ベンリスタ皮下注200mgオートインジェクター
ベンリスタ皮下注200mgシリンジ

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

2.6.1.　緒言
2.6.2.　薬理試験の概要文
2.6.3.　薬理試験概要表

グラクソ・スミスクライン株式会社

Aug 16 2017 11:23:32

非臨床概要 薬理試験の目次

	項目 - 頁
2.6.1. 緒言	2.6.1 - p.1
2.6.2. 薬理試験の概要文	2.6.2 - p.1
2.6.2.1. まとめ	2.6.2 - p.1
2.6.2.2. 効力を裏付ける試験	2.6.2 - p.3
2.6.2.3. 副次的薬理試験	2.6.2 - p.21
2.6.2.4. 安全性薬理試験	2.6.2 - p.23
2.6.2.5. 薬力学的薬物相互作用	2.6.2 - p.24
2.6.2.6. 考察及び結論	2.6.2 - p.24
2.6.2.7. 図表	2.6.2 - p.27
2.6.2.8. 参考文献	2.6.2 - p.27
2.6.3. 薬理試験概要表	2.6.3 - p.1
2.6.3.1. 薬理試験：一覧表	2.6.3 - p.1
2.6.3.2. 効力を裏付ける試験	2.6.3 - p.3
2.6.3.3. 副次的薬理試験	2.6.3 - p.3
2.6.3.4. 安全性薬理試験	2.6.3 - p.3
2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験	2.6.3 - p.3

2.6.1、2.6.2 及び 2.6.3 の略号等一覧

略語（略称）	内容
10F4	ハムスター抗マウス BLyS 抗体
12D6	膜結合型 BLyS を認識するマウスモノクローナル抗体
A01	ベリムマブ
ADCC	抗体依存性細胞介在性細胞傷害
APRIL	a proliferation-inducing ligand
BAFF	B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family
BCMA	B cell maturation antigen
BLyS	B リンパ球刺激因子
BR3	BLyS receptor 3
CAT002	ベリムマブのコントロール抗体（ヒト IgG1）
CDC	補体依存性細胞傷害
Cmax	最高血清中濃度
CRL	Charles River Laboratories
D08	ベリムマブの親抗体
dsDNA	二本鎖 DNA
EC50	50%反応濃度
ECL	電気化学発光
ELISA	酵素結合免疫吸着測定
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
FITC	フルオレセインイソシアネート
FLAG	エピトープタグ
HEK	ヒト胎児由来腎臓細胞株
HGS	Human Genome Sciences
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
ka	結合速度定数
kd	解離速度定数
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
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NK	ナチュラルキラー
PBMC	ヒト末梢血単核球
PBS	リン酸緩衝生理食塩液
PE	フィコエリスリン
PI	ヨウ化プロピジウム
SAC	Staphylococcus aureus Cowan I strain
SELENA-SLEDAI	safety of estrogens in lupus erythematosus national assessment version of the SLE disease activity index
SLE	全身性エリテマトーデス

2.6.1、2.6.2 及び 2.6.3 の略号等一覧（つづき）

略語（略称）	内容
ST486	バーキットリンパ腫由来細胞株
T2B	transitional 2 B
TACI	transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor
TNF	腫瘍壊死因子
TL1A	TNF-like ligand 1A
U937	ヒトリンパ腫由来細胞株

2.6.1. 緒言

全身性エリテマトーデス（SLE）等の自己免疫疾患では、その病態形成に自己反応性 B 細胞の活性化及び形質細胞への分化が重要な役割を果たすと考えられており[LaCava, 2013; 松下, 2005]、B 細胞を標的とした SLE 治療薬の開発が進められている。B リンパ球刺激因子（BLyS）は B 細胞のアポトーシスを抑制し、形質細胞への分化を促進させる蛋白質であり、SLE 患者の血漿中 BLyS 濃度は高く、BLyS 濃度と SLE の疾患活動性との間に関連性がみられること等から、SLE の病態形成及び疾患活動性に重要な役割を果たすと考えられている[Cheema, 2001; LaCava, 2013; Petri, 2008; Zhang, 2001; 松下, 2005]。

ベリムマブ（遺伝子組換え）（以下、ベリムマブ）は、BLyS に結合することによってその活性を阻害する完全ヒト型 IgG1 モノクローナル抗体であり、SLE に対する治療薬として期待される。

今回、「全身性エリテマトーデス（標準的な治療を受けており、自己抗体陽性で疾患活動性のある患者を対象とすること）」を効能・効果として承認申請を行った。

全身性エリテマトーデスにおける申請用法・用量は以下のとおりである。

【用法・用量】

通常、成人にはベリムマブ（遺伝子組換え）として、1 回 200 mg を 1 週間間隔で皮下注射する。

参考文献

Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, et al. Elevated serum lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. Arthritis Rheum. 2001;44:1313-9.

LaCava A. Targeting the BLyS-APRIL signaling pathway in SLE. Clin Immunol. 2013;148:322-7.

Petri M, Stohl W, Chatham M, et al. Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2008;58:2453-9.

Zhang J, Roschke V, Baker KP, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2001;166:6-10.

松下 貴史, 佐藤 伸一. BAFF と自己免疫性疾患. 日本臨床免疫学会会誌. 2005;28:333-42.

2.6.2. 薬理試験の概要文

2.6.2.1. まとめ

ベリムマブ（遺伝子組換え）（以下、ベリムマブ）は完全ヒト型 IgG1 モノクローナル抗体であり、腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリーの一種である B リンパ球刺激因子（BLyS）蛋白質に結合し、その活性を阻害する。

ベリムマブの生物学的プロファイルから、BLyS の病態や疾患活動性への関与が示唆されている全身性エリテマトーデス（SLE）等の自己免疫疾患の治療にベリムマブが有用である可能性が示され、SLE 患者に対する治療薬として臨床開発が進められた。海外では 2011 年以降、成人の SLE 患者に対する治療薬として、点滴静注用製剤が米国、カナダ及び欧州等で承認されている。また、皮下注用製剤については、米国及び欧州等の規制当局に対して承認申請中である。

今回、本邦において 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、BLyS に対する結合特性、種特異性並びに in vitro 及び in vivo における BLyS 中和作用を検討した。副次的薬理試験として、他の TNF スーパーファミリーへの結合性、ヒト及びカニクイザルの組織交差反応性並びに Fc 受容体への結合及び Fc を介する作用を検討した。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。

効力を裏付ける試験

In vitro 試験

ベリムマブの可溶型 BLyS への結合を ELISA 法で検討したところ、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 は 0.024 nM）。EC50 付近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 は 8.5 nM）。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）に発現する膜結合型 BLyS に対する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 には結合しなかった。ヒト PBMC を IFN-γ で処理することにより、単球（CD14 陽性）及び B 細胞（CD20 陽性）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 に対して結合しなかった。

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表面プラズモン共鳴法で検討したところ、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）。一方、マウス可溶型 BLyS にも結合したが、その KD はヒト可溶型 BLyS に比べて 10 倍高値であった。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 との結合を、ベリムマブはいずれも同程度の IC50 で阻害した（IC50 はそれぞれ 69、52 及び 97 nM）。

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 は 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 は 0.07 nM）。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脾細胞増殖を抑制した（IC50 は 0.06 nM）。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 であり、増殖促進作用は同程度であった。ベリムマブは、カニクイザル及びヒト BLyS（いずれも 2 ng/mL）によるマウス脾細胞増殖に対して同程度の抑制作用を示し（IC50 はそれぞれ 0.033 及び 0.046 nM）、ヒト BLyS（2 ng/mL）による初代培養ヒト B 細胞の増殖に対しても濃度依存的な抑制作用を示した（IC50 は 0.06 nM）。

In vivo 試験

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、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。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 回目の投与後では全例に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）の全例で抗ベリムマブ抗体が検出された。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、その減少は持続せず、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。

カニクイザルを用いた種々の毒性試験のうち 4 週間及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験では、50 mg/kg までの静脈内投与により、末梢血、脾臓及びリンパ節において持続的な B 細胞数の減少がみられた。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た。また、ベリムマブの 1 mg/kg を 13 週間皮下投与した免疫原性試験においても、持続的な末梢血総 B 細胞数の減少が認められた。

副次的薬理試験

ベリムマブは 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）に対して結合性を示さなかった。

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。一方、カニクイザルでは 34 種類の組織のうち膵臓及び子宮頸部に特異的な染色像がみられた。

ベリムマブは、IgG1 モノクローナル抗体で一般的にみられるのと同様に遺伝子組換えヒト FcRn 及び FcγRIIIa に結合したが、in vitro において ADCC 及び CDC を誘発しなかった。

安全性薬理試験

カニクイザルの 4 週間及び 6 ヵ月間反復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結果、ベリムマブを 50 mg/kg まで最長 6 ヵ月間反復静脈内投与しても、中枢神経系、呼吸系及び心血管系に影響は認められなかった。

2.6.2.2. 効力を裏付ける試験

SLE は 20～40 歳代の女性に好発し、主に核内の DNA 及び蛋白質に対する自己抗体と抗原の免疫複合体の組織沈着による全身性炎症性病変を特徴とする自己免疫疾患である[難病情報センター, 2015]。本邦における SLE の治療では通常、副腎皮質ステロイドが用いられ、ステロイド抵抗性の症例やステロイドの使用により重篤な副作用が発現する症例の場合、免疫抑制剤が使用される。しかし、免疫抑制剤を使用した場合でも骨髄抑制、出血性膀胱炎、卵巣機能不全及び発がん等の副作用がみられることから、より有効かつ安全な薬剤の開発が望まれている。

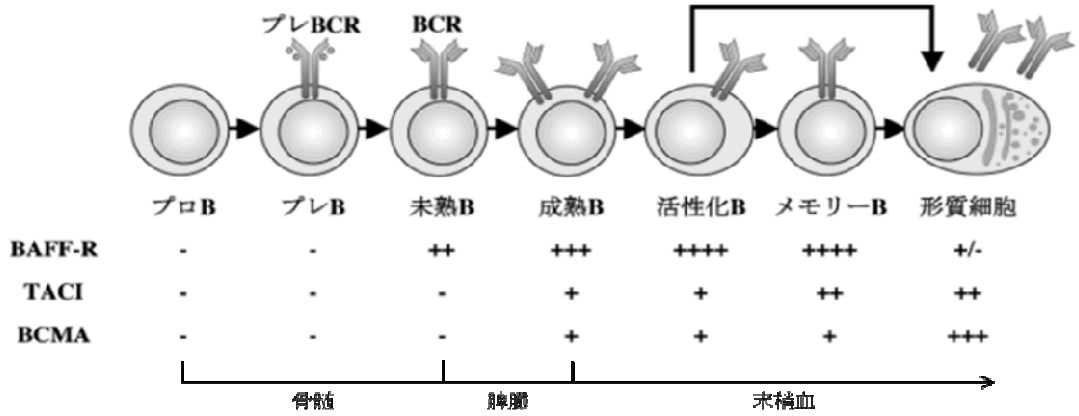
SLE をはじめとする自己免疫疾患では、その病態形成に自己反応性 B 細胞の活性化及び形質細胞への分化が重要な役割を果たすと考えられており[LaCava, 2013; 松下, 2005]、B 細胞を標的とした SLE 治療薬の開発が進められている。今回申請するベリムマブは、B 細胞の増殖を促進する BLyS に結合することによってその活性を阻害する薬剤であり、海外では既に SLE 治療薬として使用されている。

ベリムマブの標的である BLyS の特性及び SLE との関連性に関する報告について以下に概説する。

BLyS の特性

BLyS（B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family（BAFF）としても知られている）は TNF スーパーファミリーの一種であり、単球、マクロファージ及び樹状細胞等の骨髄由来細胞に発現する、285 個のアミノ酸残基からなる II 型膜結合蛋白質である[Goenka, 2014; LaCava, 2013; Moore, 1999]。膜結合型 BLyS はホモ 3 量体を形成した後、細胞外領域がフーリン様プロテアーゼによって切断され、152 個のアミノ酸残基からなる可溶型 BLyS に変換される[Cancro, 2009; Moore, 1999]。生理学的に活性型の BLyS は主に可溶型ホモ 3 量体であり[Bossen, 2011]、ベリムマブはこの可溶型 BLyS を認識する抗体として作製された。

BLyS（3 量体）は B 細胞に発現する 3 種類の膜結合型受容体（BR3（別名 BAFF 受容体）、TACI 及び BCMA）に結合する[LaCava, 2013; Cancro, 2009]。その中で BLyS の生理活性の発現に重要な受容体は BR3 である。BR3 は BLyS ホモ 3 量体と特異的に結合する受容体であり、骨髄に存在する分化初期段階の B 細胞であるプロ及びプレ B 細胞には発現せず、未熟 B 細胞以降の分化段階にある B 細胞に発現し、形質細胞の一部でも低レベルの発現がみられる[Goenka, 2014]。TACI 及び BCMA も成熟 B 細胞から形質細胞にわたって広範に発現するが、TACI は移行期 B 細胞及び短期生存型形質細胞に、BCMA はメモリーB 細胞及び形質細胞にそれぞれ高発現している[LaCava, 2013]。



BAFF-R：BR3

図 2.6.2-1　　B 細胞の分化と BLyS 受容体の発現

Data source: [松下, 2005]の図 2

BLyS は、主に可溶型 BLyS ホモ 3 量体と BR3 との結合を介して B 細胞の分化・生存・抗体産生を促進させ、恒常性を制御している[Cancro, 2009]。すなわち、BLyS は BR3 を介して、転写因子 NF-κB を 2 種類の経路（古典的及び非古典的経路）を介して活性化し、種々の抗アポトーシス蛋白質（A1/Bfl1、Bcl-xL 及び Bcl-2）の遺伝子発現を上昇させることで B 細胞の生存を維持すると考えられている[Bossen, 2006; Enzler, 2006; Kayagaki, 2002]。また、BLyS 欠損マウスでは脾臓 B 細胞数（全脾臓 B 細胞数、濾胞及び辺縁帯における B 細胞数及び T2 B 細胞数）の減少がみられる [Schiemann, 2001]のに対し、TACI 及び BCMA 欠損マウスでは成熟 B 細胞数及び辺縁帯における B 細胞数への影響は認められなかったことから、B 細胞の脾臓への移行及び成熟には主に BR3 受容体が関与していると考えられている[Tardivel, 2004]。BLyS のシグナル伝達における TACI 及び BCMA の役割は明確になっていないが、TACI 欠損マウスの表現型から、TACI はマウス B 細胞の分化を抑制する因子として働く可能性が示唆されている[Bossen, 2006]。また、BCMA は長期生存型形質細胞の生存・維持に重要な役割を担うと考えられている[O'Connor, 2004; Peperzak, 2013]。

BLyS と SLE との関連性

SLE 自然発症モデルである NZBWF1 マウス及び MRL-lpr/lpr マウスにおいて、末梢血 B 細胞数の増加が認められ、自己抗体の産生、蛋白尿及び糸球体腎炎等の SLE 様症状の発現に伴って血清 BLyS 濃度の上昇がみられた[Gross, 2000]。また、NZBWF1 マウスに BLyS 受容体融合蛋白質（BR3-Fc）を投与して BLyS 活性を阻害すると末梢血 B 細胞数が減少し、血清中の抗 dsDNA 抗体価が低下するだけではなく、SLE 様症状の進行が抑制されて生存率も上昇した[Kayagaki, 2002]。

SLE 患者の血清又は血漿中の BLyS 濃度は健康被験者の BLyS 濃度と比較して有意に高く、BLyS 濃度の上昇と抗 dsDNA 抗体値、IgG 又は IgA 濃度の上昇並びに SELENA-SLEDAI 疾患活動性スコアとの間に関連性がみられた[Petri, 2008; Cheema, 2001; Zhang, 2001]。また、SLE 患者では B 細胞のサブセットのうち移行期 B 細胞、メモリーB 細胞及び形質細胞の増加が認められた[Paran, 2015]。

これらの非臨床及び臨床の知見から、BLyS は SLE の病態形成及び疾患活動性に重要な役割を果たすことが示され、BLyS の活性を阻害するベリムマブは SLE の治療薬として期待される。

2.6.2.2.1. In vitro 試験

ベリムマブは、ファージディスプレイライブラリーからヒト BLyS に対する結合親和性に基づいて選別された親抗体（D08）を親和性成熟させることによって得られた遺伝子組換え完全ヒト型 IgG1λ モノクローナル抗体である。

本項では、ベリムマブ（A01）の BLyS への結合特性及び BLyS によって誘発される B 細胞増殖に対する抑制作用についての試験成績を示した。本項に記載した試験にはすべて一本鎖抗体ではなく、完全長 IgG1λ 抗体であるベリムマブを用いた。

2.6.2.2.1.1. 可溶型 BLyS に対する結合性

方法

試験 1：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 への種々の濃度のベリムマブ（0.00000667～66.7 nM）の結合性を、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いた ELISA 法により検討し、濃度結合曲線から EC50 を算出した（XH2010/00015/00）。

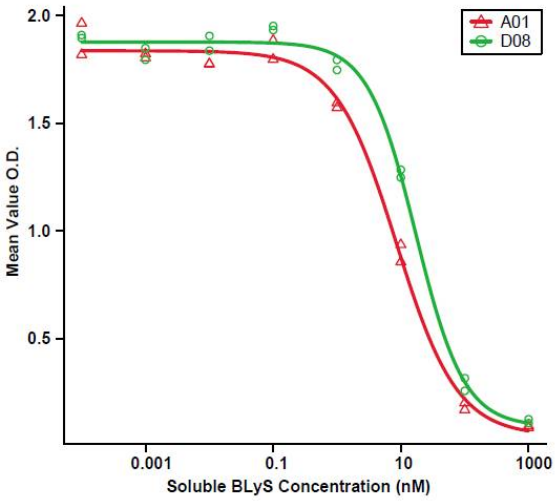
試験 2：ストレプトアビジン被覆プレート上にビオチン化可溶型 BLyS を固定化し、種々の濃度の可溶型 BLyS（0.0001～1000 nM）及び試験 1 で得られた EC50 付近の濃度のベリムマブを添加した後、試験 1 と同様の方法でビオチン化可溶型 BLyS に結合したベリムマブを検出した。プレート上に固定化したビオチン化可溶型 BLyS への結合量の減少を指標に、溶液中の可溶型 BLyS に対する結合性を評価した。

結果

試験 1：ベリムマブはプレート上に固定化したビオチン化可溶型 BLyS に対して濃度依存的に結合し、その EC50 は 0.024 nM（n=2）であった。

試験 2：プレート上に固定化したビオチン化可溶型 BLyS とベリムマブとの結合は添加した可溶型 BLyS の濃度依存的に阻害され（図 2.6.2-1）、その IC50 は 8.5 nM（n=2）であった。

いずれの試験においても、ベリムマブが可溶型 BLyS を認識することが示された。



縦軸：吸光度（波長 450 nm）の平均値、横軸：添加した可溶型 BLyS 濃度
A01：ベリムマブ、D08：ベリムマブの親抗体
結合阻害試験（n=2）

図 2.6.2-2　固定化した可溶型 BLyS へのベリムマブ結合に対する可溶型 BLyS 添加による阻害作用（試験 2）

Data source: XH2010/00015/00 の Figure 2

2.6.2.2.1.2.　膜結合型 BLyS に対する結合性

BLyS は細胞膜上に膜結合型 BLyS として存在するが、細胞外領域がフーリン様プロテアーゼで切断されて可溶型 BLyS になる[Moore, 1999; Schneider, 1999]。ベリムマブは可溶型 BLyS を認識する抗体として作製されたが、膜結合型 BLyS に対しても結合するか否かを、2 種類の方法で検討した。

方法

試験 1：膜結合型 BLyS を発現するヒト慢性骨髄性白血病由来 K-562 細胞株を用いて、ベリムマブの膜結合型 BLyS への結合性を標準的なフローサイトメトリー法により検討した（XH2010/00016/00）。K-562 細胞株にビオチン化したベリムマブ又は陽性及び陰性対照抗体を添加した後、フィコエリスリン標識ストレプトアビジン（ストレプトアビジン-PE）を添加した。PE 蛍光強度の幾何平均値を算出し、各抗体の膜結合型 BLyS に対する結合能を評価した。

試験 2：正常細胞の膜結合型 BLyS に対するベリムマブの結合能を検討するために、3 名の異なるドナー由来のヒト 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）に対するベリムマブの結合性をフローサイトメトリー二色法で解析した（XH2010/00016/00）。IFN-γ 処理により単球の細胞表面に BLyS の発現が誘導されることから[Nardelli, 2001]、PBMC を IFN-γ の存在下及び非存在下でインキュベートして抗体の結合能を比較した。すなわち、IFN-γ の存在下及び非存在下で PBMC にビオチン化ベリムマブ又は陽性及び陰性抗体並びに種々の細胞系列マーカーに対する特異的抗体（フルオレセインイソシアネート（FITC）標識抗 CD3（T 細胞）、抗 CD14（単球）、抗 CD20（B 細胞）、抗

CD56（NK 細胞）抗体）を添加した後、ストレプトアビジン-PE を添加して二重染色した。PE 蛍光強度の幾何平均値を算出し、抗体の各細胞系列への結合能を評価した。

なお、試験 1 及び 2 のいずれにおいても、陽性対照として細胞表面の膜結合型 BLyS を認識することが知られているマウスモノクローナル抗体 12D6 を、陰性対照としてヒト IgG1 及びマウス IgG1 を用いた。

結果

試験 1：K-562 細胞株を陽性対照の 12D6 で処理したときの蛍光強度の幾何平均値は、陰性対照のマウス IgG1 で処理したときと比較して有意に高かったことから、K-562 細胞株は膜結合型 BLyS を発現していることが確認された（表 2.6.2-1）。一方、ベリムマブで処理したときの蛍光強度の幾何平均値はヒト IgG1 陰性抗体と比較して低く、ベリムマブの膜結合型 BLyS への結合は検出されなかった。

試験 2：3 名中 2 名のドナーから採取した PBMC では、無刺激の単球及び B 細胞における 12D6 処理群の蛍光強度の幾何平均値がマウス IgG1 群と比較して有意に高く、その値は IFN-γ 刺激群では更に高値であった（表 2.6.2-2）。このことから、単球及び B 細胞は膜結合型 BLyS を発現しており、その発現は IFN-γ により上昇することが確認された。一方、ベリムマブで処理したときの蛍光強度の幾何平均値は、3 名のドナーから採取した PBMC 画分中の 4 種類のいずれの細胞系列に対しても、IFN-γ 刺激の有無に関わらず陰性対照と比較して同程度又は低く、ベリムマブの PBMC の膜結合型 BLyS への結合は検出されなかった。

ベリムマブは骨髄系細胞である K-562 細胞株及び PBMC のいずれにおいても、細胞表面に発現する膜結合型 BLyS を認識しなかった。

表 2.6.2-1　　K-562 細胞株における膜結合型 BLyS に対する結合性（試験 1）

抗体	蛍光強度の幾何平均値
ヒト IgG1 (陰性対照)	7.19
ベリムマブ	5.26
マウス IgG1 (12D6 の陰性対照)	3.48
12D6 (陽性対照)	6.34

n=1、12D6：膜結合型 BLyS を認識するマウスモノクローナル抗体
Data source: XH2010/00016/00 の Figure 1

表 2.6.2-2　　ヒト PBMC 画分中の細胞系列の膜結合型 BLyS に対する結合性（試験 2）

細胞系列[#]	IFN-γ	各抗体存在下での蛍光強度の幾何平均値			
		ヒト IgG1 (陰性対照)	ベリムマブ	マウス IgG1 (陰性対照)	12D6 (陽性対照)
T 細胞	-	1.78	1.76	2.24	1.99
	+	1.84	1.72	2.38	3.02
単球	-	4.06	3.29	2.93	9.20
	+	8.46	5.13	3.87	21.55
B 細胞	-	1.60	1.67	1.95	3.62
	+	1.99	2.38	2.44	9.52
NK 細胞	-	3.35	3.31	3.06	3.48
	+	3.72	3.56	3.43	2.88

[#]：3 名のドナーのうち 1 名の成績を示した
Data source: XH2010/00016/00 の Figure 2 及び 3

BLyS に対する結合性のまとめ

ベリムマブは可溶型 BLyS に高親和性で結合することが示された。一方、ヒト膜結合型 BLyS に対する結合は検出されなかった。

2.6.2.2.1.3. 種特異性

ヒト及びカニクイザル可溶型 BLyS はいずれも 152 個のアミノ酸残基からなり、その同一性は 98%、受容体結合部位のアミノ酸配列は同一である（XH2010/00019/00）。一方、ヒトとマウス可溶型 BLyS のアミノ酸配列の同一性は 86%であり[Schneider, 1999]、受容体結合部位のアミノ酸配列にも数ヵ所の相違がみられる[Kim, 2003]。そこで、マウス、カニクイザル及びヒトの可溶型 BLyS に対するベリムマブの結合親和性を比較した。

2.6.2.2.1.3.1. ヒト可溶型 BLyS に対する結合親和性

方法

ヒト可溶型 BLyS に対するベリムマブの結合親和性を、表面プラズモン共鳴法により解析した（XH2010/00017/00）。センサーチップ表面に固定化した Protein A にリガンドとしてベリムマブを結合させた後、種々の濃度の BLyS（89～196000 pM）を流路に注入し、固定化したベリムマブと可溶型 BLyS との分子間相互作用を経時的にモニターすることによって、結合速度定数（ka）及び解離速度定数（kd）並びに解離定数（KD）を算出した。

結果

ベリムマブはヒト可溶型 BLyS に対して 1:1 のモル比で結合し、その解離定数（kd/ka=KD）は 267 pM であった（表 2.6.2-3）。

表 2.6.2-3 ヒト可溶型 BLyS に対する結合速度及び解離速度定数並びに解離定数

抗体	結合速度定数 ka (10^6 $M^{-1}s^{-1}$)	解離速度定数 kd (10^{-4} s^{-1})	KD (pM)
ベリムマブ	1.26±0.136	3.32±0.631	267±70

平均値±標準偏差 (n=3)
Data source: XH2010/00017/00 の Table 1

2.6.2.2.1.3.2. カニクイザル可溶型 BLyS に対する結合親和性

方法

ヒト及びカニクイザル可溶型 BLyS に対する結合親和性を 2.6.2.2.1.3.1.と同様の方法で算出し（2 試験；試験 1（XH2010/00018/00）及び試験 2（XH2010/00019/00））、結合親和性（KD）を比較した。なお、試験 1 では、8 個のアミノ酸残基からなる FLAG で標識したヒト及びカニクイザル可溶型 BLyS を使用した。

結果

ベリムマブはいずれの試験においても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（KD は 250～338 pM）の親和性で結合した（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-4　　ヒト及びカニクイザル可溶型 BLyS に対する結合親和性

試験	KD (pM) (平均(95%信頼区間))	
	ヒト BLyS	カニクイザル BLyS
試験 1 (n=5)	274 (128 - 420)	264 (29 - 499)
試験 2 (n=3)	250 (112 - 388)	338 (101 - 575)

Data source: XH2010/00018/00 の Appendix9.1 及び XH2010/00019/00 の Table 3-1

2.6.2.2.1.3.3.　　マウス可溶型 BLyS に対する結合親和性

方法

2.6.2.2.1.3.1.と同様の方法で、ヒト及びマウス可溶型 BLyS に対するベリムマブの KD を算出して比較した（XH2010/00020/00）。

結果

ベリムマブはヒト及びマウスの可溶型 BLyS に対して 1:1 のモル比で結合した。マウス可溶型 BLyS に対するベリムマブの KD は 9480 pM であり、ヒト可溶型 BLyS に対する KD（993 pM）より約 10 倍高値であった（表 2.6.2-5）。

表 2.6.2-5　　マウス可溶型 BLyS に対する結合親和性

BLyS	KD (pM)
マウス	9480±4550
ヒト	993±579

平均値±標準偏差 (マウス: n=3、ヒト: n=4)
Data source: XH2010/00020/00 の Table 6-1

種特異性のまとめ

ベリムマブはヒト及びカニクイザル可溶型 BLyS と同程度の高い親和性で結合することが示された。また、ベリムマブはマウス可溶型 BLyS にも結合するものの、その親和性はヒト可溶型 BLyS の約 1/10 であることが示された。

2.6.2.2.1.4.　　ヒト BLyS 受容体と可溶型 BLyS との相互作用の阻害

方法

BLyS は B 細胞に発現する 3 種類の受容体（BR3、TACI 及び BCMA）に結合することが知られている[LaCava, 2013; Cancro, 2009]。本試験では、3 種類のヒト BLyS 受容体と可溶型 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評価した（HG19399.SLE.0.050）。センサーチップ表面に固定化した Protein A に、免疫グロブリンの Fc 領域を融合させた 3 種類のヒト BLyS 受容体細胞外ドメイン（BR3-Fc、TACI-Fc 及び BCMA-Fc）を結合させ、BLyS（2.5 又は 5 μg/mL）及び種々の濃度のベリムマブ（0～133 nM）の混合溶液を注入して、各 BLyS 受容体細胞外ドメインに結合した BLyS 量を測定した。

結果

濃度結合曲線から IC50 を算出すると、BR3、TACI 及び BCMA と可溶型 BLyS との結合に対するベリムマブの阻害作用（IC50）はいずれも同程度であった（表 2.6.2-6）。

表 2.6.2-6　　ヒト BLyS 受容体と可溶型 BLyS との相互作用に対する阻害作用

受容体	IC50 (nM)
BR3	69
TACI	52
BCMA	97

n=1
Data source: HG19399.SLE.0.050 の Table 3-3

2.6.2.2.1.5.　　BLyS による細胞増殖に対する作用

2.6.2.2.1.5.1.　　ヒト BLyS によるマウス脾細胞増殖に対する影響

方法

マウス脾細胞を種々の濃度のヒト BLyS（0.0005～100 nM）及び B 細胞刺激因子である SAC 存在下で、37℃、72 時間培養し、[^{3}H]標識チミジンを添加して更に 20～24 時間培養した。細胞への[^{3}H]標識チミジン取込みを指標として細胞増殖能を測定した（XH2010/00021/00）。同じ条件で、ベリムマブ（0.1 nM）又は陰性対照抗体のヒト IgG1（0.1 nM）存在下での細胞増殖能を測定し、抗体非存在下での増殖能と比較した。また、種々の濃度のベリムマブ（0.0005～100 nM）存在下で BLyS（0.06 nM）のマウス脾細胞増殖能を測定し、細胞増殖最大反応を 50%抑制するベリムマブ濃度（IC50）を算出した。

結果

ヒト BLyS は濃度依存的にマウス脾細胞の増殖を誘導し、その EC50 は 0.004 nM であった（表 2.6.2-7）。陰性対照抗体存在下での BLyS の EC50 は 0.006 nM であり、抗体非存在下での EC50 と同程度であった。一方、ベリムマブ存在下では BLyS の EC50（0.07 nM）は抗体非存在下と比較して約 18 倍高濃度であった。また、ベリムマブは濃度依存的にヒト BLyS（0.06 nM）による脾細胞増殖を抑制し、その IC50 は 0.06 nM であった（表 2.6.2-8）。

表 2.6.2-7　　ヒト BLyS によるマウス脾細胞増殖に対する作用（EC50）

抗体		EC50 (nM)
種類	濃度 (nM)	
-	-	0.004±0.001
ヒト IgG1 (陰性対照抗体)	0.1	0.006±0.002
ベリムマブ	0.1	0.07±0.05

平均値±標準誤差 (n=3)
Data source: XH2010/00021/00 の Figure 1, 2 及び 3

表 2.6.2-8　　ヒト BLyS によるマウス脾細胞増殖に対する抑制作用（IC50）

抗体	IC50 (nM)
ベリムマブ	0.06±0.01

平均値±標準誤差 (n=3)
Data source: XH2010/00021/00 の Table 4

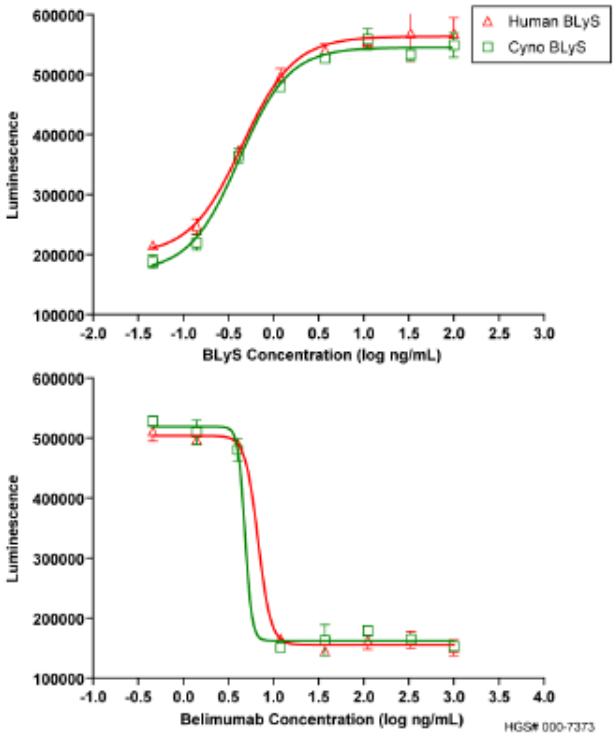
2.6.2.2.1.5.2.　　カニクイザルの BLyS によるマウス脾細胞増殖に対する作用

方法

カニクイザル BLyS によるマウス脾細胞の増殖に対するベリムマブの影響を検討し、ヒト BLyS に対する影響と比較した（XH2010/00019/00）。ベリムマブ非存在下で、マウス脾細胞をヒト又はカニクイザル BLyS（0.046～100 ng/mL）及び B 細胞刺激因子である SAC とともに 37℃で 72 時間培養した後、CellTiter-Glo アッセイにより生細胞数を計測した。また、同様の方法で、種々の濃度のベリムマブ（0.46～1000 ng/mL）存在下でヒト又はカニクイザル BLyS（2 ng/mL）のマウス脾細胞増殖能を測定し、細胞増殖最大反応を 50%抑制するベリムマブ濃度（IC50）を算出した。

結果

カニクイザル BLyS は、ヒト BLyS と同程度のマウス脾細胞増殖促進作用を示し（図 2.6.2-3 上図）、その EC50 はそれぞれ 0.41 及び 0.45 ng/mL であった。ベリムマブは、カニクイザル又はヒト BLyS（いずれも 2 ng/mL）によるマウス脾細胞増殖に対して濃度依存的な抑制作用を示し（図 2.6.2-3 下図）、その IC50 はそれぞれ 4.8 及び 6.7 ng/mL（0.033 及び 0.046 nM）であった。



縦軸：発光量（relative luminescence units: RLU）（平均値±標準誤差、n=3）
上図：カニクイザル又はヒト BLyS によるマウス脾細胞増殖
下図：カニクイザル又はヒト BLyS（2 ng/mL）によるマウス脾細胞増殖に対するベリムマブの抑制作用

図 2.6.2-3　　カニクイザル又はヒト BLyS によるマウス脾細胞増殖に対する抑制作用

Data source: XH2010/00019/00 の Figure 3-3 及び 3-4

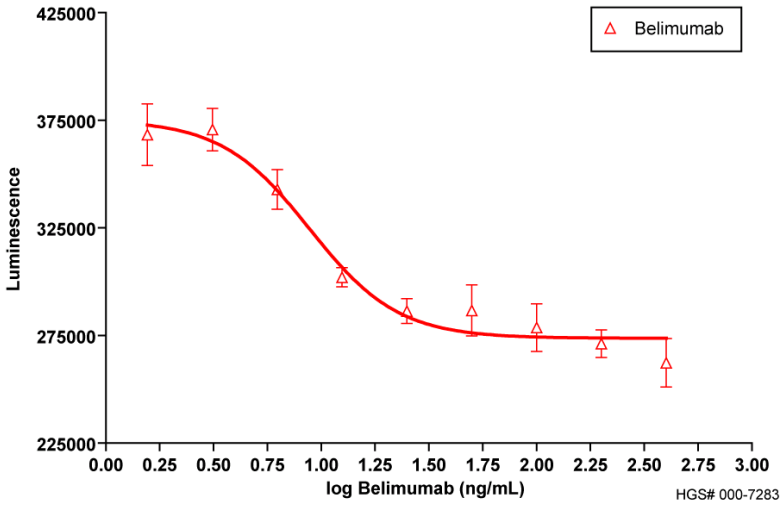
2.6.2.2.1.5.3. ヒト BLyS による初代培養ヒト B 細胞の増殖に対する作用

方法

ヒト PBMC から単離した初代培養 B 細胞を、ベリムマブ（1.56～400 ng/mL）存在下でヒト BLyS（2 ng/mL）及び B 細胞刺激因子である SAC とともに 37℃で 72 時間培養した後、CellTiter-Glo アッセイにより生細胞数を計測し、増殖抑制作用の IC50 を算出した（XH2010/00023/00）。

結果

ベリムマブはヒト PBMC から単離した B 細胞のヒト BLyS（2 ng/mL）による増殖を濃度依存的に抑制し、その IC50 は 8.8 ng/mL（0.06 nM）であった（図 2.6.2-4）。



縦軸：発光量（relative luminescence units: RLU）（平均値±標準誤差、n=3）

図 2.6.2-4 ヒト BLyS による B 細胞増殖に対する抑制作用

Data source: XH2010/00023/00 の Figure 3-5

BLyS による細胞増殖に対する作用のまとめ

ベリムマブは、カニクイザル及びヒト BLyS によるマウス脾細胞増殖に対して同程度の抑制作用を示し、ヒト BLyS による初代培養ヒト B 細胞の増殖に対しても濃度依存的な抑制作用を示した。

2.6.2.2.2. In vivo 試験

2.6.2.2.2.1. ヒト BLyS 投与マウスにおけるベリムマブの作用

マウスにヒト BLyS を投与すると脾臓重量、脾臓 B 細胞数及び血清中免疫グロブリン（IgM 及び IgA）濃度の増加がみられる[Moore, 1999]。そこで、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。

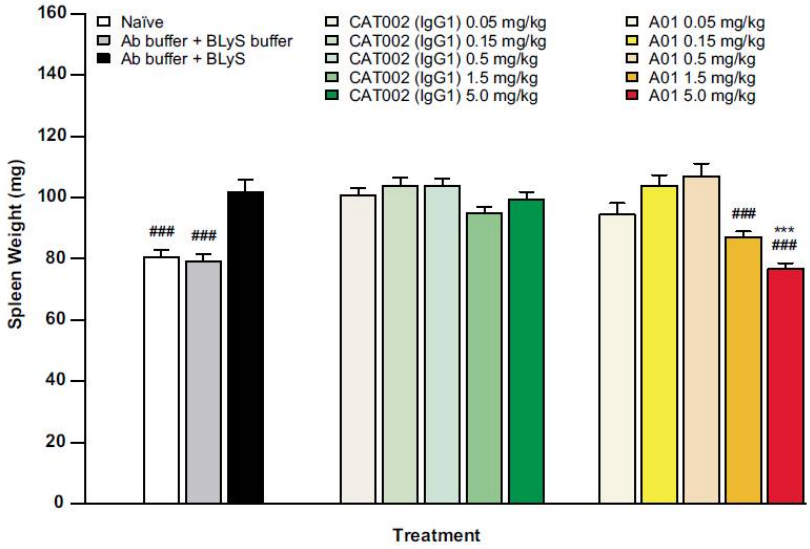
方法

雌 BALB/c マウス（10 匹／群）にヒト BLyS（0.3 mg/kg）を試験 1～4 日目に 1 日 1 回皮下投与し、試験 1 及び 3 日目に種々の用量のベリムマブ（0.05、0.15、0.5、1.5 及び 5 mg/kg）又は同じ用量の陰性対照抗体（CAT002：ヒト IgG1）を静脈内投与した

（XH2010/00024/00）。また、その他にも対照として無処置（ナイーブ）群、BLyS の媒体／抗体の媒体群及び BLyS／抗体の媒体群を設定した。試験 5 日目にマウスの脾臓重量及び脾臓 B 細胞（$B220^{+}/ThB^{+}$細胞）数（フローサイトメトリー法）、血清中 IgA 濃度（ELISA 法）を測定し、それらに対するベリムマブの作用を評価した。

結果

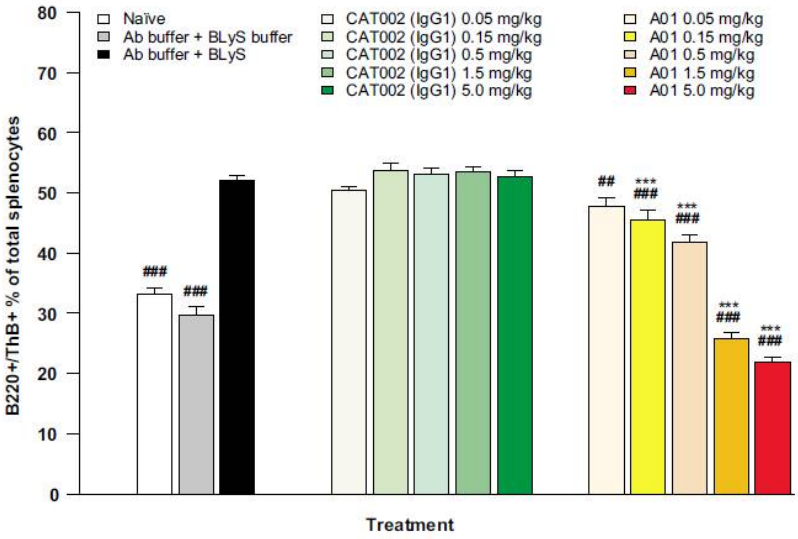
ベリムマブは 1.5 及び 5.0 mg/kg の静脈内投与によりヒト BLyS による脾臓重量の増加を抑制し、5.0 mg/kg を投与したときの脾臓重量は対照抗体と比較して有意に低値であった（図 2.6.2-5）。また、ヒト BLyS による脾臓 B 細胞数及び血清中 IgA 濃度の増加に対しては、0.15 mg/kg 以上の用量で対照抗体と比較して有意に抑制した（図 2.6.2-6 及び図 2.6.2-7）。



A01：ベリムマブ、CAT002：コントロール抗体（ヒト IgG1）
縦軸：脾臓重量（平均値±標準誤差、n=10）
###：p<0.001 vs BLyS/抗体の媒体群 (Pairwise comparison test)
***：p<0.001 vs 各用量のコントロール抗体 (Pairwise comparison test)

図 2.6.2-5　　ヒト BLyS 投与マウスの脾臓重量増加に対するベリムマブの抑制作用

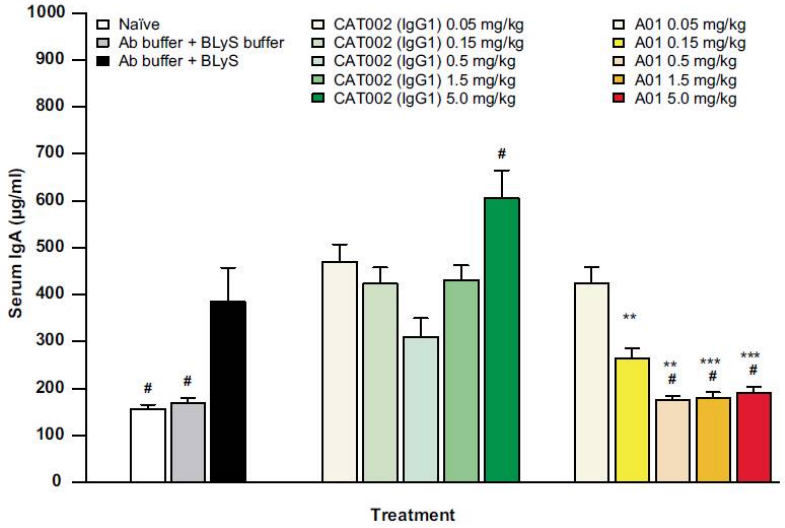
Data source: XH2010/00024/00 の Figure 1



A01：ベリムマブ、CAT002：コントロール抗体（ヒト IgG1）
縦軸：総脾細胞数に対する脾臓 B 細胞（$B220^{+}/ThB^{+}$）数の割合（平均値±標準誤差、n=10）
##及び###：$p<0.01$ 及び $p<0.001$ vs BLyS/抗体の媒体群 (Pairwise comparison test)
***：$p<0.001$ vs 各用量のコントロール抗体 (Pairwise comparison test)

図 2.6.2-6　　ヒト BLyS 投与マウスの脾臓 B 細胞数増加に対するベリムマブの抑制作用

Data source: XH2010/00024/00 の Figure 2



A01：ベリムマブ、CAT002：コントロール抗体（ヒト IgG1）
縦軸：血清 IgA 濃度（平均値±標準誤差、n=10）
#：$p<0.05$ vs BLyS/抗体の媒体群 (Pairwise comparison test)
,*：$p<0.01, 0.001$ vs 各用量のコントロール抗体 (Pairwise comparison test)

図 2.6.2-7　　ヒト BLyS 投与マウスの血清中 IgA 濃度増加に対するベリムマブの抑制作用

Data source: XH2010/00024/00 の Figure 3

まとめ

ベリムマブはマウスにおいてヒト BLyS の投与により誘発される影響（脾臓重量及び脾臓 B 細胞数の増加、並びに血清中 IgA 濃度の増加）に対して抑制作用を示した。

2.6.2.2.2.2. マウスにおけるベリムマブの作用

ベリムマブはヒト及びサルの可溶型 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、マウスにベリムマブを投与して薬理作用を評価した（XH2010/00025/00）。試験 1 ではマウスにベリムマブ（10 mg/kg）を静脈内投与することにより、血中 B 細胞数に対するベリムマブの作用を検討した。その結果、ベリムマブの 2 回目の投与後に数例の死亡がみられた。そこで、試験 2 では、マウスにベリムマブ（5 mg/kg）を静脈内又は腹腔内投与して、血中 B 細胞数に及ぼす影響並びに血清中ベリムマブ濃度及び抗ベリムマブ抗体産生の有無について検討した。

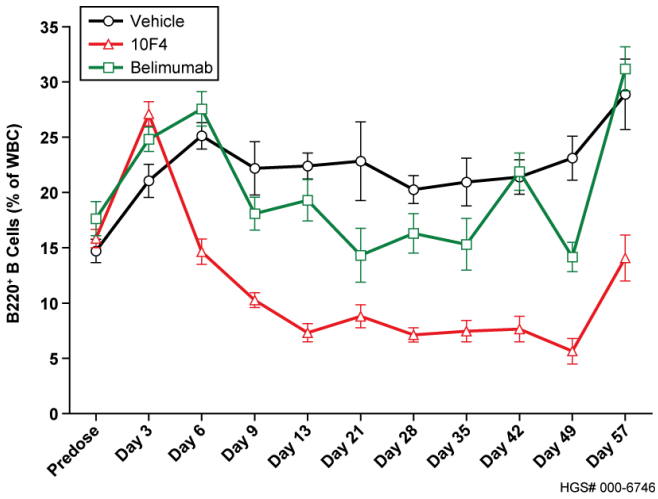
試験 1

BALB/c マウスを 3 群に分け（15 匹／群）、媒体（リン酸緩衝生理食塩液（PBS））、ハムスター抗マウス BLyS 抗体 10F4 又はベリムマブ（いずれも 10 mg/kg）をそれぞれ試験 0、14 及び 28 日目に静脈内投与し、57 日目まで経過観察した。試験 0、3、6、9、13、21、28、35、42、49 及び 57 日目に採血し、フローサイトメトリー法により総白血球数に対する CD220（CD45R）陽性 B 細胞数の割合（%）を算出した。

2 回目投与時（試験 14 日目）に、投与約 30 分後に 8 例（ベリムマブ投与群の 6 例及び 10F4 投与群の 2 例）が死亡したが、剖検及び採血は実施しなかった。3 回目投与時（試験 28 日目）においては、すべてのマウスが呼吸困難の症状を呈したものの 2 時間以内に回復し、死亡はみられなかった。

ベリムマブ投与群では媒体群と比べて、試験 9～35 日目に血中 B 細胞数の減少がみられたが、それ以降では B 細胞数減少作用は減弱した（図 2.6.2-8）。10F4 投与群では、より早期（試験 6 日目）から B 細胞数の減少がみられ、試験 49 日目（3 回目の投与 21 日後）までその作用は持続した。個別データをみると、ベリムマブ投与群のほとんどの動物で初回投与後に B 細胞数の減少がみられたものの、2 回目の投与後に死亡した動物の半数（3 例）では、試験 13 日目において B 細胞数の減少は持続しておらず、早期に B 細胞数のリバウンドがみられた。このことから、ベリムマブ投与群では中和抗体の出現により、ベリムマブの作用の持続性に影響がみられた可能性が示唆された。

そこで、試験最終日（57 日目）のベリムマブ投与群の生存例（4 例）の血清サンプルを用いた電気化学発光（ECL）法（免疫原性アッセイ）により、抗ベリムマブ抗体が存在するか否かについて検討した。なお、本アッセイにおける抗ベリムマブ抗体の検出感度は約 50 ng/mL であり、ECL カウントが約 550 を超えた動物を陽性とした。陰性対照として媒体及び 10F4 投与群の血清サンプルを測定した。その結果、ベリムマブ投与群の 4 例の血清サンプルの ECL カウントはすべて陽性（2627～83622）であり、陰性対照群（すべて陰性：媒体投与群（n=10）173～510、10F4 投与群（n=7）177～391）に比べて顕著に高値を示した。なお、本試験を実施した段階では抗 10F4 抗体の検出方法は確立していなかったため、10F4 に対する中和抗体が存在するか否かは不明であった。



Vehicle：PBS
10F4：ハムスター抗マウス BLyS 抗体
縦軸：総白血球数に対する B 細胞数（B220 陽性細胞数）の割合 (%)（平均値±標準誤差）
試験開始時は n=15、投与 14 日目以降のベリムマブ投与群は 4 匹、10F4 群は 8 匹、媒体群は 10 匹

図 2.6.2-8　　マウスの総白血球数に対する CD220 陽性 B 細胞数の割合に対する作用（試験 1）

Data source: XH2010/00025/00 の Figure 2

試験 2

抗 BLyS 抗体（ベリムマブ及び 10F4）の静脈内投与及び腹腔内投与による作用を比較した。本試験において、対照群には陰性対照抗体（CAT002：ヒト IgG1）を投与した。

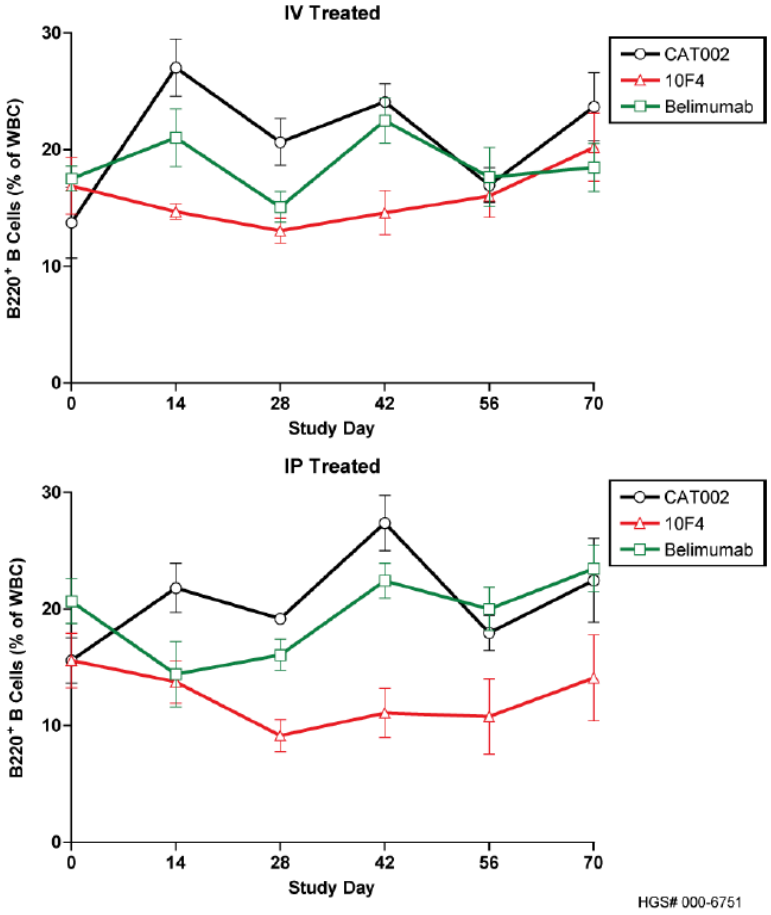
BALB/c マウスを 6 群に分け（10 匹／群）、コントロール抗体（CAT002）、10F4 又はベリムマブ（それぞれ 5 mg/kg）を試験 0、14 及び 28 日目に静脈内又は腹腔内投与し、70 日目まで経過観察した。また、試験-4～70 日目までの複数の時点で採血し、B220（CD45R）陽性 B 細胞数の割合（フローサイトメトリー法；試験 0、14、28、42、56 及び 70 日目）並びに血清中抗体濃度及び抗薬物抗体産生の有無（試験-4、35、49、63 及び 70 日目）を測定した。

ベリムマブの静脈内投与群では、試験 14 日目の投与 25～30 分後に 2 例、28 日目の投与 4 時間後に 1 例が死亡した。これらのマウスの剖検において、異常所見はみられなかった。一方、10F4 又は対照群の静脈内投与群及びすべての腹腔内投与群では死亡はみられなかった。

試験 14 及び 28 日目において、ベリムマブ及び 10F4 投与群の血中 B 細胞数の割合は静脈内及び腹腔内投与群のいずれにおいても対照群よりも低かった（図 2.6.2-9）。試験 42 日目以降試験終了日である 70 日目までの期間では、ベリムマブ投与群の B 細胞数の割合は対照群と同程度の値まで回復する傾向を示したのに対して、10F4 投与群では試験 42 日目においても対照群と比較して低値を示し、腹腔内投与群では試験終了日までその作用は持続した。

ベリムマブ投与群では試験 35 日目に 17 例中 1 例のみの血清中にベリムマブが検出され、それ以降の時点ではいずれのマウスにおいても血清中にベリムマブは検出されなかった。一方、いずれのマウスにおいてもベリムマブ投与後のすべての時点で血清中に抗ベリムマブ抗体が検出された。10F4 投与群では 20 例中 16 例で試験 35 日目以降の 1 回以上の測定時点で

血清中に 10F4 が検出されたものの、その半数以上（16 例中 10 例）は予測濃度よりも低値であった。また、10F4 投与後の 20 例中 10 例において 2 回以上の測定時点で血清中に抗 10F4 抗体が検出された。



CAT002：コントロール抗体（ヒト IgG1）
10F4：ハムスター抗マウス BLyS 抗体
縦軸：総白血球数に対する B 細胞（B220 陽性細胞）数の割合 (%)（平均値±標準誤差、n=10）

図 2.6.2-9　マウスの総白血球数に対する CD220 陽性 B 細胞数の割合に対する作用（試験 2）

Data source: XH2010/00025/00 の Figure 6

試験 1 及び 2 のまとめ

マウスにベリムマブを投与するといずれの試験でも投与初期には総白血球数に対する B 細胞数の割合の減少が認められたものの、その作用は持続しなかった。また、反復投与後に多くのマウスが呼吸困難の症状を呈し、死亡例もみられた。

複数回投与後の血清中ベリムマブ濃度は定量下限未満であったのに対し、免疫原性アッセイではすべてのマウスにおいて血清中に抗ベリムマブ抗体の存在が示された。

以上より、マウスにベリムマブを静脈内又は腹腔内投与すると投与初期にはベリムマブの薬理作用である B 細胞数減少作用が認められるが、中和抗体が産生されることによりその

作用は減弱すると考えられた。また、死亡の原因は、反復投与後に多くのマウスで呼吸困難がみられたことから、アナフィラキシー様反応によるものと考えられた。

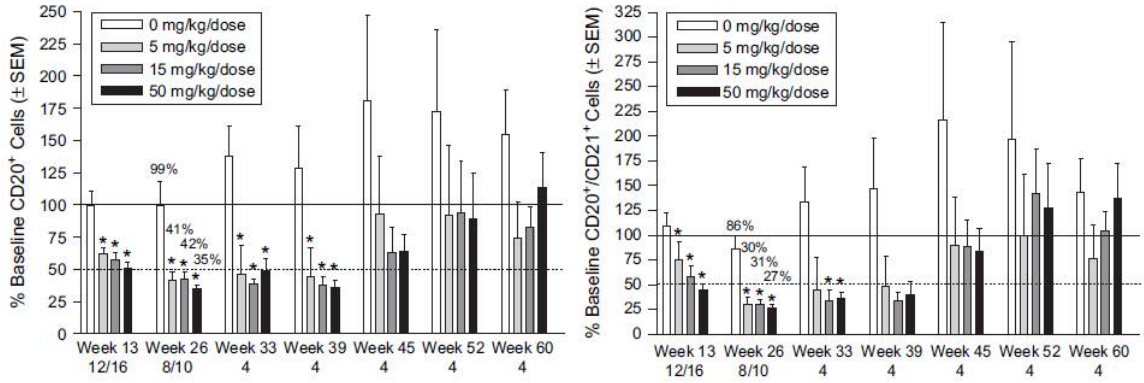
2.6.2.2.2.3. カニクイザルの B 細胞数に及ぼす影響（毒性試験における評価）

カニクイザルの B 細胞数に及ぼすベリムマブの影響を毒性試験で評価したところ、一貫して B 細胞の減少がみられた（2.6.6.9.2.）。末梢血において、投与 4 週まで総 B 細胞数に影響はみられなかったが（2.6.6.3.1.）、投与 13 週（6 ヵ月間投与試験の初回検査日）には減少がみられた（2.6.6.3.2.）。末梢血 B 細胞数の減少は、ベリムマブを反復静脈内投与した生殖発生毒性試験（2.6.6.6.3.）の母動物及び出生児においても認められた。また、ベリムマブを反復皮下投与した免疫原性試験（2.6.6.8.1.）においても、末梢血総 B 細胞数の持続的な減少が認められた。各試験の成績を表 2.6.2-9 に要約した。

表 2.6.2-9 カニクイザルの B 細胞数に及ぼす影響（毒性試験における評価）

試験	投与量 (mg/kg)	投与方法	投与期間	結果
4 週間反復投与毒性試験 (2.6.6.3.1.)	5、15 及び 50 mg/kg (雌雄各 5 匹／群)	週 1 回 静脈内投与	4 週間	末梢血の総 B 細胞（CD20 陽性）数及び成熟 B 細胞（CD20 陽性 CD21 陽性）の割合に対する影響はみられなかった。 脾臓及び腸間膜リンパ節では、回復期間終了時（Day 57）において総 B 細胞数及び成熟 B 細胞の割合はいずれの用量でも統計学的に有意に減少した。
6 ヵ月間反復投与毒性試験 (2.6.6.3.2.)	5、15 及び 50 mg/kg (雌雄各 8 匹／群)	隔週 1 回 静脈内投与	6 ヵ月間	末梢血では試験 13 週に 15 及び 50 mg/kg 群、試験 26 週に全投薬群で総 B 細胞数の低値及び成熟 B 細胞の割合の減少が認められた（図 2.6.2-10）。試験 26 週に B 細胞減少作用は最大に達し、このときの B 細胞減少の程度は投薬を受けた 3 群間で同程度 (総 B 細胞数は投与前値の約 40%、成熟 B 細胞の割合は投与前値の約 30%) であった。B 細胞数は休薬期間中の試験 39 週においても減少傾向にあったが、試験 45～60 週にかけて回復する傾向がみられた。 脾臓及び腸間膜リンパ節では試験 13 及び 26 週に全投薬群で総 B 細胞数の低値が認められた。成熟 B 細胞の割合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 B 細胞数の低値は休薬期間中に回復した。

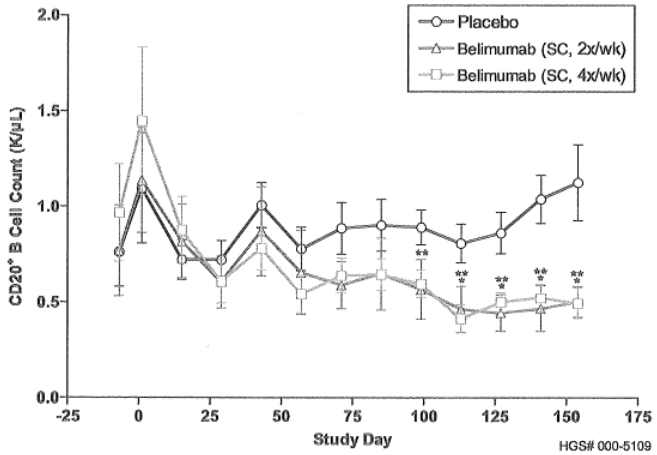
試験	投与量 (mg/kg)	投与方法	投与期間	結果
生殖発生毒性試験 (出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験) (2.6.6.6.3.)	5 又は 150 mg/kg	隔週 1 回 静脈内投与	妊娠確認日から帝王切開又は分娩まで	妊娠期間中の母動物：妊娠 90 及び 140 日に対照群を含む全例で末梢血の総 B 細胞数及び成熟 B 細胞サブセットの減少が認められた。投与前値と比較すると、投薬群における B 細胞減少の程度は対照群よりもやや大きく、これらはベリムマブの薬理作用による変化と考えられた。 分娩後の母動物：末梢血の総 B 細胞数の減少及び単球数の増加傾向（いずれも統計学的有意差なし）が認められたが、それぞれ分娩後 365 及び 28 日に正常値付近まで回復した。妊娠期間中にみられた母動物における成熟 B 細胞数の減少は分娩後には認められなかった。 胎児（妊娠 150 日）：投薬群で脾臓の重量低値（統計学的有意差なし）、鼠径及び腸間膜リンパ節、並びに脾臓における B 細胞の密度低下が認められた（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）。 出生児：生後 7 及び 28 日にベリムマブによる末梢血の総 B 細胞数及び成熟 B 細胞数の低値が認められたが、用量依存性はみられず、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、出生児では認められなかった。
免疫原性試験 (2.6.6.8.1.)	1 mg/kg (雌雄各 5 匹／群)	週 2 回又は 4 回皮下投与	13 週間 (9 週間休薬期間)	いずれの投与方法でも末梢血の総 B 細胞数の有意な減少がみられたが、投与回数の違いにより B 細胞数の減少の程度に明らかな差はみられなかった（図 2.6.2-11）。9 週間の休薬期間中に B 細胞数の減少は回復しなかった。



平均値±標準誤差 (n=12 又は 16)
左図：総 B 細胞数（CD20 陽性） (%)
右図：成熟 B 細胞数（CD20 陽性 CD21 陽性） (%)
*：p<0.05 vs 対照群 (Dunnett's test)

図 2.6.2-10　　6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験での末梢血 B 細胞数に及ぼす影響

Data source:[Halpern, 2006]の Figure 4 (6 ヵ月間反復投与毒性試験の公表文献)



平均値±標準誤差 (n=10)
Placebo：10 mM sodium citrate, 8% sucrose, 0.04% (w/v) Polysorbate 80, pH 6.5
CD20+ B cell：総 B 細胞
*：p<0.05 vs 週 2 回皮下投与における placebo 群 (Dunnett's t-test)
**：p<0.05 vs 週 4 回皮下投与における placebo 群 (Dunnett's t-test)

図 2.6.2-11　　13 週間皮下投与試験での末梢血総 B 細胞数に及ぼす影響

Data source : XD2010/00073/00 (4.2.3.7.7.) の Figure 7

カニクイザルの B 細胞数に及ぼす影響のまとめ

カニクイザルにベリムマブを反復静脈内投与又は皮下投与することにより、末梢血、脾臓及びリンパ節において持続的な B 細胞数の減少がみられた。

2.6.2.3. 副次的薬理試験

2.6.2.3.1. TNF スーパーファミリー分子に対する結合

BLyS は TNF スーパーファミリーの一種である[Moore, 1999]。BLyS と最も相同性の高い TNF スーパーファミリー分子は APRIL（44.3%）であり（2010N110702_00）、APRIL は 3 種類の BLyS 受容体のうち BCMA 及び TACI に結合することが知られている[LaCava, 2013]。そこで、APRIL を含む 6 種類の TNF スーパーファミリーに属する種々のリガンド（いずれもヒトの APRIL、TL1A、LIGHT、TNF-α、TNF-β (LTα) 及び FasL：4.9 及び 49 nM）に対するベリムマブの結合能を表面プラズモン共鳴法により検討した（2010N110702_00）。

その結果、ベリムマブは BLyS 以外の TNF スーパーファミリーに属する種々のリガンドのいずれに対しても結合性を示さなかった。

2.6.2.3.2. 組織交差反応性試験

ヒト及びカニクイザルの組織パネルを用いて組織交差反応性試験を実施し（XH2010/00026/00）、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。

35 種類のヒト組織（n＝3）及び 34 種類のカニクイザル組織（n＝2）をベリムマブ（ヒトで 2、10、50 及び 225 μg/mL、カニクイザルで 2 及び 10 μg/mL）で処理し、免疫組織化学染色により組織に結合したベリムマブを検出した。BLyS 遺伝子又はコントロールベクター（BLyS 遺伝子を含有しない）を導入したヒト胎児由来腎臓（HEK）293 細胞のペレットから作製した凍結切片を免疫組織化学染色の陽性対照又は陰性対照として用いた。また、カニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.）の初期にみられた甲状腺濾胞上皮組織の変性がベリムマブによる影響か否かを検討するため、高濃度（50 及び 225 μg/mL）のビオチン化抗ヒト IgG 抗体結合ベリムマブを用いて甲状腺濾胞上皮組織の染色性を評価した。

ヒト組織ではいずれの濃度のビオチン化抗ヒト IgG 抗体結合ベリムマブで処理しても特異的な染色像は認められなかった。一方、カニクイザルでは、1 例で 2 及び 10 μg/mL の濃度で 34 種類の組織中、膵臓のチモーゲン顆粒に強い染色が認められ、別の 1 例では 10 μg/mL の濃度でのみ子宮頸部上皮の基底層に弱い染色が認められた。甲状腺濾胞上皮組織に対しては染色性を示さなかった。

以上のように、35 種類のいずれのヒト組織においてもベリムマブに特異的な染色像は認められなかった。一方、カニクイザルでは 34 種類の組織のうち膵臓（外分泌腺）及び子宮頸部（上皮細胞）に特異的な染色が認められたが、4 週間反復投与毒性試験で影響がみられた甲状腺濾胞上皮組織では特異的な染色像はみられなかった。

2.6.2.3.3. FcR への結合及び Fc を介する作用

ベリムマブはヒト IgG1λ モノクローナル抗体であることから、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ある。FcRn は Fc 領域と結合することにより、抗体のリサイクリング及び輸送等に関与している[Roopenian, 2007]。ヒト FcγR には複数のサブタイプ（I、IIa、IIb、IIc、IIIa 及び IIIb）が知られているが、NK 細胞及び単球/マクロファージの表面に発現する FcγRIIIa は、抗体の Fc 領域と結合する

ことで ADCC 及び CDC 等のエフェクター機能を発揮すると考えられている[Bruhns, 2012; Congy-Jolivet, 2007]。そこで、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 活性について検討した。

2.6.2.3.3.1. ヒト FcRn への結合

ベリムマブと遺伝子組換えヒト FcRn との相互作用を pH 6.0 の条件下で表面プラズモン共鳴法により評価し、KD を算出した（2011N115953_00）。対照抗体として 2 種類の IgG1 モノクローナル抗体（raxibacumab（ヒト IgG1λ モノクローナル抗体）及び rituximab（定常部領域がヒト由来（IgG1κ）のマウス-ヒトキメラ型モノクローナル抗体））を用いた。

結合パラメータの解析から、ベリムマブ及び対照抗体のいずれにおいても解離速度の異なる 2 種類の FcRn/IgG 複合体が検出された（2 種類の結合速度定数 ka1 及び ka2 並びに解離速度定数 kd1 及び kd2 が得られた）。高親和性を示した複合体の KD1（kd1/ka1）はベリムマブ、raxibacumab 及び rituximab でそれぞれ 618、590 及び 318 nM であり、ベリムマブは対照抗体と同程度の KD で FcRn に結合することが示された。

表 2.6.2-10 ヒト FcRn に対する親和性

抗体	KD1 (nM)
ベリムマブ	618±170
Raxibacumab (IgG1λ)	590±187
Rituximab (IgG1κ)	318±45

平均値±標準偏差 (n=3)
Data source: 2011N115953_00 の Table 3-1

2.6.2.3.3.2. ヒト FcγRIIIa（CD16a）への結合

ベリムマブと遺伝子組換えヒト FcγRIIIa との相互作用を表面プラズモン共鳴法により評価し、KD を算出した（2012N155096_00）。対照抗体として IgG1 モノクローナル抗体（rituximab（定常部領域がヒト由来（IgG1κ）のマウス-ヒトキメラ型モノクローナル抗体）、ヒト化 IgG1κ 及びヒト IgG4κ を用いた。

ベリムマブはヒト FcγRIIIa に結合した。その KD は 1.79 μM であり、他の IgG1 対照抗体の KD（2.09 及び 2.68 μM）と同程度であった（表 2.6.2-11）。

表 2.6.2-11 ヒト FcγRIIIa に対する親和性

抗体	KD (μM)
ベリムマブ	1.79±0.04
Rituximab (IgG1κ)	2.09±0.04
IgG1κ	2.68±0.04
IgG4κ	ND

平均値±標準誤差 (n=3)
ND：算出できず
Data source: 2012N155096_00 の Table 3-1

2.6.2.3.3.3. ADCC 活性

膜結合型 BLyS を発現するヒトリンパ腫由来 U937 細胞株を蛍光標識し（標的細胞）、ベリムマブを加えて 15 分間インキュベートした（2011N115953_00）。ヒト末梢血から分離した NK 細胞（エフェクター細胞）を加え（エフェクター細胞：標的細胞＝8：1）、更に 2.5 時間インキュベートして ADCC を誘発した。死細胞をヨウ化プロピジウム（PI）染色し、蛍光標識細胞（生存細胞）をフローサイトメトリー法で検出した。また、受容体に結合した可溶型 BLyS がベリムマブとの結合を介して ADCC を誘発する可能性について評価するため、BLyS 受容体を発現するバーキットリンパ腫（B 細胞性リンパ腫）由来 ST486 細胞株を可溶型 BLyS（20 μg/mL）存在下でプレインキュベートし、上述の方法でベリムマブの ADCC 誘発活性を測定した。同様に、膜結合型 BLyS を発現するヒト末梢血 CD14 陽性単核球（3 日間 IFN-γ で処理）に対しても、U937 細胞株と同様の方法でベリムマブの ADCC 誘発活性を評価した（2012N155096_00）。

その結果、いずれの標的細胞（膜結合型 BLyS を発現する U937 株細胞及びヒト末梢血 CD14 陽性単核球並びに可溶型 BLyS 結合 ST486 細胞株）においてもベリムマブは ADCC を誘発しなかった。

2.6.2.3.3.4. CDC 活性

膜結合型 BLyS を発現する U937 細胞株にベリムマブ（10 μg/mL）を添加し、補体源として 10%ヒト血清を加えて 30 分間インキュベートした（2011N115953_00）。死細胞を PI 染色し、蛍光標識細胞（生存細胞）をフローサイトメトリー法で検出した。同様に、膜結合型 BLyS を発現するヒト末梢血 CD14 陽性単核球（3 日間 IFN-γ で処理）に対しても、U937 細胞株と同様の方法でベリムマブの CDC 誘発活性を評価した（2012N155096_00）。その結果、いずれの標的細胞（膜結合型 BLyS を発現する U937 細胞株及びヒト末梢血 CD14 陽性単核球）においてもベリムマブは CDC を誘発しなかった。

FcR への結合及び Fc を介する作用のまとめ

ベリムマブは FcRn に結合したが、その親和性は他の IgG モノクローナル抗体と同程度であった。また、ベリムマブは FcγRIIIa に結合するものの、ADCC 及び CDC を誘発しなかった。

2.6.2.4. 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を評価した（2.6.6.3.1. 及び 2.6.6.3.2.）。これらの毒性試験において、心電図及び尿検査を実施し、中枢神経系又は呼吸系に関連する所見を評価した。

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（2.6.6.3.1.及び 2.6.6.3.2.）。

2.6.2.5. 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6. 考察及び結論

2.6.2.6.1. 効力を裏付ける試験

In vitro 試験

ベリムマブの可溶型 BLyS への結合を ELISA 法で検討したところ、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 は 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、添加した可溶型 BLyS の濃度に依存して阻害された（IC50 は 8.5 nM）。一方、ヒト慢性骨髄性白血病由来 K-562 細胞株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、ベリムマブの膜結合型 BLyS に対する結合は検出されなかった。また、ヒト PBMC 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）の膜結合型 BLyS に対するベリムマブの結合をフローサイトメトリー二色法で解析したところ、陽性対照であるマウスモノクローナル抗体の 12D6 では単球（CD14 陽性）及び B 細胞（CD20 陽性）において膜結合型 BLyS への結合が認められ、その結合量は IFN-γ 処理により増加したが、ベリムマブでは IFN-γ 処理の有無に関わらず 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。これらの結果から、ベリムマブは可溶型 BLyS に結合するものの、細胞表面上に発現する膜結合型 BLyS は認識しないと考えられた。しかしながら、最新の公表文献ではベリムマブが in vitro において可溶型及び膜結合型の両 BLyS に結合することが報告されている（EC50 はそれぞれ 0.028 及び 0.14 nM）[Zhuang, 2016]。

ベリムマブのマウス、カニクイザル及びヒト 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）。また、マウス可溶型 BLyS にも結合した（KD は 9480 pM）が、その結合親和性はヒト可溶型 BLyS（KD は 993 pM）の約 1/10 であることが示された。

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）。

マウス脾細胞をヒト BLyS 及び SAC 存在下で培養すると、ヒト BLyS の濃度依存的な増殖促進作用がみられた（EC50 は 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 は 0.07 nM）。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 は 0.06 nM）。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 であり、増殖促進作用は同程度であった。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促進に対して同程度の増殖抑制作用を示し（IC50 はそれぞれ 0.033 及び 0.046 nM）、ヒト BLyS（2 ng/mL）による初代培養ヒト B 細胞の増殖に対しても濃度依存的な抑制作用を示した（IC50 は 0.06 nM）。

これらの in vitro 試験での結果から、ベリムマブはヒト可溶型 BLyS に高親和性に結合することで 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、ベリムマブのヒト及びカニクイザル可溶型 BLyS に対する結合親和性及び両種の BLyS 活性に対する阻害作用は同程度であることが示された。ベリムマブはマウス可溶型 BLyS にも結合するものの、その親和性はヒト可溶型 BLyS の約 1/10 であった。

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。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。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）の全例で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共に、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、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た（2.6.6.6.3.）。また、免疫原性試験においても、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（2.6.6.8.1.）。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）及び（BEL112341 試験；皮下投与）（2.5.4.4.7.4.）。

2.6.2.6.2. 副次的薬理試験

ベリムマブは 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）に対して結合性を示さなかったことから、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。

ヒトの組織パネルを用いた組織交差反応性試験の結果、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。

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（n＝2）では、免疫組織化学染色において 34 種類の組織のうち膵臓及び子宮頸部に特異的な染色像がみられた。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、in vitro において遺伝子組換えヒト FcRn 及び FcγRIIIa に結合した（KD はそれぞれ 618 及び 1790 nM）。これはベリムマブが IgG1 モノクローナル抗体であることから予想された結果であり、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）[Suzuki, 2010; Li, 2007]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。

2.6.2.6.3. 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への影響はみられず、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 ヵ月反復投与毒性試験においてカニクイザルに 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 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 200 mg/kg を週 1 回皮下投与したときの Cmax（117 µg/mL）の約 14 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有害事象を誘発する可能性は低いと考えられる。

2.6.2.6.4. 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。これらの試験成績から、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。

2.6.2.7. 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8. 参考文献

Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. Semin Immunol. 2006;18:263-75.

Bossen C, Tardivel A, Willen L, et al. Mutation of the BAFF furin cleavage site impairs B-cell homeostasis and antibody responses. Eur J Immunol. 2011;41:787-97.

Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. Blood. 2012;119:5640-9.

Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. J Clin Invest. 2009;119:1066-73.

Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, et al. Elevated serum lymphocyte stimulator levels in patients

with systemic immune-based rheumatic diseases. Arthritis Rheum. 2001;44:1313-9.

Congy-Jolivet N, Probst A, Watier H, et al. Recombinant therapeutic monoclonal antibodies: mechanisms of action in relation to structural and functional duality. Crit Rev Oncol Hematol. 2007;64:226-33.

Enzler T, Bonizzi G, Silverman GJ, et al. Alternative and classical NF-κB signaling retain autoreactive B cells in the splenic marginal zone and result in lupus-like disease. Immunity. 2006;25:403-15.

Goenka R, Scholz JL, Sindhava VJ, et al. New roles for the BLyS/BAFF family in antigen-experienced B cell niches. Cytokine Growth Factor Rev. 2014;25:107-13.

Gross JA, Johnston J, Mudri S, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. Nature. 2000;404:995-9.

Halpern WG, Lappin P, Zanardi T, et al. Chronic administration of belimumab, a BLyS antagonist, decreases tissue and peripheral blood b-lymphocyte populations in cynomolgus monkeys: Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicologic effects. Toxicol Sci. 2006;91:586-99.

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-κB2. Immunity. 2002;10:515-24.

Kim HM, Yu KS, Lee ME, et al. Crystal structure of the BAFF-BAFF-R complex and its implications for receptor activation. Nat Struct Biol. 2003;10:342-8.

LaCava A. Targeting the BLyS-APRIL signaling pathway in SLE. Clin Immunol. 2013;148:322-7.

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.

Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. Blood. 2001;97:198-204.

O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. J Exp Med. 2004;199:91-7.

Paran D, Naparstek Y. Is B cell-targeted therapy effective in systemic lupus erythematosus?. Isr Med Assoc J. 2015;17:98-103.

Peperzak V, Vikström I, Walker J, et al. Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. Nat Immunol. 2013;14:290-7.

Petri M, Stohl W, Chatham M, et al. Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2008;58:2453-9.

Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat Rev Immunol. 2007;7:715-25.

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.

Schneider P, Mackay F, Steiner V, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. J Exp Med. 1999;189:1747-56.

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.

Tardivel A, Tinel A, Lens S, et al. The anti-apoptotic factor Bcl-2 can functionally substitute for the B cell survival but not for the marginal zone B cell differentiation activity of BAFF. Eur J Immunol. 2004;34:509-18.

Zhang J, Roschke V, Baker KP, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2001;166:6-10.

Zhuang W, Zhang J, Pei L, et al. Generation and characterization of human B lymphocyte stimulator blocking monoclonal antibody. Mol Immunol. 2016;77:141-7.

松下 貴史, 佐藤 伸一. BAFF と自己免疫性疾患. 日本臨床免疫学会会誌. 2005;28:333-42.

難病情報センター. 全身性エリテマトーデス. Available at URL (2016.9.7): . 2015 Aug 19:.

2.6.3. 薬理試験概要表

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表

被験物質：ベリムマブ及び 10F4

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
効力を裏付ける試験					
(In vitro 試験)					
可溶型 BLyS に対する結合性	ビオチン化可溶型 BLyS	In vitro	[redacted] (米国)	XH2010/00015/00	4.2.1.1
膜結合型 BLyS に対する結合性	K-562 及び PBMC	In vitro	[redacted] (米国)	XH2010/00016/00	4.2.1.1
ヒト可溶型 BLyS に対する結合親和性	ヒト可溶型 BLyS	In vitro	[redacted] (米国)	XH2010/00017/00	4.2.1.1
カニクイザル可溶型 BLyS に対する結合親和性	カニクイザル可溶型 BLyS	In vitro	[redacted] (米国)	XH2010/00018/00 XH2010/00019/00	4.2.1.1
マウス可溶型 BLyS に対する結合親和性	マウス可溶型 BLyS	In vitro	[redacted] (米国)	XH2010/00020/00	4.2.1.1
ヒト BLyS 受容体と可溶型 BLyS との相互作用の阻害	ヒト可溶型 BLyS	In vitro	[redacted] (米国)	HG19399.SLE.0.050	4.2.1.1
ヒト BLyS によるマウス脾細胞増殖に対する影響	マウス脾細胞	In vitro	[redacted] (米国)	XH2010/00021/00	4.2.1.1
カニクイザル BLyS によるマウス脾細胞増殖に対する作用	マウス脾細胞	In vitro	[redacted] (米国)	XH2010/00019/00	4.2.1.1
ヒト BLyS による初代培養ヒト B 細胞の増殖に対する作用	初代培養ヒト B 細胞	In vitro	[redacted] (米国)	XH2010/00023/00	4.2.1.1
(In vivo 試験)					
ヒト BLyS 投与マウスにおけるベリムマブの作用	マウス	静脈内	[redacted] (米国)	XH2010/00024/00	4.2.1.1
マウスにおけるベリムマブの作用	マウス	静脈内又は腹腔内	[redacted] (米国)	XH2010/00025/00	4.2.1.1

K-562：ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞株、PBMC：ヒト末梢血単核球、U937：ヒトリンパ腫由来細胞株、ST486：バーキットリンパ腫由来細胞株、ADCC：抗体依存性細胞介在性細胞傷害、CDC：補体依存性細胞傷害、[redacted]：[redacted]、[redacted]：[redacted]

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表（つづき）

被験物質：ベリムマブ及び 10F4

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
副次的薬理試験					
TNF スーパーファミリー分子に対する結合	各種ヒト TNF スーパーファミリー分子	In vitro	[redacted] (米国)	2010N110702_00	4.2.1.2
組織交差反応性試験	ヒト及びサル組織	In vitro	[redacted] (米国)	XH2010/00026/00	4.2.1.2
ヒト FcRn への結合	遺伝子組換えヒト FcRn	In vitro	[redacted] (米国)	2011N115953_00	4.2.1.2
ヒト FcγRIIIa (CD16a) への結合	遺伝子組換えヒト FcγRIIIa	In vitro	[redacted] (米国)	2012N155096_00	4.2.1.2
ADCC 誘導能の検討	U937、ヒト末梢血 CD14 陽性単核球及び ST486	In vitro	[redacted] (米国)	2011N115953_00、2012N155096_00	4.2.1.2
CDC 活性に及ぼす影響	U937 及びヒト末梢血 CD14 陽性単核球	In vitro	[redacted] (米国)	2011N115953_00、2012N155096_00	4.2.1.2
安全性薬理試験					
4 週間反復投与毒性試験	サル	静脈内	[redacted] (米国)	XD2010/00068/00	4.2.3.2
6 ヵ月間反復投与毒性試験	サル	静脈内	[redacted] (米国)	XD2010/00069/00	4.2.3.2

K-562：ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞株、PBMC：ヒト末梢血単核球、U937：ヒトリンパ腫由来細胞株、ST486：バーキットリンパ腫由来細胞株、ADCC：抗体依存性細胞介在性細胞傷害、CDC：補体依存性細胞傷害、[redacted]：[redacted]、[redacted]：[redacted]

2.6.3.2. 効力を裏付ける試験

2.6.3.1 参照

2.6.3.3. 副次的薬理試験

2.6.3.1 参照

2.6.3.4. 安全性薬理試験

被験物質：ベリムマブ

試験の種類	動物種、系統及び性別	投与方法	用量及び濃度	例数及び標本数/群	結果	GLP 適用	添付場所
4 週間反復投与毒性試験 一般状態観察、心電図検査及び尿検査	雌雄カニクイザル	静脈内	5、15 及び 50 mg/kg (週 1 回、4 週間)	雌雄各 5 匹/群	投与期間中影響なし	適	4.2.3.2
6 ヵ月間反復投与毒性試験 一般状態観察、心電図検査及び尿検査	雌雄カニクイザル	静脈内	5、15 及び 50 mg/kg (隔週 1 回、3 又は 6 ヵ月間)	雌雄各 8 匹/群	投与期間中影響なし	適	4.2.3.2

2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。