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）

2.6. 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6.　毒性試験の概要文
2.6.7.　毒性試験概要表

グラクソ・スミスクライン株式会社

Aug 15 2017 12:01:12

非臨床概要 毒性試験の目次

項目 - 頁

2.6.6. 毒性試験の概要文 ..... 2.6.6 - p.1
2.6.6.1. まとめ ..... 2.6.6 - p.1
2.6.6.2. 単回投与毒性試験 ..... 2.6.6 - p.2
2.6.6.3. 反復投与毒性試験 ..... 2.6.6 - p.3
2.6.6.4. 遺伝毒性試験 ..... 2.6.6 - p.6
2.6.6.5. がん原性試験 ..... 2.6.6 - p.6
2.6.6.6. 生殖発生毒性試験 ..... 2.6.6 - p.7
2.6.6.7. 局所刺激性試験 ..... 2.6.6 - p.10
2.6.6.8. その他の毒性試験 ..... 2.6.6 - p.11
2.6.6.9. 考察及び結論 ..... 2.6.6 - p.14
2.6.6.10. 図表 ..... 2.6.6 - p.18
2.6.6.11. 参考文献 ..... 2.6.6 - p.18
2.6.7. 毒性試験概要表 ..... 2.6.7 - p.1
2.6.7.1. 毒性試験：一覧表 ..... 2.6.7 - p.1
2.6.7.2. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧 ..... 2.6.7 - p.3
2.6.7.3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 ..... 2.6.7 - p.4
2.6.7.4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 ..... 2.6.7 - p.5
2.6.7.5. 単回投与毒性試験 ..... 2.6.7 - p.8
2.6.7.6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 ..... 2.6.7 - p.8
2.6.7.7. 反復投与毒性試験：重要な試験 ..... 2.6.7 - p.9
2.6.7.8. In Vitro 遺伝毒性試験 ..... 2.6.7 - p.30
2.6.7.9. In Vivo 遺伝毒性試験 ..... 2.6.7 - p.30
2.6.7.10. がん原性試験 ..... 2.6.7 - p.30
2.6.7.11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 ..... 2.6.7 - p.30
2.6.7.12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 ..... 2.6.7 - p.30
2.6.7.13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 ..... 2.6.7 - p.30
2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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 ..... 2.6.7 - p.31
2.6.7.15. 新生児を用いた試験 ..... 2.6.7 - p.46
2.6.7.16. 局所刺激性試験 ..... 2.6.7 - p.47

2.6.7.17. その他の試験 ..... 2.6.7 - p.50

2.6.6 及び 2.6.7 の略号等一覧

略語（略称）	内容
ADA	抗ベリムマブ抗体
AUC	血清中濃度－時間曲線下面積
BD	Birth Day（生後日数）
BLyS	B リンパ球刺激因子
BR3	BLyS receptor 3
CAL	in vitro において細胞齢の上限にまで培養された細胞
CD	Cluster of Differentiation（分化抗原群）
Cmax	最高血清中濃度
GALT	消化管関連リンパ節
GD	Gestation Day（妊娠日数）
GLP	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
Ig	免疫グロブリン
NK	ナチュラルキラー
NOAEL	無毒性量
NZW ウサギ	New Zealand White ウサギ
PK	薬物動態
PPD	Postpartum day（分娩後日数）
SLE	全身性エリテマトーデス
TK	トキシコキネティクス

2.6.6. 毒性試験の概要文

2.6.6.1. まとめ

ベリムマブ（遺伝子組換え）（以下、ベリムマブ）の毒性を評価するため、4 週間投与試験、6 ヵ月間投与試験、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。ベリムマブの認識するエピトープが保存され、ヒトと薬理作用及び組織交差反応性のプロファイルが類似していること（2.6.2.）から、主要な in vivo 毒性試験は、すべてカニクイザルを用いて GLP に準拠して実施した。

毒性試験に用いた原薬及び製剤は、臨床試験製剤及び市販予定製剤と同等であり、本項におけるすべての用量及び濃度は精製抗体の名目濃度として表した。

毒性試験の一覧を表 2.6.6-1 に示し、観察された主な所見を以下に示す。

表 2.6.6-1 毒性試験一覧

試験項目/期間	投与経路	動物種	GLP
反復投与毒性試験			
4 週間	静脈内	カニクイザル	適
6 ヵ月間	静脈内	カニクイザル	適
耐量/試験 1、4 及び 15 日に投与	静脈内	カニクイザル	非適
生殖発生毒性試験			
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	静脈内	カニクイザル	適
局所刺激性試験			
反復/試験 1、15、29 日に投与	皮下	カニクイザル	適
単回及び隔日 7 日間	皮下	カニクイザル	適
その他の毒性試験			
免疫原性試験/2 又は 4 回/週の頻度で 13 週間投与後、9 週間休薬	皮下	カニクイザル	適
組織交差反応性	－	カニクイザル／ヒト	適

急性毒性試験

サルに最高 150 mg/kg のベリムマブを静脈内投与した結果、急性毒性の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。

反復投与毒性試験

サルに最高 50 mg/kg のベリムマブを週 1 回 4 週間及び隔週 1 回 6 ヵ月間、反復静脈内投与した結果、忍容性は良好であった。

全投薬群でフローサイトメトリー検査を行った結果、4 週間、3 及び 6 ヵ月間投与後に脾臓及び腸間膜リンパ節で総 B 細胞比の低値、3 及び 6 ヵ月間投与後に末梢血中で総 B 細胞及び成熟 B 細胞数の低値が認められた。これら末梢血及び組織中 B 細胞の減少は 8 ヵ月間の休薬後に回復した。総リンパ球数、T 細胞数及び単球数に一貫性のある変化は認められなかった。病理組織学的検査において、4 週間及び 6 ヵ月間投与試験で脾臓又はリンパ節に軽微～中等度の B 細胞領域の細胞減少がみられ、更に 4 週間投与試験では消化管関連リンパ組織（GALT）にも同様の変化が認められた。血清免疫グロブリン濃度への影響は軽微であった。

認められた変化のほとんどはベリムマブの薬理作用に関連したものであり、一般状態、体重測定、摂餌量、心電図検査、眼科学的検査、臨床検査（血液生化学、血液学、凝固系及び尿検査）に悪影響は認められなかった。増殖性変化及び前がん病変も 6 ヵ月間投与試験で認められなかった。

4 週間投与試験の高用量群で感染との関連が疑われる所見（脾膿瘍及び顎下リンパ節の壊死性肉芽腫が各 1 例）、低及び高用量群で甲状腺濾胞上皮の変性がみられたが、同様の所見は 6 ヵ月間投与試験では認められなかった。

5 mg/kg で B 細胞減少がみられたことから、ベリムマブの無影響量は 5 mg/kg 未満、無毒性量は 6 ヵ月間投与試験で 50 mg/kg と推定された。

生殖発生毒性試験

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。

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、サルに最高 150 mg/kg のベリムマブを妊娠確認日から妊娠 150 日又は分娩まで隔週 1 回静脈内投与した結果、投与期間中に母動物の末梢血 B 細胞の減少がみられたが、休薬により回復性が認められた。胎児ではリンパ系組織における B 細胞の減少、出生児では末梢血 B 細胞数及び血清 IgM の低値が認められたが、いずれの変化も生後 1 年以内に回復した。また、ベリムマブの胎盤通過性及び乳汁移行性が確認された。薬理作用に関連する変化以外に明らかな悪影響及び催奇形性は認められなかったことから、母動物、胎児及び出生児における無毒性量はいずれも 150 mg/kg と推定された。

局所刺激性試験

サルを用いたベリムマブの反復静脈内投与毒性試験及び生殖発生毒性試験において、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）の 3 回隔週投与又は 25 mg/kg の 4 回隔日投与後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。

免疫原性試験

サルを用いた一連の反復投与毒性試験及び免疫原性試験の結果、抗薬物抗体（抗ベリムマブ抗体、ADA）の産生及び TK プロファイルへの影響がみられることは稀であり、ADA に関連する毒性所見は認められなかった。

2.6.6.2. 単回投与毒性試験

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。想定外の薬理作用及び明らかな毒性所見が認められていないことから、より高用量を投与しても、新規の重要な情報を得ることは難しいと考えられた。概略の致死量は150 mg/kg 超であった。

2.6.6.3. 反復投与毒性試験

カニクイザルに最高 50 mg/kg のベリムマブを週 1 回 4 週間又は隔週 6 ヵ月間反復静脈内投与した。SLE 患者ではベリムマブを 1 時間かけて持続静脈内投与するが、反復投与毒性試験では 30 秒以上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。

反復投与毒性試験に先だって実施されたヒト組織交差反応性試験（2.6.2.3.2.）では、ベリムマブはいずれの組織にも結合しなかった。薬理作用を考慮し、反復投与毒性試験では末梢血、脾臓及びリンパ節中の B 細胞数並びに ADA 測定を実施した。

2.6.6.3.1. カニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験

各群雌雄各 5 匹のカニクイザルに媒体及びベリムマブの 5、15 及び 50 mg/kg を週 1 回 4 週間、30 秒以上かけて緩徐に反復静脈内投与した（XD2010/00068/00）。投与期間終了時（試験 29 日）に各群雌雄各 3 匹、28 日間の休薬期間終了時（試験 57 日）に各群雌雄各 2 匹を剖検した。一般状態観察、体重測定、心電図検査、眼科学的検査、尿検査、血液生化学的検査、血液学的検査、凝固系検査、血清免疫グロブリン測定（IgM、IgG 及び IgA）、TK 測定及び ADA 測定を実施した。また、末梢血単核球を用いて、総リンパ球（CD2 陽性細胞と CD20 陽性細胞の合計）、総 B 細胞（CD20 陽性細胞）、成熟 B 細胞（CD20 陽性 CD21 陽性細胞）、総 T 細胞（CD3 陽性細胞）、ヘルパーT 細胞（CD3 陽性 CD4 陽性細胞）、細胞傷害性 T 細胞（CD3 陽性 CD8 陽性細胞）及び単球（CD14 陽性細胞）をフローサイトメーターで測定した。全例について剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施し、脾臓及び腸間膜リンパ節についてはフローサイトメトリー検査を実施した。

試験成績の概略を 2.6.7.7.1.に示した。曝露量（AUC(0-28d)及び Cmax）は用量増加に比例して増加し、明らかな性差は認められなかった。ADA が 15 mg/kg 群の 1 例及び 50 mg/kg 群の 2 例（1/2 例は境界域）で検出された。測定に干渉するベリムマブ濃度が不明であることから、本測定結果に偽陰性が含まれる可能性を否定できないが、いずれの動物においても TK に影響が認められなかった。

一般状態観察、体重測定、心電図検査、眼科学的検査、尿検査、血液生化学的検査、血液学的検査及び凝固系検査においてベリムマブに関連した悪影響は認められなかった。心電図検査では、不完全右脚ブロック、低電位 QRS 群、T 波増高がみられたが、これらの変化は対照群を含む動物で投与前から認められていることから、投与との関連性はないと考えられた。

血清免疫グロブリン測定において、IgA の低値が休薬後の 50 mg/kg 群でみられたが、IgM 及び IgG に一貫性のある変化は認められなかった。

フローサイトメトリー検査において、末梢血ではベリムマブによる影響は認められなかった。脾臓及び腸間膜リンパ節では、全投薬群において投与期間終了時及び休薬後に総 B 細胞又は成熟 B 細胞比の低値又は低値傾向が認められた。投与期間終了時における 5 mg/kg 群の脾臓総 B 細胞比、休薬後における全投薬群の脾臓及び腸間膜リンパ節総 B 細胞及び成熟 B 細胞比の低値は統計学的に有意であり、これら B 細胞の低値はベリムマブの薬理作用に関連する変化と考えられた。また、その他の細胞については、投与期間終了時に脾臓の総 T 細胞比（5 及び 15 mg/kg 群）及びヘルパーT 細胞比（5 mg/kg 群）、腸間膜リンパ節の総 T 細胞比（全投薬群）及びヘルパーT 細胞比（全投薬群）に高値が認められた。休薬後においては、脾臓の総 T 細胞比（50 mg/kg 群）及び細胞傷害性 T 細胞比（50 mg/kg 群）並びに腸間膜リンパ節の総 T 細胞比（15 及び 50 mg/kg 群）及びヘルパーT 細胞比（15 mg/kg 群）に高値が認められた。これら T 細胞比の高値は B 細胞比の低値による二次的な変化であると考えられた。なお、単球比に変化は認められなかった。

剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査において、投与期間終了時に 50 mg/kg 群の 1 例で脾臓重量の高値及び脾膿瘍がみられ、休薬後に 50 mg/kg 群の 1 例で顎下リンパ節の壊死性肉芽腫が認められた。投与期間終了時、対照群と比べて 50 mg/kg 群では様々な臓器で軽微な炎症及び細胞浸潤がやや高頻度に認められたことから、これらの変化はベリムマブの免疫抑制作用に関連した感染症によるものと考えられた。しかしながら、これらの変化は広範囲な線維化を伴っており、試験開始前から存在した可能性が考えられ、更に、IgG 量にも変化は認められなかった。以上のことから、これらの所見はベリムマブによる影響ではない可能性も考えられた。また、甲状腺では、軽微～軽度の濾胞上皮変性が投与期間終了時に 50 mg/kg 群の雌雄各 2 例、休薬後に 5 及び 50 mg/kg 群の雄各 1 例で認められた。本所見については、発現頻度が低く、軽度の変化であったが、ベリムマブとの因果関係を否定できない。しかしながら、より長期にわたってベリムマブを投与した 6 ヵ月間投与試験（2.6.6.3.2.）、並びにより高用量を投与した生殖発生毒性試験（2.6.6.6.3.）で同様の変化は認められなかった。更に、組織交差反応性試験（2.6.2.3.2.）においてサルの甲状腺で陽性反応は認められなかった。ベリムマブの薬理作用に関連する変化として、投与期間終了時、腸間膜リンパ節では 5、15 及び 50 mg/kg 群の雄のそれぞれ 1/3、2/3 及び 2/3 例、50 mg/kg 群の雌の 3/3 例に軽微～軽度のリンパ球減少（B 細胞領域）がみられ、回腸の GALT では全投薬群の雄の各 1/3 例、15 及び 50 mg/kg 群の雌の各 2/3 例で軽微～中等度のリンパ球減少が認められた。休薬後、5 及び 50 mg/kg 群の腸間膜リンパ節又は GALT で軽微～軽度のリンパ球減少が認められる例も存在したが、その程度及び頻度には回復傾向が認められた。休薬後に一部の動物でリンパ球減少が認められた原因として、ベリムマブの曝露が休薬期間中も継続していたことが考えられる。

以上、ベリムマブの投与によって観察された変化は、主に薬理作用によるリンパ組織の B 細胞減少に関連した変化であり、回復性が認められた。無影響量は 5 mg/kg 未満、無毒性量は 50 mg/kg 群で認められた脾膿瘍がベリムマブに関連する所見である可能性を考慮し、15 mg/kg と推定された。

2.6.6.3.2. カニクイザルの 6 ヵ月間反復投与毒性試験

各群雌雄各 8 匹のカニクイザルにベリムマブの 5、15 及び 50 mg/kg を隔週 1 回 6 ヵ月間反復静脈内投与した（XD2010/00069/00）。投薬群においては、投与 3 ヵ月後（試験 13 週、7 回投与後）及び 6 ヵ月後（試験 26 週、13 回投与後）にそれぞれ雌雄各 3 匹、8 ヵ月間の休薬後（試験 60 週）に雌雄各 2 匹を剖検した。対照群においては、投与 3 ヵ月後、6 ヵ月後及び休薬後にそれぞれ雌雄各 2 匹を剖検した。一般状態観察、体重測定、心電図検査、眼科学的検査、尿検査、血液生化学的検査、血液学的検査、凝固系検査、血清免疫グロブリン測定（IgM、IgG、IgA 及び IgE）、TK 測定及び ADA 測定を実施した。また、末梢血単核球を用いて、総リンパ球、総 B 細胞、成熟 B 細胞、総 T 細胞、ヘルパーT 細胞、細胞傷害性 T 細胞及び単球をフローサイトメーターで測定した。全例について剖検、器官重量測定、病理組織学的検査を実施し、脾臓及び腸間膜リンパ節についてはフローサイトメトリー検査を実施した。

試験成績の概略を 2.6.7.7.2.に示した。ベリムマブの曝露量は用量増加に比例して増加した。試験 13 週の 5 mg/kg 群及び試験 26 週の 50 mg/kg 群のそれぞれ 1 例に ADA が検出され、これら 2 例では血清中ベリムマブ濃度が低値であった。血清中の ADA は休薬期間中の試験 52 週までに 2 例とも検出限界未満まで減少した。

一般状態観察、体重測定、心電図検査、眼科学的検査、尿検査、血液生化学的検査、血液学的検査及び凝固系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。心電図検査において心室性期外収縮が 50 mg/kg の雄 1 例で試験 90 日にみられたが、非連続性であり、投与日以外の測定時点においても認められたことから、本所見はストレスに関連したもので、ベリムマブの投与に関連した変化ではないと考えられた。なお、対照群の雌 2 例においてもそれぞれ正常範囲内と考えられる心室性期外収縮が試験 90 日及び 181 日に認められた。

血清免疫グロブリン測定において、ベリムマブの投与による影響はほとんどみられなかった。

フローサイトメトリー検査において、末梢血中では試験 13 週に 15 及び 50 mg/kg 群、試験 26 週に全投薬群で総 B 細胞数及び成熟 B 細胞数の低値が認められた。試験 26 週における B 細胞数低値の程度は全投薬群で同程度であった。休薬期間中の試験 39 週においても全投薬群で B 細胞数は低値傾向にあったが、試験 45～60 週にかけて回復傾向が認められた。末梢血中の T 細胞数及び単球数にベリムマブによる影響は認められなかった。組織中では試験 13 及び 26 週に全投薬群で脾臓及び腸間膜リンパ節における総 B 細胞比の低値が認められた。成熟 B 細胞比は全投薬群の脾臓で試験 13 及び 26 週、腸間膜リンパ節で試験 26 週に低値であった。脾臓及び腸間膜リンパ節におけるこれら B 細胞比の低値は休薬期間中に回復した。試験 26 週において、全投薬群の脾臓総 T 細胞比並びに 5 及び 50 mg/kg 群の脾臓ヘルパーT 細胞比の高値が認められたが、これら T 細胞比の高値は B 細胞比の低値による二次的な変化であると考えられた。

ベリムマブに関連した剖検所見はいずれの時点においても認められなかった。器官重量測定では、試験 26 週に全投薬群で薬理作用に関連する脾臓重量の低値傾向がみられたが、休薬による回復傾向が認められた。病理組織学的検査では、試験 13 及び 26 週の全投薬群の脾臓、並びに試験 26 週の 15 及び 50 mg/kg 群の腸間膜リンパ節でリンパ濾胞の小型化又は減

少が認められたが、本所見は脾臓の重量低値及び B 細胞比の低値と一致し、休薬後に回復した。

以上、ベリムマブの投与によって末梢血及びリンパ組織中 B 細胞の減少並びに脾臓重量の低値がみられたが、いずれも薬理作用に関連する変化であり、回復性が認められた。ベリムマブに関連したその他の変化は認められなかったことから、本試験における無影響量は 5 mg/kg 未満、無毒性量は 50 mg/kg と推定された。

2.6.6.3.3. 非妊娠雌カニクイザルの忍容性確認試験

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では、予定臨床用量（10 mg/kg）に対して 10 倍の曝露（Cmax：3700 µg/mL）を確保するため、150 mg/kg の隔週 22 週間反復静脈内投与を計画していた。本試験では、それと同程度の曝露条件下における忍容性を評価するため、試験 1 日に 121 mg/kg、試験 4 日に 97 mg/kg、試験 15 日に 125 mg/kg のベリムマブを 3 例の雌カニクイザルに静脈内投与し、試験 18 日に剖検した（XD2010/00070/00）。一般状態観察、体重測定、尿検査、血液生化学的検査、血液学的検査及び凝固系検査を実施した。また、末梢血単核球を用いて、総 B 細胞、成熟 B 細胞、総 T 細胞、ヘルパーT 細胞及び細胞傷害性 T 細胞をフローサイトメーターで測定した。ADA の測定は実施しなかった。

試験成績の概略を 2.6.7.6.に示した。TK 測定では 3 度目の投与時に Cmax がおおよそ 3700 µg/mL に達した。

一般状態観察、体重測定、尿検査、血液生化学的検査、血液学的検査、凝固系検査及び末梢血フローサイトメトリー検査においてベリムマブに関連した悪影響はみられなかった。また、ベリムマブに関連した剖検所見及び病理組織学的変化は認められなかった。

2.6.6.4. 遺伝毒性試験

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]。

2.6.6.5. がん原性試験

「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。

2.6.6.6. 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1. 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。

6 ヵ月間投与試験（2.6.6.3.2.）において、ベリムマブの 0、5、15 及び 50 mg/kg 群のそれぞれ 3/6、5/8、5/8 及び 3/8 例の雄に精子形成の開始に伴った精巣及び精巣上体重量の高値が認められたが、生殖器（精巣、精巣上体、精嚢及び前立腺）にベリムマブに関連した病理組織学的所見は認められなかった。雌では、排卵に伴う周期的な膣分泌物が 0、5、15 及び 50 mg/kg 群のそれぞれ 3/6、7/8、5/8 及び 6/8 例に認められた。休薬後、15 mg/kg 群の 1 例のみで卵管嚢胞及び卵細胞の低形成が認められたが、本動物の卵胞成熟が正常であったことから、ベリムマブに関連した悪影響ではないと考えられた。

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、受胎能に関してより詳細な検討を実施する必要はないと判断した。

2.6.6.6.2. 胚・胎児発生に関する試験

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（2.6.6.6.3.）の一部として実施した結果、胚・胎児発生に悪影響はみられなかった。

2.6.6.6.3. 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

ベリムマブの 0（媒体）、5 及び 150 mg/kg をカニクイザルに妊娠確認日（妊娠 20～22 日）から帝王切開（妊娠 150 日）又は分娩まで隔週 1 回静脈内投与し、出生後 1 年間の影響を評価した（XD2010/00071/00）。0、5 及び 150 mg/kg 群の母動物を 2 つのサブグループに分け、それぞれ 11、13 及び 9 匹を妊娠 150 日に帝王切開して母体及び胎児を観察する群、それぞれ 10、12、11 匹を自然分娩させて出生児を観察する群とした（表 2.6.6-2）。母動物については、一般状態観察、摂餌量及び体重測定、血液学的検査、末梢血フローサイトメトリー検査（総 B 細胞、成熟 B 細胞、総 T 細胞、ヘルパーT 細胞、細胞傷害性 T 細胞、NK 細胞（CD3 陰性 CD16 陽性細胞）及び単球）、並びに血清免疫グロブリン、血清 BLyS 及び TK 測定を実施した。なお、胚・胎児の心拍数、発育状況を確認するために妊娠 18～20 日及びその後 2～3 日以内（妊娠確認）、並びに妊娠 50、90、115 及び 140±3 日に超音波検査を実施した。胎児については、妊娠 150 日の帝王切開時又はそれ以前の出生時に剖検し、外表・内臓・骨格検査及びリンパ系組織の免疫組織化学的検査（T 細胞（CD2 陽性細胞）、B 細胞（CD20 陽性細胞）、マクロファージ（CD68 陽性細胞）及び NK 細胞（CD16 陽性細胞））を実施した。更に、羊水及び臍帯血中のベリムマブ及び ADA の測定を実施した。出生児については、一般状態観察、摂餌量及び体重測定、神経行動学的評価、血液学的検査、血液生化学的検査、凝固系検査、尿検査、フローサイトメトリー検査、並びに血清免疫グロ

ブリン、血清 BLyS、TK 及び ADA 測定を実施した。母乳中のベリムマブ、免疫グロブリン及び ADA の測定も実施した。出生児は生後 366 日～368 日に剖検し、病理組織学的検査及び免疫組織化学的検査を実施した。母動物は帝王切開後又は出生児剖検後にストックコロニーに戻した。

表 2.6.6-2　動物数及び剖検日程
（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）

母動物数 [1]	投与量 (mg/kg)	例数（胎児又は出生児）			剖検日程（胎児又は出生児）
		帝王切開 [2]	分娩	胎児死亡	
11	0 (媒体)	9	-	2	帝王切開後
10	0 (媒体)	-	9	1	生後 1 年
13	5	9	-	4	帝王切開後
12	5	-	10	2	生後 1 年
9	150	9[3]	-	0	帝王切開後
11	150	-	8	3	生後 1 年

-：該当なし
1：帝王切開/分娩前に流産/死産した母動物を含む（0、5 及び 150 mg/kg 群でそれぞれ 3、6 及び 3 例）
2：帝王切開により得た胎児数又は帝王切開前に出生した出生児数（生存例）
3：母動物 1 例（動物番号：1392）を帝王切開の 15 日後に安楽死させた。

表 2.6.6-3　胎児及び出生児死亡数
（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）

母動物数 [1]	投与量 (mg/kg)	帝王切開数 [2]（妊娠 150 日）	分娩数	胎児死亡		出生児死亡
				流産	死産	
11	0 (溶媒)	9	-	妊娠 49 日 妊娠 97 日	-	-
10	0 (溶媒)	-	9	妊娠 133 日	-	-
13	5	9	-	妊娠 50 日 妊娠 50 日 妊娠 52 日 妊娠 87 日	-	-
12	5	-	10	妊娠 38 日 妊娠 50 日	-	生後 7 日 生後 11 日
9	150	9	-	-	-	-
11	150	-	8	妊娠 125 日	妊娠 151 日 妊娠 161 日	妊娠 142 日 /出生 1 日

-：該当なし
1：帝王切開又は分娩前に流産又は死産した母動物を含む（0、5 及び 150 mg/kg 群でそれぞれ 3、6 及び 3 例）
2：帝王切開により得た胎児数又は帝王切開前に出生した出生児数
妊娠期間 140 日を境界に出生児死亡率が低下することが知られているため、妊娠期間が 140 日までの胎児死亡を流産、141 日以上の胎児死亡を死産とした[Hendrie, 1996]。

試験成績の概略を 2.6.7.14.に示した。ベリムマブの母動物への曝露量（AUC(0-14d)及び Cmax）は用量増加に比例して増加し、血清中ベリムマブ濃度は投与 15 週までに定常状態に達した。投与間隔（14 日）及び t1/2（8～14 日）から予測された通り、投与 17 週よりベリムマブの蓄積が確認された。流産／死産した母動物と帝王切開/正常分娩した母動物の間でベリムマブの曝露量に明確な差は認められなかった。臍帯血中及び羊水中のベリムマブ濃度はそれぞれ母動物の血液中の 1/4 及び 1/32～1/36 程度であった。乳汁中においても

150 mg/kg 群でベリムマブが検出された（150 mg/kg 群の 2 例のみ）。5 及び 150 mg/kg 群の母動物及び出生児の血清中ベリムマブ濃度は、分娩後又は生後 182 日までには、ほとんどの動物で検出下限未満であった。定量された出生児の血清中ベリムマブ濃度をその母動物と比較すると、5 mg/kg 群においては生後 7 日に母動物と同程度、生後 28 及び 91 日にそれぞれ母動物の 1/2 及び 1/13、150 mg/kg 群においては生後 7、28、91 及び 182 日にそれぞれ母動物の 1/10、1/9、1/1.4、1/1.6 程度であった。最終投与後の母動物における t1/2 は 11～12 日であり、非妊娠雌サルを用いた他の試験と同程度であった。1/36 例の母動物（150 mg/kg 群の 1 例）に ADA が検出され、血清中ベリムマブ濃度の低値がみられたが、中和活性を確認することはできなかった。その他の母動物では血清中ベリムマブ濃度が測定系に干渉する濃度を超えていたため、ADA 測定を実施しなかった。出生児に ADA は検出されなかった。ほとんどの母動物で TK プロファイルに変化がみられなかったことから、ベリムマブのサルにおける免疫原性は低いと考えられた。

妊娠期間中の母動物の一般状態観察、摂餌量及び体重測定、血液学的検査並びに血清免疫グロブリン濃度測定（IgG、IgM、IgA 及び IgE）において、ベリムマブに関連した変化はみられず、妊娠期間にも影響は認められなかった。フローサイトメトリー検査では、投与前値と比べて妊娠 90 及び 140 日に対照群を含む全例で妊娠に伴う総 B 細胞、成熟 B 細胞及び T 細胞サブセットの減少が認められた。投与前値と比較した場合、投薬群における B 細胞減少の程度は対照群よりもやや大きく、これらはベリムマブに関連したと考えられた。

分娩後の母動物の一般状態観察、摂餌量及び体重測定、血液学的検査並びに血清免疫グロブリン濃度測定（IgG、IgM、IgA 及び IgE）において、ベリムマブに関連した変化はみられず、哺育行動にも異常は認められなかった。フローサイトメトリー検査では、投薬群においてベリムマブに関連した末梢血総 B 細胞数の減少傾向及び単球数の増加傾向（いずれも統計学的有意差なし）が認められたが、それぞれ分娩後 365 及び 28 日までに投与前値と同程度に回復した。妊娠期間中にみられた成熟 B 細胞数の減少は分娩後には認められなかった。150 mg/kg 群の母動物 1 例（動物番号：1392）に後肢の筋萎縮がみられたため、帝王切開の 15 日後に安楽死させた。本所見は偶発的な変化であり、ベリムマブに関連した変化ではないと考えられた。

胎児では、超音波検査、体重測定、胎盤、羊水及び臍帯検査、外表・内臓・骨格検査並びに病理組織学的検査においてベリムマブに関連した影響は認められなかった。胎児死亡率においてもベリムマブによる悪影響は認められず、その値は全体で 18.2%（12/66 例）、ベリムマブの 0、5 及び 150 mg/kg 群でそれぞれ 14.3（3/21 例）、24.0（6/25 例）及び 15.0%（3/20 例）であり、カニクイザルの背景値（17.8%）[Hendrie, 1996]と同程度であった。死産／流産児に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。更に、死産／流産した母動物の一般状態観察、体重測定及び血液学的検査において、ベリムマブに関連した悪影響は認められなかった。胎児では、投薬群で脾臓の重量低値（統計学的有意差なし）、免疫組織化学的検査において、鼠径及び腸間膜リンパ節並びに脾臓の B 細胞密度の低下が認められたが、これらは胎盤を通過したベリムマブの薬理作用による変化と考えられた。T 細胞、マクロファージ及び NK 細胞の密度に変化は認められなかった。

出生児では、一般状態観察、摂餌量及び体重測定、身体検査、神経行動学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、凝固系検査及び尿検査において、ベリムマブによる影響はみられず、出生児の成長・発達は正常範囲内であった。5 mg/kg 群の 2 例が生後 2 週間以内、150 mg/kg 群の 1 例（妊娠 142 日に出生した早産児）が生後数時間のうちに死亡した（表 2.6.6-3）。剖検及び病理組織学的検査を実施したが、いずれの出生児についても明らかな悪影響はみられず、死因を特定することはできなかった。出生児の総死亡率は 11.1%（3/27 例）であり、マカクザルの背景値（10～12%）と同程度であった[Gardin, 1989; Hird, 1975]。死亡した 5 mg/kg 群の 2 例は十分な妊娠期間（154～155 日）を経て出生しており、胎児発生時及び他の出生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、ベリムマブに関連した死亡ではないと考えられた。死亡した 150 mg/kg 群の 1 例（妊娠 142 日に出生）についても明らかな死因は特定できなかった。一般的に妊娠期間 141 日以上の出生児は生存が見込まれるが[Hendrie, 1996]、150 mg/kg 群で胎児発生時にベリムマブによる悪影響が認められなかったことから、本例の死因は早産に関連したものであり、ベリムマブに関連した死亡ではないと考えられた。出生児では、生後 7 及び 28 日にベリムマブによる末梢血中の総 B 細胞及び成熟 B 細胞数の低値が用量とは関連なく認められたが、生後 91 日までに対照群と同程度に回復した。剖検、器官重量測定、病理組織学的検査及び免疫組織化学的検査においてベリムマブに関連した変化は認めらなかった。妊娠 150 日の胎児でみられたリンパ節及び脾臓における B 細胞の密度低下は、生後 1 年の出生児では認められなかった。血清 IgG 濃度はベリムマブ濃度を差し引いても生後 7 日の 150 mg/kg 群で高値であったが、他の測定時点では対照群と同程度であった。一方、血清 IgM 濃度は生後 7 又は 91 日に用量とは関連なく投薬群で低値であったが、生後 182 日以降には対照群と同程度に回復した。

母動物への最終投与後（分娩後又は生後）、投薬群ではベリムマブの消失及び減少した B 細胞数の回復に伴って、母動物及び出生児の血清中 BLyS 濃度が一過性に増加した。抗 CD20 抗体によって B 細胞が減少した患者では、B 細胞数の回復に先だって BLyS が一過性に増加することが知られている[Cambridge, 2006; Cambridge, 2008]。

以上、母動物、胎児及び出生児に認められた所見は主に B 細胞の低値（末梢血又は組織中）であり、それらはベリムマブの薬理作用に関連する変化と考えられた。ベリムマブの投与に関連する奇形は認められず、胎児でみられた B 細胞への影響は、生後 1 年の出生児では回復した。ベリムマブに関連したその他の変化は認められなかったことから、母動物、胎児及び出生児に対する無影響量は 5 mg/kg 未満、無毒性量は 150 mg/kg と推定された。

2.6.6.7. 局所刺激性試験

2.6.6.7.1. 血管刺激性試験

血管刺激性試験は実施しなかった。反復投与毒性試験（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 までの静脈内投与部位を肉眼又は病理組織学的に評価した結果、刺激性は認められなかった。

2.6.6.7.2. 皮下投与局所刺激性試験

2.6.6.7.2.1. 8 週間反復皮下投与局所刺激性試験

媒体又はベリムマブの液剤処方 200 mg/mL（1000 mg/animal/dose、244～294 mg/kg）を 1 群 4 匹の雄カニクイザルの背部に隔週 1 回の頻度で 3 回（試験 1、15 及び 29 日）反復皮下投与し、投与部位の刺激性を評価した（2012N155098_00）。本試験では、一般状態観察、体重測定、投与部位観察、臨床検査、病理組織学的検査（投与部位の皮膚のみ）、TK 測定（試験 1、15、29 及び 57 日）及びフローサイトメトリー検査（末梢血総 B 細胞、試験 33 及び 57 日）を実施した。

試験成績の概略を 2.6.7.16.1.に示した。半減期から予測されたとおり、3 回目投与後の血清中ベリムマブ濃度は初回投与後と比較して Cmax で 1.59 倍、トラフ濃度で約 2 倍に増加した。

一般状態観察、体重測定、臨床検査においてベリムマブに関連した悪影響は認められなかった。投与部位の肉眼的観察及び皮膚の病理組織学的検査（最終投与翌日に採取）において、ベリムマブに関連した変化は認められなかった。フローサイトメトリー検査では、投薬群において薬理作用に関連する末梢血総 B 細胞数の低値が試験 33 及び 57 日に認められた。

2.6.6.7.2.2. 単回又は 4 回反復皮下投与局所刺激性試験

凍結乾燥処方群及び液剤処方群の 2 群（各群雌雄各 3 匹）のカニクイザルの背部に 25 mg/kg（80 mg/mL）のベリムマブ（凍結乾燥処方又は液剤処方）、媒体及び生理食塩液を単回又は隔日 4 回反復皮下投与し、投与部位の刺激性を評価した（XD2010/00072/00）。単回皮下投与と反復皮下投与による局所への影響を同時に観察するために、各動物に 6 ヵ所の投与部位を設け、各投与部位にベリムマブ、媒体及び生理食塩液のいずれかを単回（試験 7 日）又は反復（試験 1、3、5 及び 7 日）投与した。

試験成績の概略を 2.6.7.16.2.に示した。全例でベリムマブの全身曝露が認められた。

死亡例はみられず、ベリムマブに関連した一般状態及び体重への影響は認められなかった。ベリムマブの凍結乾燥処方、液剤処方、それぞれの媒体及び生理食塩水のいずれの投与部位においても、1 ヵ所以上にごく軽度の紅斑が認められた。また、ベリムマブ（液剤処方）の反復投与によって試験 6～8 日に雄で落屑がみられた。いずれの投与部位においても、浮腫、緊張低下、亀裂及び痂皮形成はみられなかった。様々な組織学的変化（軽微～軽度）が投与局所の皮下及び筋組織に認められたが、媒体とベリムマブ投与部位に程度の差はみられず、その頻度は生理食塩液投与部位で低かった。このように、ベリムマブに関連した局所刺激性は認められなかった。

2.6.6.8. その他の毒性試験

その他の毒性試験として、免疫原性試験、免疫毒性に関する評価、同等性及び不純物に関する評価、組織交差反応性試験、げっ歯類（マウス及びモルモット）及びウサギを用いた試験を実施した。

2.6.6.8.1. 免疫原性試験

各群雌雄各 5 匹のカニクイザルに媒体又は 1 mg/kg のベリムマブを 2 回/週又は 4 回/週の頻度で 13 週間反復皮下投与後、9 週間の休薬期間を設け、ADA、TK 及び薬理作用を評価した（XD2010/00073/00）。

試験成績の概略を 2.6.7.17.1.に示した。投薬群の全例でベリムマブの全身曝露がみられたが、性差は認められなかった。試験 71 日の 1 例において ADA が検出されたが、その他の動物及び測定時点において ADA は認められなかった。本例ではベリムマブ濃度（109.9 µg/mL）が測定系に干渉する濃度を超えていたため、本検体の中和活性は評価しなかったが、TK に大きな変化がみられなかったことから中和活性はなかったと考えられる。

一般状態、体重、摂餌量にベリムマブに関連した影響はみられず、死亡例も認められなかったため、剖検は実施しなかった。ベリムマブの 2 及び 4 回/週群で同程度の末梢血総 B 細胞数の低値が認められた。2 及び 4 回/週群の B 細胞数低値はそれぞれ試験 113 及び 99 日から認められ、4 回/週群の方が発現時期はわずかに早かった。B 細胞数の低値は 9 週間の休薬期間中にも継続して認められた。末梢血中の白血球、リンパ球、総 T 細胞、ヘルパーT 細胞、細胞傷害性 T 細胞及び NK 細胞数にベリムマブに関連した変化はみられなかった。

2.6.6.8.2. 免疫毒性に関する評価

ベリムマブの毒性試験において、カニクイザルで B 細胞数の減少がみられたが、T 細胞及び NK 細胞数に変化は認められなかった（2.6.6.3.及び 2.6.6.6.）。これらの結果は BLyS 受容体の発現が B 細胞に限局していることと一貫している（2.6.2.2.）。マウスに抗 BLyS モノクローナル抗体を投与した結果、B 細胞の一次応答の減弱はみられたが、二次免疫応答への影響（メモリーB 細胞への影響）はほとんど認められなかったことが報告されている[Scholz, 2008]。また、カニクイザルの毒性試験（2.6.6.3.及び 2.6.6.6.）において、前がん病変及びベリムマブに関連した感染症は認められず、臨床試験（2.5.5.2.6.2.、2.5.5.2.6.3.）においても重篤又は重度の感染症や悪性腫瘍のリスク増加は認められなかった。

以上のことから、ベリムマブの免疫毒性学的評価は十分になされていると考える。

2.6.6.8.3. 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] 工程モード（[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、ベリムマブの脱アミド体及び凝集体が認められており（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。

2.6.6.8.4. 組織交差反応性試験

ヒト及びサル組織パネルを用いた組織交差反応性試験を実施した（XH2010/00026/00）。結果については、2.6.2.3.2.及び 2.6.7.17.2 に記載した。

2.6.6.8.5. げっ歯類（マウス及びモルモット）及びウサギを用いた試験

製剤の品質及び薬理評価のためにげっ歯類（マウス及びモルモット）及びウサギを用いた試験が実施された。げっ歯類ではベリムマブに対する忍容性が得られず、モルモットでは初回投与後、マウスでは 2 回目又はそれ以降の投与後にアナフィラキシー様反応によると考えられる死亡が認められた。ウサギでは、製剤開発中の 1 試験において 1 例の死亡がみられたが、フォローアップの 2 試験においてアナフィラキシー様反応及び死亡は認められなかった。

2.6.6.8.5.1. げっ歯類（マウス及びモルモット）等を用いた試験

特性評価において、感染源の有無及び生育条件の確認のために、in vitro において細胞齢の上限にまで培養された細胞（CAL）を用いた検討を行った。

発育鶏卵、成体マウス、乳飲みマウス及びモルモットに CAL を投与した結果、発育鶏卵、成体マウス及び乳飲みマウスにおいて、CAL 投与による悪影響は認められなかったが、モルモットでは CAL を投与した 6 例中 5 例の死亡が投与後 24～48 時間に確認された（2.3.S.2.3.5.1.）。モルモットにベリムマブを投与した機序検討試験[QR1237]において、1）

補体不活化物質（コブラ蛇毒等）の前投与により生存率の増加及び生存時間の延長がみられたこと、2）臨床症状がみられた動物の補体活性が対照群より減弱していたこと、3）ベリムマブの Fab 部分のみ（補体に対する結合能をもつ Fc 部分を含まない）を投与しても死亡しなかったことの 3 点が明らかとなり、モルモットにおけるアナフィラキシー様反応には補体の活性化が関与していると考えられた。一般的に、タンパク質製剤を用いたモルモットのアナフィラキシー試験では陽性の結果が得られるが、その結果はヒトで同様の反応が起こることを予測するものではない[薬食審査発 0323 第 1 号通知, 2012]とされている。

マウスでは、ベリムマブの 2 回目又はそれ以降の投与後にアナフィラキシー様反応が原因と考えられる死亡が数例で認められた（2.6.2.2.2.2.）。したがって、ベリムマブの非臨床試験にマウスを用いることは適切ではないと考えられた。

ベリムマブの投与によりマウス及びモルモットにアナフィラキシー様反応がみられたが、サル及びヒトで同様の反応は認められず、臨床試験における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.）。これらのことから、ベリムマブに対するアナフィラキシー様反応はモルモット及びマウスに特異的な異種蛋白反応であり、ヒトへの外挿性はないと考えられた。

2.6.6.8.5.2. ウサギを用いた試験

発熱性物質試験の予備試験において、各群 3 匹の雌ニュージーランドホワイト（NZW）ウサギに媒体又は 15 mg/kg のベリムマブを単回急速静脈内投与し、忍容性を確認した[1123-05780]。投与約 22 時間後、ベリムマブ投与群の 1/3 例に死亡が認められ、剖検を実施したが、死因は不明であった。他の動物においては試験期間を通して異常は認められなかった。第二の試験として、各群雌雄各 3 匹の NZW ウサギに媒体、10 mg/kg のアイソタイプコントロール又はベリムマブを単回急速静脈内投与し、一般状態観察、血液生化学的検査、血液学的検査及び体温を投与後 48 時間にわたって評価した[2101/008]。その結果、死亡は認められず、全例において忍容性は良好であった。第三の試験として、3 匹の雌 NZW ウサギに 10 mg/kg のベリムマブを静脈内投与し、投与前～投与後 3 時間まで体温をモニターした[AC29HG.007000.BSV]。いずれの動物においても体温上昇はみられず、ベリムマブに関連した悪影響は認められなかった。

2.6.6.9. 考察及び結論

サルを用いて、ベリムマブの静脈内投与による反復投与毒性試験、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、皮下投与による局所刺激性試験及び免疫原性試験を実施した。

2.6.6.9.1. 急性毒性

サルに最高 150 mg/kg のベリムマブを静脈内投与した結果、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。

2.6.6.9.2. 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 2.6.6-4 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 2.6.6-4 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。

2.6.6.9.3. 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。

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。

表 2.6.6-4　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）。

2.6.6.9.4. 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。

2.6.6.9.5. 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。

したがって、ベリムマブの毒性評価にマウスは適しておらず、サルのみが適切な動物種であると考えられた。

2.6.6.9.6. 結論

ベリムマブの反復投与毒性、生殖発生毒性、局所刺激性、組織交差反応性及び免疫原性について検討した結果、薬理作用に関連する B 細胞の減少が認められたが、その影響は可逆的であり、休薬により回復した。その他ベリムマブに関連した重大な悪影響は認められなかった。以上の結果から、SLE 患者への本剤の適正な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た。

2.6.6.10. 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.6.11. 参考文献

Cambridge G, Isenberg DA, Edwards JC, et al. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: relationships among serum B lymphocyte stimulator levels, autoantibody profile and clinical response. Ann Rheum Dis. 2008;67:1011-6.

Cambridge G, Stohl W, Leandro MJ, et al. Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. Arthritis Rheum. 2006;54:723-32.

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 1123-05780 Study ID NA. LymphoStat-B: A Single-Dose Intravenous Toxicity Study in New Zealand White Rabbits. Report Date 17-Oct-2006.

GlaxoSmithKline Document Number 2101/008 Study ID NA. Belimumab (LymphoStat B): Single Dose Intravenous Toxicity Study in the Rabbit. Report Date 17-Sep-2008.

GlaxoSmithKline Document Number AC29HG.007000.BSV Study ID NA. Rabbit Pyrogen Test. Report Date 19-Jun-2009.

GlaxoSmithKline Document Number QR1237 Study ID NA. Results of Studies to Investigate the Death of Guinea Pigs Administered LymphoStat-B End-of-Production Cells or LymphoStat-B. Report Date 6-May-2005.

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.

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.

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.

2.6.7. 毒性試験概要表

2.6.7.1. 毒性試験：一覧表

Test Article: Belimumab

Type of Study/ Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	GLP[b]	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Repeated-Dose Toxicity							
Cynomolgus monkey	IV (slow bolus)	4 weeks	0, 5, 15[c], 50	Yes	[redacted]	XD2010/00068/00 (1044-95)	4.2.3.2
Cynomolgus monkey	IV (slow bolus)	6 months	0, 5, 15, 50	Yes	[redacted]	XD2010/00069/00 (1177-95)	4.2.3.2
Cynomolgus monkey	IV (slow bolus)	15 days	0, 121 (Day 1), 97 (Day 4), 125 (Day 15)	No	[redacted]	XD2010/00070/00 (1736-95)	4.2.3.2
Reproductive Toxicity[d]							
Cynomolgus monkey	IV (slow bolus)	GD20 to 150 or day of parturition	0, 5, 150	Yes	[redacted]	XD2010/00071/00 (1721-95)	4.2.3.5.3
Local Tolerance							
Cynomolgus monkey	SC	3 doses (Days 1, 15, and 29)	244 - 294 (1000 mg/site)	Yes	[redacted]	2012N155098_00 (8246530)	4.2.3.6
Cynomolgus monkey	SC	Single or 4 doses (Days 1, 3, 5 and 7)	25	Yes	[redacted]	XD2010/00072/00 (6962-157)	4.2.3.6

2.6.7.1. 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Belimumab

Type of Study/ Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	GLP[b]	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Other Toxicity Studies							
Immunogenicity							
Cynomolgus monkey	SC	13 weeks	0, 1 (2x/week), 1 (4x/week)	Yes	[redacted]	XD2010/00073/00 (6962-161)	4.2.3.7.7
Tissue Cross-Reactivity							
Human and Cynomolgus monkey tissue	Ex vivo	NA	Human tissue: 2, 10, 50, 225 µg/mL Cynomolgus tissue: 2, 10 µg/mL (all tissues), or 2, 10, 50, and 225 µg/mL (thyroid only)	Yes	[redacted]	XH2010/00026/00 (00-116)	4.2.3.7.7

IV = Intravenous; SC = Subcutaneous; NA = Not applicable; GD = Gestation Day.
a = Unless otherwise specified. For the repeated-dose toxicity and reproductive toxicity studies, the highest No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) is underlined.
b = Indicates study report includes a GLP Compliance statement.
c = NOAEL for Study Number 1044-95 was 15 mg/kg; however, thyroid follicular epithelial degeneration was seen at the low dose (5 mg/kg) animal.
d = The pivotal reproduction toxicity study included pre- and post-natal development evaluations.

Testing Facility
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]

2.6.7.2. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧

Test Article: Belimumab

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	GLP[a]	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Repeated-Dose Toxicity: 4-Week Toxicity	Cynomolgus monkey	IV (slow bolus)	0, 5, 15, 50	No	[redacted]	XD2010/00068/00 (1044-95)	4.2.3.2
Repeated-Dose Toxicity: 6-Month Toxicity	Cynomolgus monkey	IV (slow bolus)	0, 5, 15, 50	No	[redacted]	XD2010/00069/00 (1177-95)	4.2.3.2
Repeated-Dose Toxicity: Dose Tolerance[b]	Cynomolgus monkey	IV (slow bolus)	0, 121 (Day 1), 97 (Day 4), 125 (Day 15)	No	[redacted]	XD2010/00070/00 (1736-95)	4.2.3.2
Reproductive Toxicity: Maternal, Fetal and Neonatal Toxicity	Cynomolgus monkey	IV (slow bolus)	0, 5, 150	Yes	[redacted]	XD2010/00071/00 (1721-95)	4.2.3.5.3
Local Tolerance[b]	Cynomolgus monkey	SC	244 - 294 (1000 mg/site)	Yes	[redacted]	2012N155098_00 (8246530)	4.2.3.6
Local Tolerance[b]	Cynomolgus monkey	SC	25	Yes	[redacted]	XD2010/00072/00 (6962-157)	4.2.3.6
Immunogenicity	Cynomolgus monkey	SC	0, 1 (2 or 4 x/week)	Yes	[redacted]	XD2010/00073/00 (6962-161)	4.2.3.7.7

IV = Intravenous; SC = Subcutaneous.
a = GLP status is with respect to TK portion of report.
b = TK data for these studies was limited to analysis of serum exposure levels.

Testing Facility
[redacted] = [redacted]

2.6.7.3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: Belimumab

	Cmax (µg/mL)				AUC (day.µg/mL)			
Species	Cynomolgus monkeys[a]	Cynomolgus monkeys[b]	Cynomolgus monkeys[c]	Human	Cynomolgus monkeys[a]	Cynomolgus monkeys[b]	Cynomolgus monkeys[c]	Human
Method of Administration	Intravenous (slow bolus)	Intravenous (slow bolus)	Intravenous (slow bolus)	Intravenous (infusion)	Intravenous (slow bolus)	Intravenous (slow bolus)	Intravenous (slow bolus)	Intravenous (infusion)
Dose (mg/kg)								
5	153 ± 9.0	111 ± 1.8	192 ± 25[e]	NA	2868 ± 259	901 ± 40	1041 ± 148[e]	NA
10	NA	NA	NA	275[d]	NA	NA	NA	2660[d]
15	472 ± 21.8	NA	NA	NA	9459 ± 1000	NA	NA	NA
50	1713 ± 142	1230 ± 180	NA	NA	37145 ± 3617	8970 ± 320	NA	NA
150	NA	NA	5240.9 ± 894.4[e]	NA	NA	NA	27441 ± 4365[e]	NA

NA = Not applicable.
a = 4-week repeat dose toxicity study: Report XD2010/00068/00.
b = Single-dose PK study: Report XD2010/00060/00 (2.6.4.3.1.1.). These data are presented in lieu of TK data from the 6-month toxicology study XD2010/00069/00 where serum samples for TK analysis were only taken immediately prior to dosing (trough samples) therefore AUC and Cmax values could not be determined. PK data from Report XD2010/00060/00 were used to model TK parameters in the 6-month study that were the basis if the safety margin calculation (see Section 2.6.6.9).
c = Reproductive toxicity study: Report XD2010/00071/00.
d = Estimates in Japanese SLE patients (BEL113750 study) based on population PK analysis (2.7.2.3.1.3.4.2.).
e = Cmax and AUC(0-14d) values are from Week 17 data.

2.6.7.4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: Belimumab

Batch No.	Formulation	Purity (%)		-HPLC	Process Impurities	Report No. (Study No.)	Type of Study
					Host Cell Protein (ng/mg)		
Proposed Commercial Specifications					ng/mg		
Lot 00A06019 Formulation 06-A	mM sodium citrate mg mL sucrose mg/mL polysorbate 80					XD2010/00068/00 (1044-95) XH2010/00026/00 (00-116)	4-week repeat dose toxicity in monkeys Cross-reactivity in human and monkey tissue
Lot 01A06041 Formulation 06-A	mg mL citric acid mg mL sucrose mg/mL polysorbate 80					XD2010/00069/00 (1177-95)	6-month repeat dose toxicity in monkeys
Lot 03A06117 Formulation 06-A	mg mL citric acid mg mL sucrose mg/mL polysorbate 80					XD2010/00070/00 (1736-95) XD2010/00071/00 (1721-95)	Dose-Tolerance study in monkeys Maternal, fetal and neonatal toxicity study in monkeys

2.6.7.4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: Belimumab

Batch No.	Formulation	Purity (%)		-HPLC	Process Impurities	Report No. (Study No.)	Type of Study
					Host Cell Protein (ng/mg)		
Proposed Commercial Specifications					ng/mg		
Lot 04TA0601 Formulation 06-B	0.13 mg/mL citric acid 2.8 mg/mL sodium citrate 80 mg/mL sucrose 0.4 mg/mL polysorbate 80				NT	XD2010/00072/00 (6962-157)	SC local tolerance in monkeys
Lot 71001 Formulation 06-B	0.13 mg/mL citric acid 2.8 mg/mL sodium citrate 80 mg/mL sucrose 0.4 mg/mL polysorbate 80				NT	XD2010/00073/00 (6962-161)	SC Immunogenicity in monkeys
Lot 04TA0602 Formulation 06-C					NT	XD2010/00072/00 (6962-157)	SC local tolerance in monkeys

2.6.7.4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: Belimumab

Batch No.	Formulation	Purity (%)			Process Impurities	Report No. (Study No.)	Type of Study
		[redacted]	[redacted]	[redacted]-HPLC	Host Cell Protein (ng/mg)		
Proposed Commercial Specifications		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted] ng/mg		
Lot 10TA0601 Formulation 06-D	0.65 mg/mL L-histidine 1.2 mg/mL L-histidine monohydrochloride [redacted] 5.3 mg m arginine hydrochloride 0.1 mg/mL polysorbate 80 [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	2012N155098_00 (8246530)	SC local tolerance in monkeys

NT = Not tested.

2.6.7.5. 単回投与毒性試験

該当する試験なし

2.6.7.6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Belimumab

Species / Strain	Method of Administration /Formulation	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)	No. /sex/group	NOAEL	Noteworthy Findings	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Cynomolgus Monkey	IV (slow bolus) 06-A	15 days	0 (control), 121 (Day 1), 97 (Day 4) and 125 (Day 15)	0M, 3F	125 mg/kg	· Administration of individual doses of belimumab at dose levels of approximately 121 mg/kg (Day 1), approximately 97 mg/kg (Day 4), and 125 mg/kg (Day 15) by IV injection was well tolerated. · There were no clinical signs indicative of an adverse effect of belimumab and no belimumab related changes in food consumption, body weight, clinical pathology, or flow cytometry parameters in peripheral blood. · There were no belimumab-related gross lesions or associated microscopic findings. · The target Cmax of approximately 3700 µg/mL was achieved after the 3rd dose.	XD2010/ 00070/00 (1736-95)	4.2.3.2

2.6.7.7. 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1. サル 4 週間静脈内投与毒性試験

Test Article: Belimumab

Report Title: A 4-Week Repeat Dose Toxicity Study of BLyS Antagonist Administered by Intravenous Injection to Cynomolgus Monkeys, with a 4-Week Recovery Period

Species / Strain: Cynomolgus Monkey
Duration of Dosing: 4-weeks
Report No: XD2010/00068/00
Initial Age: approximately 2.6 to 7.4 years of age
Duration of Postdose: 4-weeks (16 of 40 animals)
Study No: 1044-95
GLP Compliance: yes
Location in CTD: 4.2.3.2
Date of 1st Dose: December 27 and 28, 2000
Method of Administration: IV (slow bolus)
Vehicle / Formulation: [redacted] mM sodium citrate, [redacted], [redacted] mg/mL sucrose, [redacted] mg/mL polysorbate 80, [redacted] (06-A)
Special Features: 3 males and 3 females in each group were sacrificed on Day 29. The remaining 2 males and 2 females in each group were maintained over an additional 4-week treatment-free period and were sacrificed on Day 57.
NOAEL: 15 mg/kg
Data Collected: Toxicokinetics, clinical observations, body weight, food consumption, electrocardiograms, ophthalmoscopy, flow cytometry (T- and B-lymphocyte subsets and monocytes), serum chemistry, hematology, coagulation, urinalysis, serum immunoglobulins(IgM, IgG, and IgA), anti drug antibodies, organ weights, macroscopic and microscopic pathology

Dose (mg/kg):	0	5	15	50
Number of Animals:	M: 5 F: 5	M: 5 F: 5	M: 5 F: 5	M: 5 F: 5
Toxicokinetics:				
Number evaluated[a]	NA	4	4	4
AUC (0-28d) (day.µg/mL)	ND	2868 ± 259	9459 ± 1000	37145 ± 3617
Cmax (µg/mL)	ND	153 ± 9.0	472 ± 21.8	1713 ± 142

2.6.7.7.1. サル 4 週間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Noteworthy Findings	· There was no evidence of mortality in doses up to 50 mg/kg/week in cynomolgus monkeys. · No clinical signs of toxicity, changes in body weight, food consumption, electrocardiogram, ophthalmoscopy, PBMC populations (total lymphocytes, B lymphocyte subsets, T lymphocyte subsets or monocytes) or clinical pathology parameters (serum chemistry, hematology, coagulation or urinalysis) attributed to belimumab were observed. · The pharmacokinetics of belimumab was linear over the range of doses tested and there were no apparent differences between males and females. · Minimal to mild lymphocyte depletion in lymphoid organs (mesenteric lymph node and gut-associated lymphoid tissue of the ileum) was observed by histopathology on Day 29. · Belimumab-related decreases in B lymphocytes in the spleen and/or mesenteric lymph node mononuclear cell populations were generally identified on Days 29 and 57 in all belimumab treated groups. At Day 29, there were substantial reductions in the mean relative percentage of CD20+ (significantly for spleen at 5 mg/kg group) or CD20+/CD21+ cells for all treatment groups, while by Day 57 the reductions in these cell types were statistically significant in all dose groups. · Statistically significant increases in CD3+ and CD3+/CD4+ lymphocytes in the spleen and/or mesenteric lymph were evident on Days 29 and 57, while increases in CD3+/CD8+ were only observed at Day 57 where it was only observed in high dose group spleen tissue. The observed increases in T cells were thought to be secondary to the decreases in B lymphocyte populations. · Due to gross and microscopic evidence of bacterial infections in 2 high-dose (50 mg/kg) monkeys, immunosuppression at 50 mg/kg was considered a possible treatment-related effect, although IgG levels were unaffected. · Thyroid follicular epithelial degeneration was limited to high dose animals on Day 29, and was observed in 1 low dose and 1 high dose male on Day 57 suggesting a possible treatment relationship. · A significant decrease in serum IgA levels was noted in the high dose (50 mg/kg) monkeys on Day 57. · Evaluation of anti-belimumab antibodies indicated the immune response to belimumab was weak, and/or that the antibodies produced were of low affinity.							

2.6.7.7.1. サル 4 週間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight	No noteworthy findings							
Food Consumption	No noteworthy findings							
Water Consumption	No noteworthy findings							
Clinical Observations	No noteworthy findings							
Electrocardiograms	No noteworthy findings							
Ophthalmoscopy	No noteworthy findings							
Hematology:								
Mean corpuscular hemoglobin (pg)								
Day -14	18.5		18.8		18.3		18.3	
Day -7	18.7		18.9		18.0		18.3	
Day 14	19.0		19.1		18.6		18.4	
Day 28	19.1		19.2		19.0		18.4	
Day 56[b] (recovery)	18.7		19.6*		18.2		19.2	

2.6.7.7.1. サル 4 週間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Serum Chemistry:								
Chloride (mEq/L)								
Day -14	115		114		114		113	
Day -7	113		112		114		112	
Day 14	115		113		113		111*	
Day 28	112		112		112		110	
Day 56[b] (recovery)	111		112		111		111	
Total bilirubin (mg/dL)								
Day -14	0.6		0.7		0.6		0.6	
Day -7	0.6		0.6		0.5		0.5	
Day 14	0.6		0.8*		0.6		0.6	
Day 28	0.5		0.6		0.5		0.5	
Day 56[b] (recovery)	0.5		0.7		0.6		0.5	
Urea nitrogen (BUN) (mg/dL)								
Day -14	20		21		21		19	
Day -7	19		21		24		20	
Day 14	18		21		23*		19	
Day 28	19		21		22*		19	
Day 56[b] (recovery)	18		19		23†		19	
Urinalysis	No noteworthy findings							
Coagulation	No noteworthy findings							
Peripheral Blood Mononuclear Cell Analysis (absolute counts)	No noteworthy findings							

2.6.7.7.1. サル 4 週間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Serum Immunoglobulins (U/mL)								
IgA								
Predose	2208.04		1844.78		1889.77		2295.87	
Day 15	2036.29		1890.32		2265.58		1955.26	
Day 29[c]	2252.08		2436.06		2481.37		1940.71	
Day 43[b] (recovery)	1917.30		1975.33		589.21		1007.37	
Day 57[b, c] (recovery)	2266.63		2000.85		563.68		640.27‡	
IgG								
Predose	6749.18		6788.41		7712.42		9401.71	
Day 15	6730.18		6803.58		7688.35		10484.02‡	
Day 29	6661.60		6774.54		8322.22		9524.31	
Day 43[b] (recovery)	7605.38		7934.34		7377.93		6936.31	
Day 57[b, c] (recovery)	7853.65		8416.72		6767.70‡		6321.42	
IgM	No noteworthy findings							

2.6.7.7.1. サル 4 週間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Gross Pathology: Mean Organ Weights (Day 29 terminal necropsy)	No noteworthy findings							
Gross Pathology: Mean Organ Weights (Day 57 recovery necropsy)	No noteworthy findings							
Histopathology (Day 29 terminal necropsy):								
Number Evaluated:	3	3	3	3	3	3	3	3
Ileum, lymphoid depletion, GALT								
Minimal	0	0	1	0	1	1	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	1
Lymph node, mandibular, lymphoid hyperplasia								
Minimal	0	1	1	1	0	0	1	0
Lymph node, mesenteric, lymphoid depletion								
Minimal	0	0	1	0	1	0	0	1
Mild	0	0	0	0	1	0	2	2
Spleen, splenitis, chronic, abscessing								
Marked	0	0	0	0	0	0	1	0
Thyroid, degeneration, follicular epithelium								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	2
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0

2.6.7.7.1. サル 4 週間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Histopathology (Day 57 recovery necropsy):								
Number Evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2
Ileum, lymphoid depletion, GALT								
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymph node, mandibular, lymphoid hyperplasia								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Lymph node, mandibular, necrotizing granuloma								
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymph node, mesenteric, lymphoid depletion								
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Spleen, splenitis, chronic, abscessing	No noteworthy findings							
Thyroid, degeneration, follicular epithelium								
Minimal	0	0	1	0	0	0	1	0

2.6.7.7.1. サル 4 週間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Flow Cytometry % of mononuclear cells (average) (Day 29 terminal necropsy):								
Number Evaluated	3	3	3	3	3	3	3	3
Spleen								
CD20+	51.5		24.9*		30.5		33.9	
CD20+/CD21+	10.7		6.2		6.0		6.4	
CD3+	25.9		45.6*		48.4*		44.1	
CD3+/CD4+	8.8		16.9*		15.0		11.9	
CD3+/CD8+	8.2		16.2		15.5		14.3	
CD3-/CD14+	1.04		0.45		0.65		1.31	
Mesenteric Lymph Node								
CD20+	28.7		19.7		16.0		18.2	
CD20+/CD21+	5.2		3.2		3.4		2.4	
CD3+	67.0		77.9*		82.3*		78.1*	
CD3+/CD4+	46.6		56.0*		60.6*		55.5*	
CD3+/CD8+	18.2		20.9		20.7		21.7	
CD3-/CD14+	1.18		0.66		0.43		1.19	

2.6.7.7.1. サル 4 週間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Flow Cytometry % of mononuclear cells (average) (Day 57 recovery necropsy):								
Number Evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2
Spleen								
CD20+	39.3		18.0*		22.5*		20.8*	
CD20+/CD21+	8.2		3.1*		4.9*		3.5*	
CD3+	33.6		44.8		41.9		55.3*	
CD3+/CD4+	15.2		21.6		18.3		23.8	
CD3+/CD8+	13.6		17.5		18.5		24.7*	
CD3-/CD14+	2.21		1.92		1.72		1.02	
Mesenteric Lymph Node[d]								
CD20+	26.7		15.9*		11.5*		11.2*	
CD20+/CD21+	10.8		5.0*		4.0*		2.9*	
CD3+	70.9		79.5		84.7*		87.5*	
CD3+/CD4+	47.9		59.4		61.2*		59.4	
CD3+/CD8+	22.3		21.4		25.1		30.0	
CD3-/CD14+	1.66		0.78		1.72		0.69	

NA = Not applicable; ND = Not determined.

a = PK parameters were only calculated for monkeys in the recovery group because monkeys in the terminal group were sacrificed within 7 days of the last dose administration, and this did not allow for adequate characterization of the elimination phase given the long half-life of belimumab.

b = Two male and 2 female monkeys evaluated.

c = Treatment effect was significant ($p < 0.05$) for the treatment group using an ANOVA model.

d = One male and 2 female monkeys evaluated in the 50 mg/kg group.

* Statistically significant difference from control group ($p < 0.05$) using Dunnett's test.

† Statistically significant difference from control group ($p < 0.05$) using Dunn's test.

‡ Statistically significant difference from control group ($p < 0.05$) using a repeated measures ANCOVA model.

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験

Test Article: Belimumab

Report Title: A 6-Month Toxicity Study of LymphoStat-B™ Administered Bi-Weekly by Intravenous Injection to Cynomolgus Monkeys, with an 8-Month Recovery Period

Species / Strain: Cynomolgus Monkey
Initial Age: 2.5 to 5.3 years (male)
2.1 to 7.4 years (female)
Duration of Dosing: 6-months
Duration of Postdose: 8-months
Report No: XD2010/00069/00
Study No: 1177-95
Location in CTD: 4.2.3.2
GLP Compliance: yes
Date of 1st Dose: November 28 to 30, 2001
Method of Administration: IV (slow bolus)
Vehicle / Formulation: [redacted] mg/mL citric acid, [redacted], [redacted] mg/mL sucrose, [redacted] mg/mL polysorbate 80, [redacted] (06-A)
Special Features: 22 monkeys (2/sex/group for Group 1 and 3/sex/group for Groups 2-4) were sacrificed near the end of Week 13 (Day 92). The remaining 38 monkeys continued to receive treatment through Week 26 (Day 183). At that time, 22 monkeys (2/sex/group for Group 1 and 3/sex/group for Groups 2-4) were sacrificed, while 16 monkeys (2/sex each from Groups 1-4) were maintained over an additional 34-week treatment-free period and terminated near the end of Week 60 (Day 419).
NOAEL: 50 mg/kg
Data Collected: Toxicokinetics, clinical observations, body weight, food consumption, electrocardiograms, ophthalmoscopy, flow cytometry (T- and B-lymphocyte subsets and monocytes), serum chemistry, hematology, coagulation, urinalysis, serum immunoglobulins(IgM, IgG, IgA and IgE), anti drug antibodies, organ weights, macroscopic and microscopic pathology

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals: Total	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Through Week 13 (interim necropsy)	6	6	8	8	8	8	8	8
Through Week 26 (terminal necropsy)	4	4	5	5	5	5	5	5
Through Week 60 (recovery necropsy)	2	2	2	2	2	2	2	2
Toxicokinetics:	Belimumab TK appear to be dose-proportional over the range of doses tested. AUC (0-∞) and Cmax values cannot be determined[a].							

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Noteworthy Findings	· There was no evidence of mortality in doses up to 50 mg/kg in cynomolgus monkeys. · No clinical signs of toxicity, changes in body weight, food consumption, electrocardiogram, ophthalmoscopy, or clinical pathology parameters (serum chemistry, hematology, coagulation, or urinalysis) attributed to belimumab were observed. · Reductions in total B lymphocyte (CD20+) and mature B lymphocyte (CD20+/CD21+) counts occurred in all belimumab groups at Week 13 and 26, consistent with expected pharmacologic effect of belimumab. · Total B lymphocyte (CD20+) and mature B lymphocyte (CD20+/CD21+) counts remained decreased thought Week 39, and recovered nearly to baseline between Weeks 45 and 60. · No remarkable belimumab related changes occurred in other mononuclear cell subsets evaluated (CD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+ and CD3-/CD14+). · Levels of serum IgM, IgG, IgA and IgE were minimally or not affected. · Gross and microscopic necropsy findings attributed to belimumab were consistent with its expected pharmacologic activity: · Reduction in spleen weight (Week 26) was observed in all belimumab-treated groups. · Decreased lymphoid follicle size and/or number in the spleen (Week 13/26) and mesenteric lymph node (Week 26), which correlated with decreased splenic and mesenteric B lymphocytes as determined by flow cytometry. · These effects were not observed at recovery necropsy. · Anti-belimumab antibodies were observed in 2 animals (1 low and 1 high dose) at Week 13 and 26, which reversed by Week 52. This immune response was associated with altered TK and variable responses to belimumab treatment. The low dose monkey's B lymphocyte counts were considered essentially unaffected by belimumab treatment, while the high-dose monkey with serum anti-belimumab antibodies detected at Weeks 13 and 26 had a response to treatment similar to other high-dose treated animals. · The amount of belimumab accumulation at steady-state (approximately 2-fold), which was reached at approximately Day 71, was consistent with the dosing regimen and expected half-life. · The PK appears linear over the dose range tested. · During the recovery period, serum concentrations of belimumab declined approximately monoexponentially with half-lives ranging from 9.05 to 15.8 days.							

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)	No noteworthy findings							
Food Consumption (%)	No noteworthy findings							
Clinical Observations	No noteworthy findings							
Electrocardiograms	No noteworthy findings							
Ophthalmoscopy	No noteworthy findings							
Hematology	No noteworthy findings							
Serum Chemistry:								
Sodium (mEq/L)								
Week 6	148		149*		149		148	
Week 13	145		148		148		147	
Week 26	146		146		147		146	
Week 60 (recovery)	149		147		148		147	
Urinalysis	No noteworthy findings							
Coagulation	No noteworthy findings							
Peripheral Blood Mononuclear Cell Analysis:								
Absolute Lymphocytes (/µL)								
Week 13	4980		5993		4841		4881	
Week 26	4844		4817		6296		5124	
Week 33 (recovery)	6958		5225		5483		7053	
Week 39 (recovery)	7610		5780		5933		6048	
Week 45 (recovery)	6945		7595		7140		7225	
Week 52 (recovery)	6683		5660		7708		6425	
Week 60 (recovery)	7650		6163		6088		6928	

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
CD20+ (/µL)								
Week 13	756		588		348*		347*	
Week 26	708		329*		263*		281*	
Week 33 (recovery)	1186		406		276		465	
Week 39 (recovery)	1185		348		259		337	
Week 45 (recovery)	1468		745		431		573	
Week 52 (recovery)	1509		644		638		715	
Week 60 (recovery)	1535		635		578		958	
CD20+/CD21+ (/µL)								
Week 13	334		266		131*		171*	
Week 26	259		114*		92*		118*	
Week 33 (recovery)	392		187		105		167	
Week 39 (recovery)	395		184		114		221	
Week 45 (recovery)	485		406		367		448	
Week 52 (recovery)	448		392		599		575	
Week 60 (recovery)	433		296		407		669	
CD3+ (/µL)								
Week 13	3419		4184		3869		3671	
Week 26	3217		3374		5199		3830	
Week 33 (recovery)	4874		3762		5515		5376	
Week 39 (recovery)	4940		4203		4899		4701	
Week 45 (recovery)	4783		5407		6068		5276	
Week 52 (recovery)	4486		4084		6321		4859	
Week 60 (recovery)	5077		4402		4997		4716	

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
CD3+/CD4+ (/µL)								
Week 13	1805		2063		1775		1944	
Week 26	1731		1748		2186		2007	
Week 33 (recovery)	2791		1933		2610		2946	
Week 39 (recovery)	2756		2147		2273		2797	
Week 45 (recovery)	2672		2767		2722		3001	
Week 52 (recovery)	2519		2088		3087		2761	
Week 60 (recovery)	2828		2007		2294		2652	
CD3+/CD8+ (/µL)								
Week 13	1383		1835		1852		1544	
Week 26	1314		1409		2673*		1637	
Week 33 (recovery)	1902		1546		2633		2164	
Week 39 (recovery)	2003		1818		2400		1686	
Week 45 (recovery)	2081		2248		2960		2055	
Week 52 (recovery)	1914		1748		2857		1824	
Week 60 (recovery)	2419		2217		2489		1887	
CD14+ (/µL)								
Week 13	279		317		285		297	
Week 26	426		489		723		496	
Week 33 (recovery)	658		536		668		581	
Week 39 (recovery)	434		448		335		542	
Week 45 (recovery)	456		569		566		614	
Week 52 (recovery)	438		463		656		524	
Week 60 (recovery)	657		491		340		559	

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Serum Immunoglobulins:								
IgG (mg/dL)	No noteworthy findings							
IgA (mg/dL)	No noteworthy findings							
IgM (mg/dL)	No noteworthy findings							
IgE (ng/dL)[b]								
Week 1	3.1		2.6		2.2		5.8	
Week 6	2.4		1.8		2.1		2.7	
Week 13	3.5		1.9		1.5		2.7	
Week 22	30.5		18.0		9.6		14.4	
Week 26	23.1		2.3		1.6‡		14.4	
Week 34 (recovery)	46.8		8.0		13.1		22.0	
Week 39 (recovery)	51.2		14.0		36.9		24.8	
Week 52 (recovery)	62.5		49.9		49.0		55.3	
Week 60 (recovery)	44.1		92.2		55.2		53.3	
Total Ig (IgG + IgM + IgA) (mg/dL)								
Week 1	1522.5		1483.9		1451.9		1365.0	
Week 6	1450.6		1384.4		1369.8		1261.8	
Week 13	1425.8		1358.9		1424.7		1267.6	
Week 22	1629.8		1249.7		1378.0		1289.2	
Week 26	1553.3		1187.7‡		1343.1		1231.4‡	
Week 34 (recovery)	1242.5		1320.0		1390.5		1069.8	
Week 39 (recovery)	1441.3		1615.0		1511.0		1373.8	
Week 52 (recovery)	1320.5		1534.0		1573.5		1164.0	
Week 60 (recovery)	1305.0		1547.0		1615.3		1215.5	

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Gross Pathology: Mean Organ Weights (g) (Week 13 interim necropsy):								
Number evaluated	2	2	3	3	3	3	3	3
Adrenal Glands	0.298		0.467*		0.519*		0.455*	
Heart	6.615		9.826*		10.783*		9.831*	
Lungs	10.268		16.067*		16.219*		15.193*	
Kidneys	No noteworthy findings							
Pituitary (weight after fixation)	No noteworthy findings							
Epididymides	0.599	NA	3.421*	NA	3.406*	NA	1.396	NA
Gross Pathology: Mean Organ Weights (g) (Week 26 terminal necropsy):								
Number evaluated	2	2	3	3	3	3	3	3
Adrenal Glands	No noteworthy findings							
Heart	No noteworthy findings							
Lungs	No noteworthy findings							
Kidneys	13.074		9.794*		10.249		11.426	
Spleen	7.152		4.306		5.242		5.203	
Pituitary (weight after fixation)	0.063		0.048*		0.049*		0.049*	
Epididymides	No noteworthy findings							
Gross Pathology: Mean Organ Weights (g) (Week 60 recovery necropsy)	No noteworthy findings							

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Histopathology (Week 13 interim necropsy):								
Number evaluated	2	2	3	3	3	3	3	3
Lymph Node, mandibular, extramedullary hematopoiesis								
Minimal	0	0	0	1	1	1	1	0
Mild	0	0	2	1	1	2	0	1
Lymph Node, mesenteric, decreased lymphoid cell mass	No noteworthy findings							
Lymph Node, mesenteric, lymphoid depletion, germinal center	No noteworthy findings							
Spleen, absence, lymphoid follicle	No noteworthy findings							
Spleen, decrease lymphoid cell thickness, periarteriolar lymphoid sheath (PALS)								
Minimal	0	0	1	0	0	1	0	0
Mild	0	0	0	0	2	0	1	0
Spleen, decrease lymphoid follicle size/number								
Minimal	0	0	1	0	1	1	2	0
Marked	0	0	0	0	1	0	0	0

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Histopathology (Week 26 terminal necropsy):								
Number evaluated	2	2	3	3	3	3	3	3
Lymph Node, mandibular, extramedullary hematopoiesis								
Minimal	0	0	2	0	0	0	0	0
Mild	1	1	0	2	0	3	1	2
Lymph Node, mesenteric, decreased lymphoid cell mass								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	1	0	0	1
Lymph Node, mesenteric, lymphoid depletion, germinal center								
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Spleen, absence, lymphoid follicle								
Marked	0	0	0	0	0	1	0	0
Spleen, decrease lymphoid cell thickness, periarteriolar lymphoid sheath (PALS)	No noteworthy findings							
Spleen, decrease lymphoid follicle size/number								
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	1
Mild	0	0	2	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	3	1	2	2	0

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Histopathology (Week 60 recovery necropsy):								
Number evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2
Lymph Node, mandibular, extramedullary hematopoiesis								
Mild	0	0	0	1	0	1	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	0
Lymph Node, mesenteric, decreased lymphoid cell mass	No noteworthy findings							
Lymph Node, mesenteric, lymphoid depletion, germinal center	No noteworthy findings							
Spleen, absence, lymphoid follicle	No noteworthy findings							
Spleen, decrease lymphoid cell thickness, periarteriolar lymphoid sheath (PALS)	No noteworthy findings							
Spleen, decrease lymphoid follicle size/number								
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Lymphoid Tissue Analysis by Flow Cytometry: % of mononuclear cells (Week 13 interim necropsy):								
Number Evaluated	2	2	3	3	3	3	3	3
Spleen								
CD20+	38.48		19.43*		16.97*		21.13*	
CD20+/CD21+	34.23		11.98*		9.54*		13.00*	
CD3+	51.85		68.13		65.27		68.33	
CD3+/CD4+	26.35		29.43		28.97		30.33	
CD3+/CD8+	20.65		27.20		25.33		26.42	
CD3-/CD14+	1.44		1.57		1.09		1.14	
Mesenteric Lymph Node								
CD20+	12.39		3.55*		3.46*		2.90*	
CD20+/CD21+	6.47		1.65		0.77		1.69	
CD3+	58.11		40.86		53.88		47.25	
CD3+/CD4+	37.60		25.55		35.38		30.32	
CD3+/CD8+	18.54		13.65		18.13		15.43	
CD3-/CD14+	0.56		0.19		0.15		0.16	

2.6.7.7.2. サル 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		15		50	
Number of Animals:	M: 6	F: 6	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8	M: 8	F: 8
Lymphoid Tissue Analysis by Flow Cytometry % of mononuclear cells (Week 26 terminal necropsy):								
Number Evaluated	2	2	3	3	3	3	3	3
Spleen								
CD20+	30.53		12.24*		14.23*		11.83*	
CD20+/CD21+	27.30		7.13*		9.54*		7.72*	
CD3+	48.75		69.48*		71.12*		72.87*	
CD3+/CD4+	20.85		29.42*		26.17		29.05*	
CD3+/CD8+	25.33		35.20		35.00		36.60	
CD3-/CD14+	1.76		1.84		1.00		1.14	
Mesenteric Lymph Node								
CD20+	15.91		4.38*		5.08*		3.82*	
CD20+/CD21+	1.84		0.22*		0.18*		0.18*	
CD3+	70.88		80.72		79.25		83.72	
CD3+/CD4+	43.33		52.55		49.50		51.87	
CD3+/CD8+	26.88		27.88		27.98		29.87	
CD3-/CD14+	2.02		0.57*		0.35*		0.77*	
Lymphoid Tissue Analysis by Flow Cytometry (Week 60 recovery necropsy)	No noteworthy findings							

NA = Not applicable.

a = Serum samples for PK analysis were only taken immediately prior to dosing (trough samples) therefore AUC and Cmax values cannot be determined.

b = Due to the high variability in IgE levels between monkeys, the increase in IgE across all treatment groups is of questionable biologic significance and does not appear to be affected by belimumab treatment.

* Statistically significant difference from control group ($p \leq 0.05$) using ANOVA with Dunnett's/Dunn's test.

‡ Statistically significant difference from control group ($p < 0.05$) using a one-way ANOVA model.

2.6.7.8. In Vitro 遺伝毒性試験

該当する試験なし

2.6.7.9. In Vivo 遺伝毒性試験

該当する試験なし

2.6.7.10. がん原性試験

該当する試験なし

2.6.7.11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当する試験なし

2.6.7.12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

該当する試験なし

2.6.7.13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当する試験なし

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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

Test Article: Belimumab

Report Title: Maternal, Fetal and Neonatal Toxicity Study of LymphoStat-B™ Administered Bi-Weekly by Intravenous (Bolus) Injection to Pregnant Cynomolgus Monkeys, Including a One Year Postnatal Evaluation
Species / Strain: Cynomolgus Monkey
Duration of Dosing: Within 2 days of confirmed pregnancy (GD20 to GD22) until GD150 or day of parturition
Report No: XD2010/00071/00
Initial Age: 3.8 to 15 years
Day of Mating: Gestational Day 0
Study No: 1721-95
GLP Compliance: yes
Location in CTD: 4.2.3.5.3
Date of 1st Dose: July 9, 2004
Method of Administration: IV (slow bolus)
Day of C-Section: GD150 (Groups 1, 3, 5); GD175 (if delivery had not occurred in Groups 2, 4, 6)
Vehicle / Formulation: [redacted] mg/mL citric acid, [redacted], [redacted] mg/mL sucrose, [redacted] mg/mL polysorbate 80, [redacted] (06-A)
NOAEL: F0 Females: 150 mg/kg F1 Fetuses: 150 mg/kg F1 Infants: 150 mg/kg
Data Collected: F0 females: toxicokinetics, clinical observations, body weight, food consumption, hematology, flow cytometry (T- and B-lymphocyte subsets, monocytes, and NK cells), serum immunoglobulins(IgM, IgG, IgA, IgE), anti drug antibodies; F1 fetuses: ultrasound monitoring, fetal body measurements and morphology (external, visceral and skeletal), macroscopic and microscopic pathology; F1 infants:toxicokinetics, clinical observations, body weight, food consumption, neurobehavioral assessment, hematology, flow cytometry (T- and B-lymphocyte subsets, monocytes, and NK cells),serum chemistry, coagulation,urinalysis, anti drug antibodies, serum immunoglobulins (IgM and IgG), macroscopic and microscopic pathology.

Dose (mg/kg):	0		5		150	
Number of Animals:	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Adult Females: No. Pregnant	11	10	13	12	9	11
Toxicokinetics:						
AUC(0-14d) (µg.day/mL)						
Week 1	NC		674		19567	
Week 17	NC		1041		27441	
Cmax (µg/mL)						
Week 1	NQ		142		5018	
Week 17	NQ		192		5241	

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Adult Females:	**Clinical Observations**						
	Gestation Body Weight (kg)						
	(all Groups)						
	GD18	3.11		3.53*		3.22	
		No noteworthy findings for other gestation day body weights					
	Mean Postpartum Body Weight (kg)	No noteworthy findings.					
	(Groups 2, 4, and 6)						
	Mean Gestation Length (days)	No noteworthy findings.					
	(Groups 2, 4, and 6)						
	Hematology during Gestation (all Groups)						
	Polysegmented neutrophils (/µL)						
	Premate	5220.76		5495.96		5067.95	
	Predose	6617.05		7621.08		7085.05	
	GD90	4851.30		6884.37*		5063.70	
	GD140	4455.24		5458.26		5124.32	
	White Blood Cell Count (10^3/µL)						
	Premate	10.96		11.69		11.30	
	Predose	12.33		12.64		11.69	
	GD90	9.12		11.45*		9.56	
	GD140	8.41		9.44		8.75	
	Hematology postpartum (Groups 2, 4, and 6)	No noteworthy findings					

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		150	
Number of Animals:	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Adult Females: Peripheral Blood Mononuclear Cell Analysis during Gestation						
CD20+ (/µL)						
Prior to Mating	1093.81		1304.88		1334.55	
Predose	969.76		958.60		1016.10	
Predose Average	1031.79		1131.74		1175.33	
GD90	677.25		597.84		621.65	
GD140	578.41		479.84		422.58	
CD20+/CD21+ (/µL)						
Prior to Mating	490.86		606.08		549.05	
Predose	423.10		396.60		362.80	
Predose Average	456.98		501.34		455.93	
GD90	253.60		243.84		220.25	
GD140	170.00		185.16		131.16	
Total CD3+ (/µL)						
Prior to Mating	4266.00		4582.64		4346.10	
Predose	4185.05		3655.16		3333.00	
Predose Average	4225.52		4118.90		3839.55	
GD90	3087.65		3365.84		3241.85	
GD140	2554.76		2709.79		2379.05	
CD3+/CD4+ (/µL)						
Prior to Mating	2302.29		2517.88		2286.10	
Predose	2282.33		2060.20		1840.40	
Predose Average	2292.31		2289.04		2063.25	
GD90	1740.40		1913.63		1766.15	
GD140	1381.65		1481.26		1248.42	

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Adult Females:	**CD3+/CD8+ (/µL)**						
	Prior to Mating	1794.19		1969.40		1991.05	
	Predose	1838.76		1533.88		1423.25	
	Predose Average	1816.48		1751.64		1707.15	
	GD90	1282.85		1336.21		1421.50	
	GD140	1097.47		1177.37		1028.16	
	Ratio CD4+:CD8+						
	Prior to Mating	1.37		1.43		1.19	
	Predose	1.35		1.56		1.31	
	Predose Average	1.36		1.49		1.25	
	GD90	1.50		1.56		1.32	
	GD140	1.44		1.42		1.24	
	CD3-/CD14+ (/µL)						
	Prior to Mating	383.57		439.24		376.00	
	Predose	623.62		599.36		432.80*	
	Predose Average	503.60		519.30		404.40	
	GD90	409.55		542.68		436.30	
	GD140	521.94		734.47		613.32	
	CD3-/CD16+ (/µL)						
	Prior to Mating	591.86		492.24		500.95	
	Predose	508.10		393.48		330.45	
	Predose Average	549.98		442.86		415.70	
	GD90	390.40		353.16		381.60	
	GD140	350.76		383.05		420.95	

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Adult Females:	**CD20+ (% of predose average)**						
	GD90	0.66		0.51*		0.58	
	GD140	0.58		0.41*		0.40*	
	CD20+/CD21+ (% of predose average)						
	GD90	0.56		0.46		0.58	
	GD140	0.37		0.35		0.36	
	Total CD3+ (% of predose average)						
	GD90	0.74		0.78		0.88	
	GD140	0.59		0.63		0.68	
	CD3+/CD4+ (% of predose average)						
	GD90	0.77		0.80		0.89	
	GD140	0.60		0.62		0.66	
	CD3+/CD8+ (% of predose average)						
	GD90	0.71		0.72		0.86	
	GD140	0.58		0.65		0.64	
	CD3-/CD14+ (% of predose average)						
	GD90	0.85		1.01		1.14	
	GD140	1.12		1.37		1.57	
	CD3-/CD16+ (% of predose average)						
	GD90	0.91		0.89		1.21	
	GD140	0.99		0.88		1.40	

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		150	
Number of Animals:	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Adult Females: Peripheral Blood Mononuclear Cell Analysis Postpartum						
CD20+ (/µL)						
Prior to Mating	NA	1073.56	NA	1125.40	NA	1509.63
Predose	NA	984.22	NA	959.00	NA	1220.75
Predose Average	NA	1028.89	NA	1042.20	NA	1365.19
PPD7	NA	891.78	NA	780.40	NA	882.13
PPD28	NA	881.11	NA	703.10	NA	926.13
PPD91	NA	1207.00	NA	744.60	NA	876.63
PPD182	NA	1152.67	NA	904.40	NA	964.38
PPD273	NA	1243.11	NA	979.10	NA	1083.75
PPD365	NA	1046.78	NA	1040.30	NA	1232.13
CD20+/CD21+ (/µL)						
Prior to Mating	NA	452.56	NA	569.80	NA	650.50
Predose	NA	440.56	NA	454.20	NA	488.13
Predose Average	NA	446.56	NA	512.00	NA	569.31
PPD7	NA	326.67	NA	419.00	NA	402.00
PPD28	NA	356.11	NA	362.20	NA	405.38
PPD91	NA	557.22	NA	398.50	NA	379.38
PPD182	NA	563.00	NA	464.50	NA	442.50
PPD273	NA	626.11	NA	548.20	NA	533.63
PPD365	NA	484.22	NA	584.60	NA	597.00

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Adult Females:	**CD3+ (/µL)**						
	Prior to Mating	NA	4372.11	NA	4533.70	NA	5075.13
	Predose	NA	4062.44	NA	4247.20	NA	3741.38
	Predose Average	NA	4217.28	NA	4390.45	NA	4408.25
	PPD7	NA	3406.44	NA	4368.00	NA	4300.75
	PPD28	NA	2961.78	NA	4688.80	NA	4027.25
	PPD91	NA	3826.33	NA	4434.80	NA	4479.50
	PPD182	NA	3903.89	NA	4249.00	NA	4726.00
	PPD273	NA	4511.67	NA	3987.90	NA	3773.00
	PPD365	NA	4115.00	NA	4776.90	NA	3858.38
	CD3+/CD4+ (/µL)						
	Prior to Mating	NA	2350.11	NA	2366.60	NA	2615.75
	Predose	NA	2183.56	NA	2319.90	NA	2102.75
	Predose Average	NA	2266.83	NA	2343.25	NA	2359.25
	PPD7	NA	1820.33	NA	2411.60	NA	2389.75
	PPD28	NA	1629.11	NA	2498.60	NA	2341.75
	PPD91	NA	2122.89	NA	2388.20	NA	2524.25
	PPD182	NA	2120.11	NA	2444.00	NA	2679.75
	PPD273	NA	2568.11	NA	2295.50	NA	2409.38
	PPD365	NA	2163.00	NA	2501.30	NA	2247.50
	CD3+/CD8+ (/µL)						
	Prior to Mating	NA	1831.33	NA	2057.40	NA	2373.63
	Predose	NA	1805.67	NA	1868.70	NA	1493.50
	Predose Average	NA	1818.50	NA	1963.05	NA	1933.56
	PPD7	NA	1484.89	NA	1904.20	NA	1819.13
	PPD28	NA	1329.00	NA	2017.50	NA	1644.38
	PPD91	NA	1649.89	NA	2082.20	NA	1781.13
	PPD182	NA	1769.89	NA	2159.00	NA	1960.13
	PPD273	NA	2055.00	NA	1868.60	NA	1727.88
	PPD365	NA	1982.11	NA	2298.00	NA	1704.25

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Adult Females:	**Ratio CD4+:CD8+**						
	Prior to Mating	NA	1.34	NA	1.27	NA	1.18
	Predose	NA	1.29	NA	1.42	NA	1.40
	Predose Average	NA	1.32	NA	1.34	NA	1.29
	PPD7	NA	1.39	NA	1.24	NA	1.38
	PPD28	NA	1.48	NA	1.20	NA	1.42
	PPD91	NA	1.44	NA	1.20	NA	1.38
	PPD182	NA	1.22	NA	1.20	NA	1.38
	PPD273	NA	1.33	NA	1.10	NA	1.25
	PPD365	NA	1.22	NA	1.30	NA	1.25
	CD3-/CD14+ (/µL)						
	Prior to Mating	NA	324.78	NA	409.00	NA	427.50
	Predose	NA	507.78	NA	636.90	NA	422.88
	Predose Average	NA	416.28	NA	522.95	NA	425.19
	PPD7	NA	527.33	NA	1065.20	NA	1099.75
	PPD28	NA	266.89	NA	439.60*	NA	415.38
	PPD91	NA	318.67	NA	470.80	NA	442.63
	PPD182	NA	463.11	NA	436.00	NA	449.00
	PPD273	NA	349.00	NA	364.00	NA	320.00
	PPD365	NA	359.00	NA	418.10	NA	307.25
	CD3-/CD16+ (/µL)						
	Prior to Mating	NA	454.44	NA	515.70	NA	590.63
	Predose	NA	344.22	NA	505.50	NA	430.38
	Predose Average	NA	399.33	NA	510.60	NA	510.50
	PPD7	NA	440.22	NA	406.30	NA	509.63
	PPD28	NA	294.67	NA	402.40	NA	547.13
	PPD91	NA	321.22	NA	307.80	NA	386.75
	PPD182	NA	408.33	NA	422.00	NA	482.25
	PPD273	NA	501.89	NA	318.50	NA	361.00
	PPD365	NA	418.44	NA	492.20	NA	396.50

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0		5		150	
Number of Animals:	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Adult Females: Serum Immunoglobulins during Gestation (mg/mL)						
IgA						
Premate	21.76		23.32		15.60*	
Predose	17.38		13.72		15.40	
GD90	12.60		11.63		13.58	
GD140	12.94		17.32		20.58*	
IgE	No noteworthy findings.					
IgG	No noteworthy findings.					
IgM						
Premate	3.52		2.92		2.80	
Predose	3.14		2.36		2.95	
GD90	3.10		2.16		2.95	
GD140	4.24		3.11*		3.63	
Serum Immunoglobulins Postpartum (Groups 2, 4, and 6)	No noteworthy findings.					
Serum BLyS Levels (postpartum period)	· In the control group, BLyS levels remained close to the limit of detection throughout the postpatum period. · Higher Levels of BLyS were observed in the 5 mg/kg group at PPD91 and in the 150 mg/kg group at PPD182, but returned to baseline level by the following time point.					

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Fetus:	**No. Live Fetuses**	9	9	9	10	9	8
	No. Fetal Losses	2	1	4	2	0	3
	Embryo/Fetal Measurements by Ultrasound						
	Head circumference (mm)						
	GD49-GD52	43.35		43.55		43.59	
	GD89-GD91	108.05		108.93		110.76	
	GD114-GD116	140.88		139.73		141.11	
	GD140-GD142	156.50		152.62		147.01*	
	Occipitofrontal Diameter (mm)						
	GD49-GD52	14.59		14.65		14.65	
	GD89-GD91	35.82		35.84		37.61	
	GD114-GD116	48.22		48.26		47.89	
	GD140-GD142	54.26		51.13		48.78*	
	Placenta, Amniotic Fluid and Umbilical Cord Evaluation (GD150)						
	Secondary Disk Length (mm)	86.40	NA	55.00*	NA	71.00	NA
	Fetal Measurements (GD150)	No noteworthy findings (Groups 1, 3, and 5 evaluated)					
	Organ Weights (g)						
	Spleen	0.507	NA	0.374	NA	0.359	NA
	Skeletal Evaluations	No noteworthy findings (Fetal losses and Groups 1, 3, and 5 evaluated)					
	Histology	No noteworthy findings (Groups 1, 3, and 5 evaluated)					
	Immunohistochemistry Evaluation mean scores (scale of 0 = no staining to 4 = extensive intense staining)						
	CD20+						
	Inguinal lymph node	2.4	NA	1.8	NA	1.6	NA
	Mesenteric lymph node	2.8	NA	2.1	NA	1.9	NA
	Spleen	3.0	NA	2.8	NA	2.6	NA

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Infants:	**No. Evaluated**	NA	9	NA	10	NA	8
	Infant deaths	NA	0	NA	2	NA	1
	Postpartum Observations	No noteworthy findings					
	Clinical Observations	No noteworthy findings					
	Food consumption	No noteworthy findings					
	Body Weight (kg)	No noteworthy findings					
	Physical Examination	No noteworthy findings					
	Neurobehavioral Assessment	No noteworthy findings					
	Hematology						
	Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dL)						
	BD7	NA	33.65	NA	33.95	NA	35.22*
	BD28	NA	31.36	NA	33.54	NA	33.20
	BD91	NA	30.06	NA	30.69	NA	31.72
	BD182	NA	31.51	NA	31.46	NA	31.69
	BD273	NA	31.43	NA	31.67	NA	31.35
	BD365	NA	31.13	NA	31.75	NA	31.91
	White blood cell count (10^3/µL)						
	BD7	NA	5.98	NA	9.00	NA	8.60
	BD28	NA	7.78	NA	7.48	NA	12.83
	BD91	NA	14.60	NA	15.13	NA	17.24
	BD182	NA	16.57	NA	19.96	NA	19.33
	BD273	NA	14.61	NA	18.45	NA	18.37
	BD365	NA	14.48	NA	17.28	NA	21.87*
	Polysegmented neutrophils (/µL)						
	BD7	NA	1181.30	NA	3753.50	NA	2947.60
	BD28	NA	1476.60	NA	1731.40	NA	2326.80
	BD91	NA	3469.00	NA	3269.40	NA	3535.60
	BD182	NA	2672.70	NA	4244.10	NA	3703.40
	BD273	NA	3111.90	NA	5342.80	NA	3745.20
	BD365	NA	3168.80	NA	4082.40	NA	5876.40*

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Infants:	**Basophils (/µL)**						
	BD7	NA	42.50	NA	48.50	NA	69.20
	BD28	NA	34.40	NA	40.60	NA	110.50
	BD91	NA	79.80	NA	88.40	NA	119.00
	BD182	NA	138.00	NA	137.40	NA	167.00
	BD273	NA	71.50	NA	99.00	NA	128.00
	BD365	NA	52.20	NA	69.50	NA	114.40*
	Unclassified cells (/µL)						
	BD7	NA	20.00	NA	36.00	NA	36.60*
	BD28	NA	39.40	NA	29.20	NA	87.50
	BD91	NA	85.20	NA	109.40	NA	140.60
	BD182	NA	151.40	NA	185.60	NA	179.00
	BD273	NA	109.50	NA	193.80	NA	151.00
	BD365	NA	126.70	NA	172.50	NA	259.10
	Peripheral Blood Mononuclear Cell Analysis (absolute counts)						
	CD20+ (/µL)						
	BD7	NA	468.50	NA	186.33	NA	183.00
	BD28	NA	2835.75	NA	1105.20	NA	2896.00
	BD91	NA	3221.80	NA	2677.17	NA	4297.83
	BD182	NA	5176.33	NA	3749.43	NA	3759.67
	BD273	NA	3052.25	NA	3155.17	NA	3648.17
	BD365	NA	2745.11	NA	4287.13	NA	4480.71
	CD20+/CD21+ (/µL)						
	BD7	NA	325.00	NA	49.33	NA	85.50
	BD28	NA	1829.50	NA	463.80	NA	870.75
	BD91	NA	2163.80	NA	1651.67	NA	2494.67
	BD182	NA	3761.00	NA	2749.86	NA	2471.67
	BD273	NA	2312.38	NA	2349.00	NA	2417.33
	BD365	NA	1930.44	NA	1727.00	NA	2236.29

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Infants:	**CD3+ (/µL)**						
	BD7	NA	3651.75	NA	3991.33	NA	5063.50
	BD28	NA	5263.50	NA	5528.20	NA	8108.25
	BD91	NA	7497.40	NA	9778.67	NA	10918.83
	BD182	NA	10578.67	NA	12730.14	NA	11322.67
	BD273	NA	8658.50	NA	8797.00	NA	11082.83
	BD365	NA	6829.78	NA	8730.50	NA	9116.14
	CD3+/CD4+ (/µL)						
	BD7	NA	2802.25	NA	3124.00	NA	3982.75
	BD28	NA	3828.25	NA	4149.40	NA	5748.00
	BD91	NA	5179.80	NA	7262.17	NA	7589.00
	BD182	NA	6643.00	NA	7933.43	NA	7302.83
	BD273	NA	5975.75	NA	6530.17	NA	7485.33
	BD365	NA	5059.89	NA	5115.00	NA	6119.14
	CD3+/CD8+ (/µL)						
	BD7	NA	853.25	NA	856.00	NA	1114.00
	BD28	NA	1386.50	NA	1346.20	NA	2273.50
	BD91	NA	2454.20	NA	3302.50	NA	3275.83
	BD182	NA	3692.00	NA	4291.00	NA	3664.33
	BD273	NA	2948.75	NA	3565.00	NA	4138.83
	BD365	NA	2608.56	NA	3297.38	NA	3954.71*
	Ratio CD4+/CD8+						
	BD7	NA	3.55	NA	3.85	NA	4.08
	BD28	NA	2.86	NA	2.89	NA	2.81
	BD91	NA	2.12	NA	2.28	NA	2.40
	BD182	NA	1.86	NA	1.80	NA	1.92
	BD273	NA	1.98	NA	1.88	NA	1.87
	BD365	NA	2.00	NA	1.79	NA	1.60

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Infants:	**CD3-/CD14+ (/µL)**						
	BD7	NA	654.67	NA	859.67	NA	727.00
	BD28	NA	504.50	NA	440.60	NA	659.25
	BD91	NA	607.60	NA	592.50	NA	566.33
	BD182	NA	572.67	NA	610.29	NA	554.50
	BD273	NA	370.50	NA	605.00	NA	331.67
	BD365	NA	387.78	NA	427.50	NA	517.71
	CD3-/CD16+ (/µL)						
	BD7	NA	258.00	NA	133.33	NA	220.50
	BD28	NA	263.75	NA	314.00	NA	360.75
	BD91	NA	494.20	NA	490.83	NA	616.60
	BD182	NA	528.33	NA	795.57	NA	698.83
	BD273	NA	511.00	NA	674.67	NA	693.67
	BD365	NA	507.00	NA	610.25	NA	697.29

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Infants:	**Serum Immunoglobulins**						
	IgG (mg/mL)						
	BD7	NA	8.35	NA	7.93	NA	12.49*
	BD28	NA	5.46	NA	4.89	NA	7.12
	BD91	NA	6.16	NA	4.25	NA	4.22
	BD182	NA	6.11	NA	5.61	NA	6.36
	BD273	NA	6.22	NA	6.96	NA	7.01
	BD365	NA	7.83	NA	8.23	NA	8.94
	IgG (with belimumab bias adjustment) (mg/mL)						
	BD7	NA	8.35	NA	7.84	NA	11.13*
	BD28	NA	5.46	NA	4.86	NA	6.61
	BD91	NA	6.16	NA	4.19	NA	4.20
	BD182	NA	6.11	NA	5.61	NA	6.36
	BD273	NA	6.22	NA	6.96	NA	7.01
	BD365	NA	7.83	NA	8.23	NA	8.94
	IgM (mg/mL)						
	BD7	NA	368.64	NA	90.65*	NA	89.63*
	BD28	NA	314.24	NA	137.98	NA	243.95
	BD91	NA	323.11	NA	182.55*	NA	201.19
	BD182	NA	427.11	NA	345.95	NA	526.19
	BD273	NA	645.08	NA	466.63	NA	433.00
	BD365	NA	759.46	NA	562.84	NA	744.10

2.6.7.14. 生殖発生毒性試験：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（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):		0		5		150	
Number of Animals:		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Infants:	**Serum Chemistry**	No noteworthy findings					
	Coagulation	No noteworthy findings					
	Urinalysis	No noteworthy findings					
	Serum BLyS Levels	· BLyS levels were generally low at BD7. · Higher levels of BLyS were observed in the 5 mg/kg group at BD91 and in the 150 mg/kg group at BD182, and the BLyS levels were lower by the following time point. · In general higher BLyS concentrations were observed in infants compared to the adult females.					
	Gross Pathology	No noteworthy findings					
	Organ Weight and Ratios	No noteworthy findings					
	Histology	No noteworthy findings					

NA = Not applicable; NC = Not calculable (due to insufficient plasma concentration data); NQ = Not quantifiable (or below the lower limit of quantification);
GD = Gestation day; PPD = Postpartum day; BD = Birth day.
* Statistically significant difference from control group ($p \leq 0.05$) using an ANOVA model with Dunnett's/Dunn's test.

2.6.7.15. 新生児を用いた試験

該当する試験なし

2.6.7.16. 局所刺激性試験

2.6.7.16.1. 8 週間反復皮下投与局所刺激性試験

Test Article: Belimumab

Report Title: An 8-Week Subcutaneous Injection Local Tolerance Study with Belimumab in Cynomolgus Monkeys
Species / Strain: Cynomolgus Monkey **Duration of Dosing:** 3 doses (Days 1, 15, and 29) **Report No:** 2012N155098_00
Initial Age: 3 to 4 years **Study No:** 8246530
GLP Compliance: yes **Location in CTD:** 4.2.3.6
Date of 1st Dose: June 27, 2011 **Method of Administration:** Subcutaneous in ection on Days1, 15, and 29
Vehicle / Formulation: 0.65 mg/mL L-histidine, 1.2 mg/mL L-histidine monohydrochloride, [redacted], 5.3 mg/mL L-arginine hydrochloride, 0.1 mg/mL polysorbate 80, [redacted] (06-D)
Data Collected: Toxicokinetics, clinical observations, body weight, food consumption, flow cytometry (T- and B-lymphocyte subsets and monocytes), serum chemistry, hematology, coagulation, urinalysis, organ weights, skin biopsy

Dose (mg/kg):	0	1000
Number of Animals: Main	M:4	M: 4
Toxicokinetics:		
Cmax (µg/mL)		
Day1	NQ	2694 ± 326
Day15	NQ	3965 ± 732
Day29	NQ	4282 ± 767

2.6.7.16.1. 8 週間反復皮下投与局所刺激性試験（続き）

Test Article: Belimumab

Dose (mg/kg):	0	1000
Number of Animals: Main	M: 4	M: 4
Noteworthy Findings	· Belimumab was locally tolerated in cynomolgus monkeys following subcutaneous administration at a dose of 1000 mg/animal/dose on Days 1, 15, and 29 of the dosing phase. · Exposure to belimumab was demonstrated by measurement of peak and trough concentrations in serum. · Treatment related decreased absolute and relative B cell (CD20+) values were noted, with no change in lymphocyte count. This finding was related to the pharmacology of the test article and considered not adverse.	
Erythema score		
Dosing Day 1		
Very slight	2	2
Slight	0	1
Moderate	0	1
Dosing Day 29		
Very slight	1	0
Slight	0	0
Moderate	0	0
Peripheral Blood Mononuclear Cell Analysis:		
Absolute CD20+ (/µl)		
Predose Day 16	1950	1780
Predose Day 21	2020	1810
Postdose Day 33	2080	1470
Postdose Day 57	1880	1150
Relative CD20+ (%)		
Predose Day 16	27.13	21.72
Predose Day 21	25.68	20.05
Postdose Day 33	29.55	18.26
Postdose Day 57	30.05	13.95*

NQ = Not quantifiable (or below the lower limit of quantification).
* Statistically significant difference from control group ($p \leq 0.05$) using Student's t-test.

2.6.7.16.2. 単回又は 4 回反復皮下投与局所刺激性試験

Test Article: Belimumab

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)	No. /sex/group	Noteworthy Findings	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Cynomolgus Monkey	Subcutaneous	Single or Repeated (Days 1, 3, 5 and 7)	25 (lyophilized or liquid formulation)	3M, 3F	· The single or repeated (Days 1, 3, 5, and 7) SC administration of both the lyophilized and liquid formulations of belimumab at 25 mg/kg resulted in minimum dermal irritation and microscopic findings that are not considered to be attributed to belimumab. · Clinical observations were not attributed to treatment with belimumab. Body weight fluctuations were considered normal and not related to treatment. · Very slight erythema was recorded on the dermal irritation scores at one or more sites for 2 male and 2 female monkeys. This resulted from the repeated administration of the lyophilized placebo, liquid placebo, lyophilized belimumab, liquid belimumab, or saline. Additionally, desquamation was observed for 1 monkey following repeated administration of liquid belimumab. There were no instances of edema, atonia, fissuring, or eschar observed during the study. · There was no macroscopic or microscopic evidence of local tissue irritation attributed to the lyophilized or liquid formulation of belimumab at the subcutaneous injection sites following single (Day 7) or repeated (Days 1, 3, 5, and 7) injections. A variety of histomorphologic findings were present in the subcutaneous tissue and underlying muscle at the injection sites. These findings were usually of minimal or slight severity, did not differ appreciably between the placebo and test article injection sites, and occurred less frequently in the saline injection sites. · No gender-related differences in serum belimumab concentrations were observed after SC dosing with either formulation. · After the 1st subcutaneous dose of belimumab, the mean peak serum concentrations (measured prior to dosing on Day 3) were similar for both the lyophilized and liquid formulations, indicating that the rate of absorption was similar for the 2 formulations.	XD2010/ 00072/00 (6962-157)	4.2.3.6

2.6.7.17. その他の試験

2.6.7.17.1. 免疫原性試験

Test Article: Belimumab

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)	No. /sex/group	Noteworthy Findings	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Cynomolgus Monkey	Subcutaneous	13-weeks	0 (control), 1 (2x/week), 1 (4x/week)	5M, 5F	· SC injection of belimumab for 13 weeks followed by a 9-week recovery period was well tolerated. · There were no belimumab-related effects on clinical signs, body weight, or food consumption. · Belimumab significantly reduced the number of peripheral blood B cells (CD20+) in both dose groups. · Specific anti-belimumab antibodies were identified in 1 serum sample from 1 monkey; samples collected before and after the positive Day 71 sample were not confirmed to be positive in this monkey. The TK profile observed for this animal did not appear to be altered, suggesting the absence of a neutralizing antibody response. · No apparent gender-related differences in exposure were observed. · Following the Week 1 SC dosing of belimumab at 1mg/kg/dose by 2 dosing regimens, the mean Cmax, AUC(0-7d) and C7d values for a 4 times weekly schedule were 1.7-, 1.3-, and 1.9-fold higher than the corresponding values for a twice weekly schedule. · Following the Week 13 SC dosing, significant accumulation of serum belimumab exposure was observed as expected due to the dosing frequency (2 or 4 times weekly) and the long terminal half-life (8 to 11 days) in monkeys. By Week 8, steady state serum levels were achieved in cynomolgus monkeys. · The t1/2 after the last SC dose in Week 13 was 11 to 12 days.	XD2010/ 00073/00 (6962-161)	4.2.3.7.7

2.6.7.17.2. 組織交差反応性試験

Test Article: Belimumab

Species / Strain	Method of Administration	Concentration (μg/mL)	Noteworthy Findings	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Human and Cynomolgus monkey tissue	Ex vivo	Human tissue: 2, 10, 50, 225 Cynomolgus tissue: 2, 10 (all tissues), or 2, 10, 50, 225 (thyroid only)	· No specific staining was observed when anti-belimumab antibody was applied to any human tissue at any of the 4 concentrations tested. · There was no staining of thyroid tissue from the 2 cynomolgus monkeys at any of the 4 concentrations tested. There was a strong positive staining of zymogen granules in the pancreatic acinar cells from 1 of 4 cynomolgus monkeys. · There was light positive staining of the cervical epithelium from 1 of 3 cynomolgus monkeys. · There was no specific staining of any cynomolgus monkey tissues other than those noted above. · Belimumab-transfected and vector-transfected HEK293 cells served as positive and negative controls, respectively.	XH2010/ 00026/00 (00-116)	4.2.3.7.7.