目次

1.　緒言 3
1.1　構造及び薬理学的特性 3
1.2　参考文献 4

図目次

Figure 1　エプコリタマブの模式図 3

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）
CD3	surface antigen on T cells, subunit of the T cell receptor complex	T 細胞上の表面抗原、T 細胞受容体複合体のサブユニット
CD20	surface antigen, pan-B cell marker	表面抗原、pan-B 細胞マーカー
CH	constant domain of heavy chain	重鎖定常領域
Fab	fragment antigen binding	–
Fc	fragment crystallizable	–
FcγR	IgG Fc receptor	IgG Fc 受容体
FcRn	neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
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
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体

1.　緒言

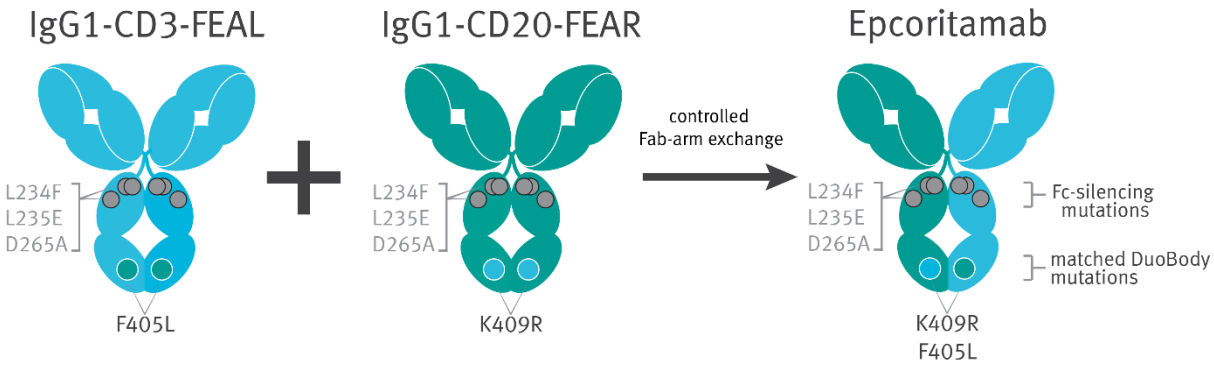
1.1　構造及び薬理学的特性

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 を認識する二重特異性抗体である（Engelberts et al, 2020）。エプコリタマブは、通常の胎児性 Fc 受容体（neonatal Fc receptor、FcRn）結合及び生体内安定性など、ヒト IgG1 抗体に典型的な IgG1 構造及び生化学的特性を有する。エプコリタマブは、T 細胞表面の CD3 及び悪性 B 細胞表面の CD20 に同時に結合し、T 細胞の活性化及び細胞傷害活性を誘導し、CD20 発現リンパ腫細胞を死滅させる。

エプコリタマブは、ヒト型抗 CD20 モノクローナル抗体（monoclonal antibody、mAb）7D8（Teeling et al, 2004; Teeling et al, 2006）とカニクイザルの CD3ε と交差反応性を示すヒト化抗 CD3ε mAb（Pessano et al, 1985）との間で制御された Fab アーム交換により得られる（Figure 1）。各親抗体は、DuoBody 分子の作製に必要な CH3 アミノ酸配列中の相補的変異（F405L、K409R）をそれぞれ 1 つ含む（Labrijn et al, 2013; Labrijn et al, 2014）。さらに、各親抗体の Fc ドメインの CH2 アミノ酸配列にそれぞれ 3 つの追加変異（L234F、L235E 及び D265A）を導入し、IgG Fc 受容体（IgG Fc receptor、FcγR）及び補体因子 C1q に結合しないが、FcRn への結合を保持する不活性化 Fc ドメインを作製した（Engelberts et al, 2020）。DuoBody 変異と不活性化変異の組み合わせは、FEAL/FEAR と呼ばれている。

エプコリタマブの分子量は約 148 kDa である。

Figure 1　エプコリタマブの模式図



Schematic representation of controlled Fab-arm exchange of parental anti-CD3ε (IgG1-CD3-FEAL, 3005a) and parental anti-CD20 (IgG1-CD20-FEAR, 3001d) antibodies to obtain epcoritamab.

CD = cluster of differentiation, IgG = immunoglobulin G, FEAL = L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody® mutations, FEAR = L234F, L235E and D265A (inertness) and K409R DuoBody® mutations

Source: (Engelberts et al, 2020).

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る（Riley and Sliwkowski, 2000）。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）。B 細胞に由来する悪性腫瘍の大部分で、CD20 の発現は保持されている。したがって、ヒト B 細胞性リンパ腫の 90%以上及び B 細胞性白血病の大部分は、CD20 を発現している（Anderson et al, 1984; Grillo-Lopez et al, 2002; Vose et al, 2001）。正常な生理機能では、CD20 は B

細胞の成熟段階全般を通じて、末梢血及びリンパ系器官の B 細胞の 90%以上に発現している。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）。

抗 CD20 抗体による治療は、様々な B 細胞性悪性腫瘍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。ただし、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が持続し、投与中止後に B 細胞は再増殖する（Leandro, 2013）。化学療法に抗 CD20 抗体を追加することにより、B 細胞性リンパ腫及び B 細胞性白血病の患者の転帰は改善したが、多くの患者で疾患の再発や進行が認められていることから、新たな治療法の開発が求められている。

エプコリタマブは、in vitro 試験、患者細胞を用いた ex vivo 試験、及びヒト化マウスモデルを用いた in vivo 試験で、B 細胞性悪性腫瘍に対して T 細胞依存性細胞傷害作用を示した（2.6.2）。エプコリタマブの薬物動態特性は十分に明らかにされており（2.6.4）、抗腫瘍活性（2.6.2）及び毒性（2.6.6）に関する非臨床試験のデザイン及び解釈に役立つ情報が提供されている。概して、エプコリタマブの投与に関連する非臨床毒性試験の所見は、T 細胞をリダイレクトする抗体で予想される影響と一致している（Van De Vyver et al, 2021）。非臨床での評価では、再発、進行性又は難治性の B 細胞性リンパ腫患者に対してエプコリタマブの使用を否定する所見は認められなかった。

1.2 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.

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.

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

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.

Leandro, M. J. (2013). B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. Arthritis Res Ther 15 Suppl 1, S3.

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.

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.

Teeling, J. L., Mackus, W. J., Wiegman, L. J., van den Brakel, J. H., Beers, S. A., French, R. R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J. W., et al. (2006). The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. Journal of Immunology 177, 362-371.

Van De Vyver, A. J., Marrer-Berger, E., Wang, K., Lehr, T., and Walz, A. C. (2021). Cytokine release syndrome by T-cell-redirecting therapies: Can we predict and modulate patient risk? Clin Cancer Res, 6083-6094.

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.

目次

1. まとめ....9
2. 効力を裏付ける試験....11
2.1 エプコリタマブの作製....17
2.1.1 ヒト型抗 CD20 mAb の作製....17
2.1.2 ヒト化抗 CD3 mAb の作製....18
2.1.3 エプコリタマブの IgG Fc ドメインの不活性化....18
2.2 エプコリタマブの in vitro での標的結合特性....25
2.2.1 CD3 発現細胞に対する結合....26
2.2.2 可溶性及び固相化 CD3ε に対する結合親和性....26
2.2.3 エプコリタマブの抗 CD3 Fab フラグメント及び CD3ε ペプチドの X 線結晶構造解析....27
2.2.4 CD20 発現細胞に対する結合....27
2.2.5 CD20 発現細胞に対する結合親和性....28
2.2.6 エプコリタマブとの結合に関与する CD20 アミノ酸残基....28
2.2.7 CD3 発現 T 細胞及び CD20 発現 B 細胞に対する同時結合活性....28
2.3 In vitro 及び ex vivo での作用機序及び細胞傷害作用....29
2.3.1 T 細胞の活性化....30
2.3.2 T 細胞の増殖....34
2.3.3 健康ヒト由来の全血でのサイトカイン産生の誘導....34
2.3.4 エプコリタマブの細胞傷害作用の in vitro 評価....35
2.3.5 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....39
2.3.6 エプコリタマブによるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）及びマントル細胞リンパ腫（MCL）患者由来検体に対する T 細胞活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害活性の ex vivo 評価....40
2.3.7 エプコリタマブと他の治療薬との in vitro での併用....42
2.4 エプコリタマブの in vivo での抗腫瘍活性：異種移植マウスモデル....44
2.4.1 皮下共移植リンパ腫異種移植モデル....45
2.4.2 MiXeno™マントル細胞リンパ腫（MCL）モデル....45
2.4.3 ヒト免疫系（HIS）モデル....46
2.4.4 ヒト免疫系（HIS）マウスを用いた患者由来異種移植片（PDX）モデル....50
2.5 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....52
3. 副次的薬理試験....55
3.1 エプコリタマブの免疫原性の予測....55
3.1.1 CD3 結合性 Fab アームの免疫原性評価....55
3.1.2 エプコリタマブの Fc ドメインの免疫原性評価....56
4. 安全性薬理試験....57
5. 薬力学的薬物相互作用試験....58

6.　考察及び結論 58

7.　参考文献 60

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 8
Table 2　効力を裏付ける試験の概要 12
Table 3　エプコリタマブの CD3 発現細胞に対する結合活性の平均 EC_{50} 値 26
Table 4　エプコリタマブの CD20 発現細胞に対する結合活性の平均 EC_{50} 値 28
Table 5　In vitro 試験で使用した CD20 発現細胞株の特徴 29
Table 6　エプコリタマブによる T 細胞活性化に対する平均 EC_{20} 値-Daudi 細胞 33
Table 7　エプコリタマブによる T 細胞活性化に対する平均 EC_{50} 値-Daudi 細胞 33
Table 8　エプコリタマブによる T 細胞活性化対する平均 EC_{20} 値-健康ヒト由来の PBMC の B 細胞 33
Table 9　エプコリタマブによる T 細胞活性化に対する平均 EC_{50} 値-健康ヒト由来の PBMC の B 細胞 34
Table 10　エプコリタマブによる細胞傷害作用に対する平均 EC_{20} 値 37
Table 11　エプコリタマブによる細胞傷害作用に対する平均 EC_{50} 値 37
Table 12　副次的薬理試験の概要 55

図目次

Figure 1　エプコリタマブの FcγRI、FcγRII 及び FcγRIII に対する結合 20
Figure 2　IgG1-CD3-FEAL（3005a）及び IgG1-CD20-FEAR（3001d）の FcγRI、FcγRII 及び FcγRIII に対する結合 21
Figure 3　エプコリタマブ及び IgG1-CD20-FEAR（3001d）の C1q 結合 23
Figure 4　IgG1-CD3-FEAL（3005a）の C1q 結合 24
Figure 5　エプコリタマブ及び IgG1-CD20-FEAR（3001d）による CDC の誘導 25
Figure 6　エプコリタマブによる T 細胞の活性化 32
Figure 7　エプコリタマブによる T 細胞媒介性細胞傷害作用 36
Figure 8　エプコリタマブによる細胞傷害作用の誘導と CD20 発現細胞に対する結合活性の比較 38
Figure 9　エプコリタマブと臨床開発中の CD3xCD20 bsAb 類似化合物の in vitro での比較 40
Figure 10　エプコリタマブによる B-NHL 患者由来の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性 42
Figure 11　ヒト免疫細胞を有するマウスを用いた細胞株由来異種移植（CDX）モデルでのエプコリタマブの効果 47

Figure 12　BRGS-ヒト免疫系（HIS）マウスを用いた Raji 細胞皮下注入モデルでのエプコリタマブの効果 48
Figure 13　NSG-ヒト免疫系（HIS）マウスを用いた Raji 細胞皮下注入モデルでのエプコリタマブの効果 49
Figure 14　DLBCL 患者由来異種移植片（PDX）皮下移植モデル LY2214 でのエプコリタマブの効果 51
Figure 15　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 53
Figure 16　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 細胞の減少及び回復 54

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）
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
APC	allophycocyanin	アロフィコシアニン
B-CLL	B-cell chronic lymphocytic leukemia	B 細胞性慢性リンパ性白血病
BAP	biotin-acceptor-peptides	ビオチンアクセプターペプチド
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
BrdU	5-bromo-2’-deoxyuridine	5-ブロモ-2’-デオキシウリジン
BRGS	BALB/c *Rag2*^{tm1Fwa} *IL-2Rγc*^{tm1Cgn} *SIRPα*^{NOD}	―
bsAb	bispecific antibody	二重特異性抗体
$bsAb_{Gen}$	CD3xCD20 bispecific antibody, based on mosunetuzumab	mosunetuzumab に基づく CD3xCD20 二重特異性抗体
$bsAb_{Reg}$	CD3xCD20 bispecific antibody, based on odronextamab	odronextamab に基づく CD3xCD20 二重特異性抗体
$bsAb_{Roc}$	CD3xCD20 bispecific antibody, based on glofitamab	glofitamab に基づく CD3xCD20 二重特異性抗体
$bsAb_{Xen}$	CD3xCD20 bispecific antibody, based on plamotamab	plamotamab に基づく CD3xCD20 二重特異性抗体
C1q	complement component 1q	補体成分 C1q
CACAO	cross-reactive anti-CD3 antibody one	交差反応性のある抗 CD3 抗体
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
cFAE	controlled Fab-arm exchange	制御された Fab アーム交換
CH	constant domain of heavy chain	重鎖定常領域
CHOP	cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin (doxorubicin), oncovin (vincristine), prednisone	シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾン
CPA	cyclophosphamide	シクロホスファミド
ctrl	control	対照
Daudi-luc	Daudi cell line transfected with gWIZ luciferase	gWIZ ルシフェラーゼ遺伝子を導入した Daudi 細胞（株）
DC	dendritic cell	樹状細胞
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
DOX	doxorubicin	ドキソルビシン
E:T 比	effector cell to target cell ratio	エフェクター細胞：標的細胞比
EC_{20}	20% effective concentration	20%効果濃度
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
ECD	extracellular domain	細胞外ドメイン

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
EGFR	epidermal growth factor receptor	上皮成長因子受容体
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
ELISpot	enzyme-linked immunospot	酵素結合免疫スポット
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
FACS	fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化細胞選別法
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 D265A	不活性変異 L234F、L235E、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
FSC	forward scatter (in flow cytometry)	前方散乱（フローサイトメトリー）
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
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
HEK-CD20	CD20-transfected HEK293F cells	CD20 遺伝子を導入した HEK293F 細胞
His	histidine tag	ヒスチジンタグ
HIS	human immune system	ヒト免疫系
HisBAP	His-tagged, biotin-acceptor-peptide	His タグ付きビオチンアクセプターペプチド
HLA	human leukocyte antigen	ヒト白血球抗原
hu	human	ヒト
huNOG	humanized NOG (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac)	ヒト化 NOG (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac)
IFN	interferon	インターフェロン
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgG1-RTX-FEAR	a rituximab variant 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バリアント
IL	interleukin	インターロイキン
IMiD	immunomodulatory drug	免疫調節薬
iTope™	in silico technology for prediction of peptide binding to human MHC class II alleles (proprietary to Antitope)	ヒト MHC クラス II 対立遺伝子へのペプチド結合を予測する in silico 評価手法（Antitope 社の登録商標）
K_D	dissociation constant, affinity	解離定数、親和性
LAMP-1	lysosomal-associated protein 1	リソソーム関連タンパク質 1

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
LNB	low nonspecific binding	低非特異的結合
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MCL	mantle-cell lymphoma	マントル細胞リンパ腫
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
MoDC	monocyte-derived dendritic cell	単球由来樹状細胞
MZL	marginal zone lymphomas	辺縁帯リンパ腫
ND	newly diagnosed	新規診断
NCG	NOD-*Prkdc*^{em26Cd52} *Il2rg*^{em26Cd22}/NjuCrl	－
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
NOD	non-obese diabetic	非肥満性糖尿病マウス系統
NOD-SCID	mouse strain with severe combined immunodeficiency (SCID) crossed onto non-obese diabetic (NOD) background	非肥満性糖尿病（NOD）マウスに重症複合型免疫不全（SCID）遺伝子を導入したマウス系統
NS/0-CD20	CD20-transfected NS/0 cells	CD20 遺伝子を導入した NS/0 細胞
NSG	NOD.*Cg-Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ	－
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
PE	phycoerythrin	フィコエリスリン
PHA-L	*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin	インゲンマメ白血球凝集素
PRD	prednisone	プレドニゾン
Pyr	pyroglutamic acid	ピログルタミン酸
QCM	quartz crystal microbalance	水晶振動子マイクロバランス
R	rituximab	リツキシマブ
Raji-luc	Raji cell line transfected with gWIZ luciferase	gWIZ ルシフェラーゼ遺伝子を導入した Raji 細胞（株）
R-CHOP	rituximab, cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin (doxorubicin), oncovin (vincristine), prednisone	リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾン
RR	relapsed or refractory	再発又は難治性
sABC	specific antibody-binding capacity	特異抗体結合活性
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合型免疫不全（症）
SK-BR-3-CD20	CD20-transfected human breast cancer SK-BR-3 cells	CD20 遺伝子を導入したヒト乳癌 SK-BR-3 細胞
SOC	standard of care	標準治療
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴法
SSC	side scatter (in flow cytometry)	側方散乱（フローサイトメトリー）
TCED™	T-cell epitope database (proprietary database of Antitope)	T 細胞エピトープデータベース（Antitope 社データベース）
TCR	T-cell receptor	T 細胞受容体
Th	T helper	T ヘルパー
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
V_H	variable region of the immunoglobulin heavy chain	重鎖可変領域

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
VINC	vincristine	ビンクリスチン
V_L	variable region of the immunoglobulin light chain	軽鎖可変領域

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	DuoBody-CD3xctrl[a]; BisG1-huCACAO-FEAL/b12-LFLEDA-K409R	Bispecific IgG1 antibody that contains a CD3-specific Fab arm identical to epcoritamab, a nonbinding control (ctrl) Fab arm, and Fc-silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone
NA	DuoBody-ctrl[a]xCD20; 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-F405L; IgG1-huCACAO-F405L	Bivalent CD3-specific IgG1 mAb with DuoBody (F405L) mutation in the Fc backbone
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-K409R; IgG1-7D8-K409R	Bivalent CD20-specific IgG1 mAb with DuoBody (K409R) mutation in the Fc backbone
NA	IgG1-CD20; IgG1-7D8	Bivalent CD20-specific IgG1 mAb
NA	IgG1-ctrl[a]; IgG1-b12	Bivalent non-binding control IgG1 mAb

CACAO = cross-reactive anti-CD3 antibody one; 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; IgG = immunoglobulin G; mAb = monoclonal antibody; NA = not applicable

a　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)

1. まとめ

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（bispecific antibody、bsAb）である（Engelberts et al, 2020）。エプコリタマブは、T 細胞表面の CD3 及び悪性 B 細胞表面の CD20 に同時に結合し、T 細胞の活性化及び細胞傷害作用を誘導し、標的リンパ腫細胞を死滅させる。エプコリタマブは、CD20 陽性 B 細胞性悪性腫瘍の皮下投与治療薬として開発中である。

DuoBody 分子は、重鎖定常領域（constant domain of heavy chain、CH）3 ドメインに相補的点突然変異をそれぞれ 1 つ（一方が F405L 及びもう一方が K409R）含む 2 つの標準型 IgG1 モノクローナル抗体（monoclonal antibody、mAb）の制御された Fab アーム交換（controlled Fab-arm exchange、cFAE）により作製された bsAb である（Labrijn et al, 2013; Labrijn et al, 2014）。DuoBody 分子は、胎児性 Fc 受容体（neonatal Fc receptor、FcRn）に対する正常な結合親和性及び生体内での安定性など、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。

エプコリタマブは、ヒト化 IgG1λ 抗 CD3ε mAb 及びヒト型 IgG1κ 抗 CD20 mAb の cFAE により作製され、それぞれの mAb は、bsAb を効率よく作製するために Fc 主鎖に相補的な DuoBody 変異（それぞれ F405L 及び K409R）を 1 つ含む。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 変異と不活性化変異の組み合わせは、FEAL/FEAR と呼ばれている。

エプコリタマブは、CD3 及び CD20 結合活性を示し、低ナノモル範囲の 50%効果濃度（50% effective concentration、EC_{50}）値（フローサイトメトリー法）及び結合親和性を示した。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 細胞の両方）及び CD20 発現 B 細胞に同時に結合した。

エプコリタマブの作用機序は、CD20 発現（腫瘍）細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害作用の誘導である。CD20 特異的細胞傷害作用は、T 細胞表面の CD3 及び（悪性）B 細胞表面の CD20 に同時結合することにより達成され、T 細胞の活性化及び増殖並びに CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞からの細胞傷害性顆粒の放出を誘導する。

In vitro 試験で、T 細胞媒介性細胞傷害作用には T 細胞表面の CD3 及び B 細胞表面の CD20 にエプコリタマブが同時に結合することが必要であることが示された。FEA の不活性化変異により、エプコリタマブは IgG Fc 受容体（IgG Fc receptor、FcγR）に結合することができず、in vitro 機能アッセイで FcγR を介した CD3 の架橋形成を誘導しなかった。さらに不活性化変異の導入の結果、補体成分 C1q（complement component 1q、C1q）結合及び補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity、CDC）の誘導はわずかであった。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）、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、CDC のわずかな誘導を示した。

エプコリタマブは、CD20 発現細胞の存在下で、健康ヒト及び血液悪性腫瘍患者由来の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の両方に活性化及び増殖を伴う細胞傷害作用を誘導した。エプコリタマブは in vitro 試験で、マントル細胞リンパ腫（mantle-cell lymphoma、MCL）、活性化 B

細胞型びまん性大細胞型 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）など種々の B 細胞性悪性腫瘍由来の多様な CD20 発現癌細胞株に対して、腫瘍細胞の死滅を誘導し、健康ヒト由来の B 細胞に対しても死滅を誘導した。さらにエプコリタマブは、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 MCL 患者から採取したリンパ節生検検体の B 細胞に対して、抗 CD20 抗体を含む治療レジメンに反応しなくなった患者から採取した検体でも、強力な T 細胞媒介性細胞傷害作用を誘導した。

In vitro 試験でエプコリタマブを B 細胞性非ホジキンリンパ腫（B-cell non-Hodgkin lymphoma、B-NHL）の標準治療（standard of care、SOC）薬と併用し、エプコリタマブ誘発性の T 細胞媒介性細胞傷害作用及び関連する T 細胞の活性化に対するこれらの薬剤の影響を検討した。個々の CHOP 療法構成薬（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾン）又はレナリドミドで前処理した T 細胞は、エプコリタマブ誘発性の T 細胞媒介性細胞傷害作用を媒介することが可能で、試験結果より、血液悪性腫瘍の治療のためにエプコリタマブをこれら SOC 薬と併用することが支持された。

エプコリタマブの非臨床 in vivo 試験での抗腫瘍活性は、ヒトの免疫細胞を持つ B 細胞性リンパ腫細胞株由来異種移植（cell line-derived xenograft、CDX）マウスモデル及び DLBCL-患者由来異種移植片（patient-derived xenograft、PDX）マウスモデルで評価した。エプコリタマブの抗腫瘍活性は、リツキシマブ（遺伝子組換え）の存在下で影響されず、生体内でのエプコリタマブの抗腫瘍活性は、検討した用量では CD20 分子との結合に関して競合する CD20 mAb が循環血液中に存在しても阻害されないことが示された。エプコリタマブは、カニクイザルで末梢血及びリンパ（系）器官の B 細胞の著しいが回復性のある減少を誘導した。

以上より、エプコリタマブは in vitro 及び in vivo 試験で、T 細胞媒介性の CD20 発現（腫瘍）細胞の効果的な死滅を誘導した。これは、エプコリタマブがヒト CD20 発現リンパ腫の有効な治療薬となる可能性を示している。

2. 効力を裏付ける試験

エプコリタマブの効力を裏付ける試験の in vitro 試験では、エプコリタマブの作製、標的結合特性の解析、IgG Fc ドメインの機能特性（「不活性化試験」）、並びに CD20 発現細胞存在下での 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に対するエプコリタマブの誘導活性を示す。

効力を裏付ける試験の in vivo 試験では、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、エプコリタマブ投与によるカニクイザルでの B 細胞数減少作用を示す。

効力を裏付ける試験の in vitro 試験の一環として実施した限られた試験では、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。

本モジュールで使用したエプコリタマブ及び関連する抗体の名称及びコードを Table 1 に示す。

エプコリタマブに関連して実施した効力を裏付ける試験の一覧を Table 2 に示す。

Table 2　効力を裏付ける試験の概要

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Conc./ Dose Level	Parameters Studied	Study No./CTD Location
Generation of Epcoritamab					
Generation and characterization of HuMab-CD20 7D8	KM® mice/ hybridoma generation In vitro	NS/0-CD20 cells (IP [6×], IV [2×])	1×10^7 cells (6× injection) 0.5×10^7 cells (2× injection)	Development of CD20-specific titer in mouse plasma Specific binding of hybridoma clones to CD20 in vitro Cloning of IgG1 CD20 variable heavy and light chain	[GMB3013-028] CTD: 4.2.1.1-1
Generation and characterization of humanized anti-CD3 antibodies	Germline humanization In vitro	3005a	2.5–10 µg/mL	Binding to human and cynomolgus CD3ε (ELISA) Biological activity of plate-bound IgG1-CD3 to IL-2 secretion and proliferation of T cells (ELISA and ^{3}H-incorporation)	[GMB3013-029] CTD: 4.2.1.1-2
Evaluation of the inertness of the Fc region of DuoBody CD3xCD20	In vitro	Epcoritamab, 3001d, 3005a	0.07–20000 ng/mL	Binding to FcγRI (ELISA)	[GMB3013-045] CTD: 4.2.1.1-3
		Epcoritamab	1.28–20000 ng/mL	FcγRIIa and FcγRIIIa binding (ELISA).	
			32–20000 ng/mL	Binding to FcγRIIb (ELISA)	
		3001d, 3005a	6.4–20000 ng/mL[a]	Binding to FcγRIIa, FcγRIIb, and FcγRIIIa (ELISA)	
			32–20000 ng/mL[b]		
			3.2–20000 ng/mL[c]		
		3005a	1–1000 ng/mL	T-cell activation (flow cytometry)	
			0.1–1000 ng/mL	T-cell proliferation (BrdU incorporation assay)	
		Epcoritamab, 3001d	40–30000 ng/mL	C1q binding using Raji cells (flow cytometry)	
			0.5–30000 ng/mL	C1q binding (ELISA)	
		3005a	17–30000 ng/mL	C1q binding using activated CD8+ T cells (flow cytometry)	
		Epcoritamab,	240–125000 ng/mL	Induction of CDC with Daudi cells (viability assay)	
		3001d	27–37500 ng/mL		
		Epcoritamab	937–15000 ng/mL	Human FcRn binding (SPR)	
Target Binding Characterization					
Evaluation of DuoBody-CD3xCD20 target binding in vitro	In vitro	Epcoritamab	1–10000 ng/mL	Binding to Jurkat cells and primary T cells (flow cytometry)	[GMB3013-030] CTD: 4.2.1.1-4
			234–15000 ng/mL	Affinity for soluble, and immobilized CD3ε (BLI)	
		Fab of 3005a	NA	Residues on CD3ε important for binding (crystallography)	
		Epcoritamab	1–10000 ng/mL	Binding to CD20-expressing Daudi cells, binding to (mutant) CD20-transfected HEK293F cells and primary B cells (flow cytometry)	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Conc./ Dose Level	Parameters Studied	Study No./CTD Location
		DuoBody-ctrlxCD20	6700–60000 ng/mL	Binding to CD20-expressing Daudi cells (QCM technology)	
		Epcoritamab	1–100000 ng/mL	Simultaneous binding to CD3+ and CD20+ cells in whole blood (flow cytometry)	
Mechanism of Action and Cytotoxicity					
Evaluation of induction of cytotoxicity by DuoBody-CD3xCD20 in vitro	In vitro	Epcoritamab, 3005a	10^{-5}–10000 ng/mL	T-cell activation using B-cell lines (NFAT-Jurkat reporter assay)	[GMB3013-032] CTD: 4.2.1.1-5
		Epcoritamab	3.3×10^{-6}– 333.3 ng/mL	Activation of primary T cells using B-cell lines and endogenous B cells in PBMCs (flow cytometry)	
		Epcoritamab, 3005a	0.1–1000 ng/mL	Proliferation (BrdU incorporation assay using PBMCs)	
		Epcoritamab, 3005a	1×10^{-7}–10000 ng/mL	Cytotoxicity using Daudi cells and primary T cells (^{51}Cr release)	
		Epcoritamab	3.3×10^{-6}– 333.3 ng/mL	Cytotoxicity using primary T cells, and B-cell lines and PBMCs (flow cytometry)	
		Epcoritamab, 3005a	1×10^{-4}–1000 ng/mL	Cytotoxicity using primary T cells and adherent SK-BR-3 and SK-BR-3-CD20 cells (viability assay)	
Evaluation of Cytokine Release in Whole Blood induced by DuoBody CD3xCD20 ex vivo	Ex vivo	Epcoritamab, 3005a	5.12×10^{-7}–1 µg/mL	Cytokine release in whole blood (ProArray Ultra® assay)	[GMB3013-054] CTD: 4.2.3.7.7-4
In vitro comparison of epcoritamab with analogs of other CD3xCD20 bispecific antibody compounds	In vitro	Epcoritamab, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Roc}$, $bsAb_{Xen}$	1.56–100 nmol/L	Binding to soluble, and immobilized CD3ε (BLI)	[GMB3013-074] CTD: 4.2.1.1-6
			0.4–205 nmol/L	Binding to primary T cells (flow cytometry)	
				Binding to CD20-expressing Daudi cells (flow cytometry)	
			2.28×10^{-8}– 2.28 nmol/L	Activation and cytotoxicity assay on primary T cells and Daudi cells (flow cytometry)	
				Cytokine release in supernatants of Daudi and T-cell coculture (Luminex technology)	
		DuoBody-ctrlxCD20, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Roc}$, $bsAb_{Xen}$	6700–60000 ng/mL	Binding to CD20-expressing Daudi cells (QCM technology)	
Anti-tumor activity of epcoritamab in patient	In vitro	Epcoritamab	10 ng/mL	Cytotoxicity using Daudi and WSU-DLCL2 cells and healthy donor T cells or LN T cells of B-NHL patients (flow	[GMB3013-072] CTD: 4.2.1.1-7

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Conc./ Dose Level	Parameters Studied	Study No./CTD Location
derived samples ex vivo				cytometry)	
	Ex vivo	Epcoritamab	0.03 µg/mL	Cytotoxicity using B-NHL patients cells in the presence of healthy allogeneic PBMCs (flow cytometry)	
				Cytotoxicity using B-NHL patients cells in the presence of LN-residing autologous T cells (flow cytometry)	
Combination of epcoritamab with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) in vitro	In vitro	Epcoritamab	0.00003–333 ng/mL	Effects of the components in CHOP on epcoritamab-induce T-cell activation and T-cell-mediated cytotoxicity using primary T cells and SU-DHL-4 cells (flow cytometry)	[GMB3013-080] CTD: 4.2.1.1-8
		Cyclophosphamide	0.1–10 µg/mL (0.383–38.30 µmol/L)		
		Doxorubicin	0.025–2.5 µg/mL (0.046–4.6 µmol/L)		
		Vincristine	1–100 ng/mL (0.121–12.12 nmol/L)		
		Prednisone	2–200 µg/mL (5.580–557.99 µmol/L)		
Combination of epcoritamab and lenalidomide in vitro	In vitro	Epcoritamab	3.3×10^{-12}–333.3 ng/mL for Daudi cells	Effect of lenalidomide on epcoritamab-induced T-cell activation and T-cell mediated cytotoxicity using primary T cells and CD20-expressing tumor cell lines (flow cytometry)	[GMB3013-082] CTD: 4.2.1.1-9
			3.3×10^{-6}–333.3 ng/mL for other cell lines		
		Lenalidomide	0.0087–0.636 µmol/L for Daudi cells[d]		
			800 µmol/L for other cell lines[d]		
			5 and 50 µmol/L for Daudi cells[e]		
			0.3 and 3 µmol/L for REC-1 cells[e]		
Anti-Tumor Activity in vivo: Mouse Xenograft Models					
Evaluation of the efficacy of DuoBody CD3xCD20 in vivo	NOD-SCID mice	Epcoritamab (IV)	0.005–0.5 mg/kg (single dose)	Tumor growth in mice inoculated with a mixture of Raji-luc cells and huPBMCs, in absence, or presence of IgG1-RTX-FEAR	[GMB3013-033] CTD: 4.2.1.1-10
		Epcoritamab (IV)	0.05 mg/kg (Q1W × 2)		

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Conc./ Dose Level	Parameters Studied	Study No./CTD Location
		IgG1-RTX-FEAR (IV)	0.1–10 mg/kg (single dose)		
	NCG mice	Epcoritamab (IV)	0.05 or 0.5 mg/kg (2Q1W [5 doses in total])	Tumor growth in mice inoculated with JEKO-1 and huPBMCs	
	BRGS-HIS mice Ex vivo	Epcoritamab (IV)	1 mg/kg (2Q1W [2 doses in total]) for Daudi-luc	Tumor growth inoculated with Raji-luc and Daudi-luc B-cell depletion in mice (flow cytometry) T-cell activation in mice (flow cytometry)	
			0.1 or 1 mg/kg (2Q1W [5 doses in total]) for Raji-luc		
	huFcRn Tg32 mice	Epcoritamab (IV)	5 mg/kg (single dose)	PK in non-tumor-bearing mice	
Anti-tumor activity of epcoritamab in a Raji model in HIS mice in vivo	NSG-HIS mice	Epcoritamab (IV)	0.05–5 mg/kg (Q1W × 5)	Tumor growth in mice inoculated with Raji-luc B-cell depletion (flow cytometry) T-cell activation (flow cytometry)	[GMB3013-073] CTD: 4.2.1.1-11
			5 mg/kg (single dose) in late treatment		
Anti-tumor activity of epcoritamab in a patient-derived DLBCL model in vivo	huNOG mice Ex vivo	Epcoritamab (IV)	0.05–5 mg/kg (Q1W × 6)	Tumor growth in mice inoculated with HuPrime® lymphoma xenograft model LY2214 (DLBCL), SC B-cell depletion (flow cytometry) T-cell activation (flow cytometry)	[GMB3013-083] CTD: 4.2.1.1-12
B-cell Depletion in Cynomolgus Monkeys					
Evaluation of B-cell depletion in cynomolgus monkeys treated with DuoBody CD3xCD20	Cynomolgus monkey	Epcoritamab (IV)	0.01, 0.1, 1, or 10 mg/kg (single dose)	B-cell depletion as part of toxicology study (see Module 2.6.6 and 2.6.7, [redacted] 529668)	[GMB3013-035] CTD: 4.2.1.1-13
	Cynomolgus monkey	Epcoritamab (IV or SC)	0.01, 0.1, or 1 mg/kg (IV, Q1W × 4)	B-cell depletion as part of toxicology study (see Module 2.6.6 and 2.6.7, [redacted] 501775)	
			0.01 mg/kg (priming) and 1 mg/kg target dose (IV)		
			0.01, 0.1, 1, 10, or 20 mg/kg (SC, single dose)		
	Cynomolgus monkey	Epcoritamab (IV or SC)	0.01, 0.1, or 1 mg/kg (IV, Q1W × 5)	B-cell depletion as part of toxicology study (see Module 2.6.6 and 2.6.7, [redacted] 503484)	
			0.1 or 1 mg/kg (IV,		

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Conc./ Dose Level	Parameters Studied	Study No./CTD Location
			single dose)		
			0.1, 1, or 10 mg/kg (SC, single dose)		

2Q1W =twice weekly; Ab = antibody; BLI = biolayer interferometry (in binding experiments); B-NHL = B-cell non-Hodgkin lymphoma; BrdU = 5-bromo-2'-deoxyuridine; BRGS = BALB/c *Rag2*^{tm1Fwa} *IL-2Rγc*^{tm1Cgn} *SIRPα*^{NOD}; bsAb = bispecific antibody; bsAbGen = CD3xCD20 bispecific antibody, based on mosunetuzumab; bsAbReg = CD3xCD20 bispecific antibody, based on odronextamab; bsAbRoc = CD3xCD20 bispecific antibody, based on glofitamab; bsAbXen = CD3xCD20 bispecific antibody, based on plamotamab; C1q = complement component 1q; CD = cluster of differentiation; CDC = complement-dependent cytotoxicity; CHOP = cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin (doxorubicin), oncovin (vincristine), prednisone; Conc. = concentration; CTD = common technical document; ctrl = control; Daudi-luc = Daudi cell line transfected with gWIZ luciferase; DLBCL = diffuse large B-cell lymphoma; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; Fab = fragment antigen binding; Fc = fragment crystallizable; FcγR = IgG Fc receptor; FcRn = neonatal Fc receptor; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody® mutations; HEK = human embryonic kidney; HIS = human immune system; hu = human; huNOG = NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac; Ig = immunoglobulin; IgG = immunoglobulin G; IgG1-RTX-FEAR = a rituximab variant with an inert Fc domain and K409R (DuoBody®) mutation; IL = interleukin; IP = intraperitoneal(ly); IV = intravenous(ly); LN = lymph node; NA = not applicable; NCG = NOD-*Prkdc*^{em26Cd52} *Il2rg*^{em26Cd22}/NjuCrl; NFAT = nuclear factor of activated T cells; No. = number; NOD-SCID = nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency; NS/0-CD20 cells = CD20-transfected NS/0 cells; NSG = NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; PK = pharmacokinetic; QCM = quartz crystal microbalance; Q1W = once weekly; Raji-luc = Raji cell transfected with gWIZ luciferase; ROA = route of administration; SC = subcutaneous(ly); SK-BR-3-CD20 = CD20-transfected SK-BR-3 breast cancer cells; SPR = surface plasmon resonance

a Binding to FcγRIIa-131H/R andFcγRIIIa-158F

b Binding to FcγRIIb

c Binding to FcγRIIIa-158V

d Lenalidomide was only present during T-cell activation and T-cell-mediated cytotoxicity assay.

e Either T-cells or target cells were pre incubated with lenalidomide and lenalidomide was present in T-cell activation and T-cell-mediated cytotoxicity assay.

2.1　エプコリタマブの作製

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 bsAb である。エプコリタマブは、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）承認の amivantamab（EGFRxMET bsAb）（Rybrevant, 2021 年 5 月）で使用された Genmab 社の DuoBody® 技術（Labrijn et al, 2013; Labrijn et al, 2014）を用いて作製した。DuoBody 分子は標準型 IgG1 構造及びヒト IgG1 に典型的な生化学的特徴を示す bsAb である。したがって、DuoBody 分子は FcRn に正常に結合し、その結果、IgG1 分子に典型的な比較的長い血漿中半減期を示す。DuoBody 分子は、CH3 ドメインに相補的点突然変異（一方の親 mAb の F405L 及びもう一方の親 mAb の K409R）をそれぞれ含む 2 種類の親 IgG1 mAb から cFAE と呼ばれる工程により作製される。すなわち、親 mAb を別々に作製し、混合し、一定の還元状態にさらすと、還元条件下で親 mAb の鎖間ジスルフィド結合が開裂し、CH3 ドメインの F405L 及び K409R の相補的変異により Fab アームのヘテロ二量体化及び二重特異性分子形成が誘導される。その後の再酸化によるジスルフィド結合の再形成により、標準型 IgG1 構造を有する高純度で安定な bsAb が得られる（Labrijn et al, 2013; Labrijn et al, 2014）。

エプコリタマブは、ヒト型 IgG1κ 抗 CD20 mAb IgG1-7D8（2.1.1 項）及びヒト化 IgG1λ 抗 CD3ε mAb SP34（2.1.2 項）を基盤にし、不活性化 Fc ドメインを得るため、L234F、L235E 及び D265A（FEA）変異を両方の親 mAb の Fc ドメインに導入した。cFAE による CD3xCD20 bsAb の作製を可能にするため、F405L 及び K409R の DuoBody 変異をそれぞれ抗 CD3 及び抗 CD20 mAb に導入した。エプコリタマブは、抗 CD3 親 mAb IgG1-CD3-L234F/L235E/D265A/F405L（IgG1-CD3-FEAL、3005a）及び抗 CD20 親 mAb IgG1-CD20-L234F/L235E/D265A/K409R（IgG1-CD20-FEAR、3001d）の cFAE により作製された。

2.1.1　ヒト型抗 CD20 mAb の作製

[GMB3013-028]

ヒト型 IgG1κ 抗 CD20 mAb IgG1-7D8 は、完全ヒト型免疫グロブリン分子を発現するよう遺伝子操作した KM®マウスに CD20 遺伝子を導入した NS/0 細胞（CD20-transfected NS/0 cells、NS/0-CD20 細胞）を免疫して作製した（Ishida et al, 2002）。[redacted]、[redacted]（略号 [redacted]）及びそれに続く[redacted]の作製工程は、GMB3013-028 試験報告書及び[3.2.S-2.3 項] Source, History and Generation of the Cell Substrate-3001d に記載した。[redacted]は、[redacted]、[redacted]及び[redacted]、並びに抗体の[redacted]に対する[redacted]及び[redacted]との[redacted]に基づいて選択した。

IgG1-7D8 は、エプコリタマブの CD20 結合性 Fab アームとして、抗 CD20 mAb パネルから選択した。IgG1-7D8 は、CD3xCD20 bsAb が関連する CD20 発現細胞に対する細胞傷害活性の in vitro 及び in vivo での誘導活性に基づいて選択した（Engelberts et al, 2020）。

2.1.2 ヒト化抗 CD3 mAb の作製

[GMB3013-029]

カニクイザルの CD3ε と交差反応するマウス抗ヒト CD3ε mAb SP34 のキメラ型［交差反応性抗 CD3 抗体（cross-reactive anti-CD3 antibody one、CACAO）］（WO2007042261）（Salmeron et al, 1991）を生殖細胞系列ヒト化ゲノム編集技術［[redacted]（[redacted]）の[redacted]、[redacted]の[redacted]及び[redacted]］を用いてヒト化した（GMB3013-029 及び[3.2.S-2.3 項] Source, History and Generation of the Cell Substrate-3005a）。ヒト化可変領域遺伝子は、マウス抗 CD3ε mAb の重鎖可変領域（variable region of the immunoglobulin heavy chain、V_H）及び軽鎖可変領域（variable region of the immunoglobulin light chain、V_L）のアミノ酸配列と適正な相同性を有するヒト生殖細胞系列配列に基づいて設計した。[redacted]種類の V_H 及び[redacted]種類の V_L 生殖細胞系列ヒト化 V 領域遺伝子を組み合わせて、V_H 及び V_L 発現ベクターにクローン化し、[redacted]（[redacted]）[redacted]細胞に[redacted]種類の可能な組み合わせで遺伝子を導入した。ヒト化抗ヒト CD3ε V_{H1}/V_{L1} バリアント（IgG1-CD3）は、エプコリタマブに CD3 結合アームを提供するヒト化親 IgG1-CD3-FEAL mAb（3005a）の作製に用いられた。ヒト化抗ヒト CD3ε V_{H1}/V_{L1} バリアント（IgG1-CD3）の選定は、ヒト及びカニクイザル CD3ε 結合活性、並びに[redacted]（[redacted]）の存在下での[redacted]細胞（[redacted]由来細胞株）の[redacted]（[redacted]）[redacted]及び[redacted]の測定による[redacted]の[redacted]に基づいた。IgG1-CD3 はヒト及びカニクイザル CD3ε に結合し、キメラ型 mAb と同様の特性を示した。

IgG1-CD3（-FEAL）の Fab ドメインと CD3ε の N 末端残基を構成する CD3ε-ペプチドとの相互作用を X 線結晶構造解析法により原子分解能で解析した。結晶構造解析により、ヒト化工程中で導入された変異部位は、結晶構造解析モデルで IgG1-CD3 と CD3ε ペプチドとの相互作用部位と空間的に離れており、CD3ε との相互作用アミノ酸残基の構造がヒト化工程中で保存されたことと一致していることが示された（2.2.3 項）。

2.1.3 エプコリタマブの IgG Fc ドメインの不活性化

[GMB3013-045]

活性型 Fc ドメインを有する T 細胞表面抗原 CD3 に特異的な抗体は、FcγR を発現している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。エプコリタマブによる T 細胞の活性化及び細胞傷害作用には CD20 発現標的細胞の存在が必要であることを確実にするために、エプコリタマブの Fc ドメインに不活性変異 L234F、L235E 及び D265A（FEA）を導入して Fc を介したエフェクター機能を抑制した。

エプコリタマブの不活性化 IgG1 Fc ドメインの機能特性を in vitro 試験で評価した結果、エプコリタマブの抗 CD3 親 mAb である IgG1-CD3-FEAL（3005a）は FcγR 結合活性を示さず、また C1q にも結合しないことが示された。さらに、IgG1-CD3-FEAL（3005a）は、FcγR を介した CD3 の架橋による T 細胞媒介性細胞傷害作用及び関連する T 細胞の活性化を誘導しなかった。エプコリタマブの抗 CD20 親 mAb である IgG1-CD20-FEAR（3001d）は、FcγR 結合活性を示さず、

わずかな C1q 結合活性及び CDC 誘導を示した。親抗体の試験結果と一致して、エプコリタマブは FcγR 結合活性を示さず、わずかな C1q 結合活性及び CDC 誘導を示した。さらに、エプコリタマブは FcγR を介した CD3 の架橋による T 細胞活性化及び細胞傷害作用の誘導活性を示さず（2.3.4 項）、エプコリタマブの細胞傷害作用は、CD3 と CD20 の両方への同時結合によってのみ誘導されることが確認された。エプコリタマブの FcRn に対する結合活性は維持された。

個々の試験の詳細を以下に示す。

2.1.3.1　ヒト IgG Fc 受容体（FcγR）に対する結合

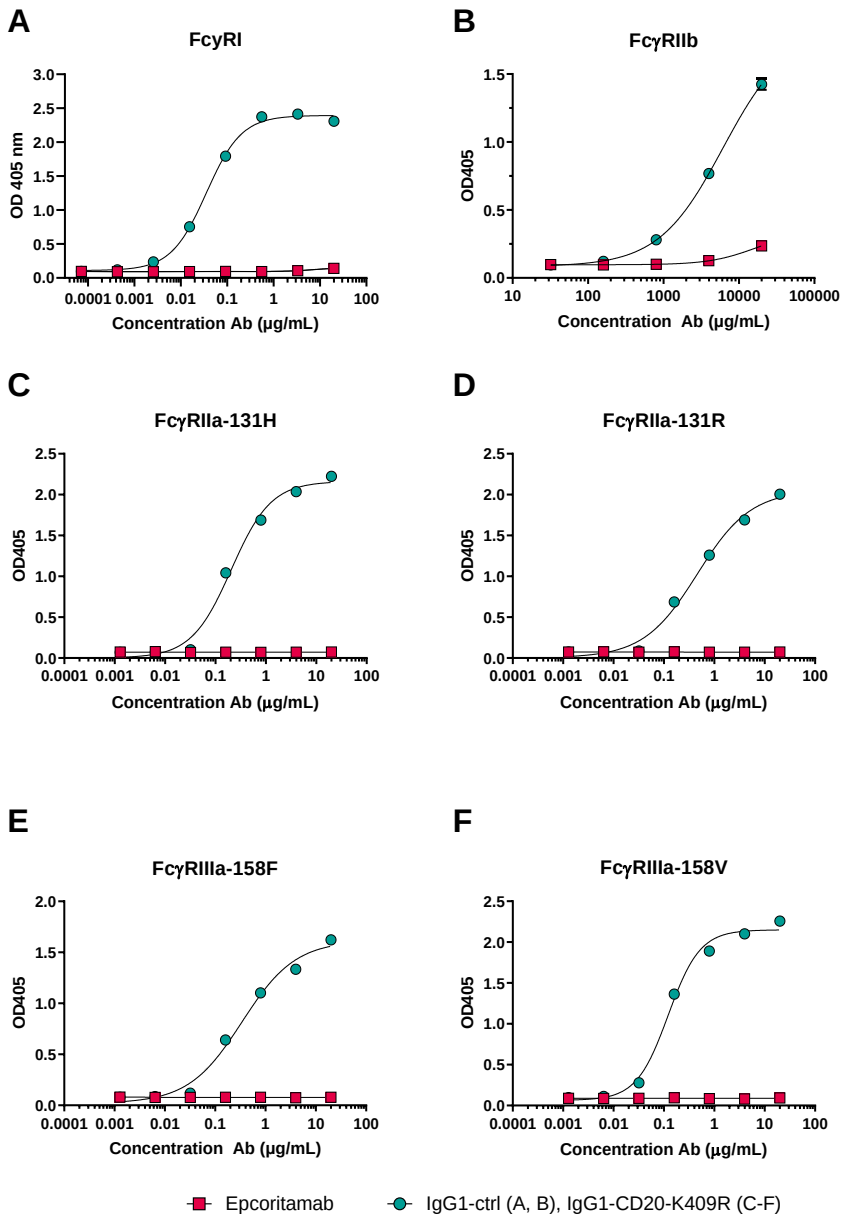
ヒスチジンタグ（histidine tag、His）付きビオチン標識 FcγRI 及び His 付きビオチンアクセプターペプチド（His-tagged, biotin-acceptor-peptide、HisBAP）標識二量体化 FcγR（II 及び III）複合体（Wines et al, 2016）を用いて、固相化した FcγRI 及び FcγRIIb がエプコリタマブと相互作用しないこと、固相化したエプコリタマブが FcγRIIa 及び FcγRIIIa と相互作用しないことが、in vitro 試験でそれぞれ ELISA により示された。さらに、これらの複合体を用いて、親抗体 IgG1-CD3-FEAL（3005a）及び IgG1-CD20-FEAR（3001d）が固相化した FcγRI、FcγRII 及び FcγRIII に結合しないことが示された。

エプコリタマブは、Fc ドメインに不活性化変異を含まない IgG1-対照抗体（control、ctrl）及び IgG1-CD20-K409R とは異なり、FcγRI、FcγRIIb、FcγRIIa-131H/R 及び FcγRIIIa-158F/V に結合しなかった（Figure 1）。これは、エプコリタマブが、これらの FcγRs を架橋して ADCC 及び ADCP などの FcγR を介したエフェクター機能を誘導しないことを示唆している。

エプコリタマブに CD20 及び CD3 結合性 Fab アームを提供する IgG1-CD3-FEAL（3005a）及び IgG1-CD20-FEAR（3001d）は、FcγRI、FcγRIIa/b 及び FcγRIIIa に結合しなかったが、Fc ドメインに不活性化変異を含まない IgG1-ctrl は全ての FcγRs に結合した（Figure 2）。

以上より、これらの試験結果はエプコリタマブが FcγR に結合できないことを示している。

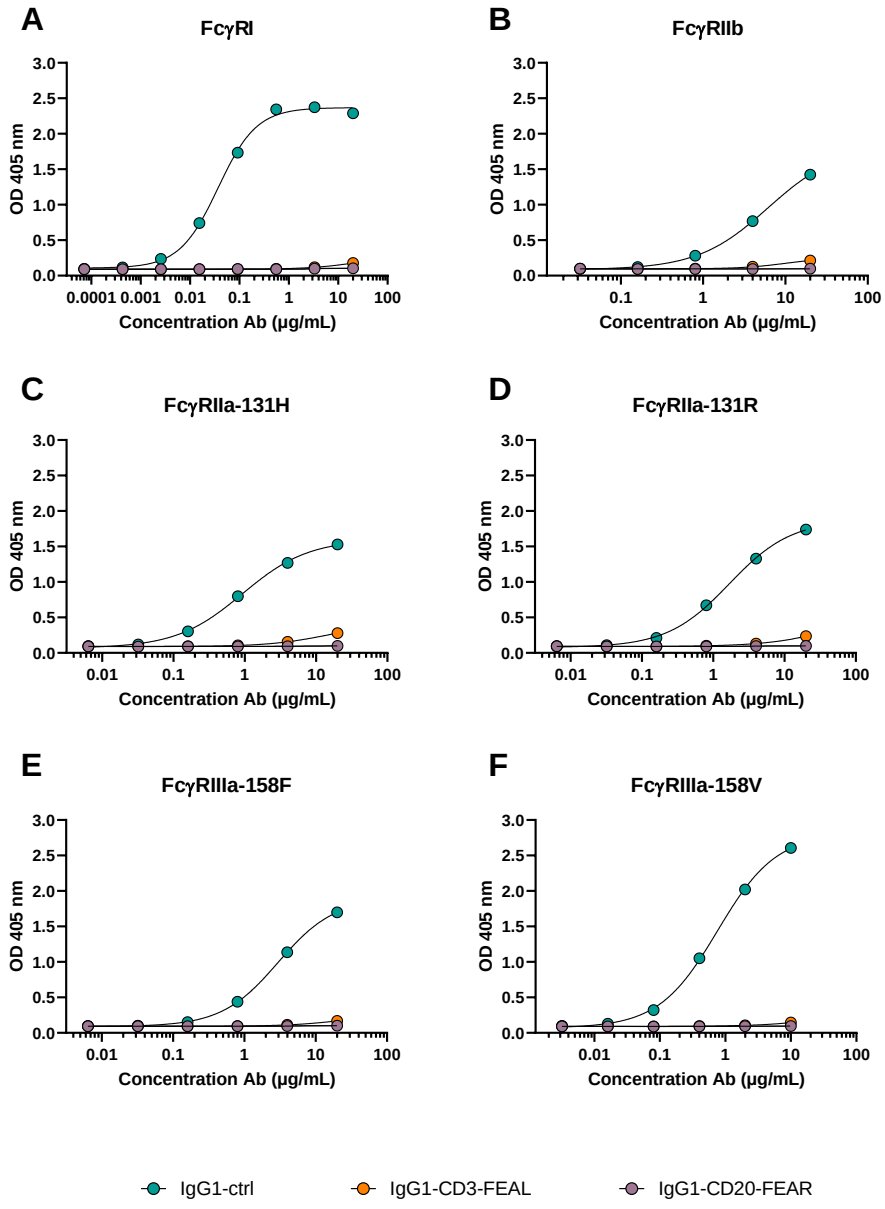
Figure 1　エプコリタマブの FcγRI、FcγRII 及び FcγRIII に対する結合



Ab = antibody; BAP = biotin-acceptor-peptide; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; Fc = fragment crystallizable; FcγR = IgG Fc receptor; Ig = immunoglobulin; OD = optical density; SD = standard deviation

A-B. Binding of FcγRI (**A**) and FcγRIIb (**B**) to the indicated antibodies was determined by ELISA using a His tagged, biotinylated FcγRI construct and a HisBAP dimeric FcγRIIb construct (Wines et al, 2016). Data shown are means ± SD from duplicates in two (**A**) or one (**B**) experiment. **C-F**. Binding of FcγRIIa-131H (**C**), FcγRIIa-131R (**D**), FcγRIIIa-158F (**E**), and FcγRIIIa-158V (**F**) (which represent the most common polymorphisms for FcγRIIa and FcγRIIIa) to the indicated antibodies was determined by ELISA using HisBAP dimeric FcγR constructs (Wines et al, 2016). Data shown are single measurements from one representative experiment out of seven performed. **A-F**. Curves were fitted using nonlinear regression curves: log(agonist) vs response – variable slope (four parameters). Source: GMB3013-045

Figure 2　IgG1-CD3-FEAL（3005a）及び IgG1-CD20-FEAR（3001d）の FcγRI、FcγRII 及び FcγRIII に対する結合



Ab = antibody; BAP = biotin-acceptor-peptide; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; Fc = fragment crystallizable; FcγR = IgG Fc receptor; FEAL = L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody® mutations; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody® mutations; Ig = immunoglobulin; OD = optical density; SD = standard deviation

A-F. Binding of FcγRI (**A**), FcγRIIb (**B**), FcγRIIa-131H (**C**), FcγRIIa-131R (**D**), FcγRIIIa-158F (**E**), and FcγRIIIa-158V (**F**) (which represent the most common polymorphisms for FcγRIIa and FcγRIIIa) to the indicated antibodies was determined by ELISA using His tagged, biotinylated FcγRI, and HisBAP dimeric FcγRII and III constructs (Wines et al, 2016). Data shown are from one experiment and are mean ± SD of duplicates. Curves were fitted using nonlinear regression curves: log(agonist) vs response – variable slope (four parameters). Source: GMB3013 045

2.1.3.2　FcγR を介した CD3 の架橋形成による T 細胞の活性化及び増殖

エプコリタマブの不活性化変異は、FcγR を介した CD3 の架橋形成を抑制し、エプコリタマブによる T 細胞の活性化及び細胞傷害作用には CD20 が不可欠であることを確実にするために導入

した。不活性化変異により FcγR を介した CD3 の架橋形成とそれに続く T 細胞の活性化及び増殖の抑制を確認するために、種々の機能アッセイを実施した。エプコリタマブによる T 細胞媒介性細胞傷害作用の誘導に CD20 と CD3 の両方への同時結合が必要であることは、2.3.4 項で評価した。

T 細胞の活性化は、PBMC を抗体段階希釈液（1×10^{-3}~1 μg/mL）と 16~24 時間インキュベートし、CD28 発現 T 細胞の初期活性化マーカーである CD69 発現量の増加を測定することにより評価した（2.3.1.2 項参照）。T 細胞の増殖は、PBMC を抗体段階希釈液（1×10^{-4}~1 μg/mL）と 72 時間インキュベートした後、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン（5-bromo-2'-deoxyuridine、BrdU）取り込み量を ELISA で測定することにより評価した（2.3.2 項参照）。

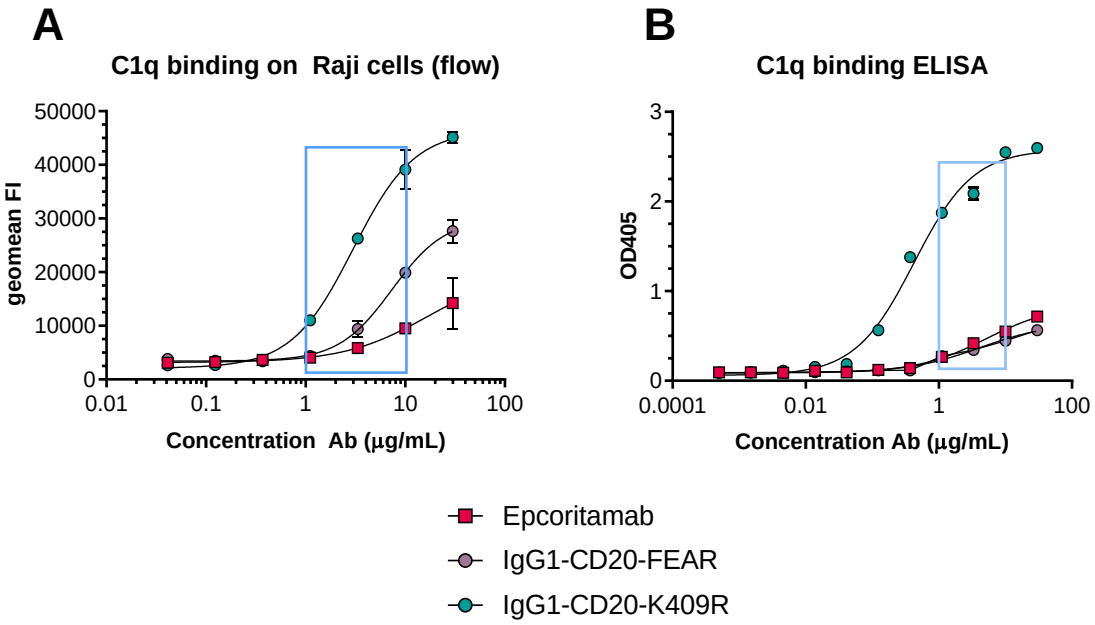
PBMC には CD3 及び CD20 発現細胞の両方が存在し、標的非依存性の T 細胞の活性化及び増殖を測定することは不可能である。したがって、PBMC で FcγR を介した CD3 の架橋形成並びにその後の T 細胞の活性化及び増殖に対する不活性化変異の影響をエプコリタマブを用いて評価することはできないため、試験は CD3 に特異的なエプコリタマブの親 mAb である IgG1-CD3-FEAL（3005a）を用いて行った。IgG1-CD3-FEAL（3005a）は PBMC の T 細胞の活性化及び T 細胞の増殖を誘導しなかった。一方、FEA 不活性化変異を同様に有するエプコリタマブは、予想通り PBMC の T 細胞の濃度依存的な増殖を誘導した。

以上より、FEA 不活性化変異により、エプコリタマブ及び抗 CD3 親 mAb IgG1-CD3-FEAL（3005a）などの抗 CD3（二重特異性）抗体分子では、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、増殖及び細胞傷害作用の誘導活性が抑制されることが示された。

2.1.3.3　補体成分 C1q との相互作用

Raji 細胞（ヒト BL 細胞株）表面に結合したエプコリタマブの C1q 結合活性をフローサイトメトリー法で評価した（Figure 3A）。C1q は、Raji 細胞表面に結合した不活性化変異を含まない IgG1-CD20-K409R に対して効率的な結合活性を示したが、臨床的に意義のある濃度（1～10 μg/mL、GCT3013-01 first-in-human 試験、[2.7.2]）では、Raji 細胞表面に結合したエプコリタマブに対する C1q 結合はわずかであった。C1q は効率的な IgG1-CD20-K409R 結合活性を示したが、固相化エプコリタマブの C1q 結合活性を ELISA で測定した結果（Figure 3B）、臨床的に意義のある濃度では、エプコリタマブに対する C1q 結合はわずかであった。IgG1-CD20-FEAR（3001d）は、細胞に基づいたフローサイトメトリーアッセイで IgG1-CD20-K409R とエプコリタマブの中間の C1q 結合活性を示し、ELISA ではわずかな C1q 結合活性を示した（Figure 3）。

Figure 3　エプコリタマブ及び IgG1-CD20-FEAR（3001d）の C1q 結合



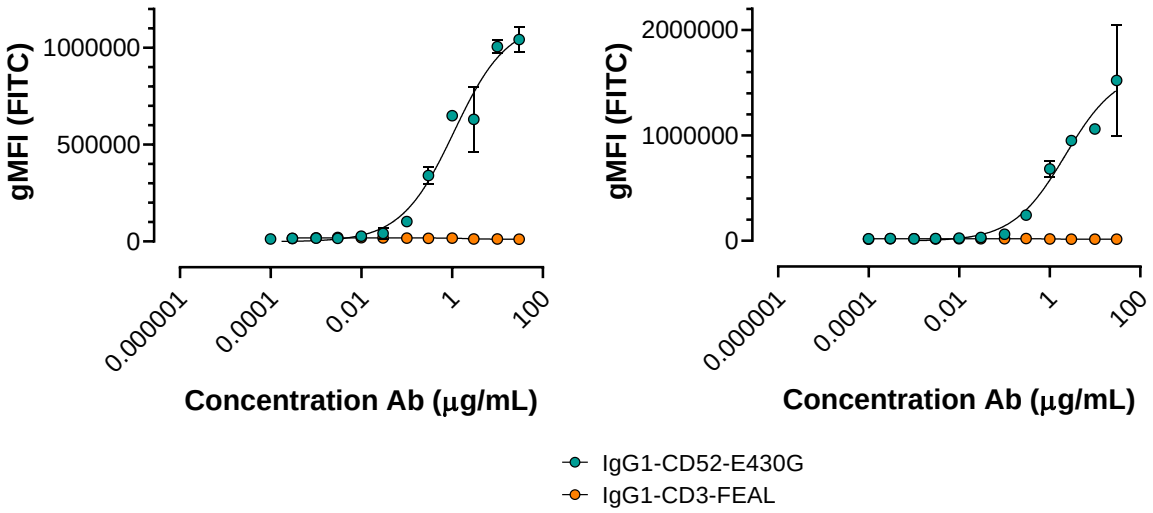
Ab = antibody; CD = cluster of differentiation; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody® mutations; FI = fluorescence intensity; Ig = immunoglobulin; SD = standard deviation

A. Binding of C1q to membrane-bound antibodies on Raji cells was determined by flow cytometry. Data shown are average geomean FI of duplicates ± SD from one representative experiment out of three performed. Curves were fitted using non linear regression curves: log(agonist) vs response – variable slope (four parameters). B. C1q binding to immobilized epcoritamab and CD20 antibodies IgG1-CD20-FEAR (3001d) and IgG1-CD20-K409R was measured by ELISA. Data shown are mean ± SD of duplicates from one representative experiment out of three experiments performed. Curves were fitted using nonlinear regression curves: log(agonist) vs response – variable slope (four parameters). Blue boxes indicate clinically relevant concentrations of epcoritamab (1-10 µg/mL, GCT3013-01, [2.7.2]). Source: GMB3013-045

活性化した CD8 陽性 T 細胞表面に結合した IgG1-CD3-FEAL（3005a）の C1q 結合活性をフローサイトメトリー法で評価した。C1q は陽性対照抗体である IgG1-CD52-E430G［E430 の変異は、抗体のヘキサマー形成、C1q 結合活性及び CDC 誘導を増強する変異（de Jong et al, 2016）、CD52 は成熟リンパ球の表面抗原］に対して結合活性を示したが、IgG1-CD3-FEAL（3005a）に対しては結合活性を示さなかった（Figure 4）。

以上より、エプコリタマブは、C1q に効果的に結合できないことが示された。

Figure 4　IgG1-CD3-FEAL（3005a）の C1q 結合



Ab = antibody; CD = cluster of differentiation; FEAL = L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody® mutations; FITC = fluorescein isothiocyanate; gMFI = geometric mean fluorescence intensity; Ig = immunoglobulin; SD = standard deviation

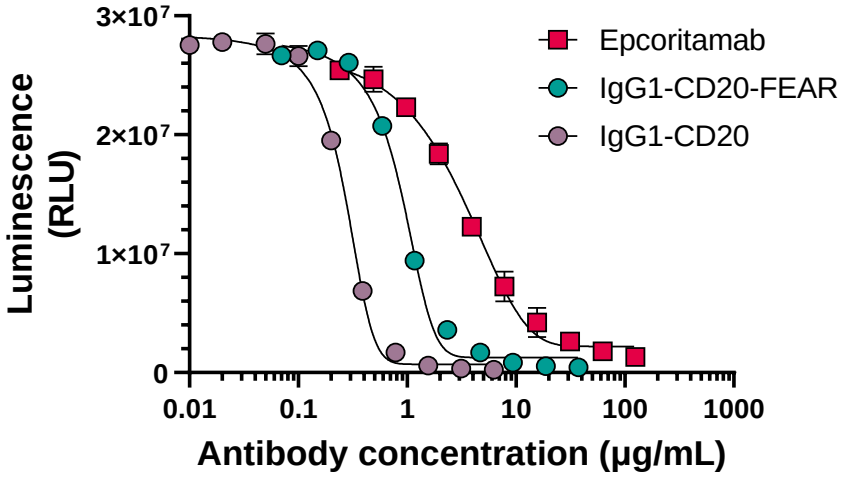
Binding of C1q to membrane-bound antibodies on activated CD8+ T cells was determined by flow cytometry. Data shown are average gMFI of duplicates ± SD for two donors (left and right graphs each represent one donor) from one representative experiment out of three performed. Curves were fitted using non linear regression curves: log(agonist) vs response – variable slope (four parameters). Source: GMB3013-045

2.1.3.4　CD20 発現細胞に対する補体依存性細胞傷害（CDC）作用

不活性化変異により IgG1-CD3-FEAL（3005a）では C1q 結合活性は全く認められず、IgG1-CD20-FEAR（3001d）及びエプコリタマブの C1q 結合活性は著しく低下した。次に IgG1-CD20-FEAR（3001d）及びエプコリタマブによる CDC の誘導を、CD20 発現 Daudi 細胞（ヒト BL 細胞株）を標的細胞として用いて CDC アッセイで評価した。IgG1-CD3-FEAL（3005a）による CDC の誘導は、IgG1-CD3-FEAL（3005a）に C1q 結合活性が認められなかったため検討しなかった。

IgG1-CD20 は Daudi 細胞の効率的な CDC 誘導活性を示したが、エプコリタマブによる CDC 誘導はわずかであった（EC_{50} 値に基づき、IgG1-CD20 と比較して 7%）（Figure 5）。IgG1-CD20-FEAR（3001d）は、エプコリタマブの臨床的に意義のある濃度の 1~10 μg/mL で CDC 誘導活性の低下を示した（IgG1-CD20 と比較して 30%）。

Figure 5　エプコリタマブ及び IgG1-CD20-FEAR（3001d）による CDC の誘導



CD = cluster of differentiation; CDC = complement-dependent cytotoxicity; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody® mutations; Ig = immunoglobulin; RLU = relative light units

Induction of CDC by epcoritamab, IgG1-CD20-FEAR (3001d), and IgG1-CD20 was measured in a CDC assay with CD20 expressing Daudi cells as target cells. Data shown are mean RLU ± SD of triplicates, representing viable cells, from one representative experiment out of three performed. Source: GMB3013-045

2.1.3.5　胎児性 Fc 受容体（FcRn）に対する in vitro での結合

IgG はエンドソームの酸性（pH 6.0）条件で FcRn に結合し、中性 pH（pH 7.4）条件で FcRn から解離する（Roopenian and Akilesh, 2007）。この pH 依存性の FcRn に対する抗体の結合活性は、FcRn と共に抗体リサイクルを引き起こし、細胞内での抗体の分解を防ぎ、ヒト IgG1 の長い血漿中半減期に不可欠である（Tam et al, 2013）。表面プラズモン共鳴法（surface plasmon resonance、SPR）により FcRn 結合親和性に対するエプコリタマブの Fc ドメインに導入した変異の影響を評価した（GMB3013-045）。

エプコリタマブは、pH 6.0 でヒト FcRn に対して濃度依存的な結合を示した（K_D 36.7 nmol/L）が、pH 7.4 では結合は認められなかった。IgG1 の FcRn 結合親和性 K_D は、30~80 nmol/L と報告されている。試験結果よりエプコリタマブの Fc ドメインの不活性化変異が FcRn 結合に影響しないことが確認された。これは、マウス FcRn 発現を欠く、ヒト FcRn をヘミ接合型遺伝子導入した hFcRn-Tg32 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ヒト IgG1 対照抗体と類似したことからも支持された（[GMB3013-033]）。

2.2　エプコリタマブの in vitro での標的結合特性

[GMB3013-030]

エプコリタマブの CD3 及び CD20 に対する標的結合特性を評価した。CD3 に対する結合特性は、フローサイトメトリー法（2.2.1 項）及びバイオレイヤー干渉法（2.2.2 項）で解析した。抗体-ペプチド複合体で近接している抗体及び CD3ε ペプチドのアミノ酸残基は、結晶構造解析法で解析した（2.2.3 項）。CD20 に対する結合特性は、フローサイトメトリー法（2.2.4 項）及び水

晶振動子マイクロバランス（quartz crystal microbalance、QCM）技術（2.2.5 項）で解析した。エプコリタマブの結合に関与する CD20 アミノ酸残基は、CD20 変異体を発現した HEK293F 細胞を用いたフローサイトメトリー法で解析した（2.2.6 項）。エプコリタマブの CD3 発現 T 細胞及び CD20 発現 B 細胞に対する同時結合活性は、全血を用いてフローサイトメトリー法で解析した（2.2.7 項）。

非臨床薬理試験で使用したエプコリタマブの研究用グレードバッチ（被験物質 2*）及び[redacted]UK 社で製造された臨床用グレードバッチ（ 被験物質 1* ）の結合特性をフローサイトメトリー法で比較した結果、細胞表面に発現した CD3 及び CD20 の両方に対する両バッチの結合特性は類似した。

2.2.1　CD3 発現細胞に対する結合

CD3 発現 CD20 陰性 Jurkat 細胞及び健康ヒト由来のバフィーコートから新鮮分離したヒト初代培養 T 細胞（総 T 細胞、並びに CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞サブセット）に対するエプコリタマブの結合活性をフローサイトメトリー法で評価した。細胞をエプコリタマブ段階希釈液（0.001~10 µg/mL）とインキュベートした後、ヤギ抗ヒト IgG の R-フィコエリスリン（phycoerythrin、PE）標識 $F(ab')_2$ フラグメントとインキュベートし、iQue®スクリーナー又は BD LSRFortessa™フローサイトメーターで解析した。

エプコリタマブは、濃度依存的に健康ヒト由来の新鮮分離 CD3 発現 CD20 陰性 T 細胞に結合し、EC_{50} 値（見かけの親和性）は 0.71 µg/mL（4.73 nmol/L）であった。EC_{50} 値は、CD4 陽性初代培養 T 細胞、CD8 陽性初代培養 T 細胞及び Jurkat 細胞で同程度であった（Table 3）。

Table 3　エプコリタマブの CD3 発現細胞に対する結合活性の平均 EC_{50} 値

Jurkat (n = 11) EC_{50}		Healthy donor T cells					
		T cells (n = 7) EC_{50}		CD4+ T cells (n = 6) EC_{50}		CD8+ T cells (n = 7) EC_{50}	
µg/mL [SD]	nmol/L [SD]	µg/mL [SD]	nmol/L [SD]	µg/mL [SD]	nmol/L [SD]	µg/mL [SD]	nmol/L [SD]
0.24 [0.11]	1.60 [0.73]	0.71 [0.37]	4.73 [2.47]	0.88 [0.41]	5.87 [2.73]	0.70 [0.33]	4.67 [2.20]

CD = cluster of differentiation; EC_{50} = 50% effective concentration; n = number of experiments/donors; SD = standard deviation

Source: GMB3013-030

2.2.2　可溶性及び固相化 CD3ε に対する結合親和性

可溶性及び固相化遺伝子組換えヒト CD3ε に対するエプコリタマブの結合カイネティクスを、ForteBio 社製 Octet®HTX システムを用いバイオレイヤー干渉法で解析した。

2.2.2.1　可溶性 CD3ε に対する結合

抗ヒト Fc 捕捉バイオセンサーを 1 µg/mL のエプコリタマブに 600 秒間浸した。ベースラインを安定化（200 秒間）後、1.4~1000 nmol/L の CD3E27-GSKa（エプコリタマブの CD3 結合性 Fab

アームに対する結合領域を含むヒト CD3ε の 1~27 位アミノ酸配列に C 末端 Cys を削除した κ 軽鎖を結合）に対する結合（1000 秒間）及び解離（2000 秒間）を測定した。エプコリタマブの可溶性 CD3ε に対する結合親和性 K_D 値は、12.5 ± 2.1 nmol/L（2 回の試験に基づく）であった。

2.2.2.2　固相化 CD3ε に対する結合

抗 Penta-HIS（HIS1K）捕捉バイオセンサーを 5 μg/mL の遺伝子組換え CD3ε 細胞外ドメイン［CD3ε-ECDHis、ヒト CD3ε の 22~130 位アミノ酸配列にヒスチジンタグ（histidine tag、His）を結合］に浸した。ベースラインを安定化（500 秒間）後、エプコリタマブの結合（200 秒間、1.56~100 nmol/L）及び解離（1000 秒間）を測定した。エプコリタマブの固相化 CD3ε に対する結合親和性 K_D 値は、16.0 nmol/L であった。

2.2.3　エプコリタマブの抗 CD3 Fab フラグメント及び CD3ε ペプチドの X 線結晶構造解析

結晶構造解析試験では、[redacted] CD3ε の [redacted] アミノ酸ペプチド（[redacted]、[redacted]）を用いた。[redacted] 及び [redacted] アミノ酸ペプチドの両方を合成し、結合活性を競合 ELISA で評価した結果（データ不掲載）、[redacted] ペプチドはエプコリタマブ由来の抗 CD3 Fab フラグメント［IgG1-CD3-FEAL（3005a）から得た］に対して [redacted] ペプチドより高親和性で結合し、[redacted] ペプチドより均一であったため、[redacted] ペプチドを結晶構造解析試験に用いることを選択した。

CD3ε ペプチドを結合した抗 CD3 Fab フラグメントの結晶構造を、2.75 Å の分解能で解析した。最大距離 3.9 Å で近接した抗体フラグメントと CD3ε ペプチドのアミノ酸残基を同定した。試験結果に基づいて、抗 CD3 Fab フラグメント軽鎖の [redacted]、[redacted] 及び [redacted]、重鎖の [redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted] 及び [redacted]、並びにヒト CD3ε ペプチドの [redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted] 及び [redacted] が、CD3ε ペプチドと抗体フラグメントの結合に関与すると判断された。

2.2.4　CD20 発現細胞に対する結合

CD20 発現 CD3 陰性ヒト BL 細胞株 Daudi 細胞及び CD20 遺伝子を導入した HEK293F 細胞（CD20-transfected HEK293F cells、HEK-CD20）に対するエプコリタマブの結合活性をフローサイトメトリー法で評価した。細胞をエプコリタマブの段階希釈液（0.001~10 μg/mL）とインキュベート後、ヤギ抗ヒト IgG の R-PE 標識 $F(ab')_2$ フラグメントとインキュベートし、iQue®スクリーナー又は BD LSRFortessa™フローサイトメーターで解析した。

エプコリタマブは CD20 発現 Daudi 細胞に濃度依存的に結合し、EC_{50} 値（見かけの親和性）は 1.56 μg/mL（10.40 nmol/L）であった。CD20 遺伝子を導入した CD3 陰性 HEK-CD20 細胞に対する EC_{50} 値も同程度であった（Table 4）。

Table 4　エプコリタマブの CD20 発現細胞に対する結合活性の平均 EC_{50} 値

Cell line			
Daudi (n=8) **EC_{50}**		**HEK-CD20 (n=7)** **EC_{50}**	
µg/mL [SD]	nmol/L [SD]	µg/mL [SD]	nmol/L [SD]
1.56 [1.90]	10.40 [12.67]	0.36 [0.20]	2.40 [1.31]

CD = cluster of differentiation; EC_{50} = 50% effective concentration; HEK = human embryonic kidney; n = number of experiments; SD = standard deviation

Source: GMB3013-030

2.2.5　CD20 発現細胞に対する結合親和性

バイオレイヤー干渉法又は SPR を用いた親和性測定は、CD20 に対する結合に細胞表面に発現した CD20 でのみ維持される高次構造エピトープが必要であるため不可能であった。したがって、CD20 発現細胞に対するエプコリタマブの結合カイネティクスは、エプコリタマブと同一の CD20 結合性 Fab アームを有しエプコリタマブの CD20 結合特性を評価するバリアントとして使用することが可能である DuoBody-ctrlxCD20 を用いた QCM 技術で解析した（2.1.1 項参照）。インゲンマメ白血球凝集素（*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin、PHA-L）レクチンでコーティングした Attana Cell™200 バイオセンサー低非特異的結合（low nonspecific binding、LNB）-カルボン酸表面センサーチップに 100000 個の Daudi 細胞を捕捉させ、抗体（6.7~60 µg/mL）を注入し、300 秒間測定した。DuoBody-ctrlxCD20 は、CD20 発現細胞と安定した 1：1 の相互作用を示した。QCM 解析によるエプコリタマブの CD20 発現細胞に対する結合親和性 K_D 値は、5.4 nmol/L であった。

2.2.6　エプコリタマブとの結合に関与する CD20 アミノ酸残基

エプコリタマブとの結合に関与する CD20 アミノ酸残基を、部位特異的変異導入により作製した CD20 変異体（Y77S-N163D、Y77S-N166D 及び N163D-N166D）遺伝子を導入した HEK293F 細胞を用い、フローサイトメトリー法（2.2.4 項参照）で解析した。エプコリタマブとの結合に CD20 の細胞外小ループのアミノ酸 Y77、細胞外大ループのアミノ酸 N163 及び N166 が重要であると判断され、これはエプコリタマブに Fab アームを提供した元の抗 CD20 mAb（IgG1-CD20）及びエプコリタマブの親 mAb IgG1-CD20-FEAR（3001d）との結合に関与するアミノ酸残基と一致した［(Teeling et al, 2006)、データ不掲載］。

2.2.7　CD3 発現 T 細胞及び CD20 発現 B 細胞に対する同時結合活性

CD3 発現 T 細胞及び CD20 発現 B 細胞に対するエプコリタマブの同時結合活性を全血で評価した。ヘパリン処理した血液をエプコリタマブ（0.001~100 µg/mL）と 2 時間インキュベートした。インキュベート後、細胞を PE 標識抗ヒト CD4 抗体及び CD8 抗体並びにアロフィコシアニン（allophycocyanin、APC）標識抗ヒト CD19（B 細胞表面抗原）抗体で染色して、それぞれ CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞及び B 細胞を同定した。標識検体は、蛍光活性化細胞選別法（fluorescence-activated cell sorting、FACS）Canto™ II フローサイトメーターで解析した。一定容量を測定し、CD4 陽性 CD19 陽性細胞又は CD8 陽性 CD19 陽性細胞の二重陽性細胞数を

CD4/CD19 及び CD8/CD19 の 4 象限分析により定量化した。エプコリタマブの存在下でのみ、CD4 陽性 CD19 陽性細胞及び CD8 陽性 CD19 陽性細胞の二重陽性細胞集団が認められた。これらの二重陽性細胞集団は T 細胞と B 細胞の Doublet 接着を意味し、エプコリタマブが B 細胞及び CD4 陽性 T 細胞又は CD8 陽性 T 細胞に同時に結合していることを示している。Doublet 接着の出現率は bsAb 濃度に依存し、ベル型曲線を示した。高濃度の bsAb では、Doublet 接着形成の減少が認められた。これは、CD3 及び CD20 分子に対して bsAb が過剰であることが原因で、CD3 又は CD20 発現細胞それぞれに bsAb の一価結合がもたらされ、Doublet 接着形成が減少した可能性が高いと考えられる。オファツムマブ（抗ヒト CD20 mAb）及び DuoBody-CD3xctrl では、Doublet 接着は認められなかった。これらは、それぞれ CD20 及び CD3 にのみ結合する。

2.3　In vitro 及び ex vivo での作用機序及び細胞傷害作用

In vitro 及び ex vivo 試験で、エプコリタマブによる T 細胞活性化及び細胞傷害作用の誘導活性を評価した（[GMB3013-032]及び[GMB3013-054]）。試験では、Jurkat T 細胞又は新鮮分離ヒト末梢血 T 細胞をエフェクター細胞として使用した。4 種類の異なる B 細胞性リンパ腫型［MCL（2 種類）、ABC-DLBCL（3 種類）、GCB-DLBCL（6 種類）及び BL（1 種類）細胞株］に由来する種々の CD20 発現リンパ腫細胞株、CD20 を過剰発現する接着性非 B 細胞株［CD20 遺伝子を導入したヒト乳癌 SK-BR-3 細胞（CD20-transfected human breast cancer SK-BR-3 cells、SK-BR-3-CD20）、細胞あたり 100000 分子超の特異抗体結合活性（specific antibody-binding capacity、sABC）を示す CD20 を発現］及び健康ヒト由来の B 細胞を標的細胞として使用した。フローサイトメトリー法で定量解析した細胞株の CD20 発現量は、細胞あたり 33000～350000 分子の変動幅を示した（Table 5）。

Table 5　In vitro 試験で使用した CD20 発現細胞株の特徴

Cell line		CD20 expression level (Number of molecules/cell)			Cytotoxicity EC_{50} (pg/mL)	
Name	Lymphoma type	Average	Range	Number of tests	Average [SD]	Number of donors
OCI-Ly7	GCB-DLBCL	350000	209000-453000	6	531 [813]	3
Daudi	BL	331000	97000-752000	11	39 [22]	11
SU-DHL-4	GCB-DLBCL	308000	101000-715000	7	31 [0]	2
RI-1	ABC-DLBCL	240000	150000-356000	4	66 [83]	6
JEKO-1	MCL	233000	159000-276000	3	89 [33]	4
WSU-DLCL2	GCB-DLBCL	233000	144000-330000	4	116 [30]	4
U-2932	ABC-DLBCL	180000	85000-241000	4	67604 [114929]	4
OCI-Ly18	GCB-DLBCL	166000	84000-237000	4	57 [42]	3
RC-K8	ABC-DLBCL	139000	78000-223000	4	743 [673]	2

Cell line		CD20 expression level (Number of molecules/cell)			Cytotoxicity EC_{50} (pg/mL)	
Name	Lymphoma type	Average	Range	Number of tests	Average [SD]	Number of donors
Z-138	MCL	90000	53000-114000	5	57 [23]	2
OCI-Ly19	GCB-DLBCL	36000	0-62000	4	181 [86]	2
SU-DHL-8	GCB-DLBCL	33000	0-88000	8	195	1

ABC-DLBCL = activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma; BL = Burkitt lymphoma; CD = cluster of differentiation; DLBCL = diffuse large B-cell lymphoma; EC_{50} = 50% effective concentration; GCB-DLBCL = germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma; MCL = mantle-cell lymphoma; SD = standard deviation

Source: GMB3013-032

2.3.1　T 細胞の活性化

[GMB3013-032]

2.3.1.1　Jurkat レポーターアッセイ

T 細胞の活性化は、活性化 T 細胞核因子（nuclear factor of activated T cells、NFAT）の活性化などの T 細胞受容体（T-cell receptor、TCR）-CD3 複合体の下流シグナル伝達により誘導される。エプコリタマブが CD3 の下流シグナル伝達を誘導することを示すために、NFAT 応答エレメントの制御下でルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現する GloResponse™ NFAT-Luc2 Jurkat T 細胞を用いて、エプコリタマブの NFAT 活性化能を評価した。NFAT 依存性のルシフェラーゼ活性は、T 細胞活性化の代替測定法と考えることができる。レポーター遺伝子を導入した Jurkat レポーターT 細胞は、エプコリタマブ又は対照抗体の段階希釈液（1×10^{-8}~10 µg/mL）及び CD20 発現標的細胞［エフェクター細胞：標的細胞比（effector cell to target cell ratio、E:T 比） = 3:4］と 24 時間インキュベートした。その後ルシフェラーゼの基質を添加し、発光量を測定した。

エプコリタマブは、CD20 発現 Daudi BL 細胞の存在下で、Jurkat レポーターT 細胞のルシフェラーゼ活性を濃度依存的に誘発した（Figure 6A）。一方、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）、高濃度でわずかな活性が測定されたのみであった。さらにエプコリタマブは、CD20 発現細胞の非存在下では T 細胞の活性化を誘導せず（Figure 6B）、エプコリタマブによる T 細胞の活性化に CD20 に対する結合が不可欠であることが確認された。抗 CD3 親 mAb である IgG1-CD3-FEAL（3005a）は、Daudi 細胞の存在下及び非存在下いずれでも T 細胞の活性化を誘導しなかった（Figure 6）。Daudi 細胞存在下のエプコリタマブによる Jurkat 細胞の NFAT 活性化に対する EC_{50} 値は、0.093 ± 0.053 pmol/L であった（2 回の試験に基づく）。

エプコリタマブはまた、CD20 発現 Daudi 細胞以外の他の 10 種類のヒト B 細胞性リンパ腫細胞株の存在下で、Jurkat レポーターT 細胞の NFAT 活性化を誘導した（Table 5 の細胞株情報参照）。

2.3.1.2　T 細胞表面の CD69、CD25 及び PD-1 の発現量の増加

T 細胞の活性化は、T 細胞活性化マーカーである CD69、CD25（T 細胞の後期活性化マーカー）及びプログラム細胞死-1（programmed cell death protein 1、PD-1）の発現量の増加をフローサイトメトリー法で解析して更に評価した。健康ヒト由来のバフィーコートから新鮮分離した T 細胞を、エプコリタマブ又は対照抗体の段階希釈液（0.33×10^{-6}~0.33 μg/mL）及び CD20 発現標的細胞と 40 時間インキュベートした（E:T 比 ＝2:1）。あるいは、健康ヒト由来のバフィーコートから新鮮分離した PBMC（CD3 発現 T 細胞及び CD20 発現標的 B 細胞の両方を E:T 比 ≒ 5:1 で含む）を、エプコリタマブ又は対照抗体の段階希釈液（0.33×10^{-6}~0.33 μg/mL）と 72 時間インキュベートした。エプコリタマブは、CD69（Figure 6C、D）、CD25 及び PD-1 を発現する CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の割合を濃度依存的に増加させた。エプコリタマブの CD3 結合アーム又は CD20 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ると（それぞれ DuoBody-ctrlxCD20 及び DuoBody-CD3xctrl）、T 細胞活性化マーカーの発現量の増加は、前者では全く認められず、後者では大幅な抑制が認められた。以上より、エプコリタマブは CD3 と CD20 の両方に同時結合することにより T 細胞の活性化を効果的に誘導することが示された。

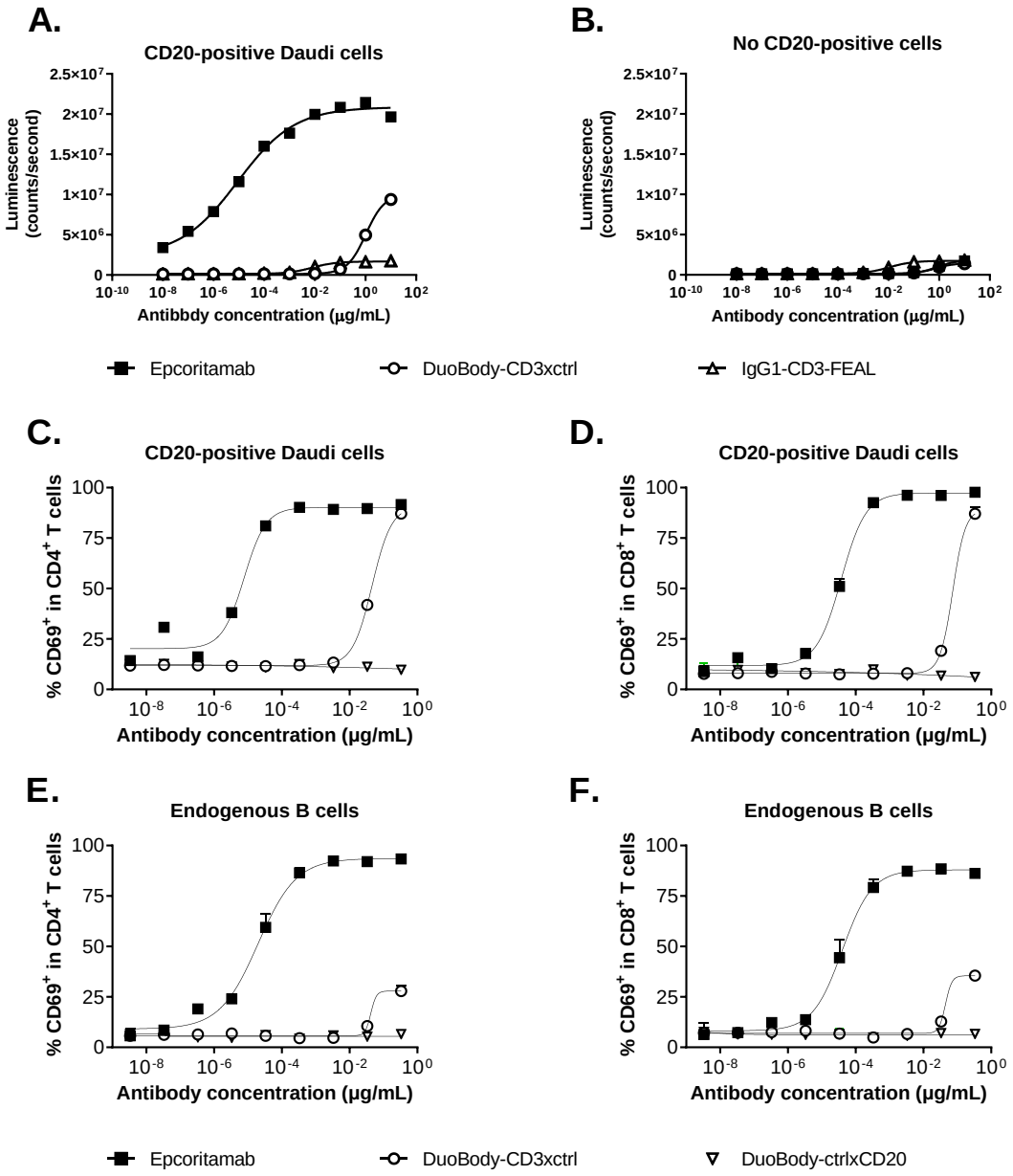
エプコリタマブはまた、検討した他の 11 種類のヒト CD20 発現 B 細胞性リンパ腫細胞株（Table 5 の細胞株情報参照）の存在下で、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞表面の CD69、CD25 及び PD-1 の発現量の増加を誘導した。さらにエプコリタマブは、CD3 発現エフェクターT 細胞及び CD20 発現標的細胞の両方を含む PBMC の T 細胞を活性化した。（Figure 6E、F）。

エプコリタマブによる CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化に対する 20%効果濃度（20% effective concentration、EC_{20}）及び EC_{50} 値を、4 パラメーター非線形回帰分析（GraphPad Prism 7.02、数式 log(agonist) vs. 反応－可変傾斜）により、3 種類の T 細胞活性化マーカーそれぞれに対して推定した。エプコリタマブによる T 細胞活性化に対する EC_{20} 及び EC_{50} 値は、CD20 陽性細胞存在下で CD69、CD25 及び PD-1 に対してピコモル未満~低ピコモルの範囲であり、概して、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞で同程度であった（Table 6、Table 7、Table 8 及び Table 9）。エプコリタマブによる CD8 陽性 T 細胞の CD69 の発現量の増加に対する EC_{50} 値は、Daudi 細胞存在下で 0.167 ± 0.133 pmol/L（25 ± 20 pg/mL）であり、健康ヒト由来の PBMC の B 細胞存在下で 0.973 ± 1.073 pmol/L（146 ± 161 pg/mL）であった。他の CD20 発現細胞株存在下のエプコリタマブによる T 細胞の活性化に対する EC_{50} 値も同程度であった。EC_{50} 値と細胞表面の CD20 分子数との間に相関関係は認められなかった。しかし、T 細胞の最大 CD69 陽性活性化率（S 曲線の y 軸幅を測定）は、CD20 発現分子数に依存した。T 細胞の最大 CD69 陽性率は、細胞あたり 100000 超の CD20 分子を有する細胞株では差は認められなかったが、おおよそ 100000 未満に低下すると T 細胞の最大活性化率は減少した。T 細胞の最大 CD25 陽性又は PD-1 陽性活性化率と細胞あたりの CD20 発現量との間に相関関係は認められなかった。CD69 の発現量の増加は、3 時間後に既に認められ、CD25 では 6 時間後、PD-1 では 24 時間後に認められた。

非臨床薬理試験で使用したエプコリタマブの研究グレードのバッチ（被験物質 2*）及び [redacted] UK 社で製造された臨床グレードのバッチ（ 被験物質 1* ）は、CD20 陽性細胞の存在下で T 細胞活性化（CD69 の発現量の増加）を同様に誘導した。

＊新薬承認情報提供時に置換

Figure 6　エプコリタマブによるT細胞の活性化



Ab = antibody; CD = cluster of differentiation; E:T = effector cell to target cell; PBMC = peripheral blood mononuclear cell

A-B: Luciferase activity (luminescence) in GloResponse™ NFAT-Luc2 Jurkat cells incubated with (**A**) or without (**B**) Daudi cells (E:T ratio 3:4) and the indicated Abs for 24 h. Luciferase activity is an indicator of CD3 crosslinking-dependent activation of NFAT-Luc2 Jurkat cells. Data shown are from one representative experiment out of two experiments performed. **C-D**: T cells were isolated from buffy coats and incubated with Daudi cells (E:T ratio 2:1) and the indicated Abs for 48 h. The percentage of CD4+ and CD8+ T cells with CD69 expressed on the surface was determined, by gating on CD4+ and CD8+ cells, respectively. Data shown are mean ± SEM of duplicate wells from one representative experiment out of ten performed. **E-F**: PBMCs were isolated from buffy coats and incubated with the indicated Abs for 72 h. The percentage of CD4+ and CD8+ T cells with CD69 expressed on the surface was determined. Data shown are mean ± SEM of duplicate well from one representative experiment out of six (CD4+) and five (CD8+) performed.
Source: GMB3013-032

Table 6　エプコリタマブによるT細胞活性化に対する平均 EC_{20} 値-Daudi 細胞

CD20 発現 Daudi 細胞存在下（E:T 比 ＝2:1）でのエプコリタマブによる T 細胞活性化に対する EC_{20} 値

	Average EC_{20} for CD69 upregulation (% CD69+)			Average EC_{20} for CD25 upregulation (% CD25+)			Average EC_{20} for PD-1 upregulation (% PD-1+)		
	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]
CD4+ T cells	5 [7]	0.033 [0.047]	10	4 [4]	0.027 [0.027]	11	7 [10]	0.047 [0.067]	10
CD8+ T cells	5 [5]	0.033 [0.033]	10	12 [12]	0.080 [0.080]	11	35 [34]	0.233 [0.227]	10

CD = cluster of differentiation; EC_{20} = 20% effective concentration; E:T = effector cell to target cell; SD = standard deviation

a　n = the number of donors with complete dose-response curves; Source: GMB3013-032

Table 7　エプコリタマブによるT細胞活性化に対する平均 EC_{50} 値-Daudi 細胞

CD20 発現 Daudi 細胞存在下（E:T 比 ＝2:1）でのエプコリタマブによる T 細胞活性化に対する EC_{50} 値

	Average EC_{50} for CD69 upregulation (% CD69+)			Average EC_{50} for CD25 upregulation (% CD25+)			Average EC_{50} for PD-1 upregulation (% PD-1+)		
	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]
CD4+ T cells	11 [20]	0.073 [0.133]	10	21 [24]	0.140 [0.160]	11	68 [70]	0.453 [0.467]	10
CD8+ T cells	25 [20]	0.167 [0.133]	10	76 [65]	0.507 [0.433]	11	360 [264]	2.400 [1.760]	10

CD = cluster of differentiation; EC_{50} = 50% effective concentration; E:T = effector cell to target cell; SD = standard deviation

a　n = the number of donors with complete dose-response curves; Source: GMB3013-032

Table 8　エプコリタマブによるT細胞活性化対する平均 EC_{20} 値-健康ヒト由来の PBMC の B 細胞

CD3 発現エフェクターT 細胞及び CD20 発現標的細胞の両方を含む PBMC（E:T 比 ≒ 5:1）でのエプコリタマブによる T 細胞活性化に対する EC_{20} 値

	Average EC_{20} of CD69 upregulation (% CD69+)			Average EC_{20} of CD25 upregulation (% CD25+)			Average EC_{20} of PD-1 upregulation (% PD-1+)		
	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]
CD4+ T cells	26 [28]	0.173 [0.187]	6	71 [46]	0.473 [0.307]	4	61 [38]	0.407 [0.253]	4
CD8+ T cells	30 [24]	0.200 [0.160]	5	132 [80]	0.880 [0.533]	4	135 [93]	0.900 [0.620]	4

CD = cluster of differentiation; EC_{20} = 20% effective concentration; E:T = effector cell to target cell; SD = standard deviation

a　n = the number of donors with complete dose-response curves; Source: GMB3013-032

Table 9　エプコリタマブによるT細胞活性化に対する平均EC_{50}値-健康ヒト由来のPBMCのB細胞

CD3発現エフェクターT細胞及びCD20発現標的細胞の両方を含むPBMC（E:T比 ≒ 5:1）でのエプコリタマブによるT細胞活性化に対するEC_{50}値

	Average EC_{50} for CD69 upregulation (% CD69+)			Average EC_{50} for CD25 upregulation (% CD25+)			Average EC_{50} for PD-1 upregulation (% PD-1+)		
	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]	pg/mL [SD]	pmol/L [SD]	n[a]
CD4+ T cells	114 [133]	0.760 [0.887]	6	241 [93]	1.607 [0.620]	4	228 [102]	1.520 [0.680]	4
CD8+ T cells	146 [161]	0.973 [1.073]	5	.487 [266]	3.247 [1.773]	4	376 [186]	2.507 [1.240]	4

CD = cluster of differentiation; EC_{50} = 50% effective concentration; E:T = effector cell to target cell; SD = standard deviation

a　n = the number of donors with complete dose-response curves; Source: GMB3013-032

2.3.2　T細胞の増殖

[GMB3013-032]

T細胞の活性化は増殖と関連している可能性があり、エプコリタマブ誘発性のT細胞の増殖をBrdU取り込み量のELISAによる測定で評価した。CD3発現エフェクターT細胞及びCD20発現標的B細胞の両方をE:T比 ≒ 5:1で含むPBMCを、エプコリタマブ又は対照抗体の段階希釈液（1×10^{-4}~1 µg/mL）と72時間インキュベートし、BrdUを添加後、5時間インキュベートした。エプコリタマブは、BrdU取り込みの増加によって示されるPBMCの増殖を濃度依存的に誘導した。一方、抗CD3親mAb（IgG1-CD3-FEAL、3005a）及びアイソタイプ対照mAb（IgG1-ctrl-FEAL）では、増殖の誘導は認められなかった。試験結果は、CD20結合がエプコリタマブによるT細胞増殖の誘導に不可欠であることを示している。

2.3.3　健康ヒト由来の全血でのサイトカイン産生の誘導

[GMB3013-054]

T細胞の活性化はサイトカインの放出と関連しており、エプコリタマブによるサイトカイン放出の誘導を全血サイトカイン放出アッセイ（[redacted]社が実施したProStorm® Cytokine Release Assay #32318）（GMB3013-054及び[2.6.6-8.4項]参照）で評価した。30例の健康ヒト由来のCD3発現T細胞及びCD20発現B細胞の両方を含む全血検体を、エプコリタマブの段階希釈液（5.12×10^{-7}~1 µg/mL）と24時間インキュベートした。その後血漿を分離し、サイトカイン濃度をProArray Ultra®で測定した。エプコリタマブは、健康ヒト30例の全血検体で、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、インターフェロン（interferon、IFN）γ及び腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor、TNF）αの濃度依存的な放出を誘導したが、IL-4の放出は誘導しなかった。一方、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たbsAb（DuoBody-CD3xctrl）又は抗CD3親mAb（IgG1-CD3-FEAL、3005a）は、別の5例の健康ヒト由来の全血を用いた追加の小試験（Assay #32400）で、非常に低いサイトカイン放出しか誘導しなかった。以上より、ヒト全血でのエプコリタマブのサイトカイン放出誘導活性は、CD20結合活性に依存することが示唆された。

2.3.4　エプコリタマブの細胞傷害作用の in vitro 評価

[GMB3013-032]

エプコリタマブにより誘導される T 細胞の活性化及び増殖は、最終的に CD20 陽性細胞の死滅をもたらす。この作用を in vitro 試験で評価するために、細胞傷害アッセイを実施した。T 細胞媒介性の細胞障害作用は、クロム（^{51}Cr）放出アッセイ、フローサイトメトリー法及び alamarBlue®細胞生存率アッセイで評価した。アッセイは、CD20 発現細胞として健康ヒト由来の B 細胞及び Table 5 に記載した 4 種類の異なる B 細胞性リンパ腫型（GCB-DLBCL、BL、ABC-DLBCL 及び MCL）に由来する 12 種類の細胞株存在下で実施した。

^{51}Cr 放出アッセイでは、CD20 発現 B 細胞性リンパ腫細胞株を ^{51}Cr で標識し、新鮮分離 T 細胞（総 T 細胞又は CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞サブセット）及びエプコリタマブの段階希釈液（1×10^{-10}~10 µg/mL）と、24 時間培養（E:T 比 ＝10:1）又は異なる E:T 比で経時的に培養した。ガンマカウンターで培養上清の ^{51}Cr の漏出量を測定して、標的細胞の死滅を定量化した。

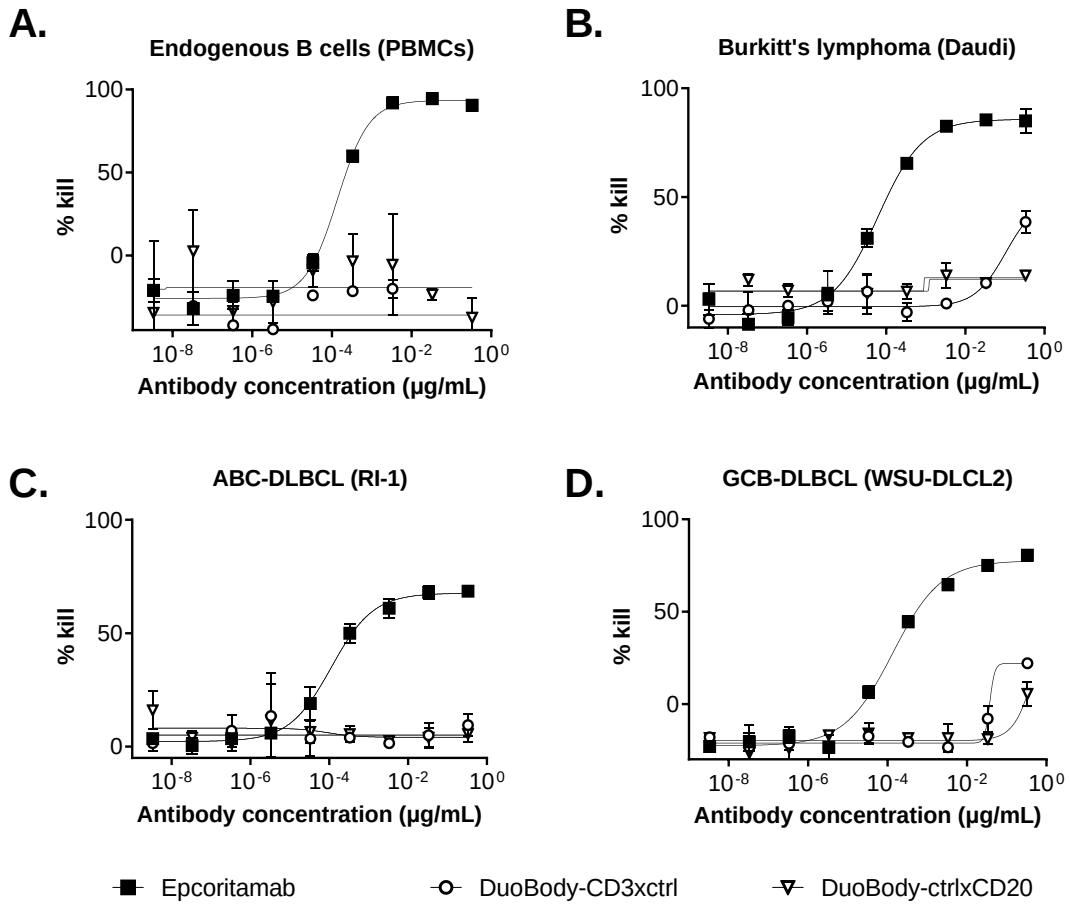
フローサイトメトリーアッセイを用いた細胞傷害作用の評価では、エプコリタマブ又は対照抗体の段階希釈液（0.33×10^{-8}~0.333 µg/mL）を、健康ヒト由来の新鮮分離 T 細胞及び CD20 発現標的細胞（E:T 比 ＝2:1）、又は健康ヒト由来の CD3 発現 T 細胞及び CD20 発現標的 B 細胞の両方を E:T 比 ≒ 5:1 で含む PBMC と、48 時間（新鮮分離 T 細胞）又は 72 時間（PBMC）インキュベートした。標的細胞の死滅は、フローサイトメトリー法で無傷の標的細胞の割合を測定して評価した［細胞株では CD4 陰性 CD8 陰性細胞の正常前方散乱（forward scatter、FSC）/側方散乱（side scatter、SSC）、PBMC の B 細胞では CD4 陰性 CD8 陰性 CD19 陽性細胞の正常 FSC/SSC］。

AlamarBlue®細胞生存率アッセイでは、接着性 CD20 発現標的細胞株をエプコリタマブの段階希釈液（1×10^{-7}~1 µg/mL）及び健康ヒト由来の新鮮分離 T 細胞（E:T 比 ＝10:1）と 48 時間インキュベート後、上清（T 細胞などの非接着性細胞を含む懸濁液）を除去し、alamarBlue®を添加して標的細胞の生存率を測定し、腫瘍細胞死の CD20 標的特異性を確認した。

エプコリタマブは、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の両方による Daudi 細胞の死滅を誘導した（^{51}Cr 放出アッセイで測定、Table 10 及び Table 11）。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速く、24 時間で同じ標的細胞溶解率を達成するためには CD8 陽性 T 細胞の 2 倍の CD4 陽性細胞が必要であった。次に ^{51}Cr 放出アッセイ（Table 10 及び Table 11）より感度の高いフローサイトメトリー法に基づくアッセイで、エプコリタマブによる T 細胞媒介性細胞傷害作用を更に検討した。エプコリタマブは濃度依存的に T 細胞を活性化して Daudi BL 細胞を死滅させた（Figure 7B）。エプコリタマブの CD3 若しくは CD20 結合アームを非結合性対照アームに置き換えた bsAb（それぞれ DuoBody-ctrlxCD20 及び DuoBody-CD3xctrl）、又は抗 CD3 親 mAb（IgG1-CD3-FEAL、3005a）では、細胞死の誘導は認められなかった。これは、エプコリタマブの細胞傷害作用が、CD3 と CD20 の両方への同時結合によってのみ誘導されることを示している。フローサイトメトリーアッセイを用いた評価で、エプコリタマブは、Daudi 細胞に加えて他の 11 種類の CD20 発現 B 細胞性リンパ腫細胞株（Table 5 の細胞株情報参照、Figure 7C~D は DLBCL の 2 種類の異なる病型である ABC-DLBCL 及び

GCB-DLBCL 由来の RI-1 及び WSU-DLCL2 細胞株の例を示している）及び健康ヒト由来の B 細胞（Figure 7A）に対しても効果的な T 細胞媒介性の細胞死誘導活性を示した。

Figure 7　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 (nonbinding 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] x 100%). Source: GMB3013-032

細胞傷害作用に対する EC_{20} 及び EC_{50} 値を、4 パラメーター非線形回帰分析（GraphPad Prism 7.02、数式 log(agonist) vs. 反応－可変傾斜）により推定した。Daudi 細胞で実施したアッセイ及び B 細胞を含む PBMC で実施したアッセイに対する EC_{20} 及び EC_{50} 値を、Table 10 及び Table 11 に示す。フローサイトメトリーアッセイを用いた評価で、エプコリタマブは、ピコモル未満~低ピコモルの範囲の EC_{50} 値［新鮮分離 T 細胞及び Daudi 細胞（E:T 比 ＝2:1）で 0.260 ±

0.147 pmol/L（39 ± 22 pg/mL）、健康ヒト由来の PBMC（E:T 比 ≒ 5:1）で 3.160 ± 5.073 pmol/L（474 ± 761 pg/mL）］で、T 細胞媒介性細胞傷害作用を示した。B 細胞性リンパ腫細胞株パネルで実施した細胞傷害作用に対するエプコリタマブの EC_{50} 値は、全てピコモル未満~低ピコモルの範囲［EC_{50} = 0.2~3.5 pmol/L（30~525 pg/mL）］で、細胞表面の CD20 分子数との相関関係は認められなかった。

Table 10　エプコリタマブによる細胞傷害作用に対する平均 EC_{20} 値

エフェクター細胞として新鮮分離 T 細胞、標的細胞として CD20 発現 Daudi 細胞（^{51}Cr 放出アッセイでは E:T 比 ＝10:1、フローサイトメトリー法での解析では E:T 比 ＝2:1）を用いた評価系、又は CD3 発現エフェクターT 細胞及び CD20 発現標的 B 細胞の両方を含む PBMC（E:T 比 ≒ 5:1）を用いた評価系でのエプコリタマブによる細胞傷害作用に対する EC_{20} 値。

Cytotoxicity assay	Effector cells	Daudi cells (3×10^5 molecules/cell)				Healthy Donor B cells (~1×10^5 molecules/cell)			
		E:T ratio	EC_{20} [SD] in pg/mL	EC_{20} [SD] in pmol/L	n[a]	E:T ratio	EC_{20} [SD] in pg/mL	EC_{20} [SD] in pmol/L	n[a]
^{51}Cr release	T cells	10:1	189 [539]	1.26 [3.59]	20	N/A	N/A	N/A	N/A
	CD4+ T cells	10:1	190 [307]	1.27 [2.05]	6	N/A	N/A	N/A	N/A
	CD8+ T cells	10:1	17 [21]	0.113 [0.140]	5	N/A	N/A	N/A	N/A
Flow cytometry	T cells	2:1	5 [4]	0.033 [0.027]	11	~5:1	85 [149]	0.567 [0.993]	5

CD = cluster of differentiation; EC_{20} = 20% effective concentration; E:T = effector cell to target cell; SD = standard deviation

a　n = the number of donors with complete dose-response curves; Source: GMB3013-032

Table 11　エプコリタマブによる細胞傷害作用に対する平均 EC_{50} 値

エフェクター細胞として新鮮分離 T 細胞、標的細胞として CD20 発現 Daudi 細胞（^{51}Cr 放出アッセイでは E:T 比 ＝10:1、フローサイトメトリー法での解析では E:T 比 ＝2:1）を用いた評価系、又は CD3 発現エフェクターT 細胞及び CD20 発現標的 B 細胞の両方を含む PBMC（E:T 比 ≒ 5:1）を用いた評価系でのエプコリタマブによる細胞傷害作用に対する EC_{50} 値。

Cytotoxicity assay	Effector cells	Daudi cells (3×10^5 molecules/cell)				Healthy Donor B cells (~1×10^5 molecules/cell)			
		E:T ratio	EC_{50} [SD] in pg/mL	EC_{50} [SD] in pmol/L	n[a]	E:T ratio	EC_{50} [SD] in pg/mL	EC_{50} [SD] in pmol/L	n[a]
^{51}Cr release	T cells	10:1	634 [1165]	4.227 [7.769]	20	N/A	N/A	N/A	N/A
	CD4+ T cells	10:1	638 [604]	4.251 [4.029]	6	N/A	N/A	N/A	N/A
	CD8+ T cells	10:1	126 [119]	0.841 [0.792]	5	N/A	N/A	N/A	N/A
Flow cytometry	T cells	2:1	39 [22]	0.260 [0.147]	11	~5:1	474 [0.761]	3.160 [5.073]	5

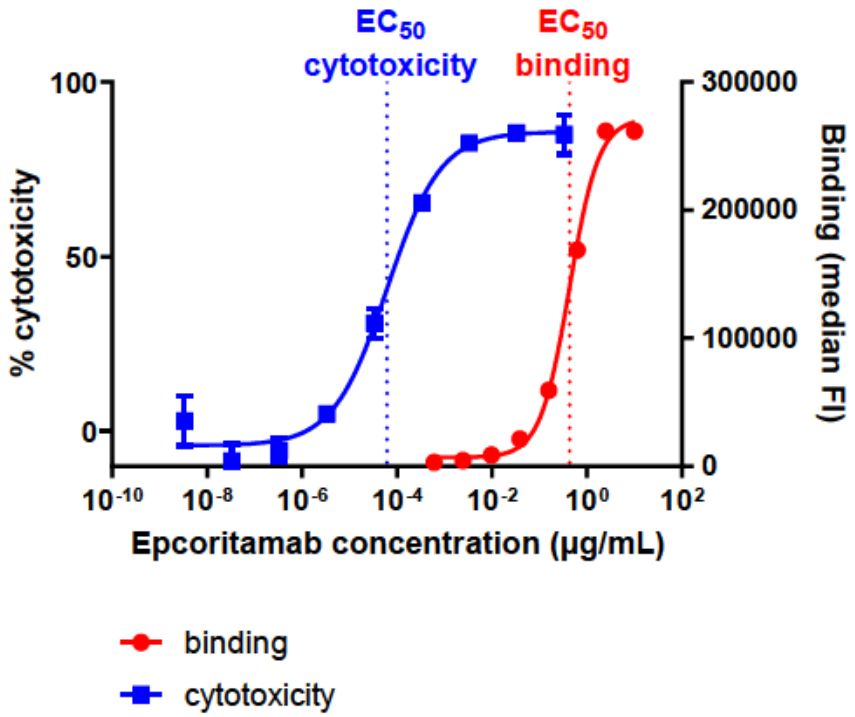
CD = cluster of differentiation; EC_{50} = 50% effective concentration; E:T = effector cell to target cell; SD = standard deviation

a　n = the number of donors with complete dose-response curves; Source: GMB3013-032

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 細胞の活性化に対する EC_{50} 値と同程度であった。一方、Figure 8 の Daudi 細胞の例示のように、細胞表面の CD20 に対する最大結合量の半分の結合を得るには、より高濃度のエプコリタマブが必要であった。この

ことは、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を示唆している。

Figure 8　**エプコリタマブによる細胞傷害作用の誘導と CD20 発現細胞に対する結合活性の比較**



EC50 = 50% effective concentration; FI = fluorescence intensity; SEM = standard error of the mean
Daudi cells were incubated with epcoritamab at 4°C for 45 min (binding) or 37°C for 48 h (cytotoxicity). Binding and induction of cytotoxicity were analyzed by flow cytometry. Data shown are median FI for one experiment out of eight performed (binding) and mean ± SEM of duplicates for one donor out of 11 (cytotoxicity). Source: GMB3013-032

非臨床薬理試験で使用したエプコリタマブの研究グレードのバッチ（被験物質 2*）及び [redacted] UK 社で製造された臨床グレードのバッチ（ 被験物質 1* ）は、in vitro で T 細胞媒介性細胞傷害作用を同程度に誘導した。

エプコリタマブにより誘導される腫瘍細胞死の標的特異性は、SK-BR-3-CD20 を用いた alamarBlue®細胞生存率アッセイで確認した。B 細胞と異なり、SK-BR-3 細胞は、エプコリタマブの存在下で T 細胞と B 細胞間の相互作用を促進する可能性のある共刺激分子を発現しない。CD20 陽性 SK-BR-3 細胞はエプコリタマブの存在下で T 細胞媒介性細胞傷害に対して感受性を示したが、CD20 陰性対照細胞は感受性を示さなかった。このことから、エプコリタマブによる T 細胞媒介性細胞傷害作用に対して、CD20 の発現は必要かつ十分で、B 細胞上に追加の（共刺激）分子は必要ないことが示された。

＊新薬承認情報提供時に置換

2.3.5　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

[GMB3013-074]

B 細胞存在下のエプコリタマブによる T 細胞の活性化及び細胞傷害活性を、臨床で現在評価中の 4 種類の CD3xCD20 bsAb 類似化合物［Regeneron 社の odronextamab に基づく CD3xCD20 bsAb（CD3xCD20 bsAb, based on odronextamab、$bsAb_{Reg}$）、Xencor 社の plamotamab に基づく CD3xCD20 bsAb（CD3xCD20 bsAb, based on plamotamab、$bsAb_{Xen}$）、Genentech/Roche 社の mosunetuzumab に基づく CD3xCD20 bsAb（CD3xCD20 bsAb, based on mosunetuzumab、$bsAb_{Gen}$）及び Roche 社の glofitamab に基づく CD3xCD20 bsAb（CD3xCD20 bsAb, based on glofitamab、$bsAb_{Roc}$］と比較した（Engelberts et al, 2020）。BsAb 類似化合物を作製するための配列及び抗体フォーマットの詳細は、それぞれ特許出願及び文献から得た［$bsAb_{Reg}$：WO2014047231 及び WO2009018411（Regeneron Pharmaceuticals 社）、$bsAb_{Xen}$：US 20170349657A1 及び US20140370013（Xencor 社）、$bsAb_{Gen}$：Rodrigues et al, 1992、US20060034835A1、US20140242080A1 及び US20150166661（Genentech 社）、並びに $bsAb_{Roc}$：US20160075785A1（Hoffmann-LaRoche 社）］。エプコリタマブ及び CD3xCD20 bsAb 類似化合物は、in vitro での結合特性、T 細胞の活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害アッセイで比較した（評価法に関しては 2.2.1、2.3.1 及び 2.3.4 項参照）。

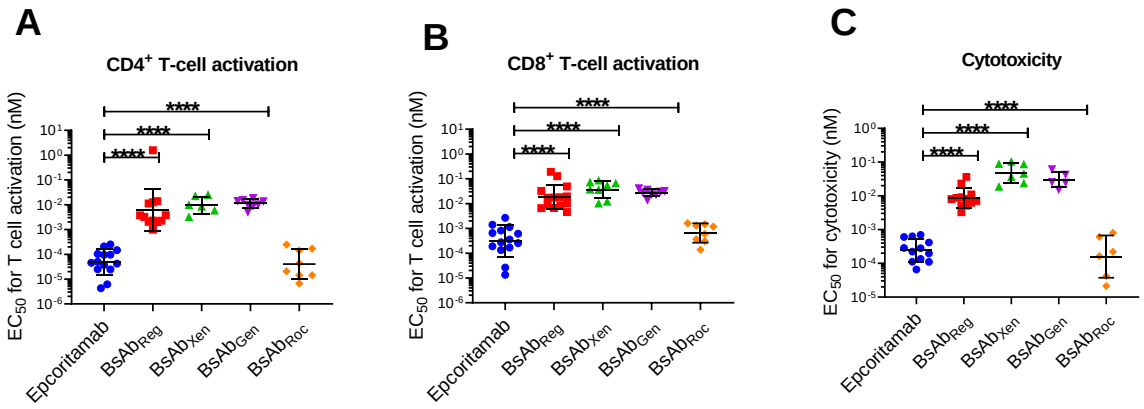
固相化 CD3ε に対するエプコリタマブ、$bsAb_{Roc}$ 及び $bsAb_{Xen}$ の結合親和性（K_D）はバイオレイヤー干渉法で測定し、それぞれ 16、12 及び 8.9 nmol/L であった。固相化 CD3ε に対する $bsAb_{Reg}$ 及び $bsAb_{Gen}$ の結合親和性は、これらが結合に CD3ε 及び CD3δ 分子の両方を必要とするため、測定できなかった。全ての CD3xCD20 bsAbs は、健康ヒト由来の新鮮分離 CD3 発現 T 細胞に濃度依存的に結合した。エプコリタマブ（DuoBody-ctrlxCD20）、$bsAb_{Xen}$、$bsAb_{Gen}$、$bsAb_{Roc}$（$bsAb_{Roc}$ の CD20 に対する親和性は 1 つの CD20 結合部位に対して測定した）及び $bsAb_{Reg}$ の CD20 結合アームは、QCM 技術を用いた解析で、それぞれ 5.4、33、53、99 及び 670 nmol/L の結合親和性で CD20 発現 Daudi 細胞に結合した。全ての CD3xCD20 bsAbs は、CD20 発現 Daudi 細胞に濃度依存的に結合した。

全ての CD3xCD20 bsAbs は、CD20 発現 Daudi 細胞の存在下で、新鮮分離ヒト CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化（CD69、CD25 及び PD-1 の発現量の増加）及び脱顆粒［リソソーム関連タンパク質 1（lysosomal-associated protein 1、LAMP-1）（別名 CD107a）の発現量の増加］を誘導した。CD69 の発現量の増加に基づき、エプコリタマブ及び $bsAb_{Roc}$ は、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を最も効果的に活性化し、EC_{50} 値は $bsAb_{Xen}$、$bsAb_{Gen}$ 及び $bsAb_{Reg}$ よりも低かった（Figure 9）。

T 細胞及び Daudi 細胞の共培養で、CD3xCD20 bsAbs は、活性化 T 細胞によって産生されるグランザイム B、IFNγ 及び TNFα の放出を誘導した。カスタマイズした Luminex 17-Plex ヒトサイトカイン磁気 TH17 ビーズパネルを用いた測定で、$bsAb_{Roc}$ は通常、最も高濃度のサイトカイン放出を誘導し、エプコリタマブによるサイトカイン放出の誘導は 2 番目だった。

CD3xCD20 bsAbs は、CD20 発現 Daudi 細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害作用を濃度依存的に誘導した。エプコリタマブ及び $bsAb_{Roc}$ は、最も効果的に T 細胞媒介性細胞傷害作用を誘導し、EC_{50} 値は $bsAb_{Xen}$、$bsAb_{Gen}$ 及び $bsAb_{Reg}$ よりも低かった（Figure 9）。

Figure 9　エプコリタマブと臨床開発中の CD3xCD20 bsAb 類似化合物の in vitro での比較



bsAb = bispecific antibody; bsAbGen = based on mosunetuzumab from Genentech/Roche; bsAbReg = based on odronextamab from Regeneron; bsAbRoc = based on glofitamab from Roche; bsAbXen = based on plamotamab from Xencor; CD = cluster of differentiation; EC_{50} = 50% effective concentration; E:T = effector cell to target cell

A-C: Isolated T cells were incubated with bsAbs and CD20-expressing Daudi cells (E:T ratio 2:1). Percentages CD69 positive CD4+ (**A**) and CD8+ (**B**) cells and cytotoxic activity (**C**) were assessed by flow cytometry after 44 h. Each dot represents the EC_{50} value calculated from one experiment. Different T cell donors were used for the individual experiments. Each experiment was determined using T cells from n = 12-14 donors (epcoritamab), 12-14 donors ($bsAb_{Reg}$), n = 6-8 donors ($bsAb_{Xen}$), n = 6-8 donors ($bsAb_{Gen}$) and n = 6-8 donors ($bsAb_{Roc}$). Median EC_{50} values and interquartile range for each bsAb are indicated. A Mann Whitney two-tailed test was used to compare the CD3xCD20 competitor bsAbs to epcoritamab **** P<0.0001. Source: GMB3013-074

2.3.6　エプコリタマブによるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）及びマントル細胞リンパ腫（MCL）患者由来検体に対する T 細胞活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害活性の ex vivo 評価

[GMB3013-072]

エプコリタマブの初代培養悪性 B-NHL に対する非臨床薬理活性を ex vivo で評価した（van der Horst et al, 2021）。DLBCL（n = 14）、FL（n = 15）及び MCL（n = 8）の新規診断（newly diagnosed、ND）患者又は再発若しくは難治性（relapsed or refractory、RR）患者のリンパ節単細胞懸濁液を用いて、健康ヒト由来の PBMC（健康ヒト由来 PBMC の T 細胞数に基づく E:T 比 = 10:1）又はリンパ節に残存する自家 T 細胞をエフェクター細胞として、一晩インキュベートによる細胞傷害アッセイを実施した。

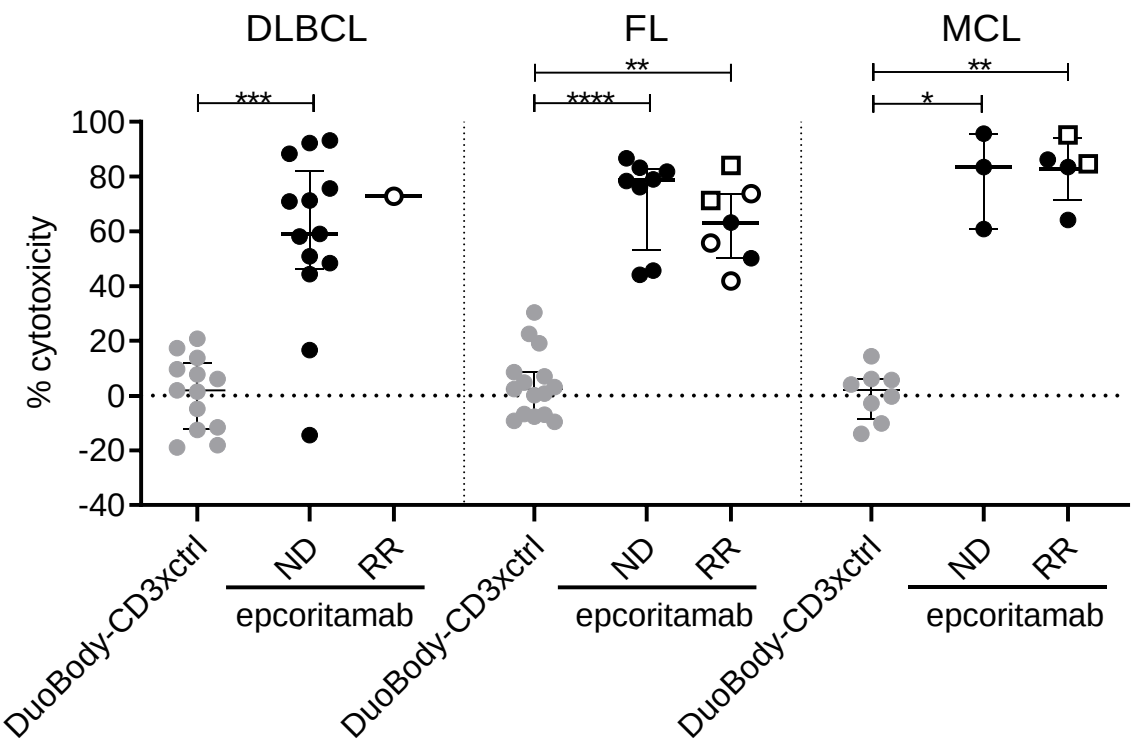
健康ヒト由来の PBMC をエフェクター細胞として用いた場合、エプコリタマブ（0.03 µg/mL）は DLBCL、FL 及び MCL の 3 種類の病型全てに対して有効な細胞傷害作用を誘導し、傷害活性（%）の中央値はそれぞれ 65%、74%及び 84%であった（Figure 10）。エプコリタマブの効果は抗 CD20 抗体を含む治療歴に関係なく、ND 及び RR 患者由来細胞の両方を死滅させた［細胞傷害活性（%）の中央値は、それぞれ 73%であった］。EC_{50} 値も、B-NHL 病型間で差はなく、EC_{50} の平均値は 0.864 ng/mL（5.771 pmol/L）であった。抗 CD20 抗体による治療歴のない患者検体で、CD20 発現量と細胞傷害活性（%）の間に相関関係は認められなかった。この相関性の検討は、細胞表面に結合した CD20 mAb が残存する可能性があり CD20 発現の定量化に信頼性が担保できないため、RR 患者検体では実施しなかった。抗 CD20 抗体の治療歴のある患者から採取

した検体では、細胞傷害活性と抗 CD20 抗体の投与中止から検体採取までの時間との間に有意な相関関係が認められ、時間が長くなるほど腫瘍細胞の死滅活性は高くなった。しかし、最後の抗 CD20 抗体の投与から検体採取まで 2 週間しか経過していない場合でも、40%超の腫瘍細胞死が認められた（GMB3013-072）（van der Horst et al, 2021）。これは、エプコリタマブは、抗 CD20 mAb の投与中止直後に投与しても有効であることを示唆する。

健康ヒト由来の同種異系 PBMC を培養液に添加しなかった場合、すなわちリンパ節自家 T 細胞がアッセイ系に存在する唯一のエフェクター細胞である場合、エプコリタマブ（0.03 µg/mL）は、低～中程度の細胞傷害作用を誘導し、DLBCL、FL 及び MCL の細胞傷害活性の中央値はそれぞれ 15%、19%及び 14%であった。エプコリタマブの効果が検体の E:T 比と相関したため、患者由来の T 細胞が機能しているかどうかを判断する目的で、健康ヒト由来の PBMC 又は B-NHL 患者生検由来の T 細胞を、標的細胞である Daudi 細胞又は WSU-DLCL2 細胞（Table 5 の細胞株情報参照）と共培養し、T 細胞媒介性細胞傷害作用及び関連する T 細胞の活性化を測定した。この測定系で T 細胞の本質的な機能障害は認められず、自家リンパ節培養での細胞傷害作用が CD3 陽性 T 細胞量と相関したことと一致した。T 細胞数が少ない検体があったが、アッセイでは患者で発生する可能性のある末梢血 T 細胞の腫瘍への流入が考慮されていない。B-NHL 患者由来の末梢血 T 細胞は、エプコリタマブの存在下で健康ヒト由来の T 細胞と同程度の細胞傷害作用を媒介した。

以上より、エプコリタマブは、DLBCL、FL 及び MCL 患者由来の初代培養腫瘍細胞の T 細胞媒介性細胞傷害作用を ex vivo で誘導できることが示された。エプコリタマブは、B-NHL 患者から採取した腫瘍リンパ節生検由来の T 細胞に、健康ヒト由来の T 細胞と同程度の細胞傷害作用を誘導した。エプコリタマブによる ex vivo での細胞傷害作用は、腫瘍微小環境に局所的に存在する T 細胞数に大きく依存する。臨床でのエプコリタマブの最適な細胞傷害活性は、おそらく T 細胞の動員又は局所展開に依存すると考えられる。

Figure 10　エプコリタマブによる B-NHL 患者由来の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性



CD = cluster of differentiation; Ctrl = control (nonbinding arm); DLBCL = diffuse large B-cell lymphoma; FL = follicular lymphoma; MCL = mantle-cell lymphoma; ND = newly diagnosed; RR = relapsed or refractory

Epcoritamab or DuoBody-CD3xctrl (0.03 µg/mL) was added to single cell suspensions from patients with DLBCL (n = 13), FL (n = 15), and MCL (n = 8) and incubated in the presence of healthy donor PBMCs (E:T ratio 10:1) for 24 h, followed by assessment of cytotoxicity by flow cytometry. Data shown are percentages cytotoxicity. RR patients included patients who relapsed from (open squares) or were refractory to (open circles) CD20 mAb containing therapy and patients who relapsed from or were refractory to other therapies (closed circles). Median ± interquartile range are indicated. Statistical analysis was performed using a Kruskal Wallis test with a post-hoc Dunn's multiple comparison test. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

2.3.7　エプコリタマブと他の治療薬との in vitro での併用

2.3.7.1　エプコリタマブと CHOP 療法構成薬との併用

[GMB3013-080]

DLBCL の標準的な一次治療は、R-CHOP［リツキシマブ（rituximab、R）＋シクロホスファミド（cyclophosphamide、CPA）、ドキソルビシン（hydroxydaunorubicin (doxorubicin)、DOX）、ビンクリスチン（oncovin (vincristine)、VINC）及びプレドニゾン（prednisone、PRD）］療法である。エプコリタマブの作用機序が R-CHOP 療法と異なることを考慮すると、これら 2 つの治療レジメンの併用により、より根本的で持続的な臨床効果が得られる可能性がある。リツキシマブは in vivo マウスモデルでエプコリタマブによる抗腫瘍活性を抑制せず（2.4.1 項）、抗 CD20 抗体による治療歴は、エプコリタマブによる B-NHL 患者生検由来の B 細胞に対する、ex vivo での T 細胞の活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害作用に影響しなかった（2.3.6 項）。T 細胞又は B 細胞を CHOP 療法構成薬とプレインキュベートした後に、T 細胞の活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害

アッセイを実施して、in vitro で B-NHL 細胞株存在下でのエプコリタマブによる T 細胞活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害作用の誘導活性に対する CHOP 構成薬の影響を評価した。

ドキソルビシン［0.025~2.5 μg/mL（0.046~4.6 μmol/L）］とのインキュベートにより、濃度に依存した顕著な T 細胞生存率の低下が認められたが、シクロホスファミド［0.1~10 μg/mL（0.383~38.3 μmol/L）］、ビンクリスチン［1~100 ng/mL（0.121~12.1 nmol/L）］及びプレドニゾン［2~200 μg/mL（5.580~558.0 μmol/L）］では T 細胞生存率に対する直接的な影響は認められなかった。生存する T 細胞は、SU-DHL-4 標的細胞（Table 5 の細胞株情報参照）との一晩インキュベートによる T 細胞の活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害アッセイに使用した。高濃度のドキソルビシンはエプコリタマブによる CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化に顕著に影響し、エプコリタマブによる T 細胞活性化マーカーCD69 及び CD25 の発現を完全に抑制した。その一方、ドキソルビシンは後期 T 細胞活性化マーカーPD-1 及び脱顆粒マーカーLAMP-1 の発現を顕著に誘導し、エプコリタマブによるこれらのマーカーの誘導の評価を妨げた。ビンクリスチン及びプレドニゾンは T 細胞とのプレインキュベートでエプコリタマブによる T 細胞活性化マーカーの発現にわずかな影響しか示さず、シクロホスファミドでは影響は認められなかった。さらに、エプコリタマブによる SU-DHL-4 標的細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害作用は、CHOP 構成薬によりわずかな低下が認められたのみであった。これらの試験結果は、CHOP 構成薬の存在下でも残存する T 細胞が依然として B 細胞に対してエプコリタマブ誘発性の T 細胞媒介性細胞傷害作用を誘導できることを示している。

2.3.7.2　エプコリタマブのレナリドミドとの併用

[GMB3013-082]

レナリドミド（IMiD3）は免疫調節薬（immunomodulatory drug、IMiD）であり、多発性骨髄腫、5 番染色体長腕部欠失を伴う（5q-）骨髄異形成症候群及び MCL の治療薬として FDA 及び本邦で承認されており、他の B 細胞性悪性腫瘍に対しても有望な効果を示す（Kritharis et al, 2015）。レナリドミドはリツキシマブとの併用療法として、2019 年 5 月に治療歴のある FL 及び辺縁帯リンパ腫（marginal zone lymphomas、MZL）の治療（FDA, 2019）並びに RR FL 及び MZL の治療に対して承認された（PMDA, 2020）。レナリドミドは、CD3 ライゲーション後の T 細胞の増殖を共刺激することが報告されている（LeBlanc et al, 2004）。

以下の 3 つのアッセイを設定して、エプコリタマブによる T 細胞の活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害作用に対するレナリドミドの作用を in vitro で評価した。（1）レナリドミドを CD20 発現腫瘍細胞株（Daudi、WSU-DLCL2、RI-1 又は U-2932 細胞）、健康ヒト由来 T 細胞（E:T 比 = 2:1）及びエプコリタマブの共培養に添加した、（2）腫瘍細胞（Daudi 又は REC-1 細胞）又は（3）T 細胞をレナリドミドとプレインキュベートし、その後エプコリタマブとの共培養で評価した。T 細胞の活性化（CD69、CD25 及び PD-1 の発現量の増加）、T 細胞の脱顆粒（LAMP-1 の発現量の増加）及び腫瘍細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害活性をフローサイトメトリー法で評価した。

（1）エプコリタマブの段階希釈液［Daudi 細胞株では 3.3×10^{-12}~333.3 ng/mL（2.28×10^{-14}~2.28 nmol/L）、その他の細胞株では 3.3×10^{-6}~333.3 ng/mL

（2.28 × 10^{-8}~2.28 nmol/L）］と 5 日間共培養後にフローサイトメトリー法で評価すると、Daudi、WSU-DLCL2、RI-1 及び U-2932 細胞（Table 5 の細胞株情報参照）に対する CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化並びに T 細胞媒介性細胞傷害作用の濃度依存的な誘導が認められた。T 細胞の活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害アッセイにレナリドミド（Daudi 細胞では 0.0087、0.074 又は 0.636 μmol/L、その他の細胞株では 800 μmol/L）を添加して評価した結果、エプコリタマブによる CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化並びに T 細胞媒介性細胞傷害作用に影響は認められなかった。

（2）Daudi 又は REC-1 細胞をレナリドミド（Daudi 細胞では 5 又は 50 μmol/L、REC-1 細胞では 0.3 又は 3 μmol/L）と 4 日間プレインキュベートして評価した結果、Daudi 又は REC-1 細胞存在下でのエプコリタマブによる CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化並びにエプコリタマブによる Daudi 細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害作用に影響は認められなかった。エプコリタマブによる REC-1 細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害作用は、一晩インキュベートアッセイで軽度の低下が認められた。

（3a）T 細胞をレナリドミド（Daudi 細胞では 5 及び 50 μmol/L、REC-1 細胞では 0.3 及び 3 μmol/L）と 48 時間プレインキュベートして評価した結果、Daudi 又は REC-1 細胞存在下でのエプコリタマブによる CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化並びにエプコリタマブによる Daudi 細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害作用に影響は認められなかったが、エプコリタマブによる REC-1 細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害作用は、一晩インキュベートアッセイで低下が認められた。

（3b）固相化抗 CD3 mAb 又は固相化エプコリタマブで CD3 が架橋形成された T 細胞をレナリドミドと 3 日間プレインキュベートして評価した結果、CD3 の架橋形成単独で誘導される活性化と比較して T 細胞の活性化は増強された。固相化抗 CD3 mAb 又は固相化エプコリタマブ存在下でレナリドミドとプレインキュベートした T 細胞は、エプコリタマブの非存在下で Daudi 細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害作用を示した。レナリドミドと抗 CD3 mAb で前処理した T 細胞は、低濃度のエプコリタマブによる T 細胞媒介性細胞傷害活性を増強したが、最大細胞傷害活性をもたらす高濃度のエプコリタマブでは、増強作用は確認できなかった。

以上より、レナリドミドは、エプコリタマブによる細胞傷害作用に直接影響しないことが示された。CD3 の架橋形成（固相化抗 CD3 mAb 又は固相化エプコリタマブ）によって誘導される T 細胞の活性化は、レナリドミドにより増強され、エプコリタマブによる CD20 発現腫瘍細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害作用をもたらす T 細胞の能力を増強した。

2.4　エプコリタマブの in vivo での抗腫瘍活性：異種移植マウスモデル

エプコリタマブの in vivo 抗腫瘍活性を、異なるヒト化マウスを用いた 3 種類の B 細胞性リンパ腫（Daudi、Raji 及び JEKO-1 MCL 細胞）CDX モデルを用いて、Genmab 社、[redacted] 社（MiXeno™モデル）及び [redacted] 社（HIS モデル）評価し（[GMB3013-033]及び[GMB3013-073]）、更にヒト化 NOG［humanized NOG (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac)、huNOG］マウスの DLBCL-PDX モデルを用いて、Crown Bioscience 社で評価した（[GMB3013-083]）。試験結果はエプコリタマブの抗腫瘍活性を一貫して示した。各モデルの詳細な結果を以下に記載する。

2.4.1　皮下共移植リンパ腫異種移植モデル

[GMB3013-033]

未刺激ヒト PBMC（5 × 10^6 細胞）（ヒト T 細胞の供給源として）及び gWIZ ルシフェラーゼ遺伝子を導入した Raji 細胞（Raji cell line transfected with gWIZ luciferase、Raji-luc）（5 × 10^6 細胞）を 200 µL のリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline、PBS）で、Brischwein らが報告しているモデル（Brischwein et al, 2006）に類似する雌性 NOD-SCID マウス［非肥満性糖尿病（non-obese diabetic、NOD）マウスに重症複合型免疫不全（severe combined immunodeficiency、SCID）遺伝子を導入したマウス系統］（5 匹/群）の皮下に共移植した。3 例の異なる健康ヒト由来の PBMC を使用した。PBMC-腫瘍細胞混合液注入後 1 時間以内に、エプコリタマブ（0.005、0.05 及び 0.5 mg/kg、100 µL）をマウスに単回静脈内投与した。腫瘍サイズは、週 2 回以上、キャリパー測定で評価し、腫瘍体積をキャリパー測定値から算出した［腫瘍体積（mm^3） = 0.52 × （長さ） × （幅）^{2}］（Tomayko and Reynolds, 1989）。投与後 21 日に、全ての用量群で腫瘍増殖の有意な抑制が認められた。0.5 mg/kg のエプコリタマブ投与動物では 3 例のドナーのうち 3 例の PBMC で有意な腫瘍増殖の抑制が認められ、0.05 mg/kg のエプコリタマブ投与動物では 3 例のドナーのうち 2 例の PBMC で有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。0.005 mg/kg のエプコリタマブ投与動物では、3 例のドナーのうち 1 例の PBMC で有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

リツキシマブは、CD20 結合に対してエプコリタマブと競合することが知られている。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バリアント［a rituximab variant with an inert Fc domain and K409R (DuoBody®) mutation、IgG1-RTX-FEAR］（FEA 変異は 2.1.3 項を参照）存在下で試験を実施し、このモデルでのエプコリタマブの効果に対する循環血液中にリツキシマブが存在した場合の影響を検討した。リツキシマブに不活性化変異を導入することにより、CD20 との結合で競合する mAb の抗腫瘍活性が交絡因子として存在しない条件下で、エプコリタマブの抗腫瘍活性に対する CD20 との結合で競合する mAb の影響を評価することは可能である。腫瘍移植直後に IgG1-RTX-FEAR をマウスに投与し、投与後 4 時間及び 6 日にエプコリタマブ（0.05 mg/kg）を投与した。0.05 mg/kg のエプコリタマブの効果は、IgG1-RTX-FEAR を最大 10 mg/kg までマウスに前投与しても抑制されなかった（10 mg/kg の結果を Figure 11A に示す）。これは、CD20 との結合で競合する抗 CD20 mAb が循環血液中に存在しても検討した用量ではエプコリタマブが抗腫瘍活性を誘導できることを示している。

2.4.2　MiXeno™マントル細胞リンパ腫（MCL）モデル

[GMB3013-033]

トリプル免疫不全 NOD-*Prkdc*^{em26Cd52} *Il2rg*^{em26Cd22}/NjuCrl（NCG）マウスに、JEKO-1 MCL 細胞（5 × 10^6 細胞）マトリゲル浮遊液を皮下移植し（Day0）、Day3 に未刺激ヒト PBMC（1 × 10^7 細胞）を腹腔内に注入した（MiXeno™モデル）。腫瘍の増殖は、キャリパー測定で評価した。リンパ腫の体積が 100 mm^3（2.4.1 項の説明と同様に算出）に達した時点で、腫瘍体積の等分布が得られるようにマウスを無作為に群分けして投与を開始した。マウスにエプコリタマブ（0.05 又

は 0.5 mg/kg）を週 2 回、合計 5 回静脈内投与した。0.5 mg/kg のエプコリタマブの週 2 回、合計 5 回の投与により、腫瘍の退縮が認められたが、0.05 mg/kg のエプコリタマブの投与では、このモデルの腫瘍増殖にほとんど影響は認められなかった（Figure 11B）。

2.4.3　ヒト免疫系（HIS）モデル

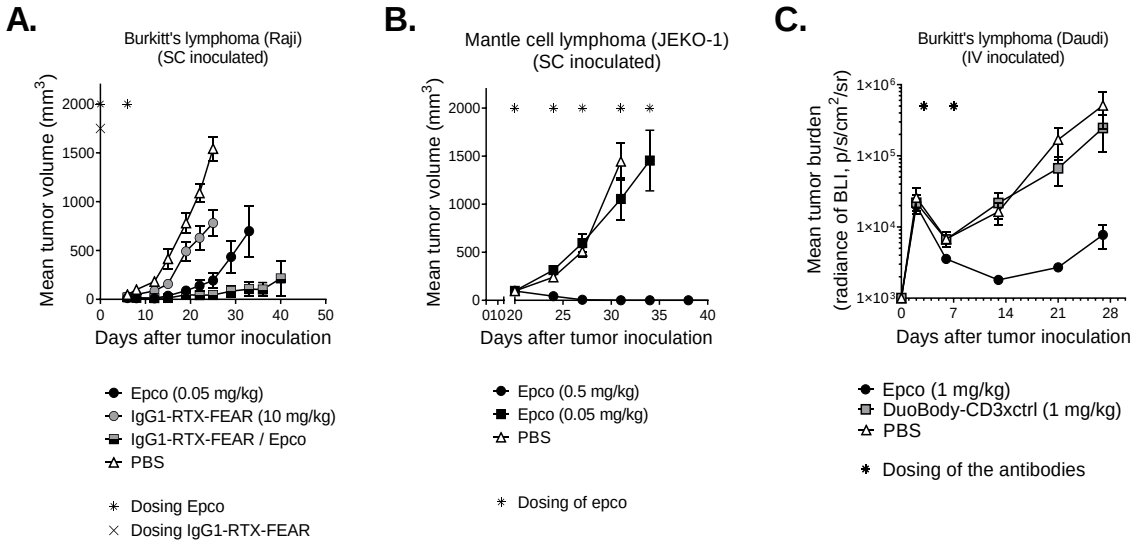
[GMB3013-033]、[GMB3013-073]

ヒト臍帯血由来の CD34 陽性造血前駆細胞（約 1×10^5 細胞）を BALB/c *Rag2*^{tm1Fwa} *IL-2Rγc*^{tm1Cgn} *SIRPα*^{NOD}（BRGS）新生児マウスの肝内に移植して、ヒト免疫系を有するマウス（BRGS-HIS マウス）を作製した（Legrand et al, 2011）（GMB3013-033）。移植後 14 週に、フローサイトメトリー法でヒト化を確認し、循環血液中の CD3 陽性ヒト T 細胞数の等分布が得られるようにマウスを群分けした。移植後 15 週に gWIZ ルシフェラーゼ遺伝子を導入した Daudi 細胞（Daudi cell line transfected with gWIZ luciferase、Daudi-luc）（5×10^6 細胞）を静脈内に注入し、Day0 とした。Day3 及び 7 に 1 mg/kg のエプコリタマブを静脈内投与した。Day9 に血液試料を採取し、白血球分画（百分率）を測定した。腫瘍の増殖は生物発光イメージングで評価した。別に移植後 15 週に Raji-luc 細胞を皮下に注入し、Day0 とした。Day3、7、10、14 及び 17 に 0.1 又は 1 mg/kg のエプコリタマブを静脈内投与した。Day4、9、16、30、39 及び 60 に血液試料を採取し、白血球分画（百分率）及び細胞活性化マーカーを測定した。腫瘍の増殖はキャリパー測定で評価した（2.4.1 項の記載と同様に算出した）。いずれの試験でも、エプコリタマブは腫瘍の増殖を顕著に抑制し、マウスの生存期間を延長した（Figure 11C、Figure 12A）。フローサイトメトリー解析で、エプコリタマブによる末梢血のヒト B 細胞数の有意な減少（Figure 12B）及びヒト T 細胞［CD4 陽性 T 細胞（Figure 12C）及び CD8 陽性 T 細胞（Figure 12D）の両方］の一過性の活性化の誘導も認められた。末梢血のヒト T 細胞数に一過性の変化が認められた。

NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ（NSG）マウスに、Raji-luc 細胞と部分的に HLA が一致した 3 例の異なるドナー由来のヒト CD34 陽性造血前駆細胞を移植した（GMB3013-073）。移植後 14 週に、[redacted] 社はフローサイトメトリー法でヒト化（末梢血で 25%超のヒト CD45 陽性細胞）を確認しマウスを出荷した。Genmab 社では、マウスに Raji-luc 細胞（5×10^6 細胞）を皮下移植した（Day0）。腫瘍の増殖をキャリパー測定で評価した。平均腫瘍体積が約 100 mm^3 に達した Day7 に、腫瘍体積及びヒト CD34 陽性ドナー細胞数に基づいてマウスを無作為化し、0.05、0.5 又は 5 mg/kg のエプコリタマブの静脈内投与を開始した（週 1 回、5 週間投与、Day7、14、21、28 及び 35）。別に後期投与群として Day18 に、5 mg/kg のエプコリタマブの単回投与試験を開始した（投与開始時の平均腫瘍体積は約 677 mm^3）。Day−7、8、19 及び 25 に、フローサイトメトリー解析用の血液試料をマウスの頬袋から採取した。0.5 及び 5 mg/kg のエプコリタマブの投与により、腫瘍増殖の抑制活性が示され（Figure 13A）、無増悪生存期間が延長された。0.5 mg/kg 投与群（1 例/9 例）では、5 mg/kg 投与群（6 例/9 例）よりも 500 mm^3 超の腫瘍に進行したマウスが少なく、5 mg/kg がこのモデルでのエプコリタマブの至適用量を超えている可能性が示された。同様の投与レジメンで 0.05 mg/kg のエプコリタマブは、初期の時点で腫瘍の増殖を有意に抑制しなかったが、無増悪生存期間を延長した。アイソタイプ対照 mAb（IgG1-ctrl）の初回投与後 1 日に、フローサイトメトリー法で血液試料に部分的かつ一過性の B 細胞数の減少が認めら

れた（Figure 13B）。一方エプコリタマブの投与では、全ての用量で末梢血の B 細胞数は持続的に著しく減少した。また、エプコリタマブの投与により、全ての用量で CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞数は一過性に減少した。活性化（CD69 及び CD25 陽性）及び脱顆粒［LAMP-1（CD107a）陽性］が誘発された CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の割合は同時に増加した（Figure 13C 及び D はそれぞれ CD69 陽性 CD4 陽性細胞及び CD69 陽性 CD8 陽性細胞数の変化を示す）。さらに後期投与群では、エプコリタマブ（5 mg/kg、単回投与）は、大きな腫瘍の退縮を誘導した（Figure 13A）。

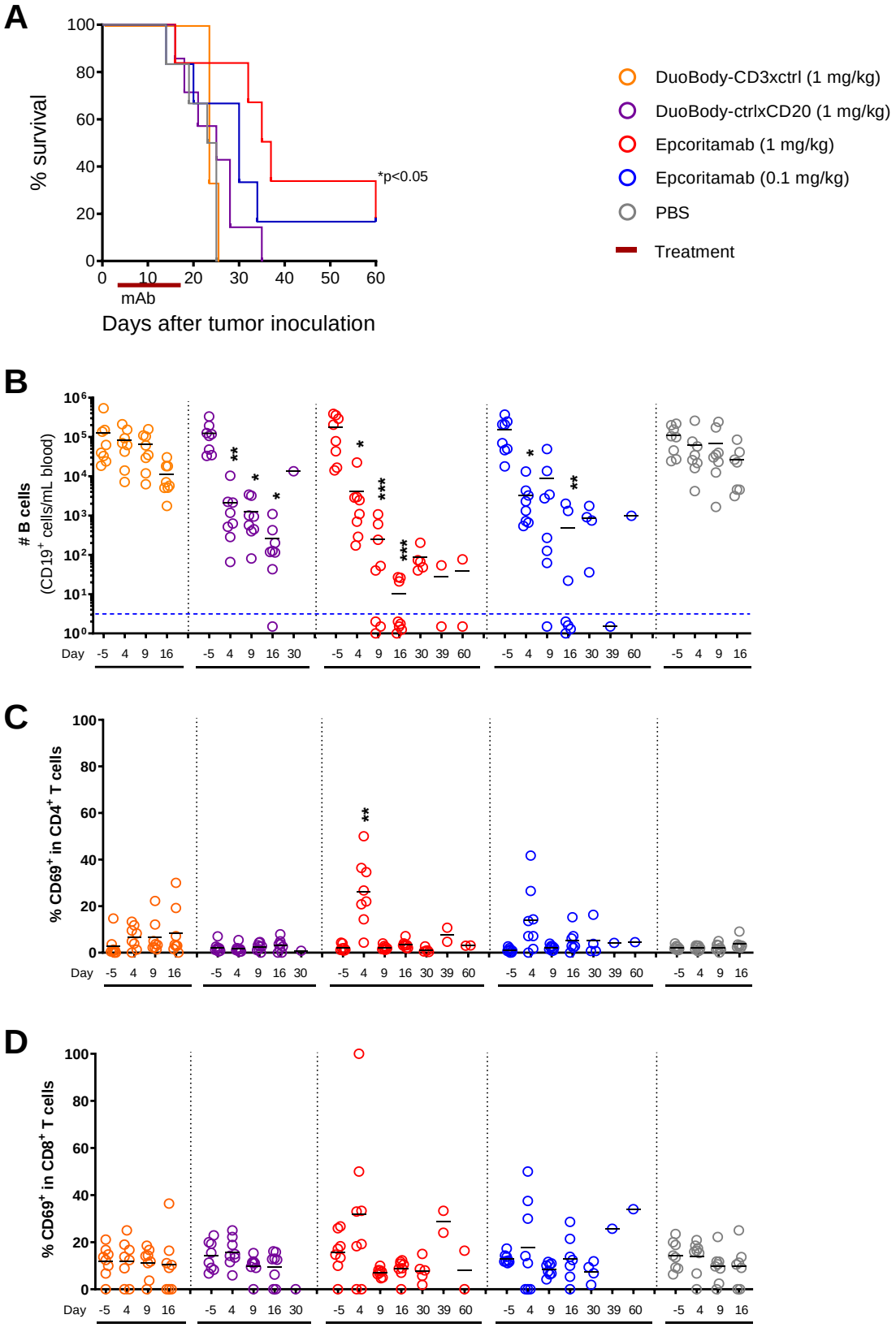
Figure 11　ヒト免疫細胞を有するマウスを用いた細胞株由来異種移植（CDX）モデルでのエプコリタマブの効果



BLI = bioluminescence imaging; CD = cluster of differentiation; Ctrl = control (nonbinding arm); epco = epcoritamab; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, /K409R DuoBody® mutations; HIS = human immune system; Ig = immunoglobulin; IV = intravenous; 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; IgG-RTX-FEAR = a rituximab variant with an inert Fc domain and K409R (DuoBody®) mutation; SC = subcutaneous; 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 IgG1-RTX-FEAR (10 mg/kg), followed by epcoritamab (0.05 mg/kg) or not after 4 h. 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 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

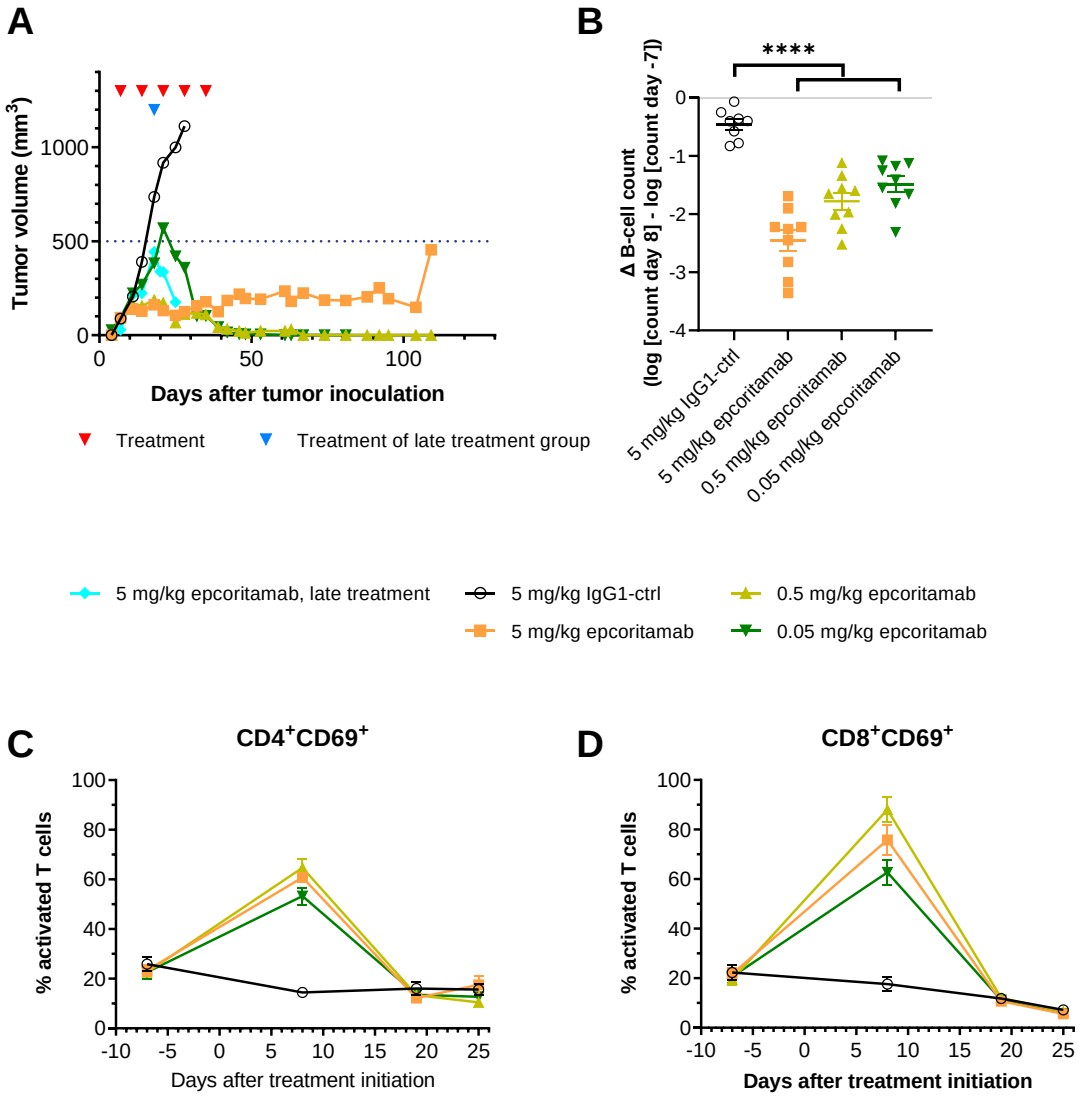
Figure 12　BRGS-ヒト免疫系（HIS）マウスを用いた Raji 細胞皮下注入モデルでのエプコリタマブの効果



ANOVA = analysis of variance; CD = cluster of differentiation; ctrl = control (nonbinding arm); HIS = human immune system; IV = intravenous; PBS = phosphate-buffered saline; SC = subcutaneous

Tumors were induced in BRGS-HIS mice by SC injection of Raji-luc cells at Day 0. Mice were treated IV with 1 mg/kg or 0.1 mg/kg Ab or vehicle control on Day 3, 7, 10, 14, and 17. **A**: Survival curves (mice were euthanized when humane endpoint criteria were reached) per treatment group (n = 8) (Log-rank [Mantel-Cox] test). **B**. Individual and average absolute numbers of circulating CD19+ B cells determined by flow cytometry and indicated per sampling time and per treatment group. **C**: Individual and average percentage of CD69+ cells in CD4+ T cell population (CD3+CD19-CD4+ events). **D**: Individual and average percentage of CD69+ cells in CD8+ T cell population (CD3+CD19-CD8+ events). Statistical differences in **B**-**D** were determined with Kruskall-Wallis ANOVA test followed by Dunn's multiple comparison test; compared with PBS-treated mice at the same day. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001. Source: GMB3013-033

Figure 13　NSG-ヒト免疫系（HIS）マウスを用いた Raji 細胞皮下注入モデルでのエプコリタマブの効果



CD = cluster of differentiation; ctrl = control (nonbinding); HIS = human immune system; Ig = immunoglobulin; IV = intravenous; SC = subcutaneous; 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. Treatment with 5 mg/kg epcoritamab was initiated at Day 18 in a separate

late treatment group (average tumor volume at the start of treatment in this group was ~677 mm^3). **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 in the human CD45+CD4+ (hCD45+hCD4+hCD8-) T-cell populations in blood samples at the indicated timepoints, as determined by flow cytometry. Data shown are mean ± SEM. **D**: Percentages of CD69+ cells in the human CD45+CD8+ (hCD45+hCD4-hCD8+) T-cell populations in blood samples at the indicated timepoints, as determined by flow cytometry. Data shown are mean ± SEM. Source: GMB3013-073

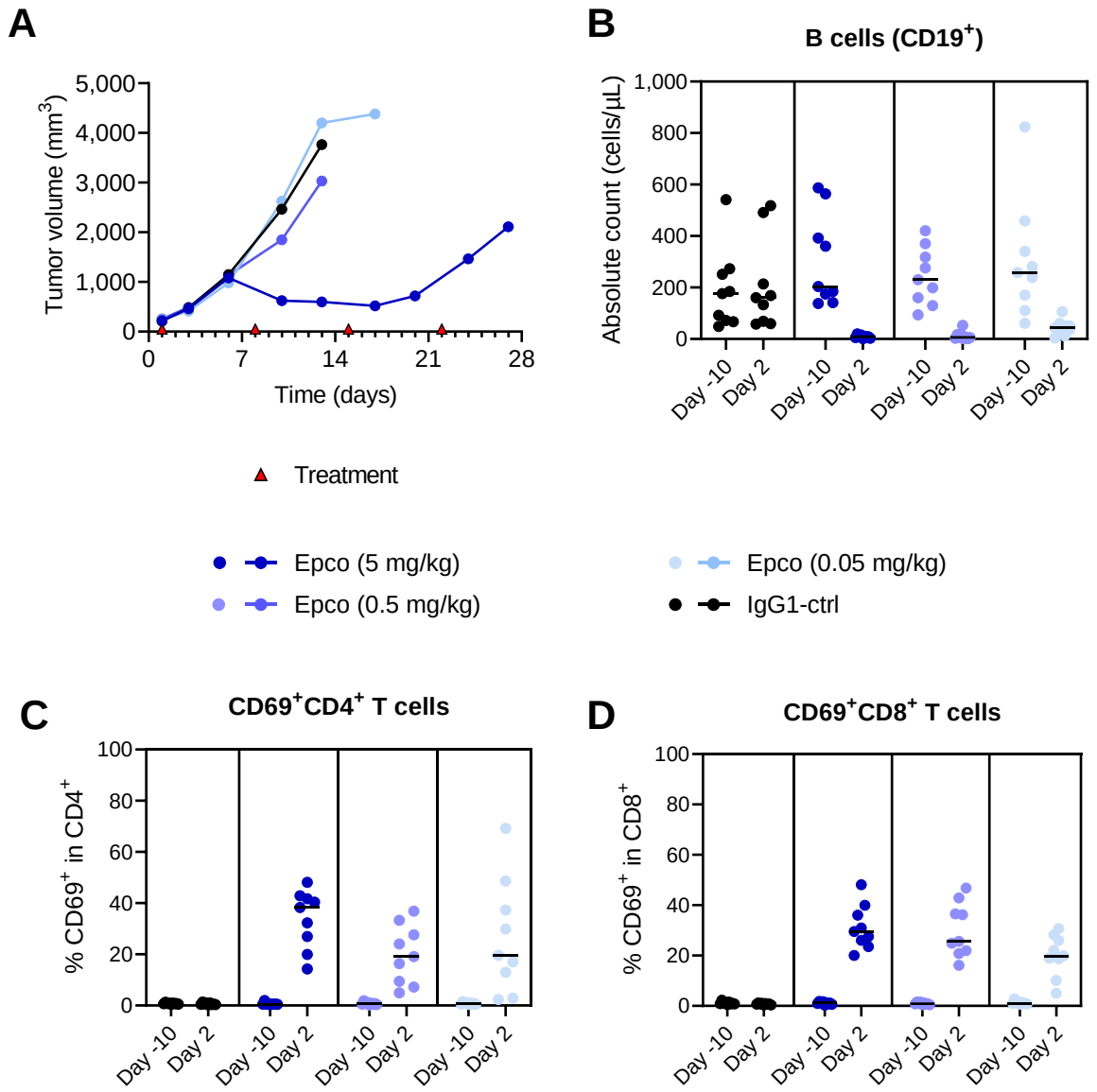
2.4.4　ヒト免疫系（HIS）マウスを用いた患者由来異種移植片（PDX）モデル

[GMB3013-083]

PDX モデルは、ヒト腫瘍生検検体を免疫不全マウスに直接移植することにより作製した。このモデルは、細胞株由来異種移植モデルよりもヒト腫瘍で認められる遺伝的及び組織学的多様性をより適切に表していると考えられている（Moro et al, 2012; Tentler et al, 2012）。DLBCL 患者由来 PDX モデルである LY2214 は、huNOG マウスの脇腹に Crown Bioscience 社の HuPrime®PDX 収集保管用マウスから採取した腫瘍片（直径 2~3 mm）を皮下移植することにより作製した。HuNOG マウスは、非肥満糖尿病（NOD）バックグラウンド系統の NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac（NOG）雌性幼若マウスに放射線照射し、健康ヒト由来のヒト CD34 陽性造血前駆細胞を静脈内注入移植することにより作製したヒト免疫系を有する HIS マウスである。腫瘍体積はキャリパーで測定した。腫瘍が 100～200 mm^3 に達した時点で、マウスを無作為化し、エプコリタマブ（0.05、0.5 又は 5 mg/kg）の投与を開始した（無作為化の日を Day1 とし、Day1、8、15、22、29 及び 36 にマウスに投与した）。血液試料は、投与前 11 日（ベースライン）及び投与開始後 1 日（Day2）に採取した。エプコリタマブの効果は IgG1-ctrl と比較した。

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、低用量（0.05 及び 0.5 mg/kg）では抑制は認められなかった（Figure 14）。エプコリタマブの薬理活性は、評価した全ての用量で初回投与後 1 日に採取した血液試料で既に認められ、ヒト T 細胞の活性化及び循環血液中のヒト B 細胞数の減少が認められた。

Figure 14　DLBCL 患者由来異種移植片（PDX）皮下移植モデル LY2214 でのエプコリタマブの効果



CD = cluster of differentiation; ctrl = control (nonbinding); DLBCL = diffuse large B-cell lymphoma; epco = epcoritamab; Ig = immunoglobulin; IV = intravenous; PDX = patient-derived xenograft model; SC = subcutaneous; SEM = standard error of the mean

The DLBCL PDX model LY2214 was established by SC implantation of tumor blocks. When tumors had reached an average volume of ~100-200 mm^3, treatment was initiated (Day 1). Mice were treated IV with 0.05, 0.5 or 5 mg/kg Ab on Day 1, 8, 15, 22, 29, and 36. **A**: Median tumor volumes per treatment group (n = 9). **B**: Median absolute B-cell counts on Day −10 and Day 2 per µL. **C**: Percentages of CD69+ cells in the human CD45+CD4+ (hCD45+hCD4+hCD8-) T-cell populations in blood samples at the indicated timepoints, as determined by flow cytometry. Median percentages per group are indicated. **D**: Percentages of CD69+ cells in the human CD45+CD8+ (hCD45+hCD4-hCD8+) T-cell populations in blood samples at the indicated timepoints, as determined by flow cytometry. Median percentages per group are indicated. Source: GMB3013-083

2.5　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

[GMB3013-035]

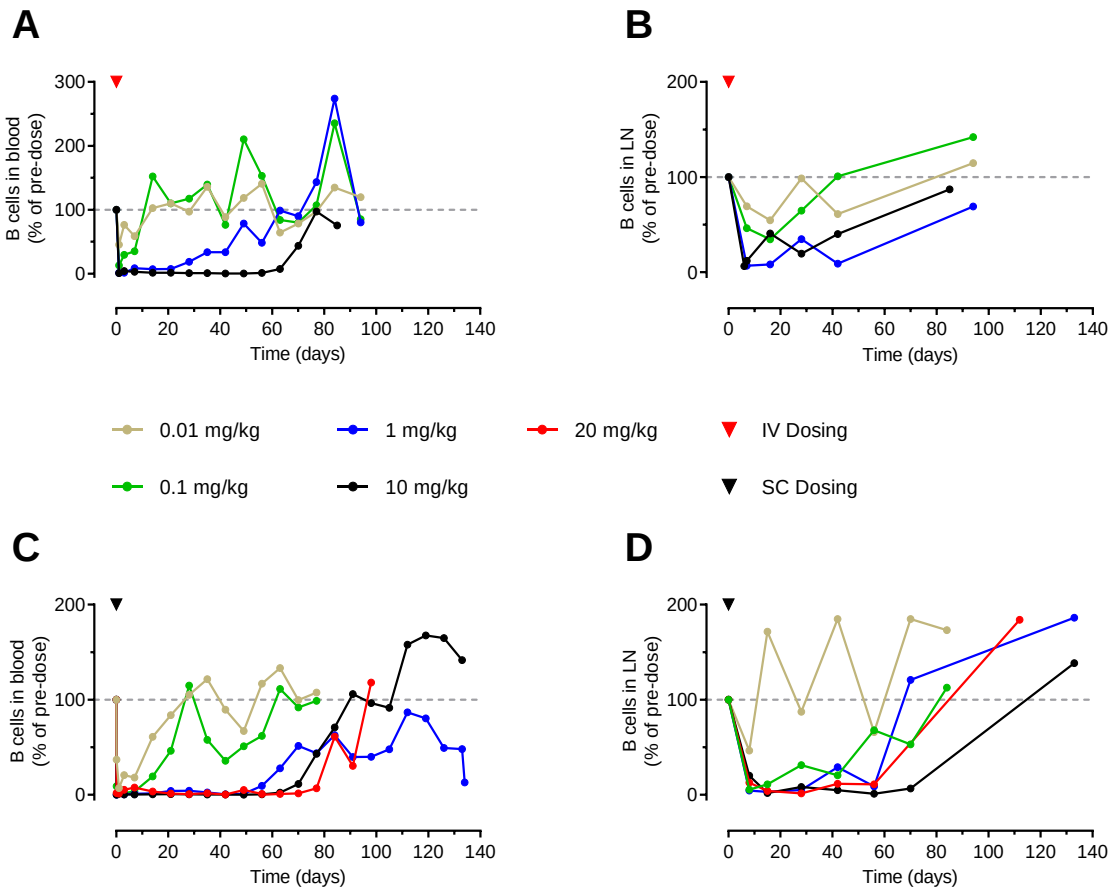
エプコリタマブはヒト及びカニクイザルで CD3 及び CD20 に対して同程度の結合活性を示し in vitro 及び in vivo 試験でカニクイザルの細胞に薬理活性を示すが、げっ歯類の CD3 及び CD20 と交差反応しない。これらの結果に基づき、エプコリタマブに関連する毒性評価に適した動物種としてカニクイザル（*Macaca fascicularis*）を選択した。非臨床毒性試験では、種々の用量及び複数の投与経路（皮下及び静脈内投与）でエプコリタマブの薬物動態及び毒性プロファイルを明らかにし、薬理活性の指標として、動物の末梢血、リンパ節及び脾臓中 B 細胞数に対するエプコリタマブの作用を評価した（GMB3013-035）。これらの試験の毒性所見は[2.6.6-2 項]及び[2.6.6-3 項]に示している。

単回投与探索毒性試験（[■■■ 529668]）では、雌カニクイザルにエプコリタマブを単回静脈内投与（0.01、0.1、1 又は 10 mg/kg）した。末梢血及びリンパ節 B 細胞数の用量依存的な減少が認められた（Figure 15A、B）。血液中の B 細胞数は 0.01 mg/kg の用量で減少し、0.1 mg/kg の用量で部分的～完全な B 細胞の枯渇が、1 及び 10 mg/kg の用量では完全な B 細胞の枯渇が認められた。B 細胞数の回復は全ての用量群で認められ、最低用量群では 3~14 日後に速やかにベースライン値に回復し、最高用量群では投与後 11 週のみで B 細胞数の完全な回復が認められた。リンパ節 B 細胞数は、0.01 及び 0.1 mg/kg の単回静脈内投与で減少し、1 及び 10 mg/kg の単回投与で完全な B 細胞枯渇が認められた。リンパ節 B 細胞数の回復は用量に関連していた。低用量群（0.01 及び 0.1 mg/kg）では、それぞれ投与後 28 日（0.01 mg/kg）及び 42 日（0.1 mg/kg）に B 細胞数の完全な回復が認められた。高用量群（1 及び 10 mg/kg）では B 細胞の枯渇が投与後 7 週間持続し、その後回復傾向が認められたが、回復は最終測定時点（12~14 週間）でも完全ではなかった。

用量設定毒性試験（[■■■ 501775]）では、雌カニクイザルにエプコリタマブを、週 1 回、4 週間静脈内投与（0.01、0.1 又は 1 mg/kg）、静脈内プライミング投与（0.01 mg/kg）に続く目標用量（1 mg/kg）の静脈内投与、又は単回皮下投与（0.01、0.1、1、10 又は 20 mg/kg）した。末梢血及びリンパ節 B 細胞数の用量依存的な減少が、反復静脈内投与、プライミング投与に続く静脈内投与及び単回皮下投与の全てに認められた。0.01 mg/kg の反復静脈内投与では、最初の 2 回の静脈内投与により、末梢血 B 細胞数がほぼ検出不能なレベルまで減少したが、投与間で部分的な回復が認められた。0.1 及び 1 mg/kg の反復静脈内投与では、末梢血 B 細胞は完全に枯渇し、それぞれ Day21 及び Day42 以降に（部分的な）回復が認められた。エプコリタマブの単回皮下投与では、全ての用量で末梢血 B 細胞は完全に枯渇したが、リンパ節 B 細胞数は、低用量（0.01 mg/kg）では減少は全く認められない又は部分的で、0.1 mg/kg 以上の全ての用量では検出不能なレベルまで減少した。B 細胞数の回復は全ての投与群で末梢血及びリンパ節の両方で認められ、低用量（0.01 及び 0.1 mg/kg）群の末梢血及び 0.01 mg/kg 群のリンパ節では投与後 4 週でベースライン値に回復し、0.1 mg/kg 群のリンパ節及び高用量（1、10 及び 20 mg/kg）群の末梢血及びリンパ節の両方では投与後 10~16 週でベースライン値への回復が認められた（Figure 15C、D）。静脈内プライミング投与（0.01 mg/kg）に続く目標用量 1 mg/kg の静脈内投与では、

末梢血及びリンパ節 B 細胞は完全に枯渇し、予定された剖検日（Day29）まで枯渇が持続した。リンパ節及び脾臓の B 細胞数の減少及び回復は、免疫組織染色により確認した（Figure 16）。

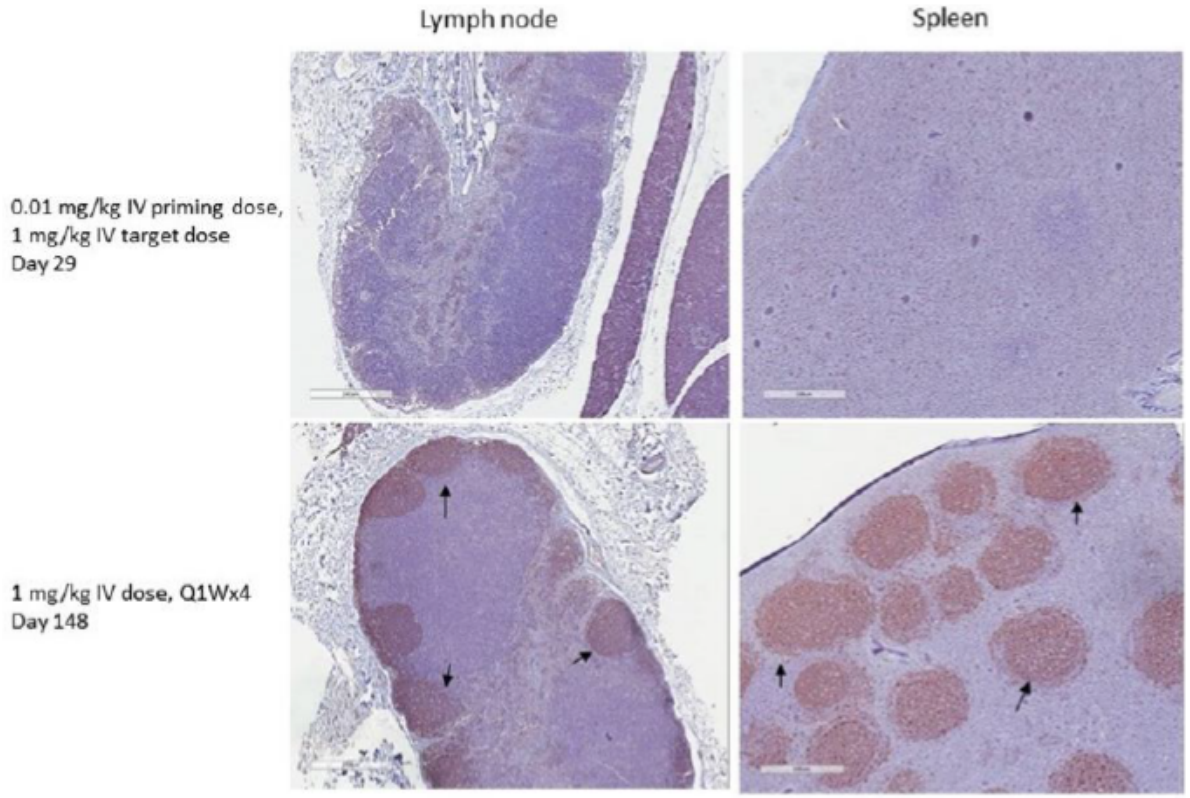
Figure 15　エプコリタマブの静脈内及び皮下投与後のカニクイザル末梢血及びリンパ節 B 細胞数



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 16　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 細胞の減少及び回復



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

Upper panels: cynomolgus monkey #4502 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. Lower panels: cynomolgus monkey #3502 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. 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

GLP 適用毒性試験（[[redacted] 503484]）では、雌雄カニクイザルにエプコリタマブを週 1 回、5 週間静脈内投与（0.01、0.1 又は 1 mg/kg）、単回静脈内投与（0.1 又は 1 mg/kg）又は単回皮下投与（0.1、1 又は 10 mg/kg）した。対照群には生理食塩液を週 1 回、5 週間静脈内投与した。生理食塩液の静脈内投与は、末梢血 B 細胞数を部分的に減少させたが、B 細胞数は最終投与後 3 週間以内にベースラインに回復した。エプコリタマブの週 1 回、5 週間の静脈内投与では、初回投与後に用量依存的な B 細胞数の減少が認められ、低用量群では部分的な減少、高用量群では長期間継続した完全な枯渇が認められた。抗薬物抗体（anti-drug antibody、ADA）が曝露量に影響した結果、0.01 mg/kg 群では試験開始後 2 週（2 回目投与後）、0.1 mg/kg 群では試験開始後 4 週（4 回目投与後）に部分的な回復が認められた。0.1 及び 1 mg/kg の単回静脈内投与では、末梢血 B 細胞は完全に枯渇し、1 mg/kg 群では枯渇は剖検日（Day36）まで継続した。エプコリタマブの皮下投与では、評価した全ての用量群で末梢血 B 細胞は完全に枯渇した。最低用量（0.1 mg/kg）群では、B 細胞数の回復の徴候が認められたが、1 及び 10 mg/kg 群では、剖検日（Day32）まで B 細胞の完全な枯渇が継続した。

以上より、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の末梢血及びリンパ器官での用量依存的なB細胞数の減少が示された。このB細胞数の減少は可逆的で、回復までの期間はエプコリタマブの用量及びクリアランスに関連した。カニクイザルの皮下投与は高いバイオアベイラビリティを示したが、皮下投与は静脈内投与と比較して血中サイトカイン放出の遅延及び低下をもたらした（[2.6.6-3.1 項]及び[2.6.6-3.2 項]参照）。これらの結果から、臨床での投与経路として皮下投与を用いることの妥当性が裏付けられた。

3.　副次的薬理試験

3.1　エプコリタマブの免疫原性の予測

エプコリタマブのCD3結合性Fabアームの可変領域（[GMB3013-031]）及びFcドメイン（[GMB3013-055]）の免疫原性をin silico及びin vitro試験で予測した。CD20結合アームの可変領域は完全ヒト型であるため、この領域の免疫原性試験は実施しなかった。

エプコリタマブに関連して実施した副次的薬理試験の一覧をTable 12に示す。

Table 12　副次的薬理試験の概要

Study Title	Test System	Test Article	Conc./ Dose Level	Parameters Studied	Study No./CTD Location
Evaluation of the immunogenicity of the CD3 arm of DuoBody CD3xCD20 in silico and in vitro	In silico	V_H and V_L regions of 3005a	NA	Immunogenicity (EpiMatrix System)	[GMB3013-031] CTD: 4.2.1.2-1
	In vitro	Fab fragment of 3005a	15 µg/mL	Induction of T-cell responses (proliferation and IL-2 production) (EpiScreen™ DC):T-cell assay)	
Evaluation of the immunogenicity of the Fc region of DuoBody CD3xCD20 in silico and in vitro	In silico	Fc regions of epcoritamab, 3005a and 3001d	NA	Immunogenicity (iTope™ technology and TECD™ epitope database)	[GMB3013-055] CTD: 4.2.1.2-2
	In silico	Fc regions of epcoritamab, 3005a and 3001d	NA	Immunogenicity (EpiMatrix System)	
	In vitro	Fc region of epcoritamab, Fc region of 3005a	15 µg/mL	Induction of T-cell responses (proliferation and IL-2 production) (EpiScreen™ DC:T-cell assay)	

Abbreviations: CD = cluster of differentiation; Conc. = concentration; CTD = common technical document; DC = dendritic cell; Fc = fragment crystallizable; IL = interleukin; NA = not applicable; No. = number; V_H = variable region of the immunoglobulin heavy chain; V_L = variable region of the immunoglobulin light chain

3.1.1　CD3結合性Fabアームの免疫原性評価

[GMB3013-031]

In silico解析を[redacted]社（米国）で実施し、EpiMatrixシステムにより全体的及び部分的免疫原性に対してアミノ酸配列を評価して、IgG1-CD3-FEAL（3005a）のV_H及びV_Lのアミノ酸配列（それぞれエプコリタマブのCD3結合アームのV_H及びV_Lと同一）の免疫原性を予測した。これは、配列内の主要組織適合複合体（major histocompatibility complex、MHC）結合性ペプチドの

予測並びに既知の MHC リガンド及び T 細胞エピトープに対する配列のスクリーニングに基づいている。全体的免疫原性は全て独立した V_H 及び V_L のアミノ酸配列で低スコアであったが、部分的免疫原性の解析では、IgG1-CD3-FEAL（3005a）の V_H 配列に免疫原性リスクをもたらす可能性がある 2 つのネオエピトープ（新生抗原決定部位）の存在が予測された。IgG1-CD3-FEAL（3005a）の $V_H + V_L$ 全体配列の免疫原性は、マウスの親 mAb（mIgG1-CD3）の免疫原性と比較して低かった。IgG1-CD3-FEAL（3005a）の $V_H + V_L$ 全体配列に対する抗治療薬応答発生率の予測値は一般的な mAb の臨床水準範囲内にあり、IgG1-CD3-FEAL（3005a）曝露による応答発生率は 6%未満と予測された。

In vitro 試験を [redacted] 社（英国）で実施し、EpiScreen™樹状細胞（dendritic cell、DC）：T 細胞アッセイを用いて、Fab フラグメントを負荷した成熟単球由来 DC（monocyte-derived dendritic cell、MoDC）による CD4 陽性 T 細胞応答誘発活性を測定して、IgG1-CD3-FEAL（3005a）の Fab フラグメント（エプコリタマブの CD3 結合アームの Fab フラグメントと同一）の免疫原性を評価した。単球を IL-4 及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（granulocyte-macrophage colony-stimulating factor、GM-CSF）と 3 日間インキュベートした後、0.3 µmol/L の Fab フラグメントを添加し、24 時間インキュベートした。その後 DC を成熟化させるために TNFα を添加し更に 4 日間インキュベートした。次に Fab フラグメントを負荷した DC を CD4 陽性 T 細胞とインキュベートし、^{3}H-チミジンアッセイで T 細胞の増殖を測定し、酵素結合免疫スポット（enzyme-linked immunospot、ELISpot）アッセイで IL-2 放出活性を測定した。IgG1-CD3-FEAL（3005a）の Fab フラグメントは、ドナー［n = 51、ヒト白血球抗原（human leukocyte antigen、HLA）アロタイプに基づき欧州及び北米人集団を代表する］のわずか 2%に T 細胞応答（T 細胞の増殖及び IL-2 放出）を誘導した。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 EpiScreen アッセイでドナーの 10%以上に応答を誘導することが知られていることから、IgG1-CD3-FEAL（3005a）の Fab フラグメントのヒトに対する免疫原性は低いと考えられる。

以上より、[redacted] 社及び [redacted] 社で実施した試験結果に基づいて、エプコリタマブの CD3 結合アームの免疫原性は低く、他の非免疫原性の mAb 治療薬の範囲内であると予測された。

3.1.2　エプコリタマブの Fc ドメインの免疫原性評価

[GMB3013-055]

野生型 IgG1 と比較して、エプコリタマブの Fc ドメインは 4 つの変異［CH2 ドメインの L234F、L235E、D265A（FEA）変異及び CH3 ドメインの F405L、K409R 変異］を有する。

In silico での免疫原性予測解析を [redacted] 社（英国）及び [redacted] 社（米国）の両方で実施した。Antitope 社の in silico iTope™技術及び T 細胞エピトープデータベース（TCED™）を用いて、エプコリタマブの Fc ドメインにヒト MHC クラス II 結合ペプチド及び CD4 陽性 T ヘルパー（T helper、Th）細胞エピトープとして知られるペプチドを同定した。この解析により、CH2 配列の D265A 変異により、高親和性かつ非特異的に結合する 2 つのペプチドの導入が予測され、IgG1-FEAR の CH3 配列の K409R 変異により、中程度の親和性かつ非特異的に結合する 1 つのペプチドの導入が予測された。しかし、これらの領域では TCED™エピトープは同定されなかった。IgG1-FEAL の CH3 配列の F405L 変異による MHC クラス II 結合ペプチドの導入は予測され

なかった。[redacted]社は、EpiMatrix システム（3.1.1 項の説明参照）を用いて、エプコリタマブの CH2 及び CH3 ドメインに導入した点突然変異の免疫原性を野生型の配列と比較解析した。IgG1-FEAL 及び IgG1-FEAR のヒンジ領域-CH2 配列の FEA 不活性化変異並びに CH3 配列の F405L DuoBody 変異による抗体分子の全体的及び部分的免疫原性のスコアは低く、これらの変異が免疫原性に対して重大なリスクをもたらすとは予測されなかった。K409R DuoBody 変異は T 細胞エピトープ候補の対象であるが、[redacted]社は、免疫原性に対するこの保存的変異の影響は少ないと考察している。

In vitro 試験を[redacted]社で実施し、EpiScreen™DC：T 細胞アッセイ（3.1.1 項の説明参照）を用いて、IgG1-CD3-FEAL（3005a）の Fc ドメイン全体の免疫原性を評価した。IgG1-CD3-FEAL（3005a）の Fc ドメインの解析では、ドナー（n = 51、HLA アロタイプに基づき欧州及び北米人集団を代表する）のわずか 6%に T 細胞応答（T 細胞の増殖及び IL-2 放出の両方）が誘導された。臨床での重大な免疫原性のリスクに関連するタンパク質治療薬は、EpiScreen アッセイでドナーの 10%以上に応答を誘導することが知られていることから、IgG1-CD3-FEAL（3005a）の Fc ドメインのヒトに対する免疫原性は低いと考えられる。

以上より、[redacted]社及び[redacted]社で実施した試験結果に基づいて、エプコリタマブの Fc ドメインの免疫原性は低く、免疫原性を示さない他の mAb 治療薬の範囲内であると予測された。

4.　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進行性疾患の治療を目的として開発されているバイオテクノロジー応用製品であり、ICH S6、S7A 及び S9 ガイドラインに従い、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。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（[2.6.6-3.2 項]）。

ICH S9 ガイドラインに従って、投与後の詳細な一般状態観察により中枢神経系及び呼吸器に対する影響の可能性を評価した。カニクイザルを用いた主要な毒性試験（[[redacted]503484]では、標準的な一般状態観察の評価の一環として、0.1 mg/kg を投与した雄 3 例中 1 例、1 mg/kg を投与した雌 3 例中 1 例、並びに 10 mg/kg を投与した雄 3 例中 3 例及び雌 3 例中 2 例に、Day1 のエプコリタマブの皮下投与後 6 時間又は 12 時間に軽度の協調運動障害が認められた。これらの動物はまた、投与後 12 時間まで活動性低下及び円背位の徴候、並びに全身性の体表面皮膚の発赤を示し、投与後 4～6 時間に嘔吐が認められた。おおむね、軽度の協調運動障害を含む一般状態の変化はエプコリタマブ投与後の発現時期に基づいてサイトカイン濃度の増加に関連している可能性が考えられ、投与後に認められた他の一般状態の変化（活動性低下及び円背位）に一致して認められた。一般状態観察で認められた協調運動障害は一過性であり、反復投与後の再発はなく追加の獣医学的検査を必要とせず、相関する病理組織学的所見は認められず、この試験の無毒性量に影響しなかった。最終皮下投与後の Day29 及び週 1 回静脈内投与では同様の徴候は認められなかった。エプコリタマブ投与後の詳細な一般状態観察で、呼吸器の変化（例：鼻汁、努力呼吸又は気管支痙攣）は認められなかった。以上より、カニクイザルを用いた特定の安全性薬理パラ

メーターの評価で、エプコリタマブ投与による心血管系、呼吸系及び神経系に対する有害な作用は認められなかった。

5.　薬力学的薬物相互作用試験

エプコリタマブの臨床開発に関連する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。

6.　考察及び結論

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 bsAb である。エプコリタマブは、T 細胞表面の CD3 及び B 細胞若しくは B 細胞性腫瘍細胞表面の CD20 に同時に結合することにより、細胞傷害シナプスの形成及び CD20 陽性標的細胞の死滅を誘導する。エプコリタマブは、CD20 発現 B 細胞性悪性腫瘍の治療薬として開発中である。

DuoBody 分子は、制御された Fab アーム交換により作製され、標準型 IgG 構造、生化学的特性、正常な FcRn 結合活性及び IgG1 抗体に典型的な生体内安定性を示す。エプコリタマブを現在臨床開発中の CD3xCD20bsAb 類似化合物と in vitro での T 細胞の活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害アッセイで比較した非臨床試験で、エプコリタマブは、1 つの CD3 及び 1 つの CD20 結合部位を有する 3 種類の IgG1-類似 bsAb（Regeneron 社の odronextamab、Xencor 社の plamotamab 並びに Genentech 社及び Roche 社の mosunetuzumab に基づく bsAb 化合物）よりも有意に強力な効果を示し、1 つの CD3 結合部位及び 2 つの CD20 結合部位を有する bsAb（Roche 社の glofitamab に基づく bsAb 化合物）と同程度の効果を示した。

制御された Fab アーム交換に基づく DuoBody 技術には、他の bsAb 技術に比べていくつかの利点がある。エプコリタマブは、標準型 IgG1 構造、生化学的特性、正常な FcRn 結合活性及びそれに伴う比較的長い血漿中半減期を示す。相補的点突然変異はヘテロ二量体化を強く促進し、これにより、最終産物の収率、純度及び安定性が向上した。生体内の生理的条件下での還元反応に耐性を示す IgG1 ヒンジ領域を使用し（Labrijn et al, 2011）、DuoBody フォーマットのアーム交換後の安定性を高めた。重要なことに、DuoBody 分子は生体内で安定性を示し、生体内で Fab アーム交換を行うことが知られる IgG4（Labrijn et al, 2009）の過剰存在下でもアーム交換は起こらない（Labrijn et al, 2013）。複数の DuoBody 分子が現在臨床開発段階にあり、アミバンタマブ（JAN）（EGFRxMET bsAb）は FDA 及び EMA で承認されている（Rybrevant, 2021 年 5 月）。

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 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。したがって、エプコリタマブの Fc ドメインに遺伝子操作を施し、CD20 発現標的細胞が存在するときに限って細胞傷害作用が誘導されるようにした。Fc ドメインの機能抑制（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、エプコリタマブの親 mAb（IgG1-CD3-FEAL、3005a）は、FcγR 陽性細胞（すなわち、PBMC）の存在下で T 細胞の活性化、増殖及び細胞傷害活性を誘導しなかった。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 は標的非依存性の 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 との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。

抗 CD20 mAb による CD20 発現細胞標的療法は、B 細胞性悪性腫瘍の治療に非常に有効であることが示されている。抗 CD20 mAb は、非ホジキンリンパ腫（non-Hodgkin lymphoma、NHL）及び B 細胞性慢性リンパ性白血病（B-cell chronic lymphocytic leukemia、B-CLL）患者の SOC の中核となっている。化学療法に抗 CD20 mAb 療法を追加すると、これらの患者の転帰は改善するが、多くの患者で疾患の再燃又は再発が発生することから、B 細胞を標的とする異なる作用機序を備えた治療の開発が求められている。mAb の作用機序は、自然免疫細胞による ADCC 及び ADCP、CDC 誘導などの 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作用を誘導することにより、適応免疫系を始動する。エプコリタマブによる T 細胞の活性化は、他の CD3 bsAb でも説明されているように、ペプチド-MHC 複合体とは無関係であり、TCR の特異性に依存しない（Offner et al, 2006）。エプコリタマブは、他の CD3 bsAb でも説明されているように、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の両方の細胞傷害活性を誘導する（Haas et al, 2009; Mack et al, 1997）。したがって、理論的には、TCR の特異性に関係なく、全ての T 細胞を活性化して CD20 発現細胞を特異的に死滅させることが可能である。抗 CD20 mAb は B 細胞性悪性腫瘍治療の SOC に含まれ、エプコリタマブの first-in-human 試験に組み入れられた患者の多くは、これらの mAb による治療を既に受けている。抗 CD20 抗体に対する B 細胞性悪性腫瘍の耐性は、ほとんどの場合、CD20 発現の消失又は CD20 の変異によるものではない。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。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 mAb の存在下でも抗腫瘍活性を誘導できることが示された。さらに、エプコリタマブは、抗 CD20 mAb の治療歴のある患者の検体で効果的な細胞傷害作用を誘導した。細胞傷害活性に対する EC_{50} 値は、結合活性に対する EC_{50} 値より著しく低かった。これは、エプコリタマブが不飽和濃度で強力な細胞傷害作用を誘導する可能性があることを示している。したがって、以前又は現在の治療ラインから循環血液中に抗 CD20 mAb が存在する患者でも、エプコリタマブによる治療が奏効する可能性がある。

カニクイザルを用いた特定の安全性薬理パラメーター（心電図、心拍数及び詳細な一般状態観察）の評価で、心血管系、呼吸系及び神経系に対する有害な作用は認められなかった。

以上まとめると、エプコリタマブは、ヒト化 IgG1λ 抗 CD3 及びヒト型 IgG1κ 抗 CD20 親 mAb の制御された Fab アーム交換により作製された新規 CD3xCD20 bsAb 製品である。エプコリタマブは、T 細胞の活性化及び CD20 陽性標的細胞の死滅を誘導し、これは、エプコリタマブの CD3 と CD20 の両方への同時結合によってのみ誘導される。非臨床薬理試験で、エプコリタマブがヒトの CD20 発現 B 細胞性悪性腫瘍の有効な治療薬となる可能性が示された。

7. 参考文献

Barbas, C. F., 3rd, 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.

Brischwein, K., Schlereth, B., Guller, B., Steiger, C., Wolf, A., Lutterbuese, R., Offner, S., Locher, M., Urbig, T., Raum, T., et al. (2006). MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. Mol Immunol 43, 1129-1143.

de Jong, R. N., Beurskens, F. J., Verploegen, S., Strumane, K., van Kampen, M. D., Voorhorst, M., Horstman, W., Engelberts, P. J., Oostindie, S. C., Wang, G., et al. (2016). A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. PLoS Biol 14, e1002344.

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.

FDA (2019). FDA approves lenalidomide for follicular and marginal zone lymphoma; https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-lenalidomide-follicular-and-marginal-zone-lymphoma; accessed 06-Apr-2020.

Haas, C., Krinner, E., Brischwein, K., Hoffmann, P., Lutterbuse, R., Schlereth, B., Kufer, P., and Baeuerle, P. A. (2009). Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. Immunobiology 214, 441-453.

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.

Kritharis, A., Coyle, M., Sharma, J., and Evens, A. M. (2015). Lenalidomide in non-Hodgkin lymphoma: biological perspectives and therapeutic opportunities. Blood 125, 2471-2476.

Labrijn, A. F., Buijsse, A. O., van den Bremer, E. T., Verwilligen, A. Y., Bleeker, W. K., Thorpe, S. J., Killestein, J., Polman, C. H., Aalberse, R. C., Schuurman, J., et al. (2009). Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. Nat Biotechnol 27, 767-771.

Labrijn, A. F., Rispens, T., Meesters, J., Rose, R. J., den Bleker, T. H., Loverix, S., van den Bremer, E. T., Neijssen, J., Vink, T., Lasters, I., et al. (2011). Species-specific determinants in the IgG CH3 domain enable Fab-arm exchange by affecting the noncovalent CH3-CH3 interaction strength. J Immunol 187, 3238-3246.

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.

LeBlanc, R., Hideshima, T., Catley, L. P., Shringarpure, R., Burger, R., Mitsiades, N., Mitsiades, C., Cheema, P., Chauhan, D., Richardson, P. G., et al. (2004). Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. Blood 103, 1787-1790.

Legrand, N., Huntington, N. D., Nagasawa, M., Bakker, A. Q., Schotte, R., Strick-Marchand, H., de Geus, S. J., Pouw, S. M., Bohne, M., Voordouw, A., et al. (2011). Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 13224-13229.

Mack, M., Gruber, R., Schmidt, S., Riethmuller, G., and Kufer, P. (1997). Biologic properties of a bispecific single-chain antibody directed against 17-1A (EpCAM) and CD3: tumor cell-dependent T cell stimulation and cytotoxic activity. J Immunol 158, 3965-3970.

Moro, M., Bertolini, G., Tortoreto, M., Pastorino, U., Sozzi, G., and Roz, L. (2012). Patient-derived xenografts of non small cell lung cancer: resurgence of an old model for investigation of modern concepts of tailored therapy and cancer stem cells. In J Biomed Biotechnol, p. 568567.

Offner, S., Hofmeister, R., Romaniuk, A., Kufer, P., and Baeuerle, P. A. (2006). Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. Mol Immunol 43, 763-771.

PMDA (2020). PMDA approves lenalidomide with rituximab for RR follicular and marginal zone lymphoma; https://www.pmda.go.jp/drugs/2020/P20200220001/380809000_22200AMX00381000_A100_1.pdf; accessed 21-June-2022.

Rodrigues, M. L., Shalaby, M. R., Werther, W., Presta, L., and Carter, P. (1992). Engineering a humanized bispecific F(ab')2 fragment for improved binding to T cells. Int J Cancer Suppl 7, 45-50.

Roopenian, D. C., and Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat Rev Immunol 7, 715-725.

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.

Tam, S. H., McCarthy, S. G., Brosnan, K., Goldberg, K. M., and Scallon, B. J. (2013). Correlations between pharmacokinetics of IgG antibodies in primates vs. FcRn-transgenic mice reveal a rodent model with predictive capabilities. MAbs 5, 397-405.

Teeling, J. L., Mackus, W. J., Wiegman, L. J., van den Brakel, J. H., Beers, S. A., French, R. R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J. W., et al. (2006). The Biological Activity of Human CD20 Monoclonal Antibodies Is Linked to Unique Epitopes on CD20. Journal of Immunology 177, 362-371.

Tentler, J. J., Tan, A. C., Weekes, C. D., Jimeno, A., Leong, S., Pitts, T. M., Arcaroli, J. J., Messersmith, W. A., and Eckhardt, S. G. (2012). Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. Nat Rev Clin Oncol 9, 338-350.

Tomayko, M. M., and Reynolds, C. P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. Cancer Chemother Pharmacol 24, 148-154.

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.

Wines, B. D., Vanderven, H. A., Esparon, S. E., Kristensen, A. B., Kent, S. J., and Hogarth, P. M. (2016). Dimeric FcgammaR Ectodomains as Probes of the Fc Receptor Function of Anti-Influenza Virus IgG. J Immunol 197, 1507-1516.

目次

1. 薬理試験：一覧表 6
2. 効力を裏付ける試験 8
3. 副次的薬理試験 25
4. 安全性薬理試験 27
5. 薬力学的薬物相互作用試験 28
6. 参考文献 29

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 5
Table 2　薬理試験一覧表 6

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）
2Q1W	twice weekly	週 2 回
Ab	antibody	抗体
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
B-NHL	B-cell non-Hodgkin lymphoma	B 細胞性非ホジキンリンパ腫
BrdU	5-bromo-2’-deoxyuridine	5-ブロモ-2’-デオキシウリジン
BRGS	BALB/c *Rag2*^{tm1Fwa} *IL-2Rγc*^{tm1Cgn} *SIRPα*^{NOD}	－
bsAb	bispecific antibody	二重特異性抗体
$bsAb_{Gen}$	CD3xCD20 bispecific antibody, based on mosunetuzumab	mosunetuzumab に基づく CD3xCD20 二重特異性抗体
$bsAb_{Reg}$	CD3xCD20 bispecific antibody, based on odronextamab	odronextamab に基づく CD3xCD20 二重特異性抗体
$bsAb_{Roc}$	CD3xCD20 bispecific antibody, based on glofitamab	glofitamab に基づく CD3xCD20 二重特異性抗体
bsAbXen	CD3xCD20 bispecific antibody, based on plamotamab	plamotamab に基づく CD3xCD20 二重特異性抗体
C1q	complememt component 1q	補体成分 C1q
CACAO	cross-reactive anti-CD3 antibody one	交差反応性のある抗 CD3 抗体
CD	cluster of differentiation	CD 分類
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CH	constant domain of heavy chain	重鎖定常領域
CHOP	cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin (doxorubicin), oncovin (vincristine), prednisone	シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾン
CPA	cyclophosphamide	シクロホスファミド
ctrl	control	対照
Daudi-luc	Daudi cell line transfected with gWIZ luciferase	gWIZ ルシフェラーゼ遺伝子を導入した Daudi 細胞（株）
DC	dendritic cell	樹状細胞
diFCGR	dimeric FcγR	FcγR 二量体
diFCGR-HisBAP	His-tagged, biotin-acceptor-peptide-containing dimeric FcγR	His タグ付きビオチンアクセプターペプチドを結合した FcγR 二量体
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
DOX	doxorubicin	ドキソルビシン
E:T ratio	effector cell to target cell ratio	エフェクター細胞：標的細胞比
EC_{20}	20% effective concentration	20%効果濃度
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
ECD	extracellular domain	細胞外ドメイン
ECG	electrocardiogram	心電図
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
ELISpot	enzyme-linked immunospot	酵素結合免疫スポット
F	female	雌
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

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
FcRn	neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
FEA	inertness mutations L234F, L235E and D265A	不活性変異 L234F、L235E、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
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
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
HEK-CD20	CD20-transfected HEK293F cells	CD20 遺伝子を導入した HEK293F 細胞
His	histidine tag	ヒスチジンタグ
HIS	human immune system	ヒト免疫系
hu	human	ヒト
huNOG	humanized NOG (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac)	ヒト化 NOG (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac)
IFN	interferon	インターフェロン
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgG1-RTX	rituximab	リツキシマブ
IgG1-RTX-FEAR	a rituximab variant 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バリアント
IL	interleukin	インターロイキン
IP	intraperitoneal(ly)	腹腔内
iTope™	in silico technology for prediction of peptide binding to human MHC class II alleles (proprietary to Antitope)	ヒト MHC クラス II 対立遺伝子へのペプチド結合を予測する in silico 評価手法（Antitope 社の登録商標）
IV	intravenous(ly)	静脈内
K_D	dissociation constant, affinity	解離定数、親和性
LAMP-1	lysosomal-associated protein 1	リソソーム関連タンパク質 1
LN	lymph node	リンパ節
M	male	雄
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
NA	not applicable	該当せず
NCG	NOD-*Prkdc*^{em26Cd52} *Il2rg*^{em26Cd22}/NjuCrl	－
ND	newly diagnosed	新規診断
NFAT	nuclear factor of activated T cells	活性化 T 細胞核因子
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NOD-SCID	mouse strain with severe combined immunodeficiency (SCID) crossed onto non-obese diabetic (NOD) background	非肥満性糖尿病（NOD）マウスに重症複合型免疫不全（SCID）遺伝子を導入したマウス系統
NS/0-CD20	NS/0 cells transfected with CD20	CD20 遺伝子を導入した NS/0 細胞
NSG	NOD.*Cg-Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ	－
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
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	pharmacokinetics	薬物動態
PRD	prednisone	プレドニゾン
Q1W	once weekly	週 1 回
QCM	quartz crystal microbalance	水晶振動子マイクロバランス
Raji-luc	Raji cell line transfected with gWIZ luciferase	gWIZ ルシフェラーゼ遺伝子を導入した Raji 細胞（株）
ROA	route of administration	投与経路
RR	relapsed or refractory	再発又は難治性
SC	subcutaneous(ly)	皮下
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合型免疫不全（症）
SK-BR-3-CD20	CD20-transfected human breast cancer SK-BR-3 cells	CD20 遺伝子を導入したヒト乳癌 SK-BR-3 細胞
TCED™	T-cell epitope database (proprietary database of Antitope)	T 細胞エピトープデータベース（Antitope 社データベース）
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
V_H	variable region of the immunoglobulin heavy chain	重鎖可変領域
VINC	vincristine	ビンクリスチン
V_L	variable region of the immunoglobulin light chain	軽鎖可変領域

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、概要表及び概要文、並びに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	DuoBody-CD3xctrl[a]; BisG1-huCACAO-FEAL/b12-LFLEDA-K409R	Bispecific IgG1 antibody that contains a CD3-specific Fab arm identical to epcoritamab, a nonbinding control (ctrl) Fab arm, and Fc-silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone
NA	DuoBody-ctrl[a]xCD20; 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-F405L; IgG1-huCACAO-F405L	Bivalent CD3-specific IgG1 mAb with DuoBody (F405L) mutation in the Fc backbone
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-K409R; IgG1-7D8-K409R	Bivalent CD20-specific IgG1 mAb with DuoBody (K409R) mutation in the Fc backbone
NA	IgG1-CD20; IgG1-7D8	Bivalent CD20-specific IgG1 mAb
NA	IgG1-ctrl[a]; IgG1-b12	Bivalent non-binding control IgG1 mAb

CACAO = cross-reactive anti-CD3 antibody one; 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; IgG = immunoglobulin G; mAb = monoclonal antibody; NA = not applicable

a　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)

1. 薬理試験：一覧表

以下の表では、エプコリタマブは DuoBody-CD3xCD20 とも表記している。3005a（IgG1-CD3-FEAL）及び 3001d（IgG1-CD20-FEAR）は、それぞれエプコリタマブの CD3 及び CD20 結合性アームを形成する親モノクローナル抗体（monoclonal antibody、mAb）を示す。DuoBody-CD3xctrl 及び DuoBody-ctrlxCD20 は単一特異性抗体であり、それぞれ CD3 及び CD20 に一価で結合する（詳細は Table 1 を参照）。

Table 2　薬理試験一覧表

Study Title	Test System	GLP	Test Article	Testing Facility	Study/Report Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics						
Generation and characterization of HuMab-CD20 7D8	Mouse, In vitro	No	NS/0-CD20 cells	Genmab B.V.; [redacted]	[GMB3013-028]	4.2.1.1-1
Generation and characterization of humanized anti-CD3 antibodies	In vitro	No	3005a (IgG1-CD3-FEAL)	Genmab B.V.; [redacted]; [redacted]	[GMB3013-029]	4.2.1.1-2
Evaluation of the inertness of the Fc region of DuoBody-CD3xCD20	In vitro, Mouse	No	Epcoritamab, 3005a, 3001d	Genmab B.V.	[GMB3013-045]	4.2.1.1-3
Evaluation of DuoBody-CD3xCD20 target binding in vitro	In vitro	No	Epcoritamab, Fab fragment of 3005a (IgG1-CD3-FEAL), DuoBody-ctrlxCD20	Genmab B.V., [redacted], [redacted]	[GMB3013-030]	4.2.1.1-4
Evaluation of induction of cytotoxicity by DuoBody-CD3xCD20 in vitro	In vitro	No	Epcoritamab, 3005a	Genmab B.V.	[GMB3013-032]	4.2.1.1-5
Evaluation of Cytokine Release in Whole Blood induced by DuoBody CD3xCD20 ex vivo	In vitro	No	Epcoritamab, 3005a, DuoBody-ctrlxCD20	Genmab B.V.	[GMB3013-054]	4.2.3.7.7-4
In vitro comparison of epcoritamab with analogs of CD3xCD20 bispecific antibody compounds in clinical development	In vitro	No	Epcoritamab and analogs of CD3xCD20 compounds of Regeneron, Genentech/Roche, Roche, and Xencor	Genmab B.V., Genmab US, Inc., [redacted]	[GMB3013-074]	4.2.1.1-6
Anti-tumor activity of epcoritamab in patient-derived samples ex vivo	Ex vivo	No	Epcoritamab	[redacted]	[GMB3013-072]	4.2.1.1-7
Combination of epcoritamab with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and	In vitro	No	Epcoritamab	Genmab B.V.	[GMB3013-080]	4.2.1.1-8

Study Title	Test System	GLP	Test Article	Testing Facility	Study/Report Number	Location in CTD
prednisone (CHOP) in vitro						
Combination of epcoritamab and lenalidomide in vitro	In vitro	No	Epcoritamab	Genmab B.V.	[GMB3013-082]	4.2.1.1-9
Evaluation of the efficacy of DuoBody-CD3xCD20 in vivo	Mouse	No	Epcoritamab	Genmab B.V., [redacted]; [redacted]	[GMB3013-033]	4.2.1.1-10
Anti-tumor activity of epcoritamab in a Raji model in HIS mice in vivo	Mouse	No	Epcoritamab	Genmab B.V.	[GMB3013-073]	4.2.1.1-11
Anti-tumor activity of epcoritamab in a patient-derived DLBCL model in vivo	Mouse	No	Epcoritamab	Crown Bioscience Inc.	[GMB3013-083]	4.2.1.1-12
Evaluation of B-cell depletion in cynomolgus monkeys treated with DuoBody-CD3xCD20	Cynomolgus monkey	No[a] and Yes[b]	Epcoritamab	[redacted]	[GMB3013-035]	4.2.1.1-13
Secondary Pharmacodynamics						
Evaluation of the immunogenicity of the CD3 arm of DuoBody-CD3xCD20 in silico and in vitro	In silico, In vitro	No	(Fab fragment and V_H and V_L sequences of) 3005a (IgG1-CD3-FEAL)	Genmab B.V.; [redacted]; [redacted]	[GMB3013-031]	4.2.1.2-1
Evaluation of the immunogenicity of the Fc region of DuoBody-CD3xCD20 in silico and in vitro	In silico, In vitro	No	Fc regions of epcoritamab, 3005a, and 3001d	Genmab B.V.; [redacted]; [redacted]	[GMB3013-055]	4.2.1.2-2
Safety Pharmacology						
Dedicated safety pharmacology studies have not been conducted for epcoritamab in accordance with ICH S6, S7A, and S9, given that epcoritamab is a biotechnology derived product that achieves specific receptor targeting and is developed for treating advanced disease. Instead, selected safety pharmacology parameters (electrocardiograms [ECGs]/heart rate) were evaluated as an integral part of the pivotal toxicology study in cynomolgus monkeys (Module [2.6.6 Section 3.2]), and no cause for concern was identified with respect to potential adverse effects from a safety pharmacology perspective.						
Pharmacodynamic Drug Interactions						
No studies investigating pharmacodynamic drug interactions relevant for epcoritamab clinical development have been conducted.						

a [redacted]529668 and [redacted]501775

b [redacted]503484

2. 効力を裏付ける試験

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Generation of Epcoritamab						
Generation and characterization of HuMab-CD20 7D8	KM® mice/ hybridoma generation technology In vitro	NS/0-CD20 cells (IP [6×], IV [2×])	1×10^7 cells (6× injection) 0.5×10^7 cells (2× injection)	Development of CD20-specific titer in mouse plasma Specific binding of hybridoma clones to CD20 in vitro Identification and cloning of the IgG1-CD20 variable heavy and light chain domains	IgG1-CD20 was selected from a panel of CD20-specific antibodies to form the basis for the CD20-specific arm in epcoritamab, based on the capacity of the bsAb to induce cytotoxicity in CD20-expressing cells in vitro and in vivo. The sequence of the variable domains (heavy and light chain) for IgG1-CD20 was identified, FEAR mutations were introduced and 3001d (IgG1-CD20-FEAR) was recombinantly expressed.	[GMB3013-028] 4.2.1.1-1
Generation and characterization of humanized anti-CD3 antibodies	Germline humanization technology In vitro	3005a (IgG1-CD3-FEAL) (ROA NA)	2.5–10 µg/mL	Binding to human and cynomolgus CD3ε (ELISA) Biological activity of plate-bound IgG1-CD3 to stimulate IL-2 secretion and proliferation of T cells (ELISA and ^{3}H-thymidine incorporation)	The humanized CD3ε-specific arm for epcoritamab was obtained from a chimeric version of the mouse CD3ε-specific, cynomolgus monkey CD3ε cross-reactive, antibody SP34 using germline humanization technology. IgG1-CD3-FEAL was selected based on binding to human and cynomolgus CD3ε and on the biological activity of plate-bound IgG1-CD3, measured as the capacity to stimulate IL-2 secretion by Jurkat T cells and proliferation of PBMCs. FEAL mutations were introduced in the sequence of the variable domains (heavy and light chain) for IgG1-CD3, and 3005a (IgG1-CD3-FEAL) was recombinantly expressed.	[GMB3013-029] 4.2.1.1-2

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Evaluation of the inertness of the Fc region of DuoBody-CD3xCD20	In vitro	Epcoritamab, 3001d, 3005a (ROA NA)	0.07–20000 ng/mL	FcγRI binding using immobilized His-tagged FcγRI construct (ELISA)	Immobilized FcγRI did not bind to epcoritamab, 3001d (IgG1-CD20-FEAR), or 3005a (IgG1-CD3-FEAL).	[GMB3013-045] 4.2.1.1-3
	In vitro	Epcoritamab (ROA NA)	1.28–20000 ng/mL (for immobilized epcoritamab)	FcγRIIa and FcγRIIIa binding by immobilized epcoritamab using His-tagged, Biotin-Acceptor-Peptide-containing dimeric FcγR (diFCGR-HisBAP) constructs (ELISA).	Immobilized epcoritamab did not bind to FcγRIIa-131H, FcγRIIa-131R, FcγRIIIa-158F, and FcγRIIIa-158V (which represent the most common polymorphisms for FcγRIIa and FcγRIIIa). Immobilized FcγRIIb did not bind to epcoritamab. Epcoritamab is therefore considered unable to induce FcγR-mediated effector functions, including ADCC, by monocytes, or NK cells.	
			32–20000 ng/mL (FcγRIIb) (for immobilized FcγRIIb)	Binding of epcoritamab by immobilized FcγRIIb diFCGR-HisBAP constructs (ELISA). Binding of 3001d and 3005a by immobilized His-tagged FcγRIIa, FcγRIIb, and FcγRIIIa diFCGR-HisBAP constructs (ELISA)		

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
		3001d, 3005a (ROA NA)	6.4–20000 ng/mL (FcγRIIa-131H/R, FcγRIIIa-158F), 32–20000 ng/mL (FcγRIIb), 3.2–20000 ng/mL (FcγRIIIa-158V) (for immobilized FcγRs)		Immobilized FcγRIIa-131H, FcγRIIa-131R, FcγRIIb, FcγRIIIa-158F, and FcγRIIIa-158V did not bind 3001d, and 3005a.	
	In vitro	3005a (ROA NA)	1–1000 ng/mL	Flow cytometry activation assay using PBMCs	3005a, the bivalent CD3-specific parental antibody used for the generation of epcoritamab, did not induce T-cell activation (CD69 upregulation) in a PBMC population.	
	In vitro	3005a (ROA NA)	0.1–1000 ng/mL	BrdU incorporation assay using PBMCs	3005a, the parental antibody used for the CD3 arm of epcoritamab, did not induce T-cell proliferation (BrdU incorporation) in a PBMC population.	
	In vitro	Epcoritamab, 3001d (ROA NA)	40–30000 ng/mL	C1q binding assay using Raji cells (flow cytometry)	Epcoritamab, bound to CD20 on Raji cells, showed minimal C1q binding at clinically relevant concentrations (1–10 μg/mL) 3001d, bound to CD20 on Raji cells, showed minimal C1q binding.	
	In vitro	Epcoritamab, 3001d (ROA NA)	0.5–30000 ng/mL	C1q binding (ELISA)	Epcoritamab showed minimal C1q binding at clinically relevant concentrations (1–10 μg/mL) 3001d showed minimal C1q binding.	
	In vitro	3005a (ROA NA)	17–30000 ng/mL	C1q binding assay using activated CD8+ T cells (flow cytometry)	3005a showed no C1q binding.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
	In vitro	Epcoritamab, (ROA NA)	240–125000 ng/mL	Induction of CDC with Daudi cells (viability assay using CellTiter-Glo®)	Epcoritamab and 3001d showed minimal CDC induction.	
		3001d (ROA NA)	27–37500 ng/mL			
	In vitro	Epcoritamab (ROA NA)	937–15000 ng/mL	Human FcRn binding (surface plasmon resonance)	Epcoritamab bound to human FcRn at acidic, but not neutral pH.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Target Binding Characterization						
Evaluation of DuoBody-CD3xCD20 target binding in vitro	In vitro	Epcoritamab (ROA NA)	1– 10000 ng/mL	Binding to Jurkat cells and primary T cells (flow cytometry)	Epcoritamab bound to CD3-expressing cells on freshly isolated, CD20-negative, human healthy donor T cells in a concentration-dependent manner, with an EC_{50} (apparent affinity) of 0.71 mg/mL (4.73 nmol/L), as determined by flow cytometry. EC_{50} values in the same range were observed using CD3-expressing, CD20-negative CD4+ or CD8+ primary T cells and Jurkat cells. Binding characteristics of the epcoritamab research grade batch (被験物質 2*) used for nonclinical studies and a clinical grade batch (　被験物質 1*　) to CD3-expressing cells were comparable.	[GMB3013-030] 4.2.1.1-4
	In vitro	Epcoritamab (ROA NA)	234– 15000 ng/mL	Affinity for soluble (CD3E27-GSKa), and immobilized (CD3ε-ECDHis) CD3ε (bio-layer interferometry)	The affinity (dissociation constant, K_D) of epcoritamab for soluble CD3ε was 12.5 nmol/L. Using immobilized CD3ε, a highly comparable value was obtained.	
	In vitro	Fab fragment of 3005a (IgG1-CD3-FEAL) (ROA NA)	NA	Residues on CD3ε important for binding (crystallography)	The structure of the binding of the CD3-specific Fab fragment of epcoritamab to CD3ε peptide [redacted] was solved at a resolution of 2.75 Å. Residues on the antibody and on the CD3ε peptide that were in close proximity, with a maximum distance of 3.9 Å, were identified. Based on these studies, it was concluded that residues [redacted], and [redacted] on the light chain, [redacted] and [redacted] on the heavy chain of the CD3-specific Fab fragment and [redacted] on the CD3ε peptide are involved in the binding of the antibody to the CD3ε peptide.	
	In vitro	Epcoritamab (ROA NA)	1– 10000 ng/mL	Binding to CD20-expressing Daudi cells, binding to (mutant)	Epcoritamab bound to CD20-expressing Daudi cells in a concentration-dependent manner, with an EC_{50} (apparent affinity) of 1.56 mg/mL (10.40 nmol/L). EC_{50} values in the same range were observed using CD20-transfected,	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
				CD20-transfected HEK293F cells, and primary B cells (flow cytometry)	CD3-negative HEK-CD20 cells. The residues of CD20 important for binding of the parental IgG1-CD20 (Y77, N163 and N166) were similarly important for the binding of epcoritamab. Binding characteristics of the epcoritamab research grade batch (被験物質 2*) used for nonclinical studies and a clinical grade batch (　被験物質 1*　) to CD20-expressing cells were comparable.	
	In vitro	DuoBody-ctrlxCD20 (ROA NA)	6,700–60000 ng/mL	Binding to CD20-expressing Dauci cells (quartz crystal microbalance technology)	DuoBody-ctrlxCD20 (monovalent) showed a stable 1:1 interaction with CD20-expressing Dauci cells and bound with an affinity of 5.4 nmol/L.	
	In vitro	Epcoritamab (ROA NA)	1–100000 ng/mL	Simultaneous binding to CD3+ and CD20+ cells in heparinized whole blood (flow cytometry)	Epcoritamab was capable of simultaneous binding to CD3-expressing T cells (both CD4+ and CD8+) and CD20-expressing B cells in whole blood.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Mechanism of Action and Cytotoxicity						
Evaluation of induction of cytotoxicity by DuoBody-CD3xCD20 in vitro	In vitro	Epcoritamab, 3005a (ROA NA)	10^{-5}– 10000 ng/mL	T-cell activation using B-cell lines Daudi, JEKO-1, OCI-Ly18, OCI-Ly19, OCI-Ly7, RC-K8, RI-1, SU-DHL-4, SU-DHL-8, WSU-DLCL-2 and Z138 (GloResponse NFAT-Jurkat reporter assay)	Epcoritamab dose-dependently induced luciferase activity in nuclear factor of activated T cells (NFAT)-Jurkat T-cell reporter cells in the presence of all tested CD20-expressing target cell types. Signal in this assay is a measure for T-cell activation.	[GMB3013-032] 4.2.1.1-5
	In vitro	Epcoritamab (ROA NA)	3.3×10^{-6}– 333.3 ng/mL	Activation of primary T cells using B-cell lines Daudi, JEKO-1, OCI-Ly18, OCI-Ly19, OCI-Ly7, RC-K8, RI-1, SU-DHL-4, SU-DHL-8, WSU-DLCL-2, U2932 and Z138 cells, and endogenous B cells in PBMCs (flow cytometry)	Epcoritamab dose-dependently induced activation of freshly isolated human CD4+ and CD8+ T cells in the presence of all tested CD20-expressing target cell types. EC_{20} and EC_{50} values for T-cell activation induced by epcoritamab were in the sub- to low picomolar range (EC_{20} 0.033 ± 0.033 pmol/L, EC_{50} 0.167 ± 0.133 pmol/L for CD69 upregulation on primary CD8+ T cells in the presence of Daudi cells; EC_{20} 0.200 ± 0.160 pmol/L, EC_{50} 0.973 ± 1.073 pmol/L in the presence of endogenous B cells in PBMC populations). A research batch (被験物質 2*) and a clinical grade batch (　被験物質 1*　) of epcoritamab behaved similarly in induction of T-cell activation.	
	In vitro	Epcoritamab, 3005a (ROA NA)	0.1– 1000 ng/mL	Proliferation (BrdU incorporation assay using PBMCs)	Epcoritamab induced dose-dependent cellular proliferation in PBMC populations.	
	In vitro	Epcoritamab, 3005a (ROA NA)	1×10^{-7}– 10000 ng/mL	Cytotoxicity using Daudi cells and primary T cells (^{51}Cr release)	Epcoritamab induced dose-dependent T-cell-mediated cytotoxicity of CD20-expressing target cells. Epcoritamab-induced T-cell-mediated cytotoxicity was mediated by both CD4+ and CD8+ T cells, with CD8+ T cells killing faster than CD4+ T cells.	
	In vitro	Epcoritamab	3.3×10^{-6}– 333.3 ng/mL	Cytotoxicity using primary T cells, and	Epcoritamab induced dose-dependent T-cell-mediated cytotoxicity of all CD20-expressing target cells tested.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
		(ROA NA)		B-cell lines OCI-Ly7, Daudi, SU-DHL-4, RI-1, WSU-DLCL2, JEKO-1, U-2932, OCI-Ly18, RC-K8, Z138, OCI-Ly19, SU-DHL-8 cells and PBMCs (flow cytometry)	EC_{20} and EC_{50} values of T-cell-mediated cytotoxicity triggered by epcoritamab were in the sub- to low picomolar range (EC_{20} 0.033 ± 0.027 pmol/L, EC_{50} 0.260 ± 0.147 pmol/L for Daudi cells: EC_{20} 0.567 ± 0.993 pmol/L, EC_{50} 3.160 ± 5.073 pmol/L for endogenous B cells). A research batch and a clinical grade batch of epcoritamab behaved similarly in induction of T-cell-mediated cytotoxicity.	
	In vitro	Epcoritamab, 3005a (ROA NA)	1×10^{-4}–1000 ng/mL	Cytotoxicity using primary T cells and adherent SK-BR-3 and SK-BR-3-CD20 cells (Alamar Blue® viability assay)	CD20 expression on target cells was required and sufficient for epcoritamab-induced T-cell-mediated killing.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
In vitro comparison of epcoritamab with analogs of other CD3xCD20 bispecific antibody compounds in clinical development	In vitro	Epcoritamab, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Roc}$, $bsAb_{Xen}$ (ROA NA)	1.56–100 nmol/L	Binding to soluble (CD3E27-GSKa) and immobilized (CD3ε-ECDHis) CD3ε (bio-layer interferometry)	The affinity (dissociation constant, K_D) of epcoritamab for immobilized CD3ε was 16 nmol/L. The affinities of $bsAb_{Roc}$ and $bsAb_{Xen}$ (analogs of bsAb compounds from Roche and Xencor) were 12 nmol/L and 8.9 nmol/L. Affinities of $bsAb_{Gen}$ and $bsAb_{Reg}$ (analogs of bsAb compounds from Genentech/Roche and Regeneron) could not be determined, because these need CD3ε and CD3δ present, to be able to bind.	[GMB3013-074] 4.2.1.1-6
	In vitro	Epcoritamab, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Roc}$, $bsAb_{Xen}$ (ROA NA)	0.4–205 nmol/L	Binding to primary T cells (expressing CD3 and not CD20 on cell surface) (flow cytometry)	Epcoritamab showed concentration-dependent binding to freshly isolated CD3-expressing, CD20-negative, human healthy donor T cells. The same was observed for $bsAb_{Reg,}$ $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Roc}$, and $bsAB_{Xen}$.	
	In vitro	DuoBody-ctrlxCD20, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Roc}$, $bsAb_{Xen}$ (ROA NA)	6,700–60000 ng/mL	Binding to CD20-expressing Daudi cells (quartz crystal microbalance technology)	DuoBody-ctrlxCD20 (monovalent) showed a stable 1:1 interaction with CD20-expressing Daudi cells with an affinity of 5.4 nmol/L. Analogs of the CD20-targeting arms of CD3xCD20 bsAbs $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Roc}$, and $bsAb_{Xen}$, tested in a ctrlxCD20 format, bound with affinities of 670, 53, 99, and 33 nmol/L.	
	In vitro	Epcoritamab, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Roc}$, $bsAb_{Xen}$ (ROA NA)	0.4–205 nmol/L	Binding to CD20-expressing Daudi cells (flow cytometry)	Epcoritamab bound to CD20-expressing Daudi cells in a concentration-dependent manner. The same was observed for $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Roc}$, and $bsAb_{Xen}$.	
	In vitro	Epcoritamab, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Roc}$,	2.28×10^{-8}–2.28 nmol/L	Activation and cytotoxicity assay on primary T cells and Daudi cells (flow	Epcoritamab induced concentration-dependent activation (CD69, CD25, and PD-1 upregulation) and degranulation (LAMP-1 upregulation) of freshly isolated CD4+ and CD8+ T cells in the presence of CD20-expressing Daudi	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
		$bsAb_{Xen}$ (ROA NA)		cytometry)	cells. Epcoritamab induced concentration-dependent T-cell-mediated cytotoxicity of CD20-expressing Daudi cells. The same was observed for $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Roc}$, and $bsAb_{Xen}$. Epcoritamab and $bsAb_{Roc}$ were more efficient (EC_{50} values in the sub-picomolar range) in induction of T-cell activation and T-cell-mediated cytotoxicity than $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Gen}$, and $bsAb_{Xen}$ (EC_{50} values in the picomolar range).	
	In vitro	Epcoritamab, $bsAb_{Gen}$, $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Roc}$, $bsAb_{Xen}$ (ROA NA)	2.28×10^{-8}–2.28 nmol/L	Cytokine release in supernatants of Daudi and T-cell coculture (Luminex technology)	Epcoritamab induced release of granzyme B, IFNγ, TNFα, IL-2, and IL-10. The same was observed for analogs of the bsAb compounds from $bsAb_{Reg}$, $bsAb_{Gen}$, $bsAB_{Roc}$ and $bsAb_{Xen}$. $BsAb_{Roc}$ typically induced the highest levels of cytokine release, followed by epcoritamab.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Anti-tumor activity of epcoritamab in patient-derived samples ex vivo	In vitro	Epcoritamab (ROA NA)	10 ng/mL	Cytotoxicity using Daudi and WSU-DLCL2 cells lines as target cells and healthy donor T cells or lymph node T cells of B-NHL patients as effector cells (flow cytometry)	There was no difference in the ability of epcoritamab to induce cytotoxicity in Daudi or WSU-DLCL2 cells when using either T cells isolated from LN from B-NHL patients or T cells that were isolated from healthy donors.	[GMB3013-072] 4.2.1.1-7
	Ex vivo	Epcoritamab (ROA NA)	30 ng/mL	Cytotoxicity using B-NHL patients cells as target cells in the presence of healthy allogeneic PBMCs (flow cytometry)	Epcoritamab significantly induced cytotoxicity at a fixed E:T ratio of 10:1, with no differences between RR and ND patients (range 0–96% target cell kill). No difference in epcoritamab-induced cytotoxicity was observed irrespective of the indication or prior (anti-CD20-) treatment status. EC_{50} values ranged from 0.01–3.9 ng/mL (all indications combined). No correlation was observed between the level of CD20 surface expression on anti-CD20 mAb naïve target cells and percentage kill of these cells. The extent of malignant cell kill by epcoritamab was significantly associated with the time period between last CD20 treatment and LN biopsy (r = 0.7785, P = 0.0301).	
	Ex vivo	Epcoritamab (ROA NA)	30 ng/mL	Cytotoxicity using B-NHL patient cells as target cells in the presence of LN-residing autologous T cells (flow cytometry)	Epcoritamab was able to induce cytotoxicity in the presence of LN-residing autologous T cells. A correlation was observed between the number of T cells present and cytotoxicity of epcoritamab.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Combination of epcoritamab with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) in vitro	In vitro	Epcoritamab	0.00003–333 ng/mL	Activation and cytotoxicity using primary T cells and SU-DHL-4 cells (flow cytometry)	Sensitivity of the tumor B cells to epcoritamab-induced T-cell-mediated cytotoxicity was not altered by pre-incubation of the B cells with the single CHOP components (CPA, DOX, VINC, PRD). Only with high doxorubicin concentrations, epcoritamab-induced killing was reduced, which may have resulted from a direct effect of doxorubicin on the T cells during the cytotoxicity assay. A dose-dependent decrease in T-cell viability was observed with doxorubicin, whereas T-cell viability was not directly affected by the other CHOP components. Epcoritamab-induced T-cell activation was not affected by pre-incubation of T cells with CPA, slightly by VINC and PRD, and strongly affected by DOX: VINC and PRD pre-incubation of T cells resulted in small differences in epcoritamab-induced expression levels of T-cell activation markers. Pre-incubation of T cells with high concentration of DOX completely inhibited upregulation of CD69 and CD25, and strongly upregulated expression of PD-1 and LAMP-1, preventing evaluation of induction of these markers by epcoritamab. Pre-incubation of T cells with the individual CHOP components did not strongly impact the ability of these cells to induce epcoritamab T-cell-mediated cytotoxicity of the SU-DHL-4 target cells.	[GMB3013-080] 4.2.1.1-8
		Cyclophosphamide (CPA)	0.1–10 µg/mL (0.383–38.30 µmol/L)			
		Doxorubicin (DOX)	0.025–2.5 µg/mL (0.046–4.6 µmol/L)			
		Vincristine (VINC)	1–100 ng/mL (0.121–12.12 nmol/L)			
		Prednisone (PRD) (ROA NA)	2–200 µg/mL (5.580–557.99 µmol/L)			

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Combination of epcoritamab and lenalidomide in vitro	In vitro	Epcoritamab	Epcoritamab: 3.3×10^{-12}–333.3 ng/mL for Daudi cells, 3.3×10^{-6}–333.3 ng/mL for other cell lines	Activation and cytotoxicity using primary T cells and CD20-expressing tumor cell lines (flow cytometry)	Addition of lenalidomide during the T-cell activation and T-cell-mediated cytotoxicity assay for five days, did not influence epcoritamab-induced CD4+, and CD8+ T-cell activation, nor T-cell-mediated cytotoxicity. Pre-incubation of tumor cells with lenalidomide for four days, did not influence epcoritamab-induced CD4+, and CD8+T-cell activation, nor T-cell-mediated cytotoxicity. Pre-incubation of T cells with lenalidomide for 48 h, did not influence epcoritamab-induced CD4+, or CD8+ T-cell activation, nor T-cell-mediated cytotoxicity. Pre-incubation of T cells with lenalidomide in the presence of CD3 crosslinking by immobilized anti-CD3 mAb or immobilized epcoritamab for 3 days, led to enhanced T-cell activation as compared with activation induced by CD3 crosslinking alone. In a T-cell activation assay with Daudi cells: - T cells pre-incubated in the presence of CD3 crosslinking still showed high expression of activation markers, that was slightly enhanced by epcoritamab. - Addition of lenalidomide to the pre-incubation of T cells with CD3 crosslinking, had no additional effect on epcoritamab-induced CD4+, and CD8+ T-cell activation. In a T-cell-mediated cytotoxicity assay with Daudi cells: - T cells pre-incubated with immobilized anti-CD3 mAb, or immobilized epcoritamab, and lenalidomide showed increased T-cell activation and subsequent T-cell-mediated cytotoxicity of Daudi cells in the absence of epcoritamab. The lenalidomide/anti-CD3 mAb pretreated T cells induced greater epcoritamab-induced T-cell-mediated cytotoxicity starting at lower epcoritamab concentrations. At higher concentrations of epcoritamab, approaching maximal cytotoxicity, the differences were not interpretable.	[GMB3013-082] 4.2.1.1-9
		Lenalidomide (ROA NA)	Lenalidomide: 0.0087–0.636 µmol/L for Daudi cells, 800 µmol/L for other cell lines (lenalidomide only present during T-cell activation and T-cell-mediated cytotoxicity assay)			
			5 and 50 µmol/L for Daudi cells, 0.3 and 3 µmol/L for REC-1 cells (either T cells or target cells were pre-incubated with lenalidomide and lenalidomide was present in T-cell activation and T-cell-mediated cytotoxicity assay)			

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Anti-Tumor Activity in vivo: Mouse Xenograft Models						
Evaluation of the efficacy of DuoBody-CD3xCD20 in vivo	NOD-SCID mice 5-10F per group	Epcoritamab (IV)	0.005–0.5 mg/kg (single dose)	Tumor growth in mice inoculated with a mixture of Raji-luc cells and huPBMCs, in absence, or presence of IgG1-RTX-FEAR	Epcoritamab effectively reduced growth of SC inoculated Raji Burkitt's lymphoma. The anti-tumor activity of epcoritamab in the Raji-luc model in vivo was not affected by the presence of a circulating anti-CD20 antibody (IgG1-RTX-FEAR) that competes for CD20 binding, at the concentration tested.	[GMB3013-033] 4.2.1.1-10
		Epcoritamab (IV) IgG1-RTX-FEAR (IV)	0.05 mg/kg (Q1W × 2) 0.1–10 mg/kg (single dose)			
	NCG mice 10M per group	Epcoritamab (IV)	0.05 or 0.5 mg/kg (2Q1W [5 doses in total])	Tumor growth in mice inoculated with JEKO-1 tumor cells and huPBMCs	Epcoritamab effectively reduced tumor growth and induced tumor regression of an established SC mantle-cell lymphoma (JEKO-1) xenograft.	
	BRGS-HIS mice 3F/4M:Daudi; 6F/2M (0.1), 5F/3M (1): Raji per group Ex vivo	Epcoritamab (IV)	1 mg/kg (2Q1W [2 doses in total]) for Daudi-luc 0.1 or 1 mg/kg (2Q1W [5 doses in total]) for Raji-luc	Tumor growth inoculated with Raji-luc and Daudi-luc tumor cells B-cell depletion in mice (flow cytometry) T-cell activation in mice (flow cytometry)	Epcoritamab effectively reduced growth of both IV and SC inoculated Burkitt's lymphoma (Daudi, Raji, respectively). Epcoritamab effectively reduced the number of human peripheral B cells in mice with a human immune system (HIS, [redacted]). Epcoritamab induced human T-cell activation upon IV administration to mice with a human immune system (HIS, [redacted]).	
	huFcRn-Tg32 mice 3F per group	Epcoritamab (IV)	5 mg/kg (single dose)	PK in non-tumor-bearing mice	Target-independent clearance of epcoritamab after a single IV dose of 5 mg/kg was 8.7 mL/kg/day, which is comparable to the clearance predicted using a two-compartment clearance model for human IgG1.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration /Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Anti-tumor activity of epcoritamab in a Raji model in HIS mice in vivo	NSG-HIS mice 9F per group	Epcoritamab (IV)	0.05–5 mg/kg (Q1W × 5) 5 mg/kg (single dose) in late treatment	Tumor growth in mice inoculated with Raji-luc tumor cells B-cell depletion (flow cytometry) T-cell activation (flow cytometry)	IV administered epcoritamab effectively reduced growth of IV inoculated Raji Burkitt's lymphoma, also upon single-dose treatment of large (~500 mm^3) tumors. Epcoritamab effectively reduced the number of human peripheral B cells upon IV administration. Epcoritamab induced human T-cell activation upon IV administration.	[GMB3013-073] 4.2.1.1-11
Anti-tumor activity of epcoritamab in a patient-derived DLBCL model in vivo	huNOG mice 9F per group Ex vivo	Epcoritamab (IV)	0.05–5 mg/kg (Q1W × 6)	Tumor growth in mice inoculated with HuPrime® lymphoma xenograft model LY2214 (DLBCL), SC B-cell depletion (flow cytometry) T-cell activation (flow cytometry)	IV administered epcoritamab effectively reduced growth of SC inoculated DLBCL PDX at the highest dose (5 mg/kg). Epcoritamab effectively reduced the number of human peripheral B cells upon IV administration to mice with a human immune system (huNOG, [redacted]). Epcoritamab induced human T-cell activation upon IV administration to mice with a human immune system (huNOG, [redacted]).	[GMB3013-083] 4.2.1.1-12

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
B-cell Depletion in Cynomolgus Monkeys						
Evaluation of B-cell depletion in cynomolgus monkeys treated with DuoBody-CD3xCD20	Cynomolgus monkey 2F per group	Epcoritamab (IV)	0.01, 0.1, 1, or 10 mg/kg (single dose [10 mL/kg] 30-min infusion)	B-cell depletion as part of toxicology study (see Module [2.6.6 Section 2.1] and [2.6.7 Section 5], [redacted] 529668)	A dose-dependent depletion of B cells in peripheral blood and lymph nodes was seen. In the blood, B cells were decreased at the 0.01 mg/kg dose level and partially to completely depleted at the 0.1 mg/kg dose level. Doses of 1 and 10 mg/kg induced complete B-cell depletion. B-cell recovery was seen in all dose groups, returning to baseline levels rapidly after 3–14 days in the lowest dose group, whereas in the highest dose group B-cell recovery was only complete 11 weeks after dosing. In lymph nodes, a single IV infusion of 0.01 or 0.1 mg/kg induced a decrease in B-cell numbers, and single infusions of 1 or 10 mg/kg induced complete B-cell depletion. Recovery of lymph node B cells was dose related. In the lowest dose groups (0.01 and 0.1 mg/kg), complete recovery of B cells was observed at 28 days (0.01 mg/kg) or 42 days (0.1 mg/kg) after dosing. In the highest dose groups (1 and 10 mg/kg), B-cell depletion remained for seven weeks after dosing, after which recovery was observed. Recovery was not complete at the last available timepoint (12-14 weeks).	[GMB3013-035] 4.2.1.1-13
	Cynomolgus monkey 2F per group	Epcoritamab (IV or SC)	0.01, 0.1, or 1 mg/kg (IV, Q1W × 4; [10 mL/kg] 30-min infusion) 0.01 mg/kg (priming)/ 1 mg/kg target dose (IV; [10 mL/kg] 30-min infusion)	B-cell depletion as part of toxicology study (see Module [2.6.6 Section 3.1] and [2.6.7 Section 6], [redacted] 501775)	Epcoritamab induced dose-dependent depletion of B cells from the peripheral blood and lymph nodes for all administrations: repeat IV administration, IV administration with a priming dose and single SC administration. B-cell recovery in peripheral blood and lymph nodes was observed at all dose levels. Time to recovery was related to the treatment dose.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/ Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
			0.01, 0.1, 1, 10, or 20 mg/kg (SC, single dose)			
	Cynomolgus monkey 3M/3F per group	Epcoritamab (IV or SC)	0.01, 0.1, or 1 mg/kg (IV, Q1W × 5; [10 mL/kg] 30-min infusion) 0.1 or 1 mg/kg (IV, single dose; [10 mL/kg] 30-min infusion) 0.1, 1, or 10 mg/kg (SC, single dose)	B-cell depletion as part of toxicology study (see Module [2.6.6 Section 3.2] and [2.6.7 Section 7], [redacted] 503484)	Once weekly for five weeks (Q1W × 5) IV administration of epcoritamab induced dose-dependent B-cell depletion in peripheral blood. A single IV infusion of 0.1 or 1 mg/kg completely depleted B cells from the peripheral blood, lasting until Day 36 (day of necropsy) for the 1 mg/kg group. SC administration of epcoritamab resulted in complete B-cell depletion from the peripheral blood at all dose levels tested. At the lowest dose level, partial recovery was observed, whereas depletion remained complete until Day 32 (day of necropsy) for the 1 and 10 mg/kg groups.	

3. 副次的薬理試験

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Evaluation of the immunogenicity of the CD3 arm of DuoBody-CD3xCD20 in silico and in vitro	In silico	V_H and V_L regions of 3005a (IgG1-CD3-FEAL) (ROA NA)	NA	Immunogenicity (EpiMatrix System)	The rates of anti-therapeutic responses to the combined V_H and V_L sequences of 3005a (IgG1-CD3-FEAL) were predicted to fall within the range of clinical benchmark control antibodies, with 3005a predicted to elicit responses in less than 6% of exposed subjects.	[GMB3013-031] 4.2.1.2-1
	In vitro	Fab fragment of 3005a (IgG1-CD3-FEAL) (ROA NA)	15 µg/mL	Induction of T-cell responses (proliferation and IL-2 production) (EpiScreen™ DC:T-cell assay)	The Fab fragment of 3005a (IgG1-CD3-FEAL) induced T-cell responses (proliferation and IL-2 production) in only 2% of the donors (n = 51) and thus has a low potential for clinical immunogenicity, since protein therapeutics that are known to be associated with a significant risk of immunogenicity in the clinic have been found to induce responses in more than 10% of the donors in this assay.	

Study Title	Test System	Test Article (ROA)	Concentration/Dose Level	Parameters Studied	Noteworthy Findings	Study/Report No./Location in CTD
Evaluation of the immunogenicity of the Fc region of DuoBody-CD3xCD20 in silico and in vitro	In silico	Fc regions of epcoritamab, 3005a, and 3001d (ROA NA)	NA	Immunogenicity (iTope™ technology and TCED™ epitope database)	The D265A mutation in the CH2 sequence of epcoritamab was predicted to introduce two high affinity promiscuous binding peptides. The K409R mutation in the CH3 sequence of 3001d was predicted to introduce a moderate affinity promiscuous binding peptide. No TCED™ epitopes were identified for these two mutations. The L234F, L235E in the CH2 of epcoritamab and the F405L mutation in the CH3 sequence of 3005a were not predicted to introduce MHC class II binding peptides.	[GMB3013-055] 4.2.1.2-2
	In silico	Fc regions of epcoritamab, 3005a, and 3001d (ROA NA)	NA	Immunogenicity (EpiMatrix System)	The FEA mutations in the CH2 sequence of epcoritamab scored low for global and regional immunogenic potential. The F405L mutation in the CH3 sequence of 3005a scored low for global and regional immunogenic potential. The K409R mutation in the CH3 region of 3001d targets a predicted T-cell epitope, but as this is a conservative mutation, [redacted] considered the impact on immunogenicity insignificant. None of the mutations are expected to represent a significant risk for immunogenicity.	
	In vitro	Fc region of epcoritamab, Fc region of 3005a (ROA NA)	15 µg/mL	Induction of T-cell responses (proliferation and IL-2 production) (EpiScreen™ DC:T-cell assay)	The Fc region of 3005a (IgG1-CD3-FEAL) was shown to induce T-cell responses (both T-cell proliferation and IL-2 secretion) in only 6% of the donors (n = 51). The Fc region of 3005a (IgG1-CD3-FEAL) is considered to have a low potential for clinical immunogenicity, because protein therapeutics known to be associated with a significant risk of immunogenicity in the clinic have been found to induce > 10% positive responses in the EpiScreen assay.	

4. 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進行性疾患の治療を目的として開発されているバイオテクノロジー応用製品であり、ICH S6、S7A 及び S9 ガイドラインに従い、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、カニクイザルを用いたエプコリタマブの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（心電図、心拍数及び詳細な一般状態観察）を評価した結果、心血管系、呼吸系及び神経系に有害な作用は認められなかった（[2.6.6-3.2 項]）。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

エプコリタマブの臨床開発に関連する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。

6. 参考文献

Barbas, C. F., 3rd, Collet, T. A., Amberg, W., Roben, P., Binley, J. M., Hoekstra, D., Cababa, D., Jones, T. M., Williamson, R. A., Pilkington, G. R., and et al. (1993). Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. J Mol Biol 230, 812-823.