ベンラリズマブ

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.4　非臨床試験の概括評価

アストラゼネカ株式会社

CONFIDENTIAL

略号及び用語の定義一覧

略号

略号	略していない用語
ADA	Anti-drug antibody（抗薬物［ベンラリズマブ］抗体）
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity（抗体依存性細胞傷害）
AHR	Airway hyperresponsiveness（気道過敏性反応）
BALF	Broncho-alveolar lavage fluid（気管支肺胞洗浄液）
BMMNC	Bone marrow mononuclear cells（骨髄単核細胞）
CDC	Complement-dependent cytotoxicity（補体依存性細胞傷害）
CDR	Complementarity-determining region（相補性決定領域）
CHO	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
CPT	Center point titer（力価中央）
DNP	Dinitrophenyl（ジニトロフェニル）
EC_{50}	50% effective concentration（50%有効濃度）
ECP	Eosinophil cationic protein（好酸球カチオンタンパク質）
EDN	Eosinophil-derived neurotoxin（好酸球由来神経毒）
ePPND	Enhanced pre- and post-natal development（拡充型出生前及び出生後の発生に関する生殖発生毒性）
FcγR	Fcγ receptor（Fcγ 受容体）
FITC	Fluorescein isothiocyanat（フルオレセインイソチオシアネート）
I61	Isoleucine at position 61（61 番目イソロイシン）
ICS	Inhaled corticosteroid（吸入ステロイド薬）
Ig	Immunoglobulin（免疫グロブリン）
IgG1κ	Immunoglobulin G subclass 1, κ isotype（免疫グロブリン G サブクラス 1、κ型アイソタイプ）
IL	Interleukin（インターロイキン）
IL-5Rα	Interleukin-5 receptor alpha subunit（インターロイキン-5 受容体 α サブユニット）
K_D	Dissociation constant（解離定数）
KLH	Keyhole limpet hemocyanin（キーホールリンペットヘモシアニン）
mAb	Monoclonal antibody（モノクローナル抗体）
MRHD	Maximum recommended human dose（最大推奨臨床用量）
NA	Not applicable（適応外）
NK	Natural killer（ナチュラルキラー）
NOAEL	No observed adverse effect level（無毒性量）
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell（末梢血単核細胞）
PK	Pharmacokinetics（薬物動態）
R	Receptor（受容体）
TCR	Tissue cross-reactivity（組織交差反応性）
TK	Toxicokinetics（トキシコキネティクス）

用語の定義

用語	定義
AUC	血漿（血清）中薬物濃度－時間曲線下面積
BD	出生児の出生後の日数を表す（生後日数、Birth date）
BIAcore	表面プラズモン共鳴シグナルによる生体分子相互作用測定機器
BIW-8405	ベンラリズマブの別名（BioWa 社の開発コード番号）
CD	モノクローナル抗体で分類されたヒト細胞表面タンパク質抗原
CL	全身クリアランス
CL/F	みかけの全身クリアランス
C_{max}	最高血漿（血清）中薬物濃度
Daudi	ヒト B 細胞リンパ腫細胞株
DNA	デオキシリボ核酸
ELISA	固相酵素結合免疫測定法
F(ab')2	抗原結合性フラグメントの 2 量体
Fc	免疫グロブリンの結晶化可能断片領域
FcγRIIIa	IgG の Fc 部位に対する受容体（FcγR）のサブクラスの一つ
GD	妊娠後の日数を表す（妊娠日数、Gestation day)
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
ICH	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use）
[redacted]	遺伝子組換え技術により IL-5R を過剰発現し、IL-5 依存的増殖を示す細胞株
KHK4563	ベンラリズマブの別名（協和発酵キリン社の開発コード番号）
KM1259	ベンラリズマブのマウス親抗体（マウス抗ヒト IL-5Rα IgG1 抗体）
KM8400	正常の CHO 細胞株から生産されるフコースを含有する IgG1 型のヒト化抗ヒト IL-5Rα モノクローナル抗体（フコース含有型ヒト化抗 IL-5Rα mAb）
KM8407	α-1,6-フコース転移酵素を欠損した CHO 細胞株の細胞集団から生産されるフコースを欠損する IgG1 型のヒト化抗ヒト IL-5Rα モノクローナル抗体。ベンラリズマブはこの細胞集団からシングルクローニングにより単クローン化された細胞株（[redacted]）から生産される。
MEDI-563	ベンラリズマブの別名（AstraZeneca/MedImmune 社の開発コード番号）
PPD	産後の日数を表す（出産後日数、Postpartum day）
QOL	生活の質
Rituximab	ヒト CD20 に対する遺伝子組換え型ヒト化モノクローナル抗体
$t_{1/2}$	血漿（血清）中消失半減期
V_{ss}	定常状態における分布容積

目次

略号及び用語の定義一覧 2
目次 4
2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 主たる薬力学作用 8
2.4.2.2 副次的薬理試験 11
2.4.2.3 安全性薬理試験 11
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用 11
2.4.3 薬物動態試験 11
2.4.3.1 非臨床薬物動態試験の概要 11
2.4.3.2 吸収及び曝露 13
2.4.3.3 分布 13
2.4.3.4 代謝 13
2.4.3.5 排泄 13
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 13
2.4.4 毒性試験 13
2.4.4.1 非臨床毒性試験の概要 13
2.4.4.2 動物種の選定 14
2.4.4.3 単回投与毒性試験 14
2.4.4.4 反復投与毒性試験 14
2.4.4.5 遺伝毒性試験 16
2.4.4.6 がん原性試験 16
2.4.4.7 生殖発生毒性試験 17
2.4.4.8 局所刺激性試験 18
2.4.4.9 その他の毒性試験 19
2.4.4.9.1 組織交差反応性試験 19
2.4.4.9.2 免疫毒性試験 20
2.4.5 総括及び結論 20
2.4.6 参考文献 23

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

ベンラリズマブ（遺伝子組換え）（以下、ベンラリズマブ、別名：MEDI-563、BIW-8405 又は KHK4563）は、成人の好酸球性の重症喘息患者に対する維持療法の追加薬剤として開発中である。本剤の投与には 1 回量 30 mg のベンラリズマブが充填された安全装置付きプレフィルドシリンジを使用し、用法及び用量は「通常、成人にはベンラリズマブとして 1 回 30 mg を、初回、4 週後、8 週後に皮下に注射し、以降、8 週間隔で皮下に注射する。」と設定した。

重症喘息はコントロール不良になることを防止するために中用量から高用量の吸入ステロイド薬（ICS）及びその他の長期管理薬（及び／又は全身ステロイド投与）による治療を必要とする喘息又は本治療にもかかわらずコントロール不良状態のままの喘息と定義されている（Chung et al, 2014）。コントロール不良な状態のままの患者は、喘息症状のコントロールが限定的となり、頻繁に症状の増悪を引き起こし、QOL の悪化をもたらす。

喘息には重篤な好酸球性喘息を含めた異なるタイプがあることが知られるようになっている（Wenzel, 2012; Chung et al, 2014）。重症喘息のおよそ 50%の患者ではコルチコステロイドの治療にもかかわらず遷延する好酸球性の気道炎症が起こる（Wenzel, 2005）。好酸球性喘息患者では病態の重症化及び頻発する増悪を伴っている（Bousquet et al, 1990; Walford and Doherty, 2014; Wener and Bel, 2013; Tran et al, 2014; Zeiger et al, 2014）。

ベンラリズマブは好酸球及び好塩基球に発現するヒトインターロイキン（IL）-5 受容体（R）α サブユニット（IL-5Rα）を標的とするフコース欠損型ヒト化免疫グロブリン（Ig）G サブクラス 1、κ 型アイソタイプ（IgG1κ）モノクローナル抗体（mAb）である（Kolbeck et al, 2010）。ベンラリズマブはフコースを欠損するオリゴ糖コア構造を有しており、その結果、ナチュラルキラー（NK）細胞及びマクロファージに発現する Fcγ 受容体（FcγR）であるヒト FcγRIIIa に対して高い親和性を有している。フコースの欠損及び FcγRIIIa に対する親和性が高まった結果、NK 細胞及びマクロファージ等のエフェクター細胞の存在下において、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性が増強し、アポトーシスによる好酸球及び好塩基球の除去が促進される。

ベンラリズマブの非臨床開発では、作用機序及び好酸球の除去を指標とした薬理学的特性、薬物動態（PK）及び毒性プロファイルを評価した。

非臨床開発において、ベンラリズマブが 1）カニクイザルの好酸球に結合すること、2）カニクイザル IL-5 誘発好酸球増多モデルにおいて薬理活性を示すこと及び 3）カニクイザルを用いた喘息モデルにおいて抗喘息作用を示すことに基づき、カニクイザルを非臨床安全性評価動物として選定した。更にヒト及びカニクイザルの組織交差反応性（TCR）に類似性があることもカニクイザルがベンラリズマブの安全性試験に適切な動物種であることを支持している。なお、ベンラリズマブはマウスの IL-5Rα とは結合しないため、げっ歯類はベンラリズマブの非臨床安全性評価に適さないと判断し、げっ歯類を用いたベンラリズマブの毒性試験は実施しなかった。

ベンラリズマブを用いた非臨床試験として合わせて 21 試験を実施した。それらは 1）非臨床薬理 13 試験、2）PK（トキシコキネティクス[TK]）5 試験、3）毒性 8 試験である。これら非臨床試験のうち、7 つの毒性試験は GLP 基準下で実施し、ICH ガイドライン ICH S6(R1)に準拠

している。[redacted].263.02 試験（4.2.3.1-1）は重要な試験の位置づけではないため、非 GLP 試験として実施された。

ベンラリズマブの生化学的及び機能的な特徴を明らかにするために、以下の一連の非臨床薬理試験を実施した。

- 組換えヒト及びカニクイザル IL-5Rα に対するベンラリズマブの親和性
- マウス IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合
- ベンラリズマブのヒト IL-5Rα 結合部位
- 新鮮末梢血より分離したヒト及びカニクイザルの好酸球に対するベンラリズマブの結合
- IL-5 依存性細胞増殖に対するベンラリズマブの阻害活性
- ヒト好酸球及び好塩基球に対するベンラリズマブの ADCC 活性
- ベンラリズマブの ADCC 活性に伴う好酸球顆粒タンパク質の放出
- ヒト好酸球に対するベンラリズマブの補体依存性細胞傷害（CDC）活性
- カニクイザルにおけるベンラリズマブの薬力学作用
- カニクイザルを用いた反復皮下及び静脈内投与毒性試験におけるベンラリズマブの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する安全性薬理評価（GLP 適合）

開発の初期段階において、いくつかの非臨床薬理試験はベンラリズマブと同等の mAb である KM8407 を用いて実施した。KM8407 は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞の単クローンから産生されるベンラリズマブとは異なり、CHO 細胞集団（プール）から産生される。また、必要に応じてフコース含有型抗 IL-5Rα mAb である KM8400 をいくつかの薬理試験で使用した。

ベンラリズマブの PK は以下の 5 つの毒性試験において評価した。

- 雄性カニクイザルを用いた単回皮下投与による TK 試験（非 GLP）
- カニクイザルを用いた 9 週間反復静脈内投与試験及び 18 日間回復性試験（GLP 適合）
- カニクイザルを用いた 15 週間反復皮下投与試験及び 12 週間回復性試験（GLP 適合）
- カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復静脈内及び皮下投与試験並びに 12 週間回復性試験（GLP 適合）
- 妊娠カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の発生に関する生殖発生毒性（ePPND）試験（GLP 適合）

ベンラリズマブの毒性プロファイルは以下の 8 試験において評価した。

- 雄性カニクイザルを用いた単回皮下投与による TK 試験（非 GLP）
- カニクイザルを用いた 9 週間反復静脈内投与試験及び 18 日間回復性試験（GLP 適合）
- カニクイザルを用いた 15 週間反復皮下投与試験及び 12 週間回復性試験（GLP 適合）
- カニクイザルを用いた 9 ヵ月間反復静脈内及び皮下投与試験並びに 12 週間回復性試験（GLP 適合）
- 妊娠カニクイザルを用いた ePPND 試験（GLP 適合）
- 正常カニクイザル組織における TCR 試験（GLP 適合）
- 正常ヒト組織における TCR 試験（GLP 適合）
- ウサギを用いた皮下投与による局所刺激性試験（GLP 適合）

ベンラリズマブの非臨床薬理試験を表 2.4.1-1に、また非臨床安全性試験を表 2.4.1-2にそれぞれ示した。

申請者は、ベンラリズマブの開発過程で実施された一連の非臨床試験は、ヒトにおける有用性を検討し、理解する上で適切な内容であると考えている。

表2.4.1-1 ベンラリズマブの非臨床薬理試験一覧表

試験番号 (資料番号)	試験名	動物種/投与経路	GLP 適合性
r-[redacted]-0337 (参考 4.2.1.1-1)	Comparison of the *in vitro* activity of anti-IL-5Rα humanized antibody KHK4563 and KM8407	ヒト	非適合
d-[redacted]-0018 (4.2.1.1-2)	Antigen binding activity of KHK4563 (MEDI-563), a humanized anti-IL-5Rα monoclonal antibody	ヒト	非適合
RIA563-0001 (参考 4.2.1.1-3)	Binding of MEDI-563 to human and cynomolgus monkey IL-5R-alpha expressed on peripheral blood-derived eosinophils and to soluble human and cynomolgus monkey IL-5R-alpha	ヒト及びカニクイザル	非適合
RIA563-0003 (参考 4.2.1.1-4)	Benralizumab (MEDI-563) does not cross-react with murine IL-5 receptor alpha	マウス	非適合
d-[redacted]-0147 (4.2.1.1-5)	Binding activity of KHK4563 (MEDI-563) to human peripheral blood derived eosinophils	ヒト	非適合
r-[redacted]-194 (参考 4.2.1.1-6)	フローサイトメーターによるヒト・サル白血球に対する KM8407 の結合性検討	ヒト及びカニクイザル	非適合
d-[redacted]-0019 (4.2.1.1-7)	Growth inhibition activity against IL-5Rα-expressing cell line of KHK4563 (MEDI-563), a humanized anti-IL-5Rα monoclonal antibody	ヒト	非適合
d-[redacted]-0148 (4.2.1.1-8)	Induction of human eosinophil apoptosis via antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by KHK4563 (MEDI-563)	ヒト	非適合
d-[redacted]-0149 (4.2.1.1-9)	Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity of KHK4563 against human eosinophils: Release of human eosinophil granule proteins by KHK4563 (MEDI-563)	ヒト	非適合
RIA563-0002 (参考 4.2.1.1-10)	Benralizumab (MEDI-563) does not induce complement dependent cytotoxicity of primary human eosinophils	ヒト	非適合
r-[redacted]-222 (4.2.1.1-11)	IL-5 誘発サル末梢血好酸球増多モデルにおける抗 IL-5 受容体ヒト化抗体 KM8407 の作用	カニクイザル/静脈内	非適合
d-[redacted]-184 (参考 4.2.1.1-12)	An asthmatic animal model in cynomolgus monkeys	カニクイザル	非適合
r-[redacted]-457 (参考 4.2.1.1-13)	サル喘息モデルを用いた抗ヒト IL-5 受容体抗体 KM8407 の薬効評価試験	カニクイザル/静脈内	非適合

この表において、ベンラリズマブは MEDI-563 及び KHK4563 と呼称する。KM8407 はベンラリズマブと同等の mAb
IL-5 ：インターロイキン-5；IL-5Rα ：インターロイキン-5 受容体 α サブユニット

表2.4.1-2 ベンラリズマブの非臨床安全性試験一覧表

試験番号（資料番号）	試験名	動物種/投与経路	GLP適合性
[redacted].263.02（4.2.3.1-1）	A toxicokinetics study of MEDI-563 administered subcutaneously in male cynomolgus monkeys	カニクイザル/皮下	非適合
[redacted].112.01（4.2.3.2-1）	Repeat dose intravenous toxicity study of BIW-8405 in cynomolgus monkeys with an 18 day recovery period	カニクイザル/静脈内	適合
[redacted].263.04（4.2.3.2-2）	A fifteen week repeat dose subcutaneous toxicity study of MEDI-563 in cynomolgus monkeys followed by a 12 week recovery period	カニクイザル/皮下	適合
AAO00095（4.2.3.2-3）	A 9-month intravenous and subcutaneous dose toxicity, toxicokinetics, and immunogenicity study of MEDI-563 in cynomolgus monkeys with a 12-week recovery period	性成熟したカニクイザル/静脈内/皮下	適合
AAO00036（4.2.3.5.3-1）	Maternal, embryo-fetal and neonatal toxicity study of MEDI-563 administered bi weekly by intravenous injection to pregnant cynomolgus monkeys, including a 6.5 month postnatal evaluation	カニクイザル/静脈内	適合
517668（4.2.3.6-1）	Tolerance study in rabbits after a single injection of KHK4563 (MEDI-563) by the subcutaneous route	New Zealand White系ウサギ/皮下	適合
IM1232（4.2.3.7.7-1）	Cross-reactivity study of F-BIW-8405 with normal cynomolgus monkey tissues	カニクイザル/NA	適合
IM1231（4.2.3.7.7-2）	Cross-reactivity study of F-BIW-8405 with normal human tissues	ヒト/NA	適合

この表において、ベンラリズマブはMEDI-563、BIW-8405及びKHK4563と呼称する; NA：適応外

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 主たる薬力学作用

非臨床薬理試験の一覧表を表2.4.1-1に示した。薬理試験の概要文を2.6.2に、概要表を2.6.3に記載した。

ベンラリズマブの結合親和性、特異性、作用機序及び有効性について明らかにすることを目的に、更に好酸球の炎症を特徴とする例えば喘息のような疾患の治療における有用性を評価することを目的として *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験を実施した。

固相化したヒトIL-5Rαに対するベンラリズマブの結合を、組換えヒトIL-5Rαタンパク質を用いてELISA及びBIAcoreにより検証した。その結果、ベンラリズマブは固相化したヒトIL-5Rαタンパク質に対して濃度依存的に結合した（試験番号：d-[redacted]-0018、4.2.1.1-2）。センサーチップに固相化した組換えヒトIL-5Rαに対するベンラリズマブの解離定数（K_D）は0.016 nmol/Lであった（試験番号：RIA563-0001、参考 4.2.1.1-3）。

固相化した組換えカニクイザルIL-5Rαに対するベンラリズマブの結合親和性をBIAcoreにより測定した。その結果、カニクイザルIL-5Rαに対するベンラリズマブのK_Dは0.042 nmol/Lであった（試験番号：RIA563-0001、参考 4.2.1.1-3）。

マウスIL-5Rαはヒト IL-5Rαとアミノ酸配列の相同性が68%であることから、ベンラリズマブのマウスIL-5Rαに対する交差反応性についてフローサイトメトリーを用いて検討した。ベンラリズマブは予想どおりヒトIL-5Rα発現細胞に結合性を示したのみで、マウスのIL-5Rα発現細胞に対して結合しなかった（試験番号：RIA563-0003、参考 4.2.1.1-4）。

ベンラリズマブのマウス IL-5Rα に対する非結合性（試験番号： RIA563-0003、参考 4.2.1.1-4）を、ベンラリズマブにより認識されるヒト IL-5Rα 上の結合エピトープ解析に利用した。ヒト、カニクイザル及びマウスの IL-5Rα についてアミノ酸配列を比較し、ヒトの IL-5Rα にアミノ酸交換変異を導入することにより、ヒト IL-5Rα 上のベンラリズマブ結合エピトープのうち、単一アミノ酸として 61 番目イソロイシン（I61）がベンラリズマブの結合に重要であることが同定された（Kolbeck et al, 2010）。I61 及び隣接するアミノ酸は、ヒト及びカニクイザルでは保存されているが、マウスの IL-5Rα では保存されていないことから、このことがカニクイザルの IL-5Rα では交差反応性を示すもののマウスの IL-5Rα では反応しない要因であることが明らかとなった。更に、IL-5Rα 上のベンラリズマブ結合エピトープは、近年に高次構造解析で同定された IL-5 結合エピトープと重複しており、IL-5 依存性細胞増殖試験においてベンラリズマブがアンタゴニスト活性を示す理論的根拠となる（Ishino et al, 2004）。

細胞表面上に発現するヒト IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合活性を評価するために、ヒト末梢血由来の好酸球を用いてフローサイトメトリー解析を実施した。本検討では、ベンラリズマブの増強された FcγRIII に対する親和性による Fc を介した非特異的結合の影響を少なくする目的で、フコース含有型の KM8400 を用いた。その結果、KM8400 は 0.036 nmol/L の 50%結合濃度でヒト好酸球に結合した（試験番号： RIA563-0001、参考 4.2.1.1-3）。

更に、ヒト好酸球上のヒト IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合活性をビオチン標識したベンラリズマブを用いてフローサイトメトリーにより測定した。ビオチン標識ベンラリズマブはヒト好酸球に対して結合活性を示したが、ビオチン標識した IgG1 型の対照抗体は結合活性を示さなかった（試験番号： d-[redacted]-0147、4.2.1.1-5）。また、抗原結合性及び ADCC アッセイにおいてベンラリズマブと同等であることが示されている KM8407 が（試験番号： r-[redacted]-0337、参考 4.2.1.1-1）、ヒトリンパ球、単球及び好中球に結合しないことを別の試験（試験番号： r-[redacted]-194、参考 4.2.1.1-6）において確認した。

好酸球及び骨髄中の好酸球前駆細胞以外では、好塩基球がヒトにおける唯一の IL-5Rα 発現細胞である。FcγR に対する非特異的な結合を避けるために、ベンラリズマブ由来 F(ab')2 を用いて好酸球と好塩基球に対する相対的な結合量を比較した。ベンラリズマブ由来 F(ab')2 の末梢血好酸球に対する結合量は、末梢血好塩基球に対する結合量と比較して 3 倍程度多かった。この結果は、好酸球上の IL-5Rα 発現数が好塩基球に比べて 3 倍多いことを示唆している。更に、ベンラリズマブ由来 F(ab')2 はヒト骨髄単核細胞（BMMNC）のうち、好酸球及びその前駆細胞と考えられる小画分（～0.9%）に結合した（Kolbeck et al, 2010）。

カニクイザル好酸球上に発現する IL-5Rα に対するベンラリズマブの 50%結合濃度を算出するために、KM8400 を、濃度段階をつけて好酸球と反応させた。その結果、KM8400 は 0.040 nmol/L の 50%結合濃度でカニクイザル好酸球に結合した（試験番号： RIA563-0001、参考 4.2.1.1-3）。また、KM8407 はカニクイザルのリンパ球、単球及び好中球には結合しなかった（試験番号： r-[redacted]-194、参考 4.2.1.1-6）。

ヒト IL-5 の受容体結合に対する阻害活性をベンラリズマブのマウス親抗体である KM1259 を用いて評価した。KM1259 とベンラリズマブの相補性決定領域（CDR）は同一であるために、これらの抗体が特異的に結合するヒト IL-5Rα 上のエピトープは共通している。KM1259 はヒト IL-5 のヒト IL-5Rα に対する結合を濃度依存的に阻害することが示された（Koike et al, 2009）。

ベンラリズマブは、組換えヒト IL-5Rα を発現した [redacted]細胞株の IL-5 依存性細胞増殖を濃度依存的に阻害したが、陰性対照抗体は細胞増殖に対して影響しなかった（試験番号：d-[redacted]-0019、4.2.1.1-7）。このことから、ベンラリズマブ の IL-5 に対する阻害活性が証明された。

FcγR に対するベンラリズマブの K_D を、固相化したヒト及びカニクイザルの FcγR を用いて BIAcore により測定した。その結果、ベンラリズマブはヒト及びカニクイザルの FcγRIIIa に対してそれぞれ 45.5 及び 23 nmol/L の K_D で結合した。ベンラリズマブのヒト及びカニクイザル FcγRIIIa に対する親和性は KM8400 に比べてそれぞれ 6 及び 8 倍高かったが、他の FcγR に対する K_D はベンラリズマブと KM8400 で同程度であった（Kolbeck et al, 2010）。

自家 NK 細胞をエフェクター細胞として用いた *in vitro* 試験において、ベンラリズマブの ADCC 活性を介したヒト好酸球に対するアポトーシス誘導能を評価した。その結果、ベンラリズマブは 0.9 pmol/L の 50%有効濃度（EC_{50}）で好酸球のアポトーシスを誘導した。 ベンラリズマブの ADCC 活性は NK 細胞依存的であった。一方、KM8400 の IL-5 依存性細胞増殖に対する阻害活性はベンラリズマブと同程度であったが、ベンラリズマブの EC_{50} より 1000 倍高い濃度においても好酸球のアポトーシスを誘導しなかった（Kolbeck et al, 2010）。また、ベンラリズマブは別の試験のドナー由来の好酸球に対しても ADCC 活性を示した（試験番号： d-[redacted]-0148、4.2.1.1-8）。

ベンラリズマブは好酸球以外ではヒトにおける唯一の IL-5Rα 発現細胞であるヒト好塩基球に対しても強い ADCC 活性を示し、好塩基球のアポトーシスを 0.5 pmol/L の EC_{50} で誘導した（Kolbeck et al, 2010）。

また、ベンラリズマブは好酸球及びその前駆細胞である可能性が高い IL-5Rα を発現する BMMNC のアポトーシスも誘導した（Kolbeck et al, 2010）。

ヒト好酸球において、*in vitro* ADCC 活性による培養上清中への好酸球性顆粒タンパク質である好酸球カチオンタンパク質（ECP）又は好酸球由来神経毒（EDN）の放出は認められなかった。これらの結果は *in vitro* 試験においてベンラリズマブ による ADCC 活性が好酸球の脱顆粒を誘導しないことを示している（Kolbeck et al, 2010）。末梢血単核細胞（PBMC）をエフェクター細胞とした別の試験においても、ベンラリズマブにより誘導された好酸球のアポトーシスは上清中 EDN 及び ECP の増加を伴わなかった（試験番号： d-[redacted]-0149、4.2.1.1-9）。

ベンラリズマブが CDC を介してヒト好酸球の細胞死を *in vitro* で誘発するか評価した。ベンラリズマブは 3 例のドナー由来の好酸球に対して CDC 活性を示さなかったのに対して、rituximab（抗 CD20 抗体）は CD20 を発現した Daudi 細胞において CDC 活性を示した（試験番号： RIA563-0002、参考 4.2.1.1-10）。末梢血由来ヒト好酸球では 1 細胞当たりの IL-5Rα 発現数が 200～1000 分子と低いために、ベンラリズマブは好酸球に対して CDC 活性を示さないと考えられた（Ingley and Young, 1991; Lopez et al, 1991; Migita et al, 1991）。

ベンラリズマブの好酸球除去作用を *in vivo* で評価するため、カニクイザルに 1 日 1 回 20 日間 IL-5 を皮下投与して重度の末梢血好酸球増多症を惹起させた。組換えヒト IL-5 の初回投与から 10 日後に 0.01 又は 0.3 mg/kg の KM8407 を単回静脈内投与した結果、無処置群に比べて KM8407 投与群では各投与量において 3 例中 2 例で血中好酸球数の増加が抑制され、KM8407 の *in vivo* 活性が示された（試験番号： r-[redacted]-222、4.2.1.1-11）。

更に末梢血中の好酸球及び骨髄中の好酸球前駆細胞に対するベンラリズマブの影響をカニクイザルにおける反復投与毒性試験の中で評価した（試験番号：[redacted].112.01、4.2.3.2-1）。カニクイザルに 4 用量（0.1、1、10 及び 30 mg/kg）のベンラリズマブ又は溶媒を 3 週間に 1 回、9 週間静脈内投与した。検討したすべての用量において、ベンラリズマブは初回投与後に末梢血

中の好酸球数を検出限界近くまで減少させたことから、ベンラリズマブは迅速かつ強力に循環血中好酸球を減少させると考えられた（Kolbeck et al, 2010）。その後の試験期間中を通じて、末梢血中の好酸球数は検出限界未満であった。同様に、骨髄中の好酸球前駆細胞はすべての用量のベンラリズマブ投与群において最終投与 3 日後（投与期間終了時剖検）まで 80%以上減少し、ベンラリズマブ 30 mg/kg 投与群では最終投与 21 日後まで検出限界未満であった（回復期間終了時剖検）。骨髄におけるベンラリズマブの顕著な効果は好酸球系細胞に特異的であり、好中球前駆細胞（骨髄芽球及び前骨髄球）の数は変化しなかった（Kolbeck et al, 2010）。

KM8407 は、カニクイザルを用いた豚回虫（*Ascaris suum*）抗原誘発試験において好酸球増多を抑制した。KM8407（1 mg/kg）の単回静脈内投与前後にジニトロフェニル（DNP）化豚回虫抽出物（DNP-Ascaris）で感作した。試験に使用したカニクイザルは、溶媒投与試験において抗原暴露により、気管支肺胞洗浄液（BALF）中の好酸球数の顕著な増加及び気道過敏性反応（AHR）の亢進が認められた（試験番号：d-[redacted]-184、r-[redacted]-457、参考 4.2.1.1-12、参考 4.2.1.1-13）。KM8407 の投与により BALF 中好酸球数増加が 80%以上抑制された。KM8407 を投与されたカニクイザルでは AHR も抑制される傾向を示したが、2 例のカニクイザルのみを用いた評価のために統計学的な解析は実施しなかった。

2.4.2.2 副次的薬理試験

ベンラリズマブの副次的薬理試験は実施しなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

ベンラリズマブの安全性薬理試験は GLP 基準に準拠したカニクイザルを用いた皮下及び静脈内反復投与毒性試験（2.6.6.3）の中で評価した。評価項目は、中枢神経系（行動の一般状態観察）、心血管系（心電図及び血圧の評価）及び呼吸器系（呼吸数及び血液ガスの評価）とした。その結果、いずれの非臨床安全性試験においても評価した安全性薬理学的パラメータにベンラリズマブに起因した異常は認められず、更に病理組織学的検査においても、主要器官にベンラリズマブに起因した異常は認められなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用

ベンラリズマブの薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 非臨床薬物動態試験の概要

ベンラリズマブの薬物動態（本項において PK は薬理学的及び毒性学的用量における薬物動態を記述する）はカニクイザルを用いた非 GLP 基準の単回投与毒性（TK）試験（試験番号：[redacted].263.02、4.2.3.1-1）、GLP に準拠した 9 週間反復投与毒性試験（試験番号：[redacted].112.01、4.2.3.2-1）、15 週間反復投与毒性試験（試験番号：[redacted].263.04、4.2.3.2-2）、9 ヵ月間反復投与毒性及び PK 試験（試験番号：AAO00095、4.2.3.2-3）並びに ePPND 試験（試験番号：AAO00036、4.2.3.5.3-1、Stewart, 2009）において評価した。概要文は 2.6.4 に、概要表は 2.6.5 に記載した。分析法及び TK 試験成績は 2.6.4 に示した。

[redacted].263.02 試験（4.2.3.1-1）において、3 例の雄性カニクイザルに 30 mg/kg のベンラリズマブを単回皮下投与した。カニクイザルでのベンラリズマブの吸収は緩やかで、投与後約 3 日に C_{max} に達した。平均 CL/F 及び $t_{1/2}$ はそれぞれ 8.37 mL/kg/d 及び 9.73 日であった。投与前及

び投与後ともに 3 例の動物に抗薬物（ベンラリズマブ）抗体（ADA）は検出されなかった。また、各個体の PK プロファイルは免疫原性反応がないことを支持した。

[redacted].112.01 試験（4.2.3.2-1）において、カニクイザルにベンラリズマブを 0.1、1.0、10 又は 30 mg/kg の用量で 3 週間に 1 回、9 週間の反復静脈内投与したときの曝露は、投与量に比例していた。$t_{1/2}$ は 7.83 から 20.4 日であり、薬物の明らかな蓄積は認められなかった。平均 CL は 3 回目投与（Day 43）における最高投与量での値（6.48 mL/kg/d）以外はすべての投与量及び投与日で差は認められなかった（3.6 から 4.56 mL/kg/d）。V_{ss} は検討した投与量範囲において同様の値であり、カニクイザルの細胞外液量である 65 mL/kg に近い値であった。ベンラリズマブの PK に性差は認められなかった。ADA はベンラリズマブ投与個体 24 例中 2 例に検出され、ADA が検出された動物のベンラリズマブの曝露は低下していた。

[redacted].263.04 試験（4.2.3.2-2）において、雌雄カニクイザルにベンラリズマブを 0、1、10 又は 30 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回、15 週間反復皮下投与したときの曝露は投与量に比例していた。$t_{1/2}$ は約 2 週間であった。皮下投与部位からのベンラリズマブの吸収は緩やかで、初回（Day 1）投与後約 3 日で C_{max} に達した。初回投与での平均 CL/F は 4.64 から 6.07 mL/kg/d であった。ベンラリズマブの曝露は、初回投与と最終投与の間で約 2 倍の蓄積を示した。PK は雌雄で同様であった。ADA はコントロール動物の 12 例中 1 例（8%）、ベンラリズマブ投与動物の 36 例中 9 例（25%）で検出された。ベンラリズマブ投与群の ADA 陽性動物のうち 2 例では、ベンラリズマブの曝露が低下していた。ベンラリズマブの曝露はその他のベンラリズマブ投与動物では維持されていた。

AAO00095 試験（4.2.3.2-3）において、雌雄カニクイザルにベンラリズマブを 2 週に 1 回 39 週間（合計 20 回）、0、10 若しくは 25 mg/kg の用量で静脈内インフュージョン（30 分）又は 0 若しくは 30 mg/kg の用量で皮下投与した。10 及び 25 mg/kg の静脈内投与後のベンラリズマブの全身曝露（AUC 及び C_{max}）は投与量に比例して増加した。皮下投与したときのベンラリズマブは、投与後 0.5 から 10 日の間に C_{max} に達した。隔週投与での各群の蓄積比は約 2 倍であった。ベンラリズマブの初回静脈内投与後の平均 CL は 3.94 から 4.57 mL/kg/d であった。また、ベンラリズマブの初回皮下投与後の平均 CL/F は 6.96 mL/kg/d であった。$t_{1/2}$ は投与 1、19 及び 20 回目で各群とも同様であり、10.3 から 15.6 日であった。皮下投与における初回及び 19 回投与後の生物学的利用率は、それぞれ約 61%及び約 58%であった。ADA はベンラリズマブ投与群の 36 例中 2 例に検出され、ADA が検出されたこれら個体の血清中のベンラリズマブの曝露は低下していた。

GLP 基準に準拠して実施した出生前及び出生後発生試験（試験番号：AAO00036、4.2.3.5.3-1）において、妊娠雌性カニクイザルにベンラリズマブを 0、10 及び 30 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回反復静脈内投与したときの曝露は投与量に比例していた。平均 $t_{1/2}$ は 7.92 から 10.8 日で初回及び 9 回目投与後で各投与群ともに同様であった。平均 CL は 4.98 から 6.72 mL/kg/d であった。出生児へのベンラリズマブの曝露が確認されたことから、母動物の循環血中ベンラリズマブは胎盤を通過して胎児に移行したと考えられる。ADA は第 2 群（10 mg/kg）の 14 例中 1 例（7%）、第 3 群（30 mg/kg）の 19 例中 2 例（11%）で検出された。これら ADA 陽性動物の血清中のベンラリズマブの曝露は低下していた。それ以外の ADA 陰性の母動物のベンラリズマブの曝露は維持されていた。出生児ではすべての時点で ADA は検出されなかった。

2.4.3.2 吸収及び曝露

ベンラリズマブをカニクイザルに単回及び反復静脈内又は皮下投与したときの吸収及び曝露についての評価を2.4.3.1項にまとめた。概して、皮下投与後の吸収は緩やかであり、生物学的利用率は約 60%であった。ベンラリズマブの曝露量は用量に比例しており、カニクイザルにおける他の一般的な IgG の曝露量と同様であった。数例の動物でみられた反復投与における曝露の低下は、ADA の産生によるものと考えられた。

2.4.3.3 分布

ベンラリズマブの組織分布に関する試験は実施しなかった。IgG と同様、ベンラリズマブの分布は細胞外液に限定されていると考えられる。

2.4.3.4 代謝

ベンラリズマブの代謝に関する試験は実施しなかった。

2.4.3.5 排泄

ベンラリズマブの排泄に関する試験は実施しなかった。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

ベンラリズマブの薬物動態学的薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 非臨床毒性試験の概要

これまでに実施した非臨床安全性試験の一覧を表 2.4.1-2に示した。概要文は 2.6.6 に、概要表は 2.6.7 に記載した。

全 8 試験の非臨床安全性試験のうち、5 試験はカニクイザルを用いてベンラリズマブの静脈内及び皮下投与により実施した。これらの試験は、単回皮下投与試験（試験番号：[redacted].263.02、4.2.3.1-1）、9 週間反復静脈内投与試験（試験番号：[redacted].112.01、4.2.3.2-1）、15 週間反復皮下投与試験（試験番号：[redacted].263.04、4.2.3.2-2）、9 ヵ月間静脈内及び皮下投与試験（試験番号：AAO00095、4.2.3.2-3）及び ePPND 試験（試験番号：AAO00036、4.2.3.5.3-1、Stewart, 2009）である。薬理作用から予想されたように、ベンラリズマブを投与した動物では投与期間及び回復期間を通じて、顕著な血中好酸球数の減少が認められた。9 週間反復静脈内投与試験では最高用量群（30 mg/kg）の 10 例中 2 例（雌雄各 1 例）で、好中球数減少を主体とした白血球数の減少が認められたものの、軽度、かつ一過性であったことから、無毒性量（NOAEL）は 30 mg/kg と判断した。15 週間反復皮下投与試験では、ベンラリズマブに起因する毒性は観察されず、NOAEL は当該試験で設定した最高用量の 30 mg/kg であった。9 ヵ月間反復投与試験では、雌雄の生殖能に関連する検査項目を含めベンラリズマブ投与に起因する毒性は認められず、NOAEL は当該試験で設定した最高用量である静脈内投与で 25 mg/kg、皮下投与で 30 mg/kg であった。

ベンラリズマブは、カニクイザル及びヒト組織を用いた TCR 試験において、両種の組織に対して同様の結合パターンを示した（試験番号： IM1232 及び IM1231、4.2.3.7.7-1 及び 4.2.3.7.7-2）

カニクイザルを用いた初期胚発生から着床に至る発生毒性試験は現実的ではない（Chellman et al, 2009 ; Martin et al, 2009）ことから実施していない。代替として性成熟したカニクイザルを用いた 9 ヵ月間の静脈内及び皮下投与毒性試験において、受胎能を間接的に評価した。受胎能の評価は月経周期（雌）、精巣の大きさ計測及び精子検査（雄）、器官重量（精巣上体、卵巣、前立腺、精嚢、精巣及び子宮）並びに生殖器官（精巣、前立腺、精巣上体、精嚢、卵巣、卵管、子宮、子宮頸管及び腟）の病理組織学的検査により実施した。受胎能に関する評価項目にベンラリズマブ投与に起因した異常所見は認められなかった。一方、カニクイザルを用いた ePPND 試験（Stewart, 2009）を実施した。すなわち、ベンラリズマブの投与を雌の妊娠動物に GD20 から GD22（妊娠を確認した日に依存）に開始し、GD35 以後、妊娠期間中から分娩後 1 ヵ月まで 14 日間に 1 回（最大 14 回）投与した。出生児は生後 6.5 ヵ月までの成長を評価した。その結果、母体に対するベンラリズマブ投与の影響、免疫学的評価（キーホールリンペットヘモシアニン[KLH]免疫による抗 KLH IgM 抗体及び抗 KLH IgG 抗体の力価中央（CPT）値並びに血清 IgG、IgM 及び IgA 量）を含む出生児の生育及び発達はカニクイザルの正常範囲内であったことから、NOAEL は本試験で設定した最高用量である 30 mg/kg であった。

ウサギを用いた局所刺激性試験において、ベンラリズマブ（凍結乾燥製剤）の皮下投与による刺激性は認められなかった。

2.4.4.2 動物種の選定

ベンラリズマブが 1）カニクイザルの好酸球に結合すること、2）カニクイザル IL-5 誘発好酸球増多モデルにおいて薬理活性を示すこと及び 3）カニクイザルを用いた喘息モデルにおいて抗喘息作用を示すことに基づき、カニクイザルを非臨床安全性評価動物に選定した。更にヒト及びカニクイザルの組織交差反応性に類似性があることもカニクイザルがベンラリズマブの安全性試験に適切な動物種であることを支持している。なお、ベンラリズマブはマウスの IL-5Rα と結合しないため、げっ歯類はベンラリズマブの非臨床安全性評価に適さないと判断し、げっ歯類を用いたベンラリズマブの毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.3 単回投与毒性試験

非 GLP 試験として、単回投与毒性試験（試験番号：[redacted].263.02、4.2.3.1-1）を実施した。3 例の雄性カニクイザルにベンラリズマブを 30 mg/kg の用量で単回皮下投与（Day 1）した。本試験では対照群を置いていないため、試験成績の解釈及び因果関係の判定には制約がある。

試験期間を通じて、すべての動物において投与部位に異常は認められなかった。原因は不明ながら、1 例で馴化期間中と比較して約 10%の体重減少が認められた（Day 22）。同個体では Day 21 及び 22 にケージトレーに赤色を帯びた尿が観察された。尿検査の結果、同個体では顕著な血尿及びタンパク尿が観察されたが、原因は不明である。また、他の 2 例においても Day 3 又は Day 11 に中等度の血尿が観察された。

ベンラリズマブを 30 mg/kg の用量で単回皮下投与した結果、すべての動物においてベンラリズマブの薬理作用として予想された好酸球数の減少が観察された。

2.4.4.4 反復投与毒性試験

ベンラリズマブの反復投与による非臨床安全性試験における主な所見は、好酸球（血中及び骨髄）の減少であった。試験に特異的な所見として、9 週間静脈内投与試験の最高用量群（30 mg/kg）において 10 例中 2 例（雌雄各 1 例）に好中球数減少を主体とした一過性の白血球

数減少が認められた。同様の変化は 9 ヵ月試験を含む他の試験では認められなかった。最後に 9 ヵ月試験では、25 mg/kg 静脈内投与群の雌 1 例の 4 回目投与後（Day 43）に回復性のある点状出血、斑状出血、血小板数の減少及び赤血球系パラメータの低値（ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、赤血球数）が一過性に認められた。この雌動物は Day 57 の投与を休薬（この動物は Day 71 に投与を再開し、最終投与まで投与）した結果、回復し、残りの試験期間を通じて異常は認められず、関連する病理学的異常も観察されなかった。その他の 25 mg/kg 静脈内投与群の動物及び 9 週間反復静脈内投与毒性試験の 30 mg/kg 投与群の動物にも同様の所見は観察されなかった。

GLP 基準に準拠した試験としてカニクイザルにベンラリズマブ を 0、0.1、1.0、10 又は 30 mg/kg の用量で 3 週間に 1 回、9 週間、計 4 回反復静脈内投与した（試験番号：[redacted].112.01、4.2.3.2-1）。投与終了後 18 日間の回復期間を設定し、ベンラリズマブによる毒性の回復性を検討した。

血液学的検査及び病理組織学的検査（骨髄塗抹検査を含む）において好酸球数の減少が観察され、ベンラリズマブの主たる薬理活性に基づく変化と考えられた。好酸球数は、雌雄すべてのベンラリズマブ投与群において投与期間及び回復期間を通じて顕著に減少した。最高用量群（30 mg/kg）の雌 1 例では、Day 46 以後、好酸球数の回復が認められた（この動物では Day 43 以降、ベンラリズマブに対する ADA 産生が認められた）。

好酸球数の顕著な減少が観察されたことに加え、好中球数の減少を主体とした一過性の白血球数減少が高用量群の雄 1 例及び雌 1 例でそれぞれ Day 25 及び Day 46 に認められた。

病理組織学的検査では、ADA が検出された 30 mg/kg 投与群の雌を除き、投与期間終了時及び回復期間終了時のすべてのベンラリズマブを投与した動物で、骨髄（胸骨及び大腿骨）の好酸球の消失又は減少が認められた。投与期間終了時の対照群及び ADA が検出された 30 mg/kg 投与群の雌 1 例では、リンパ節、胸腺又は直腸に散在性の好酸球（浸潤）が観察された。他のベンラリズマブ投与動物では同様の細胞侵潤が観察されなかったのはベンラリズマブの薬理作用によるものと推察された。骨髄塗抹検査では、すべての動物において巨核球、骨髄球（好酸球以外）及び赤芽球系のいずれの前駆細胞も正常範囲内であった。ほぼすべてのベンラリズマブ投与動物の骨髄で好酸球前駆細胞の消失又は劇的な減少が認められた。ベンラリズマブ投与群における骨髄での好酸球前駆細胞の消失並びにその回復性の欠如は被験物質の影響と考えられた。骨髄球系前駆細胞（骨髄芽球及び前骨髄球）に対する影響は認められなかった。試験期間中及び剖検後の検査を通じて被験物質によるその他の影響は認められなかった。本試験条件下において、30 mg/kg 投与群の 10 例中 2 例で好中球数の減少が認められたものの、軽度、かつ一過性であったことから、ベンラリズマブの NOAEL は 30 mg/kg と判断した。

GLP 基準に準拠した試験としてベンラリズマブ（0、1、10 又は 30 mg/kg）をカニクイザルに隔週で 15 週間、計 8 回皮下投与した（試験番号：[redacted].263.04、4.2.3.2-2）。

一般状態観察、投与部位の皮膚スコア、摂餌量、体重、眼科学的検査、心電図、血圧、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）及び器官重量にベンラリズマブ投与に関連した明らかな変化は認められなかった。また、投与終了時及び回復期間終了後の肉眼所見及び病理組織学的検査の結果にも、ベンラリズマブ投与に関連した明らかな変化は認められなかった。

いずれの検査項目においても被験物質投与の影響が認められなかったことから、カニクイザルに隔週 1 回、15 週間皮下投与したときのベンラリズマブの NOAEL は、本試験における最高用量である 30 mg/kg であった。

GLP 基準に準拠した試験として、性成熟したカニクイザル（雌雄各群 6 例）に、ベンラリズマブを隔週 1 回 39 週間、計 20 回、静脈内（0、10 又は 25 mg/kg）、又は皮下（0 又は 30 mg/kg）投与した（試験番号：AAO00095、4.2.3.2-3）。最終投与から 3 日後（Day 270）及び 12 週間後（Day 351）に剖検を実施した（雌雄各群 3 例）。各群の例数は抗体の長期毒性試験の群構成（Chapman et al, 2012）を参考とし、推奨臨床用量に対して適切な安全域を担保できる投与用量を設定した。

雌性生殖器系の評価項目（月経周期及び雌性生殖ホルモン濃度）及び雄性生殖器系の評価項目（精巣容積、精子運動量、精子濃度、精子数、精子形態及び雄性生殖ホルモン濃度）に異常は認められなかった。

ベンラリズマブの薬理作用として予想された末梢血（Day 63 まで）及び骨髄（Day 270）の好酸球数減少がほとんどのベンラリズマブ投与動物に認められた。投与期間終了時に観察された末梢血及び骨髄の好酸球数減少はそれぞれ 12 週間の回復期間を経た Day 350 及び Day 351 まで持続した。一部の動物では投与期間中に好酸球数減少が認められなかった、若しくは一過性の減少であり、これらの動物の回復期間終了時点の好酸球数は試験開始前又は対照群と同程度であった。

25 mg/kg 静脈内投与群の雄 1 例では、試験開始前からと思われる右手首の異常が悪化したことから Day 47 に剖検した。その他の動物は予定した剖検時まで生存した。25 mg/kg 静脈内投与群の雌 1 例は、4 回目の投与後（Day 43）に点状出血、斑状出血、血小板数の減少及び赤血球系パラメータの低値が一過性に認められた。この個体は Day 57 の投与を見合わせたところ、症状は回復した。Day 71 に投与を再開し、投与期間終了まで投与を継続したが、残りの試験期間中に異常は認められず、関連する病理学的所見も観察されなかった。本試験の 25 mg/kg 静脈内投与群の他の個体及び 9 週間反復静脈内投与毒性試験（試験番号：[redacted].112.01、4.2.3.2-1；2.6.6.3.1 参照）の 30 mg/kg 投与群においても同様の所見は観察されなかった。試験期間及び剖検後の検査を通じて被験物質投与に関連する異常所見は観察されなかった。なお、骨格筋又は心筋では細胞質に組織交差反応性（2.6.6.8.1 参照）が認められているものの、本試験の病理組織学的検査結果においてベンラリズマブに関連した異常は観察されなかった。これはベンラリズマブが mAb であり、細胞質へは到達しなかったためと考えられた。本試験における NOAEL は設定した最高用量である静脈内投与で 25 mg/kg、皮下投与で 30 mg/kg であった。

2.4.4.5 遺伝毒性試験

ベンラリズマブは自然界に存在するアミノ酸で構成された mAb であり、無機又は有機合成したリンカー及び他の非タンパク質成分は含有していない。したがってベンラリズマブが DNA 及び他の染色体成分と直接相互作用する可能性は極めて低いと考えられる。また、ベンラリズマブは分子量の大きいタンパク質であることから、核膜及びミトコンドリア膜を通過しないと考えられる。バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床安全性評価ガイドライン（ICH S6 (R1), 2011）によれば、ベンラリズマブのようなバイオテクノロジー応用医薬品では、通常実施される標準的な遺伝毒性試験の実施は求められていない。したがって、ベンラリズマブの遺伝毒性又は変異原性の評価は実施していない。

2.4.4.6 がん原性試験

ベンラリズマブのがん原性を評価する試験は実施していない。ベンラリズマブは喘息の長期治療を目指していることから、前述したカニクイザルを用いた静脈内又は皮下投与による GLP

基準に準拠した反復投与毒性試験において長期間の影響を評価した。反復静脈内及び皮下投与試験（2 週に 1 回 39 週間、計 20 回の投与により実施）では、30 mg/kg の皮下投与及び 25 mg/kg の静脈内投与で器官重量及び組織学的所見に前がん病変を示唆する所見は観察されなかった。

ベンラリズマブの発がん性を評価する目的として、考えられる各種の *in vivo* 評価系について検討した。この検討ではベンラリズマブのがん原性を評価する非臨床モデルが臨床的に意義のあるリスク評価情報を提供しうるかを特に重点的に検討した。げっ歯類は低分子化合物のがん原性評価において標準的に用いられる動物種であるが、ベンラリズマブはマウスの IL-5Rα に結合しないことから、げっ歯類はベンラリズマブのがん原性を直接評価する動物種として適切ではない。したがって、次にマウスと反応するサロゲート抗体又は標的を欠損したトランスジェニックマウスモデルを用いることを検討した。しかしながら、FcγR が仲介する ADCC のエフェクター機能における種差に基づき、ベンラリズマブによって増強されたヒトの ADCC 活性を反映するサロゲート抗体を使用したげっ歯類の代替モデルの作製は難しいと判断した（Niwa et al, 2004）。更に、トランスジェニックマウスモデルは IL-5Rα 及びそのリガンド以外の遺伝子改変によって作出されている。したがって、これらのモデルは異なる生理的機能を有する可能性が考えられることから、その試験結果の解釈並びに臨床的妥当性に影響を及ぼすものと考えられ、適切なモデルとは判断しなかった。次に IL-5 欠損及び IL-5Rα 欠損マウス等のノックアウト動物を検討した。IL-5Rα はマウス及びヒトの好酸球及び好塩基球に発現しているものの、マウスの IL-5Rα は B-1 細胞にも恒常的に発現しており、更にマウスの IL-5Rα は活性化した B-2 細胞において発現が誘導される（Takatsu et al, 2009）。このため、IL-5Rα 欠損マウスでは B-1 細胞の減少をもたらし、その結果 IgM 及び IgG3 の血清中濃度は低いレベルを示す（Yoshida et al, 1996）。B-1 細胞の発がん性に関連する役割が提唱されていることを考慮すると、マウス及びヒトで IL-5Rα の発現に差異があることから、ベンラリズマブのがん原性リスクに関して通常のマウスを用いる 2 年間のバイオアッセイは、臨床的に意味のある情報を提供する可能性は低いと考えられる。

結論として、マウス及びヒトの IL-5Rα 並びに FcγR が生理学的に異なること、IL-5 及び IL-5Rα 欠損マウスモデルの臨床外挿性の低さから、げっ歯類のトランスジェニック動物を用いたがん原性評価及びサロゲート抗体を用いたげっ歯類の試験は実施しなかった。（詳細は 2.6.6.5 を参照）。

2.4.4.7 生殖発生毒性試験

GLP 基準に準拠したカニクイザルを用いた ePPND 試験（Stewart, 2009）を実施した（試験番号：AAO00036、4.2.3.5.3-1）。妊娠 0 日を推定受胎日とし、交配後は、妊娠後の日数（GD）をもとに妊娠動物及び胎児に対する検査を実施した。母動物（各群 14 例を目標として試験に組込んだ）にベンラリズマブの 0、10 又は 30 mg/kg を GD20 から GD22（妊娠を確認した日に依存）、GD35 以降は妊娠期間中及び出産後 1 ヵ月まで 14 日間に 1 回、静脈内投与（bolus 投与）した（最大 14 回）。各群の動物数は、適切な試験結果の解釈を行うため十分な例数を確保できるように設定した（ICH S6 (R1), 2011 Note 5；Jarvis et al, 2010）。出生児は生後 6.5 ヵ月まで発育を評価した。

表2.4.4.7-1 生殖発生毒性試験の試験デザイン

群番号	妊娠雌動物数	設定用量（mg/kg/dose）	投与容量（mL/kg）	投与液濃度（mg/mL）
1	15[a]	0 （対照物質）	1.9	0
2	14	10	1.6	6.4
3	21[b]	30	1.9	16.2

a GD50 以前の妊娠損失により、1 例追加した。
b GD50 以前の妊娠損失により、1 例追加した。また、データ評価に適切な群構成とするため雌 6 例を追加した。

ベンラリズマブ投与に関連した唯一の変化として、妊娠期間中及び PPD28 までの母動物、及び生後 28 日の出生児において、予想された薬理学的作用である末梢血好酸球の完全又はほぼ完全な消失が認められた。母動物での好酸球数の減少は、少数例では PPD91 までに回復していたが、その他の動物においても PPD91、136、180 と徐々に回復し、多くの動物では PPD180 までに対照群と同程度まで回復した。母動物の血清中 IgM、IgG、IgA 及び IgE 濃度については、妊娠期間又は出産後を通じてベンラリズマブ投与に関連した変化は認められなかった。出生児では、抗 KLH IgG 又は抗 KLH IgM の産生及び血清総 IgG、IgM 及び IgA 濃度にベンラリズマブ投与による影響は認められなかった。出生児における IgE は、コントロール群を含むすべての群で散発的に検出されたものを除いては、すべての時点で定量下限未満であった。妊娠期間中に実施した超音波検査による胎児の形態計測では子宮内でのベンラリズマブの曝露に起因した変化は認められず、妊娠期間にも影響は認められなかった。主な器官形成期（GD50 まで）の胚損失は、被験物質に関連はないと考えられた。ベンラリズマブ投与群において妊娠第 3 期の胎児損失の頻度がわずかに高かったが、分娩に伴って一般に起こりうる合併症によるものと考えられた。妊娠第 3 期における胎児損失を起こす特定の原因を説明できるベンラリズマブの薬理作用は知られておらず、妊娠第 3 期の胎児発育に対する被験物質の影響はないものと考えられた。出生児の生育及び発達はカニクイザルの正常範囲内であった。

ベンラリズマブの 10 及び 30 mg/kg の曝露を子宮内で受けた群の出生児では、それぞれ BD28、BD91、BD136 に末梢血好酸球数の減少が認められた。30 mg/kg 投与群の 1 例を除くすべての出生児において末梢血好酸球数は BD180 までに対照群と同程度まで回復した。1 例の出生児では BD199（±2 日）まで好酸球数の減少は継続し、病理組織学的検査（BD199（±2 日））において、骨髄の好酸球が認められなかったことと相関していた。

心筋に対する組織交差反応性が認められているが（2.6.6.8.1 参照）、胎児及び出生児の心臓に対するベンラリズマブに関連した影響（出生児の病理組織学的検査を含む）は認められなかった。これはベンラリズマブが大きな分子量をもつ mAb であることから、細胞質に到達しないためと考えられた。

以上のように、評価したすべての用量において、母動物、胎児及び出生児におけるベンラリズマブ投与に起因した毒性は認められなかった。本試験の条件並びに薬理学的作用に関連した所見に基づき、NOAEL は本試験で設定した最高用量である 30 mg/kg であった。なお、好酸球数の減少は期待されるベンラリズマブの薬理作用であり、NOAEL の判断からは除外した。

2.4.4.8 局所刺激性試験

ニュージーランド白色種ウサギを用いてベンラリズマブの単回皮下投与後の局所忍容性及び刺激性を評価した（試験番号：517668、4.2.3.6-1）。6 例の動物を用い、離れた注射部位にそれぞれ 1 mL ずつプラセボ（20 mmol/L ヒスチジン、9%トレハロース、0.02%ポリソルベート

20、pH 6.0）、0.9%（w/v）塩化ナトリウム（NaCl）液及び被験物質（凍結乾燥製剤：20 mmol/L ヒスチジン、9%トレハロース、0.004%ポリソルベート-20、pH6.0、50 mg/mL ベンラリズマブ）を投与し、2 日間又は 14 日間観察した。すべての動物において一般状態に異常は観察されなかった。投与部位の皮膚反応の兆候としては、数例の動物のベンラリズマブ及び0.9%塩化ナトリウム液投与部位に紫斑が観察されたのみであった。肉眼的検査及び病理組織学的検査においてベンラリズマブの皮下投与に起因した異常は観察されなかった。結論として、ベンラリズマブをウサギに単回皮下投与し、投与 14 日後まで観察したが、ベンラリズマブの皮下投与は十分な忍容性があり、投与部位での毒性学的に意義のある組織学的病変は認められなかった。

2.4.4.9 その他の毒性試験

2.4.4.9.1 組織交差反応性試験

正常カニクイザルの各種組織の凍結切片に対する、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識ベンラリズマブ（F-ベンラリズマブ、1 及び 10 µg/mL）の結合性を免疫組織化学的に評価した（試験番号：IM1232、4.2.3.7.7-1）。ベンラリズマブの組織への結合の検出には、未標識二次抗体（抗 FITC ウサギ抗体）及びペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を使用した。

カニクイザルの組織パネルに対し、限局的な被験物質の結合性が認められた。

- 多くの組織の血管内タンパク
  - 低又は中等度の染色性を示した。可溶性 IL-5R に対する染色性を反映しているものと考えられる。
- 脾臓の単核細胞
  - 細胞質辺縁及び/又は細胞膜に中等度の染色性を示した。
- 骨格筋及び心筋
  - 細胞質辺縁（横紋内への広がりを伴う）に低い染色性を示した。
- 骨髄好酸球前駆細胞
  - 細胞膜及び細胞質に中等度の染色性を示した。

正常ヒト組織の凍結切片に対する FITC 標識ベンラリズマブ（F-ベンラリズマブ、1 及び 10 µg/mL）の結合性を免疫組織化学的に評価した（試験番号：IM1231、4.2.3.7.7-2）。ベンラリズマブの組織への結合の検出には、非標識二次抗体（抗 FITC ウサギ抗体）及びペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を使用した。

ヒトの組織パネルに対し、限局的な被験物質の結合性が認められた。

- 多くの組織の血管内タンパク
  - 低又は中等度の染色性を示した。可溶性 IL-5R に対する染色性を反映しているものと考えられる。
- 脾臓の単核細胞
  - 細胞質辺縁及び細胞膜に低から中等度の染色性を示した。
- 横紋（骨格）筋の細胞
  - 細胞質辺縁（横紋内への広がりを伴う）に低から中等度の染色性を示した。

本試験におけるカニクイザル組織交差反応性は、同じ被験物質に対するヒト組織交差反応性と極めて高い類似性を示すか又はわずかに強いものであった。ヒト及びカニクイザル組織交差

反応性が示す特徴は、ヒト組織において IL-5R の分布が極めて限られているとする文献情報とおおむね一致するものであった（Hirai et al, 1990；Murata et al, 1992；Takatsu et al, 1994；Huston et al, 1996；Ochi et al, 2000；Hakonarson et al, 2002）。特筆すべき点は、カニクイザルでは骨髄好酸球への結合性が認められたものの、ヒトでは FITC 標識した同じロットの被験物質を用いても結合性が観察されなかったことであった。なお、予想外に認められた F-ベンラリズマブのヒト又はカニクイザルの横紋筋（骨格筋又は心筋）の筋細胞及び脾臓の単核細胞への反応性に関する文献情報は見当たらない。

ヒト及びカニクイザル組織交差反応性の特徴が極めて類似していたことは、カニクイザルがベンラリズマブの安全性試験に適した動物種であることを裏付けるものである。更に、組織交差反応性で陽性を示した組織への傷害性は、カニクイザルを用いた毒性試験において認められなかった。ベンラリズマブは分子量の大きな mAb であることから、細胞質に到達することはないと考えられ、細胞質への組織交差反応性は、ヒトでの安全性に対して重大な影響はないと判断した。脾臓では単核細胞への結合性が認められたが、カニクイザルを用いたベンラリズマブの毒性試験では脾臓の病理組織学的検査及びその他の免疫学的評価（2.6.6.8.3 参照）でベンラリズマブ投与による毒性は認められなかった。骨髄好酸球に対しては、カニクイザルを用いた毒性試験の骨髄検査において、予想どおり骨髄中の好酸球減少が観察された。

2.4.4.9.2 免疫毒性試験

カニクイザルを用いた非臨床安全性試験の中で免疫学的評価を行った（リンパ球サブセット、母動物の免疫グロブリン量［妊娠期間中及び出産後の血清 IgG、IgM、IgE 及び IgA 量］、血液学的検査及び免疫系組織の病理組織学的検査）。その結果、免疫系に対する影響は認められなかった。予想されたベンラリズマブの薬理学的作用として、好酸球の減少が認められた。更に、生殖発生毒性試験では、出生児の免疫系（KLH 免疫による抗 KLH IgM 抗体及び抗 KLH IgG 抗体の CPT 値及び血清 IgG、IgM 及び IgA 量）に対してベンラリズマブに関連した異常は観察されなかった。

2.4.5 総括及び結論

ベンラリズマブの主たる作用機序は、エフェクター細胞の存在下において好酸球に発現する IL-5Rα に結合し、増強された ADCC 活性を介したアポトーシスによって好酸球を除去することである。ベンラリズマブの結合親和性、特異性、作用メカニズム、有効性の理解並びに喘息のような好酸球による炎症という特徴を持つ疾患の治療に対する可能性を検討する目的で *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験を実施した。

ベンラリズマブはヒト IL-5Rα に対して高い親和性で結合する（K_D=0.016 nmol/L）。ベンラリズマブと同一の CDR を有し、ヒト IL-5Rα に対してベンラリズマブと同じエピトープを特異的に認識するマウス由来のベンラリズマブ前駆抗体である KM1259 は、ヒト IL-5 のヒト IL-5Rα に対する結合を阻害した。フローサイトメーターを用いた解析では、フコース含有型の KM8400（ベンラリズマブの FcγRIIIa に対する増強された親和性による Fc を介した好酸球への非特異的結合を最小化するために用いた）はヒト好酸球に結合し（50%結合濃度：0.036 nmol/L）、ベンラリズマブと同等の抗体である KM8407（CHO 細胞の単クローンから産生されるベンラリズマブとは異なり、CHO 細胞集団から産生される）はヒトリンパ球、単球又は好中球と結合しないことが示された。ベンラリズマブの F(ab')2（FcγR に対する非特異的

結合を避ける目的で使用した）はヒト末梢血好塩基球と結合し、好酸球又はその前駆細胞若しくはその両者と考えられるヒト BMMNC の小画分（～0.9%）に結合した。

ベンラリズマブは遺伝子組換えカニクイザル IL-5Rα に高い親和性で結合する（K_D = 0.042 nmol/L）。フローサイトメーターを用いた解析によると、KM8400 は、カニクイザル好酸球に結合することが示され（50%結合濃度：0.040 nmol/L）、KM8407 はカニクイザルのリンパ球、単球又は好中球に結合しないことが示された。

ヒト、カニクイザル及びマウスの IL-5Rα についてアミノ酸配列を比較し、適切にアミノ酸交換変異を導入することで、ベンラリズマブのヒト IL-5Rα に対する結合エピトープは単一のアミノ酸レベルまで同定され、I61 が結合に重要であることが示された。ベンラリズマブがマウスの IL-5Rα には結合せず、ヒト及びカニクイザルの IL-5Rα に結合することは、I61 及び隣接するアミノ酸がヒト及びカニクイザルの IL-5Rα 間では保存されているが、マウスの IL-5Rα では保存されていないことを示している。更に、ベンラリズマブの結合エピトープは、IL-5 が結合する既知のエピトープと高次構造が重複しており、IL-5 依存性細胞増殖において、ベンラリズマブがアンタゴニスト活性を示す理論的根拠となる。ヒト及びカニクイザルの FcγRIIIa に対する親和性は KM8400 と比較してそれぞれ 6 倍及び 8 倍高かった。K_D 値は評価したほかのすべての FcγR ではベンラリズマブと KM8400 で同程度であった。

ベンラリズマブは [redacted] 細胞の IL-5 依存性細胞増殖を阻害する機能的活性を示した。ベンラリズマブは自家 NK 細胞をエフェクター細胞として用いた *in vitro* 試験において ADCC を介して好酸球顆粒の脱顆粒を生じることなくヒト好酸球及び好塩基球のアポトーシスを誘導した（EC_{50}はそれぞれ 0.9 pmol/L 及び 0.5 pmol/L）。同様にベンラリズマブは *in vitro* で好酸球又はその前駆細胞と考えられるヒト IL-5Rα を発現する BMMNC のアポトーシスを誘導した。ベンラリズマブはヒトドナーから調製した好酸球に対して CDC 活性を示さなかった。これは好酸球における IL-5Rα の受容体発現が低いためと考えられた。

KM8407（0.01 又は 0.3 mg/kg）を単回静脈内投与したところ、IL-5 により誘発したサル好酸球増多モデルにおいて、3 例のうち 2 例で血中好酸球数を低下させた。KM8407 は同様にカニクイザルを用いた *Ascaris suum* 抗原誘発試験において AHR の抑制傾向を伴って好酸球増加（BALF 中の好酸球数を含む）を阻害した。

全 8 試験の非臨床安全性試験のうち、5 試験はカニクイザルにベンラリズマブを静脈内及び皮下投与する試験を実施した。これらの試験は、9 週間反復静脈内投与試験、単回皮下投与試験、15 週間反復皮下投与試験、9 ヵ月間静脈内及び皮下反復投与試験及び ePPND 試験である。薬理作用から予想されたようにベンラリズマブを投与した動物では好酸球数は投与期間及び回復期間を通じて顕著に減少した。9 週間反復静脈内投与試験では、最高用量群（30 mg/kg）の 10 例中 2 例（雌雄各 1 例）で血中好中球数の減少を主体とする白血球数の減少が認められたものの、軽度、かつ一過性であったことから、NOAEL は 30 mg/kg と判断した。15 週間反復皮下投与試験では、ベンラリズマブ投与による毒性は観察されず、NOAEL は少なくとも試験の最高用量である 30 mg/kg であった。9 ヵ月反復静脈内及び皮下投与試験では雌雄の生殖能評価項目を含めてベンラリズマブ投与による影響は認められず、NOAEL は試験の最高用量である静脈内投与で 25 mg/kg、皮下投与で 30 mg/kg であった。生殖発生毒性試験では、ベンラリズマブ投与による母動物に対する影響は観察されず、出生児の生育及び発達は免疫学的評価（KLH 免疫による抗 KLH IgM 抗体及び抗 KLH IgG 抗体の CPT 値及び血清 IgG、IgM 及び IgA 量）を含めてカニクイザルの正常範囲内であったことから、NOAEL は試験の最高用量である 30 mg/kg であった。なお、10 mg/kg 以上の投与群の出生児においても薬理作用による末梢血好

酸球数の減少が認められたが、ほぼすべての個体で BD180 までに回復した。10 mg/kg 投与時の母動物における定常状態での曝露量（GD133 の $AUC_{0\text{-}14d}$ ）の平均値（1710 μg·d/mL）を臨床投与間隔（8 週間）で補正した曝露量は、臨床での曝露量（D3250C00018 試験における 30 mg を最初の 3 回は 4 週に 1 回皮下投与し、以降は 8 週に 1 回皮下投与した群の定常状態における日本人での投与間隔間の AUC の平均値）の 99.0 倍であった。ウサギを用いたベンラリズマブの皮下投与による局所刺激性試験においてベンラリズマブに起因した異常は観察されなかった。最後に、ベンラリズマブの TCR を正常ヒト及びカニクイザル組織パネルを用いて評価した。ヒト及びカニクイザルの TCR プロファイルはほぼ同様であり、ヒト組織における IL-5R は極めて限局した分布を示すとする既存の文献報告（Hirai et al, 1990; Murata et al, 1992; Takatsu et al, 1994; Huston et al, 1996; Ochi et al, 2000; Hakonarson et al, 2002）と一致しており、非臨床安全性試験においてベンラリズマブの組織交差反応性が観察された器官/組織に異常所見は認められなかった。

ベンラリズマブの曝露量は非臨床安全性試験 5 試験を通じて 0.1 から 30 mg/kg の範囲で用量に対して線形であった。皮下投与後のベンラリズマブの吸収は緩やかで、投与後約 3 日で C_{max} に到達した。性差は認められなかった。出生児の血清中にベンラリズマブが検出されており、母動物から胎盤を通過してベンラリズマブが胎児に移行したと考えられた。カニクイザルにおけるベンラリズマブの PK パラメータは、標的介在性の薬物消失のない IgG1 抗体の特徴を示した。ベンラリズマブを投与した数例の動物で ADA が検出された。

適用しうる規制ガイダンス、特に ICH S6 (R1)、ICH M3 (R2)及び ICH S5 (R2)に従って、ベンラリズマブの非臨床安全性プロファイルを明らかにするため広範な一連の毒性試験を実施した。ベンラリズマブに関連した影響は投与後の好酸球減少（血中及び骨髄）に限られた。更に反復投与試験 1 試験において好中球数の減少を主体とする一過性の白血球減少が認められ（その他の試験では認められなかった）、また 1 例の動物で点状出血、斑状出血、血小板数の減少及び赤血球系パラメータの低値を示す一過性の毒性が認められたものの、休薬により回復し、その後の試験期間を通じて更なる毒性兆候及び関連する病理組織学的所見は認められなかった。

ヒト及びカニクイザルの組織交差反応性における高い類似性を示し、ベンラリズマブのカニクイザル好酸球に対する結合性、カニクイザル IL-5 誘発好酸球増多モデルにおけるベンラリズマブの薬理学的作用及びカニクイザルの喘息モデルにおいて抗喘息作用を示したことに基づき、非臨床安全性を評価する動物種にカニクイザルを選択した。すべての反復投与試験では臨床開発計画に沿って静脈内及び皮下投与経路による曝露とし、隔週 1 回又は 3 週に 1 回の投与とした。それぞれの毒性試験における投与量は、実験動物に対して相当の負荷を与え、かつヒトでのリスク評価を適切に行うための薬物曝露のマージンを考慮して設定した。主たる毒性試験及びトキシコキネティクス試験は GLP 基準に準拠して実施した。

ベンラリズマブはマウスの IL-5Rα に結合しないことから、げっ歯類はがん原性試験を実施する上で適切な動物種ではなく、したがってがん原性試験は実施しなかった。総合的な証拠により、直接的又は間接的なベンラリズマブのがん原性リスクは極めて低いことが示唆されている。

カニクイザルでは、妊娠雌動物にベンラリズマブの投与を GD20 から GD22 に開始し、出産後 1 ヵ月までの投与を行ったところ妊娠、胚･胎児又は出生後の発達に対する影響は認められなかった。性的に成熟したカニクイザルにおいて、ベンラリズマブを皮下で 30 mg/kg 又は静脈内で 25 mg/kg の用量で隔週、9 ヵ月間投与した結果、雌（月経周期及び雌性生殖ホルモン）

又は雄（精巣容積、精子運動能、精子濃度、精子数、精子形態及び雄性生殖ホルモンパターン）の生殖毒性評価項目に異常は認められなかった。

これらベンラリズマブの非臨床試験成績が示す毒性プロファイルは、臨床でのモニタリングが可能であり、ヒトにおけるリスクの懸念は低いことを示している。更に、非臨床試験における NOAEL と 8 週間に 1 回 30 mg を皮下投与する最大推奨臨床用量（MRHD）の間には十分な曝露の安全域が確保できている（9 ヵ月試験の NOAEL を用いると MRHD に対して静脈内及び皮下投与においてそれぞれ AUC を指標にするとおよそ 409 倍及び 275 倍、C_{max} を指標にすると 396 倍及び 193 倍であった）。添付文書案にはベンラリズマブの薬理学的及び毒性学的特徴が適切に反映されている。これらは医療関係者や妊婦、産婦、授乳婦等に適切な助言を含んでいると考えている。

結論として、本申請における Module 2.6（非臨床試験の概要文及び概要表）に示した薬理学的、薬物動態学的及び毒性学的資料並びに Module 4 はベンラリズマブの推奨用量、投与経路並びに申請適応症の治療スケジュールを裏付けるにあたり、適切な内容と考えている。

2.4.6 参考文献

Bousquet et al, 1990

Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. N Engl J Med. 1990;323(15):1033-9.

Chapman et al, 2012

Chapman KL, Andrews L, Bajramovic JJ, Baldrick P, Black LE, Bowman CJ, et al. The design of chronic toxicology studies of monoclonal antibodies: implications for the reduction in use of non-human primates. Regul Toxicol Pharmacol. 2012;62(2):347-54.

Chellman et al, 2009

Chellman GJ, Bussiere JL, Makori N, Martin PL, Ooshima Y, Weinbauer GF. Developmental and reproductive toxicology studies in nonhuman primates. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2009;86(6):446-62.

Chung et al, 2014

Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. Eur Respir J. 2014;43(2):343-73.

Hakonarson et al, 2002

Hakonarson H, Whelan R, Leiter J, Kim C, Chen M, Campbell D, et al. T lymphocyte-mediated changes in airway smooth muscle responsiveness are attributed to induced autocrine release and actions of IL-5 and IL-1beta. J Allergy Clin Immunol. 2002;110(4):624-33.

Hirai et al, 1990

Hirai K, Yamaguchi M, Misaki Y, Takaishi T, Ohta K, Morita Y, et al. Enhancement of human basophil histamine release by interleukin 5. J Exp Med. 1990;172(5):1525-8.

Huston et al, 1996
Huston MM, Moore JP, Mettes HJ, Tavana G, Huston DP. Human B cells express IL-5 receptor messenger ribonucleic acid and respond to IL-5 with enhanced IgM production after mitogenic stimulation with Moraxella catarrhalis. J Immunol. 1996;156(4):1392-401.

ICH S6 (R1), 2011
International Conference on Harmonisation (ICH). S6 (R1) Guideline: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. June 2011.

Ingley and Young, 1991
Ingley E, Young IG. Characterization of a receptor for interleukin-5 on human eosinophils and the myeloid leukemia line HL-60. Blood. 1991;78(2):339-44.

Ishino et al, 2004
Ishino T, Pasut G, Scibek J, Chaiken I. Kinetic interaction analysis of human interleukin 5 receptor alpha mutants reveals a unique binding topology and charge distribution for cytokine recognition. J Biol Chem. 2004;279(10):9547-56.

Jarvis et al, 2010
Jarvis P, Srivastav S, Vogelwedde E, Stewart J, Mitchard T, Weinbauer GF. The cynomolgus monkey as a model for developmental toxicity studies: variability of pregnancy losses, statistical power estimates, and group size considerations. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2010;89(3):175-87.

Koike et al, 2009
Koike M, Nakamura K, Furuya A, Iida A, Anazawa H, Takatsu K, et al. Establishment of humanized anti-interleukin-5 receptor alpha chain monoclonal antibodies having a potent neutralizing activity. Hum Antibodies. 2009;18(1-2):17-27.

Kolbeck et al, 2010
Kolbeck R, Kozhich A, Koike M, Peng L, Andersson CK, Damschroder MM, et al. MEDI-563, a humanized anti-IL-5 receptor alpha mAb with enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity function. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(6):1344-53.

Lopez et al, 1991
Lopez AF, Vadas MA, Woodcock JM, Milton SE, Lewis A, Elliott MJ, et al. Interleukin-5, interleukin-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. J Biol Chem. 1991;266(36):24741-7.

Martin et al, 2009
Martin PL, Breslin W, Rocca M, Wright D, Cavagnaro J. Considerations in assessing the developmental and reproductive toxicity potential of biopharmaceuticals. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2009;86(3):176-203.

Migita et al, 1991
Migita M, Yamaguchi N, Mita S, Higuchi S, Hitoshi Y, Yoshida Y, et al. Characterization of the human IL-5 receptors on eosinophils. Cell Immunol. 1991;133(2):484-97.

Murata et al, 1992
Murata Y, Takaki S, Migita M, Kikuchi Y, Tominaga A, Takatsu K. Molecular cloning and expression of the human interleukin 5 receptor. J Exp Med. 1992;175(2):341-51.

Niwa et al, 2004
Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, et al. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of FcgammaRIIIa functional polymorphism. Clin Cancer Res. 2004;10(18 Pt 1):6248-55.

Ochi et al, 2000
Ochi H, De Jesus NH, Hsieh FH, Austen KF, Boyce JA. IL-4 and -5 prime human mast cells for different profiles of IgE-dependent cytokine production. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:10509-13.

Stewart, 2009
Stewart J. Developmental toxicity testing of monoclonal antibodies: an enhanced pre- and postnatal study design option. Reprod Toxicol. 2009;28(2):220-5.

Takatsu et al, 2009
Takatsu K, Kouro T, Nagai Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. Adv Immunol. 2009;101:191-236.

Takatsu et al, 1994
Takatsu K, Takaki S, Hitoshi Y. Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. Adv Immunol. 1994;57:145-90.

Tran et al, 2014
Tran TN, Khatry DB, Ke X, Ward CK, Gossage D. High blood eosinophil count is associated with more frequent asthma attacks in asthma patients. Ann Allergy Asthma Immunol. 2014;113(1):19-24.

Walford and Doherty, 2014
Walford HH, Doherty TA. Diagnosis and management of eosinophilic asthma: a US perspective. J Asthma Allergy. 2014;7:53-65.

Wener and Bel, 2013
Wener RR, Bel EH. Severe refractory asthma: an update. Eur Respir Rev. 2013;22(129):227-35.

Wenzel, 2005
Wenzel S. Severe asthma in adults. Am J Respir Crit Care Med. 2005;172(2):149-60.

Wenzel, 2012
Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. Nat Med. 2012;18(5):716-25.

Yoshida et al, 1996
Yoshida T, Ikuta K, Sugaya H, Maki K, Takagi M, Kanazawa H, et al. Defective B-1 cell development and impaired immunity against Angiostrongylus cantonensis in IL-5R alpha-deficient mice. Immunity. 1996;4(5):483-94.

Zeiger et al, 2014
Zeiger RS, Schatz M, Li Q, Chen W, Khatry DB, Gossage D, et al. High blood eosinophil count is a risk factor for future asthma exacerbations in adult persistent asthma. J Allergy Clin Immunol Pract. 2014;2(6):741-50.