結合すると考えられ，優れた CDC 活性を示す（Du et al. 2009, Cheson 2010）。また，オファツムマブは CD20 に対し強い結合能を有し，リツキシマブに比べ CD20 からの解離が遅い（2.1 項）。これらのオファツムマブの結合特性により，オファツムマブは高くかつ持続した CDC 活性を示したと考えられる。

2.4 *In vivo* 薬理活性

カニクイザル及びマウスを用いてオファツムマブ又は抗マウス CD20 抗体を皮下投与したときの *in vivo* における CD20 陽性細胞溶解作用を検討した。また，MS の動物モデルである EAE マウスに対する抗マウス CD20 抗体の治療効果を検討した。皮下投与したときの標的組織への分布及び蓄積の検討として，マウスに放射性核種で標識した抗 CD20 抗体を皮下投与して投与部位の所属リンパ節及び CNS 組織への移行を評価し，静脈内投与と比較した。さらに，一次及び二次免疫応答に対する影響についてマウスを用いて検討した。なお，ヒト B 細胞性腫瘍に対するオファツムマブの *in vivo* 抗腫瘍活性が示されており，腫瘍細胞株を異種移植したマウス腫瘍モデルにおいてオファツムマブ高用量（～100 µg／匹）を静脈内投与することで延命効果が認められている（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.10 項，Cheson 2010）。本薬又は抗マウス CD20 抗体の *in vivo* 薬理活性を検討した試験においては，投与経路として皮下投与を，投与量として B 細胞性腫瘍において効果を示した用量と比べより低用量を選択し，サルではオファツムマブを 1 mg/kg の用量，マウスでは抗 CD20 抗体を 20 µg／匹の用量で皮下投与した。

2.4.1 CD20 陽性細胞溶解作用（皮下投与）

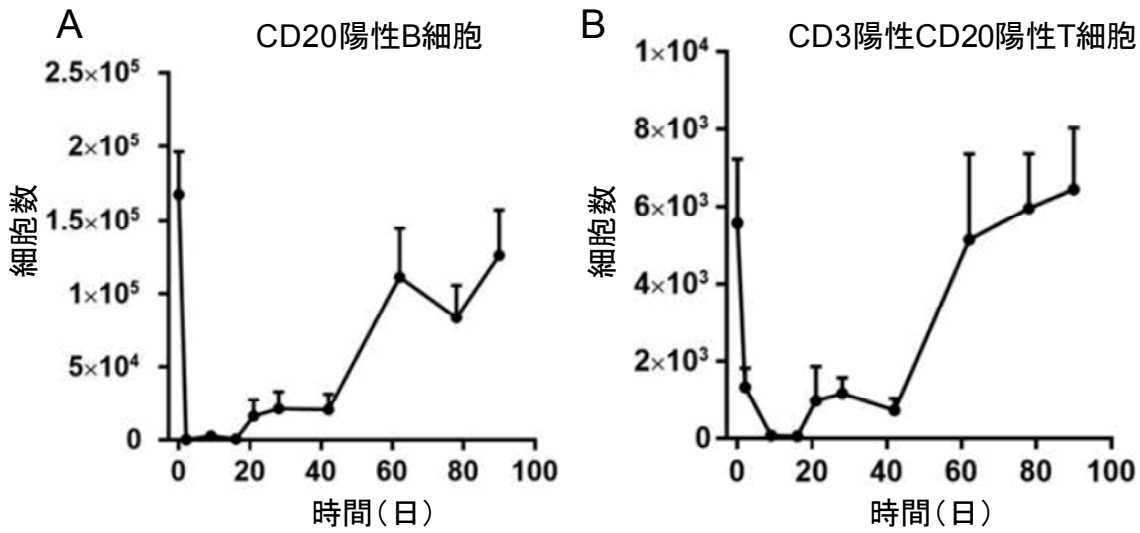
2.4.1.1 健常サルにおける CD20 陽性細胞溶解作用

健常カニクイザルにオファツムマブ（1 mg/kg）を皮下に導入投与したときの二次リンパ組織における免疫細胞に対する影響について検討した[Table 2.6.3.1 RD-2019-00021]（Theil et al. 2019）。

【方法】健常カニクイザル（n=6，7～15 年齢，体重 5～9 kg）の大腿部にオファツムマブ 1 mg/kg を導入投与として初回，初回投与から 7 日目及び 14 日目の計 3 回皮下投与した。採血は初回投与日（オファツムマブ投与前）から 90 日目（試験終了日）までの規定日に行い，腋窩リンパ節の採取を初回投与日（オファツムマブ投与前），21，62 及び 90 日目に行った。採血試料から末梢血単核細胞を単離し，フローサイトメトリー法にて末梢血中の CD20 陽性 B 細胞数及び CD20 陽性 T 細胞数を計数した。採取した腋窩リンパ節を切片化し，抗 CD21 抗体，抗 CD1c 抗体及び抗 Pax 抗体を用いた免疫組織化学的手法により B 細胞を染色し，二次リンパ組織における B 細胞の影響を検討した。

【結果】末梢血中 CD20 陽性 B 細胞数はオファツムマブ初回投与 2 日目より完全に抑制された。21 日目以降より緩やかに回復したが，30 日目でもベースラインから約 80%の抑制がみられており作用持続性が認められた（Figure 2-4，A）。その後，62～90 日目までにベースラインまでほぼ回復した。CD20 陽性 T 細胞数も同様の推移を示した（Figure 2-4，B）。21 日目に採取した腋窩リンパ節では，末梢血中 B 細胞の抑制と一致して，リンパ濾胞及びその周辺の B 細胞が抑制され，リンパ濾胞ではその量は減少し，リンパ濾胞周辺域では完全に抑制された（Figure 2-5，B）。なお，リンパ濾胞に加え辺縁洞において成熟 B 細胞が残存していた（Figure 2-5，D）。

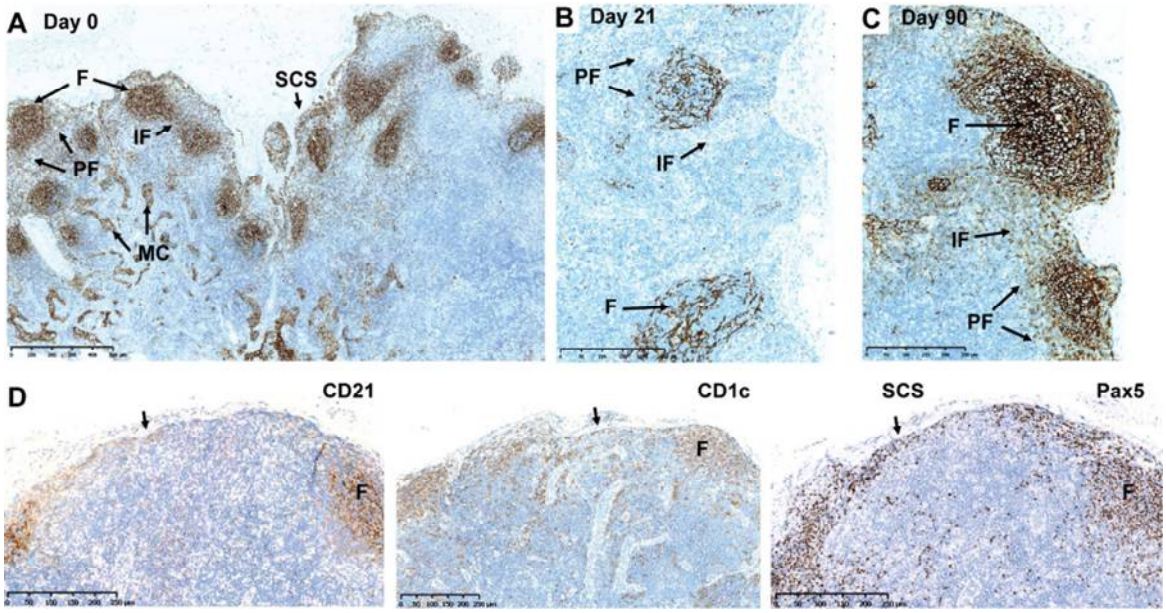
Figure 2-4　　オファツムマブの末梢血中 CD20 陽性細胞に対する作用



Source: [4.2.1.1-4-RD-2019-00021-Figure 1]

カニクイザル左大腿部にオファツムマブ 1 mg/kg を皮下投与し，末梢血中 CD20 陽性 B 細胞数及び T 細胞数の推移を検討した。オファツムマブは初回投与（0 日目），7 及び 14 日目の計 3 回投与した。規定日に橈側皮静脈より採血を行った。末梢血中の CD20 陽性 B 細胞数（A）及び CD3 陽性 CD20 陽性 T 細胞数（B）をフローサイトメトリー法にて計数した。縦軸は計数された細胞数を示し，横軸は初回投与からの日数を示す。平均値±標準誤差，n = 6。

Figure 2-5　　オファツムマブのリンパ節 CD20 陽性 B 細胞に対する作用



Source: Theil et al. 2019

試験に用いたカニクイザル（6 例，7～15 年齢，体重 5～9 kg）の腋窩リンパ節切片の免疫組織化学染色。抗 CD21 抗体，抗 CD1c 抗体及び抗 Pax5 抗体を用いて B 細胞を染色した。

抗 CD21 抗体［A，B，C，D（左）］：リンパ濾胞及び辺縁帯の成熟 B 細胞を染色。

抗 CD1c 抗体［D（中央）］：リンパ濾胞中のマントル帯及び胚中心，並びに辺縁帯の成熟 B 細胞を染色。

抗 Pax5 抗体［D（右）］：未熟な pro-B 細胞から成熟 B 細胞まで広汎な B 細胞を染色。

A：オファツムマブ初回投与日（Day 0）の投与前に採取したリンパ節の免疫組織化学染色像，B 細胞が主にリンパ濾胞（F）に豊富に存在し，濾胞間域（IF）及び濾胞周辺域（PF）にも分布が認められた。

B：オファツムマブ初回投与から 21 日目（Day 21）のリンパ節，リンパ濾胞（F）における B 細胞が減少し，濾胞間域（IF）及び濾胞周辺域（PF）への分布は完全に抑制されていた。

C：オファツムマブ初回投与から 90 日目（Day 90）のリンパ節，B 細胞が Day 0（A）と同程度に回復していた。

D：オファツムマブ初回投与から 21 日目（Day 21）のリンパ節。左及び中央，リンパ濾胞（F）及び辺縁洞（矢印）において成熟 B 細胞が認められた。

スケールバー：250 µm（一目盛りあたり 50 µm）

図中略号：F：リンパ濾胞（Follicles），IF：濾胞間域（interfollicular region），MC：髄索（medullary cords），PF：濾胞周辺域（perifollicular region），SCS：辺縁洞（subcapsular sinus）

以上，サルにオファツムマブを 1 mg/kg の用量で計 3 回，皮下に導入投与した結果，末梢血中における CD20 陽性 B 細胞及び T 細胞数が速やかに減少し，オファツムマブの初回投与から 2 日目より完全な抑制が認められ，その後 90 日目までにベースライン値まで回復した。また，二次リンパ組織に分布する CD20 陽性 B 細胞量が抑制されたが，リンパ濾胞及び辺縁洞では成熟 B 細胞の残存が認められた。リンパ濾胞及び辺縁洞に認められた成熟 B 細胞は，B 細胞枯渇後の回復に重要であると示唆されている（Theil et al. 2019）。オファツムマブはこれらの成熟 B 細胞を完全に抑制しないため，休薬後において細胞が回復したと考えられる。このことから，臨床使用下

においてもオファツムマブの皮下投与により CD20 陽性細胞が溶解し速やかに枯渇することで臨床効果が得られる一方で，休薬後には CD20 陽性細胞が投与前値まで回復することが期待される。

2.4.1.2 健常マウスにおける CD20 陽性細胞溶解作用

健常な雌性 C57BL/6 マウス（n＝3～6／群）に抗マウス CD20 抗体（20 μg／匹）又はアイソタイプを単回皮下投与し，投与日から 42 日後までの末梢血及び二次リンパ組織（腋窩リンパ節及び脾臓）中における CD19 陽性 B 細胞数をフローサイトメトリー法で測定した（Huck et al. 2019）。その結果，いずれの組織においても CD19 陽性 B 細胞数は速やかに減少し，投与 1～7 日後の期間に最低値を示し，アイソタイプ投与の対照群に対する CD19 陽性 B 細胞の抑制率は最大約 80～100%であった。その後，細胞数は回復し，投与 21 日後において対照群に対する抑制率が約 20%まで回復した。二次リンパ組織中の B 細胞サブセット別での測定では，B 細胞サブセットに応じて溶解作用の程度に違いが認められ，リンパ濾胞 B 細胞サブセットに対しては強い溶解作用が認められた。一方，辺縁帯 B 細胞サブセットに対しては作用が弱かった。

2.4.2 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）に対する治療効果（皮下投与，マウス）

EAE は髄鞘由来のタンパク質抗原等をアジュバントとともにマウス等の動物に免疫することによって誘発される自己免疫疾患モデルであり，MS の動物モデルとして用いられている。EAE モデルでは一般的に抗原免疫後 10 日程度で麻痺等の神経症状を発症し，尾，後肢，前肢へと上行性に麻痺が進行し，最終的には死亡する。EAE に伴う神経症状の重症度の評価には麻痺の程度に応じてスコア化した EAE スコアが用いられる。雌性 C57BL/6 マウス（n＝8~24／群）にミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパクペプチドを完全フロイントアジュバントとともに免疫して EAE を惹起し，免疫 1 日後及び 3 日後の計 2 回，抗マウス CD20 抗体（20 μg／匹）又はアイソタイプを皮下投与した（Huck et al. 2019）。EAE 神経症状を 6 段階の EAE スコア（0：異状なし，1：尾の完全下垂，2：片側後肢の部分麻痺，3：両後肢の完全麻痺，4：四肢麻痺，5：死亡）で評価した。免疫 7 日後より両群において EAE 神経症状が発現し，アイソタイプ投与の対照群では免疫 12 日後に EAE スコアが約 2.0 を示し最高値に達した。抗 CD20 抗体群では免疫 7 日以降の EAE スコアの上昇が抑制され，免疫 15 日及び 21 日後に約 1.5 の最高値を示し，試験期間中に記録された EAE スコアの総和は対照群に比べ有意に低かった（$p < 0.05$，Mann-Whitney 検定）。末梢血及び二次リンパ組織中における CD19 陽性 B 細胞数は，抗 CD20 抗体投与 2 日後に最低値を示し，対照群と比べ 80%以上抑制され，その後回復傾向が認められた。

2.4.3 皮下投与後の標的組織への分布及び蓄積（静脈内投与との比較，マウス）

EAE 及び健常マウス，又はヒト化マウスに放射性核種で標識された抗マウス CD20 抗体又はオファツムマブを単回皮下投与し，組織における放射能度を測定することで抗体の組織分布及び蓄

積を検討した。検討では放射能として同等量の抗体を静脈内投与して組織分布を同様に検討し，投与経路の違いによる組織への分布及び蓄積を比較した。

EAE マウスに ^{89} ジルコニウム標識抗マウス CD20 抗体を投与したとき，皮下投与群（n＝9）及び静脈内投与群（n＝3～4）ともに投与 1 日後より抗体の心臓，肝臓及び脾臓をはじめとした各組織への分布が認められた（Migotto et al. 2019）。各リンパ節での検討では，皮下投与部位（右側腹部）の所属リンパ節（鼠径リンパ節及び腸骨下リンパ節）において，静脈内投与群に比べ皮下投与群で投与 1 日後での集積が高く，鼠径リンパ節では有意な差が認められた（$p = 0.0067$，t 検定）。なお，同時に測定された CNS 組織の検討では，健常マウスに抗体を投与した対照群に比べ，EAE マウスの皮下及び静脈内投与群で投与 3 日後において，腰髄及び線条体等の CNS 組織で有意に高い集積が認められ（$p < 0.05$，χ^2 検定），EAE マウスでの抗 CD20 抗体の CNS 組織移行性が確認された。同様の結果がヒト化マウスを用いた報告（Torres et al. 2019）でも示されており，^{111} インジウム標識オファツムマブ及び ocrelizumab をヒト CD20 を発現するマウス（n＝4／群）に皮下投与又は静脈内投与し，腋窩及び鼠径リンパ節への分布を検討した結果，いずれの薬剤においても皮下投与の方が静脈内投与に比べリンパ節での ^{111} インジウム検出量が高かった。また，オファツムマブ皮下投与では ocrelizumab 静脈内投与に比べ腋窩リンパ節での検出量が多かった。

2.4.4 一次及び二次免疫応答への影響（皮下投与，マウス）

各種抗原接種で誘導される T 細胞依存性の一次及び二次免疫応答並びに T 細胞非依存性の免疫応答に対する抗 CD20 抗体の影響について健常マウスを用いて検討した（Huck et al. 2019）。T 細胞依存性応答の誘導としてジニトロフェニルをハプテンとしたスカシガイヘモシアニンを，T 細胞非依存性応答の誘導としてトリニトロフェニル化リポポリサッカライドをマウスに接種した。抗マウス CD20 抗体を接種の 3 日前及び 4 日後の計 2 回，20 μg/匹の用量で皮下投与した（n＝4／群）。抗体特異的 IgM 及び IgG の抗体価を検討した結果，両実験において，いずれも抗体価に変化は見られなかった。なお，二次リンパ組織（脾臓及び鼠径リンパ節）での B 細胞数サブセット別の測定において，健常マウスでの検討（2.4.1.2 項）と同様に，細胞溶解作用はリンパ濾胞 B 細胞サブセットに対しては強く，辺縁帯 B 細胞サブセットに対しては弱いことが確認された。

以上，サル又はマウスにオファツムマブ又は抗マウス CD20 抗体を皮下投与した *in vivo* の検討において，末梢血及び二次リンパ組織中の B 細胞が速やかに減少し，その後回復した（2.4.1.1 項，2.4.1.2 項）。サルの検討では CD20 陽性 T 細胞も CD20 陽性 B 細胞と同様に抑制された。サル及びマウスの検討で，二次リンパ組織において，リンパ濾胞 B 細胞サブセットに比べ辺縁帯 B 細胞サブセットに対する溶解作用は弱く，組織局所に残存していた。EAE マウスにおいて，抗 CD20 抗体の皮下投与により EAE 神経症状の進行が抑制された（2.4.2 項）。抗 CD20 抗体の二次リンパ組織への分布及び蓄積は静脈内投与よりも皮下投与の方が高いことが示された（2.4.3 項）。

MS 病態形成に重要な役割を担う自己反応性 B 細胞は二次リンパ組織において T 細胞に抗原提示を行う。そのため，オファツムマブを皮下投与したとき，オファツムマブは所属リンパ節に優先的に送達され自己反応性 B 細胞に作用すると考えられることから，皮下投与は静脈内投与と比べより適した投与経路である。また，抗 CD20 抗体は T 細胞依存性の一次及び二次免疫応答並びに T 細胞非依存性の免疫応答に影響を及ぼさなかった（2.4.4 項）。二次リンパ組織での辺縁帯 B 細胞サブセットは抗原刺激を受け分化した分化段階後期の成熟 B 細胞であり，病原体に対する免疫応答に重要な役割を担っていると示唆されている（Huck et al. 2019，Theil et al. 2019）。オファツムマブ及び抗 CD20 抗体は辺縁帯 B 細胞サブセットに対して完全には抑制しないことから，オファツムマブにより生体内での B 細胞が枯渇している期間においても，二次リンパ組織に残存する成熟 B 細胞が働くことにより免疫応答が正常に開始されたと考えられる。このことから，オファツムマブの臨床使用時において病原体の侵入に対する免疫応答は正常に機能し，免疫監視機構は維持されると考えられる。

2.5 作用機序

MS は CNS における炎症性脱髄疾患であり，自己免疫的な機序が病態に関与していると考えられている。MS の再発時に認められる急性期での炎症性脱髄病巣形成には自己反応性 T 細胞及び B 細胞が中心的な役割を担っている。責任抗原はいまだ不明であるが，末梢において抗原提示細胞から何らかの髄鞘抗原の提示を受けて感作された 1 型ヘルパーT 細胞（Th1）／17 型ヘルパーT 細胞（Th17）が CNS において血管内皮を透過して血管周囲腔に浸潤する。さらに血管周囲腔において末梢血由来の抗原提示細胞から再度抗原提示を受けることで活性化し，中枢神経実質内へ浸潤し，サイトカイン及びケモカインを産生し，ミクログリア等の炎症細胞を動員し炎症性脱髄病巣を形成する。血管周囲腔で活性化された Th1/Th17 細胞はサイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼを産生することで血液脳関門（BBB）を破綻させる（多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン 2017）。自己反応性 B 細胞は末梢リンパ節において T 細胞に抗原提示することで免疫反応を誘導する。また，急性期の CNS 局所では T 細胞に加え B 細胞の浸潤も認められており，B 細胞は血管周囲腔での抗原提示を担う他，CNS 内において炎症性サイトカインを分泌，並びに形質細胞へと分化して自己抗体を産生することで，炎症性脱髄の形成及び悪化に寄与する（Greenfield and Hauser 2018，Jelcic et al. 2018，D’Amico et al. 2019）。

オファツムマブは MS の再発予防及び身体的障害の進行抑制を目的に皮下投与製剤として開発された。一般的に，抗体製剤のような高分子化合物を皮下投与すると，化合物は皮下組織間質を拡散しリンパ管より吸収されると考えられている（Richter and Jacobsen 2014）。化合物はリンパ管を介して所属リンパ節に送達された後，全身循環へ移行する。皮下組織での抗体製剤の拡散は間質成分である膠原繊維の干渉を受け吸収は緩徐であることから，低用量の投与で持続した全身曝露が得られる。このことから，投与経路を皮下とすることで静脈内投与と比べて低用量の投与で持続したオファツムマブの効果が得られると考えられる。また，MS の炎症性脱髄形成では，

オファツムマブの主要な標的細胞である B 細胞が重要な役割を担っている。自己反応性 B 細胞は末梢リンパ節において T 細胞に対し抗原提示を行い，活性化した T 細胞が CNS 局所に浸潤して病巣を形成する。そのため，オファツムマブを皮下投与したとき，オファツムマブは所属リンパ節に優先的に送達され自己反応性 B 細胞に作用すると考えられることから，皮下投与は静脈内投与と比べより適した投与経路である。

オファツムマブは CD20 陽性細胞の細胞膜表面に発現する CD20 に結合し，細胞傷害（CDC 及び ADCC）を誘発し，細胞を溶解させ，生体内から除去し枯渇させる。健常ドナー由来の初代培養ヒト B 細胞を用いた検討から，オファツムマブの細胞傷害活性は主として CDC によるものであり，ADCC 活性の程度は低かった。CDC は血液中の一連の補体成分の活性化により惹起される。補体系の活性化は生体防御機構の一つとして，生体に侵入した病原体の排除に重要な役割を担っている。抗体が標的細胞上の抗原に結合すると補体成分 C1q が抗体の定常領域（Fc 領域）に結合し，これにより補体系が活性化する。その結果，標的細胞膜上において補体成分 C5b-9 で構成される膜侵襲複合体が形成され，細胞膜に小孔が穿たれることで，標的細胞が溶解する。一方，ADCC では NK 細胞を始めとしたエフェクター細胞が関与している。エフェクター細胞は Fc 受容体を介して標的細胞に結合した抗体の Fc 領域に結合して活性化し，細胞傷害顆粒を標的細胞膜上で放出する。顆粒には標的細胞の膜上で小孔を形成するパーフォリン及びタンパク質分解酵素であるグランザイムを含んでおり，これらの作用により標的細胞を殺傷する（Cleary et al. 2017）。オファツムマブは末梢において CD20 陽性 B 細胞上の CD20 に結合することにより CDC 及び ADCC を誘発し，B 細胞を溶解させる。また，健常なヒト CNS 組織及び MS 病巣においても補体成分の発現及び沈着が確認されており，神経炎症に補体が関与することが示唆されている（Veerhuis et al. 2011）。健常な CNS における補体成分の供給源としてミクログリア及びアストロサイト等の神経系の細胞が考えられているが，MS では BBB 破綻がみられることから，末梢血中からの補体成分の透過，若しくは CNS へ浸潤した末梢血由来マクロファージから供給されている可能性が考えられている（Veerhuis et al. 2011，多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン 2017）。EAE マウスに放射性核種で標識された抗マウス CD20 抗体を皮下投与し組織移行性を検討した報告では，CNS 組織での抗体の蓄積が検出されている（2.4.3 項，Migotto et al. 2019）。したがって，オファツムマブは破綻した BBB を透過し CNS へ移行し，CNS 局所で働く自己反応性 B 細胞に対して溶解作用を示すことで，炎症性脱髄病巣の形成を抑制し，治療効果を示すことが期待できる。

以上，オファツムマブは細胞傷害（CDC 及び ADCC）活性を示し，その CDC 活性は強力である。投与経路を皮下とすることで，静脈内投与と比べ低用量の投与で持続した効果が得られるとともに，末梢リンパ節に移行し，自己反応性 B 細胞に作用して溶解し枯渇させると考えられる。また，BBB 破綻がみられる MS では CNS 局所においても作用を示すことが期待できる。これにより，末梢及び CNS 病巣において免疫反応が抑制され，炎症性脱髄の形成及び進行が抑制されることにより，MS の再発と進行が抑制され治療効果を示すと考えられる。

3 副次的薬理試験

実施していない。

4 安全性薬理試験

オファツムマブの安全性薬理試験に関するプロファイル（心血管系及び腎機能）は先の承認申請時において評価済みである（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.6.2.4 項）。カニクイザルにオファツムマブを 100 mg/kg 以下の用量で静脈内投与したとき，心血管系及び腎機能に影響は認められなかった。

受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験において，100/20 mg/kg（初期用量/維持用量）までの用量で静脈内投与したとき，中枢神経系を評価するパラメータ（身体検査，神経学的検査，神経行動学的観察）に変化はみられず，本薬投与に関連した脳の病理組織学的変化も認められなかった。また，本薬投与による呼吸数の変化及び肺の病理組織学的変化は認められなかった[2.6.6-6.1 項]。

5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。

6 考察及び結論

オファツムマブ（遺伝子組換え）は CD20 分子エピトープを特異的に認識するヒト型免疫グロブリン（Ig）G1κ モノクローナル抗体である。オファツムマブは B 細胞及び一部の T 細胞サブセット表面に発現したヒト CD20 分子上の大小の細胞外ループの一部をエピトープとして認識して細胞に結合し，補体依存性細胞傷害（CDC）及び抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘発して細胞を溶解し，体内から除去し枯渇させる。これにより，末梢及び CNS 病巣において自己反応性 B 細胞及び T 細胞の免疫反応が抑制され，炎症性脱髄の形成及び進行が抑制されることにより，多発性硬化症の再発及び進行を抑制し治療効果を示すと期待される。

オファツムマブの結合特性を検討した試験より，オファツムマブの CD20 への結合能は強く，K_D 値は 167 pM であった。ヒト樹状細胞による抗原提示機構を応用した MAPPs 技術を用いた検討から，オファツムマブにおいて免疫原性ヘルパーT 細胞が認識するエピトープの存在が示唆された。このことから，オファツムマブが免疫原性を示す可能性は完全には排除できない。なお，再発を伴う多発性硬化症を対象としたオファツムマブの臨床試験において，抗オファツムマブ抗体［抗薬物抗体（ADA）］発現率は 2%未満であった。また，ADA 発現によるオファツムマブの薬物動態，安全性及び有効性への影響は確認されていない[2.7.2-4.1 項]。健常ドナー由来の初代培養ヒト B 細胞を用いた *in vitro* 試験において，オファツムマブは CDC 及び ADCC を誘発した。オファツムマブの細胞溶解作用は主として CDC 活性によるものであり，ADCC 活性の程度は CDC 活性と比べて低い。また，オファツムマブの CDC 活性はリツキシマブ及び ocrelizumab と比べ高くかつ持続することが示された。これは他の抗 CD20 抗体製剤に比べオファツムマブが細胞

膜により近接して CD20 に結合するため，かつ，CD20 からの解離が遅いためと考えられる。オファツムマブの CDC 活性は標的細胞での CD20 発現量に影響を受けにくく，ヒト CD20 をトランスフェクトした T 細胞株において，CD20 発現量の少ない細胞に対しても CDC 活性を示す。サルにオファツムマブ（1 mg/kg）を導入投与として計 3 回皮下投与し，末梢血中又は二次リンパ組織における CD20 陽性細胞を評価した結果，CD20 陽性 B 細胞及び CD20 陽性 T 細胞が速やかに減少し，その後ベースラインまで回復した。MS モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）マウスにおいて，オファツムマブは EAE に伴う神経症状の進行を抑制し治療効果を示した。マウスにおいて，抗 CD20 抗体の皮下投与後の組織分布及び蓄積を静脈内投与と比較して検討した結果，皮下投与では静脈内投与と比べ，抗 CD20 抗体のリンパ節への蓄積が高かった。一般的に，抗体製剤のような高分子化合物を皮下投与した場合，投与後の拡散及び吸収は緩徐である。したがって，投与経路を皮下とすることで静脈内投与と比べて低用量の投与で持続したオファツムマブの効果が得られると考えられる。また，MS 病態形成に重要な役割を担う自己反応性 B 細胞は二次リンパ組織において T 細胞に抗原提示を行う。そのため，オファツムマブを皮下投与したとき，オファツムマブは所属リンパ節に優先的に送達され自己反応性 B 細胞に作用すると考えられることから，皮下投与は静脈内投与と比べより適した投与経路である。マウスを用いて免疫応答への抗 CD20 抗体の影響を検討した結果，抗 CD20 抗体は抗原接種により誘導される免疫応答に対し影響を及ぼさなかった。二次リンパ組織での辺縁帯 B 細胞サブセットは病原体に対する免疫応答に重要な役割を担っており，オファツムマブ及び抗 CD20 抗体はこの辺縁帯 B 細胞サブセットに対して完全には抑制しないことが示されている。このことから，オファツムマブの臨床使用時において病原体の侵入に対する免疫応答は正常に機能し，免疫監視機構は維持されると考えられる。

オファツムマブの独立した *in vitro* 及び *in vivo* 安全性薬理試験は実施しなかった。カニクイザルにオファツムマブを 3～100 mg/kg の用量で静脈内投与した結果，中枢神経系，心血管系，呼吸系及び腎機能に関する安全性薬理評価項目に影響は認められなかった。

以上，一連の非臨床試験成績から，多発性硬化症に対するオファツムマブの有効性及び安全性が確認され，その治療薬として添付文書案に規定した用法及び用量で本薬を使用することは妥当であると判断した。

7 参考文献

[Cheson BD (2010)] Ofatumumab, a novel anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies. J Clin Oncol; 28(21):3525-30.

[Cleary KLS, Chan HTC, James S, et al. (2017)] Antibody distance from the cell membrane regulates antibody effector mechanisms. J Immunol; 198(10):3999-4011.

[D'Amico E, Zanghì A, Gastaldi M, et al. (2019)] Placing CD20-targeted B cell depletion in multiple sclerosis therapeutic scenario: present and future perspectives. Autoimmun Rev; 18(7):665-72.

[Du J, Yang H, Guo Y, et al. (2009)] Structure of the Fab fragment of therapeutic antibody ofatumumab provides insights into the recognition mechanism with CD20. Mol Immunol; 46(11-12):2419-23.

[Genovese MC, Kaine JL, Lowenstein MB, et al. (2008)] Ocrelizumab, a humanized anti-CD20 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I/II randomized, blinded, placebo-controlled, dose-ranging study. Arthritis Rheum; 58(9):2652-61.

[Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, et al. (2000)] Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. Blood; 95(12):3900-8.

[Greenfield AL and Hauser SL (2018)] B-cell therapy for multiple sclerosis: entering an era. Ann Neurol; 83(1):13-26.

[Huck C, Leppert D, Wegert V, et al. (2019)] Low-dose subcutaneous anti-CD20 treatment depletes disease relevant B cell subsets and attenuates neuroinflammation. J Neuroimmune Pharmacol; 14(4):709-19.

[Jelcic I, Al Nimer F, Wang J, et al. (2018)] Memory B cells activate brain-homing, autoreactive $CD4^+$ T cells in multiple sclerosis. Cell; 175(1):85-100.

[Johnson P and Glennie M (2003)] The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. Seminars in Oncology; 30(1 Suppl 2):3-8.

[Karle A, Spindeldreher S, Kolbinger F (2016)] Secukinumab, a novel anti-IL-17A antibody, shows low immunogenicity potential in human in vitro assays comparable to other marketed biotherapeutics with low clinical immunogenicity. MAbs; 8(3):536-50.

[Migotto MA, Mardon K, Orian J, et al. (2019)] Efficient distribution of a novel zirconium-89 labeled anti-cd20 antibody following subcutaneous and intravenous administration in control and experimental autoimmune encephalomyelitis-variant mice. Front Immunol; 10:2437.

[Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, et al. (2002)] The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. Blood; 99(4):1314-9.

[Polyak MJ and Deans JP (2002)] Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. Blood; 99(9):3256-62.

[Richter WF and Jacobsen B (2014)] Subcutaneous absorption of biotherapeutics: knowns and unknowns. Drug Metab Dispos; 42(11):1881-9.

[Riley JK and Sliwkowski MX (2000)] CD20: a gene in search of a function. Semin Oncol; 27(6 Suppl 12):17-24.

[Ruuls SR, Lammerts van Bueren JJ, van de Winkel JG, et al. (2008)] Novel human antibody therapeutics: the age of the umabs. Biotechnol J; 3(9-10):1157-71.

[Taylor RP and Lindorfer MA (2008)] Immunotherapeutic mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies. Curr Opin Immunol; 20(4):444-9.

[Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, et al. (2006)] The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. J Immunol; 177(1):362-71.

[Theil D, Smith P, Huck C, et al. (2019)] Imaging mass cytometry and single-cell genomics reveal differential depletion and repletion of B-cell populations following ofatumumab treatment in cynomolgus monkeys. Front Immunol; 10:1340.

[Torres JB, Sealey M, Kneuer R, et al. (2019)] Distribution and efficacy of ofatumumab and ocrelizumab in humanized-CD20 mice following subcutaneous or intravenous administration(P2.2-052)[abstract]. Neurology; 92 (15 Suppl) P2.2-052.

[Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ (2011)] Complement in the brain. Mol Immunol; 48(14):1592-603.

多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン(2017) 「多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン」作成委員会編. 多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン 2017. 東京; 医学書院 (internet) Available from: <https://www.neurology-jp.org/guidelinem/koukasyo_onm_2017.html> (Accessed 9 Mar 2020)

2.6.3 薬理試験概要表

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.3.1　薬理試験一覧表 4
2.6.3.2　薬効を裏付ける試験 6
2.6.3.3　副次的薬理試験 6
2.6.3.4　安全性薬理試験 7

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
CD	cluster of differentiation	分化抗原群
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
MAPPs	MHC-associated peptide proteomics	-

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
効力を裏付ける試験					
>*In vitro* 薬理試験					
Determination of kinetic rate constants and affinities of ofatumumab and ocrelizumab on CD20 expressing cells	The binding of ofatumumab and ocrelizumab to CD20 antigen on the cell surface of the Burkitt lymphoma cell line.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2019-00356]	4.2.1.1-1
In vitro comparison of the mode of action of anti-CD20 antibodies: ofatumumab and ocrelizumab	The depletion capacities of ofatumumab and ocrelizumab under condition of CDC and ADCC using human primary B cells.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2018-00361]	4.2.1.1-2
Immunogenicity of ofatumumab in MAPPs assay	The immunogenicity assessment of ofatumumab, ocrelizumab adalimumab and ustekinumab in MAPPs assay.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2019-00332]	4.2.1.1-3
>*In vivo* 薬理試験					
Imaging mass cytometry and single-cell genomics reveals differential depletion and repletion of B-cell populations following ofatumumab treatment in cynomolgus monkeys	Changes in lymphocyte subset in blood and lymphoid tissues in cynomolgus monkeys treated with human equivalent doses of subcutaneous ofatumumab.	Subcutaneous-days 0, 7 and 14 (1 mg/kg)	Novartis Pharma AG	[RD-2019-00021]	4.2.1.1-4

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Report number	Location in CTD
副次的薬理試験 実施していない				
安全性薬理試験	2.6.3.4 項参照			
薬力学的薬物相互作用試験 実施していない				

2.6.3.2　薬効を裏付ける試験

2.6.3.1 項に記載

2.6.3.3　副次的薬理試験

2.6.3.1 項に記載

2.6.3.4　安全性薬理試験

オファツムマブの独立した *in vitro* 及び *in vivo* 安全性薬理試験は実施しなかった。先の承認申請時において，心血管系及び腎機能に関する安全性薬理評価を，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験の一部として，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した（1.13.1-1-CTD2.6.2-2.6.2.4 項）。本承認申請では，中枢神経系及び呼吸系に関する安全性薬理評価について，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験の一部として，GLP に準拠して実施した[Table 2.6.7.12-1670402]。