ベンリスタ点滴静注用120mg
ベンリスタ点滴静注用400mg

製造販売承認申請書添付資料

第２部（モジュール２）CTDの概要（サマリー）

2.4. 非臨床試験の概括評価

グラクソ・スミスクライン株式会社

Aug 22 2017 15:25:02

非臨床試験の概括評価の目次

頁

2.4. 非臨床概括評価 1

2.4.1. 非臨床試験計画概略 1

2.4.2. 薬理試験 2

2.4.3. 薬物動態 5

2.4.4. 毒性試験 6

2.4.5. 総括及び結論 12

2.4.6. 参考文献 13

2.4 の略号等一覧

略語（略称）	内　容
ADA	抗ベリムマブ抗体
ADCC	抗体依存性細胞介在性細胞傷害
APRIL	a proliferation-inducing ligand
AUC	血清中濃度－時間曲線下面積
BCMA	B cell maturation antigen
BLyS	B リンパ球刺激因子
BR3	BLyS receptor 3
CDC	補体依存性細胞傷害
CL	クリアランス
CL/F	経口投与時のクリアランス
Cmax	最高血清中濃度
Cmax, ss	推定最高血清中濃度
Cmin, ss	推定最低血清中濃度
EC50	50%反応濃度
ELISA	酵素結合免疫吸着測定
F	バイオアベイラビリティ
FasL	Fas ligand
Fc	免疫グロブリンの定常部位側のフラグメント
FcR	Fc 受容体
FcRn	胎児性 Fc 受容体
FcγR	Fcγ 受容体
GLP	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
IC50	50%阻害濃度
IFN	インターフェロン
Ig	免疫グロブリン
K-562	ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞株
KD	解離定数及び結合親和性
LIGHT	lymphotoxin homolog, which exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for HveA
LT	lymphotoxin
MRT	平均滞留時間
NK	ナチュラルキラー
PBMC	ヒト末梢血単核球
PK	薬物動態
SAC	Staphylococcus aureus Cowan I strain
SLE	全身性エリテマトーデス
t1/2	消失半減期
TACI	transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor
TK	トキシコキネティクス
TL1A	TNF-like ligand 1A
TNF	腫瘍壊死因子
Vdss	定常状態における分布容積
Vz/F	皮下投与時の分布容積

2.4. 非臨床概括評価

2.4.1. 非臨床試験計画概略

ベリムマブ（遺伝子組換え）（以下、ベリムマブ）はB リンパ球刺激因子（BLyS）に対する特異的な完全ヒト型IgG1 モノクローナル抗体である。

今回、本邦において全身性エリテマトーデス（SLE）を対象に点滴静注用製剤及び皮下注用製剤を申請するにあたり、効力を裏付ける試験として、in vitro における可溶型及び膜結合型 BLyS に対する結合特性、種特異性（ヒト、マウス及びカニクイザル BLyS 間の結合親和性の比較）、ヒト BLyS 受容体と可溶型 BLyS との相互作用に及ぼす影響、ヒト又はカニクイザルの BLyS によるマウス脾細胞増殖に対する作用を検討した。In vivo ではマウスにヒト BLyS を皮下投与することによって誘発される作用に対するベリムマブの影響、並びにマウス及びカニクイザルにベリムマブを静脈内、腹腔内又は皮下投与したときの薬理作用を検討した。副次的薬理試験として他の TNF スーパーファミリー分子への結合性、ヒト及びカニクイザルの組織交差反応性試験並びに FcR への結合及び ADCC 及び CDC 誘発能を検討する試験を実施した。安全性薬理試験として独立した試験は実施せず、カニクイザルの 4 週間及び 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験のデータから安全性薬理パラメータを評価した。

ベリムマブはカニクイザル及びヒトでのみ薬理活性を示したことから、カニクイザルにベリムマブを静脈内又は皮下投与したときの薬物動態（PK）及びトキシコキネティクス（TK）、胎盤胎児移行性及び乳汁移行性について検討した。抗体医薬品は生体内でペプチド断片や各アミノ酸へと代謝されることが知られているため、その他の試験は実施していない[薬食審査発 0323 第 1 号通知, 2012]。

静脈内及び皮下投与の市販予定処方はそれぞれ 06-B 及び 06-D 処方であるが、非臨床試験において、静脈内投与では 06-A、06-B 及び 06-C 処方の 3 処方を、皮下投与では 06-A、06-B、06-C 及び 06-D 処方の 4 処方を使用した（06-A 及び 06-B 処方の成分については IV 製剤の申請資料の 2.3.P.2.2.1 の表 2.3.P.2-8、2.3.P.2.2.2 の表 2.3.P.2-12 及び 2.3.P.2-13 参照、06-C 及び 06-D 処方の成分については SC 製剤の申請資料の 2.3.P.2.1.1 の表 2.3.P.2-1 参照）。

ベリムマブが薬理活性を示すカニクイザルを用いて反復投与毒性、生殖発生毒性、局所刺激性及び免疫原性を評価した。「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」[薬食審査発 0323 第 1 号通知, 2012]に基づき、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。主要な毒性試験は一部の特殊な検査項目（フローサイトメトリー検査、血清中 BLyS、抗ベリムマブ抗体及び各種免疫グロブリンの測定）を除いて GLP 下で実施した。薬物動態及び毒性試験にはカニクイザルを使用したが、動物種の選択理由については後述した（2.4.4.1.）。

開発期間中に製造工程及び処方の変更が行われたが、品質に影響しないことが確認されている（2.3.S.2.6.）。

なお、本項に記載したベリムマブのすべての用量及び濃度は精製抗体の用量及び濃度として示す。

2.4.2. 薬理試験

2.4.2.1. 効力を裏付ける試験

In vitro 試験

ベリムマブの可溶型 BLyS に対する結合を ELISA 法で解析したところ、ベリムマブはストレプトアビジン被覆プレート上に固定化したビオチン化可溶型 BLyS に結合した（EC50＝0.024 nM）。EC50 付近の濃度のベリムマブとプレート上に固定化したビオチン化可溶型 BLyS との結合は、種々の濃度の可溶型 BLyS を添加することにより濃度依存的に阻害された（IC50=8.5 nM）（2.6.2.2.1.1.）。一方、ヒト慢性骨髄性白血病由来 K-562 細胞株及びヒト末梢血単核球（PBMC）画分中の 4 種類の細胞系列（T 細胞、単球、B 細胞及び NK 細胞）に発現する膜結合型 BLyS への結合をフローサイトメトリー法で検討したところ、ベリムマブは膜結合型 BLyS に対する結合は検出されなかった。また、ヒト PBMC を IFN-γ で処理することにより、単球及び B 細胞では膜結合型 BLyS の発現が上昇したが、ベリムマブは IFN-γ 処理した条件下においても PBMC 上に発現する膜結合型 BLyS に対する結合は検出されなかった（2.6.2.2.1.2.）。

ベリムマブのマウス、カニクイザル及びヒト可溶型 BLyS に対する結合親和性を表面プラズモン共鳴法で検討した結果、ベリムマブはヒト及びカニクイザル可溶型 BLyS に対して同程度の結合親和性で結合した（解離定数（KD）は約 250～340 pM）（2.6.2.2.1.3.1.及び 2.6.2.2.1.3.2.）。一方、マウス可溶型 BLyS にも結合した（KD=9480 pM）が、その結合親和性はヒト可溶型 BLyS（KD=993 pM）の約 1/10 であった（2.6.2.2.1.3.3.）。また、ヒト Fc 領域を融合させた 3 種類のヒト BLyS 受容体（BR3、TACI 及び BCMA）の細胞外ドメインとヒト可溶型 BLyS との結合に対するベリムマブの阻害作用を表面プラズモン共鳴法により検討したところ、ベリムマブはいずれの BLyS 受容体と可溶型 BLyS との結合に対しても阻害作用を示した（BR3、TACI 及び BCMA に対する IC50 はそれぞれ 69、52 及び 97 nM）（2.6.2.2.1.4.）。

マウス脾細胞をヒト BLyS 及び B 細胞刺激因子である Staphylococcus aureus Cowan I strain（SAC）存在下で培養すると、ヒト BLyS の濃度依存的なマウス脾細胞増殖促進作用がみられた（EC50=0.004 nM）が、ベリムマブ（0.1 nM）はヒト BLyS のマウス脾細胞増殖促進作用を約 1/18 に減弱させた（EC50=0.07 nM）（2.6.2.2.1.5.1.）。また、種々の濃度のベリムマブ存在下でヒト BLyS（0.06 nM）のマウス脾細胞増殖能を測定したところ、ベリムマブは濃度依存的にマウス脾細胞増殖を抑制した（IC50=0.06 nM）（2.6.2.2.1.5.1.）。別の試験においてカニクイザル及びヒト BLyS によるマウス脾細胞増殖に及ぼす影響を比較したところ、EC50 はそれぞれ 0.41 及び 0.45 ng/mL と同程度の増殖促進作用を示した（2.6.2.2.1.5.2.）。ベリムマブは、カニクイザル及びヒト BLyS（それぞれ 2 ng/mL）によるマウス脾細胞増殖に対して同程度の濃度依存的な抑制作用を示した（IC50 はそれぞれ 0.033 及び 0.046 nM）（2.6.2.2.1.5.2.）。同様に、ベリムマブは、ヒト PBMC から単離した初代培養ヒト B 細胞をヒト BLyS（2 ng/mL）存在下で培養したときの増殖に対しても濃度依存的な抑制作用を示した（IC50=0.06 nM）（2.6.2.2.1.5.3.）。

以上の in vitro 試験成績から、ベリムマブはヒト可溶型 BLyS に高親和性に結合することにより BLyS-BLyS 受容体間の相互作用を阻害し、BLyS の活性を中和する BLyS 特異的阻害

薬として作用することが確認された。また、ベリムマブのマウス、カニクイザル及びヒト可溶型 BLyS に対する結合親和性を比較したところ、ヒト及びカニクイザル可溶型 BLyS に対する結合親和性並びに両種の BLyS 活性に対する阻害作用は同程度であること、マウス可溶型 BLyS に対する結合親和性はヒト可溶型 BLyS の約 1/10 であることが示された。

In vivo 試験

マウスにヒト BLyS を投与すると脾臓重量及び脾臓 B 細胞数の増加並びに血清中 IgA 及び IgM 濃度の増加がみられる[Moore, 1999]ことから、BALB/c マウスにヒト BLyS を皮下投与し、BLyS により誘発される影響に対するベリムマブの作用を検討した。マウス（10 匹／群）にヒト BLyS（0.3 mg/kg）を 1 日 1 回 4 日間皮下投与し、試験 1 及び 3 日目にベリムマブ（0.05～5.0 mg/kg）を静脈内投与すると、試験 5 日目において、ベリムマブは対照抗体群と比較して、0.15 mg/kg 以上の用量でヒト BLyS による脾臓 B 細胞数及び血清中 IgA 濃度の増加を有意に抑制し、5.0 mg/kg でヒト BLyS による脾臓重量の増加を有意に抑制した（2.6.2.2.2.1.）。これらのことから、ベリムマブは in vivo においてもヒト BLyS の活性を中和することが示された。

ベリムマブはヒト及びカニクイザルの可溶型 BLyS に対する結合親和性よりも低親和性ではあるものの、マウスの可溶型 BLyS に対しても結合すること（2.6.2.2.1.3.）から、マウスにおいてベリムマブの薬理作用を検討するための 2 種類の試験を実施した（2.6.2.2.2.2.）。試験 1 ではマウス（15 匹／群）にベリムマブ（10 mg/kg）を 3 回（試験 0、14 及び 28 日目）静脈内投与して 57 日目まで観察したところ、血中 B 細胞数の減少はみられたものの、ベリムマブの 2 回目の投与後に 15 例中 6 例が死亡し、3 回目の投与後に全例で呼吸困難の症状がみられ、57 日目まで生存したマウス（4 例）の全例に抗ベリムマブ抗体が検出された。試験 2 ではマウス（10 匹／群）にベリムマブ（5 mg/kg）を 3 回（試験 0、14 及び 28 日目）静脈内又は腹腔内投与して 70 日目まで観察したところ、血中 B 細胞数の減少がみられたものの、その作用は持続せず、ベリムマブ投与群の全例で抗ベリムマブ抗体が検出された。これらのことから、マウスではベリムマブの反復投与により中和抗体が産生され、血清から急速にベリムマブが除去されるとともに、薬理作用（B 細胞数の減少）も消失することが示された。また、アナフィラキシー様反応によると考えられる死亡も複数例で認められたことから、マウスはベリムマブを長期投与したときの薬力学的及び毒性学的影響の評価に用いる動物種としては適切ではないと考えられた。

マウスではベリムマブの長期投与による有効性を評価できなかったことから、カニクイザルの毒性試験において B 細胞に及ぼすベリムマブの薬理作用を評価した。4 週間及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験では 5～50 mg/kg の静脈内投与で末梢血、脾臓及びリンパ節において B 細胞数の減少がみられた（2.6.6.3.1.及び 2.6.6.3.2.）。同様の作用が、生殖発生毒性試験の母動物及び出生児においても認められ、免疫原性試験ではベリムマブの 1 mg/kg を皮下投与することにより末梢血総 B 細胞数の減少が認められた（2.6.6.6.3.及び 2.6.6.8.1.）。これらのカニクイザルの反復投与毒性試験でベリムマブは静脈内及び皮下投与のいずれにおいても BLyS に結合して BLyS 活性を中和することにより、B 細胞数減少作用を示すことが確認された。同様に、ベリムマブを静脈内又は皮下投与した SLE 患者においても持続的な総 B 細

胞数（CD19+又は CD20+）減少作用が確認されている（臨床第 III 相試験（BEL110751 及び BEL113750 試験；静脈内投与、2.5.4.3.7.4）及び BEL112341 試験；皮下投与 [2014N216963_00]）。

2.4.2.2. 副次的薬理試験

BLyS 以外の種々の TNF スーパーファミリーの分子（いずれもヒトの APRIL、TL1A、LIGHT、TNF-α、TNF-β (LTα) 及び FasL）に対するベリムマブの結合能を検討した結果、いずれに対しても結合性を示さなかった（2.6.2.3.1.）。このことから、ベリムマブは BLyS に対して特異的に結合することが示された。

ヒト及びカニクイザルの組織パネルを用いた組織交差反応性試験を実施し、ベリムマブが標的以外の蛋白質へ非特異的に結合する可能性を評価するとともにカニクイザルとヒトの組織交差反応性を比較した。その結果、検討した 35 種類のいずれのヒト組織においてもベリムマブ特異的な染色像はみられなかった（2.6.2.3.2.）。このことから、ヒトにおいて投与されたベリムマブが標的以外の蛋白質へ非特異的に結合することにより、off-target 作用を発現する可能性は低いと考えられる。一方、カニクイザル組織では検討した 34 種類のうち膵臓及び子宮頸部に特異的な染色像がみられた（2.6.2.3.2.）。しかしながら、これらの膵臓及び子宮頸部での染色像はそれぞれ 1 例でしか認められなかったこと、及びカニクイザルの 4 週間又は 6 ヵ月間反復投与毒性試験では膵臓及び子宮頸部の組織においてベリムマブの投与に関連する所見はみられなかったことから、これらの組織でみられた染色性に関する生物学的意義は低いと推察され、カニクイザルの組織交差反応性はヒトと類似していると考えられた。なお、カニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1）の初期に影響がみられた甲状腺濾胞上皮組織においてベリムマブ特異的な染色像は認められなかった。カニクイザル及びヒトの可溶型 BLyS の同一性は 98%と非常に高く（XH2010/00019/00）、ベリムマブはヒト及びカニクイザルの可溶型 BLyS に対して同程度の親和性及び薬理作用を示したこと（2.6.2.2.1.3.2.及び 2.6.2.2.1.5.2.）、並びにカニクイザルの組織交差反応性はヒトと類似していることから、カニクイザルはベリムマブの毒性評価に適切な動物種であると考えられた。

ベリムマブは IgG1 モノクローナル抗体であり、Fc 領域が IgG 受容体（胎児性 Fc 受容体（FcRn）及び Fcγ 受容体（FcγR））と結合する可能性が考えられるため、ベリムマブの Fc 領域と FcRn 及び FcγRIIIa との結合性並びに ADCC 及び CDC の誘発能について検討した（2.6.2.3.3.）。その結果、遺伝子組換えヒト FcRn 及び FcγRIIIa に結合した（KD はそれぞれ 618 及び 1790 nM）が、その親和性は試験に用いた IgG1 対照抗体（FcRn：318～590 nM、FcγRIIIa：2090～2680 nM）及び文献報告されている IgG1 モノクローナル抗体の親和性（FcRn：508～1237 nM、FcγRIIIa：710 nM）[Li, 2007; Suzuki, 2010]と同程度であった。また、in vitro において ADCC 及び CDC のいずれも誘発しなかったことから、ベリムマブは FcγRIIIa に結合するものの、ADCC 及び CDC 活性を示さないと考えられた。

2.4.2.3. 安全性薬理試験

ベリムマブの安全性薬理試験として独立した試験は実施せず、カニクイザルの 4 週間及び 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験のデータから安全性薬理パラメータ（心電図及び尿検査パ

ラメータ、中枢神経系及び呼吸系に関する所見）を評価した（2.6.6.3.1.及び 2.6.6.3.2.）。4 週間反復投与試験ではベリムマブの 5、15 及び 50 mg/kg を週 1 回静脈内投与し、6 ヵ月間反復投与試験では同用量を隔週静脈内投与した。その結果、いずれの試験においても中枢神経系及び呼吸系に対する影響はみられず、心電図検査及び尿検査においてベリムマブの投与に関連する変化は認められなかった。

6 ヵ月間反復投与毒性試験においてカニクイザルにベリムマブの 50 mg/kg を隔週 1 回反復静脈内投与したときの Cmax は 1604 µg/mL（2.6.4.3.2.1.）であり、この濃度は日本人の SLE 患者に予定臨床用量であるベリムマブの 10 mg/kg を反復静脈内投与（初回、2 週後、4 週後、以後 4 週間間隔で投与）したときの Cmax（275 µg/mL）の約 6 倍であった（表 2.6.6-4）。このように、ヒトでの曝露量を上回る用量においても安全性薬理パラメータに影響が認められなかったことから、ベリムマブがヒトにおいて重篤な副作用を誘発する可能性は低いと考えられる。

2.4.2.4. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.4.3. 薬物動態

2.4.3.1. 吸収

静脈内投与

雌雄サルにベリムマブの 10 mg/kg を単回静脈内投与したときの曝露量に明らかな性差（2 倍超）はみられなかった。CL は 5.6～6.6 mL/day/kg と肝血流量[Davies, 1993]よりも低かった。また、Vdss は 63.0～69.5 mL/kg と総体液量[Davies, 1993]よりも小さかったことから、ベリムマブは主に血中に存在すると考えられた。t1/2 は約 7～8 日及び MRT は約 11～12 日であった（2.6.4.3.1.1.）。雌雄サルにベリムマブの 5～150 mg/kg を単回静脈内投与したときの曝露量は用量増加に伴って増加した（2.6.4.3.1.1.）。また、雌雄サルにベリムマブの 5～50 mg/kg を週 1 回 4 週間静脈内投与又は隔週で最長 26 週間静脈内投与したときの曝露量は用量増加に比例して増加し、隔週で最長 26 週間静脈内投与したときの曝露量は投与 71 日目までに定常状態に達した（2.6.4.3.2.1.）。また、シミュレーションにより 50 mg/kg を隔週で 6 ヵ月間静脈内投与したときのトラフ値、最終投与後の Cmax ss、AUC 及び Cmin ss を推定した結果、トラフ値の推定値は実測値よりも低く（1.3～1.8 分の 1）、Cmax ss、AUC 及び Cmin ss はそれぞれ 1604 µg/mL、9101 µg･day/mL 及び 445 µg/mL であった（2.6.4.3.2.1.）。

サルに 06-A 及び 06-B 処方を単回静脈内投与したときの薬物動態は同程度であった（2.6.4.3.1.3.）。

皮下投与

雌雄サルに 10 及び 30 mg/kg を単回皮下投与したときの血清中ベリムマブ濃度は投与後 1.51～3.50 日に最高濃度に達した。雌雄の曝露量に明らかな性差はなかった。t1/2 は約 8～11 日、CL/F は 6.61～8.57 mL/day/kg と肝血流量[Davies, 1993]よりも低く、Vz/F は 90.0～113.1 mL/kg と総体液量[Davies, 1993]よりも小さかったことから、ベリムマブは主に血中に

存在すると考えられた。皮下投与後の F は 76～91%であった。また、雌雄サルに 10 及び 30 mg/kg を皮下投与したときの曝露量は 10 及び 30 mg/kg の間では用量増加に伴って増加すると考えられた（2.6.4.3.1.2.）。更に、雌雄サルにベリムマブの 1 mg/kg を週 2 回又は 4 回 13 週間皮下投与したときの曝露量は投与 8 週目に定常状態に達した（2.6.4.3.2.2.）。

サルに 06-A、06-B、06-C 及び 06-D 処方を単回皮下投与したときの曝露量は同程度であると考えられた（2.6.4.3.1.3.）。

ADA の産生

サルにベリムマブを静脈内又は皮下投与したときの ADA の産生頻度は低く、投与経路、用量、投与期間及び性別に依存するものではなかった。また、ADA の検出されたサルの一部では、血清中ベリムマブ濃度が減少したことから、ADA によりベリムマブのクリアランスが増加し、曝露量が低下したと考えられた（2.6.4.3.3.）。

2.4.3.2. 分布

妊娠サルにベリムマブの 5 及び 150 mg/kg を反復静脈内投与したときの出生児血清、臍帯血及び羊水中にベリムマブが定量され、臍帯血中濃度は母動物血清中濃度の 4 分の 1 であったことから、ベリムマブは胎盤を通過することが示された（2.6.4.4.1.）。

2.4.3.3. 代謝

ベリムマブは抗体医薬品であり、生体内でペプチド断片や各アミノ酸へと代謝されることが知られていること[薬食審査発 0323 第 1 号通知, 2012]から、該当する試験は実施しなかった（2.6.4.5.）。

2.4.3.3.1. 排泄

妊娠サルにベリムマブの 5 及び 150 mg/kg を反復静脈内投与したとき、2 匹の母動物の乳汁中にベリムマブが定量され、各母動物血清中濃度のそれぞれ 0.14 及び 4.3%であったことから、ベリムマブは乳汁中に移行することが示された（2.6.4.6.）。

2.4.4. 毒性試験

ベリムマブの毒性を評価するため、反復投与毒性試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験、局所刺激性試験及び免疫原性試験を実施した。急性毒性試験は実施せず、PK 試験並びに出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験で評価した。「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」[薬食審査発 0323 第 1 号通知, 2012]に基づき、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。

2.4.4.1. 動物種の選択

ヒト及びカニクイザル可溶型 BLyS のアミノ酸残基の同一性は 98%（2.6.2.2.1.3.）と高く、ベリムマブはヒト及びカニクイザル可溶型 BLyS に対してそれぞれ同程度の親和性で結合した（2.6.2.2.1.3.2.）。In vitro では、ベリムマブはヒト及びサルの BLyS によるマウス脾細胞

増殖を同程度に抑制し（2.6.2.2.1.5.2.）、in vivo ではヒト及びサルに対して同じ薬理作用（B 細胞数の減少）（2.6.2.6.1.）を示した。

他の動物種としては、マウス、モルモット及びウサギにベリムマブを投与したが、忍容性は認められなかった。マウスではベリムマブの反復投与によってアナフィラキシー様反応による死亡が複数認められ（2.6.2.2.2.2.）、モルモット及びウサギにおいても同様であった（2.6.6.8.5.）。

以上のことから、一連の毒性試験は全てカニクイザルを用いて実施した。

2.4.4.2. 投与量及び投与スケジュール

ベリムマブは臨床において 10 mg/kg を 1 時間以上かけて 1、14、28 日、以降は 28 日間隔で点滴静注するが、反復投与毒性試験では最高 50 mg/kg を週 1 回 4 週間又は隔週 1 回 6 ヵ月間静脈内投与した。また、生殖発生毒性試験では最高 150 mg/kg のベリムマブを隔週 1 回 21 週間静脈内投与した。5 mg/kg（毒性試験の最低用量）のベリムマブをサルに投与したときの血清中ベリムマブ濃度は、4 週間及び 6 ヵ月間投与試験においてそれぞれ 29 及び 28 µg/mL（初回投与後のトラフ値）であり、血清中 BLyS 濃度（0.5 ng/mL 未満、生殖発生毒性試験における投与開始前の値）と比較して、モル濃度で 19000～20000 倍以上過剰であった。SLE 患者にベリムマブを静脈内投与する場合、1 時間以上の時間をかけて持続投与するが、非臨床毒性試験ではベリムマブを 30 秒以上の時間をかけて緩徐に静脈内投与した。一般的に急速静脈内投与では持続静脈内投与よりも Cmax が高値となるため、毒性試験の投与速度を上げることで、より高い曝露条件下での毒性評価が可能であると考えた。

2.4.4.3. 急性毒性

単回投与毒性試験は実施しなかったが、雌カニクイザルにベリムマブの 150 mg/kg を単回投与した PK 試験（2.6.4.3.1.1.）、及び妊娠カニクイザルにベリムマブの最高 150 mg/kg を反復静脈内投与した生殖発生毒性試験（2.6.6.6.3.）において、急性の毒性徴候は認められなかった。概略の致死量は 150 mg/kg 超であった。

2.4.4.4. 反復投与毒性

サルに最高 50 mg/kg のベリムマブを週 1 回 4 週間又は隔週 1 回 6 ヵ月間反復静脈内投与した結果、一般状態、体重、摂餌量、心電図検査、眼科学的検査及び臨床検査（血液生化学的検査、血液学的検査、凝固系検査及び尿検査）においてベリムマブに関連する変化は認められなかった。無毒性量は最長 6 ヵ月間の反復投与毒性試験より 50 mg/kg と推定された。

リンパ球及びリンパ系組織に対する影響

ベリムマブの毒性試験において一貫して薬理作用に関連する B 細胞の減少がみられた。末梢血において、投与 4 週まで B 細胞数に影響はみられなかったが、投与 13 週（6 ヵ月間投与試験の初回検査日）以降に減少が認められた。末梢血 B 細胞数の減少は生殖発生毒性試験の母動物及び出生児並びに免疫原性試験においても認められた。末梢血 B 細胞数は休薬 13 週より回復し始め、休薬 32 週（6 ヵ月間投与試験）又は 52 週（生殖発生毒性試験）

までに回復した。リンパ組織においても、脾臓及び腸間膜リンパ節の B 細胞減少が投与 4 週よりみられ、8 ヵ月間の休薬後に回復した。生殖発生毒性試験の出生児では生後 7 日及び 28 日に末梢血 B 細胞の減少がみられたが、生後 91 日（13 週）までに回復した。毒性試験において、単球及び NK 細胞にベリムマブの直接的な影響はみられなかった。リンパ組織において T 細胞比の増加がみられた試験もあったが、B 細胞比の減少による相対的な影響であり、ベリムマブの直接的な作用ではないと考えられた。臨床試験では、CD19 陽性 B 細胞及び CD20 陽性 B 細胞の減少が 52 週時に観察された（2.5.4.3.7.4.）。

B 細胞減少に伴う血清免疫グロブリンの減少は概してサルの毒性試験ではみられなかったが、臨床試験ではベリムマブの投与によって血清免疫グロブリンの減少が認められた（2.5.4.3.7.1.）。海外の第 III 相臨床試験（BEL110751 及び BEL110752 試験）では血清 IgG が高値の SLE 患者が多く（44%）、血清免疫グロブリンの減少は、血清 IgG 値が基準値又は低値の患者群に比べ、血清 IgG が高値の患者群で多くみられた（2.7.3.3.2.2.11.1.）。毒性試験に用いたサルの血清免疫グロブリン濃度は正常であり、サルとヒトの結果の違いについては、ベースラインにおける血清免疫グロブリン濃度がその一因として考えられる。

最長 6 ヵ月までの反復投与毒性試験の結果から、ベリムマブの B 細胞減少に関する無影響量は 5 mg/kg 未満、無毒性量は 50 mg/kg と推定された。

感染症との関連が疑われる影響

4 週間投与試験の 50 mg/kg 群で脾膿瘍及びリンパ節の壊死性肉芽腫がそれぞれ 1 例に認められた。これらの所見は感染に関連した変化である可能性が疑われたが、6 ヵ月間投与試験で同様の所見が認められなかったことから、ベリムマブに関連した変化ではないと考えられた。イムノフェノタイピングの結果、ベリムマブを投与したサルにおいて認められた影響は B 細胞数の減少のみであり、文献においても BLyS の阻害は感染防御に関わるメモリーB 細胞にほとんど影響しないことが報告されている[Scholz, 2008]。

国内外の第 II 相及び第 III 相臨床試験における重篤及び重度の感染症の発現割合は、ベリムマブ iv 群とプラセボ iv 群で同程度であった（2.5.5.2.6.2.）。

甲状腺への影響

4 週間投与試験において、投与期間終了時の高用量群の雌雄各 2 例、休薬後の低及び高用量群の雄各 1 例に甲状腺濾胞上皮の変性が認められた。これらの所見はいずれも軽微～軽度であり、発現頻度も低かった。6 ヵ月間投与試験で同様の所見はみられておらず、組織交差反応性試験においてサルの甲状腺に陽性反応は認められなかった（2.6.2.3.2.）。

臨床試験において、甲状腺に関連する有害事象に臨床的に懸念すべきものはなかった（2.5.5.）。

曝露量

6 ヵ月間投与試験及び生殖発生毒性試験の最高用量における曝露量を表 2.4.4-1 に示した。全身曝露量（Cmax 及び AUC）は用量依存的に増加し、性差はみられなかった。また、ベリムマブの消失半減期は長く、反復投与による蓄積性がみられた。6 ヵ月間投与試験ではサン

プリングの都合上 Cmax 及び AUC を算出することができなかったため、単回投与 PK 試験（2.6.4.3.1.1.）からの推定値（2.6.4.3.2.1.、XD2010/00067/00）を使用した。6 ヵ月間投与試験における血清中ベリムマブ濃度（実測値）は推定値より 50%程度高い数値を示した。曝露量比の算出に推定値（実測値より低値）を用いたことから、6 ヵ月間投与試験における真の曝露量比（サル/ヒト）は表 2.4.4-1 に示した値よりも高い。

6 ヵ月間投与試験の無毒性量（50 mg/kg）における曝露量は、ヒトに予定臨床用量（10 mg/kg）を反復静脈内投与したときと比べて、Cmax で 6 倍、投与導入期（投与 28 日までの 2 週間毎の投与）及び維持期（28 日以降の 4 週間毎の投与）の AUC でそれぞれ 3 及び 7 倍以上に相当した。生殖発生毒性試験の無毒性量（150 mg/kg）における曝露量は、ヒトに予定臨床用量（10 mg/kg）を反復静脈内投与したときと比べて、Cmax で 19 倍、投与導入期及び維持期の AUC でそれぞれ 10 及び 21 倍以上に相当した。

表 2.4.4-1　　毒性試験におけるサルとヒトの曝露量の比較

試験の種類	動物種	投与量	Cmax		AUC[1]	
			(μg/mL)	Cmax 比（サル/ヒト） 第 III 相 (i.v.)	(μg.day/mL)	AUC 比（サル/ヒト） 2 週間毎/4 週間毎 [2] 第 III 相 (i.v.)
6 ヵ月間反復投与毒性 [3]	サル	隔週 1 回 50 mg/kg	1604	6	9101	3/7
生殖発生毒性	サル	隔週 1 回 150 mg/kg	5241	19	27441	10/21
第Ⅲ相（i.v.）[4]	ヒト	初回、2 週後、4 週後、以後 4 週間間隔で 1 回, 10 mg/kg	275	-	2660	-

1. 定常状態における AUC(0-τ)。
2. AUC 比は、投与導入期（2 週間間隔）及び維持期（4 週間間隔）についてそれぞれ算出した。
3. 6 ヵ月間投与試験では血清採取を投与直前にのみ行っていたため（トラフ値）、AUC と Cmax を算出することができなかった。したがって、6 ヵ月間投与試験の代わりに単回投与 PK 試験の 50 mg/kg 投与群の値から算出した推定値を表中に示した。
4. 日本人 SLE 患者に本剤 10 mg/kg を反復静脈内投与したとき（BEL113750 試験）の定常状態における推定値（幾何平均値）。

2.4.4.5.　　遺伝毒性

ベリムマブは抗体医薬品であり、DNA 及びほかの染色体成分に直接相互作用しないと考えられるため、標準的な遺伝毒性試験を実施しなかった[薬食審査発 0323 第 1 号通知, 2012]。

2.4.4.6.　　がん原性

「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」[薬食審査発 0323 第 1 号通知, 2012]に基づき、ベリムマブを用いたがん原性試験は実施しなかった。げっ歯類では、ベリムマブ及び相同抗体のハムスター抗マウス BLyS 抗体（10F4）に対して速やかに抗体が産生されるため（2.6.2.2.2.2.）、標準的なげっ歯類を用いたがん原性試験の実施は現実的で

はない。また、臨床試験ではベリムマブを投与して 7 年目の 24 週時において末梢血 B 細胞（CD19 陽性細胞及び CD20 陽性細胞）が 20%程度維持されているが（2.7.3.3.2.4.1.5.）、BLyS 及び BLyS の主な受容体である BR3 の欠損マウス[Kayagaki, 2002; Schiemann, 2001]では B 細胞が著しく減少しているため、これらのマウスを用いてベリムマブのがん原性を評価することは適切ではないと考えられる。なお、サルの 6 ヵ月間投与試験において増殖性変化及び前がん病変は認められなかった。

2.4.4.7. 生殖発生毒性

6 ヵ月間投与試験において、雌雄生殖器にベリムマブに関連した悪影響は認められなかった。また、ヒト及びカニクイザルの組織交差反応性試験（2.6.2.3.2.）において、精巣、卵巣及び卵管に対するベリムマブの結合は認められなかった。免疫グロブリンは精子の成熟部位である精細管及び精巣上体管の管腔にほとんど移行せず[Pöllänen, 1989; Wong, 1983]、血液精巣関門を通過できないために、雄のセルトリ細胞及び精細胞まで到達することができない[Johnson, 1968]と考えられている。以上のことから、ベリムマブが受胎能に悪影響を及ぼす可能性はないと考えられた。

出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、150 mg/kg までのベリムマブを妊娠サルに投与したが、母体毒性、胚・胎児毒性及び催奇形性はみられなかった。薬理作用に関連する B 細胞数の減少が母動物、胎児及び出生児に認められたが、休薬後、回復性が認められた。他の IgG1 抗体と同様に、ベリムマブにおいても胎盤通過性及び乳汁移行性が認められた。ADA は 1/36 例の母動物で検出されたが、出生児では検出されなかった。胎児死亡率は対照群、5 及び 150 mg/kg 群でそれぞれ 14.3、24 及び 15%であり、5 mg/kg 群で高値であったが、用量依存性はみられず、流産／死産した例と帝王切開／正常分娩した例の間で曝露量に差は認められなかった。複数の胎児死亡がサルの自然流産が起こりやすいとされる妊娠 50 日（器官形成期の終了時期）以前[Hendrie, 1996]にみられたが、死産／流産した例でベリムマブに関連した奇形はみられず、病理組織学的検査においても異常は認められなかった。試験全体での胎児死亡率（18.2%）が一般的な背景値（17.8%）[Hendrie, 1996]と同程度であったことを考慮すると、5 mg/kg 群の胎児死亡はベリムマブに関連した変化ではないと考えられる。出生児では生後 2 週間以内に投薬群で 3 例が死亡した。本試験における出生児の総死亡率 11.1%（3/27 例）は、サルの一般的な背景値（10～12%）[Gardin, 1989; Hird, 1975]の範囲内であり、その他に出生児及び胎児でベリムマブによる悪影響が認められなかったことから、これらの出生児死亡はベリムマブに関連した変化ではないと考えられた。したがって、母動物、胎児及び出生児に対する無毒性量はいずれも 150 mg/kg と推定された。

2.4.4.8. 局所刺激性

サルを用いたベリムマブの反復静脈内投与毒性試験（2.6.6.3.）及び生殖発生毒性試験（2.6.6.6.3.）において、150 mg/kg までの投与部位を肉眼又は病理組織学的に評価した結果、ベリムマブに関連した刺激性は認められなかった。皮下投与においても、200 mg/mL（1000 mg/animal/dose、244～294 mg/kg）（2.6.6.7.2.1.）の 3 回隔週投与又は 25 mg/kg の 4 回隔日投与後（2.6.6.7.2.2.）にベリムマブに関連した投与部位の刺激性は認められなかった。

2.4.4.9. その他の毒性試験

2.4.4.9.1. 免疫原性

毒性試験において ADA を測定した結果、ベリムマブの免疫原性発現頻度は低かった。サルにベリムマブの 1 mg/kg を 2 又は 4 回/週の頻度で 13 週間反復投与後、1 例の 1 測定時点で ADA が検出されたが、TK に影響は認められなかった。また、反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験においても、同様に低頻度で ADA が検出され、そのうちの 3 例では血清中ベリムマブ濃度の低値が認められたが、いずれの試験においても ADA に関連する悪影響は認められなかった。

臨床試験において免疫原性が陽性を示した被験者の割合は低く（2.5.5.2.7.）、重篤な注入後全身性反応の発現割合は 1%未満であった（2.5.5.2.6.1.2）。

なお、マウスにおいて、ベリムマブの反復投与によって ADA が検出され、曝露量の低下及びアナフィラキシー様反応によると考えられる死亡がみられた（2.6.2.2.2.2）が、サル及びヒトで同様の変化はみられなかった。

2.4.4.9.2. 同等性及び不純物に関する評価

開発中に 6 つの原薬製造工程（M10、M11、M12、M13、M14 及び M15 工程）が開発され、市販予定製剤の原薬は M15 工程で製造される（2.3.S.2.6.）。静脈内投与製剤の開発過程において、非臨床試験及び臨床試験には 06-A 及び 06-B の 2 種類の処方が使用された。市販予定製剤は 06-B であり、第 III 相試験で用いたものと同等である。M10 工程～M14 工程の各工程で製造した原薬と両処方（06-A 及び 06-B）を非臨床及び臨床試験で用いた。

製造工程開発の過程における主な変更点は工程スケール（[redacted] L から [redacted] L）、[redacted]モード（[redacted]工程から[redacted]工程）、[redacted]（[redacted]から[redacted]）に関するものであり（2.3.S.2.6.）、異なる工程で製造されたロット同士の比較によってそれぞれの工程間で製造された原薬の同等性が示された（2.3.S.2.6.3.）。また、M12 工程から M13 工程へ移行する際に、非臨床 PK 試験で同等性を確認した（2.6.4.3.1.1.）。

ベリムマブの変異体及び製造工程由来不純物ついては 2.3.S.3.2.に記載した。ベリムマブの製剤中に新規の不純物は認められなかった（2.3.P.5.5.）。原薬及び製剤の規格についてはそれぞれ 2.3.S.4.1.及び 2.3.P.5.1.に記載した。

ベリムマブの代表的な目的物質関連物質及び目的物質由来不純物として、ベリムマブの[redacted]及び[redacted]が認められており（2.3.S.3.2.2.）、これらは原薬に設定された規格により管理される。

製造工程由来不純物として、宿主細胞由来 DNA、宿主細胞由来たん白質（HCP）、[redacted] が認められた（2.3.S.3.2.1）。宿主細胞由来 DNA 及び[redacted] は工程開発時及び臨床開発時に原薬の出荷時規格に規定されていたが、これらの不純物については下流のプロセスによって非常に低い量でコントロールされていたことから、原薬の規格に設定しなかった（2.3.S.3.2.1.）。HCP についても工程開発時及び臨床開発時に原薬の出荷時規格（[redacted] ng/mg 以下）に規定され、実生産工程（M15 工程）で [redacted]～[redacted] ng/mg、M13 及び M14

工程で[redacted] ng/mg 以下にコントロールされていた（2.3.S.3.2.1.）。HCP については臨床試験に使用したロットの実測値（[redacted] ng/mg 以下）に基づいて規格を設定した（2.3.S.4.5.1.13.）。

ベリムマブの点滴静注用製剤は無菌製剤であり、原薬中のエンドトキシンレベルは[redacted] EU/mg 以下に管理されている（2.3.S.3.2.1.4.1.）。

以上のことから、ベリムマブ開発中の製造工程の変更は原薬及び製剤の品質に影響を与えておらず、非臨床試験、臨床試験及び市販予定の原薬及び製剤間での同等性は担保されている。したがって、非臨床及び臨床試験を通してその安全性は確認されており、市販予定製剤において安全性の観点からの懸念はないと判断した。

2.4.5. 総括及び結論

ベリムマブは BLyS に対する特異的な完全ヒト型 IgG1 モノクローナル抗体であり、in vitro において可溶型 BLyS に結合することにより BLyS 誘発 B 細胞増殖を抑制することが示された。また、in vivo においてマウスにヒト BLyS を投与したときに誘発される活性を中和し、カニクイザルへの投与により持続的な B 細胞数減少作用を示すことが確認された。これらのことから、ベリムマブは病態や疾患活動性への BLyS の関与が示唆されている SLE 患者に対して、BLyS の活性を阻害することにより治療効果を発揮することが期待される。

サルにベリムマブを単回静脈内又は皮下投与したときの曝露量に明らかな性差はなく、t1/2 はそれぞれ約 6～14 日及び約 8～11 日であり、CL はいずれも肝血流量よりも低く、Vdss は総体液量よりも小さかったことから、ベリムマブは主に血中に存在すると考えられた。サルにベリムマブの 5～50 mg/kg を反復静脈内投与したときの薬物動態は用量増加に比例して増加することが示された。また、反復静脈内及び皮下投与したときでは、それぞれ投与 71 日及び投与 8 週で定常状態に達すると考えられた。

サルにベリムマブを静脈内又は皮下投与したときの ADA の産生頻度は低く、投与経路、用量、投与期間及び性別に依存するものではなかった。

ベリムマブは胎盤を通過すること、及び乳汁に移行することが示された。

カニクイザルを用いてベリムマブの反復投与毒性、生殖発生毒性、局所刺激性及び免疫原性を評価した。反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験において、それぞれ最高 50 及び 150 mg/kg のベリムマブを反復静脈内投与した結果、忍容性は良好であり、一般状態、体重、摂餌量、心電図検査及び眼科学的検査に悪影響は認められなかった。ベリムマブの投与によって、脾臓及び腸間膜リンパ節並びに末梢血における B 細胞減少がみられたが、休薬による回復性が認められた。ベリムマブはサルに対して弱い免疫原性を示したが、抗ベリムマブ抗体に関連した悪影響は認められなかった。反復静脈内投与毒性試験及び皮下投与局所刺激性試験において、ベリムマブに関連した投与部位の刺激性は認められなかった。生殖発生毒性試験では、ベリムマブの胎盤通過性及び乳汁分泌がみられたが、母動物及び出生前・後発生に悪影響は認められなかった。

以上より、本剤の臨床使用において予期しない重篤な副作用が発現する可能性は低いと考えられる。

2.4.6. 参考文献

Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res. 1993;10:1093-5.

Gardin JF, Jerome CP, Jayo MJ, et al. Maternal factors affecting reproduction in a breeding colony of cynomolgus macaques (Macaca fascicularis). Lab Anim Sci. 1989;39:205-12.

GlaxoSmithKline Document Number 2014N216963_00 Study ID BEL112341 (HGS1006-C1115). A Phase 3, Multi-Center, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled, 52-Week Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Belimumab (HGS1006) Administered Subcutaneously (SC) to Subjects with Systemic Lupus Erythematosus (SLE)-Double-Blind Endpoint Analysis. Report Date 8-Mar-2016.

Hendrie TA, Peterson PE, Short JJ, et al. Frequency of prenatal loss in a macaque breeding colony. Am J Primatol. 1996;40:41-53.

Hird DW, Henrickson RV, Hendrickx AG. Infant mortality in *Macaca mulatta*: Neonatal and post-neonatal mortality at the California Primate Research Center, 1968-1972. A retrospective study. J Med Primatol. 1975;4:8-22.

Johnson MH, Setchell BP. Protein and immunoglobulin content of rete testis fluid of rams. J Reprod Fertil. 1968;17:403-6.

Kayagaki N, Yan M, Seshasayee D, et al. BAFF/BLyS Receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kB2. Immunity. 2002;10:515-24.

Li P, Jiang N, Nagarajan S, et al. Affinity and kinetic analysis of Fcγ receptor IIIa (CD16a) binding to IgG ligands. J Biol Chem. 2007;282:6210-21.

Moore PA, Belvedere O, Orr A, et al. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. Science. 1999;285:260-3.

Pöllänen PP, Setchell BP. Microvascular permeability to IgG in the rat testis at puberty. Int J Androl. 1989;12:206-18.

Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. Science. 2001;293:2111-4.

Scholz JL, Crowley JE, Tomayko MM, et al. BLyS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:15517-22.

Suzuki T, Ishii-Watabe A, Tada M, et al. Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. J Immunol. 2010;184:1968-

76.

Wong PY, Tsang AY, Fu WO, et al. Restricted entry of an anti-rat epididymal protein IgG into the rat epididymis. Int J Androl. 1983;6:275-82.

薬食審査発 0323 第 1 号通知.「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」について. 平成 24 年 3 月 23 日付. 2012.