目次

1. 非臨床試験計画概略 4
2. 薬理試験（モジュール 2.6.2） 6
2.1 効力を裏付ける試験 6
2.1.1 In vitro 試験 6
2.1.2 In vivo 試験 9
2.2 副次的薬理試験 9
2.2.1 B 細胞の減少：免疫機能に及ぼす潜在的影響 9
2.2.2 T 細胞の活性化 10
2.3 安全性薬理試験 11
3. 薬物動態試験（モジュール 2.6.4） 12
3.1 分析方法 12
3.2 吸収 12
3.3 分布 12
3.4 代謝 13
3.5 排泄 13
3.6 薬物動態学的薬物相互作用 13
4. 毒性試験（モジュール 2.6.6） 15
4.1 単回投与毒性試験 16
4.2 反復投与毒性試験 16
4.2.1 ラットを用いた反復投与毒性試験 16
4.2.2 チンパンジーを用いた反復投与毒性試験 16
4.2.3 マウスを用いた muS103new の反復投与毒性試験 17
4.3 遺伝毒性試験 18
4.4 がん原性試験 18
4.5 生殖発生毒性試験 18
4.6 局所刺激性試験 19
4.7 その他の毒性試験 19
4.7.1 免疫原性試験 19
4.7.2 免疫系への影響 19
4.7.3 その他の試験：組織交差反応性 20
4.8 添加物：L-リシン塩酸塩 20
5. 考察及び結論 22
6. 参考文献 26

略語一覧

略語又は用語	定義／説明
aa	Amino acid（アミノ酸）
ADA	Anti-drug antibody（抗薬物抗体）
B-ALL	B-cell Acute lymphoblastic leukemia（B 細胞性急性リンパ性白血病）
AMG 103	blinatumomab（ブリナツモマブ）
BiTE	Bispecific T cell engager（二重特異性 T 細胞誘導）
BSA	Body surface area（体表面積）
CD3	Surface antigen on T cells, subunit of the T cell receptor complex（T 細胞上の表面抗原、T 細胞受容体複合体のサブユニット）
CD4	T cell surface antigen specific for the T helper cell subpopulation（ヘルパーT 細胞サブセットに特異的な T 細胞表面抗原）
CD8	Surface antigen present on most cytotoxic T cells and NK cells（ほぼすべての細胞傷害性 T 細胞及び NK 細胞に存在する表面抗原）
CD19	Surface antigen, pan-B cell receptor protein（表面抗原、汎 B 細胞受容体タンパク質）
CD25	Late activation marker of T cells（T 細胞の後期活性化マーカー）
CD69	Early activation marker of T cells（T 細胞の初期活性化マーカー）
CHO	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
cIV	Continuous intravenous infusion（持続静脈内注入）
CLL	Chronic lymphocytic leukemia（慢性リンパ性白血病）
CYP450	Cytochrome P450（チトクロム P450）
DNA	Deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
EC_{50}	50% effective concentration（50%有効濃度）
ECG	Electrocardiogram（心電図）
ECL	Electro-chemiluminescence（電気化学発光）
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule（上皮細胞接着分子）
FasL	Fas ligand（Fas リガンド）
Fc	Fragment crystalizable region of Immunoglobulin molecule（免疫グロブリン分子結晶化可能領域断片）
FDA	Food and Drug Adminstration（米国食品医薬品局）
GLP	Good Laboratory Practice（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準）
hERG	human Ether-a-go-go-Related Gene
HD37	Anti-CD19 murine monoclonal antibody（抗 CD19 マウスモノクローナル抗体）
ICAM-1 and -2	Intercellular Adhesion Molecules -1 and -2（細胞接着分子-1 及び 2）
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use（医薬品規制調和国際会議）
IFN-γ	Interferon-γ（インターフェロン-γ）
IL-2	Interleukin-2（インターロイキン-2）
IL-4	Interleukin-4（インターロイキン-4）
IL-10	Interleukin-10（インターロイキン-10）
IL-17	Interleukin-17（インターロイキン-17）
K_D	Equilibrium dissociation constant（平衡解離定数）
kDa	Kilodalton（キロダルトン）
L2K-07	Anti-CD3 murine monoclonal antibody（抗 CD3 マウスモノクローナル抗体）
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen-1（リンパ球機能関連抗原-1）
MEDI-538	blinatumomab（ブリナツモマブ）
MHC	Major histocompatibility complex（主要組織適合遺伝子複合体）
MRD	Minimal residual disease（微小残存病変）
MT103	blinatumomab（ブリナツモマブ）
muS103new	Murine surrogate molecule for blinatumomab（ブリナツモマブのマウス代替抗体）

略語又は用語	定義／説明
NHL	Non-Hodgkin’s lymphoma（非ホジキンリンパ腫）
NK	Natural killer（ナチュラルキラー）
NKT	Natural killer-like T（ナチュラルキラーT）
NOD/SCID	Mouse strain with severe combined immunodeficiency (SCID) crossed onto non-obese diabetic background（非肥満性糖尿病系マウスに重度複合型免疫不全（SCID）遺伝子を導入したマウス系統）
OECD	Office of Economic Cooperation and Development（経済協力開発機構）
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell（末梢血単核細胞）
PK	Pharmacokinetic, pharmacokinetics（薬物動態）
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1（P-セレクチン糖タンパクリガンド-1）
SEM	Standard error of the mean（平均値の標準誤差）
$t_{1/2}$	Half-life（半減期）
TCR	T cell receptor（T 細胞受容体）
TK	Toxicokinetic, toxicokinetics（トキシコキネティクス）
TNF	Tumor necrosis factor（腫瘍壊死因子）
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand（TNF 関連アポトーシス誘導リガンド）
Vz	Volume of distribution（終末消失相における分布容積）
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1（血管細胞接着分子-1）
VLA-4	Very Late Antigen-4（最晩期抗原 4）

1. 非臨床試験計画概略

ブリナツモマブ（AMG 103、MT 103 又は MEDI-538）は、B 細胞上に発現する CD19 及び T 細胞受容体複合体の CD3 鎖に対し二重特異性 T 細胞誘導（BiTE®）作用を示す一本鎖抗体である。ブリナツモマブは、CD3 陽性 T 細胞と CD19 陽性標的 B 細胞を一時的に架橋し、その結果 T 細胞が活性化することで標的細胞を傷害するように設計されている。ブリナツモマブは、再発又は難治性の B 細胞性急性リンパ性白血病（B-ALL）患者の治療薬として開発中である。成人 ALL 患者の治療では、初回サイクルの 1 週目の投与量を 9 μg/日、その後は 28 μg/日として 4 週間持続静脈内投与を行う。サイクル間の休薬期間は 2 週間とする。その後のサイクルでは、28 μg/日を 4 週間静脈内投与する。

ブリナツモマブの非臨床開発プログラムは、抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH-S9）及びバイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価（ICH S6[R1]）に従って実施した。主要な毒性試験及びトキシコキネティクス（TK）試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守し、経済協力開発機構（OECD）の基準に沿って実施した。本剤の開発段階において、医薬品規制調和国際会議（ICH）、諮問委員会／欧州医薬品庁（CPMP/EMA）、及び米国食品医薬品局（FDA）の該当するガイダンス文書についても参照した。

動物種の選定

ブリナツモマブは、ヒト及びチンパンジーの CD19 及び CD3 に対して高親和性を示し、両種由来の B 細胞に対して薬理活性を示す。ブリナツモマブはその他の霊長類であるヒヒ、カニクイザル、アカゲザル、アフリカミドリザル、リスザル及びマーモセット、並びにマウス、ラット及びイヌ由来の B 及び T 細胞には結合しない（モジュール 2.6.2 第 3.4 項）。

ブリナツモマブの効力は、ヒト腫瘍細胞株を移植した NOD/SCID マウス異種移植モデルにエフェクター細胞としてヒト末梢血単核細胞（PBMC）を移植して評価した。ブリナツモマブの毒性評価は、チンパンジーを用いて実施した。

また、マウスを用いた非臨床試験には、マウス CD19 及びマウス CD3 に特異的に結合するラットのモノクローナル抗体から作製したブリナツモマブのマウス代替 BiTE 抗体（muS103new）を使用した。さらに、ブリナツモマブの期待する薬理作用に起因しない毒性を検討する目的で、ラット（反復投与毒性試験）、イヌ（心血管系毒性）及びウサギ（局所刺激性）を用いて評価した。

毒性評価の投与用量及び投与方法

チンパンジーを用いた試験では、in vitro 活性に加え、開発が先行していた、ブリナツモマブとは異なる抗 CD19 の BiTE 分子を用いた in vivo 試験で得られた結果に基づき、投与量を選択した。最高用量 0.12 μg/kg において、1 例の動物で血圧の大幅な低下がみられたため、反復投与毒性試験では 0.10 μg/kg の週 1 回、4 週間静脈内投与を選択した。

代替抗体 muS103new の試験では、静脈内、皮下及び腹腔内投与時のバイオアベイラビリティを検討し、その結果から以降の試験では静脈内あるいは皮下投与を採用した。高用量投与群（5～10 mg/kg/日）は、薬剤濃度及び投与容量の限界を考慮し、投与可能な最大量に基づき採用した。低用量投与群は、薬理活性を示し、抗薬物抗体（ADA）の影響を受けない十分な用量を選択した。

ブリナツモマブの非臨床プログラム

ブリナツモマブの作用機序は明らかにされており、B 細胞に発現する CD19 及び T 細胞に発現する CD3 に特異的に結合することで、細胞間に一過性のシナプスを形成し、T 細胞の活性化、サイトカインの遊離、接着分子の発現上昇及びグランザイム B の発現上昇を誘導する。最終的には、細胞傷害性 T 細胞により CD19 陽性 B 細胞が傷害される。ブリナツモマブは、in vitro 及び in vivo で成人及び小児 B 細胞腫瘍株に対する細胞傷害性が認められ、幅広いエフェクター細胞：標的細胞比で効果を発現する。

動物を用いた非臨床薬物動態（PK）試験では、ブリナツモマブ及び muS103new は血清中から速やかに消失し、半減期は急速静脈内投与後 1.7～8 時間であった。

ヒト組織を用いた交差反応性試験を実施したところ、ブリナツモマブはリンパ球のみに結合することが確認された。

チンパンジーを用いたブリナツモマブの安全性試験において、薬理作用として B 細胞の減少、T 細胞の再分布及びサイトカインの遊離が認められた。他に、血圧の一過性の低下、心拍数及び体温の一過性の上昇がみられ、いずれもサイトカイン遊離による影響と一致するものであった。チンパンジーにおいては、この血圧低下が用量増加を制限する変化になったが、すべての所見は可逆的であった。

ブリナツモマブの薬理作用の影響を調べるために代替抗体 muS103new を用いて実施したマウスの試験では、10 mg/kg/日を 13 週間投与した際の忍容性は良好であり、認められた変化は作用機序に関連するもの（白血球数低下、B 細胞の枯渇、T 細胞の減少、サイトカイン遊離及びリンパ組織での細胞数の低下）であり、予期した以外の標的臓器は確認されなかった。すべての変化は休薬期間中に回復、あるいは回復の兆候が認められた。muS103new を用いた安全性薬理試験では、呼吸又は神経行動学的な影響は認められず、また、直接脳室内に 7 日間投与した場合も同様であった。非臨床薬理試験又は毒性試験においても、神経学的影響は認められなかった。マウスの胚・胎児発生への影響に関する試験において、母体又は胚・胎児発生に及ぼす影響はみられなかった。薬理活性を発現する濃度の muS103new がマウス胎児の体内においても検出された。薬理作用に起因しない毒性を確認する目的で、ブリナツモマブによるラットを用いた反復投与毒性試験、イヌを用いた心血管系毒性試験及びウサギを用いた局所刺激性を実施したが、安全性上の問題は認められなかった。

2. 薬理試験（モジュール 2.6.2）

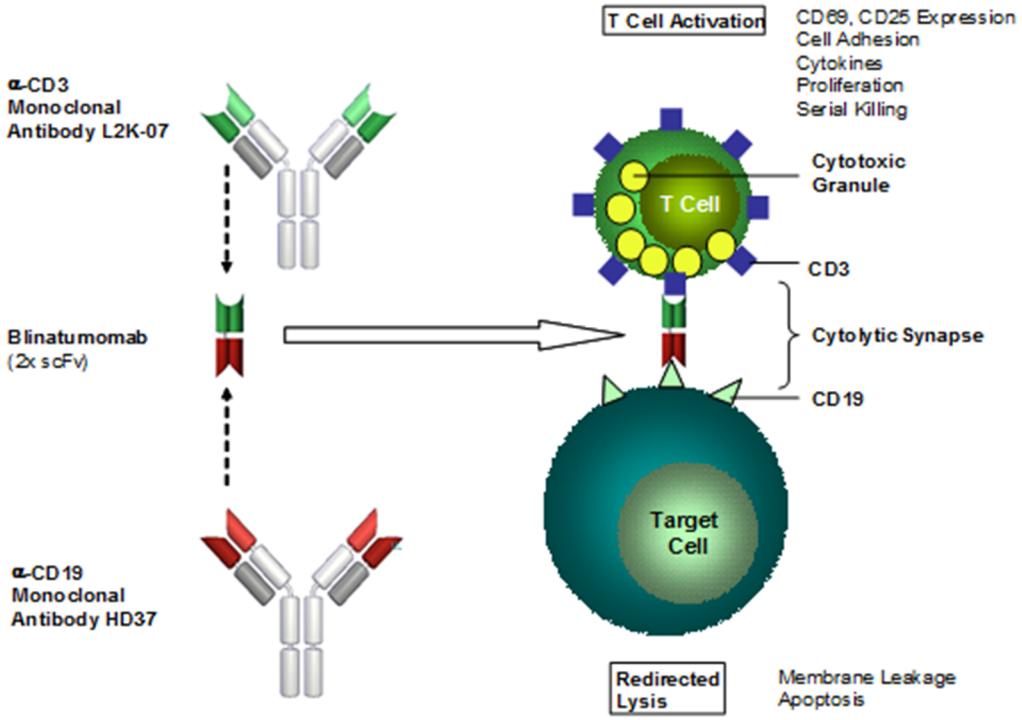
ブリナツモマブの非臨床薬理試験の概要を示す（モジュール 2.6.2、Nagorsen et al, 2012）。

2.1 効力を裏付ける試験

2.1.1 In vitro 試験

ブリナツモマブは二重特異性の結合能を有し、悪性及び正常 B 細胞表面に発現する CD19 と T 細胞表面に発現する CD3 に結合する（図 1）。ブリナツモマブモノマーは、ヒト CD19 に対し比較的高い親和性（平衡解離定数 [K_D] = 1.49 x 10^{-9} M）で結合するのに対し、T 細胞表面に発現するヒト CD3 に対する親和性は CD19 と比較して低い（K_D = 2.6 x 10^{-7} M）。これは、ブリナツモマブの CD3 への結合親和性を相対的に低くすることで、標的細胞が同時に結合しない場合、T 細胞シグナル伝達が誘導されないよう設計したものである。標的細胞が存在しない場合、ブリナツモマブは T 細胞を活性化しない（Brischwein et al, 2007、モジュール 2.6.2 第 3.2.1 項）。ブリナツモマブにより活性化した T 細胞による標的腫瘍細胞の溶解は、通常の細胞傷害性 T 細胞の反応に類似しており（Brandl et al, 2007、Offner et al, 2006、Hoffmann et al, 2005、Dreier et al, 2002、Löffler et al, 2000、モジュール 2.6.2 第 3.2.1 項及び第 3.2.2 項）、低濃度のブリナツモマブでも作用は発現した（50%有効濃度[EC_{50}] 10～100 pg/mL）。

図 1 細胞溶解性免疫シナプスの形成によるブリナツモマブ介在性の T 細胞活性化による腫瘍細胞のリダイレクト細胞溶解



CD19 は、95 kDa の膜貫通タンパクであり、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。CD19 は、B 細胞抗原受容体のシグナルを調節する共受容体である。また、B 細胞の分化、ネガティ

ブセレクション及び末梢 B 細胞プールでの増殖にも何らかの役割を担うと考えられる。CD19 の発現は、B 細胞系の細胞に限定されている。CD19 は骨髄中の前駆 B 細胞の段階から発現し、形質芽細胞を含むすべての B 細胞系細胞で発現している（Blüml et al, 2013、LeBien and Tedder 2008、Nadler et al, 1983）。

CD19 は、B 細胞悪性腫瘍を標的とした場合に有用な分子であり、B 細胞系のほとんどの細胞で発現し（Wang et al, 2012、Raponi et al, 2011、Hurwitz et al, 1988、Nadler et al, 1983）、慢性リンパ性白血病（CLL）細胞及びあらゆる非ホジキンリンパ腫（NHL）サブタイプでも発現がみられる（Scheuermann and Racila 1995）。成人及び小児の B 細胞腫瘍から採取した複数の細胞株を、ヒト PBMC 又は精製ヒト T 細胞サブセットとともに培養した場合、ブリナツモマブが細胞傷害性を示すことが確認されている（モジュール 2.6.2 第 3.2.1 項）。一方、ブリナツモマブは CD19 の発現がみられない細胞株に対しては細胞傷害性を示さず（Hoffmann et al, 2005、Dreier et al, 2002、Löffler et al, 2000、モジュール 2.6.2 第 3.2.1 項）、CD19 陽性細胞で得られる細胞溶解の EC_{50} 値よりも 1000 倍程度高濃度のブリナツモマブに曝露した場合でも CD19 の発現がみられない細胞株の生存率には影響が認められなかった。

ブリナツモマブの抗腫瘍活性は、選択的 T 細胞受容体（TCR）を有する T 細胞又はがん細胞に存在するペプチド抗原に依存せず、また、標的細胞上の主要組織適合遺伝子複合体クラス 1 分子の有無にも依存しない（Offner et al, 2006）。CD3 を発現している CD8 陽性及び CD4 陽性 T 細胞は、ブリナツモマブを介して標的である CD19 陽性細胞と結合した後、リダイレクト細胞溶解を惹起する（Kischel et al, 2009、モジュール 2.6.2 第 3.2.2 項）。ブリナツモマブは、様々なエフェクター細胞と標的細胞の混合比で細胞傷害性を発現する。In vitro 試験の場合、最適な E:T 比は 10:1 であるが、1:10 の低比率条件下でも標的細胞の溶解が認められている（Hoffmann et al, 2005）。ビデオを利用した顕微鏡下の実験においては、単一の T 細胞が複数の標的細胞の溶解を媒介することが示されている（Hoffmann et al, 2005）。また、ブリナツモマブ誘発 T 細胞増殖は、標的とする CD19 陽性細胞の存在下では認められるが、標的細胞非存在下又は CD19 を認識しない BiTE 分子の存在下では認められなかった（Löffler et al, 2000、モジュール 2.6.2 第 3.2.5 項）。

ブリナツモマブは、T 細胞表面に発現する TCR/CD3 複合体と腫瘍細胞表面に発現する CD19 とを架橋することにより、標的細胞の溶解、T 細胞の活性化、サイトカイン遊離及び刺激されたエフェクターT 細胞の増殖等、T 細胞が TCR を介して抗原を特異的に認識した場合に類似した作用を誘導する。CD8 陽性 T 細胞と標的細胞との細胞溶解性免疫シナプス形成の特性解析及び検出は、上皮細胞接着分子（EpCAM）を標的とする BiTE 抗体を用いて検討されている（Offner et al, 2006）。T 細胞活性化マーカー（CD69 及び CD25）の発現は、標的細胞存在下で T 細胞がブリナツモマブに曝露されることにより誘導される（Brischwein et al, 2007、モジュール 2.6.2 第 3.2.1 項）。

T 細胞は、小孔形成タンパクであるパーフォリンやグランザイム B 等の細胞溶解性タンパクの放出及び腫瘍壊死因子（TNF）受容体様細胞死受容体の活性化という 2 つの主な機序により標的細胞を傷害する。放出されたパーフォリンは、標的細胞膜に重合し小孔を形成することで、グランザイム B の細胞内への侵入を可能にする（Lowin et al, 1995、Millard et al, 1984）。グランザイム B はその後、細胞骨格の破壊、細胞の核タンパク質の分解及び DNA の分解酵素を活性化することで標的細胞のアポトーシスを誘導するカスパーゼカスケードを活性化する（Yang et al, 1998、Talanian et al

1997）。ブリナツモマブは、T 細胞におけるグランザイム B の発現を亢進させた（モジュール 2.6.2 第 3.2.6 項）。ブリナツモマブによるプロカスパーゼ 3 及び 7 の活性化も報告されている（Haas et al, 2009、d'Argouges et al, 2009）。TNF 受容体様細胞死受容体のリガンド（Fas リガンド [FasL]、TNF 関連アポトーシス誘導リガンド [TRAIL]、腫瘍壊死因子-α [TNF-α]）に対する阻害剤は、ブリナツモマブが誘導する B 細胞腫瘍株の溶解作用に影響しなかった（Gruen et al, 2004）。このことから、ブリナツモマブは細胞死受容体経路に作用を示すことなく、細胞溶解性タンパクの放出により作用することが確認された。

標的細胞傷害過程において、ブリナツモマブは T 細胞による炎症性サイトカインの産生及び分泌を誘導する。これは、in vitro 及び in vivo において認められている（表 1）。In vivo 試験では、サイトカインの遊離は初回のブリナツモマブの曝露時に最も強く、動物においては 2 回目以降の投与で減弱した（モジュール 2.6.2 第 3.2.8 項、モジュール 2.6.6 第 2.2.1 項、第 2.2.2 項、第 2.2.9 項及び第 2.2.10 項）。また，ヒトにおいては、点滴投与の継続に伴い減弱した（Klinger et al, 2012）。サイトカイン遊離の程度は個体間で変動した。In vitro 試験において、デキサメタゾン前処置はブリナツモマブ介在性の T 細胞活性化後のサイトカインの放出を減少させたが、ブリナツモマブ介在性の細胞傷害活性にはほとんど影響しないことが確認された。したがって、ブリナツモマブの細胞傷害活性はサイトカインの放出に依存しないことが示唆された（モジュール 2.6.2 第 6.1 項）。

表 1　In vitro 及び in vivo におけるブリナツモマブ又は muS103new 曝露後に遊離するサイトカイン

Species	In Vivo Studies	In Vitro Studies
Human	IL-2, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF-α [a]	IL-2, IL-10, IFN-γ, TNF-α [b]
Chimpanzee	IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α [c]	IL-2, IFN-γ, TNF-α [d]
Mouse	IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ, TNF-α [e]	IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α [b]

[a] Klinger et al, 2012. Data from study MT103-202 in patients with MRD+ ALL
[b] Studies 103-PCD-0065 and 103-PCD-0094.
[c] Study 103-PCD-0015
[d] Schlereth et al, 2006
[e] Studies 103-PCD-0091 and 103-PCD-0092. muS103new effects in healthy, non-tumor bearing mice.

臨床試験においてブリナツモマブの点滴静脈内投与中に認められた、一時的な T 細胞減少の機序を理解する目的で、内皮細胞接着分子に対するブリナツモマブの作用を検討した（Klinger et al, 2012）。In vitro 試験において、標的細胞存在下でのブリナツモマブ介在性の T 細胞の活性化は、内皮細胞上の接着分子である細胞接着分子-1（ICAM-1）及び血管細胞接着分子-1（VCAM-1）の発現上昇を誘導した。TNF-α 阻害剤であるエタネルセプトは、ICAM-1 及び VCAM-1 の発現上昇をほぼ阻害し、内皮細胞からのサイトカインの遊離も阻害することから、これらの作用は TNF-α に起因することが示唆された。ブリナツモマブ非存在下での ICAM-1 の発現上昇はわずかであった（モジュール 2.6.2 第 4.1 項）。動的フローチャンバーシステムを用いて、流体力学的条件下でのリンパ球と内皮細胞の相互作用について検討した結果、ブリナツモマブはヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）又はヒト脳微小血管内皮細胞（HBMEC）上の接着分子の発現上昇を誘導し、T 細胞のローリング速度を低下させた。Pentosan polysulfate（内皮細胞上の P-セレクチンに結合し、P-セレクチン糖タンパクリガンド-1 [PSGL-1] との結合を阻害）、ミノサイクリン（リンパ球機能関連抗原-1 [LFA-1] を阻害

し、ICAM-1/2 との結合を減弱）及びナタリズマブ（最晩期抗原 4 [VLA-4] に結合し、VCAM-1 との結合を阻害）は、いずれもブリナツモマブにより誘導される接着分子の発現上昇、並びに T 細胞のローリング速度の低下を阻害した（モジュール 2.6.2 第 4.1.2 項）。これらの結果から、ヒト及び動物がブリナツモマブに曝露した後の T 細胞の発現低下は、T 細胞及び内皮細胞の接着分子の変化による可能性が示唆された。

2.1.2 In vivo 試験

NOD/SCID マウスを用いた異種移植モデルにおいて、ブリナツモマブがヒトの腫瘍細胞増殖に及ぼす影響を検討した。ブリナツモマブに反応するエフェクター細胞として、PBMC を腫瘍細胞株とともに移植した。

ブリナツモマブは、ヒト前駆 B 細胞性白血病細胞由来 NALM-6 細胞株、小児の急性リンパ芽球性白血病由来 SEMc 細胞株及びバーキットリンパ腫細胞由来 Raji 細胞株を用いたモデルを含む、様々な白血病及びリンパ腫細胞株を移植した in vivo モデルにおいて、腫瘍の増殖を有意に抑制した。ブリナツモマブの作用は、その用量、投与期間及び投与レジメンに依存した。また、ブリナツモマブは、NALM-6 細胞株及びマントル細胞リンパ腫由来 Granta-519 細胞株を同所性に移植した腫瘍モデルにおいて、生存期間を延長した（モジュール 2.6.2 第 3.3 項、Dreier et al, 2003）。

2.2 副次的薬理試験

ブリナツモマブは、B 細胞腫瘍に対して傷害作用を有するが、ブリナツモマブは非悪性 B 細胞も傷害することから、正常な B 細胞が減少する可能性を有する。また、ブリナツモマブによる T 細胞の活性化は、サイトカインの遊離及び内皮細胞の活性化を誘導する可能性があり、標的細胞の傷害以外にも他の器官に影響を及ぼす恐れがある。これらについて、以下に考察した。

2.2.1 B 細胞の減少：免疫機能に及ぼす潜在的影響

B 細胞は、病原体に対する抗体産生反応に主な役割を果たす（LeBien and Tedder 2008）。ヒト及びマウスで CD19 が枯渇、すなわち B 細胞が完全に枯渇した状態では、低ガンマグロブリン血症、体液性抗体反応障害及び易感染性亢進をもたらす可能性がある（LeBien and Tedder 2008、van Zelm et al, 2006、Del Nagro et al, 2005、Yazawa et al, 2005、Engel et al, 1995）。

ブリナツモマブをチンパンジーに、あるいは muS103new をマウスに反復投与したところ、循環中の B 細胞数がそれぞれ約 50%及び 98%減少した。両動物種とも、4 週間の休薬期間終了時に循環中の B 細胞数は部分的に回復した。

病原体が少ない環境下で飼育された動物を用いた試験ではあるものの、ブリナツモマブ及び muS103new は、試験において感染症の発症率を上昇させなかった。初期の探索的試験で使用したチンパンジーの 1 例で、投与後に急性細菌性気管支肺炎を発症したことから、安楽死させた（モジュール 2.6.6 第 2.2.8 項）。試験開始時において、同動物の B 細胞数は少なく、慢性のウイルス性間質性胸膜肺炎の既往があったと考えられ、加えて、投与期間中に誤嚥が生じた可能性があったことから、ブリナツモマブが同動物の疾患に関与したかは不明であった。

他の治療薬であるリツキシマブにより、B 細胞数の減少に起因したワクチン接種時の体液性応答反応の変化が報告されており（Eisenberg et al, 2013、Arad et al, 2011、Yri et al, 2011）、B 細胞数の減少がワクチン接種に対する体液性応答反応を低下させる可能性が考えられた。ブリナツモマブ及び muS103new が異種抗原に対する抗体価の上昇に及ぼす影響については、動物モデル及び臨床試験において直接的には評価されていない。しかし、毒性試験で B 細胞数が大幅に減少した動物でも ADA の産生がみられたことから、体液性免疫反応が完全には障害されていないことが示された。

2.2.2　T 細胞の活性化

ブリナツモマブは CD3 を発現している T 細胞と CD19 を発現している B 細胞との間にシナプスを形成し、それらを近接させる。その結果、T 細胞が特異的に活性化され、標的とする B 細胞をリダイレクト溶解により傷害する。ブリナツモマブにより誘導された標的細胞溶解は、TCR/CD3 複合体による T 細胞の同時活性化を伴い、生化学的事象及び細胞応答のカスケードを開始させ、IL-2 の転写、サイトカインの産生及び T 細胞の増殖等、種々の薬理活性を誘導する（Baeuerle et al, 2009）。

非臨床試験において、ブリナツモマブはチンパンジーへの投与後に炎症誘発性サイトカインの一時的な遊離を誘発し、muS103new も同様に、マウスにおいてサイトカインの遊離を誘発した（モジュール 2.6.6 第 2.2.2 項）。In vivo 試験における、両動物種でのサイトカイン遊離の程度は、初回投与後が最も大きく、その後の投与により減弱した。Ex vivo 試験において、ヒト T 細胞を B 細胞又は B 細胞系の腫瘍細胞株と共培養した場合、ブリナツモマブ曝露後に一時的なサイトカインの遊離がみられた（モジュール 2.6.2）。

ブリナツモマブ及び muS103new の投与後に、炎症性サイトカインである TNF-α、IFN-γ、IL-6 及び IL-2 が高頻度で検出される。これらのサイトカインは、血圧、血管の健全性並びに心臓、肺、肝臓及び腎臓の機能に変化をもたらすと同時に、神経学的症状を引き起こす可能性がある（Baumgart et al, 2009、Bugelski et al, 2009）。

非臨床試験では、サイトカインに関連した重度な毒性所見はみられなかったが、サイトカインに起因する生理学的変化が認められた（モジュール 2.6.6）。ブリナツモマブを投与したチンパンジーにおいて、投与中及び投与後にサイトカインの遊離に起因すると考えられる血圧の変化が認められたが、この血圧の変化に関しては、異種又は同種動物間で一貫したパターンは確認できなかった。チンパンジーにおいて、13 週間反復投与した場合、その期間中に血圧の顕著な低下が 2 回認められたが、適切な処置により速やかに回復した。チンパンジーにおいて、心拍数、体温、肝酵素及びビリルビンの一過性の上昇も認められたが、いずれも既に知られているサイトカインの遊離に起因するものであった。チンパンジーでは、他の器官への明らかな影響は認められなかったが、本試験ではチンパンジーを用いたことから剖検及び病理組織学的検査を実施できなかったため、その評価項目は限定的であった。muS103new をマウスに投与した場合、サイトカインの一過性の増加が認められたが、サイトカイン遊離に起因した一般状態変化及び病理組織学的検査における組織での障害性の変化は認められなかった。

以上、ブリナツモマブは標的細胞存在下で T 細胞の活性化を誘導し、腫瘍細胞を傷害するものと考えられる。T 細胞の活性化に続き、サイトカインの遊離が生じ、多様な生理的反応が引き起こさ

れる可能性がある。個々の患者における、これらの反応への感受性の程度は、腫瘍の量、過去の治療歴及び併存症等他の数多くの因子に左右されると考えられる。

2.3 安全性薬理試験

ブリナツモマブの心血管系に対する影響について、イヌ及びチンパンジーへの急速静脈内投与により評価した。チンパンジーを用いた心血管系パラメータの測定には限界があったことから、ブリナツモマブの作用機序に起因しない心血管系への影響を評価する目的で、ブリナツモマブが交差反応性を示さない麻酔下のイヌを用いた試験を実施した。ブリナツモマブをイヌに 17 µg/kg まで投与したが、心血管系パラメータ又は呼吸系に対し影響はみられなかった（モジュール 2.6.2 第 5.4 項）。チンパンジーでは 3 つの試験を実施した（モジュール 2.6.6 第 2.2.8 項、第 2.2.9 項及び第 2.2.10 項）。ブリナツモマブ投与後 0～8 時間又は 7 日に測定した心電図（ECG）には有意な変化はみられず、QT 間隔にも影響は認められなかった。ブリナツモマブを投与したチンパンジーの一部で投与中及び投与終了後 2 時間のモニタリング中に、血圧の変化が認められた。用量漸増試験（モジュール 2.6.6 第 2.2.9 項）において、最高用量（0.12 µg/kg）を投与した動物の 1 例で、平均血圧が投与終了時に 50 mmHg 未満に低下した。血圧の低下が 5 分以上持続したため、非経口の輸液及びドパミンでの処置を行ったところ血圧は正常まで速やかに回復した。4 週間反復投与毒性試験（ブリナツモマブ投与は雌雄各 1 例、週 1 回×5 回投与）（モジュール 2.6.6 第 2.2.10 項）でも、1 例の雌で 4 回目の投与中に同様の平均血圧の低下が認められた。雄の平均血圧はおおむね安定していたが、5 回目投与後の観察期間終了時に低下がみられた。チンパンジーを用いた毒性試験において、サイトカインの遊離について、各時点での投与後に血中サイトカイン濃度を測定した。IL-2、IL-6、IFN-γ 及び TNF-α は、すべて投与後に上昇がみられ（最も高い遊離は初回投与後に認められた）、サイトカイン量と血圧の変化の間に直接的な相関性は認められなかったものの、血圧の変化の原因となった可能性が高い。

ブリナツモマブが hERG イオンチャネルを阻害する可能性については評価しなかった。これは、一般的に高分子（>1000 Da）は細胞膜を透過しにくく、また hERG チャンネルの機能に対し相互作用、あるいは阻害作用を示さないと考えられるためである（Vargas et al, 2013、Vargas et al, 2008）。

更に、muS103new を用いてマウスでの安全性薬理試験を実施した。呼吸パラメータを全身プレチスモグラフィーにより評価したところ、muS103new を 5 mg/kg の用量まで投与しても影響は認められなかった。

ブリナツモマブが神経行動学的作用を及ぼす可能性について、マウスに muS103new を 5 mg/kg の用量まで 5 日間連日静脈内投与し、各投与後に Irwin 法を用いて評価したところ、投与に関連した所見は認められなかった（モジュール 2.6.2 第 5.2 項）。ブリナツモマブは分子量が約 54 kDa で、Fc 結合ドメインを有さないため、正常な血液脳関門を通過する可能性は低い。そのため、muS103new を 7 日間側脳室内に直接投与したが、投与期間中行動あるいは神経学的な変化は認められなかった（モジュール 2.6.2 第 5.4 項）。更に、ラットを用いたヒト B 細胞脳リンパ腫モデル（Soussain et al, 2007）において、潜在的な神経学的作用について検討した。ブリナツモマブを投与しても、同モデルで神経学的徴候は認められず、また、血液脳関門の透過性への影響は、磁気共鳴画像においても認められなかった（Muldoon et al, 2014）。

3. 薬物動態試験（モジュール 2.6.4）

ブリナツモマブを、マウス、ラット、イヌ、カニクイザル及びチンパンジーに静脈内、皮下又は腹腔内にて単回又は反復投与し、その PK 特性を検討した。muS103new の PK はマウスを用いて検討した。ブリナツモマブ及び muS103new の PK 特性を以下に記載した。

3.1 分析方法

ブリナツモマブ及び muS103new の血清中濃度を測定する目的で、以下に示す種々の分析方法を開発した。T 細胞上の CD69 の活性化に基づくバイオアッセイ法を確立し、チンパンジー及びマウスにおけるブリナツモマブを測定した。酵素結合免疫吸着法を用い、イヌ及びカニクイザルにおけるブリナツモマブ濃度を測定した。ラットにおけるブリナツモマブの測定、並びにマウスにおける muS103new の測定のため、電気化学発光（ECL）測定法を開発した。抗 muS103new 抗体に対する ECL 法を用い、ADA を測定した。

3.2 吸収

非臨床における PK 及び TK 試験は、主に静脈内投与により実施したが、これは臨床投与経路に一致するものである。PK は各静脈内投与試験で用いた用量範囲において概して線形であった。

一部の PK 試験では、ブリナツモマブを皮下又は腹腔内に投与した。

ブリナツモマブ単回皮下投与後のバイオアベイラビリティは、マウス（BALB/c）では 1250 µg/kg 投与時で 35%（103-PCD-0081 試験）、Sprague-Dawley ラットでは 250 µg/kg 及び 2500 µg/kg 投与時でそれぞれ 16%及び 7.9%（103-PCD-0039 試験）、カニクイザルでは 500 µg/kg 投与時で 21%（103-PCD-0062 試験）であった。

muS103new の吸収について、マウスに対し 250 µg/kg を皮下投与、あるいは腹腔内投与した後に測定した。皮下及び腹腔内投与における muS103new のバイオアベイラビリティは、それぞれ 8%～15%及び 39%～61%であった（103-PCD-0090 試験）。毒性試験において、muS103new を 0.2～5 mg/kg の用量範囲で 1 日 1 回静脈内投与、あるいは 0.4～10 mg/kg の用量範囲で 1 日 2 回皮下投与した場合、毒性評価に適した曝露レベルに到達した（103-PCD-0075 試験、103-PCD-0074 試験、103-PCD-0082 試験）。

3.3 分布

放射性標識抗体を用いた組織分布試験は実施しなかった。終末消失相における分布容積（V_z）は、種々の動物種における静脈内投与後のブリナツモマブの濃度－時間プロファイルから推定した（表 2）。

表 2　種々の動物種におけるブリナツモマブ及び muS103new 静脈内投与後の分布容積

Species	Compound	V_z (mL/kg)	Study
Mouse	blinatumomab	268	103-PCD-0081
Mouse	muS103new	378	103-PCD-0090
Dog	blinatumomab	55.0	103-PCD-0008
Chimpanzee	blinatumomab	67.9 - 110	103-PCD-0024

マウスを用いた胚・胎児発生に関する予備毒性試験（103-PCD-0079 試験）において、母動物に妊娠 18 日まで muS103new を投与したところ、muS103new の胎児への移行が認められ、胎児における muS103new の血清中濃度は、母体の血清中濃度の約 0.013%であった。

3.4 代謝

ブリナツモマブを用いた定型的な代謝試験は実施していない。他の外来性タンパク質と同様に、ブリナツモマブの代謝は最終的に、個々の構成アミノ酸への異化であると予測される（Vugmeyster et al, 2012）。

3.5 排泄

ブリナツモマブ及び muS103new は、試験したすべての動物種において速やかに消失した（表 3）。同様の短い消失半減期はヒトでも観察された（~2 時間）。

表 3 種々の動物種におけるブリナツモマブ及び muS103new 静脈内投与後のクリアランス

Species	Compound	CL (mL/hr/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	Study
Mouse	blinatumomab	90.8	2	103-PCD-0081
Mouse	muS103new	202	1.3	103-PCD-0090
Rat	blinatumomab	77.5 - 256	5 - 8	103-PCD-0039
Dog	blinatumomab	19.4	2.11	103-PCD-0008
Cynomolgus	blinatumomab	39.8 – 40.1	5.6 - 7.1	103-PCD-0062
Chimpanzee	blinatumomab	17.9 - 46.1	1.5 - 2.6	103-PCD-0024

また、両腎を摘出した C57BL/6 マウスでは、非腎摘出マウスと比較してブリナツモマブの全身曝露量及び消失半減期は増加し、全身クリアランスは減少した（モジュール 2.6.4 第 6 項）。このことから、ブリナツモマブのクリアランスには、腎における排泄及びアミノ酸への異化が重要な役割を果たしていると考えられた。

ブリナツモマブの乳汁移行を評価した特定の試験は実施していない。概して、母乳に排泄される薬剤量は、血漿タンパク結合、イオン化、親油性、分子量及び PK 等の複数の物理化学的要因に依存する（Anderson 2006、Ito and Lee 2003）。ブリナツモマブは一本鎖免疫グロブリンであるため、循環血清濃度の一部が乳汁に分泌されると予測される。しかし、ヘパリン、インスリン及びインターフェロン等、分子量が 1 kDa を超えるタンパク製剤では、臨床的な影響を発現する量が乳汁に移行することはまれである（Kane et al, 2009、Hale 2005、Agatonovic-Kustrina et al, 2002、Kumar et al, 2000、Reese et al, 1994、Bahna et al, 1982）。それらの母乳中濃度は通常、母体血清中濃度の 4%未満であることが複数の試験で報告されている（Vasiliauskas et al, 2006、Mahadevan et al, 2005、Ostensen and Eigenmann 2004）。

3.6 薬物動態学的薬物相互作用

薬物動態学的薬物相互作用を検討した試験は実施していないが、これはブリナツモマブがタンパク製剤であり、チトクロム P450（CYP450）の酵素活性に直接影響を及ぼすことはないためである。このことは、in vitro において臨床的に意義のある濃度で確認されている（モジュール 2.6.4

第 7 項）。炎症性サイトカインにより CYP450 活性が変化した場合、薬物代謝に影響する可能性も考えられる（Lee et al, 2010）。ブリナツモマブによる一過性のサイトカインの上昇が、CYP450 の活性に影響する可能性について検討されており、その結果の詳細及び臨床への関連性に関しては臨床薬理の項に記載した（モジュール 2.7.2 第 3.8 項）。

4. 毒性試験（モジュール 2.6.6）

ブリナツモマブの毒性について、チンパンジー、ラット、及びウサギを用いて評価し、更に、muS103new を用い、マウスで毒性試験を実施した。muS103new は、遺伝子工学を用い 2 つの親抗体（マウス CD19 及び CD3 に対するラット抗マウスモノクローナル抗体）から製造し、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で発現させたもので、ヒトの標的分子に対するブリナツモマブの親和性と同程度の親和性でマウスの CD3 及び CD19 に結合する。精製した muS103new は 98%を超えるモノマーを含有した。

muS103new の特性をブリナツモマブと比較し表 4 に示す。

表 4 ブリナツモマブと muS103new との比較

Category	Parameter	Blinatumomab	muS103new
Molecule	Parental Antibody source MW, #aa	Mouse anti-human 54.1 kDa, 504 aa [a]	Rat anti-mouse, murinized 52.3 kDa, 490 aa [b]
Binding affinity [c]	CD19 K_d (nM) CD3 K_d (nM)	CHO-huCD19: 1.8 Human PBMC: 55.4	CHO-muCD19: 2.4 Mouse splenocytes: 10.6
Cytotoxicity [c]	EC_{50} (pg/mL) Mean ± SEM	NALM-6: 1.6 ± 0.5 KOPN-8: 0.3 ± 0.2 Primary Hu B cells: 56.5 ± 21.6	BCL-1: 37.9 ± 10.2 A20:1324 ± 373 CHO-mCD19: 361± 165
T cell activation markers [c]	CD25: EC_{50} (pg/mL) Mean ± SEM CD69: EC_{50} (pg/mL) Mean ± SEM	KOPN-8: 200 ± 56 KOPN-8: 111 ± 33	BCL-1: 170 ± 29 BCL-1: 126 ± 110
Cytokine release in vitro [c]	Cytokines at 24 hr (human) and 72 hr (mouse)	KOPN-8: IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α	A20: IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α
Maximal B cell depletion in vivo [d]		100% [e]	100% [f]
T cell redistribution in vivo [d]		Transient [e,g]	Persistent [f]
Cytokine release in vivo [d]	Cytokines elevated during 1st 24 hr	IL-2, IL-6, IL-10, IFN-γ,TNF-α [e]	IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ,TNF-α [h]

aa = amino acid; A20 and BCL-1 = murine B cell lymphoma lines; CHO = Chinese hamster ovary; cIV = continuous IV infusion; EC_{50} = 50% effective concentration; hu = human; KOPN-8 and NALM-6 = human pre-B cell ALL cell lines ; MW = molecular weight; mu = murine; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; SEM = standard error of the mean.

[a] Section 2 of Module 3.2.S.1.2 Structure

[b] Report DR-RE-103-001

[c] Report 103-PCD-0094

[d] B cell depletion, T cell redistribution, and cytokine release comparisons are in peripheral blood in humans (blinatumomab) and mice (muS103new).

[e] Klinger et al, 2012

[f] Reports 103-PCD-0074, 103-PCD-0075, 103-PCD-0082, 103-PCD-0079, 103-PCD-0080; 2.6.7 Toxicology Tabulated Summary.

[g] T cell redistribution recovers approximately 8-9 days after the start of the cIV infusion (Klinger et al, 2012).

[h] Reports 103-PCD-0091, 103-PCD-0092

本毒性試験プログラムの目的は、ブリナツモマブ（及び muS103new）の毒性プロファイルを十分に明らかにすることで、B 細胞性白血病及びリンパ腫患者への適用に際し情報を提供することであった。チンパンジーの投与量は、用量漸増法により設定した。薬理活性を示さない動物種（ラット及びウサギ）の投与量は、臨床用量である 15 μg/m^2/日（28 μg/日）を上回る投与量を選択した。マ

ウスを用いた muS103new の試験では、最大許容投与容量に基づく投与可能な最大量を高用量として、ほぼ最大の薬理作用が得られる用量域で実施した。

4.1 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は独立して実施していない。反復投与毒性試験の投与 1 日における検査項目の評価から、潜在的な急性毒性に関する情報は得られている（モジュール 2.6.6 第 2.2.1 項、第 2.2.2 項、第 2.2.9 項、及び第 2.2.10 項）。チンパンジー及びマウスに対するブリナツモマブ及び muS103new の忍容性は良好であった。チンパンジーにおいて、ブリナツモマブの持続投与中に散発的にみられた平均血圧の急激な低下について、モジュール 2.6.6 に記載し、本モジュール第 2.3 項で考察した。

4.2 反復投与毒性試験

ラット及びチンパンジーではブリナツモマブを用い、マウスではマウス代替抗体である muS103new を用いて反復投与毒性試験を実施した。

4.2.1 ラットを用いた反復投与毒性試験

ブリナツモマブはラットにおいて薬理活性を示さないが、薬理作用に起因しない毒性について検討する目的で、14 日間反復投与毒性試験（103-PCD-0044 試験）を実施した。ブリナツモマブ 25 及び 250 µg/kg/日を急速静脈内投与した結果、投与に起因した毒性はみられなかった。

4.2.2 チンパンジーを用いた反復投与毒性試験

チンパンジーはブリナツモマブが薬理活性を示す唯一の動物種であることから、ブリナツモマブの評価のための重要な試験以外の試験として、剖検を計画しない、評価項目を限定した予備試験を含む計 3 試験を実施した。予備試験（103-PCD-0009 試験）では、検査等での鎮静目的でケタミンを用いたため、ケタミンの長時間曝露による影響がみられ、また対照群を設定しなかったため結果の解釈は困難であった。そこで鎮静薬をイソフルランに変更し、対照群を設定して持続投与による試験を実施した（103-PCD-0016 及び 103-PCD-0015 試験）。以下に各試験の結果を記す。

予備試験（103-PCD-0009 試験）では、ブリナツモマブ 0.06 µg/kg を 2 時間持続静脈内投与し、その後 48 時間に 0.12 µg/kg を投与した 1 例について、2 回目の投与後 8 日に安楽死させた。その後の検査において、重篤な漏出性の急性細菌性気管支肺炎と診断された。本動物には、慢性のウイルス性間質性胸膜肺炎の既往があったこと、投与前から B 細胞数が減少していたこと、並びに持続投与中に誤嚥が生じた可能性があったことが後に明らかとなったが、ブリナツモマブにより誘発された B 細胞の減少及びサイトカインの遊離が急性細菌性肺炎に関与、あるいは慢性のウイルス性肺炎を悪化させた可能性については、明らかでなかった。なお、チンパンジーを用いたその後の毒性試験、並びにマウスを用いた muS103new 投与による毒性試験では、感染症は観察されていない。

次いで実施した反復投与試験のためブリナツモマブの忍容性を確認するため、単回投与による用量漸増試験（103-PCD-0016 試験）を実施した。雌のチンパンジー1 例を用い、溶媒、ブリナツモマブ 0.06、0.10 及び 0.12 μg/kg を各用量の投与間隔を 1 週間として、それぞれ 2 時間持続静脈内投与した。更に、反復投与試験（103-PCD-0015 試験）では、3 例のチンパンジーを用い、溶媒（雌 1 例）及びブリナツモマブ 0.10 μg/kg（雌雄各 1 例）を週 1 回、計 5 回 2 時間持続静脈内投与した。これらの試験で認められた主な変化は、ブリナツモマブの薬理作用に関連した循環血液中のリンパ球数の減少、サイトカインの遊離並びにそれによる二次的な生理的変化であった。循環血液中の B 細胞数の減少が各週 1 回の投与後に観察されたが、次の投与前までに部分的に回復していた。投与期間終了時までに、B 細胞数は投与開始前値から約 50%減少しており、4 週間の休薬期間中もその減少が持続したものの、B 細胞が完全に枯渇することはなかった。チンパンジーにおけるブリナツモマブの半減期は約 1.8 時間（103-PCD-0024 試験）で、投与は週 1 回 2 時間のみであったことが、チンパンジーの B 細胞減少がヒトで観察されたよりも軽度であったことに繋がった可能性が考えられた。

チンパンジーにおける循環血液中の T 細胞数は、ヒトでみられた変化と同様に一過性の減少が各投与後に観察された。これらの試験において、リンパ節生検を実施したところ、B 及び T 細胞に対する明らかな影響は、免疫染色では確認されなかった。炎症性サイトカインの遊離（IL-6、IL-2、IFN-γ、並びに TNF-α）が投与後にみられ、おおむね投与終了後 1～8 時間に最高濃度となった。この反応は初回投与後に最大となり、その後の投与による反応の程度は低下した。

チンパンジーでみられた他の変化として、心拍数及び体温の一過性の上昇がみられた。血圧に対する反応はばらついていたが、投与後おおむね低下する傾向が認められた。ブリナツモマブを投与したチンパンジー3 例中 2 例で大幅な血圧の低下がみられたが（103-PCD-0016 及び 103-PCD-0015 試験における 1 回目の投与時）、非経口の輸液及びドパミン処置により急速に回復した。他の 1 例では、すべての投与時において血圧は比較的安定していた。このことから、血圧の低下はサイトカインの影響等の可能性が考えられたが、詳細は明らかではなかった。血圧への影響は一過性であり、臨床上管理は可能であると考えられる。ECG については、ブリナツモマブ投与による影響は認められなかった。

4.2.3　マウスを用いた muS103new の反復投与毒性試験

BALB/c マウスを用い、GLP 適用下で muS103new による 4 週間反復静脈内投与毒性試験（103-PCD-0075 試験）、並びに 4 及び 13 週間反復皮下投与毒性試験（103-PCD-0074 試験、103-PCD-0082 試験）を実施した。4 週間反復静脈内投与試験では、muS103new の投与量として 0.2、1、及び 5 mg/kg を評価した。4 週間反復皮下投与毒性試験では、曝露量を増やすために 1 日 2 回投与とし、投与量 0.4、2、及び 10 mg/kg/日で実施した。13 週間反復皮下投与毒性試験では、muS103new を 1 日 2 回投与、投与量 2 及び 10 mg/kg/日で投与した。最高用量である 10 mg/kg/日（5 mg/kg/投与）は、1 日 2 回投与で投与できる最大量であった。muS103new の 2 mg/kg/日（1 mg/kg/投与）により、B 細胞の減少を指標にした薬理作用の最大効果が得られた。

muS103new 投与による主な所見は、ブリナツモマブ投与による薬理作用と一致しており、全試験におけるすべての用量で観察された、総白血球数及び総リンパ球数（B、T、ナチュラルキラー

［NK］、及びナチュラルキラーT［NKT］細胞）の減少であった。全般的に脾臓重量が減少し、脾臓、パイエル板、及びリンパ節を含むリンパ系組織において細胞数の低下が観察された。一部の動物では、脾臓に二次的な髄外造血が観察された。すべての変化について、投与経路及び投与期間にかかわらず、4 週間の休薬期間後に回復傾向がみられた。チンパンジーを用いた試験と異なり、マウスでは、サイトカイン遊離による二次的な生理反応やビリルビンあるいは肝酵素の変化、神経行動学的な変化の徴候等は認められなかった。また、チンパンジー及びヒトにおける T 細胞への影響が一過性であったことと異なり、マウスでは T 細胞数が長期間減少した。この理由は不明であるが、代替抗体の薬理作用による違い、あるいは持続静脈内投与とは異なり、急速反復投与による投与方法の違いを反映している可能性が考えられた。一般的に、T 細胞の再分布は各投与開始時からみられるため、マウスにおいて 1 日 1 回又は 1 日 2 回の投与を繰り返すことでより持続的な作用が惹起された可能性が考えられた。

4.3 遺伝毒性試験

ブリナツモマブは、天然のアミノ酸のみで構成される組換えタンパクであり、無機又は有機合成リンカーあるいは他に非タンパク質部分を含まない。これは、ブリナツモマブが DNA あるいは他の染色体物質と直接反応する可能性が極めて低いことを示す。したがって、ICH S6 (R1), 2011 に従い、遺伝毒性試験は実施しなかった。

4.4 がん原性試験

ブリナツモマブの作用機序に基づくと、本剤が腫瘍の発生又は増殖を誘発する可能性は極めて低い。本剤は進行性がんを適応症としているため、ICH S9, 2009 に従い、がん原性試験は実施しなかった。

4.5 生殖発生毒性試験

マウスにおける胚・胎児発生に対する影響について、Swiss 妊娠雌マウスに muS103new の 1 又は 5 mg/kg/日を着床から硬口蓋の閉鎖までの期間（妊娠 6～15 日）に急速静脈内投与して検討した。母体の一般状態、妊娠維持及び胚・胎児発生に有害な影響は認められなかった（103-PCD-0080 試験）。母体における血液検査での変化は muS103new の薬理作用と一致しており、総白血球数並びに B 及び T 細胞数の減少が認められた。胎児における血液学的影響については検討しなかった。

予備試験（103-PCD-0079 試験）において、一部の母体に muS103new の 5 mg/kg を妊娠 6～18 日に投与し、胎児の血清中濃度を測定したところ、妊娠 18 日における胎児血清中濃度は、母体の血清中濃度と比較して低かった（10.8 ng/mL）が、複数の腫瘍細胞株に対する muS103new の EC_{50} の範囲（0.04～1.3 ng/mL、103-PCD-0094 試験）を上回っていた。

ICH S9, 2009 では、適応患者が進行性がん患者である場合、一般的に受胎能に関する試験、並びに出生前及び出生後の発生に関する試験は必要ないとされており、これらの試験は実施しなかったが、マウスを用いた最長 13 週間の反復投与毒性試験では、雄及び雌の生殖器に muS103new の投与

に起因した所見は認められず、ブリナツモマブの作用機序を踏まえると、ブリナツモマブの投与により生殖機能への影響が生じる可能性は低いと考えられた。

4.6 局所刺激性試験

薬理活性を示さない動物種であるウサギを用い、局所刺激性試験（103-PCD-0010 試験）を実施した。5%ヒト血清アルブミンを溶媒とする処方により、ブリナツモマブの局所刺激性を評価した。ブリナツモマブの静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈周囲投与及び皮下投与により評価したが、いずれの投与経路においてもブリナツモマブは局所刺激性を示さなかった。

4.7 その他の毒性試験

4.7.1 免疫原性試験

非臨床試験の一部の動物で、ADA の発現がみられたが、全体的な曝露への影響はみられなかった（モジュール 2.6.4 第 1.1.2 項）。チンパンジーでは、1 例で投与後 6 週に ADA が低い抗体価で認められた。マウスにおいて、muS103new は低用量で抗原性を示したが（103-PCD-0089 試験、モジュール 2.6.6 第 2.7.1 項）、毒性試験で設定した投与量はこれよりも高く、ADA 存在下においても曝露が持続した（103-PCD-0074、103-PCD-0075、103-PCD-0082 試験）。ブリナツモマブは B 細胞を減少させるため、新たな抗原に対する抗体産生を抑制する可能性があるが、B 細胞数が大幅に減少した毒性試験において ADA の産生がみられたことは、体液性免疫が完全に障害されていないことを示している。一般に、動物でみられた外来物質に対する抗原性からは、ヒトにおける抗原性が予見できないと考えられており（Ponce et al, 2009；Bugelski and Treacy 2004；Koren et al, 2002）、非臨床試験における ADA の発現が患者に対する潜在的なリスクの存在を示すものではないと考えられた。

4.7.2 免疫系への影響

ブリナツモマブは免疫修飾因子であることから、非臨床試験において免疫系への影響を評価した。ヒトの血液細胞を用いた in vitro 試験では、ブリナツモマブは T 細胞存在下において、正常細胞及び腫瘍細胞株に関わらず、CD19 陽性 B 細胞を特異的に傷害することが示されている（Löffler et al, 2003、Dreier et al, 2002、Löffler et al, 2000、モジュール 2.6.2 第 3.2.1 項）。標的細胞の存在下でブリナツモマブが T 細胞に結合すると、一過性のサイトカイン産生（TNF-α、IFN-γ、IL-2、IL-6、IL-10）（モジュール 2.6.2 第 3.2.8 項及び第 3.5.2 項、Klinger et al, 2012、Brandl et al, 2007）及び活性化（CD25、CD69、及び細胞表面の接着分子の上方制御）を誘発する（モジュール 2.6.2 第 3.2.5 項、Klinger et al, 2012、Brandl et al, 2007）。また、T 細胞において、標的細胞の存在下でグランザイム B 及びパーフォリンの産生が亢進することが報告されている（Gruen et al, 2004）。また、ブリナツモマブとデキサメタゾンを併用した場合、デキサメタゾンはサイトカインの遊離を減少させるものの、B 細胞に対する細胞傷害作用は抑制しないことが報告されている（Brandl et al, 2007）。CD19 陽性標的細胞の存在下でブリナツモマブを長期間曝露させた場合、T 細胞の増殖も認められた（モジュール 2.6.2 第 3.2.5 項）。

マウスを用いた毒性試験において、muS103new の免疫毒性を評価する検査として、血液検査、血液中の B 及び T 細胞サブセットの免疫表現型解析並びにリンパ系組織の評価（臓器重量、病理組織学的検査、及び免疫表現型解析）を組み入れ、免疫毒性検査を実施した。血液検査では、総白血球数及びリンパ球数の明らかな減少がみられた。血中のリンパ球サブセットの免疫表現型解析では、B 細胞数の顕著な減少（> 90%）、CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞数の減少、NK 及び NKT 細胞数の減少、並びに T 細胞活性化マーカーである CD25 及び CD69 の増加が、投与量及び時間に依存して認められた。リンパ系組織では、作用機序と一致した影響が認められた。脾臓では体重に対する相対重量が減少し、白脾髄での細胞充実性の低下が観察された。末梢リンパ節では、胚中心発達の低下及び細胞数の低下がみられ、腸管系リンパ組織でも細胞数の低下が認められた。脾臓及びリンパ節組織における免疫表現型解析では、B 細胞数の減少、さらに T 細胞数の減少が認められた。マウスにおいて、これらの変化に起因した有害な影響及び感染症は認められなかった。リンパ系組織及び血液への影響は投与期間を通して持続し、すべての変化は 4 週間の休薬期間中に完全に回復するか、あるいは部分的な回復傾向を示した。以上のことから、muS103new の免疫系への影響は、予想された薬理作用に一致しており、また、投与後の回復性が確認された。

4.7.3　その他の試験：組織交差反応性

ブリナツモマブを用い、凍結ヒト組織切片に対する結合性について間接免疫ペルオキシダーゼ法を用いて検討した。ブリナツモマブの特異的な結合は、リンパ球に対してのみ観察され、また、扁桃、脾臓、胸腺及びリンパ節等リンパ系組織に多くみられた。他の組織に対しては、血管内、移行中、又は細胞間質にまれにみられるリンパ球への結合が認められたのみであった（モジュール 2.6.6 第 2.7.2.1 項）。

4.8　添加物：L-リシン塩酸塩

市販予定製剤において、静脈内投与用ブリナツモマブ溶液の調製に際し、ブリナツモマブの凍結乾燥粉末を無菌の注射用水で溶解する（Blincyto® Core Data Sheet）。溶解液は、0.9% NaCl 及び製剤に特異的な安定化剤を含む輸液バッグに添加する。

ブリナツモマブ溶液の総量 240 mL を、24 時間かけて患者に持続的に静脈内投与する場合、最終的な L-リシン塩酸塩の 1 日投与量（分子量 182.65 g/mol）は 1102.5 mg（L-リシンとして 882.5 mg）となる。

muS103new を用い、GLP 適用下で実施したマウス反復投与毒性試験における、溶媒対照中の L-リシン塩酸塩量を表 5 に示す。毒性試験には、市販予定製剤と比較して 3 倍高い濃度である 75 mM の L-リシン塩酸塩を含む溶媒が使用された（103-PCD-0075、103-PCD-0074、103-PCD-0082 及び 103-PCD-0080 試験）。マウスに対し、非経口投与で技術的に投与可能な最大容量の溶媒が投与されており、静脈内投与では 5 mL/kg が 1 日 1 回 4 週間投与され、皮下投与では 5 mL/kg が 1 日 2 回（総量 10 mL/kg/日）で最長 13 週間投与された。この結果、毒性試験におけるマウスへの L-リシン塩酸塩の総投与量は、静脈内投与で 68.47 mg/kg/日、皮下投与で 136.95 mg/kg/日であった。

これらの毒性試験では、L-リシン塩酸塩を含む溶媒の忍容性は良好であり、局所あるいは全身性の有害な影響は認められなかった。これらの試験でマウスに投与した L-リシン塩酸塩の体重当たりの総量は、成人に投与した時の少なくとも 5.6 倍（体重を 45 kg と想定）、小児に投与した時の少なくとも 1.2 倍（BSA を 0.4 と想定）に相当した。

また、L-リシンについて、外国で使用されている L-リシン含有医薬品の使用状況を確認したところ、多くは栄養補給用の静注製剤として市販されていた。最も高濃度の L-リシンを含有する製剤は ProSol であり、1 日投与量として L-リシン 115 mg/kg を含有する。成人患者の体重を 45 kg とした場合、ProSol 投与時における L-リシンの 1 日投与量は 5175 mg となり、本剤を静脈内投与した時の L-リシンの 1 日最大投与量である 882.5 mg を上回ることから、ヒトにおける安全性は確認されていると考えられた。公表論文から、L-リシンの反復静脈内投与毒性試験あるいはがん原性試験の報告は確認できなかった。しかし、一部の大腸菌株を用いた in vitro エイムズ試験試験において変異原性は確認されず、また、ラットを用いた腹腔内投与生殖発生毒性試験では 1212 mg/kg/日まで毒性が認められなかったことから、L-リシンのヒトに対する安全性は高いものと推測された（TRPT-024859）。

マウスを用いた毒性試験の結果、溶媒投与群において本剤をヒトに投与したときに含まれる量を上回る L-リシン塩酸塩が投与され、毒性所見が認められないこと、また、外国において本剤のヒト投与量を上回る L-リシン塩酸塩が静脈内投与にて既に使用されていることから、市販予定製剤に含まれる L-リシン塩酸塩の 1 日最大投与量をヒトに投与した場合の安全性は、確認できたものと判断した。

表 5　製剤の溶媒に L-リシン塩酸塩を使用した GLP 適合毒性試験及び申請製剤との安全性マージン

Study Title	Study Number	Route	Total Volume	Total Dose L-Lysine HCL	Multiple of Daily L-Lysine HCL Dose of Commercial Product Administered [a, b]
muS103new: Toxicity Study by Intravenous (bolus) Administration to Balb/c Mice for 4 Weeks Followed by a 4 Week Recovery Period	103-PCD-0075	IV bolus	5 mL/kg/day	68.47 mg/kg/day	Adult: 2.8 Pediatric: 0.6
muS103new: Toxicity Study by Subcutaneous Administration to BALB/c Mice for 4 Weeks Followed by a 4 Week Recovery Period	103-PCD-0074	SC	10 mL/kg/day	136.95 mg/kg/day	Adult: 5.6 Pediatric: 1.2
muS103new: Toxicity Study by Twice-Daily Subcutaneous Administration to BALB/c Mice for 13 Weeks Followed by a 4-Week Recovery Period	103-PCD-0082				
Study for Effects on Embryo-Fetal Development by Intravenous Route (Bolus) in Mice	103-PCD-0080	IV bolus	5 mL/kg/day	68.47 mg/kg/day	Adult: 2.8 Pediatric: 0.6

[a] 240 mL administered to 45 kg adult patient corresponds to 24.5 mg/kg/day L-Lysine HCL

[b] 240 mL administered to 0.4 BSA pediatric patient corresponds to 24 mL/kg/day or 110.3 mg/kg/day L-Lysine HCL

5. 考察及び結論

ブリナツモマブの非臨床プログラムのまとめは以下のとおりである。

- ブリナツモマブは、一本鎖の BiTE 抗体であり、T 細胞に発現する CD3 及び B 細胞に発現する CD19 に対して特異的に結合した。
- ブリナツモマブは、T 細胞と標的である B 細胞とを一時的に架橋することで、T 細胞介在性に CD19 陽性 B 細胞を傷害する（リダイレクト細胞溶解）。ブリナツモマブにより活性化された T 細胞は、複数のがん細胞に対し連続的に細胞傷害作用を示し、これは細胞傷害性 T 細胞の応答に類似していた。
- ブリナツモマブによる T 細胞の活性化は、CD19 陽性の標的 B 細胞の存在下においてのみ発現し、薬理作用はエフェクター細胞と標的細胞の幅広い比率で認められた。
- CD19 を発現しているヒト成人及び小児由来腫瘍細胞株は、ブリナツモマブによる細胞傷害に対する感受性を有していた（EC_{50} 値は 約 10～100 pg/mL）。
- ブリナツモマブは、NOC/SCID マウスを用いた in vivo 異種移植モデルにおいて、多様な固型及び播種性ヒト B 細胞性悪性腫瘍に対して活性が認められ、腫瘍増殖を抑制又は生存期間を延長させた。
- ブリナツモマブは T 細胞を活性化し、T 細胞活性化マーカー、細胞接着分子及びグランザイム B の発現上昇、並びに炎症性サイトカインの一過性の遊離及び T 細胞の増殖を引き起こした。
- 標的細胞の存在下において、ブリナツモマブは T 細胞を活性化し種々のサイトカイン（IL-6、IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4、IL-10、IL-17）を遊離させた。サイトカインの遊離は一過性であり、その遊離は初回投与後に最も顕著であり、2 回目以降の投与では減弱した。
- デキサメタゾンにより、ブリナツモマブによるサイトカインの遊離は抑制されたが、リダイレクト細胞溶解は抑制されなかった。
- 標的細胞の存在下でのブリナツモマブによる T 細胞の活性化により、TNF-α の産生が誘導され、TNF-α の産生に伴い内皮細胞の接着分子の発現が亢進した。
- ブリナツモマブは、T 細胞のローリング速度の低下及び T 細胞の内皮細胞への接着亢進を通じ、T 細胞の拡散を抑制する。In vitro において、内皮細胞あるいは T 細胞上の接着分子を阻害することで、T 細胞のローリング速度及び接着、並びに内皮細胞の活性化に対するブリナツモマブの作用は抑制された。
- ブリナツモマブを用いた非臨床試験において、動物での PK を検討したところ、ブリナツモマブを 0.06 µg/kg～2.5 mg/kg の用量範囲で単回及び反復投与した場合、概して線形性を示した。動物における本薬の排泄は急速であり、半減期は 1.7～8 時間であった。反復投与後の蓄積はほとんどみられなかった。
- ブリナツモマブのマウス代替抗体である muS103new の PK について、マウスを用いた毒性試験において 0.2～10 mg/kg の用量で検討したところ、概して線形性を示した。急速静脈内投与後の終末相半減期は 1.3 時間であり、反復投与後の蓄積性はほとんどみられなかった。TK において性差はみられなかった。一部の動物で ADA が検出されたが、曝露への実質的な影響は認められなかった。

- チンパンジーを用いた試験では、ブリナツモマブの薬理作用である B 細胞の減少、T 細胞の再分布及びサイトカインの遊離が認められた。チンパンジーにおいて、ブリナツモマブの 0.12 µg/kg を 2 時間持続投与したときに血圧の低下が認められた。チンパンジーで認められた作用は、一過性の血圧の低下、心拍数及び体温の一過性の上昇であり、いずれも既に明らかであるサイトカイン遊離の影響と一致するものであった。
- マウスを用い、muS103new を最大 10 mg/kg/日まで、最長 13 週間の反復皮下投与毒性試験を実施したが、安全性上懸念となる所見は認められなかった。
- マウスでみられた muS103new による変化は、作用機序（過剰な薬理作用）に関連しており、総白血球数及び総リンパ球数の減少、血液、リンパ節及び脾臓での B、T、NK 及び NKT 細胞の減少、T 細胞の活性化、脾臓重量の減少並びにリンパ系組織（脾臓、リンパ節及びパイエル板）での細胞数の低下が認められた。すべての所見は休薬期間中に回復、あるいは回復傾向を示した。
- マウスにおいて、muS103new を用いた胚・胎児発生に関する毒性試験を実施したところ、最大 5 mg/kg/日の静脈内投与において、母体及び胚・胎児発生への影響は認められなかった。妊娠末期の胎児には薬理作用を示す濃度の曝露が確認された。母体では B 及び T 細胞の減少が観察されたが、胎児では血液学的影響については検討していない。

ブリナツモマブに対し薬理活性を示さない動物種で安全性試験を実施したところ（イヌの心血管系に関する安全性薬理試験、ラット 2 週間反復投与毒性試験及びウサギ局所刺激性試験）、いずれの試験においても安全性上の懸念は認められなかった。

- ヒト組織を用いた ex vivo 組織交差反応性試験において、ブリナツモマブの結合はリンパ球に限定されていた。
- 臨床試験において神経学的事象が観察されたが、非臨床における有効性を評価する試験、安全性薬理試験、毒性試験及び脳室内持続投与試験において神経学的毒性の兆候は認められなかった。

ブリナツモマブは、ヒト及びチンパンジーの標的に対してのみ結合する。ヒト初回投与試験を支持するための初期の試験としては、ヒト細胞や組織を用いた ex vivo 試験及びチンパンジーを用いた試験を実施した。薬理試験では、ヒト細胞を用いた ex vivo 試験、あるいはマウスでの異種移植モデルにおいて、エフェクター細胞としてヒト PBMC 又は精製したヒト T 細胞を使用した。ブリナツモマブの薬理作用に起因しない毒性を検討する目的で、ラットを用いた反復投与毒性試験、イヌを用いた心血管系に対する安全性薬理試験及びウサギを用いた局所刺激性試験を実施した。毒性試験のため、マウスにおいて十分な結合親和性及び薬理活性を有するマウス代替抗体である muS103new を作製した。

最初の臨床試験は、ブリナツモマブを 2 時間で持続静脈内投与した。チンパンジーを用いた試験は、これと同じ投与方法を採用したが、マウス及びラットを用いた薬理作用に起因しない毒性を検討する試験では、急速静脈内投与を採用した。マウスにおける muS103new を用いた試験では、1 日 1 回の急速静脈内投与又は 1 日 2 回の皮下投与を採用した。1 mg/kg/日以上の muS103new の投与により最大の薬理作用（B 細胞の完全な枯渇）が確認された。チンパンジーを用いた試験では薬理作用が認められたが、最大投与量である 0.12 µg/kg/日においても B 細胞の完全な枯渇は観察されなか

った。反復投与毒性試験（103-PCD-0015 試験）において、チンパンジーは 2 時間の持続静脈内投与により総量としてブリナツモマブ 5.5～6.3 μg の投与を受けたが、クリアランスが急速であること及び 7 日間の投与間隔を設定したことから、最大の薬理効果に到達しなかった。2 時間の持続投与において採用したチンパンジーへの投与量は、血圧の低下がみられたため、投与量の増量は不可能であった。

ブリナツモマブ及び muS103new による全体的な非臨床毒性学的プロファイルから、これらの分子の忍容性は良好であり、望ましい薬理作用が得られ、薬理作用に関連しない全身的影響を有さないことが示された。

チンパンジーを用いた安全性試験では、B 細胞の減少、T 細胞の再分布及びサイトカインの遊離がみられ、さらに、一過性の血圧の低下、心拍数及び体温の一過性の上昇がみられ、いずれも既に明らかであるサイトカイン遊離の影響に一致するものであった。チンパンジーを用いた最初の試験において、ブリナツモマブの 2 回目の持続投与後 8 日に一般状態の悪化のため、1 例を安楽死させたが、その後、漏出性の急性細菌性肺気管支肺炎に加えて、慢性ウイルス性間質性胸膜肺炎の既往があったと結論付けられた。本感染症におけるブリナツモマブの関与については不明であった。その後実施した、チンパンジーを用いた安全性試験では、ブリナツモマブの忍容性は良好であった。血圧の低下により投与量の漸増が制限された。チンパンジーにおいて、薬理学的に最大の効果を示す用量まで評価することはできなかったが、B 細胞数の減少、T 細胞の活性化、T 細胞の再分布及びサイトカインの遊離等、予想された薬理作用が確認できた。

マウスにおいて観察された muS103new の影響も、薬理作用として予測されたものであった（T 細胞の活性化、サイトカインの産生、及び B 細胞の持続的な減少）。また、muS103new では、ヒトで観察されたのとは異なり、投与期間を通して持続的な T 細胞の減少が認められた。これが、代替抗体の薬理作用による違いによるか、あるいは急速かつ反復投与したことにより、持続静脈内投与とは異なった投与方法によって誘発されたかは不明であった。muS103new を用いた試験では、懸念される毒性学的所見は認められなかった。

ヒト初回投与試験に先立ち、イヌにおいてブリナツモマブの心血管系に関する安全性試験を実施したところ、影響は認められなかった。イヌはブリナツモマブの薬理活性がみられない動物種であるため、当該試験の意義は限定的であった。チンパンジーを用いた試験において、ブリナツモマブの各投与後の複数時点で ECG を評価したところ、変化は観察されなかった。呼吸系及び中枢神経系の安全性薬理学的評価については、muS103new を用いマウスを対象として検討したが、muS103new に関連した影響は認められなかった。臨床試験において神経学的な事象が観察されたことから、マウスを用い、muS103new を側脳室に直接持続注入することにより（局所的に曝露量を増加させるため）神経学的な影響について検討した。当該試験及び muS103new を用いたいずれの一般毒性試験及びブリナツモマブを用いたチンパンジーの試験においても神経学的な影響は認められなかった。

ブリナツモマブの安全域の算出は不可能であった。薬理活性を示す動物種を対象として実施した非臨床試験は、チンパンジーにおける試験のみであった。チンパンジーへの投与は週 1 回、2 時間の静脈内投与であり、臨床試験におけるヒトへの投与は 28 日間にわたる持続静脈内投与であることから、チンパンジーを用いた試験と臨床試験での曝露量を比較することは不可能である。チンパンジーにおいては、2 時間の持続投与中、1 分間あたりの薬剤量がヒトと比較して高く投与されている

ものの、1 日あたりの投与量で比較した場合、ヒトでの投与と比べ 1 日あたりの総量のマージンは 1 を下回っていた。また、毒性試験成績の大半は muS103new を用いて検討したため、マウスでの投与量をヒトにおけるブリナツモマブの投与量と直接比較することはできない。muS103new を用いた試験成績は、本分子の薬理活性に関連した潜在的な有害作用を特定する上で有用であるが、ブリンツモマブのヒトにおける曝露量と直接関連付けることはできなかった。ちなみに、マウスにおいて最大の薬理反応を示す用量よりも 5 倍以上高い用量を用い、muS103new を最長 13 週間反復投与した結果、予測外の標的臓器毒性は認められなかった。

これらの非臨床試験成績は、ヒトのリスクに関連する安全上の懸念はないことを示していた。

結論として、今回実施した薬力学、PK 及び毒性に関する結果は、再発又は難治性の B-ALL 患者の治療において、単剤としてブリナツモマブを使用する際に推奨される用量、投与経路、及び投与スケジュールでの製造販売承認申請が適切であることを裏付けるものであった。

6. 参考文献

Agatonovic-Kustrina S, Ling LH, Tham SY, et al. Molecular descriptors that influence the amount of drugs transfer into human breast milk. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 20 June 2002;29(1-2):103-119

Anderson GD. Using pharmacokinetics to predict the effects of pregnancy and maternal-infant transfer of drugs during lactation. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2006;2:947-960.

Arad U, Tzadok S, Amir S, et al. The cellular response to influenza vaccination is preserved in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab. Vaccine 2011;29:1643-1648.

Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R. BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. Curr Opin Molec Therapeutics. 2009;11:22-30.

Bahna SL, Keller MA, Heiner DC. IgE and IgD in human colostrum and plasma. Pediatr Res. 1982;16(8):604-607.

Baumgart DC, Lowder JN, Targan SR, et al. Transient cytokine-induced liver injury following administration of the humanized anti-CD3 antibody visilizumab (HuM291) in Crohn's Disease. Am J Gastroenterol. 2009;104:868-876.

Blüml S, McKeever K, Ettinger R, et al. B-cell targeted therapeutics in clinical development. Arthritis Research & Therapy 2013;15(Suppl 1):S4-S25.

Brandl C, Haas C, d'Argouges S, et al. The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct. Cancer Immunol Immunother. 2007;56:1551-1563.

Brischwein K, Parr L, Pflanz S, et al. Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class. J Immunother. 2007;30:798-807.

Bugelski PJ, Achuthanandam R, Capocasale RJ, et al. Monoclonal antibody-induced cytokine-release syndrome. Expert Rev Clin Immunol. 2009;5:499-521.

Bugelski PJ and Treacy G. Predictive power of preclinical studies in animals for the immunogenicity of recombinant therapeutic proteins in humans. Curr Opin Molec Ther. 2004;6:10-16.

d'Argouges S, Wissing S, Brandl,C, et al. Combination of rituximab with blinatumomab (MT103/MEDI-538), a T cell-engaging CD19-/CD3-bispecific antibody, for highly efficient lysis of human B lymphoma cells. Leuk Res. 2009;33:465-473.

Del Nagro CJ, Otero DC, Anzelon AN, et al. CD19 function in central and peripheral B-cell development. Immunologic Res 2005;32:119-131.

Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, et al. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. Int J Cancer. 2002;100:690-697.

Dreier T, Baeuerle PA, Fichtner I, et al. T cell co-stimulus-independent and very efficacious inhibition of tumor growth in mice bearing subcutaneous or leukemic human B cell lymphoma xenografts by a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. J Immunol. 2003;170:4397-4402.

Eisenberg RA, Jawad AF, Boyer J, et al. Rituximab-treated patients have a poor response to influenza vaccination. J Clin Immunol. 2013;33:388-396.

Engel P, Zhou L-J, Ord DC, et al. Abnormal B lymphocyte development, activation and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. Immunity. 1995;3:39-50.

Gruen M, Bommert K, Bargou RC. T-cell-mediated lysis of B cells induced by a CD19xCD3 bispecific single-chain antibody is perforin dependent and death receptor independent. Cancer Immuno Immunother. 2004;53:625-632.

Haas C, Krinner E, Brischwein K, et al. Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. Immunobiology. 2009;214:441-453.

Hale TW.Drug Therapy and Breastfeeding. In: Riordan J, ed. Breastfeeding and Human Lactation. 3rd ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 2005:137-166.

Hoffmann P, Hofmeister R, Brischwein K, et al. Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. Int J Cancer. 2005;115:98-104.

Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, et al. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1988;72:299-307.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. S6 (R1): Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals (Step 4), 2011. Available at: http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html

ICH Harmonized Tripartite Guideline. S9:Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals (Step 4), 2009. Available at: http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html

Ito S and Lee A. Drug excretion into breast milk--overview. Adv Drug Deliv Rev. April 29 2003;55(5):617-627.

Kane S, Ford J, Cohen R,et al. Absence of Infliximab in Infants and Breast Milk from Nursing Mothers Receiving Therapy for Crohn's Disease Before and After Delivery. J Clin Gastroenterol. 2009;43(7):613-616.

Kischel R, Hausmann S, Klinger M, et al. Effector memory cells make a major contribution to redirected target cell lysis by T cell-engaging BiTE antibody MT110. AACR Meeting Poster 2009: 3252

Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, et al. Immunopharmacological response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. Blood. 2012;119:6226-6233.

Koren E, Zuckerman LA and Mire-Sluis AR. Immune responses to therapeutic proteins in humans- Clinical significance, assessment and prediction. Curr Pharmaceut Biotechnol. 2002;3:349-360.

Kumar A, Hale T, Mock R. Transfer of interferon alfa into human breast milk. J Hum Lact. August 2000;16(3):226-228.

LeBien TW and Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. Blood 2008;112:1570-1580.

Lee JI, Zhang L, Men AY, et al. CYP-mediated therapeutic protein-drug interactions: clinical findings, proposed mechanisms and regulatory implications. Clin Pharmacokinet. 2010;49:295-310.

Löffler A, Kufer P, Lutterbuse R, et al, Schwenkenbecher JM, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3 induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. Blood. 2000;95:2098-2103.

Löffler A, Gruen M, Wuchter C, et al. Efficient elimination of chronic lymphocytic leukemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. Leukemia 2003;17:900-909.

Lowin B, Peitsch MC, Tschopp J. Perforin and Granzymes: Crucial Effector Molecules in Cytolytic T Lymphocyte and Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. Pathways for Cytolysis. Cur Topics Microbio Immun. 1995;198:1-24.

Mahadevan U, Kane S, Sandborn W, et al. Intentional infliximab use during pregnancy for induction or maintenance of remission in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2005;21(6):733-738.

Millard PJ, Henkart MP, Reynolds CW, et al. Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. J Immunol. 1984;132(6):3197-3204.

Muldoon LL, Pishko GL, Wu J, et al. BiTE antibody AMG-103 (blinatumomab) in rat models of human CNS B-cell lymphoma: MRI of brain and tumor vasculature. Final Report July 2014.

Nadler LM, Anderson KC, Marti G, et al. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated and malignant B lymphocytes. J Immunol. 1983;131:244-250.

Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, et al. Blinatumomab: A historical perspective. Pharmacol Therapeut. 2012;136:334-342.

Offner S, Hofmeister R, Romaniuk A, et al. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. Mol Immunol. 2006;43:763-771.

Ostensen M and Eigenmann GO. Etanercept in breast milk. J Rheumatol. 2004;31(5):1017-1018.

Ponce R, Abad L, Amaravadi L, et al. Immunogenicity of biologically-derived therapeutics: Assessment and interpretation of nonclinical safety studies. Regul Toxicol Pharmacol.2009;54:164-182.

Raponi S, De Propris MS, Intoppa S, et al. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: Analysis of 552 cases. Leuk Lymphoma 2011;52:1098-1107.

Reese J, Raghuveer TS, Dennington PM, et al. Breast feeding in neonatal alloimmune thrombocytopenia. J Paediatr Child Health. 1994;30(5):447-449.

Scheuermann Rh and Racila E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. Leuk Lymphoma. 1995;18:385-397.

Schlereth B, Quadt C, Dreier T, et al. T-cell activation and B-cell depletion in chimpanzees treated with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. Cancer Immunol Immunother. 2006;5:503-514.

Soussain C, Muldoon LL, Varallyay C, et al. Characterization and magnetic resonance imaging of a rat model of human B-cell central nervous system lymphoma. Clin Cancer Res. 2007;13:2504-2511.

Talanian RV, Yang XE, Turbov J, et al. Granule-mediated Killing: Pathways for Granzyme B-initiated Apoptosis. J Exp Med. 1997;186(8):1323-1331.

van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. New Eng J Med. 2006;354:1901-1912.

Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, et al. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. J Pharmacol Toxicol. Methods 2008;58:72-76.

Vargas HM, Amouzadeh HR, Engwall ME. Non-Clinical Strategy Considerations for Safety Pharmacology: Evaluation of Biopharmaceuticals. Expert Opin Drug Safety 2013;12:91-102.

Vasiliauskas EA, Church JA, Silverman N, et al. Case report: evidence for transplacental transfer of maternally administered infliximab to the newborn. Clin Gastroenterol Hepatol. 2006;4(10):1255-1258.

Vugmeyster Y, Xu X, Theil F-P, et al. Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. World J Biol Chem. 2012; 3:73-92.

Wang K, Wei, G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. Exp Hematol Oncol. 2012;1:36.

Yang X, Stennicke HR, Wang B, et al. Granzyme B Mimics Apical Caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. J Bio Chem. 1998;273:34278-34283.

Yazawa N, Hamaguchi Y, Poe JC, et al. Immunotherapy using unconjugated CD19 monoclonal antibodies in animal models for B lymphocyte malignancies and autoimmune disease. Proc Natl Acad Sci. 2005;102:15178-15183.

Yri, OE, Torfoss D, Hungnes O, et al. Rituximab blocks protective serologic response to influenza A (H1N1) 2009 vaccination in lymphoma patients during or within 6 months after treatment. Blood 2011;118:6769-6771.

TRPT-024859: L-Lysine: Derivation of a Toxicology-based Limit. 2017