ユプリズナ点滴静注 100 mg
製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1　緒言

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6　非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1　緒言 4
2.6.1.1　構造，性質 5
2.6.1.2　効能又は効果，用法及び用量 5
2.6.1.3　参考文献 6

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
AQP4	aquaporin 4	アクアポリン 4
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis	抗体依存性貪食
CD	cluster of differentiation	-
CNS	central nervous system	中枢神経系
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
NMOSD	neuromyelitis optica spectrum disorder	視神経脊髄炎関連疾患

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

Inebilizumab（MEDI-551）は，視神経脊髄炎関連疾患（NMOSD）の治療薬として現在開発中である．Inebilizumab は，親和性を最適化したヒト化脱フコシル化免疫グロブリン G1 カッパ（IgG1κ）モノクローナル抗体であり，B 細胞特異的表面抗原である CD19 に結合して，CD19 陽性 B 細胞と一部の形質細胞を減少させる．

CD19 は CD19 遺伝子によってコードされる，免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型たん白質であり，その発現は B 細胞に限定される．このたん白質は，重鎖再構成時から形質細胞への最終分化時にダウンレギュレートされるまで，早期プレ B 細胞によって発現している（Nadler et al, 1983）．造血幹細胞及びプロ B 細胞段階以前の B 細胞では，CD19 の発現は認められない（Nadler et al, 1983; Loken et al, 1987）．

また，CD19 を欠損させたノックアウトマウスでは，骨髄内の B 細胞発生自体に異常は認められないが，末梢リンパ系器官における B 細胞数が減少し，血清中の免疫グロブリン濃度の低下も認められている（Engel et al, 1995）．反対に，B 細胞コンパートメント内の CD19 を過剰発現するマウスでは，骨髄の早期 B 細胞発生に異常が認められ，マイトジェンに対する B 細胞応答が増加し，血清中免疫グロブリン濃度が上昇する（Engel et al, 1995）．CD19 は，B 細胞受容体複合体の構成因子として，B 細胞活性化の閾値を制御することが報告されている（Bradbury et al, 1993）．

NMOSD（別名 Devic 症候群）は，中枢神経系（CNS）の自己免疫性慢性炎症性希少疾患であり，脊髄及び視神経が主に障害される．NMOSD の特徴は血清抗アクアポリン 4 抗体（すなわち，AQP4-IgG 又は NMO-IgG）の存在である．アクアポリン 4 は，CNS における最も主要な水チャネルであり，血液脳関門周辺にあるアストロサイトの細胞膜上の足突起に発現する．AQP4-IgG は約≧80%の患者で検出され（Jarius and Wildemann, 2010），CD19 陽性 B 細胞系形質芽細胞によって産生される（Chihara et al, 2011）．これらの形質芽細胞の存在と疾患活動性との間に相関性が認められることから（Chihara et al, 2011; Kim et al, 2011; Greenberg et al, 2012; Jarius et al, 2008），CD19 陽性 B 細胞を標的とする薬剤の投与は，NMOSD 発作リスクの減少に有効である可能性がある．

Inebilizumab はヒト CD19 に特異的に結合し，げっ歯類又はウサギの CD19 に対する交差反応性を示さない．また，ヒヒ，アカゲザル，アフリカミドリザル，又はカニクイザルの B 細胞表面の CD19 に対して全く又はほとんど交差反応性を示さない．そのため，ヒト CD19 トランスジェニック（huCD19 Tg）マウスモデルを適切な動物種として選択し，Inebilizumab の安全性と薬理活性を評価した．このモデルにおいて，huCD19 発現は，ヒトの場合と同様に B 細胞系に限られており，細胞表面発現の発生パターンに倣う（Zhou et al, 1994）．Inebilizumab は，ヒトで期待される作用機序と同じ機序かつ同等の親和性で huCD19 Tg マウスの huCD19 陽性 B 細胞に結合し，その数を減少させる．

2.6.1.1　構造，性質

Inebilizumab は，均一に脱フコシル化された抗体を産生するフコシル基転移酵素欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞株（BioWa Potelligent®技術）を用いて，mAb 16C4 を発現させることにより糖鎖部分を改変した抗体である．すなわち，mAb Fc 領域からフコースを除去することにより，活性化 Fcγ 受容体 IIIA に対する親和性が約 10 倍増加し，抗体依存性細胞傷害（ADCC）機序を介した NK 細胞による B 細胞の減少及び抗体依存性細胞貪食（ADCP）機序を介したマクロファージによる B 細胞の減少を著しく増強した．

このことから，Inebilizumab の抗原結合特性（高親和性，インターナリゼーションの低下及び解離速度の低下）は ADCC 及び ADCP に適切であると考える．Inebilizumab は 2 本の軽鎖と 2 本の重鎖からなり，全体の分子量は約 149 kDa である．また，補体依存性細胞傷害活性を示さない．

Inebilizumab の製剤及び安定性については，それぞれ Module 3.2.P.1 及び Module 3.2.P.8.1 に記載する．また，Inebilizumab の重鎖と軽鎖について予想されるアミノ酸シーケンスを Module 3.2.S.1.2 に示す．

2.6.1.2　効能又は効果，用法及び用量

申請する Inebilizumab の適応は NMOSD である．ピボタル試験 CD-IA-MEDI-551-1155 では，被験者に 300 mg の Inebilizumab を Day1 と Day15 に IV 投与した後，26 週ごとに 1 回単回投与した．

2.6.1.3 参考文献

1. Bradbury LE, Goldmacher VS, Tedder TF. The CD19 signal transduction complex of B lymphocytes. Deletion of the CD19 cytoplasmic domain alters signal transduction but not complex formation with TAPA-1 and Leu 13. J Immunol. 1993 Sep 15;151(6):2915-27.
2. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 1;108(9):3701-6.
3. Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. Immunity. 1995 Jul;3(1):39-50.
4. Greenberg BM, Graves D, Remington G, Hardeman P, Mann M, Karandikar N, et al. Rituximab dosing and monitoring strategies in neuromyelitis optica patients: creating strategies for therapeutic success. Mult Scler. 2012 Jul;18(7):1022-6.
5. Jarius S, Paul F, Franciotta D, Waters P, Zipp F, Hohlfeld R, et al. Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. Nat Clin Pract Neurol. 2008 Apr;4(4):202-14.
6. Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. Nat Rev Neurol. 2010 Jul;6(7):383-92.
7. Kim SH, Kim W, Li XF, Jung IJ, Kim HJ. Repeated treatment with rituximab based on the assessment of peripheral circulating memory B cells in patients with relapsing neuromyelitis optica over 2 years. Arch Neurol. 2011 Nov;68(11):1412-20.
8. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. Blood. 1987 Nov;70(5):1316-24.
9. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF, et al. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. J Immunol. 1983 Jul;131(1):244-50.
10. Zhou LJ, Smith HM, Waldschmidt TJ, Schwarting R, Daley J, Tedder TF. Tissue-specific expression of the human CD19 gene in transgenic mice inhibits antigen-independent B-lymphocyte development. Mol Cell Biol. 1994 Jun;14(6):3884-94.

ユプリズナ点滴静注 100 mg
製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2　薬理試験の概要文

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧.....3
2.6.2　薬理試験の概要文.....4
2.6.2.1　まとめ.....4
2.6.2.2　効力を裏付ける試験.....7
2.6.2.2.1　*In vitro* 薬理試験.....7
2.6.2.2.2　*in vivo* 薬理試験.....21
2.6.2.3　副次的薬力学試験.....30
2.6.2.4　安全性薬理試験.....30
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験.....30
2.6.2.6　考察及び結論.....30
2.6.2.7　参考文献.....32

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis	抗体依存性貪食
ALL	acute lymphoblastic leukemia	急性リンパ性白血病
BAFF	B cell activating factor	B 細胞活性化因子
CD	cluster of differentiation	-
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CDR	complementarity-determining region	相補性決定領域
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CLL	chronic lymphocytic leukemia	慢性リンパ性白血病
CNS	central nervous system	中枢神経系
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	C-X-C モチーフケモカインリガンド 1
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
EC_{50}	half-maximal effective concentration	50%有効濃度
ELISpot	enzyme-linked immunosorbent spot assay	酵素免疫スポットアッセイ
FACS	fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化セルソーティング
Fc	fragment crystallizable	結晶化フラグメント
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
huCD19 Tg	human CD19 transgenic	ヒト CD19 トランスジェニック
Ig	immunoglobulin	イムノグロブリン
IFNγ	interferon γ	インターフェロン γ
IL	interleukin	インターロイキン
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MM	multiple myeloma	多発性骨髄腫
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NMOSD	neuromyelitis optica spectrum disorder	視神経脊髄炎関連疾患
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	末梢血由来単核細胞
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PK/PD	pharmacokinetics/pharmacodynamics	薬物動態/薬力学
rhMOG	recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein	組み換えヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖たん白質
TNFα	tumor necrosis factor α	腫瘍壊死因子 α

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

Inebilizumab は，ヒト化免疫グロブリン G1 カッパ（IgG1κ）モノクローナル抗体（mAb）であり，B 細胞特異的表面抗原である CD19 に結合する．CD19 は，免疫グロブリン様ドメインを有するスーパーファミリーに属する膜貫通型受容体である．CD19 は，B 細胞受容体複合体の構成因子であり，B 細胞活性化を調節する（Bradbury et al., 1993）．骨髄内では，B 細胞の分化はプロ B 細胞段階から始まり，その後プレ B 細胞段階，未熟 B 細胞段階を経て，最終的に成熟 B 細胞となる．この際，CD19 の発現はプロ B 細胞段階から，CD20 の発現は未熟 B 細胞段階から認められる．末梢では，CD19 と CD20 の両方が移行 B 細胞，ナイーブ B 細胞，胚中心 B 細胞，メモリーB 細胞に発現する．形質細胞に関しては大きく異なっており，CD20 は成熟形質細胞では発現せず，CD19 は脾臓や扁桃腺などの二次リンパ器官の形質細胞の大部分，血中形質細胞のすべて，骨髄形質細胞の 50%以上に発現している（Chen et al., November 2016）．また，CD19 は B 細胞にのみ発現するのに対し，CD20 は CD4 陽性 T 細胞のサブセットにも発現する（Chen et al., November 2016）．つまり，CD19 は CD20 よりも広範かつ特異的な B 細胞発現パターンを有する．

Inebilizumab は，抗体依存性細胞傷害（ADCC）を増強するよう設計されており，*in vitro* 及び *in vivo* においてその薬理学的特性が明らかにされている．Inebilizumab はマウス抗ヒト CD19 IgG1κ mAb HB12a（Yazawa et al., 2005）を改変し作製された．結合特性を改善するために，ヒト化抗体の親和性を最適化し，変異体である mAb 16C4 を得た．最適化された mAb 16C4 は抗原のインターナリゼーションをほとんど誘発せず，細胞表面からの解離速度が遅い性質を有していた．これら双方とも ADCC 依存性機序に適切な特徴である．更に，Fc 領域の糖鎖部分を改変することにより，エフェクター機能が増強された．Inebilizumab は脱フコシル化抗体のみを産生する，フコシル基転移酵素欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞株（CHO）に mAb 16C4 を発現させることにより作製した．抗体の Fc 領域からフコースを除去することにより，ヒト Fcγ 受容体 IIIaA とマウス Fcγ 受容体 IV に対する結合親和性が約 10 倍増加した．Inebilizumab では，活性化 Fcγ 受容体の結合選択性が向上すると共に，フコシル化体の mAb 16C4 と比較して，ADCC 活性が著しく向上した．Inebilizumab は，B 細胞株及びヒト初代培養 B 細胞の両方に対し *in vitro* で強力な ADCC 活性を示し，それはリツキシマブの活性と同程度であった．更に，Inebilizumab は *in vitro* で抗体依存性細胞貪食（ADCP）活性を示すが，補体依存性細胞傷害（CDC）は示さなかった．

ヒト血液，扁桃腺，脾臓，骨髄由来の CD27 陽性かつ CD38 強陽性形質細胞上の CD19 の発現をフローサイトメトリーにより解析し，同一細胞集団上の CD20 の発現と比較した．CD20 の発現はヒト B 細胞上に認められたが，血液，脾臓，又は骨髄中の形質細胞には，ごくわずかしか存在しない．対照的に，CD19 は形質芽細胞及びほとんどの形質細胞に発現する．フローサイトメトリーにより，脾臓及び骨髄において CD19 陰性の形質細胞集団が同定された．骨髄の CD19 陰性及び CD19 陽性形質細胞は，形態，免疫表現型，mRNA 発現，及

び機能の点でほぼ同等であった．更に，骨髄及び脾臓由来の CD19 陰性及び CD19 陽性形質細胞はいずれも，ポリオ，破傷風毒素，ジフテリア毒素及びインフルエンザワクチン抗原に対して特異的な抗体を分泌しており，両集団が長期生存型免疫に寄与することが示唆されている（Groves et al., 2018）．CD19 陽性形質細胞としてヒト初代培養骨髄形質細胞，及びヒト血液 B 細胞から *in vitro* で分化させた形質細胞をターゲット細胞として用い ADCC 活性を評価した. その結果, 双方の CD19 陽性形質細胞に対して Inebilizumab は ADCC 活性を示した.

非臨床試験成績から，Inebilizumab はヒト CD19 を特異的に認識し，ヒト以外の霊長類又はげっ歯類由来の CD19 に対してほとんど，又は全く交差反応性を示さなかった．したがって，Inebilizumab の薬力学的作用及び安全性の検討に適切な動物種としてヒト CD19 トランスジェニック（huCD19 Tg）マウスを選択した．Inebilizumab は，*in vivo* で huCD19 Tg マウスの血液中及び組織中の B 細胞を効果的に減少させ，B 細胞の減少持続期間は用量依存的であった．Inebilizumab の作用は B 細胞にのみ認められ，循環血中のその他の免疫細胞に対する明らかな影響は認められなかった．Inebilizumab 投与群では，対照群で観察された血清中 Ig 濃度上昇が抑制されたことから，Inebilizumab が抗体産生を阻害することが示唆された.

Inebilizumab は実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデル（Chen et al., 2014）での検討において，単回投与により huCD19 Tg マウスにおける EAE 発症を抑制した．具体的な作用として，Inebilizumab は脊髄への白血球浸潤を抑制し，短寿命及び長寿命形質細胞を共に減少させることで，末梢及び中枢神経系（CNS）における全抗体及びミエリン特異抗体を有意に減少させた.

同様に, 自己免疫疾患の非臨床モデルである Sle1-huCD19 Tg マウスにおいて, Inebilizumab は血液中及び組織内の B 細胞, 並びに脾臓内の形質細胞を減少させた. また, Sle1-huCD19 Tg マウスの血清中の総 Ig，自己抗体，及び炎症性メディエーターも，Inebilizumab 投与後に低下した.

このように，Inebilizumab は B 細胞を選択的に標的とし，これを減少させる．その結果，自己抗体を含む血清総 Ig が減少する．自己免疫疾患状態下では，Inebilizumab による B 細胞減少は，標的臓器における形質細胞の蓄積を抑制した．これらのデータは前臨床自己免疫疾患における病原性 B 細胞を標的とする治療に関して，Inebilizumab による B 細胞減少が高い効果を有することを示しており，発症メカニズムに自己抗体が寄与する視神経脊髄炎関連障害（NMOSD）のような慢性自己免疫疾患の治療薬として，Inebilizumab を開発する裏付けとなる.

これまでに実施された非臨床薬理試験の概要を［表 2.6.2.1－1］に示す．この薬理データ全体を本項で要約する.

表 2.6.2.1－1　Inebilizumab について実施された薬理試験の要約

Study No.	Study Type [a]	Study Site	Species	Study Title
[redacted]551-0001	Primary In vitro	MedImmune	Not Applicable	Affinity Optimization of Monoclonal Antibody 3649
[redacted]551-0002	Primary In vitro	MedImmune	Not Applicable	Binding Properties of anti-CD19 Antibodies
[redacted]551-0003	Primary In vitro	MedImmune	Not Applicable	In Vitro Effector Function of MEDI-551 Against Multiple Lymphoblastic Cell Lines
[redacted]551-0004	Primary In vitro	MedImmune	Not Applicable	In Vitro Effector Function of MEDI-551 with Healthy Donor- and Leukemia Patient-derived Peripheral Blood B Cells
Matlawska-Wasowska et al., 2013	Primary In vitro	University of New Mexico Health Sciences Center	Not Applicable	Macrophage and NK-mediated Killing of Precursor-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Targeted with a-Fucosylated Anti-CD19 Humanized Antibodies
[redacted]551-0008	Primary In vitro	MedImmune	Monkey	Binding of Monoclonal Antibody 16C4 to Nonhuman Primate B Cells Measured by Flow Cytometry
[redacted]551-0009	Primary In vitro	MedImmune	Transgenic Mouse	Binding of MEDI-551 to Human CD19 Expressed on Human B Cells and on Murine B Cells from Human CD19 Transgenic Mice
[redacted]551-0002	Primary In vitro	MedImmune	Human	MEDI-551 Mediated Depletion of Human Plasma Cells
[redacted]551-0004	Primary In vitro	MedImmune	Human	Differential Expression of CD19 and CD20 on Human Plasma Cells
[redacted]551-0005	Primary In vitro	MedImmune	Rabbit	MEDI-551 Does Not Bind to Rabbit Peripheral B Cells
[redacted]551-0010	Primary In vivo	MedImmune	Transgenic Mouse	Longitudinal Study of B-cell Depletion by MEDI-551 in Human CD19 Transgenic Mice
[redacted]551-0003	Primary In vivo	MedImmune	Transgenic Mouse	MEDI-551 Treatment Depletes the Majority of Murine B Cells and Reduces Serum Titers of Autoantibodies in Sle1-human CD19 Transgenic Mice
Chen et al., 2014	Primary In vivo	University of Texas Southwestern Medical Center	Transgenic Mouse	Single dose of glycoengineered anti-CD19 antibody (MEDI551) disrupts experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting pathogenic adaptive immune responses in the bone marrow and spinal cord while preserving peripheral regulatory mechanisms.

a.　All non-GLP studies

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　*In vitro* 薬理試験

2.6.2.2.1.1　mAb 3649 の親和性最適化（試験 [redacted] 551-0001）

ヒト化抗 CD19 mAb 3649 の結合親和性を最適化するため以下の一連の試験を行った．細胞表面に組換えヒト CD19 を発現させた 300.B4 細胞を用いた試験を実施し，相補性決定領域（CDR）に抗原への結合親和性を高める変異を有する抗体をスクリーニングした．あらゆる単一アミノ酸変異を有するコンビナトリアル・ライブラリをスクリーニングした結果，親和性が向上した変異体 16C4 を得た．

この抗体は，親和性を最適化したヒト化モノクローナル抗体（mAb 16C4）で，Inebilizumab の前駆体であり，元となるマウス抗体よりも約 2 倍強力にヒト CD19 に特異的に結合する．［図 2.6.2.2－1］に示すように，親和性を最適化した変異体である mAb 16C4 は，重鎖及び軽鎖 CDR 内の 3 アミノ酸残基が最適化前の mAb 3649 と異なっている．



図 2.6.2.2－1　ヒト化 mAb 3649 及び親和性を最適化した mAb 16C4 の可変部領域の配列アラインメント

mAb = monoclonal antibody
CDR (complementary-determining regions) are boxed. Amino acid differences encoded in 16C4 are bold, red underlined, and circled.

2.6.2.2.1.2　抗 CD19 抗体の結合特性解析（試験 [redacted] 551-0002）

ヒト化抗 CD19 mAb 3649 及びその親和性を最適化した mAb 16C4（Inebilizumab のフコシル化体）の結合特性を，蛍光活性化セルソーティング（FACS）解析及び共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて更に検討した．その際，Daudi ヒトバーキットリンパ腫細胞（Daudi 細胞）をモデル B リンパ球として用いた．その結果，mAb 16C4 は，親和性未最適化の抗 CD19 抗体である mAb 3649 と比較し Daudi 細胞に強く結合することが示された［図 2.6.2.2－2］．mAb 16C4 は，mAb 3649 又は抗 CD20 mAb であるリツキシマブと比較し，細胞表面からの解離が遅いことが示された．

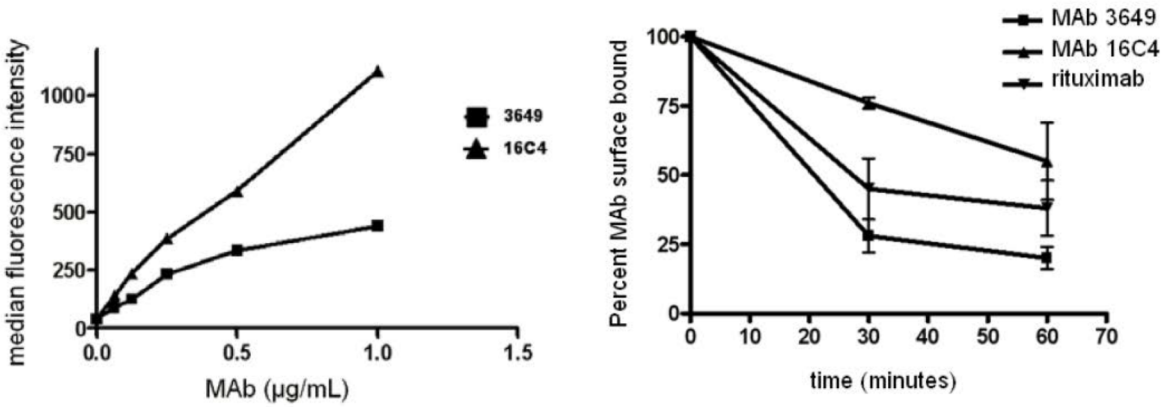


図 2.6.2.2－2　Daudi 細胞を用いた，抗 CD19 mAb 16C4 及び 3649 の結合（左）及び解離（右）の FACS 解析

FACS = fluorescence-activated cell sorting; MAb = monoclonal antibody Right panel: The anti-CD20 mAb rituximab was included for comparison.

FACS を用いたインターナリゼーション解析を行ったところ，mAb 16C4 では mAb 3649 と比較して抗原インターナリゼーションが減少しており，一方で陽性対照である抗 CD22 mAb では CD22 抗原の急速なインターナリゼーションが誘発されることが示された．共焦点顕微鏡による解析からも，FACS 解析のデータが裏付けられた．すなわち，抗 CD22 mAb によって誘発される CD22 の急速なインターナリゼーションは示されたが，mAb 16C4 処置後の CD19 のインターナリゼーションはごくわずかであった．要約すると，これらの結果は，mAb 16C4 が ADCC 依存性の作用機序に求められる適切な性質（高い親和性，遅い解離，及び遅いインターナリゼーション）を有することを示している．更に，BIAcore 法による平衡結合定数の測定により，脱フコシル化ヒト IgG1-Fc では，ヒト活性化 Fcγ 受容体，FcγR IIIA 及びその相同体であるマウス FcγR IV への結合が，フコシル化体と比較して約 10 倍増加することが示された．

2.6.2.2.1.3　リンパ芽球細胞株に対する Inebilizumab の *in vitro* エフェクター機能評価（試験 [redacted]551-0003）

KC1333 細胞（BioWa 社から入手，ナチュラルキラー［NK］細胞株）又は健常ドナーから単離した NK 細胞のいずれかをエフェクター細胞として，B リンパ腫細胞株をターゲット細胞として，乳酸脱水素酵素放出試験により Inebilizumab の ADCC 誘発能を評価した．また，健常人の血清及び B リンパ腫ターゲット細胞の存在下で Inebilizumab の CDC 誘発能も検討した．

その結果，*in vitro* において，Inebilizumab は ADCC 活性（EC_{50} = 3 ng/mL）を有することが示された．ターゲット細胞として Daudi 細胞を用いた試験結果の代表例を［図 2.6.2.2－3 A］に示す．一方で，Inebilizumab は，抗 CD20 mAb であるリツキシマブが有するような CDC 活

性を示さない［図 2.6.2.2－3 B］．また，複数の B 細胞株に対する ADCC 活性を検討したところ，脱フコシル化抗体である Inebilizumab は，フコシル化体である mAb 16C4 に比べて著しく強力な活性を示した．更に，エフェクター細胞として KC1333 NK 細胞を用いた場合や，健常ドナーから用時調製した NK 細胞を用いた場合にも，ADCC 活性が認められた．

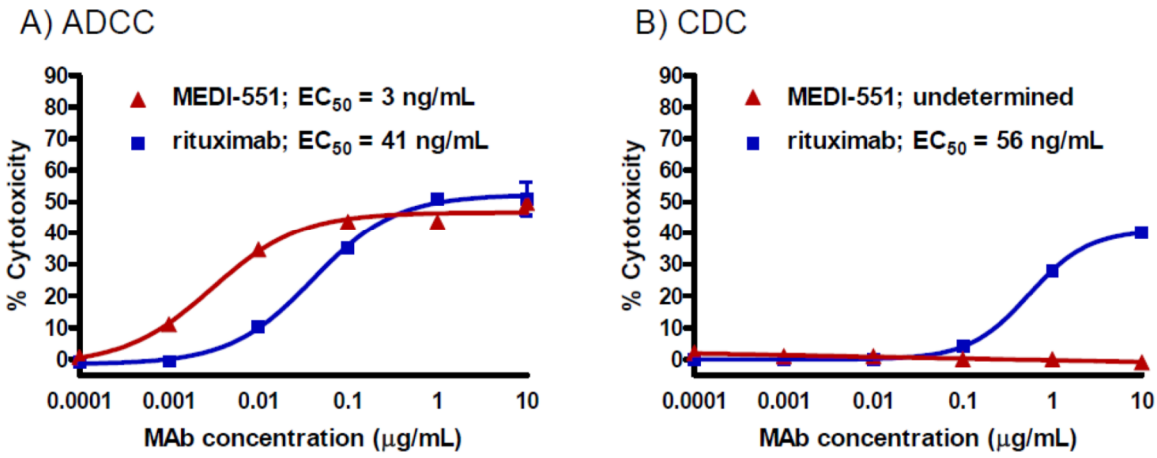


図 2.6.2.2－3　*In vitro* における Daudi 細胞に対する Inebilizumab のエフェクター機能

ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity; CDC = complement-dependent cytotoxicity; EC_{50} = half maximal effective concentration; MAb = monoclonal antibody; MEDI-551 = inebilizumab; NK = natural killer
A)　Inebilizumab (MEDI-551) is more effective than rituximab in mediating ADCC with Daudi target cells and KC1333 NK cells as effectors.
B)　In contrast to rituximab, inebilizumab (MEDI-551) does not mediate CDC.

多くの細胞株において，最大細胞傷害率は Inebilizumab とリツキシマブで同程度であったが，mAb 濃度が低い場合には Inebilizumab の方が EC_{50} 値は低値となり，つまり高活性であった．また，CD138 陽性 CD19 陰性細胞及び CD138 陰性 CD19 陽性細胞の混合亜集団から構成される複数の多発性骨髄腫(MM)細胞株を用いた Inebilizumab の ADCC 活性も評価した．これらの MM 細胞株において，Inebilizumab は CD138 陰性 CD19 陽性細胞を特異的に減少させたが，CD138 陽性 CD19 陰性細胞には影響しなかった．

2.6.2.2.1.4　ヒト末梢血 B 細胞を用いた Inebilizumab の *in vitro* エフェクター機能評価（試験 [redacted]551-0004）

FACS を用いた *in vitro* における細胞傷害性試験として，次の 3 種類の末梢血単核細胞（PBMC）サンプル中の B 細胞，すなわち（1）健常ドナー由来の新鮮 PBMC，（2）慢性リンパ性白血病（CLL）患者由来の凍結 PBMC，及び（3）急性リンパ芽球性白血病（ALL）患者由来の凍結 PBMC，に対する Inebilizumab の細胞傷害作用を検討した．Inebilizumab は，健常ドナー由来 PBMC の B 細胞死を効果的に惹起し，その EC_{50} 値は，CD20 を標的とするリツキシマブよりも概して低かった．しかし，リツキシマブによる最大細胞傷害性が Inebilizumab よりも大きい場合（最高濃度の抗体処置時）もあった．Inebilizumab は，健常ド

ナー由来 PBMC と同様，CLL 又は ALL のドナーから採取した悪性 B 細胞をリツキシマブより概して低い EC_{50} 値で減少させた．健常ドナー8 例の PBMC 試料を用いた Inebilizumab とリツキシマブの ADCC 比較データを［図 2.6.2.2－4］に示す．全体として，Inebilizumab による CD19 を標的とした B 細胞減少作用は，リツキシマブで得られる減少作用と同程度であった．

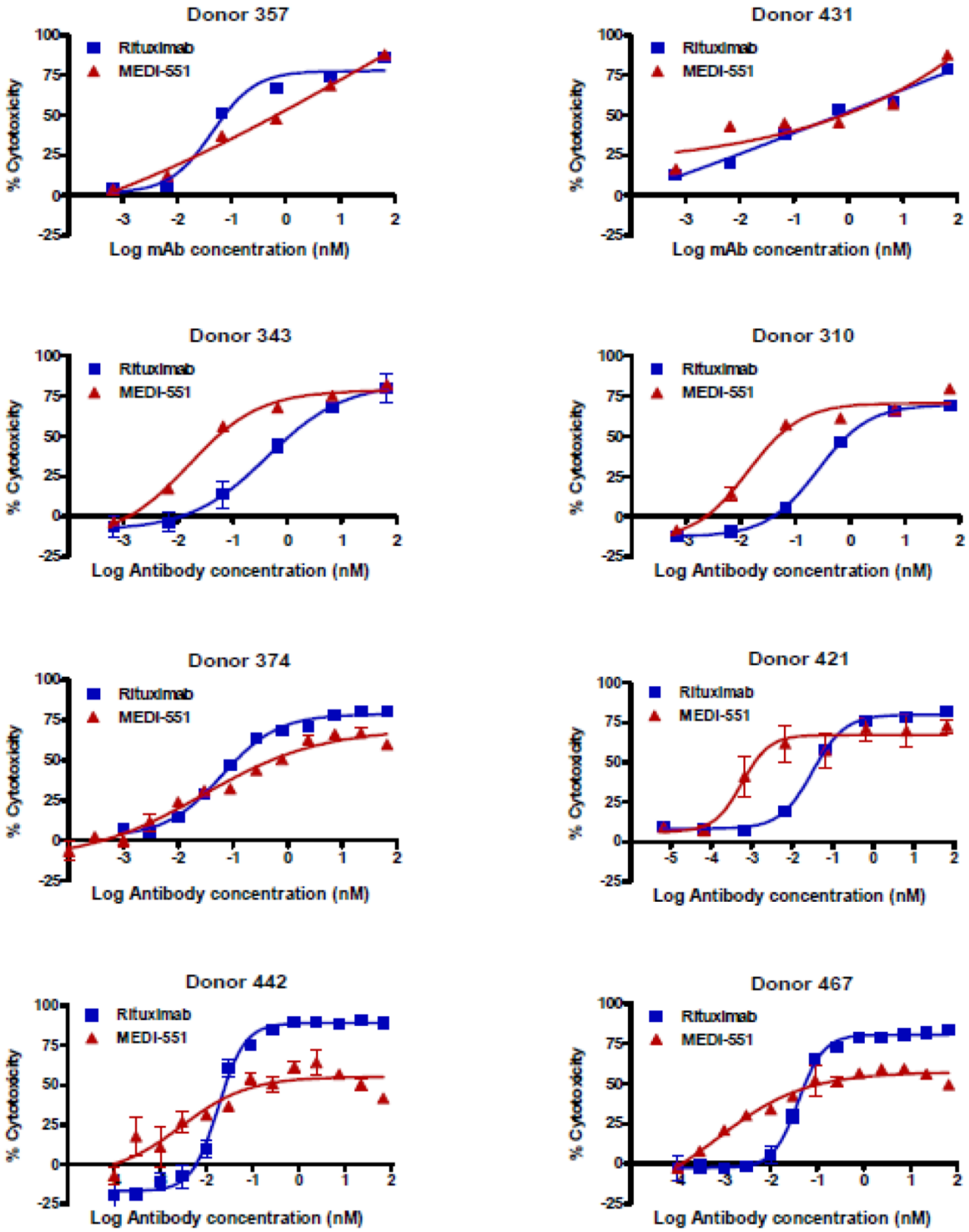


図 2.6.2.2－4　健常ドナー由来の PBMC における Inebilizumab とリツキシマブの抗体依存性細胞傷害の比較

MEDI-551 = inebilizumab; PBMC = peripheral blood mononuclear cells

2.6.2.2.1.5　Inebilizumab による ADCP 活性評価

顕微鏡下において，ヒト単球由来マクロファージによる抗体被覆白血病細胞の食作用の Inebilizumab による誘導能を評価した（Matlawska-Wasowska et al., 2013）．蛍光標識した Inebilizumab でターゲット細胞を被覆した後，ヒトマクロファージと共にインキュベートし，ターゲット細胞の貪食を 4 時間観察した．マクロファージと Inebilizumab 被覆ターゲット細胞との間の最初の結合は，培養 30 分以内に認められ，その後，食作用によるターゲット細胞の取り込みが観察された［図 2.6.2.2－5］．ターゲット細胞対エフェクター細胞の比が 1:3 のとき，大部分の細胞が 3 時間以内に完全に貪食された．これらのデータは，*in vitro* において Inebilizumab が ADCP 活性誘導能を有することを示唆している．一方で，Fcγ RIIa が ADCP のプロセスに関与する主要な Fcγ 受容体であることが文献に示されている（Richards et al, 2008，Dugast et al, 2011，Ackerman et al, 2013，Tebo et al, 2002）が，本試験において Fcγ RIIa の関与は明らかにされておらず，生体内での B 細胞低下における ADCP の寄与は不明である．

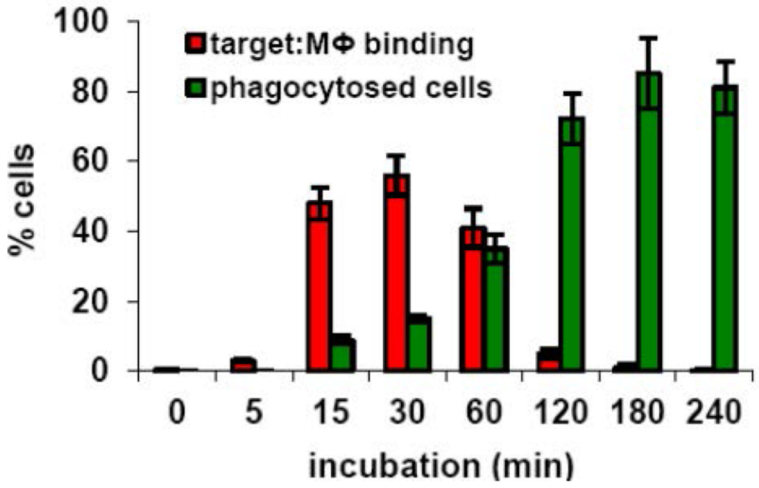


図 2.6.2.2－5　*In vitro* Inebilizumab 誘発 ADCP 活性評価

ADCP = antibody dependent cellular phagocytosis; MΦ = macrophage
The kinetics of target cell binding (“synapses”) and internalization by MΦ. Pre B acute lymphoblastic leukemia cells (697 cell line) were coated with fluorescently labeled inebilizumab, and nucleoli of these cells were stained with Hoechst 33342. Next, 697 cells were co-incubated with MΦ from a FcγRIIIA-158F/V donor at 1:3 ratio (target:effector) for indicated intervals. Cells were fixed with 2% PFA and analyzed by confocal microscopy.

2.6.2.2.1.6　ヒト形質細胞における CD19 及び CD20 発現解析（試験 [redacted]551-0004）

形質細胞は液性免疫において重要な役割を果たす分化 B 細胞であり，外来抗原を認識し，これを中和する抗体を分泌する．通常，形質細胞は感染やワクチン接種のような免疫攻撃に反応して分化誘導される．しかしながら，自己免疫疾患においては，自己抗体を分泌する形質細胞が分化誘導され，疾患の発症に関与する．そこで，ヒト血液及び組織由来の形質芽細胞及び形質細胞上での CD19 発現の特性を詳細に明らかにすると共に，様々な組織由来の形

質細胞の表現型と抗原特異的 Ig 産生との関連性を調べる目的で本試験を実施した. ヒトドナー由来の末梢血，扁桃腺，脾臓及び骨髄から形質細胞を単離し，フローサイトメトリーにより表面抗原の発現特性を評価した．更に，分類した細胞検体を用いて，ELISpot により総 Ig 産生及び抗原特異的 Ig 産生について検討した.

CD19 はヒト血液，扁桃腺，脾臓及び骨髄中に存在する正常な形質細胞上に発現している［図 2.6.2.2－6］. CD20 は，扁桃腺由来の形質細胞を除き形質細胞上に発現しないか，発現しても非常に低レベルであった．更に，脾臓及び骨髄には，CD19 陰性形質細胞集団がこれらの組織における形質細胞の亜集団として存在する［図 2.6.2.2－6］. 骨髄の CD19 陰性及び CD19 陽性形質細胞は，形態，免疫表現型，mRNA 発現，及び機能の点でほぼ同等であった（Groves et al., 2018）.

また，骨髄及び脾臓由来の CD19 陰性及び CD19 陽性形質細胞はいずれも，ポリオ，破傷風毒素，ジフテリア毒素及びインフルエンザワクチン抗原に対して特異的な抗体を分泌しており，両集団が長期生存型免疫に寄与することが示唆された［図 2.6.2.2－7］.

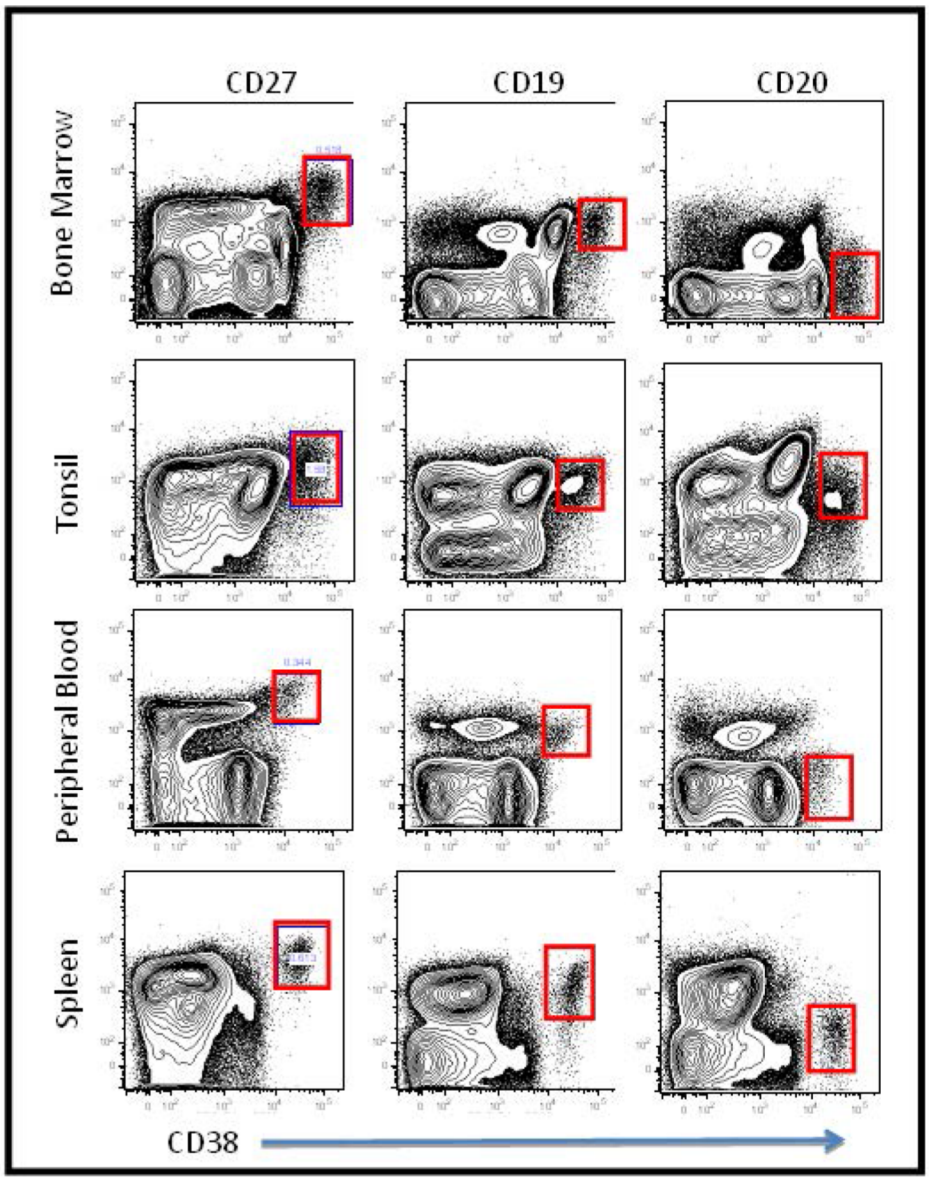


図 2.6.2.2－6　正常ヒト組織由来 CD27 陽性 CD38 強陽性細胞上での CD19 及び CD20 の発現

APC = allophycocyanin; BM = bone marrow; CD = cluster of differentiation; Cy7 = cyanine dye 7; ELISpot = enzyme-linked immunosorbent spot assay; PC = plasma cell; PE = phycoerythrin; PerCp-Cy5.5 = peridinin-chlorophyll protein complex conjugated to Cy5.5.
Freshly isolated and prepared human tonsil, peripheral blood, bone marrow, and spleen from healthy donors were incubated with antibodies to CD38 (PE-Cy7), CD27 (PerCp-Cy5.5), and CD19 (APC) or CD20 (APC). CD38++, x- axis on all dot plots, show a distinct PC fraction (red) that is CD27+, y-axis on the left column. The majority of CD38++ PC show positive surface expression for CD19 (y-axis on the center column), while only tonsil PC express low surface levels of CD20 (y-axis on the right column).

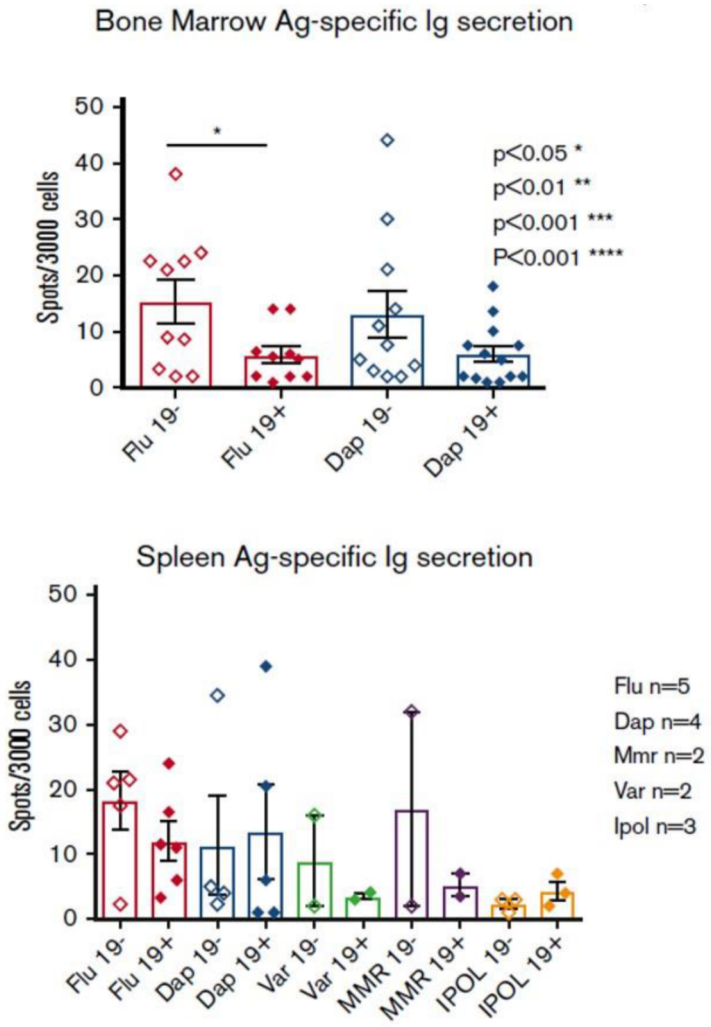


図 2.6.2.2－7　CD19 陽性抗体分泌細胞及び CD19 陰性抗体分泌細胞によって産生されるワクチン特異的 IgG

Ag = antigen; ASC = antibody secreting cells; Dap = Daptacel; Flu = Fluzone; Ig = immunoglobulin; IPOL = inactivated polio; MMR = measles, mumps, and rubella; Var = Varicella
(Top) CD19+ and CD19- ASC antigen-specific ELISpot results for Daptacel and Fluzone (Bottom) 3000 CD19+ and CD19- ASCs from spleen were sorted onto Daptacel (n = 4), Fluzone (n = 5), MMR (n = 2), Varicella (n = 2), or IPOL (n = 3) vaccine antigen precoated ELISpot plates and detected for total IgG.

2.6.2.2.1.7　*In vitro* における Inebilizumab によるヒト形質細胞の減少評価（試験 [redacted]551-0002）

CD19 陽性形質細胞に対する Inebilizumab の ADCC 誘導能を，2 種類の由来の異なるヒト形質細胞を用いて *in vitro* で検討した．まず，健常者ドナーの PBMC からナイーブ B 細胞とメモリーB 細胞を単離し，*in vitro* で IL-21，抗 IgM，抗 CD40 で刺激して形質細胞に分化させた．培養 6.5 日後において，フローサイトメトリーにより CD27 強陽性 CD38 強陽性細胞への分化が確認された．次に，形質細胞に対する Inebilizumab の ADCC 活性をエフェクター細胞として NK 細胞を用いた標準的な方法で検討した．更に，ナイーブ B 細胞，メモリーB

細胞，及び形質細胞をネガティブ細胞マーカー選択により骨髄細胞から単離し，ADCC 活性を評価した［図 2.6.2.2－8］．Inebilizumab は，ヒト PBMC から分化した形質細胞，及びヒト骨髄から新鮮単離した形質細胞もともに有意に減少させた．

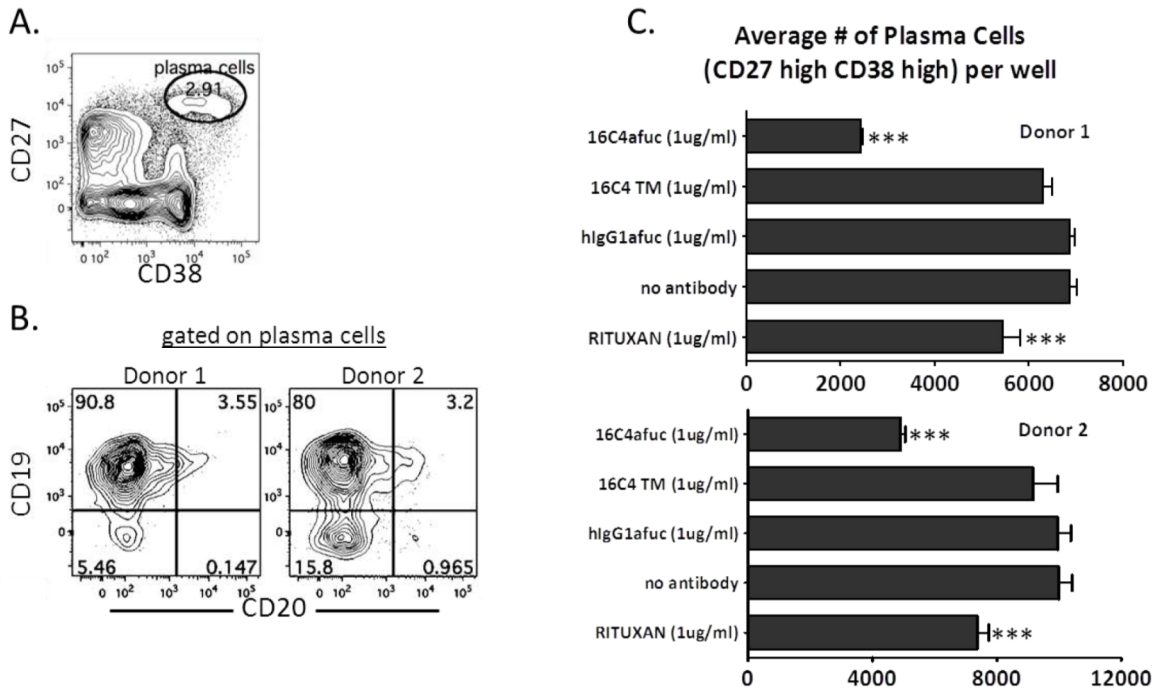


図 2.6.2.2－8　ヒト骨髄より新鮮単離した形質細胞に対する Inebilizumab の ADCC 活性

ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; PC = plasma cell
In part C, 16C4afuc is inebilizumab. 16C4 TM is a control antibody: triple mutant human IgG1 against CD19 modulated for reduced effector activity. hIgG1afuc is an afucosylated isotype control antibody.
A)　Representative data illustrating the identification of PCs (CD27 high CD38 high) following B-cell enrichment.
B)　CD19 and CD20 expression of the PC from two donors.
C)　Average number of viable PC per well post-ADCC assay. Each individual donor is graphed and the mean (± SD n = 6 replicates) is shown for each group. *** indicates a p-value ≤ 0.001 in a pairwise comparison with no antibody controls.

2.6.2.2.1.8　mAb 16C4 の非ヒト霊長類 B 細胞に対する結合評価（試験 [redacted]551-0008）

ヒト及び非ヒト霊長類（ヒヒ，アカゲザル，アフリカミドリザル又はカニクイザル）の B 細胞上に発現している CD19 への mAb 16C4（Inebilizumab のフコシル化体）の結合を FACS 解析にて検討した．B 細胞は，ヒト及び非ヒト霊長類の全血から単離し，標識した抗 CD20 mAb であるリツキシマブを用いて検出した．標識 mAb 16C4 はヒトの全血から単離した CD20 陽性 B 細胞に結合したが，カニクイザルから単離した B 細胞への結合は認められなかった［表 2.6.2.2－1］．

間接標識法ではヒト及び非ヒト霊長類の PBMC から単離した B 細胞はリツキシマブにより検出可能であった．mAb 16C4 の PBMC 由来 B 細胞結合量は，ヒヒ，アカゲザル，又はア

フリカミドリザルの CD20 陽性 B 細胞に比べて，ヒトの CD20 陽性 B 細胞では約 10～20 倍高かった. このことから, mAb 16C4 はヒトの B 細胞には結合するが, 非ヒト霊長類由来 CD19 陽性 B 細胞にはほとんど結合しないことが示された.

以上より，Inebilizumab のフコシル化体である mAb 16C4 は，ヒヒ，カニクイザル，アカゲザル，又はアフリカミドリザルの B 細胞に発現する CD19 に対して交差反応性を全く，又はほとんど示さないことが，FACS 解析により明らかとなった.

表 2.6.2.2－1　カニクイザルから分離した B 細胞への抗 CD19 mAb 16C4 の結合

Sample ID	16C4 MFI [a]	Rituximab MFI
Cynomolgus 763	88	5512
Cynomolgus 764	0	14820
Cynomolgus 773	0	11145
Cynomolgus 774	0	16436
Human 324	1064	12382
Human 501	1149	10425

mAb = monoclonal antibody; MFI = median fluorescence intensity

a. Numbers were corrected for background staining by the isotype control, mAb R347

2.6.2.2.1.9　Inebilizumab のウサギ B 細胞に対する結合評価（試験 [redacted]551-0005）

Inebilizumab はヒト以外の霊長類由来の CD19 にはほとんど，又は全く交差反応性を示さないため，ウサギ CD19 に対する交差反応性を評価した．3 回の独立した試験で，ウサギ血中単核細胞をウサギ特異的 B 細胞マーカー（IgM）抗体で染色した後，Inebilizumab に対する結合性を検討した．Inebilizumab は IgM 陽性ウサギ B 細胞に結合しなかったが，別群にて実施したヒト血液に対する染色では，すべての CD20 陽性ヒト血中 B 細胞に Inebilizumab が結合することが示された［図 2.6.2.2－9］.

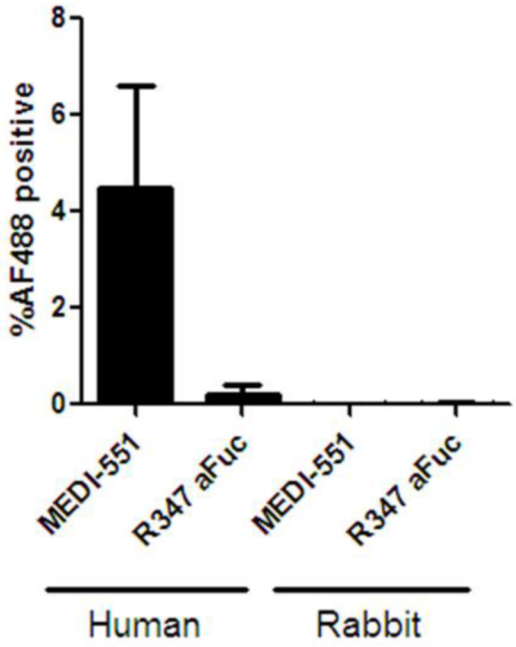


図 2.6.2.2－9　Inebilizumab のウサギ B 細胞への非結合性評価試験

AF = AlexaFluor; aFuc = afucosylated; MEDI-551 = inebilizumab
Mononuclear cells from human and rabbit blood were stained for B cell markers by flow cytometry. B cells were co-labeled with AF488-conjugated MEDI-551 or isotype control, R347 aFuc. This figure represents the average percentage of AF488 positive lymphocytes in human and rabbit blood, when stained with MEDI-551 or isotype control (n = 3 donors run in duplicate).

2.6.2.2.1.10　ヒト CD19 トランスジェニックマウス使用の妥当性

ヒト CD19（huCD19）とマウス CD19（mCD19）の配列は全体の 65%が相同（74%が類似）である．huCD19 と mCD19 はいずれも，その細胞外領域に 2 か所の保存された免疫グロブリン様ドメインが存在している．CD19 は，B 細胞受容体のシグナル伝達補助受容体として，細胞質ドメインの複数のチロシン残基がリン酸化される．すべてのチロシン残基とその周囲のアミノ酸残基（様々な SH2 ドメイン含有シグナル伝達分子が結合するためのコンセンサス配列）は，huCD19 と mCD19 で共通である．huCD19 と mCD19 の間の機能的保存は十分に確認されており，huCD19 ヘテロ接合性 Tg かつ mCD19 ノックアウト動物において，huCD19 は mCD19 と置換が可能であることが報告されている（Sato et al., 1997）．

そのため，Inebilizumab の薬力学的作用及び安全性の検討に適切な動物種としてヒト CD19 トランスジェニック（huCD19 Tg）マウスを選択した．huCD19 Tg マウスは，C57BL6 マウスの遺伝的背景を有し，ヒト CD19 プロモーターにより発現調節されるヒト CD19 遺伝子が導入されている．huCD19 Tg マウスは，Duke University の Thomas Tedder の研究室で作出され，Tedder らはその様々な特徴を明らかにしている（Zhou et al., 1994; Sato et al., 1995; Sato et al., 1997; Inaoki et al., 1997; Yazawa et al., 2005）．このモデルにおいて，huCD19 発現は，ヒトの場合と全く同様に B 細胞系に限られており，細胞表面発現の成熟に伴う発生パターンもまたヒトと同様である（Zhou et al., 1994）．huCD19 Tg マウスの解析により，B 細胞活性化調節

における CD19 の役割，並びに免疫寛容の低下及び自己免疫疾患の発症におけるその意味について，重要な洞察が得られている．すなわち CD19 発現の増加は，B 細胞の過剰活性化と免疫寛容の低下をもたらし，最終的に自己免疫に至る可能性がある．この所見は，全身性強皮症患者において同様に認められる（Sato et al., 1995; Sato et al., 1997; Inaoki et al., 1997; Taylor et al., 2006）．このような自己免疫疾患発症の可能性に基づき，すべての毒性試験において，huCD19 ホモ接合性 Tg マウスではなく huCD19 ヘテロ接合性 Tg マウスを用いた．Inebilizumab を用いたこのモデルの特性評価については，[redacted]551-0009 及び第 2.6.2.2.1.11 項と第 2.6.2.2.1.12 項に記載した．

2.6.2.2.1.11　ヒト CD19 トランスジェニックマウス由来 B 細胞への Inebilizumab の結合

ヒト B 細胞に発現したヒト CD19 及び huCD19 Tg マウス由来の B 細胞に発現したヒト CD19 に対する Inebilizumab の親和性を，FACS 分析により検討した．ヒト B 細胞上の CD19 への Inebilizumab の結合親和性は，huCD19 Tg マウス由来の B 細胞上のヒト CD19 への結合親和性と同程度であった［図 2.6.2.2－10］.

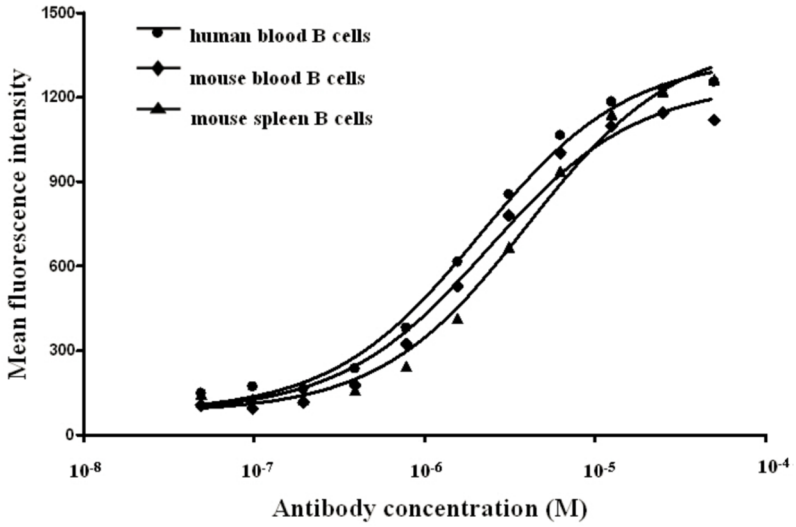


図 2.6.2.2－10　ヒト B 細胞及びヒト CD19 トランスジェニックマウス由来 B 細胞に対する Fab-Inebilizumab 結合

Fab = antigen binding fragment

2.6.2.2.1.12　ヒト CD19 トランスジェニックマウスにおける CD19 発現

［図 2.6.2.2－11］に示すとおり，Inebilizumab 結合は，huCD19 Tg マウス由来の B 細胞に特異的であり，血液，脾臓，骨髄，及び腹腔由来の B 細胞に結合する．野生型 B6 マウスの血液及び組織から採取した単核細胞は Inebilizumab と結合せず，すなわち Inebilizumab はマウス B 細胞と交差反応しないことから，huCD19 に対する Inebilizumab の特異性が本モデルにおいても確認された.

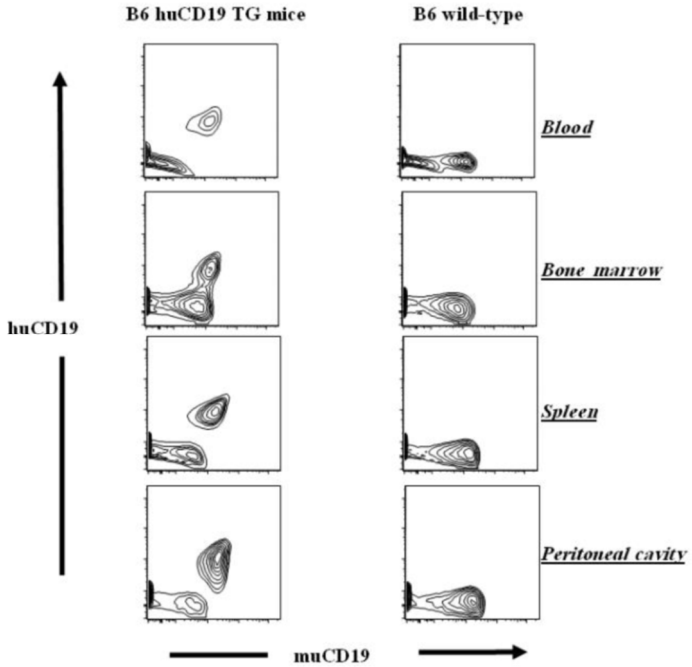


図 2.6.2.2－11　Inebilizumab によるヒト CD19 トランスジェニックマウス由来マウス CD19 陽性細胞に発現するヒト CD19 への特異的結合

huCD19 = human CD19; muCD19 = murine CD19; TG = transgenic

すべての B 細胞サブセットにおける huCD19 導入遺伝子の発現を確認するために，マウス PBMC，腹腔から採取した細胞，及びリンパ器官（骨髄，脾臓）から採取した細胞を単離し，フローサイトメトリーにより huCD19 の発現解析を実施した．異なる発生段階の B 細胞を同定するために，特有の細胞表面抗原に対する抗体を用いて，試料を共染色した．［図 2.6.2.2－12］に示すとおり，huCD19 は，未熟・成熟 B 細胞，腹腔内の B 細胞，及び B1a B 細胞を含むすべての B 細胞集団に発現する．発現レベルが最も低かったのは早期プロ及びプレ B 細胞であり，過去の所見と一致していた（Zhou et al., 1994）．［図 2.6.2.2－12］の上図は，huCD19 の発現が huCD19 Tg マウスにおける CD19 の発現に影響を及ぼさないことを示している．下図は，huCD19 が huCD19 Tg マウス由来の B 細胞上で検出された一方，野生型 B6 マウス由来の B 細胞上では検出されなかったことを示している．Tedder らが実施した特性評価（Sato et al., 1995; Sato et al., 1997; Inaoki et al., 1997; Zhou et al., 1994; Yazawa et al., 2005）と同様に，B 細胞系以外の細胞において huCD19 は検出されなかった．

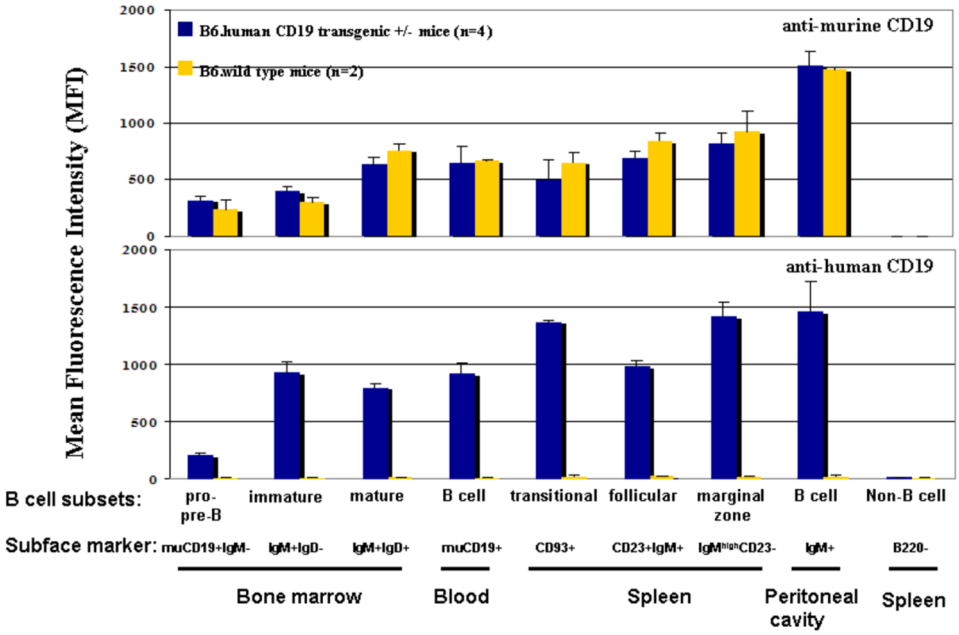


図 2.6.2.2－12　ヒト CD19 トランスジェニックマウスにおける B 細胞発生全段階を通じて発現するヒト CD19

Ig = immunoglobulin; mu = murine

2.6.2.2.2　*in vivo* 薬理試験

2.6.2.2.2.1　Inebilizumab のヒト CD19 トランスジェニックマウス B 細胞数に対する作用（試験 [redacted]551-0010）

huCD19 Tg マウスを用い，正常血液中及び組織中の B 細胞の減少とその回復に及ぼす Inebilizumab の作用を検討した．Inebilizumab は *in vivo* で血液中及び組織中の B 細胞を減少させた．B 細胞の減少持続期間は用量依存性であり，Inebilizumab 250 μg 単回投与後には 10 週間を超えて B 細胞が減少した．B 細胞が対照群とほぼ同等の細胞数及び成熟度に回復するまでには更に 4～6 週間が必要であった［図 2.6.2.2－13］．Inebilizumab の作用は B 細胞に限定され，循環血中のその他の免疫細胞に対する明らかな影響は認められなかった．更に，本モデルで血清中のサイトカイン及びケモカインを定量した．Inebilizumab を投与した huCD19 Tg マウスにおいて，B 細胞活性化因子（BAFF）濃度は，B 細胞減少後に上昇し，その後 B 細胞の回復に比例して低下し B 細胞が完全に回復するとベースラインに戻った．TH1，TH2 サイトカイン，及び複数のケモカイン（IFNγ，IL10，IL12p70，IL1β，IL2，IL4，IL5，CXCL1 及び TNFα）については，Inebilizumab 投与後 7 週又は 9 週間の時点で，各投与群間で有意な変動は認められなかった．

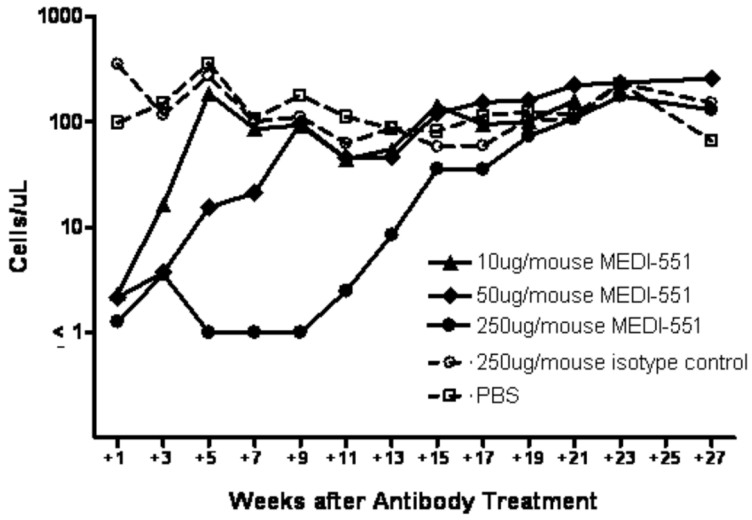


図 2.6.2.2－13　ヒト CD19 トランスジェニックマウスにおける Inebilizumab 投与による血液中 B 細胞の減少及び回復

MEDI-551 = inebilizumab; PBS = phosphate-buffered saline

本試験期間中，B 細胞の減少作用を有さないヒト IgG1 対照抗体である R347 を投与したマウスでは，血清中 Ig 濃度が上昇し，PBS を投与したマウスでは，血清中の IgM，IgG1 及び IgG2b 濃度が徐々に上昇した．Inebilizumab 投与群ではこのような血清中 Ig 濃度上昇が抑制されたことから，Inebilizumab が抗体産生を阻害することが示唆された．用量 50 μg 又は 250 μg の Inebilizumab を投与した動物では，血清中 IgM 濃度はそれぞれ 13 週間後及び 21 週間後までにベースライン値にまで回復した．また，用量 50 μg 又は 250 μg の Inebilizumab を投与した動物では，血清中 IgG1 及び IgG2b 濃度は 21 週間後までにベースライン値にまで回復した．通常では低濃度である血清中 IgG2c，IgA，IgG3 濃度は，Inebilizumab 投与による影響を受けなかった［図 2.6.2.2－14］.

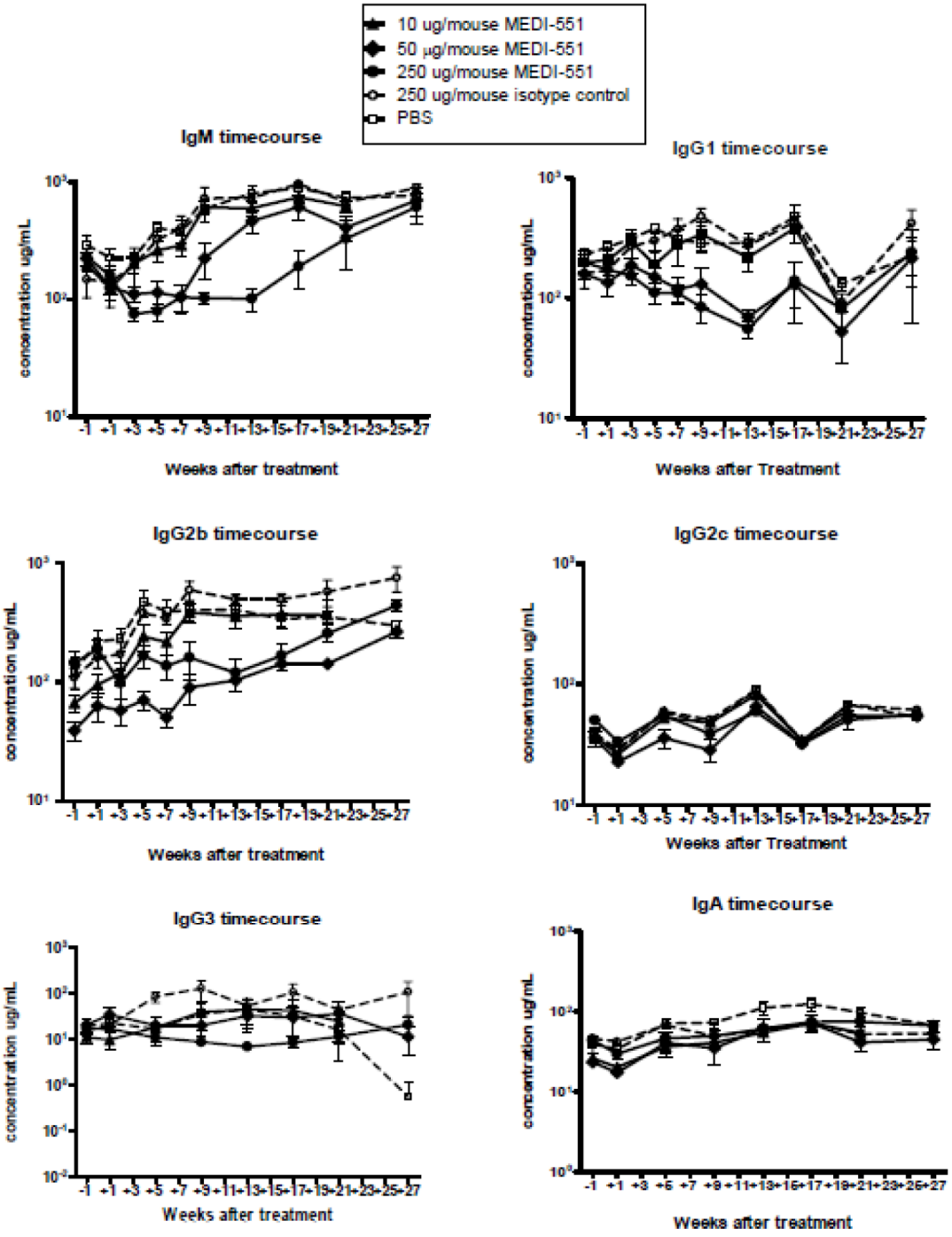


図 2.6.2.2－14　huCD19 トランスジェニックマウスに Inebilizumab を投与した後の免疫グロブリン濃度の低下

MEDI-551 = inebilizumab: PBS = phosphate-buffered saline

以上のように，huCD19 Tg マウスに Inebilizumab を投与することで，血液中の B 細胞は顕著かつ持続的に減少し，その後，正常な細胞数及び分化度まで回復した．また，Inebilizumab による B 細胞の減少により，抗体産生も阻害された．

2.6.2.2.2.2　Sle1-ヒト CD19 トランスジェニックマウスにおける Inebilizumab のマウス B 細胞の減少作用及び，血清中自己抗体の減少作用（試験 [redacted]551-0003）

自己免疫疾患のマウスモデルにおいて，血液中及び組織内の B 細胞，形質細胞，及び血清自己抗体価に対する Inebilizumab の作用を評価した．Sle1-huCD19 Tg マウスは，ヒトとマウスの両方における強力な自己免疫感受性遺伝子座である Sle1 がホモ接合性であり，ヒト CD19 遺伝子が導入されている．このマウスは，IgM 及び IgG 自己抗体の高値，特徴的な B 細胞サブセット，高度に活性化された B 細胞及び T 細胞など，多くの古典的な自己免疫疾患症状を呈するが，死亡率の顕著な上昇や腎機能障害といった所見は示さないモデルである．Inebilizumab を Week 0 に 10 mg/kg の用量で投与し，続いて Week 2，6，8，10 に 400 µg/マウスの維持用量を投与した．Inebilizumab は Sle1-huCD19 Tg マウスの血液中及び組織内の B 細胞を用量依存的かつ有意に枯渇させた［図 2.6.2.2－15］．

Inebilizumab の投与後，脾臓の胚中心 B 細胞と形質細胞を含めた活性化 B 細胞及び分化 B 細胞の数が 90%以上減少し，血清総 IgG，自己抗体及び循環血液中の炎症マーカーも減少した［図 2.6.2.2－16 及び図 2.6.2.2－17］．