Table of Contents

1 非臨床試験計画概略 5
2 薬理試験 6
2.1 効力を裏付ける試験 6
2.2 副次的薬理試験 8
2.3 安全性薬理試験 8
2.4 薬力学的薬物相互作用試験 8
3 薬物動態試験 9
3.1 分析法 9
3.1.1 血清中 elotuzumab 濃度測定 9
3.2 吸収／TK 9
3.3 分布 9
3.4 代謝 9
3.5 排泄 10
3.6 薬物動態学的薬物相互作用 10
4 毒性試験 10
4.1 単回投与毒性試験 11
4.2 反復投与毒性試験 11
4.3 遺伝毒性試験 11
4.4 がん原性試験 12
4.5 生殖発生毒性試験 12
4.6 局所刺激性試験 14
4.7 その他の毒性試験 14
4.7.1 動物種選択のための試験 14
4.7.1.1 免疫組織化学（IHC）法を用いた HuLuc63（elotuzumab）のヒト及び非ヒト組織交差反応性試験 14
4.7.1.2 HuLuc63（elotuzumab）の非ヒト霊長類由来遺伝子組換え CS1（SLAMF7）蛋白を用いた交差反応性試験 14
4.7.1.3 HuLuc63（elotuzumab）の非ヒト霊長類全血免疫サブセット結合性試験 15
4.7.1.4 正常ヒト組織並びにチンパンジー及びアカゲザル組織を用いた HuLuc63（elotuzumab）の交差反応性試験法検証試験 15
4.7.1.5 HuLuc63（elotuzumab）の正常ヒト組織を用いた交差反応性試験 15
4.7.2 免疫毒性 15
4.7.3 骨髄幹細胞の分化能試験 15

4.7.4 ヒト全血を用いた溶血性試験 16
4.7.5 免疫原性 16
5 総括及び結論 16
6 参考文献 19

List of in-text Tables

Table 4-1: 毒性試験一覧 10
Table 4.1-1: サル単回投与試験の TK 値 11

用語及び略号一覧

略号	英語	日本語
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
AUC	area under the serum concentration vs time curve	血清中濃度時間曲線下面積
AUC(INF)	area under the serum concentration vs time curve extrapolated to infinity	投与後 0 時間から無限時間まで外挿した血清中濃度曲線下面積
BMS	Bristol-Myers Squibb	ブリストル・マイヤーズ スクイブ
Cmax	maximum drug concentration	最高血清中濃度
CS1	CD2 subset 1	CD2 サブセット 1
CYP	cytochrome(s) P450	チトクローム P450
EAT-2	EWS-Fli1-activated transcript-2	－
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫吸着測定
Fc	fragment crystallizable	－
GLP	Good Laboratory Practices	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学
IL	interleukin	インターロイキン
Kd	equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MuLuc63	mouse antihuman SLAMF7	マウス抗ヒト SLAMF7
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NKT	natural killer-like T cell	ナチュラルキラーT 細胞
PK	pharmacokinetics	薬物動態
SCID	severe combined immunodeficient	重症複合型免疫不全
SLAMF7	signaling lymphocyte activation molecule family member 7	－
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

1 非臨床試験計画概略

Elotuzumab（BMS-901608、HuLuc63）は、ヒト signaling lymphocyte activation molecule family member 7［SLAMF7、CD2 サブセット 1（CS1）、CRACC、CD319］に特異的に結合するヒト化免疫グロブリン（Ig）G1 モノクローナル抗体（mAb）である。SLAMF7 は多発性骨髄腫細胞に高発現する細胞表面糖蛋白質であり、その発現は細胞遺伝学的な異常とは関連性がなく、病期を通して発現する。SLAMF7 はヒト血液中の白血球サブセット及び健康成人の多くの組織（骨髄、乳房、消化管など）の浸潤白血球にも発現する。Elotuzumab は、親抗体であるマウス抗体 MuLuc63 の相補性決定領域がヒト IgG1 の重鎖及びκ軽鎖のフレームワーク領域に結合した構造を有している。Elotuzumab は遺伝子組換え技術により NS0 細胞から製造される。

Elotuzumab はヒト SLAMF7 に高い親和性（Kd：30～45 nM）で結合する。Elotuzumab は骨髄腫細胞の SLAMF7 に結合し、CD16 を介してナチュラルキラー（NK）細胞との相互作用を促進して、抗体依存性細胞傷害（ADCC）により骨髄腫細胞の細胞死を惹起する。また、SLAMF7 は NK 細胞機能の調節因子であることが知られており、*in vitro* で elotuzumab が NK 細胞上の SLAMF7 へ結合することにより、NK 細胞が直接活性化され、骨髄腫細胞への傷害活性が増強する。非臨床薬理試験の結果から、elotuzumab が SLAMF7 を発現する多発性骨髄腫細胞の ADCC を濃度依存的に惹起することが示されている。これは、骨髄腫細胞株、患者由来の初代培養骨髄腫細胞及び多発性骨髄腫に対する標準治療薬であるボルテゾミブ（低分子のプロテアソーム阻害剤）に抵抗性又は難治性の患者由来骨髄腫細胞を用いた *in vitro* 試験において実証されている [1]。また、*in vivo* 試験ではマウスのヒト骨髄腫細胞異種移植モデルにおいて elotuzumab の腹腔内投与により腫瘍の増殖が抑制され [1,2]、その作用には用量依存性が認められた [1]。重症複合型免疫不全（SCID）マウスを用いた OPM2 細胞異種移植モデルの反復投与試験では、0.1～10 mg/kg の elotuzumab 投与で平均血清中濃度が用量依存的に増加し、血清中濃度 70～430 μg/mL（用量 10 mg/kg の血清中濃度範囲）で最大の抗腫瘍効果が認められた。また、elotuzumab が生物学的活性を示す最小血清中濃度は 2～13 μg/mL（用量 0.5 mg/kg の血清中濃度範囲）であった。異種移植モデルにおける elotuzumab の抗腫瘍効果は、低分子薬のボルテゾミブ（26S プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する可逆的阻害薬）、レナリドミド [3]又はポマリドミド（免疫調節、抗血管新生及び抗腫瘍活性を有するサリドマイドアナログ）との併用や、NK 細胞の抑制性調節分子（KIR2DL3）を阻害する抗体及び NK 細胞の共刺激分子（CD137）の作動性抗体との併用による NK 細胞の機能亢進によっても増強した。

非臨床評価の結果、elotuzumab はヒト SLAMF7 蛋白のみに結合し、他の動物種（チンパンジー、カニクイザル、アカゲザル、イヌ、ミニブタ、ウサギ、ラット及びマウス）の SLAMF7 には結合しなかった。Elotuzumab の非臨床安全性評価に用いる代替動物として C57BL/6 マウスにヒト SLAMF7 遺伝子を導入したトランスジェニック動物モデルを作製した [4]。しかし、トランスジェニックマウスにおけるヒト SLAMF7 の発現を検討した結果、休止 T 細胞及び活性化 T 細胞のいずれにもヒトと同様のヒト SLAMF7 の発現は認められなかった。この発現の相違により、トランスジェニック動物モデルは、非臨床安全性評価に用いる代替動物として適切でないと考えられた。Elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、毒性試験に適した動物種が存在しないことから、非臨床安全性評価と

して主に *in vitro* 安全性評価及び *in vivo* 生物学的活性評価を実施し、本薬の選択性及び潜在的な毒性を検討した。

ヒト組織パネルを用いた組織交差反応性試験（GLP 適合）では、elotuzumab は複数の組織における形質細胞及び免疫芽細胞（形質細胞へ分化途中の B 系列細胞）の細胞膜及び細胞質に結合した。形質細胞及び免疫芽細胞にみられた染色は、正常ヒト形質細胞及び免疫芽細胞に発現することが知られている SLAMF7 が elotuzumab によって認識されたものと考えられた。評価したヒト組織において、上記の形質細胞及び免疫芽細胞以外には elotuzumab の特異的な交差反応性はみられなかった。Elotuzumab を 0、30 及び 100 mg/kg の用量でアカゲザルに投与した探索的単回静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験では、最高用量の 100 mg/kg（AUC：335～447 mg•h/mL）まで elotuzumab 投与に関連した影響はみられなかった。これらの結果より、elotuzumab が標的外作用を発現する可能性は低いと考えられた。ウサギを用いた局所刺激性試験では、ヒト投与時の濃度（最高 6.6 mg/mL）と同様の濃度（5 mg/mL）の elotuzumab を単回静脈内投与しても刺激性は認められず、elotuzumab の局所刺激性は低いことが示唆された。ヒト全血を用いた溶血性試験では、elotuzumab は評価した最高濃度（10 mg/mL）まで溶血を惹起しなかった。ヒト全血における elotuzumab の影響による白血球サブセットの細胞数減少の可能性を検討した *in vitro* 試験では、elotuzumab を 100 及び 200 µg/mL の濃度で反応させても T 細胞（CD3+、CD4+、CD8+）及び B 細胞を減少させなかったが、NK 細胞数を平均 20%（0～45%）減少させた。更に、造血幹細胞の赤芽球系及び骨髄系細胞への分化に関し、評価した elotuzumab の最高濃度 500 µg/mL まで影響はみられなかった。したがって、ヒト全血及び骨髄を用いた試験結果より、elotuzumab は、その薬理作用に関連すると考えられる NK 細胞の減少を除き、全血及び骨髄の白血球を減少させる可能性は低いことが示された。

マウス及びアカゲザル血清中 elotuzumab 濃度を測定するため、酵素免疫吸着測定（ELISA）法を開発した。マウス及びアカゲザル血清中 elotuzumab の定量範囲は、それぞれ 0.12～8.0 µg/mL 及び 0.3～6.0 µg/mL であった。抗薬物抗体の分析は行わなかった。

2 薬理試験

2.1 効力を裏付ける試験

多発性骨髄腫は、抗体産生を担う B 細胞に最終的に分化する形質細胞が悪性腫瘍化した疾患である。その特徴は、腫瘍化し異常増殖した形質細胞クローンの骨髄浸潤であり、血清や尿中に単クローン性免疫グロブリンの増加がみられる [5]。近年、高用量化学療法、分子標的薬及び幹細胞移植の進歩により、多発性骨髄腫患者の全生存期間及び無イベント生存期間の延長がみられているが、ほぼ全ての患者において再発・増悪がみられる。そのため、現在でも多発性骨髄腫は難治性で、依然として罹患率及び死亡率が高い。

SLAMF7 は細胞表面蛋白質の CD2 ファミリーに相同性を有する細胞表面糖蛋白質である。遺伝子発現解析により、SLAMF7 は多発性骨髄腫患者の骨髄標本に高発現することが示された [1,2]。SLAMF7 は、正常形質細胞、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症及び多発性骨髄腫において高発現する。SLAMF7 発現は、病型のリスク分類に関与する分子のプロファイルや、細胞遺伝学的な異常にかかわらず全ての患者集団で認められる [2]。また、SLAMF7 発現は治療後再発の多発性骨髄腫患者に

おいても認められる。多発性骨髄腫患者の診断時及び再発時のいずれにおいても、SLAMF7 発現が検出されている[2]。

上記の遺伝子発現解析データと同様に、フローサイトメトリー分析でも多発性骨髄腫患者の骨髄から採取した CD138+ 形質細胞では elotuzumab の強力な結合が認められた[1,2]。また、多発性骨髄腫の細胞株 L363 及び OPM2 を用いたフローサイトメトリー分析でも、elotuzumab はこれらの細胞株に強力に結合し、初代培養の多発性骨髄腫細胞の細胞表面及び不死化した細胞株上のいずれにおいても SLAMF7 が発現していることが示された。更に、elotuzumab の親抗体であるマウス抗ヒト SLAMF7 抗体（MuLuc63）を用いた免疫組織化学（IHC）検査においても、試験に用いた骨髄腫組織標本全例で強力な結合がみられた[2]。

SLAMF7はヒト血液中の白血球サブセット及び健康成人の多くの組織中の浸潤白血球にも発現する[6]。Elotuzumab 及び MuLuc63 は、NK 細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞及び CD8+ T 細胞に結合し、CD4+ T 細胞、静止期単球、循環血中 CD20+ HLA-DR+ B 細胞及び顆粒球には明らかな結合を示さなかった。親抗体 MuLuc63 を用いた各種ヒト組織の IHC 検査の結果、各組織中の浸潤白血球のみに結合が認められた。これらは主に CD138+ 形質細胞で、CD3+ T 細胞及び CD20+ B 細胞も少数認められた。主要な臓器及び組織の上皮、平滑筋細胞及び血管に結合はみられなかった。

SLAMF7 は多発性骨髄腫で高発現し、前述した白血球サブセット以外の正常細胞では発現がみられないことから、SLAMF7 を多発性骨髄腫の治療標的として選択した。Elotuzumab はヒト SLAMF7 に対するヒト化 IgG1 mAb である。Elotuzumab は骨髄腫細胞上の SLAMF7 蛋白に結合し、骨髄腫細胞と NK 細胞の相互作用を促進して、ADCC により骨髄腫細胞を死滅させる。また、*in vitro* で elotuzumab が NK 細胞上の SLAMF7 へ結合することにより、NK 細胞が直接活性化され、骨髄腫細胞への傷害活性が増強する[7]。

SLAMF7 はセルフリガンドであり、NK 細胞を介した細胞傷害の活性化に関与することが知られている[8,9]。SLAMF7 は EWS-Fli1-activated transcript-2（EAT-2）分子と結合した場合は活性化受容体として作用するが、EAT-2 を発現していない細胞では抑制性受容体として作用すると考えられている[9]。本概括評価に記載した試験結果により、elotuzumab の作用機序が SLAMF7 を発現する多発性骨髄腫細胞に対する ADCC 作用によることが裏付けられているが、NK 細胞に発現する SLAMF7 との結合により NK 細胞を直接活性化する作用も有すると考えられる[9]。また、SLAMF7 は免疫反応における B 細胞の増殖を調節し、細胞接着、細胞周期の調節又はその他の細胞増殖及び細胞生存のシグナル伝達経路に関与していると考えられる[1,10]。

表面プラズモン共鳴試験の結果、elotuzumab のヒト SLAMF7 に対する親和性は MuLuc63 と類似しており、Kd 値は 30～45 nM の範囲であった。*In vitro* 試験において、elotuzumab は SLAMF7 を発現するヒト多発性骨髄腫細胞に対し ADCC を濃度依存的に誘導した。Elotuzumab 存在下において SLAMF7 を発現する 12 種類の多発性骨髄腫細胞株でエフェクター細胞を介した ADCC を誘導した結果、最大細胞溶解作用の 50%の反応を惹起する elotuzumab 濃度は 9.29～28.71 ng/mL の範囲であった[1]。Elotuzumab による ADCC 作用は、骨髄腫細胞株、患者由来の初代培養骨髄腫細胞及び多発性骨髄腫に対する標準治療薬であるボルテゾミブに抵抗性又は難治性の患者由来骨髄腫細胞を用いた *in vitro*

試験において実証されている[1,2]。また、*in vivo* 試験ではマウスのヒト骨髄腫細胞異種移植モデルにおいて elotuzumab の腹腔内投与により腫瘍の増殖が抑制され[1,2]、その作用には用量依存性が認められた[1]。Elotuzumab を OPM2 異種移植モデルに 0.1、0.5、1.0、5.0 及び 10 mg/kg の用量で 3 日に 1 回腹腔内投与した結果、0.1 mg/kg 群のみ統計学的に有意な抗腫瘍効果がみられなかった。この OPM2 異種移植モデルにおいて elotuzumab の抗腫瘍効果と血清中濃度の関連性を検討した結果、最大の抗腫瘍効果は 70～430 µg/mL（10 mg/kg 投与群）の血清中濃度でみられ、生物学的活性を示す最小血清中濃度は 2～13 µg/mL（0.5 mg/kg 投与群の血清中濃度範囲）であった[1]。異種移植モデルにおける elotuzumab の抗腫瘍効果は、低分子薬のボルテゾミブ、レナリドミド[3]又はポマリドミドとの併用や、NK 細胞の抑制性調節分子（KIR2DL3）を阻害する抗体及び NK 細胞の共刺激分子（CD137）の作動性抗体との併用による NK 細胞の機能亢進によっても増強した。

2.2 副次的薬理試験

該当なし

2.3 安全性薬理試験

Elotuzumab はがん患者の治療を目的とした選択的な作用機序を有する mAb であり、心血管系へ影響が懸念される医薬品及び化学物質のいずれにも該当しない。「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」ガイドライン［日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S6(R1)ガイドライン］、「安全性薬理試験ガイドライン」（ICH S7A ガイドライン）、「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」（ICH S9 ガイドライン）に記載されているように、抗悪性腫瘍モノクローナル抗体のような特異的受容体を標的としたバイオテクノロジー応用医薬品に対しては個別の安全性薬理試験は求められていない。

また、elotuzumab には種特異的な交差反応性がみられず、安全性薬理試験及び毒性試験の実施に適した動物種又はトランスジェニックマウスモデルが存在しない。アカゲザルを用いて探索的単回静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験を実施した結果、elotuzumab は試験の最高用量 100 mg/kg（AUC 値：335～447 mg•h/mL）まで一般症状に標的外作用を示唆する所見は認められなかった。

更に、elotuzumab の血液及び免疫系への影響を評価するため、*in vitro* でヒト骨髄幹細胞分化能試験、ヒト全血における溶血性試験及びヒト全血における白血球サブセット枯渇評価試験を実施した。その結果、elotuzumab は骨髄幹細胞分化能試験において 500 µg/mL 以下の濃度で、赤芽球や骨髄球のコロニー形成に有害な影響を及ぼさなかった。また、elotuzumab はヒト全血において 10 mg/mL の濃度まで溶血性を示さなかった。白血球サブセットへの影響に関しては、elotuzumab（100 及び 200 µg/mL）により健康成人の末梢血中の総リンパ球、CD3+、CD4+及び CD8+T 細胞並びに B 細胞数に影響を及ぼさなかったが、NK 細胞数は両濃度において平均 20%（0～45%）減少した。

2.4 薬力学的薬物相互作用試験

Elotuzumab の直接的な薬力学的薬物相互作用試験は、適切な薬理モデルが存在しないことから実施しなかった。

3 薬物動態試験

3.1 分析法

3.1.1 血清中 elotuzumab 濃度測定

マウス及びアカゲザル血清中 elotuzumab 濃度を測定するため ELISA 法を開発した。標準曲線用標準試料の各濃度の真度及び品質管理試料の各濃度の真度及び精度に基づくと、本分析法はマウス及びアカゲザル血清中の elotuzumab を正確かつ精度良く定量可能であることが示された。

マウス血清中 elotuzumab 濃度測定のための ELISA 法を用量設定試験（RTR15 試験）に用い、アカゲザル血清中 elotuzumab 濃度測定のための ELISA 法を単回投与毒性及び TK 試験（TR07150 試験）に用いた。これらの分析法では、ヒト CS1（SLAMF7）の細胞外ドメインとマウス IgG1 Fc で構成された融合蛋白である HuCS1mFc を elotuzumab の捕獲物質として用い、ホースラディシュペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト κ 軽鎖を用いて elotuzumab を検出した。マウス血清中及びアカゲザル血清中 elotuzumab の定量下限は、それぞれ 0.12 及び 0.3 μg/mL であった。

3.2 吸収／TK

Elotuzumab の血清中濃度と薬理活性との関係を検討するための用量設定試験において、OPM2 異種移植マウスに elotuzumab を反復腹腔内投与したときの PK を検討した。OPM2 異種移植マウスに elotuzumab を 3 日に 1 回、計 7 回腹腔内投与した結果、平均血清中濃度は 0.1～10 mg/kg の用量増加に伴って増加した。血清中濃度が 70～430 μg/mL（10 mg/kg 投与時の最低濃度～最高濃度）のとき、抗腫瘍効果は最大となり、生物学的活性を示す最小血清中濃度は 2～13 μg/mL（0.5 mg/kg 投与時の最低濃度～最高濃度）であった。

アカゲザルに elotuzumab を単回静脈内投与したときの TK を検討した。その結果、全身曝露量は 30 mg/kg と 100 mg/kg の間で用量に比例して増加し、明らかな性差はみられなかった。30 mg/kg の用量で投与したとき、投与後 0 時間から無限時間まで外挿した血清中濃度曲線下面積［AUC(INF)］値は雄性及び雌性でそれぞれ 118 及び 194 mg•h/mL、また、100 mg/kg の用量で投与したときの AUC(INF)値は雄性及び雌性でそれぞれ 335 及び 447 mg•h/mL であった。全身血清クリアランスは 0.155～0.299 mL/hr/kg、見かけの消失半減期は 8～14.8 日であった。

3.3 分布

ICH S6(R1)ガイドラインに基づき、動物を用いた elotuzumab の分布試験を行わなかった。しかしながら、アカゲザルに elotuzumab を単回静脈内投与したときの分布容積は 46.3～61.5 mL/kg と小さかったことから、elotuzumab は血管内に分布することが示唆された。

3.4 代謝

ICH S6(R1)ガイドラインに基づき、動物を用いた elotuzumab の代謝試験を行わなかった。しかしながら、モノクローナル抗体（mAb）である elotuzumab の *in vivo* 代謝は、チトクローム P450（CYP）酵素に依存しない生化学的経路を介した小さなペプチド及び個々のアミノ酸への分解と考えられた。

3.5 排泄

ICH S6(R1)ガイドラインに基づき、動物を用いた elotuzumab のマスバランス試験は行わなかった。

3.6 薬物動態学的薬物相互作用

In vivo において、mAb は CYP 酵素に依存しない生化学的経路を介して分解されることから、elotuzumab のような典型的なモノクローナル抗体が、CYP 酵素によって代謝される化合物との相互作用を起こす可能性は低いと考えられた。

4 毒性試験

非臨床評価の結果、elotuzumab はヒト SLAMF7 蛋白のみに結合し、他の動物種（チンパンジー、カニクイザル、アカゲザル、イヌ、ミニブタ、ウサギ、ラット及びマウス）の SLAMF7 には結合しなかった。Elotuzumab の非臨床安全性評価に用いる代替動物として C57BL/6 マウスにヒト SLAMF7 遺伝子を導入したトランスジェニック動物モデルを作製した[4]。しかし、トランスジェニックマウスにおけるヒト SLAMF7 の発現を検討した結果、休止 T 細胞及び活性化 T 細胞のいずれにもヒトと同様のヒト SLAMF7 の発現は認められなかった。T 細胞は、自然免疫系と獲得免疫系の間のクロストークにより NK 細胞の恒常性及び腫瘍に対する反応性を調節していることが知られており、上記のヒトとトランスジェニックマウスの間のヒト SLAMF7 発現の相違は NK 細胞の機能に重要な影響を及ぼすものと考えられ、トランスジェニックマウスモデルはヒトの SLAMF7 の生物学的活性の評価に適切でないと考えられた。Elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、毒性試験に適したトランスジェニック動物が存在しないことから、非臨床安全性評価として主にヒト細胞及びヒト組織を用いた *in vitro* 安全性評価を実施し、標的外作用による毒性及び局所刺激性を検討するための *in vivo* 試験を実施した。Elotuzumab の臨床投与経路が静脈内投与であることから、*in vivo* 試験の投与経路は静脈内投与とした。Elotuzumab 投与の安全性を担保するために実施した毒性試験を Table 4-1 に示す。重要な試験は、試験開始時の総合的な分析評価結果に基づき臨床で使用される薬剤と同等の薬剤を用いて実施した。

Table 4-1: 毒性試験一覧

試験種類	投与経路	動物種	GLP 適合性
単回投与毒性試験	静脈内	アカゲザル	非 GLP
局所刺激性試験	静脈内	ウサギ	GLP
免疫組織化学法を用いた交差反応性試験	*In vitro*	カニクイザル、アカゲザル、ミニブタ、ラット、マウス、ウサギ、イヌ及びヒト	非 GLP
ELISA 法及び遺伝子組み換え培養細胞を用いた組み換え SLAMF7 の結合性試験	*In vitro*	チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル	非 GLP
全血結合性試験	*In vitro*	チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル	非 GLP

Table 4-1:　毒性試験一覧

試験種類	投与経路	動物種	GLP 適合性
組織交差反応性試験	*In vitro*	チンパンジー、アカゲザル及びヒト	GLP
免疫毒性試験	*In vitro*	ヒト	非 GLP
骨髄分化能試験	*In vitro*	ヒト	非 GLP
溶血性試験	*In vitro*	ヒト	GLP

4.1　単回投与毒性試験

アカゲザル（雌雄各 1 匹/群）に elotuzumab を 0、30 及び 100 mg/kg の用量で 30 分間単回持続静脈内投与し、elotuzumab の標的外毒性を評価した。30 及び 100 mg/kg［AUC(INF) = 335～447 mg•h/mL］の用量で elotuzumab を投与したサルにおける忍容性は良好であり、死亡はみられなかった。一般状態、体重、摂餌量、臨床病理学的検査、イムノフェノタイピング、器官重量、剖検及び病理学的検査に elotuzumab 投与に関連した影響はみられなかった。Elotuzumab の全身曝露量（AUC 及び Cmax）は概して投与量に応じて増加し、性差はみられなかった。サル単回投与試験の TK 値を Table 4.1-1 に示した。

Table 4.1-1:　サル単回投与試験の TK 値

パラメータ	採血日	Elotuzumab 投与量（mg/kg）			
		30		100	
		雄	雌	雄	雌
Cmax (mg/mL)	Day 1	0.64	0.64	1.66	2.07
AUC(INF)[a] (mg•h/mL)	Day 1	194	118	335	447

[a] 30 及び 100 mg/kg 群の雌雄合算 AUC 値はそれぞれ 156 及び 391 mg•h/mL

4.2　反復投与毒性試験

毒性試験に適した動物種が存在せず、ICH S6(R1)ガイドラインに記載されている適切なトランスジェニック動物も存在しないことから、elotuzumab の反復投与毒性試験は実施していない。

4.3　遺伝毒性試験

ICH S6(R1)ガイドラインに記載されているとおり、従来の医薬品について通常実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類は、バイオ医薬品に対しては適切なものでなく、このような成分が DNA や他の染色体成分に直接相互作用するとは考えにくいため必要とされない。したがって、elotuzumab の遺伝毒性試験は実施しなかった。

4.4 がん原性試験

Elotuzumab が薬理学的活性を示す動物モデルは存在せず、elotuzumab の SLAMF7 に対する特異性は高いことから、標的外作用を発現する可能性は低いと考えられる。また、elotuzumab が細胞周期及び DNA に影響を及ぼすことを示唆する知見はない。更に、「医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス」(ICH S1A)、ICH S6(R1)及び ICH S9 ガイドラインに示されている通り、モノクローナル抗体などのバイオ医薬品においては標準的ながん原性試験は一般的に不適当であり、更に、進行した全身性疾患の治療を目的とした抗腫瘍剤では必要とされない。したがって、elotuzumab のがん原性試験は実施しなかった。

4.5 生殖発生毒性試験

ICH S6(R1)及び S9 ガイドラインに示されているとおり、バイオ医薬品の生殖発生毒性試験は 1 種の薬理学的に適切な動物種を用いて実施すべきである。しかし、elotuzumab はヒト SLAMF7 蛋白のみに結合するヒト化 IgG1 mAb であり、他の動物種（チンパンジー、カニクイザル、アカゲザル、イヌ、ミニブタ、ウサギ、ラット及びマウス）の SLAMF7 には結合しなかった。更に、トランスジェニックマウスにおいて休止 T 細胞及び活性化 T 細胞のいずれにもヒトと同様のヒト SLAMF7 の発現は認められなかったことから、トランスジェニック動物モデルは、非臨床安全性評価に用いる代替動物として適切でないと考えられた。したがって、毒性試験に適した動物種が存在しないため、生殖発生毒性試験は実施していない。Elotuzumab の生殖発生毒性については、組織における標的の局在、薬理学的作用機序及び公表論文により評価した。

SLAMF7 発現は、ヒト血液中の白血球サブセット及び健康成人の器官に浸潤した白血球にのみ低レベルに認められる [6]。Elotuzumab 及び MuLuc63（elotuzumab の相同マウス抗体）は NK 細胞及び NKT 細胞並びに CD8+T 細胞サブセットに結合したが、CD4+T 細胞、静止期単球、循環血中 CD20+HLA−DR+B 細胞及び顆粒球に結合しなかった。ヒト組織パネルを用いた組織交差反応性試験（GLP 適合）では、elotuzumab の反応が複数の組織における形質細胞及び免疫芽細胞（形質細胞へ分化途中の B 系列細胞）の細胞膜及び細胞質にみられた。形質細胞及び免疫芽細胞にみられた染色は、これらの細胞に発現することが知られている SLAMF7 が elotuzumab によって認識されたものと考えられた。子宮［体部（子宮内膜）及び頸部］及び卵管の形質細胞及び免疫芽細胞を除き、生殖器官に elotuzumab の結合はみられなかった。子宮における形質細胞及び免疫芽細胞への elotuzumab の結合が *in vivo* で生殖に影響を及ぼす可能性は明らかでない。しかし、形質細胞を含む B 細胞は生殖機能、胚胎児発生並びに出生前及び出生後の発達に有意な影響を及ぼさないことが、リツキシマブ（CD20 を発現する骨髄中の B 細胞前駆細胞並びに血中及びリンパ組織中の未熟及び成熟 B 細胞を選択的に枯渇させる抗 CD20 モノクローナル IgG1 抗体）を用いた試験のデータより示されている [11]。また、胎児及び出生児には、毒性所見としてリツキシマブの薬理作用に一致する回復性の B 細胞の減少が認められた。同様に、臨床における妊娠第 1、2 及び 3 三半期のリツキシマブ投与では、出生児に一時的な B 細胞減少がみられたのみであった [12,13,14,15]。Elotuzumab は循環血中 CD20+HLA−DR+B 細胞に結合せず、elotuzumab を全血と 100 及び 200 µg/mL の濃度で反応させた試験において B 細胞の減少が認められなかったことから、elotuzumab は胎児及び出生児において B 細胞を減少させないと考えられる。

SLAMF7 欠損マウスは正常に誕生し、正常な発生及び発達周期の繁殖能を有すると考えられる [16]。更に、SLAMF7 は主に NK 細胞上に発現しているが、*in vivo* 及び *in vitro* のいずれの系においても NK 細胞の発達に影響を及ぼすことを示す結果は得られていない。これらの結果より、SLAMF7 は発生及び胚・胎児の発達において重要な役割をもたないことが示唆される。しかし、SLAMF7 欠損マウスにおいて脾臓の $CD44^{hi}CD122+$自然免疫 CD8+T 細胞及び胸腺の $CD44^{hi}$成熟 NKT 細胞の有意な増加が認められており、内因性の SLAMF7 発現が自然免疫 CD8+T 細胞及び NKT 細胞数に対して負の影響を及ぼしていることを示している [17]。

ヒト全血を用いた *in vitro* アッセイにおいて、elotuzumab は 100 及び 200 µg/mL の濃度で T 細胞（CD3+、CD4+及び CD8+）及び B 細胞の減少を惹起しなかった。しかし、NK 細胞数は 0～45%（平均 20%）減少し、これは elotuzumab の薬理作用による影響と考えられた。NK 細胞は生殖及び胎児の母体からの免疫寛容に重要な役割をもつと考えられている。しかし、子宮の NK（uNK）細胞は、主に細胞傷害性を有する $CD56^{dim}CD16+$細胞である血中の NK 細胞とは異なり、主に細胞傷害性を持たず血管形成因子の産生により血管形成作用を有する $CD56^{bright}CD16-$細胞である [18]。Elotuzumab によるリンパ球減少症及び uNK 細胞への作用が妊娠に及ぼす影響については明らかでない。

Elotuzumab は IgG1mAb である。本サブタイプの IgG は、FcRn 受容体を介してヒト胎盤関門を通過することが知られており、胎児は特に妊娠の後期に elotuzumab に直接的に曝露される可能性がある [19]。Elotuzumab が胎児の発生に及ぼす影響の評価は行っていないが、SLAMF7 欠損マウスにおいて発生への影響が特に認められていないことは、elotuzumab 投与による SLAMF7 の阻害が発生毒性を引き起こさないことを示唆していると考えられる。また、本薬の乳汁移行に関しては、ヒトにおいて母乳中の抗体は出生児の血中に実質的に移行しないことが知られており、母乳中に分泌される免疫グロブリンの大部分は主に腸内の感染を予防する IgA である [20]。したがって、IgG である elotuzumab が母乳由来で出生児の血中に移行する量は著しく低く、リンパ球減少症を引き起こすことはないと考えられる。

Elotuzumab は多発性骨髄腫の治療を目的とし、レナリドミドとデキサメタゾン、ボルテゾミブとデキサメタゾン又はその他の治療法との併用療法のみの開発を実施している。したがって、elotuzumab と併用する際にこれらの薬剤の生殖発生毒性を考慮する必要がある。例として、レナリドミドは、免疫調節作用、抗血管形成作用及び抗新生物作用をもつサリドマイドの誘導体であり、妊婦への投与は禁忌とされている [21]。レナリドミドの添付文書には、サルの生殖発生毒性試験で認められた催奇形性に関する胚胎児毒性の警告欄が設けられている。ボルテゾミブは、哺乳類細胞の 26S プロテアソーム低分子のキモトリプシン様活性を可逆的に阻害する低分子化合物であり、胚胎児発生に対する警告が、器官形成期に臨床用量（1.3 mg/m^2）の約半分の用量を投与したウサギで着床後死亡の増加及び生存胎児数の減少がみられたことに基づいて示されている [22]。これらの所見より、妊娠の可能性のある女性では、elotuzumab とこれらの薬剤を併用投与する期間に妊娠を回避する措置を講じることが強く推奨される。

以上より、elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、生殖発生毒性試験の実施に適切なトランスジェニックマウスモデルも存在しないことから、elotuzumab の生殖発生毒性は *in vitro* 及び作用機序のデータ並びに elotuzumab に限定しない関連公表論文に基づき評価した。SLAMF7（ヒトに

おける elotuzumab の標的分子）欠損マウスが正常に誕生することは、SLAMF7 を標的とすることにより生殖発生毒性が発現するリスクは低いことを示していると考えられる。しかし、ヒトにおける妊娠中の elotuzumab によるリンパ球減少症並びに elotuzumab の生殖器官における形質細胞及び免疫芽細胞への結合の影響は不明であり、発生毒性物質として知られている薬剤との併用投与であることから、妊娠の可能性のある女性では、elotuzumab とレナリドミド及びボルテゾミブを併用投与する期間に妊娠を回避する措置を講じることが必要である。公表論文より、ヒト母乳中の IgG は出生児の血中に実質的に移行しないことが示唆されているが、授乳婦への投与は避けることが望ましく、やむを得ず投与する場合は授乳を避けさせることが望ましい。

4.6 局所刺激性試験

ウサギの右耳介辺縁静脈に溶媒［0.05% Tween 80 及び 20 mM クエン酸ナトリウムを含有する 120 mM 塩化ナトリウム水溶液（pH 6.05）］に溶解した濃度 5 mg/mL の elotuzumab 1 mL を 1 mL/分の投与速度で単回投与し、elotuzumab の局所刺激性を評価した。臨床推奨投与（最高濃度 6.6 mg/mL、投与速度 2 mL/分未満）と同様の条件の単回静脈内投与において、投与部位の炎症及び局所刺激性は認められなかった。全例が計画剖検日まで生存し、いずれの観察時点でも投与に関連した一般状態の変化はみられなかった。体重及び摂餌量測定、剖検及び病理組織学的検査結果に elotuzumab に関連した変化は認められなかった。

4.7 その他の毒性試験

4.7.1 動物種選択のための試験

4.7.1.1 免疫組織化学（IHC）法を用いた HuLuc63（elotuzumab）のヒト及び非ヒト組織交差反応性試験

正常ヒト及び各動物種（カニクイザル、アカゲザル、ミニブタ、イヌ、ウサギ、ラット及びマウス）における elotuzumab の交差反応性を IHC で評価し、毒性試験に用いる動物種を検討した。概して、本試験で評価した非ヒト組織に elotuzumab の結合を示唆する染色はみられなかった。これらの結果から、elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、毒性試験に適した動物種が存在しないことが示された。Elotuzumab 特異的な細胞表面の染色は、ヒトの扁桃腺、脾臓、リンパ節、結腸及び三叉神経節の単核細胞にみられ、ヒトの大脳、小脳、脊髄及び後根神経節にはみられなかった。

4.7.1.2 HuLuc63（elotuzumab）の非ヒト霊長類由来遺伝子組換え CS1（SLAMF7）蛋白を用いた交差反応性試験

Elotuzumab の交差反応性を、非ヒト霊長類（チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル）由来の精製遺伝子組み換え SLAMF7 の Fc 融合蛋白を用いて検討した。その結果、elotuzumab はヒト SLAMF7 のみに特異的に結合し、SLAMF7 の精製 Fc 融合蛋白を用いた ELISA 法及び完全長 SLAMF7 を表面に発現させた改変培養細胞を用いたフローサイトメトリー法による測定の結果、評価したいずれの動物種（チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル）由来の遺伝子組み換え SLAMF7 にも結合しなかった。したがって、チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザルは毒性試験に適さない動物種であることが示された。

4.7.1.3 HuLuc63（elotuzumab）の非ヒト霊長類全血免疫サブセット結合性試験

Elotuzumab と正常なチンパンジー、カニクイザル及びアカゲザルの全血中白血球サブセットとの結合性を評価した。その結果、elotuzumab はチンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル血液中の NK 細胞、NKT 細胞、CD8+T 細胞及び単球並びにチンパンジーの CD4+T 細胞への結合を示さなかった。血液中 B 細胞への elotuzumab の結合がカニクイザル及びアカゲザルで認められたが、チンパンジーでは認められなかった。しかし、elotuzumab の B 細胞への結合には個体間で大きなばらつきがあり、elotuzumab は異種細胞に発現させたカニクイザル及びアカゲザル由来の遺伝子組み換え SLAMF7 蛋白に結合しなかったため、カニクイザル及びアカゲザルの血液中 B 細胞への elotuzumab の結合は、SLAMF7 に特異的な結合ではないと考えられた。これらの結果から、*in vitro* において非ヒト霊長類血液に対する elotuzumab の結合パターンはヒト血液に対する結合パターンと異なることが示された。したがって、非ヒト霊長類は毒性試験に適さない動物種であると考えられた。

4.7.1.4 正常ヒト組織並びにチンパンジー及びアカゲザル組織を用いた HuLuc63（elotuzumab）の交差反応性試験法検証試験

Elotuzumab の組織交差反応性試験の条件を正常ヒト、チンパンジー及びアカゲザル組織で検討した結果、elotuzumab（HuLuc63）のヒト組織交差反応性試験で用いる IHC では、複合体を用いる手法が特異的かつ高感度で再現性も良好であることが示された。また、陽性対照組織及び陰性対照組織の適切性を確認した。更に、3 及び 10 μg/mL を以降のヒト組織パネルを用いるヒト組織交差反応性試験の elotuzumab 濃度とした。

4.7.1.5 HuLuc63（elotuzumab）の正常ヒト組織を用いた交差反応性試験

各 3 例の提供者から得たヒト組織パネル（約 36 組織）の組織を elotuzumab（3 及び 10 μg/mL）と反応させ、elotuzumab の組織結合性を比較した。その結果、elotuzumab の結合は、骨髄、乳房、胃腸管［結腸（大腸）、食道、小腸、胃］、肝臓、リンパ節、卵管、膵臓、唾液腺、脾臓、胸腺、甲状腺、扁桃腺、尿管及び子宮［体部（子宮内膜）及び頸部］に様々な数で存在する形質細胞及び免疫芽細胞の細胞膜及び細胞質にみられた。形質細胞及び免疫芽細胞の染色は、elotuzumab の標的分子（SLAMF7）が形質細胞及び免疫芽細胞上に発現していることを示唆した。評価したその他のヒト組織では、特異的な交差反応性はみられなかった。

4.7.2 免疫毒性

Elotuzumab の影響による白血球サブセットの細胞数減少の可能性を、健康成人の全血を用いた *in vitro* 試験で検討した。100 及び 200 μg/mL の elotuzumab 存在下で全血を培養した結果、すべての健康成人（8 例）の総リンパ球、CD3+T 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、B 細胞及びメモリーB 細胞数に影響はみられなかった。8 例中 5 例で NK 細胞数の減少が elotuzumab の両濃度で観察された（4 例：約 20～30%、1 例：45%）。

4.7.3 骨髄幹細胞の分化能試験

メチルセルロース培地を用い、ヒト骨髄幹細胞由来の赤血球及び骨髄球前駆細胞の分化能に対する elotuzumab の影響を検討した。Elotuzumab は、評価した最高用量（500 μg/mL）まで造血前駆細胞の増殖並びに赤芽球系（赤芽球コロニー形成単位及び赤芽球バースト形成単位）及び骨髄系（顆粒球-

マクロファージコロニー形成単位及び顆粒球赤血球単球巨核球コロニー形成単位）コロニーの形成に対照培養と比較して有意な影響を及ぼさなかった。

4.7.4 ヒト全血を用いた溶血性試験

Elotuzumab のヒト全血に対する適合性を溶血性試験により検討した。全血に濃度 2、5 及び 10 mg/mL の elotuzumab を加えて 60 分間培養した結果、いずれの上清にも溶血はみられなかった。また、陰性対照（0.9%塩化ナトリウム溶液）では溶血はみられず、陽性対照（0.1%炭酸ナトリウム溶液）では 100%溶血がみられた。したがって、elotuzumab はヒト全血に対して溶血性を示さず、ヒト血液適合性が認められると判定した。

4.7.5 免疫原性

サルの探索的単回持続静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験では、免疫原性の評価は実施しておらず、免疫原性に関連すると考えられる所見もみられなかった 。Elotuzumab はヒト化抗体であるため、ヒトで免疫関連の有害な反応が発現する可能性は低いと考えられる。

5 総括及び結論

多発性骨髄腫は、形質細胞が悪性腫瘍化した疾患で、世界中で年間 86,000 人が新たに発症する [23,24]。全ての血液悪性腫瘍の 10%、全ての悪性腫瘍の 1%を多発性骨髄腫が占める [25]。近年、高用量化学療法、分子標的薬及び幹細胞移植の進歩により、多発性骨髄腫患者の全生存期間、無イベント生存期間が延長している。しかしながら、ほぼ全例において再発・増悪がみられる。そのため、多発性骨髄腫は罹患率及び死亡率が高く難治性であることから、現在でもアンメットメディカルニーズの高い疾患である。

Elotuzumab は、悪性骨髄腫細胞及び一部のヒト正常白血球サブセット（NK 細胞、NKT 細胞、CD8+T 細胞及び形質細胞）に発現する細胞表面糖蛋白質の SLAMF7 を標的とするヒト化 mAb（IgG1）である。Elotuzumab の主要な作用機序は、NK 細胞を介した ADCC である。Elotuzumab による ADCC は NK 細胞及び CD16 のいずれにも依存している。また、SLAMF7 は NK 細胞機能の調節因子であることが知られており、*in vitro* で elotuzumab が NK 細胞上の SLAMF7 へ結合することにより、NK 細胞が直接活性化され、骨髄腫細胞への傷害活性が増強する。Elotuzumab はプロテアソーム阻害剤のボルテゾミブ治療抵抗性患者由来の骨髄腫細胞に ADCC を誘導したことから、ボルテゾミブ抵抗性の多発性骨髄腫患者において elotuzumab が効果を示すことが示唆される。ボルテゾミブは腫瘍細胞死を誘導することにより、直接抗腫瘍活性を示す。ボルテゾミブ抵抗性患者の骨髄腫細胞は SLAMF7 を発現し、elotuzumab による ADCC を回避できないことから、骨髄腫細胞の ADCC による細胞死とボルテゾミブによる細胞死は異なる経路を介したものと示唆され、elotuzumab とボルテゾミブを併用した場合の相加・相乗効果に関する生物学的根拠となっている。

ヒト PBMC 存在下でヒト多発性骨髄腫細胞を培養した共培養モデルにおいて、elotuzumab により骨髄腫細胞の細胞死を誘導する NK 細胞活性化が認められた。本共培養モデルでレナリドミドを併用することにより、骨髄腫細胞の細胞死増加が認められ、これはエフェクター細胞と標的細胞の接着増加

やサイトカインの IL-2 及び TNF-α による NK 細胞の活性化亢進によるものと考えられた。この試験結果により、elotuzumab とレナリドミド併用の相乗効果が示された。

非臨床動物モデルにおいて、elotuzumab は単剤で SLAMF7 を発現する多発性骨髄腫細胞異種移植モデルの腫瘍増殖を用量依存的に阻害したが、この *in vivo* における薬効はボルテゾミブ、レナリドミド又はポマリドミドとの併用により更に増強した。また、抗 KIR2DL1/2/3 特異的 mAb（lirilumab）及び抗マウス CD137 作動性 mAb との併用試験においても、elotuzumab の *in vivo* 活性は KIR2DL3 阻害及び CD137 活性化により増強することが示された。Lirilumab は、HLA-C と NK 細胞上の KIR2DL1/2/3 受容体との相互作用を介した抑制性シグナルを阻害し、NK 細胞の細胞傷害活性を増加させる [26]。また、CD137 の活性化は NK 細胞の ADCC 活性の増強により、*in vivo* での薬効を増強した [27]。これらの知見は、今後、elotuzumab とその効果を増強させる他の mAb を併用する場合の裏付けとなり得ると考えられる。

用量設定試験において、OPM2 異種移植マウスに elotuzumab を 3 日に 1 回、計 7 回腹腔内投与した結果、elotuzumab の平均血清中濃度は投与回数に伴って増加したことから、投与期間中の elotuzumab の蓄積が示唆された。更に、elotuzumab の平均血清中濃度は 0.1～10 mg/kg の用量増加に伴って増加した。Elotuzumab の血清中濃度と薬理活性との関係から、血清中濃度が 70～430 μg/mL（10 mg/kg 投与時の最低濃度～最高濃度）のとき、抗腫瘍効果は最大となり、生物学的活性を示す最小血清中濃度は 2～13 μg/mL（0.5 mg/kg 投与時の最低濃度～最高濃度）であることが示された。臨床データから、レナリドミド及びデキサメタゾンと併用して elotuzumab を 10 及び 20 mg/kg の用量で 2 サイクルまで毎週、その後 2 週間間隔で投与したときの定常状態トラフ濃度は、臨床効果が期待されるトラフ濃度の 70 μg/mL（OPM2 異種移植マウスモデルに基づく濃度）を上回ることが示された。

アカゲザルに elotuzumab を単回静脈内投与したときの TK は、小さい分布容積、小さい全身クリアランス及び長い消失半減期という特性を示した。全身曝露量は 30 mg/kg と 100 mg/kg の間で用量に比例して増加し、明らかな性差はみられなかった。

ICH S6(R1)ガイドラインに基づき、動物を用いた elotuzumab の代謝試験は行わなかったものの、mAb である elotuzumab は、*in vivo* で CYP 酵素に依存しない生化学的経路を介して小さなペプチド及び個々のアミノ酸へと分解されると考えられた。したがって、elotuzumab が CYP 酵素を介して代謝される化合物との薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられた。

Elotuzumab の非臨床安全性試験では、毒性試験に使用可能な動物種選択のための結合性試験として、①カニクイザル、アカゲザル、ミニブタ、イヌ、ウサギ、ラット及びマウス組織の IHC 分析、②ELISA 法によるチンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル由来の精製遺伝子組み換え SLAMF7 Fc 融合蛋白の分析、③チンパンジー、カニクイザル、アカゲザル及びマウスの完全長 SLAMF7 を表面に発現させた異種培養細胞を用いたフローサイトメトリー測定による分析、④正常チンパンジー、カニクイザル及びアカゲザル全血を用いたフローサイトメトリー測定による分析を実施した。霊長類の間で SLAMF7 蛋白のアミノ酸配列は高度に保存されているが（ヒト SLAMF7 蛋白との相同性はチンパンジーで 98%、カニクイザルで 90%、アカゲザルで 89%）、結合性試験結果の総合的な評価から elotuzumab は非ヒト霊長類の SLAMF7 には結合せず、毒性試験で一般的に用いるイヌ、ミニブタ、ウサギ、ラッ

ト及びマウスの SLAMF7 にも結合しないことが示された。また、ヒト SLAMF7 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、休止 T 細胞及び活性化 T 細胞のいずれにもヒトと同様のヒト SLAMF7 の発現が認められなかったことから、毒性評価に用いる代替動物として適切でないと考えられた[4]。

Elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、毒性試験に適した動物種及びトランスジェニック動物モデルが存在しないことが示唆された。したがって、非臨床安全性評価として主に *in vitro* 安全性評価及びアカゲザルの探索的単回投与試験を実施し、本薬の選択性及び潜在的な毒性を検討した。すなわち、GLP 適合下でウサギの局所刺激性試験、ヒト全血の溶血性試験及びヒト組織パネルを用いたヒト正常組織の交差反応性試験を実施し、更に、アカゲザルを用いた探索的単回静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験で elotuzumab の標的外作用について検討した。また、その他の探索的免疫毒性試験として、elotuzumab のヒト全血における白血球サブセット枯渇及びヒト骨髄幹細胞分化能への影響を検討するための *in vitro* 試験を実施した。

ヒト組織パネルを用いた組織交差反応性試験では、elotuzumab の反応が複数の組織における形質細胞及び免疫芽細胞（形質細胞へ分化途中の B 系列細胞）の細胞膜及び細胞質にみられた。形質細胞及び免疫芽細胞にみられた染色は、正常ヒト形質細胞及び免疫芽細胞に発現することが知られている SLAMF7 が elotuzumab によって認識されたものと考えられた。評価したヒト組織において、上記の形質細胞及び免疫芽細胞以外には elotuzumab の特異的な交差反応性はみられなかった。Elotuzumab を最高用量 100 mg/kg（AUC：335～447 mg•h/mL）で投与したアカゲザルに、投与に関連した影響はみられなかった。これらの結果より、elotuzumab が標的外作用を発現する可能性は低いと考えられた。また、ウサギを用いた局所刺激性試験では、5 mg/mL の elotuzumab を単回静脈内投与しても刺激性は認められず、elotuzumab の局所刺激性は低いことが示唆された。

ヒト全血を用いた溶血性試験では、elotuzumab は評価した最高濃度（10 mg/mL）まで溶血を起こさなかった。ヒト全血における elotuzumab の影響による白血球サブセットの細胞数減少の可能性を検討した *in vitro* 試験では、elotuzumab を 100 及び 200 µg/mL の濃度で反応させても T 細胞（CD3+、CD4+、CD8+）及び B 細胞を減少させなかったが、NK 細胞数を平均 20%（0～45%）減少させた。更に、造血幹細胞の赤芽球系及び骨髄系細胞への分化に関し、評価した elotuzumab の最高用量 500 µg/mL まで影響はみられなかった。したがって、ヒト全血及び骨髄を用いた試験結果より、elotuzumab は、その薬理作用に関連すると考えられる NK 細胞の減少を除き、全血及び骨髄の白血球を減少させる可能性は低いことが示された。

以上より、elotuzumab はヒト以外の動物種に交差反応性を示さず、毒性試験に適した動物種が存在しないことから、非臨床安全性評価として主に *in vitro* 安全性評価（組織交差反応性試験並びにヒト全血及び骨髄を用いた試験）及び限定的な *in vivo* 試験を実施し、本薬の選択性及び潜在的な毒性を検討した。これらの非臨床毒性試験の結果から、臨床における進行期悪性腫瘍患者を対象とした elotuzumab 投与の安全性が懸念される所見はみられなかった。

6 参考文献

1 Tai YT, Dillon M, Song W, et al. Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. Blood. 2008;112:1329-1337.

2 Hsi ED, Steinle R, Balasa B, et al. CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2008;14:2775-2784.

3 Balasa B, Yun R, Belmar NA, et al. Elotuzumab enhances natural killer cell activation and myeloma cell killing through interleukin-2 and TNF-α pathways. Cancer Immunol Immunother. 2015;64:61-73.

4 Generation of hCS1 transgenic mice (Study [redacted]940). Bristol-Myers Squibb Company; 20[redacted]. Document Control No. 930084495.

5 Longo DL, Anderson KC. Plasma cell disorders. In: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, et al. editors. Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. McGraw-Hill 2005:656-662.

6 Zonder JA, Mohrbacher AF, Singhal S, et al. A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. Blood. 2012;120:552-559.

7 Collins SM, Bakan CE, Swartzel GD, et al. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. Cancer Immunol Immunother. 2013;62:1841-1849.

8 Bouchon A, Cella M, Grierson HL, et al. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. J Immunol. 2001;167:5517-5521.

9 Veillette A, Guo H. CS1, a SLAM family receptor involved in immune regulation, is a therapeutic target in multiple myeloma. Crit Rev in Oncol Hematol. 2013;88:168-177.

10 Lee JK, Mathew SO, Vaidya SV, et al. CS1 (CRACC, CD319) induces proliferation and autocrine cytokine expression on human B lymphocytes. J Immunol. 2007;179:4672-4678.

11 Vaidyanathan A, McKeever K, Anand B, et al. Developmental immunotoxicology assessment of rituximab in cynomolgus monkeys. Toxicol Sci. 2011;119:116-125.

12 Decker M, Rothermundt C, Hollander G, et al. Rituximab plus CHOP for treatment of diffuse large B-cell lymphoma during second trimester of pregnancy. Lancet Oncol. 2006;7:693-694.

13 Friedrichs B, Tiemann M, Salwender H, et al. The effects of rituximab treatment during pregnancy on a neonate. Haematologica. 2006;91:1426-1427.

14 Klink DT, van Elburg RM, Schreurs MWJ, et al. Rituximab administration in third trimester of pregnancy suppresses neonatal B-cell development. Clin Dev Immunol. 2008;Article No.271363.

15 Kimby E, Sverrisdottir A, and Elinder G. Safety of rituximab therapy during the first trimester of pregnancy: a case history. Eur J Haematol. 2004;72:292-295.

16 Cruz-Munoz ME, Dong Z, Shi X, et al. Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natureal killer cell function. Nat Immunol. 2009;10:297-305.

17 De Calisto J, Wang N, Wang G, et al. SAP-dependent and -independent regulation of innate T cell development involving SLAMF receptors. Fron Immunol. 2014;5:Article186.

18 Sharma S. Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss. Int J Dev Biol. 2014;58: 219-229.

19 Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. Vaccine. 2003;21:3365-3369.

20 Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. Vaccine. 2003;21:3374-3376.

[21] レブラミド®カプセル 5mg（レナリドミド） 添付文書, 第 9 版. 2015.

[22] ベルケイド®注射用 3mg（ボルテゾミブ） 添付文書, 第 8 版. 2013.

[23] Becker N. Epidemiology of multiple myeloma. Recent Results Cancer Res. 2011;183:25-35.

[24] Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, et al. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. Int J Cancer. 2007;120:40-61.

[25] Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol. 2011;86:57-65.

[26] Kohrt HE, Thielens A, Marabelle A, et al. Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies. Blood. 2014:123:678-686.

[27] Kohrt HE, Houot R, Goldstein MJ, et al. CD137 stimulation enhances the antilymphoma activity of anti-CD20 antibodies. Blood. 2011;117:2423-2432.