目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 3
2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 モスネツズマブの構造 3
2.6.1.2 科学的根拠と作用機序 3
2.6.1.3 承認申請の概要 4
2.6.1.4 参考文献 4

図一覧

図 2.6.1.1-1 モスネツズマブの構造 3

略語一覧

略語	英名	和名
CAR-T	chimeric antigen receptor-T cell	キメラ抗原受容体発現 T 細胞
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
Fab	fragment antigen-binding	抗原結合性フラグメント
Fc	fragment crystallizable	結晶化可能フラグメント
FL	follicular lymphoma	濾胞性リンパ腫
TCR	T-cell receptor	T 細胞受容体

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

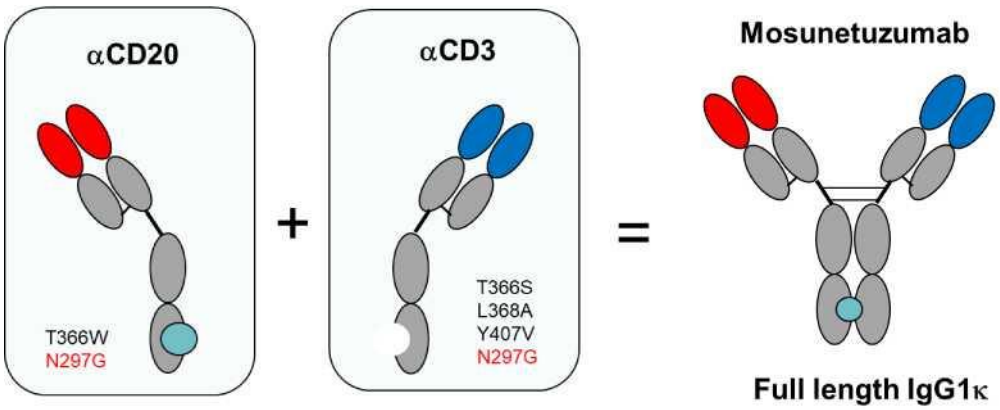
2.6.1.1　モスネツズマブの構造

モスネツズマブ（遺伝子組換え）（BTCT4465A）は，抗 CD20/CD3ヒト化二重特異性モノクローナル抗体である[1)]。モスネツズマブは Knobs-into-holes 技術により，抗 CD20抗体と抗 CD3抗体の各半抗体を組み合わせて構築される（図 2.6.1.1-1）。抗 CD20重鎖には T366W という“knob”アミノ酸置換が，抗 CD3重鎖には T366S，L368A 及び Y407V の“hole”アミノ酸置換が付与されている[2),3)]。重鎖の“knob”及び“hole”により，抗 CD20 knob 抗体と抗 CD3 hole 抗体の各1分子からなるヘテロ二量体が形成される。

モスネツズマブはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で産生される。しかし，モスネツズマブは，結晶化可能フラグメント（Fc）領域の１アミノ酸を糖鎖付加が起こらないアミノ酸へ置換（N297G）してあるため，Fcγ 受容体に非結合性のタンパク質として発現する。このため，モスネツズマブの Fc を介したエフェクター機能は著しく低下している。

モスネツズマブの構造的特徴を図 2.6.1.1-1に示した。

図 2.6.1.1-1　モスネツズマブの構造



抗 CD20（αCD20）半抗体の Fc 領域にある T366W 置換が“knob”を，抗 CD3（αCD3）半抗体の Fc 領域の T366S，L368A 及び Y407V の置換は“hole”を形成する。モスネツズマブは，これらの半抗体のヘテロ二量体である。

2.6.1.2　科学的根拠と作用機序

濾胞性リンパ腫（FL）は，他の B 細胞による悪性リンパ腫と同様に，CD20が標的分子の一つである。CD20は，B 細胞特異的に強く発現し，細胞内への取込み（インターナリゼーション）が起こりにくいという特性がある。この特性を利用した悪性リンパ腫治療薬の標的としてのCD20の妥当性は，抗CD20モノクローナル抗体であるリツキシマブによって示されている。同じく抗 CD20モノクローナル抗体であるオビヌツズマブは，リツキシマブとは異なる立体配座で CD20へ結合し，強い Fc 依存性エフェクター作用を有する[4)]。これにより，オビヌツズマブは，再発又はリツキシマブを含む既存療法に抵抗性となった悪性リンパ腫患者において有効性を示している[5),6)]。

これらとは異なる悪性リンパ腫の治療法として，T 細胞を活用した治療法も開発されている。国内で承認されている T 細胞を用いた治療法には，細胞系譜に特異的な表面分子を標的としたキメラ抗原受容体 T 細胞（CAR-T）療法（アキシカブタゲン　シロルユーセル，チサゲンレクルユーセル，イデカブタゲン　ビクルユーセル，シルタカブタゲン　オートルユーセル，リソ

カブタゲン　マラルユーセル）及び，特異的な表面抗原に結合することでT細胞と腫瘍細胞を結びつけることができる抗CD19/CD3二重特異性抗体（ブリナツモマブ）がある。

抗CD20/CD3二重特異性抗体であるモスネツズマブは，一方の抗原結合性フラグメント（Fab）がB細胞上のCD20の細胞外ドメインに結合し，もう片方のFabがT細胞上のT細胞受容体（TCR）複合体のCD3εサブユニットの細胞外ドメインに結合する（図 2.6.1.1-1）。これによりモスネツズマブは，TCRの特異性に依存せずにT細胞を活性化し，B細胞を傷害すると考えられる。

2.6.1.3 承認申請の概要

本申請で予定している効能・効果及び用法・用量については，2.2に記載した。

2.6.1.4 参考文献

1) Sun LL, Ellerman D, Mathieu M, et al. Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies. Sci Transl Med. 2015;7(287):ra70.
2) Atwell S, Ridgway JBB, Wells JA, et al. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. J Mol Biol 1997;270:26-35.
3) Spiess C, Merchant M, Huang A, et al. Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies. Nat Biotechnol 2013;31:753-8.
4) Freeman CL, Sehn LH. A tale of two antibodies: obinutuzumab versus rituximab. Br J Haematol 2018;182:29-45.
5) Sehn LH, Chua N, Mayer J, et al. Obinutuzumab plus bendamustine versus bendmustine monotherapy in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (GADOLIN): a randomised, controlled, open-label, multicentre,phase 3 trial. Lancet Oncol 2016;17:1081-93.
6) Cheson BD, Chua N, Mayer J, et al. Overall survival benefit in patients with rituximab-refractory indolent non-hodgkin lymphoma who received obinutuzumab plus bendamustine induction and obinutuzumab maintenance in the GADOLIN study. J Clin Oncol 2018;36:2259-66.

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.2.1 *In vitro* 試験 7
2.6.2.2.1.1 モスネツズマブの結合特性 7
2.6.2.2.1.2 抗 CD20/CD3 TDB 抗体（2H7v16/UCHT1v9）の作用機序 8
2.6.2.2.1.3 2H7v16/UCHT1v9 の B 細胞傷害活性 10
2.6.2.2.1.4 2H7v16/UCHT1v9 及び 2H7v16/40G5c の活性比較 13
2.6.2.2.1.5 モスネツズマブ及び 2H7v16/40G5c の活性比較 16
2.6.2.2.1.6 リツキシマブ-DANA 及びデキサメタゾン存在下における 2H7v16/40G5c の活性 18
2.6.2.2.2 *In vivo* 試験 20
2.6.2.2.2.1 ヒト CD20/CD3 導入マウスを用いた 2H7v16/UCHT1v9 のコンセプト検証 20
2.6.2.2.2.2 ヒト CD20/CD3 導入マウスにおける B 細胞枯渇効果を指標とした用量の検討 21
2.6.2.2.2.3 ヒト CD20/CD3 導入マウスにおける 2H7v16/40G5c の効果 21
2.6.2.2.2.4 NSG マウスにおける 2H7v16/UCHT1v9 及び 2H7v16/40G5c の効果 23
2.6.2.2.2.5 ヒト CD20/CD3 導入マウスにおけるモスネツズマブ及び 2H7v16/40G5c の効果 24
2.6.2.2.2.6 カニクイザルにおけるモスネツズマブ及び 2H7v16/40G5c の効果 25
2.6.2.2.2.6.1 モスネツズマブの単回投与 25
2.6.2.2.2.6.2 モスネツズマブ又は 2H7v16/40G5c の反復投与 29
2.6.2.3 副次的薬理試験 36
2.6.2.4 安全性薬理試験 36
2.6.2.4.1 心血管系 36
2.6.2.4.2 中枢神経系 36
2.6.2.4.3 呼吸系 37
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 37
2.6.2.6 考察及び結論 37
2.6.2.7 図表 38
2.6.2.8 参考文献 38

表一覧

表 2.6.2.1-1 薬理試験で使用した抗 CD20/CD3 TBD 抗体 5
表 2.6.2.2.1.1-1 モスネツズマブのヒト CD20及び CD3に対する結合親和性 7

図一覧

図 2.6.2.2.1.2-1 抗 CD20/CD3 TDB（2H7v16/UCHT1v9）を用いた作用機序の検証 9
図 2.6.2.2.1.3-1 2H7v16/UCHT1v9の B 細胞リンパ腫細胞株に対する細胞傷害活性..... 11
図 2.6.2.2.1.3-2 2H7v16/UCHT1v9の健常ヒト末梢血液由来 B 細胞に対する細胞傷害活性. 12
図 2.6.2.2.1.4-1 カニクイザル PBMC における B 細胞傷害活性及び CD8陽性 T 細胞の活性化 13
図 2.6.2.2.1.4-2 ヒト PBMC を用いた B 細胞傷害活性及び T 細胞活性化 14
図 2.6.2.2.1.5-1 ヒト PBMC におけるモスネツズマブ及び2H7v16/40G5c の B 細胞傷害活性及び T 細胞活性化誘導能 17
図 2.6.2.2.1.6-1 リツキシマブ-DANA 及びデキサメタゾン存在下の2H7v16/40G5c の B 細胞傷害活性..... 19
図 2.6.2.2.2.1-1 ヒト CD20/CD3二重遺伝子導入マウス脾臓における T 細胞依存性の B 細胞枯渇作用..... 20
図 2.6.2.2.2.3-1 ヒト CD20/CD3導入マウスにおける2H7v16/40G5c の効果..... 22
図 2.6.2.2.2.4-1 ヒト化 NSG マウスにおける抗 CD20/CD3 TDB 抗体の B 細胞枯渇効果..... 23
図 2.6.2.2.2.5-1 ヒト CD20/CD3導入マウスにおけるモスネツズマブ及び2H7v16/40G5c の効果..... 24
図 2.6.2.2.2.6.1-1 カニクイザルにおけるモスネツズマブの薬理効果 26
図 2.6.2.2.2.6.1-2 モスネツズマブによるサイトカイン産生誘導 27
図 2.6.2.2.2.6.1-3 モスネツズマブ投与による BAFF 産生量の変動 28
図 2.6.2.2.2.6.2-1 2H7v16/40G5c による B 細胞の動態及び BAFF 濃度 30
図 2.6.2.2.2.6.2-2 抗薬物抗体とモスネツズマブの薬理効果 32
図 2.6.2.2.2.6.2-3 2H7v16/40G5c の T 細胞に対する薬理効果 33
図 2.6.2.2.2.6.2-4 IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α, MIP1β 及び IL-13の産生 34
図 2.6.2.2.2.6.2-5 モスネツズマブの漸増投与によるサイトカイン産生 35

略語一覧

略語	英名	和名
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
BAFF	B-cell activating factor	B 細胞活性化因子
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CLL	chronic lymphocytic leukemia	慢性リンパ性白血病
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
ECG	electrocardiogram	心電図
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
Fab	fragment antigen-binding	抗原結合性フラグメント
FACS	fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化セルソーティング
Fc	fragment crystallizable	結晶化可能フラグメント
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2	ヒト上皮細胞増殖因子受容体2型
IL	interleukin	インターロイキン
IFN	interferon	インターフェロン
IV	intravenous	静脈内
K_d	equilibrium binding constant	平衡結合定数
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	no observed effect level	無影響量
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核球細胞
PK	pharmacokinetic	薬物動態
SC	subcutaneous	皮下
TDB	T cell-dependent bispecific	T 細胞依存性二重特異性
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

モスネツズマブ（遺伝子組換え）（別名 BTCT4465A）は抗 CD20/CD3T 細胞依存性二重特異性（TDB）抗体であり，一方の抗原結合性フラグメント（Fab）が B 細胞上の CD20 の細胞外ドメインに結合し，もう一方の Fab が T 細胞上の TCR（T 細胞受容体）複合体の CD3ε サブユニットの細胞外ドメインに結合する。これによりモスネツズマブは，TCR の特異性に依存せずに T 細胞を活性化し，B 細胞を傷害する。

モスネツズマブの薬理作用を検討するために *in vitro* 及び *in vivo* の薬理試験では，モスネツズマブに加え，機能的に同等な抗体 2H7v16/40G5c，及びコンセプト検証のための抗体 2H7v16/UCHT1v9（ヒト CD3 に結合するがモスネツズマブと異なりカニクイザル CD3 には結合性を示さない）を用いた。これらの 3 種類の抗 CD20/CD3 T 細胞依存性二重特異性抗体は，結晶化可能フラグメント（Fc）領域のアミノ酸置換により，抗 CD20 半抗体と抗 CD3 半抗体のヘテロ二量体よりなる [1),2)] 。3 種類の抗 CD20/CD3 TBD 抗体の概要を表 2.6.2.1-1 に示した。

- モスネツズマブの Fc 領域は，N297G アミノ酸置換により糖鎖修飾のない重鎖として，チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞により産生される。この非糖鎖修飾型 Fc は Fcγ 受容体への結合性を消失するため，Fc を介したエフェクター機能が著しく低下している。また，モスネツズマブは，抗 CD20 半抗体 2H7v16 に加えて，ヒト及びカニクイザルの CD3 に同程度の親和性で結合する抗 CD3 半抗体 40G5c により形成される。カニクイザルを用いた主要な医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠したすべての毒性試験及び一部の *in vitro* 及び *in vivo* の薬理試験は，この分子を用いて実施した。

- 2H7v16/40G5c は，モスネツズマブと機能的に同等の抗 CD20/CD3 抗体である。Fc 領域の N297G 置換がないという点でモスネツズマブと異なるが，大腸菌で産生されるため糖鎖修飾を受けておらず，Fc 依存性のエフェクター機能が著しく低下している。この分子を用いて，カニクイザルを用いた初期の *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験，並びにパイロット毒性試験及び探索的試験を行った。

- 2H7v16/UCHT1v9 は，ヒト CD3 に結合するが，カニクイザル CD3 には結合しない抗 CD3 半抗体 UCHT1v9 を有するという点で，2H7v16/40G5c とは異なる。2H7v16/UCHT1v9 は大腸菌で産生されるため，Fc 依存性エフェクター機能が著しく低下している。この分子を用いて，いくつかの初期の *in vitro* 及びマウスを用いた *in vivo* における抗 CD20/CD3 抗体の作用コンセプトの検証を行った。

表 2.6.2.1-1　薬理試験で使用した抗 CD20/CD3 TBD 抗体

抗体	特徴	産生細胞	Fc 変異/糖鎖修飾
モスネツズマブ（BTCT4465A）	・ 臨床開発候補品 ・ 抗 CD20半抗体：2H7v16 [a]（ヒト及びカニクイザル CD20に結合） ・ 抗 CD3半抗体：40G5c [b]（ヒト及びカニクイザル CD3に結合）	CHO 細胞	N297G/なし
2H7v16/40G5c	・ モスネツズマブと同等の機能を有する抗体 ・ Fc 領域 N297G 置換以外はモスネツズマブと同じアミノ酸配列 ・ 抗 CD20半抗体：2H7v16 [a] ・ 抗 CD3半抗体：40G5c [b]	大腸菌	なし/なし
2H7v16/UCHT1v9	・ 作用コンセプトを検証するための抗体 ・ 抗 CD20半抗体：2H7v16 [a] ・ 抗 CD3半抗体：UCHT1v9 [b]（ヒト CD3に結合し，カニクイザル CD3には結合しない）	大腸菌	なし/なし

CHO = チャイニーズハムスター卵巣；TDB = T 細胞依存性二重特異性。
[a] Fc 領域に“knob”変異（T366W）を有する。
[b] Fc 領域に“hole”変異（T366S，L368A 及び Y407V）を有する。

モスネツズマブと 2H7v16/40G5c は，カニクイザル又はヒトの末梢血単核球細胞（PBMC）を用いたいずれの試験においても *in vitro* で同程度の効力を示したが，げっ歯類には交差反応性を示さなかった。したがって，モスネツズマブ及び 2H7v16/40G5c の非臨床薬理，薬物動態（PK）及び安全性の評価に適切な動物種としてカニクイザルを選択した。モスネツズマブと 2H7v16/40G5c は機能的に同一であり，*in vitro* におけるヒト及びカニクイザルの B 細胞傷害，T 細胞活性化及びサイトカイン産生における効力，並びにマウスを用いた *in vivo* 試験において同程度の薬理効果を示した。これらの抗体の PK 及び毒性のプロファイルはカニクイザルで類似していた（2.6.4 薬物動態試験の概要文及び 2.6.6 毒性試験の概要文）。また，いくつかの初期の試験において作用コンセプトを検証するために使用した抗体 2H7v16/UCHT1v9 は，ヒト PBMC を用いた *in vitro* 試験において，2H7v16/40G5c と同程度の B 細胞傷害活性を示した。

モスネツズマブ及び 2H7v16/40G5c の薬理活性，3 種類の抗体の機能的同等性及び 2H7v16/UCHT1v9 を用いた作用コンセプトの検証を含む *in vitro* 試験の主要な結果を以下に示す。

- 2H7v16/UCHT1v9 はヒトリンパ腫 B 細胞株 BJAB に対して濃度依存的に B 細胞傷害活性を示した。この活性は CD3 陽性 T 細胞の存在下においてのみ発揮された。また，完全長の 2H7v16/UCHT1v9 と F(ab′)2 断片は同等の細胞傷害活性を示したことから，Fc 領域は活性に不要であった。
- 2H7v16/UCHT1v9 は標的となる CD20 陽性 B 細胞存在下で CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化し，CD20 陽性 B 細胞を傷害する T 細胞を動員した。同濃度の 2H7v16/UCHT1v9 では，CD4 陽性 T 細胞と比較して CD8 陽性 T 細胞の方が多くのグランザイム B 発現及びパーフォリン産生を示した。

- 2H7v16/UCHT1v9 は CD20 発現量が低いリツキシマブ非感受性の細胞株，ヒト末梢血液由来 B 細胞及び慢性リンパ性白血病（CLL）患者由来の初代培養 B 細胞など，CD20 発現量が様々な種類のヒト B 細胞に対し広く細胞傷害活性を示した。
- 抗 CD3 抗体であるクローン 40G5c はヒト及びカニクイザルの CD3ε 抗原に対し同等の一価の結合親和性を示した。2H7v16/40G5c はヒト及びカニクイザルの PBMC に対し，同等の細胞傷害活性を示した。
- 2H7v16/40G5c は，抗 CD20 抗体（リツキシマブ-DANA，Fc 依存性のエフェクター機能を消失させたリツキシマブ改変体）やデキサメタゾン存在下で細胞傷害活性を示した。
- モスネツズマブ及び 2H7v16/40G5c はヒト PBMC を用いた *in vitro* 試験において同等の B 細胞傷害活性及び T 細胞活性化を示した。
- モスネツズマブは標的となる CD20 陽性 B 細胞に依存して，T 細胞活性化及び増殖並びにサイトカイン産生を誘導した。CD20 陽性 B 細胞の非存在下では T 細胞活性化及びサイトカイン産生は認められなかった。
- モスネツズマブはヒト Fc 受容体（FcγRIA，FcγRIIA，FcγRIIB 及び FcγRIIIA）に対する結合性をほとんど示さなかった。

ヒト CD20/CD3導入マウス，ヒト化 NSG マウス及びカニクイザルを用いて，モスネツズマブ及び機能的に同等な2H7v16/40G5c の作用機序と薬理効果を検証した。

- ヒト CD20/CD3 導入マウス，NSG マウス及びカニクイザルの末梢血液及びリンパ組織において強力かつ用量依存的な B 細胞枯渇効果を示した。
- ヒト CD20/CD3 導入マウス，NSG マウス及びカニクイザルの末梢血液及びリンパ組織中の CD8 陽性 T 細胞及び CD4 陽性 T 細胞の一過性かつ用量依存性の活性化並びにサイトカイン産生が認められた。T 細胞活性化とサイトカイン産生は概ね初回投与直後に検出され，以降の投与では減少又は認められなくなった。
- 抗 CD20/CD3 抗体投与直後に末梢血中の T 細胞が一過性に減少し，3～7 日後に回復した。これは活性化に伴う T 細胞の辺縁趨向，再分配，その後の増殖と拡大に起因するとみられる。T 細胞の拡大後にマウスの末梢血やリンパ組織の T 細胞数がベースラインを下回るのは活性化に伴う細胞死によると考えられる。カニクイザルでは T 細胞数は概ねベースラインまで戻った。

安全性薬理評価を，単回投与 GLP 毒性試験（4.2.3.1-3）及び漸増投与法を用いた 4 週間非 GLP 毒性試験（4.2.3.2-4）に組み込んだ。

- テレメトリー機器を外科的に埋め込んだ歩行可能な動物では，モスネツズマブの投与に伴って，1 mg/kg の静脈内（IV）投与で可逆的な低血圧，0.1 mg/kg を超える IV 投与又は皮下（SC）投与で頻脈及び深部体温の上昇が認められた。心拍数増加による RR 間隔，PR 間隔及び QT 間隔の短縮を除き，心電図の量的又は質的な変化は認められなかった。これらの所見はサイトカイン放出及び関連する急性蛋白反応と一致する。
- 呼吸系及び神経系の安全性薬理評価項目に薬剤に関連した影響は認められなかった。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　*In vitro* 試験

2.6.2.2.1.1　モスネツズマブの結合特性

1)　モスネツズマブのヒト CD20 及びヒト CD3 結合親和性

（資料番号 4.2.1.1-1）

モスネツズマブのヒト CD20及びヒト CD3に対する結合親和性を，CD20を発現する BJAB 細胞及び CD3を発現する Jurkat 細胞を用いて，標識抗体によるスキャッチャード分析により評価した。その結果，モスネツズマブの平衡結合定数（Kd）の平均値は，CD20に対して68 nmol/L，CD3に対して40 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1.1-1）。また，複数の非臨床パイロット試験に使用している，大腸菌で産生された2H7v16/40G5c はそれぞれの抗原に対し，モスネツズマブと同等の結合親和性を示した。

表 2.6.2.2.1.1-1　モスネツズマブのヒト CD20及び CD3に対する結合親和性

抗体分子	抗原	K_d （nmol/L，一価）	K_d 平均値 （nmol/L）
モスネツズマブ	ヒト CD20/BJAB 細胞	77.52 ± 3.76 56.59 ± 3.85 69.74 ± 6.30	68
	ヒト CD3/Jurkat 細胞	30.07 ± 8.34 40.92 ± 13.06 48.65 ± 8.05	40
2H7v16/40G5c	ヒト CD20/BJAB 細胞	87.74 ± 8.47 77.53 ± 8.16	83
	ヒト CD3 Jurkat 細胞	45.96 ± 5.37 41.41 ± 7.39 34.36 ± 4.80	40

K_d = 平衡結合定数

［資料番号4.2.1.1-1 Table 1及び Table 2より改変］

2)　2H7v16/40G5c の CD20 及び CD3 への結合

（資料番号4.2.1.1-2）

モスネツズマブ及び2H7v16/40G5c の CD20を認識する Fab 領域はオクレリズマブと同一である。オクレリズマブはげっ歯類の CD20には結合しない。しかし，オクレリズマブの CD20認識部位のアミノ酸配列は，ヒト及びカニクイザルでは完全に保存されており，オクレリズマブはヒト及びカニクイザル双方の CD20に結合できる[3),4)]。

モスネツズマブの抗 CD3半抗体クローン40G5c の Fab 領域とヒト及びカニクイザルの CD3ε 抗原との結合親和性をビアコア法により測定したところ，それぞれ12.0 nmol/L 及び14.2 nmol/L であり，ヒトとカニクイザルで同程度の結合親和性を示した。

また，*in vitro* における2H7v16/40G5c のヒト及びカニクイザルの末梢血由来 B 細胞に対する細胞傷害活性の90%有効濃度（EC_{90}値）は，ヒトで0.07～1.1 nmol/L（n = 5），カニクイザルで0.026～0.074 nmol/L（n = 2）の範囲であり，同程度であった。

3)　モスネツズマブのヒト及びカニクイザルのリンパ球への結合

（資料番号4.2.1.1-3）

2種類の異なる原薬製造工程に由来するモスネツズマブ（v0.1及び v0.2）の T 細胞及び B 細胞への結合活性を，ヒト及びカニクイザルの PBMC を用いた蛍光活性化セルソーティング（FACS）法で評価した。その結果，v0.1及び v0.2製剤はヒト及びカニクイザルの B 細胞上の CD20並びに T 細胞上の CD3ε に対して同等の結合性を示した。

4)　ヒト Fcγ 受容体に対するモスネツズマブの *in vitro* 結合活性

（資料番号 4.2.1.1-4）

ヒト Fcγ 受容体（FcγRIIA［H131 及び R131 アロタイプ］，FcγRIIB 及び FcγRIIIA［F158 及び V158 アロタイプ］）とモスネツズマブ（Fc 領域に N297G 変異を含む）との結合相互作用を，酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）に基づくリガンド結合アッセイで評価した。その結果，モスネツズマブの Fcγ 受容体に対する結合は非常に弱かった。

2.6.2.2.1.2　抗 CD20/CD3 TDB 抗体（2H7v16/UCHT1v9）の作用機序

（資料番号4.2.1.1-5）

抗 CD20/CD3 TDB 抗体の作用機序である T 細胞活性化及び B 細胞傷害活性の Fc 依存性を評価するために，コンセプト証明抗体である2H7v16/UCHT1v9を用いて *in vitro* 試験を実施した。

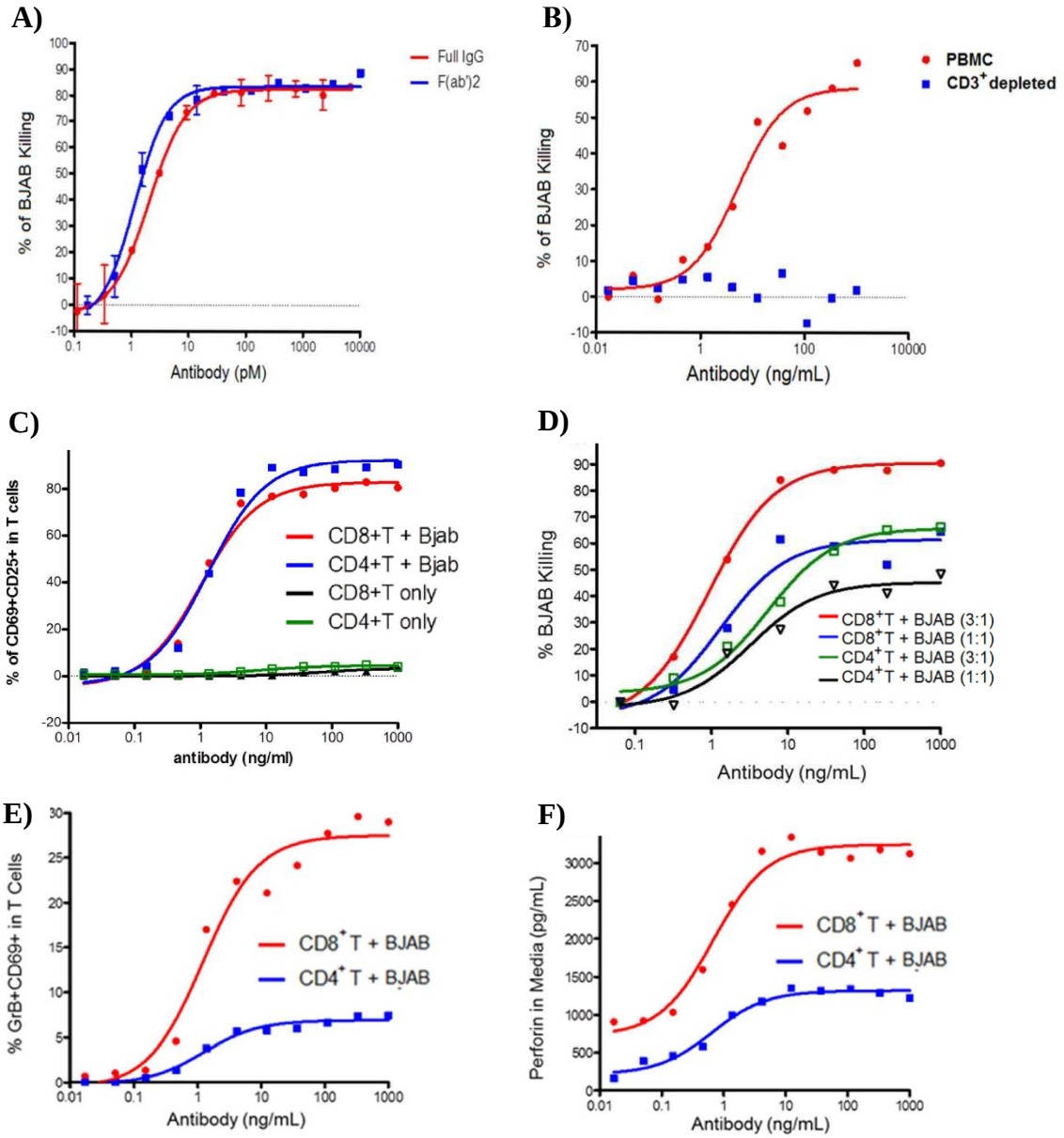
始めに，ヒト PBMC を用いて，完全長の2H7v16/UCHT1v9及びその Fc 領域を欠いた $F(ab')_2$ によるヒト B 細胞リンパ腫細胞株 BJAB に対する細胞傷害活性を調べた。その結果，$F(ab')_2$は完全長の2H7v16/UCHT1v9と同等の細胞傷害活性を示した（図 2.6.2.2.1.2-1A）。このことから，抗 CD20/CD3 TDB 抗体の標的細胞の殺細胞作用は抗体の Fc 領域に依存しないことが示された。

また，PBMC から CD3陽性細胞を除去すると，2H7v16/UCHT1v9の細胞傷害活性が消失したことから（図 2.6.2.2.1.2-1B），2H7v16/UCHT1v9が機能するためには T 細胞が必須であり，2H7v16/UCHT1v9が B 細胞上の CD20及び T 細胞上の CD3に同時に結合することで細胞傷害活性を示すと考えられた。

次に，CD4陽性 T 細胞及び CD8陽性 T 細胞の活性化に関して，BJAB 存在もしくは非存在下で評価した。その結果，CD4陽性 T 細胞及び CD8陽性 T 細胞は，いずれも BJAB の存在下で2H7v16/UCHT1v9により活性化された。しかし，BJAB 非存在下では，2H7v16/UCHT1v9は T 細胞の活性化を誘導しなかった（図 2.6.2.2.1.2-1C）。さらに，BJAB に対する細胞傷害の程度は，CD4陽性 T 細胞と比較して CD8陽性 T 細胞の方が強かった（図 2.6.2.2.1.2-1D）。

細胞傷害活性の結果と一致して，2H7v16/UCHT1v9による細胞内グランザイム B の発現誘導は，活性化 CD4陽性 T 細胞と比較して，活性化 CD8陽性 T 細胞でより顕著であった（図 2.6.2.2.1.2-1E）。また，パーフォリンの培地中への産生量も，活性化 CD8陽性 T 細胞のほうが活性化 CD4陽性 T 細胞と比較して多量であった（図 2.6.2.2.1.2-1F）。

図 2.6.2.2.1.2-1　抗 CD20/CD3 TDB（2H7v16/UCHT1v9）を用いた作用機序の検証



A)　ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 BJAB 及びヒト末梢血単核球細胞（PBMC）を完全長の2H7v16/UCHT1v9（Full IgG）又はその Fc 領域を欠く F(ab')2 存在下で24時間培養後に，細胞傷害活性を蛍光活性化セルソーティング（FACS）法により測定した。

B)　ヒト PBMC 又は $CD3^+$ 細胞を除去したヒト PBMC（$CD3^+$ depleted）の存在下における2H7v16/UCHT1v9（Full IgG）の BJAB に対する細胞傷害活性を FACS 法により測定した。

C)　BJAB を単独培養，もしくは CD8陽性 T 細胞（$CD8^+$ T）又は CD4陽性 T 細胞（$CD4^+$ T）と共培養した時の2H7v16/UCHT1v9による T 細胞の活性化を，CD69及び CD25を指標とした FACS 法により測定した。

D)　$CD8^+$ T 又は $CD4^+$ T と BJAB の混合比率を変え，2H7v16/UCHT1v9の細胞傷害活性を FACS 法により測定した。

E)　$CD8^+$ T 又は $CD4^+$ T と BJAB を混合し，T 細胞活性化及びグランザイム B を FACS 法により測定した。

F)　$CD8^+$ T 又は $CD4^+$ T と BJAB を混合し，培地中に産生されたパーフォリンを酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）により測定した。

［4.2.1.1-5 Figure 1, 2, 3及び4より改変］

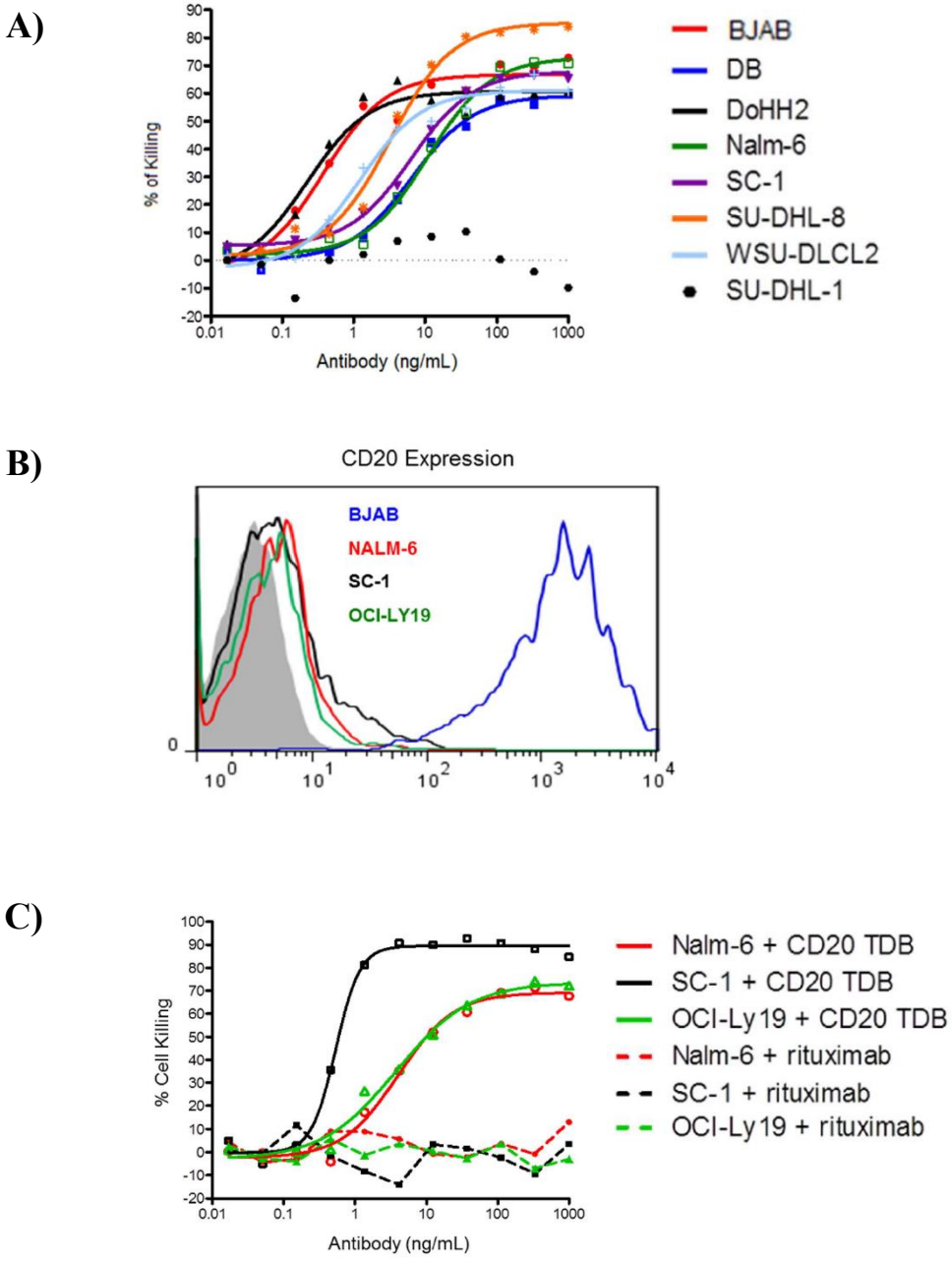
2.6.2.2.1.3 2H7v16/UCHT1v9の B 細胞傷害活性

（資料番号4.2.1.1-5）

2H7v16/UCHT1v9の抗 CD20/CD3 T 細胞依存性二重特異性（TDB）抗体としての作用機序を明らかにするために，CD20発現量が異なる7種類の B 細胞リンパ腫細胞株（BJAB，DB，DoHH2，NALM-6，SC-1，SU-DHL-8及び WSU-DLCL2）及び CD20を発現していない B 細胞リンパ腫細胞株（SU-DHL1）を用いて B 細胞傷害活性を評価した。その結果，2H7v16/UCHT1v9は CD20発現 B リンパ腫細胞株各種に対して濃度依存的な細胞傷害活性を示し，EC_{50}値は0.22～11 ng/mL の範囲であった（図 2.6.2.2.1.3-1A）。一方で，2H7v16/UCHT1v9は CD20を発現しない SU-DHL1に対し細胞傷害活性を示さなかった。また，2H7v16/UCHT1v9は，CD20発現量が低く，リツキシマブ不応答性 B 細胞リンパ腫細胞株（NALM-6，SC-1及び OCI-LY19）に対し，濃度依存的な B 細胞傷害活性を示した（図 2.6.2.2.1.3-1B 及び図 2.6.2.2.1.3-1C）。

2H7v16/UCHT1v9は，ヒト PBMC からの T 細胞を用いた試験において，濃度依存的な B 細胞傷害活性を示し（図 2.6.2.2.1.3-2A），24時間培養後の平均の EC_{50}値は3 ng/mL 未満であった（図 2.6.2.2.1.3-2B）。また，最大濃度である1000 ng/mL の2H7v16/UCHT1v9による B 細胞傷害率は30例のドナーPBMC の平均で約85%であった。また，2例の CLL 患者由来 PBMC を用いた同様の試験においても，2H7v16/UCHT1v9は B 細胞傷害活性を示した（図 2.6.2.2.1.3-2C）。

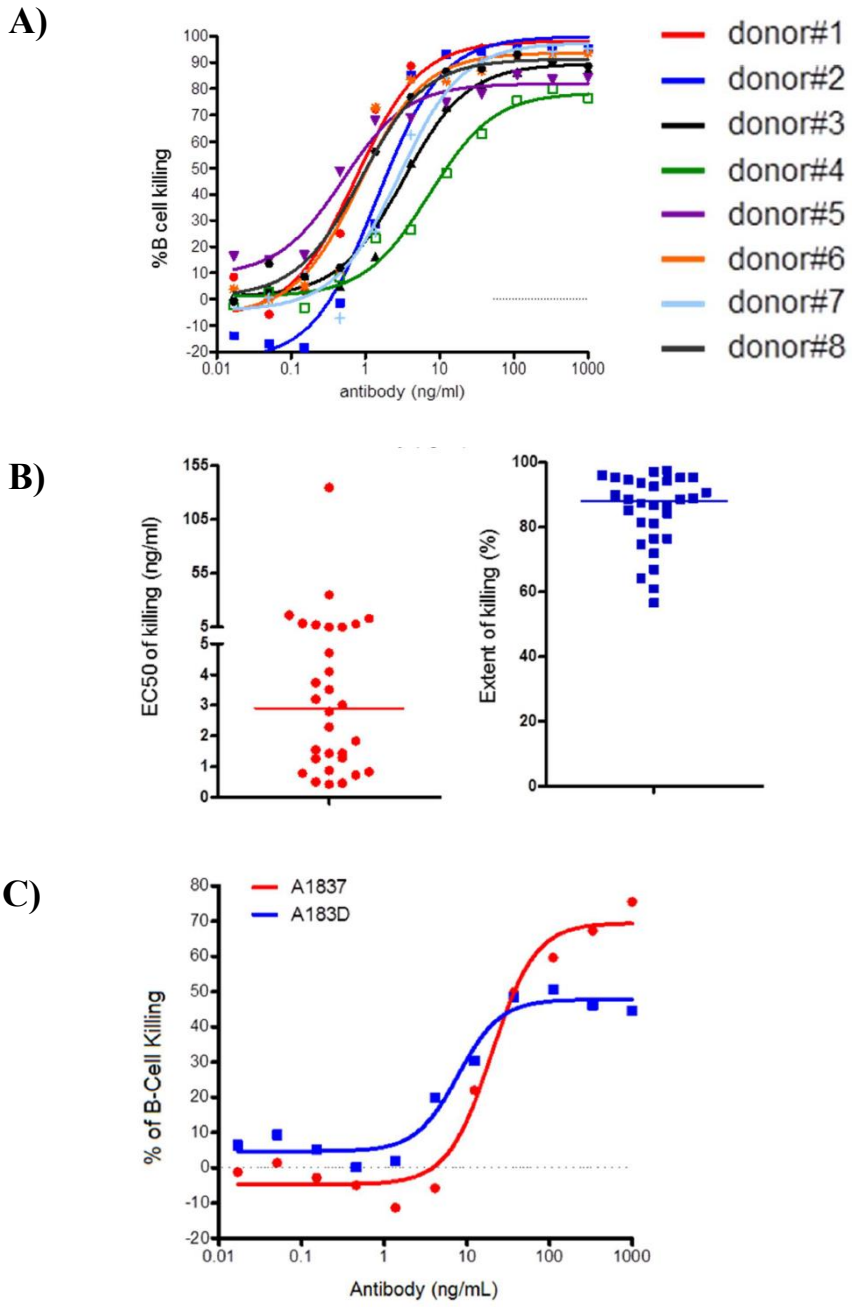
図 2.6.2.2.1.3-1　2H7v16/UCHT1v9の B 細胞リンパ腫細胞株に対する細胞傷害活性



A) 2H7v16/UCHT1v9のヒト B 細胞リンパ腫細胞株に対する細胞傷害活性を蛍光活性化セルソーティング（FACS）法により測定した。エフェクター細胞としてヒト末梢血単核球細胞（PBMC）を用いた。
B) ヒト B 細胞リンパ腫細胞株の CD20発現を FACS 法により評価した。
C) 抗 CD20/CD3 T 細胞依存性二重特異性（TDB）抗体2H7v16/UCHT1v9（CD20 TDB）及びリツキシマブ（rituximab）のヒト B 細胞リンパ腫細胞株に対する細胞傷害活性を FACS 法により評価した。

［4.2.1.1-5 Figure 5及び6より改変］

図 2.6.2.2.1.3-2　2H7v16/UCHT1v9の健常ヒト末梢血液由来 B 細胞に対する細胞傷害活性



A) 8例のヒト末梢血液由来 B 細胞から得られた結果の用量反応曲線。

B) 30例のヒト B 細胞傷害活性に対する EC_{50}値（左パネル）と1000 ng/mL の2H7v16/UCHT1v9による細胞傷害率（右パネル）を示す。

C) 慢性リンパ性白血病（CLL）患者2例からの PBMC（A1837由来 PBMC は $CD5^+CD19^+$ B リンパ腫細胞70%，$CD8^+$T 細胞8.4%，A183D 由来 PBMC は CD5陽性 CD19陽性 B リンパ腫細胞80%，CD8陽性 T 細胞4.4%）を表示濃度の2H7v16/UCHT1v9と48時間培養し，B 細胞傷害活性を測定した。

［4.2.1.1-5 Figure 7及び8より改変］

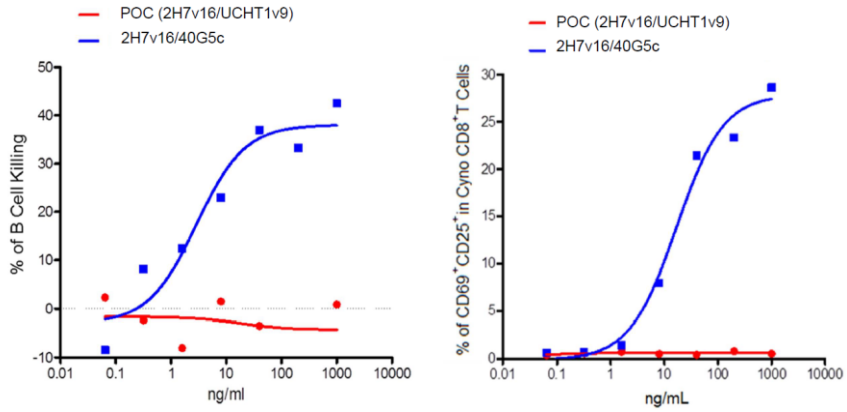
2.6.2.2.1.4　2H7v16/UCHT1v9及び2H7v16/40G5c の活性比較

（資料番号4.2.1.1-2）

2H7v16/40G5c と2H7v16/UCHT1v9は，異なる抗 CD3半抗体を持つ。2H7v16/40G5c はヒト及びヒト以外の霊長類においても活性を示すが，2H7v16/UCHT1v9はヒトでのみ活性を示す。

カニクイザルの PBMC を用いた試験では，2H7v16/40G5c のみが CD8陽性 T 細胞を活性化してカニクイザル B 細胞を死滅させたが，2H7v16/UCHT1v9はそのような活性を示さなかった（図 2.6.2.2.1.4-1）。

図 2.6.2.2.1.4-1　カニクイザル PBMC における B 細胞傷害活性及び CD8陽性 T 細胞の活性化



PBMC=末梢血単核球細胞，POC = コンセプト検証。

カニクイザルから単離した PBMC を2H7v16/40G5c 又は2H7v16/UCHT1v9と共に24時間培養し，B 細胞傷害活性及び活性化 CD8陽性 T 細胞の割合を蛍光活性化セルソーティング法にて測定した。

（資料番号4.2.1.1-2 Figure 1より改変）

次に，2H7v16/40G5c 及び2H7v16/UCHT1v9の B 細胞傷害，T 細胞活性化及びサイトカイン産生に対する薬理活性を，ヒト PBMC を用いて検討した。B 細胞傷害活性について，両抗体は *in vitro* で同等の活性を示した（図 2.6.2.2.1.4-2A 左パネル及び図 2.6.2.2.1.4-2B 左パネル）。2H7v16/40G5c の CD8陽性 T 細胞に対する活性化誘導能は2H7v16/UCHT1v9と比較して低いと考えられた（図 2.6.2.2.1.4-2A 右パネル及び図 2.6.2.2.1.4-2B 右パネル）。サイトカイン産生誘導についても2H7v16/40G5c の方が2H7v16/UCHT1v9より活性は低い傾向があり（図 2.6.2.2.1.4-2C），CD8陽性 T 細胞の活性化誘導能の結果と一致していた。

2H7v16/40G5c のヒト及びカニクイザルの PBMC に対する B 細胞傷害活性は同程度であり，EC_{90}値はヒトで0.07～1.1 nmol/L，カニクイザルで0.026～0.074 nmol/L の範囲であった。

図 2.6.2.2.1.4-2 ヒト PBMC を用いた B 細胞傷害活性及び T 細胞活性化

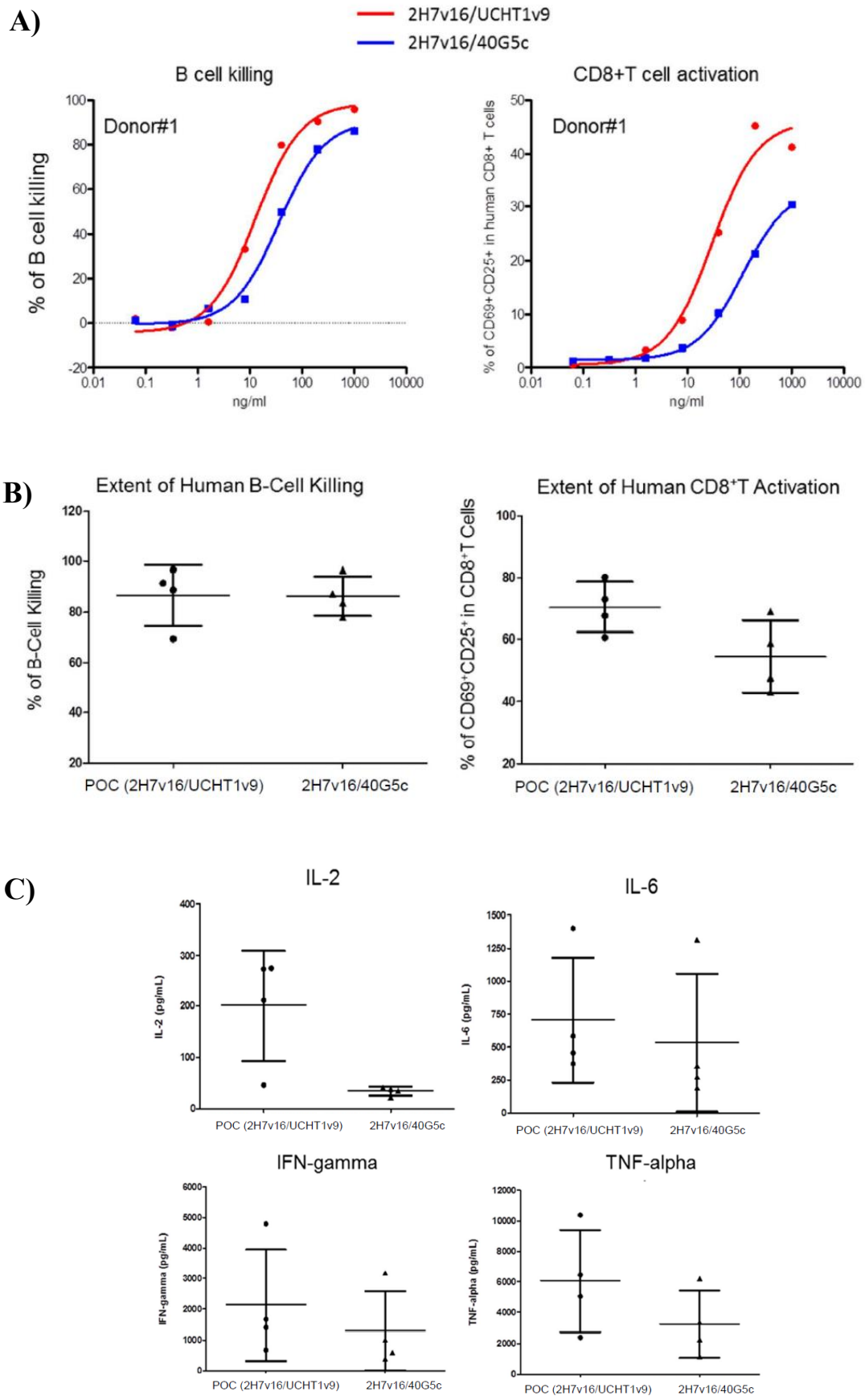


図 2.6.2.2.1.4-2 ヒト PBMC を用いた B 細胞傷害活性及び T 細胞活性化（続き）

A) B 細胞傷害活性（左パネル）及び CD8陽性 T 細胞活性化（右パネル）に対する2H7v16/40G5c 及び 2H7v16/UCHT1v9の濃度依存性。末梢血単核球細胞（PBMC）を抗体の存在下で24時間培養後に蛍光活性化セルソーティング法により B 細胞を検出した。抗体非存在下で培養した標本中の B 細胞数より抗体処理標本における B 細胞傷害活性を算出した。

B) B 細胞傷害活性（左パネル）及び CD8陽性 T 細胞活性化（右パネル）に対する1000 ng/mL の 2H7v16/40G5c 及び2H7v16/UCHT1v9 の活性。4例のヒト末梢血液由来細胞を使用し，平均 ± 標準偏差で示す。Unpaired t-test による統計学的有意差は認められなかった。

C) インターロイキン（IL）-2，IL-6，インターフェロン（IFN）-γ 及び腫瘍壊死因子（TNF）-α の産生。ヒト PBMC を抗体の存在下で24時間培養し，細胞培養上清中に産生された各サイトカインを測定した。Unpaired t-test による統計学的有意差は認められなかった。

（資料番号4.2.1.1-2 Figure 2, 3及び4より改変）

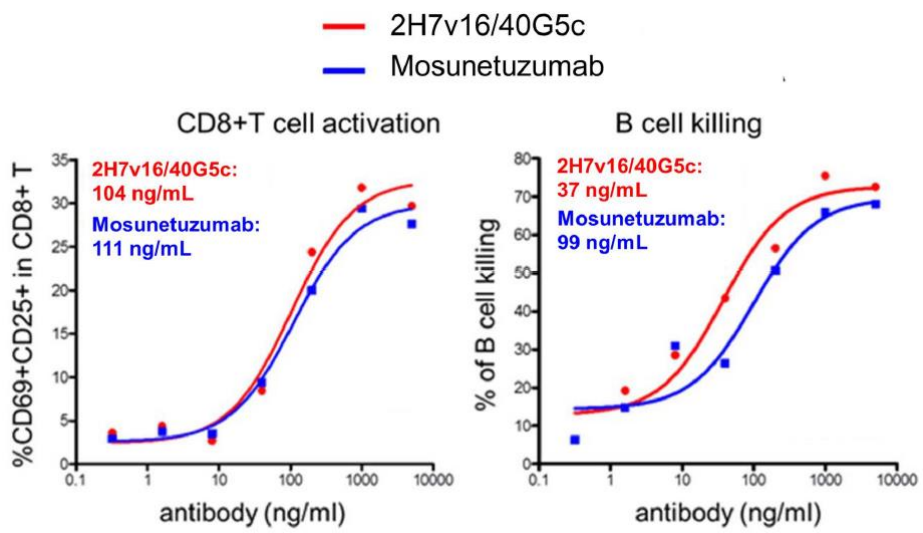
2.6.2.2.1.5 モスネツズマブ及び2H7v16/40G5c の活性比較

（資料番号4.2.1.1-1）

CHO 細胞由来のモスネツズマブ及び大腸菌により産生される2H7v16/40G5c の B 細胞傷害活性，T 細胞活性化及びサイトカイン産生を比較した。その結果，モスネツズマブは0.3～10 μmol/L の用量範囲で濃度依存的に B 細胞傷害活性，T 細胞活性化並びにインターロイキン（IL）-2，IL-6，インターフェロン（IFN）-γ 及び腫瘍壊死因子（TNF）α の産生を示した（図 2.6.2.2.1.5-1）。これらの試験において，モスネツズマブと2H7v16/40G5c は同等の活性を示し，明らかな差は認められなかった。

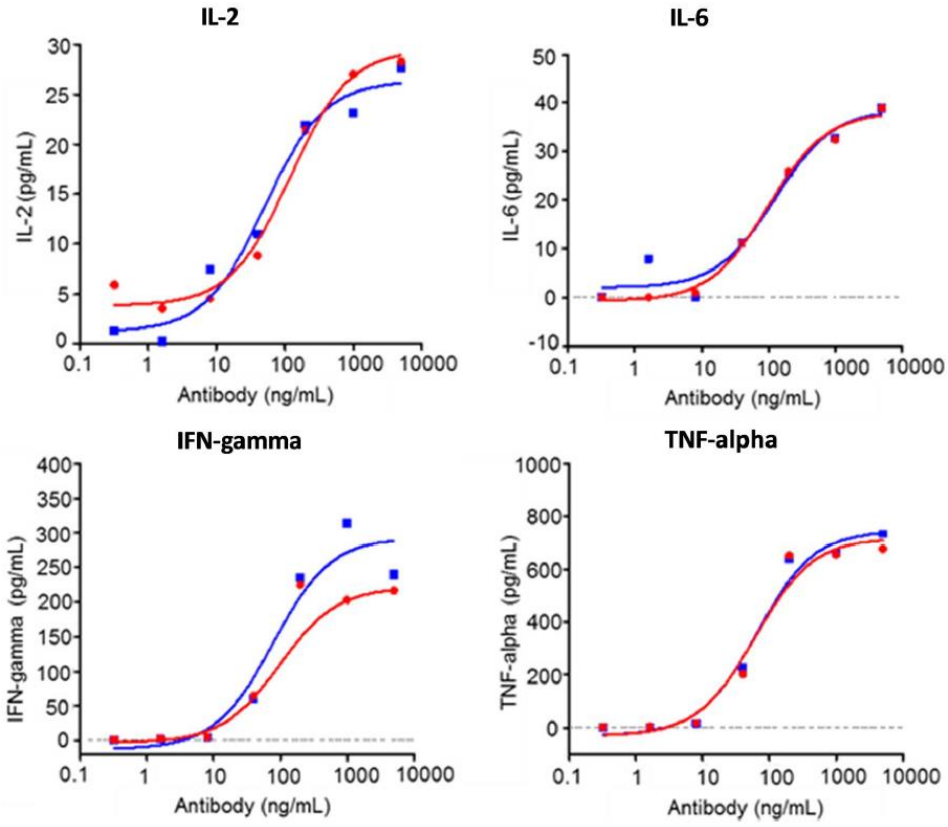
図 2.6.2.2.1.5-1　ヒト PBMC におけるモスネツズマブ及び2H7v16/40G5c の B 細胞傷害活性及び T 細胞活性化誘導能

A)



3例のドナーから得られた結果のうち代表例を示す。

B)



IL=インターロイキン，IFN=インターフェロン，TNF=腫瘍壊死因子

3例のヒト末梢血液標本を用いて得られた結果の代表例を示す。

（資料番号4.2.1.1-1 Figure 1及び2より改変）

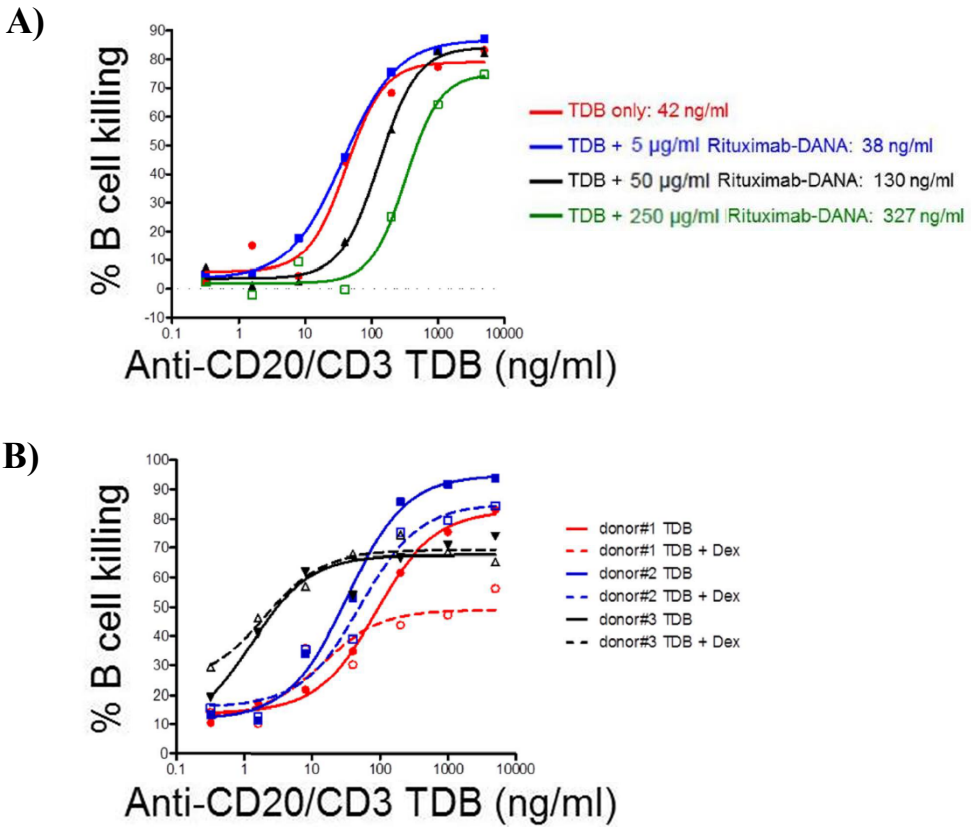
2.6.2.2.1.6 リツキシマブ-DANA 及びデキサメタゾン存在下における 2H7v16/40G5c の活性

（資料番号4.2.1.1-6及び4.2.1.1-7）

リツキシマブは臨床において B 細胞の悪性リンパ腫の治療に使用されている。抗 CD20/CD3 TDB 抗体である2H7v16/40G5c とリツキシマブはいずれも CD20を標的とするため，2H7v16/40G5c がリツキシマブ存在下で薬理活性を有するかを評価した。この試験では，リツキシマブのB細胞傷害活性の影響を排除するために，Fcを介したエフェクター機能が欠損し，B 細胞傷害活性を示すことなく CD20に結合するリツキシマブ-DANA 改変体を用いた。その結果，2H7v16/40G5c は，CD20抗原の飽和結合するために十分な濃度のリツキシマブ-DANA の存在下においても B 細胞傷害活性を示した（図 2.6.2.2.1.6-1A）。

2H7v16/40G5c は T 細胞動員抗体であり，その効力は活性化 T 細胞に依存する。そこで T 細胞の免疫応答を抑制するデキサメタゾン存在下の2H7v16/40G5c の活性を検討した。その結果，2H7v16/40G5c はデキサメタゾン存在下においても B 細胞傷害活性を示した（図 2.6.2.2.1.6-1B）。

図 2.6.2.2.1.6-1　リツキシマブ-DANA 及びデキサメタゾン存在下の2H7v16/40G5c の B 細胞傷害活性



PBMC= 末梢血単核球細胞，Rituximab-DANA = リツキシマブ-DANA，TDB = T 細胞依存性二重特異性抗体，Dex = デキサメタゾン。

A) ヒト PBMC にリツキシマブ-DANA を添加し1時間後に，2H7v16/40G5c の存在下で24時間培養し，B 細胞傷害活性を測定した。各凡例の末尾に，EC_{50}値（ng/ml）を示した。

B) ヒト PBMC（3例）を1µmol/L のデキサメタゾンで一晩前処理し，2H7v16/40G5c の存在下で24時間培養し，B 細胞傷害活性を測定した。

（4.2.1.1-6 Figure 3及び4.2.1.1-7 Figure 1より改変）

2.6.2.2.2 *In vivo* 試験

2.6.2.2.2.1 ヒト CD20/CD3導入マウスを用いた2H7v16/UCHT1v9のコンセプト検証

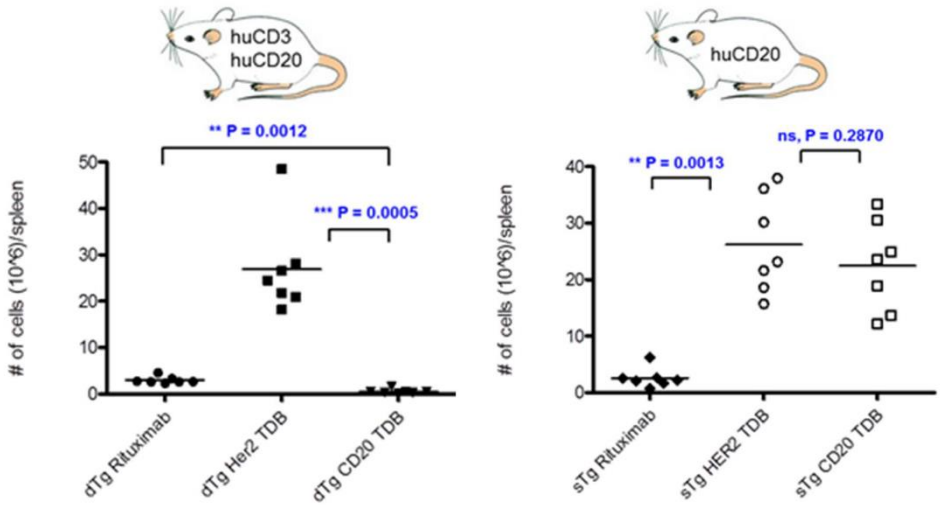
（資料番号4.2.1.1-8）

抗 CD20/CD3 TDB 抗体の単回投与による有効性を，ヒト CD20を B 細胞に，ヒト CD3ε を T 細胞に発現する二重遺伝子導入 B6N マウス（以下，ヒト CD20/CD3導入マウス）[5),6)] 及びヒト B 細胞及び T 細胞を持つヒト化 NSG マウスを用いて検証した。

抗 CD20/CD3 TDB 抗体の作用コンセプトを検証するために，ヒト CD20/CD3導入マウスに2H7v16/UCHT1v9を0.5 mg/kg IV 投与し，7日後に脾臓細胞を用いて解析を行った。その結果，2H7v16/UCHT1v9はマウス B 細胞及び T 細胞の両方に結合したが，アイソタイプを一致させた陰性対照抗体である抗ヒト上皮細胞増殖因子受容体2型（HER2）/CD3 TDB 抗体はマウス T 細胞のみに結合した。ヒト CD20単独遺伝子導入マウスを用いた試験結果とは対照的に，2H7v16/UCHT1v9はヒト CD20/CD3導入マウスにおいて，リツキシマブよりも20倍低い用量にもかかわらず，脾臓 B 細胞に対する減少効果は有意に強かった（図 2.6.2.2.2.1-1左パネル）。陰性対照である抗 HER2/CD3 TDB 抗体は，ヒト CD20単独遺伝子導入又はヒト CD20/CD3導入マウスのいずれにおいても B 細胞の減少作用を示さなかった。

2H7v16/UCHT1v9の特異性を確認するために，ヒト CD20単独遺伝子導入マウスに0.5 mg/kg のリツキシマブ，抗 HER2/CD3 TDB 抗体あるいは2H7v16/UCHT1v9を投与した。リツキシマブ及び2H7v16/UCHT1v9はマウス B 細胞に結合したが，マウス T 細胞には結合しなかった。対照抗体である抗 HER2/CD3 TDB 抗体はマウス免疫細胞に結合しなかった。抗体投与より7日後の脾臓において，抗 CD20 TDB 抗体はリツキシマブと比較して B 細胞を減少させる効果を示さなかった（図 2.6.2.2.2.1-1右パネル）。これらの結果から，抗 CD20/CD3 TDB 抗体による B 細胞枯渇効果の T 細胞依存性が確認された。

図 2.6.2.2.2.1-1　ヒト CD20/CD3二重遺伝子導入マウス脾臓における T 細胞依存性の B 細胞枯渇作用



huCD3 = ヒト CD3，huCD20 = ヒト CD20，ns = 有意差なし，dTg = 二重遺伝子導入，sTg = 単独遺伝子導入，TDB = T 細胞依存性二重特異性。

（資料番号4.2.1.1-8 Figure 4より改変）

2.6.2.2.2.2 ヒト CD20/CD3導入マウスにおける B 細胞枯渇効果を指標とした用量の検討

（資料番号4.2.1.1-9）

ヒト CD20及びヒト CD3の2つの遺伝子を導入したマウスに2H7v16/UCHT1v9を0.00005 mg/kgから0.5 mg/kg の用量で静脈内へ単回投与した。0.05 mg/kg までの用量では投与1日後に血中 B 細胞数が減少したが，15日間に渡り B 細胞の枯渇を維持するために必要な2H7v16/UCHT1v9の最小用量は0.5 mg/kg であった。このことから，0.5 mg/kg の投与量は，マウスの血液及びリンパ組織における B 細胞の枯渇に有効な用量であると考えられた。

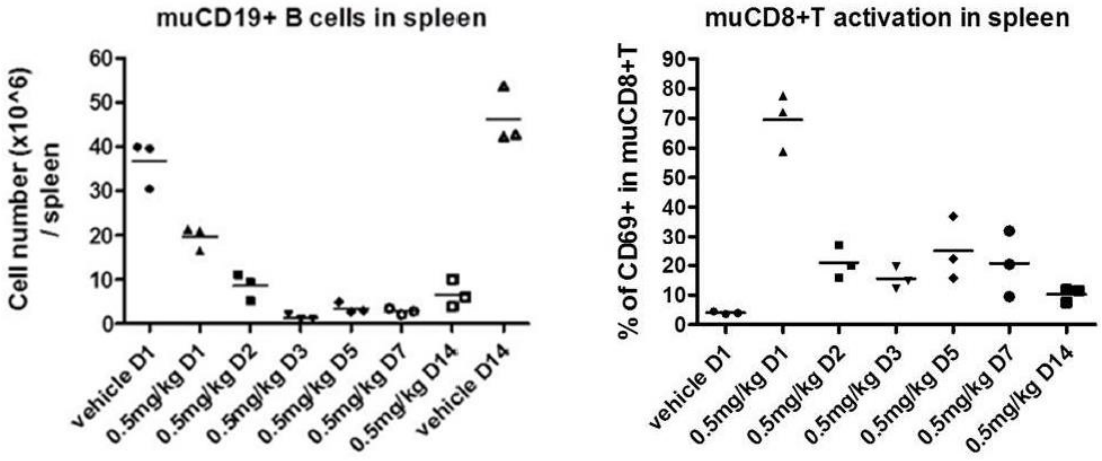
2.6.2.2.2.3 ヒト CD20/CD3導入マウスにおける2H7v16/40G5c の効果

（資料番号4.2.1.1-10）

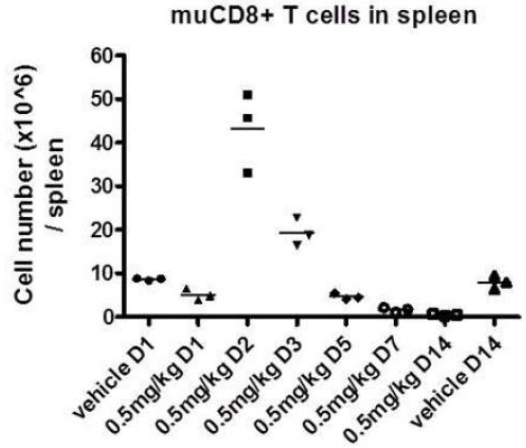
ヒト CD20/CD3導入マウスに2H7v16/40G5c（0.5 mg/kg）を静脈内へ単回投与した。投与1, 2, 3, 5, 7及び14日後の脾臓を採取した。脾臓の CD19陽性 B 細胞及び CD8陽性 T 細胞の数，並びに T 細胞活性化を FACS 法により測定した。その結果，CD19陽性 B 細胞は，投与1日後（D1）より減少し，投与3日後（D3）ではほとんど枯渇していた（図 2.6.2.2.2.3-1A 左パネル）。CD8陽性 T 細胞は，投与1日後から活性化マーカーである CD69を発現していた（図 2.6.2.2.2.3-1A 右パネル）。CD69の発現量は投与1日後で最大となり，投与2日後にはほぼベースラインの発現量まで減少した。また，CD8陽性 T 細胞数は，投与2日後に最大5倍まで増加し，投与5~14日後までの間にベースライン以下まで減少した（図 2.6.2.2.2.3-1B）。

図 2.6.2.2.2.3-1　ヒト CD20/CD3導入マウスにおける2H7v16/40G5c の効果

A)



B)



mu = マウス，D = （投与）日後

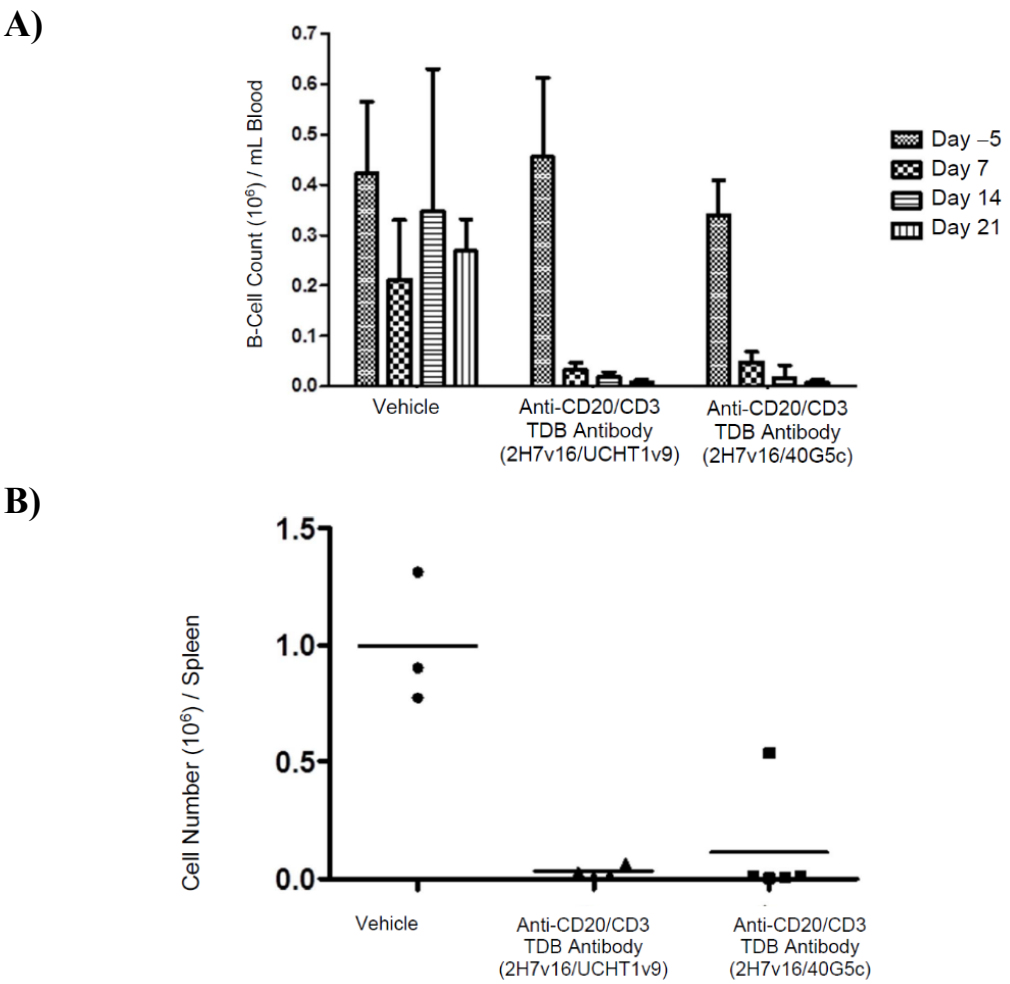
（資料番号4.2.1.1-10 Figure 2, 3及び4より改変）

2.6.2.2.2.4　NSG マウスにおける2H7v16/UCHT1v9及び2H7v16/40G5c の効果

（資料番号4.2.1.1-11）

抗 CD20/CD3 TDB 抗体である2H7v16/UCHT1v9及び2H7v16/40G5c の効果を，ヒトの造血系を再構築し，ヒト B 細胞及びヒト T 細胞を持つ NSG マウスを用いて検討した。2H7v16/UCHT1v9, 2H7v16/40G5c（各0.5 mg/kg）又は溶媒対照をヒト化 NSG マウスに週1回，3週間 IV 投与した。抗体の初回投与5日前，7日後，14日後及び21日後に末梢血液を採取し，試験終了日である初回投与21日後に脾臓を採取した。B 細胞及び T 細胞活性化を FACS 法により測定した。その結果，2H7v16/UCHT1v9及び2H7v16/40G5c はいずれも末梢 B 細胞を強力に枯渇させた。初回投与7日後の血液中に B 細胞はほとんど検出されなかった。B 細胞の減少は以降の2回の投与後にも持続していた（図 2.6.2.2.2.4-1A）。投与21日後の試験終了時において，末梢血及び脾臓では B 細胞はほとんど検出されなかった（図 2.6.2.2.2.4-1A 及び図 2.6.2.2.2.4-1B）。なお，投与7日後の時点では T 細胞活性化は検出されず，図 2.6.2.2.2.3-1A 右パネルの投与7日後の結果と一致するものであった。これらの結果は，2H7v16/UCHT1v9及び2H7v16/40G5c が同程度の B 細胞枯渇効果を持つことを示している。

図 2.6.2.2.2.4-1　ヒト化 NSG マウスにおける抗 CD20/CD3 TDB 抗体の B 細胞枯渇効果



TDB＝T 細胞依存性二重特異性，Day＝（投与）日後

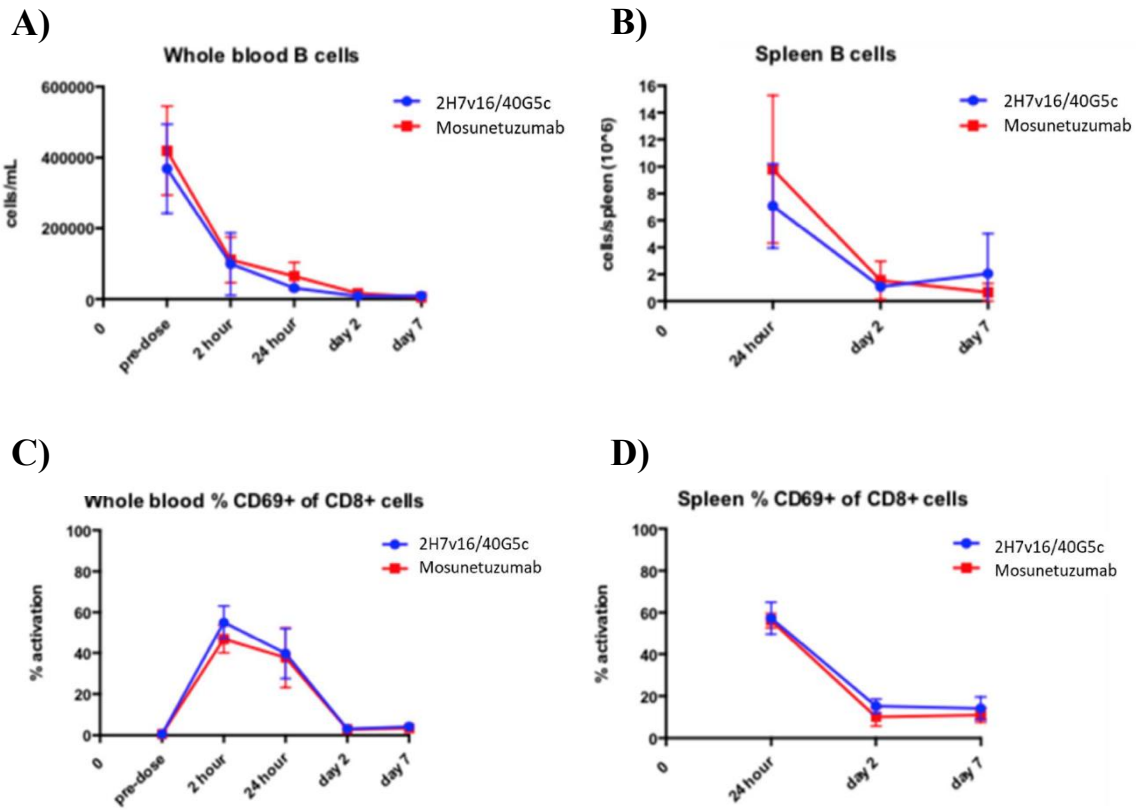
［資料番号4.2.1.1-11 Figure 2及び3より改変］

2.6.2.2.2.5　ヒト CD20/CD3 導入マウスにおけるモスネツズマブ及び 2H7v16/40G5c の効果

（資料番号4.2.1.1-12）

In vivo における B 細胞傷害効果及び T 細胞の活性化誘導能を比較するため，モスネツズマブと2H7v16/40G5c をヒト CD20/CD3導入マウスの静脈内に投与した。投与3日前，投与2時間及び24時間後，投与2日後及び7日後に末梢血を採取した。また，投与24時間後，2日後及び7日後に脾臓及びリンパ節を採取した。これらの組織における B 細胞数及び T 細胞の活性化を FACS 法で測定した。その結果，B 細胞はモスネツズマブ及び2H7v16/40G5c，いずれの抗体を投与した場合でも，投与2日後から血液（図 2.6.2.2.2.5-1A）及び脾臓（図 2.6.2.2.2.5-1B）からほぼ消失し，標的組織の B 細胞を強力に枯渇させた。また，CD69の発現を指標とした T 細胞の活性化が24時間後に検出され，投与7日後までに CD69の発現は消失した（図 2.6.2.2.2.5-1C 及び図 2.6.2.2.2.5-1D）。これらの結果から，モスネツズマブ及び2H7v16/40G5c は *in vivo* において同等の B 細胞傷害効果及び T 細胞活性化誘導能を有することが示された。

図 2.6.2.2.2.5-1　ヒト CD20/CD3導入マウスにおけるモスネツズマブ及び2H7v16/40G5c の効果



（資料番号4.2.1.1-12）

2.6.2.2.2.6 カニクイザルにおけるモスネツズマブ及び2H7v16/40G5c の効果

カニクイザルに交差反応性を持つモスネツズマブ及び2H7v16/40G5c を用いて，B 細胞数及び T 細胞数の変動，T 細胞活性化，並びにサイトカイン産生を検討した。また，B 細胞枯渇のバイオマーカーである B 細胞活性化因子（BAFF）の血液中の経時的変動を評価した。

2.6.2.2.2.6.1 モスネツズマブの単回投与

（資料番号 4.2.1.1-13）

1) B 細胞枯渇効果

カニクイザルにモスネツズマブ 0.01, 0.1又は1 mg/kg を IV 投与又は1 mg/kg を SC 投与した。抗体の投与前，投与2時間後，1，2，3，8，15，22，29，36，43，50及び57日目に末梢血液の B 細胞数を測定した。その結果，モスネツズマブは投与2時間以内に末梢血液より B 細胞を枯渇させた（図 2.6.2.2.2.6.1-1A）。B 細胞の枯渇は，1 mg/kg 群では投与22日目まで持続し，投与57日目までに回復した。1 mg/kg を IV 投与した時と SC 投与した時の血中及びリンパ組織における B 細胞の減少は同程度であった。

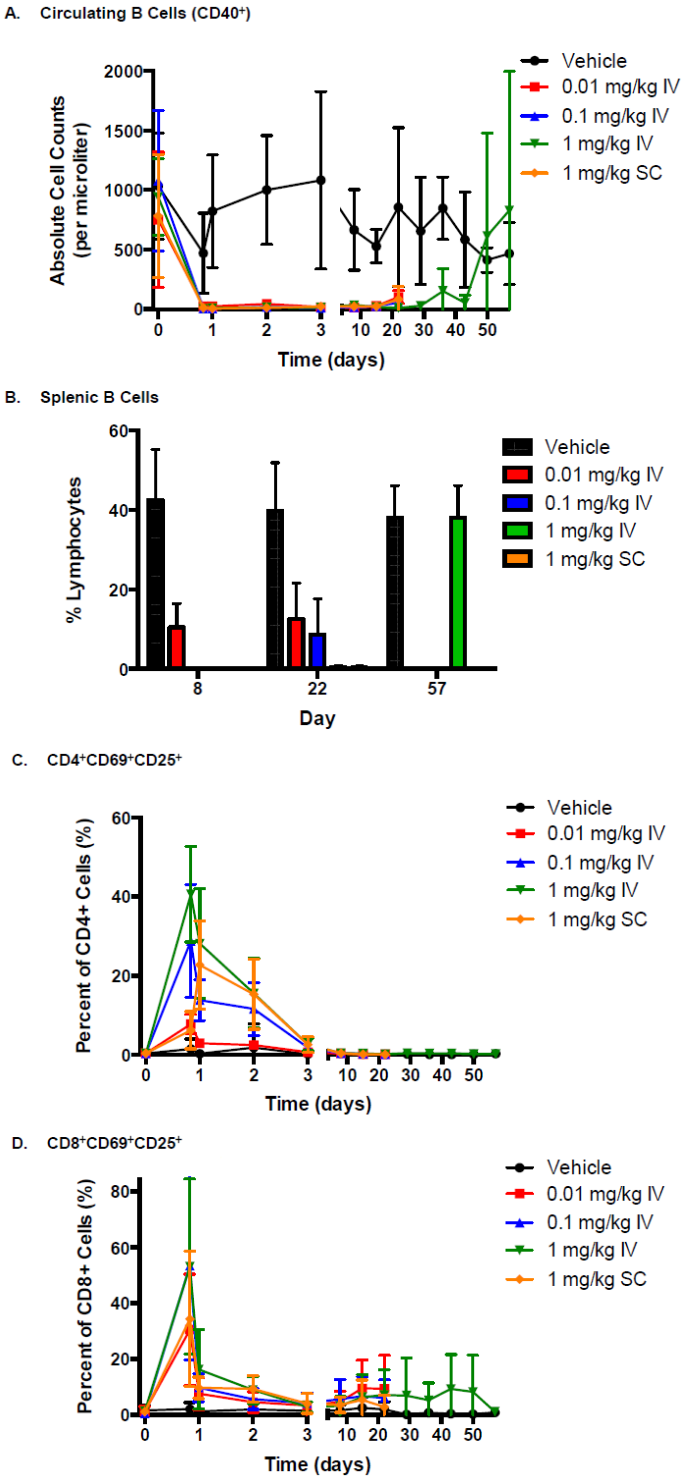
脾臓においてモスネツズマブは，すべての投与群で B 細胞の枯渇を用量依存的にもたらした。モスネツズマブは0.1 mg/kg 以上の用量では投与8日目までにほぼ完全に B 細胞を枯渇させた（図 2.6.2.2.2.6.1-1B）。

2) T 細胞の動態及び活性化

モスネツズマブを0.1 mg/kg 以上の用量で投与すると，投与2時間後の末梢血液ではヘルパー T 細胞，細胞傷害性 T 細胞，ナチュラルキラー細胞及び単球が一過性に減少し，投与3日目までにベースライン値近くまで回復した。リンパ組織では T 細胞数に有意な変化は認められなかった。

モスネツズマブの投与により，早期活性化マーカーCD69と後期活性化マーカーCD25を指標とする CD4陽性及び CD8陽性の T 細胞の一過性かつ用量依存的な活性化が認められた（図 2.6.2.2.2.6.1-1C 及び図 2.6.2.2.2.6.1-1D）。CD69のみを発現する CD4陽性及び CD8陽性 T 細胞でも同様の変動を示した。1 mg/kg のモスネツズマブの IV 投与群と SC 投与群を比較しても，活性化 T 細胞の変動は類似していた。SC 投与群では，IV 投与群と比較して細胞数及び活性化 T 細胞の割合（CD69陽性及び CD69 CD25共陽性の両細胞群）がわずかに低下していた。

図 2.6.2.2.2.6.1-1　カニクイザルにおけるモスネツズマブの薬理効果



IV=静脈内投与，SC=皮下投与。

A)　末梢血液の B 細胞の変動を蛍光活性化セルソーティング（FACS）法により評価した。

B)　抗体投与 8，22及び57日目の脾臓の B 細胞数を FACS 法により評価した。57日目では，溶媒及び IV 投与群（1 mg/kg）のみを評価した。

C)　活性化 CD4陽性 T 細胞の割合を CD69及び CD25の発現を指標として FACS 法により評価した。

D)　活性化 CD8陽性 T 細胞の割合を CD69及び CD25の発現を指標として FACS 法により評価した。

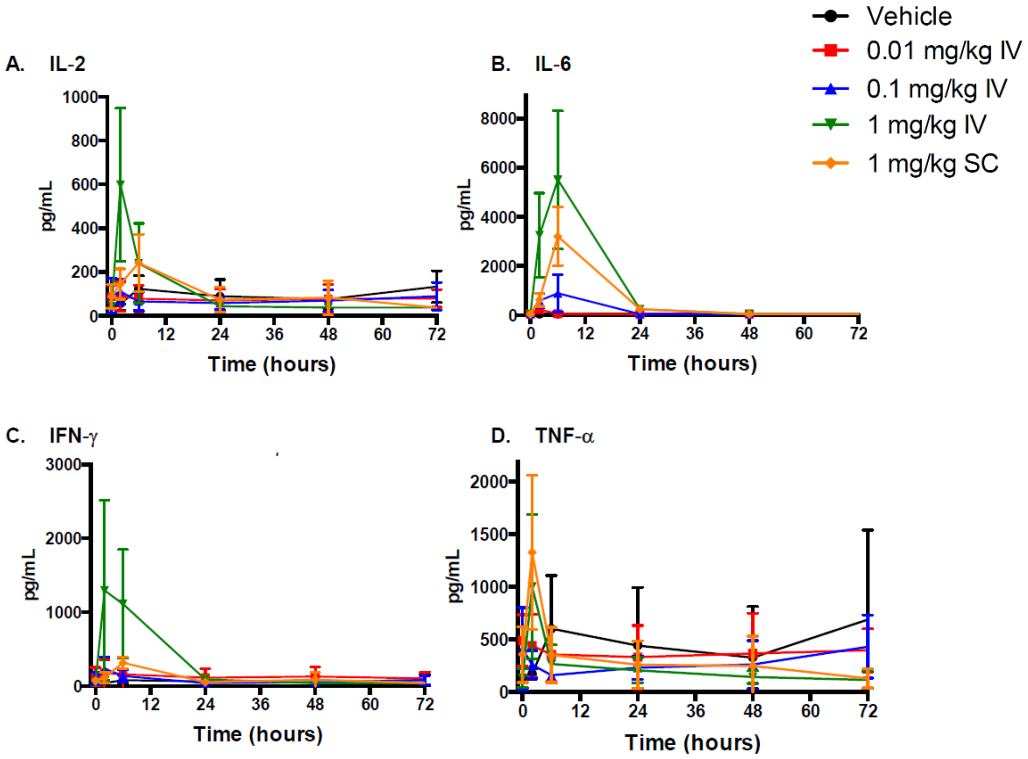
［資料番号4.2.1.1-13］

3)　サイトカイン産生

モスネツズマブの投与前，投与2, 6, 24, 48及び72時間後の血液中の IL，TNF 及び IFN について測定を行った。0.1 mg/kg 以上の用量でモスネツズマブを投与したとき，検討したすべてのサイトカイン及びケモカインに一過性かつ用量依存的な濃度上昇が認められた。サイトカイン IL-2、IL-6、IFN-γ 及び TNF-α の測定結果を図 2.6.2.2.2.6.1-2に示す。これらのサイトカインの濃度は，抗体の投与後速やかに上昇し，24時間以内にベースライン値まで低下した。

これらのサイトカインの変動は，モスネツズマブ投与後の最初の2~4時間に活性化 T 細胞が検出されたことと一致した。1 mg/kg の SC 投与におけるサイトカイン産生は，1 mg/kg IV 投与群と比較して低く，わずかに遅延した。

図 2.6.2.2.2.6.1-2　モスネツズマブによるサイトカイン産生誘導



IL = インターロイキン，IFN-γ = インターフェロ-γ，IV＝静脈内投与，SC＝皮下投与，TNF-α = 腫瘍壊死因子-α。

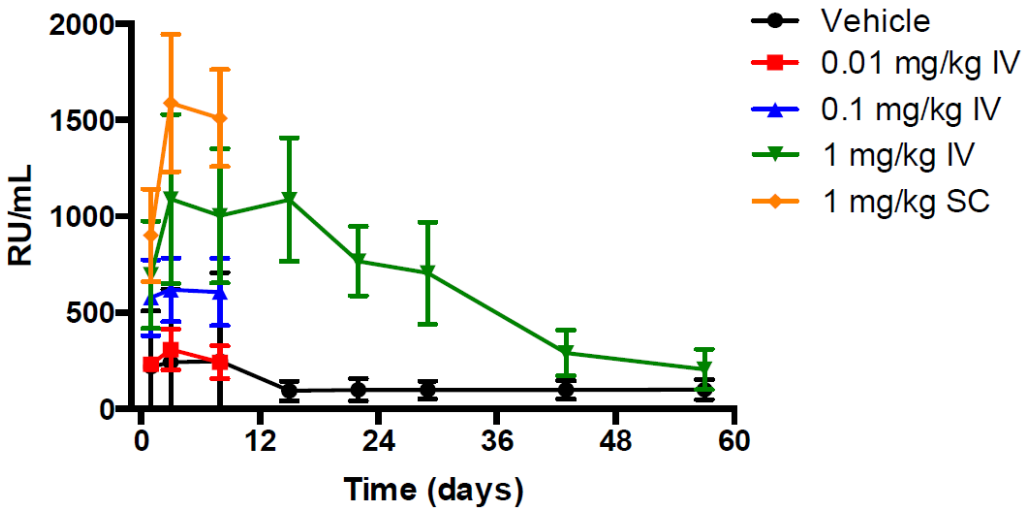
モスネツズマブを投与したカニクイザル末梢血液のサイトカイン濃度をルミネックス法により測定した。パネルはそれぞれ **A**）IL-2, **B**）IL-6, **C**）IFN-γ 及び **D)** TNF-α の測定結果（Mean ± SD）を示す。

［資料番号4.2.1.1-13］

4) BAFF 産生量の変動

BAFF は B 細胞が枯渇するとその産生は増加することが示されている[7)]。モスネツズマブの投与前，投与 2, 4, 8, 15, 22, 29, 43 及び 57 日目の末梢血液中の BAFF について測定を行った。その結果，BAFF はモスネツズマブの用量依存的に増加した。BAFF 濃度は，溶媒投与と比較して，0.01，0.1 及び 1 mg/kg の IV 投与並びに 1 mg/kg SC 投与で，最大でそれぞれ 1.6，3.3，6.3 及び 8.4 倍増加した（図 2.6.2.2.2.6.1-3）。BAFF の最大増加倍率は，0.01 及び 0.1 mg/kg IV 投与では 8 日目に，1 mg/kg IV 投与では 22 日目に認められた。

図 2.6.2.2.2.6.1-3　モスネツズマブ投与による BAFF 産生量の変動



BAFF = B細胞活性化因子，IV = 静脈内投与，SC = 皮下投与

0.01又は0.1 mg/kg IV投与群及び1 mg/kg SC投与群の血清BAFF濃度を8日目まで測定した。1 mg/kgのIV投与群では57日目まで測定を継続した。

［資料番号4.2.1.1-13］

2.6.2.2.2.6.2　モスネツズマブ又は2H7v16/40G5c の反復投与

1)　反復投与による薬理作用

（資料番号 4.2.1.1-17, -18, -19,-20 及び -21）

2H7v16/40G5c を週1回4週間投与した3つの反復投与試験で薬理作用を評価した。最初の用量設定試験（4.2.1.1-17）では，2H7v16/40G5c を0，0.01，0.1及び1 mg/kg の用量で IV 投与した。4.2.1.1-17 で認められた毒性を検討するために計画された残りの2試験では，2H7v16/40G5c を1 mg/kg の用量でのみ IV 又は SC 投与（4.2.1.1-18）又は IV 投与（4.2.1.1-19）により実施した。

さらに，サイトカイン関連の急性毒性を軽減し，長期投与をサポートするようデザインされた投与方法により，モスネツズマブを IV 投与する4週間及び26週間の反復投与試験を実施し，薬理効果を評価した（4.2.1.1-20及び4.2.1.1-21）。

4.2.1.1-20では、1日目（0.2 mg/kg）と2日目（0.8 mg/kg）に最初の1 mg/kg を分割して投与し，その後0.3, 1又は3 mg/kg を週1回，3週間投与した。この投与レジメンにより，サイトカイン関連の急性毒性を最小限に抑えながら，速やかな組織 B 細胞の枯渇及び抗薬物抗体の産生の軽減が達成された。26週間の試験では，1日目と2日目に同じ漸増用量を投与した後，0.1又は0.5 mg/kg のモスネツズマブを週1回投与した。

これらの試験で得られた薬理効果は単回投与試験の結果と同様であり，用量依存的かつ可逆的な B 細胞の枯渇，T 細胞の活性化及びサイトカイン産生などが示された。1 mg/kg を IV 投与した試験の結果はすべて同様であった。

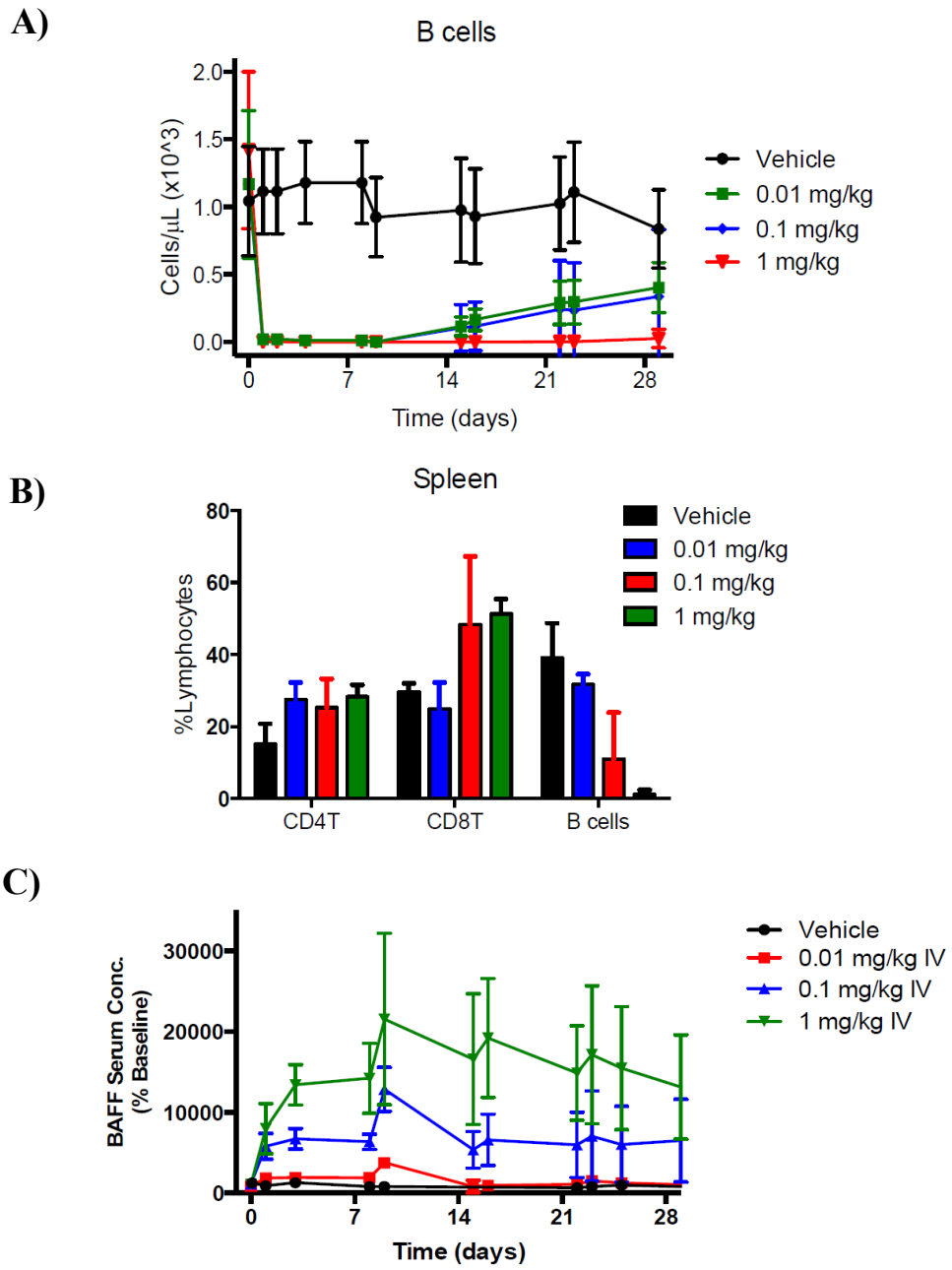
2)　B 細胞枯渇効果

（資料番号 4.2.1.1-17）

2H7v16/40G5c は投与後 2 時間以内に循環 B 細胞の急速な枯渇を誘導した（図 2.6.2.2.2.6.2-1A）。2H7v16/40G5c を 1 mg/kg で IV 又は SC 投与したカニクイザルにおいて，循環血中 B 細胞の枯渇が投与期間を通して維持され，最終投与後 6~8 週間まで維持された。この結果と一致して，FACS 法及び免疫組織化学染色法により，脾臓及びリンパ節を含むリンパ組織における B 細胞の枯渇が，すべての試験の投与終了時及び 7 週間の休薬期間後に認められた。0.01 及び 0.1 mg/kg を投与したカニクイザルの大部分では，抗体価の高い抗薬物抗体の発現及び薬物曝露量の減少により，2 週目終了時から B 細胞の回復が認められた（2.6.6）。しかし，抗薬物抗体が発現しなかった 1 例（0.1 mg/kg 群）では，投与後 29 日目においても明らかな血液及び脾臓の B 細胞枯渇が観察された（図 2.6.2.2.2.6.2-1A 及び 1B）。これらのことから，2H7v16/40G5c は 0.1 mg/kg を週 1 回投与することにより，B 細胞の枯渇を誘発し，維持できることが示された。

また，2H7v16/40G5c は用量依存的に BAFF を増加させた（図 2.6.2.2.2.6.2-1C）。0.01，0.1 及び 1 mg/kg の用量では 2H7v16/40G5c は，投与前と比較して BAFF 濃度が最大でそれぞれ 4.3，11.1 及び 20.2 倍に増加した。

図 2.6.2.2.2.6.2-1　2H7v16/40G5c による B 細胞の動態及び BAFF 濃度



IV＝ 静脈内投与

A) 末梢血液を，抗体の投与前2週間，1日目（投与当日の投与前及び投与後2時間），2日目（投与後24時間），4日目，8日目，9日目，15日目，16日目，22日目，23日目及び29日目に採取し，経時的な B 細胞数の変動を蛍光活性化セルソーティング法で測定した。

B) 各投与群の29日目の脾臓におけるリンパ球サブセットの割合。

C) 各投与群の経時的な血中 B 細胞活性化因子（BAFF）濃度

（資料番号4.2.1.1-17）

2) B 細胞枯渇効果（続き）

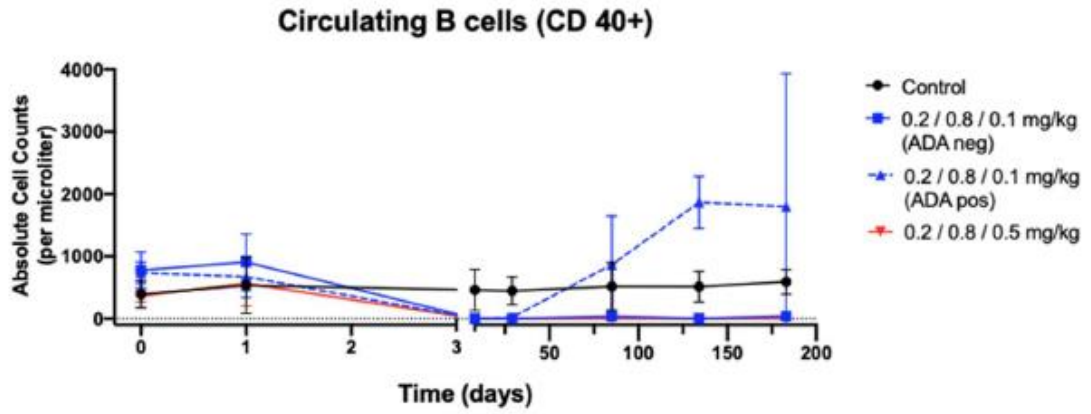
（資料番号4.2.1.1-20及び-21）

抗薬物抗体（ADA）の発現を軽減するための投与法を評価するための4週間試験の投与試験を実施した。最初の1 mg/kg の用量を，1日目（0.2 mg/kg）及び2日目（0.8 mg/kg）に分割してモスネツズマブを IV 投与した後，0.3，1又は3 mg/kg の用量で週1回3週間投与した（4.2.1.1-20）。この投与方法により，初回投与に伴うサイトカイン関連の急性毒性を最小限に抑制し，B 細胞の急速な枯渇及び ADA の軽減が可能となった。

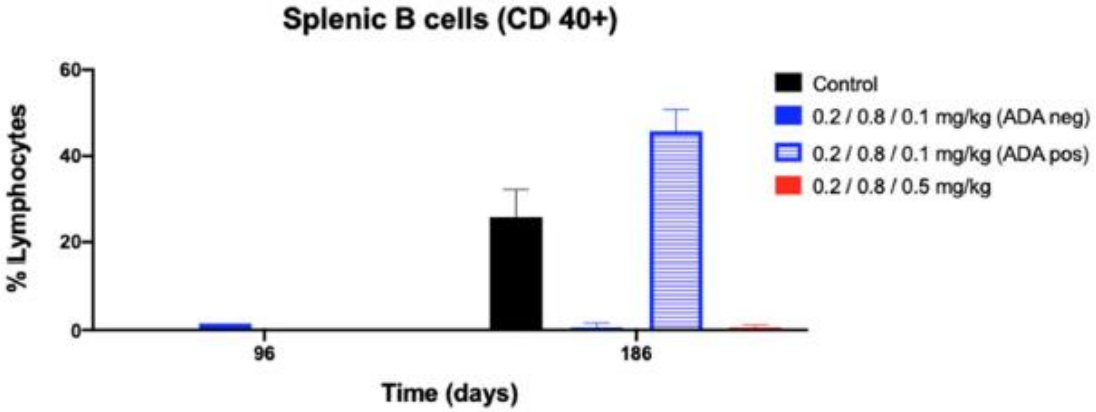
26週間の試験では，1日目及び2日目に同じ漸増用量を投与後，週1回0.1又は0.5 mg/kg のモスネツズマブを投与した。その結果，末梢血及びリンパ組織の両方で急速かつ持続的な B 細胞枯渇が誘発された。強い ADA の発現が認められた0.1 mg/kg 群の3例を除き，0.1 mg/kg 投与群の7例中残りの4例及び0.5 mg/kg 投与群の7例全例が生存し，6ヵ月間の投与期間を通して B 細胞の枯渇が維持された（図 2.6.2.2.2.6.2-2A 及び B）。また，モスネツズマブ投与後に BAFF の増加が認められ，B 細胞が枯渇した個体において BAFF の血中濃度は高いままであった。一方，B 細胞枯渇効果が消失した個体では，BAFF 濃度はベースラインまで低下した（図 2.6.2.2.2.6.2-2C）。

図 2.6.2.2.2.6.2-2 抗薬物抗体とモスネツズマブの薬理効果

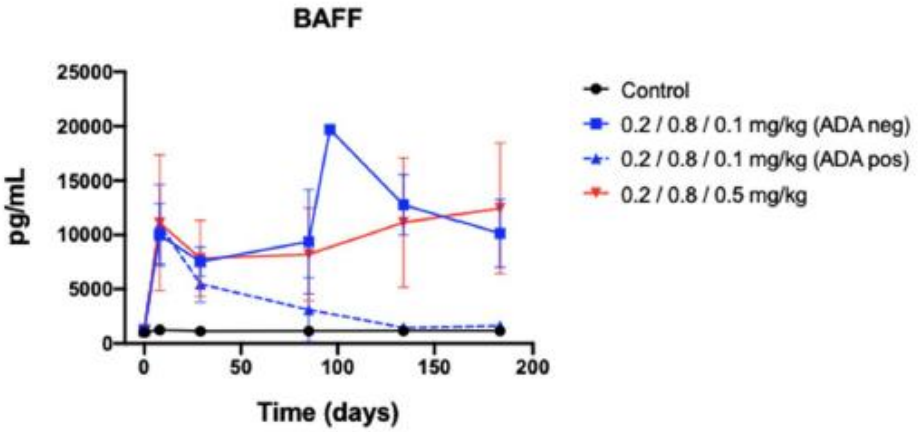
A.



B.



C.



ADA = 抗薬物抗体，BAFF = B 細胞活性化因子

抗体の投与用量を，1日目（投与当日）/2日目/以降の各週の追加投与の用量として，各パネル右側に示した。0.2/0.8/0.1 mg/kg 投与群では，青色の破線（ADA pos）は，ADA の発現が認められ，モスネツズマブの十分な曝露量を維持しなかった個体を示す。青実線（ADA neg）は，ADA 陰性又は ADA が低力価であった個体であり，モスネツズマブが十分な曝露量を維持した個体を示す。高力価の ADA を発現した個体では，B 細胞枯渇効果は消失し，BAFF 濃度がベースライン値に戻った。

（資料番号4.2.1.1-21）

3)　T 細胞の活性化及び増殖

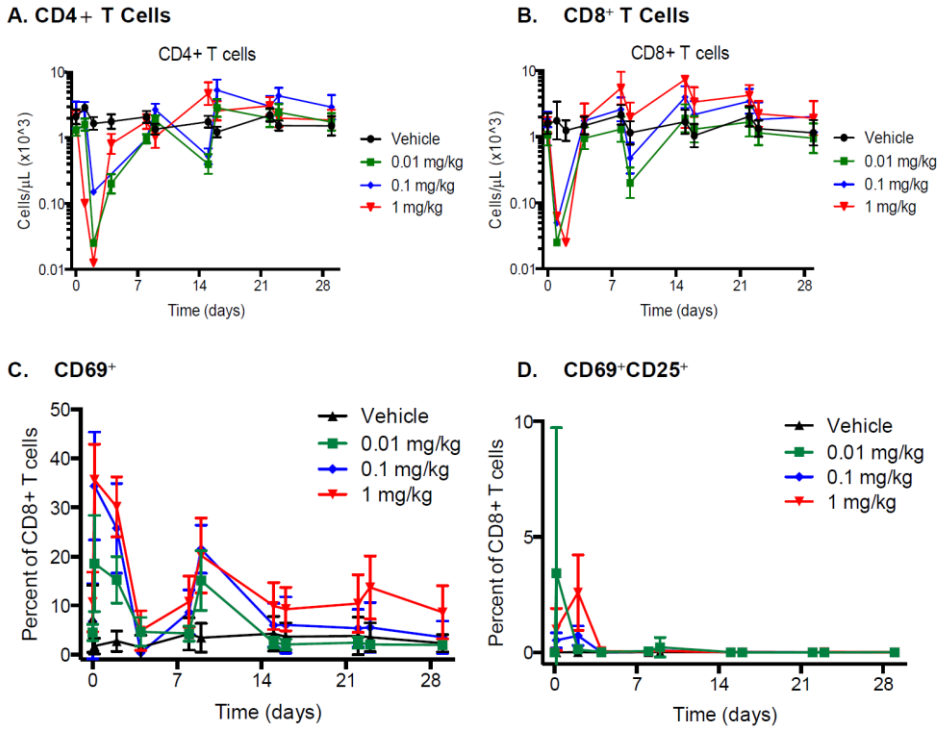
（資料番号 4.2.1.1-17）

末梢血 T 細胞は 2H7v16/40G5c の投与 2 日以内に顕著に減少し，初回投与から 8 日目（2 回目の投与の前）にベースライン値又はそれを上回る値に回復した（図 2.6.2.2.2.6.2-3A 及び図 2.6.2.2.2.6.2-3B）。これらの変化は，活性化による T 細胞の遊走，再分布及び増殖によるものであると考えられた。2 回目の投与後にも T 細胞の減少とそれに続く増殖も軽度に認められたが，それ以降の投与では認められなかった。

2H7v16/40G5c 1 mg/kg 投与群では初回投与後 2 時間以内に CD69 CD25 共陽性となる活性化 T 細胞の出現が認められた。CD69 単独陽性又は CD69 CD25 共陽性の活性化 T 細胞の割合は用量依存的に増加し，4 日目までにベースライン値に戻った。試験期間を通して CD8 陽性 T 細胞において CD69 発現が認められ，その割合は初回投与後に最も高かった（図 2.6.2.2.2.6.2-3C）。CD8 陽性 T 細胞上の CD69 CD25 共発現が初回投与後に認められたが，それ以降の投与では認められなかった（図 2.6.2.2.2.6.2-3D）。

4.2.1.1-20 及び 4.2.1.1-21 では，モスネツズマブでも同様の結果が認められた。

図 2.6.2.2.2.6.2-3　2H7v16/40G5c の T 細胞に対する薬理効果



抗体の投与前，投与後2時間, 2, 4, 8, 9, 15, 16, 22, 23 及び29日目の各投与群における末梢血液中の T 細胞を蛍光活性化セルソーティング法で測定した。

A）CD4陽性 T 細胞数

B）CD8陽性 T 細胞数

C）CD8陽性 T 細胞における早期活性化マーカーCD69発現細胞の割合

D）CD8陽性 T 細胞における活性化マーカーCD69 CD25共発現細胞の割合

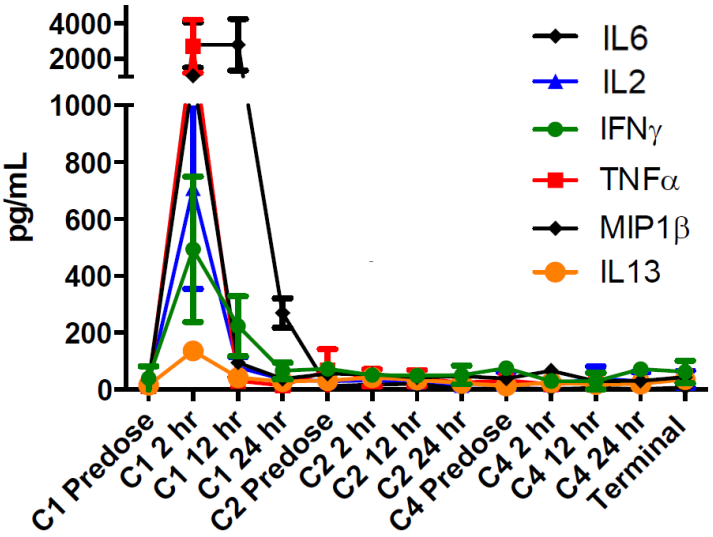
（資料番号 4.2.1.1-17）

4)　サイトカイン産生

（資料番号 4.2.1.1-19）

2H7v16/40G5c（1 mg/kg）を IV に週1回，4週間に渡るサイクル（C）で投与（初回投与を1日目 C1として，8日目 C2，15日目 C3 及び22日目 C4 に追加投与）した。2H7v16/40G5c 初回投与後に一過性かつ用量依存的なサイトカイン及びケモカインの産生が認められた（図 2.6.2.2.2.6.2-4）。これらの産生量は，投与2時間後に最高値を示し，投与24時間後までに投与前の値まで回復した。サイトカイン及びケモカインの産生の増加は初回投与でのみ認められた（図 2.6.2.2.2.6.2-4）。

図 2.6.2.2.2.6.2-4　IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α, MIP1β 及び IL-13の産生



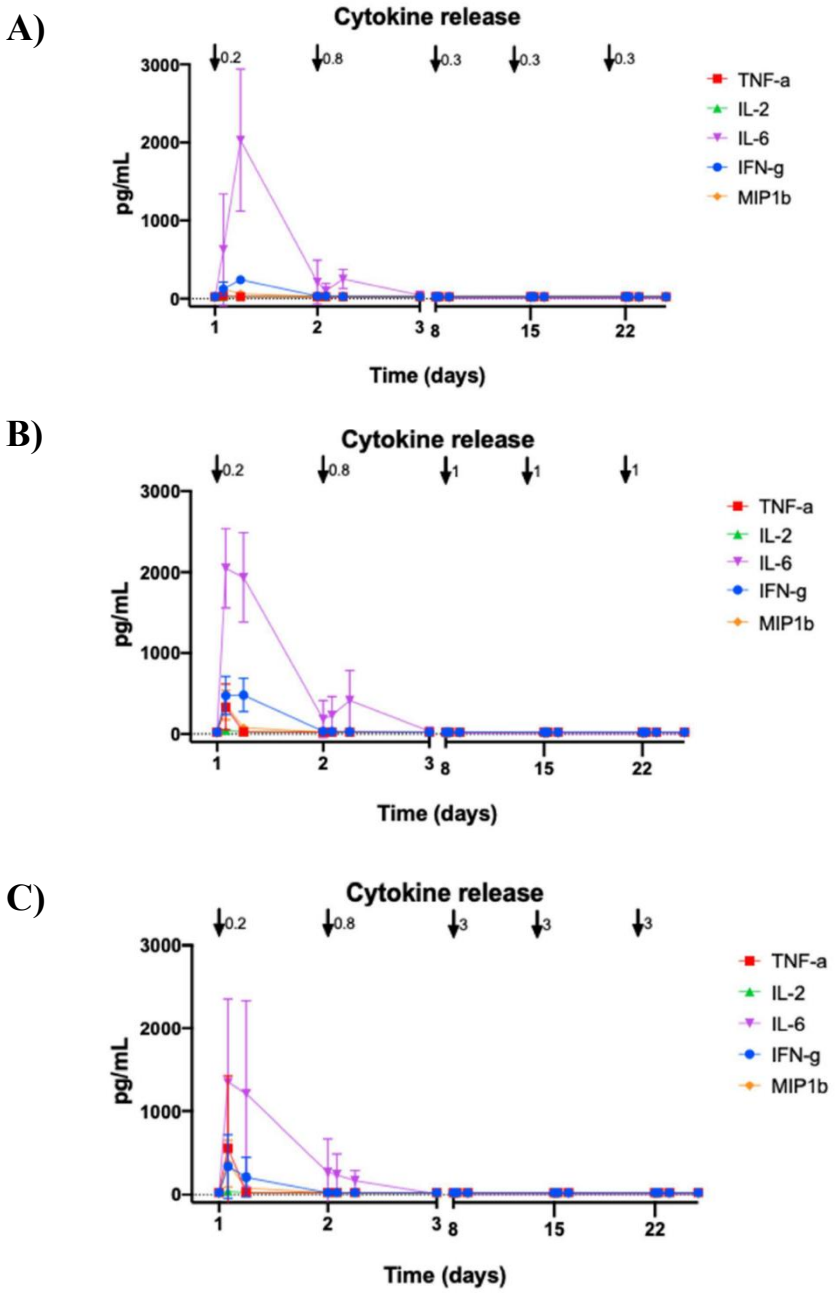
C＝ 投与サイクル，IFN-γ＝ インターフェロン-γ，IL＝ インターロイキン，MIP＝ マクロファージ炎症性蛋白，TNF-α＝ 腫瘍壊死因子-α
ルミネックス法を用いて対象分子の濃度を測定した。

（資料番号 4.2.1.1-19）

（資料番号4.2.1.1-20及び4.2.1.1-21）

モスネツズマブの漸増投与では，循環血中のサイトカインの一過性の増加が主に初回投与後（0.2 mg/kg）に認められ，2~6時間後にピークに達し，概ね投与後24時間でベースラインに戻った。初回投与から2日目の2回目投与（0.8 mg/kg）後又はそれ以降の週1回投与では，用量にかかわらず，サイトカイン産生は軽微であるか，もしくは変化が認められなかった（図 2.6.2.2.2.6.2-5）。

図 2.6.2.2.2.6.2-5　モスネツズマブの漸増投与によるサイトカイン産生



IFN = インターフェロン，IL = インターロイキン，MIP = マクロファージ炎症性タンパク質，TNF = 腫瘍壊死因子。

漸増した投与用量によるサイトカイン産生の経時変化。投与日及び投与用量を各パネルの黒矢印と数字（mg/kg）で示した。1日目：初回投与（0.2 mg/kg），2日目：投与2回目（0.8 mg/kg），以降，追加投与を1週毎（8日目，15日目及び22日目）に **A)** 0.3 mg/kg, **B)** 1 mg/kg 及び **C)** 3 mg/kg の用量で行った。採血を以下の日程で実施し，血液中のサイトカイン量を測定した。1日目：投与前，2時間後及び6時間後，2日目：投与前及び6時間後，8日目，15日目及び22日目：投与前，2時間後及び6時間後。

（資料番号4.2.1.1-20）

2.6.2.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

心血管系（心拍数，心電図［ECG］，血圧，中心体温），呼吸系（呼吸数及びパルスオキシメトリ）及び神経学的評価項目を含むモスネツズマブの安全性薬理評価を，カニクイザルを用いた GLP 適用単回投与毒性試験に組み入れた（4.2.3.1-3）。更に，モスネツズマブの4週間漸増反復投与試験（4.2.3.2-4）において血圧及び心拍数を評価し，モスネツズマブの26週間試験（4.2.3.2-5）並びに2H7v16/40G5c を用いた試験（4.2.3.2-1，4.2.3.2-2，4.2.3.2-3）において神経学的評価を実施し，2H7v16/40G5c を用いた試験（4.2.3.2-1）において呼吸数及びパルスオキシメトリーを実施した。試験デザイン及び結果については，2.6.2.2.2.6項及び2.6.6「毒性試験の概要文」の2.6.6.2項及び2.6.6.3項を参照のこと。

2.6.2.4.1 心血管系

モスネツズマブを用いて実施した GLP 適用単回投与試験（4.2.3.1-3）では，4群のカニクイザルにモスネツズマブを0.01，0.1又は1 mg/kg の用量で1時間かけて IV 投与又は1 mg/kg の用量で SC 投与した。別の群の動物には溶媒対照を IV 及び SC 投与した。心血管系の評価では，動物（1群雌雄各2匹）にテレメトリー機器を外科的に埋め込み，投与前から投与3週間後（試験デザインについては2.6.6項「毒性試験の概要文」を参照のこと）まで評価した。0.1 mg/kg（IV 投与）及び1 mg/kg（IV 投与又は SC 投与）では Day 1に心拍数及び体温の上昇が認められ，対照群及び試験前の値と比較して日中のパターンの減弱が認められた。Day 1に1 mg/kg の用量で IV 投与した動物の血圧は低下し，収縮期血圧及び拡張期血圧は試験前の値と比較してそれぞれ11-18 mmHg 及び22-25 mmHg 低下した。これらの用量での心拍数増加（RR 間隔短縮）は，1 mg/kg を IV 又は SC 投与した動物で PR 間隔及び QT 間隔の短縮と関連していたが，QTc への影響は認められなかったことから，これらの変化は完全に心拍数依存的であり，心室再分極への影響を示すものではないと考えられた。評価した ECG はカニクイザルで定性的に正常と判断された。心電図，血行動態パラメータ及び体温の変化はいずれも投与7日目までに完全に回復した。これらの所見は，モスネツズマブによるサイトカイン放出及び関連する急性期蛋白反応に続発したものと考えられた。本試験のデータに基づき，モスネツズマブを単回 IV 投与したときの心血管系に対する無影響量（NOEL）は0.01 mg/kg,無毒性量（NOAEL）は0.1 mg/kg と判断した。SC 投与後の NOAEL は1 mg/kg であった。

モスネツズマブの4週間漸増反復投与試験（4.2.3.2-4）では，3群の動物（各群雌雄各2例）に，初回用量として1 mg/kg を Day 1（0.2 mg/kg）と Day 2（0.8 mg/kg）に分けて1時間かけて IV 投与し，その後0.3，1又は3 mg/kg を週1回，3週間投与した。別の3匹の群には溶媒対照を投与した。血圧及び心拍数は，外科的に埋め込んだ動脈圧プローブ及びジャケット外部テレメトリー（JET）システムを用いて動物で評価した。全身血圧に明らかな薬剤に関連した変化は認められなかった。モスネツズマブ投与群の全例で，Day 1及び Day 2に心拍数の増加が認められ，最も顕著であったのは暗期であった。この所見は，モスネツズマブによるサイトカイン放出に起因するものであった。その後の週では，8日目に1 mg/kg 群の雌及び3 mg/kg 群の雄で暗期に軽度の心拍数増加が認められたが，22日目には認められなかった。

2.6.2.4.2 中枢神経系

モスネツズマブ及び2H7v16/40G5c の単回投与及び反復投与毒性試験の一部として，無麻酔動物を用いて，カニクイザルで妥当性が確認されている標準的な神経学的検査パネルを実施した。このパネルには，動物の一般状態及び行動，精神状態，姿勢，歩行，頭部及び眼の向きと動き，筋緊張並びに反射を含めた。

生存中の神経学的異常は，モスネツズマブの4週間漸増反復投与試験（4.2.3.2-4）の動物1例に認められた痙攣のみであった。この動物は Day 1に0.2 mg/kg，Day 2に0.8 mg/kg，Day 8に1 mg/kg を投与され，Day 11に痙攣が認められたため安楽死させた。この動物の中枢神経系の病理組織学的所見は，Day 25の計画剖検時に残りの動物の中枢神経系で認められた所見よりも広範囲であったことから，痙攣の原因と考えられた（2.6.6項「毒性試験の概要文」の2.6.6.3項を参照のこと）。2H7v16/40G5c を用いた試験（4.2.3.2-1，4.2.3.2-2，4.2.3.2-3）の神経学的評価では，毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

モスネツズマブを単回 IV 投与又は SC 投与したときの神経系所見に関する NOEL は，検討した最高用量である1 mg/kg であった（4.2.3.1-3）。モスネツズマブを IV 投与したときの NOEL は，1日目に0.2 mg/kg,2日目に0.8 mg/kg,その後0.5 mg/kg を週1回25週間投与したときと推定された（4.2.3.2-5）。

2.6.2.4.3 呼吸系

呼吸数及びパルスオキシメトリーを，カニクイザルを用いたモスネツズマブの GLP 単回投与試験（4.2.3.1-3）及び2H7v16/40G5c の4週間用量設定試験（4.2.3.2-1）で評価した。モスネツズマブ又は2H7v16/40G5c に関連した影響は認められなかった。したがって，モスネツズマブを単回 IV 投与又は SC 投与したときの呼吸器系に対する NOEL は，検討した最高用量である1 mg/kg と判断された（4.2.3.1-3）。2H7v16/40G5c を反復 IV 投与したときの NOEL は1 mg/kg であった（4.2.3.2-1）。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

In vitro 及び *in vivo* の非臨床薬理試験の結果から，モスネツズマブ及び2H7v16/40G5c は T 細胞を動員し活性化することで，用量依存的な B 細胞傷害効果を示した。モスネツズマブ及び2H7v16/40G5c による B 細胞の傷害は，標的細胞の CD20の発現及びエフェクターT 細胞の存在に依存していた。モスネツズマブ及び2H7v16/40G5c は，リツキシマブ非感受性の低 CD20発現を有する B リンパ腫細胞株を強力に傷害した。また，モスネツズマブの機能同等抗体である2H7v16/40G5c は，リツキシマブ-DANA 又はデキサメタゾンの存在下においても B 細胞傷害効果を示した。

In vivo のカニクイザルを用いた試験において，モスネツズマブ及び2H7v16/40G5c の投与により，T 細胞活性化，サイトカイン産生及び活性化後の T 細胞の減少，増殖及び再分布が示された。これらの薬理作用は，主に初回投与によりもたらされると考えられ，標的細胞である B 細胞が枯渇した後の投与では認められなかった。

外科的にテレメトリー機器を埋め込んだカニクイザルを用いてモスネツズマブの心血管系安全性薬理を評価したところ，1 mg/kg の IV 投与で用量依存的かつ可逆的な低血圧，0.1 mg/kg 以上の IV 投与及び1 mg/kg の SC 投与で心拍数及び体温の上昇が認められた。これらの変化はサイトカイン放出及び急性期蛋白反応に起因するものであった。1 mg/kg の初回 IV 投与を Day 1に0.2 mg/kg, Day 8に0.8 mg/kg に分割するか，1 mg/kg を SC 投与すると，低血圧が軽減されると考えられた。心拍数に関連した変化を除いて，心電図の量的又は質的な変化は認められなかった。呼吸機能評価では，薬剤に関連した変化は認められなかった。

いずれの試験においても，生存中の神経学的異常は，4週間の漸増投与試験（4.2.3.2-4）において，Day 1，Day 2及び Day 8にそれぞれ0.2，0.8及び1 mg/kg のモスネツズマブを IV 投与した後の Day 11に1例で認められた痙攣のみであった。この動物の中枢神経系の病理組織学的所見は，Day 25の計画剖検時に残りの動物の中枢神経系で認められた所見よりも広範囲であり，痙攣の原因と考えられた。この動物の C_{max} 及び AUC の値は，主要な臨床試験である GO29781試験において同程度の期間（投与開始から2週間：1日目に1 mg，8日目に2 mg）にわたって患者にモスネツズマブを投与したときの値と比較して，それぞれ約50倍及び20倍高かった。いずれの毒性試験においても，長期投与後においてもその他の神経学的異常は認められなかった。

以上，モスネツズマブの薬効薬理に関する特性は，B 細胞に起因する濾胞性リンパ腫の新規治療薬としてのモスネツズマブの薬理学的な有効性を支持するものであった。

2.6.2.7 図表

図表は本文内に挿入した。

2.6.2.8 参考文献

1) Atwell S, Ridgway JBB, Wells JA, et al. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. J Mol Biol 1997;270:26–35.
2) Spiess C, Merchant M, Huang A, et al. Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies. Nat Biotechnol 2013;31(8):753–8.
3) Klein C, Lammens A, Schäfer W, et al. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. MAbs 2013;5(1):22–33.
4) Kobayashi H, Matsunaga Y, Uchiyama Y, et al. Novel humanized anti-CD20 antibody BM-ca binds to a unique epitope and exerts stronger cellular activity than others. Cancer Med. 2013;2(2):130–43.
5) de la Hera A, Müller U, Olsson C, et al. Structure of the T cell antigen receptor (TCR): two CD3 □ subunits in a functional TCR/CD3 complex. J Exp Med 1991;173(1):7−17.
6) Gong Q, Ou Q, Ye S, et al. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. J Immunol 2005;174(2):817–26.
7) Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, et al. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. Ann Rheum Dis 2007;66(5):700–3.

目次

2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.3.2.1 *In vitro* 試験 7
2.6.3.2.2 *In vivo* 試験 10
2.6.3.3 副次的薬理試験 24
2.6.3.4 安全性薬理試験 25
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 28

略語一覧

略語	英名	和名
ADA	anti–drug antibody	抗薬物抗体
BAFF	B-cell activating factor	B 細胞活性化因子
ECG	electrocardiogram	心電図
E. coli	*Escherichia coli*	大腸菌
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
IFN	interferon	インターフェロン
IL	interleukin	インターロイキン
IV	intravenous	静脈内
MCP	monocyte chemoattractant protein	単球走化性蛋白質
MRI	magnetic resonance imaging	磁気共鳴画像法
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	no observed effect level	無影響量
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核球細胞
PD	pharmacodynamic	薬力学
SC	subcutaneous	皮下
TK	toxicokinetic	トキシコキネティクス
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表

Type of Study	Test System	Administration	Testing Facility	CTD No. Study No.
Primary Pharmacodynamics (*in vitro*)				
Binding	*in vitro*	—	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-1 [redacted]-3525
Binding and potency	*in vitro*	—	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-2 [redacted]-0394
Comparability of binding activity	*in vitro*	—	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-3 [redacted]-2037
Binding	*in vitro*	—	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-4 [redacted]-3202
Potency and characterization	*in vitro*	—	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-5 [redacted]-0391
Comparison of anti-CD20/CD3 TDB antibody (2H7v16/40G5c) to rituximab	*in vitro*	—	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-6 [redacted]-0396
Comparison of anti-CD20/CD3 TDB antibody (2H7v16/40G5c) to dexamethasone	*in vitro*	—	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-7 [redacted]-0397

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表（続き）

Type of Study	Test System	Administration	Testing Facility	CTD No. Study No.
Primary Pharmacodynamics (*in vivo*)				
Single-dose efficacy	Double-Transgenic Mice	IV	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-8 [redacted]-0404
Dose titration	Double-Transgenic Mice	IV	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-9 [redacted]-0404B
Single-dose efficacy	Double-Transgenic Mice	IV	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-10 [redacted]-0404M
Repeat-dose efficacy	Humanized NSG Mice	IV	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-11 [redacted]-0404K
PK/PD	Double-Transgenic Mice	IV	Genentech (South San Francisco, CA)	4.2.1.1-12 [redacted]-2919
Toxicity/TK/PD	Cynomolgus Monkeys	IV, SC	[redacted]	4.2.1.1-13 [a] [redacted]-1246
PK/PD	Cynomolgus Monkeys	IV	[redacted]	4.2.1.1-14 [redacted]-2298
Toxicity/TK/PD	Cynomolgus Monkeys	IV	[redacted]	4.2.1.1-15 [redacted]-1514
Toxicity/TK/PD	Cynomolgus Monkeys	IV	[redacted]	4.2.1.1-16 [redacted]-2135
Toxicity/TK/PD	Cynomolgus Monkeys	IV	[redacted]	4.2.1.1-17 / 4.2.3.2-1 [redacted]-3160

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表（続き）

Type of Study	Test System	Administration	Testing Facility	CTD No. Study No.
Toxicity/TK/PD	Cynomolgus Monkeys	IV, SC	[redacted]	4.2.1.1-18 / 4.2.3.2-2 [redacted]-1689
Toxicity/TK/PD	Cynomolgus Monkeys	IV	[redacted]	4.2.1.1-19 / 4.2.3.2-3 [redacted]-2134
Toxicity/TK/PD	Cynomolgus Monkeys	IV	[redacted]	4.2.1.1-20 [redacted]-2088
Toxicity/TK/PD	Cynomolgus Monkeys	IV	[redacted]	4.2.1.1-21 [a] [redacted]-1815
Safety Pharmacology [b]				
	Cynomolgus Monkeys	IV, SC	[redacted]	4.2.1.1-13 / 4.2.3.1-3 [a] [redacted]-1246
	Cynomolgus Monkeys	IV	[redacted]	4.2.1.1-20 / 4.2.3.2-4 [redacted]-2088
	Cynomolgus Monkeys	IV	[redacted]	4.2.1.1-21 / 4.2.3.2-5 [a] [redacted]-1815

GLP = Good Laboratory Practice, IV = intravenous, SC = subcutaneous.

Note: 2H7v16/40G5c is functionally equivalent to mosunetuzumab and has the same amino acid sequence as mosunetuzumab but without the N297G substitution in the Fc region.

[a] Good Laboratory Practice (GLP) study.

[b] No dedicated safety pharmacology studies were conducted with mosunetuzumab. Instead, per ICH Guideline S6(R1): Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals (2011), safety pharmacology (cardiovascular, respiratory, neurologic) assessments were integrated into the general toxicity studies. Cardiovascular assessment was incorporated in the single-dose GLP toxicity study in cynomolgus monkeys (Study [redacted]-1246) and the 4-week step-up dosing repeat dose study (Study [redacted]-2088); the respiratory system assessment was incorporated in Studies [redacted]-1246 and [redacted]-3160; the central nervous system assessment was incorporated in Studies [redacted]-1246, the 26-week study (Study [redacted]-1815),

[redacted]-3160, [redacted]-1689, and [redacted]-2134.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 *In vitro* 試験

表 2.6.3.2.1-1 効力を裏付ける試験（*In vitro*）

Test Article: Mosunetuzumab, 2H7v16/40G5c, 2H7v16/UCHT1v9

Type of Study	Test System	Test Method	Key Results	Study No.
In vitro binding	Mosunetuzumab binding to human CD20 and CD3	Scatchard assay using human BJAB and Jurkat cells	The average measured binding affinity was 68 nmol/L for CD20 and 40 nmol/L for CD3.	■-3525
In vitro binding and potency	Anti-CD3 antibody clone 40G5c to human and cynomolgus monkey CD3εγ antigens	Biacore assay	The average binding affinity to human CD3εγ antigens was 12.0 nmol/L. The average binding affinity to cynomolgus monkey CD3εγ antigens was 14.2 nmol/L. 2H7v16/40G5c demonstrated comparable *in vitro* potency in human and cynomolgus monkey PBMCs with EC90 values for B-cell killing ranging from 0.07 to 1.1 nmol/L for human and 0.026 to 0.074 nmol/L for cynomolgus monkey, respectively.	■-0394
Comparability of binding activity of mosunetuzumab v0.1-derived drug product and mosunetuzumab v0.2-derived drug product	Binding activity of mosunetuzumab v0.1-derived drug product and mosunetuzumab v0.2-derived drug product to human and cynomolgus monkey T and B cells	Flow cytometry using PBMCs from human and cynomolgus monkey	The mosunetuzumab v0.1-derived drug product and mosunetuzumab v0.2-derived drug product demonstrated comparable binding activity to both CD20 on B cells and CD3ε on T cells in human and cynomolgus monkey.	■-2037
In vitro binding	Mosunetuzumab with human Fc gamma receptors	ELISA-based ligand binding assays	Mosunetuzumab shows minimal binding to each Fc gamma receptor tested.	■-3202

表 2.6.3.2.1-1 効力を裏付ける試験（*In vitro*）（続き）

Type of Study	Test System	Test Method	Key Results	Study No.
In vitro potency and characterization	B-cell line BJAB	Normal human donor PBMCs in presence of 2H7v16/UCHT1v9 and a F(ab')2 fragment of 2H7v16/UCHT1v9 lacking the Fc region	The fragment was found on a molar basis to be equipotent to intact TDB antibody suggesting anti-CD20/CD3 TDB-induced B-cell killing is not dependent on Fc expression or Fc receptor-mediated effector functions. Depletion of CD3-expressing cells from PBMCs abolished the activity of 2H7v16/UCHT1v9, indicating that T cells are required for activity, and T-cell activation by 2H7v16/UCHT1v9 antibody was strictly dependent on the presence of $CD20^+$ target cells.	■-0391
In vitro potency	B-lymphoma cell lines with various levels of surface CD20 expression	Dose-response assays	50% effective concentration (EC50) values ranged from 0.22 to 11 ng/mL. 2H7v16/UCHT1v9 had no activity against cells that do not express CD20, but was potent in killing CD20 low-expressing B-lymphoma cells that were insensitive to rituximab treatment. EC50 values and the extent of cell killing from 30 healthy donors were summarized demonstrating a mean EC50 for killing of less than 3 ng/mL after 24 hours in culture. 2H7v16/UCHT1v9 activated $CD8^+$ T cells from patients with CLL and induced B-cell killing.	■-0391

表 2.6.3.2.1-1 効力を裏付ける試験（*In vitro*）（続き）

Type of Study	Test System	Test Method	Key Results	Study No.
B-cell killing and $CD8^+$ T-cell activation	Cynomolgus monkey PBMCs	*In vitro* assays	Only 2H7v16/40G5c was able to activate $CD8^+$ T cells and kill cynomolgus monkey B cells, while 2H7v16/UCHT1v9 was inactive with cynomolgus monkey PBMCs. 2H7v16/40G5c and 2H7v16/UCHT1v9 had comparable *in vitro* potency in B-cell killing and induced a similar extent of B-cell killing. 2H7v16/40G5c appeared to have lower potency in $CD8^+$ T-cell activation and resulted in a lower extent of $CD8^+$ T-cell activation than 2H7v16/UCHT1v9. 2H7v16/40G5c and 2H7v16/UCHT1v9 demonstrated comparable B-cell killing potency with human and cynomolgus monkey PBMCs, with EC90 values of 0.07-1.1 nmol/L for human, and 0.026-0.074 nmol/L for cynomolgus monkey.	[redacted]-0394
B-cell killing, T-cell activation, cytokine production	Human PBMCs	*In vitro* assays	Mosunetuzumab and 2H7v16/40G5c demonstrated comparable target antigen binding affinity. No apparent difference was observed in their potency in B-cell killing, $CD8^+$ T-cell activation, and cytokine production of IL-2, IL-6, IFN-γ, and TNF-α.	[redacted]-3525
Comparison of anti-CD20/CD3 TDB antibody (2H7v16/40G5c) to rituximab for the treatment of B-cell malignancies in the clinic	Human PBMCs	*In vitro* assays	2H7v16/40G5c was active in B-cell killing in the presence of high concentrations of rituximab-DANA, a rituximab variant with reduced Fc-mediated effector functions that binds to CD20 without significant B-cell killing activity. Rituximab-DANA increased the EC_{50} values, but did not reduce the extent of B-cell killing mediated by 2H7v16/40G5c. 2H7v16/40G5c was still active in B-cell killing in the presence of high concentrations of dexamethasone *in vitro*.	[redacted]-0396 and [redacted]-0397

EC_{50} = 50% effective concentration; EC_{90} = 90% maximal effective concentration; PBMC = peripheral blood mononuclear cell.

2.6.3.2.2 *In vivo* 試験

表 2.6.3.2.2-1 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: 2H7v16/UCHT1v9

Study No. ■-0404
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, Single-dose efficacy
Methods: The objectives of this study were to characterize the *in vivo* pharmacological activity of the POC anti-CD20/CD3 TDB antibody (2H7v16/UCHT1v9) and to assess the utility of human CD20/CD3ε double-transgenic mice in characterizing the *in vivo* pharmacological activity of anti-CD20/CD3 TDB antibodies. Forty-two male and female (5551) hu.CD3E.tg_hu.CD20.tg.B6N and hu.CD20.tg.B6N mice were divided into 6 groups. Groups 1, 2, and 5 had 5 male and 2 female mice, while Groups 3, 4, and 6 had 4 male and 3 female mice. On the day of randomization (Day 0), animals were given a single intravenous dose of test material (2H7v16/UCHT1v9 or rituximab). General clinical observations were performed twice per week for the duration of the study. Mice were promptly euthanized if body weight loss was ≥20% of their starting weight. All mice were euthanized on Day 7 as scheduled. Blood for fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was collected from the retro-orbital sinus of all animals 2 days prior to the initial dose and 2 days after the initial dose. To minimize stress, animals were anaesthetized with isoflurane during blood collection. Blood was collected into EDTA collection tubes. For each collection, blood volume collected did not exceed 70 μL/mouse. On Day 7 (7 days post-dose), mice were euthanized and spleens and inguinal lymph nodes were collected. All samples were processed immediately after collection and analyzed by FACS. Data analysis for B- and T-cell count and T-cell activation was performed using FlowJo software (Ashland, OR).
Results: 2H7v16/UCHT1v9 bound to both mouse B and T cells, whereas the isotype-matched negative control antibody, HER2/CD3 TDB antibody, bound to only mouse T cells. In contrast to the single human CD20 transgenic mouse experiment, 2H7v16/UCHT1v9 in double-transgenic mice was highly active and showed significantly greater clearance of splenic B cells than rituximab despite a 20-fold lower dose. HER2/CD3 antibody did not induce B-cell killing in either single- or double-transgenic mice. To confirm the specificity of 2H7v16/UCHT1v9, human CD20 single-transgenic mice were given 0.5 mg/kg of either 2H7v16/UCHT1v9, anti-HER2/CD3 TDB antibody, or rituximab. Rituximab and 2H7v16/UCHT1v9 bound to mouse B cells but not mouse T cells in the human CD20 single-transgenic mice, whereas HER2 TDB antibody bound to neither mouse immune cells nor mouse HER2. Both TDB antibody test agents were inactive as compared to rituximab in Day 7 spleen samples

表 2.6.3.2.2-2 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: 2H7v16/UCHT1v9

Study No. ■-0404B
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, Dose Titration
Methods: The objective of this study was to define the efficacious dose range of anti-CD20/CD3 TDB antibody in B-cell depletion in the human CD20/CD3ε double-transgenic mice. Twenty-four male and female (5551) hu.CD3E.tg_hu.CD20.tg.B6N and hu.CD20.tg.B6N mice were divided into 6 groups. Groups 1–3 contained 1 male and 3 females; Groups 4 and 5 contained 2 of each sex per group; and Group 6 contained 4 females. Animals received a single intravenous (IV) dose of test material on the day of randomization (Day 0). General clinical observations were performed twice per week for the duration of the study. Mice were promptly euthanized if body weight loss was ≥20% of their starting weight. All mice were euthanized on Day 7 as scheduled. Blood collection for fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was collected from the retro-orbital sinus of all animals at –2 days (2 days prior to initial dose) and at 1, 8, 15, and 22 days post-first dose. To minimize stress, animals were anaesthetized with isoflurane during blood collection. The blood was collected into EDTA collection tubes. For each collection, blood volume collected did not exceed 70 μL/mouse. All samples were analyzed immediately by FACS analysis. Data analysis for B- and T-cell count and T-cell activation was performed using FlowJo software (Ashland, OR).
Results: While a dose up to 0.05 mg/kg resulted in decreased B-cell counts in blood 1 day post-dose, the minimal dose of anti-CD20/CD3 TDB antibody (2H7v16/UCHT1v9) required to sustain depletion for 15 days was 0.5 mg/kg (top dose tested). Taken together, 0.5 mg/kg was likely the efficacious dose of 2H7v16/UCHT1v9 for complete B-cell depletion in blood and lymphoid tissues in double-transgenic mice.

表 2.6.3.2.2-3 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: 2H7v16/40G5c

Study No. ■-0404M
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, Single Dose Efficacy
Methods: The objectives of this study were to confirm the efficacious dose for spleen B-cell depletion and to characterize the immune cell dynamics (B- and T-cell counts and T-cell activation) following a single dose of anti-CD20/CD3 TDB antibody in the human CD20/CD3ε double-transgenic mice. Thirty female (5551) hu.CD3E.tg_hu.CD20.tg.B6N mice were divided into 10 groups (n = 3 animals/group). Animals in Groups 1, 5, and 8 received a single intravenous (IV) dose of histidine buffer 8. Animals in Groups 2–4, 6, 7, 9, and 10 received single IV dose of anti-CD20/CD3 TDB antibody at either 0.05 or 0.5 mg/kg. The test articles were administrated on different days, such that during terminal spleen sample collection, mice had been treated for 1, 2, 3, 5, 7, and 14 days with the antibody (groups were labeled as Days 1, 2, 3, 5, 7, and 14 post-treatment, respectively). Anti-CD20/CD3 TDB antibody (2H7v16/40G5c) was diluted in histidine buffer 8 at concentrations of 0.02 and 0.17 mg/mL. Concentrations were calculated to deliver a dose of 0.05 and 0.5 mg/kg based on a mean body weight of 29.6 g. Mice were dosed at 0.1 mL of the dosing solution per dose. Body weights were collected, and general clinical observations were performed twice each week for the duration of the study. Mice were promptly euthanized if body weight loss was ≥ 20% of their starting weight. After all mice were euthanized, spleens were collected, processed, and analyzed immediately by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Data analysis for B- and T-cell count and T-cell activation was performed using FlowJo software (Ashland, OR).
Results: Results from this study showed that 2H7v16/40G5c potently depleted tissue B cells. At 0.5 mg/kg, spleen B-cell depletion was detected at Day 1 post-dose and was complete at Day 3 post-dose. Slight recovery of B cells was observed at 14 days post-dose. Activation of both $CD8^+$ T cells and $CD4^+$ T cells in the spleen based on CD69 expression was detected at Day 1 post-dose. Maximal levels of CD69 expression were detected at Day 1 post-dose and returned to near-baseline levels 2 days post-dose. $CD8^+$ T-cell counts were significantly increased up to 5-fold at Day 2 post-dose and gradually decreased to or below baseline levels between Days 5 and 14 post-dose.

表 2.6.3.2.2-4 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: 2H7v16/UCHT1v9 and 2H7v16/40G5c

Study No. ■-0404K
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, Repeat-Dose Efficacy
Methods: The objectives of this study were to compare the *in vivo* pharmacological activity of POC anti-CD20/CD3 TDB antibody (2H7v16/UCHT1v9) and 2H7v16/40G5c and to assess the utility of humanized NOD/scid gamma (NSG) mice in characterizing the B-cell killing activity of anti-CD20/CD3 TDB antibodies. Fifteen female humanized NSG mice were separated into three groups of 5 mice each. Test article administration began on the day of randomization (Day 0) and animals received a single intravenous (IV) dose. Body weights were recorded and general clinical observations were performed twice per week for the duration of the study. Mice were promptly euthanized if body weight loss was ≥ 20% of their starting weight. All mice were euthanized on Day 21 after the first treatment. Blood for fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was collected from the retro-orbital sinus of all animals 5 days prior to the initial dose (Day 0) and at 7 and 14 days post–first dose. To minimize stress, animals were anaesthetized with isoflurane during blood collection. Blood was collected into EDTA collection tubes. For each collection, blood volume collected did not exceed 70 μL/mouse. On Day 21, mice were anaesthetized with isoflurane and blood was collected by cardiac puncture into EDTA collection tubes. Spleens from all mice were collected in iced phosphate-buffered saline (PBS). All blood and spleen samples were analyzed immediately by FACS analysis. Data analysis for B- and T-cell count and T-cell activation was performed using FlowJo software (Ashland, OR).
Results: Both 2H7v16/UCHT1v9 and 2H7v16/40G5c potently depleted peripheral B cells. Very few B cells were detected in blood 7 days after the first dose. B-cell depletion was sustained following the latter two doses, with B cells virtually absent in peripheral blood and spleen (except for 1 animal) at the end of the study at Day 21 post–first dose. No apparent T-cell activation was detected, most likely due to the timing of sample collection (7 days post-dose). Overall, the results suggested that 2H7v16/UCHT1v9 and 2H7v16/40G5c have comparable B-cell depleting activity *in vivo*.

表 2.6.3.2.2-5 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: Mosunetuzumab and 2H7v16/40G5c

Study No. ■-2919
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics
Methods: The primary objective of this study was to evaluate the pharmacokinetics and pharmacodynamics of 2H7v16/40G5c and mosunetuzumab in huCD20/CD3 transgenic mice. Twenty-four mice were randomly assigned to one of two groups (n = 12 per group). Mice in each group were given a 0.5 mg/kg single intravenous (IV) dose of either 2H7v16/40G5c produced in E. coli (Group 1) or mosunetuzumab produced in CHO cells (Group 2)). At selected timepoints throughout the study, serum samples were collected and assayed for mosunetuzumab or 2H7v16/40G5c serum concentrations using an ELISA. Serum concentration–time data were used to evaluate pharmacokinetics. Subsets of peripheral blood lymphocytes were evaluated by flow cytometry to evaluate pharmacodynamics. Peripheral blood was collected at 3 days prior to treatment, at 2 and 24 hours post-dose, and at Days 2 and 7 post-dose. Spleens and lymph nodes were also collected at 24 hours and at Days 2 and 7 post-dose. Flow cytometry analyses were conducted to measure B cells and to detect T-cell activation
Results: Both 2H7v16/40G5c and mosunetuzumab potently depleted peripheral and tissue B cells, as very few B cells were detected Day 2 post-dose in blood, spleen, and lymph nodes. T-cell activation, as defined by CD69 expression on both $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells, was detected at 24 hours post-dose and reduced at Day 7. These results demonstrated that 2H7v16/40G5c and mosunetuzumab molecules have comparable pharmacologic activities *in vivo*. PK results from this study are discussed in 2.6.4 Pharmacokinetic Written Summary.

表 2.6.3.2.2-6 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: Mosunetuzumab

Study No. ■-1246
Type of Study: *In vivo*, GLP, Pharmacodynamics in single-dose toxicity study in cynomolgus monkeys
Methods: The objectives of this study were to evaluate the toxicokinetics, pharmacodynamics, and toxicity of mosunetuzumab, an anti-CD20/CD3 T-cell dependent bispecific antibody, when administered to cynomolgus monkeys as a single intravenous infusion (60 minutes) or subcutaneous injection and to assess the reversibility and persistence of any drug-related effects after a 7-week recovery period. For the experimental study, see 2.6.6 Toxicokinetic Written Summary. Only PD results are summarized here. For the experimental design and the results of the toxicology assessment, see 2.6.6 Toxicokinetic Written Summary. For complete information on methodology, refer to the Final Study Report ■-1246 (■■■

表 2.6.3.2.2-7 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: Mosunetuzumab

Study No. ■-2298
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, single-dose pharmacokinetic and PD study in cynomolgus monkeys
Methods: The objective of this study was to evaluate the pharmacokinetics and pharmacodynamics of mosunetuzumab, an anti-CD20/CD3 T-cell dependent bispecific antibody, when administered to cynomolgus monkeys as a single intravenous bolus injection (approximately 30 seconds to 1 minute). For complete information on methodology, refer to the final study report ■-2298 (■■■

表 2.6.3.2.2-8 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: 2H7v16/40G5c

Study No. [redacted]-1514
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, repeat dose study in cynomolgus monkey
Methods: The objective of this study was to evaluate the toxicity of 2H7v16/40G5c following repeat intravenous administration in cynomolgus monkeys using magnetic resonance imaging (MRI). Three male cynomolgus monkeys were used in the study and they received 2H7v16/40G5c, at a dose level of 1 mg/kg, by intravenous injection once a week for four weeks (i.e., on Days 1, 8, 15, and 22. Only PD results are summarized here. For the experimental design and the results of the toxicology assessment, see 2.6.6 Toxicokinetic Written Summary. For complete information on methodology, refer to the final study report [redacted]-1514 ([redacted]).
Results: B-cell depletion: Administration of 2H7v16/40G5c induced a rapid B-cell depletion from peripheral blood within 2 hours. B-cell depletion was sustained in the blood through the entire dosing period. Evidence of B-cell depletion in spleen and lymph nodes was observed at necropsy on Day 29. T-cell counts and activation: T helper and cytotoxic lymphocytes ($CD4^+$ and $CD8^+$) rapidly disappeared from peripheral blood within 24 hours of dosing consistent with activation-induced margination. T-cell counts recovered to baseline levels by Day 8 of the dosing period. T-cell activation was evident in both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, as indicated by expression of CD69 (early activation marker) and to a lesser degree dual expression of CD69 and CD25 (late activation marker), with a slightly greater proportion among $CD8^+$ cytotoxic T cells. These effects were primarily associated with the first dose, with reduced or no changes following subsequent doses. Cytokine release: Following anti-CD20/CD3 TDB administration increased serum cytokine levels were observed for all cytokines and chemokines examined including IFN-γ, IL-2, IL-12/23, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-6, IL-1b, TNF-α, IL-8, MIP1a, MIP1b, IL-18, TGF-α, IL-15, IL-17A, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), vascular endothelial growth factor (VEGF), IL1 receptor antagonist (IL1ra) and soluble CD40 ligand (sCD40L). Cytokines increased to maximum levels 2 hours after dosing and declined to near baseline levels within 24 hours. Elevation of the cytokines was primarily associated with the first dose, with minimal to no changes following the subsequent doses.

表 2.6.3.2.2-9 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: 2H7v16/40G5c

Study No. [redacted]-2135
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, Single Dose Toxicokinetic, Pharmacodynamic, and Toxicology Study in cynomolgus monkeys
Methods: The objective of this study was to evaluate the toxicokinetics, pharmacodynamics, and toxicity of 2H7v16/40G5c when administered as a single intravenous dose to male cynomolgus monkeys. Only PD results are summarized here. For the experimental design and the results of the toxicology assessment, see 2.6.6 Toxicokinetic Written Summary. For complete information on methodology, refer to the final study report [redacted]-2135 ([redacted]).
Results: B-cell depletion: Administration of 2H7v16/40G5c resulted in the depletion of B-lymphocytes in periphery and lymphoid tissues on Day 3 and remained reduced in lymph nodes on Days 14 and 28 through the end of dosing. Consistent with B cell depletion, there was an increase (11.1 fold) in serum BAFF levels that peaked by Day 3 postdose. T-cell counts and activation: The level of circulating T cells and subsets (Th and Tc), natural-killer (NK) cells and monocytes showed an initial reduction at 2 hours post dose, likely due to activation-related margination, and recovered by Day 7. Despite the small numbers of lymphocytes present in the peripheral blood after dosing, activation of T cells (increased percentages of cells that were $CD25^+$, $CD69^+$, and $CD25^+/CD69^+$) and monocytes ($CD69^+$ and $CD54^+$) was present at 2-hour and 48-hours postdose when comparing to their respective baseline values, and T-cell proliferation as indicated by increased percentages of $Ki67^+$ Th, Tc, and B lymphocytes and NK cells was present. Similar kinetics and activation pattern were observed with the naive and memory T lymphocyte subsets (cmTh, emTh, nTh, cmTc, emTc, nTc). Cytokine release: Administration of 2H7v16/40G5c resulted in a rapid increase in the levels of several plasma cytokines and chemokines starting 2 hours after dosing. Most of the levels decreased to baseline levels within 12–24 hours following 2H7v16/40G5c administration.

表 2.6.3.2.2-10 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: 2H7v16/40G5c

Study No.[redacted]-3160
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, Multiple Dose Toxicokinetic, Pharmacodynamic, and Toxicology Study in cynomolgus monkeys
Methods: The objective of this study was to evaluate the toxicity, toxicokinetics, and pharmacodynamics of 2H7v16/40G5c when administered to cynomolgus monkeys weekly via slow bolus intravenous injections (approximately 30 seconds to 1 minute) for a total of 4 doses. Only PD results are summarized here. For the experimental design and the results of the toxicology assessment, see 2.6.6 Toxicokinetic Written Summary. For complete information on methodology, refer to the final study report [redacted]-3160 ([redacted]).
Results: B-cell activation: Administration of 2H7v16/40G5c at dose levels of 0.01 to 1 mg/kg resulted in a significant reduction of B lymphocytes in the periphery and a complete or near complete decrease in B lymphocyte numbers in the secondary lymphoid organs (spleen and lymph nodes) postdose. There was a sustained decrease of blood B lymphocytes in animals that did not have anti-drug antibodies (ADA) at 0.1 and 1 mg/kg. B lymphocyte recovery was noted in all animals at 0.01 mg/kg and some animals at 0.1 mg/kg correlating with loss of exposure due to ADA. There was also a dose-dependent increase in BAFF levels consistent with a decrease in B lymphocyte numbers. T-cell counts and activation: 2H7v16/40G5c induced dose-dependent and transient activation, and reduction followed by expansion of circulating T lymphocytes, the latter likely due to activation-induced T-lymphocyte margination followed by expansion or redistribution. These changes were primarily associated with the first dose and to a lesser degree, the second dose, but were not noted in subsequent doses. Cytokine release: 2H7v16/40G5c induced a dose-dependent rapid increase in the levels of several plasma cytokines and chemokines within 2 hours of dosing. Most of the levels decreased to baseline levels within 2 days following the first dose. The increases in cytokines/chemokines were primarily observed following the first dose.

表 2.6.3.2.2-11 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: 2H7v16/40G5c

Study No. ■-1689
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, Multiple Dose Toxicokinetic, Pharmacodynamic, and Toxicology Study in cynomolgus monkeys
Methods: The objective of this study was to evaluate the toxicokinetics, pharmacodynamics, and toxicity of 2H7v16/40G5c with or without steroid or rituximab pretreatment when administered to cynomolgus monkeys weekly for a total of 4 doses via intravenous (IV) or subcutaneous (SC) routes. Only PD results are summarized here. For the experimental design and the results of the toxicology assessment, see 2.6.6 Toxicokinetic Written Summary. For complete information on methodology, refer to the final study report ■-1689 (■■■

表 2.6.3.2.2-12 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: 2H7v16/40G5c

Study No. ■-2134
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, repeat dose study in cynomolgus monkey
Methods: The objective of this study was to evaluate the toxicity of 2H7v16/40G5c following repeat intravenous administration in cynomolgus monkeys using magnetic resonance imaging (MRI). Three male cynomolgus monkeys were used in the study and they received 2H7v16/40G5c, at a dose level of 1 mg/kg, by intravenous injection once a week for four (4) weeks (i.e. on Days 1, 8, 15 and 22. Only PD results are summarized here. For the experimental design and the results of the toxicology assessment, see 2.6.6 Toxicokinetic Written Summary. For complete information on methodology and results, refer to the final study report ■-2134 (■■■

表 2.6.3.2.2-13 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: Mosunetuzumab

Study No. ■-2088
Type of Study: *In vivo*, Non-GLP, Toxicity Study in Monkeys
Methods: The objective of the study was to determine the toxicity and toxicokinetic profile of the test article, mosunetuzumab, following step-up dose administration on Days 1 and 2 followed by weekly dosing for 3 doses to cynomolgus monkeys. All dose administrations were given via 60-min intravenous infusion. The purpose of this study was to evaluate whether this step-up dosing could minimize first-dose associated cytokine release and adverse events while avoiding anti-drug antibodies (ADA) to enable longer term dosing in future studies. Only PD results are summarized here. For the experimental design and the results of the toxicology assessment, see 2.6.6 Toxicokinetic Written Summary. For complete information on methodology, refer to the final study report ■-2088 (■■■

表 2.6.3.2.2-14 効力を裏付ける試験（*In vivo*）

Test Article: Mosunetuzumab

Study No. ■-1815
Type of Study: *In vivo*, GLP, Multiple Toxicity and Toxicokinetic Study in Cynomolgus Monkey
Methods: The objective of the study was to evaluate the toxicity and to determine the toxicokinetic profile of mosunetuzumab, an anti-CD20/CD3 T-cell dependent bispecific antibody, when administered to cynomolgus monkeys via 60-minute intravenous infusion as daily step-up doses for 2 days, followed by a once weekly intravenous (infusion) administration for at least 26 weeks. Only PD results are summarized here. For the experimental design and the results of the toxicology assessment, see 2.6.6 Toxicokinetic Written Summary. For complete information on methodology, refer to the final study report ■-1815 (■■■

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当なし。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: Mosunetuzumab

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Sex/No./Group	Noteworthy Findings	GLP Status	CTD番号 Study No.
Cardiovascular (ECG, blood pressure, heart rate and body temperature), respiratory (respiration rate and pulse oximetry), and neurological (standard neurological assessment)	Cynomolgus monkeys	IV, SC	IV mosunetuzumab : 0.01, 0.1, 1 SC mosunetuzumab : 1	M/7, F/7 (Groups 1, 4) M/5, F/5 (Groups 2, 3, 5)	Cardiovascular (CV) system: heart rate and body temperature increases at 0.1 mg/kg (IV) and 1 mg/kg (IV or SC) on Day 1, resulting in attenuated diurnal patterns compared to control and pre-study values. Blood pressure decreased in animals given an IV dose at 1 mg/kg on Day 1 with systolic and diastolic values 11–18 and 22–25 mmHg lower than pre-study and control values, respectively. Heart rate increases (RR interval decreases) at these dose levels had correlating decreases in PR and QT intervals in animals given IV or SC doses at 1 mg/kg, but as there was no effect on QTc, these changes were considered entirely rate-dependent and not indicative of an effect on ventricular repolarization. The ECGs evaluated were qualitatively considered normal for cynomolgus monkeys. All changes in ECG, hemodynamic parameters, and body temperature were completely reversible by Day 7. These findings were considered to be secondary to mosunetuzumab-induced cytokine release and associated acute phase protein reactions. There was no mosunetuzumab-related effects on neurobehavioral or respiratory endpoints. The NOEL and NOAEL for CV system were 0.01 and 0.1 mg/kg IV, respectively. The NOAEL following a SC injection was 1 mg/kg. The NOEL for neurological assessment and respiratory system was 1 mg/kg IV and SC.	Yes	4.2.3.1-3 [redacted]-1246

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Sex/No./Group	Noteworthy Findings	GLP Status	CTD番号 Study No.
Cardiovascular (blood pressure and heart rate), neurological	Cynomolgus monkeys	IV	Mosunetuzumab: 0.2, 0.8 for Days 1 and 2, Respectively (Groups 2–4) 0.3, 1, 3 for Groups 2–4, Respectively (Days 8, 15, and 22)	M/2, F/1 (Groups 1–4)	Mosunetuzumab was associated with increased heart rate in all animals in Groups 2–4 on Days 1 and 2, most notable during the dark period. This finding was attributed to mosunetuzumab-induced cytokine release. In subsequent weeks, slight heart rate increase was observed during the dark period in females administered 1 mg/kg and males administered 3 mg/kg on Day 8, but not on Day 22. There were no clear mosunetuzumab-related changes in systemic blood pressures. In-life neurologic abnormalities were limited to a single incidence of convulsion on Day 11 in one animal administered 0.2/0.8/1 mg/kg on Days 1/2/8, and was euthanized for cause.	No	4.2.3.2-4 [redacted]-2088
Neurological	Cynomolgus monkeys	IV	Mosunetuzumab: 0.2, 0.8 (Days 1 and 2, respectively); 0, 0.1, 0.5 (Days 8–183)	M/4, F/4 (Groups 1–3)	No noteworthy findings.	Yes	4.2.3.2-5 [redacted]-1815
Neurological, respiration rate and pulse oximetry	Cynomolgus monkeys	IV	2H7v16/40G5c: 0.01, 0.1, 1	M/2, F/2 (Groups 1–4)	No noteworthy findings.	No	4.2.3.2-1 [redacted]-3160
Neurological	Cynomolgus monkeys	IV, SC	2H7v16/40G5c: 1	M/4	No noteworthy findings.	No	4.2.3.2-2 [redacted]-1689
Neurological	Cynomolgus monkeys	IV	2H7v16/40G5c: 1	M/3	No noteworthy findings.	No	4.2.3.2-3 [redacted]-2134

CV = cardiovascular; ECG = electrocardiogram; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; NOAEL = no observed adverse effect level;

NOEL = no observed effect level SC = subcutaneous.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。