目次

2.6.1 緒言 3

略号一覧表

略号又は略称	名称及び内容
CD3	cluster of differentiation 3
GPRC5D	G タンパク質共役受容体ファミリーC グループ 5 メンバーD（G protein-coupled receptor family C group 5 member D）
IgG	免疫グロブリン G（immunoglobulin G）
MHC	主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex）
PAA	プロリン，アラニン，アラニン（proline, alanine, alanine）

2.6.1 緒言

JNJ-64407564（以下，トアルクエタマブ）は，多発性骨髄腫細胞上に発現する GPRC5D 及び T 細胞上に発現する CD3 を標的とするヒト化 IgG4-PAA 二重特異性抗体であり，多発性骨髄腫の治療薬として開発している。トアルクエタマブは，CD3 陽性 T 細胞を GPRC5D 発現細胞近傍に動員することで T 細胞を活性化し，GPRC5D 発現多発性骨髄腫細胞に対する傷害を誘導する（図 2.6.1-1）。トアルクエタマブによる T 細胞活性化は，T 細胞上の T 細胞受容体の抗原特異性に依存せず，抗原提示細胞上の MHC クラス I 分子非拘束的に誘導される。

トアルクエタマブの Fc 領域には，二重特異性抗体を安定化させるために導入したプロリン置換変異（GPRC5D 結合アームにおける S226P 及び CD3 結合アームにおける S233P），及び Fc 受容体に対する相互作用を減弱させる（意図しないエフェクター作用を抑制する）ために導入した 2 つのアラニン置換変異（GPRC5D 結合アームにおける F232A 及び L233A 並びに CD3 結合アームにおける F239A 及び L240A）が含まれる（PAA 変異）。トアルクエタマブの [redacted] グリコフォームの分子量は約 147 kDa，等電点は [redacted]～[redacted] である。280 nm におけるトアルクエタマブの吸収定数は [redacted] $(mg/mL)^{-1}cm^{-1}$ と決定された。

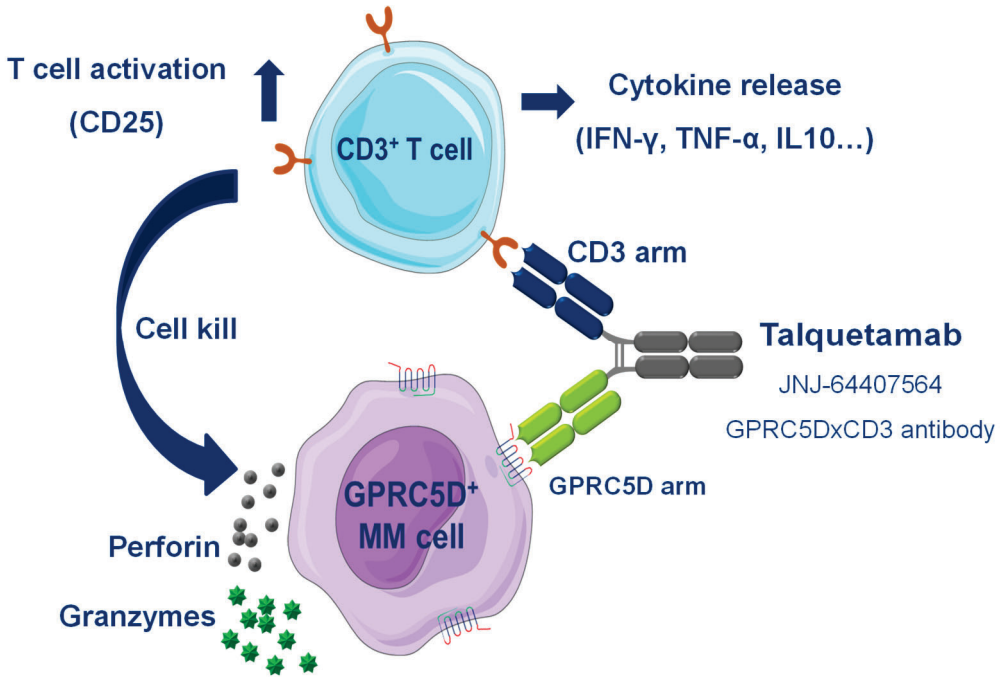


図 2.6.1-1 トアルクエタマブの作用機序の概略図

CD3 = cluster of differentiation 3; CD25 = cluster of differentiation 25; GPRC5D = G protein coupled receptor family C group 5 member D; IFN-γ = interferon gamma; IL10 = interleukin-10; MM = multiple myeloma; TNF-α = tumor necrosis factor alpha

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.2.3 副次的薬理試験 20
2.6.2.4 安全性薬理試験 20
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 20
2.6.2.6 考察及び結論 20
2.6.2.7 図表 22
2.6.2.8 参考文献 23
2.6.3 薬理試験概要表 1

略号一覧表

略号又は略称	名称及び内容
CD	cluster of differentiation
CFR	連邦規則集（Code of Federal Regulations）
cGPRC5D	カニクイザル GPRC5D（cynomolgus monkey GPRC5D）
EC_{20}	20%有効濃度（20% maximal effective concentration）
EC_{50}	50%有効濃度（half-maximal effective concentration）
EC_{90}	90%有効濃度（90% maximal effective concentration）
FFPE	ホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
GPRC5D	G タンパク質共役受容体ファミリーC グループ 5 メンバーD（G protein-coupled receptor family C group 5 member D）
hGPRC5D	ヒト GPRC5D（human GPRC5D）
ICH	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation）
IFN-γ	インターフェロンγ（interferon gamma）
IgG	免疫グロブリン G（immunoglobulin G）
IHC	免疫組織化学（immunohistochemistry）
IL	インターロイキン（interleukin）
ISH	*in situ* ハイブリダイゼーション（in situ hybridization）
IV	静脈内（intravenous）
K_d	解離定数（dissociation constant）
mRNA	メッセンジャーRNA（messenger RNA）
NCBI BLAST	National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool
NK	ナチュラルキラー（natural killer）
NSG	NOD/scid$\gamma_c^{-/-}$
OECD	経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development）
PAA	プロリン，アラニン，アラニン（proline, alanine, alanine）
PBMC	末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cell）
PBS	リン酸緩衝食塩液（phosphate buffered saline）
RNA	リボ核酸（ribonucleic acid）
RT-qPCR	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（reverse transcription polymerase chain reaction）
SC	皮下（subcutaneous）
TNF-α	腫瘍壊死因子 α（tumor necrosis factor alpha）

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

トアルクエタマブは，多発性骨髄腫細胞上に発現する GPRC5D 及び T 細胞上に発現する CD3 を標的とするヒト化 IgG4-PAA 二重特異性抗体であり，多発性骨髄腫の治療薬として開発している。トアルクエタマブは，CD3 陽性 T 細胞を GPRC5D 発現細胞近傍に動員することで T 細胞を活性化し，GPRC5D 発現多発性骨髄腫細胞に対する傷害を誘導する。

背景及び目的

トアルクエタマブの非臨床薬理試験は，ICH S6(R1)，S7A 及び S9 に従って実施した。全ての非臨床試験は，最良の科学的原則に従って実施し，重要な安全性試験は，FDA の GLP 規制 21 CFR，Part 58 及び/又は OECD-GLP 原則を遵守して実施した。GLP 適用及び試験施設に関する情報を含む薬理試験の概要表を【2.6.3.1】に示す。

薬理試験は，以下を目的として計画した。

① トアルクエタマブの作用機序及び薬理作用を明らかにすること

② GPRC5D に対する標的特異性を確認すること

③ 毒性試験を実施する上で薬理学的に適切な動物種を同定すること

トアルクエタマブは，非臨床動物種に対する交差反応性を示さなかったことから，トアルクエタマブの毒性を評価する上で薬理学的に適切な動物種を特定することはできなかった（2.6.2.2.3）。したがって，cGPRC5D と相互作用し，機能活性を示すサロゲート抗体（JNJ-64024701；トアルクエタマブと同じ CD3 結合アームを有するが GPRC5D 結合アームは異なる）を開発した。cGPRC5D 発現細胞に対する JNJ-64024701 の結合親和性及び *in vitro* 機能活性は，hGPRC5D 発現細胞に対するトアルクエタマブの結合親和性及び *in vitro* 機能活性と同程度である（2.6.2.2.3）。これらのデータに基づき，GPRC5D×CD3 二重特異性抗体のハザードを特定する上で，JNJ-64024701 は適切なサロゲート抗体であると判断した。JNJ-64024701 を用いたカニクイザルの 1 カ月間反復投与毒性試験（GLP）に心血管系，呼吸系及び中枢神経系に関する評価項目を組み込み，GPRC5D×CD3 二重特異性抗体の安全性薬理パラメータを評価した。

結果の要約

一連の *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験結果から，トアルクエタマブは hGPRC5D 発現細胞特異的に T 細胞介在性の細胞傷害を誘導する二重特異性抗体であることが示された。*In vitro* 試験において，トアルクエタマブは GPRC5D を発現する多発性骨髄腫細胞株に特異的に結合し，当該細胞株に対して T 細胞介在性の細胞傷害を誘導した。また，ヒト多発性骨髄腫細胞を異種移植した *in vivo* マウスモデルにおいて，トアルクエタマブは顕著な抗腫瘍効果を示した。

トアルクエタマブは，カニクイザルの CD3 に結合したが，その他の一般的な動物種の GPRC5D 及び CD3 に対する結合は弱い又は結合しなかった。また，cGPRC5D 発現細胞に対するトアルクエタマブの *in vitro* 機能活性（T 細胞活性化及び細胞傷害活性）は，hGPRC5D 発現細胞と比較して約 100 倍弱かった。

In vitro ヒト細胞膜タンパク質アレイにおいて，トアルクエタマブの GPRC5D 結合アームは GPRC5D に対して高い特異性を示し，オフターゲット結合は認められなかった。したがって，トアルクエタマブによるオフターゲット作用のリスクは低いと考えられる。

カニクイザルを用いた 1 カ月間反復静脈内投与毒性試験（GLP）において，サロゲート抗体（JNJ-64024701）を最大 30 mg/kg まで週 1 回 4 回投与したところ，心血管系，呼吸系及び中枢神経系に JNJ-64024701 投与に関連した影響は認められなかった。剖検及び病理組織学的検査では，心臓重量への影響，並びに心臓及び骨格筋における病理組織学的な影響は認められなかった。当該試験ではトアルクエタマブではなくサロゲート抗体を用いたため，臨床曝露量に対する曝露量比は算出しなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験

2.6.2.2.1.1 健康ドナー由来の全血及び多発性骨髄腫患者由来の骨髄検体に対するトアルクエタマブの結合プロファイル

資料番号 4.2.1.1.1，4.2.1.1.2

フローサイトメトリーを用いて健康ドナー由来の全血及び多発性骨髄腫患者由来の凍結骨髄単核細胞に対するトアルクエタマブの結合を評価した。各血球サブタイプに対する特異的マーカーを用いて解析したところ，トアルクエタマブは CD3 結合アームを介して CD4 又は CD8 陽性 T 細胞及び NK T 細胞に結合した。一方，トアルクエタマブは NK 細胞，B 細胞，単球及び好中球に結合しなかったことから，これらの細胞に GPRC5D 及び CD3 は発現しないことが示唆された（図 2.6.2-1，4.2.1.1.1/DD[redacted]026）。トアルクエタマブは，多発性骨髄腫患者由来の骨髄単核細胞（GPRC5D 陽性）に結合した（図 2.6.2-7，4.2.1.1.2/DD[redacted]025）。

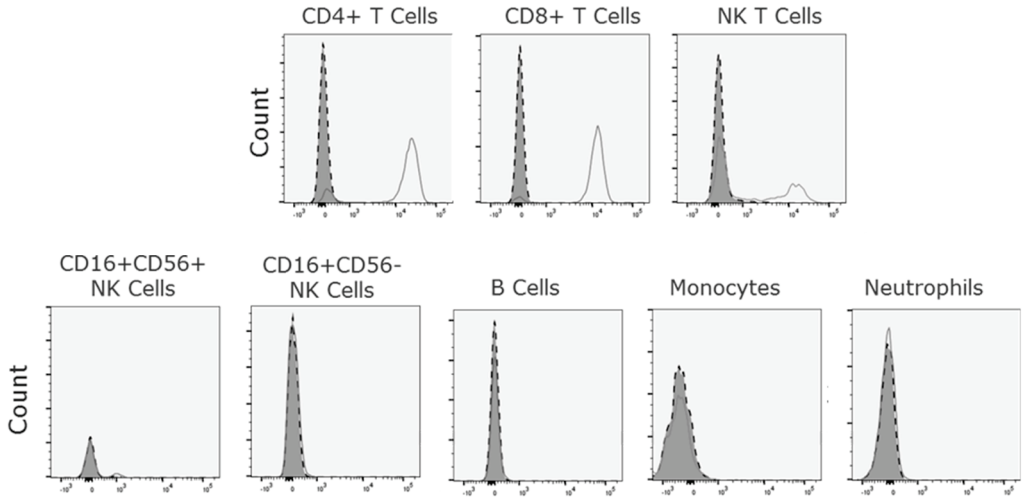


図 2.6.2-1 健康ドナー由来の全血におけるトアルクエタマブの結合プロファイル

Source: DD[redacted]026
CD = cluster of differentiation; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; NK = natural killer.
Note: Whole blood from 3 healthy human donors was stained with talquetamab antibody against GPRC5D. Gating analysis was performed to identify lymphocytes in the leukocyte population using standard cell specific markers. Staining intensity for 1 representative donor is shown in the panels, where solid lines represent talquetamab and dotted lines with filled gray are the corresponding isotype. No talquetamab binding was observed on lymphocytes (B cells were gated using CD19 marker), monocytes or neutrophils in 3 normal donors. The parental GPRC5D antibody showed binding to CD3+ T cells in all 3 donors with varying intensity between donors.

2.6.2.2.1.2 ヒト正常組織における GPRC5D の発現

資料番号 4.2.1.1.3，4.2.1.1.4，4.2.1.1.5，4.2.1.1.6，4.2.1.1.7，4.2.1.1.8

解析方法

公表文献，Human Protein Atlas などの公開データ，及び社内の [redacted] データベース（[redacted] を含む複数のデータソースから構築した [redacted] データ），並びに組織切片を用いたタンパク質（IHC）及び RNA（ISH）発現解析により，ヒト正常組織における GPRC5D の発現を検討した。GPRC5D 発現の有無を確認した陽性及び陰性対照切片を用いて，4 種の市販抗体から IHC に用いる抗体を決定した。検討した抗体のうち，clone [redacted] モノクローナル抗体（[redacted]）でのみ，GPRC5D タンパク質に対する特異的染色が確認された（4.2.1.1.3/Histo-022120[redacted]）。一方，Human Protein Atlas で報告されているポリクローナル抗体（HPA071909）では，陽性及び陰性対照細胞で同程度の染色性を認めたため，IHC に用いる抗体として適切でないと判断し，以降の検討では clone [redacted] 抗体を用いた。

結果の概要

公表文献（Inoue 2004; Kodama 2019; Smith 2019; Venkateshaiah 2013; Verkleij 2021）及び社内データ（Histo-022120[redacted]，4.2.1.1.4/Histo-040920[redacted]，4.2.1.1.5/Histo-072420[redacted]，4.2.1.1.6/Histo-101620[redacted] 及び 4.2.1.1.7/Histo-062920[redacted]）から，ヒト GPRC5D は，形質細胞，並びに皮膚及び舌などの角化した上皮細胞に限定して発現することが示唆された。

GPRC5D は，形質細胞に発現することが複数の文献で報告されている（Kodama 2019; Venkateshaiah 2013; Verkleij 2021）。形質細胞は，扁桃，リンパ節及び脾臓等に常在性形質細胞として豊富に存在する。ヒト扁桃，リンパ節，脾臓，骨髄，唾液腺及び消化管（胃，十二指腸及び結腸）に対する IHC 及び ISH 解析を実施した結果，これらの組織における常在性形質細胞で GPRC5D の発現が確認された（Histo-101620[redacted] 及び Histo-062920[redacted]; Goldsmith 2021）。GPRC5D mRNA 及びタンパク質の発現は，ヒトの毛包（毛球及び毛幹）及びエクリン汗腺の上皮細胞，並びに舌の糸状乳頭でも認められた（Histo-062920[redacted]; Histo-101620[redacted]; Goldsmith 2021）。これらの結果と一致して，Smith（2019）らは，ヒトの毛包及び汗腺で GPRC5D タンパク質が発現することを報告している。なお，ヒトでは検討されていないが，爪床における GPRC5D の発現がマウス（RNA）及びカニクイザル（タンパク質）で報告されている（Inoue 2004; Smith 2019）。

肺における GPRC5D の発現

バルク試料を対象とした RNA 発現解析では，低レベルであるが肺でヒト *GPRC5D* が検出されている（Genotype-Tissue Expression project; Human Protein Atlas; 4.2.1.1.8/DD[redacted]024）。一方，気管，肺胞及びリンパ組織を含むヒト正常肺に対して IHC 及び ISH を実施したところ，GPRC5D の発現は認められなかった（Histo-072420[redacted]; Goldsmith 2021）。社内で実施した IHC 及び ISH では，あらかじめ FFPE 組織試料の解剖学的部位，品質（適切な試料採取及び取扱い，試料中の目的構造の有無，並びに IHC/ISH への試料の適合性等）及び病変の有無を確認できることから，IHC 及び ISH で得られた発現データは，バルクの組織ホモジェネートに対する RNA 発現解析に比べて頑健であると考えられる。

脳における GPRC5D の発現

ISH では，ヒト脳幹（延髄）の下オリーブ核の運動ニューロンにおいて低レベルの *GPRC5D* RNA が検出されたが，IHC ではヒト小脳，脳幹（延髄），上衣細胞及び脈絡叢において

GPRC5D タンパク質は認められなかった（Histo-072420[redacted]; Goldsmith 2021）。RT-qPCR を用いた解析では，小脳でごく低レベルの *GPRC5D* 発現が報告されている（Pillarisetti 2020）が，これは *GPRC5D* RNA を発現する下オリーブ核の運動ニューロンが小脳に軸索を伸ばしていることに起因すると考えられる。上記データと一致して，Smith（2019）らの報告でもヒトの肺及び脳で GPRC5D タンパク質の発現は認められなかった。ヒト組織マイクロアレイで検討した他の脳領域及び神経組織（大脳，髄膜，脳梁，中脳，視床，線条体，脊髄，後根神経節及び末梢神経を含む）でも GPRC5D RNA 及びタンパク質は検出されなかった（Histo-062920[redacted]）。

以上のとおり，ヒト正常組織における GPRC5D の発現を包括的に解析した結果，GPRC5D タンパク質は，形質細胞，皮膚の毛包及び汗腺，並びに舌の糸状乳頭に限定して発現することが示唆された。

2.6.2.2.1.3 多発性骨髄腫細胞株に対するトアルクエタマブの結合

資料番号 4.2.1.1.2

フローサイトメトリーを用いて，GPRC5D 発現ヒト多発性骨髄腫細胞株（MM.1R，OPM-2，H929 及び JIM-3）及び GPRC5D 陰性ヒト細胞株（Daudi 及び NALM-6）に対するトアルクエタマブの結合を評価した。トアルクエタマブは，GPRC5D 発現多発性骨髄腫細胞に濃度依存的に結合したが，GPRC5D 陰性細胞には結合しなかった（図 2.6.2-2A）。GPRC5D×null 対照抗体は，トアルクエタマブと同様の結合プロファイルを示した（図 2.6.2-2B）。一方，null×CD3 対照抗体は，高濃度（>100 nmol/L，非特異的結合と考えられる）を除き，いずれの細胞株にも結合しなかった（図 2.6.2-2C）。以上のことから，トアルクエタマブの結合は GPRC5D 特異的であることが示唆された（DD[redacted]025）。

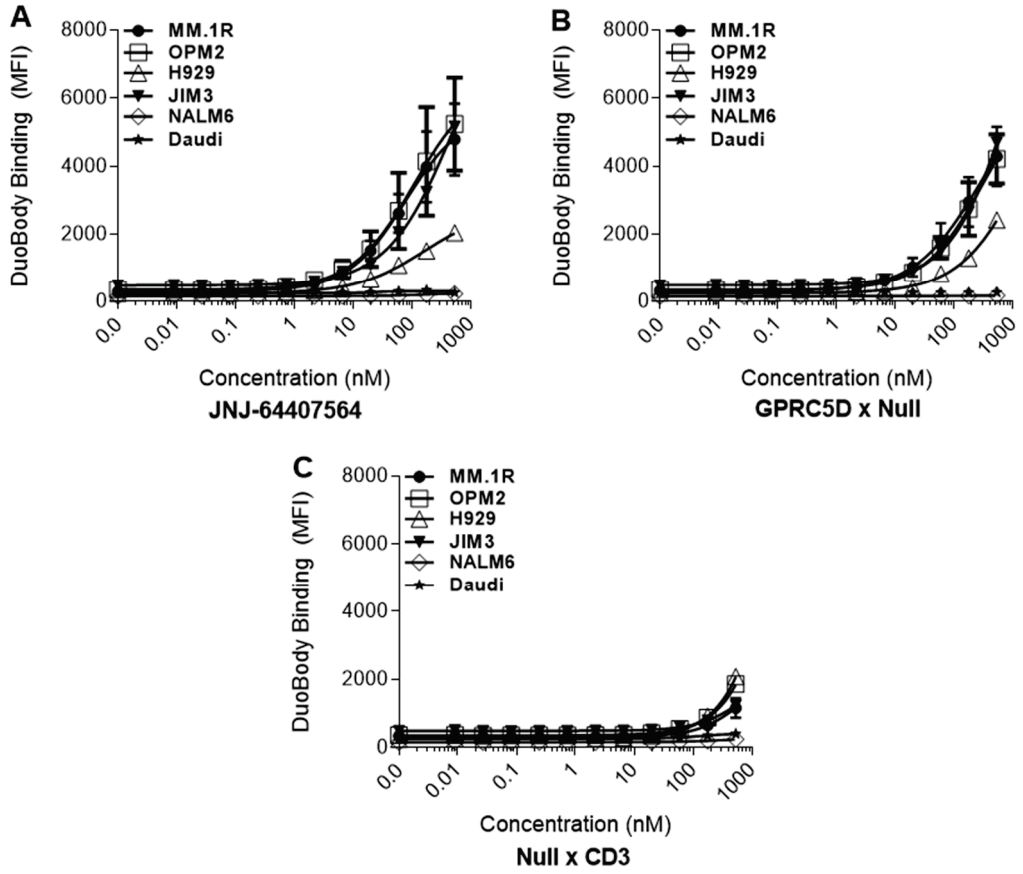


図 2.6.2-2 ヒト細胞株に対するトアルクエタマブの結合

Source: DD[redacted]025
CD3 = cluster of differentiation 3; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; JNJ-64407564 = talquetamab; MFI = mean fluorescence intensity; nM = nmol/L.
Note: GPRC5D-positive and GPRC5D-negative cells (50,000 cells in 100 µL) were stained for 60 minutes with various concentrations of talquetamab (Panel A), GPRC5D×null (Panel B), and null×CD3 (Panel C) antibodies to measure the surface binding profiles (n=2). Binding is expressed as the geometrical mean (MFI). Mean ± standard error of the mean is shown.

2.6.2.2.1.4 多発性骨髄腫細胞株に対するトアルクエタマブの T 細胞介在性細胞傷害，T 細胞活性化及びサイトカイン放出

資料番号 4.2.1.1.2

標的細胞として GPRC5D 発現多発性骨髄腫細胞株（H929，MM.1R 及び OPM-2），及びエフェクター細胞として健康ドナー由来 T 細胞（6 例）を E:T 比=5:1 で 48 時間共培養し，GPRC5D 発現細胞に対するトアルクエタマブの細胞傷害活性を評価した。

トアルクエタマブは GPRC5D 発現多発性骨髄腫細胞株に対して濃度依存的な T 細胞介在性の細胞傷害を誘導し，H929，MM.1R 及び OPM-2 に対する平均 EC_{50} 値（標準誤差）は，それぞれ 0.057 (0.004)，0.015 (0.001)及び 0.214 (0.014) nmol/L であった（図 2.6.2-3，DD[redacted]025）。一方，GPRC5D 陰性細胞株（Daudi 及び NALM-6）に対してトアルクエタマブは細胞傷害活性を示さなかった。対照の二重特異性抗体（null×CD3 又は GPRC5D×null）は，いずれの細胞株に対しても細胞傷害活性を示さなかった。

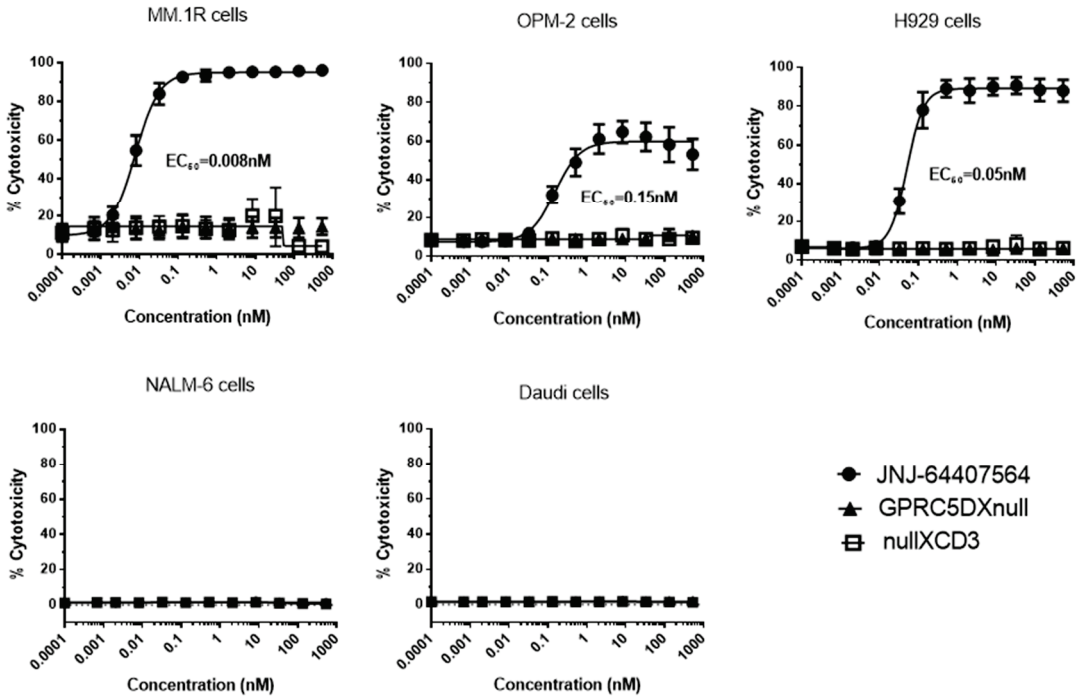


図 2.6.2-3 多発性骨髄腫細胞株に対するトアルクエタマブの T 細胞介在性細胞傷害

Antibody concentrations:

µg/mL	0	0.0003	0.001	0.005	0.020	0.078	0.313	1.250	5.000	20.000	80.000
nM	0	0.0020	0.008	0.032	0.130	0.520	2.078	8.313	33.250	133.000	532.000

Source: DD[redacted]025

CD3 = cluster of differentiation 3; CFSE = carboxyfluorescein succinimidyl ester; EC_{20} = 20% maximal effective concentration; EC_{50} = half-maximal effective concentration; E:T = effector:target; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; JNJ-64407564 = talquetamab; MM = multiple myeloma; nM = nmol/L.

Note: Talquetamab and negative control molecules were incubated at increasing concentrations with MM cell lines and healthy donor pan T cells at an E:T ratio of 5:1 in the presence of fragment crystallizable blocker. After 48 hours of incubation, the number of CFSE labelled dead cells were counted by flow cytometry and % cytotoxicity and EC_{50} and EC_{20} were calculated using GraphPad Prism Software. The data above represents the average of 6 different T cell donors. Mean ± standard error of the mean is shown.

続いて，T 細胞活性化の指標として CD25 の発現を測定した。GPRC5D 発現多発性骨髄腫細胞株と健康ドナー由来 T 細胞の共培養試験において，トアルクエタマブは T 細胞の活性化を誘導し，H929，MM.1R 及び OPM-2 と共培養したときの平均 EC_{50} 値（標準誤差）は，それぞれ 0.082 (0.009)，0.014 (0.001)及び 0.288 (0.047) nmol/L であった（図 2.6.2-4）。一方，GPRC5D 陰性細胞（Daudi 及び NALM-6）との共培養，及び対照抗体（null×CD3 又は GPRC5D×null）では T 細胞活性化は認められなかった（DD[redacted]025）。また，標的である GPRC5D 発現細胞の非存在下ではトアルクエタマブは T 細胞活性化を誘導しなかったことから，当該作用は GPRC5D 特異的であることが示された（DD[redacted]026）。

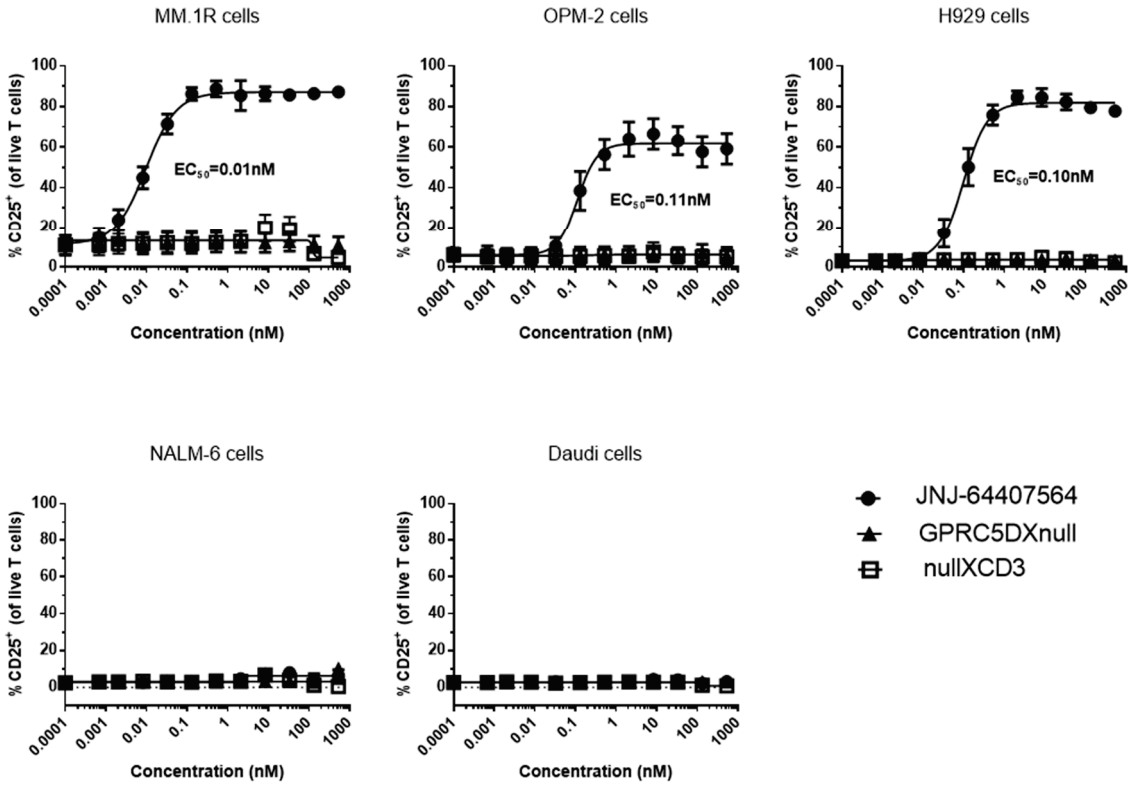


図 2.6.2-4 多発性骨髄腫細胞株と共培養したときのトアルクエタマブの T 細胞活性化作用

Source: DD[redacted]025
CD3 = cluster of differentiation 3; CD25 = cluster of differentiation 25; EC_{50} = half-maximal effective concentration; E:T = effector:target; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; JNJ-64407564 = talquetamab; nM = nmol/L.
Note: Talquetamab and negative control molecules were incubated at increasing concentrations with MM cell lines and healthy donor pan T cells at an E:T ratio of 5:1 (determined from fresh and frozen bone marrow samples from subjects with multiple myeloma) in the presence of fragment crystallizable blocker. After 48 hours of incubation the T cell activation was measured as percent CD25 expressing CD3-positive cells. The data above represent the average of 6 different T cell donors. Mean ± standard error of the mean is shown.

トアルクエタマブによる T 細胞活性化をさらに検討するために，培養上清中に放出された種々のサイトカイン（IFN-γ，TNF-α，IL-2，IL-1β，IL-6，IL-8 及び IL-10）濃度を測定した。その結果，H929 細胞と共培養したときの各サイトカイン濃度の平均 EC_{50} 及び EC_{20} 値は表 2.6.2-1 のとおりであった（DD[redacted]025）。

表 2.6.2-1 H929 細胞存在下におけるトアルクエタマブのサイトカイン放出誘導（平均 EC_{50} 及び EC_{20} 値）

Cytokine	EC_{50} (nmol/L)	EC_{20} (nmol/L)
IFN-γ	1.120 ± 0.205	0.617 ± 0.069
TNF-α	1.545 ± 0.123	0.805 ± 0.052
IL-2	1.962 ± 0.094	1.380 ± 0.178
IL-1β	0.717 ± 0.111	0.462 ± 0.061
IL-6	0.685 ± 0.037	0.443 ± 0.062
IL-8	0.438 ± 0.036	0.273 ± 0.026
IL-10	1.082 ± 0.129	0.672 ± 0.081

Source: DD[redacted]025
EC_{20} = 20% maximal effective concentration ; EC_{50} = half-maximal effective concentration
Note: The data above represent the average of 6 different T cell donors. Mean ± standard error of the mean is shown.

2.6.2.2.1.5　正常全血モデルにおけるトアルクエタマブの T 細胞介在性細胞傷害，T 細胞活性化及びサイトカイン放出

資料番号 4.2.1.1.2

よりヒト生体内を反映するエフェクター細胞を用いてトアルクエタマブの機能活性を評価するため，健康ドナー由来の全血に GPRC5D 発現多発性骨髄腫細胞（H929）を E:T 比=5:1 となるように添加し，種々の濃度のトアルクエタマブを 48 時間曝露したときの H929 細胞に対する細胞傷害活性，T 細胞活性化及びサイトカイン放出を評価した。

トアルクエタマブは濃度依存的な細胞傷害活性を示し，6 例のドナーから得られた EC_{50} の個別値の範囲は 0.206～0.612 nmol/L，平均 EC_{50} 値（標準誤差）は 0.389 (0.057) nmol/L であった（図 2.6.2-5，DD[redacted]025）。

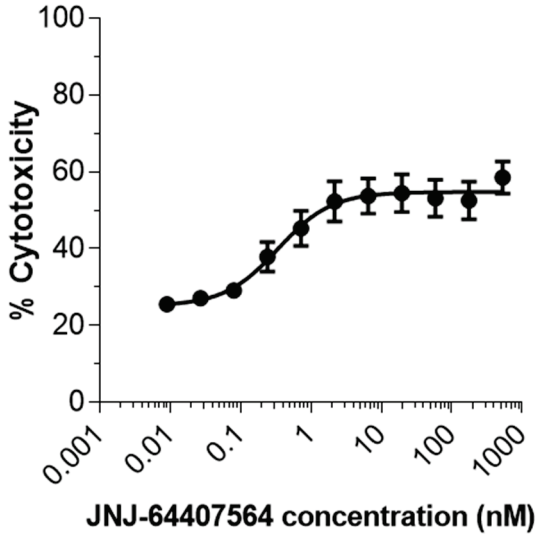


図 2.6.2-5 全血モデルにおける H929 細胞に対するトアルクエタマブの細胞傷害活性（48 時間共培養）

Source: DD[redacted]025
JNJ-64407564 = talquetamab; nM = nmol/L.
Note: Cytotoxicity was measured by flow cytometry. Graph above depicts the mean of 6 individual donors. Mean ± standard error of the mean is shown.

続いて全血モデルにおけるトアルクエタマブの T 細胞活性化及びサイトカイン放出作用を評価した。活性化 T 細胞の指標として，CD3 陽性 T 細胞のうち CD25 陽性を示す T 細胞の割合を測定したところ，トアルクエタマブは濃度依存的に T 細胞活性化を誘導し，6 例のドナーから得られた EC_{50} の個別値の範囲は 0.124～0.407 nmol/L，平均 EC_{50} 値（標準誤差）は 0.236 (0.052) nmol/L であった（図 2.6.2-6）。培養上清中に放出された種々のサイトカイン（IFN-γ，TNF-α，IL-1β，IL-2，IL-4，IL-6，IL-8 及び IL-10）の濃度を測定した結果，本全血モデルにおける各サイトカイン濃度の平均 EC_{50} 及び EC_{20} 値は表 2.6.2-2 のとおりであった（DD[redacted]025）。

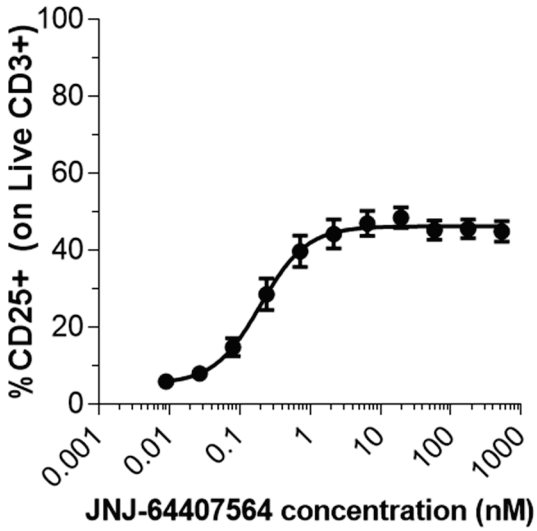


図 2.6.2-6 全血モデルにおけるトアルクエタマブの T 細胞活性化作用

（48 時間共培養）

Source: DD[redacted]025
CD3 = cluster of differentiation 3; CD25 = cluster of differentiation 25; Conc. = concentration; JNJ-64407564 = talquetamab; nM = nmol/L.
Note: T cell activation was measured by flow cytometry. Graph above depicts the mean of 6 individual donors. Mean ± standard error of the mean is shown.

表 2.6.2-2 全血モデルにおけるトアルクエタマブのサイトカイン放出誘導

（平均 EC_{50} 及び EC_{20} 値）

Cytokine	n	EC_{50} (nmol/L)	EC_{20} (nmol/L)
IFN-γ	4	0.639 ± 0.177	0.245 ± 0.038
TNF-α	6	0.598 ± 0.096	0.228 ± 0.052
IL-2	4	0.554 ± 0.051	0.272 ± 0.051
IL-1β	3	0.285 ± 0.071	0.160 ± 0.071
IL-4	6	0.627 ± 0.060	0.277 ± 0.069
IL-6	5	0.454 ± 0.124	0.099 ± 0.045
IL-8	5	0.500 ± 0.099	0.105 ± 0.046
IL-10	6	0.107 ± 0.033	0.032 ± 0.012

Source: DD[redacted]025
EC_{20} = 20% maximal effective concentration; EC_{50} = half-maximal effective concentration
Note: Mean ± standard error of the mean is shown.

2.6.2.2.1.6 患者由来の CD138 陽性多発性骨髄腫骨髄細胞に対するトアルクエタマブの結合，細胞傷害活性及び T 細胞活性化作用

資料番号 4.2.1.1.2

よりヒトの病態を反映する標的細胞を用いてトアルクエタマブの機能活性を評価するため，6 例の多発性骨髄腫患者の骨髄単核細胞（標的細胞である骨髄腫細胞が含まれる）と健康ドナー由来の T 細胞（エフェクター細胞）を 1:1 の比で 48 時間共培養し，トアルクエタマブの骨髄腫細胞に対する結合，細胞傷害活性及び T 細胞活性化作用を評価した。

トアルクエタマブは全ての患者の多発性骨髄腫細胞（CD138 陽性の形質細胞）に対して濃度依存的な結合及び細胞傷害活性を示した。CD138 陽性形質細胞の減少を指標に測定した細胞傷害活性の平均 EC_{50} 及び EC_{90} 値（標準誤差）は，それぞれ 0.124 (0.068)及び 0.972 (0.371) nmol/L であ

った（図 2.6.2-7A，B）。同時に濃度依存的な T 細胞活性化も認められ，平均 EC_{50} 及び EC_{90} 値（標準誤差）はそれぞれ 0.061 (0.023)及び 0.489 (0.223) nmol/L であった。対照抗体（null×CD3 及び GPRC5D×null）は，1 例の検体（>10 nmol/L でわずかな T 細胞活性化を伴う細胞傷害活性が認められた　MM-1*　）を除き，明らかな細胞傷害及び T 細胞活性化を誘導しなかった。

以上のデータから，トアルクエタマブは多発性骨髄腫患者の *ex vivo* 骨髄単核細胞に対して細胞傷害を誘導することが示された（DD[redacted]025）。なお，本試験で 6 例の患者検体から得られた細胞傷害活性の EC_{90} の最大値［2.398 nmol/L（353 ng/mL）］は，臨床試験におけるトアルクエタマブの有効投与量の予測に使用した【2.7.2.2.1】。

(A)

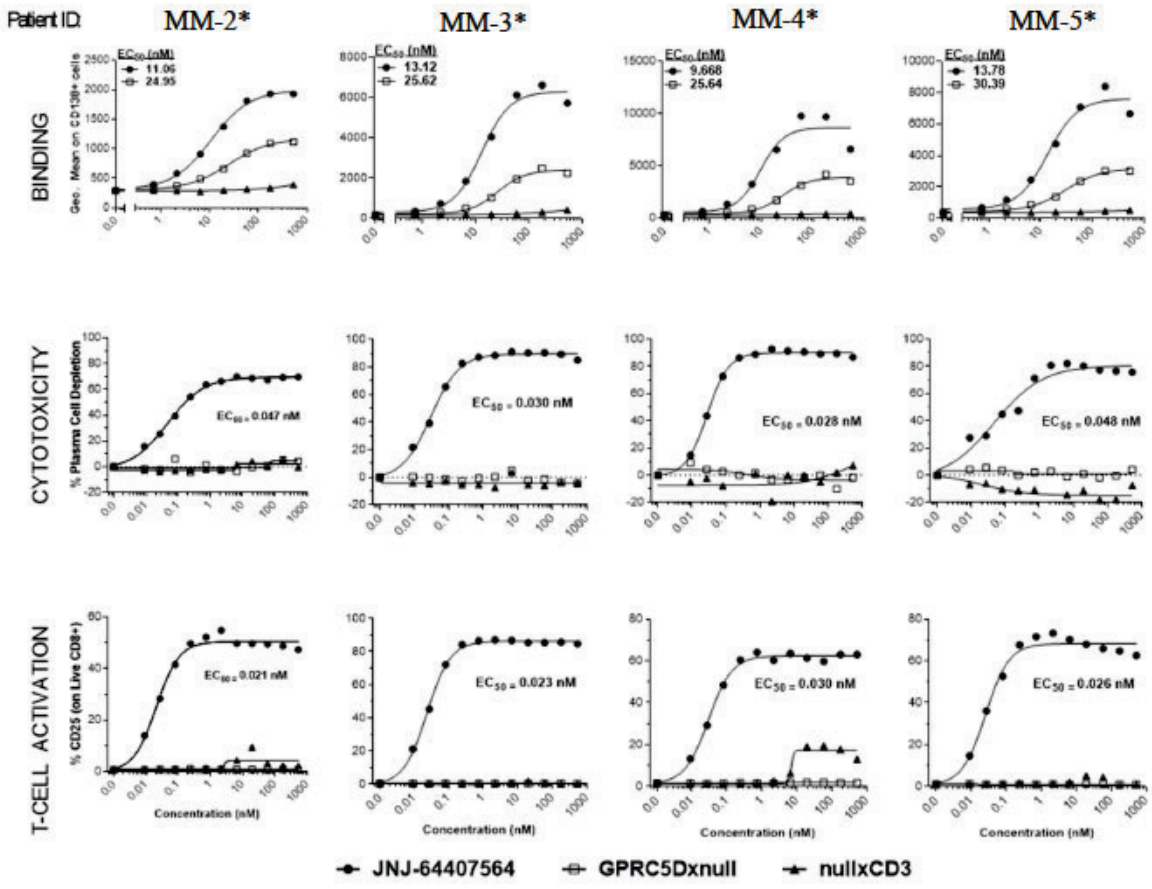


図 2.6.2-7 多発性骨髄腫患者由来の骨髄単核細胞に対するトアルクエタマブの結合，細胞傷害活性及び T 細胞活性化作用

(B)

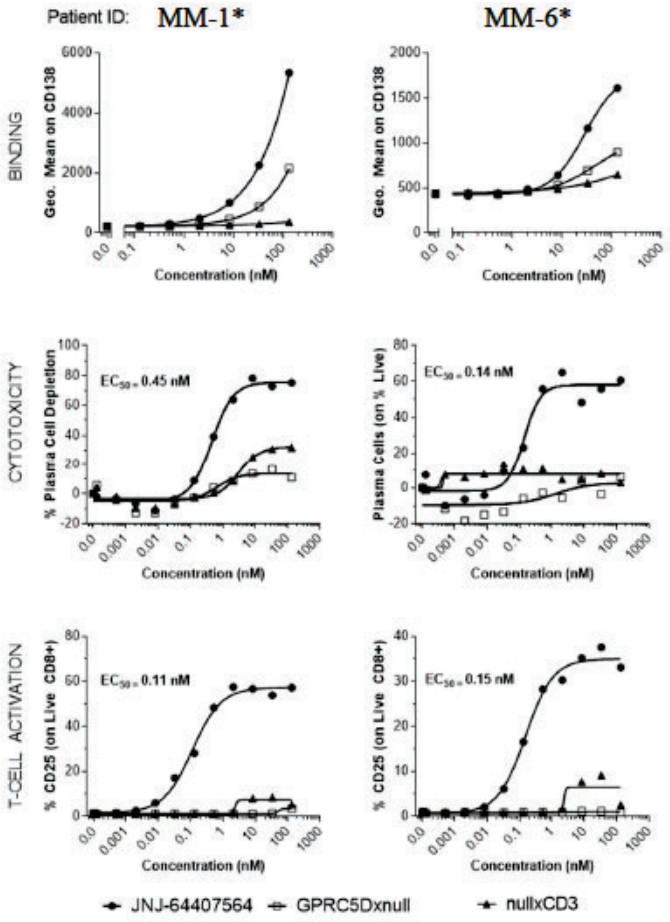


図 2.6.2-7 多発性骨髄腫患者由来の骨髄単核細胞に対するトアルクエタマブの結合，細胞傷害活性及び T 細胞活性化作用（続き）

Source: DD[redacted]025
BMMNC = bone marrow aspirate mononuclear cells; CD8 = cluster of differentiation 8; CD25 = cluster of differentiation 25; CD138 = cluster of differentiation 138; EC_{50} = half-maximal effective concentration; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; IgG4 = immunoglobulin G4; JNJ-64407564 = talquetamab; MM = multiple myeloma; nM = nmol/L; SEM = standard error of the mean.
Circle indicates GPRC5D×CD3 antibody, square indicates GPRC5D×null antibody, and triangle indicates null×CD3 antibody.
Note: Figure A) Frozen bone marrow-derived mononuclear cells from 4 different subjects (MM-2* , MM-3* , MM-4* , and MM-5*) were used to assess talquetamab binding, compared to IgG4 isotype (CNTO 9412, top panel), plasma cell cytotoxicity (middle) and T cell activation (bottom). For the cytotoxicity assay, T cells from the [redacted] normal healthy donor were exogenously added to subject BMMNC samples and incubated with talquetamab, GPRC5D×null or null×CD3 for 48 hours. The talquetamab antibody binds to plasma cells in a dose-dependent manner in all donor samples and the mean fluorescence intensities were depicted on the Y-axis. Note the loss of live plasma cells (CD138-positive) and the concomitant upregulation of CD25 on T cells in response to talquetamab treatment. Two additional MM subject samples were tested using talquetamab (produced in small batches) and show similar binding, killing, and T cell activation profiles. The donor-specific EC_{50} values for cytotoxicity and EC_{50} values for T cell activation are indicated on the graphs. Mean EC_{50} values obtained from 6 subject samples were 0.127 nM for the killing assay and 0.061 nM for the T cell activation assay. Binding EC_{50} values were not determined as saturation was not achieved in these assays.

2.6.2.2.1.7　多発性骨髄腫患者の自己骨髄腫細胞に対するトアルクエタマブの細胞傷害活性

初発の多発性骨髄腫，再発又は難治性多発性骨髄腫，及びダラツムマブに難治性の多発性骨髄腫患者由来の骨髄検体（標的細胞である自己骨髄腫細胞，及びエフェクター細胞である自己 T 細胞が含まれる）を用いて，トアルクエタマブの細胞傷害活性を評価した（Verkleij 2021）。患者由来の自己検体に種々の濃度（0.00128～4 μg/mL）のトアルクエタマブを添加後 48 時間培養し，

フローサイトメトリーを用いて細胞傷害活性（CD138/CD38 陽性多発性骨髄腫細胞の減少を指標に測定），T 細胞活性化（CD25 発現を指標に測定）及び脱顆粒（CD107a 発現を指標に測定）を評価した。

トアルクエタマブは，異なる治療歴を有する患者由来の多発性骨髄腫細胞に対して自己 T 細胞を介した細胞傷害を誘導した（図 2.6.2-8）。初発の多発性骨髄腫，再発又は難治性多発性骨髄腫，及びダラツムマブに難治性の多発性骨髄腫患者由来の骨髄腫細胞に対するトアルクエタマブの細胞傷害活性は同程度であった。また，トアルクエタマブによる細胞傷害活性と関連して，T 細胞の活性化及び脱顆粒が認められた。

以上のデータから，トアルクエタマブは多発性骨髄腫患者の *ex vivo* 自己骨髄検体においても細胞傷害を誘導することが示された（Verkleij 2021）。

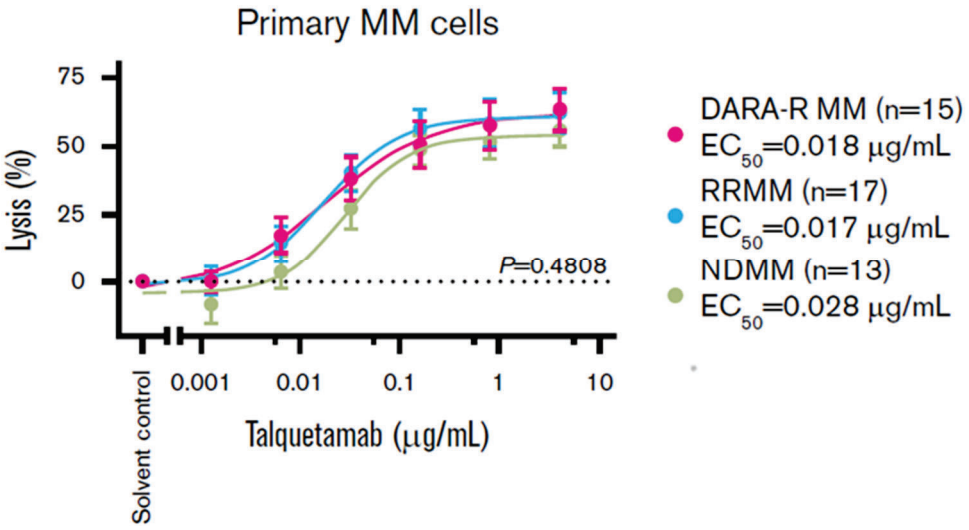


図 2.6.2-8 多発性骨髄腫患者の自己骨髄検体におけるトアルクエタマブの細胞傷害活性

Source: Verkleij 2021
Dara-R MM = daratumumab-refractory multiple myeloma; NDMM = newly diagnosed multiple myeloma; RRMM = relapsed/refractory multiple myeloma.

2.6.2.2.1.8 BCMA 欠損多発性骨髄腫細胞に対するトアルクエタマブの細胞傷害活性及び T 細胞活性化作用

資料番号 4.2.1.1.9

近年，多発性骨髄腫の治療選択肢として BCMA を標的とした T 細胞免疫療法（CAR-T 療法及び二重特異性抗体等）の臨床的有用性が証明されているが，これらの BCMA 標的治療に対する耐性機序として，BCMA 抗原の消失又は減少が報告されている（Zhou 2023）。一方，多発性骨髄腫細胞における GPRC5D タンパク質は，BCMA と独立して発現することが知られている（Smith 2019）。BCMA 抗原が消失した多発性骨髄腫に対してトアルクエタマブが細胞傷害を誘導できるかを検討するため，BCMA 欠損多発性骨髄腫細胞株（H929-BCMA-KO）と健康ドナー由来 T 細胞（4 例）を用いた共培養試験（72 時間培養，E:T 比=3:1）を実施した。

トアルクエタマブは，BCMA 欠損多発性骨髄腫細胞株に対して濃度依存的な T 細胞介在性の細胞傷害を誘導し，野生型 H929（BCMA 及び GPRC5D 発現）及び H929-BCMA-KO（GPRC5D 発現）に対する平均 EC_{50} 値は，それぞれ 0.243 及び 0.761 nmol/L であった（図 2.6.2-9，

4.2.1.1.9/DD[redacted]023; Pillarisetti 2020）。同時に，トアルクエタマブは T 細胞活性化（CD25 発現）を誘導し，野生型 H929 及び H929-BCMA-KO と共培養したときの平均 EC_{50} 値は，それぞれ 0.233 及び 0.633 nmol/L であった。一方，BCMA×CD3 抗体（テクリスタマブ）は H929-BCMA-KO に対して明確な細胞傷害及び T 細胞活性化を誘導しなかった。対照抗体は，いずれの細胞株に対しても機能活性を示さなかった。

以上のことから，トアルクエタマブは BCMA 欠損多発性骨髄腫細胞株に対して細胞傷害を誘導することが示された。

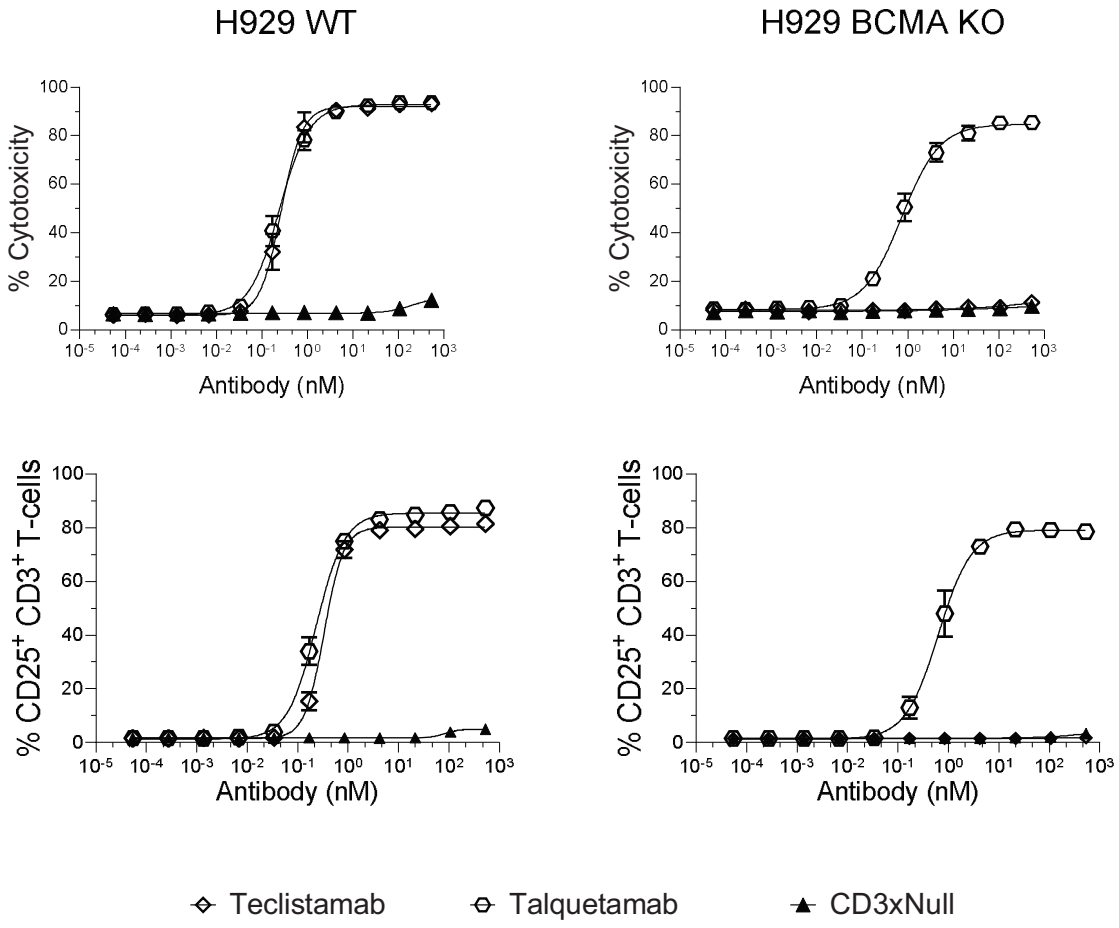


図 2.6.2-9 BCMA 欠損多発性骨髄腫細胞株に対するトアルクエタマブの細胞傷害活性及び T 細胞活性化作用

Source: DD[redacted]023
BCMA = B-cell maturation antigen; CD = cluster of differentiation; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; nM = nmol/L; SEM = standard error of the mean.
Hexagon indicates GPRC5DxCD3 antibody, rhombus indicates BCMAxCD3 antibody, and triangle indicates nullxCD3 antibody.
Note: T cells from 4 healthy donors were tested in T-cell redirection assays with the indicated cell lines and antibodies at an E:T ratio of 3:1 for 72 hours. H929 cells are BCMA+GPRC5D+.Target cell death was expressed as % cytotoxicity. T-cell activation was measured as % CD25+CD3+ T cells calculated relative to total live T cells. Data are averaged (single point per condition per donor) and means ± SEM are graphed.

2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験

2.6.2.2.2.1 ヒト多発性骨髄腫細胞異種移植マウスモデルにおけるトアルクエタマブの抗腫瘍効果

資料番号 4.2.1.1.10

PBMC 又は T 細胞ヒト化 NSG マウスを用いた GPRC5D 発現多発性骨髄腫異種移植モデル（予防及び治療モデル）でトアルクエタマブの *in vivo* 抗腫瘍効果を評価した。予防モデルでは，多発性骨髄腫細胞（H929）の移植時に被験薬の投与を開始し，治療モデルでは，腫瘍（MM.1S 及び RPMI 8226）の生着確認後に被験薬の投与を開始した。

予防モデル（H929）

Day -7 に 1×10^7 個のヒト PBMC（エフェクター細胞）を NSG マウスに静脈内移植した後，Day 0 に 5×10^6 個の H929 細胞を皮下移植し，同日からトアルクエタマブを 0（PBS），0.1，1 及び 10 µg/例（0.005，0.05 及び 0.5 mg/kg に相当）で Day 0，3，5，7 及び 10 に静脈内投与した（10 例/群）。

トアルクエタマブは，いずれの用量でも顕著な抗腫瘍効果を示し，1 及び 10 µg/例では PBS 投与群と比較して腫瘍形成及び増殖を完全に抑制した（p<0.05，Day 19）（図 2.6.2-10，4.2.1.1.10/DD[redacted]029）。

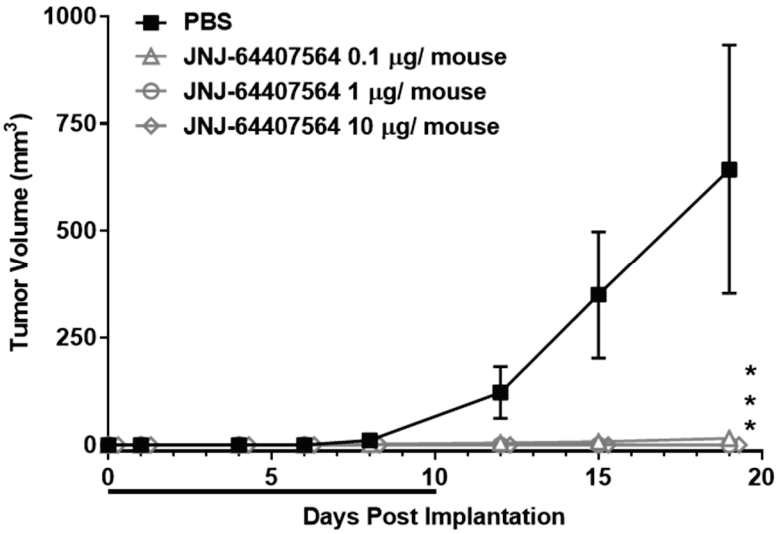


図 2.6.2-10 H929 異種移植マウスモデルにおけるトアルクエタマブの抗腫瘍効果（予防モデル）

Source: DD[redacted]029

ANOVA = analysis of variance; CD3 = cluster of differentiation 3; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; JNJ-64407564 = talquetamab; MM = multiple myeloma; NSG = NOD/scid$\gamma_c^{-/-}$; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; PBS = phosphate buffered saline; SEM = standard error of the mean.

Note: The figure shows the H929 prophylactic model. NSG mice were intravenously engrafted with human PBMCs on Day -7. One week later on Day 0, mice were subcutaneously inoculated with H929 MM cells, and then intravenously dosed with GPRC5D×CD3 bispecific talquetamab at 0.1, 1, or 10 µg (equivalent to 0.005, 0.05, and 0.5 mg/kg, respectively). Subsequent dosing occurred on Days 0, 3, 5, 7, and 10. Subcutaneous tumors were calipered twice weekly and the results presented as average tumor volume, expressed in mm^3 ± SEM of each group. Talquetamab antibody treatment when dosed at 0.1 µg/animal (0.005 mg/kg), 1 µg/animal (0.05 mg/kg), or 10 µg/animal (0.5 mg/kg) had significant antitumor efficacy compared to PBS ($p<0.05$). Statistical significance was evaluated using a 1-way ANOVA with multiple comparisons using Dunnett's post-test using GraphPad Prism software (version 7). Differences between groups were considered significant when the probability value (p) was ≤0.05.

治療モデル（MM.1S）

Day 0 に 1 × 10^7 個の MM.1S 細胞を NSG マウス皮下に異種移植し，Day 7 に 1 × 10^7 個のヒト PBMC（エフェクター細胞）を静脈内移植した。腫瘍の生着（平均腫瘍体積は約 75 mm^3）を確認した Day 14 に群分けし（N=10/群），トアルクエタマブを 0（PBS），0.1，1，10 及び 50 µg/例（0.005，0.05，0.5 及び 2.5 mg/kg に相当）で Day 15，18，22，24，29，32 及び 36 に静脈内投与した。

トアルクエタマブは用量依存的な抗腫瘍効果を示し，PBS 投与群と比較して 1，10 及び 50 µg/例で腫瘍増殖をそれぞれ 65%，100%及び 100%抑制した（p<0.05，Day 36，図 2.6.2-11）。一方，0.1 µg/例のトアルクエタマブ及び対照抗体（null×CD3 及び GPRC5D×null，いずれも 10 µg/例）では明確な抗腫瘍効果は認められなかった。Day 36 以降，移植片対宿主病に起因する顕著な体重減少又は死亡が生じ，Day 43 には全群で 1 群あたりの生存率が 60%以下となったため，試験を終了した。試験終了時点において 10 及び 50 µg/例では全例で腫瘍が消失していた（DD[redacted]029）。

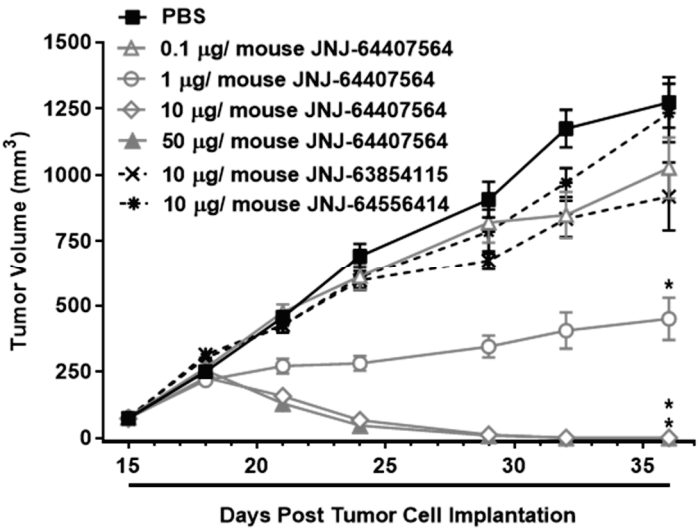


図 2.6.2-11 MM.1S 異種移植マウスモデルにおけるトアルクエタマブの抗腫瘍効果（治療モデル）

Source: DD[redacted]029
ANOVA = analysis of variance; CD3 = cluster of differentiation 3; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; IV = intravenous; JNJ-64407564 = talquetamab; MM = multiple myeloma; NSG = NOD/scidγc$^{-/-}$; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; PBS = phosphate buffered saline; SC = subcutaneous; SEM = standard error of the mean; TGI = tumor growth inhibition.
Note: NSG mice were SC implanted with MM.1S human multiple myeloma cells on Day 0. Human PBMC were IV inoculated on study Day 7. PBS, talquetamab (0.1 1, 10, or 50 µg/animal [equivalent to 0.005, 0.05, 0.5, and 2.5 mg/kg, respectively]) and Null control antibodies (null×CD3 [JNJ-63854115] and GPRC5D×null [JNJ-64556414], 10 µg/animal) were IV dosed on Days 15, 18, 22, 24, 29, 32, and 36. Subcutaneous tumors were measured twice weekly and the results were presented as the mean tumor volume, expressed mm^3 ± SEM of each group. Talquetamab antibody treatment when dosed at 1 µg/animal (0.05 mg/kg) significantly inhibited subcutaneous tumor growth compared to PBS (TGI=65%, p≤0.05). Talquetamab doses of 10 µg/animal (0.5 mg/kg) and 50 µg/animal (2.5 mg/kg) completely regressed tumor growth (p≤0.05). The null control antibodies had negligible or no effect. Statistical significance was evaluated on Day 36 using a 1-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. Differences between groups were considered significant when the probability value (p) was ≤0.05.

治療モデル（RPMI 8226）

Day 0 に 9×10^6 個の RPMI 8226 細胞を NSG マウス皮下に異種移植し，Day 19 に 2×10^7 個のヒト T 細胞（エフェクター細胞）を静脈内移植した。腫瘍の生着（平均腫瘍体積は約 57 mm^3）を確認した Day 19 に群分けし（N=10/群），トアルクエタマブを 0（PBS），1，10 及び 50 μg/例（0.05，0.5 及び 2.5 mg/kg に相当）で Day 22，26，29，33，36 及び 40 に静脈内投与した。

RPMI 8226 腫瘍に対しては，いずれの用量でもトアルクエタマブによる抗腫瘍効果は認められなかった。これは RPMI 8226 細胞では GPRC5D の発現量が低いことに起因すると考えられる（DD[redacted]024）。

2.6.2.2.3 毒性試験に用いる薬理学的に適切な動物種の同定及びサロゲート抗体の作製

資料番号 4.2.1.1.11，4.2.1.1.12，4.2.1.1.13，4.2.1.1.14，4.2.1.1.15，4.2.1.1.16

一般的に，CD3 結合アームを有する二重特異性抗体が薬理作用を発揮するには，T 細胞上の CD3 及び標的細胞上の腫瘍関連抗原（GPRC5D）に抗体が結合することにより三分子複合体を形成する必要がある。トアルクエタマブの薬物動態及び毒性試験に用いる薬理学的に適切な動物種を同定するため，配列相同性，標的結合親和性，*in vitro* 機能活性及び GPRC5D の発現プロファイルを検討した。

薬理学的に適切な動物種の同定

カニクイザル CD3ε は，ヒト CD3ε の細胞外ドメインと比較して 88%の配列相同性を有し，トアルクエタマブのエピトープ部位の配列は完全に保存されている（4.2.1.1.11/DS-TEC-51663）。一方，その他の実験動物種であるマウス，ラット，モルモット及びブタの CD3ε のヒトに対する配列相同性は，それぞれ 63%，57%，59%及び 65%と低く，トアルクエタマブのエピトープ部位の配列はほとんど保存されていない（DS-TEC-51663 及び 4.2.1.1.12/DS-TEC-51660）。CD3 に対するトアルクエタマブの結合プロファイルは，トアルクエタマブ又はトアルクエタマブの作製に用いられた抗 CD3 親抗体（CD3[redacted]）を用いて評価した。フローサイトメトリーを用いて，ヒト及びカニクイザルの T 細胞に対するトアルクエタマブの結合を測定した結果，トアルクエタマブはヒト及びカニクイザル CD3 に対して同程度の結合親和性を示し，K_d 値はそれぞれ 15.1 及び 2.8 nmol/L であった（4.2.1.1.13/DS-TEC-91511）。一方，CD3[redacted] は，マウスの CD3 陽性 T 細胞には結合しなかった（4.2.1.1.14/DS-TEC-102635）。CD3[redacted] がマウス CD3 に結合しなかったこと，及びその他の動物種の CD3ε のヒト CD3ε に対する配列相同性はマウス CD3ε と同程度に低いことを考慮すると，ラット，モルモット，ブタ及びウサギ（NCBI BLAST 解析より配列相同性が低いことを確認）の CD3 もトアルクエタマブに対して交差反応性を示さないと考えられる。

マウス，マーモセット及びカニクイザル／アカゲザルの GPRC5D アミノ酸配列は，ヒトの完全長 GPRC5D に対して，それぞれ 81%，94%及び 96%同一である（DS-TEC-91511）。ヒト，マーモセット及びカニクイザルの GPRC5D に対するトアルクエタマブの結合を測定した結果，トアルクエタマブは hGPRC5D に K_d=189 nmol/L で結合したが，マーモセット GPRC5D には結合せず，cGPRC5D に対する結合は非常に弱いため K_d 値は算出できなかった（DS-TEC-91511）。また，cGPRC5D 発現細胞に対するトアルクエタマブの *in vitro* 機能活性（T 細胞活性化及び細胞傷害活性）は，hGPRC5D 発現細胞と比較して約 100 倍弱かった（4.2.1.1.15/DD[redacted]027）。このこと

と関連して，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験ではトアルクエタマブによる有害作用は認められず，明らかな薬力学的作用も認められなかった【2.6.6.3.1】。

以上の結果から，トアルクエタマブの毒性試験に用いる薬理学的に適切な動物種は同定できなかった。したがって，GPRC5D×CD3 二重特異性抗体のハザードを特定するためにサロゲート抗体（JNJ-64024701）を開発した。

サロゲート抗体（JNJ-64024701）の開発

JNJ-64024701 は，トアルクエタマブと同一の CD3 結合アームを有するが，GPRC5D 結合アームは異なり cGPRC5D と相互作用する。カニクイザルの CD3 及び GPRC5D に対する JNJ-64024701 の結合親和性（K_d 値）は，それぞれ 5.88 及び 280.6 nmol/L であり，ヒトの CD3 及び GPRC5D に対するトアルクエタマブの結合親和性と同程度であった（表 2.6.2-3，DS-TEC-91511）。同様に，ヒト又はカニクイザル T 細胞と cGPRC5D 発現細胞を用いた共培養試験における JNJ-64024701 の *in vitro* 機能活性（T 細胞活性化及び細胞傷害活性）は，hGPRC5D 発現細胞に対するトアルクエタマブの機能活性と同程度であった（表 2.6.2-4，DD[redacted]027）。加えて，カニクイザルの正常組織における GPRC5D の発現は，主として形質細胞及び皮膚の毛包等の角化構造で認められており，ヒトの発現パターンと類似している（2.6.2.2.1.2; 4.2.1.1.16/Histo-071520[redacted]; Smith 2019）。

以上の結果から，カニクイザルを用いた JNJ-64024701 の毒性試験により GPRC5D×CD3 二重特異性抗体のハザードを適切に評価することが可能と判断した。

表 2.6.2-3 hGPRC5D 発現 MM.1R 細胞に対するトアルクエタマブの結合親和性及び cGPRC5D 発現 HEK 細胞に対するサロゲート抗体（JNJ-64024701）の結合親和性

Antibody	K_d (nM) Human GPRC5D	K_d (nM) Cynomolgus Monkey GPRC5D
Talquetamab	189 (95% CI: 149-240)	Not determined (saturation not achieved)
Surrogate antibody (JNJ-64024701)	Not measured	280.6 (95% CI: 199.7-394.1)

CI = confidence interval; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; HEK = human embryonic kidney; K_d = dissociation constant; nM = nmol/L.
Source: DS-TEC-91511

表 2.6.2-4 ヒト及びカニクイザルの GPRC5D 発現細胞に対するトアルクエタマブ及びサロゲート抗体（JNJ-64024701）の *in vitro* 機能活性

Antibody	Assay	Human GPRC5D/ Human T Cells (nM)		Cynomolgus GPRC5D/ Human T Cells (nM)		Cynomolgus GPRC5D/ Cynomolgus T Cells (nM)	
		EC_{50}	EC_{20}	EC_{50}	EC_{20}	EC_{50}	EC_{20}
Talquetamab	Cytotoxicity	0.03	0.01	3.41	1.25	4.01	0.76
	T cell activation	0.03	0.01	3.33	1.65	1.85	0.74
Surrogate antibody (JNJ-64024701)	Cytotoxicity	0.04	0.02	0.07	0.01	0.12	0.02
	T cell activation	0.03	0.01	0.14	0.05	0.19	0.07

EC_{20} = 20% maximal effective concentration; EC_{50} = half-maximal effective concentration; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; HEK = human embryonic kidney; nM = nmol/L.
Note: Data were generated using recombinant human and cynomolgus monkey GPRC5D-overexpressing HEK cell lines and primary human and cynomolgus monkey T cells. HEK-hGPRC5D cells have a receptor density of 2,226 receptors/cell, and the HEK-cGPRC5D cells have a receptor density of 128,584 receptors/cell.
Source: DD[redacted]027

2.6.2.3 副次的薬理試験

資料番号 4.2.1.2.1

In vitro ヒト細胞膜タンパク質アレイを用いて，トアルクエタマブの GPRC5D 結合アーム（GC5[redacted]）の標的結合特異性を評価した。6,232 種のヒトタンパク質（5,861 種の細胞膜タンパク質及び細胞表面に結合した分泌タンパク質，並びに 371 種のヘテロダイマー）を個別に発現するヒト胎児腎細胞に GC5[redacted] を 5 µg/mL で添加したところ，GC5[redacted] は GPRC5D 発現細胞にのみ結合し，他のヒト細胞膜タンパク質に対する相互作用は認められなかった（4.2.1.2.1/TOX14948）。

以上のデータから，トアルクエタマブの GPRC5D 結合アームは標的タンパク質に高い特異性を示し，オフターゲット作用のリスクは低いことが示唆された。

2.6.2.4 安全性薬理試験

資料番号 4.2.1.3.1

トアルクエタマブの安全性評価に用いる薬理学的に適切な動物種は存在しないことから，トアルクエタマブの *in vivo* 安全性薬理試験は実施しなかった。そこで，GPRC5D×CD3 二重特異性抗体のハザードを特定するために，サロゲート抗体（JNJ-64024701）を用いたカニクイザルの 1 カ月間反復静脈内投与毒性試験（GLP）に安全性薬理評価項目（心血管系，呼吸系及び中枢神経系）を組み込み評価した（4.2.1.3.1/T-20[redacted]-009）。当該試験では，カニクイザル（1 群雌雄各 3 例）に JNJ-64024701 を 0（溶媒），10 及び 30 mg/kg で週 1 回静脈内投与した。心電図（I，II，III，aVR，aVL，aVF 及び V2 誘導），血圧，心拍数，体温及び呼吸数を投与前及び Week 2～4 に 2 回ずつ測定し，異常の有無を評価した。中枢神経系評価項目として一般状態を 1 日 1 回評価し，より詳細な一般状態観察を Week -1 から週 1 回実施した。

検討した心血管系，呼吸系及び中枢神経系パラメータに JNJ-64024701 投与に関連した影響は，最高用量の 30 mg/kg/週まで認められなかった。剖検及び病理組織学的検査では，心臓重量に JNJ-64024701 に関連した影響はなく，心臓及び骨格筋に病理組織学的な影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし。

2.6.2.6 考察及び結論

効力を裏付ける試験

トアルクエタマブは，GPRC5D を発現するヒト多発性骨髄腫細胞株（H929，MM.1R 及び OPM-2）に濃度依存的に結合したが，GPRC5D 陰性細胞株（NALM-6 及び Daudi）には結合しなかった。

トアルクエタマブは，GPRC5D 発現多発性骨髄腫細胞株に対して濃度依存的な T 細胞介在性の細胞傷害を誘導し，H929，MM.1R 及び OPM-2 に対する平均 EC_{50} 値は，それぞれ 0.057，0.015

及び 0.214 nmol/L であった。同時に，トアルクエタマブは T 細胞の活性化を誘導し，H929，MM.1R 及び OPM-2 と共培養したときの平均 EC_{50} 値は，それぞれ 0.082，0.014 及び 0.288 nmol/L であった。一方，GPRC5D 陰性細胞株との共培養ではトアルクエタマブの細胞傷害活性及び T 細胞活性化作用は認められなかった。トアルクエタマブは，BCMA 欠損多発性骨髄腫細胞株（BCMA 標的治療に対する耐性機序の一つ）に対しても濃度依存的な T 細胞介在性の細胞傷害を誘導し，野生型 H929（BCMA 及び GPRC5D 発現）及び H929-BCMA-KO（GPRC5D 発現）に対する平均 EC_{50} 値は，それぞれ 0.243 及び 0.761 nmol/L であった。

よりヒト生体内を反映すると考えられる複数のモデルを用いてトアルクエタマブの機能活性を評価した。*In vitro* ヒト全血モデルにおいて，トアルクエタマブは GPRC5D 発現細胞株（H929）に対して，細胞傷害（EC_{50} = 0.389 nmol/L）及び T 細胞活性化（EC_{50} = 0.236 nmol/L）を誘導した。多発性骨髄腫患者由来の骨髄単核細胞を用いた *ex vivo* モデルにおいても，トアルクエタマブは骨髄腫細胞に対して，細胞傷害（EC_{50} = 0.127 nmol/L）及び T 細胞活性化（EC_{50} = 0.061 nmol/L）を誘導した。

PBMC 又は T 細胞ヒト化 NSG マウスを用いた GPRC5D 発現多発性骨髄腫異種移植モデル（予防及び治療モデル）でトアルクエタマブの *in vivo* 抗腫瘍効果を評価した。H929 を用いた予防モデルにおいて，トアルクエタマブ（0.05 及び 0.5 mg/kg）は腫瘍形成及び増殖を完全に抑制した。MM.1S を用いた治療モデルにおいて，トアルクエタマブは用量依存的な抗腫瘍効果を示し，PBS 投与群と比較して 0.05，0.5 及び 2.5 mg/kg で腫瘍増殖をそれぞれ 65%，100%及び 100%抑制した。試験終了時点において 0.5 及び 2.5 mg/kg では全例の腫瘍が消失した。RPMI 8226 を用いた治療モデルでは，トアルクエタマブの抗腫瘍効果は認められなかったが，これは RPMI 8226 細胞の GPRC5D 発現量が低いことに起因すると考えられる。

以上の *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験の結果から，トアルクエタマブは GPRC5D 発現細胞特異的に T 細胞介在性の細胞傷害を誘導する二重特異性抗体であることが示された。

副次的薬理試験及び安全性薬理試験

In vitro ヒト細胞膜タンパク質アレイにおいて，トアルクエタマブの GPRC5D 結合アームは GPRC5D にのみ結合し，オフターゲット結合は認められなかった。このことから，トアルクエタマブによるオフターゲット作用のリスクは低いことが示唆された。

ICH S9，S6 (R1)及び S7A に従い，トアルクエタマブ又は GPRC5D×CD3 サロゲート抗体の独立した安全性薬理試験は実施しなかった。トアルクエタマブの安全性評価に用いる薬理学的に適切な動物種は存在しないことから，GPRC5D×CD3 二重特異性抗体のハザードを特定するために，サロゲート抗体（JNJ-64024701）を用いたカニクイザルの 1 カ月間反復投与毒性試験（GLP）に安全性薬理評価項目（心血管系，呼吸系及び中枢神経系）を組み込んだ。

検討した最高用量の 30 mg/kg/週まで，安全性薬理パラメータに JNJ-64024701 投与に関連した影響は認められなかった。剖検及び病理組織学的検査では，心臓重量に JNJ-64024701 に関連した影響はなく，心臓及び骨格筋に病理組織学的な影響は認められなかった。他の CD3 リダイレクト分子をカニクイザルに投与した試験ではサイトカイン放出に関連すると考えられる低血圧及び頻脈が認められた（Saber 2017）が，本試験では明らかな血中サイトカインの増加，低血圧及び頻脈は認められなかった【2.6.6.3.3】。本試験ではトアルクエタマブではなくサロゲート抗体を用いたため，臨床曝露量に対する曝露量比は算出しなかった。

正常組織における GPRC5D の発現は，形質細胞，並びに皮膚及び舌などの角化した上皮細胞に限定されており，ヒト脳及び肺組織で GPRC5D は発現していない（2.6.2.2.1.2）。また，ヒト組織を用いた *in vitro* 組織交差反応性試験（GLP）では，心臓，骨格筋，脳及び脊髄の細胞膜にトアルクエタマブの特異的染色は認められなかった（T-20[redacted]-040）【2.6.6.8.6.1】。

以上のことから，ヒトに GPRC5D×CD3 二重特異性抗体を投与する上で，心血管系，呼吸系及び中枢神経系に対する重大な懸念は認められなかった。しかしながら，以下に示す理由から，ヒト多発性骨髄腫患者におけるトアルクエタマブのリスクを評価する上で，JNJ-64024701 を用いた正常カニクイザルの非臨床毒性試験で得られたデータは慎重に解釈する必要がある。

- JNJ-64024701 は，ハザードの特定のみを目的として作製されたサロゲート抗体である。そのため，JNJ-64024701 を用いた試験で認められた所見は，トアルクエタマブの毒性を完全には反映しない可能性があること。
- 正常カニクイザルにおいて GPRC5D を発現する形質細胞は，多発性骨髄腫患者（GPRC5D 発現骨髄腫細胞が大量に存在する）に比べて著しく少ないため，CRS 等のオンターゲット毒性を適切に検出できない可能性がある。このことと関連して，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験では JNJ-64024701 による明確な薬力学的及び毒性学的反応は認められなかった【2.6.6.3】。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

Goldsmith R, et al. P-095: Normal human tissue expression of G-protein coupled receptor 5D (GPRC5D), a promising novel target for multiple myeloma, is restricted to plasma cells and hard keratinized tissues. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2021;21(Suppl 2):S91.

Inoue S, et al. The RAIG Family Member, GPRC5D, is associated with hard-keratinized structures. J Invest Dermatol. 2004;122:565-73.

Kodama T, et al. Anti-GPRC5D/CD3 bispecific T-cell-redirecting antibody for the treatment of multiple myeloma. Mol Cancer Ther. 2019;18(9):1555-64.

Pillarisetti K, et al. A T-cell-redirecting bispecific G-protein-coupled receptor class 5 member D x CD3 antibody to treat multiple myeloma. Blood. 2020;135(15):1232-43.

Saber H, et al. An FDA oncology analysis of CD3 bispecific constructs and first-in-human dose selection. Regul Toxicol Pharmacol. 2017;90:144-52.

Smith EL, et al. GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells. Sci Transl Med. 2019;11(485):eaau7746.

Venkateshaiah SU, et al. GPRC5D Is a Cell Surface Plasma Cell Marker Whose Expression Is High In Myeloma Cells and Reduced Following Coculture With Osteoclasts. Blood. 2013;122(21): Poster 651.

Verkleij CPM, et al. Preclinical activity and determinants of response of the GPRC5DxCD3 bispecific antibody talquetamab in multiple myeloma. Blood Adv. 2021;5(8):2196-215.

Zhou X, et al. BCMA loss in the epoch of novel immunotherapy for multiple myeloma: from biology to clinical practice. Haematologica. 2023;108(4):958-68.

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: JNJ-64407564 (talquetamab)[a] or JNJ-64024701 (surrogate antibody)[b]

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/Formulation)	GLP	Test Facility	Study No./ Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Binding profile in whole blood	FACS	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]026/ 4.2.1.1.1
GPRC5D expression by IHC method development	IHC on normal human FFPE tissues	In vitro	No	JRD (San Diego, CA, US)	Histo-022120[redacted]/ 4.2.1.1.3
GPRC5D expression by ISH assay development	ISH on normal human FFPE tissues	In vitro	No	JRD (San Diego, CA, US)	Histo-040920[redacted]/ 4.2.1.1.4
GPRC5D expression on normal human tissues	IHC and ISH	In vitro	No	JRD (San Diego, CA, US)	Histo-072420[redacted]/ 4.2.1.1.5
GPRC5D expression on normal human tissues (oral cavity)	IHC and ISH	In vitro	No	JRD (San Diego, CA, US)	Histo-101620[redacted]/ 4.2.1.1.6
GPRC5D expression on normal human tissues	IHC and ISH	In vitro	No	JRD (San Diego, CA, US)	Histo-062920[redacted]/ 4.2.1.1.7
GPRC5D expression on normal human tissues[d]	TaqMan	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]024/ 4.2.1.1.8
Binding profile on multiple myeloma cell lines[e]	Human endogenous GPRC5D-expressing cell lines, FACS	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]025/ 4.2.1.1.2
T cell-dependent cytotoxicity in GPRC5D-expressing cell lines	Human endogenous GPRC5D-expressing cell lines, human pan T cells, FACS	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]025/ 4.2.1.1.2
Talquetamab-mediated T cell-dependent cytotoxicity of H929 cells in healthy whole blood	Healthy human whole blood spiked with MM H929 cell lines	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]025/ 4.2.1.1.2
Talquetamab-mediated T cell activation	Human endogenous GPRC5D-expressing cell lines, human pan T cells, FACS	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]025/ 4.2.1.1.2
Talquetamab-mediated cytokine release	Human endogenous GPRC5D-expressing cell lines, human pan T cells, [redacted]	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]025/ 4.2.1.1.2
Talquetamab-mediated T cell activation in healthy whole blood	Healthy human whole blood spiked with MM H929 cell lines	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]025/ 4.2.1.1.2
Talquetamab-mediated T cell-dependent cytotoxicity of frozen primary MM bone marrow MNC samples	Human MM subject bone marrow MNC samples, FACS	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]025/ 4.2.1.1.2
Talquetamab-mediated T cell-dependent cytotoxicity of H929-BCMA-KO cells	Human BCMA-deficient cell line, human pan T cells, FACS	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]023/ 4.2.1.1.9

(Continued)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: JNJ-64407564 (talquetamab)[a] or JNJ-64024701 (surrogate antibody)[b]

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/Formulation)	GLP	Test Facility	Study No./ Location in CTD
Primary Pharmacodynamics (Continued)					
Efficacy in prophylactic H929 model of human MM in PBMC humanized NSG mice	Subcutaneous H929 ($GPRC5D^+$) inoculation, engrafted human healthy PBMCs	In vivo	No	JRD[c]	DD[redacted]029/ 4.2.1.1.10
Efficacy in established model of human MM in PBMC humanized NSG mice	Subcutaneous MM.1S ($GPRC5D^+$) inoculation, engrafted human healthy PBMCs	In vivo	No	JRD[c]	DD[redacted]029/ 4.2.1.1.10
Efficacy in established model of human MM in PBMC humanized NSG mice	Subcutaneous RPMI8226 ($GPRC5D^+$) inoculation, engrafted human healthy T cells	In vivo	No	JRD[c]	DD[redacted]029/ 4.2.1.1.10
Binding to murine CD3ε of JNJ-[redacted] (talquetamab CD3 binding arm)	Human T cells and negative staining in mouse T cells	In vitro	No	JRD[c]	DS-TEC-102635/ 4.2.1.1.14
Amino acid sequence identity for the GPRC5D protein across species	Primary sequence alignment	Data review	No	JRD[c]	DS-TEC-91511/ 4.2.1.1.13
Nonclinical species cross-reactivity	cGPRC5D over-expressing HEK cells	In vitro	No	JRD[c]	DS-TEC-91511/ 4.2.1.1.13
Nonclinical species cross-reactivity	Marmoset GPRC5D-transfected HEK cells	In vitro	No	JRD[c]	DS-TEC-91511/ 4.2.1.1.13
Functional activity of talquetamab and the surrogate antibody to human and cynomolgus monkey GPRC5D	hGPRC5D and cGPRC5D-expressing HEK target cells	In vitro	No	JRD[c]	DD[redacted]027/ 4.2.1.1.15
Identification and selection of GPRC5D arm of the antibody	Antibody generation	In vitro	No	JRD[c]	DS-TEC-91511/ 4.2.1.1.13
Identification and selection of CD3 arm of the antibody	Antibody generation	In vitro	No	JRD[c]	DS-TEC-51660/ 4.2.1.1.12
Amino acid sequence identity for the CD3 protein across species	Primary sequence alignment	In vitro	No	JRD[c]	DS-TEC-51663/ 4.2.1.1.11
GPRC5D expression on normal cynomolgus monkey tissues	IHC and ISH	In vitro	No	JRD (San Diego, CA, US)	Histo-071520[redacted]/ 4.2.1.1.16
Secondary Pharmacodynamics					
Binding profile in a human plasma membrane protein array for the GPRC5D binding arm of talquetamab	HEK cells individually expressing 6,232 human proteins	In vitro	No	[redacted] (, UK)	TOX14948/ 4.2.1.2.1

(Continued)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: JNJ-64407564 (talquetamab)[a] or JNJ-64024701 (surrogate antibody)[b]

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/Formulation)	GLP	Test Facility	Study No./ Location in CTD
Safety Pharmacology					
Safety pharmacology assessments[f] for the surrogate antibody in a 1-month toxicity study[g]	Cynomolgus monkey	IV (slow bolus), weekly for 4 weeks (buffer formulation[h])	Yes	[redacted] ([redacted], [redacted], US)	T-20[redacted]-009/ 4.2.3.2.3
Pharmacodynamic Drug Interactions	No study conducted				

[a] The test article is talquetamab (JNJ-64407564) unless otherwise noted.
[b] The surrogate antibody (JNJ-64024701) has cross-reactivity to cGPRC5D that is similar to that of talquetamab and was considered pharmacologically relevant in cynomolgus monkey.
[c] The JRD facility location is Spring House, PA, US unless noted.
[d] TaqMan primers and probes were used to detect GPRC5D mRNA.
[e] Commercial antibody was used to measure receptor expression.
[f] Cardiovascular and respiratory system evaluations were performed on conscious monkeys twice prestudy and during Weeks 2 and 4 and included qualitative assessment of electrocardiogram parameters (leads I, II, III, aVR, aVL, aVF, and V2), blood pressure, heart rate, and respiration rate. CNS endpoints were evaluated via daily cage-side and detailed clinical observations beginning Week -1; postdose observations conducted 1 to 2 hours after dosing on Day 1; and by the measurement of body temperatures of conscious animals twice prestudy and during Weeks 2 and 4.
[g] A pharmacologically relevant animal model could not be identified for talquetamab (Mod2.6.2.2.3). The cynomolgus monkey was determined to be not pharmacologically relevant because talquetamab poorly bound to cGPRC5D and elicited at least 100-fold lower in vitro pharmacologic activity in cells expressing cGPRC5D compared to human GPRC5D. Based on the poor cross-reactivity, and lack of adverse effects and minimal pharmacodynamic effects observed in an exploratory 4-week tolerability study (Mod2.6.6.3.1), further nonclinical safety studies with talquetamab in the cynomolgus monkey were not considered useful for human risk assessment. Therefore, for hazard identification, repeat-dose toxicity studies in the cynomolgus monkey were conducted with the surrogate antibody (JNJ-64024701) and the pivotal 1-month toxicity study included safety pharmacology assessments.
[h] The buffer formulation contained [redacted] mM [redacted], [redacted]% [redacted], [redacted]% polysorbate 20, and [redacted] µg/mL EDTA at pH [redacted]

CA = California; CD3 = cluster of differentiation 3; CD3ε = cluster of differentiation 3 epsilon chain; cGPRC5D = cynomolgus monkey GPRC5D; [redacted] = [redacted]; EDTA = ethylenediamine tetra-acetic acid; FACS = fluorescence-activated cell sorting; FPPE = formalin-fixed paraffin-embedded; GLP = Good Laboratory Practice; GPRC5D = G Protein-coupled receptor family C group 5 member D; HEK = human embryonic kidney; IHC = immunohistochemistry; ISH = in situ hybridization; IV = intravenous; JRD = Janssen Research & Development, LLC; MM = multiple myeloma; MNC = mononuclear cells; mRNA = messenger ribonucleic acid; [redacted] = [redacted]; NSG = NOD/scidγc$^{-/-}$; [redacted] = [redacted]; PA = Pennsylvania; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; UK = United Kingdom; US =United States.

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の詳細は概要文中に記載した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験の詳細は概要文中に記載した。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: JNJ-64024701 (surrogate antibody)[a,b]

Organ Systems Evaluated	Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/Formulation)	Doses (mg/kg)	Noteworthy Findings	GLP	Study No./ Location in CTD
Cardiovascular, respiratory, and CNS assessments[c] in a 1-month hazard identification study	Cynomolgus monkey (3/sex/group)	IV (slow bolus), weekly for 4 weeks (buffer formulation[d])	0, 10, 30 (JNJ-64024701)	The surrogate antibody (JNJ-64024701) had no effects on cardiovascular, respiratory, or CNS parameters.[c] In addition, gross and microscopic pathology revealed no treatment-related effects on heart weight or histomorphological effects on the heart or skeletal muscles.	Yes	T-20[redacted]-009/ 4.2.3.2.3

[a] The surrogate antibody (JNJ-64024701) has cross-reactivity to cGPRC5D that is similar to that of talquetamab and was considered pharmacologically relevant in cynomolgus monkey (Mod2.6.2.2.3).

[b] A pharmacologically relevant animal model could not be identified for talquetamab. Cynomolgus monkey was determined to be not pharmacologically relevant because talquetamab poorly bound to cGPRC5D and elicited at least 100-fold lower in vitro pharmacologic activity in cells expressing cGPRC5D compared to hGPRC5D. Based on the poor cross-reactivity and lack of adverse effects and minimal pharmacodynamic effects observed in an exploratory 4-week tolerability study, further nonclinical safety studies with talquetamab in the cynomolgus monkey were not considered useful for human risk assessment. Therefore, for hazard identification, studies were conducted with the surrogate antibody. (Mod2.6.2.2.3)

[c] Cardiovascular and respiratory system evaluations were performed on conscious monkeys twice prestudy and during Weeks 2 and 4 and included qualitative assessment of electrocardiogram parameters (leads I, II, III, aVR, aVL, aVF, and V2), blood pressure, heart rate, and respiration rate. CNS endpoints were evaluated via daily cage-side and detailed clinical observations beginning Week -1; postdose observations conducted 1 to 2 hours after dosing on Day 1; and by the measurement of body temperatures of conscious animals twice prestudy and during Weeks 2 and 4.

[d] Buffer formulation contained [redacted] mM [redacted], [redacted]% [redacted], [redacted]% polysorbate 20, and [redacted] µg/mL EDTA at pH[redacted].

cGPRC5D = cynomolgus monkey GPRC5D; CNS = central nervous system; EDTA = ethylenediamine tetra-acetic acid; GLP = Good Laboratory Practice; GPRC5D = G protein-coupled receptor family C group 5 member; hGPRC5D = human GPRC5D; IV = intravenous; No. = number.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし。