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

2.6.6　毒性試験の概要文

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
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）
CHO	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
CLL	Chronic lymphatic leukemia（慢性リンパ性白血病）
CPT	Center point titer（力価中央）
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 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）
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）
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）
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
BD	出生児の出生後の日数を表す（生後日数、Birth date）
BIW-8405	ベンラリズマブの別名（BioWa 社の開発コード番号）
DNA	デオキシリボ核酸
Fc	免疫グロブリンの結晶化可能断片領域
FcγRIIIa	IgG の Fc 部位にする受容体（FcγR）のサブクラスの一つ
FcγRIV	IgG の Fc 部位にする受容体（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）
GTPase	GTP結合タンパク質におけるGTPをGDPに加水分解する機能
ICH	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use）
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）
[redacted]	[redacted]
MEDI-563	ベンラリズマブの別名（AstraZeneca/MedImmune 社の開発コード番号）
[redacted]	[redacted]
PPD	産後の日数を表す（出産後日数、Postpartum day）
[redacted]	[redacted]

目次

略号及び用語の定義一覧 2
目次 3
2.6.6 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.1.1 毒性試験の要約 4
2.6.6.1.2 動物種の選定 8
2.6.6.2 単回投与毒性試験 8
2.6.6.2.1 雄性カニクイザルを用いた皮下投与による単回投与毒性（トキシコキネティクス）試験（試験番号：[redacted].263.02；非 GLP）資料番号：4.2.3.1-1 8
2.6.6.3 反復投与毒性試験 8
2.6.6.3.1 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（試験番号：[redacted].112.01；GLP）資料番号：4.2.3.2-1 8
2.6.6.3.2 カニクイザルを用いた 15 週間反復皮下投与及び 12 週間回復性試験（試験番号：[redacted].263.04；GLP）資料番号：4.2.3.2-2 9
2.6.6.3.3 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（試験番号：AAO00095；GLP）資料番号：4.2.3.2-3 10
2.6.6.4 遺伝毒性試験 11
2.6.6.5 がん原性試験 11
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 13
2.6.6.6.1 受胎能及び初期胚発生から着床までの試験 13
2.6.6.6.2 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試験（試験番号：AAO00036；GLP）資料番号：4.2.3.5.3-1 14
2.6.6.6.3 幼若動物を用いた毒性試験 15
2.6.6.7 局所刺激性試験 16
2.6.6.7.1 ウサギを用いた単回皮下投与後の局所刺激性試験（試験番号：517668；GLP）資料番号：4.2.3.6-1 16
2.6.6.8 その他の毒性試験 17
2.6.6.8.1 カニクイザル組織交差反応性試験（試験番号：IM1232）資料番号：4.2.3.7.7-1 17
2.6.6.8.2 ヒト組織交差反応性試験（試験番号：IM1231）資料番号：4.2.3.7.7-2 17
2.6.6.8.3 免疫毒性 18
2.6.6.9 考察及び結論 18
2.6.6.10 図表 19
2.6.6.11 参考文献 19

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 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、フコースを欠損したヒト化モノクローナル抗体（mAb）であり、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）に結合し（Kolbeck et al, 2010）、増強した抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性によってアポトーシスを誘導することにより好酸球及び好塩基球を特異的に除去する（Kolbeck et al, 2010 ; Humbles et al, 2011）。ベンラリズマブは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）mAb であり、2 個の重鎖（G1）と 2 個の軽鎖（κ）を有し、分子量は約 150 kDa である。ADCC 活性を増強したベンラリズマブは、遺伝子組換えにより α-1,6-フコース転移酵素（FUT8）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。

2.6.6.1.1 毒性試験の要約

これまでに実施した非臨床安全性試験を表 2.6.6.1.1-1に記載した。非臨床安全性試験の動物種の選択に関する考察は次項（2.6.6.1.2）にまとめた。

カニクイザルを用いてベンラリズマブを静脈内及び皮下投与する 5 つの非臨床安全性試験（単回皮下投与試験、9 週間反復静脈内投与試験、15 週間反復皮下投与試験、9 ヵ月間反復静脈内及び皮下投与試験並びに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[Stewart, 2009]）を実施した。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。

カニクイザル及びヒトの組織を用いた組織交差反応性（TCR）試験では、サル及びヒトの組織において類似した染色性を示した。

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、子宮頸管及び膣）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。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、ベンラリズマブの皮下投与による刺激性は認められなかった。

表2.6.6.1.1-1　ベンラリズマブの非臨床毒性試験要約

試験種	試験番号（資料番号）	種／系統	投与経路	被験物質	投与回数	用量（mg/kg）	GLP 適合性	試験施設
単回投与毒性	[redacted].263.02（4.2.3.1-1）	カニクイザル	皮下	ベンラリズマブ	単回（Day 1）	30: 雄 3	非 GLP	[redacted], USA
反復投与毒性	[redacted].112.01（4.2.3.2-1）	カニクイザル	静脈内	ベンラリズマブ	3 週間に 1 回、9 週間（Day 1, 22, 43, 64）	0: 雌 5／雄 5 0.1: 雌 2／雄 2 1.0: 雌 3／雄 3 10: 雌 2／雄 2 30: 雌 5／雄 5	GLP	[redacted], USA
	[redacted].263.04（4.2.3.2-2）	カニクイザル	皮下	ベンラリズマブ	隔週、15 週間計 8 回投与	0: 雌 6／雄 6 1.0: 雌 6／雄 6 10: 雌 6／雄 6 30: 雌 6／雄 6	GLP	[redacted], USA
	AAO00095（4.2.3.2-3）	カニクイザル	静脈内／皮下	ベンラリズマブ	隔週、39 週間計 20 回投与	静脈内 0: 雌 6／雄 6 10: 雌 6／雄 6 25: 雌 6／雄 6 皮下 0: 雌 6／雄 6 30: 雌 6／雄 6	GLP	[redacted], USA
遺伝毒性	ICH ガイダンス S6(R1), 2011 に基づき、遺伝毒性試験は実施しなかった（2.6.6.4参照）							
がん原性	がん原性試験は実施しなかった（詳細は2.6.6.5参照）							
生殖発生毒性	AAO00036（4.2.3.5.3-1）	カニクイザル	静脈内	ベンラリズマブ	GD20~22, GD35 並びに妊娠期間中及び生後 1 ヵ月まで 14 日間隔（最大 14 回投与）	0: 雌 14 10: 雌 14 30: 雌 14	GLP	[redacted], USA

表2.6.6.1.1-1　ベンラリズマブの非臨床毒性試験要約（続き）

試験種	試験番号（資料番号）	種／系統	投与経路	被験物質	投与回数	用量（mg/kg）	GLP 適合性	試験施設
局所刺激性	517668（4.2.3.6-1）	ウサギ／New Zealand White	皮下	ベンラリズマブ（凍結乾燥製剤）	単回（Day 1）	50 mg/injection (1 mL): 雄 6	GLP	[redacted], Scotland
その他の毒性試験（組織交差反応性試験）	IM1232（4.2.3.7.7-1）	カニクイザル	NA	ベンラリズマブ（FITC 標識）	NA	1 及び 10 µg/mL	GLP	[redacted], USA
	IM1231（4.2.3.7.7-2）	ヒト	NA	ベンラリズマブ（FITC 標識）	NA	1 及び 10 µg/mL	GLP	[redacted], USA

GD： 妊娠日数、FITC：フルオレセインイソチオシアネート、NA：適応外
用量値の下線は当該試験の無毒性量（NOAEL）を示す。

2.6.6.1.2 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。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 雄性カニクイザルを用いた皮下投与による単回投与毒性（トキシコキネティクス）試験（試験番号：[redacted].263.02；非 GLP）資料番号：4.2.3.1-1

非 GLP 試験として、単回投与毒性試験（試験番号：[redacted].263.02）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。未使用の雄性カニクイザルを表 2.6.6.2.1-1に示す単回投与群に割り付けた。

表2.6.6.2.1-1 [redacted].263.02 の群構成

投与群	投与経路	用量（mg/kg）	投与液濃度（mg/mL）	投与容量（mL/kg）	動物数（雄）
1	皮下	30	60.9	0.49	3

単回皮下投与後の忍容性、血中薬物濃度及び免疫原性を 21 日間評価した。一般状態観察、体重、投与部位観察、尿検査、血液学的検査、トキシコキネティクス（TK）及び免疫原性を評価した（TK 及び免疫原性の結果は 2.6.4.8.1 を参照）。

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。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 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（試験番号：[redacted].112.01；GLP）資料番号：4.2.3.2-1

カニクイザルにベンラリズマブ を 0（クエン酸緩衝液 10 mmol/L、塩化ナトリウム 150 mmol/L、0.02%ポリソルベート 80、pH 6.0）、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）。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。最終投与 2 日後（Day 67；投与期間終了時）及び 18 日間の回復期間終了後（Day 85；回復期間終了時）に剖検した。

未使用のカニクイザル 34 例（雄 17 例、雌 17 例）を表 2.6.6.3.1-1に示す投与群に割り付けた。

表2.6.6.3.1-1 [redacted].112.01 試験の群構成

群番号	動物数（雄／雌）	投与経路	投与用量（mg/kg）	剖検動物数（雄／雌）	
				Day 67	Day 85
1	5/5	静脈内	0	3/3	2/2
2	2/2	静脈内	0.1	2/2	0/0
3	3/3	静脈内	1	3/3	0/0
4	2/2	静脈内	10	2/2	0/0
5	5/5	静脈内	30	3/3	2/2

一般状態観察、摂餌量、体重、身体検査、血圧、心電図、呼吸数、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球サブセット、TK、抗薬物（ベンラリズマブ）抗体（ADA）及び血液ガス検査を実施した（TK 及び ADA の結果は 2.6.4.8.2 参照）。安楽死させた後、肉眼検査、病理組織学的検査及び器官重量測定を実施した。

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。

2.6.6.3.2 カニクイザルを用いた 15 週間反復皮下投与及び 12 週間回復性試験（試験番号：[redacted].263.04；GLP）資料番号：4.2.3.2-2

ベンラリズマブ（0［ヒスチジン 10 mmol/L、グリシン 300 mmol/L 及び 0.02%ポリソルベート 20、pH 6.0］、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）。未使用のカニクイザル 48 例（雄 24 例、雌 24 例）を表 2.6.6.3.2-1に示す用量群に割り付けた。

表2.6.6.3.2-1 [redacted].263.04 試験の群構成

群番号	動物数（雄／雌）	投与経路	用量（mg/kg）	剖検動物数（雄／雌）	
				Day 101	Day 183
1	6/6	皮下	0	3/3	3/3
2	6/6	皮下	1	3/3	3/3
3	6/6	皮下	10	3/3	3/3
4	6/6	皮下	30	3/3	3/3

一般状態観察、皮膚 Draize スコアによる投与部位評価、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）、器官重量、組織肉眼的検査、病理組織学的検査を実施した。最終投与後 2 日（Day 101）及び 12 週（Day 183）にそれぞれ剖検を実施した（各群雌雄 3 例）。TK 及び ADA 産生も合わせて評価した（TK 及び ADA の結果は 2.6.4.8.3 参照）。

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）、器官重量並びに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、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に 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。

2.6.6.3.3 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（試験番号：AAO00095；GLP）資料番号：4.2.3.2-3

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に 1 回 39 週間、計 20 回、静脈内（0［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、pH 6.0］、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）。最終投与から 3 日後（Day 270；投与期間終了時）及び 12 週間後（Day 351；回復期間終了時）に剖検を実施した（雌雄各群 3 例）。各群の例数は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。

未使用の性成熟したカニクイザル 48 例（雄 24 例及び雌 24 例）を表 2.6.6.3.3-1に示す用量群に割り付けた。

表2.6.6.3.3-1 AAO00095 試験の群構成

群番号	動物数（雄／雌）	投与経路	投与用量（mg/kg）	剖検動物数（雄／雌）	
				Day 270	Day 351
1	6/6	静脈内／皮下	0	3/3	3/3
2	6/6	静脈内	10	3/3	3/3
3	6/6	静脈内	25	3/3	2[a]/3
4	6/6	皮下	30	3/3	3/3

a：25 mg/kg 静脈投与群の雄 1 例は Day 47 に剖検した。

一般状態観察、インフュージョン又は投与部位反応、摂餌量、体重、身体検査、心電図、血圧、眼科学的検査、月経周期（雌）、精巣容積／大きさ計測及び精子検査（雄）、臨床検査、器官重量、病理肉眼検査及び病理組織学的検査を実施した。また、血液を採取し、TK 及び

ADA 解析、雌雄のホルモン解析並びにリンパ球フェノタイピングを実施した（TK 及び ADA の結果は 2.6.4.8.4 参照）。

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 12 週間の回復期間を経た Day 350 又は Day 351 まで持続した。一部の動物では投与期間中に好酸球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（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；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。

2.6.6.4 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を実施していない。

2.6.6.5 がん原性試験

ベンラリズマブの主たる作用機序である好酸球数の減少が悪性腫瘍の誘発リスクを高めるとする説得力のある証拠はない。限定的な発現パターンを示す IL-5Rα が IL-5 による細胞の生存及び増殖に影響を与えることが報告されている（Pierce et al, 1998）。腫瘍細胞（膀胱がん）の遊走における IL-5 の役割を示唆する限られた報告はあるものの（Lee et al, 2012a；Lee et al, 2012b；Lee et al, 2013）、IL-5 又は IL-5Rα の腫瘍の成長及び増殖に対する作用については、主に好酸球のバイオロジーに関連して研究が行われている。ベンラリズマブは好酸球を消失させ

ることから、好酸球の減少がもたらす発がん性リスクとの関係について理解することが重要である。好酸球は、固形がん、特に上皮性の固形腫瘍（乳がん、大腸がん；Samoszuk, 1997）との関連が示されているが、腫瘍の成長における好酸球の役割はまだ明らかとなっていない。いくつかの臨床試験において、がん患者の生存に好酸球の存在が良好な予後を示す指標になることが示唆されているものの、直接の関連性は立証されていない（Lowe et al, 1981；Hogan, 2007）。各種の悪性上皮性腫瘍において組織中の好酸球が予後判定に影響するとすれば、腫瘍の発生及び進展と好酸球の関係は複雑で、腫瘍の種類によって異なり、時間の経過とともに変化すると考えられている（Keresztes et al, 2007）。

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腫瘍形成及び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。

適切な代替法ではベンラリズマブがヒトで ADCC 活性を増強して機能する点を考慮する必要がある。ADCC 活性は抗体の Fc 領域が、対応する Fcγ 受容体（FcγR）と結合して標的細胞を融解させる。ヒトでは、主にナチュラルキラー（NK）細胞に発現する FcγR の一種である FcγRIIIa が ADCC 活性に基づく標的細胞の破壊に重要である（Nimmerjahn and Ravetch, 2006の総説）。フコースを除去することによってヒト FcγRIIIa との結合を亢進させた結果、ベンラリズマブの ADCC 活性は増強し、好酸球の除去を促進する（Shields et al, 2002；Shinkawa et al, 2003）。マウスでは FcγRIV がヒトの FcγRIIIa に相当するものの、FcγRIV は NK 細胞には発現せず、好中球、単球及び樹状細胞に発現している。その他の決定的な違いとして、ヒト FcγRIIIa と異なり、マウス FcγRIV は IgG1 抗体と結合せず、IgG2a 及び IgG2b アイソタイプ抗体と結合する点がある。これら 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）。

標的を欠損したトランスジェニックマウスモデルがベンラリズマブの腫瘍誘発リスクの評価に適切か検討した。好酸球を欠損するように遺伝子改変したマウスの利用が可能である（ΔdblGATA 欠損マウス及び EPO-DTA [PHIL]トランスジェニックマウス；Yu et al, 2002；Lee et al, 2004）。しかし、これらのマウスは 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、これらのモデルの表現型は異なる生理的機能に依存すると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）。

腫瘍における B-1 細胞の役割を示す証拠が数多く報告されている（Kasaian and Casali, 1993；Hardy, 2006）。T 細胞白血病において染色体転座に関与する責任遺伝子として tcl1 が同定され、この遺伝子はヒト B 細胞腫瘍でも確認されている。Eμ エンハンサーによる制御を受けてこの遺伝子を発現しているマウスでは、B-1 の表現型を示す前白血病性の B 細胞増殖を起こす。マウスでは加齢に伴って正常 CD5 陽性 B-1 タイプの B 細胞に類似した表現型を有する慢性リンパ性白血病（CLL）様増殖が起こる（Bichi et al, 2002）。Rap1 GTPase 活性化タンパクである SPA-1 を欠損したマウスでは、ループス様自己免疫疾患（CD5 陽性 B-1 細胞が媒介しうる疾患）を発症するとともに、散発的に溶血性自己抗体を伴う B 細胞性白血病を発症することから、Rap1 のシグナルは自己寛容の維持に関与していることが示唆されている（Ishida et al, 2006）。また、ヒト CLL 由来の低親和性かつ多反応性 B 細胞 R（多反応性自己抗体を発現）を発現するトランスジェニックマウスは、腹腔内に非特異的活性化によって免疫グロブリン分泌を顕著に誘導する B-1a のフェノタイプ（おそらくマウス自己抗原に対する交差反応性によって選択されたメモリーB 細胞）を持った導入遺伝子陽性の B 細胞を有していた（Widhopf et al, 2004）。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。

IL-5 欠損マウス（Kopf et al, 1996）もまた B-1 細胞の欠損を示す。しかし、欠損は一過性である。更に、IL-5 欠損マウスの骨髄及び末梢血には正常な形態をした正常レベルの好酸球を有している。IL-5 欠損動物では全身性の好酸球増加は認められないものの、*Mesocestoides corti* 感染では感染部位に好酸球の集積が認められることから、好酸球は正常な機能を保持していることを示唆している。したがって、IL-5 欠損マウスモデルはヒトの生理的反応及びベンラリズマブの臨床投与による発がん性リスク評価に適切とは言えない。

結論として、GLP 基準に準拠した試験としてカニクイザルを用いて実施したベンラリズマブの反復静脈内又は皮下投与毒性試験では、増殖性変化及び前がん性の病変は認められなかった。ベンラリズマブはマウスの IL-5Rα に結合しないことから古典的な 2 年間のげっ歯類を用いた生物試験による直接評価は実施しなかった。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。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 受胎能及び初期胚発生から着床までの試験

カニクイザルを用いた初期胚発生から着床までを評価する生殖発生毒性試験は現実的でないことから（Chellman et al, 2009；Martin et al, 2009）、実施しなかった。代替として、性成熟した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毒性試験を実施し、受胎能を間接的に評価した（概要表 2.6.7.7-3）。受胎能の評価として、雌の月経周期、雄の精巣容積／大きさ及び精子検査、器官重量（精巣上体、卵巣、前立腺、精嚢、精巣及び子宮）並びに生殖器系組

織（精巣、前立腺、精巣上体、精嚢、卵巣、卵管、子宮、子宮頸管及び腟）の病理組織学的に評価した。その結果、ベンラリズマブ投与に起因した異常所見は観察されなかった。

2.6.6.6.2 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試験（試験番号：AAO00036；GLP）資料番号：4.2.3.5.3-1

妊娠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）。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）に対照物質（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、pH 6.0）又はベンラリズマブの 10 若しくは 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2.6.6.6.2-1 AAO00036 試験の試験設計

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。

母動物の評価項目として、一般状態観察に加えて摂餌量、体重、妊娠状態の確認、臨床病理検査を実施した。また、血液を採取し、TK 及び ADA 産生を評価した（TK 及び ADA の結果は 2.6.4.8.5 参照）。また、超音波診断により胚･胎児の発育を計測し、妊娠期間についても評価した。妊娠動物は自然分娩により出産させた。出産日（出産していることが確認された朝又は日中に出産した場合はその当日）を基準として、母動物は出産後 1 日（PPD1）、出生児は生後 1 日（BD1）とした。BD28 までの出生児の評価項目は、一般状態観察、体重、身体検査、外観、形態計測、筋緊張、神経行動学的検査、眼科学的検査、骨格検査、末梢血リンパ球サブセット及び免疫グロブリン濃度とした。

PPD/BD28 以後、更に産後／生後 5.5 ヵ月間、母動物並びに出生児の一般状態観察、摂餌量（親動物のみ）、体重、血液学的検査、末梢血リンパ球サブセット、免疫グロブリン濃度、TK 及び ADA 産生に関する評価を継続した。出生児は KLH に対する T 細胞依存性抗体反応の免疫学的評価に加えて、外観、形態計測及び眼科学的検査を継続して評価した。およそ BD199（±2 日）に出生児を安楽死させた。すべての出生児を対象に内臓検査及び組織の肉眼検査を含む剖検を実施した。一部の組織については器官重量を測定し、病理検査を実施した。

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。この他には、妊娠期間中、いずれの母動物においても、一般状態、摂餌量又は体重推移に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。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）における胚損失は、対照群及び最高用量群でそれぞれ 1 例に認めたのみであり、被験物質による影響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 に 2/7 例及び 6/10 例、BD91 に 8/9 例及び 9/10 例、BD136 に 3/8 例及び 6/12 例で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（2.6.6.8.1参照）が、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/dose 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。

2.6.6.6.3 幼若動物を用いた毒性試験

ベンラリズマブの幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかったが、これまでに終了した非臨床安全性試験においてベンラリズマブの毒性学的プロファイルに年齢の違いによる差異は認められていない。カニクイザルを用いたベンラリズマブの 9 週間静脈内投与試験では 2～9 歳、15 週間の試験では 3～5 歳の動物を使用しており、一般にヒトの年齢で 10～12 歳又はそれ以上の年齢に相当する。また、例えば免疫系のような生後に発達するものについては、ヒトのより若い年齢層に対する外挿も適切であると考えられる（Weinbauer et al, 2012）。カニクイザルを用いた 9 ヵ月間の試験は性成熟した動物（雄で 6.3～12.9 歳、雌で 4.4～6.2 歳）を用いて実施した。

妊娠可能女性を臨床試験に含めるにあたり、カニクイザルを用いた ePPND 試験を実施した結果、ベンラリズマブ投与に起因した明らかな異常所見は観察されなかった。胚･胎児発生に加えて、生後 6.5 ヵ月までの出生児でベンラリズマブの影響を評価した。神経行動学的評価、骨格の発達及び免疫機能等、評価項目の多くは幼若動物を用いた毒性試験で評価する項目と同一であり、生後発達段階の評価に必要な項目についてはある程度実施したと考えられる。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 ウサギを用いた単回皮下投与後の局所刺激性試験（試験番号：517668；GLP）資料番号：4.2.3.6-1

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（臨床用の凍結乾燥製剤を被験物質とした）の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）。表 2.6.6.7.1-1に示すように、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（乾燥凍結製剤：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、pH 6.0、ベンラリズマブ 50 mg/mL）を投与した。

表2.6.6.7.1-1 517668 試験の試験設計

動物番号	投与部位（背部皮下）		投与物質	剖検日
1	1	左側上部	被験物質	Day 3
	2	右側中央	対照物質 1（プラセボ）	
	3	左側下部	対照物質 2（0.9% w/v NaCl 液）	
2	1	左側上部	対照物質 2（0.9% w/v NaCl 液）	Day 3
	2	右側中央	被験物質	
	3	左側下部	対照物質 1（プラセボ）	
3	1	左側上部	対照物質 1（プラセボ）	Day 3
	2	右側中央	対照物質 2（0.9% w/v NaCl 液）	
	3	左側下部	被験物質	
4	1	左側上部	被験物質	Day 15
	2	右側中央	対照物質 1（プラセボ）	
	3	左側下部	対照物質 2（0.9% w/v NaCl 液）	
5	1	左側上部	対照物質 2（0.9% w/v NaCl 液）	Day 15
	2	右側中央	被験物質	
	3	左側下部	対照物質 1（プラセボ）	
6	1	左側上部	対照物質 1（プラセボ）	Day 15
	2	右側中央	対照物質 2（0.9% w/v NaCl 液）	
	3	左側下部	被験物質	

すべての動物について一般状態を毎日観察した。注射部位は投与後 1 時間、その後は（ほぼ投与時刻と同じ時刻に）毎日、剖検まで皮膚の反応を観察した。投与時及び試験終了時に体重を測定した。すべての動物から投与部位を採取し、病理組織学的検査を実施した。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、2 例の動物のベンラリズマブ投与部位及び別の 2 例の 0.9%塩化ナトリウム液処置部位に紫斑が観察されたのみであった。体重推移に投与の影響は認められなかった。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、全身性の毒性や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。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 カニクイザル組織交差反応性試験（試験番号：IM1232）資料番号：4.2.3.7.7-1

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）。ベンラリズマブの結合は、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。

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。

2.6.6.8.2 ヒト組織交差反応性試験（試験番号：IM1231）資料番号：4.2.3.7.7-2

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）。ベンラリズマブの結合は、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。

本試験で観察されたヒト組織交差反応性は、ヒト組織では IL-5R の分布が極めて限られているとする文献報告と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）。本試験では内因性ミエロペルオキシダーゼによるバックグラウンド染色のため、IL-5R を発現している末梢血又は骨髄好酸球に対する F-ベンラリズマブの反応性を確認することはできなかった。F-ベンラリズマブの末梢血又は骨髄好酸球に対する染色性は、陰性対照抗体染色標本又は一次抗体を除いた陰性対照標本と比べ同程度であった。

なお、予想外に認められた F-ベンラリズマブ のヒトの横紋筋（骨格筋）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。

2.6.6.8.3 免疫毒性

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（2.6.6.6参照）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。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。

2.6.6.9 考察及び結論

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ベンラリズマブが好酸球の IL-5Rα と結合することにより惹起される増強した ADCC 活性を介するアポトーシスにより好酸球を除去することである。ベンラリズマブはヒト及びカニクイザルの好酸球と同程度の親和性で結合するが、マウスの IL-5Rα には結合しない。ヒト好酸球に対するベンラリズマブにより増強された ADCC 活性は好酸球のアポトーシスに介在している。アポトーシスを起こした好酸球は好酸球顆粒タンパクを放出しないため、炎症反応には影響を与えない。カニクイザルを用いたモデルにおいてベンラリズマブは IL-5 誘発好酸球増加を効果的に抑制した。更に、カニクイザル喘息モデルにおいてベンラリズマブを投与することによって肺の好酸球を劇的に減少させた。ヒト及びカニクイザルの組織交差反応性が極めて類似した特徴を示すことは、カニクイザルがベンラリズマブの安全性評価に適切な動物種であることを更に支持するものであった。したがって、カニクイザルをベンラリズマブの非臨床安全性評価に適切なモデルとして選択した。

ベンラリズマブの静脈内及び皮下投与によるカニクイザルを用いた非臨床安全性試験を 5 試験実施した。これらは 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 ヵ月間反復静脈内及び皮下投与試験並びに ePPND 試験（Stewart, 2009）である。投与期間及び回復期間を通じてベンラリズマブを投与した動物において予想どおり好酸球数が明らかに減少した。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（雄 1 例及び雌 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、NOAEL は 30 mg/kg と判断した。15 週間反復皮下投与試験では、ベンラリズマブに関連した異常所見は認められず、NOAEL は最高用量である 30 mg/kg であった。9 ヵ月間反復静脈内及び皮下投与試験では、雌雄の生殖器系検査項目を含め、ベンラリズマブ投与に起因した異常所見は観察されず、NOAEL は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、母動物に対するベンラリズマブの影響は認められず、出生児は免疫系の評価（KLH 免疫法による抗 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、異常は認められなかった。したがってベンラリズマブの生殖発生毒性試験における NOAEL は、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。ウサギを用いてベンラリズマブを皮下投与した局所刺激性試験では、ベンラリズマブ投与に関連した異常所見は観察されなかった。最後にベンラリズマブの組織交差反応性を正常ヒト及びカニクイザルの組織パネルを用いて評価した。ヒト及びカニクイザルの組織交差反応性の特徴はほぼ同様であり、ヒト組織において IL-5R の分布が極めて限局的であるとする文献報告と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）。更に非臨床安全性試験ではベンラリズマブの組織交差反応性が認められた器官／組織に異常所見は観察されなかった。

これらベンラリズマブの非臨床安全性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、非臨床安全性試験における NOAEL 及び 8 週間に 1 回 30 mg を皮下投与する最大推奨臨床用量（MRHD）の曝露には、十分な安全域を確保できている（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）。

2.6.6.10 図表

本章のすべての図表は本文中に記載した。

2.6.6.11 参考文献

Bichi et al, 2002

Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(10):6955-60.

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.

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.

Hardy, 2006
Hardy RR. B-1 B cell development. J Immunol. 2006;177(5):2749-54.

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.

Hogan, 2007
Hogan SP. Recent advances in eosinophil biology. Int Arch Allergy Immunol. 2007;143(Suppl 1):3-14.

Humbles et al, 2011
Humbles AA, Gossage D, Raible D, Damschroder MM, Koike M, Kolbeck R, et al. Benralizumab, a humanized anti-interleukin 5 receptor-alpha monoclonal antibody, with enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity function, in development for the treatment of asthma. 7th Biennial Symposium of the International Eosinophil Society, Inc.; June 21-25, 2011; Québec City, Canada.

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 Moraxells 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.

Ishida et al, 2006
Ishida D, Su L, Tamura A, Katayama Y, Kawai Y, Wang SF, et al. Rap1 signal controls B cell receptor repertoire and generation of self-reactive B1a cells. Immunity. 2006;24(4):417-27.

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.

Kasaian and Casali, 1993
Kasaian MT, Casali P. Autoimmunity-prone B-1 (CD5 B) cells, natural antibodies and self recognition. Autoimmunity. 1993;15(4):315-29.

Keresztes et al, 2007
Keresztes K, Szollosi Z, Simon Z, Tarkanyi I, Nemes Z, Illes A. Retrospective analysis of the prognostic role of tissue eosinophil and mast cells in Hodgkin's lymphoma. Pathol Oncol Res. 2007;13(3):237-42.

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.

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, 2012a
Lee SJ, Lee EJ, Kim SK, Jeong P, Cho YH, Yun SJ, et al. Identification of pro-inflammatory cytokines associated with muscle invasive bladder cancer; the roles of IL-5, IL-20, and IL-28A. PLoS One. 2012;7(9):e40267.

Lee et al, 2012b
Lee EJ, Park SS, Kim WJ, Moon SK. IL-5-induced migration via ERK1/2-mediated MMP-9 expression by inducing activation of NF-kappaB in HT1376 cells. Oncol Rep. 2012;28(3):1084-90.

Lee et al, 2013
Lee EJ, Lee SJ, Kim S, Cho SC, Choi YH, Kim WJ. Interleukin-5 enhances the migration and invasion of bladder cancer cells via ERK1/2-mediated MMP-9/NF-kappaB/AP-1 pathway: involvement of the P21WAF1 expression. Cell Signal. 2013;25(10):2025-38.

Lowe et al, 1981
Lowe D, Jorizzo J, Hutt MS. Tumour-associated eosinophilia: a review. J Clin Pathol. 1981;34(12):1343-8.

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.

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.

Nimmerjahn and Ravetch, 2006
Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors: old friends and new family members. Immunity. 2006;24(1):19-28.

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(19):10509-13.

Pierce et al, 1998
Pierce A, Whetton AD, Owen-Lynch PJ, Tavernier J, Spooncer E, Dexter TM, et al. Ectopic interleukin-5 receptor expression promotes proliferation without development in a multipotent hematopoietic cell line. J Cell Sci. 1998;111(Pt 6):815-23.

Samoszuk, 1997
Samoszuk M. Eosinophils and human cancer. Histol Histopathol. 1997;12(3):807-12.

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 oligosaccharide shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. J Biol Chem. 2003;278(5):3466-73.

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.

Weinbauer et al, 2012
Weinbauer GF, Chellman GJ, Rasmussen AD, Vogelwedde E. Use of primate pediatric model. In: Hoberman AM, Lewis EM, eds. Pediatric Nonclinical Drug Testing: Principles, Requirements, and Practices, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2012;255-79.

Widhopf et al, 2004
Widhopf GF 2nd, Brinson DC, Kipps TJ, Tighe H. Transgenic expression of a human polyreactive Ig expressed in chronic lymphocytic leukemia generates memory-type B cells that respond to nonspecific immune activation. J Immunol. 2004;172(4):2092-9.

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.

Yu et al, 2002
Yu C, Cantor AB, Yang H, Browne C, Wells RA, Fujiwara Y, et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. J Exp Med. 2002;195(11):1387-95.

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

2.6.7　毒性試験概要表

アストラゼネカ株式会社

CONFIDENTIAL

目次

目次 2
2.6.7 毒性試験概要表 3
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス 試験の一覧表 5
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス 試験成績の一覧 6
2.6.7.4 毒性試験：使用ロット 7
2.6.7.5 単回投与毒性試験 8
2.6.7.6 反復投与毒性試験 –重要な試験以外の試験 9
2.6.7.7 反復投与毒性試験 10
2.6.7.8 遺伝毒性試験 24
2.6.7.9 がん原性試験 25
2.6.7.10 生殖発生毒性試験 –重要な試験以外の試験 26
2.6.7.11 生殖発生毒性試験 -受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 27
2.6.7.12 生殖発生毒性試験 –胚・胎児発生に関する試験 28
2.6.7.13 生殖発生毒性試験 – 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 29
2.6.7.14 幼若動物を用いた試験 34
2.6.7.15 局所刺激性試験 35
2.6.7.16 その他の毒性試験 36
2.6.7.17 参考文献 37

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

Table 2.6.7.1-1 Overview of Nonclinical Toxicology Studies of Benralizumab

Type of Study	Study Number	Species/ Strain	ROA	Test Article	Number of Doses	Dose and Number per Gender (mg/kg [a])	GLP Compliance	Testing Facility	資料番号
Single-dose toxicity	[redacted].263.02	Cynomolgus monkey	SC	Benralizumab	Single dose on Day 1	30: 3M	No	[redacted], USA	4.2.3.1-1
Repeat-dose toxicity	[redacted].112.01	Cynomolgus monkey	IV	Benralizumab	Every 3 weeks for 9 weeks on Days 1, 22, 43, and 64	0: 5F/5M 0.1: 2F/2M 1.0: 3F/3M 10: 2F/2M 30: 5F/5M	Yes	[redacted], USA	4.2.3.2-1
	[redacted].263.04	Cynomolgus monkey	SC	Benralizumab	Every other week for 15 weeks for a total of 8 doses	0: 6F/6M 1.0: 6F/6M 10: 6F/6M 30: 6F/6M	Yes	[redacted], USA	4.2.3.2-2
	AAO00095	Cynomolgus monkey (sexually mature)	IV/SC	Benralizumab	Every other week for 39 weeks for a total of 20 doses	IV 0: 6F/6M 10: 6F/6M 25: 6F/6M SC 0: 6F/6M 30: 6F/6M	Yes	[redacted], USA	4.2.3.2-3
Genotoxicity	In accordance with ICH guidance ICH S6 (R1), 2011, no genotoxicity studies were performed (see Section 2.6.7.8).								
Carcinogenicity	No carcinogenicity studies were conducted (see Section 2.6.7.9 for more details)								

Table 2.6.7.1-1 Overview of Nonclinical Toxicology Studies of Benralizumab (Continued)

Type of Study	Study Number	Species/ Strain	ROA	Test Article	Number of Doses	Dose and Number per Gender (mg/kg [a])	GLP Compliance	Testing Facility	資料番号
Reproductive and developmental toxicity	AAO00036	Cynomolgus monkey	IV	Benralizumab	GD20-22, GD35, and every 14 days through gestation and 1-month postpartum for maximum of 14 doses	0: 14F 10: 14F <u>30</u>: 14F	Yes	[redacted], USA	4.2.3.5.3-1
Local tolerance	517668	New Zealand White rabbits	SC	Benralizumab (lyophilized formulation)	Single dose on Study Day 1	50 mg/injection (1 mL): 6M	Yes	[redacted], Scotland	4.2.3.6-1
Other toxicity studies (TCR)	IM1232	Cynomolgus monkey	NA	Benralizumab (FITC-labeled)	NA	1 and 10 µg/mL	Yes	[redacted], US	4.2.3.7.7-1
	IM1231	Human	NA	Benralizumab (FITC-labeled)	NA	1 and 10 µg/mL	Yes	[redacted], US	4.2.3.7.7-2

F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; NA = not applicable; ROA = route of administration; SC = subcutaneous; TCR = tissue cross-reactivity.
a: Unless otherwise specified, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) is underlined.

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス 試験の一覧表

Table 2.6.7.2-1 Toxicokinetic Studies of Benralizumab

Type of Study	Study Number	Test System	ROA	Dose (mg/kg)	GLP Compliance	資料番号
Single-dose toxicity	[redacted].263.02	Cynomolgus monkey	SC	30 mg/kg	No	4.2.3.1-1
Repeat-dose toxicity	[redacted].112.01		IV	0.1, 1, 10, and 30 mg/kg IV on Days 1, 22, 43, and 64	Yes	4.2.3.2-1
	[redacted].263.04		SC	1, 10, and 30 mg/kg SC every other week for 15 weeks for a total of 8 doses		4.2.3.2-2
	AAO00095		IV/SC	10 and 25 mg/kg IV and 30 mg/kg SC every other week for 39 weeks for a total of 20 doses		4.2.3.2-3
Reproductive and developmental toxicity	AAO00036		IV	10 and 30 mg/kg IV GD20-22, GD35, and every 14 days through gestation and 1-month postpartum for maximum of 14 doses		4.2.3.5.3-1

GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; ROA = route of administration; SC=subcutaneous
Note: Toxicokinetic (TK) evaluations were conducted as a component of the toxicology studies with benralizumab.

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス 試験成績の一覧

トキシコキネティクスの試験成績は、個別の毒性試験の表中に記述した。

2.6.7.4 毒性試験：使用ロット

Table 2.6.7.4-1 Benralizumab: Test Article Information by Study

Test Article Lot Number	Bulk Drug Substance Lot Number	Purity (% Monomer) [a]	Specified Impurities	Study Number	Type of Study
DF3859:005	05006791[e]	98.4%	NA	[redacted].263.02	Single-dose toxicity
05-001191-27Sep05	050170119	98.38% , 98.34%, and 99.36% [b]	NA	[redacted].112.01	Repeat-dose toxicity
TL3594-90L (1 mg/mL) TL3594-90M (10 mg/mL) TL3594-90H (30 mg/mL)	05006791[e]	99.1% 98.3% 98.2%	NA	[redacted].263.04	
NDL4517.042 (2 mg/mL) CNF5186.48 (2 mg/mL) NDL4517.042 (5 mg/mL) CNF5186.49 (5 mg/mL) NDL4517.042 (30 mg/mL)	08BG12-B	99.3% 99.1% 99.3% 99.2% 99.3%	NA	AAO00095	
KP4277.154 (6.4 mg/mL for 10 mg/kg/dose) KP4277.155 (16.2 mg/mL for 30 mg/kg/dose)	NDL4517.015	99.7% 99.6%	NA	AAO00036	Reproductive and developmental toxicity
09C11-117[c]	08BG12-2	99.4%	NA	517668	Local tolerance
PR051005D (1.4 mg/mL) [d]	05-000235[e]	NA	NA	IM1232	Cynomolgus monkey TCR
PR051005D (1.4 mg/mL) [d]	05-000235[e]	NA	NA	IM1231	Human TCR

NA = not applicable; TCR = tissue cross-reactivity
a: As measured by High Pressure Size Exclusion Chromatography (HPSEC)
b: Values from mid-point stability timepoints and endpoint stability timepoint
c: Lyophilized drug product
d: FITC-conjugated benralizumab
e: early BioWa lot number

2.6.7.5 単回投与毒性試験

資料番号：4.2.3.1-1

Table 2.6.7.5-1 Benralizumab: Single-dose SC Study in Male Cynomolgus Monkeys with a 3-Week Follow-Up (Study Number [redacted].263.02; Non-GLP)

Species: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing**: Single 30 mg/kg SC dose on Study Day 1	**Study Number:** [redacted].263.02
Initial Age: Males were 4 to 6 years old	**Duration of Postdose**: Animals were followed until Day 22. All study animals were returned to the stock colony following the completion of the in-life portion of this study.	**GLP Compliance**: No
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration**: Single SC injection; dose volume of 0.49 mL/kg	
No-Observed-Adverse-Effect-Level: Not determined	**Vehicle/Formulation**: 10 mmol/L histidine, 300 mmol/L glycine, 0.02% polysorbate-20, pH 6.0	
Parameters Evaluated: Mortality, clinical observations, body weights, urinalysis, and hematology. Blood samples were collected for toxicokinetic, and immunogenicity evaluations.		
Noteworthy Findings: There was no control group comparator. Hematology analysis showed that absolute eosinophil counts for all animals were decreased from baseline by Day 3 and generally further decreased by Day 10, consistent with an anticipated pharmacological effect.		
Dose (mg/kg)	30	
Number of Animals	M: 3	
Toxicokinetics [Mean (SD)]		
CL/F (mL/kg/d)	8.37 (1.04)	
$t_{1/2}$ (d)	9.73 (2.90)	
C_{max} (µg/mL)	213 (20.8)	
AUC_{0-t} (µg·d/mL)	2,750 (108)	
Eosinophils Absolute [10^3/µL; Mean (SD)]		
Pre-dose	0.15 (0.07)	
Day 3	0.04 (0.02)	
Day 10	0.01 (0.01)	

AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable time point; $t_{1/2}$ = terminal elimination half-life; CL/F = apparent clearance after extravascular administration; C_{max} = maximal observed concentration; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; SC = subcutaneous; SD = standard deviation. TK parameters were rounded to 3 significant figures after calculations were performed.

2.6.7.6 反復投与毒性試験 –重要な試験以外の試験

該当する試験は実施していない。

2.6.7.7 反復投与毒性試験

資料番号：4.2.3.2-1

Table 2.6.7.7-1 Benralizumab: Repeat-dose IV Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with an 18-day Recovery Period (Study [redacted].112.01; GLP)

Species: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing**: Every 3 weeks for 9 weeks on Days 1, 22, 43, and 64. Dose levels were 0.1, 1, 10, and 30 mg/kg IV	**Study Number**: [redacted].112.01
Initial Age: 2 to 9 years old	**Duration of Postdose**: Main study necropsy was on Day 67. Recovery phase animals were followed an additional 18 days following completion of dosing (Day 85).	**GLP Compliance**: Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration**: Bolus intravenous injection; dose volume of 0.02 to 6.0 mL/kg depending on the dose group	
No-Observed-Adverse-Effect-Level: 30 mg/kg; the neutrophil count decrease in 2 of 10 animals in the 30 mg/kg group was mild and temporarily observed.	**Vehicle/Formulation**: 10 mmol/L citrate buffer, 150 mmol/L NaCl, 0.02% polysorbate-80, pH6.0	
Parameters Evaluated: Clinical observations, food consumption, body weights, physical examinations, blood pressure, electrocardiography, respiratory rate, ophthalmology, urinalysis, hematology, coagulation, serum chemistry, flow cytometry of peripheral blood lymphocyte subsets, TK, anti-test article immune response, and blood gases. Postmortem examinations included gross pathology, histopathology, and organ weight changes.		
Noteworthy Findings: The eosinophil depletion observed for peripheral blood eosinophil counts and at histopathology examination (including bone marrow smear examination) was considered to result from the main pharmacological action of benralizumab. Peripheral blood eosinophil counts were markedly decreased in males and females of benralizumab treatment groups throughout the dosing and recovery periods. In addition to the marked decreases observed in eosinophil counts, transient decreases in leukocytes, resulting from differential decreases in neutrophil counts, were also seen in one 30 mg/kg male, and in one 30 mg/kg female, on both Day 25 and Day 46. In the histopathology examination, no or decreased eosinophils in the bone marrow (sternum and femur) were observed in all test-article treated animals from terminal and recovery necropsies with the exception of the 30 mg/kg female with a detectable ADA response to benralizumab. Eosinophils (infiltration) were observed sporadically in the lymph nodes, thymus or rectum of terminal animals from Group 1 (control), and in the 30 mg/kg female with a detectable ADA response. In the quantitative bone marrow smear examination, for all animals, numbers of precursors of the megakaryocytic, myeloid (other than eosinophilic), and erythroid series appeared to be within normal limits. Eosinophilic precursors were absent or dramatically decreased in marrows of nearly all benralizumab-treated animals. No effect on the granulocytic stem cells (myeloblast and promyelocyte stages) was noted. No other signs of benralizumab treatment were observed in any of the other in-life or postmortem examinations and assessments of the study.		

ADA = anti-drug antibody; IV = intravenous; TK = toxicokinetics

Table 2.6.7.7-1 Benralizumab: Repeat-dose IV Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with an 18-day Recovery Period (Study [redacted].112.01; GLP) (Continued)

Dose 3 (Day 43) Toxicokinetic Parameters [Mean (SD)]							
Dose (mg/kg)	**0.1**		**1**		**10**		**30**
CL (mL/kg/d)	3.84 (0.960)		4.32 (0.720)		4.08 (0.480)		6.48 (5.28)
$t_{1/2}$ (d)	10.8 (4.75)		12.8 (1.40)		12.1 (3.69)		18.6 (9.83)
C_{max} (µg/mL)	3.10 (0.50)		38.8 (3.97)		380 (40.8)		934 (86.4)
$AUC_{0\text{-}21d}$ (µg·d/mL)	21.8 (13.7)		234 (44.4)		2,450 (281)		5,760 (1,760)
Hematology Parameters [Mean (SD, N)]							
Eosinophils Absolute (10^3/µL) – Males							
Dose (mg/kg)	**Pre-dose 1**	**Pre-dose 2**	**Day 4**	**Day 25**	**Day 46**	**Day 64**	**Day 78**
0 (Control)	0.28 (0.15, 5)	0.25 (0.1, 5)	0.33 (0.18, 5)	0.32 (0.15, 5)	0.36 (0.13, 5)	0.31 (0.15, 5)	0.21 (0.11, 2)
0.1	0.07 (0.08, 2)	0.09 (0.11, 2)	0.01 (0.00, 2)	0.00 (0.00, 2)	0.00 (0.00, 2)	0.00 (0.00, 2)	NA
1	0.12 (0.14, 3)	0.19 (0.13, 3)	0.00 (0.00, 3)	0.00 (0.00, 3)	0.00 (0.00, 3)	0.00 (0.00, 3)	NA
10	0.19 (0.13, 2)	0.25 (0.26, 2)	0.10 (0.12, 2)	0.00 (0.00, 2)	0.01 (0.01, 2)	0.00 (0.00, 2)	NA
30	0.1 (0.09, 5)	0.11 (0.08, 5)	0.02 (0.02, 5)	0.00 (0.00, 5)	0.00 (0.00, 5)	0.00 (0.00, 5)	0.00 (0.00, 2)
Eosinophils Absolute (10^3/µL) – Females							
Dose (mg/kg)	**Pre-dose 1**	**Pre-dose 2**	**Day 4**	**Day 25**	**Day 46**	**Day 64**	**Day 78**
0 (Control)	0.13 (0.07, 5)	0.11 (0.03, 5)	0.14 (0.12, 5)	0.16 (0.15, 5)	0.19 (0.09, 4)	0.12 (0.08, 5)	0.06 (0.04, 2)
0.1	0.24 (0.23, 2)	0.35 (0.09, 2)	0.06 (0.08, 2)	0.00 (0.00, 2)	0.00 (0.00, 2)	0.01 (0.01, 2)	NA
1	0.42 (0.24, 3)	0.30 (0.15, 3)	0.00 (0.01, 3)	0.00 (0.00, 3)	0.01 (0.01, 3)	0.00 (0.01, 3)	NA
10	0.66 (0.80, 2)	0.39 (0.41, 2)	0.01 (0.01, 2)	0.00 (0.00, 2)	0.00 (0.00, 2)	0.00 (0.00, 2)	NA
30	0.35 (0.22, 5)	0.30 (0.20, 5)	0.10 (0.09, 5)	0.00 (0.00, 5)	0.01 (0.02, 5)	0.02 (0.05, 5)	0.00 (0.00, 2)

$AUC_{0\text{-}21d}$ = area under the concentration-time curve from time 0 through day 21; CL = systemic clearance; C_{max} = maximal observed concentration; GLP = Good Laboratory Practice; N = number of animals; NA = not applicable; SD = standard deviation; $t_{1/2}$ = terminal elimination half-life

TK parameters were rounded to 3 significant figures after calculations were performed.

Table 2.6.7.7-1 Benralizumab: Repeat-dose IV Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with an 18-day Recovery Period (Study [redacted].112.01; GLP) (Continued)

Hematology Parameters [Mean (SD, N)]							
Lymphocytes Absolute (10^3/µL) – Males							
Dose (mg/kg)	**Pre-dose 1**	**Pre-dose 2**	**Day 4**	**Day 25**	**Day 46**	**Day 64**	**Day 78**
0 (Control)	6.1 (1.11, 5)	5.69 (1.45, 5)	6.21 (1.24, 5)	5.98 (0.61, 5)	5.17 (0.61, 5)	4.91 (0.88, 5)	4.92 (1.03, 2)
0.1	3.88 (0.46, 2)	3.96 (1.44, 2)	4.32 (0.98, 2)	4.39 (0.89, 2)	4.28 (1.68, 2)	3.1 (0.93, 2)	NA
1	5.88 (1.96, 3)	5.69 (0.73, 3)	4.66 (0.26, 3)	4.4 (0.9, 3)	4.47 (0.21, 3)	3.69 (1.38, 3)	NA
10	6.87 (1.17, 2)	5.26 (0.27, 2)	4.34 (0.03, 2)	5.94 (1.53, 2)	4.86 (2.32, 2)	6.82 (2.44, 2)	NA
30	5.44 (2.26, 5)	4.89 (2.3, 5)	5.23 (3.69, 5)	4.59 (2.43, 5)	4.95 (2.27, 5)	4.52 (2.82, 5)	7.19 (2.01, 2)
Lymphocytes Absolute (10^3/µL) – Females							
Dose (mg/kg)	**Pre-dose 1**	**Pre-dose 2**	**Day 4**	**Day 25**	**Day 46**	**Day 64**	**Day 78**
0 (Control)	4.91 (0.95, 5)	4.62 (1.28, 5)	5.66 (1.77, 5)	4.07 (0.87, 5)	4.78 (0.9, 4)	3.15 (0.27, 5)	5.64 (0.46, 2)
0.1	5.63 (2.81, 2)	7.06 (0.13, 2)	6.43 (1.75, 2)	6.46 (0.88, 2)	6.5 (0.93, 2)	4.37 (0.26, 2)	NA
1	7.41 (2.09, 3)	5.4 (1.18, 3)	5.9 (2.17, 3)	5.52 (2.31, 3)	5.16 (1.69, 3)	4.39 (1.85, 3)	NA
10	7.99 (6.48, 2)	4.27 (1.9, 2)	4.36 (2.2, 2)	6.11 (4.14, 2)	3.79 (1.32, 2)	2.69 (0.37, 2)	NA
30	6.38 (1.87, 5)	5.29 (2.2, 5)	4.33 (0.55, 5)	6.27 (2.54, 5)	4.06 (0.53, 5)	3.52 (1.06, 5)	6.35 (2.73 , 2)

GLP = Good Laboratory Practice; N = number of animals; NA = not applicable; SD = standard deviation

Table 2.6.7.7-1 Benralizumab: Repeat-dose IV Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with an 18-day Recovery Period (Study [redacted].112.01; GLP) (Continued)

Hematology Parameters [Mean (SD, N)]							
Neutrophils Absolute (10^3/µL) – Males							
Dose (mg/kg)	**Pre-dose 1**	**Pre-dose 2**	**Day 4**	**Day 25**	**Day 46**	**Day 64**	**Day 78**
0 (Control)	5.85 (1.72, 5)	6.67 (2.91, 5)	5.07 (2.27, 5)	5.83 (2.21, 5)	5.57 (1.43, 5)	10.69 (2.96, 5)	5.48 (1.44, 2)
0.1	4.25 (2.94, 2)	4.61 (3.42, 2)	3.4 (2.64, 2)	3.34 (1.03, 2)	5.84 (4.51, 2)	13.39 (3.13, 2)	NA
1	4.65 (1.47, 3)	4.78 (1.18, 3)	4.86 (0.85, 3)	4.84 (1.01, 3)	4.92 (1.61, 3)	10.76 (2.87, 3)	NA
10	4.01 (0.59, 2)	3.52 (0.58, 2)	3.95 (2.35, 2)	6.23 (0.94, 2)	3.7 (1.07, 2)	3.94 (0.19, 2)	NA
30	5.56 (1.81, 5)	6.77 (2.34, 5)	7.31 (2.39, 5)	2.77 (2.04, 5)	4.31 (2.81, 5)	7.16 (1.88, 5)	6.64 (2.55, 2)
Neutrophils Absolute (10^3/µL) – Females							
Dose (mg/kg)	**Pre-dose 1**	**Pre-dose 2**	**Day 4**	**Day 25**	**Day 46**	**Day 64**	**Day 78**
0 (Control)	4.13 (1.89, 5)	3.93 (1.61, 5)	3.44 (1.29, 5)	4.37 (1.49, 5)	5.86 (1.08, 4)	10.42 (3.2, 5)	3.57 (0.33, 2)
0.1	3.09 (0.08, 2)	4.08 (0.78, 2)	3.92 (0.98, 2)	3.37 (0.07, 2)	3.32 (0.47, 2)	7.37 (1.88, 2)	NA
1	4.12 (1.57, 3)	5.46 (2.17, 3)	4.07 (1.66, 3)	4.56 (0.55, 3)	3.72 (1.19, 3)	7.17 (1.94, 3)	NA
10	2.51 (0.9, 2)	6.73 (1.46, 2)	7.61 (0.94, 2)	6.42 (3.71, 2)	3.51 (1.49, 2)	6.37 (4.09, 2)	NA
30	4.83 (0.44, 5)	5.91 (1.38, 5)	4.7 (1.48, 5)	3.54 (2.05, 5)	4.94 (3.79, 5)	6.38 (2.5, 5)	1.92 (0.57, 2)

GLP = Good Laboratory Practice; N = number of animals; NA = not applicable; SD = standard deviation

Table 2.6.7.7-1 Benralizumab: Repeat-dose IV Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with an 18-day Recovery Period (Study [redacted].112.01; GLP) (Continued)

Eosinophils in Bone Marrow (Sternum)													
Necropsy Interval, Sex	**0 mg/kg**			**0.1 mg/kg**		**1 mg/kg**			**10 mg/kg**		**30 mg/kg**		
Terminal, Males													
Animal No.	2	4	6	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
No. w/decreased eosionphil	−	−	−	P	−	P	P	P	P	P	P	P	P
Terminal, Females													
Animal No.	1	3	5	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29
No. w/decreased eosionphil	−	−	−	P	P	P	P	P	P	P	−	P	P
Recovery, Males													
Animal No.	8	10		NA		NA			NA	32	34		
No. w/decreased eosionphil	−	−								P	P		
Recovery, Females													
Animal No.	7	9		NA		NA			NA	31	33		
No. w/decreased eosionphil	−	−								P	P		

− = No abnormal changes; NA = not applicable. No. = number; P = Non-graded change

Table 2.6.7.7-1 Benralizumab: Repeat-dose IV Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with an 18-day Recovery Period (Study [redacted].112.01; GLP) (Continued)

Quantitative Evaluation of Bone Marrow Smear [a], Group Mean (n)					
Necropsy Interval, Sex	**0 mg/kg**	**0.1 mg/kg**	**1 mg/kg**	**10 mg/kg**	**30 mg/kg**
Terminal Necropsy, Males					
Eosinophilic Myelocyte	1.00 (3)	1.50 (2)	0.00 (3)	0.50 (2)	0.00 (3)
Eosinophilic Metamyelocyte	2.67 (3)	1.50 (2)	0.00 (3)	0.00 (2)	0.00 (3)
Eosinophilic Band	3.67 (3)	1.00 (2)	0.00 (3)	0.00 (2)	0.00 (3)
Segmented Eosinophil	5.33 (3)	1.00 (2)	0.00 (3)	0.00 (2)	0.00 (3)
Terminal Necropsy, Females					
Eosinophilic Myelocyte	1.00 (3)	0.00 (2)	0.33 (3)	0.00 (2)	0.00 (3)
Eosinophilic Metamyelocyte	1.00 (3)	0.00 (2)	0.00 (3)	0.00 (2)	0.00 (3)
Eosinophilic Band	2.33 (3)	0.00 (2)	0.00 (3)	0.00 (2)	1.00 (3)
Segmented Eosinophil	7.0 (3)	0.00 (2)	0.00 (3)	0.00 (2)	0.67 (3)
Recovery Necropsy, Males					
Eosinophilic Myelocyte	2.00 (2)	NA	NA	NA	0.00 (2)
Eosinophilic Metamyelocyte	0.50 (2)	NA	NA	NA	0.00 (2)
Eosinophilic Band	3.00 (2)	NA	NA	NA	0.00 (2)
Segmented Eosinophil	7.50 (2)	NA	NA	NA	0.50 (2)
Recovery Necropsy, Females					
Eosinophilic Myelocyte	1.00 (2)	NA	NA	NA	0.00 (2)
Eosinophilic Metamyelocyte	0.50 (2)	NA	NA	NA	0.00 (2)
Eosinophilic Band	3.50 (2)	NA	NA	NA	0.00 (2)
Segmented Eosinophil	3.50 (2)	NA	NA	NA	0.00 (2)

a : Values are number/500 cells.
NA = not applicable; n = number of animals

資料番号：4.2.3.2-2

Table 2.6.7.7-2 Benralizumab: A 15-week Repeat-dose SC Toxicity Study of Benralizumab in Cynomolgus Monkeys with a 12-week Recovery Period (Study [redacted].263.04; GLP)

Species: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing**: SC injection once every other week for 15 weeks for a total of 8 doses. Dose levels were 1, 10, and 30 mg/kg SC	**Study Number**: [redacted].263.04
Initial Age: 3 to 5 years old	**Duration of Postdose**: Main study necropsy was on Day 101. Recovery phase animals were followed an additional 12 weeks following completion of dosing (Day 183).	**GLP Compliance**: Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration**: Bolus subcutaneous injection; dose volume of 1.0 mL/kg	
No-Observed-Adverse-Effect-Level: 30 mg/kg (the highest dose tested)	**Vehicle/Formulation**: 10 mmol/L histidine with 300 mmol/L glycine and 0.02% polysorbate 20 at pH 6.0	

Parameters Evaluated: Clinical observations, dermal Draize scoring of injection sites, food consumption, body weights, ophthalmologic effects, electrocardiographic effects, blood pressure, clinical pathology (hematology, coagulation, clinical chemistry, and urinalysis), organ weights, and macroscopic and microscopic pathology. Blood samples were collected for toxicokinetic evaluation and anti-drug antibody (immunogenicity) analyses.

Noteworthy Findings: No mortalities occurred during the 15-week toxicology study, and there were no definitive benralizumab-related changes in clinical observations, dermal scoring of injection sites, food consumption, body weights, ophthalmology, electrocardiograms, blood pressure, clinical pathology (hematology, coagulation, clinical chemistry, and urinalysis), organ weights or macroscopic and microscopic pathology data from the terminal or recovery necropsy.

Toxicokinetics [Mean (SD)]

Dose (mg/kg)	Dose Number	1	10	30
CL/F (mL/kg/d)	1	4.64 (0.851)	6.07 (1.64)	5.92 (1.57)
	8	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (d)	1	12.5 (2.92)	13.8 (4.44)	16.0 (8.82)
	8	15.7 (3.41)	14.9 (3.97)	15.1 (1.56)
C_{max} (µg/mL)	1	10.5 (1.39)	80.3 (10.7)	247 (74.9)
	8	21.2 (5.61)	151 (30.9)	407 (224)
AUC_{τ} (µg·d/mL) [a]	1	99.3 (11.6)	756 (88.9)	2,220 (474)
	8	222 (66.7)	1,640 (266)	5,090 (1,060)

AUC_{τ} =area under the concentration-time curve within dosing interval τ; CL/F = apparent clearance after extravascular administration; C_{max} = maximal observed concentration; GLP = Good Laboratory Practice; SC = subcutaneous; SD = standard deviation; $t_{1/2}$ = terminal elimination half-life; NA = not applicable; TK parameters were rounded to 3 significant figures after calculations were performed.
a : $AUC_{0\text{-}12d}$ for Day 1 and $AUC_{0\text{-}14d}$ for Day 99

Table 2.6.7.7-2 Benralizumab: A 15-week Repeat-dose SC Toxicity Study of Benralizumab in Cynomolgus Monkeys with a 12-week Recovery Period (Study [redacted].263.04; GLP) (Continued)

Eosinophils Absolute (10^3/µL) [Mean (SD)]						
Dose (mg/kg)	**Day −5 (n = 6)**	**Day 3 (n = 6)**	**Day 28 (n = 6)**	**Day 70 (n = 6)**	**Day 101 (n = 6)**	**Day 183 (n = 3)**
Males						
0 (Control)	0.06 (0.05)	0.13 (0.11)	0.06 (0.05)	0.09 (0.07)	0.09 (0.11)	0.06 (0.07)
1	0.02 (0.01)	0.17 (0.15)	0.01 (0.01)	0.04 (0.04)	0.07 (0.06)	0.07 (0.08)
10	0.02 (0.01)	0.10 (0.06)	0.02 (0.02)	0.05 (0.04)	0.09 (0.09)	0.26 (0.24)
30	0.01 (0.01)	0.09 (0.12)	0.05 (0.12)	0.07 (0.13)	0.10 (0.14)	0.12 (0.21)
Females						
0 (Control)	0.03 (0.02)	0.05 (0.02)	0.05 (0.03)	0.06 (0.03)	0.07 (0.06)	0.06 (0.04)
1	0.03 (0.03)	0.10 (0.12)	0.01 (0.01)	0.02 (0.03)	0.03 (0.04)	0.08 (0.04)
10	0.04 (0.02)	0.30 (0.35)	0.28 (0.54)	0.27 (0.46)	0.38 (0.75)	0.58 (0.77)
30	0.04 (0.06)	0.04 (0.03)	0.00 (0.01)	0.07 (0.11)	0.07 (0.11)	0.07 (0.09)

n = number of animals; SD = standard deviation

資料番号：4.2.3.2-3

Table 2.6.7.7-3 Benralizumab: A 9-month IV and SC Toxicity, TK, and Immunogenicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-week Recovery Period (Study AAO00095; GLP)

Species: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** Every other week for 39 weeks for a total of 20 doses. Dose levels were 10 and 25 mg/kg IV and 30 mg/kg SC	**Study Number**: AAO00095
Initial Age: 6.3 to 12.9 years old males and 4.4 to 6.2 years old females	**Duration of Postdose:** Main study necropsy was on Day 270 (3 days after completion of dosing). Recovery phase animals were followed an additional 12 weeks following completion of dosing (Day 351).	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Intravenous infusion (30 minutes); dose volume of 5.0 mL/kg. Bolus subcutaneous injection; dose volume of 1.0 mL/kg	
No-Observed-Adverse-Effect-Level: 25 mg/kg for IV and 30 mg/kg for SC (the highest doses tested)	**Vehicle/Formulation:** 20 mmol/L histidine, 9% trehalose, 0.004% polysorbate 20 at pH 6.0	
Parameters Evaluated: Clinical observations, infusion/injection site reactions, food consumption, body weights, physical examinations, electrocardiograms, blood pressure, ophthalmic examinations, menses (females), testicular volume/size measurements and sperm evaluation (males), clinical pathology indices, organ weights, and macroscopic and microscopic examinations. Blood samples were also collected for TK evaluation and ADA analysis, male and female hormone analysis, and peripheral blood lymphocyte phenotyping.		
Noteworthy Findings: No benralizumab-related adverse changes occurred after IV infusion and/or SC injection once every 2 weeks for 9 consecutive months in clinical signs, body weights, food consumption, detailed observations, IV infusion or SC injection site reactions, physical examination parameters, electrocardiograms, blood pressure measurements, ophthalmology, clinical pathology indices (serum chemistry, hematology, and coagulation), or peripheral blood lymphocyte subsets. There were no changes in female (menstrual cycle lengths or female reproductive hormone) or male (testicular volume, sperm motility, concentration, count per ejaculate, morphology, or male reproductive hormone patterns) reproductive toxicology parameters. Finally, there were no macroscopic, organ weights, organ weight ratios, or histopathologic alterations that were considered unequivocally related to the test article. Decreased eosinophils (an expected pharmacologic effect of benralizumab) were observed in most benralizumab-dosed animals in the peripheral blood (by Day 63) and bone marrow (Day 270). Decreased eosinophils in the peripheral blood and bone marrow at the end of the dosing phase generally remained low through Day 350 and 351, respectively following the 12-week dose-free recovery period. Animals that demonstrated either no effect or a transient effect during the dosing phase had eosinophil counts comparable to pre-study and/or controls at the completion of the recovery period. One 25 mg/kg IV male was necropsied early on Day 47 due to observed discomfort from progression of a subclinical, likely prestudy, right wrist anomaly not related to the test article. All other animals survived to scheduled necropsy. One 25 mg/kg IV female had a transient adverse reaction after the fourth dose (Day 43) that included petechiae, ecchymosis, decreased platelet count, and indicators of circulating erythrocyte mass. This female recovered after a dosing holiday on Day 57 (dosing resumed on Day 71 until termination for this animal) and demonstrated no further adverse reactions for the remainder of the study and no correlative pathology. Similar findings were not evident for any of the other 25 mg/kg IV animals in this study, or for 30 mg/kg animals in the 9-week repeated-dose IV toxicology study.		

ADA = anti-drug antibody; IV = intravenous; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetic

Table 2.6.7.7-3 Benralizumab: A 9-month IV and SC Toxicity, TK, and Immunogenicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-week Recovery Period (Study AAO00095; GLP) (Continued)

Toxicokinetics [Mean (SD)]				
Dose (mg/kg)	**Dose Number**	**10 mg/kg IV**	**25 mg/kg IV**	**30 mg/kg SC**
CL or CL/F (mL/kg/d)	1	3.94 (0.945)	4.57 (0.593)	6.96 (1.52)
	19	NA	NA	NA
	20	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (d)	1	13.7 (4.23)	12.3 (2.29)	13.4 (4.21)
	19	15.2 (5.33)	10.3 (2.62)	13.7 (8.58)
	20	13.9 (0.857)	15.6 (0.797)	12.5 (0.989)
C_{max} (µg/mL)	1	269 (41.5)	627 (116)	218 (80.9)
	19	287 (77.4)	834 (140)	406 (149)
	20	NA	NA	NA
$AUC_{0\text{-}14d}$ (µg·d/mL)	1	1,430 (146)	3,270 (439)	2,170 (656)
	19	2,320 (700)	6,100 (1,170)	4,110 (1,480)
	20	NA	NA	NA

Table 2.6.7.7-3 Benralizumab: A 9-month IV and SC Toxicity, TK, and Immunogenicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-week Recovery Period (Study AAO00095; GLP) (Continued)

Sampling Interval	Absolute Eosinophils Count (Number per Microliter) [Mean (SD), n]			
	0 (Control), IV/SC	10 mg/kg, IV	25 mg/kg, IV	30 mg/kg, SC
Males				
Predose 1	164.3 (89.8, 6)	92.8 (72.5, 6)	74.7 (42.7, 6)	91.3 (56.7, 6)
Predose 2	191.5 (104.2, 6)	187.3 (89.5, 6)	78.5 (37.9, 6)	94.2 (50.1, 6)
Day 3	133.0 (106.0, 6)	50.0 (66.5, 6)	82.7 (61.5, 6)	85.7 (49.8, 6)
Day 63	206.5 (160.0, 6)	57.7 (137.4, 6)	0.00 (0.00, 5)	24.0 (36.4, 6)
Day 87	130.8 (66.1, 6)	61.8 (151.5, 6)	1.6 (3.6, 5)	15.2 (25.7, 6)
Day 183	244.8 (126.6, 6)	98.7 (187.2, 6)	2.0 (4.5, 5)	34.5 (55.7, 6)
Day 267	304.0 (203.0, 6)	89.8 (122.9, 6)	8.4 (8.4, 5)	26.0 (35.3, 6)
Day 270	128.0 (78.5, 6)	138.7 (286.7, 6)	3.6 (5.0, 5)	32.3 (53.4, 6)
Day 281	282.3 (61.2, 3)	207.3 (359.1, 3)	0.00 (0.00, 2)	40.3 (48.4, 3)
Day 350	271.0 (114.5, 3)	175.0 (296.2, 3)	11.0 (4.2, 2)	94.7 (122.3, 3)
Females				
Predose 1	276.8 (190.3, 6)	98.8 (114.8, 6)	194.8 (323.4, 6)	145.7 (114.9, 6)
Predose 2	308.3 (238.0, 6)	170.2 (203.1, 6)	153.7 (191.6, 6)	109.3 (64.8, 6)
Day 3	169.3 (136.5, 6)	109.3 (65.7, 6)	63.7 (66.9, 6)	73.7 (43.1, 6)
Day 63	206.2 (78.4, 6)	6.0 (7.6, 6)	52.7 (95.0, 6)	10.7 (10.7, 6)
Day 87	267.2 (196.2, 6)	6.5 (8.5, 6)	58.3 (104.7, 6)	5.8 (9.9, 6)
Day 183	270.2 (131.7, 6)	20.7 (18.1, 6)	47.5 (62.5, 6)	18.0 (19.2, 6)
Day 267	278.5 (84.2, 6)	45.3 (40.6, 6)	84.3 (128.9, 6)	40.8 (48.3, 6)
Day 270	154.5 (75.4, 6)	24.7 (24.8, 6)	99.8 (169.4, 6)	23.0 (27.8, 6)
Day 281	189.0 (56.5, 3)	50.0 (14.0, 3)	82.7 (84.0, 3)	8.3 (7.4, 3)
Day 350	199.3 (96.8, 3)	147.3 (83.9, 3)	183.3 (143.0, 3)	15.7 (8.6, 3)

$AUC_{0\text{-}14d}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to 14 days postdose; CL = systemic clearance; CL/F = apparent clearance after extravascular administration; C_{max} = maximal observed concentration; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; n = number of animals; NA = not applicable; SC = subcutaneous; SD = standard deviation; $t_{1/2}$ = terminal elimination half-life; TK = toxicokinetic. TK parameters were rounded to 3 significant figures after calculations were performed.

Table 2.6.7.7-3 Benralizumab: A 9-month IV and SC Toxicity, TK, and Immunogenicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-week Recovery Period (Study AAO00095; GLP) (Continued)

Sampling Interval	Platelet Count (10^3/µL) [Mean (SD), n]			
	0 (Control), IV/SC	10 mg/kg, IV	25 mg/kg, IV	30 mg/kg, SC
Males				
Predose 1	463.0 (105.8, 6)	431.7 (105.8, 6)	411.8 (51.8, 6)	408.7 (47.5, 6)
Predose 2	480.5 (126.3, 6)	484.7 (154.0, 6)	468.7 (25.6, 6)	447.2 (48.3, 6)
Day 3	453.7 (117.9, 6)	445.7 (123.1, 6)	423.2 (37.2, 6)	412.3 (63.6, 6)
Day 63	456.7 (113.9, 6)	433.5 (120.0, 6)	415.4 (39.6, 5)	371.5 (61.9, 6)
Day 87	440.0 (99.1, 6)	434.8 (92.7, 6)	399.6 (51.8, 5)	389.2 (66.2, 6)
Day 183	416.8 (109.1, 6)	452.0 (91.9, 6)	396.0 (60.1, 5)	374.3 (58.9, 6)
Day 267	448.2 (101.9, 6)	492.0 (124.9, 6)	394.6 (74.5, 5)	405.7 (43.8, 6)
Day 270	422.5 (100.6, 6)	484.2 (129.9, 6)	380.6 (59.0, 5)	402.8 (46.2, 6)
Day 281	454.7 (184.0, 3)	416.0 (95.6, 3)	439.5 (70.0, 2)	391.3 (33.8, 3)
Day 350	392.0 (131.7, 3)	381.7 (78.7, 3)	414.5 (31.8, 2)	347.3 (39.1, 3)

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous ; n = number of animals; SC = subcutaneous ; SD = standard deviation; TK = toxicokinetic

Table 2.6.7.7-3 Benralizumab: A 9-month IV and SC Toxicity, TK, and Immunogenicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-week Recovery Period (Study AAO00095; GLP) (Continued)

Sampling Interval	Platelet Count (10^3/μL) [Mean (SD), n]			
	0 (Control), IV/SC	10 mg/kg, IV	25 mg/kg, IV[a]	30 mg/kg, SC
Females				
Predose 1	508.5 (82.9, 6)	463.7 (135.9, 6)	473.5 (66.6, 6)	407.8 (72.7, 6)
Predose 2	516.0 (91.1, 6)	442.3 (81.9, 6)	504.7 (97.5, 6)	436.3 (76.2, 6)
Day 3	470.7 (79.5, 6)	435.8 (101.8, 6)	481.7 (90.8, 6)	423.8 (84.8, 6)
Day 63	493.0 (77.8, 6)	451.7 (120.4, 6)	465.2 (151.2, 6)	408.0 (81.3, 6)
Day 87	489.0 (65.6, 6)	478.7 (117.6, 6)	437.7 (211.5, 6)	420.8 (65.6, 6)
Day 183	517.0 (77.5, 6)	445.2 (138.9, 6)	478.3 (148.3, 6)	402.2 (58.6, 6)
Day 267	497.5 (80.4, 6)	435.3 (145.3, 6)	537.3 (74.0, 6)	412.5 (77.7, 6)
Day 270	486.7 (49.3, 6)	402.8 (114.4, 6)	467.3 (88.6, 6)	397.8 (51.0, 6)
Day 281	503.0 (106.4, 3)	413.7 (104.0, 3)	477.3 (61.6, 3)	351.3 (77.8, 3)
Day 350	434.0 (106.7, 3)	445.3 (179.4, 3)	529.7 (66.3, 3)	367.0 (27.9, 3)

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous ; n = number of animals; SC = subcutaneous; SD = standard deviation; TK = toxicokinetic

a: One 25 mg/kg IV female (Animal 3501) had a transient adverse reaction after the fourth dose (Day 43) that included petechiae, ecchymosis, decreased platelet count, and indicators of circulating erythrocyte mass. This female recovered after a dosing holiday on Day 57 (dosing resumed on Day 71 until termination for this animal) and demonstrated no further adverse reactions for the remainder of the study and no correlative pathology. Individual platelet counts (10^3/μL) for Animal 3501 were as follows:

Predose 1	384
Predose 2	396
Day 3	395
Day 63	169
Day 87	47
Day 183	195
Day 267	443
Day 270	386
Day 281	NA
Day 350	NA

Table 2.6.7.7-3 Benralizumab: A 9-month IV and SC Toxicity, TK, and Immunogenicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-week Recovery Period (Study AAO00095; GLP) (Continued)

Necropsy Interval, Sex	Quantitative Evaluation of Bone Marrow Smear, Group Mean (n)			
	0 (Control), IV/SC	10 mg/kg, IV	25 mg/kg, IV	30 mg/kg, SC
Terminal Necropsy, Males				
Eosinophils % (per myeloid cells counted)	4.6 (3)	2.8 (3)	0.0 (3)	0.3 (3)
Terminal Necropsy, Females				
Eosinophils % (per myeloid cells counted)	8.2 (3)	1.9 (3)	0.0 (3)	3.3 (3)
Recovery Necropsy, Males				
Eosinophils % (per myeloid cells counted)	7.0 (3)	3.0 (3)	0.0 (2)	2.4 (2)
Recovery Necropsy, Females				
Eosinophils % (per myeloid cells counted)	7.8 (3)	3.7 (3)	5.0 (3)	0.0 (3)

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous ; n = number of animals; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetic

2.6.7.8 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モノクローナル抗体であり、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（医薬品規制調和国際会議 [ICH] 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を実施していない。

2.6.7.9 がん原性試験

ベンラリズマブのがん原性試験は実施していない。現在までに、GLP 基準に準拠したカニクイザルを用いた静脈内又は皮下投与による 9 ヵ月までの反復投与毒性試験において、増殖性変化及び前がん病変を示唆する所見は認められなかった。ベンラリズマブはマウスの IL-5Rα に結合しないことから古典的な 2 年間のげっ歯類を用いた生物試験による直接評価は実施しなかった。同様に、マウス及びヒトの IL-5Rα 並びに Fcγ 受容体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、サロゲート抗体又はげっ歯類の遺伝子改変動物を用いたがん原生試験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た。ベンラリズマブのがん原性リスク評価に利用可能な動物モデル及び被験物質の限界を考慮した結果、更なる非臨床動物試験によるリスク評価に意味のある結果を期待できないと考えられた。

2.6.7.10 生殖発生毒性試験 –重要な試験以外の試験

該当する試験は実施していない。

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

カニクイザルを用いた初期胚発生から着床までを評価する生殖発生毒性試験は現実的でないことから（Chellman et al, 2009；Martin et al, 2009）、実施しなかった。代替として、性成熟した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毒性試験を実施し、受胎能を間接的に評価した（Table 2.6.7.7-3）。受胎能の評価として、雌の月経周期、雄の精巣容積／大きさ及び精子検査、器官重量（精巣上体、卵巣、前立腺、精嚢、精巣及び子宮）並びに生殖器系組織（精巣、前立腺、精巣上体、精嚢、卵巣、卵管、子宮、子宮頸管及び腟）の病理組織学的に評価した。その結果、ベンラリズマブ投与に起因した異常所見は観察されなかった。

2.6.7.12 生殖発生毒性試験 –胚・胎児発生に関する試験

ベンラリズマブの胚・胎児発生に関する独立した試験は実施していない。胚・胎児に対するベンラリズマブの影響は出生前及び出生後の発生に関する試験の一部として評価した (2.6.7.13項).

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 – 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

資料番号：4.2.3.5.3-1

Table 2.6.7.13-1 Benralizumab Reproductive and Developmental Toxicity: Maternal, Embryofetal and Neonatal IV Toxicity Study in Pregnant Cynomolgus Monkeys with a 6.5 Month Postnatal Evaluation (Study AAO00036; GLP)

Species: Female cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** IV bolus injection of maternal animals beginning on Gestation Day (GD) 20 to GD22 (dependent on pregnancy determination), on GD35, once every 14 days thereafter through gestation, and 1-month postpartum (maximum 14 doses). Dose levels were 10 and 30 mg/kg IV.	**Study Number:** AAO00036
Initial Age: 4.4 to 9.7 years old	**Duration of Postdose:** Growth and development of infants were evaluated for 6.5 months postnatally (Birth Day (BD) 199 +/− 2 days).	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Bolus intravenous injection; dose volume of 1.6 or 1.9 mL/kg depending on the dose group	
No-Observed-Adverse-Effect-Level: 30 mg/kg (the highest dose tested)	**Vehicle/Formulation:** 20 mmol/L histidine, 9% trehalose, 0.004% polysorbate 20 at pH 6.0	

Parameters Evaluated: For adult females: Clinical signs and changes in food consumption, body weight, pregnancy status, and clinical pathology. Blood samples were also collected for toxicokinetic evaluation and ADA formation analyses. Embryo/fetal parameters included measurements by ultrasound and gestational length.

The day of parturition (determined to be the morning after birth was detected or day of birth if it occurred during the day) was considered post-partum day (PPD) 1 for the mothers and BD1 for the infants. Parameters evaluated for neonates (infants) through BD28 included clinical signs; changes in body weight; infant physical, external, morphometric, muscle tone, neurobehavioral, ophthalmologic, and skeletal examinations/assessments; and changes in peripheral blood lymphocytes, and immunoglobulin levels.

After PPD/BD28, for an additional 5.5 months postpartum/postnatal, the adult females and infants continued to be evaluated for clinical signs and changes in food consumption (adults), body weight, hematology parameters, peripheral blood lymphocytes, immunoglobulin levels, TK and ADA formation. Infants continued to be evaluated for external, morphometric, and ophthalmologic examinations/assessments, in addition to immunological assessment of T-cell dependent antibody response to keyhole limpet hemocyanin. The infants were euthanized on approximately BD199 (± 2 days). A visceral exam and full necropsy was conducted on all infants, including macroscopic tissue examinations. A subset of tissues was weighed, and tissues were collected, preserved, and examined by a study pathologist.

Table 2.6.7.13-1 Benralizumab Reproductive and Developmental Toxicity: Maternal, Embryofetal and Neonatal IV Toxicity Study in Pregnant Cynomolgus Monkeys with a 6.5 Month Postnatal Evaluation (Study AAO00036; GLP) (Continued)

Noteworthy Findings: The only benralizumab-related change consisted of complete or near-complete depletion of peripheral blood eosinophils in the adult females during gestation and through PPD28 postpartum and infants at BD28, an expected pharmacologic effect. Eosinophil counts began to increase incrementally on PPD91, 136, and 180, with a few counts comparable to control by PPD91 and most counts similar to control by PPD180. For all adult females during gestation, there were no other test article-related changes in clinical signs, food consumption, or body weight. There were no benralizumab-related alterations in maternal serum IgM, IgG, IgA, or IgE during gestation or during the postpartum period.

There were no test article-related effects in fetal measurements via ultrasound through gestation for fetuses exposed to benralizumab in utero, nor were there test article-related effects in gestational length. Embryonic losses during major organogenesis (prior to GD50) only occurred once each in the control and 30 mg/kg groups and were not considered test article related. Frequencies of fetal losses during the third trimester of gestation were slightly higher in benralizumab-dosed animals, likely due to complications associated with parturition. The apparently higher rate of third trimester fetal loss in benralizumab-dosed animals was not considered test article-related and there is no known pharmacological effect of benralizumab that would explain a specific causality of third trimester fetal loss. The growth and development of the infants were within normal limits for infant cynomolgus monkeys.

The number of neonatal deaths was consistent with historical control data for cynomolgus monkeys. For infants, there were no test article-related changes in clinical signs, body weight, physical examinations, infant measurements, neurobehavioral assessment, peripheral blood lymphocytes, immunoglobulin levels, or skeletal evaluations. Infants exposed in utero to benralizumab at 10 and 30 mg/kg/dose had similar serum IgM, IgG, and IgA levels to control infants at all time points evaluated. No benralizumab-related changes were observed in anti-KLH IgM and IgG CPT values in infant monkeys exposed in utero to benralizumab at 10 and 30 mg/kg/dose when compared to the control group. The growth and development of infants, regardless of group, were within normal limits for infant cynomolgus monkeys.

Infants exposed in utero to benralizumab at 10 and 30 mg/kg had decreased peripheral blood eosinophil counts in 2 of 7 infants and 6 of 10 infants on BD 28, 8 of 9 infants and 9 of 10 infants on BD 91, and 3 of 8 infants and 6 of 12 infants on BD136, in the 10 and 30 mg/kg exposure groups, respectively. Peripheral blood eosinophil counts had risen to counts comparable to controls by BD180 in all infants except one infant at 30 mg/kg/dose, which remained depleted through BD199 (± 2 days) correlating with histopathologic evidence of depleted bone marrow eosinophils at BD199 (± 2 days) for this animal.

Toxicokinetics Adult Females [Mean (SD)]

	Dose (mg/kg)	**10**	**30**
CL (mL/kg/d)	Dose 1 (GD20-22)	6.42 (2.21)	4.98 (1.68)
	Dose 9 (GD133)	6.07 (1.22)	6.72 (1.78)
$t_{1/2}$ (d)	Dose 1 (GD20-22)	9.71 (2.93)	10.8 (5.51)
	Dose 9 (GD133)	7.92 (1.53)	8.39 (3.80)
C_{max} (µg/mL)	Dose 1 (GD20-22)	222 (39.9)	763 (124)
	Dose 9 (GD133)	273 (45.4)	957 (972)
AUC_{0-14d} (µg·d/mL)	Dose 1 (GD20-22)	1,120 (316)	4,040 (617)
	Dose 9 (GD133)	1,710 (343)	4,760 (1,290)

Table 2.6.7.13-1 Benralizumab Reproductive and Developmental Toxicity: Maternal, Embryofetal and Neonatal IV Toxicity Study in Pregnant Cynomolgus Monkeys with a 6.5 Month Postnatal Evaluation (Study AAO00036; GLP) (Continued)

Toxicokinetics Adult Females and Infants			
	Dose (mg/kg)	**10**	**30**
PPD7	Adult [Mean µg/mL (SD)]	56.3 (29.7)	164 (102)
BD7	Infant [Mean µg/mL (SD)]	37.3 (14.2)	109 (35.4)
PPD28	Adult [Mean µg/mL (SD)]	64.1 (23.2)	195 (84.9)
BD28	Infant [Mean µg/mL (SD)]	14.5 (5.72)	53.4 (29.1)
PPD91	Adult [Mean µg/mL (SD)]	7.20 (4.30)	20.3 (14.2)
BD91	Infant [Mean µg/mL (SD)]	0.749 (0.938)	2.10 (1.59)
PPD180	Adult [Mean µg/mL (SD)]	0.448 (0.383)	1.28 (1.05)
BD180	Infant (Mean µg/mL)	BLQ	0.130

Concentrations for all infants were below the limit of quantitation (BLQ) on BD 199. NA = Not Applicable

Pregnancy Outcome						
Dose Group	**No. of Pregnant Females**	**No. of Infants (Male/Female)**	**No. of Pregnancy Losses (M/F/Unk)**	**Pregnancy Losses**		
				Prior to GD50	**GD50 to GD99 (Fetus M/F/Unk)**	**≥ GD100 [c] (Fetus M/F/Unk)**
0 mg/kg (Control)	15 [a]	5/7	1/0/2	1	0/0/0	1/0/1
10 mg/kg	14	8/3	1/2/0	0	0/0/0	1/2/0
30 mg/kg	21 [b]	8/6	3/2/2	1	0/0/1	3/2/0

a: Includes 1 female that was enrolled onto study to replace early pregnancy losses prior to GD 50.
b: Includes 1 female that was enrolled onto study to replace early pregnancy losses prior to GD 50 and 6 females that were enrolled onto study to ensure adequate group size for data interpretation.
c: Pregnancy losses after GD 100 include abortions (GD 100 to GD 139) and still births (≥ GD 140).

Table 2.6.7.13-1 Benralizumab Reproductive and Developmental Toxicity: Maternal, Embryofetal and Neonatal IV Toxicity Study in Pregnant Cynomolgus Monkeys with a 6.5 Month Postnatal Evaluation (Study AAO00036; GLP) (Continued)

Fetal Losses				
Dose Group	**No. of Pregnant Females**	**Gestation Day of Fetal Losses**	**Overall Percent Loss by Dose Level**	**Third Trimester Percent Loss by Dose Level**
0 mg/kg (Control)	15 [a]	GD46, GD102, and GD162	20.0%	13.3%
10 mg/kg	14	GD140 [c], GD160, and GD171	21.4%	21.4%
30 mg/kg	21 [b]	GD46, GD52, GD138, GD144, GD151[c], GD155, and GD165[c]	33.3%	23.8%

a: Includes 1 female that was enrolled onto study to replace early pregnancy losses prior to GD50.
b: Includes 1 female that was enrolled onto study to replace early pregnancy losses prior to GD50 and 6 females that were enrolled onto study to ensure adequate group size for data interpretation.
c: Stillbirths, resulting from complications associated with delivery (likely breech).

Historical third trimester percent loss at the testing facility was 15.4% (range of 8 studies was 0% to 28.6%).

Infant Losses				
Dose Group	**No. of Pregnant Females**	**Birth Day of Infant Losses**	**Total No. of Infants Affected**	**Causes of Loss**
0 mg/kg (Control)	15 [a]	BD3 BD3	2 of 12 (16.7%)	Rejection by mother Rejection by mother
30 mg/kg	21 [b]	BD3 BD14	2 of 25 (8.0%)	Found dead Mother found dead PPD10. Attempts to cross-foster unsuccessful

a: Includes 1 female that was enrolled onto study to replace early pregnancy losses prior to GD50.
b: Includes 1 female that was enrolled onto study to replace early pregnancy losses prior to GD50 and 6 females that were enrolled onto study to ensure adequate group size for data interpretation.
There were no infant losses at the 10 mg/kg dose level.
Total study incidence of infant loss is 4 of 37 (10.8%). External historical control data ranges from 10% to 12% (Hird et al, 1975; Gardin et al, 1989).

Table 2.6.7.13-1 Benralizumab Reproductive and Developmental Toxicity: Maternal, Embryofetal and Neonatal IV Toxicity Study in Pregnant Cynomolgus Monkeys with a 6.5 Month Postnatal Evaluation (Study AAO00036; GLP) (Continued)

Eosinophils Absolute [No./µL; Mean (Standard Deviation, N)] Adult Females				
Dose Group	**GD20-22**	**GD91**	**PPD7**	**PPD14**
0 mg/kg (Control)	167.1 (149.3, 15)	87.9 (39.2, 14)	95.5 (48.4, 10)	149.6 (60.3, 10)
10 mg/kg	203.6 (291.8, 14)	47.8 (93.1, 14)	13.7 (26.7, 11)	13.0 (23.1, 11)
30 mg/kg	131.8 (90.1, 21)	11.3 (18.6, 19)	2.3 (5.6, 12)	0.7 (2.3, 12)
Dose Group	**PPD28**	**PPD91**	**PPD136**	**PPD180 ± 1**
0 mg/kg (Control)	203.5 (178.1, 10)	243.3 (331.6, 9)	154.2 (74.7, 9)	163.2 (89.8, 9)
10 mg/kg	21.9 (48.0, 11)	55.3 (98.6, 11)	73.2 (144.0, 11)	113.0 (186.0, 11)
30 mg/kg	0.7 (2.3, 12)	20.8 (17.2, 12)	59.4 (58.3, 12)	197.5 (264.3, 12)

Eosinophils Absolute [No. /µL; Mean (Standard Deviation, N)] Infants					
Dose Group	**BD28**	**BD91**	**BD136**	**BD180**	**BD199 ± 2**
0 mg/kg (Control)	111.8 (147.7, 8)	125.2 (76.2, 6)	97.9 (57.6, 9)	130.1 (86.6, 7)	295.9 (190.5, 7)
10 mg/kg	105.4 (118.5, 7)	25.2 (38.2, 9)	100.6 (100.8, 8)	94.5 (53.7, 11)	294.9 (86.1, 9)
30 mg/kg	36.0 (39.9, 10)	17.9 (22.2, 10)	69.8 (81.0, 12)	118.3 (111.5, 10)	269.4 (214.3, 12)

ADA = anti-drug antibody; $AUC_{0\text{-}14d}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to 14 days post-dose; BD = Birth Day; CL = apparent clearance; C_{max} = maximal observed concentration; CPT = center point titer; F = female; GD = Gestation Day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; N = number of animals; NA = not applicable; No. = number; PPD = post-partum day; SD = standard deviation; $t_{1/2}$ = terminal elimination half-life; TK = toxicokinetic; Unk = unknown. TK parameters were rounded to 3 significant figures after calculations were performed.

2.6.7.14 幼若動物を用いた試験

ベンラリズマブの幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかったが、これまでに終了した非臨床安全性試験においてベンラリズマブの毒性学的プロファイルに年齢の違いによる差異は認められていない。カニクイザルを用いたベンラリズマブの 9 週間静脈内投与試験では 2～9 歳、15 週間の試験では 3～5 歳の動物を使用しており、一般にヒトの年齢で 10～12 歳又はそれ以上の年齢に相当する。また、例えば免疫系のような生後に発達するものについては、ヒトのより若い年齢層に対する外挿も適切であると考えられる（Weinbauer et al, 2012）。カニクイザルを用いた 9 ヵ月間の試験は性成熟した動物（雄で 6.3～12.9 歳、雌で 4.4～6.2 歳）を用いて実施した。

妊娠可能女性を臨床試験に含めるにあたり、カニクイザルを用いた ePPND 試験を実施し、胚･胎児発生に加えて、生後 6.5 ヵ月までの出生児でベンラリズマブの影響を評価した。神経行動学的評価、骨格の発達及び免疫機能等、評価項目の多くは幼若動物を用いた毒性試験で評価する項目と同一であり、生後発達段階の評価に必要な項目についてはある程度実施したと考えられる。

2.6.7.15 局所刺激性試験

資料番号：4.2.3.6-1

Table 2.6.7.15-1 Benralizumab: Local Tolerance Study in Rabbits after a Single SC Injection (Study 517668; GLP)

Species: Male New Zealand White Rabbits	**Duration of Dosing**: Single SC injection of test article and controls on Day 1.	**Study Number**: 517668
Initial Age: Approximately 9 weeks old	**Duration of Postdose**: Initial necropsy was on Day 3 (2 days after dosing) with remaining animals necropsied on Day 15 (14 days after dosing).	**GLP Compliance**: Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration**: Bolus subcutaneous injection; dose volume of 1.0 mL for each item	
No-Observed-Adverse-Effect-Level: 50 mg/injection	**Vehicle/Formulation**: Benralizumab was in 20 mmol/L histidine, 9% trehalose, 0.004% polysorbate 20 at pH6.0 (lyophilized formulation). Control #1 consisted of 20 mmol/L histidine, 9% trehalose, 0.02% polysorbate 20 at pH6.0. Control #2 consisted of 0.9% NaCl solution.	
Parameters Evaluated: Clinical observations, injection site observations, body weights, and injection site macroscopic and microscopic pathology.		
Noteworthy Findings: There were no signs of systemic toxicity of benralizumab in any animal. Evaluation of injection sites revealed no toxicologically significant findings (clinical observations and macroscopic and microscopic pathologic examinations).		

SC = subcutaneous

2.6.7.16 その他の毒性試験

資料番号（IM1232）：4.2.3.7.7-1
資料番号（IM1231）：4.2.3.7.7-2

Table 2.6.7.16-1 Other Toxicity Studies of Benralizumab

Study No.	Study Objective	Species and Other Information	Doses	GLP Status	Noteworthy Findings
IM1231	Cross-Reactivity Study of F-BIW-8405 with Normal Human Tissues	F-benralizumab was tested for binding to normal human tissues IgG1 control with a different antigenic specificity epitope was used to discriminate specific from nonspecific binding Positive control: Cryosections of IL-5R transfected TF-1 cells (TF-1/IL-5R). Negative control: Cryosections of untransfected TF-1 cells (TF-1/wild).	FITC-labeled benralizumab (F-benralizumab; F-BIW-8405): 1 and 10 µg/mL	GLP	Staining was noted for intravascular protein in many tissues (staining of soluble IL-5R; low to intermediate staining affinity), mononuclear cells in spleen (low to intermediate staining affinity of peripheral cytoplasm and/or membrane), and striated (skeletal) myocytes in striated (skeletal) muscle (low to intermediate staining affinity of peripheral cytoplasm with extension into cross-striations).
IM1232	Cross-Reactivity Study of F-BIW-8405 with Cynomolgus Monkey Tissues	F-benralizumab was tested for binding to cynomolgus monkey tissues IgG1 control with a different antigenic specificity epitope was used to discriminate specific from nonspecific binding Positive control: Cryosections of IL-5R transfected TF-1 cells (TF-1/IL-5R). Negative control: Cryosections of untransfected TF-1 cells (TF-1/wild).	FITC-labeled benralizumab (F-benralizumab; F-BIW-8405): 1 and 10 µg/mL	GLP	Staining was noted for intravascular proteins in many tissues (staining of soluble IL-5R; low to intermediate staining affinity), mononuclear cells in spleen (intermediate staining affinity of peripheral cytoplasm and/or membrane), striated (skeletal and cardiac) myocytes in striated (skeletal) muscle and heart, respectively (low staining affinity of peripheral cytoplasm with extension into cross-striations), and eosinophil progenitors in bone marrow (intermediate staining affinity of membrane and cytoplasm).

F-benralizumab = FITC-conjugated benralizumab; GLP = Good Laboratory Practice; IgG = immunoglobulin G; IL-5R = interleukin-5 receptor
In this table, benralizumab is referred to as BIW-8405.

2.6.7.17 参考文献

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.

Gardin et al, 1989
Gardin, JF, Jerome CP, Jayo MJ, Weaver DS. Maternal factors affecting reproduction in a breeding colony of cynomolgus macaques (Macaca fascicularis). Lab Anim Sci. 1989;39(3):205-12.

Hird et al, 1975
Hird DW, Henrickson RV, Hendrickx AG. Infant mortality in *Macaca mulatta*: neonatal and post-neonatal mortality at the California Primate Research Center, 1968-1972. A retrospective study. J Med Primatol. 1975;4(1):8-22.

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

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.

Weinbauer et al, 2012
Weinbauer GF, Chellman GJ, Rasmussen AD, Vogelwedde E. Use of primate pediatric model. In: Hoberman AM, Lewis EM, eds. Pediatric Nonclinical Drug Testing: Principles, Requirements, and Practices, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2012;255-79.