ベンラリズマブ

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

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
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity（抗体依存性細胞傷害）
AHR	Airway hyperresponsiveness（気道過敏性反応）
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）
ECP	Eosinophil cationic protein（好酸球カチオンタンパク質）
FUT8	α-1, 6-fucosyltransferase（α-1, 6-フコース転移酵素）
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor（顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子）
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）
ILC2	Type 2 Innate lymphoid cells（2 型自然リンパ球）
iNKT	Invariant natural killer T（インバリアントナチュラルキラーT）
LPS	Lipopolysaccharide（リポポリサッカライド）
mAb	Monoclonal antibody（モノクローナル抗体）
MBP	Major basic protein（主要塩基性タンパク質）
NK	Natural killer（ナチュラルキラー）
R	Receptor（受容体）
RSV	Respiratory syncytial virus（RS ウイルス）
TGF	Transforming growth factor（トランスフォーミング増殖因子）

用語の定義

用語	定義
APRIL	TNF スーパーファミリーに属する細胞表面機能分子の一つ（A proliferation-inducing ligand）
BIW-8405	ベンラリズマブの別名（BioWa 社の開発コード番号）
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
INN	医薬品国際的一般名
JAN	日本医薬品一般名称
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）
MEDI-563	ベンラリズマブの別名（AstraZeneca/MedImmune 社の開発コード番号）
QOL	生活の質

目次

略号及び用語の定義一覧 2
目次 3
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 緒言 4
2.6.1.2 ベンラリズマブの一般的な情報 7
2.6.1.2.1 名称 7
2.6.1.2.2 一般的特性 7
2.6.1.2.3 処方 7
2.6.1.2.4 安定性 7
2.6.1.2.5 構造 8
2.6.1.2.6 効能・効果（案） 8
2.6.1.2.7 用法・用量（案） 8
2.6.1.3 参考文献 8

2.6.1 緒言

2.6.1.1 緒言

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。

喘息患者では、病態の重症化及び高頻度の増悪に好酸球が関与する（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。ベンラリズマブは増強した抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を介したアポトーシスの誘導により、好酸球及び好塩基球を特異的に除去する。したがって、ベンラリズマブは能動的に好酸球を除去することにより、好酸球性の重症喘息患者に対して有益な治療薬となりうると考えられる。

IL-5R は、IL-3R 及び顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）R と共有する β_c 鎖及び α 鎖の 2 種のポリペプチド鎖からなるヘテロ二量体である（Lopez et al, 1991）。IL-5 は高親和性の IL-5R を活性化する唯一のサイトカインであるとされている（Tavernier et al, 1991）。IL-5 は 1980 年代初期に、当初マウスの B 細胞の成熟及び分化作用を有するものとして報告された（Takatsu et al, 1988; Swain et al, 1988; Vitetta et al, 1984）。しかしながら、ヒトの B 細胞は IL-5 に反応しない又は IL-5R を発現していないことから、ヒトにおいては好酸球及び好塩基球のみが IL-5R を発現する細胞として現在では認識されている（Ingley and Young, 1991; Lopez et al, 1991; Migita et al, 1991; Valent, 1994）。IL-5R が培養肥満（マスト）細胞において検出されたとする報告があるが（Dahl et al, 2004）、より最近の研究では、喘息患者の粘膜の肥満細胞上に IL-5R の発現は確認されていない（Kolbeck et al, 2010）。

IL-5 は、主に T リンパ球、肥満細胞、好酸球、インバリアントナチュラルキラーT（iNKT）細胞及び最近になって同定された 2 型自然リンパ球（ILC2）から分泌されるサイトカインである（Sakuishi et al, 2007; Dubucquoi et al, 1994; Ying et al, 1995; Scanlon and McKenzie, 2012）。IL-5 は、IL-5R への結合を介して好酸球の増幅、分化、増殖、生存及び活性化を制御する最も重要なサイトカインであると考えられている（Lopez et al, 1988; Sanderson, 1992; Collins et al, 1995; Rothenberg et al, 1996）。IL-5 を欠損したマウスでは、骨髄及び血液中の好酸球数の減少を来す（Kopf et al, 1996; Foster et al, 1996）。一方、IL-5 の全身性の過剰発現は血液及び組織において顕著な好酸球増加をもたらす（Dent et al, 1990）。これらのことは、好酸球の分化及び生存因子としての IL-5 の重要性を示している。

健康なヒトでは、好酸球は循環血白血球中の約 1～5%を構成し、主に消化管に集積しており、消化管ほどではないものの胸腺、脾臓及びリンパ節にも分布している（Kato et al, 1998）。マウスにおける最近の研究では脂肪組織中の好酸球由来の IL-4 が、ベージュ脂肪の発達を含む代謝プロセスの制御に重要であることが示されている（Wu et al, 2011; Qiu et al, 2014）。また、好酸球は、APRIL（A proliferation-inducing ligand）及び IL-6 のような重要な B 細胞の生存因子を産生することによってマウスの骨髄中のプラズマ B 細胞の生存促進にとって重要であることが示されている（Chu et al, 2011; Chu and Berek, 2012）。好酸球がマウス以外の動物種においても同様の役割を示すかどうかはまだ検討されていない。

また、好酸球は、病原体に対する宿主反応にも寄与している。寄生虫の除去に対して生産的に寄与しているかどうかは議論が残るところではあるが、実際に血液及び組織での好酸球増加は、蠕虫感染に対する典型的な宿主反応である（Sher et al, 1990; Travers and Rothenberg, 2015）。更に、好酸球は殺菌作用又はリポポリサッカライド（LPS）のような細菌の産生物質に対する反応性が示されている毒性顆粒タンパク質である主要塩基性タンパク質（MBP）及び好酸球カチオンタンパク質（ECP）の放出（Lehrer et al, 1989; Persson et al, 2001）及びミトコンドリアDNAから成る細胞外トラップの放出（Yousefi et al, 2008）を介して細菌感染への宿主反応に関与する。更に、好酸球及びその産生物質は、ウイルス、特に RS ウイルス（RSV; Phipps et al, 2007）及びパラインフルエンザウイルス（Adamko et al, 1999）といった呼吸器系ウイルスに対する感染防御に寄与するとされている。これらの知見の他の病原体及びヒトでの感染に対する関連性及び一般化はまだ明らかにされていない。一般的に、マウス及びヒトの好酸球の生物学的役割は同様であるとする多くのエビデンスがあるが、両種の健常時と病態時における好酸球の働きには異なる役割があるといった違いも報告されている（Lee et al, 2012）。

肺の粘膜における好酸球性炎症は喘息の特徴の一つとして考えられている。好酸球は、神経細胞、上皮細胞及び粘膜細胞といった周囲の細胞を傷害し、気道過敏性反応（AHR）及び粘液の分泌過多（Gundel et al, 1991; Coyle et al, 1995）を誘導する顆粒関連塩基性タンパク質（Ayars et al, 1985）、活性酸素（Gleich, 1990）及び脂質メディエーター（Shaw et al, 1985）といった多くの可溶性メディエーターの産生細胞である。更に、好酸球は、慢性の気道リモデリング（Kay and Klion, 2004）の要因となるトランスフォーミング増殖因子（TGF）-α、TGF-β、線維芽細胞増殖因子 2、血管内皮細胞増殖因子及びマトリックスメタロプロテアーゼ 9 といった線維化因子の産生源でもある。実際に、好酸球欠損マウスを用いたアレルギー性の気道炎症動物モデルの検討では、細気管支周囲でのコラーゲン沈着、気道平滑筋細胞の集積（Humbles et al, 2004）、AHR 及び粘液の分泌過多（Lee et al, 2004）が減少することが示されている。同様の結果は、IL-5（Foster et al, 1996）及び IL-5Rα（Tanaka et al, 2000; Tanaka et al, 2004）の欠損マウス、並びに抗 IL-5 抗体を投与したマウスにおいても報告されている（Hamelmann et al, 1999）。一方で、IL-5 を肺の上皮に過剰発現させたマウスでは、好酸球性炎症、粘液の分泌過多、コラーゲン沈着及び AHR の増加が惹起される（Lee et al, 1997）。

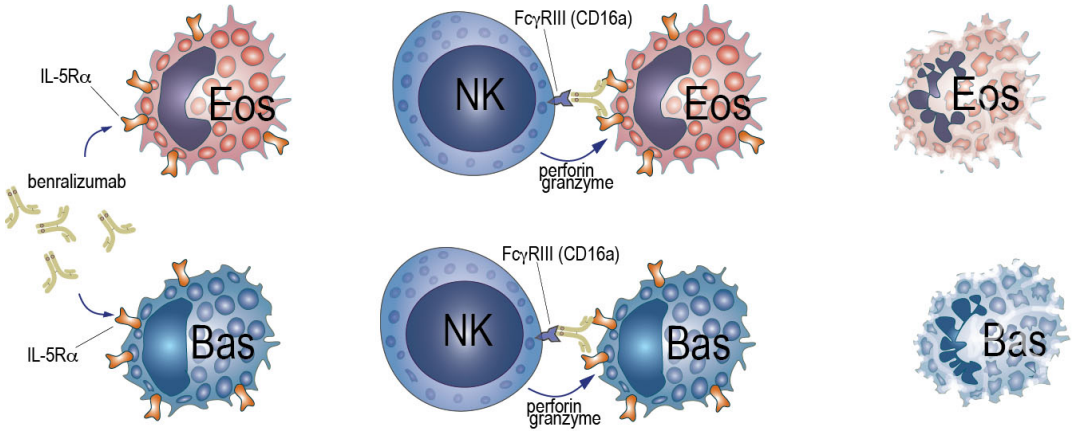
喘息は気道に浸潤している顆粒球の種類に基づいて、1）好酸球性、2）好中球性、3）混合顆粒球性（好酸球性及び好中球性の混合型）、4） 非顆粒球性型（paucigranular）の 4 つのフェノタイプに分類されている（Simpson et al, 2006）。炎症の種類により喘息治療に対する反応が異なるので、これは妥当な分類と考えられる。好酸球性喘息は、気道中の好酸球数の増加を特徴とする。好酸球性気道炎症と喘息の重症度が正に相関することは良く知られている（Bousquet et al, 1990）。更に、喀痰中に多くの好酸球がみられる喘息患者では増悪の頻度が高く、喀痰中の好酸球数の増加が喘息増悪より先行して起こることが示されている（Jatakanon et al, 2000）。また、喀痰中の好酸球を吸入ステロイド薬（ICS）でコントロールする方が、Guided Care による症状マネジメント（symptom management guided care）よりも喘息患者の増悪の頻度を下げることが報告されており（Green et al, 2002; Jayaram et al, 2006）、喘息患者における好酸球の病原的役割の更なるエビデンスを示している。実際に副腎皮質ステロイド療法未実施の喘息患者の 70～80%及び副腎皮質ステロイドを投与しても症状のある喘息患者の 50%以内で喀痰中の好酸球数の上昇が認められることが報告されており（Gibson et al, 2002）、このことは現在の治療法では適切に疾患がコントロールされていない患者にとって治療ニーズがあることを示唆している。

マウス及びサルの喘息モデルにおける IL-5 阻害の有益な効果（Hamelmann et al, 1999; Mauser et al, 1995）並びに喘息のフェノタイプに寄与する好酸球に関するエビデンスは、IL-5 の機能を阻害する mAb の臨床開発を促進させた。2 つのヒト化抗 IL-5 アンタゴニスト抗体（メポリズマブ及び reslizumab）で実施された最初の臨床試験では、循環血中及び組織中に存在する好酸球の数を減少させることに成功し、ヒトにおいて好酸球の増加及び生存における IL-5 の重要性を初めて示したが、喘息症状及び肺機能の改善は期待していた効果には及ばなかった（Leckie et al, 2000; Kips et al, 2003; Flood-Page et al, 2003）。

臨床データから IL-5 又は好酸球が喘息増悪の原因的役割を果たすことが確認されたのは最近になってからである。重要なことは、これらの試験において、メポリズマブは、副腎皮質ステロイドを使用しているにもかかわらず、疾患がコントロールできていない重症の喘息で、喀痰中の好酸球数が上昇している患者に投与されたことである。急性増悪の減少が主要な臨床でのエンドポイントとして定義された（Nair et al, 2009; Haldar et al, 2009）。メポリズマブの反復投与により喘息増悪の頻度の約 50%の減少、QOL の質問スコアの改善及びプレドニゾン使用量の減少が示された。これらの試験は、喘息のコントロールがされておらず、喀痰中の好酸球数が上昇している患者で試験をするためには適切な臨床エンドポイント（急性増悪）を選択することが有用であることを示した。興味深いことに、メポリズマブは有意に循環血中及び喀痰中の好酸球数を減少させたが、粘膜の好酸球増多の減少に関する効果は、高用量での曝露を持続させた場合（12 ヵ月間、750 mg/月）においても、最大でも部分的であり、有意ではなかった（Haldar et al, 2009）。

メポリズマブ及び reslizumab のように好酸球の生存及び活性化を促進する他のサイトカイン（IL-3 及び GM-CSF 等）を阻害しない IL-5 のアンタゴニスト mAb と異なり、ベンラリズマブは細胞表面に発現する IL-5Rα に結合し、増強された ADCC 活性を介して好酸球のアポトーシスを誘導する（図 2.6.1.1-1）。重要なことは、ベンラリズマブ処置による ADCC 依存的な好酸球の細胞死は細胞表面でのアポトーシスマーカーである annexin V の発現増加をもたらし、*in vitro*（Kolbeck et al, 2010）又は喘息患者（Busse et al, 2010）のどちらにおいても、好酸球の脱顆粒を惹起しないことである。ベンラリズマブの薬理活性は患者での投与後 24 時間以内の早期の好酸球除去（Busse et al, 2010）、循環血中の好酸球の検出限界未満までの完全な減少（Busse et al, 2010）、気道粘膜の好酸球のほぼ完全な除去（Laviolette et al, 2013）、骨髄の好酸球及びその前駆体細胞に対する広範囲での効果（Laviolette et al, 2013）、及び細胞表面に IL-5Rα を発現しているが、生存に関しては IL-5 に依存しない血中の好塩基球を減少させること（Laviolette et al, 2013）に特徴づけられる。ベンラリズマブは以上の薬理作用及び薬力学的活性により、喘息のような好酸球性炎症のある疾患の治療にとって重要な抗体となりうる。

図2.6.1.1-1　増強された ADCC を介したベンラリズマブによる標的細胞の除去



ベンラリズマブは、循環血及び組織中の IL-5Rα を発現する標的細胞（好酸球[Eos]、好塩基球[Bas]）に結合する。ベンラリズマブの Fc は、エフェクター細胞（ナチュラルキラー[NK] 細胞、マクロファージ）に発現する FcγRIIIa（CD16a）に高い親和性で結合するため、非特異的な低親和性の IgG（フコース含有型）の FcγRIIIa への結合を置換する。FcγRIIIa の活性化は細胞毒性を有するメディエーター（perforin、proteases、granzyme）を放出し、標的細胞のアポトーシスを誘導する。

2.6.1.2　ベンラリズマブの一般的な情報

2.6.1.2.1　名称

本剤の JAN は、ベンラリズマブ（遺伝子組換え）であり、INN は、Benralizumab である。また、MEDI-563、BIW-8405 及び KHK4563 としても知られている。現時点で、更なる他の名称は付けられていない。

2.6.1.2.2　一般的特性

ベンラリズマブは、フコース欠損型ヒト化 IgG1κ mAb であり、全体の分子量は約 150 kDa である。ベンラリズマブは、遺伝子組換え可溶性ヒト IL-5Rα を免疫したマウスにて作製したマウス mAb（KM1259）に由来する（Koike et al, 2009）。親マウスクローンのヒト化は、IL-5Rα の相補性決定領域（CDR）をヒトのフレームワーク配列に組み込むことで行った。

ベンラリズマブはオリゴ糖鎖に単糖のフコースを付加するために必要な酵素である α-1,6-フコース転移酵素（FUT8; POTELLIGENT® 技術; Shinkawa et al, 2003; Yamane-Ohnuki et al, 2004）を欠損したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）/[redacted]から生産される。そのため、ベンラリズマブはフコースを含まない抗体であり、ベンラリズマブのフコース含有型抗 IL-5Rα mAb と比較して、ヒト FcγRIIIa に対する親和性が 6 倍増強し、ヒト IL-5Rα を発現している細胞（ヒト好酸球及び好塩基球）に対する ADCC 活性の増強をもたらす（Kolbeck et al, 2010）。

2.6.1.2.3　処方

ベンラリズマブの処方については 3.2.P.1 項に記載されている。

2.6.1.2.4　安定性

ベンラリズマブの安定性については 3.2.S.7.1 及び 3.2.P.8.1 項に記載されている。

2.6.1.2.5 構造

ベンラリズマブの重鎖及び軽鎖の推定アミノ酸配列については 3.2.S.1.2 項に示している。

2.6.1.2.6 効能・効果（案）

ベンラリズマブは、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を目的としたフコース欠損型ヒト化 IgG1κ mAb である。本邦における本剤の効能・効果（案）は、「気管支喘息（既存治療によっても喘息症状をコントロールできない難治の患者に限る）」である。

2.6.1.2.7 用法・用量（案）

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。

2.6.1.3 参考文献

Adamko et al, 1999

Adamko DJ, Yost BL, Gleich GJ, Fryer AD, Jacoby DB. Ovalbumin sensitization changes the inflammatory response to subsequent parainfluenza infection: Eosinophils mediate airway hyperresponsiveness, M_2 muscarinic receptor dysfunction, and antiviral effects. J Exp Med. 1999;190(10):1465-77.

Ayars et al, 1985

Ayars GH, Altman LC, Gleich GJ, Loegering DA, Baker CB. Eosinophil- and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. J Allergy Clin Immunol. 1985;76(4):595-604.

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.

Busse et al, 2010

Busse WW, Katial R, Gossage D, Sari S, Wang B, Kolbeck R, et al. Safety profile, pharmacokinetics, and biologic activity of MEDI-563, an anti-IL-5 receptor alpha antibody, in a phase I study of subjects with mild asthma. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(6):1237-44.

Chu and Berek, 2012

Chu VT, Berek C. Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. Eur J Immunol. 2012;42(1):130-7.

Chu et al, 2011

Chu VT, Frohlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. Nat Immunol. 2011;12(2):151-9.

Collins et al, 1995
Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. J Exp Med. 1995;182(4):1169-74.

Coyle et al, 1995
Coyle AJ, Ackerman SJ, Burch R, Proud D, Irvin CG. Human eosinophil-granule major basic protein and synthetic polycations induce airway hyperresponsiveness in vivo dependent on bradykinin generation. J Clin Invest. 1995;95(4):1735-40.

Dahl et al, 2004
Dahl C, Hoffmann HJ, Saito H, Schiotz PO. Human mast cells express receptors for IL-3, IL-5 and GM-CSF; a partial map of receptors on human mast cells cultured in vitro. Allergy. 2004;59(10):1087-96.

Dent et al, 1990
Dent LA, Strath M, Mellor AL, Sanderson CJ. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. J Exp Med. 1990;172(5):1425-31.

Dubucquoi et al, 1994
Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, et al. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. J Exp Med. 1994;179(2):703-8.

Flood-Page et al, 2003
Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. Am J Respir Crit Care Med. 2003;167(2):199-204.

Foster et al, 1996
Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. J Exp Med. 1996;183(1):195-201.

Gibson et al, 2002
Gibson PG, Fujimura M, Niimi A. Eosinophilic bronchitis: clinical manifestations and implications for treatment. Thorax. 2002;57(2):178-82.

Gleich, 1990
Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. J Allergy Clin Immunol. 1990;85(2):422-36.

Green et al, 2002
Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. Lancet. 2002;360(9347):1715-21.

Gundel et al, 1991
Gundel RH, Letts LG, Gleich GJ. Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. J Clin Invest. 1991;87(4):1470-3.

Haldar et al, 2009
Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. N Engl J Med. 2009;360(10):973-84.

Hamelmann et al, 1999
Hamelmann E, Cieslewicz G, Schwarze J, Ishizuka T, Joetham A, Heusser C, et al. Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness. Am J Respir Crit Care Med. 1999;160(3):934-41.

Humbles et al, 2004
Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, et al. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. Science. 2004;305(5691):1776-9.

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.

Jatakanon et al, 2000
Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161(1):64-72.

Jayaram et al, 2006
Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, Boulet LP, Lemiere C, Pizzichini E, et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. Eur Respir J. 2006;27(3):483-94.

Kato et al, 1998
Kato M, Kephart GM, Talley NJ, Wagner JM, Sarr MG, Bonno M, et al. Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissue. Anat Rec. 1998;252(3):418-25.

Kay and Klion, 2004
Kay AB, Klion AD. Anti-interleukin-5 therapy for asthma and hypereosinophilic syndrome. Immunol Allergy Clin North Am. 2004;24(4):645-66.

Kips et al, 2003
Kips JC, O'Connor BJ, Langley SJ, Woodcock A, Kerstjens HA, Postma DS, et al. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. Am J Respir Crit Care Med. 2003;167(12):1655-9.

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.

Kopf et al, 1996
Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, Ramsay AJ, Milbourne EA, Dai WJ, et al. IL-5-deficient mice have a developmental defect in $CD5^+$ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. Immunity. 1996;4(1):15-24.

Laviolette et al, 2013
Laviolette M, Gossage DL, Gauvreau G, Leigh R, Olivenstein R, Katial R, et al. Effects of benralizumab on airway eosinophils in asthmatic patients with sputum eosinophilia. J Allergy Clin Immunol. 2013;132(5):1086-96.

Leckie et al, 2000
Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. Lancet. 2000;356(9248):2144-8.

Lee et al, 2004
Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, et al. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. Science. 2004;305(5691):1773-6.

Lee et al, 2012
Lee JJ, Jacobsen EA, Ochkur SI, McGarry MP, Condjella RM, Doyle AD, et al. Human versus mouse eosinophils: "that which we call an eosinophil, by any other name would stain as red". J Allergy Clin Immunol. 2012;130(3):572-84.

Lee et al, 1997
Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, et al. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. J Exp Med. 1997;185(12):2143-56.

Lehrer et al, 1989
Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, Gleich GJ. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. J Immunol. 1989;142(12):4428-34.

Lopez et al, 1988
Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG, Vadas MA. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. J Exp Med. 1988;167(1):219-24.

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.

Mauser et al, 1995
Mauser PJ, Pitman AM, Fernandez X, Foran SK, Adams GK 3rd, Kreutner W, et al. Effects of an antibody to interleukin-5 in a monkey model of asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1995;152(2):467-72.

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.

Nair et al, 2009
Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. N Engl J Med. 2009;360(10):985-93.

Persson et al, 2001
Persson T, Andersson P, Bodelsson M, Laurell M, Malm J, Egesten A. Bactericidal activity of human eosinophilic granulocytes against Escherichia coli. Infect Immun. 2001;69(6):3591-6.

Phipps et al, 2007
Phipps S, Lam CE, Mahalingam S, Newhouse M, Ramirez R, Rosenberg HF, et al. Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. Blood. 2007;110(5):1578-86.

Qiu et al, 2014
Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, Cui X, Tian X, Locksley RM, et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. Cell. 2014;157(6):1292-308.

Rothenberg et al, 1996
Rothenberg ME, Ownbey R, Mehlhop PD, Loiselle PM, van de Rijn M, Bonventre JV, et al. Eotaxin triggers eosinophil-selective chemotaxis and calcium flux via a distinct receptor and induces pulmonary eosinophilia in the presence of interleukin 5 in mice. Mol Med. 1996;2(3):334-48.

Sakuishi et al, 2007
Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T. Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. J Immunol. 2007;179(6):3452-62.

Sanderson, 1992
Sanderson CJ. Pharmacological implications of interleukin-5 in the control of eosinophilia. Adv Pharmacol. 1992;23:163-77.

Scanlon and McKenzie, 2012
Scanlon ST, McKenzie AN. Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy. Curr Opin Immunol. 2012;24(6):707-12.

Shaw et al, 1985
Shaw RJ, Anderson SD, Durham SR, Taylor KM, Schoeffel RE, Green W, et al. Mediators of hypersensitivity and "fog"-induced asthma. Allergy. 1985;40(1):48-57.

Sher et al, 1990
Sher A, Coffman RL, Hieny S, Cheever AW. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against Schistosoma mansoni in the mouse. J Immunol. 1990;145(11):3911-6.

Shinkawa et al, 2003
Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. J Biol Chem. 2003;278(5):3466-73.

Simpson et al, 2006
Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. Respirology. 2006;11(1):54-61.

Swain et al, 1988
Swain SL, Dutton RW, McKenzie D, Helstrom H, English M. Role of antigen in the B cell response. Specific antigen and the lymphokine IL-5 synergize to drive B cell lymphoma proliferation and differentiation to Ig secretion. J Immunol. 1988;140(12):4224-30.

Takatsu et al, 1988
Takatsu K, Tominaga A, Harada N, Mita S, Matsumoto M, Takahashi T, et al. T cell-replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): molecular and functional properties. Immunol Rev. 1988;102:107-35.

Tanaka et al, 2000
Tanaka H, Kawada N, Yamada T, Kawada K, Takatsu K, Nagai H. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in interleukin-5 receptor alpha chain-deficient mice. Clin Exp Allergy. 2000;30(6):874-81.

Tanaka et al, 2004
Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Takatsu K, et al. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2004;31(1):62-8.

Tavernier et al, 1991
Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der Heyden J, Fiers W, et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF. Cell. 1991;66(6):1175-84.

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.

Travers and Rothenberg, 2015
Travers J, Rothenberg ME. Eosinophils in mucosal immune responses. Mucosal Immunol. 2015;8(3):464-75.

Valent, 1994
Valent P. The phenotype of human eosinophils, basophils, and mast cells. J Allergy Clin Immunol. 1994;94(6 Pt 2):1177-83.

Vitetta et al, 1984
Vitetta ES, Brooks K, Chen YW, Isakson P, Jones S, Layton J, et al. T-cell-derived lymphokines that induce IgM and IgG secretion in activated murine B cells. Immunol Rev. 1984;78:137-57.

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.

Wu et al, 2011
Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. Science. 2011;332(6026):243-7.

Yamane-Ohnuki et al, 2004
Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, Kusunoki M, Iida S, Nakano R, et al. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. Biotechnol Bioeng. 2004;87(5):614-22.

Ying et al, 1995
Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q, Kay AB. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. Am J Respir Cell Mol Biol. 1995;12(5):477-87.

Yousefi et al, 2008
Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. Nat Med. 2008;14(9):949-53.

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.

ベンラリズマブ

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

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
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）
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）
FcγR	Fcγ receptor（Fcγ 受容体）
FITC	Fluorescein isothiocyanate（フルオレセインイソチオシアネート）
FUT8	α-1,6-fucosyltransferase（α-1,6-フコース転移酵素）
HEK	Human embryonic kidney（ヒト胎児腎臓）
HRP	Horseradish peroxidase（西洋わさびペルオキシダーゼ）
I61	Isoleucine at position 61（61 番目イソロイシン）
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）
k_{on}	Association rate constant（結合速度定数）
k_{off}	Dissociation rate constant（解離速度定数）
LDH	Lactate dehydrogenase（乳酸脱水素酵素）
mAb	Monoclonal antibody（モノクローナル抗体）
MFI	Mean fluorescence intensity（平均蛍光強度）
NHSM	Normal human serum media（正常ヒト血清培地）
NK	Natural killer（ナチュラルキラー）
pAb	Polyclonal antibody（ポリクローナル抗体）
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell（末梢血単核細胞）
PBS	Phosphate-buffered saline（リン酸緩衝食塩水）
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate（ホルボールミリステートアセテート）
R	Receptor（受容体）

用語の定義

用語	定義
A23187	カルシウムイオノフォア試薬
Bevacizumab	ヒト血管内皮細胞増殖因子に対する遺伝子組換え型ヒト化モノクローナル抗体
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
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
eotaxin	ケモカイン CCL11 の別名、好酸球走化性物質
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
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）
PC150	呼吸器抵抗性が 150%増加するメサコリン濃度
RANTES	好酸球走化性物質
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

目次

略号及び用語の定義一覧 2
目次 4
2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.2 ヒト化 IL-5Rα アンタゴニストであるベンラリズマブの作製 7
2.6.2.3 効力を裏付ける試験 9
2.6.2.3.1 組換えヒト IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合親和性（試験番号：d-[redacted]-0018、RIA563-0001）資料番号：4.2.1.1-2、参考 4.2.1.1-3 9
2.6.2.3.2 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（試験番号：RIA563-0001）資料番号：参考 4.2.1.1-3 10
2.6.2.3.3 マウス IL-5Rα に対するベンラリズマブの交差反応性（試験番号：RIA563-0003）資料番号：参考 4.2.1.1-4） 10
2.6.2.3.4 ヒト IL-5Rα 上のベンラリズマブ結合エピトープ解析 11
2.6.2.3.5 末梢血由来ヒト好酸球及び好塩基球上の IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合（試験番号：RIA563-0001、d-[redacted]-0147、r-[redacted]-194）資料番号：参考 4.2.1.1-3、4.2.1.1-5、参考 4.2.1.1-6 13
2.6.2.3.6 カニクイザル好酸球上の IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合（試験番号：RIA563-0001、r-[redacted]-194）資料番号：参考 4.2.1.1-3、参考 4.2.1.1-6 15
2.6.2.3.7 抗 IL-5Rα mAb である KM1259 による固相化ヒト IL-5Rα に対する IL-5 の結合阻害 16
2.6.2.3.8 IL-5 依存性細胞増殖に対するベンラリズマブの阻害（試験番号：d-[redacted]-0019）資料番号：4.2.1.1-7 16
2.6.2.3.9 ヒト及びカニクイザルの FcγRIIIa（CD16a）に対するベンラリズマブの結合親和性 17
2.6.2.3.10 ヒト好酸球及び好塩基球に対するベンラリズマブの ADCC を介したアポトーシス誘導（試験番号：d-[redacted]-0148）資料番号：4.2.1.1-8 17
2.6.2.3.11 ヒト IL-5Rα を発現する BMMNC に対するベンラリズマブのアポトーシス誘導 20
2.6.2.3.12 ベンラリズマブによるヒト好酸球のアポトーシス誘導に伴う好酸球性顆粒タンパク質の放出（試験番号：d-[redacted]-0149）資料番号：4.2.1.1-9 21
2.6.2.3.13 *In vitro* 試験におけるベンラリズマブの CDC 活性（試験番号：RIA563-0002）資料番号：参考 4.2.1.1-10 24
2.6.2.3.14 カニクイザルにおける IL-5 誘発性末梢血好酸球増多モデルに対するベンラリズマブの阻害作用（試験番号：r-[redacted]-222）資料番号：4.2.1.1-11 24
2.6.2.3.15 ベンラリズマブによるカニクイザル末梢血中好酸球及び骨髄中好酸球前駆細胞の除去（試験番号：[redacted].112.01）資料番号：4.2.3.2-1 26
2.6.2.3.16 サル喘息モデルにおける KM8407 の有効性（試験番号：d-[redacted]-184、r-[redacted]-457）資料番号：参考 4.2.1.1-12、参考 4.2.1.1-13 27

2.6.2.4 副次的薬理試験 29
2.6.2.5 安全性薬理試験 29
2.6.2.6 薬力学的薬物相互作用 29
2.6.2.7 考察及び結論 29
2.6.2.8 図表 30
2.6.2.9 参考文献 30

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

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。

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。ベンラリズマブは増強した抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を介したアポトーシスの誘導により好酸球及び好塩基球を特異的に除去する。喘息患者では、病態の重症化及び高頻度の増悪に好酸球が関与する（Bousquet et al, 1990；Tran et al, 2014；Walford and Doherty, 2014；Wener and Bel, 2013；Zeiger et al, 2014）。ベンラリズマブは能動的に好酸球を除去することにより、好酸球性の重症喘息患者に対して有益な治療薬となりうると考えられる。

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。

ベンラリズマブの非臨床薬理試験一覧を表 2.6.2.1-1に記す。

表2.6.2.1-1　ベンラリズマブの非臨床薬理試験

試験番号 （資料番号）	試験種	試験名	GLP 適合性
r[redacted]-0337 （参考 4.2.1.1-1）	*In vitro* 抗体活性	Comparison of the *in vitro* activity of anti-IL-5Rα humanized antibody KHK4563 and KM8407	非適合
d-[redacted]-0018 （4.2.1.1-2）	*In vitro* 結合性	Antigen binding activity of KHK4563 (MEDI-563), a humanized anti-IL-5Rα monoclonal antibody	非適合
RIA563-0001 （参考 4.2.1.1-3）	*In vitro* 結合性	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	非適合
RIA563-0003 （参考 4.2.1.1-4）	*In vitro* 結合性	Benralizumab (MEDI-563) does not cross-react with murine IL-5 receptor alpha	非適合
d[redacted]-0147 （4.2.1.1-5）	*In vitro* 結合性	Binding activity of KHK4563 (MEDI-563) to human peripheral blood derived eosinophils	非適合
r-[redacted]194 （参考 4.2.1.1-6）	*In vitro* 結合性	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	非適合
d-[redacted]-0019 （4.2.1.1-7）	*In vitro* 細胞増殖阻害活性	Growth inhibition activity against IL-5Rα-expressing cell line of KHK4563 (MEDI-563), a humanized anti-IL-5Rα monoclonal antibody	非適合
d[redacted]-0148 （4.2.1.1-8）	*In vitro* ADCC 活性	Induction of human eosinophil apoptosis via antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by KHK4563 (MEDI-563)	非適合
d-[redacted]0149 （4.2.1.1-9）	*In vitro* ADCC 誘導性脱顆粒	Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity of KHK4563 against human eosinophils: Release of human eosinophil granule proteins by KHK4563 (MEDI-563)	非適合
RIA563-0002 （参考 4.2.1.1-10）	*In vitro* CDC 活性	Benralizumab (MEDI-563) does not induce Complement Dependent Cytotoxicity of primary human eosinophils	非適合
r-[redacted]-222 （4.2.1.1-11）	*In vivo* カニクイザル末梢好酸球増多モデルにおける活性評価	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	非適合
d[redacted]-184 （参考 4.2.1.1-12）	*In vivo* カニクイザル喘息モデル	An asthmatic animal model in cynomolgus monkeys	非適合
r-[redacted]-457 （参考 4.2.1.1-13）	*In vivo* カニクイザル喘息モデルにおける活性評価	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	非適合

ADCC：抗体依存性細胞傷害、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 サブユニト、KM8407：ベンラリズマブと同等の mAb
この表における MEDI-563 及び KHK4563 はベンラリズマブを示す。

2.6.2.2　ヒト化 IL-5Rα アンタゴニストであるベンラリズマブの作製

ベンラリズマブは、可溶性の組換えヒト IL-5Rα を免疫したマウスにより産生されたマウス mAb（KM1259）を用いて作製された（Koike et al, 2009）。マウス親抗体のヒト化は IL-5Rα 認識部位である相補性決定領域（CDR）をヒトのフレームワーク配列に組み込むことで実施した。

ベンラリズマブは、遺伝子組換え技術を用いて、複合型糖鎖に単糖フコースを付加するために必要な α-1,6-フコース転移酵素（FUT8；POTELLIGENT® 技術；Shinkawa et al, 2003；

Yamane-Ohnuki et al, 2004）を欠損した CHO/[redacted] により産生された。フコース欠損型ベンラリズマブは、フコース含有型の KM8400 に比べてヒト Fcγ 受容体（FcγR）IIIa に対する親和性が 6 倍上昇し、ヒト IL-5Rα 発現細胞に対する ADCC 活性が増強している（Kolbeck et al, 2010）。

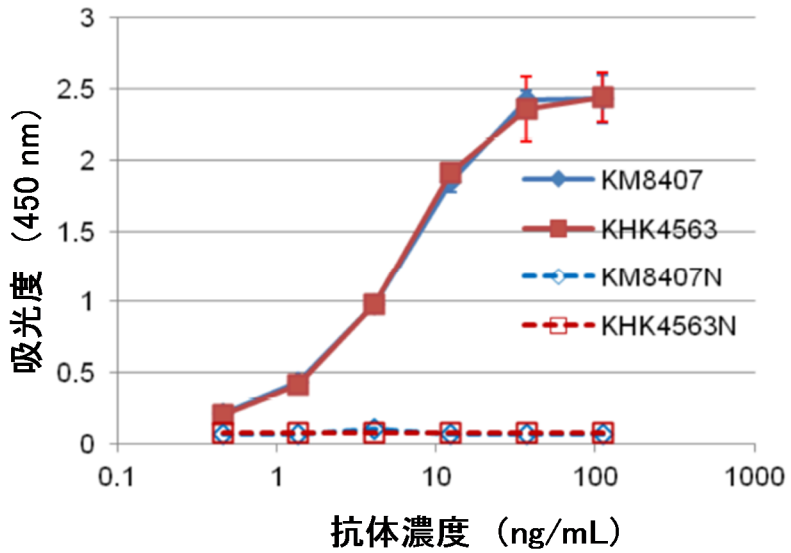
ベンラリズマブ及びベンラリズマブ関連抗体の特徴及び抗体名について表 2.6.2.2-1に記す。

表2.6.2.2-1　ベンラリズマブ及びベンラリズマブ関連抗体の特徴及び抗体名

抗体名	特徴
KM1259	マウス抗ヒト IL-5Rα IgG1 抗体
KM8400	フコース含有型ヒト化抗ヒト IL-5Rα IgG1 抗体
KM8407	安定発現細胞集団（FUT8 欠損 CHO 細胞株）由来のフコース欠損型ヒト化抗ヒト IL-5Rα IgG1 抗体
ベンラリズマブ（MEDI-563、BIW-8405、KHK4563）	安定発現細胞クローン [redacted]（FUT8 欠損 CHO 細胞株）由来のフコース欠損型ヒト化抗ヒト IL-5Rα IgG1 抗体

KM8407 は産生する細胞株のみベンラリズマブと異なり、抗原結合活性及び ADCC 活性はベンラリズマブと同等である。非臨床薬理試験（試験番号：r[redacted]-194、r[redacted]-222、r-[redacted]-457）において KM8407 を用いたことの妥当性を示すために、r-[redacted]-0337 試験（参考 4.2.1.1-1）において KM8407 及びベンラリズマブの同等性を検証した。固相化したヒト IL-5Rα を用いた ELISA 結合アッセイにおいて、KM8407 及びベンラリズマブの抗原結合活性は同等であった（図 2.6.2.2-1）。

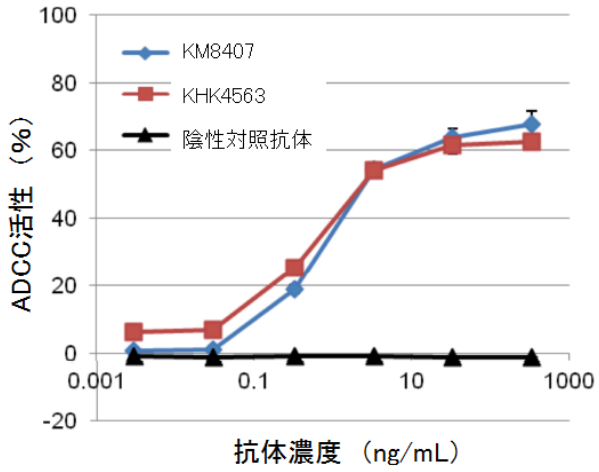
図2.6.2.2-1　KM8407 及びベンラリズマブの抗原結合活性



濃度段階をつけた KM8407 又はベンラリズマブを固相化したヒト IL-5Rα と反応させ ELISA により測定した。KHK4563：ベンラリズマブ、N：組換えヒト IL-5Rα 溶液の代わりにリン酸緩衝食塩水（PBS）を 96 穴プレートに処置した陰性対照群。各値は平均値±標準偏差（n=3、陰性対照群は n=1）を示す。

[redacted]細胞株をエフェクター細胞として使用した際の、ヒト IL-5Rα 遺伝子を導入した[redacted]細胞株に対する ADCC 活性は、KM8407 及びベンラリズマブで同等であった（図 2.6.2.2-2）。

図2.6.2.2-2　KM8407 及びベンラリズマブの ADCC 活性



[redacted]細胞株をエフェクター細胞として使用した際の、ヒト IL-5Rα 遺伝子を導入した細胞株 [redacted]に対する ADCC 活性は KM8407 及びベンラリズマブで同等であった。ADCC 活性を評価するために乳酸脱水素酵素（LDH）を、LDH-細胞毒性テストを用いて定量した。ADCC：抗体依存性細胞傷害、KHK4563：ベンラリズマブ、陰性対照抗体：Bevacizumab（抗ヒト血管内皮増殖因子 mAb）。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。

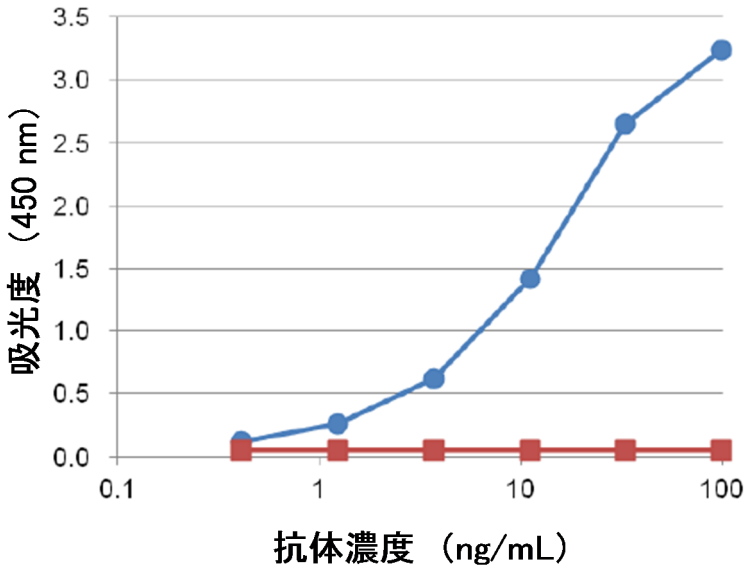
2.6.2.3　効力を裏付ける試験

ベンラリズマブの結合親和性、特異性、作用機序、効力及び喘息等の好酸球性炎症を特徴とする疾患における効果を評価する *in vivo* 及び *in vitro* 試験を実施した。

2.6.2.3.1　組換えヒト IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合親和性（試験番号：d-[redacted]-0018、RIA563-0001）資料番号：4.2.1.1-2、参考 4.2.1.1-3

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。ELISA では、濃度段階をつけたベンラリズマブ又はベンラリズマブと同じ抗体アイソタイプである抗ジニトロフェニル（DNP）抗体（陰性対照抗体）を、プレートに固相化したヒト IL-5Rα と 1 時間反応させた。ヒト IL-5Rα 特異的に結合した抗体を、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いて検出した。図 2.6.2.3.1-1のとおり、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）。

図2.6.2.3.1-1　ベンラリズマブの組換えヒト IL-5Rα に対する結合活性



0.4、1.2、3.7、11.1、33.3 及び 100 ng/mL の濃度におけるベンラリズマブ（●）又は陰性対照抗体（■）の組換えヒト IL-5Rα に対する結合活性を ELISA により測定した。各値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。

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）を BIAcore により測定した。ヒト IL-5Rα に対するベンラリズマブの K_D は 0.016 nmol/L であった（表 2.6.2.3.1-1、試験番号： RIA563-0001）。

表2.6.2.3.1-1　ヒト IL-5Rα に対するベンラリズマブの反応速度定数と結合定数

パラメータ	k_{on}（$1/Ms\times10^5$）	k_{off}（$1/s\times10^{-3}$）	K_D（nmol/L）
ヒト IL-5Rα	44.1	0.070	0.016

K_D：解離定数、k_{on}：結合速度定数、k_{off}：解離速度定数

2.6.2.3.2　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（試験番号：RIA563-0001）資料番号：参考 4.2.1.1-3

センサーチップに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 K_D を BIAcore により測定した。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 であり、ヒト IL-5Rα に対する K_D に比べて 2.6 倍低かった（表 2.6.2.3.2-1、試験番号：RIA563-0001）。

表2.6.2.3.2-1　カニクイザル IL-5Rα に対するベンラリズマブの反応速度定数と結合定数

パラメータ	k_{on}（$1/Ms\times10^5$）±SD	k_{off}（$1/s\times10^{-3}$）±SD	K_D（nmol/L）±SD
カニクイザル IL-5Rα	252±141	0.818±0.301	0.042±0.035

K_D：解離定数、k_{on}：結合速度定数、k_{off}：解離速度定数、SD=標準偏差

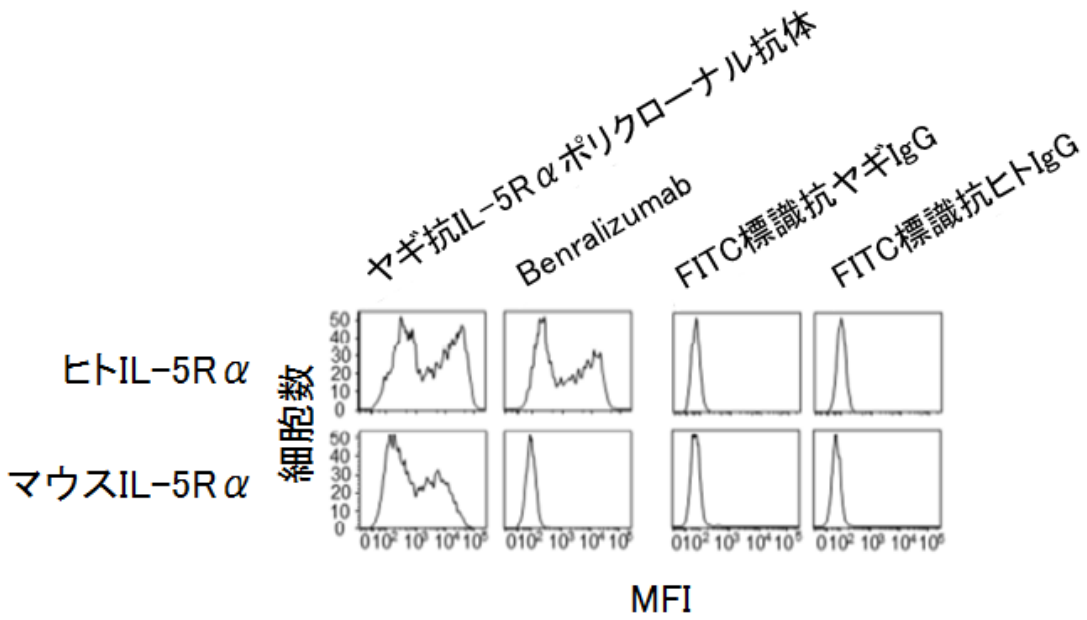
2.6.2.3.3　マウス IL-5Rα に対するベンラリズマブの交差反応性（試験番号：RIA563-0003）資料番号：参考 4.2.1.1-4）

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を検証した。マウス又はヒトの全長をコードする DNA を合成し、哺乳動物細胞発現ベクターである pEBNA に挿入した。作製した IL-5Rα 発現ベクターをヒト胎児腎臓（HEK）293F 細胞に導入し、マウス IL-5Rα 又はヒト IL-5Rα の発現を、それ

ぞれ 10 µg/mL のヤギ抗マウス又は抗ヒト IL-5Rα ポリクローナル抗体（pAb）と反応させた後に、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識抗ヤギ IgG 抗体で検出することで確認した。遺伝子導入された HEK293F 細胞の表面上に発現したマウス又はヒト IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合を評価するために、10 µg/mL のベンラリズマブと反応させた後に洗浄した細胞を、1 µg/mL の FITC 標識抗ヒト IgG 抗体と反応させた。すべての検体は LSRII フローサイトメーターを用いて解析した。

抗マウス又は抗ヒト IL-5Rα pAb を用いて、遺伝子導入した HEK293F 細胞の表面上にマウス又はヒト IL-5Rα を強く発現していることを確認したが、ベンラリズマブはマウス IL-5Rα 発現細胞に対して結合しなかった。ベンラリズマブは予想どおりヒト IL-5Rα 発現細胞に強く結合した（図 2.6.2.3.3-1、試験番号： RIA563-0003）。

図2.6.2.3.3-1　フローサイトメトリーによるベンラリズマブのマウス IL-5Rα に対する結合解析



全長ヒト（上段）又はマウス（下段）IL-5Rα を HEK293 細胞表面上に一過性に発現させた。両タンパク質が強く発現していることを抗ヒト又は抗マウス IL-5Rα pAb を用いて確認した。ベンラリズマブは予想どおりヒト IL-5Rα 発現細胞にのみ結合し、マウス IL-5Rα 発現細胞には結合しなかった。二次抗体（FITC 標識抗ヒト又はヤギ IgG）のみを反応させた対照群では平均蛍光強度の上昇はみられなかった。Y 軸は細胞数、X 軸は平均蛍光強度（MFI）を示す。

2.6.2.3.4　ヒト IL-5Rα 上のベンラリズマブ結合エピトープ解析

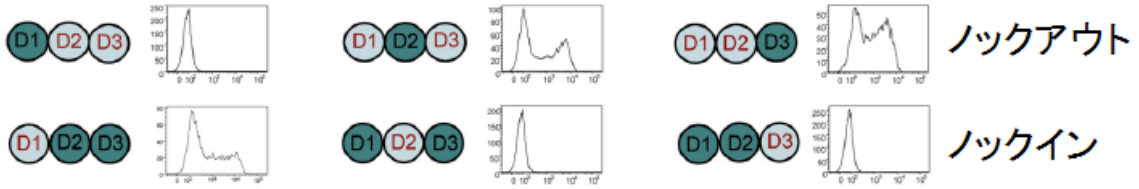
ベンラリズマブのマウス IL-5Rα に対する非結合性（試験番号： RIA563-0003）を、ベンラリズマブにより認識されるヒト IL-5Rα 上の結合エピトープ解析に利用した。ヒト IL-5Rα の細胞外領域 1（D1）、2（D2）及び 3（D3）を相当するマウス IL-5Rα のアミノ酸配列に置き換えたノックアウト又はノックイン変異体を作製した（Kolbeck et al, 2010）。

すべての変異体の発現は抗ヒト又は抗マウス IL-5Rα pAb によりフローサイトメトリーで検出した。ベンラリズマブはヒト IL-5Rα の D1 を含む変異体にのみ結合した（図 2.6.2.3.4-1）。

配列比較においてヒト、カニクイザル及びマウス IL-5Rα は D1 のアミノ酸配列が異なっていたことから、ベンラリズマブの結合エピトープを更に絞りこむために D1 に着目することにした（図 2.6.2.3.4-2）。

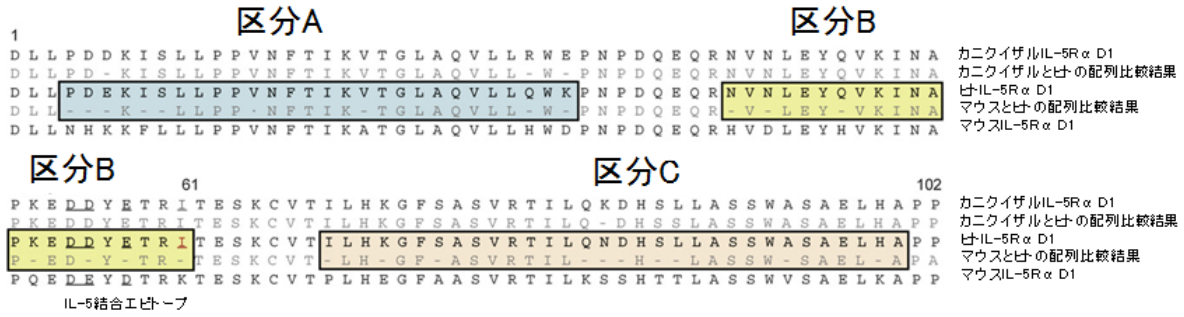
その結果、ヒト IL-5Rα の区分 B を発現する変異体のみベンラリズマブにより認識された。したがって、区分 B はベンラリズマブの結合エピトープを含むことが明らかになった（図 2.6.2.3.4-3）。

図2.6.2.3.4-1 ヒト IL-5Rα 上のベンラリズマブ結合エピトープ同定：変異体への結合



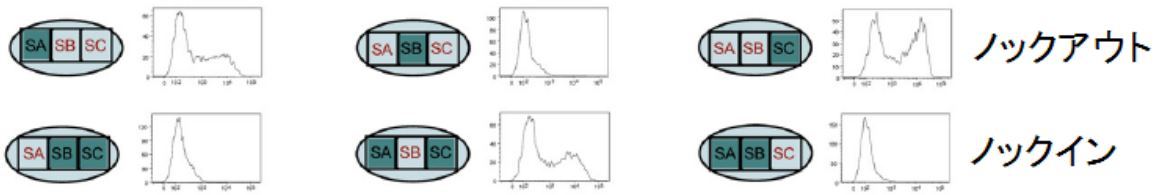
ヒト（薄緑）及びマウス（濃緑）IL-5Rα の細胞外領域 D1、D2 及び D3 を組み合わせた変異体に対するベンラリズマブの結合。D=細胞外領域

図2.6.2.3.4-2 ヒト IL-5Rα 上のベンラリズマブ結合エピトープ同定：配列比較



ヒト、カニクイザル及びマウスの IL-5Rα の細胞外領域 D1 に対するアミノ酸配列比較（配列が異なる箇所は-（ダッシュ記号）で示す）。区分 A、区分 B、区分 C はそれぞれ四角で囲った。

図2.6.2.3.4-3 IL-5Rα 内区分 B の変異体に対するベンラリズマブの結合

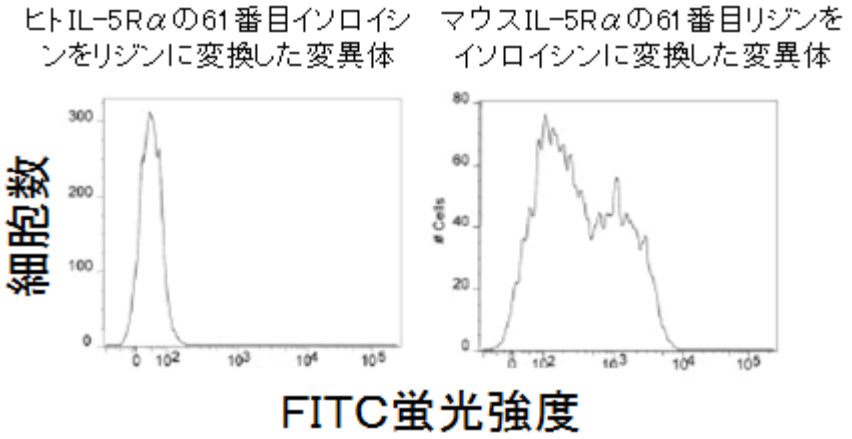


ヒト（薄緑）及びマウス（濃緑）IL-5Rα 細胞外 D1 領域内区分の変異体に対するベンラリズマブの結合。SA：区分 A、SB：区分 B、SC：区分 C

区分 B のアミノ酸配列のうちヒト及びマウスで共通しないアミノ酸を置換することで、更に詳細なエピトープの解析を実施した。ヒト IL-5Rα の区分 B に存在する 40 番目アスパラギン（N40）、42 番目アスパラギン（N42）、46 番目グルタミン（Q46）、56 番目アスパラギン酸（D56）及び 58 番目グルタミン酸（E58）をマウスの相当するアミノ酸残基に置換したところ、ヒト IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合に影響は認められなかった。しかし、マウス IL-5Rα の 61 番目リジン（K61）をヒト IL-5Rα の 61 番目イソロイシン（I61）に置換するとベンラリズマブはマウス IL-5Rα に結合した。反対に、ヒト IL-5Rα の I61 をマウス IL-5Rα の K61 に置換するとベンラリズマブのヒト IL-5Rα に対する結合は消失した。以上より、ヒト IL-5Rα

の I61 がベンラリズマブの結合に重要なアミノ酸残基であることが同定された（図 2.6.2.3.4-4）。

図2.6.2.3.4-4 ヒト IL-5Rα 上のベンラリズマブ結合エピトープ同定：61 番目イソロイシンの役割



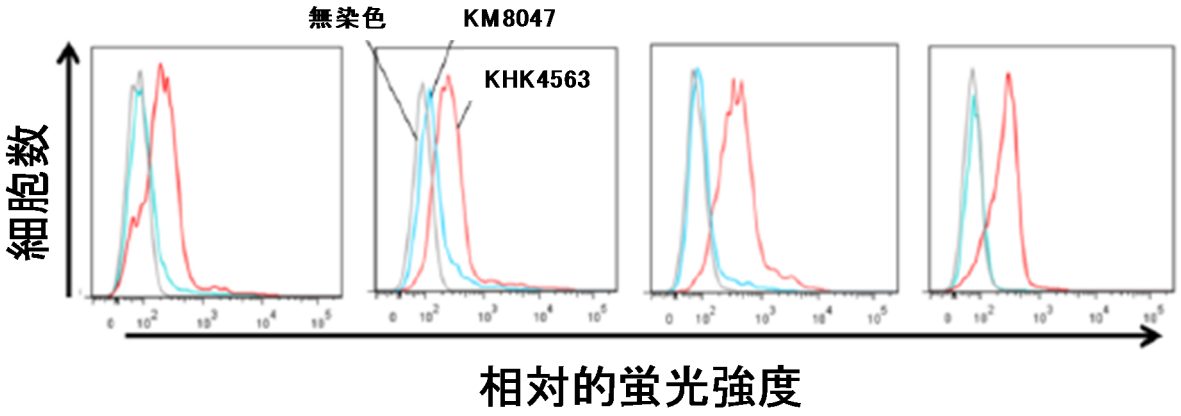
ヒト IL-5Rα の 61 番目イソロイシン（I61）はベンラリズマブの結合に重要なアミノ酸残基である。I61 は図 2.6.2.3.4-2において赤字で示した。

D1 内（I61 を含む）に存在する区分 B（アミノ酸 40 番目から 61 番目）はヒト及びカニクイザルで 100%一致しており、ベンラリズマブがカニクイザル IL-5Rα に交差反応することが示唆される。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）。

2.6.2.3.5 末梢血由来ヒト好酸球及び好塩基球上の IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合（試験番号：RIA563-0001、d-[redacted]-0147、r-[redacted]-194）資料番号：参考 4.2.1.1-3、4.2.1.1-5、参考 4.2.1.1-6

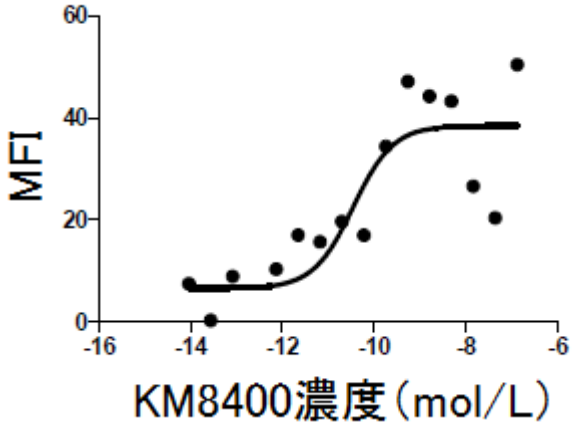
細胞表面上に発現するヒト IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合活性を評価するために、ヒト末梢血由来の好酸球を用いてフローサイトメトリー解析を実施した（試験番号：RIA563-0001、d-[redacted]-0147）。ベンラリズマブは陰性対照抗体と比較してヒト好酸球表面上の IL-5Rα に特異的に結合した（図 2.6.2.3.5-1、試験番号：d-[redacted]-0147）。健常人由来のヒト好酸球に対するベンラリズマブの 50%結合濃度を算出するために、非特異的な Fc に対する結合の影響が少ないフコース含有型の KM8400 を、濃度段階をつけて好酸球と反応させた。ベンラリズマブ及び KM8400 は IL-5 依存性細胞増殖を同程度の薬効強度で阻害するために、ヒト IL-5R に対する結合活性が同程度であると考えられる（Kolbeck et al, 2010）。KM8400 の 50%結合濃度は MFI により算出した。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（図 2.6.2.3.5-2、試験番号： RIA563-0001）。

図2.6.2.3.5-1　ヒト好酸球に対するベンラリズマブの結合活性



好酸球上 IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合活性を検証するために、ビオチン標識したベンラリズマブ（KHK4563）を用いた。ビオチン標識した KM8047（抗 DNP 抗体）を陰性対照として使用した。健常人末梢血由来好酸球（n=4）に対するベンラリズマブ又は KM8047 の結合はそれぞれ赤線又は青線で示し、無染色条件は灰色線で示す。各図は異なる健常人由来の好酸球を用いた結果を示す。

図2.6.2.3.5-2　ヒト好酸球に対する抗 IL-5Rα mAb 結合の非線形曲線フィット解析

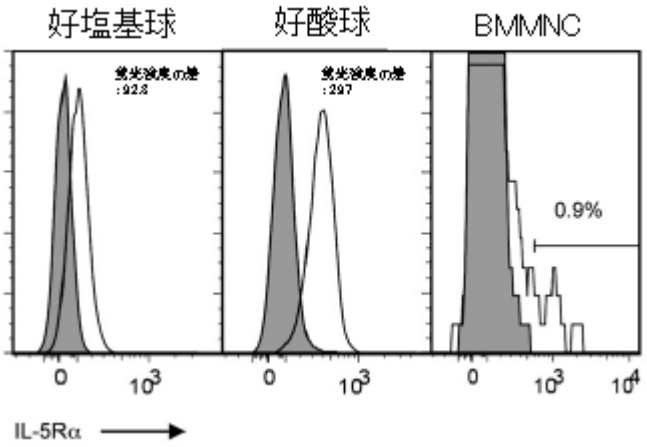


50%結合濃度=0.036 nmol/L、MFI：平均蛍光強度。この試験ではフコース含有型抗 IL-5Rα mAb である KM8400 を使用した。

フローサイトメトリーを用いた別の試験において、KM8407 がヒト好酸球に特異的に結合し、ヒトリンパ球、単球及び好中球には結合しないことを確認した（試験番号：r-[redacted]-194）。

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（図 2.6.2.3.5-3、Kolbeck et al, 2010）。

図2.6.2.3.5-3　ヒト好酸球、好塩基球及び BMMNC に対するベンラリズマブ由来 F(ab')2 の結合

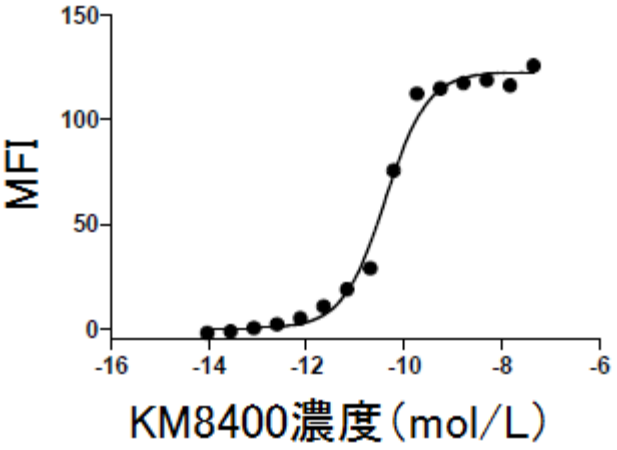


ベンラリズマブ 由来 F(ab')2（白）又は陰性対照 F(ab')2（影）を用いた好塩基球（n=2）、好酸球（n=3）又は BMMNC（n=4）のヒト IL-5Rα 発現解析。図は代表的な測定結果を示す。
BMMNC：骨髄単核細胞、IL-5Rα：インターロイキン-5 受容体 α サブユニット

2.6.2.3.6　カニクイザル好酸球上の IL-5Rα に対するベンラリズマブの結合（試験番号：RIA563-0001、r-[redacted]-194）資料番号：参考 4.2.1.1-3、参考 4.2.1.1-6

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、非特異的な Fc に対する結合の影響が少ないフコース含有型の KM8400 を、濃度段階をつけて好酸球と反応させた。KM8400 の 50%結合濃度は MFI により算出した。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（図 2.6.2.3.6-1、試験番号： RIA563-0001）。

図2.6.2.3.6-1　カニクイザル好酸球に対する抗 IL-5Rα mAb 結合の非線形曲線フィット解析



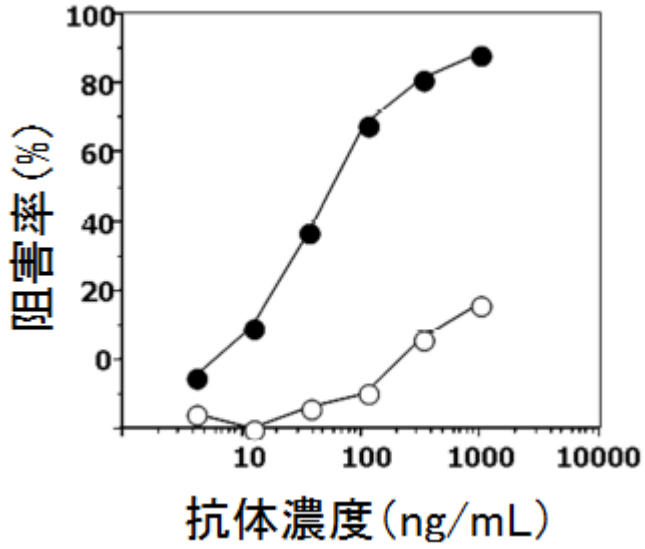
50%結合濃度=0.040 nmol/L、MFI：平均蛍光強度。この試験ではフコース含有型抗 IL-5Rα mAb である KM8400 を使用した。

また別の試験において、KM8407 がカニクイザル好酸球に特異的に結合し、カニクイザルリンパ球、単球及び好中球には結合しないことを確認した（試験番号：r-[redacted]-194）。

2.6.2.3.7 抗 IL-5Rα mAb である KM1259 による固相化ヒト IL-5Rα に対する IL-5 の結合阻害

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 及びベンラリズマブの 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。ヒト IL-5 のヒト IL-5Rα への結合に対する KM1259 の阻害活性を検証するために、ELISA 用プレートに固相化した Fc 融合可溶性ヒト IL-5Rα へのビオチン標識ヒト IL-5 結合に対する、濃度段階をつけた KM1259 の阻害活性を測定した。ヒト IL-5Rα 上の異なるエピトープに結合する他の mAb（KM1257）を対照抗体とした。その結果、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したが、KM1257 は阻害しなかった（図 2.6.2.3.7-1、Koike et al, 2009）。

図2.6.2.3.7-1 ヒト IL-5 のヒト IL-5Rα 結合に対する KM1259 の阻害

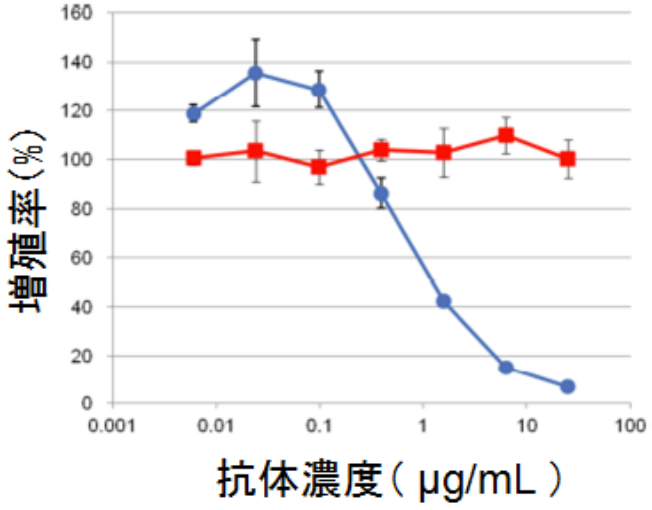


Fc 融合組換えヒト IL-5Rα を ELISA 用プレートに固相化し、マウス抗ヒト IL-5Rα mAb である KM1257（白）又は KM1259（黒）のビオチン標識ヒト IL-5 の結合に対する阻害活性を様々な濃度で検証した。値は阻害率を示す。

2.6.2.3.8 IL-5 依存性細胞増殖に対するベンラリズマブの阻害（試験番号：d-[redacted]-0019）資料番号：4.2.1.1-7

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を評価するために、組換えヒト IL-5Rα を発現した [redacted] 細胞株を用いて細胞増殖評価試験を実施した。その結果、ベンラリズマブは組換えヒト IL-5Rα を発現した [redacted] 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（図 2.6.2.3.8-1、試験番号：d[redacted]-0019）。

図2.6.2.3.8-1　ベンラリズマブによる IL-5Rα 発現細胞の増殖阻害



IL-5Rα 発現細胞株（[redacted]）を 0.006、0.024、0.098、0.391、1.563、6.250 及び 25 μg/mL のベンラリズマブ（●）又は陰性対照抗体（■）と反応させ、細胞増殖を測定した。値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。

2.6.2.3.9　ヒト及びカニクイザルの FcγRIIIa（CD16a）に対するベンラリズマブの結合親和性

ヒト IgG の糖鎖から単糖フコースを欠損させることで FcγRIIIa（CD16a）に対する結合親和性が向上し ADCC 活性が増強することが既に報告されている（Shields et al, 2002 ; Shinkawa et al, 2003）。そこで、固相化したヒト及びカニクイザルの FcγR に対するベンラリズマブ の K_D を、BIAcore を用いて測定した。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 に対する親和性はフコース含有型の 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（表 2.6.2.3.9-1、Kolbeck et al, 2010）。

表2.6.2.3.9-1　BIAcore により測定したヒト及びカニクイザル FcγR に対するベンラリズマブ及び KM8400 の結合親和性

	K_D（nmol/L）±標準誤差							
	ヒト				カニクイザル			
	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIIa	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIIa
ベンラリズマブ	18.5±2.5	1280±10	4580±1150	45.5±0.5	1	3170	2070	23±3
KM8400	18	1170	3890	275.5±0.5	1	2970	1720	195.5±10.5

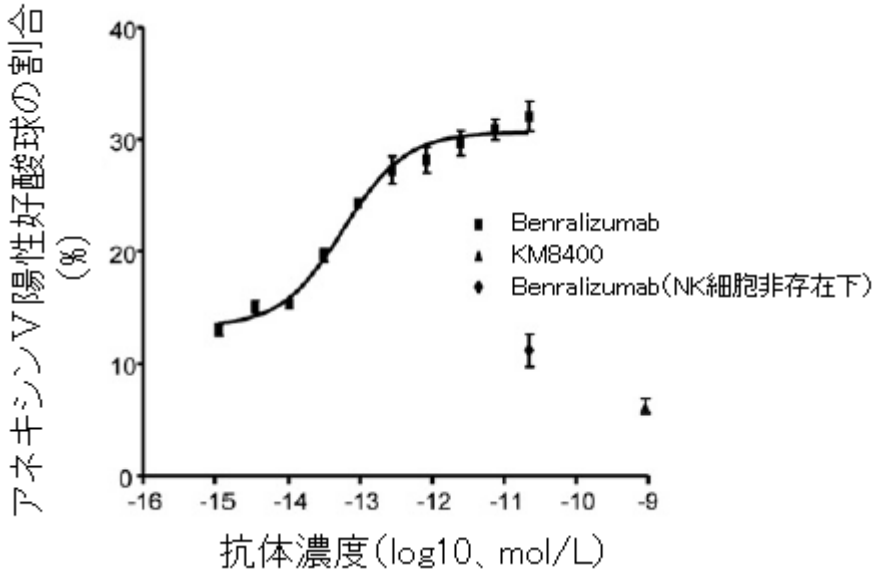
K_D ：解離定数
ベンラリズマブは KM8400 と比較してヒト及びカニクイザル FcγRIIIa に対する結合親和性がそれぞれ 6 倍及び 8 倍高いが、他の FcγR に対する結合親和性は KM8400 と同程度であった。

2.6.2.3.10　ヒト好酸球及び好塩基球に対するベンラリズマブの ADCC を介したアポトーシス誘導（試験番号：d-[redacted]-0148）資料番号：4.2.1.1-8

ベンラリズマブのヒト好酸球に対するアポトーシス誘導活性は自家ナチュラルキラー（NK）細胞をエフェクター細胞として使用した *in vitro* 試験で検証した。ベンラリズマブによりアポトーシスが誘導された好酸球をアネキシン V 染色により評価した結果、ベンラリズマブは 50%有効濃度（EC_{50}）0.9 pmol/L で好酸球のアポトーシスを誘導した（図 2.6.2.3.10- 1）。図 2.6.2.3.10- 1で示すとおり、ベンラリズマブの ADCC 活性は NK 細胞依存的であった。また、フコース含有型の KM8400 は、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）。これらの結果は、ベンラリズマブでは IL-5Rα を発現するヒト好酸球のアポトーシスを誘導する ADCC 活性が増強していることを明確に示している。

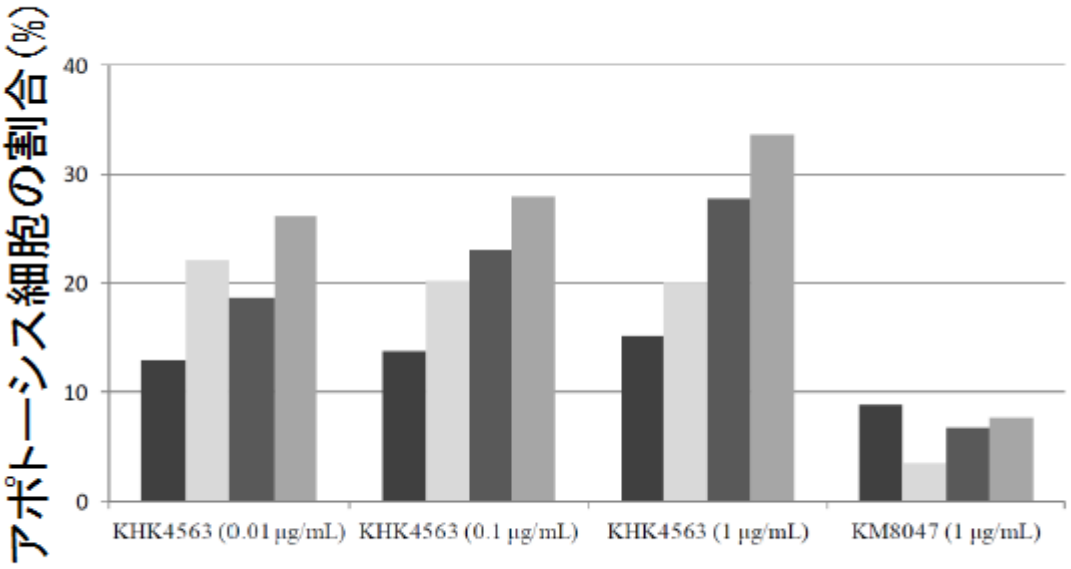
図2.6.2.3.10- 1 ヒト好酸球に対するベンラリズマブの ADCC 活性



ヒト好酸球に対するベンラリズマブの ADCC 活性（EC_{50}=0.9 pmol/L、n=5）
KM8400：フコース含有型抗 IL-5Rα mAb、NK 細胞：ナチュラルキラー細胞

ヒト末梢血単核細胞（PBMC）をエフェクター細胞とした別の試験においても、ベンラリズマブは追加ドナー由来の好酸球に対して強いアポトーシス誘導活性を示した（図 2.6.2.3.10-2、試験番号：d-[redacted]-0148）。

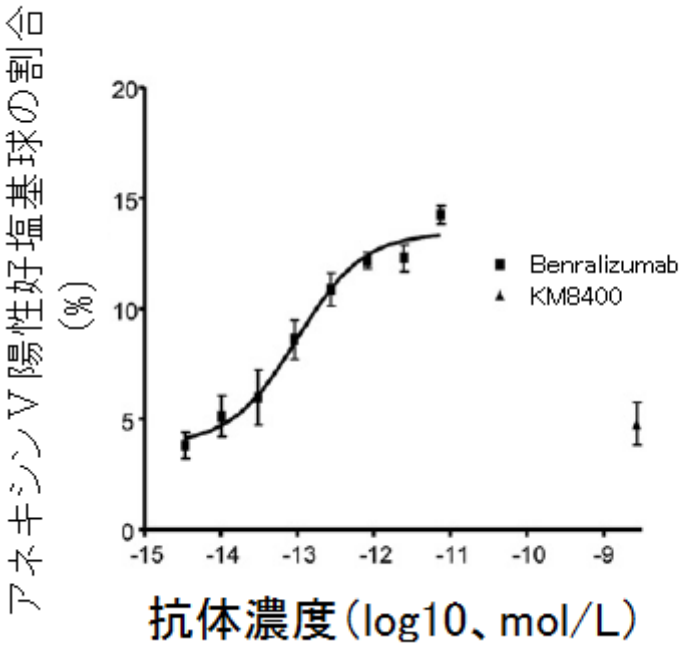
図2.6.2.3.10-2　ベンラリズマブ又はKM8047によるアポトーシス誘導率



ベンラリズマブ（KHK4563）は ADCC を介してヒト好酸球のアポトーシスを誘導した。ドナーごとの値を棒グラフとして示す。
KM8047：抗 DNP 抗体（陰性対照抗体）

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* 試験においてヒト好塩基球に対しても強い ADCC 活性を示した。好塩基球は、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。ADCC 評価試験において、ベンラリズマブは好塩基球のアポトーシスを EC_{50} 値 0.5 pmo/L で誘導した（図 2.6.2.3.10-3）。しかし、フコース含有型の KM8400 はベンラリズマブの EC_{50} より 1000 倍高い濃度においても好塩基球のアポトーシスを誘導しなかった（Kolbeck et al, 2010）。

図2.6.2.3.10-3　ヒト好塩基球に対するベンラリズマブの ADCC 活性

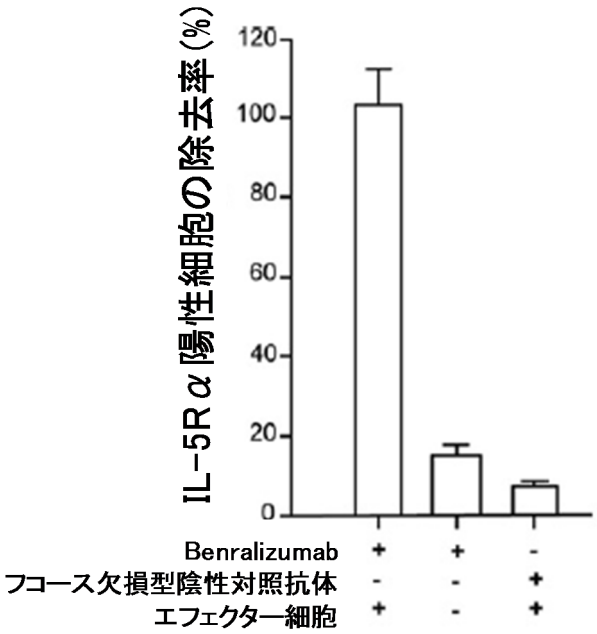


ヒト好塩基球に対するベンラリズマブの ADCC 活性（EC_{50}=0.5 pmol/L、n=3）
KM8400：フコース含有型抗 IL-5Rα mAb

2.6.2.3.11　ヒト IL-5Rα を発現する BMMNC に対するベンラリズマブのアポトーシス誘導

NK 細胞をエフェクター細胞として用いてヒト BMMNC に対する ADCC 評価試験を実施した結果、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 のアポトーシスを特異的に誘導した（図 2.6.2.3.11-1）。ベンラリズマブによる IL-5Rα を発現する BMMNC のアポトーシス誘導は NK 細胞依存的であり、フコース欠損型陰性対照抗体では起こらなかった（Kolbeck et al, 2010）。

図2.6.2.3.11-1 *In vitro* 試験におけるベンラリズマブによるヒト IL-5Rα 発現 BMMNC の除去

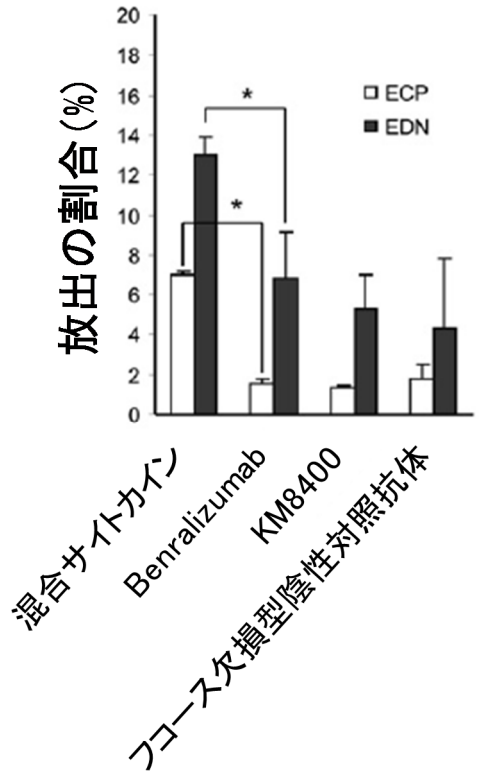


代表的な試験結果を示す（n=2）。

2.6.2.3.12 ベンラリズマブによるヒト好酸球のアポトーシス誘導に伴う好酸球性顆粒タンパク質の放出（試験番号：d-[redacted]-0149）資料番号：4.2.1.1-9

In vitro 試験においてベンラリズマブによる好酸球のアポトーシス誘導の機序を更に解析するために、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）及び好酸球由来神経毒（EDN）がアポトーシスにより上清中に放出されるか検討した。界面活性剤である tritonX-100 存在下で好酸球を溶解した際に放出される ECP 及び EDN 量を最大放出量として 100%に設定した。陽性対照として eotaxin、RANTES 及び好酸球活性化サイトカインである IL-33 の混合物を使用し、ECP 及び EDN の濃度は ELISA により測定した。図 2.6.2.3.12-1で示すとおり、ベンラリズマブ により誘導された NK 細胞による好酸球のアポトーシスは、フコース欠損型陰性対照抗体及びフコース含有型の KM8400 と比較して上清中の EDN 及び ECP 濃度を上昇させなかった。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）。

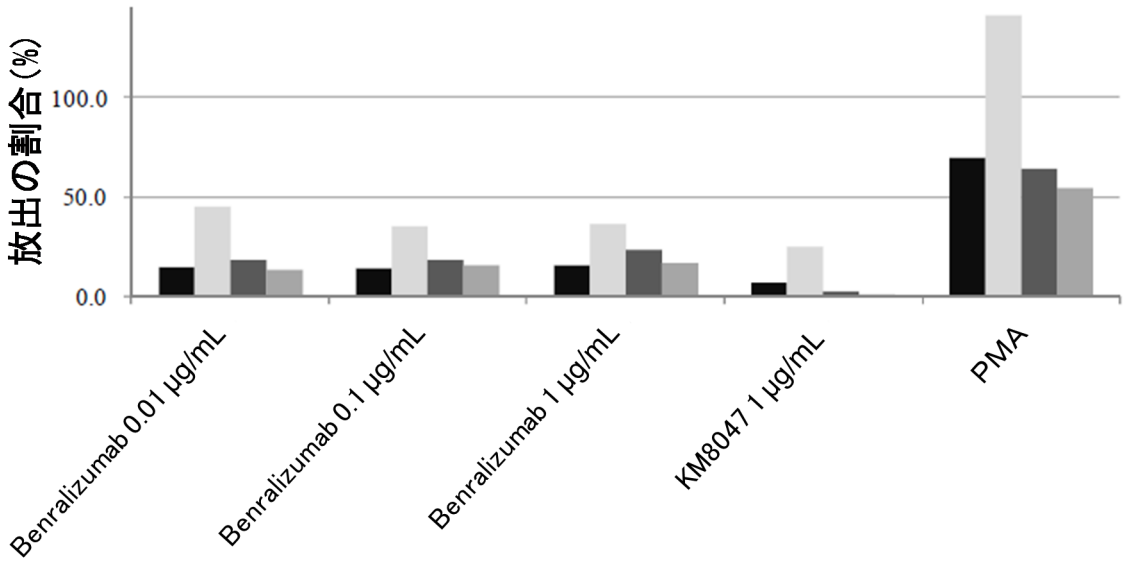
図2.6.2.3.12-1 ECP 及び EDP の放出を伴わないベンラリズマブによる好酸球の ADCC 活性



混合サイトカイン：RANTES、エオタキシン及び IL-33、ECP：好酸球カチオンタンパク質、EDN：好酸球由来神経毒、KM8400：フコース含有型抗 IL-5Rα mAb
TritonX-100 により誘導された ECP 及び EDN の値を 100%として計算した（n=2）。
*：有意差は student t test により計算した（$p<0.05$）。

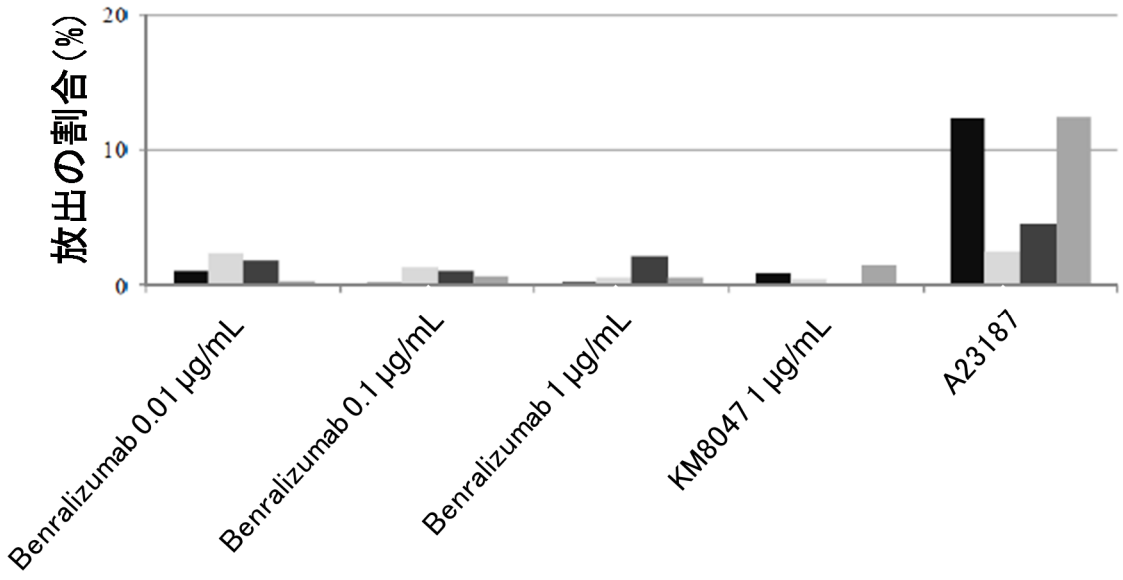
PBMC をエフェクター細胞とした別の試験においても、ベンラリズマブにより誘導された好酸球のアポトーシスは上清中 EDN 及び ECP の増加を伴わなかった（図 2.6.2.3.12-2、図 2.6.2.3.12-3、試験番号：d-[redacted]-0149）。

図2.6.2.3.12-2　ベンラリズマブ、KM8047 及び PMA による EDN 放出率



ベンラリズマブ、KM8047（抗 DNP 抗体、陰性対照）又は 1 ng/mL のホルボールミリステートアセテート（PMA）（陽性対照）による EDN の放出。ドナーごとの値を棒グラフとして示す。

図2.6.2.3.12-3　ベンラリズマブ、KM8047 及び A23187 による ECP 放出率

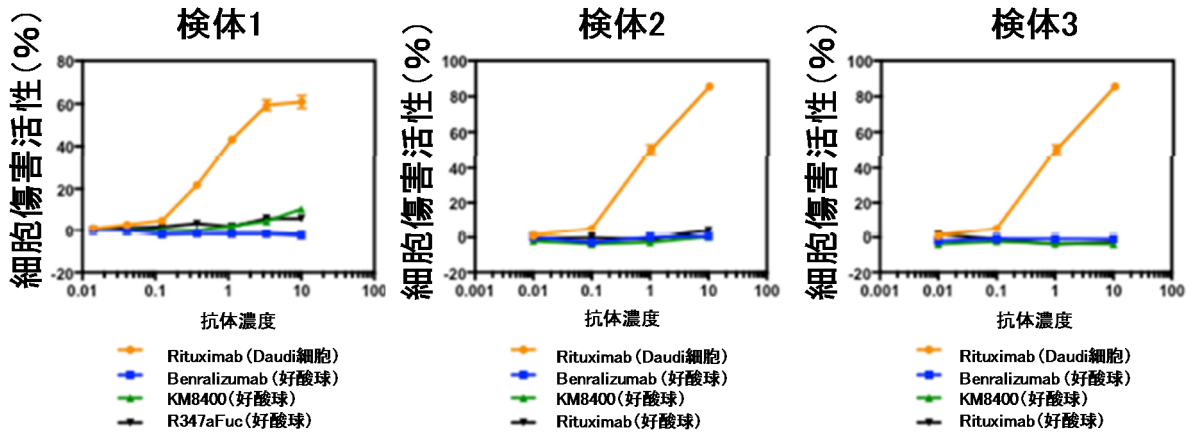


ベンラリズマブ、KM8047（抗 DNP 抗体、陰性対照）又は 1 µmol /L の A23187（陽性対照）による ECP の放出。ドナーごとの値を棒グラフとして示す。

2.6.2.3.13 *In vitro* 試験におけるベンラリズマブの CDC 活性（試験番号：RIA563-0002）資料番号：参考 4.2.1.1-10

ベンラリズマブが CDC を誘導するか検証するために、末梢血から分離したヒト好酸球を正常ヒト血清培地（NHSM）で培養した。ベンラリズマブ、フコース含有型の KM8400、陰性対照抗体である R347aFuc 又は rituximab を、濃度段階をつけて細胞と共培養した。抗 CD20 抗体である rituximab による CDC 活性は報告されている（van Meerten et al, 2006）。陽性対照として CD20 を発現している Daudi 細胞を、濃度段階をつけた rituximab と共培養した。CDC 活性はフローサイトメトリーにより生細胞及び死細胞を測定することで検証した。Rituximab は NHSM 中に含まれる補体の存在下において Daudi 細胞に対して CDC を誘導した。ベンラリズマブ及び KM8400 は ADCC 評価試験における EC_{50} の 1000 倍以上高い濃度であっても、3 ドナー由来の好酸球に対して CDC を誘導しなかった（図 2.6.2.3.13-1、試験番号： RIA563-0002）。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、ベンラリズマブが好酸球に対して CDC 活性を示さないと考えられる（Ingley and Young, 1991；Lopez et al, 1991；Migita et al, 1991）。一方、Daudi 細胞では 1 細胞当たりの CD20 発現数がこれより約 500 倍多いために、rituximab が CDC 活性を示すことができたと考えられる（van Meerten et al, 2006；Niwa et al, 2005）。

図2.6.2.3.13-1 ヒト好酸球に対するベンラリズマブの CDC 活性



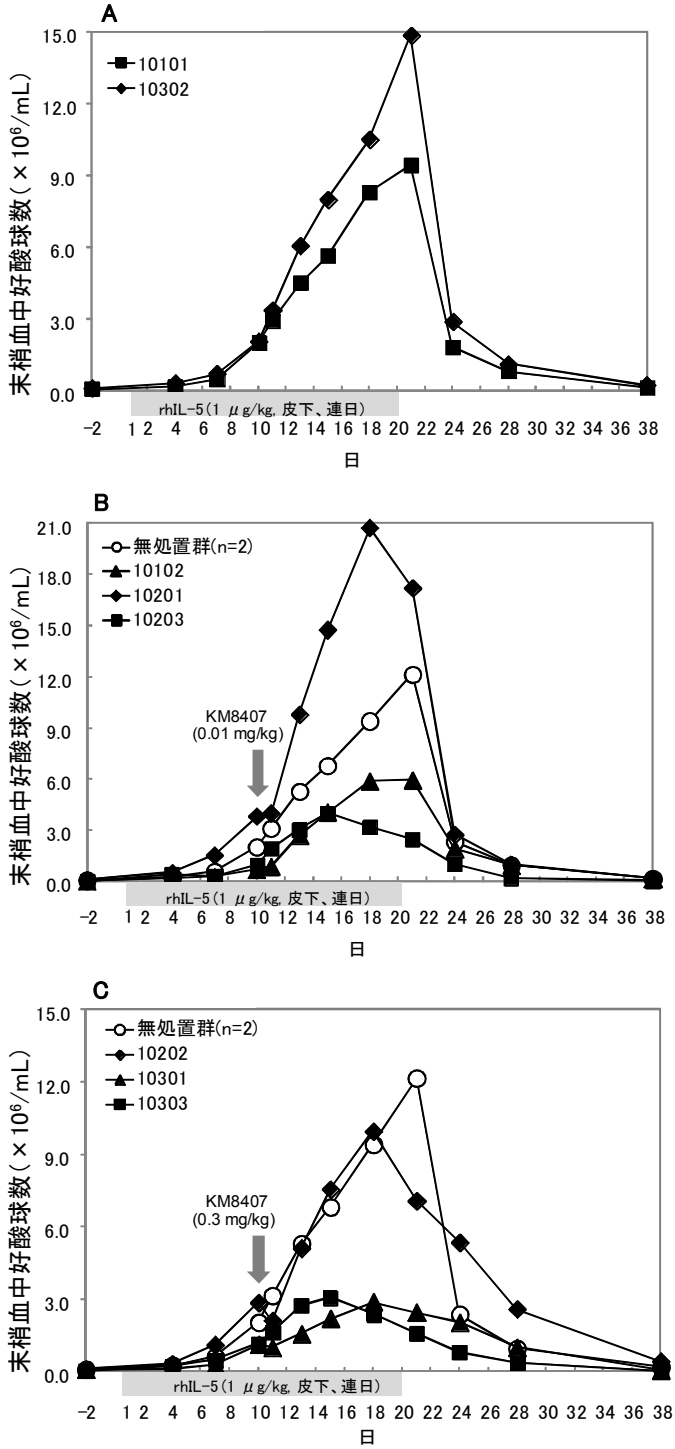
標的細胞である Daudi 細胞又は末梢血より分離した好酸球を、濃度段階をつけた抗体及び正常人由来血清が存在する条件下において 37℃ で 4 時間反応させた。細胞傷害活性は、フローサイトメトリーを用いて生細胞及び死細胞を測定し、1 ウェル当たりの総細胞数をもとに計算した。値は平均値±標準偏差（n=2～3）を示す。
KM8400：フコース含有型抗 IL-5Rα mAb、R347aFuc：フコース欠損型陰性対照抗体、Rituximab：抗 CD20 抗体、Rituximab（Daudi 細胞）：Rituximab を Daudi 細胞と共培養させた陽性対照

2.6.2.3.14 カニクイザルにおける IL-5 誘発性末梢血好酸球増多モデルに対するベンラリズマブの阻害作用（試験番号：r-[redacted]-222）資料番号：4.2.1.1-11

カニクイザルに IL-5 を反復皮下投与すると顕著な末梢血好酸球増加が誘発される。この好酸球増多モデルを用いて、IL-5 誘発好酸球増加に対する KM8407 の阻害作用を評価した。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た。この結果は、KM8407 が生体内で好酸球増加を抑制したことを示す（図 2.6.2.3.14-1、試験番号：r[redacted]-222）。KM8407 はベンラリズマブと同等であることが示されてい

る（試験番号：r[redacted]-0337）。ただし、2 例のカニクイザルが KM8407 に反応しなかった理由は不明である。

図2.6.2.3.14-1　サル IL-5 誘発性好酸球増多モデルにおける KM8407 の評価



A：2 例のカニクイザル（10101 及び 10302）に対して試験 1 日目から 20 日目まで 0.001 mg/kg の組換えヒト IL-5 を 1 日 1 回連日皮下投与した（最初に組換えヒト IL-5 を投与した日を試験 1 日目とする）。末梢血中の好酸球数は試験-2（最初に組換えヒト IL-5 を投与した日の 2 日前）、4、7、10、11、13、15、18、21、24、28 及び 38 日に測定した。

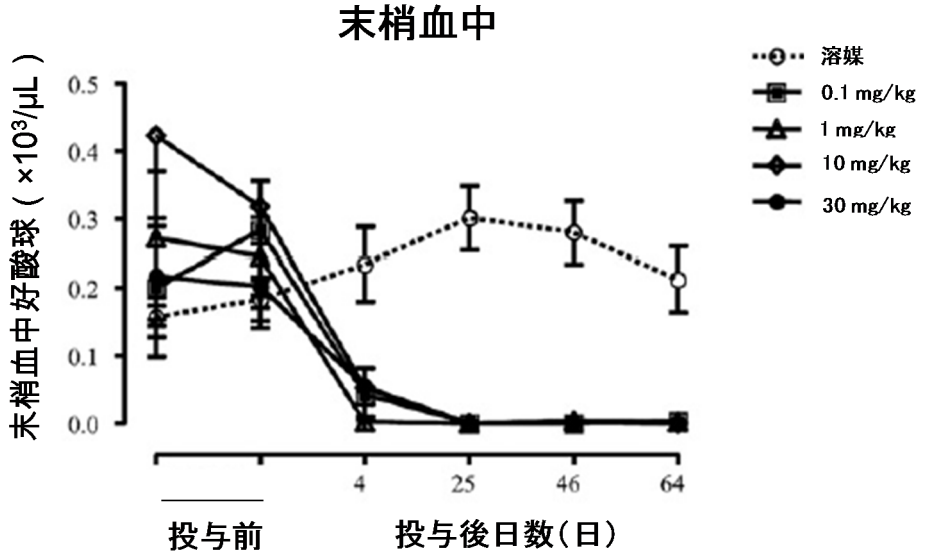
B：3 例のカニクイザル（10102、10201 及び 10203）に対して試験 1 日目から 20 日目まで 0.001 mg/kg の組換えヒト IL-5 を 1 日 1 回連日皮下投与した。組換えヒト IL-5 投与 10 日目に 0.01 mg/kg の KM8407 を静脈内投与した。末梢血中の好酸球数は試験-2、4、7、10、11、13、15、18、21、24、28 及び 38 日に測定した。白丸は KM8407 無処置群での平均値を示す。

C：3 例のカニクイザル（10202、10301 及び 10303）に対して試験 1 日目から 20 日目まで 0.001 mg/kg の組換えヒト IL-5 を 1 日 1 回連日皮下投与した。組換えヒト IL-5 投与 10 日目に 0.3 mg/kg の KM8407 を静脈内投与した。末梢血中の好酸球数は試験-2、4、7、10、11、13、15、18、21、24、28 及び 38 日に測定した。白丸は KM8407 無処置群での平均値を示す。

2.6.2.3.15 ベンラリズマブによるカニクイザル末梢血中好酸球及び骨髄中好酸球前駆細胞の除去（試験番号：[redacted].112.01）資料番号：4.2.3.2-1

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）。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（計 4 回投与）。末梢血中の好酸球及び骨髄中の好酸球前駆細胞数を、各ベンラリズマブ投与後に測定した。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。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（図 2.6.2.3.15-1、Kolbeck et al, 2010）。

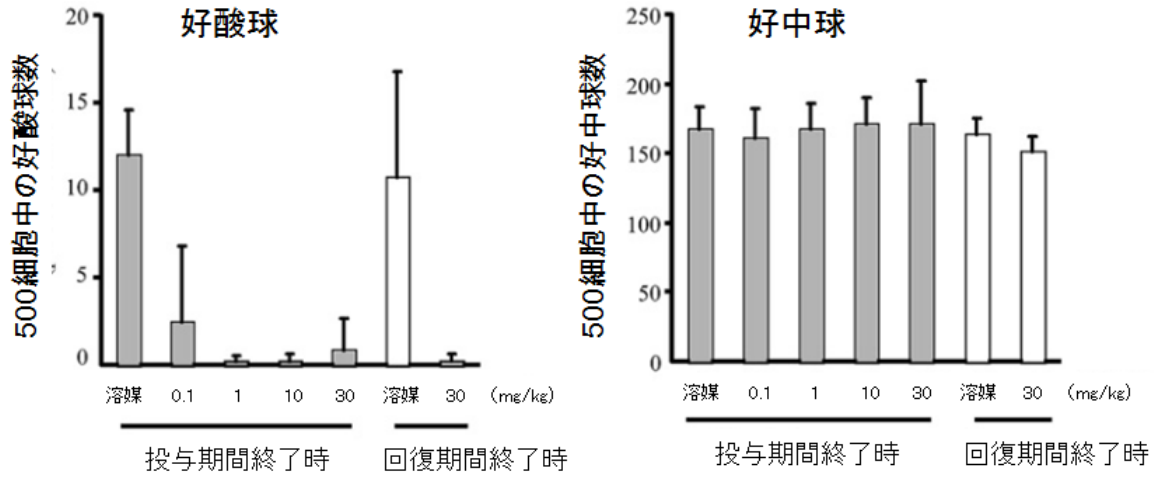
図2.6.2.3.15-1 ベンラリズマブによるカニクイザル末梢血中好酸球の除去



4 用量のベンラリズマブ（0.1、1、10 及び 30 mg/kg）又は溶媒をカニクイザルに 3 週間に 1 回、9 週間静脈内投与した。末梢血中の好酸球は各投与後に測定した。値は平均値±標準偏差（n=4～10）を示す。

同様に、組織学的解析により、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、図 2.6.2.3.15-2）。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（図 2.6.2.3.15-2）。

図2.6.2.3.15-2 ベンラリズマブによる骨髄中好酸球前駆細胞の除去

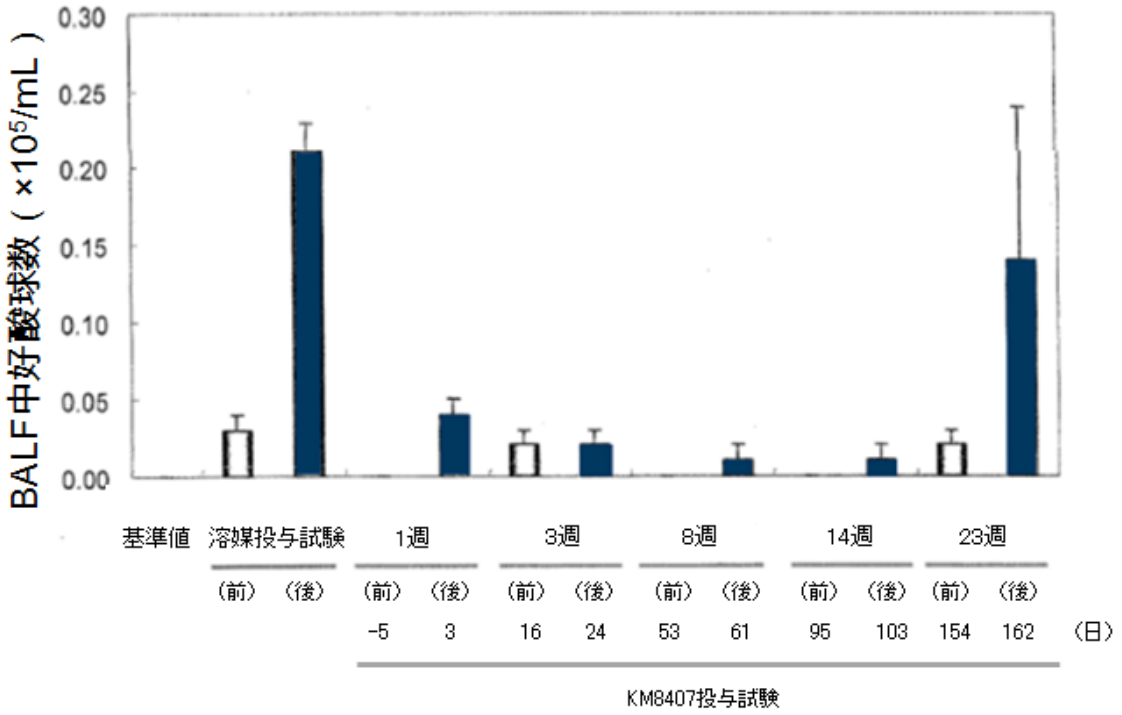


4 用量のベンラリズマブ（0.1、1、10 及び 30 mg/kg）又は溶媒をカニクイザルに 3 週間に 1 回、9 週間静脈内投与した。骨髄中の好酸球前駆細胞（左図）及び好中球前駆細胞（右図）は最終投与 3 日後（投与期間終了時剖検、Day 67）又は 30 mg/kg 投与群では最終投与 21 日後（回復期間終了時剖検、Day 85）に測定した。値は平均値±標準偏差（n=4～6）を示す。

2.6.2.3.16 サル喘息モデルにおける KM8407 の有効性（試験番号：d-[redacted]-184、r[redacted]-457）資料番号：参考 4.2.1.1-12、参考 4.2.1.1-13

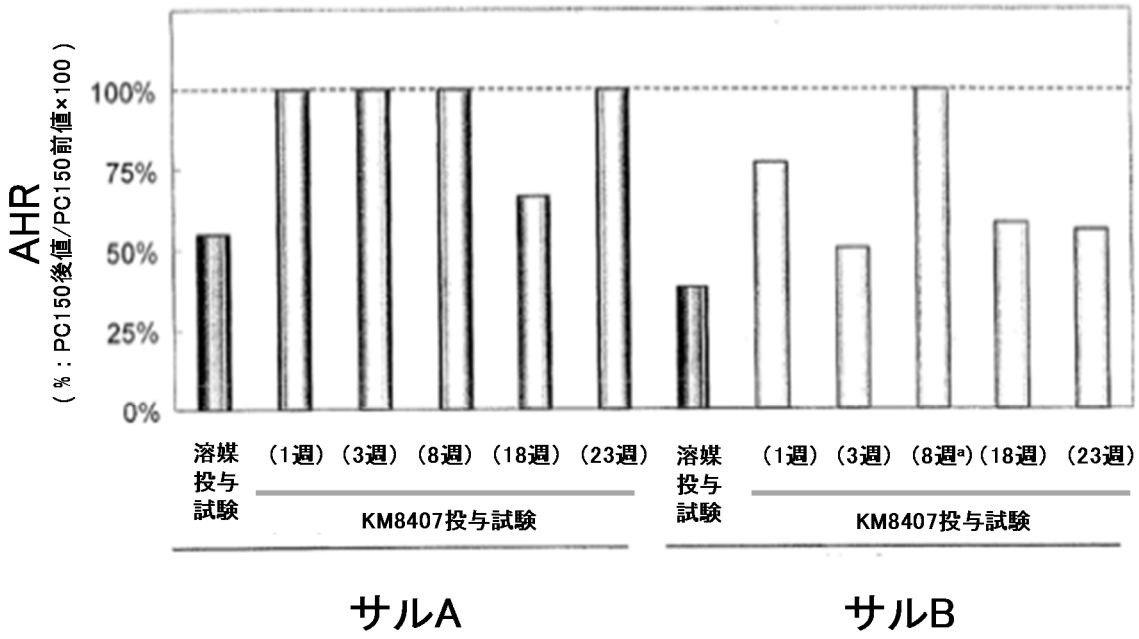
5 例のカニクイザルをジニトロフェニル化豚回虫抽出物で 4 回感作し、豚回虫抗原で 2 回噴霧チャレンジした。初回感作から 14 週目に溶媒を投与した動物における豚回虫抗原に対する反応性を、気管支肺胞洗浄液（BALF）中の好酸球数及びメサコリン吸入で誘発した気道過敏性反応（AHR）により評価し、基準値とした（試験番号：d[redacted]-184）。溶媒投与試験の 8 週間後に、同じカニクイザルを用いて KM8407 投与試験を実施した。抗原曝露（Day 2）の前日（Day 1）に KM8407（1 mg/kg）を単回静脈内投与し、更に Day 23、60、102 及び 161 に追加の抗原曝露を実施した（試験番号：r-[redacted]-457）。各抗原曝露の前及び 24 時間後に BALF 中の好酸球数を測定した。また、各抗原曝露の 24 時間後に濃度勾配をつけたメサコリンに対する AHR を測定した。KM8407 投与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曝露により BALF 中の好酸球数増加（図 2.6.2.3.16-1）及び AHR の亢進が確認された（図 2.6.2.3.16-2）が、KM8407 の投与により Day 3、24、61 及び 103 における 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。

図2.6.2.3.16-1 感作後カニクイザルでの豚回虫抗原吸入による好酸球集積に対する KM8407 の作用



KM8407 投与試験は溶媒投与試験の 8 週後に実施した。KM8407 は Day2 に実施する抗原曝露の前日（Day 1）に静脈内投与した。更に試験 Day 23、60、102 及び 161 に抗原曝露した。BALF は抗原曝露の前（白）及び 24 時間後（青）に採取した。基準値は無処置のカニクイザルでの値を示す。白は抗原曝露前の BALF 中平均好酸球数+標準誤差（n=5）、青は抗原曝露後の BALF 中平均好酸球数+標準誤差（n=5）を示す。
BALF：気管支肺胞洗浄液

図2.6.2.3.16-2　豚回虫抗原吸入後のメサコリン吸入による AHR に対する KM8407 の作用



AHR：気道過敏性反応、PC：誘発濃度、対照試験：溶媒投与試験
気道反応性は呼吸器抵抗性が 150%増加するメサコリン濃度（PC150）として測定した。AHR は PC150 前値（豚回虫抗原の吸入 1 週間前の値）及び PC150 後値（豚回虫抗原の吸入 1 日後の値）を用いて評価した。Day 103 に呼吸器機能を測定した際にメサコリン濃度を誤った可能性があるため、2 例のカニクイザルについては Day130（18 週）に追加で抗原曝露し AHR を測定した。
a：PC150 前値が通常よりも低かった（データは示していない）。

2.6.2.4　副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.5　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）、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を認めなかった。

2.6.2.6　薬力学的薬物相互作用

該当する試験は実施していない。

2.6.2.7　考察及び結論

ベンラリズマブは標準治療法によるコントロールが困難な好酸球性の重症喘息患者に対する治療薬として期待される。*In vitro* 薬理試験においてヒト化抗 IL-5Rα mAb であるベンラリズマブは、ヒト及びカニクイザル IL-5Rα に強い親和性で結合したが、マウス IL-5Rα には結合しなかった。ヒト IL-5Rα 上の特異的結合エピトープがベンラリズマブと共通であるマウス親抗体 KM1259 は、IL-5 の IL-5Rα に対する結合を阻害し、ベンラリズマブ は IL-5 依存性細胞増殖を

抑制した。しかし、ベンラリズマブは ADCC 活性が増強されており、*in vitro* 評価系においてアンタゴニスト活性よりも好酸球及び好塩基球のアポトーシス誘導活性の方が強い。重要なことに、*in vitro* における ADCC を介した好酸球のアポトーシス誘導は、好酸球の脱顆粒を伴わなかった。以上の薬理的作用を総合的に考えると、ベンラリズマブは好酸球及び好塩基球の生存を促進する IL-5 以外の成長因子が存在する条件下においても、組織中の好酸球及び好塩基球を除去できる可能性が考えられる。実際にベンラリズマブはナイーブ又は抗原曝露されたカニクイザルに投与した際に、迅速かつ顕著に末梢血、骨髄及び BALF 中の好酸球を減少させ、*in vivo* 薬理活性を示した。

2.6.2.8 図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.2.9 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.

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.

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.

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.

Niwa et al, 2005
Niwa R, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Matsushima K, Ueda R, et al. Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. Clin Cancer Res. 2005;11(6):2327-36.

Shields et al, 2002
Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcgamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. J Biol Chem. 2002;277(30):26733-40.

Shinkawa et al, 2003
Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. J Biol Chem. 2003;278(5):3466-73.

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.

van Meerten et al, 2006
van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebeling SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. Clin Cancer Res. 2006;12(13):4027-35.

Yamane-Ohnuki et al, 2004
Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, Kusunoki M, Iida S, Nakano R, et al. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. Biotechnol Bioeng. 2004;87(5):614-22.

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.

ベンラリズマブ

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3　薬理試験概要表

アストラゼネカ株式会社

CONFIDENTIAL

目次

目次 2
2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 9
2.6.3.4 安全性薬理試験 9
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 9

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Table 2.6.3.1-1 Overview of Pharmacology Studies with Benralizumab

Type of Study	Study Number	Title	Testing Facility	資料番号
In Vitro Antibody Activity	r-[redacted]-0337	Comparison of the *in vitro* activity of anti-IL-5Rα humanized antibody KHK4563 and KM8407	Biologics Research Laboratories, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. Tokyo, Japan	参考 4.2.1.1-1
In Vitro Binding	d-[redacted]-0018	Antigen binding activity of KHK4563 (MEDI-563), a humanized anti-IL-5Rα monoclonal antibody	Biologics Research Laboratories, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. Tokyo, Japan	4.2.1.1-2
In Vitro Binding	RIA563-0001	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	MedImmune Gaithersburg, MD USA	参考 4.2.1.1-3
In Vitro Binding	RIA563-0003	Benralizumab (MEDI-563) does not cross-react with murine IL-5 receptor alpha	MedImmune Gaithersburg, MD USA	参考 4.2.1.1-4
In Vitro Binding	d-[redacted]-0147	Binding activity of KHK4563 (MEDI-563) to human peripheral blood derived eosinophils	Fuji Research Park, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. Shizuoka, Japan	4.2.1.1-5
In Vitro Binding	r-[redacted]-194	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	Biologics Research Laboratories, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. Tokyo, Japan	参考 4.2.1.1-6
Cell-based Growth Inhibition	d-[redacted]-0019	Growth inhibition activity against IL-5Rα-expressing cell line of KHK4563 (MEDI-563), a humanized anti-IL-5Rα monoclonal antibody	Biologics Research Laboratories, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. Tokyo, Japan	4.2.1.1-7
ADCC Induction	d[redacted]0148	Induction of human eosinophil apoptosis via antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by KHK4563 (MEDI-563)	Fuji Research Park, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. Shizuoka, Japan	4.2.1.1-8

Table 2.6.3.1-1 Overview of Pharmacology Studies with Benralizumab (Continued)

Type of Study	Study Number	Title	Testing Facility	資料番号
ADCC-induced Protein Release	d-[redacted]-0149	Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity of KHK4563 against human eosinophils: Release of human eosinophil granule proteins by KHK4563 (MEDI-563)	Fuji Research Park, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. Shizuoka, Japan	4.2.1.1-9
CDC Induction	RIA563-0002	Benralizumab (MEDI-563) does not induce Complement Dependent Cytotoxicity of primary human eosinophils	MedImmune Gaithersburg, MD USA	参考 4.2.1.1-10
In Vivo Evaluation of Peripheral Blood Eosinophilia in Cynomolgus Monkeys	r[redacted]-222	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	[redacted], Japan Pharmaceutical Research Center, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. (current Fuji Research Park, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) Shizuoka, Japan	4.2.1.1-11
In Vivo Cynomolgus Monkey Asthma Model	d-[redacted]-184	An asthmatic animal model in cynomolgus monkeys	Pharmaceutical Research Center, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Shizuoka and Yamaguchi, Japan (current Fuji Research Park, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.)	参考 4.2.1.1-12
In Vivo Evaluation in a Cynomolgus Monkey Asthma Model	r[redacted]-457	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	Pharmaceutical Research Center, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Shizuoka and Yamaguchi, Japan (current Fuji Research Park, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.)	参考 4.2.1.1-13

ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity; IL-5 = interleukin -5; IL-5Rα= interleukin-5 receptor alpha; KM8407 = benralizumab equivalent mAb
In this table benralizumab is referred to as MEDI-563, KHK4563.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Table 2.6.3.2-1 *In Vitro* Pharmacology Studies with Benralizumab

Type of Study	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings	Study Number	資料番号
In Vitro Antibody Activity	IL-5Rα-expressing cell line [redacted]) and [redacted]cell line Recombinant human IL-5Rα	• Antigen binding: Plate-bound hIL-5Rα was incubated with increasing concentrations of KHK4563 or KM8407 (0.5-111 ng/mL). Bound antibody was detected with a goat anti-human IgG-HRP. • ADCC: IL-5Rα-expressing cells and [redacted] cell lines were incubated with KHK4563 or KM8407 (0.003-333 ng/mL) for approximately 3 hours, then LDH in the supernatant was quantified.	Activity assessment: • Antigen binding of KHK4563 and KM8407 were equivalent • ADCC activities of KHK4563 and KM8407 were comparable	r[redacted]-0337	参考 4.2.1.1-1
In Vitro Binding	Recombinant human IL-5Rα	Plate-bound hIL-5Rα was incubated for 1 hour with increasing concentrations (0.4-100 ng/mL) of KHK4563 or isotype control antibody. Bound antibody was detected with a goat anti-human IgG-HRP	• KHK4563 showed reactivity against immobilized hIL-5Rα protein in a dose-dependent manner.	d-[redacted]-0018	4.2.1.1-2
In Vitro Binding	Human and cynomolgus monkey eosinophils Recombinant human and cynomolgus monkey IL-5Rα	Binding of MEDI-563 (6 pmol/L-25 nmol/L) to soluble human and cynomolgus monkey IL-5Rα was evaluated by BIAcore. Binding of KM8400 to human and cynomolgus monkey eosinophils was evaluated by flow cytometry. KM8400 (0.01 pmol/L-10 nmol/L). EC_{50} was determined by MFI.	• The EC_{50} of parental fucosylated anti-IL-5Rα mAb binding to human and cynomolgus monkey eosinophils correlated with MEDI-563 K_D of binding to human and cynomolgus monkey soluble IL-5Rα, which were estimated to be approximately 16 and 42 pmol/L, respectively. • The binding of KM8400 to human and cynomolgus monkey peripheral blood eosinophils was comparable (approximate EC_{50} = 30 to 40 pmol/L).	RIA563-0001	参考 4.2.1.1-3

Table 2.6.3.2-1 *In Vitro* Pharmacology Studies with Benralizumab (Continued)

Type of Study	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings	Study Number	資料番号
In Vitro Binding	HEK293F cells transfected with murine IL-5Rα	HEK293F cells transfected with murine IL-5Rα were incubated with benralizumab (10 μg/mL), cells were then incubated with goat anti-human IgG-FITC, and the binding of benralizumab was analyzed by flow cytometry.	• Benralizumab does not bind to murine IL-5Rα	RIA563-0003	参考 4.2.1.1-4
In Vitro Binding	Human eosinophils	Purified eosinophils (n=4 donors) were incubated with biotinylated KHK4563 at 1 μg/mL for 1 hour at 4°C after treatment with FcR blocking reagent then evaluated by flow cytometry.	• Biotinylated KHK4563 showed binding activity to human eosinophil obtained from healthy volunteers (n=4). • Negative control antibody did not show binding activity.	d-[redacted]-0147	4.2.1.1-5
In Vitro Binding	Human and cynomolgus monkey peripheral blood	Binding activity of Biotinylated KM8407 (1 μg) to lymphocytes, monocytes, neutrophils and eosinophils isolated from human (n=3) and cynomolgus monkey (n=3) peripheral blood was evaluated by flow cytometry.	• Biotinylated KM8407 specifically binds to peripheral blood eosinophils of both human and cynomolgus monkey, without binding to lymphocytes, monocytes and neutrophils. • Biotinylated KM8407 did not exhibit significant binding activity to eosinophils from 1 out of 3 cynomolgus monkeys.	r[redacted]-194	参考 4.2.1.1-6
Cell-based Growth Inhibition	IL-5Rα -expressing cell line, [redacted]	IL-5Rα-expressing cells were prepared and incubated with KHK4563 and KM8047 (isotype control antibody) (0.006-25 μg/mL) for 48 hours with and without rhIL-5. The growth was measured using WST-1 assay.	• MEDI-563 showed growth inhibition activity against IL-5Rα -expressing cell line in a concentration-dependent manner. • MEDI-563 has neutralizing activity against IL-5 activity	d-[redacted]-0019	4.2.1.1-7

Table 2.6.3.2-1 *In Vitro* Pharmacology Studies with Benralizumab (Continued)

Type of Study	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings	Study Number	資料番号
ADCC Induction	PBMCs and eosinophils isolated from peripheral blood of healthy human volunteers (n=4).	Purified PBMCs were incubated with MEDI-563 (0.01-1 µg/mL) for 20 hours, stained with annexinV and 7-amino-actinomycin D to analyze the apoptosis cells in flow cytometry.	• MEDI-563 induced apoptosis on human eosinophils when incubated with PBMCs.	d[redacted]-0148	4.2.1.1-8
ADCC-induced Protein Release	PBMCs and eosinophils isolated from peripheral blood of healthy human volunteers (n=4).	Purified PBMCs and eosinophils were incubated with MEDI-563 (0.01-1 µg/mL) for 20 hours, then the concentrations of EDN and ECP in the supernatants were determined using a commercially available ELISA kit	• Eosinophil apoptosis induced by MEDI-563 was not associated with the release of eosinophilc granule proteins, EDN or ECP.	d-[redacted]-0149	4.2.1.1-9
CDC Induction	Human eosinophils	Human eosinophils were plated in microtiter plate. Benralizumab (0.01-10 µg/mL), positive or the negative control antibodies were titrated and co-incubated with target cells. Cells were stained, fixed and analyzed by flow cytometry.	• Rituximab (positive control) induced CDC of Daudi cells in the presence of complement. • Benralizumab and KM8400 used at concentrations more than 1000 fold above their ADCC EC_{50} did not demonstrate CDC activity of eosinophils purified from three different human donors.	RIA563-0002	参考 4.2.1.1-10

ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity; CDC = complement-dependent cytotoxicity; EC_{50} = 50% effective concentration; ECP = eosinophil cationic protein; EDN = eosinophil-derived neurotoxin; FcR = Fc receptor; FITC = Fluorescein isothiocyanate; HRP = horseradish peroxidase; IL-5 = interleukin-5; IL-5Rα = interleukin-5 receptor alpha subunit; K_D = dissociation constant; LDH = lactate dehydrogenase; MFI = mean fluorescence intensity; NK = natural killer; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; rhIL-5 = recombinant human IL-5
In this table benralizumab is referred to as MEDI-563, KHK4563.
KM8407 = benralizumab equivalent mAb; KM8400 = fucosylated parent anti-IL-5Rα mAb

Table 2.6.3.2-2 *In Vivo* Pharmacology Studies with Benralizumab

Type of Study	Strain	ROA	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	資料番号
In Vivo evaluation in IL-5-induced eosinophilia model	Cynomolgus monkey	IV	Single dose of 0, 0.01 or 0.3 mg/kg KM8407	2 males (untreated control) 3 males per treatment group	• Eosinophilia induced by repeat subcutaneously injection of recombinant hIL-5 was potently suppressed in 2 of 3 cynomolgus monkeys in each treatment group. • One monkey in each KM8407 treated group, however, showed no effect on eosinophils after a single dose of either 0.01 or 0.3 mg/kg KM8407. An explanation of this finding remains unclear.	r-[redacted]-222	4.2.1.1-11
In Vivo Cynomolgus Monkey Asthma Model	Cynomolgus monkeys	NA	No benralizumab was used in this study.	24 males	• Antigen-specific IgE antibody was produced in response to sensitization in all the animals. • AHR was induced by antigen inhalation. • Eosinophils in BALF increased after antigen inhalation.	d-[redacted]-184	参考 4.2.1.1-12
In Vivo evaluation in an asthma model	Cynomolgus monkey	IV	Single dose of 1 mg/kg	5 males for the study on eosinophil infiltration (BAL analysis) 2 males for the AHR evaluation	• KM8407 significantly suppressed the number of infiltrated eosinophils in BAL induced by antigen challenge in the cynomolgus monkeys sensitized to DNP-Ascaris for more than 14 weeks. • A trend towards improved AHR to cholinergic stimulation was observed receiving KM8407.	r-[redacted]-457	参考 4.2.1.1-13

AHR = airway hyperresponsiveness; BALF = Bronchoalveolar lavage fluid; BAL = Bronchoalveolar lavage; DNP = Dinitrophenyl; IL-5 = interleukin-5; IV = intravenous; NA = not applicable; ROA= route of administration; KM8407 = benralizumab equivalent mAb

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験は実施しなかったが、安全性薬理学的パラメーターは非臨床安全性試験の一部として評価した。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。