目次

略語一覧 2
1. タファシタマブ（遺伝子組換え）の構造....3
2. 薬理学的特性....3
3. 申請された臨床適応、用量及び投与期間に関する情報....4
4. 参考文献....4

図一覧

Figure 1: タファシタマブの構造図....3

略語一覧

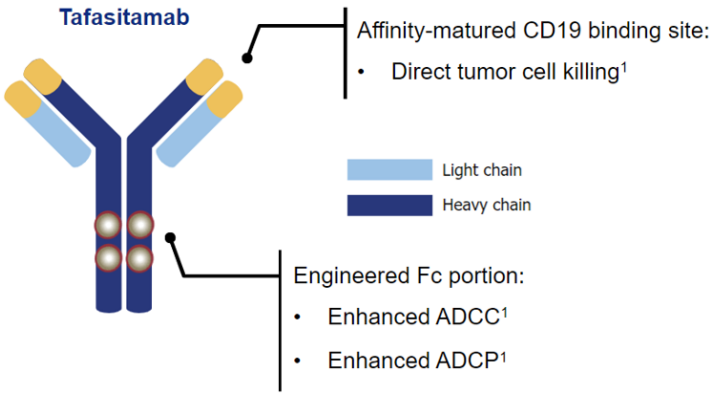
略語	定義	
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis	抗体依存性細胞貪食
CHO	Chinese hamster Ovary	チャイニーズハムスター卵巣細胞
CLL	Chronic lymphocytic leukaemia	慢性リンパ性白血病
Fc	Constant Fragment	定常フラグメント
FcγR	Fc Gamma Receptor	Fcγ 受容体
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
NK	Natural Killer	ナチュラルキラー
NOD	Non-obese diabetic	非肥満糖尿病型
SCID	Severe combined immunodeficiency	重症複合型免疫不全

1. タファシタマブ（遺伝子組換え）の構造

タファシタマブ（遺伝子組換え）（以下、「タファシタマブ」。別名 MOR00208、MOR208、XmAb 5574）は、B 細胞悪性腫瘍治療薬として開発された、ヒト B 細胞表面抗原 CD19 を標的とした、定常フラグメント（Fc）改変ヒト化モノクローナル抗体である。タファシタマブには、Xencor 社（米国）独自の新規性の高い XmAb®テクノロジーを使用して、ヒト配列含有量を最大化し、抗原に対する親和性及び様々な Fcγ 受容体（FcγR）に対する結合親和性を高めるべく最適化された Fc 改変が行われている（Woyach et al 2014）。

タファシタマブはチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）により産生され、451 個のアミノ酸からなる重鎖 2 本及び 219 個のアミノ酸からなる軽鎖（κ 鎖）2 本で構成されている（Figure 1）。タファシタマブの分子量は約 150,000 Da である。

Figure 1: タファシタマブの構造図



1: Horton HM, et al. Cancer Res. 2008;68:8049-8057

マウス抗 CD19 抗体 4G7 のヒト化及び親和性成熟により得られ（Lazar et al 2007）、重鎖定常領域の CH2 ドメインに S243D 及び I336E［Eu index（Edelman et al 1969）による記載では S239D 及び I332E］の 2 個のアミノ酸残基の置換が行われている。この改変により、すべての FcγR に対する結合親和性が増強されている（Lazar et al 2006）。タファシタマブの CH1 ドメイン及びヒンジ部はヒト免疫グロブリン G（IgG）1 と同一配列で、CH2 ドメインと CH3 ドメインは、IgG1 由来の G331A と上述の S243D 及び I336E の 2 個のアミノ酸残基置換部分を除き、ヒト IgG2 と同一である。

2. 薬理学的特性

タファシタマブの標的分子である CD19 は、前駆 B 細胞及び成熟 B 細胞の細胞表面に発現する。CD19 は、正常細胞及び B 細胞性腫瘍細胞の発生段階に広く発現し、B 細胞性腫瘍細胞表面に存在して B 細胞受容体シグナル伝達と腫瘍細胞増殖を増幅する。そのため CD19 は、濾胞性リンパ腫及び辺縁帯リンパ腫を含む B 細胞悪性腫瘍の治療における重要な治療標的となる。CD19 は、B 細胞の分化段階のうち CD20 の発現がみられない前駆 B 細胞や成熟 B 細胞成熟 B リンパ球の最終分化（形質細胞）段階でも発現し、CD20 のダウンレギュレーションが起きている場合にも発現することが知られているため、特に抗 CD20 抗体含有免疫化学療法で治癒が得られなかった患者に対する治療選択肢としてその有効性が期待される。

タファシタマブの CH2 ドメインに加えられた 2 つのアミノ酸の置換（S243D 及び I336E）により、抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び抗体依存性細胞貪食（ADCP）を媒介するものを含め、すべてのヒト Fcγ 受容体（FcγR）に対する結合親和性が増強されている（Lazar et al 2006）。

タファシタマブは CD19 に結合すると直ちに、ナチュラルキラー（NK）細胞、γδT 細胞、食細胞といった免疫エフェクター細胞と結合したり、直接的な細胞死（アポトーシス）を誘導したりすることにより、B 細胞の排除を媒介する。FcγR に対する親和性の増強が ADCC 及び ADCP 活性化を含む免疫エフェクター細胞を介した作用機序をより高めている（Horton et al 2008）。

タファシタマブと免疫調節薬レナリドミドとの併用により、*in vitro* 及び *in vivo* のいずれにおいても効果が高まった。レナリドミドには細胞増殖抑制作用や血管新生抑制作用があるだけでなく、T 細胞や NK 細胞等の免疫エフェクターの活性を刺激し、NK 細胞数を増加させる（Kotla et al 2009、Gribben et al 2015）。また、レナリドミドは、タファシタマブと高い結合親和性を示す FcγRIII の NK 細胞における発現を増加させる（Lapalombella et al 2008）。そのため、レナリドミド処理により、タファシタマブが媒介する NK 細胞の活性化と ADCC 活性の増強が見られたと報告されている（Awan et al 2010）。これらの非臨床の知見から、CD19 陽性腫瘍に対する Fc 改変抗体タファシタマブと NK 細胞活性化剤レナリドミドの併用療法が支持される。

ヒト CD19 及び CD20 発現 CLL 由来細胞株 MEC-1 に対し、タファシタマブとリツキシマブ（遺伝子組換え）（以下、リツキシマブ）を併用した *in vitro* 試験において、ADCC を介した細胞毒性の増強が認められた。タファシタマブとリツキシマブの併用により、11 種の B 細胞リンパ腫細胞株のうち 7 株で、ADCC、ADCP 又は直接的な細胞傷害性の少なくとも 1 つ以上の作用機序を介して、それぞれの単剤と比較して統計学的に優位な腫瘍細胞死の増加が認められた。残りの 4 種の細胞株のうち 2 株はタファシタマブ単剤に対する感受性が高く、別の 2 株はリツキシマブに対する感受性が高く、併用による有意な作用の増強は見られなかった（Patra-Kneuer et al 2023）。ヒト末梢血単核細胞と Ramos 細胞を NOD/SCID マウスに同時接種した異種皮下移植生存モデルにおいて、タファシタマブとリツキシマブを併用投与された群では、それぞれの単剤投与を受けた群に比べ、統計学的に有意な腫瘍増殖抑制及び生存期間の延長が認められた（Patra-Kneuer et al 2023）。これらのデータは、タファシタマブとリツキシマブの併用が、B 細胞リンパ腫細胞を協同的に消失させる可能性を示唆している。

3. 申請された臨床適応、用量及び投与期間に関する情報

申請効能「再発又は難治性の濾胞性リンパ腫」において、タファシタマブは免疫調節薬レナリドミド及び抗 CD20 抗体リツキシマブとの併用により投与する。このとき、タファシタマブは、28 日間を 1 サイクルとして、最初の 3 サイクルは 1 週間間隔で、4 サイクル目以降は 12 サイクルまで 2 週間間隔で 1 日 1 回 12 mg/kg（体重）を点滴静注される。

詳細な効能又は効果（案）並びに用法及び用量（案）は【モジュール 1.8】に示す。

4. 参考文献

Awan FT, Lapalombella R, Trotta R, et al. CD19 targeting of chronic lymphocytic leukemia with a novel Fc-domain-engineered monoclonal antibody. Blood. 2010 Feb 11;115(6):1204-1213.

Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, et al. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85.

Gribben JG, Fowler N, Morschhauser F. Mechanisms of action of lenalidomide in B cell Non-Hodgkin Lymphoma. J Clin Oncol. 2015 Sep 1;33(25):2803-2811.

Horton HM, Bernett MJ, Pong E, et al. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.

Kotla V, Goel S, Nischal S, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. J Hematol Oncol. 2009 Aug 12;2:36.

Lapalombella R, Yu B, Triantafillou G, et al. Lenalidomide down-regulates the CD20 antigen and antagonizes direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab on primary chronic lymphocytic leukemia cells. Blood. 2008 Dec 15;112(13):5180-5189.

Lazar GA, Dang W, Karki S, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4005-4010.

Lazar GA, Desjarlais JR, Jacinto J, et al. A molecular immunology approach to antibody humanization and functional optimization. Mol Immunol. 2007 Mar;44(8):1996-1998.

Patra-Kneuer M, Chang G, Xu W, et al. Activity of tafasitamab in combination with rituximab in subtypes of aggressive lymphoma. Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558.

Woyach JA, Awan F, Flinn IW et al. A Phase I Trial of the Fc Engineered CD19Antibody XmAb®5574 (MOR00208) Demonstrates Safety and Preliminary Efficacy in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. Blood. 2014 Dec 4;124(24):3553-3560.

目次

略号一覧 5
1. まとめ 7
1.1. CD19 に対する結合性 7
1.2. CD19 の内在化に対する作用 8
1.3. FcγR 結合親和性 8
1.4. 抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性 8
1.5. 抗体依存性細胞貪食（ADCP）活性 8
1.6. 補体依存性細胞傷害（CDC）活性 8
1.7. *In vitro* におけるレナリドミドとの併用効果 9
1.8. *In vitro* におけるリツキシマブとの併用効果 9
1.9. *In vivo* におけるタファシタマブの抗腫瘍効果 9
1.10. *In vivo* におけるタファシタマブとレナリドミドの併用効果 9
1.11. *In vivo* におけるタファシタマブとリツキシマブの併用効果 9
1.12. アポトーシス誘導作用 10
1.13. *In vivo* における CAR-T 細胞療法との逐次療法の検討 10
1.14. 副次的薬理試験 11
1.15. 安全性薬理試験 11
1.16. 薬力学的薬物相互作用 11
2. 効力を裏付ける試験 11
2.1. *In vitro* 薬理試験 11
2.1.1. ヒト CD19 に対する結合性 11
2.1.2. ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルの CD19 発現リンパ球に対する結合性 11
2.1.3. CD19 の内在化作用 12
2.1.4. ヒト、マウス及びカニクイザルの Fcγ 受容体に対する結合親和性 14
2.1.5. NK 細胞をエフェクター細胞とした各種細胞株に対する ADCC 活性 16
2.1.6. PBMC をエフェクター細胞とした患者由来腫瘍細胞に対する ADCC 活性 17
2.1.7. γδT 細胞をエフェクター細胞とする ADCC 活性 17
2.1.8. マクロファージをエフェクター細胞とする ALL 由来細胞株に対する ADCP 活性 18
2.1.9. カスパーゼ媒介アポトーシスによる増殖抑制作用 19
2.1.10. 補体依存性細胞毒性（CDC）活性の評価 21
2.1.11. 患者由来 CLL 細胞におけるレナリドミド併用時の ADCC 活性 22
2.1.12. 各種 DLBCL 由来細胞株におけるレナリドミド併用時の ADCC 活性 23
2.1.13. B 細胞リンパ腫由来細胞株におけるリツキシマブ併用時の ADCC、ADCP 及び直接的細胞傷害作用 24

2.1.13.1. 各種リンパ腫細胞株におけるリツキシマブ併用時の直接的細胞傷害活性 24
2.1.13.2. 各種リンパ腫細胞株におけるリツキシマブ併用時の ADCC 活性 25
2.1.13.3. 各種リンパ腫細胞株におけるリツキシマブ併用時の ADCP 活性 26
2.1.13.4. 標的分子発現レベルと抗体活性の相関関係 28
2.2. *In vivo* 薬理試験 29
2.2.1. Ramos 又は Raji 細胞株皮下異種移植モデルにおけるタファシタマブの抗腫瘍効果 29
2.2.2. Ramos 細胞株播種性異種移植モデルにおけるタファシタマブとレナリドミドの併用効果 31
2.2.3. Ramos 細胞株皮下異種移植モデルにおけるタファシタマブとリツキシマブの併用効果 32
2.2.4. Jeko-1 細胞株又は患者由来 ALL 細胞静脈内異種移植モデルにおけるタファシタマブと CART19 の逐次療法の検討 35
3. 副次的薬理試験 41
3.1. カニクイザルに対するタファシタマブ単回投与時の末梢血及び組織への影響 41
3.2. カニクイザルに対するタファシタマブ 2 週間間隔 8 週間反復投与時の末梢血リンパ球集団への影響 41
3.3. カニクイザルに対するタファシタマブ 1 週間間隔 13 週間反復投与時の末梢血リンパ球集団への影響 42
4. 安全性薬理試験 43
4.1. カニクイザルに対するタファシタマブ 2 週間間隔 8 週間反復静脈内投与時の心血管系機能に対する影響 43
4.2. カニクイザルに対するタファシタマブ 1 週間間隔 13 週間反復投与時の心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対する影響 43
5. 薬力学的薬物相互作用 44
6. 考察及び結論 44
7. 参考文献 45

表一覧

Table 1: タファシタマブの薬理試験で用いられた主な対照抗体 7
Table 2: CD19 発現 HEK 細胞におけるタファシタマブ最大結合量に対する有効濃度の割合 11
Table 3: タファシタマブ又はリツキシマブで染色された B 細胞の割合 12
Table 4: タファシタマブ又は抗 CD45 抗体で染色された B 細胞の割合 12
Table 5: Ramos 細胞播種性異種移植モデルにおけるタファシタマブとレナリドミドの併用効果：平均生存期間及び生存期間延長率 32

図一覧

Figure 1: タファシタマブ、抗 CD20 抗体及び抗 CD22 抗体による CD19 抗原内在化作用 13

Figure 2: ヒト FcγR に対するタファシタマブ、抗 CD19-IgG1 及び抗 CD19, Fc-KO の結合親和性 14
Figure 3: マウス FcγR に対するタファシタマブ、抗 CD19-IgG1 及び抗-CD19, Fc-KO の結合親和性 15
Figure 4: カニクイザル FcγR に対するタファシタマブ及び抗 CD19-IgG1 の結合親和性 15
Figure 5: 9 種のヒトリンパ腫又は白血病由来細胞株に対するタファシタマブの ADCC 活性 16
Figure 6: 患者由来腫瘍細胞に対するタファシタマブの ADCC 活性 17
Figure 7: γδT 細胞をエフェクター細胞としたときの各種 B 細胞性非ホジキンリンパ腫細胞株に対する ADCC 活性 18
Figure 8: 2 種の ALL 由来細胞株に対するタファシタマブの ADCP 活性 19
Figure 9: SU-DHL-6 細胞株における細胞増殖抑制作用及びカスパーゼ介在性アポトーシス誘導作用 21
Figure 10: Raji、Ramos 及び SU-DHL-6 細胞株に対するタファシタマブの CDC 活性 22
Figure 11: CLL 細胞に対するタファシタマブとレナリドミド併用時の ADCC 活性 23
Figure 12: 各種 DLBCL 細胞株に対するタファシタマブとレナリドミド併用時の ADCC 活性 24
Figure 13: 9 種のリンパ腫細胞株におけるタファシタマブ、リツキシマブ及び両剤併用時の細胞傷害活性の比較 25
Figure 14: 11 種のリンパ腫細胞株におけるタファシタマブ、リツキシマブ及び両剤併用時の ADCC 活性の比較 26
Figure 15: 11 種のリンパ腫細胞株におけるタファシタマブとリツキシマブ併用時の ADCP 活性の比較 27
Figure 16: 11 種のリンパ種細胞株を用いた *in vitro* 試験におけるタファシタマブとリツキシマブの併用効果のまとめ 27
Figure 17: リンパ腫細胞株における CD19 又は CD20 抗原発現量と直接的な細胞傷害活性、ADCC 活性及び ADCP 活性との相関 28
Figure 18: Ramos 又は Raji 細胞株皮下異種移植モデルにおけるタファシタマブの抗腫瘍効果 30
Figure 19: Ramos 細胞株播種性異種移植モデルにおけるタファシタマブとレナリドミドの併用効果：Kaplan-Meier 生存曲線 31
Figure 20: Ramos 細胞株と PBMC の同時皮下異種移植 NOD/SCID マウスにおけるタファシタマブ 1 mg/kg、リツキシマブ 0.6 mg/kg 又は併用投与時の腫瘍体積及び生存率 33
Figure 21: Ramos 細胞株と PBMC の同時皮下異種移植 NOD/SCID マウスにおけるタファシタマブ 0.3 又は 1 mg/kg、リツキシマブ 0.3 mg/kg 又は両剤の併用投与時の腫瘍体積及び生存率 34
Figure 22: ルシフェラーゼ陽性 Jeko-1 細胞株静脈内異種移植 NSG マウスモデルにおける CART19 の抗腫瘍効果に対するタファシタマブ前処理の影響 37
Figure 23: CAR-T 細胞毒性マウスモデルにおけるタファシタマブと CART19 の逐次投与による CRS の発現及び生存期間への影響 39
Figure 24: CART19 投与翌日の CAR-T 細胞毒性マウスモデルから単離した腫瘍細胞のウェスタンブロット 40

Figure 25: カニクイザルに対するタファシタマブ 2 週間間隔 8 週間反復投与時の B 細胞（CD3- CD20+）数の推移.....41
Figure 26: カニクイザルに対する 1 週間間隔 13 週間反復静脈内投与時の雌動物における B 細胞（CD3- CD20+）数推移.....42

略号一覧

略号	定義	
ABC	Activated B cell	活性型B細胞
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis	抗体依存性細胞貪食
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia	急性リンパ芽球性白血病
APC	Allophycocyanin	アロフィコシアニン
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
B-ALL	B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia	B細胞性急性リンパ芽球性白血病
BLI	Bioluminescent Imaging	生物発光イメージング
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester	カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル
CI	Confidence interval	信頼区間
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia	慢性リンパ性白血病
CML	Chronic Myeloid Leukemia	慢性骨髄性白血病
CRS	Cytokine Release Syndrome	サイトカイン放出症候群
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole	4’,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール
DLBCL	Diffuse Large B Cell Lymphoma	びまん性大細胞型B細胞リンパ腫
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	Deoxyribonucleic Acid	デオキシリボ核酸
EC_{50}	Drug Concentration Producing Half-Maximal Response	50%効果濃度
EC_{90}	Effective concentration at 90% maximal effect	90%効果濃度
EC_{95}	Effective concentration at 95% maximal effect	95%効果濃度
E:T比	Effector to target cell ratio	エフェクター/標的細胞比
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting	蛍光活性化セルソーティング
Fc	Constant Fragment	定常フラグメント
FcγR	Fc Gamma Receptor	Fcγ受容体
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
FSC	Forward Scatter	前方散乱光

略号	定義	
GCB	Germinal center B-cell-	胚中心B細胞
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
GST	Glutathione S-Transferase	グルタチオンS-トランスフェラーゼ
HCL	Hairy Cell Leukemia	有毛細胞白血病
HEK	Human Embryonic Kidney	ヒト胎児腎臓
HR	Hazard ratio	ハザード比
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリンG
ILS	Increased Life Span	生存期間延長率
Kd	Equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
KO	Knockout	ノックアウト
LDH	Lactate Dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
mAB	Monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MCL	Mantle Cell Lymphoma	マントル細胞リンパ腫
MFI	Mean Fluorescence Intensity	平均蛍光強度
NHL	Non-Hodgkin’s Lymphoma	非ホジキンリンパ腫
NK	Natural Killer	ナチュラルキラー
NOD	Non-obese diabetic	非肥満糖尿病
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells	末梢血単核球
PBS	Phosphate Buffered Saline	リン酸緩衝生理食塩水
PE	Phycoerythrin	フィコエリスリン
PEP	PEG300/Ethanol/Phosal	PEG300/エタノール/ホサール
R/R	Relapsed or refractory	再発又は難治性
RSV	Respiratory Syncytial Virus	RSウイルス
SCID	Severe Combined Immunodeficiency	重症複合免疫不全症
SPR	Surface Plasmon Resonance	表面プラズモン共鳴法
SSC	Side Scatter	側方散乱
UTD	untransduced T cells	非形質導入T細胞

1. まとめ

タファシタマブ（遺伝子組換え）（以下、タファシタマブ。別名 MOR00208、MOR208 又は XmAb5574）は、CD19 に結合する Fc 改変ヒト化モノクローナル抗体（mAb）である。マウス mAb 4G7 の可変領域のヒト化及び親和性成熟により得られたヒト免疫グロブリン G（IgG）1/2 ハイブリッド抗体で（Lazar et al 2007）、重鎖定常領域における 2 個のアミノ酸残基の置換 S243D 及び I336E［Eu index（Edelman et al 1969）による記載では S239D 及び I332E］により、Fcγ 受容体（FcγR）に対する高い結合親和性がもたらされている（Lazar et al 2006）。

CD19 は B 細胞系細胞の特異的マーカーであり、正常及び悪性の B 細胞表面に発現しているが、造血幹細胞又は非造血細胞系上には発現していない。CD19 は、B 細胞性急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、辺縁帯リンパ腫（MZL）等の B 細胞性腫瘍に高発現し、CD20 のダウンレギュレーション等の要因によりリツキシマブ（遺伝子組換え）（以下、リツキシマブ）の効果が示されない場合にも発現することが知られている（Gerber et al 2009、Davis et al 1999）。そのため、リツキシマブ等の抗 CD20 抗体を含む免疫化学療法が適さない患者やそれらが無効であった患者に対し、CD19 を標的とする治療の有効性が期待される。実際、我が国でも、CD19 を標的としたキメラ抗原受容体発現 T 細胞輸注療法（CAR-T 療法）のための複数の再生医療等製品が、DLBCL、FL 等を適応として承認、発売されている。CAR-T 療法の実施施設は全国で現在 20 施設以上に増えたものの、患者ごとに毎回 CAR-T 細胞を作成しなければならず、非常に高価な医療である（保仙 2022）。抗 CD19 モノクローナル抗体であるタファシタマブは、リツキシマブ療法を補完し、より多くの患者に使用可能な治療薬になると期待される。

タファシタマブの、再発又は難治性の（R/R）FL の治療を目的とした臨床開発及び承認申請のために実施した薬理試験の成績を以下に示す。なお、タファシタマブの Fc ドメインに加えられた改変の意義を評価するため、本薬の薬理試験においては、必要に応じて、Table 1 に示す抗体を対照として用いた。

Table 1:　　タファシタマブの薬理試験で用いられた主な対照抗体

略名	相当する抗体の説明
抗CD19-IgG1又は XmAb5603	タファシタマブと同じFvドメインを持ち、ヒトCD19を認識するが、Fcドメインはヒト IgG1と同じで、FcγRとの相互作用は可能だがFc改変の最適化はなされていない抗体
抗-CD19，Fc-KO	タファシタマブと同じFvドメインを持ち、ヒトCD19を認識するが、FcドメインにはFcγRとの相互作用を阻害する（ノックアウト）目的でアミノ酸置換（EU indexによる記載でG236R/L328R）が導入されている抗体
XmAbアイソタイプ対照	Fcドメインはタファシタマブと同じだが、Fvドメインは抗RSウイルス（RSV）抗体motavizumabと同じでCD19を認識できない陰性対照抗体

1.1. CD19 に対する結合性

ヒト CD19 を一過性に発現しているヒト胎児腎臓（HEK）293T 細胞に対するタファシタマブの 50%効果濃度（EC_{50}）は 4.8 nM、結合曲線から求めた 95%効果濃度（EC_{95}）は 90.5 nM（13.6 µg/mL）であった。2 種のヒト CD19 発現腫瘍細胞株から得られた平均平衡解離定数（K*d*）は約 0.4 nM であった。

ヒト及び各種実験動物の CD19 に対するタファシタマブの結合性を検討した結果、タファシタマブはカニクイザル、アカゲザルの CD19 に交差反応性を示した。一方、ウサギ、イヌの CD19 に対する結合性は低く、マウス、ラットの CD19 には結合しなかった。

1.2. CD19 の内在化に対する作用

ヒトバーキットリンパ腫由来 Raji 細胞を用いた試験において、タファシタマブは CD19 の内在化をほとんど起こさなかった（Horton et al 2008）。

1.3. FcγR 結合親和性

タファシタマブのヒト、カニクイザル、マウス FcγR に対する結合親和性を検討し、抗 CD19-IgG1 と比較した。タファシタマブはいずれの動物、受容体に対しても抗 CD19-IgG1 より高い親和性を示した（Horton et al 2008、Zalevsky et al 2009）。特に、FL 患者のリツキシマブ治療による奏効率や無増悪生存率に相関するとの報告（Cartron et al 2002、Weng and Levy 2003）がある。ヒト FcγRIIIa の F158 アロタイプ及び FcγRIIa の R131 アロタイプに対するタファシタマブの結合親和性は抗 CD19-IgG1 のそれぞれ 136 倍及び 11 倍であった。

タファシタマブのヒト及びカニクイザルの FcγR に対する結合特性は類似していた（Zalevsky et al 2009）。タファシタマブはマウス FcγR に対して抗 CD19-IgG1 と比べれば高い結合親和性を示した（Horton et al 2008）。

1.4. 抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性

ヒトナチュラルキラー（NK）細胞をエフェクター細胞として、ヒトリンパ腫及び白血病由来細胞株に対する ADCC 活性を、乳酸脱水素酵素（LDH）活性を指標に検討した。バーキットリンパ腫及び DLBCL 由来細胞株を含む 9 種の細胞株において、タファシタマブは Fc 改変の最適化が行われていない抗 CD19-IgG1 の 100~1000 倍高い ADCC 活性を示した（EC_{50} 0.1～1.0 ng/mL）。CD19 を認識しない XmAb アイソタイプ対照は ADCC 活性を示さなかった（Horton et al 2008）。

新鮮未刺激 PBMC をエフェクター細胞として CD19 を高発現している急性リンパ芽球性白血病（ALL）及びマントル細胞リンパ腫（MCL）患者由来の腫瘍細胞に対する ADCC 活性をクロム－51（^{51}Cr）放出を指標として検討した。いずれの細胞株に対しても抗 CD19-IgG1 は ADCC 活性を示さなかったが、タファシタマブは ADCC 活性を示した（Horton et al 2008）。

γδT 細胞をエフェクター細胞とし、B 細胞性非ホジキンリンパ腫由来の細胞株に対する ADCC 活性を、E:T 比 0.7:1～20:1 まで変化させて細胞溶解率を指標に検討した。タファシタマブは抗 CD19-IgG1 及び陰性対照のヒト IgG1 よりも有意に高い ADCC 活性を示し、E:T 比が高いほど高い ADCC 活性が得られた（Her et al 2022）。

1.5. 抗体依存性細胞貪食（ADCP）活性

単球由来マクロファージをエフェクター細胞とし、2 種の ALL 由来細胞株に対するタファシタマブの ADCP 活性を、フローサイトメトリー法により、貪食率を指標に検討した。タファシタマブは明らかな ADCP 活性を示し、その貪食作用は抗 CD19-IgG1 対照の約 10 倍であった（Horton et al 2008）。

1.6. 補体依存性細胞傷害（CDC）活性

CD19 及び CD20 発現を発現していることが知られる 3 種の B 細胞リンパ腫由来細胞株（Raji 細胞、Ramos 細胞及び SU-DHL-6 細胞）に対するタファシタマブ及びリツキシマブの CDC 活性を、Alamar blue 試薬を用い、平均蛍光強度（MFI）を指標に検討した。その結果、陽性対照であるリツキシマブはいずれの細胞株に対しても CDC 活性を示したが、タファシタマブは CDC 活性を示さなかった。

1.7. *In vitro* におけるレナリドミドとの併用効果

健康ドナー由来の NK 細胞をエフェクター細胞とし、患者由来 CLL 細胞を標的細胞としたときの ADCC 活性を、^{51}Cr 放出を指標として測定したとき、NK 細胞を免疫調節薬レナリドミドで前処理したときの ADCC 活性は溶媒対照に比べ有意に高く、*in vitro* におけるタファシタマブとレナリドミドの併用効果が確認された（Awan et al 2010）。PBMC をエフェクター細胞とし、胚中心 B 細胞（GCB）型又は活性化微細胞（ABC）型 DLBCL 由来細胞株に対する ADCC 活性を、細胞毒性を指標に測定した結果からも、*in vitro* におけるタファシタマブとレナリドミドの併用効果が確認された。

1.8. *In vitro* におけるリツキシマブとの併用効果

9 種のヒトリンパ腫由来細胞株を用いた *in vitro* 試験でタファシタマブとリツキシマブの 2 剤併用による直接的細胞傷害活性を、11 種のヒトリンパ種細胞株（DLBCL 由来細胞株 9 種及びバーキットリンパ腫由来細胞株 2 種）を用いた *in vitro* 試験ではタファシタマブとリツキシマブの 2 剤併用時の ADCC 及び ADCP 活性を検討した。その結果、タファシタマブとリツキシマブの 2 剤併用により、ADCC、ADCP 又は直接的な細胞傷害性のうち少なくとも 1 つの作用機序を介した統計学的に有意な腫瘍細胞死の増加が 11 種の細胞株中 8 種において認められた。残りの 3 種の細胞株のうち、1 種の細胞はタファシタマブ単剤、別の 2 種はリツキシマブ単剤に対し高い感受性を示し、併用による有意な作用の増強は見られなかった（Patra-Kneuer et al 2023）

1.9. *In vivo* におけるタファシタマブの抗腫瘍効果

ヒトバーキットリンパ腫由来 Raji 又は Ramos 細胞を皮下移植した重症複合免疫不全（SCID）マウスにおいて、タファシタマブ 1～10 mg/kg の週 2 回腹腔内投与により、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）投与群及び XmAb アイソタイプ対照投与群に比べ有意な腫瘍増殖抑制作用が用量依存的に認められた（Horton et al 2008）。

Ramos 細胞株を皮下移植し、2 週間で腫瘍体積が約 80 mm^3 に成長した SCID マウスに、タファシタマブ、抗 CD19-IgG1 又は抗 CD19, Fc-KO 各 10mg/kg 若しくは PBS を週 2 回 6 週間腹腔内投与したとき、タファシタマブ投与群では最も高い抗腫瘍効果が認められ、タファシタマブ、抗 CD19-IgG1 又は抗 CD19, Fc-KO 投与群はいずれも PBS 対照群に対し統計学的に有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。

1.10. *In vivo* におけるタファシタマブとレナリドミドの併用効果

Ramos 細胞株を静脈移植した播種性異種移植 SCID マウスモデルにおいて、タファシタマブとレナリドミドの併用により、同量のレナリドミドを投与した群に比べ生存期間延長が認められ、併用による作用の増強が示された。

1.11. *In vivo* におけるタファシタマブとリツキシマブの併用効果

Ramos 細胞と健康ドナー由来 PBMC の同時皮下移植を行った非肥満糖尿病（NOD）／SCID マウスモデルに移植日からタファシタマブ 0.3 又は 1 mg/kg、リツキシマブ 0.3 又は 0.6 mg/kg をそれぞれ単独又は 2 剤併用により週 2 回 6 週間腹腔内投与し、抗腫瘍効果について検討した。タファシタマブ単剤投与でもリツキシマブ単剤投与でも陰性対照群に比べ腫瘍増殖抑制効果が認められたが、2 剤併用群での腫瘍増殖抑制効果はタファシタマブ単剤群及び/又はリツキシマブ単剤投与群に比べ有意に強かった。移植後 105 日まで週 3 回腫瘍体積を測定し、腫瘍体積が 500 mm^3 に到達するまでの期間を生存期間とみなして生存解析を行った結果、タファシタマブ 1 mg/kg とリツキシマブ 0.6 mg/kg の併用群はタファシタマブ 1 mg/kg 投与群に比べ統計学的に有意な生存期間延長を示した（Patra-Kneuer et al 2023）。

1.12. アポトーシス誘導作用

B 細胞リンパ腫由来 SU-DHL-6 細胞株及びヒト FcγRIIIa-グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）融合受容体を用いて、タファシタマブのアポトーシス誘導作用を生細胞内のアデノシン三リン酸（ATP）発光量、カスパーゼ活性及びアネキシン V 染色細胞を指標に検討した。その結果、タファシタマブは、抗 CD19-IgG1 及び Fc 部分の FcγR との相互作用を阻害された対照抗体（以下、抗 CD19, Fc-KO）に比べ高い細胞傷害作用を示し、カスパーゼ介在アポトーシスがタファシタマブの直接的な細胞傷害作用につながることが示された（Horton et al 2008）。

1.13. *In vivo* における CAR-T 細胞療法との逐次療法の検討

近年、再発又は難治性の DLBCL 及び/又は FL の治療目的で、チサゲンレクルユーセル、リソカブタゲン マラルユーセル、アキシカブタゲン シロルユーセル等の、マウス mAb である FMC63 に由来する単鎖可変領域フラグメントを用いて CD19 を標的とするキメラ抗原受容体 T（CAR-T）細胞療法が国内外で承認されている。タファシタマブはこれらの CAR-T 細胞（CART19）療法と同じ抗原を標的とするため、タファシタマブによる治療がその後の CART19 療法に影響を与えるか否かは臨床上の重要な課題である。チサゲンレクルユーセルと同様の CAR コンストラクト（FMC63-41BBζ）を使用して、非臨床リンパ腫又は白血病モデルにおいて、タファシタマブと CART19 の併用時及びタファシタマブを CART19 の前に使用した場合の抗腫瘍効果、生存期間、CART19 投与後の CRS 発現に与える影響とその機序が検討された（Sakemura et al 2024）。タファシタマブと CART19 を同時併用した *in vitro* 試験では、主要な CD19 に対する結合の競合が起こり CART19 の機能が阻害されたが、タファシタマブで前処理した後、未結合のタファシタマブを除去した場合の CART19 の機能は影響を受けなかったことから、ルシフェラーゼ発現 Jeko-1 細胞株を静脈内投与した NGS マウスを用い、タファシタマブと CART19 の逐次療法について検討が行われた。タファシタマブによる前処置後に CART19 投与を行った場合には、タファシタマブの投与を受けたことがないマウスに CART19 投与のみを行った場合と比較して、有意に高い抗腫瘍効果と生存期間の延長が認められた。その機序として、タファシタマブ投与終了後に残存するタファシタマブが一時的に CD19 を占有することで CART19 の過剰活性化とアポトーシスを抑制し、CART19 の遅発性の増殖をもたらすとともに、CART19 投与後の腫瘍細胞のパイロトーシスを減少させることで CART19 投与後のサイトカイン放出症候群（CRS）の発生率と重症度を低下させることが考えられた。

以上のように、タファシタマブは CD19 が発現していることが知られている種々の B 細胞リンパ腫に対して抗腫瘍効果を示し、レナリドミド及び/又はリツキシマブとの併用効果も確認されていることから、再発又は難治性の FL に対する標準治療の 1 つとされるリツキシマブ・レナリドミド併用療法（R^2療法）にタファシタマブを併用することで臨床効果の向上が期待される。また、近年、本邦でも再発 FL に対する治療選択肢の 1 つとなった CAR-T 細胞療法とタファシタマブ治療との関係について、臨床的評価はまだ十分行われていないが、タファシタマブを用いた治療はその後に行われる CAR-T 細胞療法の有効性を損なうことがなく、逆に CRS の発現を抑え、その治療成績向上に寄与する可能性も示された。

なお、申請効能である FL 細胞を用いた薬効薬理試験は実施していないが、FL と同じく胚中心細胞（中心芽細胞及び中心細胞）を起原とし、FL と同じ成熟 B 細胞腫瘍に分類されるバーキットリンパ腫及び DLBCL 由来の細胞株、FL と同じインドレントリンパ腫に分類される CLL 及び MCL 由来の細胞株や患者由来腫瘍細胞を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 試験で薬効評価がなされている。これらの結果は、タファシタマブが B 細胞性腫瘍に対して有効な治療薬となる可能性を支持しており、ICH-S9 ガイドラインに「必ずしも臨床で適応となる腫瘍と同種の腫瘍を対象とした試験を実施する必要はない。」と記載があることから、FL の細胞株等を用いた *in vitro* 又は *in vivo* 試験は実施しなかった。

1.14. 副次的薬理試験

副次的薬理作用は独立した試験は実施せず、カニクイザルを用いた GLP 非適用単回投与毒性試験及び GLP 適用反復投与毒性試験の中で評価した。タファシタマブは 0.3～100 mg/kg の用量範囲において末梢血 B 細胞を枯渇させた。また、骨髄、鼠径リンパ節及び脾臓においても B 細胞の枯渇が認められた。B 細胞枯渇作用は休薬期間中に可逆性を示した。

1.15. 安全性薬理試験

安全性薬理試験も独立した試験は実施せず、カニクイザルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験の一部として評価した。カニクイザルにタファシタマブを 100 mg/kg/週まで、13 週間投与しても、神経行動学的機能、体温、血圧、呼吸数、心電図に影響は認められなかった。

1.16. 薬力学的薬物相互作用

正式な薬物相互作用試験は実施しなかった。他の抗悪性腫瘍剤との併用時の効果については、2.1.11、2.1.13、2.2.2 及び 2.2.3 項に記載した。また、タファシタマブと CART19 を同時又は逐次投与したときの CART19 の薬理作用に対する影響を 2.2.4 項に記載した。

2. 効力を裏付ける試験

2.1. *In vitro* 薬理試験

2.1.1. ヒト CD19 に対する結合性

ヒト CD19 を一過的に発現させた HEK293T 細胞におけるタファシタマブの CD19 抗原への結合性を、抗 Fab PE 標識 $F(ab')_2$ を用いてフローサイトメトリーにより評価した【TR07098】。Table 2 に示すように、タファシタマブの EC_{50} は約 4.8 nM で、得られた結合曲線から算出した EC_{95} は約 90.5 nM（13.6 µg/mL）であった【MOR208L045】。

また、2 種類の CD19 発現ヒト腫瘍細胞株（バーキットリンパ腫由来細胞株 Raji 細胞及び ALL 由来細胞株 RS4;11 細胞）を用いたフローサイトメトリーにより、タファシタマブの K*d* を求めた結果、K*d* の平均値は約 0.4 nM であった。

Table 2: CD19 発現 HEK 細胞におけるタファシタマブ最大結合量に対する有効濃度の割合

単位	EC_{50}	EC_{90}	EC_{95}
µg/mL	0.7156	6.4404	13.5964
nM	4.76067	42.846	90.4527

出典：MOR208L045 Table 1

2.1.2. ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルの CD19 発現リンパ球に対する結合性

毒性評価に適切な動物種の選定を目的として、ヒト PBMC、サル（カニクイザル及びアカゲザル）、イヌ、ウサギ、ラットの全血試料並びにマウスの血液プールを用い、CD19 発現リンパ球に対するフルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識タファシタマブの結合性をフローサイトメトリー法により評価した【XC9-23209】。

蛍光活性化セルソーティング（FACS）でリンパ球数を確認するため、FITC 標識タファシタマブとともに、ヒト及びサルのリンパ球は抗 CD20 抗体リツキシマブのアロフィコシアニン（APC）標識体を、イヌ及びウサギのリンパ球は、それぞれ白血球共通抗原 CD45RA 及び CD45 並びにフィコエリスリン共役抗マウス二次抗原（CD45-PE）を用い、共染色した。マウス及びラットの血液試料については FITC 標識タファシタマブ単独での染色とした。

Table 3 に示すように、タファシタマブはヒト、カニクイザル及びアカゲザルの CD19 に交差反応性を示した。ヒト、カニクイザル及びアカゲザルのリンパ球に対する FITC 標識タファシタマブの結合は CD20-APC と同程度であったことから、これら 2 つの抗原は B 細胞上で高度に重複する発現パターンを示すことが示唆された。

Table 3: タファシタマブ又はリツキシマブで染色された B 細胞の割合

動物種	FITC標識タファシタマブ（%）	APC標識リツキシマブ（%）	試験ドナー数
ヒト	19.6 ± 6.2	19.6 ± 6.6	4
カニクイザル	31.4 ± 7.8	33.6 ± 8.7	5
アカゲザル	26.1 ± 5.1	25.8 ± 4.9	5

FITC: フルオレセインイソチオシアネート, APC: アロフィコシアニン
前方散乱光シグナル（FSC）及び側方散乱光シグナル（SSC）を元に、生リンパ球のみをゲーティングして FACS 解析した。設定されたゲート内の PBMC のうち染色された細胞の割合（%）を平均値±標準偏差で示した。ヒトについては 1 名のドナーの PBMS を異なる日に 4 回試験、マウスについては 3 種の異なる血液プールを解析した。
出典：XC9-23209 Table 1

一方、Table 4 に示すように、タファシタマブのイヌ及びウサギのリンパ球への結合は著しく低く、ラット及びマウスのリンパ球には結合しなかった。

以上のことから、タファシタマブの毒性評価には、カニクイザル又はアカゲザルのいずれかの動物種を用いることが適切であると考えられた。

Table 4: タファシタマブ又は抗 CD45 抗体で染色された B 細胞の割合

動物種	FITC標識タファシタマブ（%）	CD45-PE（%）	試験ドナー数
イヌ	3.3 ± 0.4	54.7 ± 5.1	3
ウサギ	1.3 ± 0.4	44.3 ± 3.1	3
ラット	0	—	3
マウス	0.1 ± 0	—	3

FITC: フルオレセインイソチオシアネート
CD45-PE : CD45RA 及び CD45 並びにフィコエリスリン共役抗マウス二次抗原
FSC 及び SSC を元に、生リンパ球のみをゲーティングして実施した。結果は、設定されたゲート内の PBMC のうち染色された細胞の割合（%）を、平均値±標準偏差で示した。ヒトについては 1 名のドナーの PBMS を異なる日に 4 回試験し、マウスについては 3 種の異なる血液プールを解析に用いた。
出典：XC9-23209 Table 1

2.1.3. CD19 の内在化作用

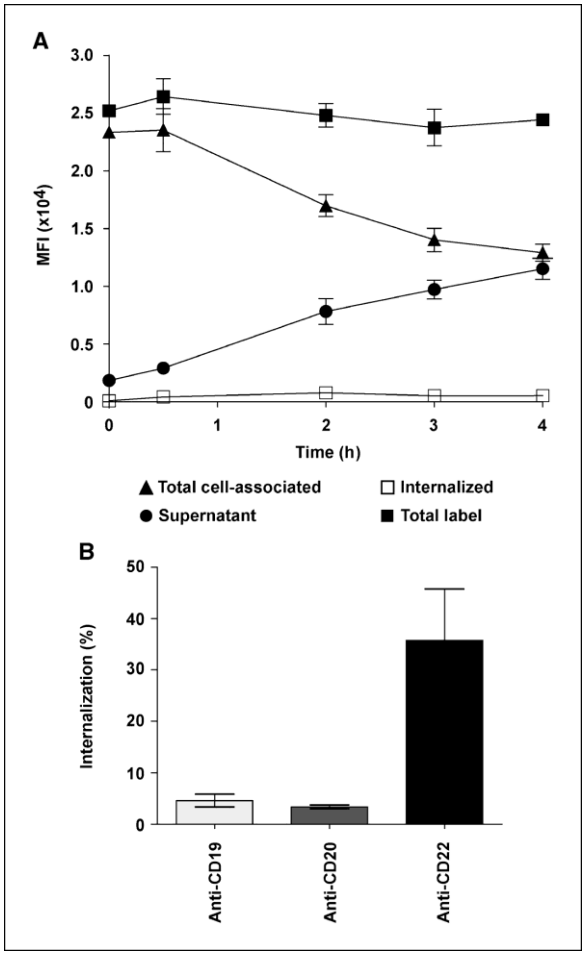
抗体のエフェクター機能は抗体―抗原複合体の内在化により影響を受けることから、タファシタマブの CD19 内在化作用を検討した（Horton et al 2008）。

タファシタマブによる CD19 の内在化を、速い内在化速度を誘導することが知られている抗 CD22 抗体 RFB4 及び遅い内在化速度を誘導する抗 CD20 抗体リツキシマブ（Press et al 1989）と

の比較により評価した。3 つの抗原すべてを高発現していることが知られている Raji 細胞（Ingle et al 2008）と、ユウロピウム（Eu）で直接標識した抗体をインキュベートし、複数の時点で Eu 蛍光を測定した。

細胞表面 CD19 からの抗体の解離は抗原親和性の関数であり、予想されたとおり時間とともに解離が進んで上清中の Eu 標識抗体量が増加し、Total cell-associated fraction が減少した（Figure 1 A）。4 時間の間、タファシタマブとの結合による内在化はごく僅かしか起きなかった。内在化は約 2 時間で最大値を示したものの、その割合は 6%に過ぎなかった（Figure 1 B）。抗 CD20 抗体も同様のプロファイル及び最大値を示したが、内在化は 3%未満であった。対照的に、抗 CD22 抗体は急速な内在化を誘導し、30 分で最大 37%の内在化を示した。これらのデータから、タファシタマブは CD19 に結合しても軽微な内在化しか誘導せず、エフェクター機能に有意な影響を及ぼさないことが示唆された。

Figure 1: タファシタマブ、抗 CD20 抗体及び抗 CD22 抗体による CD19 抗原内在化作用



A: Total cell-associated fraction（細胞表面結合及び内在化抗体）及び上清中の Eu 標識タファシタマブの経時変化
内在化抗原 - 抗体複合体は、Total cell-associated fraction の pH を下げて細胞表面結合抗体を除去し、細胞に結合している Eu 蛍光を再度測定することにより推定した。Total label は total cell-associated fraction、上清及び内在化画分を合計して算出した。
B: タファシタマブ、抗 CD20 抗体及び抗 CD22 抗体の最大内在化割合
データは 3 回取得し、エラーバーは標準偏差を示す。
出典：Horton HM et al. Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057. Figure 2

2.1.4. ヒト、マウス及びカニクイザルの Fcγ 受容体に対する結合親和性

タファシタマブのヒト及びマウスの FcγR に対する結合親和性について、表面プラズモン共鳴（SPR）法を用い検討した（Horton et al 2008）。

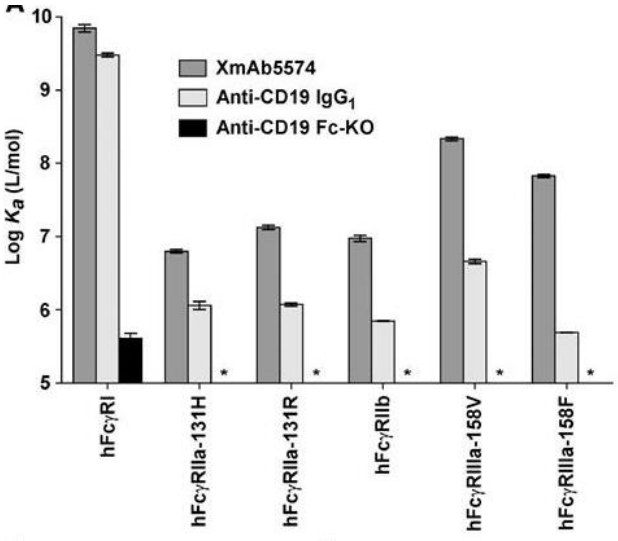
タファシタマブに導入された Fc 改変技術により FcγR に対する親和性が増強しているか確認するため、対照として Fc 改変の最適化が行われていない抗 CD19-IgG1 と、FcγR に対する相互作用を除く目的で 2 個のアミノ酸置換を行った抗-CD19, Fc-KO を用いた。

その結果、タファシタマブでは検討対象としたすべてのヒト FcγR に対する親和性が、抗 CD19-IgG1 と比べ著しく増強された（Figure 2）。特に、活性化受容体 FcγRIIIa とその低親和性 158F アレル（ヒト FcγRIIIa-158V 及びヒト FcγRIIIa-158F）に対する結合はそれぞれ、47 倍及び 136 倍と最も大きく増強された。FcγRIIa-131R は FcγRIIIa-158F と同様に FL 患者のリツキシマブ治療による奏効率や無増悪生存率に相関するとの報告（Cartron et al 2002、Weng and Levy 2003）があるが、タファシタマブは FcγRIIa-131R に対しても抗 CD19-IgG1 の 11 倍と高い親和性を示した。

タファシタマブのマウス FcγR に対する結合親和性についても同様に検討した結果、Figure 3 に示すように、タファシタマブのマウス FcγRI に対する結合は抗 CD19-IgG1 の 50 倍で、マウス FcγRII では 11 倍、マウス FcγRIV では 148 倍であった。抗-CD19, Fc-KO はいずれのマウス FcγR に対しても検出可能な結合を示さなかった。

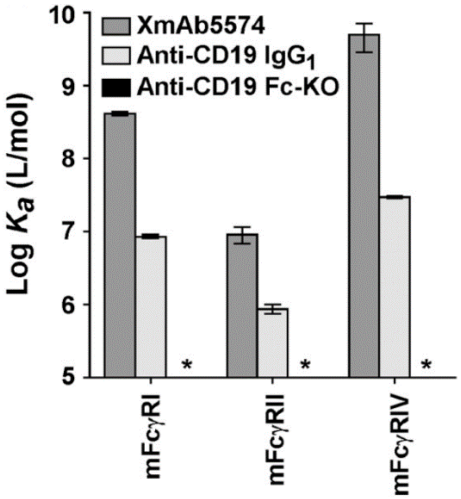
タファシタマブはマウス FcγR に対して抗 CD19-IgG1 と比べて高い結合親和性を示すため、マウス異種移植腫瘍モデルを用いて、*in vivo* でのタファシタマブの抗腫瘍効果を検討することができると考えられた。

Figure 2: ヒト FcγR に対するタファシタマブ、抗 CD19-IgG1 及び抗 CD19, Fc-KO の結合親和性



タファシタマブのヒト FcγRI に対する結合は抗 CD19-IgG1 の 2 倍、ヒト FcγRIIa-131H では 6 倍、ヒト FcγRIIa-131R では 11 倍、ヒト FcγRIIb では 13 倍、ヒト FcγRIIIa-158V では 47 倍、ヒト FcγRIIIa-158F では 136 倍であった。抗 CD19, Fc-KO では結合は、完全にない（*FcγRIIa、FcγRIIb 及び FcγRIIIa）か、著しく低かった（FcγRI）。
*：抗 CD19, Fc-KO による結合を全く認めず。3 回以上の独立した試験の平均値と標準偏差を示した。
出典： Horton HM et al. Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057. Figure 1A

Figure 3:　　マウス FcγR に対するタファシタマブ、抗 CD19-IgG1 及び抗-CD19, Fc-KO の結合親和性



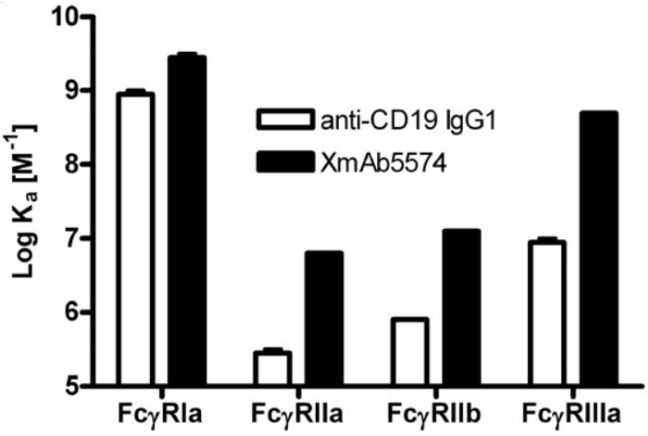
タファシタマブのマウス FcγRI に対する結合は抗 CD19-IgG1 の 50 倍で、マウス FcγRII では 11 倍、マウス FcγRIV では 148 倍であった。抗-CD19, Fc-KO はいずれのマウス FcγR に対しても検出可能な結合を示さなかった。エラーバーは標準偏差を示す。
出典：Horton HM et al. Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057 Figure 1B

上記のタファシタマブのヒト FcγR に対する結合と同じ方法（Horton et al 2008）を用いて、タファシタマブのカニクイザル FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb 及び FcγRIIIa に対する結合親和性について検討した（Zalevsky et al 2009）。

その結果、Fc 改変により、タファシタマブのカニクイザル FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb 及び FcγRIIIa への結合は、抗 CD19-IgG1 のそれぞれ 3 倍、25 倍、16 倍及び 60 倍に増強された（Figure 4）。抗 CD19-IgG1 のカニクイザル FcγR に対する結合親和性は、ヒト FcγR に対する結合親和性（Horton et al 2008）と同程度であり、タファシタマブで得られた親和性増強の程度もヒト FcγR で認められたものと同程度であった。

タファシタマブのヒト及びカニクイザルの FcγR に対する結合親和性が類似していたことから、カニクイザルはタファシタマブの薬理学的及び毒性学的特性を評価するためのモデルとして適切な動物種であると考えられた。

Figure 4:　　カニクイザル FcγR に対するタファシタマブ及び抗 CD19-IgG1 の結合親和性



2 回の試験結果の平均値（±範囲）で示した。
出典： Zalevsky J et. al. Blood. 2009 Apr 16;113(16):3735-3743. Figure 1C

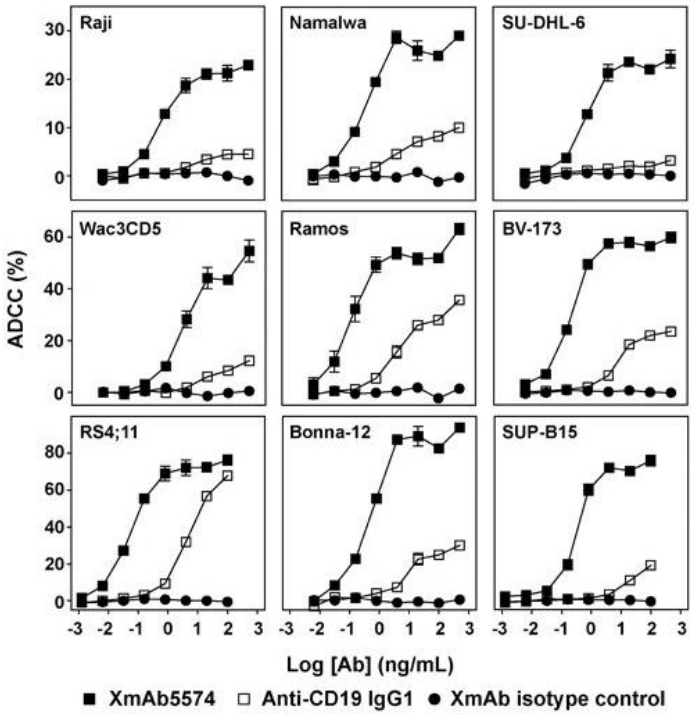
2.1.5. NK 細胞をエフェクター細胞とした各種細胞株に対する ADCC 活性

タファシタマブの FcγR に対する親和性の増強が免疫エフェクター機能の増強につながっているか明らかにするため、精製インターロイキン-2 活性化 NK 細胞をエフェクター細胞とし、種々のヒトリンパ腫又は白血病由来の 9 腫の細胞株に対するタファシタマブと対照抗体の ADCC 活性を、LDH 活性を指標に検討した（Horton et al 2008）。標的細胞として用いた細胞株はバーキットリンパ腫、DLBCL、CLL、有毛細胞白血病（HCL）、CD19 陽性慢性骨髄性白血病（CML）及び ALL に由来し、その CD19 抗原発現量は細胞株により異なり、15,000～105,000 分子/細胞の範囲にあった。

タファシタマブは、検討したすべての腫瘍細胞株で顕著な ADCC 活性を示し（Figure 5）、抗 CD19-IgG1 と比較して有効性（最大溶解率）及び効力（EC_{50}）とも有意に高かった。タファシタマブの EC_{50} 値は 0.1～1.0 ng/mL の範囲で、抗 CD19-IgG1 と比較して効力が 100～1000 倍であった。タファシタマブによる腫瘍細胞の最大溶解率は 25～90%で、細胞表面 CD19 発現との相関は認められなかった。抗 CD19-IgG1 の有効性（最大溶解率）はこれより明らかに低く、RS4;11 細胞株を除けば、ADCC が認められないか、タファシタマブの 1/3～1/2 であった。特に抗 CD19-IgG1 がほとんど活性を示さない細胞株（SU-DHL-6 細胞及び Raji 細胞）においても、タファシタマブは顕著な細胞溶解を誘導した。

CD19 を認識しない XmAb アイソタイプ対照は検出可能な細胞溶解を誘発しなかったことから、Fv-CD19 抗原の相互作用がないままで Fc 改変のみで FcγR への結合を高めても、ADCC を誘発するには不十分であることが示された。

Figure 5: 9 種のヒトリンパ腫又は白血病由来細胞株に対するタファシタマブの ADCC 活性



使用した標的細胞株とこれに対応する CD19 分子数（括弧内）は、バーキットリンパ腫由来 Raji 細胞（105,000）、Namalwa 細胞（37,000）及び Ramos 細胞（56,000）；DLBCL 由来 SU-DHL-6 細胞（15,000）；CLL 由来 Wac3CD5 細胞（38,000）；CML 由来 BV-173 細胞（80,000）；ALL 由来 RS4;11 細胞（43,000）及び SUP-B15 細胞（49,000）；HCL 由来 Bonna-12 細胞（29,000）。標的細胞を抗体でオプソニン化し、NK 細胞と 1:5 の細胞比で混合した。4 時間後に LDH 放出量を測定した。データは 3 回測定した。エラーバーは標準偏差を示す。

出典：Horton HM et al. Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057. Figure 3A

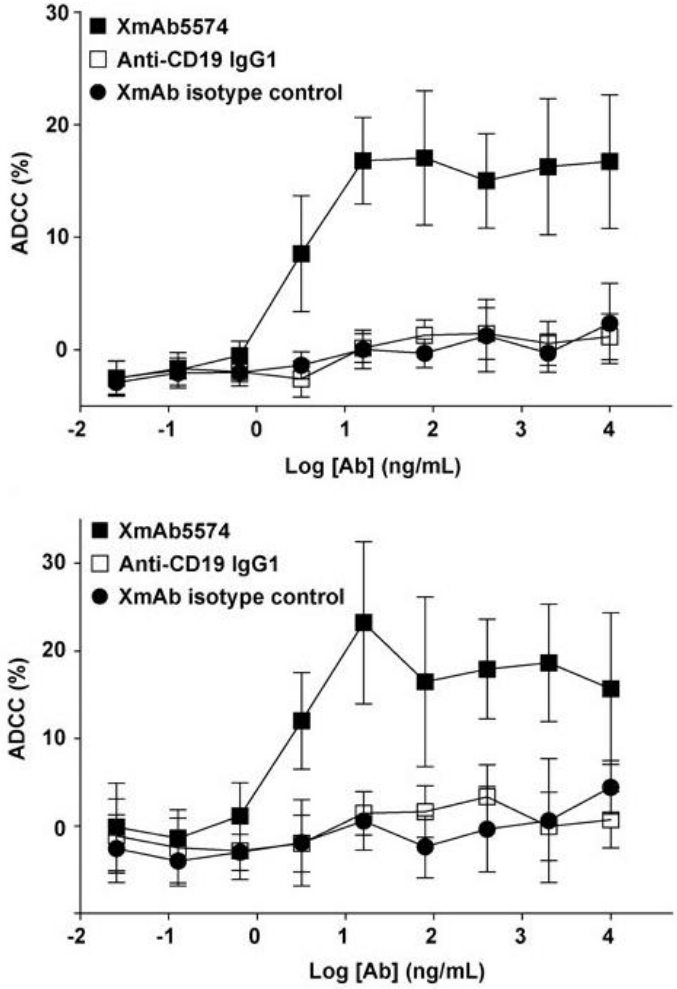
2.1.6. PBMC をエフェクター細胞とした患者由来腫瘍細胞に対する ADCC 活性

タファシタマブが患者由来腫瘍細胞に対しても ADCC の増強を媒介するか確認するため、CD19 を高発現している ALL 又は MCL 患者から得た腫瘍細胞と新鮮未刺激 PBMC を用いて検討した。

患者から得られた腫瘍細胞に対するタファシタマブ及び対照抗体の ADCC 活性を、^{51}Cr 放出を指標として最大溶解率を求め、評価した。

タファシタマブは ALL 及び MCL のいずれの腫瘍細胞に対しても、高い ADCC 活性を示したが、抗 CD19-IgG1 ではいずれにおいても ADCC が殆ど検出できなかった（Figure 6）。

Figure 6: 患者由来腫瘍細胞に対するタファシタマブの ADCC 活性



標的腫瘍細胞は ALL 患者（上図）及び MCL 患者（下図）より採取した。全ての試料は高い CD19 発現を示した。腫瘍細胞を ^{51}Cr（100 μCi/10^6 cells）で標識し、抗体でオプソニン化した後、細胞比 1:80 で PBMC と 4 時間混合した。ADCC は ^{51}Cr 放出を指標として測定した。3 例の異なる PBMC ドナーから採取した 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。
出典：Horton HM et al. Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057. Figure 3B&C

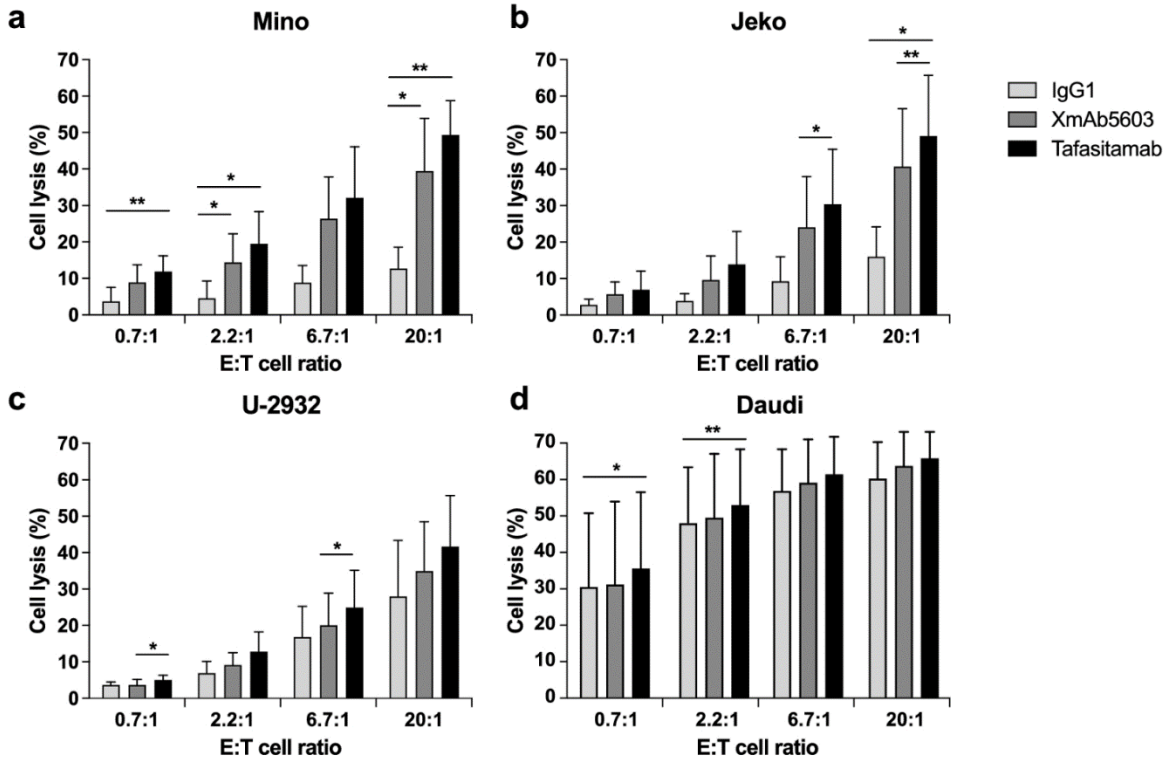
2.1.7. γδT 細胞をエフェクター細胞とする ADCC 活性

3 名の健康なドナー由来の γδT 細胞をエフェクター細胞とし、各種標的細胞株（MCL 由来 Mino 細胞又は Jeko-1 細胞、DLBCL 由来 U2932 細胞並びにバーキットリンパ腫由来 Daudi 細胞）を異なる E:T 比（0.7:1, 2.2:1, 6.7:1 又は 20:1）で組み合わせ、タファシタマブ、抗 CD19-IgG1 又はヒ

ト IgG1（陰性対照）と 4 時間インキュベートし、ADCC 活性を、細胞溶解率を指標に検討した（Her et al 2022）。

タファシタマブは Mino 細胞及び Jeko-1 細胞では E:T 比依存的に高い細胞溶解率（$p < 0.05$、両側 t test）を示した（Figure 7）。抗 CD19-IgG1 もタファシタマブよりは低いがヒト IgG1 に比して有意な細胞溶解率を示し（$p < 0.05$、両側 t test）、タファシタマブの ADCC 活性の一部は Fc 増強に由来すると考えられた。DLBCL 由来 U2932 細胞でもタファシタマブにより同レベルの細胞溶解率が示されたが、バーキットリンパ腫由来 Daudi 細胞では陰性対照でも高い細胞溶解が起き、意味のある結論は導けなかった。

Figure 7:　γδT 細胞をエフェクター細胞としたときの各種 B 細胞性非ホジキンリンパ腫細胞株に対する ADCC 活性



*: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$（両側 t test）
標的細胞（T）である Mino 細胞（a）、Jeko 細胞（b）、U-2932 細胞（c）又は Daudi 細胞（d）を、エフェクター細胞（E）であるγδT 細胞と種々の比率で混合し、1 μg/mL のタファシタマブ、抗 CD19-IgG1（XmAB5603）又は陰性対照である IgG1 とともに 4 時間インキュベートした。細胞溶解率は、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE）及び TO-PRO-3 で染色された標的細胞の蛍光活性化セルソーティング（FACS）分析により求めた。データは、3 名の健康ドナー由来のγδT 細胞を用い、3 回の独立したアッセイ実施時の平均値と標準偏差を示した。
出典：Her JH, et al. Cancer Immunol Immunother. 2022 Nov;71(11):2829-2836. Figure 1

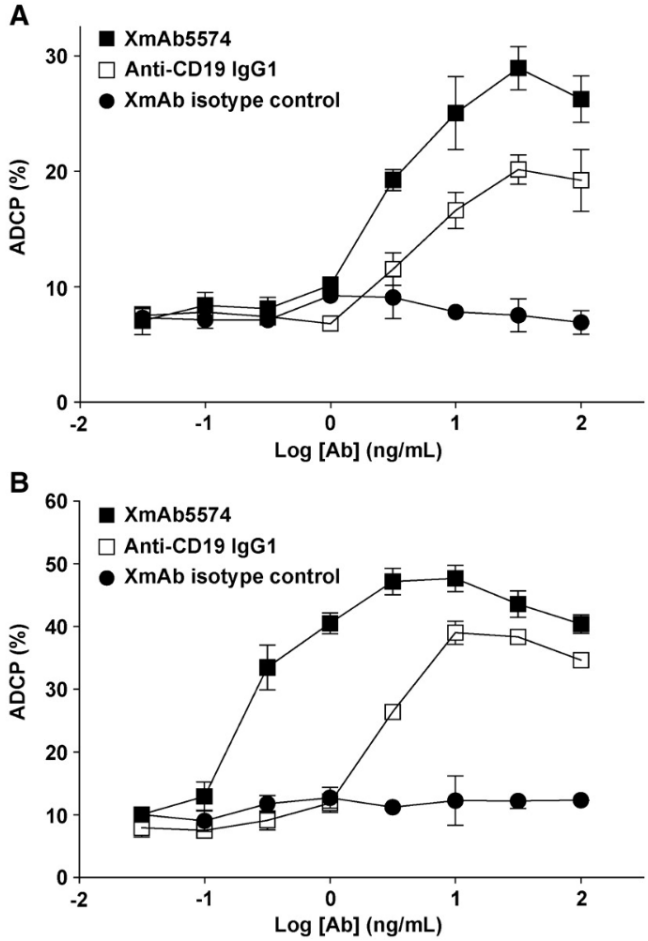
2.1.8.　マクロファージをエフェクター細胞とする ALL 由来細胞株に対する ADCP 活性

単球由来マクロファージをエフェクター細胞とし、2 種の ALL 由来細胞株（RS4;11 又は SUP-B15 細胞）に対するタファシタマブの ADCP 活性を、フローサイトメトリー法を用い貪食率を指標に検討した（Horton et al 2008）。

その結果、タファシタマブは抗 CD19-IgG1 に比べ、貪食作用を約 10 倍に増強した（Figure 8）。ADCC 活性の検討（2.1.5 項）において、タファシタマブは抗 CD19-IgG1 に比べ 100~1000 倍の効力を示したが、ADCP 活性ではその差は 10 倍と小さかった。

このような所見は、タファシタマブのヒト FcγRIIIa 及び FcγRIIa に対する親和性が抗 CD19-IgG1 のそれぞれ 100 倍及び 10 倍と、FcγRIIIa に対する結合親和性の方が FcγRIIa に比べ 10 倍強いことと、FcγRIIIa のみを発現する NK 細胞と異なりマクロファージは活性化受容体 FcγRI、FcγRIIa 及び FcγRIIIa と抑制性受容体 FcγRIIb の両方を発現しており、抗体依存性マクロファージ貪食作用は主に FcγRIIa を介すると報告されている（Richards et al 2008）ことと関連するものと考えられた。

Figure 8:　　2 種の ALL 由来細胞株に対するタファシタマブの ADCP 活性



A: RS4;11 細胞に対する ADCP、B; SUP-B15 細胞に対する ADCP
蛍光色素 PKH 67 又は CFSE で標識した RS4;11 細胞（A）又は SUP-B15 細胞（B）を標的細胞とし、単球由来マクロファージをエフェクター細胞とするフローサイトメトリー法により測定。ADCP（%）は、PKH 67 又は CFSE 標識（ALL 細胞）/CD14-APC 及び CD11b-APC（マクロファージ）二重陽性細胞数を腫瘍細胞総数で除して算出した。データは 3 回測定した。エラーバーは標準偏差。
出典：Horton HM et al. Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057. Figure 4

2.1.9.　　カスパーゼ媒介アポトーシスによる増殖抑制作用

タファシタマブ、抗 CD19-IgG1、抗 CD19, Fc-KO 又は XmAb アイソタイプ対照と FcγRIIIa-158V-GST 融合受容体の架橋抗体を SU-DHL-6 細胞株とともにインキュベートし、相対 ATP 発光量（非処理対照と比較したときの%）を指標として細胞増殖解析を行った。また、これらの架橋抗体のアポトーシス誘導作用をカスパーゼ活性（試料当たりの陽性細胞%）及びアネキシン V 染色陽性細胞（試料当たりの陽性細胞%）を指標として検討した（Horton et al 2008）。

架橋抗体を用いた細胞増殖解析の結果、タファシタマブは抗 CD19-IgG1 に比べ強い抗増殖作用を示し、抗増殖作用の媒介には、FcγR への結合が最適化された Fc 改変が重要であることが示唆

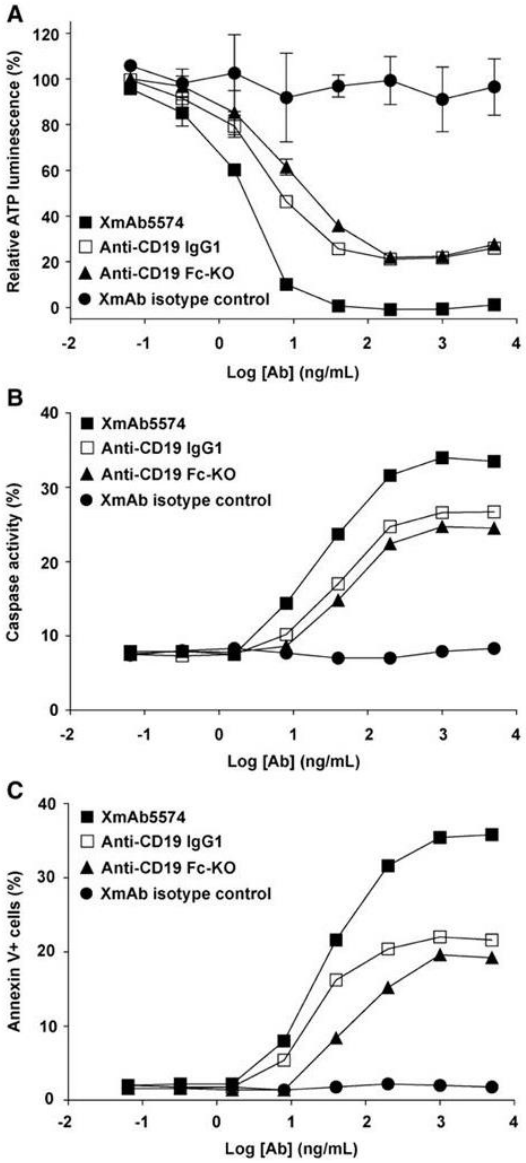
された（Figure 9 A）。抗-CD19, Fc-KO が抗 CD19-IgG1 と同程度の細胞増殖抑制作用を示しており、細胞増殖抑制作用は FcγR との架橋形成により増強されるものの完全にそれに依存するものではないことが示された。

カスパーゼ活性解析及びアネキシン V 染色から、カスパーゼ介在アポトーシスがタファシタマブの直接的な細胞傷害作用につながることが示された（Figure 9 B 及び C）。

細胞増殖解析の結果と同じく、タファシタマブは抗 CD19-IgG1 に比べ強いカスパーゼ活性、アポトーシス誘導作用を示し、抗 CD19-IgG1 の作用は抗 CD19 Fc-KO と同程度であった。

このことから、タファシタマブでは FcγR 結合の強化により、抗体の架橋が増強され、細胞表面の CD19 架橋が促進され、アポトーシスの増加につながる可能性が示唆され、タファシタマブはカスパーゼ誘導性アポトーシスにより抗 CD19-IgG1 に比べ強力な細胞増殖抑制効果を示したものと考えられる。

Figure 9: **SU-DHL-6 細胞株における細胞増殖抑制作用及びカスパーゼ介在性アポトーシス誘導作用**



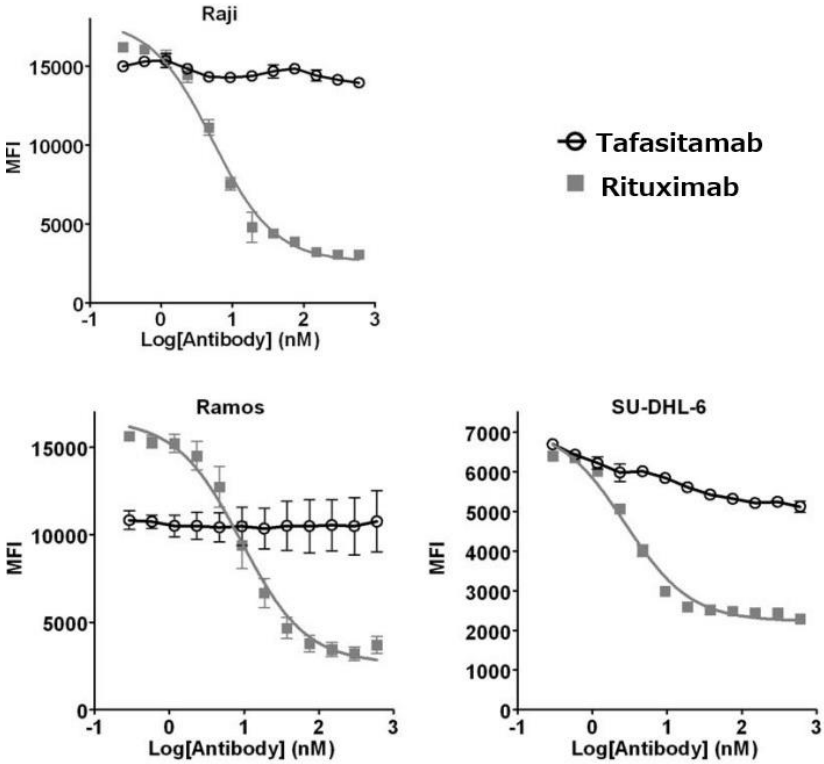
SU-DHL-6 細胞を用いて、ヒト FcγRIIIa-GST 融合受容体との架橋抗体を作成し、下記の試験を実施した。
A: 細胞増殖アッセイ（架橋抗体を 6×10^3 細胞と 72 時間インキュベートし、蛍光生細胞アッセイを用いて細胞力価を分析した。データは 3 回測定した。エラーバーは標準偏差を示す。）
B: カスパーゼ活性を指標にしたアポトーシスアッセイ（架橋抗体を SU-DHL-6 細胞と 48 時間インキュベートし、蛍光分析法によりカスパーゼ活性を測定した。データは 1 回測定した。）
C: アネキシン V 染色陽性細胞割合を指標にしたアポトーシスアッセイ（標的細胞をアネキシン V-PE 及び 7-アミノアクチノマイシン D で標識後、蛍光をフローサイトメトリーにより測定した。データは 1 回測定した。）
出典：Horton HM et al. Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057. Figure 5

2.1.10. 補体依存性細胞毒性（CDC）活性の評価

CDC 活性に対するタファシタマブの媒介能を、Raji 細胞、Ramos 細胞又は SU-DHL-6 細胞を用いて評価した。CDC 活性は Alamar blue 試薬を用い、MFI を指標に評価した【TR08139】。

陽性対照のリツキシマブは、CD19 及び CD20 発現細胞株 Raji 細胞、Ramos 細胞及び SU-DHL-6 細胞に対して特異的な CDC 活性を示した。これに対しタファシタマブは、検討したいずれの細胞株に対しても CDC 活性を示さず、CDC を誘導しないと考えられた（Figure 10）。

Figure 10: Raji、Ramos 及び SU-DHL-6 細胞株に対するタファシタマブの CDC 活性



CD19 陽性かつ CD20 陽性の細胞株 Raji 細胞、Ramos 細胞及び SU-DHL-6 細胞に対するタファシタマブ及びリツキシマブの CDC 活性を、Alamar blue 試薬を用い、MFI を指標に測定した。データは 2 回測定した。
出典：TR08139 Figure 4

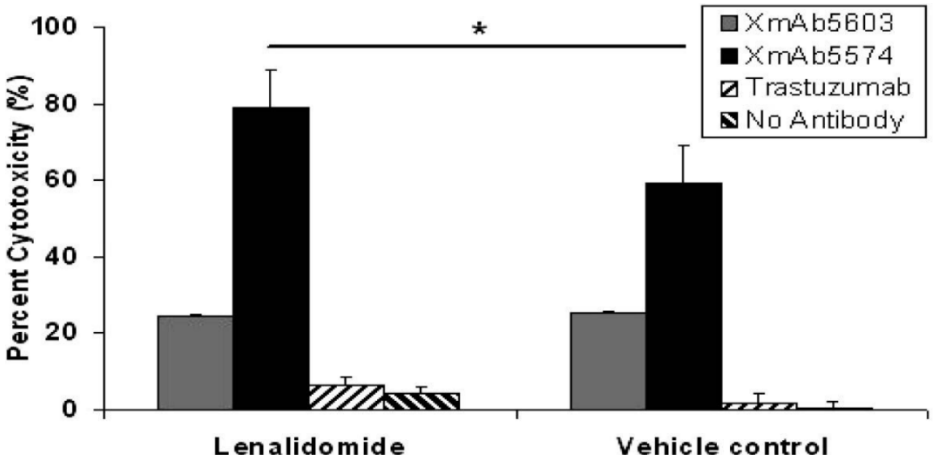
2.1.11. 患者由来 CLL 細胞におけるレナリドミド併用時の ADCC 活性

レナリドミドは T 細胞を活性化し、インターフェロン γ 及びインターロイキン 2 を放出する。これらのサイトカインが NK 細胞の活性を刺激し、NK 細胞数を増加させる（Kotla et al 2009、Gribben et al 2015）。また、レナリドミドは、タファシタマブと高い結合親和性を示す FcγRIII の NK 細胞における発現を増加させる（Lapalombella et al 2008）。

健康ドナーから得た NK 細胞をエフェクター細胞、CLL 患者から単離し ^{51}Cr 標識した細胞を標的細胞として、タファシタマブ、レナリドミド又はこれら 2 剤併用時の細胞毒性が、^{51}Cr 放出を指標として検討された（Awan et al 2010）。

0.5 μM レナリドミド又は溶媒で 24 時間前処理した NK 細胞と CLL 細胞を E/T 比 25:1 で用いて、タファシタマブ、抗 CD19-IgG1、トラスツズマブ又は抗体を含まない培地対照を添加して標準的な 4 時間の ^{51}Cr 放出アッセイを行った。レナリドミドによる前処理を受けた NK 細胞を用いたときのタファシタマブによる ADCC 活性は、レナリドミドによる前処理を行わない場合より 20.6%高く、有意に増強された（p = 0.03）（Figure 11）。

Figure 11: CLL 細胞に対するタファシタマブとレナリドミド併用時の ADCC 活性



健康ドナー由来の NK 細胞をエフェクター細胞、患者由来 CLL 細胞を標的細胞とし、E/T 比 25:1 で用いて、標準的な 4 時間の ^{51}Cr 放出アッセイを行った。NK 細胞を 0.5 μM レナリドミドで 24 時間前処理することにより、タファシタマブによる ADCC 活性は著しく増強された（レナリドミド処理時の ADCC は、溶媒対照処理時と比較して 20.6%（95%信頼区間：2.0-39.2、n = 21* p = 0.03）増強された。エラーバーは平均値の標準誤差。
出典：Awan FT, et al. Blood. 2010 Feb 11;115(6):1204-1213. Figure 6

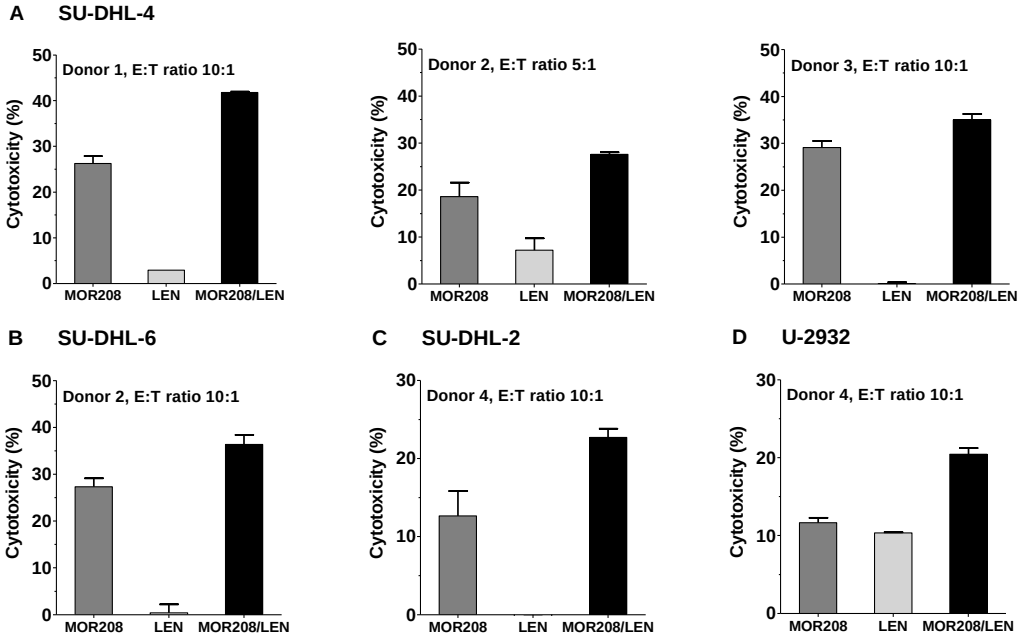
2.1.12. 各種 DLBCL 由来細胞株におけるレナリドミド併用時の ADCC 活性

4 名の健康ドナーの全血から得た PBMC をエフェクター細胞とし、GCB 又は ABC 型 DLBCL 由来細胞株（SU-DHL-4、SU-DHL-6、SU-DHL-2 又は U2932 細胞）に対するタファシタマブ、レナリドミド又はこれら 2 剤併用時の細胞毒性を、DAPI を指標に検討した【MOR208L039】。PBMC は DMSO に溶解したレナリドミド又は DMSO（対照）で前処理してから、標的細胞と、単独又はタファシタマブとともに 2 時間共培養した。細胞毒性（%）は死亡細胞割合（%）から対照の死亡細胞割合を引いた値と定義した。

SU-DHL-4 細胞株において、3 名のドナーから得られた PBMC をエフェクター細胞とした ADCC 活性は、タファシタマブ単独ではそれぞれ 26.3、18.6 及び 29.1%であったが、レナリドミドによる前処理と併用した場合にはそれぞれ 41.8、27.6 及び 35.0%と増強された（Figure 12 A）。SU-DHL-6、SU-DHL-2 及び U2932 細胞株においては、レナリドミド前処理した PBMC を用いたときのタファシタマブの細胞毒性は、無処置の PBMC を使ったタファシタマブ単独投与に比べ、平均して 9.3%増強されていた（Figure 12 B～D）。タファシタマブ非存在下では、レナリドミド前処理した PBMC の細胞毒性（%）は、ドナー及び細胞株により全く認められないか、2.9～10.4%の範囲にとどまった。

以上のように、タファシタマブとレナリドミドを併用すると、各種 DLBCL 細胞株に対する細胞傷害作用が、それぞれの薬剤単剤に比べ高まることが *in vitro* で実証された。PBMC 媒介 ADCC アッセイにおける主たるエフェクター細胞集団は NK 細胞であることから、これらのデータは、レナリドミドの NK 細胞活性化という作用機序（Kotla et al 2009、Gribben et al 2015）と合致する。これらの所見は CD19 陽性腫瘍の治療におけるタファシタマブと NK 細胞活性化剤レナリドミドの併用を支持するものである。

Figure 12:　各種 DLBCL 細胞株に対するタファシタマブとレナリドミド併用時の ADCC 活性



■MOR208: タファシタマブ単独処置（DMSO により前処理した PBMC を標的細胞及びタファシタマブとインキュベート）、■LEN: レナリドミド単独処置（レナリドミドにより前処理した PBMC を標的細胞とインキュベート）、■MOR208/LEN: タファシタマブ・レナリドミド併用処置（レナリドミドにより前処理した PBMC を標的細胞及びタファシタマブとインキュベート）
4 名のドナーから得た PBMC をレナリドミド 10 μM 又は DMSO と 72 時間インキュベート（前処理）し、エフェクター細胞として E:T 比 10:1 又は 5:1 で使用した。標的細胞は CFSE で蛍光染色した。2 時間の共培養後にフローサイトメトリーにより生細胞数と死亡細胞数を計数し、次式より死亡細胞（%）と細胞毒性（%）を求めた。
死亡細胞（%）　＝ 死亡細胞数／（死亡細胞数＋生細胞数）×100（サンプル）
細胞毒性（%）　＝ タファシタマブ、レナリドミド又は両剤併用時の死亡細胞（%）－DMSO 処置した PBMC をタファシタマブ非存在下で共培養した陰性対照の死亡細胞（%）
データは 2 回測定し、平均値を示した。エラーバーは平均値の標準誤差を示す。
出典：MOR208L039 Figure 1

2.1.13.　B 細胞リンパ腫由来細胞株におけるリツキシマブ併用時の ADCC、ADCP 及び直接的細胞傷害作用

ヒト B 細胞性リンパ腫由来細胞株（GCB-DLBCL 由来 HT、SU-DHL-4 又は SU-DHL-6、ABC-DLBCL 由来 OCI-LY10、TMD8、SU-DHL-2 又は U-2932、未分類 DLBCL 由来 NU-DUL-1、バーキットリンパ腫由来 Ramos 細胞等）を用い、リツキシマブとタファシタマブの併用時の ADCC、ADCP 及び直接的細胞傷害活性を、それぞれの薬剤単独処理時の活性と比較し評価した（Patra-Kneuer et al 2023）。

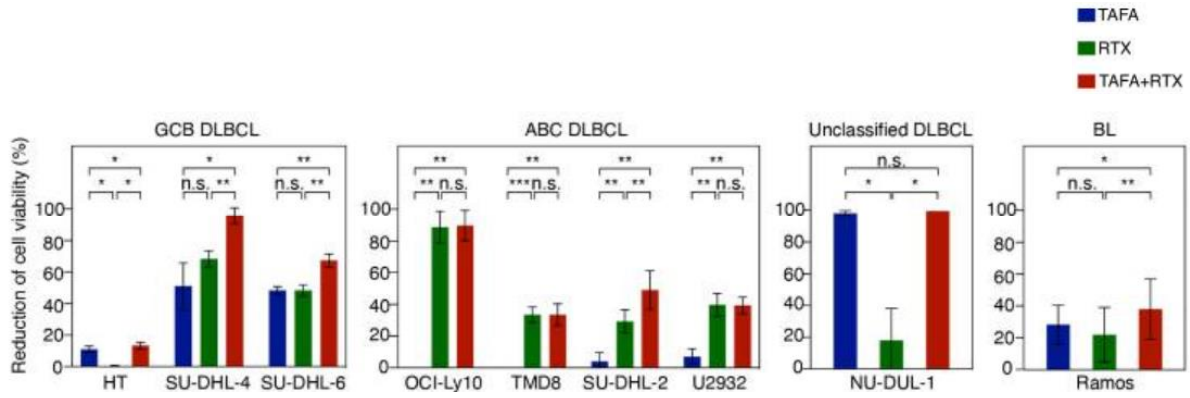
2.1.13.1.　各種リンパ腫細胞株におけるリツキシマブ併用時の直接的細胞傷害活性

9 種の B 細胞リンパ腫由来細胞株（GCB-DLBCL 由来 HT、SU-DHL-4 又は SU-DHL-6、ABC-DLBCL 由来 OCI-LY10、TMD8、SU-DHL-2 又は U-2932、未分類 DLBCL 由来 NU-DUL-1、バーキットリンパ腫由来 Ramos 細胞）を、培地、5 nM のタファシタマブ、リツキシマブ又は両剤の混合液とともに 96 時間（ただし SU-DHL-6 のみ 24 時間）インキュベートし、Cell-Titer Glo アッセイを使用して生細胞減少率を求めた。

9 種の細胞株のうち、1 つの細胞株（NU-DUL-1 細胞）は主にタファシタマブ単剤に対して感受性を示し、9 細胞株中 3 細胞株（OCI-Ly10、TMD8 及び U2932 細胞）は主にリツキシマブ単剤に

対して感受性を示した（Figure 13）。タファシタマブとリツキシマブを併用することで、5 つの細胞株（HT、SU-DHL-4、SU-DHL-6、SU-DHL-2 及び Ramos 細胞）でそれぞれの単剤処理時に比べ統計学的に有意な細胞生存率の低下が認められた。

Figure 13: **9 種のリンパ腫細胞株におけるタファシタマブ、リツキシマブ及び両剤併用時の細胞傷害活性の比較**



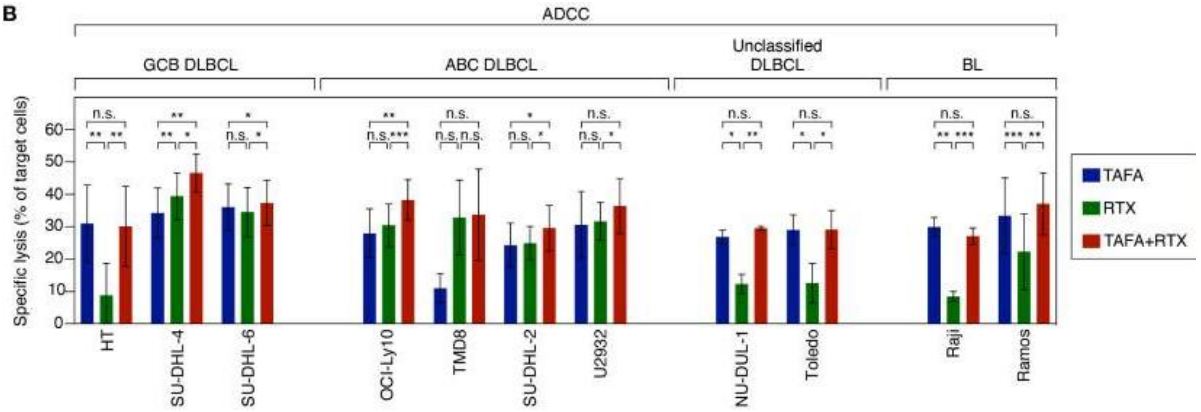
9 種の B 細胞リンパ腫細胞を、抗体を含まない培地、5 nM タファシタマブ（TAFA）、5 nM リツキシマブ（RTX）、または両剤混合（TAFA+RTX）とともに、24 時間（SU-DHL-6 細胞株）又は 96 時間（他のすべての細胞株）培養した。なお、SU-DHL-6 細胞株では各抗体単剤で急速かつ顕著な生存率低下が見られたため、培養時間を 24 時間とした。細胞生存率は、Cell-Titer Glo アッセイを使用して測定し、無処置細胞に対して正規化した。3〜6 回の独立した試験の平均値と標準偏差 をグラフに示す。* p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、n.s.: 有意差なし（対応のある t 検定）。
出典：Patra-Kneuer M, et al. Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558. Figure 1 D

2.1.13.2. 各種リンパ腫細胞株におけるリツキシマブ併用時の ADCC 活性

タファシタマブとリツキシマブの併用時の ADCC 活性を、11 種の標的細胞株（GCB-DLBC 由来 HT、SU-DHL-4 又は SU-DHL-6、ABC-DLBCL 由来 OCI-LY10、TMD8、SU-DHL-2 又は U-2932、未分類 DLBCL 由来 NU-DUL-1 又は Toledo、バーキットリンパ腫由来 Raji 又は Ramos 細胞）を初代 NK 細胞又は 1 又は 10 nM のタファシタマブ、リツキシマブあるいはこれら 2 剤とインキュベートし、DAPI を指標に測定した。

その結果、11 種の細胞株のうち 7 種（HT、TMD8、U2932、NU-DUL-1、Toledo、Raji 又は Ramos 細胞）では、両剤併用とそれぞれの単剤で処理したときの ADCC 活性の間に有意な差はなかった（Figure 14）。なお、これら 7 種のうち 5 種（HT、NU-DUL-1、Toledo、Raji 及び Ramos 細胞）ではタファシタマブ単剤がリツキシマブ単剤より高い ADCC 活性を示し、2 種（TMB8 及び U2932 細胞）では、タファシタマブとリツキシマブの ADCC 活性に差はなかった。一方、11 種類の標的細胞株のうち、残り 4 種（SU-DHL-4、SU-DHL-6、OCI-Ly10 及び SU-DHL-2 細胞）では、タファシタマブ又はリツキシマブの単剤に比べ、両剤の併用時に有意に高い ADCC 活性が認められた。

Figure 14: **11 種のリンパ腫細胞株におけるタファシタマブ、リツキシマブ及び両剤併用時の ADCC 活性の比較**



初代培養 NK 細胞をエフェクター細胞、DLBCL 又はバーキットリンパ腫（BL）計 11 種の細胞株を標的細胞として使用し、1 又は 10 nM のタファシタマブ、リツキシマブ、又はこれら 2 剤とともにそれぞれインキュベートした。E:T 比 は 0.5:1（HT、SU-DHL-4 及び Toledo 細胞）、1:1（OCI-Ly10、TMD8、SU-DHL-2、NU-DUL-1 及び Raji 細胞）、又は 3: 1（SU-DHL-6、U2932 及び Ramos 細胞）とした。Specific lysis（%）は、DAPI 陽性 CFSE 標識標的細胞の定量化によって決定した。3～4 名（HT: 4 名、SU-DHL-4: 4 名、SU-DHL-6: 3 名、OCI-LY10: 3 名、TMD8: 3 名、SU-DHL-2: 4 名、U2932: 4 名、NU-DUL-1: 3 名、Toledo: 3 名、Raji: 3 名、Ramos: 4 名）のドナーから得たエフェクター細胞を使用して実施された独立した試験の平均値をグラフに示した。*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、n.s.: 有意差なし（対応のある t 検定）。
出典：Patra-Kneuer M, et al. Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558. Figure 2 B

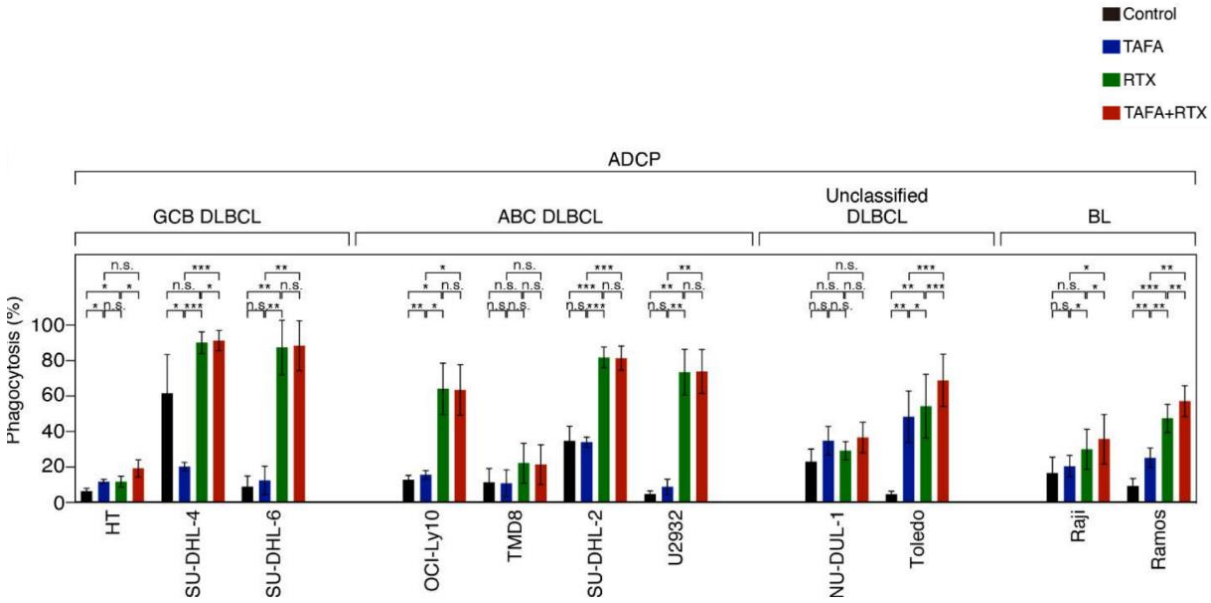
2.1.13.3. 各種リンパ腫細胞株におけるリツキシマブ併用時の ADCP 活性

タファシタマブとリツキシマブの併用時の ADCC 活性を検討した 11 種の B 細胞リンパ腫細胞株を標的細胞、単球由来成熟マクロファージをエフェクター細胞として、抗体なし（対照）又はタファシタマブ、リツキシマブ、これら 2 剤とともにインキュベートし、フローサイトメトリー法を用い貪食率を指標に ADCP 活性について検討した。

その結果、11 種の細胞株のうち 4 種（SU-DHL-6、OCI-Ly10、SU-DHL-2 及び U2932 細胞）はリツキシマブ単剤でも高い ADCP 活性を示し、タファシタマブを併用しても有意な ADCP 活性の増強は認められなかった（Figure 15）。HT 細胞ではタファシタマブとリツキシマブの単剤で同程度の ADCP 活性が認められ、併用時の ADCP 活性はリツキシマブ単剤に比べ有意に高かったが、タファシタマブ単剤との間に有意差は認められなかった。TMD8 細胞及び NU-DUL-1 細胞はタファシタマブ、リツキシマブのいずれでも ADCP 活性が認められず、併用しても ADCP 活性は得られなかった。

一方、11 種の細胞株のうち 4 種（SU-DHL-4、Toledo、Raji 及び Ramos 細胞）において、タファシタマブとリツキシマブの併用により、それぞれの単剤に比べて有意な ADCP 活性の増強が認められた。なお、SU-DHL-4 細胞においては、対照による ADCP 活性 61%という想定外の高い値が認められた。

Figure 15:　11 種のリンパ腫細胞株におけるタファシタマブとリツキシマブ併用時の ADCP 活性の比較



CellTrace Violet 染色した DLBCL 又はバーキットリンパ腫（BL）細胞株を標的細胞、CFSE 染色した単球由来マクロファージをエフェクター細胞とし、E:T 比 2:1 で使用した。これらの細胞を飽和濃度 10 nM のタファシタマブ、リツキシマブ又はこれら 2 剤又は抗体なし（対照）とそれぞれインキュベートした。貪食率（%）は二重染色細胞の割合から算出した。3～5 名（HT: 3 名、SU-DHL-4: 4 名、SU-DHL-6: 3 名、OCI-LY10: 3 名、TMD8: 3 名、SU-DHL-2: 4 名、U2932: 4 名、NU-DUL-1: 3 名、Toledo: 5 名、Raji: 4 名、Ramos: 4 名）のドナーから得たエフェクター細胞を使用して実施された独立した試験の平均値をグラフに示した。*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、n.s.: 有意差なし（対応のある t 検定）。
出典：Patra-Kneuer M, et al. Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558. Figure 2 C

以上、11 種の細胞株を用いて行った直接的な細胞傷害性、ADCC 活性、ADCP 活性の検討結果をまとめると、11 種の細胞株のうち 8 種においてタファシタマブとリツキシマブの 2 剤併用により、ADCC、ADCP 又は直接的な細胞傷害性のうち少なくとも 1 つの作用機序を介した統計学的に有意な腫瘍細胞死の増加が認められた（Figure 16）。残りの細胞株のうち、1 種の細胞株はタファシタマブ単剤、別の 2 種の細胞株はリツキシマブ単剤に対し高い感受性を示したため、併用による有意な作用の増強は見られなかった。

Figure 16:　11 種のリンパ種細胞株を用いた *in vitro* 試験におけるタファシタマブとリツキシマブの併用効果のまとめ

Mode of action	GCB			ABC				Unclassified		BL	
	HT	SU-DHL-4	SU-DHL-6	OCI-LY10	TMD8	SU-DHL-2	U-2932	NUDUL-1	TOLEDO	RAJI	RAMOS
Reduction of cell viability	C	C	C	R	R	C	R	T	n.d.	n.d.	C
ADCC	T	C	C	C	T+R	C	T+R	T	T	T	T
ADCP	T+R	C	R	R	ins.	R	R	ins.	C	C	C

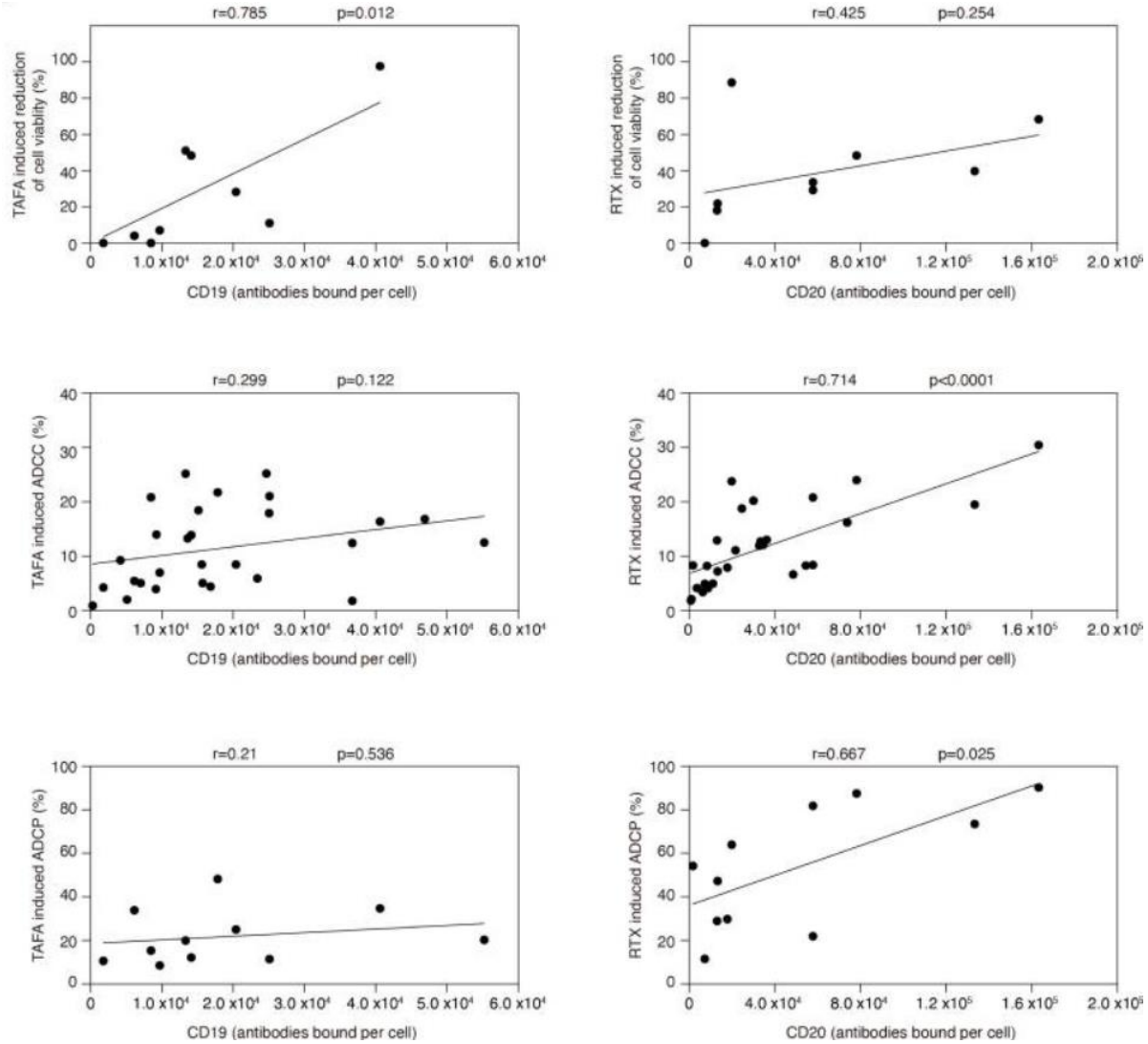
C: タファシタマブとリツキシマブの併用により有意な作用増強が認められた
T: 主にタファシタマブに感受性を示し、併用による有意な作用増強が認められなかった
R: 主にリツキシマブに感受性を示し、併用による有意な作用増強が認められなかった
T+R: タファシタマブとリツキシマブ両剤に感受性を示し、併用による有意な作用増強は認められなかった
n.d.: 判定不能（解釈困難な結果）
ins.: タファシタマブとリツキシマブのいずれにも感受性を示さなかった
出典：Patra-Kneuer M, et al. Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558. Figure 3 A

2.1.13.4. 標的分子発現レベルと抗体活性の相関関係

タファシタマブとリツキシマブにより得られた直接的細胞傷害作用、ADCC 活性及び ADCP 活性と、検討対象とした細胞株の細胞表面 CD19 又は CD20 抗原発現量との相関関係について Pearson's test を用いて検討した（Figure 17）。

タファシタマブによる直接的細胞傷害作用は、各標的細胞株の CD19 抗原発現量と明らかな相関を示し（p = 0.012）、標的細胞株の CD20 抗原発現量とリツキシマブによる ADCC 活性及び ADCP 活性の間に有意な相関が認められた（それぞれ p < 0.0001 及び p = 0.025）。各標的細胞株の CD19 抗原発現量とタファシタマブによる ADCC 活性（p = 0.122）及び ADCP 活性（p = 0.536）並びに CD20 抗原発現量とリツキシマブによる直接的細胞傷害作用（p = 0.254）の間には相関関係は認められなかった。リンパ腫のサブタイプとタファシタマブ又はリツキシマブの各作用の間にも相関関係は認められなかった。

Figure 17: リンパ腫細胞株における CD19 又は CD20 抗原発現量と直接的な細胞傷害活性、ADCC 活性及び ADCP 活性との相関



出典：Patra-Kneuer M, et al. Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558. Figure 3 B

2.2. *In vivo* 薬理試験

2.2.1. Ramos 又は Raji 細胞株皮下異種移植モデルにおけるタファシタマブの抗腫瘍効果

Ramos 又は Raji 細胞株を皮下移植した SCID マウスを 5 群（10 例/群）に分け、腫瘍細胞移植後 Day 3、6、10 及び 13 にそれぞれタファシタマブ 1、3 又は 10 mg/kg、XmAb アイソタイプ対照 10 mg/kg 又は PBS を腹腔内投与し、触知可能な腫瘍を週 2 回計測して腫瘍体積を求めた（Horton et al 2008）。

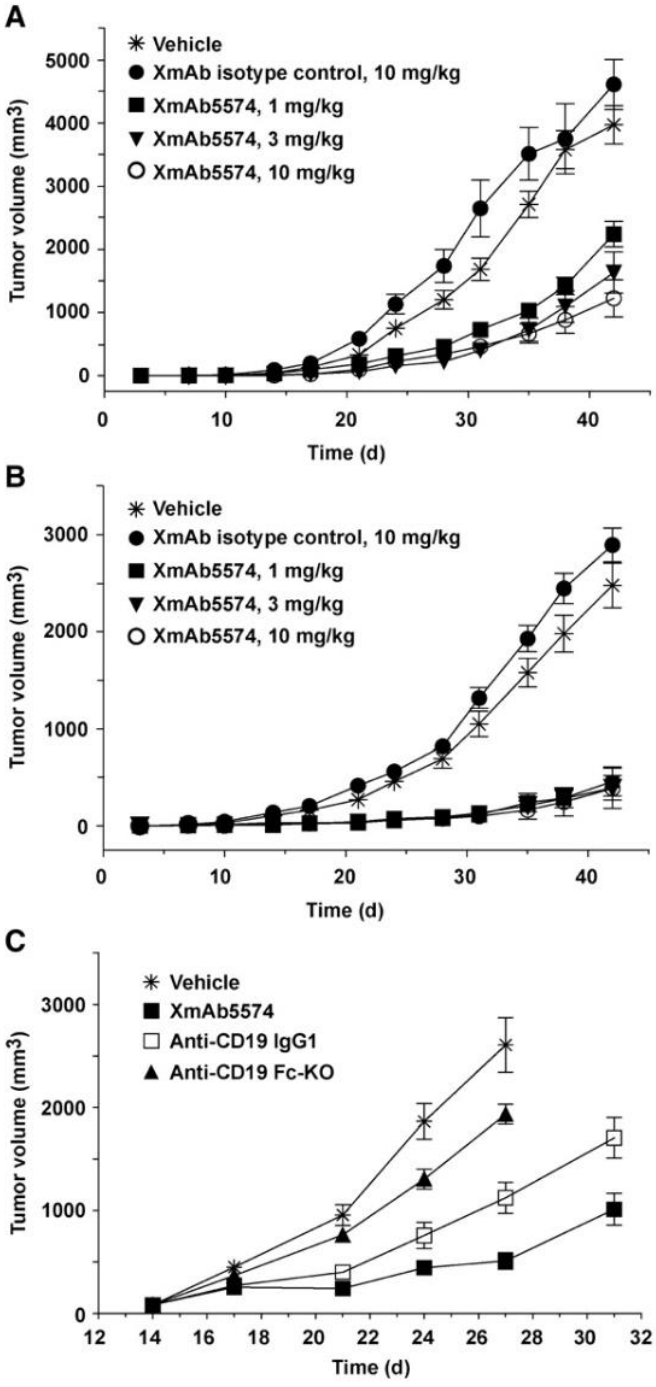
その結果、Ramos 及び Raji 細胞移植モデルのいずれにおいても Day 3、6、10 及び 13 にタファシタマブを投与した群では、いずれの用量でも PBS 対照群又は XmAb アイソタイプ対照群と比較し、統計学的に有意な腫瘍増殖抑制が認められた（$p < 0.05$、Mann-Whitney U test、Figure 18 A 及び B）。

Ramos 細胞移植モデルでは、Day 42 において、タファシタマブ 1、3 及び 10 mg/kg 投与群は対照と比較して、それぞれ腫瘍増殖を 44、59 又は 69%抑制した。Raji 細胞移植モデルでは、タファシタマブ 1、3 及び 10 mg/kg 投与群は PBS 対照群又は XmAb アイソタイプ対照群と比較し、腫瘍増殖を 80%以上抑制し、10～30%のマウスで腫瘍が完全消失した。いずれの試験においても、XmAb アイソタイプ対照と PBS 対照の間に差は認められなかったことから、S239D/I332E のアミノ酸置換は、免疫エフェクター細胞の非特異的活性化を誘導しないことが示唆された。

次に、進行した腫瘍モデルにおけるタファシタマブの有効性を評価するため、Ramos 細胞移植後 Day14 時点で 30～130 mm^3 の腫瘍を有するマウスを、各群の平均腫瘍体積が同じになるように群分けし（82～84 mm^3;各群 10 例）、10 mg/kg のタファシタマブ、抗 CD19-IgG1 又は抗 CD19, Fc-KO あるいは PBS を週 2 回 2 週間で腹腔内投与した。

Day 27 までに、いずれの抗 CD19 抗体でも PBS 対照群と比較して腫瘍増殖が有意に抑制された（Figure 18 C）。タファシタマブは最も高い腫瘍増殖抑制効果を誘発し、Day 27 において、タファシタマブ、抗 CD19-IgG1 又は抗 CD19, Fc-KO は PBS 対照群に比べ、腫瘍増殖をそれぞれ 80%、57%及び 26%減少させ、いずれも統計学的に有意な差を示した（$p < 0.05$、Mann-Whitney U test）。

Figure 18:　Ramos 又は Raji 細胞株皮下異種移植モデルにおけるタファシタマブの抗腫瘍効果



A: SCID マウスに Ramos 細胞 5×10^6 個を皮下移植した後、Day 3, 6, 10 及び 13 に、タファシタマブ（1、3 又は 10 mg/kg）、XmAb アイソタイプ対照 10 mg/kg 又は PBS 溶媒を投与。
B: SCID マウスに Raji 細胞 10^7 個を皮下移植した後、Day 3, 6, 10 及び 13 に、タファシタマブ（1、3 又は 10 mg/kg）、XmAb アイソタイプ対照 10 mg/kg 又は PBS 溶媒を投与。
C: SCID マウスに Ramos 細胞 2.5×10^6 個を皮下移植し平均腫瘍体積を 80 mm^3 まで増殖させ、Day 14 からタファシタマブ、抗 CD19-IgG1 又は抗 CD19, Fc-KO をそれぞれ 10 mg/kg 又は PBS を週 2 回 2 週間で腹腔内投与した。
1 群各 10 例、平均値±SD を示した。
出典：Horton HM et al. Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057. Figure 6

2.2.2. Ramos 細胞株播種性異種移植モデルにおけるタファシタマブとレナリドミドの併用効果

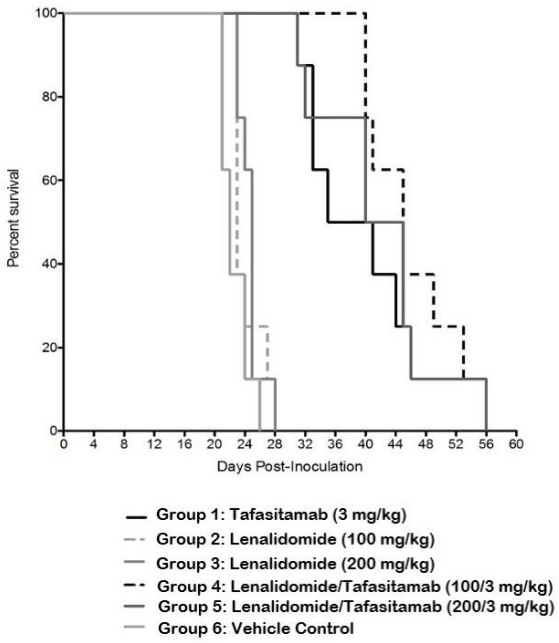
Ramos 細胞株を、SCID マウス（8 例/群）の尾静脈から注入し、その後ランダムに、2 つのレナリドミドとタファシタマブの併用投与群（100/3 mg/kg、200/3 mg/kg）、タファシタマブ 3 mg 投与群、レナリドミド 100 mg/kg 投与群、レナリドミド 200 mg/kg 投与群、溶媒投与群の 6 群に分け、タファシタマブとレナリドミドの併用時の延命効果を単剤投与時と生存期間中央値及び生存期間延長率（ILS）により比較した【MOR208P009】。

腫瘍受容率を高めるため、腫瘍細胞移植に先立ちシクロホスファミドを 2 日間投与し、移植日を試験開始日（Day 0）とし、薬剤又は溶媒は Day 3 より投与開始した。レナリドミド（100 又は 200 mg/kg）は Day 3 より 28 日間連日経口投与する計画とし、タファシタマブ（3 mg/kg）は週 2 回、3 週間（Day 3、6、10、13、17 及び 20）静脈内投与した。溶媒投与群には、Ora-Plus:Ora-Sweet SF 混液（1:1）をレナリドミドと同期間経口投与するとともに、アイソタイプ対照抗体（Ref_mab_33）を Day 3、6、10、13、17 及び 20 に静脈内投与した。薬剤投与終了後、Day 56 まで生存期間を追跡した。

Kaplan-Meier 生存曲線に統計学的に有意な差［$p < 0.001$、Log-rank (Mantel-Cox) test］が認められた（Figure 19）ので、多重対比較（Holm-Sidak test）を実施した。タファシタマブ投与群（Group 1）、タファシタマブとレナリドミドを併用した群（Group 4 及び 5）では、溶媒対照群（Group 6）に比べ生存期間中央値の統計学的に有意な延長が見られた（$p < 0.05$、Holm-Sidak test、Table 5）。しかしながら、レナリドミドを単独投与した群（Group 2 及び 3）では、溶媒対照群（Group 6）に比べ統計学的に有意な生存期間延長は見られなかった。タファシタマブとレナリドミドを併用した Group 4 及び 5 では、同量のレナリドミドを投与した群（それぞれ Group 2 及び 3）に比べ、生存期間中央値の統計学的に有意な延長が認められた（$p < 0.05$、Holm-Sidak test）。

併用時の効果は 2 つの併用療法群で明らかに同じ傾向を示し、それぞれの薬剤の単剤投与時の ILS 合計は併用投与時の ILS を下回り、増強効果が認められた。

Figure 19: Ramos 細胞株播種性異種移植モデルにおけるタファシタマブとレナリドミドの併用効果：Kaplan-Meier 生存曲線



出典：MOR208P009 Figure 1

Table 5:　Ramos 細胞播種性異種移植モデルにおけるタファシタマブとレナリドミドの併用効果：平均生存期間及び生存期間延長率

群	薬剤投与	生存期間中央値（移植後日数）	生存期間延長率（%ILS）§	Day 56に臨床症状なしの動物数	併用効果の評価
1	タファシタマブ3 mg/kg	38.0[a]	72.73	0/8	NA
2	レナリドミド100mg/kg	23.0	4.55	0/8	NA
3	レナリドミド200 mg/kg	25.0	13.64	0/8	NA
4	レナリドミド/タファシタマブ（100/3 mg/kg）	45.0[a,b]	104.55	0/8	増強*
5	レナリドミド/タファシタマブ（200/3 mg/kg）	42.5[a,c]	93.18	0/8	増強**
6	溶媒対照	22.0	NA	0/8	NA

§: 次式により求めた。
　生存期間延長率
　＝（薬剤投与群の生存期間中央値－溶媒対照群の生存期間中央値）/（溶媒対照群の生存期間中央値）×100
a: 溶媒対照群（Group 6）に対し統計学的有意差あり（$p < 0.05$、Holm-Sidak test）
b: レナリドミド 100 mg/kg 群（Group 2）に対し統計学的有意差あり（$p < 0.05$、Holm-Sidak test）
c: レナリドミド 200 mg/kg 群（Group 3）に対し統計学的有意差あり（$p < 0.05$、Holm-Sidak test）
NA: Not Applicable
*: ILS 併用 (104.55%) > ILS タファシタマブ 3mg/kg + ILS レナリドミド 100 mg/kg (72.73% + 4.55% = 77.28%)。
**: ILS 併用(93.18%) > ILS タファシタマブ 3mg/kg + ILS レナリドミド 200 mg/kg (72.73% + 13.64% = 86.37%)
出典：MOR208P009 Table 2

2.2.3.　Ramos 細胞株皮下異種移植モデルにおけるタファシタマブとリツキシマブの併用効果

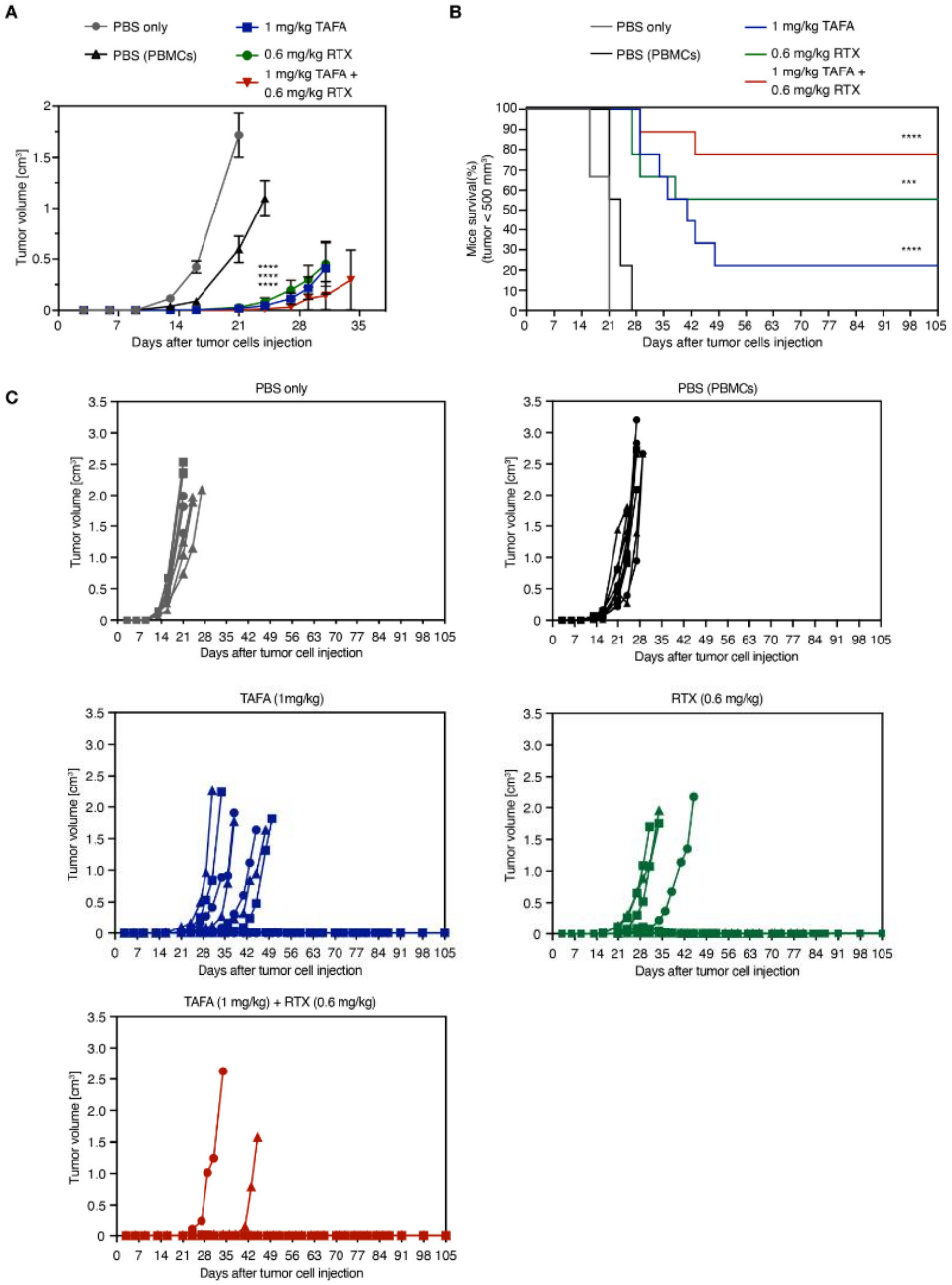
Ramos 細胞株と健康ドナーの全血から分離した PBMC を E:T 比 5：1 になるよう混合して NOD／SCID マウス（9 例/群）に皮下移植し、移植日（Day 0）からタファシタマブ 0.3 又は 1 mg/kg、リツキシマブ 0.3、0.6 又は 1 mg/kg をそれぞれ単独又は併用により週 2 回 6 週間腹腔内投与し、腫瘍体積を週 3 回測定した（Patra-Kneuer et al 2023）。陰性対照として、Ramos 細胞のみを皮下移植し、PBS を投与する PBS only 群、及び Ramos 細胞と PBMC を皮下移植し PBS を投与する PBS（PBMCs）群の 2 群を設定した。なお、腫瘍体積が 1.5 cm^3 以上となった場合、当該動物は切迫屠殺した。腫瘍体積は移植後 105 日目まで測定し、生存率解析では、腫瘍体積が 500 mm^3 に達することを以てエンドポイント到達とみなした。

その結果、タファシタマブ又はリツキシマブ単剤投与群では、それぞれ PBS（PBMCs）群と比較して用量依存的な腫瘍増殖抑制が認められた。タファシタマブ 1 mg/kg とリツキシマブ 0.6 mg/kg の 2 剤の併用投与群の平均腫瘍体積が最も低く推移し、併用群とリツキシマブ 0.6 mg/kg 投与群との比較では傾向差が、タファシタマブ 1 mg/kg 投与群との比較では、統計学的有意差が認められ（$p = 0.079$、$p = 0.032$、Mann-Whitney test）、タファシタマブとリツキシマブの併用により、腫瘍増殖抑制作用の増強が見られた（Figure 20 A）。

移植後 105 日までの間に、タファシタマブ 1 mg/kg 投与群では 9 例中 2 例、リツキシマブ 0.6 mg/kg 投与群では 9 例中 5 例、タファシタマブ 1 mg/kg とリツキシマブ 0.6 mg/kg の併用群では 9 例中 7 例で腫瘍の消失が見られた（Figure 20 C）。

生存率の比較では、タファシタマブ 1 mg/kg とリツキシマブ 0.6 mg/kg の併用群はタファシタマブ 1 mg/kg 投与群に比べ統計学的に有意な生存延長を示した（$p = 0.022$, Mantel-Cox test）が、リツキシマブ 0.6 mg/kg 投与群との間に有意差は認められなかった（$p = 0.27$, Mantel-Cox test）（Figure 20 B）。

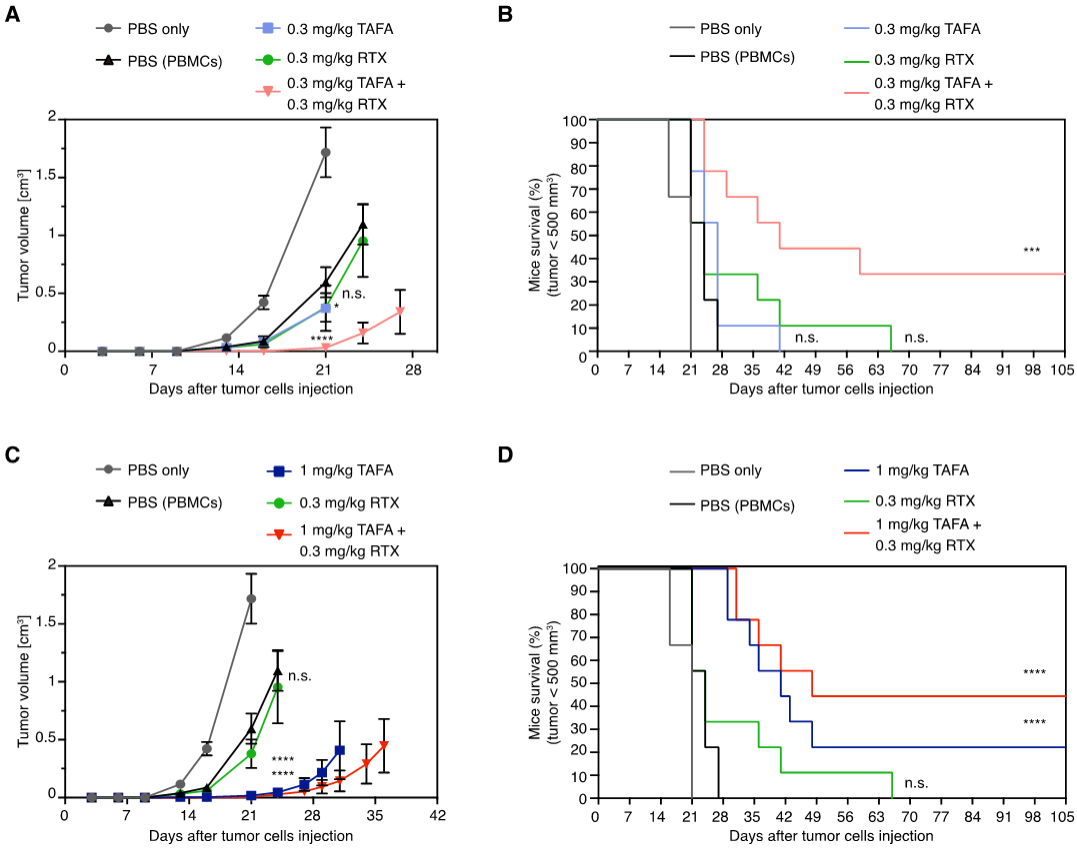
Figure 20:　Ramos 細胞株と PBMC の同時皮下異種移植 NOD/SCID マウスにおけるタファシタマブ 1 mg/kg、リツキシマブ 0.6 mg/kg 又は併用投与時の腫瘍体積及び生存率



3 名の健康ドナー由来 PBMC と Ramos 細胞を E:T 比 5:1 で NOD/SCID マウス 9 例/群（3 例/ドナー/群）の皮下に移植し、移植日より週 2 回、6 週間にわたり抗体を投与した。
PBS only: Ramos 細胞のみマウスに皮下移植して、抗体の代わりに PBS を腹腔内投与した対照群
PBS (PBMCs): Ramos 細胞と PBMC を共にマウスに皮下移植して抗体の代わりに PBS を腹腔内投与した対照群
A: 2 つの対照群、タファシタマブ 1 mg/kg 投与群、リツキシマブ 0.6 mg 投与群及びタファシタマブ 1 mg/kg とリツキシマブ 0.6 mg/kg 併用投与群の平均腫瘍体積の推移。
B: 2 つの対照群、タファシタマブ 1 mg/kg 投与群、リツキシマブ 0.6 mg 投与群及びタファシタマブ 1 mg/kg とリツキシマブ 0.6 mg/kg 併用投与群の生存率（腫瘍体積が 500 mm^3 に達するまでの期間を生存期間とみなした Kaplan-Meier 曲線）
C: 2 つの対照群、タファシタマブ 1 mg/kg 投与群、リツキシマブ 0.6 mg 投与群及びタファシタマブ 1 mg/kg とリツキシマブ 0.6 mg/kg 併用投与群の個別動物の腫瘍体積推移。PBMC のドナー別に異なる記号を用いて示した。
p < 0.001、*p < 0.0001、n.s.: 有意差なし［PBS (PBMCs)対照群との比較、腫瘍体積の比較は Mann-Whitney test、生存期間の比較は Mantel-Cox test］
出典: Patra-Kneuer M, et al. Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558. Figure 6

タファシタマブ 0.3 又は 1 mg/kg とリツキシマブ 0.3 mg/kg を併用したときの平均腫瘍体積の推移並びに生存曲線を Figure 21 に示した。タファシタマブ及びリツキシマブ 0.3 mg/kg 同士の併用群では、それぞれを単剤で投与したときに比べ有意な生存期間延長が認められ（Figure 21 B、対タファシタマブ p = 0.015、対リツキシマブ p = 0.033、Mantel-Cox test）、タファシタマブ 1 mg/kg とリツキシマブ 0.3 mg/kg の併用群ではリツキシマブ単剤投与群との間にのみ有意差が見られ、タファシタマブ 1 mg/kg 単剤投与群との間に差は見られなかった（Figure 21 D、対タファシタマブ p = 0.333、対リツキシマブ p = 0.007, Mantel-Cox test）。多変量 Cox 比例ハザードモデルを使用したシナジー解析では、タファシタマブ 1 mg/kg とリツキシマブ 0.6 mg/kg の相乗効果が確認され、（ハザード比 12.068、p = 0.042）タファシタマブ 1 mg/kg とリツキシマブ 0.3 mg/kg の併用では相加性が確認された（ハザード比 2.004、p = 0.39）。

Figure 21:　Ramos 細胞株と PBMC の同時皮下異種移植 NOD/SCID マウスにおけるタファシタマブ 0.3 又は 1 mg/kg、リツキシマブ 0.3 mg/kg 又は両剤の併用投与時の腫瘍体積及び生存率



3 名の健康ドナー由来 PBMC と Ramos 細胞を E:T 比 5:1 で NOD／SCID マウス 9 例/群（3 例/ドナー/群）の皮下に移植し、移植日より週 2 回、6 週間にわたり抗体を投与した。
A 及び C: タファシタマブ 0.3 mg/kg（A）又は 1 mg/kg（C）、リツキシマブ 0.3 mg/kg 又はこれら 2 剤を併用投与したマウスの平均腫瘍体積の推移。A は Day 21、C は Day 24 に Mann-Whitney test により群間の腫瘍体積の差を検討した。*p ＜ 0.05、**p ＜ 0.01、***p ＜ 0.001、****p ＜ 0.0001、n.s:有意差なし［PBS (PBMCs)対照群との比較］。A における併用投与群とタファシタマブ単剤投与群又はリツキシマブ単剤投与群との比較では、それぞれ p = 0.005 又は p = 0.053 であった。C における併用投与群とタファシタマブ単剤投与群又はリツキシマブ単剤投与群との比較では、それぞれ p = 0.09 又は p = 0.019 であった。
B 及び D: タファシタマブ 0.3 mg/kg（B）又は 1 mg/kg（D）、リツキシマブ 0.3 mg/kg 又はこれら 2 剤を併用投与したマウスの生存解析。群間比較のため Mantel-Cox test を実施。*p ＜ 0.05、**p ＜ 0.01、***p ＜ 0.001、**** p ＜ 0.0001、n.s: 有意差なし［PBS (PBMCs)対照群との比較］。B における併用投与群とタファシタマブ単剤投与群又はリツキシマブ単剤投与群の比較では、それぞれ p = 0.015 又は p = 0.033 であった。D における併用投与群とタファシタマブ単剤投与群又はリツキシマブ単剤投与群の比較では、それぞれ p = 0.333 又は p = 0.007 であった。
出典: Patra-Kneuer M, et al. Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558. Figure S3

2.2.4. Jeko-1 細胞株又は患者由来 ALL 細胞静脈内異種移植モデルにおけるタファシタマブと CART19 の逐次療法の検討

既承認の CAR-T 細胞療法の 1 つであるチサゲンレクルユーセルと同様の CAR コンストラクト（FMC63-41BBζ）を使用して、タファシタマブと CD19 を標的とする CAR-T 細胞（CART19）療法の前にタファシタマブを使用した場合の抗腫瘍効果と生存期間を MCL 由来 Jeko 細胞株移植マウスを用いて検討された。その結果、タファシタマブ投与を受けていたマウスでは、タファシタマブ投与を受けていないマウスに比べ CART19 投与後の抗腫瘍効果と生存期間の向上が認められたため、その機序について患者由来 ALL 移植 CAR-T 細胞毒性マウスモデルを用いた検討が行われた（Sakemura et al 2024）。

In vitro 試験において、タファシタマブと CART19 の同時併用では CD19 に結合する CART19 の FMC63 ドメインとタファシタマブが競合し、CART19 の機能が阻害されるが、タファシタマブで処理後に未結合のタファシタマブを除去した場合には CART19 の機能は影響を受けないことが確認された。そこで、タファシタマブ無効例において一定期間経過した後に CART19 療法が行われた場合を模した、ルシフェラーゼ発現 Jeko-1 細胞株と NSG マウスによる 2 段階異種静脈内移植モデルを用い、生物発光イメージング（BLI）による腫瘍量の変化と全生存率の検討が行われた。

本モデルでは、第 1 段階として Jeko-1 細胞移植 7 日後に腫瘍量に基づきマウスをランダムに 2 群に分け、タファシタマブ又は PBS（溶媒）の週 3 回 3 週間腹腔内投与を行った。NK 細胞欠損等を特徴とする重複免疫不全マウスである NSG マウスでは、3 週間のタファシタマブ投与により明らかな抗腫瘍効果は認められなかった。第 1 段階終了時点で両群のマウスの脾臓を摘出し、第 2 段階として無処置の NGS マウスにタファシタマブ又は PBS の投与群から得られた脾臓細胞を移植し、移植 14 日後（Day 0）に CART19 又は非形質導入 T 細胞を静脈内投与し、Day41 まで BLI を用いた腫瘍量の評価を行った。その結果、CART19 投与後に、タファシタマブによる前処理群で PBS 前処理群に比べ有意に高い抗腫瘍効果（Day 41 において $p < 0.05$、t-test）及び全生存期間延長［ハザード比（HR）5.96；95%信頼区間 0.9971-35.63、$p = 0.05$、Log-rank test］が示された。

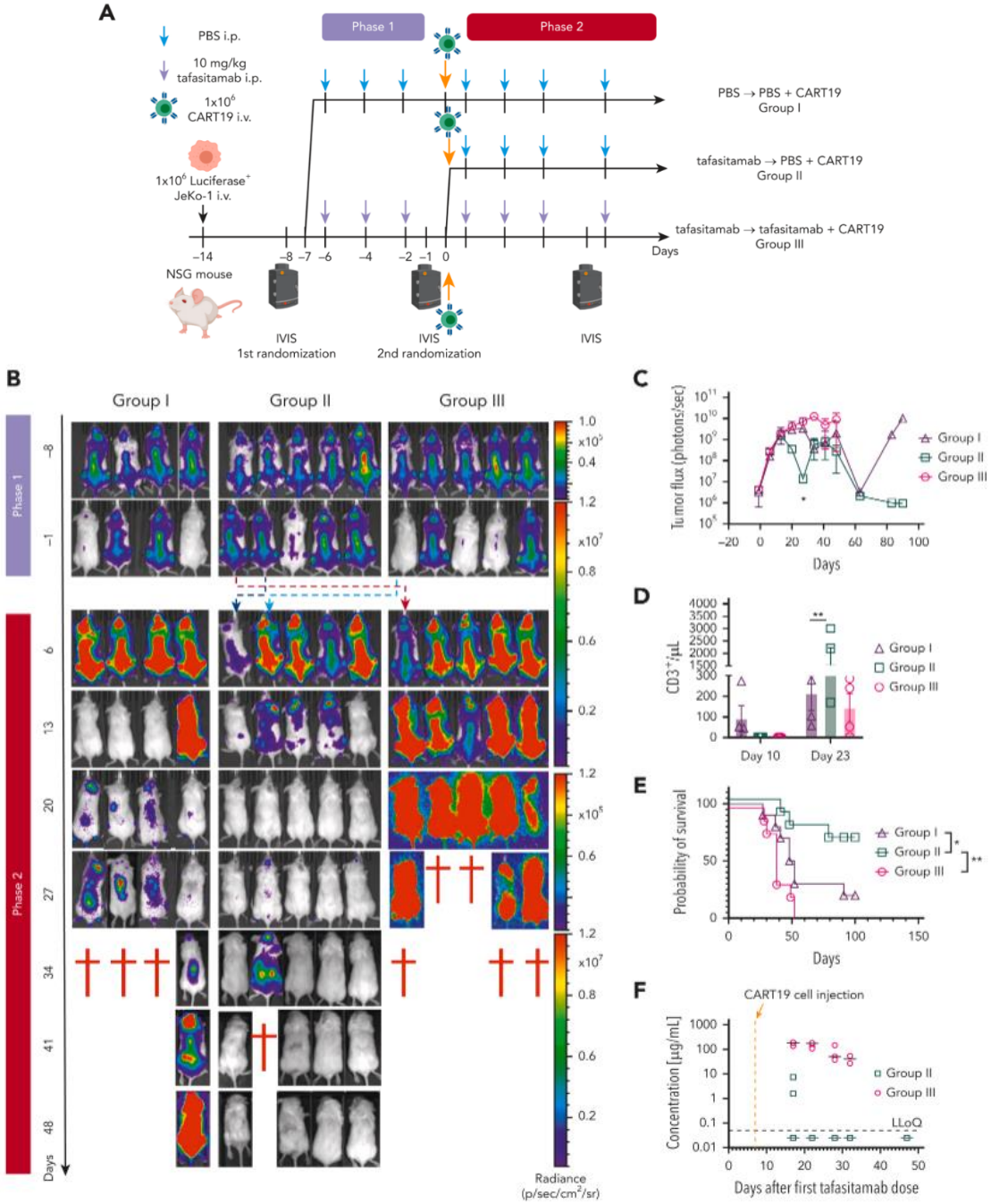
この結果を踏まえ、更に、タファシタマブ投与期間中又はタファシタマブ投与終了後直ちに CART19 を行った場合を模したモデルでの検討が行われた。

ルシフェラーゼ発現 Jeko-1 細胞株を静脈内投与により NSG マウスに移植し、移植日（Day -14）から 1 週間後（Day -7）に、BLI から求めた腫瘍量に基づきマウスを PBS（Group I）週 3 回腹腔内投与群（n = 5）又はタファシタマブ週 3 回腹腔内投与群（n = 10）にランダムに割付け、各群に Day-6 から Day-2 までに 3 回、PBS 又はタファシタマブ 10 mg/kg/day を腹腔内投与した。3 回目投与の翌日（Day-1）に再び BLI を用いて腫瘍量を評価し、タファシタマブ投与を受けていた 10 例を、タファシタマブ投与中止群（Group II、n = 5）とタファシタマブ投与継続群（Group III、n = 5）にランダムに割付けた。更に翌日（Day 0）に Group I～III の全例に CART19 を静脈内投与した。Group I 及び II には PBS、Group III にはタファシタマブの週 3 回腹腔内投与を継続して行い、BLI による腫瘍量の経時的評価と生存期間について評価した（Figure 22 A）。また、CART19 の増殖程度を見るため、Day 10 及び Day 23 に全群から末梢血を採取した。Group II 及び III ではタファシタマブ初回投与開始日から 47 日後まで定期的に採血し、血清中タファシタマブ濃度を確認した。

その結果、タファシタマブ投与中止後すぐに CART19 投与を行った Group II では、タファシタマブ前処理を受けていない Group I 及び CART19 投与前のみならず CART19 投与後もタファシタマブ投与を継続した Group III に比べ有意に高い抗腫瘍効果（$p < 0.05$、二元配置分散分析）が認められた（Figure 22 B 及び C）。生存期間の比較においても、Group II は他の 2 群に比べ有意に優っていた（Figure 22 E）。Group II 及び III では Day 10 における CART19 が PBS 対照の Group I より少なかったが、Day 23 においては CART19 投与前にタファシタマブ投与を中止した Group II のみ、Group I に比べ有意な高値（$p < 0.01$、二元配置分散分析）を示していたことから、Group

II では CSRT19 投与直後に残存するタファシタマブが細胞表面の CD19 をマスクして CAR-T 活性化を抑え、初期の CSRT19 のアポトーシスが減ることにより、抗腫瘍効果と生存期間延長につながったのではないかと考えられた。

Figure 22:　ルシフェラーゼ陽性 Jeko-1 細胞株静脈内異種移植 NSG マウスモデルにおける CART19 の抗腫瘍効果に対するタファシタマブ前処理の影響



（A）実験スキーマ。NSG マウスにルシフェラーゼ発現 Jeko-1 細胞 1×10 ^{6} 個を移植し、移植日を Day-14 として Day -6 に BLI を用いて腫瘍量を評価し、タファシタマブ 10 mg/kg/day 腹腔内投与群 10 例と PBS 溶媒腹腔内投与群 5 例（Group I）に、腫瘍量に応じてランダムに割付けた。Day -1 に BLI を用いて腫瘍量を再評価し、タファシタマブ投与を受けていたマウスを、タファシタマブ投与中止群（5 例、Group II）と投与継続群（5 例、Group III）にランダムに割付けた。（B 及び C）BLI による解析結果。Group II（CART19 投与前までタファシタマブ投与を受けたマウス）では、Group I 又は Group III より良好な抗腫瘍効果が認められた（* $p < 0.05$、二元配置分散分析）。（D）生体内における CART19 の増加。CART19 の増加解析するため、CART19 投与後の Day 10 及び Day 23 に末梢血を採取した。Group II は遅発性の CART19 増加を示した（** $p < 0.01$、二元配置分散分析）。（E）全生存曲線。Group II は、Group I 又は III と比較して優れた全生存率を示した（* $p < 0.05$、** $p < 0.01$、Log-lank test、Group II vs Group III；HR 0.166、95%信頼区間 0.04991-0.5515、Group II vs I HR 0.294; 95%信頼区間 0.08938-0.9671）。（F）タファシタマブ薬物動態解析。タファシタマブ初回投与から 17、22、28、32 及び 47 日後に末梢血を採取し、タファシタマブの血清中濃度を電気化学発光（ECLA）アッセイにより測定した。
出典: Sakemura RL et al. Blood. 2024 Jan 18;143(3):258-271 Figure 4

このことを確認するため、ルシフェラーゼ発現 Jeko-1 細胞細胞株静脈内移植 NSG マウスモデルにタファシタマブ 10 mg/kg/day 又は PBS を週 3 回 1 週間腹腔内投与した後 CART19 を投与し、その 24 時間後に安楽死させたマウスから採取した脾臓細胞をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、タファシタマブ前処理群では、PBS 前処理群に比べて、活性化 T 細胞（CD69 及び HLA-DR 陽性）が有意に少なく（*p < 0.05、t-test）、アポトーシスを起こした T 細胞も有意に減少（*p < 0.05、t-test）していることが確認された。

タファシタマブと CAR-T 細胞の逐次療法では CART19 の増殖遅延が生じていることから、この逐次療法が CAR-T 細胞療法後のサイトカイン放出症候群（CRS）発生率及び重症度を抑制する可能性について、CAR-T 細胞毒性マウスモデル（Sterner et al 2019、Sakemura et al 2021、Manriquez Roman et al 2023）を用いて評価された。

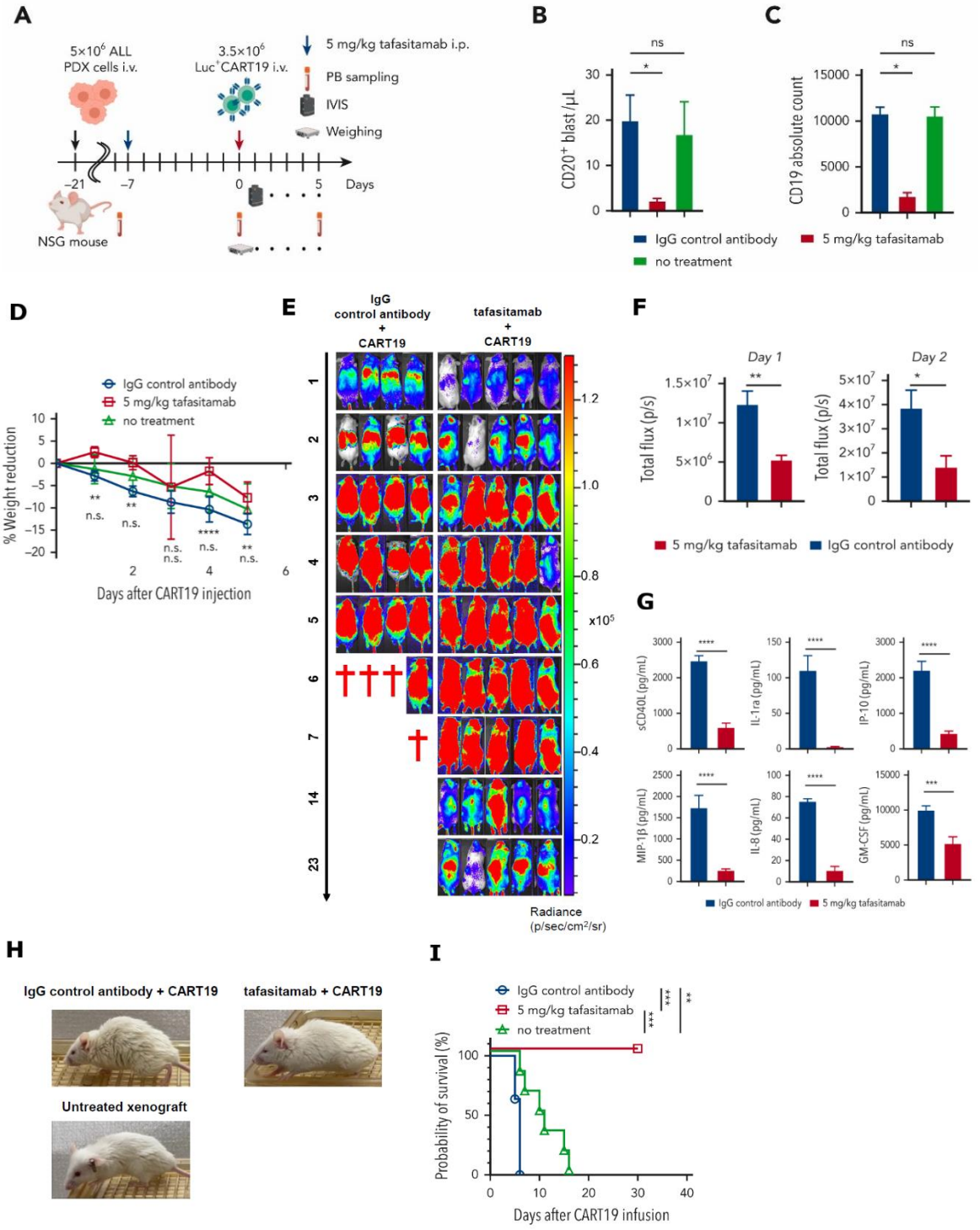
R/R ALL 患者から採取した白血病芽球を NSG マウスに移植し、マウスの全血中ヒト $CD45^+$細胞数が 10 個/μL 以上に達した時点でヒト $CD45^+$細胞数に基づき 3 群にランダムに割付け、うち 2 群には CART19 移植の 1 週間前（Day -7）にタファシタマブ 5 mg/kg（タファシタマブ前処理群）又は IgG 対照（IgG 対照前処理群）を腹腔内投与した。残り 1 群は無処置対照群とした。Day 0 にタファシタマブ前処理群及び IgG 対照前処理群に高用量のルシフェラーゼ発現 CART19 を静脈内投与し、体重変化及び一般状態の観察、腫瘍量及びサイトカイン測定のための末梢血採取、CART19 細胞増殖を定量的に追跡するためのシリアル BLI を行った（Figure 23 A）。CRS は、ヒトサイトカインの上昇を伴う運動麻痺、円背、体重減少の発現と定義した。

CART19 投与前の採血で、タファシタマブ前処理群では IgG 対照前処理群に比べ有意な白血病芽球細胞数の低下がみられ、$CD20^+$白血病細胞上の CD19 のマスキングが起きていることが確認された（Figure 23 B 及び C、p < 0.05、t-test）。

CART19 投与日以降、全群の動物で体重減少が認められたが、IgG 対照前処理群ではタファシタマブ前処理群よりも体重減少の程度が有意に大きかった（Figure 23 D、p < 0.01、二元配置分散分析）。シリアル BLI により、IgG 対照前処理群では CART19 投与直後から CART19 細胞増殖が認められ（Figure 23 E）、Day 1 及び Day 2 における CART19 細胞増殖には、IgG 対照前処理群とタファシタマブ前処理群の間に有意差が認められた（Figure 23 F、p < 0.05、t-test）。CART19 細胞増殖のピークは IgG 対照前処理群では Day 4 に見られ、タファシタマブ前処理群では Day 6 で見られた。Day 4 において、IgG 対照前処理群では CRS 関連サイトカイン［sCD40L、インターロイキン(IL)-1 受容体アンタゴニスト、インターフェロン γ 誘導性タンパク質 10（IP-10）、IL-8、マクロファージ炎症タンパク質（MIP）-1β、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）］レベルがタファシタマブ投与群に比べ有意に高かった（Figure 23 G）。なお、Day 6 のサイトカイン分析では、タファシタマブ群でも IL-1 受容体アンタゴニスト、IL-8、GM-CSF 等の炎症誘発性サイトカインの軽度の上昇が示された。

IgG 対照前処理群では Day 4 で重度の円背と運動麻痺が見られたが、タファシタマブ前処理群及び無処置群では一般状態は比較的保たれていた（Figure 23 H）。IgG 対照前処理群では CRS 発症により、すべてのマウスが CART19 投与後 7 日以内に死亡したのに対し、タファシタマブ前処理群では完全寛解も見られ、IgG 対照前処理群に対しても無処置対照群に対しても、有意に長い生存期間が得られた（Figure 23 I、それぞれ p = 0.0003 及び p = 0.0005、Log-rank test）。

Figure 23:　CAR-T 細胞毒性マウスモデルにおけるタファシタマブと CART19 の逐次投与による CRS の発現及び生存期間への影響

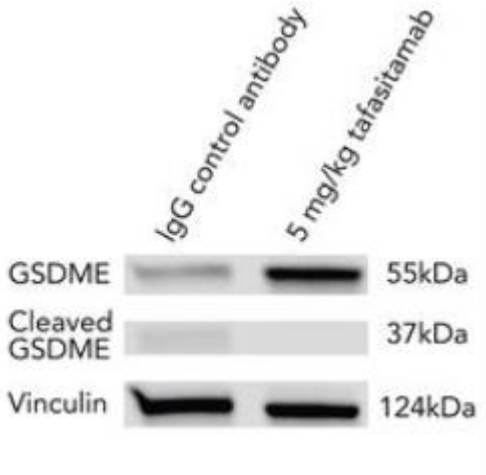


（A）実験スキーマ。NSG マウスにブスルファン 30 mg/kg を腹腔内投与し、24 時間後に R/R ALL 患者由来の白血病芽球 5×10^6 を静脈内投与した。末梢血を採取して経時的に腫瘍量を観察し、全血中ヒト $CD45^+$細胞数が 10 個/μL 以上に達したとき、ヒト $CD45^+$細胞数に基づき、（1）IgG 対照又は（2）タファシタマブ 5 mg/kg を腹腔内投与する群、及び（3）無処置対照群の 3 群に割付け、タファシタマブ又は IgG 対照を腹腔内投与した（Day-7）。Day 0 に、IgG 対照前処理群とタファシタマブ前処理群に対し 3.5×10^6 個のルシフェラーゼ発現 CART19 を投与した。CART19 の増加をシリアル BLI によりモニタリングするとともに、マウスの体重と一般状態により CRS 発現をモニタリングした。（B）CART19 細胞投与前に採血を行い、腫瘍量を再評価した。白血病芽球は、ヒト $CD45^+$、マウス $CD45^-$及びヒト $CD20^+$細胞と定義した（$^*p < 0.05$、t-test、各群 n = 3〜6）。（C）フローサイトメトリーを用いて白血病芽球上の CD19 発現数を評価した。CD19 の絶対数は Quantum Simply Cellular キット

を用いて測定した（*p < 0.05、t-test、各群 n = 3～5）。（D）ベースラインからの体重減少率を示す。上段及び下段のアスタリスク又は「ns」は、それぞれ IgG 対照前処理群及びタファシタマブ前処理群、IgG 対照前処理群と無処置対照群の統計学的比較結果を示している。**p < 0.01、****p < 0.0001、二元配置分散分析）。（E 及び F）生体内での CART19 細胞増殖の分析。IgG 対照前処理群とタファシタマブ前処理群を Day 1 及び Day 2 に BLI で評価した（*p < 0.05、**p < 0.01、t-test）。（G）CART19 投与後 Day 4 にマウスから採血し、マルチプレックスでサイトカイン濃度を測定した（***p < 0.001、****p < 0.0001、t-test）。（H）Day 5 における各群の代表的なマウスの写真を示す。（I）カプランマイヤー生存曲線を示す。IgG 対照前処理群 vs タファシタマブ前処理群の HR は 17.81、95%信頼区間 3.805～83.40。**p = 0.0003（Log-rank test）、タファシタマブ前処理群 vs 無処置群の HR は 0.04569、95%信頼区間 0.008027～0.2601、****p = 0.0005（Log-rank test）、IgG 対照前処理群 vs 無処置群の HR は 13.64、95%信頼区間 2.855～65.17、**p = 0.0011（Log-rank test）。
出典: Sakemura RL et al. Blood. 2024 Jan 18;143(3):258-271 Figure 6 及び Supplemental Figure S10

腫瘍細胞のパイロトーシスが CAR-T 細胞療法中に CRS を引き起こすことを示唆する最近の報告（Liu et al 2020、Tsuchiya 2021）があることから、タファシタマブによる腫瘍細胞の CD19 の一過性のマスキングが、CART19 療法後の腫瘍細胞のパイロトーシスの減少をもたらしている可能性について、Figure 23 A と同様の CAR-T 細胞毒性マウスモデルを用い、CART19 投与の 24 時間後に安楽死させたマウスの脾臓から CD20 マイクロビーズを用いて腫瘍細胞を単離した。単離した腫瘍細胞中のヒト $CD45^+CD20^+$細胞含量が>98%であることをフローサイトメトリーにより確認してから、ウエスタンブロッティングを行った。GSDME 発現細胞ではガスダーミン E（GSDME）がカスパーゼ 3 により切断されることにより、非炎症性アポトーシスからパイロトーシスへの転換が起こることが知られているが、IgG 対照前処理群から単離した腫瘍細胞では、タファシタマブ前処理群から単離した腫瘍細胞よりも GSDME が著しく少なく、切断された GSDME が多く発現していた（Figure 24）。このことから、タファシタマブ前処理群では CART19 投与後初期の腫瘍細胞のパイロトーシスが減少していることが示された。

Figure 24:　CART19 投与翌日の CAR-T 細胞毒性マウスモデルから単離した腫瘍細胞のウェスタンブロット



NSG マウスにブスルファン 30 mg/kg を腹腔内投与し、24 時間後に R/R ALL 患者由来の白血病芽球 5×10^6 を静脈内投与した（Day-21）。Day-8 に末梢血を採取してフローサイトメトリーによりヒト $CD45^+$細胞数に基づき、（1）IgG 対照又は（2）タファシタマブ投与する群、及び（3）無処置対照群の 3 群に割付け、Day-7 にタファシタマブ 5 mg/kg 又は IgG 対照を腹腔内投与した。Day 0 に、IgG 対照前処理群とタファシタマブ前処理群に対し 3.5×10^6 個の CART19 を投与した。CART19 投与 24 時間後にマウスを安楽死させ、脾臓を採取した。次いで、脾臓細胞から CD20 マイクロビーズを用いて腫瘍細胞を単離した。GSDME の発現は、ウェスタンブロットを使用して決定した（各群 n = 3）。
出典: Sakemura RL et al. Blood. 2024 Jan 18;143(3):258-271 Figure 7

3. 副次的薬理試験

3.1. カニクイザルに対するタファシタマブ単回投与時の末梢血及び組織への影響

カニクイザルを用いて実施した 3 つの非 GLP 単回静脈内投与毒性試験【XC9-07907】、【XC9-08007】及び【XC9-05707】では、0.3～10 mg/kg のタファシタマブ静脈内投与後 48 時間以内に末梢血、骨髄、鼠径リンパ節及び脾臓の B 細胞数の顕著な減少が認められた。これらの所見には可逆性が認められた。

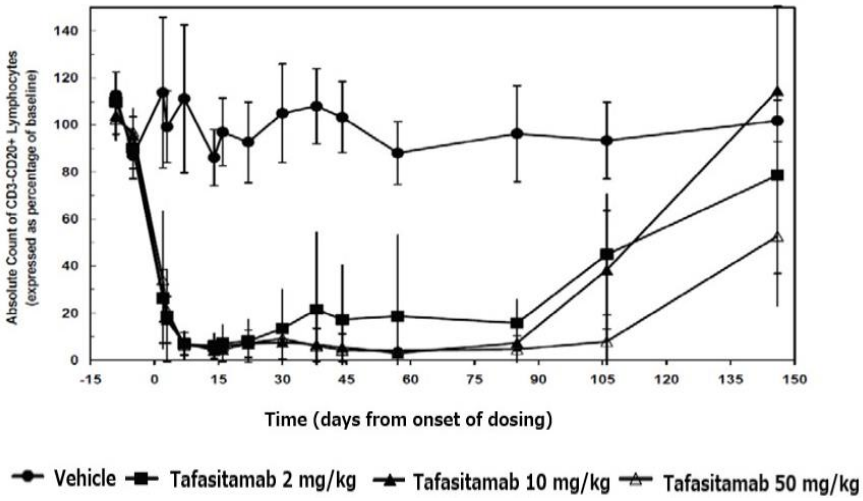
3.2. カニクイザルに対するタファシタマブ 2 週間間隔 8 週間反復投与時の末梢血リンパ球集団への影響

カニクイザル（雌雄各 5 例/群）に対し、Day 1、15、29 及び 43 にタファシタマブ 0（溶媒）、2、10 又は 50 mg/kg を 2 週間間隔で 8 週間、1 時間かけて静脈内投与した【XC9-14408】。各群雌雄 2 例について、最終投与後に 90 日の回復期間を設けた。馴化期間中 2 回と Day 2、3、7、14、16、22、30、38、44、57、85、106 及び 146 に採取した全血を用いて末梢血免疫表現型解析を行い、リンパ球ゲート内の T 細胞（CD3+CD20-）数、NK 細胞（CD3-CD20-）数、B 細胞（CD3-CD20+）数の推移を調べた。

2、10 又は 50 mg/kg のタファシタマブ 2 週間間隔 4 回投与により、末梢血中の B 細胞数の明らかな枯渇が見られた。末梢血中の B 細胞数は Day 2 に減少し、その後、投与期間中は減少したままであった。Day 146 の 90 日間の回復期間終了までに、2 又は 10 mg/kg 投与群ではそれぞれベースライン値の 79%及び 115%まで回復したが、50 mg/kg 投与群ではベースライン値の 53%まで回復した（Figure 25）。

投与開始後最初の検査日（Day 2）に溶媒投与対照群を含む全 4 群で NK 細胞の減少が見られたものの、投与期間中にベースラインに回復した。T 細胞の絶対数には変化は認められず、投与期間中に T 細胞の占める割合が上昇したのは、同時期の B 細胞数の減少を反映したものと考えられた。

Figure 25: カニクイザルに対するタファシタマブ 2 週間間隔 8 週間反復投与時の B 細胞（CD3- CD20+）数の推移



馴化期間中 2 回と、Day 2、3、7、14、16、22、30、38、44、57、85、106 及び 146 に採取した全血を用いて、免疫表現型検査により、CD3-CD20+リンパ球の絶対数を計測した。投与前の平均値から算出したベースラインに対する割合（%）を計算し、データとして示した。
出典：XC9-14408 Figure 1

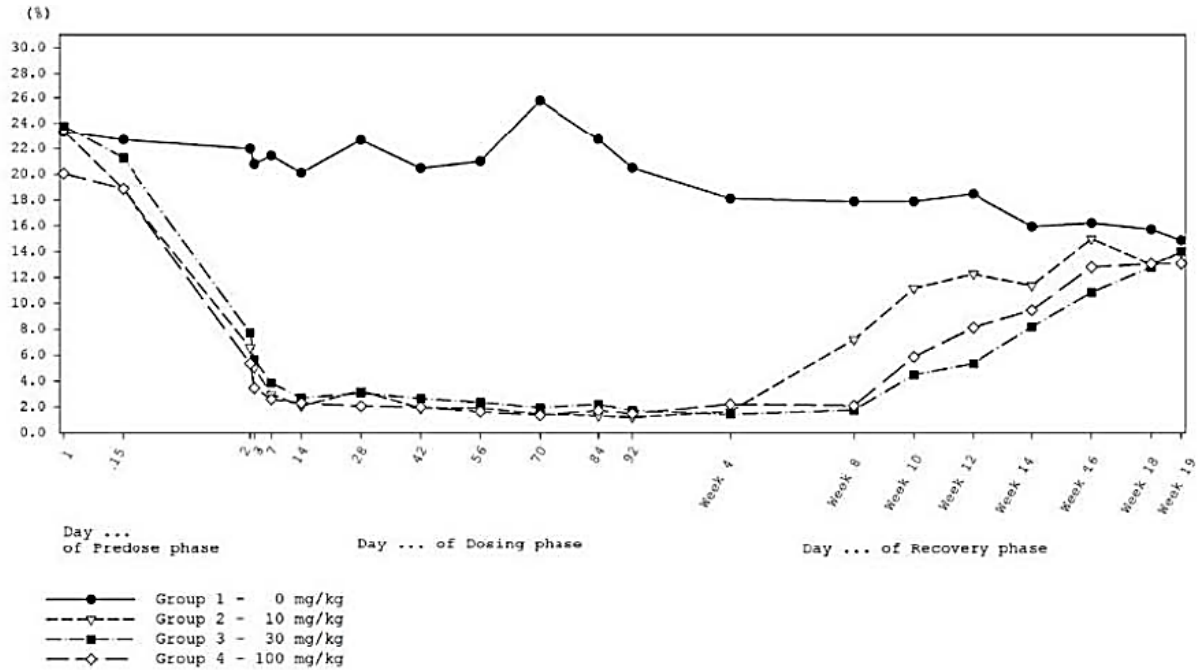
3.3. カニクイザルに対するタファシタマブ 1 週間間隔 13 週間反復投与時の末梢血リンパ球集団への影響

カニクイザル（雌雄各 5 例/群）に対し、タファシタマブ 0（溶媒）、10、30 又は 100 mg/kg を 1 週間間隔で 13 週間にわたり 1 時間かけて静脈内投与した【MOR208P008】。投与期間終了時に各群雌雄 3 例を屠殺して剖検に処し、残りの動物は 19 週間の回復期間終了時に剖検に処した。馴化期間中 2 回と Day 2、3、7、14、28、42、56、70、84 及び 92 並びに休薬期間の Week 4、8、10、12、14、16、18 及び 19 に全血を採取した。フローサイトメトリーによる末梢血免疫表現型解析を行って B 細胞（CD3-CD20+）数と CD16+ NK 細胞（CD3-CD20-CD16+）数を求め、同日のリンパ球数に対する百分率の解析を行った。また、剖検時に骨髄、脾臓及び鼠径リンパ節の B 細胞数を免疫表現型検査により評価した。

リンパ球数の軽度な減少とタファシタマブに誘導された CD20+ B 細胞の減少がすべての用量で、雌雄を問わず認められた。用量間の差はわずかであり、投与開始後 2 週間以内に明らかな減少が認められ、この減少は投与期間終了時まで持続した（Figure 26）。

タファシタマブ投与期間終了後の休薬期間中に、枯渇した B 細胞の回復が見られた。10 mg/kg 投与群では、30 又は 100 mg/kg 投与群よりも回復が早かった。19 週間の回復期間終了までに B 細胞数は対照群と同程度まで回復した。

Figure 26: カニクイザルに対する 1 週間間隔 13 週間反復静脈内投与時の雌動物における B 細胞（CD3- CD20+）数推移



リンパ球数に対する B 細胞（CD3-CD20+）の割合（%）を、全血検体を用いた各検査時点での免疫表現型解析結果より求めた。代表的なデータとして雌動物（動物番号 8309044）における結果を示す。雄動物でも同様の結果が認められている。
出典：MOR208P008 Figure 9.2, 68 ページ

CD16+ NK 細胞数については、対照群を含めた全群において、投与 1 週目に投与前よりも低い値を一時的に示した動物が認められたが、その後、投与期間中に投与前の範囲に回復した。このような変動は、タファシタマブ投与群の方が対照群よりも顕著であった。

末梢血で観察されたB細胞の枯渇と一致する形で、投与期間終了時剖検例においては、骨髄、脾臓及び鼠径リンパ節中のB細胞の減少がすべてのタファシタマブ投与群で認められた。回復期間終了時には部分的又は完全な回復が認められた。

4. 安全性薬理試験

ICH S6（R1）、ICH S9及びICH S7aガイドラインに従い、生命維持に必要な器官（心血管系、呼吸器系、中枢神経系）の機能に関する安全性薬理パラメータのモニタリングを、GLP適用のカニクイザルを用いた8週間及び13週間反復投与毒性試験【XC9-14408】【MOR208P008】の中で実施した。独立した安全性薬理試験は実施しなかった。

4.1. カニクイザルに対するタファシタマブ2週間間隔8週間反復静脈内投与時の心血管系機能に対する影響

カニクイザル（雌雄各5例/群）に対し、Day 1、15、29及び43にタファシタマブ0（溶媒）、2、10又は50 mg/kgを1時間かけて静脈内投与する反復投与毒性試験の馴化期間中に1回、初回及び最終投与の1~2時間後に各1回、心電図検査を行った（XC9-14408）。

すべての心電図は正常範囲内にあり、不整脈は認められなかった。

4.2. カニクイザルに対するタファシタマブ1週間間隔13週間反復投与時の心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対する影響

カニクイザル（雌雄各5例/群）に対し、タファシタマブ0（溶媒）、10、30又は100 mg/kgを1週間間隔で13週間、1時間かけて静脈内投与する反復投与毒性試験において、すべての動物（無麻酔一時拘束下）の心電図検査、血圧及び呼吸数の評価を、投与期間前に1回、投与期間中のWeek 4及びWeek 13（投与5日後、Day 27及びDay 90）に各1回、並びに回復期間最終週（Day 128）に1回行った（MOR208P008）。また、すべての動物の神経行動学的観察を投与期間前に1回、投与期間中のWeek 5及びWeek 12（Day 34及びDay 84）に各1回、並びに回復期間のWeek 10（Day 68）に1回実施した。

心毒性又は不整脈誘発の心電図所見は認められなかった（個々の心電図記録における軽微な変化には一定の傾向は認められず、時間の経過に伴う体表心電図パラメータのランダムな変化及び通常の解析精度の限界によって説明されうるものであった）。

血圧の評価では正常な変動がみられたが、タファシタマブ投与に関連した影響は認められなかった。

呼吸数は、無麻酔下で拘束された動物の正常な変動範囲内にあった。

神経行動学的評価項目に関するタファシタマブ投与による影響は認められなかった。なお、試験期間中に、非拘束時のケージ内観察では、動物18907M（対照群）及び動物19055F（30 mg/kg）に軽度の振戦が1回認められたが、これらの所見はタファシタマブと関連なしと判断された。

また、神経行動学的評価項目の1つである体温に関して、対照群と一部のタファシタマブ投与群の間に統計学的有意差が認められたが、タファシタマブ投与群の体温変動はほぼ正常範囲内であった。

5. 薬力学的薬物相互作用

他の抗悪性腫瘍剤との併用時の効果については、2.1.11、2.1.13、2.2.2 及び 2.2.3 項に記載した。正式な薬物相互作用試験は実施しなかった。

6. 考察及び結論

タファシタマブは、マウス CD19 抗体 4G7 に由来する Fc 改変ヒト化モノクローナル抗体である。タファシタマブは、Fc を介した機能の修飾を目的とする 2 つのアミノ酸置換が行われた IgG1/2 ハイブリッド Fc ドメインを持つ（Lazar et al 2006、Lazar et al 2007）。タファシタマブはヒト B 細胞表面抗原 CD19 に高い結合親和性を示し、タファシタマブに加えられた Fc 改変技術により、ヒト FcγR に対する結合性が高められた。

ヒト活性化受容体 FcγRIIIa 及び FcγRIIa に対する治療用抗体の Fc 領域結合親和性は臨床的有効性に影響を及ぼし、結合親和性の高い FcγR アロタイプのがん患者は、親和性の低いアロタイプの患者に比べ免疫療法に対する反応性が高いと報告されており（Cartron et al 2002、Cheung et al 2006）、FL 患者では、FcγRIIIa の 158F アロタイプ及び FcγRIIa の 131R アロタイプがリツキシマブ治療による奏効率や無増悪生存率に相関するとの報告もある（Cartron et al 2002、Weng and Levy 2003）。タファシタマブの FcγRIIIa 158F アロタイプ及び FcγRIIa 131R アロタイプに対する結合性は、Fc ドメインがヒト IgG と同じである抗 CD19-IgG1 のそれぞれ 136 倍及び 11 倍と特に高くなっていた。

タファシタマブは ADCC や ADCP などの複数の作用機序を介して腫瘍細胞を死滅させ、これらの機序は Fc 改変技術により増強されていると考えられた。さらに、タファシタマブはアポトーシスの誘導により直接的な細胞傷害活性を媒介することも確認された。*In vivo* において、ヒト CD19 陽性リンパ腫異種移植マウスにタファシタマブを投与することにより、再現性のある統計学的に有意な腫瘍増殖抑制と生存期間の延長が認められた（Horton et al 2008）。

免疫調節薬レナリドミドは増殖抑制作用及び血管新生抑制作用を有し、T 細胞及び NK 細胞等の免疫エフェクターの活性を刺激し、NK 細胞数の増加を誘導する（Kotla et al 2009、Gribben et al 2015）。NK 細胞はタファシタマブが ADCC 活性を発揮する際の重要なエフェクター細胞集団であることから、レナリドミドの NK 細胞活性化及び NK 細胞数増加作用により、タファシタマブはより大きく、より強力に腫瘍細胞を殺傷できるエフェクター細胞プールを得られると考えられる。その予想のとおり、タファシタマブとレナリドミドを併用することにより、*in vitro* 及び *in vivo* 試験において、タファシタマブの抗腫瘍効果が増強され、*in vivo* 試験において統計学的に有意な生存期間の延長が見られ、タファシタマブとレナリドミドによる併用療法が支持された。

タファシタマブとリツキシマブの併用について検討した *in vitro* 試験においては、それぞれの薬剤単剤に対して強い感受性を示した細胞株を除き、検討したすべての細胞株で 2 剤併用により、ADCC 活性、ADCP 活性又は直接的な細胞傷害作用のいずれか 1 つ以上で併用効果が確認された。*In vivo* 試験においても、タファシタマブとリツキシマブの併用による腫瘍増殖抑制の増強及び生存期間の延長作用がみられた。これらの試験結果は、リツキシマブとタファシタマブの併用療法を支持するものであった（Patra-Kneuer et al 2023）。

NCCN ガイドライン（National Comprehensive Cancer Network 2025）や日本血液学会の造血器腫瘍診療ガイドライン（日本血液学会 2024）で R/R FL に対する治療選択肢の 1 つとしてリツキシマブとレナリドミドの併用療法（R^2 療法）が推奨されている。前述の薬理試験の結果から、リツキシマブ、レナリドミドとタファシタマブの 3 剤を併用することでタファシタマブが R^2 療法に補完的に働き、その抗腫瘍効果や延命効果の向上が期待される。

また、近年、2 ライン以上の治療歴のある再発 FL に対して、タファシタマブと同じく CD19 を標的とする CAR-T 細胞療法であるチサゲンレクルユーセルが国内外で承認され、上記の治療ガ

イドラインで 3 次治療の選択肢として推奨されている。タファシタマブと CART19 の逐次投与を行った *in vivo* 試験においては、タファシタマブ投与を受けた後、CART19 投与を行ったヒト CD19 陽性腫瘍移植マウスでは、CART19 投与のみを行った場合に比べ高い抗腫瘍効果と生存期間の延長が認められ、CRS の発現率及び重症度も軽減されることが確認された（Sakemura et al 2024）。CAR-T 細胞療法とタファシタマブ治療との関係について、臨床的評価はまだ十分行われていないが、この試験結果はタファシタマブを用いた治療はその後に行われる CAR-T 細胞療法の有効性を損なうことがなく、逆に CRS の発現を抑え、その治療成績向上に寄与する可能性を示すものと考えられている（Sakemura et al 2024）。

タファシタマブのヒト及びカニクイザルのリンパ球上 CD19 に対する結合は同等であるが、マウス、ラット、ウサギ、イヌといった一般的な実験動物のリンパ球には結合しなかった。カニクイザルの FcγR に対する結合特性もヒトと同等であった。これらの所見から、毒性試験に用いる動物種としてカニクイザルを選択することが妥当と考えられた。

タファシタマブは正常 B 細胞の CD19 にも結合するため、カニクイザルを用いた単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験において、タファシタマブによる正常 B 細胞に及ぼす影響を検討した。0.3～100 mg/kg の用量範囲で末梢血からの B 細胞枯渇、骨髄、脾臓及び鼠径リンパ節の B 細胞数減少が認められた。これらの B 細胞減少は可逆的なもので、休薬期間中に部分的又は完全な回復が認められた。

カニクイザルにタファシタマブを最大 100 mg/kg/週の用量で 13 週間静脈内投与しても、神経行動学的機能、体温、血圧、呼吸数及び心電図に影響は認められなかった。

以上より、タファシタマブの薬理学的特性は、一連の非臨床 *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験で十分に明らかにされており、B 細胞性悪性腫瘍の治療薬となる可能性が推測される。

7. 参考文献

Awan FT, Lapalombella R, Trotta R, et al. CD19 targeting of chronic lymphocytic leukemia with a novel Fcdomain-engineered monoclonal antibody. Blood. 2010 Feb 11;115(6):1204-1213.

Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgRIIIa gene. Blood. 2002 Feb 1;99(3):754-758.

Cheung NK, Sowers R, Vickers AJ, et al. FCgR2A polymorphism is correlated with clinical outcome after immunotherapy of neuroblastoma with anti-GD2 antibody and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. J Clin Oncol 2006 Jun 20;24(18):2885-2890.

Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. Clin Cancer Res. 1999 Mar;5(3):611-615.

Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, et al. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85.

Gerber HP, Kung-Sutherland M, Stone I, et al. Potent antitumor activity of the anti-CD19 auristatin antibody drug conjugate hBU12-vcMMAE against rituximab-sensitive and -resistant lymphomas. Blood 2009;113:4352-4361.

Gribben JG, Fowler N, Morschhauser F. Mechanisms of Action of Lenalidomide in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. J Clin Oncol. 2015 Sep 1;33(25):2803-2811.

Her JH, Pretscher D, Patra-Kneuer M, et al. Tafasitamab mediates killing of B-cell non-Hodgkin's lymphoma in combination with γδ T cell or allogeneic NK cell therapy. Cancer Immunol Immunother. 2022 Nov;71(11):2829-2836.

Horton HM, Bernett MJ, Pong E, et al. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.

Ingle GS, Chan P, Elliott JM, et al. High CD21 expression inhibits internalization of anti-CD19 antibodies and cytotoxicity of an anti-CD19-drug conjugate. Br J Haematol 2008;140:46-58.

Kotla V, Goel S, Nischal S, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. J Hematol Oncol. 2009 Aug 12;2:36.

Lapalombella R, Yu B, Triantafillou G, et al. Lenalidomide down-regulates the CD20 antigen and antagonizes direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab on primary chronic lymphocytic leukemia cells. Blood. 2008 Dec 15;112(13):5180-5189.

Lazar GA, Dang W, Karki S, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4005-4010.

Lazar GA, Desjarlais JR, Jacinto J, Karki S, Hammond PW. A molecular immunology approach to antibody humanization and functional optimization. Mol Immunol. 2007 Mar;44(8): 1986-1998.

Liu Y, Fang Y, Chen X, Wang Z, et al. Gasdermin E-mediated target cell pyroptosis by CAR T cells triggers cytokine release syndrome. Sci Immunol. 2020 Jan 17;5(43):eaax7969.

Manriquez Roman C, Sakemura RL, Jin F, et al. Assessment of chimeric antigen receptor T cell-associated toxicities using an acute lymphoblastic leukemia patient-derived xenograft mouse model. J Vis Exp. 2023(192):e64535.

National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology: B-Cell Lymphomas Version 2.2025. 2025.

Patra-Kneuer M, Chang G, Xu W, et al. Activity of tafasitamab in combination with rituximab in subtypes of aggressive lymphoma. Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558.

Press OW, Farr AG, Borroz KI, et al. Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. Cancer Res. 1989 Sep 1;49(17):4906-4912.

Richards JO, Karki S, Lazar GA,et al. Optimization of antibody binding to FcgammaRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. Mol Cancer Ther. 2008 Aug;7(8):2517-2527.

Sakemura R, Bansal A, Siegler EL, et al. Development of a clinically relevant reporter for chimeric antigen receptor T-cell expansion, trafficking, and toxicity. Cancer Immunol Res. 2021;9(9):1035-1046.

Sakemura RL, Manriquez RC, Horvei P, et al. CD19 occupancy with tafasitamab increases therapeutic index of CART19 cell therapy and diminishes severity of CRS. Blood. 2024 Jan 18;143(3):258-271.

Sterner RM, Sakemura R, Cox MJ, et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts. Blood. 2019;133(7):697-709.

Tsuchiya K. Switching from Apoptosis to Pyroptosis: Gasdermin-Elicited Inflammation and Antitumor Immunity. Int J Mol Sci. 2021 Jan 4;22(1):426.

Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. J Clin Oncol. 2003 Nov 1;21(21):3940-3947.

Zalevsky J, Leung IW, Karki S, et al. The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcgamma receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates. Blood. 2009 Apr 16;113(16):3735-3743.

一般社団法人 日本血液学会（編）. 造血器腫瘍診療ガイドライン 2024 年版、第 II 章 リンパ腫、1 濾胞性リンパ腫（follicular lymphoma：FL）金原出版, 2024（Accessed on Mar11, 2025. http://www.jshem.or.jp/gui-hemali/2_1.html#soron）

保仙直毅. 造血器腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の現状と展望.日本内科学会雑誌 111.3 (2022): 633-639.

目次

略号一覧 2
1. 薬理試験：一覧表 3
2. 効力を裏付ける試験 6
2.1. *In vitro* 薬理試験 6
2.2. *In vivo* 薬理試験 9
3. 副次的薬理試験 10
4. 安全性薬理試験 11
5. 薬力学的薬物相互作用試験 12

略号一覧

略号	定義	
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis	抗体依存性細胞貪食
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia	急性リンパ芽球性白血病
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia	慢性リンパ性白血病
CML	Chronic Myeloid Leukemia	慢性骨髄性白血病
CRS	Cytokine Release Syndrome	サイトカイン放出症候群
DLBCL	Diffuse Large B Cell Lymphoma	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
EC_{95}	Effective concentration at 95% maximal effect	95%効果濃度
Fc	Constant Fragment	定常フラグメント
FcγR	Fc Gamma Receptor	Fcγ 受容体
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
HCL	Hairy Cell Leukemia	有毛細胞白血病
HEK	Human Embryonic Kidney	ヒト胎児腎臓
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
Kd	Equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
KO	Knockout	ノックアウト
MCL	Mantle Cell Lymphoma	マントル細胞リンパ腫
NK	Natural Killer	ナチュラルキラー
NOD	Non-obese diabetic	非肥満糖尿病
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells	末梢血単核球
PBS	Phosphate Buffered Saline	リン酸緩衝生理食塩水
SCID	Severe Combined Immunodeficiency	重症複合免疫不全症

1. 薬理試験：一覧表

Test Article: Tafasitamab

Type of Study	Test System/Species	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Primary Pharmacodynamics: *in vitro*					
Binding assay to human CD19	HEK293T cells	*In vitro*	Xencor Inc. MorphoSys A.G.	【TR07098】 and 【MOR208L045】	4.2.1.1-1
Cell-based equilibrium binding assay	Raji cells and RS4;11 ceslls	*In vitro*			
Binding to CD19	Human PBMC, Whole Blood from Rat, Rabbit, Dog and Non-Human Primates, pooled blood of mouce	*In vitro*	Xencor Inc.	【XC9-23209】	4.2.1.1-2
Internalization of CD19	Raji cells	*In vitro*	Xencor Inc.	【Horton et al】 Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.	4.3-13
Binding to Fcγ receptors	Mouse and Human Fcγ Receptors	*In vitro*	Xencor Inc.	Horton et al Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.	4.3-13
Binding to Fcγ receptors	Cynomolgus Fcγ Receptors	*In vitro*	Xencor Inc.	【Zalevsky et al】 Blood. 2009 Apr 16;113(16):3735-3743.	4.3-35
Characterization of ADCC activity	Effector cells: Human NK cells Taget cells: Human Burkitt's lymphoma, CLL, HCL, CML, DLBCL and ALL cell lines (Raji, Namalwa, SU-DHL 6, WQac3CD5, Ramoss BV-173, RS4;11, Bonna-12 and SUP-B15 cells)	*In vitro*	Xencor Inc.	Horton et al Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.	4.3-13
	Effector cells: Human Taget cells: PBMC and Primary ALL and MCL tumor cells	*In vitro*	Xencor Inc.		

Test Article: Tafasitamab

Type of Study	Test System/Species	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Characterization of ADCC activity	Effector cells: Human γδT cells Taget cells:Mino, Jeko-1, U2932 and Daudi cells	*In vitro*	MorphoSys AG, [redacted]	【Her et al】 Cancer Immunol Immunother. 2022 Nov;71(11):2829-2836.	4.3-12
Characterization of ADCP activity	Effector cells: Monocyte-derived Macrophage Taget cells: RS4;11 and SUP-B15 cells	*In vitro*	Xencor Inc.	【Horton et al】 Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.	4.3-13
Antiproliferative apoptotic activity	Human SU-DHL-6 cell line	*In vitro*	Xencor Inc.	Horton et al Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.	4.3-13
Characterization of CDC activity	Raji, RAMOS, and SU- DHL-6 cells	*In vitro*	Xencor Inc.	【TR08139】	4.2.1.1-3
ADCC activity of Tafasitamab in Combination with Lenalidomide	Effector cells: Lenalidomide pretreated human NK cells Taget cells:Primary CLL cells	*In vitro*	[redacted]	【Awan et al】 Blood. 2010 Feb 11;115(6):1204-1213.	4.3-1
ADCC activity of Tafasitamab in Combination with Lenalidomide	Effector cells: Human PBMC Taget cells: DLBCL delived cell lines (SU-DHL-4, SU-DHL-6, SU-DHL-2 and U2932 cells)	*In vitro*	MorphoSys AG	【MOR208L039】	4.2.1.1-4
Direct Cytotoxic Effects of Tafasitamab in Combination with Rituximab	HT, SU-DHL-4, SU-DHL-6, OCI-LY10, TMD8, SU-DHL-2, U-2932, NU-DUL-1 and Ramos cells	*In vitro*	MorphoSys AG, [redacted], and so on	【Patra-Kneuer et al】 Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558.	4.3-24
ADCC activity of Tafasitamab in Combination with Rituximab	Effector cells: NK cells Taget cells: HT, SU-DHL-4, SU-DHL-6, OCI-LY10, TMD8, SU-DHL-2, U-2932, NU-DUL-1, Raji and Ramos cells	*In vitro*	MorphoSys AG, [redacted], and so on	Patra-Kneuer et al Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558.	4.3-24
ADCP activity of Tafasitamab in Combination with Rituximab	Effector cells: Monocyte-derived Macrophage Taget cells: HT, SU-DHL-4, SU-DHL-6, OCI-LY10, TMD8, SU-DHL-2, U-2932, NU-DUL-1, Raji and Ramos cells	*In vitro*	MorphoSys AG, [redacted], and so on	Patra-Kneuer et al Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558.	4.3-24

Test Article: Tafasitamab

Type of Study	Test System/Species	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Primary Pharmacodynamics: *in vivo*					
Anti-Tumor Efficacy of Tafasitamab as Single Agent	Ramos and Raji cells/SCID mice	*i.p.*	Xencor Inc.	【Horton et al】 Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.	4.3-13
Anti-tumor Efficacy of Tafasitamab in Combination with Lenalidomide	Ramos cells/SCID mice	Tafasitamab: *i.p.* Lenalidomide: *p.o.*	[redacted]	【MOR208P009】	4.2.1.1-5
Anti-tumor Efficacy of Tafasitamab in Combination with Rituximab	Ramos cells and PBMC/ NOD/SCID mice	Tafasitamab: *i.p.* Rituxmimab: *i.p.*	MorphoSys AG, [redacted], and so on	【Patra-Kneuer et al】 Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558.	4.3-24
Sequential therapy with tafasitamab and CART19	Jeko-1 cells and Leukemic Blasts Derived from Patients with R/R ALL/NSG mice	Tafasitamab: *i.p.* CART19: *i.v.*	[redacted]	【Sakemura et al】 Blood. 2024 Jan 18;143(3): 258-271.	4.3-28
Secondary Pharmacodynamics					
Immunophenotyping of lymphocyte populations	Cynomolgus monkey	*i.v.*	[redacted]	【XC9-14408】	4.2.3.2-1
Immunophenotyping of lymphocyte populations	Cynomolgus monkey	*i.v.*	[redacted]	【MOR208P008】	4.2.3.2-2
Safety Pharmacology					
Cardiovascular Function	Cynomolgus monkey	*i.v.*	[redacted]	XC9-14408	4.2.3.2-1
Cardiovascular, Respiratory, Neurological Function	Cynomolgus monkey	*i.v.*	[redacted]	MOR208P008	4.2.3.2-2

2. 効力を裏付ける試験

2.1. *In vitro* 薬理試験

Test Article: Tafasitamab

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration	Gender/No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Binding assay to human CD19	HEK293T cells	*In vitro*	NA	NA	EC_{95} reached at 90.5 nM (13.6µg/mL).	【TR07098】and 【MOR208L045】
Cell-based equilibrium binding assay	Raji cells and RS4;11 ceslls	*In vitro*	NA	NA	Tafasitamab binds cell-surface CD19 with an average Kd of approximately 0.4 nM.	
Binding to CD19	Human PBMC, Whole Blood from Rat, Rabbit, Dog and Non-Human Primates, pooled blood of mouce NA	*In vitro*	NA	NA	Tafasitamab recognizes and binds to human and macaque CD19 but not to CD19 from other species.	【XC9-23209】
Internalization of CD19	Raji cells	*In vitro*	NA	NA	Tafasitamab binding induces minimal CD19 internalization in a 4-hour assay.	【Horton et al】 Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.
Binding to Fcγ receptors	Mouse and Human Fcγ Receptors	*In vitro*	NA	NA	Binding affinity of tafasitamab to FcγRIIIa was increased 47-fold and 147-fold for the 158V and 158F alleles relative to IgG1 Fc. Binding to FcγRIIa was increased 11-fold and 5.4-fold for the 131R and 131H alleles.	Horton et al Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.
Binding to Fcγ receptors	Cynomolgus Fcγ Receptors	*In vitro*	NA	NA	Fc engineering increased the binding of tafasitamab to cynomolgus monkey FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, and FcγRIIIa by 3-, 25-, 16-, and 60-fold, respectively.	【Zalevsky et al.】 Blood. 2009 Apr 16;113(16):3735-3743.

Test Article: Tafasitamab

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration	Gender/No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Characterization of ADCC activity	Effector cells: Human NK cells Taget cells: Human Burkitt's lymphoma, CLL, HCL, CML, DLBCL and ALL cell lines (Raji, Namalwa, SU-DHL 6, WQac3CD5, Ramoss BV-173, RS4;11, Bonna-12 and SUP-B15 cells)	*In vitro*	NA	NA	Tafasitamab mediates potent ADCC by NK cells against $CD19^+$ expressing tumor cells lines.	【Horton et al】 Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.
	Effector cells: Human Taget cells: PBMCand Primary ALL and MCL tumor cells	*In vitro*	NA	NA	Tafasitamab mediates potent ADCC by PBMC against primary tumors.	
Characterization of ADCC activity.	Effector cells: Human γδT cells Taget cells:Mino, Jeko-1, U2932 and Daudi cells	*In vitro*	1 µg/mL	NA	Tafasitamab demonstrated potent ADCC activity mediated by γδ T cells towards several lymphoma cell lines.	【Her et al】 Cancer Immunol Immunother. 2022 Nov;71(11):2829-2836.
Characterization of ADCP activity	Effector cells: Monocyte-derived Macrophage Taget cells: RS4;11 and SUP-B15 cells	*In vitro*	NA	NA	Tafasitamab mediates potent ADCP by macrophages against $CD19^+$ expressing tumor cell lines.	Horton et al Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.
Antiproliferative apoptotic activity	Human SU-DHL-6 cell line	*In vitro*	NA	NA	Tafasitamab exhibited direct cytotoxicity and antiproliferative effects due to caspase-induced apoptosis.	Horton et al Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.
Characterization of CDC activity	Raji, RAMOS, and SU- DHL-6 cells	*In vitro*	0.29 to 600 nM	NA	Tafasitamab does not mediate CDC.	【TR08139】
ADCC activity of Tafasitamab in Combination with Lenalidomide	Effector cells: Lenalidomide pretreated human NK cells Taget cells:Primary CLL cells	*In vitro*	10 µg/mL	NA	The enhanced NK cell–mediated ADCC with tafasitamab was enhanced further by lenalidomide.	【Awan et al】 Blood. 2010 Feb 11;115(6):1204-1213.

Test Article: Tafasitamab

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration	Gender/No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
ADCC activity of Tafasitamab in Combination with Lenalidomide	Effector cells: Human PBMC Taget cells: DLBCL delived cell lines (SU-DHL-4, SU-DHL-6, SU-DHL-2 and U2932 cells)	*In vitro*	Tafasitamab: 10 °nM Lenalidomide: 10°µM	NA	Tafasitamab in combination with lenalidomide showed increased cytotoxic effects *in vitro*.	【MOR208L039】
Direct Cytotoxic Effects of Tafasitamab in Combination with Rituximab	HT, SU-DHL-4, SU-DHL-6, OCI-LY10, TMD8, SU-DHL-2, U-2932, NU-DUL-1 and Ramos cells	*In vitro*	Tafasitamab: 5°nM Rituximab: 5°nM	NA	4/11 cell lines were sensitive primarily to rituximab or tafasitamab. The combination resulted in enhanced cell death in 5/9 cell lines.	【Patra-Kneuer et al】 Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558.
ADCC activity of Tafasitamab in Combination with Rituximab	Effector cells: NK cells Taget cells: HT, SU-DHL-4, SU-DHL-6, OCI-LY10, TMD8, SU-DHL-2, U-2932, NU-DUL-1, Raji and Ramos cells	*In vitro*	Tafasitamab: 1 and 10°nM Rituximab: 1 and 10°nM	NA	In 4/11 cell lines, combination of tafasitamab and rituximab showed significantly increased ADCC activity as compared with single agent. Tafasitamab showed a higher rate of ADCC over rituximab in 5/11 cell lines while tafasitamab and rituximab induced similar cytotoxicity rates in 2/11 cell lines.	Patra-Kneuer et al Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558.
ADCP activity of Tafasitamab in Combination with Rituximab	Effector cells: Monocyte-derived Macrophage Taget cells: HT, SU-DHL-4, SU-DHL-6, OCI-LY10, TMD8, SU-DHL-2, U-2932, NU-DUL-1, Raji and Ramos cells	*In vitro*	Tafasitamab: 10°nM Rituximab: 10°nM	NA	Four out of 11 (4/11) cell lines were primarily sensitive to rituximab and 1/11 showed similar sensitivity to tafasitamab and rituximab. Two out of 11 cell lines were insensitive to both antibodies. The combination of tafasitamab and rituximab resulted in significantly enhanced ADCP activity compared with single agent in 4/11 cell lines (including 1 cell line where combination of tafasitamab showed significantly higher ADCP as compared with rituximab but not significant as compared with tafasitamab). An unexpected high phagocytosis rate was observed in the control samples for SU-DHL-4 cells.	Patra-Kneuer et al Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558.

2.2. *In vivo* 薬理試験

Test Article: Tafasitamab

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender / No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Anti-Tumor Efficacy of Tafasitamab as Single Agent (Prophylactic Tumor Model Studies)	Raji cells in SCID mice	*i.p.* (Day 3, 6, 10 and 13 post-tumor cell implant)	0, 1, 3, 10 mg/kg	F/10	Treatment of mice with 1, 3 or 10 mg/kg of tafasitamab twice weekly for 2 weeks had a significant inhibitory effect on the growth of Raji lymphoma xenografts.	【Horton et al】 Cancer Res. 2008 Oct 1;68(19):8049-8057.
	RAMOS cells in SCID mice	*i.p.* (Day 3, 6, 10 and 13 post-tumor cell implant)	0, 1, 3, 10 mg/kg	F/10	Treatment of mice with 1, 3 or 10 mg/kg of tafasitamab twice weekly for 2 weeks had a significant inhibitory effect on the growth of RAMOS lymphoma xenografts.	
Anti-Tumor Efficacy of Tafasitamab as Single Agent (Established Tumor Model Study)	RAMOS cells in SCID mice	*i.p.* (Twice per week for 2 weeks from Day 14 post-tumor cell implant)	10 mg/kg	F/10	Tafasitamab twice per week for 2 weeks showed potent antitumor efficacy against established RAMOS human Burkitt's lymphoma xenografts compared to anti-CD-19 IgG1 and anti CD19, Fc-KO treatment.	
Anti-tumor Efficacy of Tafasitamab in Combination with Lenalidomide	RAMOS cells in SCID mice	Tafasitamab: *i.p.* Lenalidomide: *p.o.*	Tafasitamab: 0, 3 mg/kg Lenalidomide: 100, 200 mg/kg	F/8	Tafasitamab twice weekly for 3 weeks in combination with lenalidomide once daily for 28 days resulted in increased anti-tumor activity compared to both monotherapy regimens.	【MOR208P009】
Anti-tumor Efficacy of Tafasitamab in Combination with Rituximab	Ramos cells and PBMC in NOD/SCID mice	Tafasitamab: *i.p.* Rituxmimab: *i.p.*	Tafasitamab: 0, 3, 1 mg/kg Rituxmimab: 0.3, 0.6, 1 mg/kg	F/9	The combination treatment of tafasitamab 1 mg/kg and rituximab 0.6 mg/kg resulted in a synergistic survival benefit in a PBMC-humanized Ramos NOD/SCID mouse model.	【Patra-Kneuer et al】 Front Immunol. 2023 Jul 31;14:1220558.
Sequential therapy with tafasitamab and CART19 (Tafasitamab pre-treated model)	Jeko-1 cells in NSG mice	Tafasitamab: *i.p.* CART19: *i.v.*	Tafasitamab: 0, 10 mg/kg/day CART19: 1×10^6	NA/5	CART19 in tafasitamab-pretreated mice shows a better antitumor response.	【Sakemura et al】 Blood. 2024 Jan 18;143(3):258-271.
Sequential therapy with tafasitamab and CART19 (CAR T-cell toxicity mouse model)	Leukemic Blasts Derived from Patients with R/R ALL in NSG mice	Tafasitamab: *i.p.* Luciferase$^+$ CART19: *i.v.*	Tafasitamab: 5 mg/kg, Luciferase$^+$ CART19: 3.5×10^6	NA/5	Sequential therapy with tafasitamab and CART19 cell decreased the incidence and severity of CRS and exhibited superior antitumor effect and overall survival compared with CART19 alone.	

3. 副次的薬理試験

Test Article: Tafasitamab

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Immunophenotyping of lymphocyte populations	Cynomolgus monkey	*i.v.* (one-hour infusion)	0, 10 mg/kg[1]	F/3, M/3	Substantial depletion of B lymphocytes in peripheral blood occurred in the 24-hour period after administration.	No	【XC9-05707】
			0, 0.3, 1, 3 mg/kg[1]	M/2		No	【XC9-07907】
			0, 3 mg/kg[1]	F/2, M/2		No	【XC9-08007】
			0, 2, 10, 50 mg/kg[2]	F/5, M/5	Recovery to baseline was observed for studies including an extended recovery period (XC9-14408 and MOR208P008).	Yes	【XC9-14408】
			0, 10, 30, 100 mg/kg[3]	F/5, M/5		Yes	【MOR208P008】

1: single dose, 2: once every 2 weeks for 8 weeks; 3: once weekly for 13 weeks

4. 安全性薬理試験

Test Article: Tafasitamab

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular Function	Cynomolgus monkey	*i.v.* (one-hour infusion)	0, 2, 10, 50 mg/kg[1]	F/5, M/5	No abnormalities in rhythm were found. There were no abnormal electrocardiographic findings attributable to the administration of tafasitamab at doses up to 50°mg/kg for 8 weeks.	Yes	【XC9-14408】
Cardiovascular, Respiratory, Neurological Function	Cynomolgus monkey	*i.v.* (one-hour infusion)	0, 10, 30, 100°mg/kg[2]	F/5, M/5	Tafasitamab treatment at doses up to 100 mg/kg/week for 13 weeks had no effect on neurobehavioral function, body temperature, blood pressure, respiratory rate or electrocardiography.	Yes	【MOR208P008】

1: once every 2 weeks for 8 weeks; 2: once weekly for 13 weeks

5. 薬力学的薬物相互作用試験

他の抗悪性腫瘍剤との併用時の効果については 2.1 項及び 2.2 項に記載した。

正式なタファシタマブの薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。