目次

1.　非臨床試験計画の概要 6
1.1　GLP 適用 7
1.2　薬理 7
1.3　薬物動態 8
1.4　毒性 8
1.5　品質特性 8
2.　薬効薬理 9
2.1　効力を裏付ける試験 11
2.1.1　治療標的としての CD20 11
2.1.2　エプコリタマブの作製及び選択 12
2.1.3　標的結合特性 12
2.1.4　エプコリタマブの Fc ドメインの機能特性 13
2.1.5　エプコリタマブの作用機序の in vitro 評価 13
2.1.6　In vivo でのエプコリタマブの CD20 発現細胞除去活性 18
2.2　副次的薬理試験 22
2.3　安全性薬理試験 23
2.4　薬力学的薬物相互作用試験 23
3.　薬物動態 23
3.1　分析法の妥当性 24
3.2　カニクイザルを用いたトキシコキネティクス 24
4.　毒性 25
4.1　In vivo 毒性試験 27
4.2　その他の毒性試験 29
4.3　動物からヒトへのデータの外挿性 29
5.　総括及び結論 29
6.　添付文書案 32
7.　参考文献 32

表目次

Table 1　エプコリタマブ及び関連抗体の名称及びコード 6
Table 2　実施した非臨床薬理試験の概要 9
Table 3　エプコリタマブの T 細胞活性化特性 15

Table 4　Daudi 細胞及び健康ヒト由来の B 細胞に対するエプコリタマブによる T 細胞媒介性細胞傷害作用の特性 16
Table 5　非臨床薬物動態試験の概略 23
Table 6　非臨床毒性試験の概略 25

図目次

Figure 1　エプコリタマブによる CD8 陽性 T 細胞の活性化 14
Figure 2　エプコリタマブによる T 細胞媒介性細胞傷害作用 16
Figure 3　エプコリタマブによる腫瘍増殖の阻害 19
Figure 4　HIS マウスを用いた皮下 Raji モデルでのエプコリタマブの効果 20
Figure 5　エプコリタマブの静脈内及び皮下投与後のカニクイザル末梢血及びリンパ節 B 細胞数 21
Figure 6　エプコリタマブの静脈内投与後のカニクイザル脾臓及びリンパ節 B 細胞数減少及び回復 22

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
7D8	IgG1-CD20, CD20-specific antibody clone	IgG1-CD20、抗 CD20 抗体クローン
ABC-DLBCL	activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma	活性化 B 細胞型びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	antibody-dependent cell-mediated phagocytosis	抗体依存性細胞貪食
AUC	area under the concentration-time curve	薬物濃度 - 時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}28d}$	area under the concentration-time curve from time zero to time t=28 days	投与後 28 日までの AUC
$AUC_{0\text{-}inf}$	area under the concentration-time curve from time zero to time to infinity	0 時間から無限大時間までの AUC
$AUC_{0\text{-}tau}$	area under the concentration-time curve from time zero to time tau, where tau is the dosing interval	0 時間から次の投与時点までの AUC
B-CLL	B-cell chronic lymphocytic leukemia	B 細胞性慢性リンパ性白血病
BL	Burkitt lymphoma	バーキットリンパ腫
B-NHL	B-cell non-Hodgkin lymphoma	B 細胞性非ホジキンリンパ腫
BRGS	BALB/c *Rag2*^{tm1Fwa} *IL-2Rγc*^{tm1Cgn} *SIRPα*^{NOD}	―
bsAb	bispecific antibody	二重特異性抗体
C1q	complement component 1q	補体成分 C1q
CD	cluster of differentiation	CD 分類
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CDR	complementarity-determining region	相補性決定領域
CDX	cell line-derived xenograft	細胞株由来異種移植
CH	constant domain of heavy chain	重鎖定常領域
CL	clearance	クリアランス
C_{max}	the maximum observed concentration observed after dosing	最高濃度
CRS	cytokine release syndrome	サイトカイン放出症候群
ctrl	control	対照
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
ECLIA	electrochemiluminescence immunoassay	電気化学発光免疫測定
EGFRxMET bsAb	bispecific antibody targeting epidermal growth factor receptor and Met	上皮成長因子受容体及び Met を標的とする二重特異性抗体
EMA（旧 EMEA）	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
Fab	fragment antigen binding	抗体結合フラグメント
Fc	fragment crystallizable	結晶形成フラグメント
FcγR	IgG Fc receptor	IgG Fc 受容体
FcRn	neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FEA	inertness mutations L234F, L235E and	不活性変異 L234F、L235E、D265A

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
	D265A	
FEAL	L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody® mutations	L234F/L235E/D265A 不活性、F405L DuoBody®変異
FEAR	L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody® mutations	L234F/L235E/D265A 不活性、K409R DuoBody®変異
FL	follicular lymphoma	濾胞性リンパ腫
GALT	gut-associated lymphoid tissue	腸管関連リンパ組織
GCB-DLBCL	germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma	胚中心 B 細胞型びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
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
HIS	human immune system	ヒト免疫系
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgG1-RTX-FEAR	rituximab with an inert Fc domain and K409R (DuoBody®) mutation	不活性化 Fc ドメイン及び K409R（DuoBody®）変異を遺伝子操作により導入したリツキシマブ
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
K_D	dissociation constant, affinity	解離定数、親和性
LBCL	large B-cell lymphoma	大細胞型 B 細胞リンパ腫
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MAD	mutual acceptance of data	データ相互受け入れ制度
MCL	mantle-cell lymphoma	マントル細胞リンパ腫
MS4A	membrane-spanning 4A gene family	膜貫通 4A 遺伝子ファミリー
ND	newly diagnosed	新規診断
NFAT	nuclear factor of activated T cells	活性化 T 細胞核因子
NHL	non-Hodgkin lymphoma	非ホジキンリンパ腫
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NSG	NOD.*Cg-Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ	－
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PD-1	programmed cell death protein 1	プログラム細胞死-1
PDX	patient-derived xenograft	患者由来異種移植片
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency	医薬品医療機器総合機構
QCM	quartz crystal microbalance	水晶振動子マイクロバランス
RR	relapsed or refractory	再発又は難治性
SMC	single molecule counting	1 分子カウント
TCR	T-cell receptor	T 細胞受容体
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	time after dosing at which the	最高濃度到達時間

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
	maximum observed concentration is observed	
TMDD	target-mediated drug disposition	標的介在性薬物動態
V_D	apparent volume of distribution	見かけの分布容積
V_{ss}	apparent volume of distribution at steady state	定常状態での見かけの分布容積

化合物の命名法

エプコリタマブの開発では複数の名称及びコードを使用した。非臨床試験報告書、概要表、概要文及び総括評価で使用したエプコリタマブ及び関連抗体の名称及びコードを Table 1 に示す。

Table 1　エプコリタマブ及び関連抗体の名称及びコード

Product Code	**Nonclinical Code**	**Description**
Epcoritamab	DuoBody®-CD3xCD20; GEN3013; BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR	Bispecific IgG1 antibody that contains a CD3-specific Fab arm, a CD20-specific Fab arm, and with Fc-silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone.
NA	Epcoritamab-FITC; DuoBody-CD3xCD20-FITC; GEN3013-FITC; BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR-FITC	FITC-labeled bispecific IgG1 antibody that contains a CD3-specific Fab arm, a CD20-specific Fab arm and with Fc-silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone.
NA	DuoBody-CD3xctrl; BisG1-huCACAO-FEAL/b12-LFLEDA-K409R	Bispecific IgG1 antibody that contains a CD3-specific Fab arm identical to epcoritamab, a non-binding control (ctrl) Fab arm, and Fc-silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone.
NA	DuoBody-ctrlxCD20; BisG1-b12-FEAL/7D8-FEAR	Bispecific IgG1 antibody that contains a CD20-specific Fab arm identical to epcoritamab, a non-binding control (ctrl) Fab arm, and with Fc-silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone.
3005a	IgG1-CD3-FEAL; IgG1-huCACAO-FEAL	Bivalent CD3-specific IgG1 mAb with Fc-silencing (FEA) and DuoBody (F405L) mutations in the Fc backbone; parental antibody for epcoritamab.
NA	IgG1-CD3; IgG1-huCACAO	Bivalent CD3-specific IgG1 mAb
3001d	IgG1-CD20-FEAR; IgG1-7D8-FEAR	Bivalent CD20-specific IgG1 mAb with Fc-silencing (FEA) and DuoBody (K409R) mutations in the Fc backbone; parental antibody for epcoritamab.
NA	IgG1-CD20; IgG1-7D8	Bivalent CD20-specific IgG1 mAb

CACAO = cross-reactive anti-CD3 antibody one; ctrl = control (non-binding control Fab arm derived from the anti-human immunodeficiency virus [HIV] glycoprotein 120 [gp120] antibody IgG1-b12 [Barbas et al, 1993]); CD = cluster of differentiation; Fab = fragment antigen binding; Fc = fragment crystallizable; FEA = inertness mutations L234F, L235E and D265A; FEAL = L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody® mutations; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody® mutations; FITC= fluorescein isothiocyanate; huCACAO = humanized cross-reactive anti-CD3 antibody one; IgG = immunoglobulin G; mAb = monoclonal antibody; NA = not applicable

1.　非臨床試験計画の概要

本総括評価で使用したエプコリタマブ及び関連抗体の名称及びコードを Table 1 に示す。

エプコリタマブ（GEN3013、DuoBody®-CD3xCD20）は、T 細胞表面抗原 CD3 及び B 細胞表面抗原 CD20 を認識する免疫グロブリン G（immunoglobulin G、IgG）1 二重特異性抗体である（Engelberts et al, 2020）。薬理、薬物動態及び毒性試験は、CD20 陽性 B 細胞性悪性腫瘍に対する皮下投与治療薬としてエプコリタマブの臨床開発及び承認申請をサポートするために計画した。

エプコリタマブの効力を裏付ける試験では、標的結合特性、IgG Fc ドメインの機能的特性、並びに T 細胞媒介性細胞傷害、関連する T 細胞活性化、T 細胞増殖及びサイトカイン産生の誘導活性を in vitro 試験で解析し、エプコリタマブ投与による（悪性）B 細胞数減少作用を in vivo 試験で評価した。副次的薬理試験では、in silico 及び in vitro 試験でエプコリタマブの免疫原性を予測した（2 項、Table 2）。いくつかの非臨床薬理試験では、エプコリタマブの代わりに構造面、更に試験に関連する機能面でエプコリタマブと同等である抗体分子バリアントを使用した。該当箇所に、使用した抗体分子バリアントに関する説明を記載した。

薬物動態試験は、カニクイザルを用いた試験である（3 項、Table 5）。毒性試験プログラムとして、カニクイザルを用いた主要な GLP 適用試験及び非 GLP 適用予備試験のほか、サイトカイン放出、組織交差反応性及び溶血性（4 項、Table 6）の評価を行った。この非臨床概括評価では、エプコリタマブの薬理、薬物動態及び毒性の総合的かつ重要な評価を示す。

1.1　GLP 適用

非臨床安全性試験は ICH ガイドラインに従って実施し、主要な試験は経済協力開発機構（Organization for Economic Co-operation and Development、OECD）の毒性試験ガイドライン及び GLP に準拠して、データ相互受け入れ制度（mutual acceptance of data、MAD）に加盟する国々で実施した。非 GLP 適用試験は、品質保証部門による査察を受けていないが、高度な科学的基準に従って実施された。反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験では、試験戦略に関する ICH ガイダンスからのいずれの逸脱も PMDA、米国食品医薬品局（Food and Drug Administration、FDA）及び欧州医薬品庁（European Medicines Agency、EMA）の規制当局の合意を得ている。

1.2　薬理

エプコリタマブに関して実施した非臨床薬理試験を Table 2 に示す。

エプコリタマブの効力を裏付ける試験を、多様な in vitro、ex vivo 及び in vivo 非臨床試験で評価した。エプコリタマブの標的結合特性、エプコリタマブの不活性化 Fc ドメインの機能特性、並びに T 細胞媒介性細胞傷害作用、関連する T 細胞活性化、T 細胞増殖及びサイトカイン産生の誘導活性を in vitro で評価した。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（diffuse large B-cell lymphoma、DLBCL）、濾胞性リンパ腫（follicular lymphoma、FL）及びマントル細胞リンパ腫（mantle-cell lymphoma、MCL）患者腫瘍細胞に対するエプコリタマブの細胞傷害作用誘導活性を ex vivo で評価した。

ヒト末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell、PBMC）又はヒト免疫系（human immune system、HIS）を共移植した免疫不全マウスを用いた B 細胞性リンパ腫細胞株由来異種移植（cell line-derived xenograft、CDX）モデル及び DLBCL 患者由来異種移植片（patient-derived xenograft、PDX）モデルで、エプコリタマブの in vivo 抗腫瘍活性を評価した。非臨床安全性試験の一環として、エプコリタマブのカニクイザル末梢血及びリンパ器官の CD20 発現 B 細胞数減少活性も評価した。

エプコリタマブの副次的薬理試験として、免疫原性リスクを in silico 及び in vitro 非臨床試験で評価した。

ICH S6、S7A 及び S9 ガイドラインに従い、エプコリタマブの安全性薬理に特化した試験は実施していない。代わりに、カニクイザルを用いた主要な毒性試験の一環として特定の安全性薬理パラメーターを評価した。

1.3　薬物動態

非臨床安全性試験の一環として、カニクイザルを用いてエプコリタマブの非臨床薬物動態（pharmacokinetics、PK）を検討した。カニクイザル血漿試料中のエプコリタマブ及び抗薬物抗体（anti-drug antibody、ADA）を測定するための分析法を開発した。単回投与試験及び用量設定試験では、適切な薬物濃度分析法及び ADA 分析法を用いた。GLP 適用毒性試験では、規制当局のガイドライン及び社内の標準操作手順書に従ってバリデーションした薬物濃度及び ADA 分析法を用いた。

1.4　毒性

エプコリタマブの非臨床安全性試験は、ヒト細胞及び組織を用いた in vitro 試験（サイトカイン放出試験、溶血性試験、血漿適合性及び組織交差反応性試験）、並びに皮下及び静脈内投与経路による毒性を評価するカニクイザルを用いた in vivo 試験で構成されている。エプコリタマブは、ヒト及びカニクイザルの CD3 及び CD20 と同程度に結合し、カニクイザル細胞を用いた in vitro 試験で薬理学的活性を示し、げっ歯類の CD3 及び CD20 と交差反応しないことから、適切な動物種としてカニクイザルを選択した。カニクイザルを用いたエプコリタマブの GLP 適用毒性試験の用量は、カニクイザルを用いた過去の探索的及び用量設定試験で得られた忍容性の成績に基づき設定した。GLP 適用毒性試験では、安全性評価項目として安全性薬理に加えて、B 細胞のイムノフェノタイピングによるモニタリング及びサイトカイン濃度の評価を実施した。皮下投与による臨床投与をサポートするため、カニクイザルを用いた非臨床安全性評価には、皮下投与後のエプコリタマブの生物学的利用率及び局所刺激性の評価も含めた。

エプコリタマブの特定の遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及び幼若動物を用いた毒性試験は実施していない。エプコリタマブは免疫原性を示す可能性が高いことが示されており、カニクイザルを用いた静脈内及び皮下投与による毒性試験でエプコリタマブの全身曝露量が減少したことから、製造販売承認申請では、日米欧の各地域（PMDA、FDA、EMEA）で 13 週間反復投与毒性試験及び胚・胎児発生に関する試験のいずれも不要であることが確認されている（FDA Type B End of Phase 1、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日、Reference ID:[redacted];EMEA Scientific Advice Procedure No.:[redacted]；医薬品医療機器総合機構[redacted]相談、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日、#[redacted]）。ADA 反応を克服する可能性のある高用量のエプコリタマブを投与する選択肢は、エプコリタマブの薬理学的作用機序に関連する忍容性の問題により限定的と考えられる。

1.5　品質特性

エプコリタマブは、標準型ヒト IgG1 構造及び IgG1 抗体に典型的な生化学的特徴を示す。エプコリタマブは、ヒト化 IgG1λ 抗 CD3ε モノクローナル抗体（monoclonal antibody、mAb）及び

ヒト型 IgG1κ 抗 CD20 mAb の制御された Fab アーム交換（Labrijn et al, 2013; Labrijn et al, 2014）により作製され、各 mAb は、二重特異性抗体（bispecific antibody、bsAb）を効率よく作製するため、Fc 主鎖に相補的な DuoBody 変異（それぞれ F405L 及び K409R）の 1 つを含む。さらに 3 つの不活性変異 L234F、L235E 及び D265A（inertness mutations L234F, L235E and D265A、FEA）を導入し、Fc を介したエフェクター機能を抑制した。DuoBody 変異と不活性変異の組み合わせは、FEAL/FEAR と呼ばれている（Table 1）。

臨床用グレードのエプコリタマブを用いて、カニクイザルを用いた GLP 適用毒性試験を実施した。非臨床試験で使用した他のすべてのロットは、臨床試験で使用した製剤と機能的及び生化学的に同等であった。

エプコリタマブの静脈内投与及び皮下投与の製剤はカニクイザルを用いて検討した。静脈内投与用の溶媒は、カニクイザルを用いた単回投与及び用量設定試験ではリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline、PBS）を、GLP 適用試験では 0.9%塩化ナトリウム（0.9%生理食塩水）を用いた。皮下投与用の溶媒は、150 mmol/L ソルビトールを含む pH 5.5 の 30 mmol/L 酢酸緩衝液であった。

臨床用エプコリタマブ皮下投与製剤は、30 mmol/L 酢酸ナトリウム、150 mmol/L ソルビトール、0.04%ポリソルベート 80 を含有し、pH 5.5 である。ポリソルベート 80 は非臨床皮下投与製剤には含まれていなかったが、タンパク質を安定化させ、凝集を防ぐ目的で添加剤として臨床開発中に導入された。ポリソルベート 80 は、臨床用エプコリタマブ製剤中にヒトで安全と考えられる 0.4 mg/mL 又は 0.04%の濃度で含まれる。公表されている臨床及び非臨床データの包括的な文献レビューに基づくと、エプコリタマブ皮下投与製剤中のポリソルベート 80 の濃度は市販のワクチン及び治療用 mAb 製剤中の濃度と同程度であり、心血管系に対する影響及び肝毒性に関するヒトの閾値であるそれぞれ 10 mg/kg 又は 35 mg/kg/日を大幅に下回っている。さらに、重篤な過敏症反応のリスクは低いと考えられる（[SUB-017107]、[SUB-017108]）。

2.　薬効薬理

エプコリタマブで実施した非臨床薬理試験を Table 2 に示す。

Table 2　**非臨床薬理試験の概略**

Study Title	GLP	Test Facility	Report Number	Test Compound	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Generation and characterization of HuMab-CD20 7D8	No	Genmab B.V.; [redacted]	[GMB3013-028]	NA	4.2.1.1
Generation and characterization of humanized anti-CD3 antibodies	No	Genmab B.V.; [redacted]	[GMB3013-029]	NA	4.2.1.1
Evaluation of the inertness of the Fc region of DuoBody-CD3xCD20	No	Genmab B.V.	[GMB3013-045]	Epcoritamab 3005a 3001d	4.2.1.1

Study Title	GLP	Test Facility	Report Number	Test Compound	Location in CTD
Evaluation of DuoBody-CD3xCD20 target binding in vitro	No	Genmab B.V., [redacted]	[GMB3013-030]	Epcoritamab Fab fragment of 3005a DuoBody-ctrlxCD20 (variant)	4.2.1.1
Evaluation of induction of cytotoxicity by DuoBody-CD3xCD20 in vitro	No	Genmab B.V.	[GMB3013-032]	Epcoritamab 3005a	4.2.1.1
Evaluation of Cytokine Release in Whole Blood induced by DuoBody CD3xCD20 ex vivo	No	Genmab B.V.	[GMB3013-054]	Epcoritamab 3005a DuoBody-ctrlxCD20	4.2.3.7.7
In vitro comparison of epcoritamab with analogs of CD3xCD20 bispecific antibody compounds in clinical development	No	Genmab B.V.; Genmab US, Inc.; [redacted]	[GMB3013-074]	Epcoritamab, analogs of CD3xCD20 compounds of odronextamab, mosunetuzumab, glofitamab and plamotamab	4.2.1.1
Anti-tumor activity of epcoritamab in patient-derived samples ex vivo	No	[redacted]	[GMB3013-072]	Epcoritamab	4.2.1.1
Combination of epcoritamab with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (CHOP) in vitro	No	Genmab B.V.	[GMB3013-080]	Epcoritamab	4.2.1.1
Combination of epcoritamab and lenalidomide in vitro	No	Genmab B.V.	[GMB3013-082]	Epcoritamab	4.2.1.1
Evaluation of the efficacy of DuoBody-CD3xCD20 in vivo	No	Genmab B.V., [redacted]	[GMB3013-033]	Epcoritamab	4.2.1.1
Anti-tumor activity of epcoritamab in a Raji model in HIS mice in vivo	No	Genmab B.V.	[GMB3013-073]	Epcoritamab	4.2.1.1
Anti-tumor activity of epcoritamab in a patient-derived DLBCL model in vivo	No	Crown Bioscience Inc.	[GMB3013-083]	Epcoritamab	4.2.1.1
Evaluation of B-cell depletion in cynomolgus monkeys treated with DuoBody-CD3xCD20	No/ Yes	[redacted]	[GMB3013-035]	Epcoritamab	4.2.1.1
Secondary Pharmacodynamics					
Evaluation of the immunogenicity of the CD3 arm of DuoBody-CD3xCD20 in silico and in vitro	No	Genmab B.V.; [redacted]	[GMB3013-031]	(Fab fragment and V_H and V_L sequences of) 3005a	4.2.1.2
Evaluation of the immunogenicity of the Fc region of DuoBody-CD3xCD20 in silico and in vitro	No	Genmab B.V.; [redacted]	[GMB3013-055]	Fc regions of epcoritamab, 3005a, and 3001d	4.2.1.2

Study Title	GLP	Test Facility	Report Number	Test Compound	Location in CTD
Safety Pharmacology No specific studies conducted. Selected safety pharmacology parameters (electrocardiograms [ECGs]/heart rate and detailed clinical observations) were evaluated as an integral part of the pivotal toxicity study in cynomolgus monkeys (Module [2.6.6 Section 3.2]).					
Pharmacodynamic Drug Interactions Studies investigating pharmacodynamic drug interactions, relevant for epcoritamab clinical development, have not been conducted. In general, no direct interactions between therapeutic proteins and concomitant co-medications are expected.					

CD = cluster of differentiation; CHOP = cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin (doxorubicin), oncovin (vincristine), prednisone; CTD = common technical document; ctrl = control; DLBCL = diffuse large B-cell lymphoma; Fab = fragment antigen binding; Fc = fragment crystallizable; HIS = human immune system; NA = not applicable; V_H = variable region of the immunoglobulin heavy chain; V_L = variable region of the immunoglobulin light chain

2.1　効力を裏付ける試験

2.1.1　治療標的としての CD20

ヒト CD20 は、細胞膜 4 回貫通型の非グリコシル化リン酸化タンパク質であり（Riley and Sliwkowski, 2000）、膜貫通 4A 遺伝子ファミリー（membrane-spanning 4A gene family、MS4A、CD20 = MS4A1）に属する。CD20 タンパク質のアミノ末端及びカルボキシル末端はいずれも細胞質内に存在し、タンパク質のごく一部のみが細胞外に露出し、治療用抗体に接触可能である。CD20 の細胞外ドメインは、約 44 個のアミノ酸からなる大ループ及び 9 個のアミノ酸からなる小ループで構成されている。

CD20 の生理的機能は不明であり、CD20 のリガンドは同定されていない。生理機能が正常な状態では、CD20 は末梢血及びリンパ器官の B 細胞表面に発現している。CD20 はプレ B 細胞に最初に発現し、形質細胞様免疫芽細胞に至る B 細胞の成熟段階まで発現が持続する。CD20 は造血幹細胞、プロ B 細胞、形質細胞及びその他の正常組織には発現しない（Plosker and Figgitt, 2003; Tedder et al, 1985）。通常、CD20 は B 細胞にのみ発現すると考えられている（Pedersen et al, 2002）。大細胞型 B 細胞リンパ腫（large B-cell lymphoma、LBCL）を含むほとんどのヒト B 細胞性リンパ腫及び白血病で、CD20 は発現している（Anderson et al, 1984; Grillo-Lopez et al, 2002; Vose et al, 2001）。

抗 CD20 mAb による治療は、様々な B 細胞性悪性腫瘍の治療に対して十分に確立されている。抗 CD20 抗体を投与すると、悪性 B 細胞だけでなく正常 B 細胞も減少するが、一般に忍容性は良好である。CD20 は形質細胞及び造血幹細胞では発現しないため、免疫グロブリン産生は持続し、投与中止後に B 細胞は再増殖する。抗 CD20 抗体を含むレジメンによる治療歴のある患者の大多数で B 細胞表面に CD20 が存在することから、抗 CD20 抗体に対する耐性は、ほとんどの場合、CD20 発現の消失によるものではないと考えられる（Gisselbrecht et al, 2010）。

化学療法と抗 CD20 抗体の併用により B 細胞性悪性腫瘍患者の転帰は改善したが、多くの患者で疾患の再発が認められていることから、新たな有効な治療法が医療で必要とされている。

2.1.2　エプコリタマブの作製及び選択

ヒト化抗 CD3ε 親 mAb（IgG1-CD3）は、ヒト及びカニクイザルの CD3ε を認識するマウス抗体 SP34（Pessano et al, 1985; Salmeron et al, 1991）のキメラ型から、生殖細胞系列ヒト化ゲノム編集技術［相補性決定領域（complementarity-determining region、CDR）のグラフィティング、マウス主要フレームワーク配列のリテンション及び復帰突然変異工程］を用いて作製した（[GMB3013-029]）。結晶構造解析により、ヒト化工程中に導入された変異部位が IgG1-CD3 と CD3ε ペプチドとの相互作用部位と空間的に離れていることが示され、CD3ε との相互作用アミノ酸残基がヒト化工程で保存されたことが示された。ヒト型抗 CD20 親 mAb IgG1-7D8（IgG1-CD20）は、KM®マウスに CD20 遺伝子を導入した NS/0 細胞を免疫して作製した抗ヒト CD20 抗体パネルから選択した（Teeling et al, 2004）（[GMB3013-028]）。KM®マウスは、完全ヒト型免疫グロブリン分子を発現する遺伝子改変マウスである（Ishida et al, 2002）。

抗 CD3 抗体及び抗 CD20 抗体の可変ドメイン配列は、DuoBody 分子の作製に必要な重鎖定常領域（constant domain of heavy chain、CH）3 ドメインの相補的変異（それぞれ F405L 及び K409R）を含むヒト IgG1λ 及び IgG1κ 骨格にそれぞれ遺伝子組換え技術を用いて導入した。親 mAb の Fc ドメインに 3 つの追加変異（L234F、L235E 及び D265A すなわち FEA、不活性化変異）を導入し、IgG Fc 受容体（IgG Fc receptor、FcγR）及び補体成分 C1q（complement component 1q、C1q）と結合しないが、胎児性 Fc 受容体（neonatal Fc receptor、FcRn）との結合を保持した不活性化 Fc ドメインを作製した（[GMB3013-045]）。これらの結果、親 mAb である IgG1-CD3-FEAL（3005a）及び IgG1-CD20-FEAR（3001d）を得た。CD3 及び CD20 結合性の bsAb であるエプコリタマブは、F405L 及び K409R 変異を有する mAb の制御された Fab アーム交換に基づく DuoBody®技術（Labrijn et al, 2013; Labrijn et al, 2014）により親抗体から作製された。エプコリタマブの分子構造及び生化学的特性は、標準型 IgG1 と同様である。

2.1.3　標的結合特性

エプコリタマブは、CD3 発現細胞に濃度依存的に結合し、フローサイトメトリー法での 50% 効果濃度（50% effective concentration、EC_{50}）値（見かけの親和性）は 0.71 μg/mL（4.73 nmol/L）であった。可溶性 CD3ε に対する親和性（解離定数、K_D）は 12.5 nmol/L であった。エプコリタマブは CD20 発現細胞に濃度依存的に結合し、フローサイトメトリー法での EC_{50} 値は 1.56 μg/mL（10.40 nmol/L）であった。可溶性 CD20 を用いた親和性解析は技術的に不可能なため、代わりに水晶振動子マイクロバランス（quartz crystal microbalance、QCM）技術を用いて評価した。エプコリタマブの CD20 に対する一価結合を解析するためにエプコリタマブのバリアントとして使用した DuoBody-ctrlxCD20（CD20 結合性 Fab アーム及び非結合性 Fab アームで構成される二重特異性 IgG1 分子）は、CD20 発現細胞に 5.4 nmol/L の K_D 値で結合した。全血検体を用いたフローサイトメトリー法による評価では、エプコリタマブは、CD3 発現 T 細胞（CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞）及び CD20 発現 B 細胞に同時に結合した（[GMB3013-030]）。

2.1.4　エプコリタマブの Fc ドメインの機能特性

エプコリタマブでは FEA 不活性化変異を Fc ドメインに導入し、Fc ドメインを介した FcγR 発現細胞及び補体との相互作用によるエフェクター機能を抑制した。In vitro 試験で、エプコリタマブは、ヒト FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb 及び FcγRIIIa に結合しないことが示された。したがって、エプコリタマブは、抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity、ADCC）及び抗体依存性細胞貪食（antibody-dependent cell-mediated phagocytosis、ADCP）などの FcγR を介したエフェクター機能を誘導できないと考えられる。In vitro 試験で、エプコリタマブは補体活性化の古典的経路の最初の成分である C1q にわずかしか結合しないため、補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity、CDC）誘導活性は著しく抑制され、臨床的に意義のある濃度（1~10 μg/mL）で CD20 陽性細胞に対する CDC の誘導はわずかであった。IgG1 分子の血漿クリアランスの重要な決定因子である FcRn に対するエプコリタマブの結合は、野生型 IgG1 と同程度であった（[GMB3013-045]）。これは、無癌マウスでのエプコリタマブの血漿クリアランスが標的結合活性のない IgG1 対照抗体と類似したことからも支持された（[GMB3013-033]）。

活性型 Fc ドメインを有する抗 CD3 抗体は、FcγR 発現白血球と相互作用し、抗体による CD3 の架橋により、T 細胞の活性化、増殖及び細胞傷害作用を誘導する可能性がある。エプコリタマブの不活性化変異は、CD20 発現細胞の非存在下でのエプコリタマブの T 細胞への結合による抗体媒介性の FcγR を介した CD3 の架橋形成を抑制し、エプリコタマブによる T 細胞媒介性細胞傷害及び関連する T 細胞の活性化には CD20 が不可欠であることを確実にするために導入した。抗 CD3 親 mAb である IgG1-CD3-FEAL（3005a）を用いて、抗体媒介性の FcγR を介した CD3 架橋形成が抑制されたことを確認した。IgG1-CD3-FEAL（3005a）は in vitro で、標的細胞存在下又は非存在下のいずれでも、T 細胞の活性化、増殖及び T 細胞媒介性細胞傷害作用を誘導しなかった（[GMB3013-032]）。さらに、IgG1-CD3-FEAL（3005a）は、全血でサイトカイン放出を誘導しなかった（[GMB3013-054]及び[2.6.6-8.4 項]）。エプコリタマブによる腫瘍細胞死誘導に対する標的特異性は、CD20 発現及び野生型 SK-BR-3 細胞を用いて確認した（[GMB3013-032]）。

2.1.5　エプコリタマブの作用機序の in vitro 評価

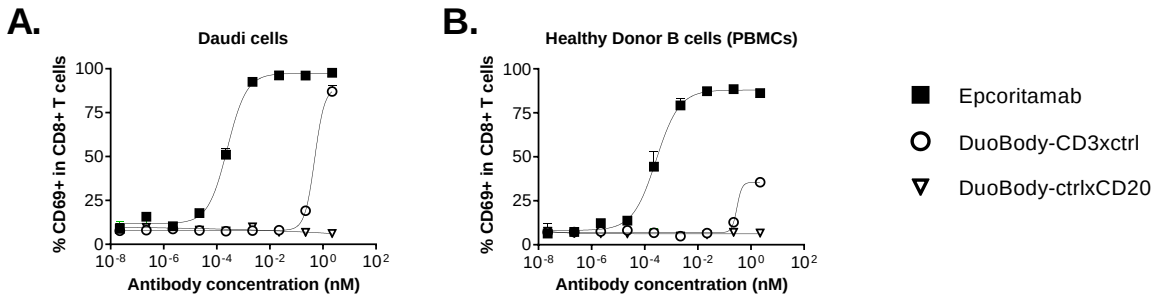
2.1.5.1　エプコリタマブによる in vitro での T 細胞の活性化

CD20 発現標的細胞の存在下でエプコリタマブによる T 細胞活性化誘導活性を、in vitro で 2 種類のアッセイを用いて評価した（[GMB3013-032]）。Jurkat NFAT レポーターアッセイでは、Jurkat T 細胞の活性化を、T 細胞受容体（T-cell receptor、TCR）-CD3 複合体のシグナル伝達経路下流の転写因子である活性化 T 細胞核因子（nuclear factor of activated T cells、NFAT）の活性化量を測定することにより評価した。フローサイトメトリーアッセイでは、新鮮分離ヒト末梢血 T 細胞の活性化を、細胞表面の活性化マーカーCD69、CD25 及びプログラム細胞死-1（programmed cell death protein 1、PD-1）の発現量の増加を測定することにより評価した。標的細胞として、健康ヒト由来の B 細胞及び 4 種類の異なる B 細胞性リンパ腫型［MCL、活性化 B 細胞性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma、ABC-DLBCL）、胚中心 B 細胞型 DLBCL（germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma、GCB-DLBCL）、バーキッ

トリンパ腫（Burkitt lymphoma、BL）］の多様な種類の CD20 発現リンパ腫細胞株を評価した。これらのリンパ腫細胞の CD20 発現量は、細胞あたり 33000~350000 分子の変動幅を示した。

CD20 発現細胞の存在下で、エプコリタマブは、Jurkat 細胞の NFAT 活性化量、並びに活性化した CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の割合［CD69（Figure 1）、CD25 及び PD-1 の発現量の増加を測定］を濃度依存的に増加させた。CD3 結合アームを非結合性対照アームに置き換えると（DuoBody-ctrlxCD20）、T 細胞活性化マーカーの発現量の増加は全く認められず、エプコリタマブの CD20 結合アームを非結合性対照アームに置き換えると（DuoBody-CD3xctrl）、T 細胞活性化マーカーの増加は著しく抑制され、T 細胞の活性化にはエプコリタマブが CD3 及び CD20 の両方への同時結合が必要であることが示された。また、抗 CD3 親 mAb である IgG1-CD3-FEAL（3005a）は、T 細胞の活性化を誘導しなかった（[GMB3013-045]）。Daudi 細胞又は健康ヒト由来の B 細胞の存在下でエプコリタマブの T 細胞の活性化の誘導に対する EC_{50} 値の概要を Table 3 に示す。他の CD20 発現細胞株を用いたエプコリタマブの T 細胞活性化に対する EC_{50} 値も、同程度であった（[GMB3013-032]）。

Figure 1　エプコリタマブによる CD8 陽性 T 細胞の活性化



CD = cluster of differentiation; ctrl = control (non-binding arm); E:T = effector cell to target cell; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; SEM = standard error of the mean

A: Primary human T cells were incubated with Daudi cells (E:T ratio 2:1) and the indicated antibodies for 48 h. The percentage of CD69-positive CD8+ T cells was determined. Data shown are mean ± SEM of duplicate wells from one representative experiment out of ten performed. **B**: PBMCs were incubated with the indicated antibodies for 72 h. The percentage of CD69-positive CD8+ T cells was determined. Data shown are mean ± SEM of duplicate well from one representative experiment out of five (CD8+) performed. DuoBody CD3xctrl and DuoBody-ctrlxCD20 lack a CD20- or CD3-specific arm, respectively. Source: [GMB3013-032]

Table 3　エプコリタマブの T 細胞活性化特性

T-cell Activation Measure	Effector Cells	Daudi Cells				Healthy Donor B Cells			
		E:T Ratio	EC_{50} [SD] in pg/mL	EC_{50} [SD] in pmol/L	n Tests/Donors	E:T Ratio	EC_{50} [SD] in pg/mL	EC_{50} [SD] in pmol/L	n Tests/ Donors
NFAT activation	Jurkat cells	3:4	14 [8]	0.093 [0.053]	2	NA	NA	NA	NA
CD69 expression	$CD4^+$ T cells	2:1	11 [20]	0.073 [0.133]	10	~5:1	114 [133]	0.760 [0.887]	6
	$CD8^+$ T cells	2:1	25 [20]	0.167 [0.133]	10	~5:1	146 [161]	0.973 [1.073]	5
CD25 expression	$CD4^+$ T cells	2:1	21 [24]	0.140 [0.160]	11	~5:1	241 [93]	1.607 [0.620]	4
	$CD8^+$ T cells	2:1	76 [65]	0.507 [0.433]	11	~5:1	487 [266]	3.247 [1.773]	4
PD-1 expression	$CD4^+$ T cells	2:1	68 [70]	0.453 [0.467]	10	~5:1	228 [102]	1.520 [0.680]	4
	$CD8^+$ T cells	2:1	360 [264]	2.400 [1.760]	10	~5:1	376 [186]	2.507 [1.240]	4

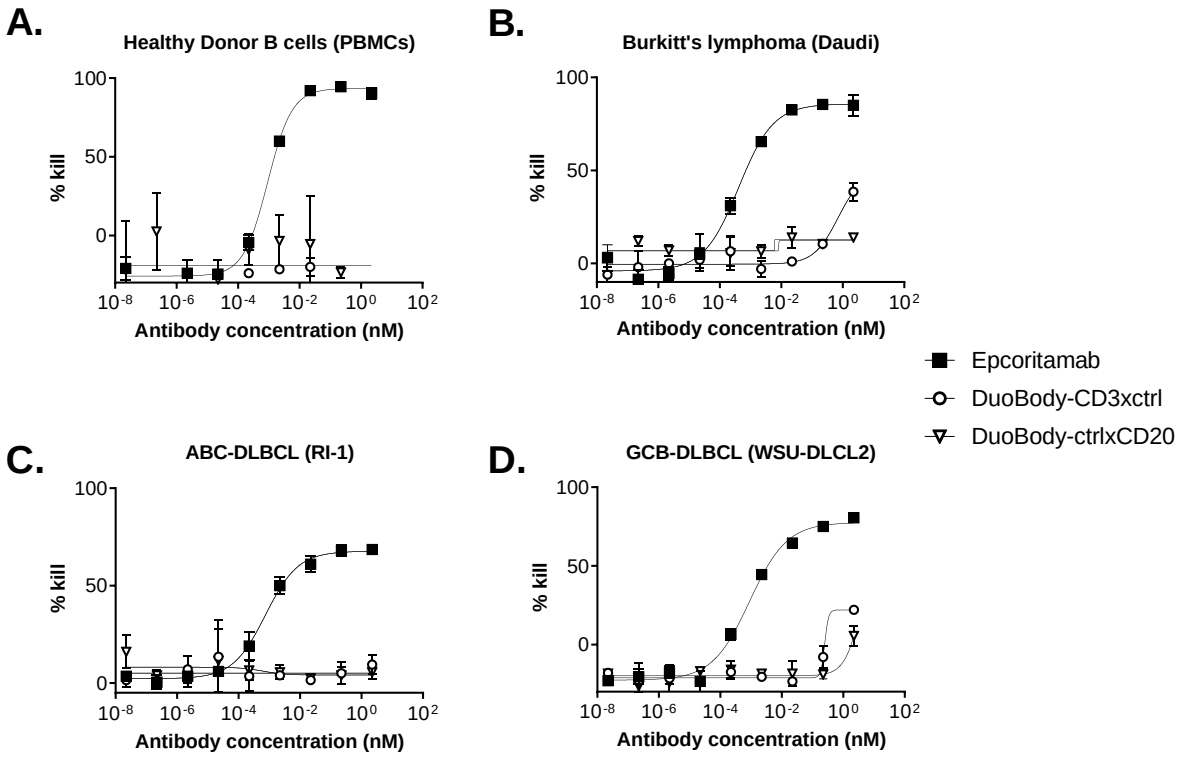
CD = cluster of differentiation; EC_{50}: 50% effective concentration; E:T = effector cell to target cell; NA = not applicable; NFAT = nuclear factor of activated T cells; PD-1 = programmed cell death protein 1; SD = standard deviation. Source: [GMB3013-032]

2.1.5.2　エプコリタマブによる in vitro での T 細胞媒介性細胞傷害作用

エプコリタマブによる CD20 発現標的細胞の死滅誘導活性を、2 種類のアッセイを用いて評価した。クロム（^{51}Cr）放出アッセイでは、^{51}Cr 標識標的細胞を T 細胞の存在下で 24 時間エプコリタマブとインキュベートした後、標的細胞からの放射性漏出量を測定して標的細胞の死滅を評価した。フローサイトメトリー法では、T 細胞及びエプコリタマブと 48 時間インキュベートした後、フローサイトメトリー法により無傷の標的細胞数を定量して細胞傷害活性を評価した（[GMB3013-032]）。

いずれのアッセイでも、エプコリタマブは、濃度依存的に CD20 発現標的細胞に対して T 細胞媒介性の死滅を誘導した。CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の両方が細胞傷害活性を示した。CD8 陽性 T 細胞媒介性細胞傷害作用は、CD4 陽性 T 細胞媒介性細胞傷害作用よりも迅速であった。エプコリタマブは、BL、MCL、ABC-DLBCL 及び GCB-DLBCL 由来の CD20 発現細胞株、並びに健康ヒト由来の B 細胞に対して死滅誘導活性を示した（Figure 2、MCL の試験結果は不掲載）。CD20 若しくは CD3 結合アームのいずれかを非結合性対照アームに置き換えた二重特異性対照抗体の存在下、又は抗 CD3 親 mAb である IgG1-CD3-FEAL（3005a）の存在下で CD20 発現細胞及び T 細胞をインキュベートしたとき、細胞傷害活性が認められなかったことから、エプコリタマブによる細胞傷害作用には CD3 及び CD20 の両方に同時結合する必要があることが示された。エプコリタマブによる B 細胞性リンパ腫細胞株及び健康ヒト由来の B 細胞の死滅誘導活性に対する EC_{50} 値は、概して、ピコモル未満~低ピコモルの範囲であり（EC_{50} = 0.2~5.0 pmol/L、Daudi 及び健康ヒト由来の B 細胞に対する概要を Table 4 に示す）、細胞表面の CD20 分子数とは相関しなかった。

Figure 2　エプコリタマブによる T 細胞媒介性細胞傷害作用



Ab = antibody; ABC-DLBCL = activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma; CD = cluster of differentiation; ctrl = control (non-binding arm); E:T = effector cell to target cell; FSC = forward scatter; GCB-DLBCL = germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; SEM = standard error of the mean; SSC = side scatter

A: PBMCs were incubated with the indicated Abs and harvested after 72 h, after which the percentage of remaining CD4-CD8-CD19+ B cells with normal FSC/SSC was determined by flow cytometry. Data shown are mean ± SEM of duplicates of one representative experiment out of five performed. **B**-**D**: CD20 expressing Daudi (**B**), RI-1 (**C**), WSU-DLCL2 (**D**) cells were incubated with isolated T cells (E:T ratio 2:1) and the indicated Abs. After 48 h, cells were harvested and percentages of remaining intact target cells (CD4-CD8-, with normal FSC/SSC) were determined by flow cytometry. Data shown are mean ± SEM of duplicates of one representative experiment out of 11, 6, and 4 performed, respectively. Results are presented as '% kill' (% kill = 100 – % survival, where % survival = [counts given well/counts control well] × 100%).
Source: [GMB3013-032]

Table 4　Daudi 細胞及び健康ヒト由来の B 細胞に対するエプコリタマブによる T 細胞媒介性細胞傷害作用の特性

Cytotoxicity Assay	Effector Cells	Daudi Cells				Healthy Donor B Cells			
		E:T Ratio	EC_{50} [SD] in pg/mL	EC_{50} [SD] in pmol/L	n Donors	E:T Ratio	EC_{50} [SD] in pg/mL	EC_{50} [SD] in pmol/L	n Donors
^{51}Cr release	T cells	10:1	634 [1,165]	4.227 [7.769]	20	NA	NA	NA	NA
	CD4+ T cells	10:1	638 [604]	4.251 [4.029]	6	NA	NA	NA	NA
	CD8+ T cells	10:1	126 [119]	0.841 [0.792]	5	NA	NA	NA	NA
Flow cytometry	T cells	2:1	39 [22]	0.260 [0.147]	11	~5:1	474 [761]	3.160 [5.073]	5

CD = cluster of differentiation; Cr = chromium; EC_{50} = 50% effective concentration; E:T = effector cell to target cell; NA = not applicable; SD = standard deviation. Source: [GMB3013-032]

フローサイトメトリー法で測定したエプコリタマブによるT細胞媒介性細胞傷害作用に対するEC_{50}値は、T細胞活性化のEC_{50}値と同程度であった（Table 3、Table 4）。なお、細胞表面のCD20の50%に結合するためには、より高濃度のエプコリタマブが必要であった（2.1.3項）（[GMB3013-032]）。以上より、エプコリタマブが低い標的占有率で強力な細胞傷害作用を誘導する可能性が示唆された。

2.1.5.3　エプコリタマブと臨床開発中のCD3xCD20 bsAb類似化合物との比較

B細胞の存在下で、エプコリタマブによるT細胞媒介性細胞傷害活性及び関連するT細胞活性化を、臨床で現在評価中の4種類のCD3xCD20 bsAb類似化合物（mosunetuzumab、glofitamab、odronextamab及びplamotamabの類似化合物）と比較した（[GMB3013-074]、Engelberts et al, 2020）。エプコリタマブ及びこれらの類似化合物は、フローサイトメトリー法によるT細胞の活性化アッセイ及び細胞傷害アッセイで評価した（2.1.5.1項及び2.1.5.2項参照）。エプコリタマブは、CD3及びCD20結合ドメインを1つ有する3種類のIgG1-類似bsAb（mosunetuzumab、odronextamab及びplamotamab類似化合物）よりT細胞活性化及びT細胞媒介性細胞傷害作用の両方に対して有意に強力な誘導活性を示し、1つのCD3及び2つのCD20結合ドメインを有するbsAb（glofitamab類似化合物）と同程度のT細胞活性化及びT細胞媒介性細胞傷害作用の誘導を示した。

2.1.5.4　患者由来検体を用いたエプコリタマブのex vivoでの抗腫瘍活性

B細胞性非ホジキンリンパ腫（B-cell non-Hodgkin lymphoma、B-NHL）患者由来腫瘍細胞のエプコリタマブによる細胞傷害作用に対する固有感受性及び患者由来T細胞のエプコリタマブ存在下での細胞死誘導活性を、B-NHL患者のリンパ節生検由来の単細胞懸濁液を用いてex vivoで評価した（[GMB3013-072]、van der Horst et al, 2021）。リンパ節細胞を同種健康ヒト由来のPBMCの非存在下又は存在下でエプコリタマブとインキュベートし、エプコリタマブによる細胞傷害作用に対する腫瘍細胞の感受性を評価した。細胞傷害活性は、24時間インキュベート後にフローサイトメトリー法で測定した（7-アミノアクチノマイシンD生存率染色）。

エプコリタマブは、ex vivoで、DLBCL、FL及びMCL患者由来の腫瘍細胞に対して健康ヒト由来のT細胞媒介性の細胞傷害作用の誘導活性を示した。腫瘍細胞死誘導活性は、新規診断（newly diagnosed、ND）患者及び再発又は難治性（relapsed or refractory、RR）患者由来検体で同程度であった。さらに、抗CD20 mAbを含む治療法に反応しなくなった患者から採取した腫瘍細胞に対しても、エプコリタマブは、細胞死誘導活性を示した。これらの試験結果は、患者由来の腫瘍細胞がエプコリタマブによるT細胞媒介性細胞傷害作用に感受性であることを示している。同種T細胞を添加しなかった試験では、B-NHL患者から採取したリンパ節生検中のT細胞数が細胞傷害活性と相関したことから、患者由来T細胞は機能的にエプコリタマブによる細胞傷害作用を媒介できることが示された。T細胞数が少ない検体があったが、このアッセイでは患者で発生する可能性のある末梢血T細胞の腫瘍への動員が考慮されていなかった。

2.1.6　In vivo でのエプコリタマブの CD20 発現細胞除去活性

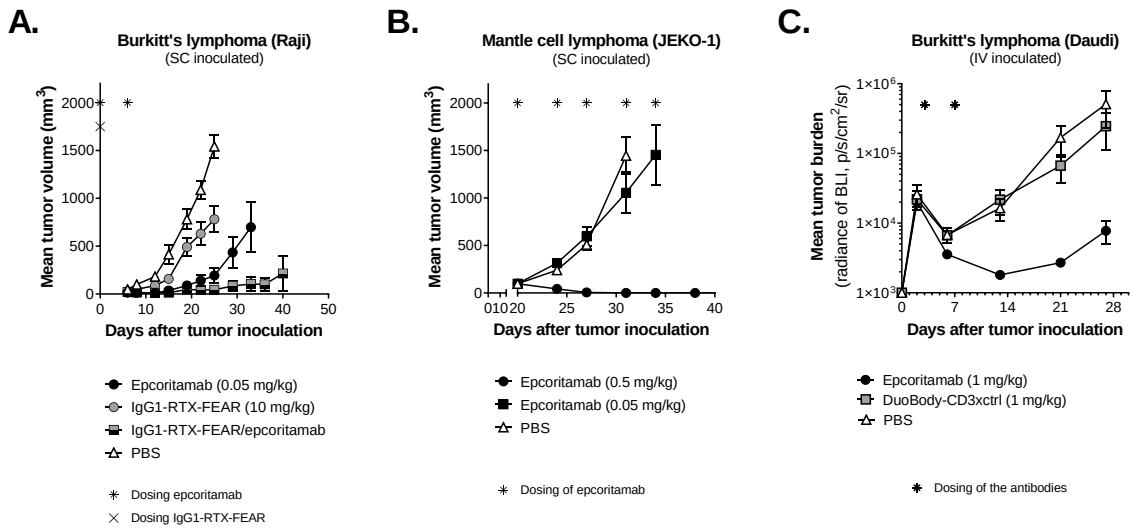
2.1.6.1　ヒト化マウス異種移植モデルでのエプコリタマブの抗腫瘍活性

エプコリタマブの in vivo での抗腫瘍活性を、異なるヒト化マウスを用いて、3 種類の異なる B 細胞性リンパ腫（Daudi、Raji 及び JEKO-1 MCL 細胞）CDX モデル及び 1 種類の DLBCL-PDX モデルで評価した（[GMB3013-033]、[GMB3013-073]及び[GMB3013-083]）。これらの試験では、エプコリタマブは静脈内投与した。

エプコリタマブは、すべての CDX モデルで、0.005~5 mg/kg の用量範囲で抗腫瘍活性を示した。最初のモデルでは、ヒト T 細胞の供給源である未刺激ヒト PBMC 及びバーキットリンパ腫 Raji 細胞の 1:1 混合浮遊液を免疫不全マウスの皮下に共移植した。エプコリタマブは、Raji 細胞異種移植片の腫瘍増殖を抑制した（Figure 3A）。2 番目のモデルでは、免疫不全マウスに JEKO-1 MCL 細胞マトリゲル浮遊液を皮下移植し、腫瘍が定着した後（平均腫瘍体積 100 mm^3）に投与を開始した。このモデルでは、エプコリタマブの治療的投与により腫瘍退縮が誘導された（Figure 3B）。3 番目のモデルでは、ヒト免疫系を有するマウス［BALB/c *Rag2*^{tm1Fwa} *IL-2Rγc*^{tm1Cgn} *SIRPα*^{NOD}（BRGS）-HIS マウス］にバーキットリンパ腫 Daudi 細胞を静脈内注入、又はバーキットリンパ腫 Raji 細胞を皮下移植した。エプコリタマブは、Daudi 細胞及び Raji 細胞の両方の異種移植片の腫瘍増殖に対して抑制活性を示した（Figure 3C は Daudi 細胞の結果を示す）。DuoBody-CD3xctrl（CD20 結合アームがない）は腫瘍増殖を抑制しなかった（Figure 3C）。Raji 細胞を異種移植した NOD.*Cg-Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ（NSG）-HIS マウスでは、高腫瘍組織量（約 500 mm^3）で投与を開始した場合でも、エプコリタマブは、著しい抗腫瘍活性効果を示した（Figure 4A）。BRGS-（データ不掲載）及び NSG-HIS マウスでは、エプコリタマブは循環血液中のヒト B 細胞数の有意な減少を誘導し（Figure 4B）、循環血液中のヒト CD4 陽性 T 細胞（Figure 4C）及び CD8 陽性 T 細胞（Figure 4D）の活性化を誘導したが、DuoBody-CD3xctrl はいずれに対しても活性化を誘導しなかった。DLBCL-PDX モデル（LY2214）では、エプコリタマブは 5 mg/kg の用量で腫瘍増殖の抑制活性を示したが、検討されたそれより低い用量では抑制は認められなかった。

また、エプコリタマブは、検討された用量で、特許出願の配列で作製し Fc ドメインを介したエフェクター機能を最小限に抑えるための不活性化 Fc ドメイン及び K409R（DuoBody®）変異を遺伝子操作により導入したリツキシマブ［rituximab with an inert Fc domain and K409R (DuoBody®) mutation、IgG1-RTX-FEAR、Figure 3A］類似化合物を前投与したマウスで、腫瘍増殖の抑制活性を示した。以上より、エプコリタマブは、標的結合を競合する抗 CD20 抗体が循環血液中に存在しても抗腫瘍活性を誘導できることが示された。

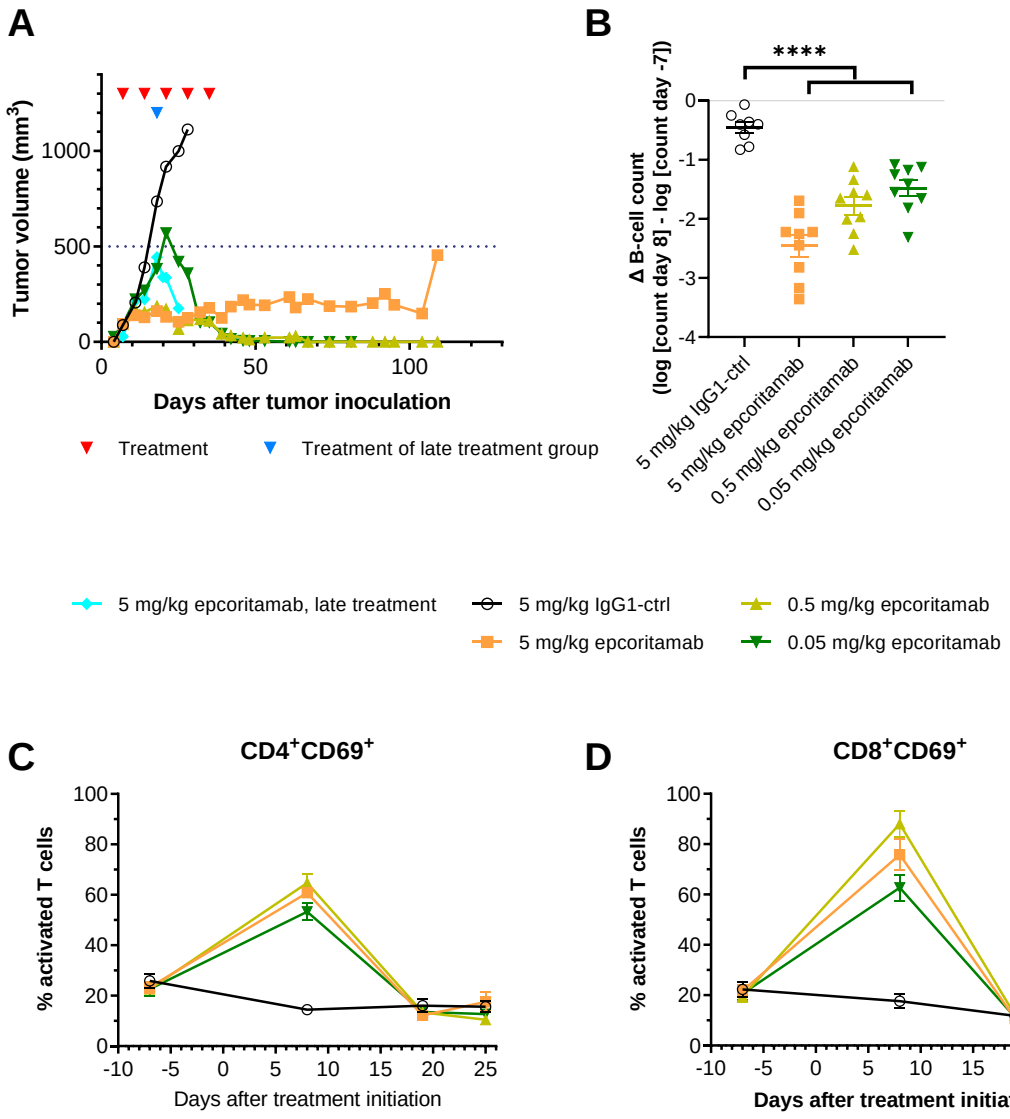
Figure 3　エプコリタマブによる腫瘍増殖の阻害



BLI = bioluminescence imaging; CD = cluster of differentiation; ctrl = control (non-binding arm); FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody® mutations; HIS = human immune system; Ig = immunoglobulin; IV = intravenously; NOD-SCID = mouse strain with severe combined immunodeficiency (SCID) crossed onto non-obese diabetic (NOD) background; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; PBS = phosphate-buffered saline; SC = subcutaneously; SEM = standard error of the mean

A: NOD-SCID mice were injected SC with a 1:1 mixture of CD20-expressing Raji-luc tumor cells and PBMCs. At the same day they were treated IV with PBS or a rituximab variant with an inert Fc domain and K409R (DuoBody®) mutation (IgG1-RTX-FEAR, 10 mg/kg), followed by epcoritamab (0.05 mg/kg) or not after 4 hours. Epcoritamab (0.05 mg/kg) treatment was repeated at Day 6. **B**: Triple immunodeficient mice were inoculated SC with 5×10^6 CD20-expressing JEKO-1 MCL cells, followed by human PBMCs on Day 3. When tumors reached a volume of ~100 mm^3, mice were treated with 0.05 or 0.5 mg/kg epcoritamab, at Days 20, 24, 27, 31, and 34. **C**: BRGS-HIS mice were inoculated IV with 5×10^6 CD20-expressing Daudi-luc cells and treated with 1 mg/kg epcoritamab (or DuoBody-CD3xctrl) at Days 3 and 7. Data shown are mean tumor volumes or burden ± SEM per group (**A** [n = 10], **B** [n = 10], **C** [n = 7]). Source: [GMB3013-033]

Figure 4　HIS マウスを用いた皮下 Raji モデルでのエプコリタマブの効果



CD = cluster of differentiation; HIS = human immune system; Ig = immunoglobulin; IV = intravenously; SC = subcutaneously; SEM = standard error of the mean

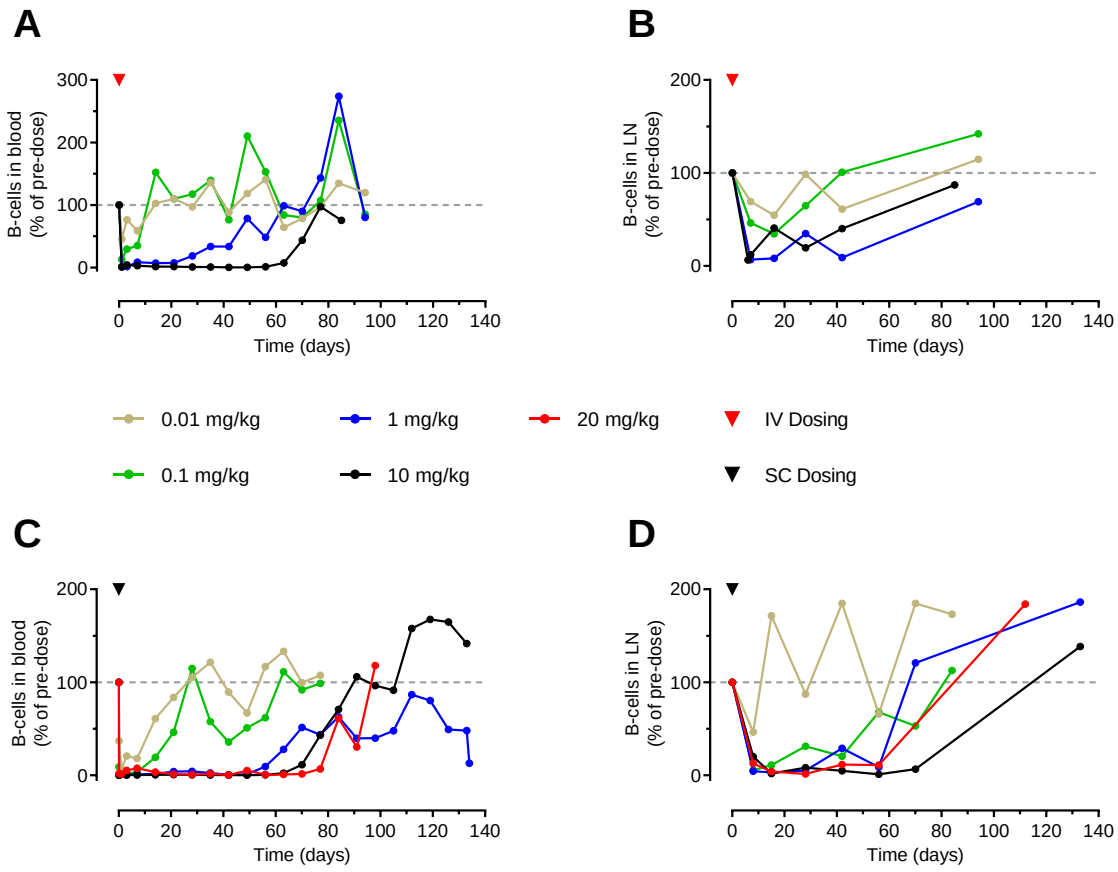
Tumors were established in NSG-HIS mice by SC injection of Raji-luc cells at Day 0. Mice were treated IV with 0.05, 0.5, or 5 mg/kg Ab on Days 7, 14, 21, 28, and 35. **A**: Median tumor volumes per treatment group (n = 9). **B**: Difference of log-transformed B-cell counts on Day −7 and Day 8 (Δ B-cell count). A Mann Whitney test was used to compare the Δ B-cell counts. **** P<0.0001. **C**: Percentages of CD69+ cells within the human CD45+CD4+ (hCD45+hCD4+hCD8-) T-cell populations in blood samples at the indicated time points, as determined by flow cytometry. Data shown are mean ± SEM. **D**: Percentages of CD69+ cells within the human CD45+CD8+ (hCD45+hCD4-hCD8+) T-cell populations in blood samples at the indicated time points, as determined by flow cytometry. Data shown are mean ± SEM. Source: [GMB3013-073]

2.1.6.2　エプコリタマブによるカニクイザルでの B 細胞数減少作用

エプコリタマブはヒト及びカニクイザルで CD3 及び CD20 に対して同程度の結合活性を示し、in vitro 試験でカニクイザルの細胞に薬理活性を示すが、評価した他の非臨床動物種の CD3 及び CD20 の両方と交差反応しない。これらの結果に基づき、エプコリタマブに関連する非臨床安全性評価に適した動物種としてカニクイザルを選択した（4 項、[GMB3013-034]）。CD20 発現

細胞を減少させるエプコリタマブの非臨床薬理活性の指標として、毒性試験で末梢血及びリンパ器官の B 細胞数減少を評価した。エプコリタマブの単回皮下投与又は静脈内投与では、末梢血（Figure 5A 及び C）及びリンパ節（Figure 5B 及び D）B 細胞数の用量依存的な減少が認められ、これは皮下及び静脈内投与後で同程度であった。B 細胞数の減少は可逆的で、回復までの期間は用量に関連した（Figure 5 及び Figure 6）。

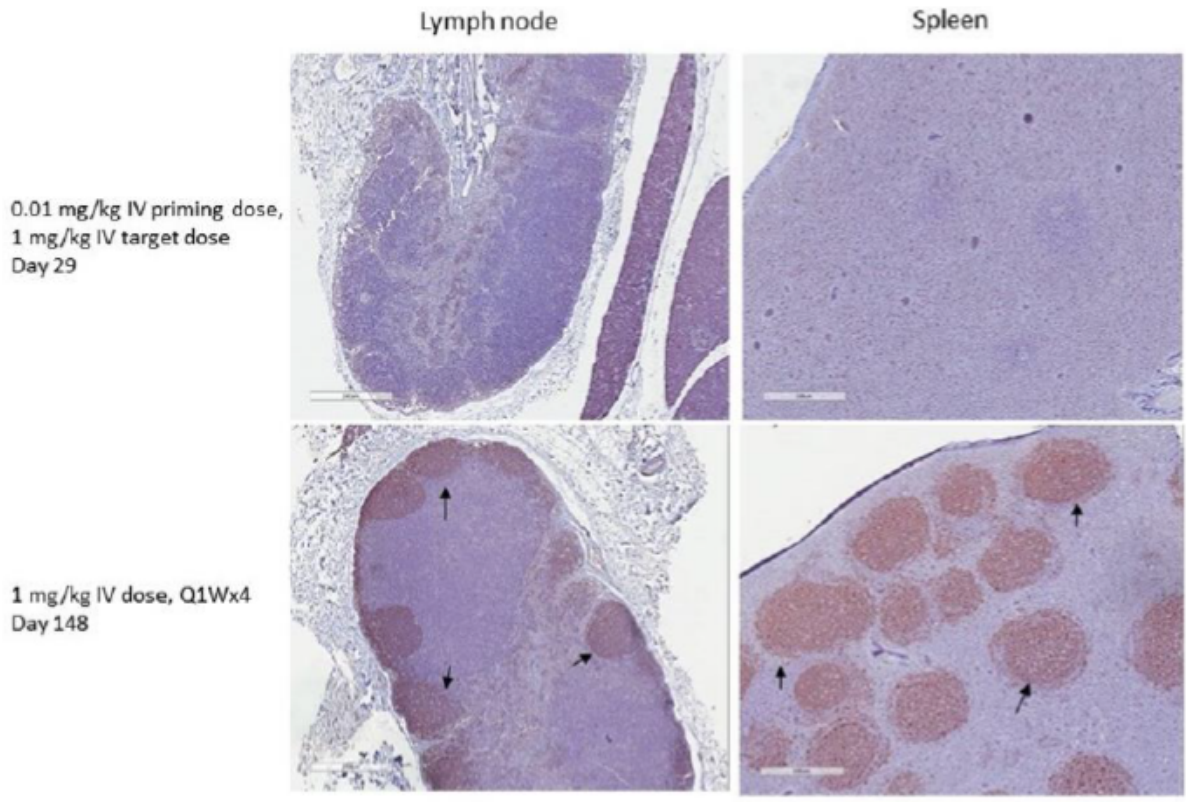
Figure 5　エプコリタマブの静脈内及び皮下投与後のカニクイザル末梢血及びリンパ節 B 細胞数



CD = cluster of differentiation; IV = intravenous; LN = lymph node; SC = subcutaneous

B-cell counts (CD19+ cells) were calculated per monkey (n = 2 per dose group) as a percentage of the B-cell counts prior to dosing. Each line represents two animals. B-cell counts in peripheral blood (**A**, **C**) and lymph nodes (**B**, **D**) were measured by flow cytometry and are shown for the indicated dose levels of a single IV (**A**, **B**) or SC (**C**, **D**) administration of epcoritamab. Source: [GMB3013-035]

Figure 6　エプコリタマブの静脈内投与後のカニクイザル脾臓及びリンパ節 B 細胞数減少及び回復



CD = cluster of differentiation; IV = intravenous; Q1W × 4 = once weekly for four weeks

Upper panels: cynomolgus monkey #4502 (group 4, as described in Module [2.6.6 Section 3.1] and [[redacted] 501775]) was treated with epcoritamab as a 0.01 mg/kg priming dose at Day 1 and a 1 mg/kg target dose at Day 2. The animal was euthanized on Day 29 (as per protocol). Lower panels: cynomolgus monkey #3502 (group 3, as described in Module [2.6.6 Section 3.1] and [[redacted] 501775]) was treated with once weekly for four weeks (Q1W × 4) 1 mg/kg doses of epcoritamab. The animal was euthanized on Day 148, after B cell recovery could be measured in peripheral blood (as per protocol). Frozen sections of lymph node and spleen were stained using a CD19 specific mAb to detect B cells (brown staining; some B-cell follicles are indicated with arrows for illustration). Hematoxylin was used to detect cell nuclei (blue staining). Source: [GMB3013-035]

2.2　副次的薬理試験

エプコリタマブの CD3 結合アームの可変領域（[GMB3013-031]）及び Fc ドメイン（不活性化変異及び DuoBody 変異を含む）（[GMB3013-055]）の免疫原性を in silico 及び in vitro 試験で予測した。CD20 結合アームは完全ヒト型であるため、このアームの可変領域の免疫原性試験は実施しなかった。臨床での重大な免疫原性リスクに関連するタンパク質治療薬は、この in vitro 免疫原性アッセイでドナーの 10%以上に応答を誘発することが知られている。IgG1-CD3-FEAL（3005a）の Fab 及び Fc ドメインは、ドナーのそれぞれわずか 2%及び 6%に応答を誘導した。

以上より、in silico 予測及び in vitro 試験に基づいて、エプコリタマブの免疫原性は低く、他の非免疫原性治療用 mAb の範囲内であると予測された。これは、ADA の発現率が低いことを示す臨床データと一致しており、エプコリタマブの免疫原性リスクは低いことが示唆された。

2.3　安全性薬理試験

エプコリタマブは特定の受容体を標的とするバイオテクノロジー応用医薬品であり、進行性疾患の治療薬として開発しており、ICH S6（R1）、S7A 及び S9 に従い、エプコリタマブに関する安全性薬理に特化した試験は実施していない。代わりに、主要な毒性試験の一環として、特定の安全性薬理パラメーター（投与後の心電図、心拍数及び詳細な一般状態観察）をカニクイザルで評価した（[2.6.6-3.2 項]）。安全性薬理の観点から、有害な作用の可能性に関して懸念となる要因は特定されなかった。

2.4　薬力学的薬物相互作用試験

エプコリタマブの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。一般に、タンパク質治療薬と併用薬との直接的な相互作用はないと予想される。

3.　薬物動態

エプコリタマブで実施した非臨床薬物動態試験を Table 5 に示す。

Table 5　**非臨床薬物動態試験の概略**

Study Title (Toxicology study)	GLP	Test Facility	Report Number	Test Compound	Location in CTD
Absorption – Single Dose					
BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR and [redacted]: A Single Dose Toxicity Study by Intravenous Injection in Cynomolgus Monkeys[a]	No	[redacted], UK	[[redacted] 529668 Appendix 4, 5]	Epcoritamab	4.2.3.1
Absorption – Repeat Dose					
A Dose Range Finding Study of BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Recovery Period	No	[redacted], UK	[[redacted] 501775 Appendix 14, 15, 16]	Epcoritamab	4.2.3.2
A 5-Week Toxicity Study of GEN3013 by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Bioavailability, Local Tolerance, and a 6-Week Recovery Period	Yes	[redacted], UK	[[redacted] 503484 Appendix 15, 16, 17]	Epcoritamab	4.2.3.2
Other Pharmacokinetic Studies No specific studies conducted					

Study Title (Toxicology study)	GLP	Test Facility	Report Number	Test Compound	Location in CTD
Distribution No specific studies conducted					
Metabolism No specific studies conducted					
Excretion No specific studies conducted					
Pharmacokinetic Drug Interaction No specific studies conducted					

CACAO = cross-reactive anti-CD3 antibody one; FEAL = L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody® mutations; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody® mutations; huCACAO = humanized cross-reactive anti-CD3 antibody one; IgG = immunoglobulin G

a [redacted] included in the single-dose study but is not reported here.

3.1　分析法の妥当性

様々な非臨床毒性試験／薬物動態試験で、カニクイザル血漿中エプコリタマブ濃度の測定には異なる 3 種類の分析法、すなわち一般的なヒト IgG PK 用電気化学発光免疫測定（electrochemiluminescence immunoassay、ECLIA）法、Imperacer®法及び 1 分子カウント（single molecule counting、SMC）法を使用した。カニクイザル血漿試料中のエプコリタマブに対する ADA は、IgG 及び免疫グロブリン M（immunoglobulin M、IgM）に対するスクリーニング試験に ECLIA 法又はブリッジング ECLIA 法を用いて測定した。ブリッジング ECLIA は、抗体確認試験及び抗体価測定試験にも用いた。

3.2　カニクイザルを用いたトキシコキネティクス

カニクイザルを用いた全ての試験（[redacted 529668]、[redacted 501775]及び[redacted 503484]）で、エプコリタマブの体内動態は用量に伴って変化する明確なパターンを示し、高用量と比較して低用量で速やかに排泄された。このような標的介在性薬物動態（target-mediated drug disposition、TMDD）のパターンは、循環血中の標的に対する抗体では一般的である。

カニクイザルを用いた主要な GLP 毒性試験（[redacted 503484]）では、血漿中エプコリタマブ濃度 - 時間プロファイルは、静脈内持続投与及び皮下投与でおおむね一致していた。濃度推移は静脈内持続投与開始から終了時までの 30 分間は上昇し、その後はおおむね二相性に低下した。皮下投与後の上昇時間は更に延長し、投与約 72 時間後にピークに達し 168 時間まで比較的安定した濃度を維持した。その後、4 週間の試料採取期間終了時まで濃度は単相性に減少した。

週 1 回 5 週間の静脈内持続投与（0.01、0.1 及び 1 mg/kg）の最初の投与後、エプコリタマブの全身曝露量は、雌雄ともに 0.01～1 mg/kg で用量比を上回って増加した。週 1 回 5 週間反復静脈内投与後、0.01 及び 0.1 mg/kg を投与した大部分の動物で Day 15 及び 29 に ADA が認められ、エプコリタマブ濃度が定量可能であった試料は限られていた。これら試料のトキシコキネティクス（toxicokinetics、TK）プロファイルの AUC は算出不可能であった。最高用量では、エプコリタマブの全身曝露量は Day 1 と比較して Day 15 で高く、AUC での蓄積比は雌雄ともに 1.8 であった。曝露量は Day 29 までに更に増加し、Day 1 と比較した蓄積比は雄で 3.5、雌で 2.6 であった。

30 分間の単回静脈内持続投与群では、エプコリタマブの全身曝露量は、0.1～1 mg/kg で概して用量比例性を上回って増加した。

静脈内投与後の最高濃度到達時間（time after dosing at which the maximum observed concentration is observed、t_{max}）の中央値は一貫して 0.5 時間（持続投与終了時）であった。クリアランス（clearance、CL）、見かけの分布容積（apparent volume of distribution、V_D）及び定常状態での見かけの分布容積（apparent volume of distribution at steady state、V_{ss}）は用量の増加に伴い低下する傾向が認められた。

単回皮下投与後のエプコリタマブの全身曝露量は、雌雄ともに 0.1～10 mg/kg で用量比を上回って増加した。t_{max} の中央値は、雄では 72 時間と一定していたが、雌では 168 時間までばらつきがみられた。

皮下投与したエプコリタマブの大部分が全身循環血中に到達した。生物学的利用率の推定値は、用量設定試験での 100%超から、GLP 毒性試験での雄及び雌のそれぞれ約 85%及び 49%までの範囲であった。皮下投与後の C_{max} は、同用量を静脈内投与したときの約 1／10 であった。

消失半減期は、反復投与（週 1 回）又は単回静脈内持続投又は皮下投与後に雌雄とも最高用量で最も長く、同量を投与したときの皮下投与と静脈内投与で同程度であった。静脈内投与後の全身曝露量に性差は認められなかった。皮下投与後のエプコリタマブの曝露量は、0.1 mg/kg の雄が雌より高く、高用量群で同程度であった。

GLP 適用下で実施した主要な毒性試験で最高用量の 10 mg/kg を皮下投与したときの平均 C_{max} は、雄で 35.9 μg/mL、雌で 35.1 μg/mL であった。$AUC_{0\text{-}28d}$ の平均値は、雄で 389 μg·day/mL、雌で 385 μg·day/mL であった。平均 $AUC_{0\text{-}inf}$ は雄で 398 μg·day/mL、雌で 401 μg·day/mL であった。

4.　毒性

エプコリタマブで実施した非臨床毒性試験を Table 6 に示す。

Table 6　**非臨床毒性試験の概略**

Study Title	GLP	Test Facility	Report Number	Test Compound	Location in CTD
Single-Dose Toxicity					
BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR and [redacted]: A Single Dose Toxicity Study by Intravenous Injection in Cynomolgus Monkeys[a]	No	[redacted] UK	[redacted 529668]	Epcoritamab	4.2.3.1-1
Repeat-Dose Toxicity					
A Dose Range Finding Study of BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Recovery Period	No	[redacted] UK	[redacted 501775]	Epcoritamab	4.2.3.2-1
A 5-Week Toxicity Study of GEN3013 by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Bioavailability, Local Tolerance, and a 6-Week Recovery Period	Yes	[redacted] UK	[redacted 503484]	Epcoritamab	4.2.3.2-2

Study Title	GLP	Test Facility	Report Number	Test Compound	Location in CTD
Other Toxicity Studies					
Species Cross-reactivity Study in vitro to Determine Relevant Animal Species for Nonclinical Safety Studies	No	Genmab B.V.	[GMB3013-034]	Epcoritamab	4.2.3.7.7-1
ProStorm® Cytokine Release Assay (30 donors)	No	[redacted] UK	[32318]	Epcoritamab	4.2.3.7.7-2
ProStorm® Cytokine Release Assay (5 donors)	No	[redacted], UK	[32400]	DuoBody-CD3xctrl, IgG1-CD3-FEAL	4.2.3.7.7-3
Evaluation of Cytokine Release in Whole Blood induced by DuoBody-CD3xCD20 ex vivo	No	Genmab B.V.	[GMB3013-054][b]	Epcoritamab, DuoBody-CD3xctrl, IgG1-CD3-FEAL	4.2.3.7.7-4
Evaluation of the Hemolytic Potential of GEN3013 in Human Whole Blood in vitro and Plasma Compatibility Assessment	Yes	[redacted] UK	[redacted 301352]	Epcoritamab	4.2.3.7.7-5
Development of an Immunohistochemical Staining Method for the Demonstration of Specific Positive Staining with GEN3013 in Control Material and Assessment of Potential Cross-Reactivity in a Selected Panel of Human Tissues	No	[redacted] UK	[redacted 8361457]	Epcoritamab-FITC	4.2.3.7.7-6
Assessment of the Potential Cross-Reactivity of GEN3013 with a Selected Panel of Human and Cynomolgus Monkey Tissues	Yes	[redacted] UK	[redacted 8361454]	Epcoritamab-FITC	4.2.3.7.7-7
Genotoxicity In Vitro No specific studies conducted					
Genotoxicity In Vivo No specific studies conducted					
Carcinogenicity No specific studies conducted					
Reproductive and Development Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development to Implantation No specific studies conducted					
Reproductive and Development Toxicity: Effects on Embryofetal Development No specific studies conducted					
Reproductive and Development Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development Including Maternal Function No specific studies conducted					
Studies in Juvenile Animals No specific studies conducted					
Local Tolerance No specific studies conducted					

CD = cluster of differentiation; [redacted]; huCACAO = humanized cross-reactive anti-CD3 antibody one; EC_{20} = 20% effective concentration; EC_{50} = 50% effective concentration; EC_{90} = 90% effective concentration; FEAL = L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody® mutations; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody® mutations; GLP = Good Laboratory Practice; FITC = fluorescein isothiocyanate

a [redacted] included in the single-dose study but is not reported here.

b This report summarizes calculations of EC_{20}, EC_{50}, and EC_{90} values as performed at Genmab for data from ProStorm Cytokine Storm Assays, Study 32318, and Study 32400.

エプコリタマブの非臨床安全性試験は、皮下投与経路によるエプコリタマブの製造販売承認申請をサポートするための包括的プログラムとして計画された。

エプコリタマブの安全性評価を裏付ける主要な毒性試験は、適用可能な ICH ガイドラインに準拠して実施され、主要な非臨床毒性試験はすべて OECD 試験法ガイドライン及び GLP に従い、OECD の MAD プログラム加盟国で実施された。エプコリタマブを用いて実施したいくつかの試験は探索的試験であり、GLP のあらゆる側面に完全には準拠していなかった（非 GLP 適用）。これらの試験は科学的に妥当であり、GLP 適用試験の計画及び解釈に有用な情報を提供するために必要であった。

非臨床安全性試験の GLP 適合性は、それぞれの GLP 適用試験の最終報告書（各最終報告書に記載された既知の例外又は逸脱を含む）に示されている。GLP 適用下で実施された主要な毒性試験（[[redacted]503484]）では、以下の 2 点を GLP 適用外とした。1）調製した製剤の正式な安定性の評価は実施しなかった。2）週 1 回調製した静脈内投与液の最低濃度（0.001 mg/mL）は、バリデートされた既存の A280 測定法では検出できなかった。

これらの例外は試験の結論に影響しないと考えられる。

エプコリタマブの臨床用グレードのバッチを用いて、サルを用いた GLP 適用毒性試験を実施した。非臨床試験で使用した他のすべてのロットは、臨床試験で使用した抗体と機能的及び生化学的に同等であった（[GMB3013-030]、[GMB3013-032]）。

4.1　In vivo 毒性試験

エプコリタマブは、ヒト及びカニクイザルの CD3 及び CD20 に同程度に結合し、カニクイザル細胞を用いた in vitro 試験で薬理活性を示し、げっ歯類の CD3 及び CD20 と交差反応しないことから、毒性試験に用いる動物種としてカニクイザルを選択した。エプコリタマブの作用機序と一致する薬理作用がカニクイザルの in vivo 試験で示され、サイトカイン放出、末梢血 B 細胞の枯渇、及びリンパ系組織［脾臓、種々のリンパ節及び腸管関連リンパ組織（gut-associated lymphoid tissue、GALT）］でのリンパ球密度の減少が認められている。

サルを用いた毒性評価では、全身曝露量を増大させて、毒性プロファイルを十分に明らかにするため、エプコリタマブを 1 mg/kg 以下の用量で反復（週 1 回）静脈内投与した。皮下投与経路による臨床投与をサポートするため、GLP ブリッジング毒性評価も実施し、カニクイザルにエプコリタマブを皮下投与したときの安全性、生物学的利用率及び局所刺激性を評価した。

エプコリタマブの GLP 適用毒性試験（[[redacted]503484]）での用量は、カニクイザルを用いた過去の探索的試験（[[redacted]529668]）及び用量設定試験（[[redacted]501775]）で得られた忍容性の成績に基づき設定した。これらの試験の所見は GLP 適用毒性試験の所見と一致しており、エプコリタマブを投与したカニクイザルで有害な一般状態の変化（嘔吐、活動性低下、円背位の発現）が認められた。これらの所見は、主に初回投与後に認められたサイトカイン濃度の上昇と関連していると考えられた。目標用量の前にプライミングドーズを静脈内投与したところ、サイトカイン濃度が低下した。

カニクイザルを用いたGLP適用毒性試験（[■■■503484]）では、エプコリタマブを0.01、0.1又は1 mg/kgの用量で週1回5週間（Q1W × 5）静脈内投与、あるいは0.1、1又は10 mg/kgの用量で週2回皮下投与した。

カニクイザルにエプコリタマブを0.01、0.1又は1 mg/kgの用量で週1回、5週間静脈内投与した結果、総白血球の可逆的な血液学的変化及びB細胞の用量依存的な枯渇が認められた。一般状態の変化として、Day 1の0.1 mg/kg以上の群で嘔吐が投与直後から投与後2時間に、活動性低下及び円背位が投与後4～12時間に認められた。サイトカイン濃度は初回投与後に顕著に上昇した。反復投与後の増加はそれほど顕著ではなかった。0.1 mg/kg以上の群で、病理組織学的所見として脾臓の白脾髄濾胞、リンパ節濾胞及びGALTのリンパ球密度の減少が認められた。6週間の投与後観察期間中、これらの所見は回復傾向を示した。1 mg/kg群の1例をDay 1の投与後約12.75時間に、サイトカインの増加に伴う一般状態の悪化により安楽死させた。これらの所見に基づき、静脈内投与での無毒性量（no observed adverse effect level、NOAEL）は0.1 mg/kgと考えられた。

エプコリタマブを最大10 mg/kgの用量で単回皮下投与したときの忍容性は良好であり、全用量で総白血球及びリンパ球サブポピュレーションの血液学的変化が認められた。全用量に関連した一般状態の変化として、Day 1のおおむね投与後4～12時間に、嘔吐、活動性低下、円背位、散発的な全身の皮膚発赤及び軽度の協調運動障害が認められた。Day 1の投与後にサイトカイン放出が認められ、同じ用量（mg/kg）の静脈内投与と比較して、サイトカインの最高濃度は低かったが、B細胞の枯渇は同程度であった。全体として、軽度の協調運動障害を含む一般状態の所見は、発現時期及び発現期間に基づくとエプコリタマブ投与後のサイトカイン濃度上昇に関連する可能性があると考えられ、投与後に認められた他の臨床所見（活動性低下及び円背位）と一致していた。1又は10 mg/kg群では、病理組織学的所見として脾臓の白脾髄濾胞、リンパ節濾胞及びGALTのリンパ球密度の減少が認められた。これらの所見に基づき、皮下投与によるNOAELは10 mg/kgと考えられた。

カニクイザルにエプコリタマブを投与しても、エプコリタマブに関連した局所刺激性所見は認められず、心血管系、呼吸系及び神経系に対する有害な影響も確認されなかった。

ICH S9に従い、進行がん患者を対象としたエプコリタマブの使用では、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに出生前及び出生後の発生に関する試験は実施しなかった。しかし、GLP適用下で実施した主要な毒性試験（[■■■503484]）では、4～6歳齢の雌雄カニクイザルの生殖器にエプコリタマブに関連する肉眼的又は病理組織学的所見は認められなかった。カニクイザルを用いたエプコリタマブの胚・胎児発生に関する試験は、エプコリタマブはカニクイザルに免疫原性を有する可能性が高いこと、及びエプコリタマブの毒性評価に適した他の適切な動物種が特定されていないことから、第III相試験の開始及び日米欧の各地域（PMDA、FDA、EMEA）でのエプコリタマブの承認申請には免除されている。ADA反応を克服する可能性のある高用量のエプコリタマブ投与は、エプコリタマブの薬理学的作用機序に関連する忍容性の問題により限定的と考えられる。エプコリタマブの作用機序及び他のB細胞標的薬の関連情報を考慮した重みづけアプローチに基づき、エプコリタマブは妊婦から発生中の胎児に移行する可能性があり、その作用機序に基づくと、胎児がエプコリタマブに曝露されると、B細胞リンパ球減少症及び子宮

内曝露された乳児での正常な免疫応答の変化を含む、有害ではあるが可逆的な発達転帰を生じる可能性がある（[SUB-017262]）。

4.2　その他の毒性試験

エプコリタマブのその他の毒性評価から、in vitro ヒト全血サイトカイン放出アッセイでエプコリタマブがサイトカイン放出を誘導することが示された。ヒト全血を用いた溶血性試験で、エプコリタマブは溶血性を示さず、20 µg/mL 以下の濃度でヒト全血及び血漿とも適合した。ヒト及びカニクイザル組織の包括的パネルを用いた GLP に準拠した組織交差反応性試験で、エプコリタマブの結合は当該動物種間で同程度であり、様々な組織の単核細胞に限定された。CD3 及び CD20 はそれぞれ T 細胞及び B 細胞に発現しているため、大部分の組織で血中リンパ球及び単核細胞の染色は予想された反応性に一致していた。

4.3　動物からヒトへのデータの外挿性

エプコリタマブはヒト及びカニクイザルの CD3 及び CD20 に同程度に結合し、カニクイザル細胞を用いた in vitro 試験で薬理活性を示すことから、毒性試験に用いる動物種としてカニクイザルを選択した。したがって、カニクイザルは毒性評価及びヒトでの安全性に関するリスク評価に適した動物種である。エプコリタマブの作用機序と一致する薬理作用として、カニクイザルの in vivo 試験で、サイトカイン放出、末梢血 B 細胞の枯渇、及びリンパ系組織（脾臓、種々のリンパ節及び GALT）のリンパ球密度減少などの作用が認められている。エプコリタマブの臨床試験では B 細胞枯渇及びサイトカイン放出症候群（cytokine release syndrome、CRS）が認められている。CRS は、ヒトへのエプコリタマブ投与に伴う重要な特定されたリスクであり、適切な予防措置及び CRS 事象管理のためのガイダンスにより管理される。エプコリタマブの投与により、循環血中 B 細胞の急速かつ持続的な枯渇が誘導される（検出可能な B 細胞を有する被験者のサブセットでは、過去の抗 CD20 療法によりほとんどの患者で B 細胞は検出されない）（2.7.4）。B 細胞が枯渇すると、感染症のリスクが上昇する可能性がある。

5.　総括及び結論

エプコリタマブは、T 細胞表面抗原 CD3 及び B 細胞表面抗原 CD20 を認識する二重特異性抗体である。エプコリタマブは、DuoBody 分子の作製に必要な相補的変異（それぞれ F405L 及び K409R）の 1 つを含むヒト化 IgG1λ 抗 CD3ε mAb 及びヒト型 IgG1κ 抗 CD20 mAb IgG1-7D8 の制御された Fab アーム交換により得られる（Engelberts et al, 2020; Labrijn et al, 2013; Labrijn et al, 2014）。エプコリタマブは、標準型 IgG1 構造及びヒト IgG1 抗体に典型的な生化学的特性を示す。さらに、エプコリタマブの Fc ドメインに 3 つの変異を導入し、Fc を介した FcγR 及び C1q との相互作用によるエフェクター機能を抑制した。エプコリタマブは、CD20 発現 B 細胞性悪性腫瘍の皮下投与による治療薬として開発している。

DuoBody プラットフォームは臨床で検証されている。複数の DuoBody 分子が現在臨床開発段階にあり、1 つは FDA 及び EMA で審査中であり、他の 1 つ、アミバンタマブ（JAN）［上皮成長因子受容体及び Met を標的とする二重特異性抗体（bispecific antibody targeting epidermal growth

factor receptor and Met、EGFRxMET bsAb）、Rybrevant, 2021］は FDA 及び EMA で承認されている。

エプコリタマブの作用機序は、T 細胞表面の CD3 及び標的細胞表面の CD20 に同時に結合することによる T 細胞媒介性細胞傷害、並びに関連する T 細胞の活性化及び増殖の誘導である。

抗 CD20 mAb による CD20 発現細胞を標的とする治療法は、B-NHL 及び B 細胞性慢性リンパ性白血病（B-cell chronic lymphocytic leukemia、B-CLL）患者に対する標準治療の一環として実施されている。抗 CD20 mAb の作用機序は、ADCC 及び ADCP などの自然免疫細胞並びに CDC による Fc を介したエフェクター機能の誘導である。一方、エプコリタマブは、CD20 発現（腫瘍）細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害の誘導により、適応免疫系のエフェクター細胞に作用する。抗 CD20 mAb は、B 細胞性悪性腫瘍に対する標準治療の一環であり、多くの患者はこれらの mAb による前治療を受けている。抗 CD20 抗体を含むレジメンによる治療歴のある患者の大多数で B 細胞表面に CD20 が存在することから、抗 CD20 抗体に対する耐性は、ほとんどの場合、CD20 発現の消失によるものではないと考えられる。したがって、抗 CD20 mAb と異なる作用機序を有する CD20 を標的とする抗体は、CD20 発現 B 細胞性悪性腫瘍に対して新しい強力な治療法となる可能性がある。

エプコリタマブは、種々の CD20 陽性 B 細胞性リンパ腫細胞株及び末梢血 B 細胞の存在下で、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の両方に対して in vitro で標的特異的な細胞傷害作用、並びに関連する活性化及び増殖を誘導した。ヒト化マウスの B 細胞性リンパ腫異種移植モデルを用いた非臨床薬理試験で、エプコリタマブは、著しい in vivo 抗腫瘍活性を示した。さらに、エプコリタマブは、カニクイザルで用量依存的な長期間継続した著しい末梢血及びリンパ系器官 B 細胞数の減少を示した。B 細胞数の減少は可逆的であり、回復までの期間は用量に関連した。重要なことに、マウスモデルを用いた in vivo 試験で、エプコリタマブは検討された用量で、CD20 との結合に関して競合する循環血液中の抗 CD20 抗体の存在化でも抗腫瘍活性を誘導できることが示された。さらに、B-NHL 患者の検体では、抗 CD20 mAb を含む治療法に反応しなくなった患者から採取した腫瘍細胞に対しても細胞死誘導活性を示した。エプコリタマブの腫瘍細胞死滅作用に対する EC_{50} 値は CD20 結合に対する EC_{50} 値より著しく低く、エプコリタマブの効果は CD20 受容体の低い占有率でも発現することが示された。以上より、以前の治療ラインから循環血液中に抗 CD20 mAb が残存している患者でも、エプコリタマブによる治療に奏効する可能性が示唆された。

CD20 発現細胞非存在下での T 細胞の活性化及び細胞傷害作用を抑制するためには、エプコリタマブが抗体媒介性の FcγR を介した CD3 の架橋形成及びそれに続く T 細胞の活性化を誘導しないことが重要である。エプコリタマブの Fc ドメインは、細胞傷害活性が CD20 発現標的細胞の存在に依存するように遺伝子操作された。Fc ドメインの機能抑制（FEA、不活性化）変異の導入により、標的細胞非存在下（又は標的細胞結合アームの非存在下）で T 細胞媒介性細胞傷害作用、関連する T 細胞の活性化、T 細胞の増殖及びサイトカイン産生が誘導されないことを確認した。同様に、エプコリタマブの抗 CD3 親 mAb（3005a、IgG1-CD3-FEAL）は、FcγR 陽性細胞（すなわち、PBMC）の存在下で細胞傷害活性、並びに関連する T 細胞の活性化及び増殖を誘導しなかった。したがって、エプコリタマブに残留 3005a が混在する可能性はあるが、その場合

でも残留 3005a は標的非依存的な T 細胞の活性化及び細胞傷害作用のリスクをもたらさないと考えられる。

さらに、不活性化変異は FcγRI、II 及び III に対する結合を抑制するため、エプコリタマブは ADCC、ADCP などの Fc ドメインを介したエフェクター機能を誘導できないと考えられ、補体成分 C1q 結合活性及び CDC の誘導はわずかであった。

カニクイザルを用いた TK 試験で、エプコリタマブの体内動態は用量に伴って変化する明確なパターンを示し、高用量と比較して低用量で速やかに排泄された。このような TMDD のパターンは抗体、特に末梢血で高発現する標的に対する抗体では一般的である。概して、低用量（0.01 及び 0.1 mg/kg）を投与した試験を通して、Day 15 以降に大部分の動物で ADA 反応が認められ、エプコリタマブ濃度が定量可能な試料は限られていた。しかし、評価した最高用量（1 mg/kg 静脈内投与、20 mg/kg 皮下投与）では、ほとんどの動物で Day 29 まで高い曝露量が維持された。

GLP 適用毒性試験で評価した最高皮下用量（無毒性量）の 10 mg/kg での平均 C_{max} は、雄で 35.9 μg/mL、雌で 35.1 μg/mL であり、$AUC_{0\text{-}inf}$ の平均値は、雄で 398 μg·day/mL、雌で 401 μg·day/mL であった。国内第 I/II 相試験（04 試験）における 48 mg 投与時（12 週）の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}tau}$ の幾何平均値は、それぞれ 13.9 μg/mL 及び 89.9 μg·day/mL であった。このことから、主要な毒性試験と臨床試験での曝露量を比較したときの安全域は、C_{max} で 2.5～2.6 倍、AUC で 4.4～4.5 倍であると推定された。カニクイザルに単回投与したときと比較して、患者に週 1 回投与したときは、蓄積及びクリアランス低下が考えられることから、これらの安全域は控えめのマージンと考えられる。

エプコリタマブを投与したカニクイザルでの主要な毒性所見として、有害な一般状態の変化（嘔吐、活動性低下、円背位の発現、1 mg/kg 以上を静脈内投与したときの死亡）が認められた。これらの変化は、主に初回投与後に認められたサイトカイン濃度の上昇と関連していると考えられた。カニクイザルにエプコリタマブを皮下投与すると、C_{max} 及び最高サイトカイン濃度は低下したが、B 細胞枯渇は同じ用量（mg/kg）を静脈内投与したときと比較して同程度であった。プライミングドーズを後の用量よりも低い用量で静脈内投与すると、サイトカイン濃度が比較的低かった。エプコリタマブに関連するその他の所見として、可逆的な血液学的変化（白血球及びリンパ球の変化）並びに病理組織学的検査で観察されたリンパ系組織の可逆的なリンパ球密度の減少に一致する末梢血の可逆的な B 細胞枯渇が認められた。カニクイザルでの in vivo 毒性試験の所見と一致して、エプコリタマブはヒト全血を用いた in vitro サイトカイン放出アッセイでもサイトカイン放出を誘導した。全体として、これらの毒性所見はエプコリタマブの薬理作用と一致していた。

結論として、選択した試験系及び非臨床動物種でのエプコリタマブの非臨床プロファイルは適切に特徴付けられており、予定している患者集団に対するがん治療にエプコリタマブを使用することを裏付けている。

6. 添付文書案

生殖発生毒性を評価するエビデンスの重み付けアプローチに基づき、エプコリタマブは妊娠した母親から発生中の胎児に移行する可能性があり、その作用機序に基づくと、胎児がエプコリタマブに曝露されると、子宮内曝露された乳児での B 細胞リンパ球減少症及び正常な免疫応答の変化など、有害ではあるが可逆的な発生転帰が生じる可能性がある。エプコリタマブ投与後の妊娠リスクに関する説明は、治験依頼者が提案する添付文書に記載されている。

7. 参考文献

Anderson, K. C., Bates, M. P., Slaughenhoupt, B. L., Pinkus, G. S., Schlossman, S. F., and Nadler, L. M. (1984). Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. Blood 63, 1424-1433.

Barbas, C. F., Collet, T. A., Amberg, W., Roben, P., Binley, J. M., Hoekstra, D., Cababa, D., Jones, T. M., Williamson, R. A., Pilkington, G. R., et al. (1993). Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. J Mol Biol 230, 812-823.

Engelberts, P. J., Hiemstra, I. H., de Jong, B., Schuurhuis, D. H., Meesters, J., Beltran Hernandez, I., Oostindie, S. C., Neijssen, J., van den Brink, E. N., Horbach, G. J., et al. (2020). DuoBody-CD3xCD20 induces potent T-cell-mediated killing of malignant B cells in preclinical models and provides opportunities for subcutaneous dosing. EBioMedicine 52, 102625.

Gisselbrecht, C., Glass, B., Mounier, N., Singh Gill, D., Linch, D. C., Trneny, M., Bosly, A., Ketterer, N., Shpilberg, O., Hagberg, H., et al. (2010). Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. J Clin Oncol 28, 4184-4190.

Grillo-Lopez, A. J., Hedrick, E., Rashford, M., and Benyunes, M. (2002). Rituximab: ongoing and future clinical development. Semin Oncol 29, 105-112.

Ishida, I., Tomizuka, K., Yoshida, H., Tahara, T., Takahashi, N., Ohguma, A., Tanaka, S., Umehashi, M., Maeda, H., Nozaki, C., et al. (2002). Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo animals. Cloning Stem Cells 4, 91-102.

Labrijn, A. F., Meesters, J. I., de Goeij, B. E., van den Bremer, E. T., Neijssen, J., van Kampen, M. D., Strumane, K., Verploegen, S., Kundu, A., Gramer, M. J., et al. (2013). Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 5145-5150.

Labrijn, A. F., Meesters, J. I., Priem, P., de Jong, R. N., van den Bremer, E. T., van Kampen, M. D., Gerritsen, A. F., Schuurman, J., and Parren, P. W. (2014). Controlled Fab-arm exchange for the generation of stable bispecific IgG1. Nat Protoc 9, 2450-2463.

Pedersen, I. M., Buhl, A. M., Klausen, P., Geisler, C. H., and Jurlander, J. (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, 1314-1319.

Pessano, S., Oettgen, H., Bhan, A. K., and Terhorst, C. (1985). The T3/T cell receptor complex: antigenic distinction between the two 20-kd T3 (T3-delta and T3-epsilon) subunits. EMBO J 4, 337-344.

Plosker, G. L., and Figgitt, D. P. (2003). Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. Drugs 63, 803-843.

Riley, J. K., and Sliwkowski, M. X. (2000). CD20: a gene in search of a function. Semin Oncol 27, 17-24.

Rybrevant (May 2021). USPI. Janssen Biotech Inc.

Salmeron, A., Sanchez-Madrid, F., Ursa, M. A., Fresno, M., and Alarcon, B. (1991). A conformational epitope expressed upon association of CD3-epsilon with either CD3-delta or CD3-gamma is the main target for recognition by anti-CD3 monoclonal antibodies. J Immunol 147, 3047-3052.

Tedder, T. F., Boyd, A. W., Freedman, A. S., Nadler, L. M., and Schlossman, S. F. (1985). The B cell surface molecule B1 is functionally linked with B cell activation and differentiation. J Immunol 135, 973-979.

Teeling, J. L., French, R. R., Cragg, M. S., van den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P. W., Hack, C. E., Dechant, M., et al. (2004). Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. Blood 104, 1793-1800.

van der Horst, H. J., de Jonge, A. V., Hiemstra, I. H., Gelderloos, A. T., Berry, D., Hijmering, N. J., van Essen, H. F., de Jong, D., Chamuleau, M. E. D., Zweegman, S., et al. (2021). Epcoritamab induces potent anti-tumor activity against malignant B-cells from patients with DLBCL, FL and MCL, irrespective of prior CD20 monoclonal antibody treatment. Blood Cancer J 11, 38.

Vose, J. M., Giles, F. J., Manshouri, T., Bociek, G., Bierman, P. J., Armitage, J. O., and Albitar, M. (2001). High levels of soluble CD20 (sCD20) in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL): Correlation with clinical behavior and contrast with patients with Hodgkin's disease (HD). Blood 98, 767a-768a.