2.6.1、2.6.2 及び 2.6.3 の略号等一覧

略語（略称）	英語	日本語
ADA	Anti-drug antibodies	抗薬物抗体
ADC	Antibody-drug conjugate	抗体薬物複合体
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害作用
ADCP	Antibody-dependent cellular phagocytosis	抗体依存性細胞貪食作用
APRIL	A proliferation-inducing ligand	－
AUC	Area under the curve	濃度－時間曲線下面積
BAFF	B-cell activating factor	B 細胞活性化因子
BCMA	B-cell maturation antigen	B 細胞成熟抗原
BET	Bromodomain and Extra-Terminal motif	－
BMSC	Bone marrow stromal cells	骨髄間質細胞
BPd	Belantamab mafodotin in combination with pomalidomide and dexamethasone	ベランタマブ　マホドチン＋ポマリドミド＋デキサメタゾン
BVd	Belantamab mafodotin in combination with bortezomib and dexamethasone	ベランタマブ　マホドチン／ボルテゾミブ／デキサメタゾン
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CI	Confidence interval	信頼区間
Cmax	Maximum observed plasma drug concentration	最高血漿中薬物濃度
CRT	Calreticulin	カルレティキュリン
Cys-mcMMAF	Cysteine maleimidocaproyl MMAF, the active cytotoxic moiety released from belantamab mafodotin (also known as SGD-1362)	システインマレイミドカプロイル MMAF、ベランタマブ　マホドチンから放出される細胞傷害性活性部分（別名 SGD-1362）
DAMP	Damage associated molecular patterns	ダメージ関連分子パターン
DAR	Drug-antibody ratio	薬物抗体比
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNMT	DNA methyltransferase	DNA メチルトランスフェラーゼ
DP	Drug product	製剤
DS	Drug substance	原薬
EC50	Concentration that demonstrates 50% maximal efficacy	50%有効濃度
ECG	Electrocardiogram	心電図
eIF2α	Eukaryotic initiation factor 2	真核生物翻訳開始因子 2
EL4-hBCMA	EL4 lymphoma tumors expressing human BCMA	ヒト BCMA を発現させた EL4 リンパ腫細胞株
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2	－
FcRn	Neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
FcγR	Fc gamma receptors	Fcγ 受容体
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
GSI(s)	Gamma secretase inhibitors	γ セクレターゼ阻害剤

略語（略称）	英語	日本語
HEK293	Human embryonic kidney cell line	ヒト胎児腎細胞株
hERG	Human ether-à-go-go-related gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
H&E	Hematoxylin and eosin	ヘマトキシリン&エオジン
HMGB1	High mobility group box 1	非ヒストン DNA 結合蛋白質
HSP	Heat shock protein	熱ショックタンパク質
IC50	Concentration that demonstrates 50% inhibition	50%阻害濃度
ICD	Immunogenic cell death	免疫原性細胞死
ICH	International Council for Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
ICOS	Inducible T cell co stimulator	－
iDC	Immature dendritic cells	未成熟樹状細胞
IFN-γ	Interferon-gamma	インターフェロン-γ
Ig	Immunoglobulin	免疫グロブリン
IHC	Immunohistochemistry	免疫組織化学
IL	Interleukin	インターロイキン
IP	Intraperitoneal	腹腔内
IV	Intravenous	静脈内
ka	Association rate constant	結合速度定数
kd	Dissociation rate constant	解離速度定数
Kd	Equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
LSD1	Lysine-specific demethylase 1	リジン特異的脱メチル化酵素 1
MM	Multiple myeloma	多発性骨髄腫
MMAE	Monomethyl auristatin	モノメチルアウリスタチン E
MMAF	Monomethyl auristatin F	モノメチルアウリスタチン F
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	マクロファージコロニー刺激因子
NFAT	Nuclear factor of activated T cells	－
NF-κB	Nuclear factor-kappaB	核内因子 κB
NK	Natural killer	ナチュラルキラー
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核細胞
PD	Pharmacodynamic(s)	薬力学
PD-1	Programmed cell death protein 1	－
PERK	PKR like ER kinase	PKR 様小胞体キナーゼ
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
PO	Peroral	経口
PRMT	Protein arginine methyltransferase	蛋白質アルギニンメチルトランスフェラーゼ
rhBCMA ECD	Soluble recombinant BCMA extracellular domain	遺伝子組み換え可溶性 BCMA 細胞外ドメイン
sBCMA	Soluble BCMA	可溶性 BCMA
SC	Subcutaneous	皮下
SCID	Severe combined immune-deficient	重症複合免疫不全
SPR	Surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴法
TIL	Tumor infiltrating lymphocyte	腫瘍浸潤リンパ球

略語（略称）	英語	日本語
TK	Toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
TLR4	Toll-like receptor 4	Toll 様受容体 4
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha	腫瘍壊死因子 α

2.6.1. 緒言

ベランタマブ　マホドチン（遺伝子組換え）（GSK2857916）は、B 細胞成熟抗原（BCMA）に特異的に結合するヒト化 IgG1 抗体に微小管阻害剤であるモノメチルアウリスタチン F（MMAF）を結合させた抗体薬物複合体（ADC）である。ベランタマブ　マホドチンは、低フコース化した抗 BCMA 親抗体（GSK2857914）を部分的に還元し、鎖間システイン残基に MMAF をプロテアーゼ耐性マレイミドカプロイル（mc）リンカーで結合させることにより製造する。細胞内で抗体部分が蛋白質分解を受けて活性型細胞傷害性薬物（cys-mcMMAF；SGD-1362 とも表される）が放出されると、微小管が崩壊することにより細胞周期停止及びアポトーシスが誘導され、細胞が殺傷される[Doronina, 2006]。ベランタマブ　マホドチンの平均薬物抗体比（DAR）は 4 である［2.3.S.1.3. 一般特性（ベランタマブ　マホドチン）］。

多発性骨髄腫（MM）は、形質細胞の単クローン性／腫瘍性増殖及び形質細胞から産生される免疫グロブリン蛋白（M 蛋白）の増加を特徴とする難治性疾患である[Furukawa, 2015; Kumar, 2004]。MM の特徴的な症状として、骨痛や病的骨折、高カルシウム血症、腎不全、貧血、血小板減少及び感染症等が知られている[Kumar, 2004]。

近年、MM に対する治療法は急速に進歩しているものの、以下の特徴を有する新たな治療選択肢が依然として必要とされている。

（1）高い有効性を有し、患者の関連症状を改善可能である

（2）現行治療に対する耐性を克服できる新規の作用機序を有する

BCMA は、184 のアミノ酸から成る膜貫通型受容体であり[Laabi, 1994; Rickert, 2011]、2 種類の既知のリガンド［BAFF（又は BLyS とも呼ばれる）及び APRIL］のシグナルを伝達することで細胞の生存に関与している。BCMA は、B 細胞の分化段階後期に限定して発現しており、扁桃胚中心 B 細胞、血中形質芽細胞及び長期生存形質細胞に認められ、正常組織にはほとんど発現がみられない[Darce, 2007; Tai, 2015]。B 細胞の関与する疾患において過剰発現がみられることから、BCMA を標的とした ADC は、細胞傷害性分子を標的細胞に特異的に送達させ、BCMA 発現細胞を選択的に殺傷することが可能となる。ベランタマブ　マホドチンは、MM 細胞表面に発現している BCMA に結合すると速やかに細胞内に取り込まれ、細胞内で抗体部分が蛋白質分解を受けて活性型細胞傷害性薬物（cys-mcMMAF）が放出されると、微小管が崩壊することにより細胞周期停止及びアポトーシスが誘導され、細胞が殺傷される。また、ベランタマブ　マホドチンは低フコース化された抗体であるため、免疫細胞（NK 細胞及びマクロファージ等）に存在する FcγR への結合親和性が増強しており、MM 細胞に対して強力な ADCC 及び ADCP 活性を有する。ベランタマブ　マホドチンのペイロード部分である MMAF は、微小管形成阻害作用を有する天然化合物ドラスタチンの合成アナログであるが、ドラスタチンは免疫原性細胞死（ICD）を誘導することが知られている[Doronina, 2003]。ドラスタチンと同様に、ベランタマブ　マホドチンによって ICD が誘導されるかについて検討したところ、ベランタマブ　マホドチンによる ADC 誘導性アポトーシスによって ICD マーカーの誘導及び樹状細胞の活性化が認められたことから、ベラン

タマブ　マホドチンの作用機序にT細胞を介した腫瘍免疫応答が関与する可能性が考えられた。

ベランタマブ　マホドチンはB細胞系列の細胞に発現するBCMAを標的としているため、再発又は難治性の多発性骨髄腫の新たな治療選択肢となりうる。再発又は難治性の成人MMの患者を対象として実施した国際共同第Ⅲ相試験［ボルテゾミブ及びデキサメタゾンとの3剤併用療法（BVd）を評価したDREAMM-7試験及びポマリドミド及びデキサメタゾンとの3剤併用（BPd）療法を評価したDREAMM-8試験］で得られた有効性・安全性の結果（2.5.4及び2.5.5）から、「少なくとも1つの標準的な治療が無効又は治療後に再発したMM」を適応症として承認申請を行うこととした。

ベランタマブ　マホドチンの推奨用量は2.5 mg/kg（実測体重）であり、BVd併用療法では、3週間間隔で点滴静注する。BPd療法では、初回は2.5 mg/kg、2回目以降は1.9 mg/kgを4週間間隔で点滴静注する。患者の状態により適宜減量する。本用法・用量は安全性及び有効性データに基づき設定した（2.5）。

市販用製剤（ブーレンレップ点滴静注用）は、有効成分としてベランタマブ　マホドチン（遺伝子組換え）を含有する点滴静注用凍結乾燥製剤である。製剤は、[redacted] mg/mL ベランタマブ　マホドチン、[redacted] mmol/L クエン酸ナトリウム／クエン酸、[redacted] mmol/L トレハロース、[redacted] mmol/L エデト酸ナトリウム及び[redacted]ポリソルベート80（pH [redacted]）を含む製剤バルク溶液から製造する。凍結乾燥製剤は、未処理のタイプIの透明ガラスバイアルに充てんし、凍結乾燥後、[redacted]、[redacted]製ゴム栓で打栓し、[redacted]の付いた[redacted]で密封する（3.2.P.1）。

非臨床開発計画

ベランタマブ　マホドチンの非臨床薬理試験、吸収・分布・代謝・排泄（ADME）試験及び毒性試験を実施した。ベランタマブ　マホドチンは抗悪性腫瘍薬であることから、非臨床試験はICH S6(R1)、ICH S7A、ICH S9及びICH S9 Q&Aガイドラインに従い、ADC治療薬の特性を考慮して計画・実施した。すなわち、低分子医薬品で通常実施する試験のうち、ベランタマブ　マホドチンの開発に適していると考えられる試験を実施した。

主要な毒性試験はGLPに従って実施し、また、OECDガイドラインに従いOECD加盟国で実施した。その他の試験は、一般的に科学的妥当性が認められた手法に従い、適切な試験方法で実施した。非臨床試験の投与経路は、予定臨床投与経路である静脈内とした。

ベランタマブ　マホドチンの非臨床試験の多くは、市販予定製剤と同等の被験物質を使用した。本項では、ベランタマブ　マホドチンと表記した。非臨床試験で使用した種々の抗BCMA抗体及びADC、並びに関連するその他の被験物質の詳細は2.6.2の表2.6.2.1に示した。ベランタマブ　マホドチンの非臨床プロファイルを更に明確にするために、cys-mcMMAF（細胞傷害性活性部分）及びGSK2857914（ベランタマブ　マホドチンの抗体部分）を用いて評価した。GSK2857914については、国際一般名（INN）であるbelantamabとは表記せず、読みやすさ及び明確化のため、本項及び2.6ではGSK2857914と表記した。

ヒトでの予定投与経路である静脈内投与により試験を実施した。非臨床試験は、ラット、ウサギ及びサルを用いて実施した。ベランタマブ　マホドチンはサル BCMA に対して結合することが示されており、サル BCMA に対する親和性は、ヒト BCMA に対する親和性よりもわずかに高いことが示されている（2.6.2.2.1）。カニクイザルを用いた単回投与薬理試験において、ベランタマブ　マホドチンの投与により BCMA 発現形質細胞の減少がみられ、それに関連して免疫グロブリン濃度が低下することが示された（2.6.2.2.5）。したがって、毒性試験に用いる動物種は、薬理学的に適切なカニクイザルを選択した。ベランタマブ　マホドチンはラットの BCMA には結合せず、ウサギの BCMA に結合する可能性は低い。しかし、アウリスタチン結合型 ADC の用量制限毒性はアウリスタチン単独での用量制限毒性と概ね類似しており、抗原結合に依存しないことから[Donaghy, 2016]、ラットを用いた毒性評価、並びにウサギを用いた眼毒性の評価を実施した。

実施した非臨床試験の概要

効力を裏付ける試験では、in vitro 試験において BCMA に対する結合親和性及び種特異性、MM 細胞に対する増殖抑制作用並びに作用機序（ADC としての作用、ADCC 及び ADCP 活性並びに免疫原性細胞死の誘導）を検討した。また、in vivo 試験において、種々のヒト MM 細胞株異種移植マウス及び EL4-hBCMA 細胞株移植マウスにおいてベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍作用を評価した。更に、他の抗がん剤との併用したときのベランタマブ　マホドチンの有効性を評価する in vitro 及び in vivo 試験も実施した。

副次的薬理試験では、BCMA とそのリガンドである BAFF 又は APRIL との結合に対する GSK2857914 の阻害作用を、無細胞プレートアッセイで検討した。また、ヒト培養細胞を用いて、ベランタマブ　マホドチンが NF-κB シグナル伝達経路に対する活性化作用を有するかを検討した。更に、ベランタマブ　マホドチンの標的が BCMA 発現 MM 細胞に選択的であるかを確認するため、MM 細胞以外のその他の細胞種に対するベランタマブ　マホドチンの作用を検討した。

ベランタマブ　マホドチンの安全性薬理試験として独立した試験は実施していないが、ICH S9、ICH S7A 及び S7B ガイドラインに従い、サルを用いたベランタマブ　マホドチン、GSK2857914 及び cys-mcMMAF の反復投与毒性試験において、心血管系及び／又は呼吸系に対する影響を評価した。中枢神経系に対する作用は、ラット及びサルを用いたベランタマブ　マホドチンの反復投与毒性試験の IV 投与後にケージサイドで一般状態の観察を行って評価した。また、cys-mcMMAF については、in vitro において hERG アッセイを実施し、QT 間隔を延長する可能性を評価した。

ベランタマブ　マホドチンの吸収・分布・代謝・排泄（ADME）試験では、ベランタマブ　マホドチンの薬物動態学的特性を評価し、毒性試験に使用する動物種の適切性について検討した。

ベランタマブ　マホドチンの Wistar Han ラット及びカニクイザルを用いた静脈内投与による単回投与毒性試験及び最長 13 週間の反復投与毒性試験を実施した。これらの試験では、最長 12 週間の休薬期間を設け回復性を評価した。また、免疫原性についても評価した。更に、ベランタマブ　マホドチンの特性を明らかにするために、GSK2857914 のカニクイザル

を用いた最長 13 週間の反復投与毒性試験並びに線形異性体 cys-mcMMAF の SD ラット及びカニクイザルを用いた 5 日間反復投与毒性試験を実施した。ベランタマブ　マホドチンのヒト組織結合能を評価するための ex vivo 組織交差反応性試験、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を用いた in vitro のサイトカイン放出試験、眼毒性の発現機序を検討するための探索的 in vitro 及び in vivo 試験、並びにベランタマブ　マホドチン（in vitro 小核試験）及び cys-mcMMAF の遺伝毒性試験を実施した。ベランタマブ　マホドチンの局所刺激性並びに適応免疫応答（免疫フェノタイピング）及び雌雄受胎能（組織学的評価のみ）に対する影響については、ラット及びサルの単回及び反復投与毒性試験成績を基に評価した。ベランタマブ　マホドチンの免疫毒性については、非臨床及び臨床データ並びに予想される薬理作用に基づき評価した。

ベランタマブ　マホドチンの生殖発生毒性試験及び幼若動物を用いた毒性試験、GLP 適用下での遺伝毒性試験並びにがん原性試験は実施していないが、ヒトリンパ球を用いた in vitro 小核試験により、染色体構造異常及び異数性誘発能を評価している[ICH, 2009; ICH, 2016; ICH, 1995]。cys-mcMMAF の変異原性及び染色体異常誘発性については、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）、哺乳類細胞を用いるマウスリンフォーマ TK 試験及びラットを用いた静脈内投与による小核試験により評価した。また、ベランタマブ　マホドチン（mcMMAF を含む）の合成経路を基に遺伝毒性不純物が原薬又は製剤に含まれる可能性について評価した。

薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の詳細は、2.6.2～2.6.7 に示す。最終報告書及び公表文献はモジュール 4 に添付した。

参考文献

Darce J R, Arendt B K, Wu X, Jelinek D F. Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. J Immunol. 2007 Dec 1;179(11):7276-86.

Donaghy H. Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates. MAbs. 2016;8(4):659–671.

Doronina, S O, Toki B E, Torgov, M Y, Mendelsohn, B A, Cerveny, C G, Chace D F et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology. 2003;21, 778–784.

Doronina S, Mendelsohn B, Bovee T, Cerveny C, Alley S, Meyer D, et al. Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. Bioconjugate Chemistry. 2006;17:114-24.

Furukawa Y, Kikuchi J. Molecular pathogenesis of multiple myeloma. Int J Clin Oncol 2015;20:413-22.

Kumar S K, Therneau T M, Gertz M A, et al. Clinical course of patients with relapsed multiple myeloma. Mayo Clin Proc 2004;79(7):867-874.

Laabi Y, Gras MP, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, Tsapis A. The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed. Nucleic Acids Res. 1994 Apr 11:22(7);1147-54.

Rickert, RC, Jellusova, J and Miletic, A. V. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. Immunological reviews, 2011;244(1):115-33.

Tai Y T and Anderson K C. Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma. Immunotherapy. 2015;7(11):1187-99.

2.6.2. 薬理試験の概要文

2.6.2.1. まとめ

ベランタマブ　マホドチン（遺伝子組換え）（GSK2857916）は、B 細胞成熟抗原（BCMA）に特異的に結合するヒト化 IgG1 抗体に微小管阻害剤であるモノメチルアウリスタチン F（MMAF）を結合させた抗体薬物複合体（ADC）である。ベランタマブ　マホドチンは、低フコース化した抗 BCMA 親抗体（GSK2857914）を部分的に還元し、鎖間システイン残基に MMAF をプロテアーゼ耐性マレイミドカプロイル（mc）リンカーで結合させることにより製造する。細胞内で抗体部分が蛋白質分解を受けて活性型細胞傷害性薬物（cys-mcMMAF）が放出されると、微小管が崩壊することにより細胞周期停止及びアポトーシスが誘導され、細胞が殺傷される[Doronina, 2006]。ベランタマブ　マホドチンの平均薬物抗体比（DAR）は約 4 である［2.3.S.1.3. 一般特性（ベランタマブ　マホドチン）］。

BCMA は、184 のアミノ酸から成る膜貫通型受容体であり[Laabi, 1994; Rickert, 2011]、2 種類の既知のリガンド［BAFF（又は BLyS とも呼ばれる）及び APRIL］のシグナルを伝達することで細胞の生存に関与している。BCMA は、B 細胞の分化段階後期に限定して発現しており、扁桃胚中心 B 細胞、血中形質芽細胞及び長期生存形質細胞に認められ、正常組織にはほとんど発現がみられない[Darce, 2007; Tai, 2015]。B 細胞の関与する疾患において過剰発現がみられることから、BCMA を標的とした ADC は、細胞傷害性分子を標的細胞に特異的に送達させ、BCMA 発現細胞を選択的に殺傷することが可能となる。

ベランタマブ　マホドチンは抗悪性腫瘍薬であることから、非臨床試験は ICH S9 ガイドライン及び ICH S9 ガイドラインに関する質疑応答集に従うとともに、適宜、ICH S6（R1）ガイドラインを参照し、ADC であることについても考慮して試験を計画・実施した。すなわち、低分子医薬品に対して通常実施される多くの試験のうち、ADC である本薬の評価に適すると考えられる試験を実施した。

効力を裏付ける試験では、in vitro 試験において BCMA に対する結合親和性及び種特異性、多発性骨髄腫（MM）細胞に対する増殖抑制作用並びに作用機序を検討した。また、in vivo 試験において、種々のヒト MM 細胞株異種移植マウスを用いてベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914（ベランタマブ　マホドチンの抗体部分）の抗腫瘍効果を検討した。ヒト BCMA を安定発現させた EL4 マウスリンパ腫（EL4-hBCMA）細胞株移植マウスにおいてもベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍作用を検討した。

ベランタマブ　マホドチンはサル BCMA に結合することが示されたこと、また、カニクイザルにベランタマブ　マホドチンを単回静脈内投与した薬理試験において、BCMA 発現形質細胞の顕著な減少／免疫グロブリン量の低下がみられたことから、ベランタマブ　マホドチンの毒性を評価するための動物種としてカニクイザルを選択した。

副次的薬理試験では、ベランタマブ　マホドチンの標的が BCMA 発現 MM 細胞に選択的であるかを確認するため、MM 細胞以外のその他の細胞種に対するベランタマブ　マホドチンの作用を検討した。

ベランタマブ　マホドチンの安全性薬理試験として独立した試験は実施していないが、ICH S9、ICH S7A 及び S7B ガイドラインに従い、ラット及びサルを用いたベランタマブ

マホドチン、GSK2857914 及び cys-mcMMAF の反復投与毒性試験において、心血管系及び／又は呼吸系に対する影響を評価した。また、cys-mcMMAF については、in vitro において hERG アッセイを実施し、QT 間隔を延長する可能性を評価した。

ベランタマブ　マホドチンの非臨床試験では、市販予定製剤と同等の被験物質を使用した。反復投与毒性試験における安全性薬理評価項目の評価に使用したベランタマブ　マホドチンの原薬（DS）バッチの不純物プロファイルは、臨床試験で使用したバッチを代表するものであり、市販予定の DS 及び製剤（DP）と一致するものであった。その後、スケールアップのために製造工程が変更されたが、市販予定の DS/DP が、以前の製造工程で製造された DS/DP と同等であることが示された。

薬理試験では、ベランタマブ　マホドチン以外にも、種々の抗 BCMA 抗体及びその ADC、並びに関連するその他の被験物質を使用した（表 2.6.2.1）。ベランタマブ　マホドチンは、GSK2857914 に mcMMAF を結合させることにより製造されるが、mcMMAF の結合は抗体の BCMA 及び Fc 受容体への結合に影響を及ぼさないことが示された（2.6.2.2.1）。

ADC としての活性（細胞傷害活性）評価を目的としていない非臨床試験［本分子の BCMA シグナル伝達に及ぼす影響、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性及び抗体依存性細胞貪食（ADCP）活性を測定するアッセイ等］では、ベランタマブ　マホドチンの代わりに GSK2857914 を使用した。GSK2857914 の国際一般名（INN）は belantamab であるが、本項では GSK2857914 と記載した。また、本項に記載したすべての用量及び濃度はベランタマブ マホドチン、GSK2857914 及び cys-mcMMAF として表したものである。

ベランタマブ　マホドチンの in vitro 及び in vivo 薬理試験の報告書に記載されている被験物質の名称は統一されていないため、各試験報告書内で記載されている被験物質が本項で記載するどの化合物名・化合物番号に該当するのかを Appendix 2 に示す一覧表にまとめた。

表 2.6.2.1 非臨床試験で用いた被験物質

GSK Nomenclature	Description	Alternative Nomenclature
Belantamab mafodotin	ADC in which GSK2857914 is conjugated to MMAF via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker. For bioanalytical purposes, GSK2857916 is quantified as GSK2857916 (ADC) and GSK2857916 (total mAb). GSK2857916 (ADC) is defined as GSK2857914 conjugated to one or more mcMMAF groups (DAR >0) and GSK2857916 (total mAb) is defined as GSK2857914 with or without conjugated mcMMAF (DAR≥0).	GSK2857916 Anti-BCMA J6M0 Potelligent MMAF CA8 J6M0 Potelligent MMAF
GSK2857914[a] (Belantamab)	Unconjugated mAb (parent anti-BCMA antibody). CA8 humanized antibody J6M0. Afucosylated by production in the BioWa (FUT8-/-) CHO DG44 cells. Referred to as 'Potelligent' form	Anti BCMA CA8 J6M0 Potelligent CA8 J6M0 Potelligent J6M0
GSK2857915	GSK2857914 conjugated to the microtubule inhibitor MMAE via a protease-sensitive linker (vc-MMAE)	J6M0 Potelligent MMAE
Cys-mcMMAF	Microtubule inhibitor MMAF conjugated to cysteine via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker. The active cytotoxic moiety released from GSK2857916.	SGD-1362
GSK2800525	Humanized IgG1 anti-BCMA antibody CA8 J6M0. Produced in HEK or CHO cells with WT fucosylation.	Anti BCMA CA8 J6M0 CA8 J6M0 J6M0-normal Fc
Anti-BCMA J6M0-MMAF[b]	GSK2800525 with WT fucosylation conjugated to MMAF via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker (i.e. wild type fucosylated form of belantamab mafodotin).	None

Nomenclature and Description of GSK2857916, GSK2857914, cys-mcMMAF and Other Related anti-BCMA Antibodies and Antibody-drug Conjugates Used in the Nonclinical Development Program (Continued)

GSK Nomenclature	Description	Alternative Nomenclature
CA8 J6M0 (Fc disabled)	GSK2800525 with mutation of L235 and G237 within the CH2 domain of the heavy chain constant region to alanine residues	None
IgG1-mcMMAF	Non-binding IgG1 Isotype mAb to GSK2800525 conjugated to monomethyl auristatin-F (MMAF) via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker.	None
IgG1-afucosylated	Non-binding IgG1 Isotype mAb to GSK2800525 Afucosylated by production in the BioWa (FUT8-/-) CHO DG44 cells	None
Control human Fc disabled IgG1 Ab	Non-binding IgG1 Isotype mAb to GSK2800525 with mutation of L235 and G237 within the CH2 domain of the heavy chain constant region to alanine residues	None
J6M0 IgG2a chimera	mAb generated by grafting the J6M0 CDRs onto a murine IgG2a isotype framework	None
mIgG2a-afucosylated	Non-binding mIgG2a Isotype mAb to J6M0 IgG2a chimera afucosylated by production in the BioWa (FUT8-/-) CHO DG44 cells	None

Key:

a = Although the INN for GSK2857914 has been designated as belantamab and it is typical to refer to the INN in m2.6.2, for readability and clarity GSK2857914 will be used to describe belantamab throughout m2.6.2.
b = Monomethyl auristatin E conjugates also produced and evaluated.
ADC = Antibody drug conjugate; BCMA = B cell maturation antigen; CHO = Chinese hamster ovary; CDR = Complementarity-determining region; Cys = Cysteine; DAR = Drug-antibody ratio; Fc = Fragment-crystallized; HEK = Human Embryonic Kidney; IgG1 = Immunoglobulin G1; mAb = Monoclonal antibody; MMAF = Monomethyl auristatin-F; mc = Maleimidocaproyl; NA = Not applicable; Potelligent = Synonymous with afucosylation; WT= Wild type.

効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験は、標準作業手順書に従い適切な試験方法で実施した。安全性薬理試験（cys-mcMMAF を用いた in vitro hERG アッセイ）は GLP 及び OECD ガイドラインに従って実施し、ラット及びサルを用いたベランタマブ　マホドチン、GSK2857914 及び cys-mcMMAF の反復投与毒性試験（GLP 試験）において心血管系及び／又は呼吸系に対する影響を評価した。GLP 試験はすべて、OECD 加盟国において実施した。

本承認申請に際して実施した一連の薬理試験成績の要約を以下の項に示す。実施した試験一覧、最終報告書の添付場所及び GLP 適用状況を表 2.6.2.2、表 2.6.2.11 及び表 2.6.2.12 に記載した。安全性薬理試験の概要表は 2.6.3 に記載した。本申請時に最終報告書を添付しなかった試験の一覧及び理由を Appendix 1 に示した。

効力を裏付ける試験

- ベランタマブ　マホドチンは MM 細胞上に発現する BCMA と結合後、速やかに細胞内に取り込まれ、リソソームで蛋白質が分解されることにより細胞傷害性を有する薬物（cys-mcMMAF）が細胞内に放出されることが示された。
- ベランタマブ　マホドチンは低フコース化された抗体であるため、免疫細胞（NK 細胞及びマクロファージ等）に存在する Fcγ受容体（FcγR）への結合親和性が増強しており、MM 細胞に対して強力な ADCC 及び ADCP 活性を有することが示された。
- ドラスタチン類と同様に、ベランタマブ　マホドチンによって誘発されたアポトーシスは免疫原性細胞死（ICD）マーカーの誘導を伴うことが示された。

副次的薬理試験

- GSK2857914 は、無細胞アッセイにおいて BCMA リガンド（BAFF 及び APRIL）の BCMA への結合及び MM 細胞株において BAFF 及び APRIL により誘導される細胞内 NF-κB シグナル伝達を阻害した。
- 細胞表面に発現している BCMA を介して GSK2857914 がアゴニスト作用を示すか（NF-κB シグナル活性化に影響を及ぼすか）各種 BCMA 発現細胞株を用いて検討したところ、アゴニスト作用はみられなかった。しかし、GSK2857914 に抗ヒト IgG を添加し架橋結合させたとき、NCI-H929 及び OPM-2 細胞株では、GSK2857914 のみで処理したときと比較して NF-κB シグナル伝達の増強がみられた。
- ベランタマブ　マホドチン存在下で BCMA 発現 MM 細胞株及び BCMA を発現していない細胞を共培養すると、BCMA 発現 MM 細胞株に選択的な細胞傷害作用がみられた（すなわち、バイスタンダー効果による細胞傷害作用は認められなかった）。

安全性薬理試験

- In vitro において、cys-mcMMAF による hERG チャネルへの影響は認められなかった。
- ベランタマブ　マホドチンのサルを用いた反復投与毒性試験において心血管系に対する影響を評価したところ、心電図（ECG）波形異常、不整脈及び補正 QT（QTc）変化は認められなかった。また、サルに cys-mcMMAF 又は GSK2857914 を反復投与しても、ECG に対する影響はみられなかった。
- ベランタマブ　マホドチンのサルを用いた 13 週間反復投与毒性試験では、雄の 10 mg/kg/週群で 5 回目の投与後に心拍数の増加（16%）がみられたが、これは一般状態の悪化に関連するものと判断された。
- ベランタマブ　マホドチンのラット及びサルを用いた 3 及び 13 週間反復投与毒性試験において IV 投与後に一般状態の観察を行ったところ、いずれの試験においても呼吸系・神経行動への影響を示唆する一般状態の変化は認められなかった。また、cys-mcMMAF 又は GSK2857914 の毒性試験でも神経行動への影響を示唆する一般状態の変化は認められなかった。

2.6.2.2. 効力を裏付ける試験

多発性骨髄腫を適応症として承認申請するにあたり、効力を裏付ける試験として、一連の in vitro 及び in vivo 試験を実施した。In vitro 試験では、BCMA に対する結合親和性及び種特異性、MM 細胞増殖抑制作用並びに作用機序を検討した。ベランタマブ　マホドチンの細胞傷害性物質を介さない作用機序を検討するため、いくつかの試験では MMAF 非結合型抗体を用いた試験を実施した。In vivo 試験では、種々のヒト MM 細胞株異種移植マウスを用いてベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914（ベランタマブ　マホドチンの抗体部分）の抗腫瘍効果を検討した。また、ヒト BCMA を安定発現させた EL4 マウスリンパ腫（EL4-hBCMA）細胞株を移植したモデルにおいてもベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍作用を検討した。実施した試験の一覧及び最終報告書の添付場所を表 2.6.2.2 に示した。

表 2.6.2.2 効力を裏付ける試験一覧

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Binding affinity by surface plasmon resonance	Monkey, Human	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2013N175824	m4.2.1.1
Cell line and cell free neutralization assays (sBCMA and BCMA ligands)	Human MM NCI-H929, ARH77-10B5 and OPM-2 cell lines	In vitro	MAB	No	GSK	2011N125952	m4.2.1.1
ADC activity: internalization and apoptosis	Human MM NCI-H929 line	In vitro	MAB	No	GSK	2013N177426	m4.2.1.1
ADC activity: internalization and apoptosis	Human MM cell lines	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2013N176113	m4.2.1.1
ADC activity: G2/M arrest and apoptosis; ADCC potency studies	Human MM cell lines ± BMSC, PBMC, or plasmablasts from healthy donors or MM patients	In vitro, Ex vivo	ADC	No	[redacted] GSK	2013N176111	m4.2.1.1
ADC potency studies, and effect of sBCMA and BCMA ligands on potency	Human MM cell lines	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2011N125948	m4.2.1.1
GSK2857916 treatment decreased cell viability of murine EL4 cells expressing human BCMA-luciferase	EL4 BCMA-luc	In vitro	ADC	No	GSK	2017N312863	m4.2.1.1
Evaluation of BCMA as a target for ADC mediated cytotoxicity	Human MM patients	Ex vivo	ADC	No	[redacted]	2014N219883	m4.2.1.1
ADCC potency studies, and effect of sBCMA and BCMA ligands on potency	Human MM cell lines or ARH-77-10B5 B cell line transfected with BCMA ± PBMCs	Ex vivo/In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2011N125945	m4.2.1.1

List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
ADCC potency studies	Human whole blood plasmablasts	Ex vivo/In vitro	MAB	No	GSK	2013N183018	m4.2.1.1
Induction of Immunogenic Cell Death	Human MM NCI-H929 cell line	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2019N397960	m4.2.1.1
Induction of Immunogenic Cell Death	EL4 BCMA-luc	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2019N400866	m4.2.1.1
Characterization of the effect of GSK2857916 on human T cell activation in PBMC with anti-CD3/anti-CD28 stimulation	Human PBMC	In vitro	ADC	No	GSK	2015N249192	m4.2.1.1
In vitro human T cell functional assays	Human CD4+ or CD8+ T cells	In vitro	ADC	No	GSK	2014N224675	m4.2.1.1, m4.2.1.2
Effect of GSK2857916 treated NCI-H929 cells on the activation of immature dendritic cells	Human MM NCI-H929	In vitro	ADC	No	GSK	2016N304715	m4.2.1.1
BCMA ADC combinations with other agents	Human MM cell lines	In vitro	ADC	No	GSK	2013N178354	m4.2.1.1
BCMA ADC combinations with cancer epigenetic agents	Human MM and lymphoma cell lines	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2018N392007	m4.2.1.1
In vitro Cell Kill and in vivo Efficacy of GSK2857916 and Standard of Care as Single Agents and in Combination, in Two Human MM Murine Xenograft Models	OPM-2 and MOLP-8 cell lines Mouse (NOD/SCID) with OPM-2 and MOLP-8 xenografts	In vitro IP	ADC, MAB	No	[redacted]	2019N395340	m4.2.1.1

List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Evaluation of GSK2857916 in combination with gamma-secretase inhibitors in ADC, ADCC assays and release of soluble BCMA.	Human MM and lymphoma cell lines	In vitro	ADC	No	GSK	2019N415573	m4.2.1.1
Assessment of in vivo activity of GSK285916 and GSK2857914 in CB17 SCID mice	Mouse (CB17 SCID) NCI-H929 and OPM-2 human MM cell xenograft	IP	ADC MAB	No	GSK	2013N175478	m4.2.1.1
sBCMA free and complex assay development and analysis of BCMA expression in cynomolgus and human serum	Mouse (CB17 SCID) NCI-H929 and OPM-2 human MM cell xenograft	IP	ADC	No	GSK	2013N167720	m4.2.1.1
Analysis of the effect of DAR variance on in vivo anti-tumor activity	Mouse (CB17 SCID)[b]	IP	ADC	No	GSK	2017N317971	m4.2.1.1
Histopathology and IHC Evaluation in NCI-H929 Xenograft model.	Mouse (CB17 SCID)	IP	ADC MAB	No	GSK	2019N395917	m4.2.1.1
In vivo efficacy of GSK2857916 and Related Antibodies in the EL4-hBCMA model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC, MAB	No	[redacted]	2019N396819	m4.2.1.1
CD4/CD8 depletion in the EL4-hBCMA model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2018N359715	m4.2.1.1
Histopathology and IHC Evaluation in the EL4-hBCMA syngeneic tumor model with GSK2857916.	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC MAB	No	GSK	2019N395916	m4.2.1.1
Effect of anti-PD-1 on the anti-tumor activity of GSK2857916 in the EL4-hBCMA model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2017N345016	m4.2.1.1

List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Evaluation of changes in PD markers following treatment with GSK2857916 alone and in combination with anti-PD-1 in the EL4-hBCMA model	Mouse (C57BL/6)	NR	ADC	No	GSK	2018N380821	m4.2.1.1
Histopathology and IHC Evaluation in the EL4-hBCMA syngeneic tumor model with GSK2857916 and/or PD-1	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2019N395913	m4.2.1.1
Effect of GSK2857916 monotherapy or combination with TLR4 agonist, an anti-mouse ICOS antibody clone 7E.17G9, or anti-mouse OX40 antibody clone OX86 on tumor growth in the EL4-hBCMA syngeneic tumor model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2017N348146	m4.2.1.1
Evaluation of changes in PD markers following treatment with GSK2857916 alone and in combination with anti-murine OX40 Surrogate antibodies in the EL4-hBCMA syngeneic tumor model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2018N384579	m4.2.1.1
In vivo efficacy of GSK2857916, mouse anti-OX40 and/or mouse anti-ICOS as single agents or in combination in the EL4-hBCMA syngeneic model.	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	[redacted]	2019N398617	m4.2.1.1
Evaluation of changes in PD markers following treatment with GSK2857916 alone and in combination with a TLR4 agonist in the EL4-hBCMA syngeneic lymphoma model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2018N384601	m4.2.1.1

List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Effect of GSK2857916 monotherapy or combination with cancer epigenetic agents on tumor growth in the EL4-hBCMA syngeneic tumor model.	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2018N393779	m4.2.1.1
In vivo efficacy of GSK2857916 with other anti-tumor therapies in the EL4-hBCMA syngeneic model or the NCI-H929 xenograft model	Mouse (C57BL/6) or (CB17 SCID)	IP	ADC	No	[redacted]	2019N398490	m4.2.1.1
Efficacy Study of anti-BCMA GSK2857916 (Belantamab mafodotin-blmf) and GSK2857914 (Belantamab) in combination with Gamma Secretase Inhibitor Nirogacestat in Female NOD/Scid Mice Bearing NCI-H929 and OPM-2 Multiple Myeloma Xenografts	Mouse (NOD/SCID)	IP	ADC, MAB	No	[redacted]	2023N528894	m4.2.1.1
Efficacy Study of GSK2857914 (Belantamab) as a single agent and in Combination with anti-BCMA GSK2857916 (Belantamab mafodotin-belmaf) in Female NOD/Scid Mice Bearing NCI-H929 and OPM-2 Multiple Myeloma Xenografts	Mouse (NOD/SCID)	IP	ADC, MAB	No	[redacted]	2023N528895	m4.2.1.1
Pharmacodynamic biomarker analysis of monkey plasma cells in peripheral whole blood, serum and bone marrow.	Monkey (cynomolgus)	IV[a]	ADC MAB	No	GSK	2013N163514	m4.2.1.1

List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Key:
ADCC = Antibody-dependent cellular cytotoxicity;
BCMA = B cell maturation antigen; BMSC = Bone marrow stromal cells;
DAR = Drug antibody ratio.
EL4-hBCMA = EL4 lymphoma tumors expressing human BCMA.
EL4 BCMA-luc = Murine lymphoma cell line with stable expression of human BCMA with luciferase reporter gene; IgG = Immunoglobulin G;
IgM = Immunoglobulin; IHC – Immunohistochemistry;
IP = Intraperitoneal; IV = Intravenous; luc =Luciferase;
MM = Multiple myeloma; PBMC = Peripheral blood mononuclear cells;
PD = Pharmacodynamic(s)
PD-1 = Programmed cell death protein; NR = Not recorded;
SCID = Severe combined immune-deficient; sBCMA = Soluble BCMA;
TLR4 = Toll-like receptor 4.
a = Single dose of 1 mg/kg
b = NCI-H929 human myeloma SCID mouse xenograft model.

Test Articles
ADC = Belantamab mafodotin (GSK2857916).
MAB = GSK2857914, unconjugated afucosylated mAb (parent anti-BCMA antibody).

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted]
GSK = GlaxoSmithKline.
[redacted] = [redacted]

2.6.2.2.1. In vitro 試験

BCMA に対する結合親和性

遺伝子組換えサル及びヒト BCMA、ヒト及びカニクイザル FcγR 並びにヒト胎児性 Fc 受容体（FcRn）に対するベランタマブ　マホドチン及び関連する抗 BCMA 抗体［GSK2857914（MMAF 非結合の低フコース化抗体）、GSK2800525（MMAF 非結合の野生型フコース抗体）及び Fc 無効化変異を導入した GSK2800525］（表 2.6.2.1）の結合親和性を表面プラズモン共鳴法（SPR）で測定した（2013N175824）。

25℃での遺伝子組換えサル及びヒト BCMA に対するベランタマブ　マホドチンの結合親和性（Kd）はそれぞれ 0.692 nM（0.105 µg/mL）及び 1.098 nM（0.167 µg/mL）であった（表 2.6.2.3）。別の試験で、25℃及び 37℃での遺伝子組換えヒト BCMA に対するベランタマブ　マホドチンの結合を検討したところ、Kd はそれぞれ 1.6 nM（0.24 µg/mL）及び 3.1 nM（0.47 µg/mL）であった（表 2.6.2.4）。ベランタマブ　マホドチンのヒト BCMA に対する結合親和性は、GSK2857914 及び GSK2800525 と同程度であった（表 2.6.2.4）。

表 2.6.2.3　サル及びヒト BCMA に対するベランタマブ　マホドチンの結合

Species	25°C			37°C		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_d (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_d (nM)
Monkey	$8.83x10^5$	$6.11x10^{-4}$	0.692	$2.15x10^6$	$8.58x10^{-3}$	3.982
Human	$3.94x10^5$	$4.32x10^{-4}$	1.098	$5.66x10^5$	$4.73x10^{-3}$	8.357

Note:
Report 2013N175824, m4.2.1.1.
Key:
BCMA = B-cell maturation antigen; ka = Association rate constant, kd = Dissociation rate constant; K_d = Equilibrium dissociation constant

表 2.6.2.4　ヒト BCMA に対するベランタマブ　マホドチン並びに関連する抗 BCMA 抗体の結合

Antibody	25°C			37°C		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_d (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_d (nM)
Belantamab mafodotin	$1.75x10^5$	$2.81x10^{-4}$	1.609	$1.56x10^6$	$4.84x10^{-3}$	3.093
GSK2857914	$1.75Ex10^5$	$2.92x10^{-4}$	1.673	$1.41x10^6$	$4.29x10^{-3}$	3.04
GSK2800525 with Fc disabling mutations	Not tested			$1.54x10^6$	$4.55x10^{-3}$	2.96
GSK2800525				$1.42x10^6$	$4.38x10^{-3}$	3.089

Note:
Report 2013N175824, m4.2.1.1.
Key:
BCMA = B-cell maturation antigen; ka = Association rate constant; kd = Dissociation rate constant.
K_d = Equilibrium dissociation constant.; MMAF = Monomethyl auristatin F;
Potelligent™ = Synonymous with afucosylation.

FcγR に対する結合親和性

ベランタマブ　マホドチンの遺伝子組換えヒト FcγRIIIa 及びサル FcγRIII に対する結合親和性は、低フコース型抗体であることから予想されたとおり、GSK2800525（MMAF 非結合の野生型フコース付加抗体）と比較して約 10～20 倍高いことが示された（表 2.6.2.5）。ベランタマブ　マホドチン、GSK2800525 及び GSK2857914 の間でヒト FcRn、FcγRI 及び FcγRIIa への結合に対する親和性は同程度であり、FcγRIIIa 以外の FcγR への結合親和性は、低フコース化及び mcMMAF 結合による影響はみられなかった。抗体の重鎖定常領域の CH2 ドメイン内に位置する L235 及び G237 をアラニン残基に置換することにより、Fc 領域のヒト Fc 受容体への結合能が消失することが知られているが、GSK2800525 の IgG1 定常領域にこの Fc 結合能を無効化させる変異を導入した抗体では、いずれの FcγR に対しても検出可能な結合を示さないことが確認された。

表 2.6.2.5 サル及びヒト Fc gamma R に対するベランタマブ マホドチン及び関連する抗 BCMA 抗体の結合能

Antibody	K_d (nM)								
	Human FcγR						Monkey FcγR		
	I	IIa R	IIa H	IIIa V	IIIa F	FcRn (pH6.0)	II B	III	II A
Belantamab mafodotin	6.81	3080	2940	28	235	52.10	2410	61	2840
GSK2857914	15	2760	2350	16	156	35.70	2040	41	2510
GSK2800525	18	4790	2840	329	2420	34.70	2530	346	3490
Control human IgG1 Ab Fc WT	23	5710	3330	486	3180	-	2750	433	3890
GSK2800525 Fc disabled IgG1m(AA)	NB	NB	NB	NB	NB	42.20	NB	NB	NB
Control human Fc disabled IgG1 Ab, IgG1m(AA)	NB	NB	NB	NB	NB	-	NB	NB	NB

Note:
Report 2013N175824, m4.2.1.1.
Key:
Ab =Antibody; FcRn = Human neonatal Fc receptor; IgG1 = Immunoglobulin G1.
K_d = Equilibrium dissociation constant; MMAF = Monomethyl auristatin F; NB = no analyzable binding;
WT = wild type, - = Not conducted

2.6.2.2.1.1. BCMA リガンド結合及び NF-kappa B シグナル伝達に対する GSK2857914 の作用

BAFF 又は APRIL の BCMA への結合に対する GSK2857914（最高濃度 10 µg/mL）の中和能を、プレートベースアッセイ（無細胞アッセイ）で検討した（2011N125952）。また、ヒト MM 細胞株 NCI-H929 を用い、BAFF 及び APRIL により誘導される細胞内 NF-κB シグナル伝達に及ぼす GSK2857914 の影響を検討した。本試験では、無血清培地を添加した 96 ウェルプレートに細胞を播種し、24 時間後に GSK2857914 を添加（アッセイ条件に応じて、ウェル内最終濃度 100 µg/mL まで）して 30 分間インキュベートしたのち、市販の pNF-κB アッセイキット（Meso Scale Discovery 社）を用い、リン酸化 NF-κB 濃度を測定した（2011N125952）。

GSK2857914 は無細胞アッセイにおいて BAFF 及び APRIL の BCMA への結合を中和し、50%阻害濃度（IC50）はそれぞれ 748.9 及び 616.8 ng/mL であった。また、NCI-H929 細胞株における BAFF 及び APRIL 誘発 NF-κB シグナル伝達を阻害することが示された（IC50 はそれぞれ 0.91 及び 2.43 µg/mL）。

2.6.2.2.1.2. ADC による細胞傷害作用の発現機序

ベランタマブ　マホドチンは、細胞傷害作用を有する低分子 MMAF が非切断型の mc リンカーを介して抗体に結合した ADC であり、抗体部分の抗原特異性により、BCMA 発現細胞に cys-mcMMAF を選択的に送達することが可能である。ベランタマブ　マホドチンが標的細胞に取り込まれ、リソソームで蛋白質分解を受けると、細胞内に活性型薬物 cys-mcMMAF が放出され、標的細胞が特異的に殺傷される[Doronina, 2006]。

天然化合物であるドラスタチン 10 並びにその合成アナログである MMAE 及び MMAF 等のアウリスタチンは、チューブリンの重合による微小管形成を阻害することが知られている[Doronina, 2003]。MMAE は細胞透過性が高いため、がん細胞内で放出された MMAE が細胞膜を透過し、周囲の細胞に対しても細胞傷害活性を示すことが知られている（バイスタンダー効果）が、MMAF は C 末端フェニルアラニン基が帯電していることによって細胞膜透過性が低下しているため、標的細胞以外への細胞傷害活性は低いことが in vitro において示されている。ベランタマブ　マホドチンの標的細胞が存在する骨髄では、バイスタンダー効果によって骨髄毒性が増強される可能性があるため、そのような効果がないことが望ましいと考えられる。

2.6.2.2.1.2.1. ベランタマブ　マホドチンの細胞内への取り込み及びアポトーシス誘導作用

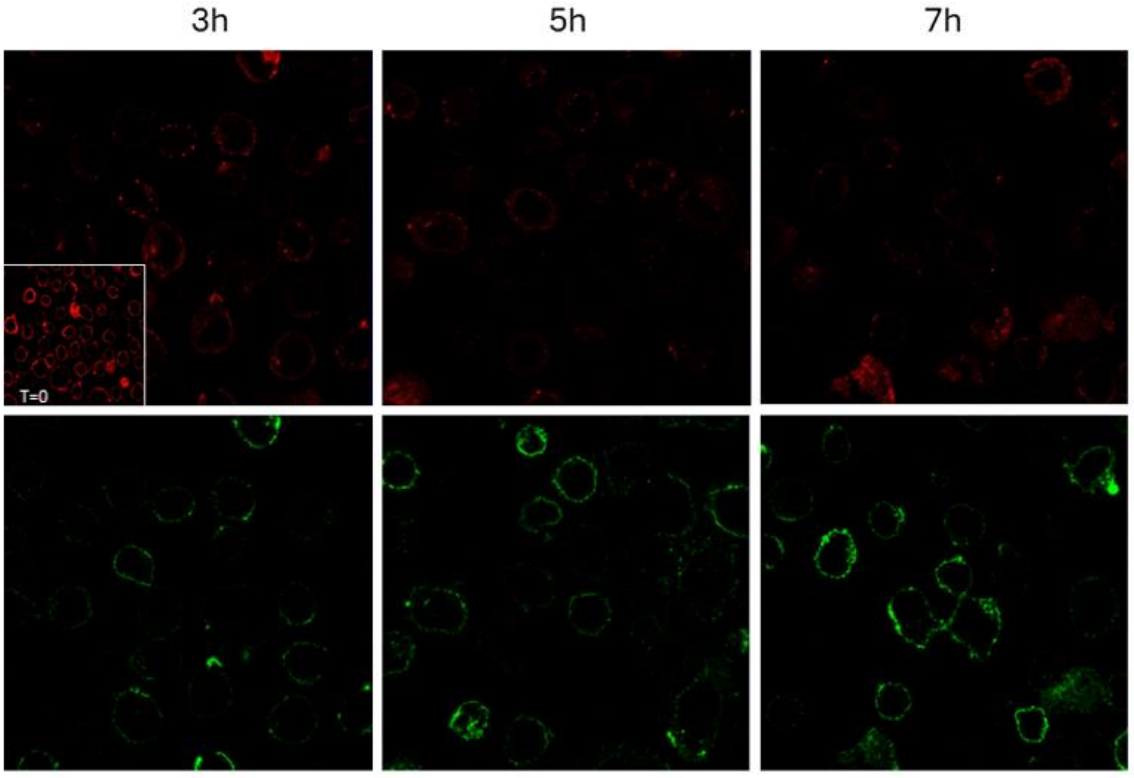
細胞内への取り込みとリソソームへの輸送

MM 細胞株をベランタマブ　マホドチン及び関連するその他の ADC で処理したときの細胞表面 BCMA への結合、細胞内への取り込み、活性型薬物放出のためのリソソームへの輸送及び BCMA の細胞表面における再発現速度を評価する試験を実施した。

最初の試験では、ヒト MM 細胞株 NCI-H929 の細胞表面 BCMA への GSK2857914 の結合、細胞内への取り込み及び BCMA の細胞表面における再発現速度を共焦点顕微鏡で視覚的に評価した（2013N177426）。細胞に GSK2857914（10 µg/mL）を添加して 15 分間インキュベートした。洗浄後、0（T=0）～7 時間までの種々の時間 37℃でインキュベートしたのち、細胞表面の抗体及び細胞内部に移行した抗体を赤色蛍光標識した二次抗体（goat anti-human Alexa568）で検出した。また、上記同様に GSK2857914（10 µg/mL）を添加して 15 分インキュベートし、細胞を洗浄後、0（T=0）～7 時間までの種々の時間 37℃でインキュベートしたのち、マウス抗 BCMA 抗体を添加し、新たに再発現した受容体をマウス抗 BCMA 抗体に結合する緑色蛍光標識二次抗体（goat anti-mouse Alexa488）で可視化した。更に、抗初期エンドソーム抗原 1（EEA1）抗体を用いてエンドソームを可視化した。対照抗体として、マウス IgG 及びヒト化抗 RS ウイルス抗体（10 µg/mL）を用いた。

NCI-H929 細胞株を GSK2857914 で 15 分間処理後、細胞表面に結合している抗体量は 3 時間以内に著しく減少するとともに、細胞内部に移行した抗体が検出された（図 2.6.2.11）。抗 BCMA 抗体の BCMA への結合は GSK2857914 と競合するため、GSK2857914 によって占有されていない受容体のみを検出することが可能であり、2 番目に添加したマウス抗 BCMA 抗体により細胞表面における BCMA の再発現が確認された。この抗体で検出される細胞表面における GSK2857914 によって占有されていない BCMA の再発現は、GSK2857914 処理

の 3 時間後には認められ、その後 4 時間にわたって増加し続けた。細胞表面の非占有 BCMA の再発現が、GSK2857914 が結合し、内在化した後にリサイクルされたものか又は新たに合成された蛋白質であるかについての更なる検討は行わなかった。



Note:
Report 2013N177426, m4.2.1.1
Top panels (red) demonstrate the extent of internalization of surface labeled receptor within 3 hours as compared to T=0 (inset), out to 7 hours where little remains. In the bottom panels the re-expression of surface receptor (green) is low after 3 hours but is noticeable and significant at 7 hours.

図 2.6.2.11 GSK2857914 の細胞内への取り込み及び BCMA の細胞表面への再発現

2 つ目の試験では、ベランタマブ　マホドチンの MM 細胞株 NCI-H929 表面への結合を 2 種類の検出法［APC 標識マウス抗ヒト IgG（Fc）抗体（γ 鎖特異的抗体）又は抗 MMAF 抗体で染色される細胞のフローサイトメトリーによる評価］で検討した。NCI-H929 細胞をベランタマブ　マホドチン（1 μg/mL）存在下、37℃で 15 分間インキュベートした。細胞を洗浄したのち、更に 15 分～32 時間インキュベートした。その後、細胞を洗浄・固定化し、APC 標識マウス抗ヒト IgG（Fc）抗体又は抗 MMAF 抗体で染色される細胞をフローサイトメトリーで検出した。また、細胞表面への結合の濃度依存性を検討するため、NCI-H929 細胞株に GSK2857915 を 10 μg/mL までの種々の濃度で添加し、37℃で 15 又は 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄後、更に 0～24 時間インキュベートし、フローサイトメトリーで細胞表面に結合した抗体を検出した。更に、BCMA 占有率を評価するため、NCI-H929 細胞株にベランタマブ　マホドチン、GSK2857914 又は GSK2857915（1 又は 10 μg/mL）を添加

してインキュベートし、最大 96 時間までの各時点で細胞を洗浄・固定化したのち、APC 標識マウス抗ヒト IgG（Fc）抗体（γ 鎖特異的抗体）で細胞を染色して、フローサイトメトリー解析を実施した（2013N176113）。

ベランタマブ　マホドチン（1 μg/mL）存在下で 15 分間インキュベートすることにより、いずれの方法によっても細胞表面への結合が検出され、洗浄後の経時変化も同様の結果が得られた。また、GSK2857915 を用いて濃度依存性を検討した試験では、抗体が細胞表面に結合した細胞の割合（Fc 陽性細胞の割合）が濃度依存的に増加し、1 μg/mL 以上の濃度ではほぼすべての細胞で抗体の結合が検出された。GSK2857915 の存在下で短時間（15 分間）インキュベートした後に検出された細胞表面に結合した抗体量（平均蛍光強度）は時間経過と共に減少し、16～24 時間後には対照であるアイソタイプ抗体を処理したときと同程度まで減少した。GSK2857914 又はベランタマブ　マホドチン存在下で長時間（最大 96 時間まで）インキュベートすると、平均蛍光強度は時間依存的に減少した。一方、GSK2857915（1 μg/mL）の存在下で最大 72 時間までインキュベートしたのち、細胞を溶解させ、APC 標識マウス抗ヒト IgG（Fc）抗体で染色することにより細胞内に移行した抗体を検出したところ、細胞内に抗体の移行がみられた細胞の割合は 72 時間まで減少しなかった。

以上より、ベランタマブ　マホドチンは、MM 細胞の細胞表面に速やかに結合し、その後 16～24 時間かけて徐々に細胞表面から消失又は細胞の内部に移行することが示された。ベランタマブ　マホドチンを長時間曝露させた試験では、細胞表面のベランタマブ　マホドチン量は時間依存的に減少したが、24～96 時間のインキュベート後も細胞表面に一定のレベルで検出された。なお、ベランタマブ　マホドチンに繰り返し曝露させた試験では、2 回目の曝露後に細胞表面に結合した抗体量の増加がみられたことから、BCMA のリサイクリング又は新規合成過程が生じている可能性が示唆された。

アポトーシス誘導作用

MM 細胞株を用いた細胞生存アッセイ、フローサイトメトリーよる細胞周期の解析及び切断型カスパーゼ 3（CC3）陽性細胞の検出により、ベランタマブ　マホドチンの作用機序から予想される細胞周期の G2/M 期での停止及びアポトーシス誘発作用を評価した（2013N176113 及び 2013N176111）。

ヒト MM 細胞株 NCI-H929 に MMAF を結合させた GSK2800525（濃度 0.01～3 μg/mL）を添加し、37℃で 24～72 時間インキュベートすることによって、濃度及び時間依存的なアポトーシス誘導作用が認められるか否かを検討した。また、NCI-H929 細胞株に MMAF を結合させた GSK2800525（1 μg/mL）又はベランタマブ　マホドチン（10 μg/mL）を添加して 15 分間インキュベート・洗浄したのち、37℃で 96 時間までインキュベートしたときのアポトーシス誘導作用を検討した。更に、BCMA 高発現の NCI-H929 細胞株をベランタマブ　マホドチン（10 μg/mL）存在下 37℃で 2～168 時間、又は GSK2857914 もしくは MMAF 結合型 GSK2800525（1 μg/mL）存在下 37℃で 2～72 時間インキュベートしたときの細胞表面 BCMA 発現量に及ぼす影響を評価し、BCMA 低発現の MM 細胞株 KMS-12-BM をベランタマブ　マホドチン（10 μg/mL）で 0.25～96 時間処理したときの影響と比較した。上記のすべての試験において、インキュベーション時間終了後に細胞を回収し、洗浄及び固定化し

た。透過処理した細胞を FITC 標識ウサギ抗ヒト CC3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで CC3 陽性細胞（アポトーシス細胞）を検出した（2013N176113）。

NCI-H929 細胞株に MMAF 結合型 GSK2800525 を添加することにより、0.1 μg/mL 超の濃度で濃度依存的なアポトーシス誘導作用がみられ、CC3 陽性細胞の割合はインキュベーション時間（24～72 時間）依存的に増加した。NCI-H929 細胞株を MMAF 結合型 GSK2800525（1 μg/mL）又はベランタマブ　マホドチン（10 μg/mL）で 15 分間処理することにより、IgG 処理対照群と比較して CC3 陽性細胞の割合の増加がみられたことから、一定レベルのアポトーシスを誘導するには短時間の曝露でも十分であることが示されたが、CC3 陽性細胞の割合はインキュベーション時間に依存して増加した。ベランタマブ　マホドチン（10 μg/mL）存在下で 96 時間処理した場合では、ほぼすべての細胞でアポトーシスが認められた。ベランタマブ　マホドチンによるアポトーシス誘導作用の発現時間は細胞表面の BCMA 発現レベルと関連していることが示され、ほぼすべての細胞にアポトーシスを誘導するのに必要なインキュベーション時間は、BCMA 高発現の NCI-H929 細胞株では 4 時間超であったのに対し、BCMA 低発現の KMS-12-BM 細胞では 33 時間超であった。BCMA 高発現の NCI-H929 及び低発現の KMS-12-BM 細胞株のいずれにおいても、CC3 陽性細胞の割合はベランタマブ　マホドチンの曝露時間とともに増加したが、BCMA 発現レベルの高い細胞では速やかにアポトーシスが誘導されるのに対し、低発現細胞での誘導には長時間の処理が必要であることが示された。

続いて、患者由来 CD138 陽性 MM 細胞（n=12）をベランタマブ　マホドチン（0.01 及び 1 μg/mL）存在下で 3 日間インキュベートしたのち、アネキシン V／ヨウ化プロピジウム（PI）染色を行い、フローサイトメトリーによりアポトーシス細胞を検出した。その結果、ベランタマブ　マホドチンの処理により、濃度依存的なアネキシン V／PI 染色陽性細胞の増加がみられた（2013N176111）。また、別の MM 患者 2 例から採取した CD138 陽性細胞をベランタマブ　マホドチンで 3 日間処理し、生細胞数及びアポトーシス誘導の指標となるカスパーゼ 3/7 活性を測定したところ、ベランタマブ　マホドチン（1 及び 10 μg/mL）の処理により濃度依存的なカスパーゼ 3/7 の活性化がみられた（2013N176111）。以上より、患者由来 CD138 陽性 MM 細胞を用いた検討において、ベランタマブ　マホドチンによる濃度依存的なアポトーシス誘導作用が示された。

2.6.2.2.1.2.2. ADC としての効力

各種 MM 細胞株に対する増殖抑制作用

細胞表面 BCMA を様々なレベルで発現している 13 種類のヒト MM 細胞株を用いた 6 日間のアッセイにおいて、MMAF 結合型 GSK2800525（野生型フコース付加抗体）の増殖阻害作用を 1000 ng/mL までの濃度で評価し、BCMA 発現細胞への特異性を確認するとともに、BCMA 発現と効力との間の関係を検討した。本試験では、BCMA 発現が認められない 4 種類の細胞株を陰性対照として用いた（2011N125948）。

BCMA 発現レベルが高い細胞株（NCI-H929、MM.1R 及び JJN3 等）では概して ADC（MMAF 結合型 GSK2800525）による増殖抑制作用が強く、BCMA 発現レベルが低い細胞株（MC/CAR 及び HuNS1 等）における増殖抑制作用は弱かった（表 2.6.2.6 及び 図

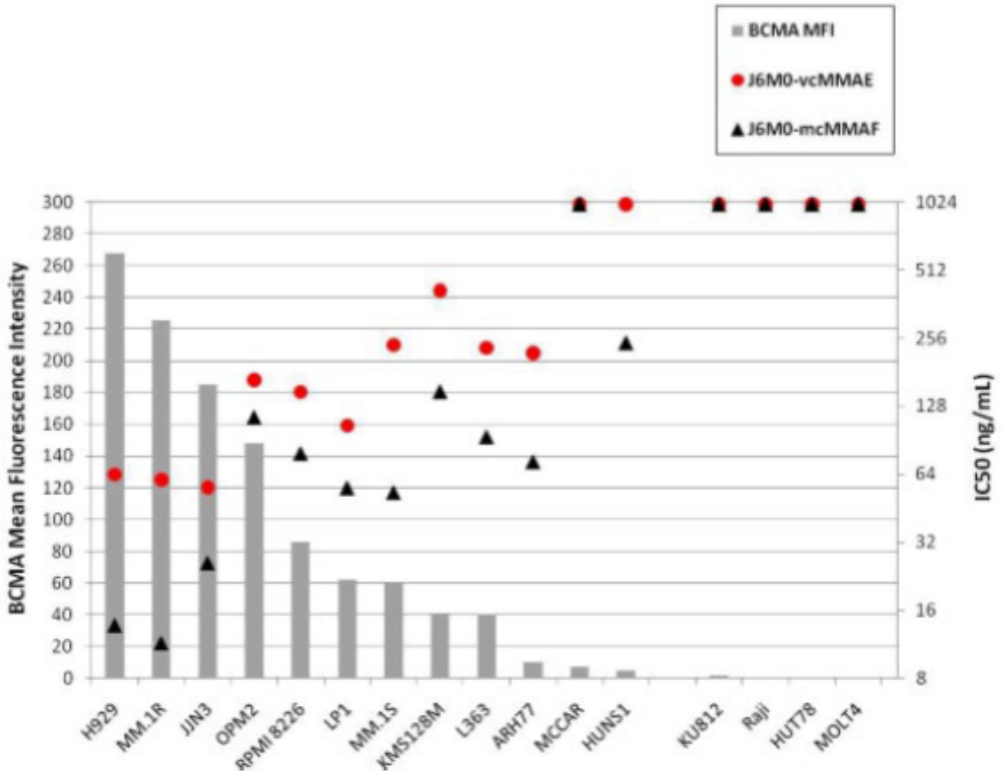
2.6.2.2）。陰性対照細胞株（MM 細胞ではない他のリンパ腫細胞株で BCMA の発現は認められない細胞株；KU812、Raji、HUT78 及び MOLT4）では、増殖抑制作用は認められなかった（IC50 >1000 ng/mL）。

上記の試験は MMAF 結合型 GSK2800525 を用いて実施したことから、ベランタマブ　マホドチンによる MM 細胞株に対する増殖抑制作用が MMAF 結合型 GSK2800525 と同程度であるかを、BCMA 発現レベルが高い細胞株である NCI-H929 及び JJN3 細胞株を用いて評価した。その結果、いずれの細胞株を用いた検討においてもベランタマブ　マホドチンによる増殖抑制作用は MMAF 結合型 GSK2800525 と同程度であった（表 2.6.2.7）。

表 2.6.2.6　MMAF 結合型 GSK2800525 の各種 MM 細胞株に対する増殖抑制作用

MM Cell Line	IC50 (ng/mL)	95% CI
U266	3.0	1.4 - 6.5
MM.1R	11.5	10.9 - 12.1
NCI-H929	13.8	13.2 - 14.3
JJN3	26.0	24.1 - 28.1
MM1S	53.2	49.5 - 57.0
LP1	55.7	44.3 - 70.1
ARH77	72.7	58.8 - 89.7
RPMI8226	79.1	60.1 - 104.1
L363	93.7	74.3 - 118.2
OPM-2	114.3	97.0 - 134.9
KMS128M	148.4	124.1 - 177.5
HUNS1	244.2	198.4 - 300.5
MC/CAR	>1000	NA

Key:
CI = Confidence interval; IC50 = Concentration that demonstrates 50% inhibition; MM = Multiple myeloma; NA = not applicable.
Report 2011N125948, m4.2.1.1



Key:
BCMA = B cell maturation antigen; J6M0-mcMMAF = GSK2800525 conjugated to MMAF.;
J6M0-vcMMAE = GSK2800525 conjugated to MMAE; IC50 = Concentration that demonstrates 50% inhibitior
Report 2011N125948, m4.2.1.1

図 2.6.2.2 MMAF 結合型 GSK2800525 の各種 MM 細胞株に対する増殖抑制作用と細胞表面 BCMA の発現レベルとの関係

表 2.6.2.7 ベランタマブ マホドチン及び MMAF 結合型 GSK2800525 の MM 細胞株に対する増殖抑制作用の比較

ADC	MM Cell Line	IC50, ng/mL (95% CI)
GSK2857916	NCI-H929	8.9 (8.0 – 9.8)
	JJN3	25.1 (18.2 – 34.8)
GSK2800525 conjugated to MMAF[a]	NCI-H929	13.8 (13.2 – 14.3)
	JJN3	26 (24.1 - 28.1)

Key:
a = GSK2800525 with WT fucosylation conjugated to MMAF via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker (i.e. wild type fucosylated form of belantamab mafodotin)
ADC = Antibody-drug conjugate; CI = Confidence interval; IC50 = Concentration that demonstrates 50% inhibition; MM = Multiple myeloma; MMAF = Monomethyl auristatin F.
Report 2011N125948, m4.2.1.1

コロニー形成阻害作用

種々の MM 細胞株（MM1S、NCI-H929、ANBL6、RPM1 8226、OPM-2 及び INA6）のコロニー形成能に対するベランタマブ　マホドチンの作用を検討した。メチルセルロース培地を用いて、50 個を超える MM 細胞から成るコロニーをベランタマブ　マホドチンの存在下で 21 日間培養し、コロニー形成への影響を顕微鏡で評価した（2013N176111）。その結果、ベランタマブ　マホドチン（0.01～10 μg/mL）は、検討したいずれの MM 細胞株に対してもコロニー形成を強力に阻害した（IC50 は 6～70 ng/mL）。

骨髄間質細胞と共培養したときの MM 細胞に対する増殖抑制作用

骨髄間質細胞（BMSC）は MM 細胞の増殖を促進させることから、他の MM 治療薬を用いた in vitro 試験では、MM 細胞と BMSC との共培養下ではその増殖抑制作用が減弱することが知られている。そのため、種々の MM 細胞株を BMSC 又は骨髄アクセサリー細胞と共培養したときのベランタマブ　マホドチンの MM 細胞に対する増殖抑制作用を評価した（2013N176111）。

7 種類の MM 細胞株及び 2 例の患者から得た MM 細胞をベランタマブ　マホドチン（0.1～10 μg/mL）存在下で 3 日間培養すると、濃度依存的な増殖抑制作用がみられた。これらの MM 細胞株又は患者由来 MM 細胞を BMSC と共培養すると、MM 細胞の増殖が促進されたが、ベランタマブ　マホドチンの処理により BMSC によって促進した細胞増殖及び生存は濃度依存的に抑制された。一方、ベランタマブ　マホドチン存在下（最高濃度 10 μg/mL）で NK 細胞又は BMSC を 4 日間培養、もしくは BMSC と NK 細胞を 4 日間共培養しても、NK 細胞又は BMSC の生存に対する影響は認められなかったが、MM1Sluc 細胞株をベランタマブ　マホドチン（最高濃度 10 μg/mL）で処理したときには、単独培養及び BMSC との共培養のいずれにおいても MM1Sluc 細胞株の生存が阻害された。したがって、BCMA を発現する MM 細胞内でベランタマブ　マホドチンから遊離した cys-mcMMAF が、BCMA を発現していない標的外の細胞（BMSC 及び種々のエフェクター細胞）に対して傷害作用を示す可能性は低く、MM 細胞の生存を選択的かつ強力に阻害することが示された。

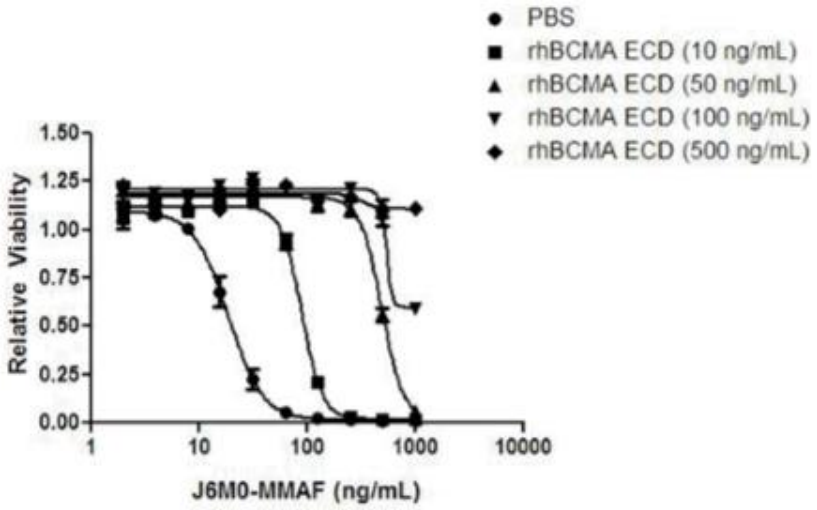
BCMA リガンド及び可溶性 BCMA 存在下での MM 細胞に対する増殖抑制作用

MM 患者にベランタマブ　マホドチンを投与した際に、BCMA のリガンドである BAFF 及び APRIL 並びに可溶性 BCMA（sBCMA）の存在がベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍作用に影響を及ぼす可能性を評価した（2011N125948）。

ベランタマブ　マホドチンの MM 細胞に対する増殖抑制作用が BCMA 蛋白質への特異的な結合を介するものであることを確認するため、遺伝子組換え可溶性 BCMA 細胞外ドメイン（rhBCMA ECD）の存在下で、ベランタマブ　マホドチンの NCI-H929 細胞株の増殖に対する影響を検討した。NCI-H929 細胞株にベランタマブ　マホドチン（1000 ng/mL までの各濃度）及び rhBCMA ECD（10～500 ng/mL）を添加し、96 時間インキュベートしたのち、CellTiter-Glo アッセイで生細胞数を計測した。その結果、ベランタマブ　マホドチンの増殖抑制作用は rhBCMA ECD の濃度依存的に阻害された。rhBCMA ECD（500 ng/mL）添加群で

は、検討した最高濃度（1000 ng/mL）のベランタマブ　マホドチンの増殖抑制作用が完全に阻害された（図 2.6.2.3）。

同様のアッセイで、内因性の BCMA リガンドである BAFF 及び APRIL 存在下におけるベランタマブ　マホドチンの増殖阻害作用についても検討した。その結果、遺伝子組換えヒト BAFF（最高濃度 500 ng/mL）は、NCI-H929 細胞株に対するベランタマブ　マホドチンの増殖抑制作用を阻害しなかった。一方、遺伝子組換えヒト APRIL の存在下では、ベランタマブ　マホドチンの増殖抑制作用が濃度依存的に阻害され、APRIL（500 ng/mL）添加群では、ベランタマブ　マホドチンの増殖抑制作用は 10 分の 1 未満に減弱した。



Key:
J6M0-MMAF = Belantamab mafodotin; rhBCMA ECD = Soluble recombinant BCMA extracellular domain.
Report 2011N125948, m4.2.1.1.

図 2.6.2.3　rhBCMA ECD の存在下におけるベランタマブ　マホドチンの NCI-H929 細胞株に対する増殖抑制作用

BCMA を高発現する NCI-H929 細胞株を培養すると、培地中に可溶性 BCMA（sBCMA）が遊離されることから、培地中の sBCMA がベランタマブ　マホドチンの増殖抑制作用に及ぼす影響を評価した（2011N125948）。NCI-H929 細胞株を種々の細胞数（10^5～10^6cells/mL）で 48 時間培養したのち、培地を採取した（preconditioned 培地；sBCMA を含む）。種々の細胞数で培養した preconditioned 培地を新たなプレートに添加し、ベランタマブ　マホドチンの増殖抑制作用を無添加時と比較した。その結果、ベランタマブ　マホドチンの増殖抑制作用は preconditioned 培地を得る際に播種した細胞数依存的に阻害され、最も多い細胞数（10^6cells/mL）を播種した培地から得た preconditioned 培地を添加したときの細胞増殖抑制作用の IC50 は無添加時の 6.7 倍であった。

次に、細胞表面 BCMA 発現レベルが異なる MM 細胞株［NCI-H929（高レベル）、JJN3（中程度）及び KMS-12-BM（低レベル～中程度）］用いて、sBCMA 並びに BCMA リガンドである APRIL の存在がベランタマブ　マホドチンの増殖抑制作用に及ぼす影響を評価した（2011N125948）。Preconditioned 培地中の sBCMA によりベランタマブ　マホドチンの増

殖抑制作用の減弱がみられたが、その程度は細胞表面 BCMA の発現レベルと相関しており、NCI-H929、JJN3 及び KMS-12-BM 細胞株における sBCMA 存在下での増殖抑制作用の IC50 は、preconditioned 培地無添加時の IC50 のそれぞれ 9.4、2.5 及び 2.3 倍であった。また、preconditioned 培地に APRIL（200 ng/mL）を添加したときに、更なる増殖抑制作用の減弱が認められるかについて検討したところ、NCI-H929 細胞株を用いた検討ではわずかな減弱が認められた。JJN3 及び KMS-12-BM 細胞株では、更なる活性の減弱は認められなかった。なお、検討した 3 種類の MM 細胞株のいずれにおいても、ベランタマブ　マホドチンの最大作用に sBCMA 及び APRIL の添加による明らかな影響は認められず、1 μg/mL 以上の濃度では sBCMA 及び APRIL の存在に関わらず増殖はほぼ完全に抑制された。

EL4-hBCMA 細胞株の生存性に及ぼす影響

ヒト BCMA を安定発現させた EL4 マウスリンパ腫（EL4-hBCMA）細胞株及び親細胞である EL4 細胞株にベランタマブ　マホドチン（0.039～10 μg/mL）又は IgG アイソタイプ対照抗体（10 μg/mL）を添加し、4、24、48、72 及び 96 時間培養した（2017N312863）。培養後、CellTiter-Glo アッセイにより生細胞を検出し、細胞生存性に及ぼす影響を評価した。

EL4-hBCMA 細胞株をベランタマブ　マホドチンで処理することにより、培養時間及び濃度依存的に生細胞数は低下した。一方、ヒト BCMA を発現していない EL4 親細胞株は、ベランタマブ　マホドチン存在下で 96 時間培養しても生存性への影響は認められなかった。

初代培養骨髄腫細胞に対するベランタマブ　マホドチンの細胞傷害作用

初代培養骨髄腫細胞に対するベランタマブ　マホドチンの細胞傷害作用を評価するため、MM 患者由来骨髄単核細胞をベランタマブ　マホドチン（0.05～0.5 μg/mL）及び 20%MM 患者血漿とともに最長 7 日間培養した（2014N219883）。

3 例の MM 患者から得た骨髄単核細胞にベランタマブ　マホドチンを添加することにより、いずれの患者由来の細胞においても濃度依存的な生細胞数の減少がみられた。また、その作用は培養時間依存的であり、ベランタマブ　マホドチン存在下で 6～7 日間培養したときの生細胞数は 2 日間培養したときよりも低値であった。

2.6.2.2.1.3. ADCC 及び ADCP 活性

GSK2857914 の ADCC 活性

ADCC 活性は、抗体の Fc 領域と NK 細胞等のエフェクター細胞上の FcγRIIIa 受容体との結合を介して発現することが知られている。そこで、ベランタマブ　マホドチンの抗体部分である GSK2857914 を用いて、種々の MM 細胞株に対する ADCC 活性を評価した（2011N125945）。

ターゲット細胞として、BCMA 発現 MM 細胞株（NCI-H929、RPMI 8226、JJN3、OPM-2 又は U266）を用い、GSK2857914（最高濃度 10 μg/mL）とともにインキュベートしたのち、エフェクター細胞である末梢血単核細胞（PBMC；11 例の健常ドナーから得た）を添加した（エフェクター細胞：標的細胞＝50：1）。更に 18 時間インキュベートしたのち、残存する標的細胞（生存細胞）を蛍光標識した抗 CD138 抗体で染色し、フローサイトメトリー

法で検出することにより細胞傷害作用（%）を求め、得られた濃度反応曲線から、EC50 を算出した。

GSK2857914 による ADCC 活性（EC50）を表 2.6.2.8 に示した。GSK2857914 は、検討したいずれの細胞株に対しても ADCC 活性を示したが、用いた PBMC ドナー及び標的細胞株によって活性にばらつきがみられ、EC50 は 0.57 ng/mL（NCI-H929 細胞株）～111 ng/mL（JJN3 細胞株）の範囲であった（表 2.6.2.8）。

表 2.6.2.8　GSK2857914 による BCMA 発現 MM 細胞株に対する ADCC 活性

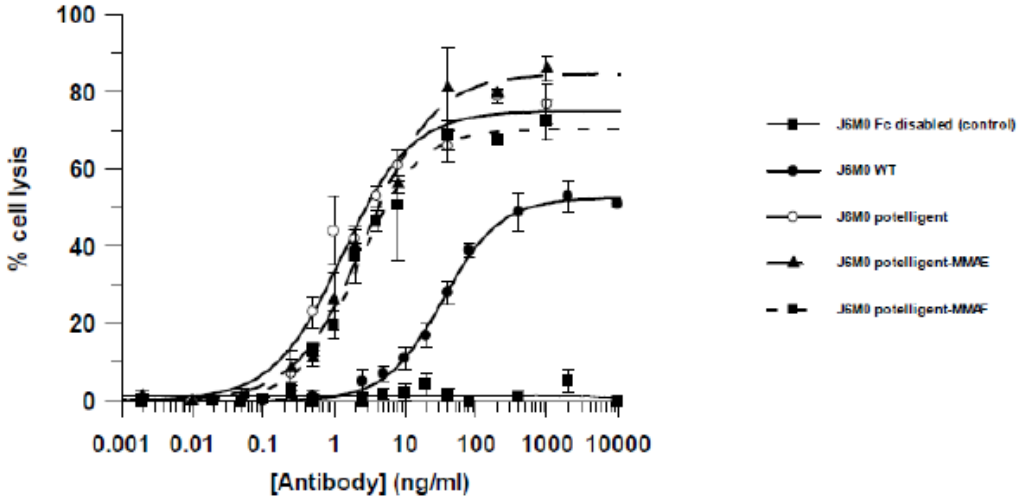
Experiment[a]	PBMC Donor	MM Cell Line EC50 (ng/mL)				
		NCI-H929	RPMI8226	JJN3	OPM-2	U266
1	A	1.43		1.64		
2	A	2.05				
3	B	0.57				
4	C	0.73		1.01		
5	C	1.81				
6	D		4.09			
7	E			14.4		
8	F	2.18				
9	G			26.3		
10	H	4.79		111		
11	I			40.1		
12	J	2.19	20.4	4.89		
13	K	ND		4.52	4.15	9.04

Key:
a = EC50 values generated on 13 independent assays using 11 donors (designated A to K) across 5 MM cell lines. Empty values were not assayed in that experiment. ND = not determined
ADCC = Antibody-dependent cellular cytotoxicity; EC50 = Concentration that demonstrates 50% maximal efficacy; MM = Multiple myeloma; PBMC = Peripheral blood mononuclear cell
Report 2011N125945, m4.2.1.1.

ベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 による ADCC 活性の比較

ヒト BCMA を発現させた MM 細胞株 ARH77-10B5 を用い、ベランタマブ　マホドチンの ADCC 活性を GSK2857914 と比較した（2011N125945）。ユーロピウム標識した ARH77-10B5 細胞をウェルに添加し、GSK2857914 又はベランタマブ　マホドチン（1000 ng/mL までの濃度）とともにインキュベートしたのち、エフェクター細胞として PBMC を添加した（エフェクター細胞：標的細胞＝50：1）。その後、傷害細胞から遊離される培養上清中のユーロピウムの蛍光を検出して、ADCC 活性を評価した。対照として、GSK2800525 及び MMAE 結合型 GSK2857914 の ADCC 活性についても検討した。

ベランタマブ　マホドチンは濃度依存的な ADCC 活性を示した（図 2.6.2.4）。その作用は 100 ng/mL で最大反応に達し、EC50 は 1.8 ng/mL であった。GSK2857914 及び MMAE 結合型 GSK2857914 でも同様の結果が得られ、抗体に MMAE 又は MMAF を結合させることによる影響はみられなかった。また、ベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 はいずれも、FcγRIIIa への結合親和性が増強された低フコース型抗体であることから想定されたとおり、GSK2800525（MMAF 非結合の野生型フコース付加抗体）よりも強力な ADCC 活性を示すことが確認された。



Key:
J6M0 Fc disabled = GSK2800525 with Fc disabling mutations (no Fc receptor engagement)
J6M0 WT = GSK2800525
J6M0 potelligent = GSK2857914
J6M0 potelligent-MMAE = GSK2857914 conjugated to MMAE
J6M0 potelligent-MMAF = belantamab mafodotin
Report 2011N125945, m4.2.1.1.

図 2.6.2.4　ARH77-10B5 細胞株に対するベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 の ADCC 活性

BCMA リガンド及び sBCMA 存在下でのベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 の ADCC 活性

BCMA を発現する MM 細胞株から遊離する sBCMA がベランタマブ　マホドチンの ADCC 活性に及ぼす影響を、細胞表面 BCMA 発現レベルが異なる MM 細胞株［NCI-H929（高レベル）及び JJN3（中程度）］を用いて評価した（2011N125945）。本試験では、新鮮培地（unconditioned）又は NCI-H929 細胞株培養上清（conditioned 培地；sBCMA を含む）のいずれかを使用し、上述の試験と同様の方法で ADCC 活性を測定した。その結果、conditioned 培地を用いたアッセイ（sBCMA 存在下）で得られた ADCC 活性（IC50）は、NCI-H929 及び JJN3 細胞株でそれぞれ 116 及び 501 ng/mL であり、sBCMA を含まない unconditioned 培地を用いたアッセイで得られた IC50 の約 24 及び 4.5 倍であったことから、sBCMA の存在によりベランタマブ　マホドチンの ADCC 活性が減弱することが示された。

また、別の試験で、ヒト BCMA を発現させた MM 細胞株 ARH-77 を用いて、sBCMA 又は BCMA リガンド（APRIL 及び BAFF）が GSK2857914 の ADCC 活性に及ぼす影響を検討した。その結果、sBCMA 又は APRIL 存在下で GSK2857914 の ADCC 活性の減弱が認められたが、GSK2857914 による最大作用に sBCMA 及び APRIL の添加による明らかな影響は認められなかった。BAFF を添加することによる ADCC 活性への影響はみられなかった。

患者由来 MM 細胞に対するベランタマブ　マホドチンの ADCC 活性

上記の MM 細胞株を用いた検討と同様に、患者由来 MM 細胞に対してもベランタマブ マホドチンによる ADCC 活性がみられるかを、傷害された細胞から放出されるカルセイン AM（細胞透過性のある生細胞染色用色素）を測定する細胞溶解アッセイで検討した（2013N176111）。ターゲット細胞として MM 患者（10 例）の骨髄由来 CD138 陽性細胞を用い、エフェクター細胞として健常ドナー由来の PBMC（n=2）又は CD138 陽性 MM 細胞を得たのと同じ患者由来の PBMC（n=8）を用いて検討した。

その結果、ベランタマブ　マホドチンは、エフェクター細胞として健常ドナーの PBMC を使用した同種異系条件及び CD138 陽性 MM 細胞を得たのと同じ患者の PBMC を使用した自家条件のいずれにおいても同程度の ADCC 活性を示した（濃度反応曲線から推定した EC50 はいずれも約 100 ng/mL）。

健常ドナー由来形質芽細胞に対する GSK2857914 の ADCC 活性

4 例の健常ドナーより得た全血を用いて、形質芽細胞（BCMA を発現）に対する ADCC 活性についても評価した（2013N183018）。GSK2857914（0.015 ng/mL～25 μg/mL）を血液サンプルに直接添加して 5 時間インキュベートしたのち、フローサイトメトリーで形質芽細胞（CD19+/CD27hi/CD38hi）数を測定した。対照抗体として、GSK2800525 及び Fc 無効化 GSK2800525 を用いて比較した。

その結果、全血を GSK2857914 で処理することにより、対照抗体を添加した場合と比較して、形質芽細胞数の顕著な減少がみられた。EC50 は 34～222 ng/mL であった。

ベランタマブ　マホドチンによる ADCP 活性

ADCP 活性は、抗体の Fc 領域とマクロファージ等のエフェクター細胞上の FcγRIII 受容体への結合を介して発現することが知られている。そこで、ターゲット細胞として種々の MM 細胞株（ADCC 活性を評価した細胞株と同じ株）、エフェクター細胞としてヒト PBMC から得た単球を M-CSF で刺激することによって得たマクロファージを用い、ベランタマブ マホドチンの ADCP 活性を評価した（2013N176111）。

MM 細胞株（MM1S、NCI-H929、RPMI 8226 又は INA6）を細胞膜蛍光色素 PKH67 で標識し、洗浄したのち、被験物質［ベランタマブ　マホドチン（10 μg/mL、MM1S 細胞株では 2 μg/mL でも検討）又は対照抗体である iso-mcMMAF mAb］及びマクロファージとともに 4 時間インキュベートした（エフェクター細胞：標的細胞＝4：1）。培養後、マクロファージに貪食された MM 細胞をフローサイトメトリー法で検出（蛍光標識した抗 CD11b 抗体で染色し、CD11b 陽性かつ PKH67 陽性細胞を検出）して ADCP 活性を評価した。

その結果、いずれの細胞株においても、ベランタマブ　マホドチン処理群では、アイソタイプ対照群と比較して、マクロファージによる MM 細胞の貪食が顕著に促進された。

2.6.2.2.1.4. NCI-H929 及び EL4-hBCMA 細胞株における ICD マーカーの誘導

ICD は小胞体ストレスと関連する細胞死の一種であり、その過程においてカルレティキュリン（CRT）や HMGB1（high mobility group box 1；非ヒストン DNA 結合蛋白質）等の DAMPs と呼ばれる分子の細胞表面への表出又は細胞からの放出がみられる。殺細胞性抗がん剤によって、CRT の細胞膜表面への移行、がん細胞からの ATP 及び HMGB1 の放出がみられることが報告されており、ICD の誘導が抗がん剤の作用機序に関わっている可能性が示唆されている[Galluzzi, 2016]。CRT の細胞膜表面への移行はアポトーシスの前段階からみられ、ATP 及び HMGB1 は、それぞれアポトーシスが誘導される過程及びされたがん細胞から放出される。そこで、MM 細胞株をベランタマブ　マホドチンで処理したときの CRT、ATP 及び HMGB1 等の ICD マーカーに対する影響について評価した。

最初の試験では、ウエスタンブロット法により、小胞体ストレスを反映する早期 ICD マーカーである eIF2α（リン酸化）、BAP31（切断）及び PERK（リン酸化）に及ぼす影響を検討した（2019N397960）。NCI-H929 細胞株をベランタマブ　マホドチン（1 μg/mL）存在下で 72 時間インキュベートしたところ、eIF2α のリン酸化並びに BAP31 蛋白質の切断が認められた。また、ベランタマブ　マホドチン（10g/mL）存在下で 48 又は 72 時間インキュベートすることにより、リン酸化 PERK が検出された。続いて、ベランタマブ　マホドチン（0.1～10 μg/mL）存在下で 72 時間インキュベートしたのち、培養液中の HSP70 及び HSP90α（ER ストレスを表す早期 ICD マーカー）、IL-8（免疫応答の変化及び炎症反応の開始を表す中期 ICD マーカー）及び HMGB1（細胞死によって放出される中後期 ICD マーカー）濃度を ELISA 法により測定したところ、細胞外放出される HSP70 及び HSP90α、IL-8 及び HMGB1 濃度の上昇がみられた。これらの ICD マーカーに及ぼす影響は、対照抗体として用いた GSK2857914 及び IgG-mcMMAF（1 又は 10 μg/mL）では認められなかった。

別の試験では、NCI-H929 及び EL4-hBCMA 細胞株をベランタマブ　マホドチン（1～100 μg/mL）で最長 96 時間インキュベートしたのち、ICD マーカー（CRT、HSP90、HSP70 及び HMGB1）の変化をフローサイトメトリー及び ELISA で評価した（2019N400866）。フローサイトメトリーによる解析により、NCI-H929 細胞株をベランタマブ　マホドチンで処理すると、CRT、HSP90、HSP70 及び HMGB1 の細胞膜への移行が増強されることが示された。これらの ICD マーカーに及ぼす影響は、対照抗体として用いた GSK2857914 及び IgG-mcMMAF では認められなかった。EL4-hBCMA 細胞株でも、フローサイトメトリーによる解析及び ELISA 法により、ベランタマブ　マホドチンで処理すると、ICD／ER ストレスマーカー（CRT、HSP90、HSP70 及び HMGB1）の細胞膜への移行増強／培養液中濃度の上昇が検出された。親細胞株（EL4 細胞株）を用いた検討ではこれらの変化は認められなかった。

以上より、ベランタマブ　マホドチンによって誘発されたアポトーシスは ICD マーカーの誘導を伴うことが示された。

2.6.2.2.1.5. ベランタマブ　マホドチンの免疫調節作用

CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の活性化及び機能に及ぼす影響

ヒト PBMC から得た CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の活性化及び機能に対するベランタマブ　マホドチンの作用を検討するため、ヒト全血から得た PBMC を用い、T 細胞活性化に関連する各種マーカーへの影響を評価した（2014N224675 及び 2015N249192）。

最初の試験では、6 例のドナーから得た PBMC を抗 CD3 抗体／抗 CD28 抗体の存在下又は非存在下でベランタマブ　マホドチン（最高 1 μM）とともに最長 72 時間インキュベートしたのち、CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の増殖、活性化（細胞表面 CD25 及び OX40 の発現をフローサイトメトリーで解析することによって評価）及びサイトカイン産生（細胞外への IFNγ、IL-12p70、IL-13、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6 及び TNF-α の遊離量を電気化学発光法で測定）への影響を評価したところ、ベランタマブ　マホドチンの処理による影響はほとんどみられなかった（2014N224675）。

別の試験では、2 例のドナーから得た PBMC を抗 CD3 抗体／抗 CD28 抗体及びベランタマブ　マホドチン（最高 3 μg/mL）の存在下で最長 72 時間インキュベートしたのち、CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の活性化マーカー（細胞表面 CD25、CD69、PD-1、OX40、ICOS、CTLA-4、CD73、CD39、CD137、TIM3 及び LAG3 発現に及ぼす影響をフローサイトメトリー法により評価）及び、サイトカイン産生（IFNγ 及び IL-4 の発現をフローサイトメトリー法により評価）への影響を評価した（2015N249192）ところ、これらのマーカーに対してベランタマブ　マホドチン処理による影響はほとんどみられなかった。

ヒト T 細胞には BCMA 発現はみられないことから、ベランタマブ　マホドチン処理により T 細胞の増殖及び活性化に影響がみられなかったと考えられる。

樹状細胞の活性化／成熟に及ぼす影響

ベランタマブ　マホドチンによって誘導される細胞死が樹状細胞の活性化に及ぼす影響を検討した（2016N304715）。NCI-H929 細胞株をベランタマブ　マホドチン（0.1～10 μg/mL）存在下で 48 時間プレインキュベートしたのち、ベランタマブ　マホドチン非存在下でヒト未熟樹状細胞（iDC；健常ドナーから得た単球を GM-CSF/IL-4 処理することによって得た）と 24 時間共培養し、樹状細胞の活性化／成熟に及ぼす影響（活性化によって樹状細胞から遊離する IL-10 及び IL-12p70 を電気化学発光法で測定、並びに活性化／成熟マーカーである CD40、CD83 及び CD86 をフローサイトメトリーで解析）を評価した。

その結果、NCI-H929 細胞株をプレインキュベートした際のベランタマブ　マホドチンの濃度に依存して、樹状細胞の細胞表面における CD40、CD83 及び CD86 の発現増加がみられた。このことから、ベランタマブ　マホドチンによる NCI-H929 細胞株の殺傷によって樹状細胞が活性化／成熟されることが示唆された。また、ベランタマブ　マホドチン存在下でプレインキュベートした NCI-H929 細胞株と iDC を共培養した群において IL-10 が検出されたが、ベランタマブ　マホドチン存在下でプレインキュベーションしていない NCI-H929 細胞株と iDC を共培養した群と比較するとその濃度は低く、NCI-H929 細胞株をプレインキュベートした際のベランタマブ　マホドチンの濃度に応じてより低値を示した。したがって、ベランタマブ　マホドチン存在下でプレインキュベートした NCI-H929 細胞株と iDC を共培

養した群においてみられた IL-10 産生は樹状細胞の活性化と関連する作用ではないと考えられた。IL-12p70 はいずれの処理群においても検出されなかった。

2.6.2.2.2. In vitro においてベランタマブ　マホドチンと他剤を併用したときの抗腫瘍作用

MM 細胞株及び患者由来 MM 細胞を用いた in vitro 試験において、ベランタマブ　マホドチンと既承認の MM 治療薬を併用することにより、アポトーシス誘導作用及び ADCC 活性の増強がみられることが報告されている[Tai, 2014]。以下に、ベランタマブ　マホドチンと既承認の MM 治療薬又はその他の薬剤との併用効果についての検討した in vitro 試験の成績を記載した。

ベランタマブ　マホドチン、GSK2857914、MM に対する標準治療薬の単独での細胞増殖抑制作用

2 種類のヒト MM 細胞株（OPM-2 及び MOLP-8）を用いて、ベランタマブ　マホドチン、GSK2857914、MM に対する標準治療薬（レナリドミド、ポマリドミド、ボルテゾミブ又はデキサメタゾン）の細胞増殖抑制作用を評価した（2019N395340）。MM 細胞株を各被験物質とともに 72 時間インキュベートしたのち、CellTiter-Glo アッセイで細胞生存性に及ぼす影響を評価した。その結果、ベランタマブ　マホドチンは、OPM-2 及び MOLP-8 細胞株に対して細胞傷害作用を示した（OPM-2 及び MOLP-8 細胞株に対する増殖抑制作用の IC50 はそれぞれ 0.5 及び 1.77 μg/mL）が、GSK2857914 では増殖抑制作用はみられなかった。また、OPM-2 細胞株をボルテゾミブ、デキサメタゾン、レナリドミド又はポマリドミドで処理することにより細胞傷害作用が認められたが、MOLP-8 細胞株に対して直接的な細胞傷害作用を示したのはボルテゾミブのみであった。

ボルテゾミブとの併用

ベランタマブ　マホドチンとボルテゾミブ（既承認の MM 治療薬であるプロテアソーム阻害剤）を併用したときの殺細胞作用を、8 種類の MM 細胞株を用いて検討した（2013N178354）。

MM 細胞株をベランタマブ　マホドチン（最高 10 μg/mL）又はボルテゾミブ（最高 0.1 μM）単独、もしくはそれらを併用（濃度比を固定）下で 72 時間インキュベートしたのち、CellTiter-Glo アッセイにより細胞生存率を測定した。その結果、ベランタマブ　マホドチン単独処理群では、8 株中 7 株の MM 細胞株に対して増殖阻害作用がみられた。固定濃度比でボルテゾミブと併用した群では、8 株中 2 株で相乗効果が認められ、1 株で相加効果が認められた。

レナリドミドとの併用

ベランタマブ　マホドチンの ADCC 活性及び活性型細胞傷害性薬物（cys-mcMMAF）による殺細胞作用がレナリドミド（MM 治療薬として承認されている免疫調整薬）によって増強されるか否かを検討した（2013N176111）。

ベランタマブ　マホドチン（最高 10 μg/mL）による ADCC 活性を、カルセイン AM を用いた細胞溶解アッセイにより測定した。ターゲット細胞には、カルセイン AM でラベルした MM1Sluc、XG1 及び ANBL6 細胞株又は患者由来 MM 細胞を用い、エフェクター細胞には、レナリドミド（2 μM）を添加／非添加で 5 日間プレインキュベートした PBMC（単独又は BMSC と共培養）を用いた。その結果、レナリドミド存在下でプレインキュベートした PBMC を用いた群では、BMSC 併存下／非併存下のいずれにおいても MM1Sluc、XG1 及び ANBL6 細胞株又は患者由来 MM 細胞に対するベランタマブ　マホドチンの ADCC 活性がレナリドミドを添加しなかった群と比較して増強した。sBCMA の影響を評価するために、MM 細胞株培養液の上清（sBCMA を含む）を添加して同様のアッセイを行ったところ、sBCMA の存在下でもベランタマブ　マホドチンの ADCC 活性はレナリドミドと併用することにより増強した。

また、MM1R 細胞株をベランタマブ　マホドチン又はレナリドミド単独、もしくはそれらを併用したときの殺細胞作用を CellTiter-Glo アッセイで評価したところ、併用した群では、ベランタマブ　マホドチン単独群と比較して殺細胞作用の増強がみられた。

エピジェネティック作用薬との併用

ベランタマブ　マホドチンによる MM 細胞株に対する増殖抑制作用がエピジェネティック作用薬と併用したときに増強されるか否かを in vitro の細胞生存アッセイで評価した（2018N392007）。細胞表面 BCMA 発現レベルが異なる MM 細胞株又はリンパ腫細胞株に数種類のエピジェネティック化合物（濃度比を固定）を添加して 4 日間インキュベートした。その後、ベランタマブ　マホドチン（最高 10 μM）を添加／非添加で更に 2 日間インキュベートしたのち、細胞生存性を CellTiter-Glo™アッセイで測定した。対照抗体として、GSK2857914 又は IgG1-mcMMAF の評価も行った。その結果、検討した細胞株及び薬剤で一貫した併用効果は認められなかった。

γ セクレターゼ阻害剤との併用

細胞表面 BCMA 発現レベルが異なる MM 細胞株及びリンパ腫細胞株パネルを用いた一連の in vitro 試験において、γ セクレターゼ阻害剤（GSI）処理により、細胞表面 BCMA 発現が増加し、その結果としてベランタマブ　マホドチンの作用（細胞増殖活性及び ADCC 活性）が増強するか否かを検討した（2019N415573）。細胞増殖アッセイでは、各細胞株に種々の濃度の GSI（nirogacestat を含むいくつかの GSI を使用）を添加し 24 時間プレインキュベートした。その後、ベランタマブ　マホドチン（最高 10 μg/mL）を添加して更に 72 時間インキュベートし、細胞生存性を Coulter Vi-Cell-XR Cell Viability Analyzer で測定した。ADCC アッセイでは、ベランタマブ　マホドチンと nirogacestat を併用したときのヒト FcγRIIIa 活性化作用について、ヒト FcγR 活性化刺激に応答して nuclear factor of activated T cells（NFAT）レポーター遺伝子を発現するように改変した Jurkat 細胞を用いて評価した。NFAT は ADCC 発現の際に核に移行する転写因子であり、NFAT レポーター遺伝子の活性化は ADCC 活性の指標となる。Jurkat エフェクター細胞を種々の濃度の各 GSI 及び

GSK2857914（ベランタマブ　マホドチンの抗体部分；最高 10 μg/mL）の存在下で 24 時間プレインキュベートし、FcγR への結合を評価した。

細胞増殖アッセイでは、ベランタマブ　マホドチン単独で増殖抑制作用がみられた MM 細胞株及びリンパ腫細胞株において、ベランタマブ　マホドチンと種々の GSI を併用することにより、細胞増殖抑制作用が相乗的に増強した。Nirogacestat 併用時におけるベランタマブ　マホドチンの EC50 は、単独処理した場合の 1/3000～1/50 であった。また、ベランタマブ　マホドチンの単独処理では増殖抑制作用がみられなかった一部のリンパ腫細胞株でも併用により相乗効果が認められた。対照抗体として用いた IgG-mcMMAF では、単独及び GSI との併用時のいずれにおいても細胞増殖抑制作用は認められなかった。ADCC アッセイでは、細胞増殖アッセイよりも少ない細胞株数で評価したが同様の結果が得られ、GSK2857914 及び nirogacestat の併用により ADCC 活性の増強がみられた。

2.6.2.2.3. In vivo 試験

種々のヒト MM 細胞株を移植したマウスを用いて、ベランタマブ　マホドチン及び／又は関連する ADC の抗腫瘍効果を評価した。本試験に使用する細胞株として、抗 BCMA 抗体に微小管阻害薬を結合させた ADC に対する感受性の異なる NCI-H929、OPM-2 及び MOLP-8 細胞株を選択した。BCMA の発現レベルが高い NCI-H929 細胞株では、in vitro において強力な抗腫瘍活性が認められ、BCMA の発現レベルが中程度～高い細胞株である OPM-2 では NCI-H929 に比べて、ベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍活性が弱いことが示されている。MOLP-8 は CD38 の発現レベルが高く BCMA の発現レベルが低い細胞株である。これらの細胞株を NK 細胞及びマクロファージを保持するが T 細胞及び B 細胞を欠失した免疫不全マウス（CB17 SCID マウス）に移植し、in vivo における抗腫瘍作用を検討した。また、ヒト BCMA を発現させた EL4 マウスリンパ腫（EL4-hBCMA）細胞株を正常な免疫機能を有する C57BL/6 マウスに移植し、ベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果への免疫学的機序の関与を評価した。

本項では、ベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果について要約したが、ベランタマブ　マホドチンの mAb 部分である GSK2857914 の作用についても検討し、特異性又は抗腫瘍効果の相違について評価した。対照群には IgG 抗体、IgG1-mcMMAF 及び／又は媒体を投与した。検討したすべてのモデルでみられたベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果は、主に BCMA を標的とした ADC としての作用であると考えられた。使用したマウスはヒト IgG 抗体による ADCC 活性を評価するために最適化された系統ではない。また、ベランタマブ　マホドチンのマウス FcγR に対する親和性は検討していないが、ヒト IgG1 及びマウス FcγR 間の相互作用により ADCC 及び ADCP 作用が引き起こされることが報告されている[Smith, 2012]。

2.6.2.2.3.1. NCI-H929 細胞株を用いた異種移植モデルにおける抗腫瘍効果

MM 細胞株 NCI-H929 を皮下移植した雌の CB17 SCID マウス（n=5/群）に、ベランタマブ　マホドチン、GSK2857914、IgG 対照抗体又は IgG1-mcMMAF［いずれもリン酸緩衝生理食塩液（PBS）で調製］を表 2.6.2.9 に示す用法／用量で IP 投与した（2013N175478）。無作

為化割付後、初回投与日を試験 0 日として、最長試験 60 日まで腫瘍体積［長径×（短径 ^{2}）×0.5］を測定したが、腫瘍の長径が既定のエンドポイントである 1.5 cm に到達した時点又は腫瘍の自潰がみられた場合はマウスを安楽死させた。

試験 1（Study1）では、ベランタマブ　マホドチンの 4 mg/kg（100 μg/匹）を週 2 回 2 週間 IP 投与した 5 匹のマウス全例で完全な腫瘍退縮が認められ、試験終了（60 日）までその効果が持続した。ベランタマブ　マホドチンの 2 mg/kg（50 μg/匹）を同じ用法で投与した時、投与初期に腫瘍体積の減少が認められたものの、その効果は持続しなかった。試験 2（Study2）では、試験 30 日まで腫瘍体積の測定を行った。ベランタマブ　マホドチン（4 mg/kg）の単回投与群では投与初期に腫瘍体積の減少が認められたが、その効果は持続しなかった。一方、週 2 回 1 週間 IP 投与した群では完全な腫瘍退縮が認められ、その効果は持続した。試験 4（Study4）では、試験 31 日まで腫瘍体積の測定を行った。ベランタマブマホドチン（4 mg/kg）を週 2 回 1 週間、又は週 1 回 2 週間（いずれも計 2 回投与）IP 投与したマウスでは、腫瘍体積の減少が認められ、その効果は持続した（表 2.6.2.9）。

GSK2857914 投与群では、試験 1 及び 2 において、検討したすべての用量（2 mg/kg 及び 4 mg/kg）及び用法で腫瘍増殖の抑制が認められたが、完全に腫瘍の退縮がみられたのは 4 mg/kg を週 2 回 2 週間投与した 1 例のみであった（表 2.6.2.9）。

表 2.6.2.9　NCI-H929 細胞株を用いた異種移植モデルにおけるベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果のまとめ（n=5/群）

Treatment	Study Number	Dose	Total Doses	Dose Frequency	Study Length (days)	Average Tumor volume (mm^3)			Tumor Free Mice at End of Study
						Day 0 (predose)	Week 3	End of Study[a]	
Belantamab mafodotin	Study1	50 µg (2 mg/kg)	4	Twice weekly	60	189.8	112.1	1563.2	0/5
	Study1	100 µg (4 mg/kg)	4	Twice weekly	60	163.8	0.7	0	5/5
	Study2	100 µg (4 mg/kg)	1	NA	30	208.7	679.2	680.63	0/5
	Study2	100 µg (4 mg/kg)	2	Twice weekly	30	219.5	0.63	0.10	4/5
	Study4	100 µg (4 mg/kg)	2	Twice weekly	31	175.9	1.7	2.79	4/5
	Study4	100 µg (4 mg/kg)	2	Once weekly	31	201.5	30.1	49.7	3/5
GSK2857914	Study1	50 µg (2 mg/kg)	4	Twice weekly	60	174.3	311.2	859.7	0/5
	Study1	100µg (4 mg/kg)	4	Twice weekly	60	180.5	410.9	980.3	1/5
	Study2	100 µg (4 mg/kg)	1	NA	30	177.4	943.7	1031.1	0/5
	Study2	100 µg (4 mg/kg)	2	Twice weekly	30	200.1	995.6	1137.2	0/5

Key:
GSK2857914 = The unconjugated, afucosylated monoclonal antibody; NA = not applicable
Report 2013N175478, m4.2.1.1
a = Day 60.

血清中 sBCMA 濃度及び sBCMA—薬剤複合体濃度測定

NCI-H929 細胞株移植 CB17 SCID マウスにベランタマブ　マホドチンを投与したのち、血清中の sBCMA 及び sBCMA—薬剤複合体濃度を測定した（2013N167720）。その結果、IgG1-mcMMAF 投与群と比較して、ベランタマブ　マホドチン投与群では遊離 sBCMA 濃度の低下及びベランタマブ　マホドチンと複合体を形成した sBCMA 濃度の上昇がみられた。

抗腫瘍効果に対する薬物抗体比の影響

NCI-H929 細胞株を用いた異種移植モデルにおいて、ベランタマブ　マホドチンの DAR の抗腫瘍効果への影響について評価した（2017N317971）。NCI-H929 細胞株を移植した雌の CB17 SCID マウス（n=9 又は n=10/群）に DAR が 2.1～5.7 のベランタマブ　マホドチン（生理食塩液で調製、2 及び 4 mg/kg）又は IgG 対照抗体（4 mg/kg）を週 2 回計 4 回、IP 投与し

た。初回投与日を試験 1 日として、腫瘍体積が既定のエンドポイントである 2000 mm^3 に到達した時点又は試験最終日（試験 61 日）にマウスを安楽死させた。

DAR が 2.1～5.7 のベランタマブ　マホドチン（2 mg/kg）は抗腫瘍効果を示したが、DAR の違いによる抗腫瘍効果への影響はみられなかった。また、DAR が 3.5～4.6 のベランタマブ　マホドチンを用いた試験では、4 mg/kg 群は 2 mg/kg 群よりも強い抗腫瘍効果を示したが、DAR の相違による抗腫瘍効果への影響はみられなかった。DAR が 2.1 のベランタマブ　マホドチンを 4 mg/kg で投与したときの抗腫瘍効果は、DAR が 4.1 のベランタマブ　マホドチンを 2 mg/kg で投与したときよりも強かった。以上の結果から、検討した DAR の範囲内では、ベランタマブ　マホドチンの in vivo での抗腫瘍効果に対して DAR の相違による明らかな影響はないことが示された。

2.6.2.2.3.1.1. NCI-H929 細胞株を用いた異種移植モデルにおける病理組織学的及び免疫組織化学的解析

NCI-H929 細胞株を皮下移植した CB17 SCID マウスにベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914（いずれも 4 mg/kg、n=5/群）を 1、2 又は 3 回 IP 投与（試験 0、3 又は 7 日に投与）したのち、最終投与 3 日後に腫瘍を採取して白血球浸潤及び／又は ICD バイオマーカーに及ぼす影響を評価した（2019N395917）。対照として非投与群を設定した。これとは別に、ベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 を上記と同じ用法・用量で投与したのち、最終投与 7 又は 10 日後に腫瘍を採取する群を設定したが、いずれの時点においてもベランタマブ　マホドチン投与群では腫瘍が完全に退縮しており、腫瘍を採取することはできなかった。それ以外の投与群では、生存期間中の設定した採取日に腫瘍及び血液を採取し、病理組織学的評価並びにヘマトキシリン&エオジン（H&E）染色、Ki67、CC3、CRT 及び pEIF2α 抗体を用いた免疫組織化学的評価を行った。Ki67 は増殖細胞で発現しているタンパク質、CC3 はアポトーシスの際に切断される酵素、CRT 及び pEIF2α は早期 ICD マーカーである。

ベランタマブ　マホドチン投与群では、非投与群の対照マウス及び／又は GSK2857914 投与マウスから採取した腫瘍と比較して、腫瘍実質内でネクローシスの割合が減少すると共に腫瘍浸潤リンパ球の増加がみられた。また、ベランタマブ　マホドチンの投与群の腫瘍細胞において、Ki67、CC3、CRT 及び pEIF2α の染色強度の低下がみられた。

2.6.2.2.3.2. OPM-2 細胞株を用いた異種移植モデルにおける抗腫瘍効果

OPM-2 細胞株を皮下移植した雌の CB17 SCID マウス（n=5/群）にベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914（いずれも 100 μg/匹：4 mg/kg、PBS で調製）を、表 2.6.2.10 に示す用法で IP 投与した（2013N175478）。

試験 3（Study3）では、初回投与日を試験 0 日として、試験 100 日まで腫瘍体積［長径×（短径 ^{2}）×0.5］を測定したが、腫瘍の長径が既定のエンドポイントである 1.5 cm に到達した時点又は腫瘍の自潰がみられた場合はマウスを安楽死させた。ベランタマブ　マホドチン（4 mg/kg）を週 2 回 1 又は 2 週間投与（計 2 又は 4 回投与）した全例で腫瘍の退縮が認められた。しかし、試験終了時（試験 100 日）まで持続的な腫瘍退縮がみられたのは、計 2 回

投与群では 5 例中 1 例及び計 4 回投与群では 5 例中 2 例であった。GSK2857914（4 mg/kg）を週 2 回 1 又は 2 週間投与（計 2 又は 4 回投与）した群においても、対照群と比較してわずかな腫瘍増殖の抑制がみられたが、統計学的な有意差は認められなかった（表 2.6.2.10）。

試験 5（Study5）では、ベランタマブ　マホドチン（4 mg/kg）を週 1 回 2 週間又は週 2 回 1 週間投与（いずれも計 2 回投与）し、初回投与日を試験 0 日として 36 日まで腫瘍体積を測定した。ベランタマブ　マホドチン（4 mg/kg）を週 2 回 1 週間投与したときの抗腫瘍効果は、週 1 回 2 週間投与したときよりも強かった。試験最終日（試験 36 日）に完全な腫瘍の退縮が認められたのは週 2 回投与群で 5 例中 3 例であったのに対し、週 1 回投与群では 5 例中 2 例であった（表 2.6.2.10）。

表 2.6.2.10　OPM-2 細胞株を用いた異種移植モデルにおけるベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果のまとめ（n=5/群）

Treatment	Study Number	Dose	Total Doses	Dose Frequency	Study Length (days)	Average Tumor volume (mm^3)			Tumor Free Mice at End of Study
						Day 0 (predose)	Week 3	End of Study[a]	
Belantamab mafodotin	Study3	100 µg (4 mg/kg)	2	Twice weekly	100	202.7	28.1	168.3	1/5
	Study3	100 µg (4 mg/kg)	4	Twice weekly	100	193.3	2.2	1	2/5
	Study5	100 µg (4 mg/kg)	2	Once weekly	36	207.2	39.8	88.4	2/5
	Study5	100 µg (4 mg/kg)	2	Twice weekly	36	209.9	12.8	44.2	3/5
GSK2857914	Study3	100 µg (4 mg/kg)	2	Twice weekly	100	207.5	1196.3	1345.7	0/5
	Study3	100 µg (4 mg/kg)	4	Twice weekly	100	194.3	968.9	1258.7	0/5

Key:
GSK2857914 = The unconjugated, afucosylated monoclonal antibody; NA = not applicable.
Report 2013N175478, m4.2.1.1.
a = Day 60.

血清中 sBCMA 濃度及び sBCMA—薬剤複合体濃度測定

OPM-2 細胞株移植 CB17 SCID マウスにおいても血清中の遊離型及び薬物結合型 sBCMA 濃度を測定した（2013N167720）。その結果、NCI-H929 細胞株移植マウスを用いた検討と同様に、ベランタマブ　マホドチン投与群では、IgG 対照抗体投与群と比較して遊離 sBCMA 濃度の低下及びベランタマブ　マホドチンと複合体を形成した sBCMA 濃度の上昇がみられた。

2.6.2.2.3.3. MM1Sluc 細胞株を用いた播種性同所移植モデルにおける抗腫瘍効果及び免疫組織化学的解析

T 細胞、B 細胞及び NK 細胞が機能不全である雌の CB17 SCID-beige マウスにヒト MM1Sluc 細胞株（ルシフェラーゼ発現細胞）を注入して播種性同所移植モデルを作製し、ベランタマブ　マホドチンの生存期間に及ぼす影響及び抗腫瘍作用（骨髄中の腫瘍量に対する作用）を検討した（2013N176111）。マウス（n=8/群）にベランタマブ　マホドチン（0.4 及び 4 mg/kg）、GSK2857914（4 mg/kg）、IgG1-mcMMAF（対照：4 mg/kg）又は媒体（PBS）を、週 2 回の頻度で、計 9 回 IP 投与した。すべてのマウスの腫瘍量（骨髄におけるルシフェリン―ルシフェラーゼ反応による発光量を指標）及び体重を 5～12 日毎に試験最終日（試験 120 日）まで測定した。試験最終日の腫瘍量及び体重測定後に大腿骨を採取して切片を作製し、免疫組織化学染色による解析を行った。

ベランタマブ　マホドチンの 0.4 及び 4 mg/kg 投与群では、媒体群及び IgG1-mcMMAF 投与群と比較して、腫瘍量の顕著な減少がみられた。0.4 mg/kg 投与群では全例（n=8）で試験期間の 120 日間に渡り腫瘍退縮がみられた（死亡例なし）。4 mg/kg 投与群でも全例（n=8）で腫瘍退縮がみられた。そのうち 5 例は試験 120 日まで生存し、試験最終日まで腫瘍の退縮がみられた。その他の 3 例は骨髄における腫瘍増殖はみられなかったものの、試験 84 日以降に死亡した（剖検の結果、死因は胸腺リンパ肉腫と判断された）。また、ベランタマブ　マホドチン投与群では、いずれの用量においても媒体群及び IgG1-mcMMAF 投与群と比較して生存期間の延長（カプランマイヤー曲線による解析で有意差あり）が認められた。また、試験期間を通して体重減少はみられなかった。IgG1-mcMMAF 投与群の腫瘍量及び生存期間は、媒体群との間に有意な差は認められなかった。ベランタマブ　マホドチン、媒体群及び IgG1-mcMMAF 投与群における生存期間の中央値は、それぞれ 101、48 及び 62 日であった。GSK2857914（4 mg/kg）投与群における腫瘍増殖抑制作用は、ベランタマブ　マホドチン（0.4 及び 4 mg/kg）投与群よりも弱かったが、媒体群及び IgG1-mcMMAF 投与群と比較して有意な腫瘍量の抑制及び生存期間の延長がみられた。

試験最終日に採取した大腿骨における BCMA 及び CD138 の免疫組織化学染色では、ベランタマブ　マホドチン投与群での腫瘍量の減少を裏付けるように、BCMA の染色強度の低下及び CD138 陽性腫瘍細胞の減少がみられた。また、ベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 投与群では腫瘍周囲へのマクロファージの浸潤（F4/80 マーカーを指標）の増加がみられた。本モデルは NK 細胞の機能不全を示す CB17 SCID-beige マウスを用いていることから、本試験でみられたベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果には FcγR を発現している単球又はマクロファージが寄与している可能性が示唆された。

2.6.2.2.3.4. マウス EL4-hBCMA 細胞株同種移植リンパ腫モデルを用いた試験

ヒト BCMA を発現させた EL4 マウスリンパ腫細胞株（EL4-hBCMA）を正常な免疫機能を有する C57BL/6 マウスに皮下移植した同種移植モデルを用い、ベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果を検討した。

2.6.2.2.3.4.1. EL4-hBCMA 細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果

EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6（n=10/群、群の平均腫瘍体積 154～156 mm^3）にベランタマブ　マホドチン（生理食塩液で調製、1、3、10、15、20 及び 30 mg/kg）、対照として媒体（生理食塩液）又は IgG1-mcMMAF（30 mg/kg）を 3 日に 1 回、計 6 回 IP 投与した（2019N396819）。割付日を試験 1 日とし、腫瘍体積が 2000 mm^3 に達した時点又は試験最終日（試験 60 日）にマウスを安楽死させた。

ベランタマブ　マホドチン投与群では、すべての用量で忍容性が認められ、体重への影響はほとんどみられなかった。ベランタマブ　マホドチン群では、用量依存的な腫瘍増殖抑制作用及び生存期間の延長がみられた（p≤0.001 vs 媒体群）。ベランタマブ　マホドチンの最高用量（30 mg/kg）群では、10 例中 10 例で完全な腫瘍の退縮がみられた。そのうち 9 例が試験終了時（試験 60 日）まで生存し、試験終了時点でいずれのマウスにおいても腫瘍は検出されなかった。ベランタマブ　マホドチンの 1、3、10、15 及び 20 mg/kg 投与群において、試験終了時点まで生存し、かつ腫瘍が検出されなかった動物は、それぞれ 1、0、3、1 及び 5 例（各群 10 例中）であった。IgG1-mcMMAF（30 mg/kg）群では 10 例中 1 例であった。

続いて、上記試験において試験終了時まで生存し、かつ腫瘍の完全退縮がみられたマウスに、EL4 親細胞又は EL4-hBCMA 細胞株（n=9/群）を再移植（再移植群）した。再移植後の腫瘍体積について、ベランタマブ　マホドチンを投与していないマウスに EL4 親細胞（n=10）又は EL4-hBCMA を移植した群（n=10）（ナイーブマウス群）と比較した。その結果、再移植群では、EL4 親細胞又は EL4-hBCMA 細胞株のいずれにおいても腫瘍増殖はみられなかった。一方、ナイーブマウス群では EL4 親細胞又は EL4-hBCMA 細胞株移植の各群 10 例中それぞれ 10 例及び 9 例で腫瘍増殖がみられ、再移植群と比較して、有意な差がみられた（p≦0.001 vs 再移植群）。以上の結果から、ベランタマブ　マホドチンを投与したマウスでは腫瘍抗原スプレッディングが誘導され、BCMA だけでなく、他の腫瘍抗原に対する免疫反応も惹起されている可能性が示唆された。

抗腫瘍効果における複数の作用機序の寄与

ベランタマブ　マホドチンが有する複数の作用機序の抗腫瘍作用への寄与を評価するため、EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6 マウス（n=10/群、群の平均腫瘍体積 168～172 mm^3）にベランタマブ　マホドチン、GSK2857914、数種類の抗体（低フコース化 IgG1 抗体、Fc 無効化変異を導入した GSK2800525、低フコース化マウス IgG2a 抗体並びにマウス IgG2a に GSK2857914 の CDR を導入した抗体）及び IgG1-mcMMAF を投与し、腫瘍体積及び生存期間に及ぼす影響を検討した（2019N396819）。用量はいずれの被験物質も 30 mg/kg で週 2 回、3 週間 IP 投与した。割付日を試験 1 日とし、腫瘍体積が 2000 mm^3 に達した時点又は試験 60 日まで腫瘍体積を測定した。

本モデルにおいて、GSK2857914 投与群では、Fc 無効化変異を導入した GSK2800525 及び低フコース化 IgG1 投与群と比較して、腫瘍体積が 2000 mm^3 に達するまでの期間の有意な延長及び生存期間の延長（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）が認められた。このことからベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果に ADCC がある程度寄与している可能性が

示唆された。ベランタマブ　マホドチンは、対照群である数種類の抗体及び IgG1-mcMMAF 投与群と比較して、腫瘍体積が 2000 mm^3 に達するまでの期間の延長及び生存期間の延長（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）が認められ、10 例中 4 例で腫瘍退縮が試験終了時まで持続した。本モデルにおいて持続的な腫瘍の退縮は ADC であるベランタマブ マホドチンのみでみられ、naked 抗体である GSK2857914 では腫瘍の退縮作用はみられなかった。このことから、腫瘍退縮作用の発現には、NK 細胞及びマクロファージを介した ADCC 又は ADCP による抗体依存的な作用だけでは十分ではなく、cys-mcMMAF によるチューブリンの重合阻害及びアポトーシスの誘導に伴う ICD が必要であることが示唆された。

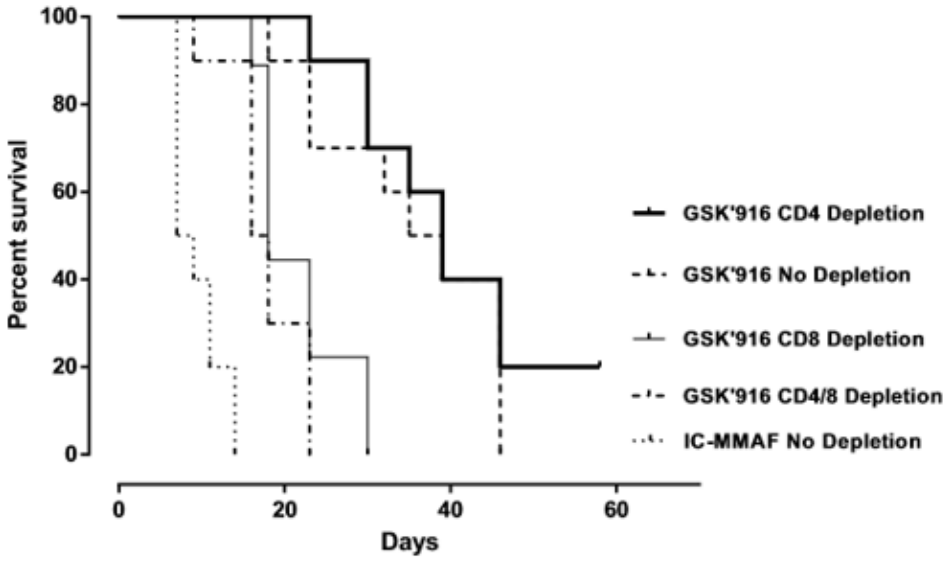
2.6.2.2.3.4.2. EL4-hBCMA 細胞株移植モデルにおける抗腫瘍効果に対する CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の関与

EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌マウスを用いてベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果における CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の関与について検討した（2018N359715）。ベランタマブ　マホドチン（15 mg/kg、生理食塩液で調製）、IgG1-mcMMAF（15 mg/kg）又は生理食塩液投与群を設け、それぞれを更に 4 群に分けて各群に抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD4 抗体／CD8 抗体並びに生理食塩液を併用投与した（n=10/群）。初回投与日を試験 0 日として、ベランタマブ　マホドチン、IgG1-mcMMAF 及び媒体（生理食塩液）を週 2 回 3 週間（計 6 回）投与し、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD4 抗体／CD8 抗体又は生理食塩液は、0、4、10 及び 16 日目に計 4 回投与した。試験 4 日及び試験 58 日（試験最終日）の腫瘍体積並びに生存期間を評価した。抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD4 抗体／CD8 抗体又は生理食塩液投与群は、以下、CD4、CD8、CD4/CD8 depletion 群又は no depletion 群と記載した。

ベランタマブ　マホドチン投与群の試験 4 日における腫瘍体積は、抗 CD4 及び抗 CD8 抗体の存在にかかわらず、IgG1-mcMMAF 対照群と比較して有意に低値であった。ベランタマブ　マホドチンの腫瘍増殖抑制作用に抗 CD4 抗体及び抗 CD8 抗体投与による有意な影響はみられなかった。生理食塩液又は IgG1-mcMMAF の投与対照群においても抗 CD4 抗体及び CD8 抗体投与による腫瘍体積への影響はみられなかった。試験最終日（試験 58 日）において、腫瘍の消失が認められたのはベランタマブ　マホドチン＋CD4 depletion 群の 10 例中 2 例（20%）のみであったが、ベランタマブ　マホドチンの全投与群（CD4、CD8、CD4/CD8 depletion 群又は no depletion 群）において、腫瘍増殖抑制作用がみられ、試験最終日の腫瘍体積は抗 CD4 及び／又は CD8 抗体投与に関わらず IgG1-mcMMAF 対照投与群と比較して有意に低値であった（$p<0.001$）。また、ベランタマブ　マホドチン＋no depletion 群は、ベランタマブ　マホドチン＋CD8 depletion 群並びにベランタマブ　マホドチン＋CD4/CD8 depletion 群と比較して、生存期間の延長が認められた（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり；それぞれ $p=0.012$ 及び $p<0.001$）（図 2.6.2.5）。ベランタマブ　マホドチン＋no depletion 群及びベランタマブ　マホドチン＋CD4 depletion 群の投与群間では、カプランマイヤー曲線の比較で有意差はみられなかった。IgG1-mcMMAF 対照群では、CD4、CD8、CD4/CD8 depletion 群又は no depletion 群間で生存期間に有意な差はみられなかった。生理食

塩液＋no depletion 群では、生理食塩液＋CD8 depletion 群及び CD4/CD8 depletion 群と比較して生存期間の延長がみられた（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり；それぞれ p=0.041 又は p=0.049）。

以上のことから、EL4-hBCMA モデルに対するベランタマブ　マホドチンの生存期間の延長作用に CD4 陽性 T 細胞の関与はみられず、CD8 陽性 T 細胞が関与していることが示唆された。



Key:
GSK'916 = Belantamab mafodotin; IC-MMAF = IgG1-mcMMAF
Report 2018N359715, m4.2.1.1.

図 2.6.2.5　EL4-hBCMA 細胞株移植モデルにおけるベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果に対する CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の関与

2.6.2.2.3.4.3. EL4-hBCMA 細胞株移植マウスにおける病理組織学的及び免疫組織化学的評価

EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6 マウスにベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914（15 mg/kg）を 1、2 又は 3 回（試験 0、2 又は 4 日）IP 投与した。1 又は 2 回投与群では最終投与 2 日後に腫瘍及び血液を採取し、3 回投与群では最終投与の 3、5 又は 7 日後に腫瘍及び血液を採取して、病理組織学的評価並びに H&E 染色、CRT 及び／又は CD8 抗体を用いた免疫組織化学的評価を実施した（n=5/群）。対照として非投与群を設けた（2019N395916）。

ベランタマブ　マホドチン投与群では、非投与対照群と比較して腫瘍におけるネクローシスの割合が増加し、腫瘍の周囲において腫瘍浸潤リンパ球（TIL）及び CD8 陽性 T 細胞が増加した。腫瘍細胞における CRT の染色強度は、GSK2857914 投与群よりもベランタマブ　マホドチン投与群の方が高く、ベランタマブ　マホドチンの 3 回投与群の最終投与の 5 及び 7 日後に採取した腫瘍で最も高く、同程度であった。このことから、ベランタマブ　マホド

チンの投与によって腫瘍に浸潤した TIL を介するシグナル伝達が CRT 発現レベルの増加に関連している可能性が示唆された。一方、GSK2857914 を 1 回投与し、その 2 日後に採取した腫瘍、及びベランタマブ　マホドチンを 1 又は 2 回投与し、最終投与の 2 日後に採取した腫瘍での CRT 染色強度は低かったことから、CRT の免疫組織化学的評価で ICD（マーカー）を検出するためには、ベランタマブ　マホドチンの投与後、4 日以降が適切であると考えられた。

2.6.2.2.4. 他剤と併用したときの抗腫瘍効果

ベランタマブ　マホドチンを既承認の MM 治療薬と併用することにより、MM 細胞株及び患者由来 MM 細胞においてアポトーシス活性及び ADCC 作用が増強することが示されている[Tai, 2014]。本項では、MM 細胞株を移植したマウス又は EL4-hBCMA 細胞株移植モデルにベランタマブ　マホドチンを単独投与又は他の抗腫瘍薬と併用投与したときの腫瘍体積及び生存期間に及ぼす影響を検討した。対照として IgG1-mcMMAF 及び媒体を用いた。MM 治療薬の調製には薬理試験で一般的に使用されており、各薬剤に適した媒体を使用した。

2.6.2.2.4.1. MM の標準治療薬と併用したときの抗腫瘍効果

ボルテゾミブ、レナリドミド又はデキサメタゾンとの 2 剤又は 3 剤併用投与試験

2 種類のヒト MM 細胞株（OPM-2 又は MOLP-8）を皮下移植したマウスモデルを用いて、ベランタマブ　マホドチンを MM に対する標準治療薬であるボルテゾミブ、レナリドミド又はデキサメタゾンと 2 剤又は 3 剤で併用投与したときの腫瘍増殖抑制作用及び生存期間に及ぼす影響を評価した（2019N395340）。

OPM-2 細胞株を皮下移植した雌の NOD/SCID マウス（n=10/群）に、ベランタマブ　マホドチンと、レナリドミド、ボルテゾミブ又はデキサメタゾンを 2 剤併用投与、もしくはベランタマブ　マホドチン、ボルテゾミブ及びデキサメタゾンの 3 剤併用投与を行った。2 剤併用投与の試験では、対照群として、ベランタマブ　マホドチン＋各薬剤の媒体（ベランタマブ　マホドチン単独投与群と定義）、IgG1-mcMMAF＋各薬剤の媒体、及び IgG1-mcMMAF＋レナリドミド、ボルテゾミブ又はデキサメタゾン（各薬剤の単独投与群と定義）を投与し、3 剤併用投与の試験では、IgG1-mcMMAF＋デキサメタゾン＋ボルテゾミブを投与した。また、生理食塩液のみを投与する群も設定した。これらの試験では、ベランタマブ　マホドチン（生理食塩液で調製、2 mg/kg）を週 2 回 IP 投与、ボルテゾミブ（1 mg/kg）を週 2 回 IP 投与、レナリドミド（10 mg/kg）を 4 日に 1 回 PO 投与、デキサメタゾン（3 mg/kg）を 1 日 1 回 IP 投与した。MOLP-8 細胞株を皮下移植した雌の NOD/SCID マウス（n=10/群）では、レナリドミド以外の被験物質は OPM-2 細胞株移植モデルと同様の条件で投与し、レナリドミドは 50 mg/kg を 5 日に 1 回 PO 投与した。投与期間はすべて 2 週間とした。被験物質非投与の対照群［IgG1-mcMMAF（2 mg/kg、IP 投与）＋各薬剤の媒体投与群及び生理食塩液投与群］も同様の期間投与した。MM 細胞株を移植した日を試験 0 日として、腫瘍体積が既定のエンドポイントである 2000 mm^3 に到達した時点又は試験最終日（OPM-2 細胞株移植モデル；試験 57 日、MOLP-8 細胞株移植モデル；試験 54 日）にマウスを安楽死させた。

OPM-2 及び MOLP-8 細胞株移植モデルのいずれにおいても、ベランタマブ　マホドチン単独投与群では忍容性が認められ、明らかな体重減少及び一般状態への影響は認められなかった。しかし、MOLP-8 細胞株移植モデルにおいて、ベランタマブ　マホドチン＋標準治療薬を併用投与した群では、投与開始後 2 日以内に体重減少が認められた。また、IgG1-mcMMAF＋標準治療薬投与群及びベランタマブ　マホドチン＋標準治療薬の 2 剤及び 3 剤併用投与群では死亡例がみられた（ボルテゾミブ単独投与群で 3 例、ベランタマブ　マホドチン＋ボルテゾミブ併用投与群で 3 例、デキサメタゾン単独投与群で 3 例、IgG1-mcMMAF＋ボルテゾミブ＋デキサメタゾン併用投与群で 1 例、ベランタマブ　マホドチン＋ボルテゾミブ＋デキサメタゾン併用投与群で 3 例）。ベランタマブ　マホドチン単独投与群では死亡は認められず、併用投与群における死亡はボルテゾミブ単独投与群又はデキサメタゾンの併用投与群でみられた死亡数を超えるものではなかったことから、併用投与群でみられた死亡はベランタマブ　マホドチンの投与に関連するものではないと考えられた。

OPM-2 又は MOLP-8 細胞株移植マウスの試験 25 日における各群の平均腫瘍体積を比較したところ、ベランタマブ　マホドチン単独投与群の平均腫瘍体積は、IgG1-mcMMAF＋各薬剤の媒体投与群よりも有意に低値であった。いずれのモデルにおいても、ベランタマブ　マホドチン＋レナリドミドの併用投与群における腫瘍増殖抑制作用は、ベランタマブ　マホドチン又はレナリドミド単独投与群よりも強く、有意差が認められた。また、OPM-2 細胞株移植マウスにベランタマブ　マホドチン＋ボルテゾミブを 2 剤で併用したときの腫瘍増殖抑制作用はベランタマブ　マホドチン又はボルテゾミブ単独投与群よりも強く、有意差が認められた。MOLP-8 細胞株移植モデルにおいても、ベランタマブ　マホドチン＋ボルテゾミブ併用群における腫瘍増殖抑制作用は、ボルテゾミブ単独投与群よりも強く、有意差が認められたが、ベランタマブ　マホドチン単独投与群との比較では有意差は認められなかった。OPM-2 及び MOLP-8 細胞株移植モデルのいずれにおいても、ベランタマブ　マホドチン＋デキサメタゾン併用群とベランタマブ　マホドチン単独投与群の腫瘍増殖抑制作用に有意差は認められなかった。すなわち、ベランタマブ　マホドチン＋デキサメタゾン併用投与でみられた腫瘍増殖抑制作用は、主にベランタマブ　マホドチンによる作用であり、デキサメタゾンの併用による相加／相乗効果は認められなかった。OPM-2 細胞株移植モデルにおいてベランタマブ　マホドチン＋ボルテゾミブ＋デキサメタゾンの 3 剤併用群における腫瘍増殖抑制は、ベランタマブ　マホドチン＋ボルテゾミブの 2 剤併用群と同程度であった。MOLP-8 細胞移植モデルではベランタマブ　マホドチン＋ボルテゾミブ＋デキサメタゾンを 3 剤併用投与したときの腫瘍増殖抑制作用は、ベランタマブ　マホドチン＋ボルテゾミブの 2 剤併用群と比較してわずかに増強したが有意差は認められなかった。以上のように、腫瘍増殖の抑制を指標とした上記の検討では、デキサメタゾンを追加投与することによる腫瘍増殖抑制作用の増強はみられなかった。

ポマリドミド又はデキサメタゾンとの 2 剤又は 3 剤併用投与試験

OPM-2 又は MOLP-8 細胞株を移植したマウスモデルに、ベランタマブ　マホドチンと MM に対する標準薬であるポマリドミドを 2 剤併用投与、又はデキサメタゾンを加えた 3 剤併用投与したときの腫瘍増殖抑制作用及び生存期間に及ぼす影響について評価した。対照群

として、ベランタマブ　マホドチン単独投与群（ベランタマブ　マホドチン＋各薬剤の媒体投与群を単独投与群と定義）に加え、2 剤併用投与試験では、IgG1-mcMMAF＋各薬剤の媒体の併用投与、IgG1-mcMMAF＋ポマリドミド又はデキサメタゾン（各薬剤の単独投与群と定義）又はポマリドミド＋デキサメタゾン投与群、3 剤併用投与試験では、デキサメタゾン＋ポマリドミド＋IgG1-mcMMAF 投与群を設けた。

OPM-2 細胞株移植モデルにおいて、ベランタマブ　マホドチン（週 2 回 IP 投与、2 mg/kg）＋ポマリドミド（1 日 1 回 PO 投与、2.5 mg/kg）併用群の腫瘍増殖抑制作用を各薬剤の単独投与群と比較したところ、腫瘍増殖抑制作用の増強は認められなかった。一方、生存期間は、ベランタマブ　マホドチン＋ポマリドミドの併用群の方が各薬剤の単独投与群と比較して長く、ベランタマブ　マホドチン＋ポマリドミドの併用群と各薬剤の単独投与群の生存曲線に有意な差がみられた（それぞれ p=0.011、p=0.028、ログランク検定）。ベランタマブ　マホドチン＋ポマリドミド＋デキサメタゾンの 3 剤併用群では、ベランタマブ　マホドチン＋ポマリドミドの 2 剤併用群又はポマリドミド＋デキサメタゾンの 2 剤併用群と比較して、腫瘍増殖抑制作用に有意差は認められなかった。MOLP-8 細胞株移植モデルでも、OPM-2 細胞株移植モデルと同じ用法／用量でベランタマブ　マホドチンとポマリドミドを併用したところ、各薬剤の単独投与群と比較して腫瘍増殖抑制作用の増強は認められなかった。また、ベランタマブ　マホドチンの単独投与群と比較して生存期間の延長も認められなかった。ベランタマブ　マホドチン＋ポマリドミド＋デキサメタゾンの 3 剤併用群では、ベランタマブ　マホドチン＋ポマリドミドの 2 剤併用群と比較して腫瘍増殖抑制作用の増強は認められなかった。ベランタマブ　マホドチン＋ポマリドミド＋デキサメタゾンの 3 剤併用群は、ベランタマブ　マホドチン＋ポマリドミドの 2 剤併用群と比較して生存期間の延長（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）がみられたが、ベランタマブ　マホドチン単独投与群と比較したときには有意な差はみられなかった。

以上をまとめると、OPM-2 及び MOLP-8 細胞株を用いたいずれのモデルにおいても、ベランタマブ　マホドチン＋ポマリドミドの 2 剤併用群にデキサメタゾンの追加による更なる腫瘍増殖抑制作用の増強及び生存期間の延長はみられなかった。

2.6.2.2.4.1.1. EL4-hBCMA 細胞株移植モデルにおけるベランタマブ　マホドチン及び抗 PD-1 抗体の併用効果

抗腫瘍効果

ベランタマブ　マホドチン及び抗 PD-1 抗体の併用投与による抗腫瘍作用を評価するために、EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6 マウス（n=10/群）に、ベランタマブ　マホドチン（1、3、10 又は 15 mg/kg）を単独又はサロゲート抗体である抗マウス PD-1 抗体 RMP1-14（10 mg/kg）（すべて生理食塩液で調製）との併用で週 2 回 3 週間 IP 投与した（2017N345016）。併用投与のすべての群で忍容性が認められ、ベランタマブ　マホドチンの最高用量である 15 mg/kg の単独投与群又は RMP1-14（10 mg/kg）との併用投与群でも、体重減少はみられず、腫瘍の自潰は軽微であり、その他の悪影響は認められなかった。ベランタマブ　マホドチンの単独投与群ではいずれの用量においても、対照群である IgG1-mcMMAF 群と比較して有意な腫瘍増殖抑制がみられたが、RMP1-14 との併用による抗腫瘍

作用の有意な増強はみられなかった。また、試験終了時点で腫瘍消失がみられたマウスの割合を比較して併用効果を評価したところ、併用群では 50%であり、ベランタマブ　マホドチン単独投与群での割合（40%）と比較して高い傾向がみられたが、有意な差はみられなかった。

血清サイトカイン並びに免疫プロファイリング及び遺伝子発現プロファイリングに及ぼす影響

ベランタマブ　マホドチン及び RMP1-14 を併用投与したときの、血清中サイトカインの測定、免疫プロファイリング（血液を用いて、フローサイトメトリーにより T 細胞、NK 細胞、B 細胞数を測定）及び遺伝子発現プロファイリングに及ぼす影響を検討した。EL4-hBCMA 細胞株移植マウスを、ベランタマブ　マホドチン単独投与群（ベランタマブ　マホドチン＋ラット IgG2 を単独投与群と定義）、RMP1-14 単独投与群（RMP1-14＋ヒト IgG1-mcMMAF を単独投与群と定義）、ベランタマブ　マホドチン＋RMP1-14 投与群、非投薬群（ラット IgG2＋ヒト IgG-mcMMAF）及び媒体（生理食塩液）群に群分けした。1 週目にはラット IgG2（10 mg/kg）、RMP1-14（10 mg/kg）又は生理食塩液のみを、計 2 回投与し、2 週目にこれらの被験物質とヒト IgG1-mcMMAF（15 mg/kg）、ベランタマブ　マホドチン（15 mg/kg）又は生理食塩液を同時に計 2 回投与した。すなわち、RMP1-14、その対照抗体は及び生理食塩液は計 4 回、ベランタマブ　マホドチン及びその対照抗体は計 2 回投与した。最終投与 24 時間後、血液、腫瘍及び脾臓を採取して解析を行った（2018N380821）。腫瘍検体については、H&E 染色による病理組織学的評価並びに CRT 及び／又は CD8 抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った（2019N395913）。

いずれの投与群においても、血清中サイトカイン濃度に対する影響は認められなかった。免疫プロファイリングの結果、ベランタマブ　マホドチン単独投与では、媒体群と比較して T 細胞及び樹状細胞の腫瘍浸潤が有意に増加し、腫瘍微小環境におけるコアクチベーター分子 OX40 及び ICOS の発現、T 細胞の増殖及び樹状細胞の活性化マーカーの発現が有意に上昇していた。また、遺伝子発現プロファイリングの結果、RMP1-14 又はベランタマブ　マホドチン単独投与群のいずれにおいても、腫瘍内の主要な免疫応答遺伝子発現に変化がみられたが、併用投与群では免疫応答遺伝子の発現への影響はほとんどみられなかった。更に、組織学的解析で腫瘍のネクローシスの比率を評価したところ、その比率は RMP1-14 単独投与群及びベランタマブ　マホドチンとの併用投与群で高かった。腫瘍の周囲への CD8 陽性 T 細胞浸潤が最も多くみられたのは、RMP1-14 の単独投与群であった。

2.6.2.2.4.1.2. EL4-hBCMA 細胞株移植モデルにおけるベランタマブ　マホドチンと抗 OX40 アゴニスト抗体との併用効果

1 つ目の試験では、EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6 マウスにベランタマブ　マホドチン（生理食塩液で調製、10 mg/kg）又はサロゲート抗体である抗マウス OX40 アゴニスト抗体（クローン OX86；マウス IgG2a）（生理食塩液で調製、1 及び 5 mg/kg）を単独もしくは併用により週 2 回 3 週間 IP 投与した（n=10/群）。本試験ではベランタマブ

マホドチン単独投与群にはベランタマブ　マホドチン＋マウス IgG2a を、抗 OX40 アゴニスト抗体単独投与群には、OX86+IgG1-mcMMAF を投与した。対照群には適切なアイソタイプ対照抗体を投与した。初回投与を試験 0 日として、腫瘍体積が既定のエンドポイントである 2000 mm^3 に到達した時点又は試験最終日（試験 83 日）にマウスを安楽死させた（2017N348146）。

OX86 及びベランタマブ　マホドチンの併用効果を、試験最終日の時点で腫瘍が消失したマウスの個体数を指標に評価した。OX86 及びベランタマブ　マホドチンの投与に対して忍容性がみられ、いずれの群においても明らかな体重減少及び一般状態への影響は認められなかった。死亡は、ベランタマブ　マホドチン単独投与群の 1 例でのみ認められた（試験 31 日）（投与に関連した死亡ではないと判断）。この群の死亡個体以外のマウスは、腫瘍の消失がみられず、試験期間中に腫瘍体積がエンドポイントに到達したため、その時点で安楽死させた。OX86 の単独投与群（1 及び 5 mg/kg）ではそれぞれ 10 例中 8 例及び 5 例で試験終了時（試験 83 日）に腫瘍の消失がみられた。OX86 の 1 又は 5 mg/kg とベランタマブ　マホドチンを併用した群ではそれぞれ 10 例中 5 例及び 9 例で試験終了日に腫瘍の消失がみられた。OX86 単独投与群と比較して、腫瘍消失例数は OX86 の 1 mg/kg の併用群では減少し、OX86 の 5 mg/kg の併用群では増加したが、いずれも統計学的な有意差はみられなかった。したがって、本試験では OX86 及びベランタマブ　マホドチンの併用投与による明らかな効果は示されなかった。

2 つ目の試験では、EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6 マウス（n=10/群）にベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg）又は OX86（0.2、1 又は 5 mg/kg）を週 2 回 3 週間、単独又は併用で IP 投与し、単独／併用時の作用を比較した（2019N398617）。本試験ではベランタマブ　マホドチン単独投与群にはベランタマブ　マホドチン＋マウス IgG2a を、抗 OX40 アゴニスト抗体単独投与群には、OX86＋IgG1-mcMMAF を投与した。また、ベランタマブ　マホドチン＋OX86 併用群、マウス IgG2a＋IgG1-mcMMAF 投与群及び媒体（生理食塩液）群を設定して、各群の腫瘍体積及び生存期間を評価した。

すべての投与群で忍容性が認められた。いずれの群においても、試験期間中に平均体重の減少は認められず、投与に関連した死亡も認められなかった。媒体群及び OX86（5 mg/kg）の単独投与群では、一部のマウスで腫瘍の自潰が認められた。ベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg）と OX86（0.2、1 及び 5 mg/kg）の併用群では、各単独投与群と比較して、生存期間の有意な延長及び腫瘍増殖抑制作用の増強が認められた。ベランタマブ　マホドチン又は OX86（0.2 mg/kg）の単独投与群では、試験終了時（試験 60 日）に腫瘍消失がみられた動物はおらず、OX86（1 及び 5 mg/kg）単独投与群ではそれぞれ 10 例中 1 例でのみ認められた。ベランタマブ　マホドチン及び OX86（0.2、1 及び 5 mg/kg）の併用投与群では、それぞれ 10 例中 7、4 及び 5 例で試験終了時に腫瘍の消失がみられた。

3 つ目の試験では、EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6 マウス（n=7/群）に、ベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg）及び OX86（1 又は 5 mg/kg）を単独もしくは併用投与により 2 日間隔で 2 回 IP 投与し、初回又は 2 回目の投与の 48 時間後に組織検体を採取して、薬理マーカーの変化（血中サイトカインの変化、並びに所属リンパ節及び腫瘍におけるマーカーの変化）を解析した（2018N384579）。

血中サイトカインの解析では、ベランタマブ　マホドチン及び OX86（1 mg/kg）の併用投与群において、初回投与後に I 型インターフェロンシグネチャーの発現が認められた。このシグネチャーの発現レベルは OX86（1 mg/kg）の単独投与群、ベランタマブ　マホドチンの単独投与群並びに OX86＋ベランタマブ　マホドチンの併用投与群のいずれにおいても、2 回目の投与後に増強がみられた。所属リンパ節における免疫細胞の割合を評価したところ、ベランタマブ　マホドチン及び OX86（5 mg/kg）の各単独投与群及び併用群において、IgG1-mcMMAF 対照群と比較して、樹状細胞の割合の増加が認められた。また、ベランタマブ　マホドチンの単独投与群では、OX40（5 mg/kg）の単独投与又は併用群と比較して、制御性 T 細胞の割合の有意な増加も認められた。更に、腫瘍における薬理マーカーの変化をフローサイトメトリーで解析したところ、OX86（5 mg/kg）及びベランタマブ　マホドチンの単独投与群並びにそれらの併用群では、初回投与後の生存細胞において ICD マーカーである CRT の発現増加がみられた。

2.6.2.2.4.1.3. EL4-hBCMA 細胞株移植モデルにおけるベランタマブ　マホドチンと抗 ICOS アゴニスト抗体との併用効果

1 つ目の試験では、EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌マウス（n=10/群）にベランタマブ　マホドチン（生理食塩液で調製、10 mg/kg）又はサロゲート抗体である抗マウス ICOS 抗体（クローン 7E.17G9；マウス IgG1 抗体）（生理食塩液で調製、200 µg/匹）を単独もしくは併用で週 2 回、3 週間 IP 投与した。本試験ではベランタマブ　マホドチン単独投与群にはベランタマブ　マホドチン＋マウス IgG1 抗体を、ICOS 抗体単独投与群には ICOS 抗体＋IgG1-mcMMAF（10 mg/kg）を投与した。対照群には適切なアイソタイプ対照抗体を投与した。初回投与を試験 0 日として、腫瘍体積が既定のエンドポイントである 2000 mm^3 に到達した時点又は試験最終日（試験 83 日）にマウスを安楽死させた（2017N348146）。

すべての投薬群で忍容性が認められ、明らかな体重減少及び一般状態への影響は認められなかった。試験を通して死亡はみられず、全例が腫瘍体積のエンドポイントに到達したため安楽死させたか、試験終了時（試験 83 日）に腫瘍の消失がみられたかのいずれかであった。試験終了時に腫瘍の消失がみられた動物は、ベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg）の単独投与群で 10 例中 1 例、抗 ICOS 抗体（200 µg/匹）の単独投与群で 10 例中 2 例、ベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg）及び抗 ICOS 抗体（200 µg/匹）の併用群で 10 例中 3 例であった。以上のように単独投与群と併用投与群で、試験終了時（試験 83 日）に腫瘍の消失がみられた動物数に明らかな違いはみられなかった。

2 つ目の試験では、EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6 マウス（n=10/群）に、サロゲート抗体であるマウス抗 ICOS 抗体（クローン 7E.17G9；マウス IgG1 抗体）（0.05、0.5、1、5 及び 10 mg/kg）を単独（抗 ICOS 抗体＋IgG1-mcMMAF を単独投与と定義）又はベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg）との併用で週 2 回 3 週間 IP 投与した（2019N398617）。併用群の腫瘍増殖抑制作用及び生存期間をベランタマブ　マホドチン単独群と比較したところ、明らかな併用効果は認められなかった。

2.6.2.2.4.1.4. EL4-hBCMA 細胞株移植モデルにおけるベランタマブ　マホドチンと Toll 様受容体 4（TLR4）アゴニストとの併用効果

1 つ目の試験では、EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6 マウス（n=10/群）にベランタマブ　マホドチン（生理食塩液で調製、10 mg/kg、IP 投与）又は TLR4 アゴニスト（0.5%グリセロール／4%ブドウ糖で調製、5、25 又は 50 µg/匹、IV 投与）の単独もしくは併用で週 2 回 3 週間投与し、腫瘍増殖抑制作用及び生存期間に及ぼす影響を検討した。本試験ではベランタマブ　マホドチンの単独投与群にはベランタマブ　マホドチン＋ブドウ糖を、TLR4 アゴニスト単独投与群には TLR4 アゴニスト＋IgG1-mcMMAF を投与した。初回投与を試験 0 日として、腫瘍体積が既定のエンドポイントである 2000 mm^3 に到達した時点又は試験最終日（試験 61 日）にマウスを安楽死させた（2017N348146）。

すべての投与群で忍容性が認められ、明らかな体重減少及び一般状態への影響は認められなかった。試験 10 日に TLR4 アゴニスト単独投与群の 1 例で死亡が認められた（投与に関連した死亡ではないと判断）。この群の死亡例以外のマウスは、腫瘍体積のエンドポイントに到達したため安楽死させたか又は試験終了時（試験 83 日）まで生存した（腫瘍は検出されず）。TLR4 アゴニスト（5、25 又は 50 µg/匹）及びベランタマブ　マホドチンの併用群の生存期間は各用量の TLR4 アゴニスト単独投与群と比較して延長する傾向がみられたが、生存曲線の比較において有意差は認められなかった。併用群の生存期間はベランタマブ　マホドチン単独投与群との比較においても延長傾向はみられたが、有意差が認められたのは、TLR4 アゴニスト（25 µg/匹）及びベランタマブ　マホドチンの併用投与群のみであった（p=0.049）。また、試験最終日に腫瘍消失が認められた動物数を比較したところ、TLR4 アゴニスト（25 又は 50 µg/匹）及びベランタマブ　マホドチンの併用投与群では 10 例中 4 例であったのに対し、TLR4 アゴニスト（25 又は 50 µg/匹）又はベランタマブ　マホドチン単独投与群ではそれぞれ 2 例及び 0 例であった。

2 つ目の試験では、EL4-hBCMA モデルに TLR4 アゴニスト（25 µg/匹、IV 投与）を単独又はベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg、IP 投与）との併用で試験 0、3 日に投与し、それぞれの投与 24 時間後（それぞれ試験 1 及び 4 日）に腫瘍を採取して、薬理マーカーの変化を評価した（2018N384601）。

併用投与群の腫瘍を用いたフローサイトメトリーによる解析では、CD8 陽性 T 細胞における CD25（T 細胞活性化マーカー）発現の有意な増加がみられた。また、試験 1 日及び 4 日に採取した腫瘍の遺伝子発現解析において、TLR4 アゴニストの単独投与群と同様に、併用投与群でも総遺伝子発現、マクロファージ及び骨髄マーカーの発現並びに CD8、Th1 及び B 細胞の発現レベルが増加することが示された。また、ベランタマブ　マホドチンの単独投与群と同様に、ベランタマブ　マホドチンと TLR4 アゴニスト併用群でも I 型インターフェロンシグネチャー及び TNF-α 発現レベルが増加した。

2.6.2.2.4.1.5. EL4-hBCMA 細胞株移植モデルにおけるベランタマブ　マホドチンとエピジェネティック抗がん剤との併用効果

EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6 マウス（n=10/群）にベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg）を単独（ベランタマブ　マホドチン＋媒体を単独投与と定義）又は

種々のエピジェネティック抗がん剤［Enhancer of zeste homolog 2（EZH2）、蛋白質アルギニンメチルトランスフェラーゼ 1 又は 5（PRMT1 又は 5）、Bromodomain and Extra-Terminal motif（BET）、リジン特異的ヒストン脱メチル化酵素 1（LSD1）又は DNA メチルトランスフェラーゼ 1（DNMT1）の阻害剤］との併用で週 2 回 3 週間 IP 投与し、腫瘍増殖抑制作用及び生存期間に及ぼす影響を検討した。初回投与を試験 0 日とし、腫瘍体積が 2000 mm^3 を超えたマウスは試験から除外し安楽死させた（2018N393779）。

すべての投与群で忍容性が認められ、明らかな体重減少及び一般状態のへの影響は認められなかった。PRMT 1 阻害剤単独投与群（PRMT1 阻害剤＋IgG1-mcMMAF を単独投与群と定義）で試験 8 日に 1 例、DNMT1 阻害剤＋ベランタマブ　マホドチンの併用群で試験 25 日に 1 例の死亡が認められたが、これらのマウスのいずれにおいても、試験 0 日と比較して体重減少は認められなかった。剖検は実施しなかったため、死因は不明であるが、これらの群の他の 9 例及びその他の投与群において、一般状態の悪化は認められなかった。

ベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg）の単独投与群では、IgG1-mcMMAF 対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制作用及び生存期間の延長（カプランマイヤー曲線の比較）がみられた。ベランタマブ　マホドチンと PRMT1 阻害剤との併用群では、ベランタマブ　マホドチン単独投与群と比較して生存期間の延長が認められた（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）が、PRMT1 単独投与群の生存曲線との間に有意差はみられなかった。試験最終日に腫瘍消失がみられた動物数は併用投与群で 10 例中 6 例であったのに対し、ベランタマブ　マホドチン又は PRMT1 の単独投与群ではそれぞれ 10 例中 0 例及び 2 例であった。ベランタマブ　マホドチンと PRMT5 阻害剤又は BET 阻害剤との併用群においても、ベランタマブ　マホドチン単独投与群と比較して生存期間の延長が認められた（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）。以上の結果から、エピジェネティック抗がん剤 PRMT1、PRMT5 及び BET 阻害剤をベランタマブ　マホドチンと併用することにより、ベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果が増強する可能性が示唆された。なお、ベランタマブ　マホドチンと EZH2 阻害剤、LSD1 阻害剤又は DNMT1 阻害剤との併用群では、いずれも併用効果は認められなかった。

また、腫瘍に対する免疫記憶を評価するため、上記試験において試験 74 日まで生存し、かつ腫瘍が認められなかったマウスに、EL4-hBCMA 細胞株を再移植した。対照としてベランタマブ　マホドチンを投与していない同週齢の C57BL/6 マウス（ナイーブマウス）に EL4-hBCMA を移植し、腫瘍形成能を確認した。ベランタマブ　マホドチンの投与により腫瘍の消失が認められたマウスでは、EL4-hBCMA 細胞株を再移植しても腫瘍増殖はみられなかったことから、腫瘍抗原に対するメモリーT 細胞が存在していることが示された。ナイーブマウスに EL4-hBCMA を移植した群では腫瘍の増殖がみられたことから、用いた EL4-hBCMA は増殖能を有していることが確認された。

2.6.2.2.4.1.6. EL4-hBCMA 細胞株移植モデル又は NCI-H929 細胞株異種移植モデルにおけるベランタマブ　マホドチンと PRMT1 又は 5 阻害剤との併用効果

EL4-hBCMA モデルにおける抗腫瘍効果

EL4-hBCMA 細胞株を皮下移植した雌の C57BL/6 マウス（n=10/群）にベランタマブ　マホドチン、PRMT1 又は PRMT5 阻害剤を単独もしくは併用で 3 週間投与し、腫瘍増殖抑制作用及び生存期間に及ぼす影響を検討した。ベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg、週 2 回 IP 投与）の単独投与群にはベランタマブ　マホドチン＋媒体（脱イオン水）を、PRMT1 阻害剤（37.5 及び 150 mg/kg、1 日 1 回 PO 投与）単独投与群には PRMT1 阻害剤＋IgG1-mcMMAF を、PRMT5 阻害剤（50 又は 100 mg/kg で 1 日 2 回又は 100 mg/kg、1 日 1 回 PO 投与）単独投与群には PRMT5 阻害剤＋IgG1-mcMMAF を投与した。対照群には生理食塩液を投与した。初回投与を試験 1 日とし、腫瘍体積が既定のエンドポイントである 2000 mm^3 に到達した時点又は試験最終日（試験 60 日）にマウスを安楽死させた（2019N398490）。

ベランタマブ　マホドチンの単独投与群で試験 22 日に 1 例、PRMT1 阻害剤（150 mg/kg）＋ベランタマブ　マホドチン（10 mg/kg）投与群で試験 33 日に 1 例、PRMT1 阻害剤（150 mg/kg）単独投与群で試験 3 日に 1 例の死亡が認められた。これらの死亡と投与との関連性は否定できなかった。

ベランタマブ　マホドチンの単独投与群では、媒体対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制作用及び生存期間の延長（カプランマイヤー曲線の比較）がみられた。ベランタマブ　マホドチンと PRMT1 又は PRMT5 阻害剤との併用投与群では、それぞれの単独投与群と比較して、有意な腫瘍増殖抑制作用の増強及び生存期間の延長が認められた。

NCI-H929 モデルにおける抗腫瘍効果

NCI-H929 細胞株を皮下移植した雌の CB17 SCID マウス（n=10/群）に GSK2857914（2 mg/kg、週 2 回 2 週間 IP 投与）及びベランタマブ　マホドチン（2 mg/kg、週 2 回 2 週間 IP 投与）を単独又は PRMT1 阻害剤［（150 mg/kg、1 日 1 回 PO 投与）PRMT1 阻害剤＋IgG1-mcMMAF を単独投与と定義］又は PRMT5 阻害剤［（100 mg/kg、1 日 2 回 PO 投与 PRMT5 阻害剤＋IgG1-mcMMAF を単独投与と定義］と併用投与し、腫瘍増殖抑制作用を検討した。対照群には IgG1-mcMMAF を投与した。初回投与を試験 1 日とし、腫瘍体積が既定のエンドポイントである 2000 mm^3 に到達した時点又は試験最終日（試験 60 日）にマウスを安楽死させた（2019N398490）。

GSK2857914＋PRMT1 阻害剤の併用群で試験 7 日に 1 例、ベランタマブ　マホドチン＋PRMT5 阻害剤の併用群で試験 37 日に 1 例で顕著な体重減少がみられたため、安楽死させた。また、PRMT1 阻害剤単独投与群の 1 例で偶発的な死亡がみられた。

ベランタマブ　マホドチンの単独投与群は、IgG1-mcMMAF と比較して有意な腫瘍増殖抑制作用及び生存期間の延長（カプランマイヤー曲線の比較）がみられた。ベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 と PRMT 阻害剤（PRMT1 阻害剤又は PRMT5 阻害剤）の併用群では、PRMT 阻害剤単独群と比較して腫瘍増殖抑制作用の増強及び生存期間の延長（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）が認められた。一方、ベランタマブ　マホドチン又は

GSK2857914 の単独投与群との比較においては、腫瘍増殖抑制作用の増強及び生存期間の有意な延長は認められなかった。

2.6.2.2.4.1.7. NCI-H929 又は OPM-2 細胞株異種移植モデルにおけるベランタマブ　マホドチンと GSI との併用効果

2 種類のヒト MM 細胞株（NCI-H929 及び OPM-2）を皮下移植したマウス（2.6.2.2.3.1 及び 2.6.2.2.3.2）を用いて、ベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 を GSI である nirogacestat と併用したときの腫瘍増殖抑制作用及び生存期間に及ぼす影響を検討した（2023N528894）。

NCI-H929 又は OPM-2 細胞株を皮下移植した雌の NOD/SCID マウス（n=10/群）にベランタマブ　マホドチン（生理食塩液で調製、2 及び 4 mg/kg、週 2 回 2 週間）、GSK2857914（生理食塩液で調製、0.2、0.4、2 及び 4 mg/kg、週 2 回 2 週間）又は nirogacestat（DMSO 混合液で調製、30 及び 60 mg/kg、1 日 1 回 3 週間）を単剤もしくは併用で IP 投与した。ベランタマブ　マホドチンの単独投与群にはベランタマブ　マホドチン＋DMSO 混合液を、GSK2857914 の単独投与群には GSK2857914＋DMSO 混合液を、nirogacestat の単独投与群には nirogacestat＋生理食塩液を投与した。対照群には、生理食塩液＋DMSO 混合液を投与した。

NCI-H929 又は OPM-2 細胞株を移植したいずれのモデルにおいても、ベランタマブ　マホドチン（2 及び 4 mg/kg）の単独投与群は、対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制作用がみられた。ベランタマブ　マホドチン＋nirogacestat（30 及び 60 mg/kg）の併用投与群とベランタマブ　マホドチン単独投与群の腫瘍増殖作用に有意差はみられなかった。ベランタマブ　マホドチン（2 及び 4 mg/kg）の単独投与群の生存期間は、対照群と比較して延長がみられた（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）が、ベランタマブ　マホドチン＋nirogacestat（30 及び 60 mg/kg）の併用投与群とベランタマブ　マホドチン単独投与群の生存曲線に有意差は認められなかった。

NCI-H929 及び OPM-2 細胞株移植モデルにおいて、GSK2857914（0.2、0.4、2 及び 4 mg/kg）の単独投与群及び nirogacestat との併用群のいずれにおいても、媒体対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制作用は認められなかった。また、GSK2857914（2 及び 4 mg/kg）の単独投与群において、媒体対照群と比較して生存期間の延長がみられた（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）が、nirogacestat と併用しても、GSK2857914 の各単独投与群と比較して生存期間の更なる延長は認められなかった。

2.6.2.2.4.1.8. NCI-H929 又は OPM-2 細胞株異種移植モデルにおける GSK2857914 の単独投与の効果、GSK2857914 とベランタマブ　マホドチンの 2 剤の併用効果並びに MM 治療薬又は GSI との 3 剤併用効果

2 種類のヒト MM 細胞株（NCI-H929 及び OPM-2）を皮下移植したマウス（2.6.2.2.3.1 及び 2.6.2.2.3.2）を用いて、GSK2857914 の単独投与、GSK2857914 とベランタマブ　マホドチンの 2 剤の併用効果並びに GSK2857914 とベランタマブ　マホドチンを GSI である

nirogacestat 又は MM 治療薬ポマリドミドと 3 剤併用したときの腫瘍増殖抑制作用及び生存期間に及ぼす影響を検討した（2023N528895）。

NCI-H929 及び OPM-2 モデルにおける GSK2857914 の単独投与の効果

NCI-H929 又は OPM-2 細胞株を皮下移植した雌の NOD/SCID マウス（n=10/群）に GSK2857914（生理食塩液で調製、4、8 及び 16 mg/kg）を週 2 回 2 週間 IP 投与したところ、媒体対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制作用及び生存期間の延長（カプランマイヤー曲線の比較）がみられた。

NCI-H929 モデルにおける様々な投与スケジュールによるベランタマブ　マホドチンと GSK2857914 の併用効果

NCI-H929 細胞株を皮下移植した雌の NOD/SCID マウスにベランタマブ　マホドチン（生理食塩液で調製、4 mg/kg）又は GSK2857914（生理食塩液で調製、8 mg/kg）を単独もしくは併用で IP 投与した。様々な投与スケジュールでの併用効果を検討するため、ベランタマブ　マホドチンと GSK2857914 の併用群では、初回の投与を試験 0 日として、以下のようなスケジュールで投与する群を設けた（n=10/群）：ベランタマブ　マホドチン（試験 0 日投与）＋GSK2857914（試験 0 日投与）、ベランタマブ　マホドチン（試験 0 日投与）＋GSK2857914（試験 3、7、10 日投与）、ベランタマブ　マホドチン（試験 0 日投与）＋GSK2857914（試験 7、10、13 日投与）。媒体対照群には、生理食塩液（試験 0、3、7、10 日投与）を投与した。

ベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 の単独投与群では媒体対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制作用がみられた。また、ベランタマブ　マホドチン＋GSK2857914 の併用投与群では、ベランタマブ　マホドチンの単独投与群の腫瘍増殖抑制作用と比較して、有意な増強がみられた。また、ベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 の単独投与群では、媒体対照群と比較して生存期間の延長（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）がみられた。ベランタマブ　マホドチン＋GSK2857914 の併用投与群の生存期間は、いずれの投与スケジュールにおいても、媒体対照群及び各単独投与群と比較して更なる延長がみられた（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）。

NCI-H929 モデルにおけるベランタマブ　マホドチンと GSK2857914 の 2 剤の併用効果並びに MM 治療薬又は GSI との 3 剤併用効果

NCI-H929 細胞株を皮下移植した雌の NOD/SCID マウス（n=10/群）にベランタマブ　マホドチン（4 mg/kg）及び GSK2857914（8 mg/kg）の 2 剤、並びにこれらの 2 剤と nirogacestat（60 mg/kg）又はポマリドミド（2.5 mg/kg）の 3 剤を併用投与し、腫瘍増殖抑制作用及び生存期間に及ぼす影響を検討した。初回投与日を試験 0 日として、ベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 を試験 0 日に IP 投与、nirogacestat は 1 日 1 回 3 週間 IP 投与、ポマリドミドは 1 日 1 回 3 週間 PO 投与した。媒体対照群には生理食塩液＋DMSO 混合液を投与した。

試験 20 日における腫瘍体積を比較したところ、ベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 の 2 剤併用群の腫瘍体積は、媒体対照群と比較して有意に低値であった。ベランタマブ　マホドチン＋GSK2857914＋nirogacestat 又はポマリドミドの 3 剤併用群と、ベランタマブ　マホドチン＋GSK2857914 の 2 剤併用群の腫瘍増殖抑制作用に有意差はみられなかった。また、ベランタマブ　マホドチン＋GSK2857914 の 2 剤併用投与群では、媒体対照群と比較して生存期間の延長（カプランマイヤー曲線の比較で有意差あり）がみられた。ベランタマブ　マホドチン＋GSK2857914＋nirogacestat 又はポマリドミドの 3 剤併用群とベランタマブ　マホドチン＋GSK2857914 の 2 剤併用群の生存曲線には有意差は認められなかった。

2.6.2.2.5. サルを用いた単回投与薬理試験

形質細胞に対するベランタマブ　マホドチンの薬力学的作用を評価するために、サルを用いた単回 IV 投与試験を実施した。雄のカニクイザル（n=3/群）にベランタマブ　マホドチン（PBS で調製、1 mg/kg）又は GSK2857914（PBS で調製、1 mg/kg）を単回急速 IV 投与したのち、骨髄及び血液サンプルを採取した［2013N157994（PK 試験における検体採取）及び 2013N163514（バイオマーカー分析）］。フローサイトメトリーで血液又は骨髄中の形質細胞を解析することにより、骨髄（投与前及び投与後 14 日）及び全血（投与前並びに投与後 1 及び 14 日）における形質細胞（CD138 及び CD38 陽性）数を測定し、血液細胞中の形質細胞の割合を算出した。また、CD138 及び CD38 陽性細胞を抗 BCMA 抗体で染色して、薬物非結合の形質細胞数を測定し、形質細胞中の薬物非結合細胞の割合を算出した。更に、骨髄及び血液中（それぞれ投与前並びに投与後 14 及び 70 日）の T、B 及び NK 細胞数についても測定した。また、投与前、投与 5、30 及び 60 分後、3 及び 6 時間後並びに投与後 1、2、3、4、5、7、14、49、56 及び 70 日に採取した血清中の IgG、IgE、IgM 及び IgA 濃度を ELISA により測定した。更に、血清中の遊離 sBCMA 及び薬物結合型 BCMA 濃度を測定した。血清中の炎症性サイトカインについては、IL-2、IL-8、IL-12p70、IL-1β、GM-CSF、IFNγ、IL-6、IL-10 及び TNF-α の濃度を 9-plex アッセイを用いて投与後 70 日まで測定した。

ベランタマブ　マホドチンの単回投与群では、投与前と比較して、投与後 1 及び 14 日の血液中で形質細胞の減少、及び投与後 14 日の血液中で薬物非結合の BCMA を発現している形質細胞の減少がみられ、骨髄では投与後 14 日で形質細胞及び薬物非結合の BCMA を発現する形質細胞の軽微な減少が認められた。CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、CD14 陽性単球、顆粒球又は NK 様細胞（CD3 陰性/CD4 陰性/CD8 陽性）の細胞数には明らかな変化は認められなかった。また、投与後、遊離 sBCMA は速やかに（5 分後）減少したのち、投与 30 分後から投与後 2 日まで増加し、投与後 7 日まで高値が維持され、投与後 14 日から 49 日にかけて減少した。ベランタマブ　マホドチン結合 sBCMA は投与後に増加して投与後 1～4 日に最高値に達し、これはベランタマブ　マホドチンの半減期が 4 日であるという薬物動態データ（2.6.4.3.1.3）と関連した変化であった。ベランタマブ　マホドチン結合 sBCMA 濃度は投与後 4 から 14 日にかけて減少したのち、ベランタマブ　マホドチンが検出されなくなった時点で検出不可能になった。ベランタマブ　マホドチン投与によって抗体を産生する形

質細胞の減少がみられることから、免疫グロブリン濃度が低下する可能性が考えられるが、想定された通り、ベランタマブ　マホドチン投与群の平均 IgE 濃度は投与 5 分後（ベースライン）と比較して、投与後 3 日以降で 50～75%減少し、IgG、IgA 及び IgM 濃度は軽度に減少した。

GSK2857914 の単回投与群では、ベランタマブ　マホドチンと同様の形質細胞への影響がみられ、薬物非結合の BCMA を発現する形質細胞数及び IgE 濃度の顕著な減少並びに IgG、IgA 及び IgM 濃度の軽微な減少がみられた。

2.6.2.2.6. 作用機序

ベランタマブ　マホドチン（GSK2857916）は、BCMA に特異的に結合するヒト化 IgG1 抗体に微小管阻害剤である MMAF を結合させた ADC であり、低フコース化した抗 BCMA 親抗体（GSK2857914）を部分的に還元し、鎖間システイン残基に MMAF をプロテアーゼ耐性マレイミドカプロイル（mc）リンカーで結合させることにより製造する。

ベランタマブ　マホドチンは、MM 細胞表面に発現している BCMA に結合すると速やかに細胞内に取り込まれ、細胞内で抗体部分が蛋白質分解を受けて活性型細胞傷害性薬物（cys-mcMMAF）が放出されると、微小管が崩壊することにより細胞周期停止及びアポトーシスが誘導され、細胞が殺傷される[Doronina, 2006]。ベランタマブ　マホドチンは低フコース化された抗体であるため、免疫細胞（NK 細胞及びマクロファージ等）に存在する FcγR への結合親和性が増強しており、MM 細胞に対して強力な ADCC 及び ADCP 活性を有する。MM 細胞をベランタマブ　マホドチンで処理することにより CRT の細胞表面への移行並びに HMGB1 及び ATP の放出がみられたことから、細胞内で遊離した cys-mcMMAF 誘発アポトーシスは免疫原性を誘導する可能性がある。In vitro 試験においてベランタマブ　マホドチンによって誘導される細胞死が樹状細胞を活性化させることが示されたことから、ベランタマブ　マホドチンの作用機序に T 細胞を介した腫瘍免疫応答が関与する可能性が考えられた（図 2.6.2.6）。

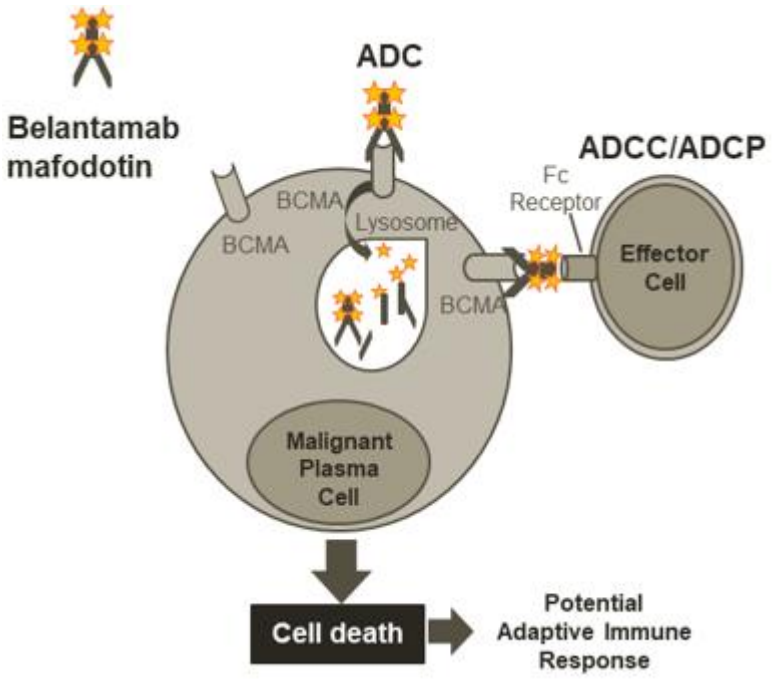


図 2.6.2.6　ベランタマブ　マホドチンの作用機序

2.6.2.3.　副次的薬理試験

副次的薬理試験では、ヒト培養細胞においてベランタマブ　マホドチンが NF-κB 経路の活性化作用を有するか、及びベランタマブ　マホドチンによる細胞傷害作用が BCMA 発現免疫細胞に特異的であるか否かを検討した。これらの試験は、効力を裏付ける試験の項で述べたような既に明らかにされている作用機序以外のベランタマブ　マホドチンが有する潜在的な作用を明らかにすることを目的として実施した。実施した試験、最終報告書の添付場所及び GLP の適用状況を表 2.6.2.11 に示した。

表 2.6.2.11 ベランタマブ マホドチンの副次的薬理試験

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
GSK2857914 inhibition of ligand binding to BCMA	Human MM cell lines	In vitro	MAB	No	GSK	2011N125952	m4.2.1.1, m4.2.1.2
Potential for agonism: NF-κB activation	Human MM cell lines	In vitro	MAB	No	GSK	2013N175851	m4.2.1.2
In vitro human T cell functional assays	Human CD4+ or CD8+ T cells	In vitro	ADC	No	GSK	2014N224675	m4.2.1.2
Selective cytotoxicity assay	Human PBMC, NK cells, CD14+ monocytes, BMSC (healthy donor and MM patient cells)	Ex vivo	ADC	No	GSK	2013N176111	m4.2.1.1, m4.2.1.2
MM Bone Marrow Methylcellulose Colony Formation Assay	Bone marrow mononuclear cells from normal and MM subjects	Ex vivo	ADC	No	[redacted]	2013N176110	m4.2.1.2

Key:
BMSC = Bone marrow stromal cells.
MM = Multiple myeloma.
NF-κB = Nuclear factor-kappaB.
NK = Natural killer cells.
PBMC = Peripheral blood mononuclear cells.

Test Articles:
ADC = Belantamab mafodotin (GSK2857916).
MAB = GSK2857914, unconjugated afucosylated mAb (parent anti-BCMA antibody).

Testing Facility:
GSK = GlaxoSmithKline.
[redacted] = [redacted]

2.6.2.3.1. In vitro 試験

2.6.2.3.1.1. BAFF 及び APRIL の BCMA への結合に対する GSK2857914 の阻害作用

BCMA とそのリガンドである BAFF 又は APRIL との結合に対する GSK2857914 の阻害作用を、無細胞プレートアッセイで検討した（2011N125952）。また、BCMA リガンドは、種々の BCMA 発現細胞において、NF-κB、JNK、PI3 キナーゼ／AKT 及び ERK シグナル等の多くの細胞シグナル伝達経路を活性化することが報告されていることから、細胞ベースのアッセイにおいて、BCMA を介した BAFF 又は APRIL 誘発 NF-κB 活性化に対する GSK2857914 の作用を検討した。

無細胞プレートアッセイにおいて、GSK2857914 は BAFF 及び APRIL 両リガンドの BCMA への結合を阻害した（2.6.2.2.1.1）。本アッセイで対照である BCMA を標的としないヒト IgG 抗体パリビズマブは阻害作用を示さなかった。

MM 細胞株 NCI-H929 を用いた NF-κB アッセイでは、GSK2857914 は sBCMA 存在下で BAFF 誘導性 NF-κB の活性化を完全に抑制した。また、sBCMA 非存在下でも同様の検討を行ったところ、GSK2857914 は BAFF 誘導性 NF-κB の活性化を完全に抑制した（2.6.2.2.1.1）。また、GSK2857914 は sBCMA 非存在下で APRIL 誘導性 NF-κB の活性化を抑制し、IC50 は 2.43 μg/mL であったが、sBCMA 存在下では抑制が認められなかった（2.6.2.2.1.1）。いずれのアッセイでもアイソタイプ対照抗体は活性を示さなかった。

2.6.2.3.1.2. BCMA を介するシグナル伝達に及ぼす影響

NF-κB は炎症性サイトカインによって活性化され、それによって抗アポトーシス経路がアップレギュレートされることで、細胞の生存に関与することが知られている[Rickert, 2011]。そこで、細胞表面に発現している BCMA を介して GSK2857914 が NF-κB シグナルに及ぼす影響（アゴニスト作用）を検討した（2013N175851）。ベランタマブ　マホドチンは、BCMA 発現 MM 細胞株に対して細胞傷害作用を示すことから、本試験ではヒト BCMA と Fc 受容体の両方に対してベランタマブ　マホドチンと同程度の結合親和性を有する GSK2857914（ベランタマブ　マホドチンの抗体部分）（2.6.2.2.1）を用いて検討した。

BCMA 発現 MM 細胞株（NCI-H929、OPM-2、ARH77-10B5 及び JJN3）に GSK2857914 及びその他の抗 BCMA 抗体を最高濃度 450 μg/mL までの濃度で添加し、NF-κB の活性化を種々の培養条件下で評価した。いずれの細胞株においても、GSK2857914 及びその他の抗 BCMA 抗体は最高濃度 450 μg/mL までアゴニスト作用を示さなかった。しかし、GSK2857914 に抗ヒト IgG を添加し架橋結合させると、NCI-H929 及び OPM-2 細胞株では、GSK2857914 のみで処理したときと比較して NF-κB シグナル伝達がそれぞれ約 2 及び 5 倍に著しく増加した（EC50 は約 1.2 及び 1.13 μg/mL）が、JJN3 細胞株では同様の変化はみられなかった。

2.6.2.3.1.3. 細胞傷害作用の選択性

ベランタマブ　マホドチンの標的が BCMA 発現 MM 細胞に選択的であるかを確認するため、MM 細胞以外のその他の細胞種に対するベランタマブ　マホドチンの結合及び ADC 又

は ADCC による細胞傷害作用を、健康ドナー及び MM 患者から単離した細胞を用いて検討した（2013N176111）。ベランタマブ　マホドチンは、MM 患者から単離した PBMC、NK 細胞、CD14 陽性単球又は BMSC の生存に影響を及ぼさなかった。BCMA の発現レベルが CD138 陽性形質細胞よりも低いことが確認されている健康ドナー及び骨髄腫患者由来の形質細胞様樹状細胞を用いた検討において、これらの細胞に対するベランタマブ　マホドチンの抗体依存性細胞傷害作用は、MM 細胞でみられた作用と比較して弱かった。

次に、メチルセルロースベースの半固形培地を用いた長期（14～16 日）のコロニー形成細胞アッセイを実施した（2013N176110）。ベランタマブ　マホドチン（500 又は 5000 ng/mL）は、正常ヒト骨髄由来骨髄前駆細胞又は患者骨髄由来 MM 前駆細胞数に影響を及ぼさなかった（それぞれ n=5 又は 4）。

以上の結果から、ベランタマブ　マホドチンの細胞傷害作用は BCMA 発現細胞に特異的な作用であることが示された。

更に、複数のドナーから採取した血液を用い、活性化 CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞の機能（増殖、活性化及びサイトカイン産生）に対するベランタマブ　マホドチンの作用についても検討した（2014N224675）。T 細胞増殖の測定には、CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit を使用した。その結果、活性化 CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞の機能に対してベランタマブ マホドチン添加による明らかな影響はみられなかった。

2.6.2.4. 安全性薬理試験

ICH S9、ICH S7A 及び 7B に従って、サルを用いた反復投与毒性試験において、ベランタマブ　マホドチン、cys-mcMMAF 及び GSK2857914 投与による心血管系及び／又は呼吸系に対する影響を評価した。また、cys-mcMMAF については、in vitro において hERG アッセイを実施し、QT 間隔を延長する可能性を評価した。実施した試験一覧、最終報告書の添付場所及び GLP 適用状況を表 2.6.2.12 に記載した。hERG アッセイで使用した cys-mcMMAF のバッチの一覧表及び媒体の情報を表 2.6.2.13 に示した。また、反復投与毒性試験で使用したベランタマブ　マホドチン、cys-mcMMAF 及び GSK2857914 のバッチの一覧表及び調製法について表 2.6.6.4 に記載した。安全性薬理試験一覧を 2.6.3 に記載した。

ベランタマブ　マホドチン

雌雄カニクイザルを用いたベランタマブ　マホドチン（1、3、10 mg/kg/週、週 1 回 IV 投与）の 3 週間反復投与毒性試験（2013N158643）において、心電図及び血清中心臓トロポニン I を測定した。各群の雌（n=3 又は 5/群）では、初回投与（試験 1 日）の 14 日前（ベースライン）、2 回目投与（試験 8 日）の直前及び投与約 30 分後に複数の誘導法（I、II、III、aVR、aVL 及び aVF を含む四肢誘導並びに MV1、MV2 及び MV3 を含む胸部 3 誘導）で ECG を約 1 分間測定した。各群の雄（n=3 又は 5/群）では、初回投与の 14 日前（ベースライン）に複数の誘導法で約 1 分間測定したのち、初回投与の 7 日前（ベランタマブ　マホドチン投与群）又は投与の 4 日前（媒体群の雄）に 1 誘導（心基部－心突部双極誘導）で約 24 時間（24 時間測定のベースライン）及び 2 回目投与（試験 8 日）後に再度 1 誘導で ECG を約 24 時間測定して定量的評価をした。その結果、心拍数並びに RR、PR、QRS、QT 及び

QTc 間隔に、ベランタマブ　マホドチンの投与に関連する明らかな変化は認められなかった。本試験で得られたカニクイザルの ECG の波形は正常と判断され、いずれの所見も散発的で発現頻度が低かったことからベランタマブ　マホドチンに関連するものではないと考えられた。以上より、ベランタマブ　マホドチンの投与による異常な ECG 所見はないと判断された。また、血清中心臓トロポニン I を測定した結果、投薬に関連する変化は認められなかった（2013N158643）。なお、血清中心臓トロポニン I は、ラットを用いたベランタマブ　マホドチン（3、10、30 mg/kg/週、週 1 回 IV 投与）の 3 週間反復投与毒性試験においても測定したが、サルでの結果と同様に投薬に関連する変化は認められなかった（2013N174857）。

カニクイザルを用いたベランタマブ　マホドチン（1、3、10 mg/kg/週、1 週間に 1 回 IV 投与）の 13 週間反復投与毒性試験では、非侵襲的テレメトリーシステム［体外ジャケット式テレメトリー（JET）システム、表面電極を使用］を使用し、6 点標準四肢誘導（I、II、III、aVR、aVL 及び aVF）で ECG の測定を実施した（2018N375127）。全例（n=3 又は 5/性/群）でベースラインとして投与開始前に約 27 時間（sham 投与の約 3 時間前から 24 時間後まで）ECG を測定した。その後、ベランタマブ　マホドチンの 5 回目投与（試験 29 日）及び 12 回目投与（試験 78 日）の投与前約 2 時間から投与後約 24 時間（計 26 時間）の ECG を測定した。対照群及び 3 mg/kg 群では、13 週間投与後の 12 週間の休薬期間中も ECG を測定した。ECG 測定では、心拍数（ECG 波形の RR 間隔から算出）、PR、QRS 及び QT 間隔並びに QTc（QT 間隔を心拍数で補正した値）をモニターした。10 mg/kg/週群の雄において、5 回目の投与 4～18 時間後に心拍数の増加［投与前値と比較して平均 19.6 拍/分（16%）］がみられたが、対照群では投与前値と比較して平均 13.2 拍/分（9%）減少した。10 mg/kg/週群は、一般状態の悪化により 5 週目に投与を中止したため、12 週及び 12 週間の休薬期間中の ECG 測定を実施しなかった。3 mg/kg/週群では、休薬期間を含む試験期間を通して心拍数及び ECG パラメータへの影響は認められなかった。本試験の投与期間中、被験物質に関連する異常な ECG 所見は認められなかったことから、本試験の休薬期間に測定した ECG の波形の質的評価は行わなかった。

以上のように、カニクイザルにベランタマブ　マホドチン（1、3 又は 10 mg/kg、週 1 回 IV 投与）を 3 又は 13 週間反復投与した結果、ベランタマブ　マホドチンによる ECG 波形異常、不整脈及び QTc の変化はみられなかった。ベランタマブ　マホドチンの 10 mg/kg を週 1 回、計 5 回投与した雄のカニクイザルにおいて心拍数の増加（16%）がみられたが、本所見は一般状態悪化に関連するものと考えられた。雌では心拍数の変化は認められなかった。

Cys-mcMMAF

カニクイザルを用いた cys-mcMMAF の 5 日間反復投与毒性試験において、ECG、血圧、呼吸数及び心拍数に対する影響を評価した（2013N177530）。全例（n=5/性/群）で IV 投与前、初回投与（試験 1 日）1～2 時間後並びに試験 7 及び 18 日に ECG を測定した。ECG は標準的な方法（10 誘導）により 50 mm/sec で記録し、RR、PR 及び QT（QTc）間隔並びに QRS 時間を測定した。ECG の各間隔で収縮期、拡張期及び平均動脈圧、心拍数並びに呼吸

数を測定／算出した。血圧の測定は、ECG 測定の前に実施した。ECG、血圧、呼吸数及び心拍数の解析は循環器専門の獣医師が実施した。

Cys-mcMMAF の IV 投与によって ECG パラメータに質的及び量的変化はみられず、呼吸数への影響も認められなかった。雌雄合算解析では、試験 1 日及び試験 7 日の収縮期、拡張期及び平均血圧は用量依存的に上昇する傾向がみられたが、雌雄別の統計解析では、これらのパラメータに統計学的な有意な変化は認められなかった。

GSK2857914

カニクイザルを用いた GSK2857914 の 4 週間反復投与毒性試験において、各動物（n=3/性/群）で初回投与開始前及び試験 15 日に ECG を測定した（2012N150466）。試験 15 日の ECG 測定は、投与前かつ Tmax（投与 48 時間後）付近で行った。ECG 測定には、I、II、III、aVR、aVL、aVF、MV_1、MV_2 及び MV_3 誘導を使用し、波形異常の有無を評価した。その結果、心電図波形に異常はみられず、GSK2857914 に関連する変化は認められなかった。また、GSK2857914 の 13 週間反復投与毒性試験において、各動物（n=3-4/性/群）で初回投与開始前及び試験 12 週に ECG を測定した。ECG の測定は、6 点標準四肢誘導（I、II、III、aVR、aVL 及び aVF）でそれぞれ 22 時間連続して測定した。その結果、心電図波形に異常はみられず、GSK2857914 に関連する変化は認められなかった（2023N536587）。

呼吸系・神経行動学的機能

呼吸系・中枢神経系に対するベランタマブ　マホドチンの作用は、ラット及びサルを用いたベランタマブ　マホドチンの 3 及び 13 週間反復投与毒性試験の IV 投与後にケージサイドで一般状態を観察することにより評価した。いずれの試験においても呼吸系・神経行動への影響を示唆する一般状態の変化は認められなかった（2013N174857、2018N374327、2013N158643 及び 2018N375127）。また、ラット及びサルを用いた cys-mcMMAF の反復投与毒性試験でも神経行動への影響を示唆する一般状態の変化は認められなかった（2013N177527 及び 2013N177530）。更に、GSK2857914 の 13 週間反復投与毒性試験においても、神経行動への影響を示唆する一般状態の変化は認められなかった（2023N536587）。

hERG アッセイ

hERG アッセイは蛋白質の影響を受けることが知られており、バイオテクノロジー応用医薬品の評価には適切でないと考えられている。また、ベランタマブ　マホドチンのような分子量の大きい蛋白質複合体が細胞膜を透過して、hERG チャネル又は hERG 阻害の機序とされる他のイオンチャネルを阻害する可能性は低いと考えられる[Sanguinetti, 2005; Vargas, 2008]ことから、ベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 を用いた心室再分極遅延の可能性を評価する in vitro 電気生理学的試験（hERG アッセイ等）は実施していない。

hERG テール電流に対する cys-mcMMAF の作用を、hERG を安定的に発現させた HEK293 細胞を用いたホールセルパッチクランプ法により検討した（2018N376608）。Cys-mcMMAF（0、10 及び 100 μM）及び媒体［0.3%ジメチルスルホキシド（DMSO）］を 1 濃度当たり 3

又は 4 個の細胞へ添加しての hERG テール電流に及ぼす影響を評価した。測定の最後に E-4031（hERG テール電流を阻害する化合物）を最大阻害濃度超の 500 nM 添加し、その際に抑制されない電流を解析から除外した。また、試験系の hERG テール電流阻害作用の感度を確認する陽性対照としてテルフェナジンを使用した。Cys-mcMMAF は hERG 電流を阻害し、阻害率（平均値 ± SEM）は 10 μM で 1.2 ± 0.7%（n=4/細胞）、100 μM で 3.4 ± 0.4%（n=3/細胞）であった［媒体対照群の阻害率は 1.1 ± 0.6%（n=3/細胞）］。Cys-mcMMAF の hERG テール電流阻害作用の IC50 は 100 μM 超と推定された。同じ条件下で、陽性対照（テルフェナジン、60 nM）の hERG テール電流阻害率（平均値 ± SD、n=2/細胞）は 87.5 ± 1.3%であったことから、本試験条件での hERG 阻害作用に対する感度が確認された。

表 2.6.2.12 ベランタマブ マホドチンの安全性薬理試験

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Test Article	Dose (mg/kg/week) or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
hERG assay	HEK293 cells	NA	In vitro	cys-mcMMAF	10 and 100 µM	NA	Yes	[redacted]	2018N376608 (130913.TFD)	m4.2.1.3
Cardiovascular monitoring[a]	Monkey (cynomolgus)	Up to 5M/5F	IV (bolus)	ADC	1, 3, 10	3 Weeks[b] (once weekly)	Yes	GSK	2013N158643 (P70260G)	m4.2.3.2
Cardiovascular monitoring[a]	Monkey (cynomolgus)	Up to 5M/5F	IV (bolus)	ADC	1, 3, 10	13 Weeks[b] (once weekly)	Yes	[redacted]	2018N375127 (P71346G)	m4.2.3.2
Cardiovascular and respiratory monitoring[a]	Monkey (cynomolgus)	5M/5F	IV (bolus)	cys-mcMMAF	0.5, 2, 5 mg/kg/day	5 Days	Yes	[redacted]	2013N177530 (1019-009)	m4.2.3.2
Cardiovascular monitoring[a]	Monkey (cynomolgus)	3M/3F	IV (bolus)	MAB	10, 30, 100	4 Weeks (once weekly)	Yes	GSK	2012N150466 (P70204G)	m4.2.3.2
Cardiovascular monitoring[a]	Monkey (cynomolgus)	3M/3F, 4M/4F[f] 3M/3F	SC IV (bolus)	MAB	2, 10 40	13 Weeks (once weekly)	Yes	[redacted]	2023N536587 (P73042G)	m4.2.3.2

Key:
a = No standalone in vivo safety pharmacology studies were conducted, evaluations of potential respiratory and/or cardiovascular effects were conducted as part of the GLP repeat dose toxicology studies conducted in cynomolgus monkeys.
b = Dosing was followed by a 12 week off dose period.
HEK293 = Human embryonic kidney cell line.
hERG = Human ether-à-go-go-related gene.
IV = Intravenous; NA = Not Applicable.

Test Articles:
ADC = Belantamab mafodotin (GSK2857916).
cys-mcMMAF = Microtubule inhibitor MMAF conjugated to cysteine via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker [The active cytotoxic moiety released from belantamab mafodotin].
MAB = GSK2857914, unconjugated afucosylated mAb (parent anti-BCMA antibody).

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
GSK = GlaxoSmithKline.
[redacted] = [redacted]

表 2.6.2.13 安全性薬理試験におけるベランタマブ マホドチンのバッチ一覧及び試験概要

Batch or Lot Number(s)	Study Type	Species (Strain) or Test System	Form	Duration of Dosing	Report No. (Study No.)	Concentration (mg/mL)	Formulation
[redacted]	hERG assay	HEK293 cells	cys-mcMMAF	NA	2018N376608 (130913.TFD)	10 and 100 μM	HB-PS and 0.3% DMSO

Note: The material used for nonclinical and clinical batches were representative of each other.

Key:

DMSO = Dimethyl sulfoxide.
HB-PS = HEPES-buffered physiological saline
HEK293 = Human embryonic kidney cell line.
hERG = Human ether-à-go-go-related gene.
NA = Not applicable.

Forms:

cys-mcMMAF = Microtubule inhibitor MMAF conjugated to cysteine via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker [The active cytotoxic moiety released from belantamab mafodotin].

2.6.2.5. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用を検討する試験は実施していない。ベランタマブ　マホドチンはBCMA に対して高い特異性と親和性を有しており、その他の分子に作用して影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

2.6.2.6. 考察及び結論

効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験では、in vitro 試験において BCMA に対する結合親和性及び種特異性、MM 細胞増殖抑制作用並びに作用機序を検討した。また、in vivo 試験において、種々のヒト MM 細胞株異種移植マウス及びヒト BCMA を安定発現させた EL4 マウスリンパ腫（EL4-hBCMA）細胞株移植マウスを用いてベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍作用を検討した。更に、ベランタマブ　マホドチンを他の抗がん剤と併用したときの作用を in vitro 及び in vivo 試験で検討した。

ベランタマブ　マホドチンは、MM 細胞表面に発現している BCMA に結合すると速やかに細胞内に取り込まれ、細胞内で抗体部分が蛋白質分解を受けて活性型細胞傷害性薬物（cys-mcMMAF）が放出されると、微小管が崩壊することにより細胞周期停止及びアポトーシスが誘導され、細胞が殺傷される[Doronina, 2006]。ベランタマブ　マホドチンは低フコース化された抗体であるため、免疫細胞（NK 細胞及びマクロファージ等）に存在する FcγR への結合親和性が増強しており、MM 細胞に対して強力な ADCC 及び ADCP 活性を有する。MM 細胞をベランタマブ　マホドチンで処理することにより CRT の細胞表面への移行並びに HMGB1 及び ATP の放出がみられたことから、細胞内で遊離した cys-mcMMAF によって誘導されたアポトーシスは免疫原性を誘導する可能性が示された。In vitro 試験においてベランタマブ　マホドチンによって誘導される細胞死が樹状細胞を活性化させることが示されたことから、ベランタマブ　マホドチンの作用機序に T 細胞を介した腫瘍免疫応答が関与する可能性が考えられた。

In vitro において、ベランタマブ　マホドチンは、BCMA の発現レベルが低い細胞株を含む検討したすべての MM 細胞株に対して細胞傷害性薬物及び ADCC の両方の機序による細胞傷害作用を有することが示された。更に、ベランタマブ　マホドチンは、ヒト標的細胞及び骨髄の微小環境を模倣するようデザインされた条件下（生理学的濃度の BCMA リガンド存在下／放出された sBCMA の存在下／様々な BCMA 発現レベルの細胞の使用／ヒトで到達可能と予想されるベランタマブ　マホドチン濃度条件下）で活性を示した。FcγR への結合親和性に mcMMAF 結合による影響はみられず、ベランタマブ　マホドチンの ADCC 活性は mcMMAF 非結合の親抗体（GSK2857914）と同程度であった。同様に、野生型フコース付加抗体と比較したとき、抗体部分の低フコース化による ADC 活性への影響は認められなかった。ベランタマブ　マホドチンは、ヒト MM 細胞株 NCI-H929、OPM-2 及び MM1Sluc を移植した雌マウスモデルにおいて腫瘍増殖を強力に抑制した。また、ベランタマブ　マホドチンは、NCI-H929 細胞株を用いた in vitro 試験において、ATP、HMGB1 及び CRT 等の ICD マーカーを増加させ、NCI-H929 細胞株と iDC を共培養した試験では、樹状細胞活性化

／成熟マーカーである CD40、CD83 及び CD86 の発現を濃度依存的に増加させた。ヒト BCMA を発現させた EL4 マウスリンパ腫細胞株（EL4-hBCMA）を、免疫機能が正常なマウスに皮下移植した同種移植モデルを用いた試験では、ベランタマブ　マホドチンの投与により持続的な腫瘍退縮がみられた。本モデルでみられたベランタマブ　マホドチンの抗腫瘍効果には、ICD マーカーの誘導及び CD8 陽性 T 細胞の増加が関与していることが示唆された。

ベランタマブ　マホドチンの併用効果の検討では、マウスモデルを用いて MM の標準治療薬（免疫チェックポイントモジュレーター及びエピジェネティック薬）との併用効果を検討した。OPM-2 又は MOLP-8 細胞株を皮下移植したマウスモデルを用いて、ベランタマブ　マホドチンと MM に対する標準治療薬であるボルテゾミブ、レナリドミド、ポマリドミド又はデキサメタゾンと 2 剤又は 3 剤で併用投与したときの抗腫瘍効果を検討した。OPM-2 細胞株移植マウスにおいて、ベランタマブ　マホドチンとボルテゾミブ、レナリドミド又はポマリドミドの 2 剤併用群は、ベランタマブ　マホドチンの単独投与群と比較して、強い腫瘍増殖抑制作用が認められた。MOLP-8 細胞株移植マウスモデルにおいては、ベランタマブ　マホドチンとレナリドミドの 2 剤併用群は、ベランタマブ　マホドチンの単独投与群と比較して、強い腫瘍増殖抑制作用が認められた。OPM-2 又は MOLP-8 細胞株を移植したマウスモデルにおいて、ベランタマブ　マホドチンと MM の標準治療薬の併用にデキサメタゾンを追加投与しても腫瘍増殖抑制作用の増強はみられなかった。EL4-hBCMA 細胞株移植モデルにベランタマブ　マホドチンをサロゲート抗体である抗マウス OX40 アゴニスト抗体又はエピジェネティック抗がん剤 PRMT1、PRMT5 もしくは BET 阻害剤と併用投与した結果、ベランタマブ　マホドチンの単独投与群と比較して強い抗腫瘍効果が認められた。In vitro 試験において、ベランタマブ　マホドチンを GSI と併用した結果、ADC 及び ADCC による細胞傷害作用が大幅に増強した。

サルを用いた単回投与薬理試験で雄のカニクイザルにベランタマブ　マホドチンを単回 IV 投与した結果、血液中 BCMA 発現細胞に対する効果として、薬物非結合の BCMA を発現する形質細胞及び IgE 濃度の顕著な減少並びに IgG、IgA 及び IgM 濃度の軽度な減少がみられた。

副次的薬理試験

BCMA とそのリガンドである BAFF 又は APRIL との結合に対する GSK2857914 の阻害作用を、無細胞プレートアッセイで検討した。また、ヒト培養細胞においてベランタマブ　マホドチンが NF-κB 経路活性化作用を有するか、及びベランタマブ　マホドチンによる細胞傷害作用が BCMA 発現細胞に特異的であるか否かを検討した。

無細胞プレートアッセイにおいて、GSK2857914 は BAFF 及び APRIL 両リガンドの BCMA への結合を完全に抑制した。また、セルベースアッセイにおいて、GSK2857914 は sBCMA 非存在下又は存在下いずれにおいても、BAFF 誘導性 NF-κB シグナル伝達を完全に抑制した。GSK2857914 は、sBCMA 非存在下で、APRIL 誘導性 NF-κB 細胞シグナル伝達を完全に抑制した。GSK2857914 は、抗ヒト IgG を添加しない又は固体基質に固定化させない場合、NF-κB シグナルに影響（アゴニスト作用）を及ぼさなかった。ベランタマブ　マホド

チン存在下で BCMA 発現細胞と非 BCMA 発現細胞を共培養した結果、BCMA 発現細胞に選択的な細胞傷害作用がみられた（すなわち、バイスタンダー効果による細胞傷害作用はみられなかった）。また、複数のドナーから採取した血液を用いた試験において、ベランタマブ　マホドチン添加による活性化 CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞の機能（増殖、活性化及びサイトカイン産生）への影響は認められなかった。

安全性薬理試験

ベランタマブ　マホドチンは進行がん患者への適用を予定しているため、ICH S9、ICH S7A 及び S7B に従い、独立した in vivo 安全性薬理試験は実施しなかったが、サルを用いた反復投与毒性試験の結果に基づき、心血管系及び呼吸系に対する影響を評価した。

カニクイザルを用いたベランタマブ　マホドチンの 3 週間反復投与毒性投与試験では、反復投与後 24 時間まで ECG を測定して定量的評価をしたところ、ECG 波形異常、不整脈及び QTc 変化は認められなかった。また、血清中心臓トロポニン I を測定した結果、投薬に関連する変化は認められなかった。血清中心臓トロポニン I は、ラットを用いたベランタマブ　マホドチンの 3 週間反復投与毒性投与試験においても測定したが、サルの結果と同様に投薬に関連する変化は認められなかった。カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験では、雄の 10 mg/kg/週群で、5 回投与後に心拍数増加（16%）がみられたが、一般状態の悪化に関連するものと判断された。雌では心拍数の変化は認められなかった。

GSK2857914 の 4 週間及び 13 週間反復投与毒性試験において、それぞれ試験 15 日又は試験 12 週で EGG を測定したところ、GSK2857914 に関連する心電図の異常は認められなかった。Cys-mcMMAF の 5 日間反復投与毒性試験で ECG、血圧、呼吸数及び心拍数に対する影響を評価した結果、投与に関連する変化は認められなかった。また、cys-mcMMAF は、in vitro の hERG アッセイにおいて、hERG テール電流に対して 100 μM までの濃度で顕著な影響を及ぼさなかった。

呼吸系・中枢神経系に対するベランタマブ　マホドチンの作用は、ラット及びサルを用いたベランタマブ　マホドチンの 3 及び 13 週間反復投与毒性試験において IV 投与後に一般状態を観察することにより評価した。いずれの試験においても呼吸系・神経行動への影響を示唆する一般状態の変化は認められなかった。また、cys-mcMMAF 及び GSK2857914 の毒性試験でも神経行動への影響を示唆する一般状態の変化は認められなかった。

結論

以上の非臨床薬理試験成績は、再発／難治性多発性骨髄腫の患者への臨床使用を支持すると考えられた。

2.6.2.7. 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8. 参考文献

Darce J R, Arendt B K, Wu X, Jelinek D F.　Regulated expression of BAFF-binding receptors during

human B cell differentiation. J Immunol. 2007;179(11):7276-86.

Doronina, S O, Toki B E, Torgov, M Y, Mendelsohn, B A, Cerveny, C G, Chace D F et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology. 2003;21:778–84.

Doronina S, Mendelsohn B, Bovee T, Cerveny C, Alley S, Meyer D, et al. Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. Bioconjugate Chemistry. 2006;17:114-24.

Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Mechanisms Underneath the Efficacy of Cancer Therapy. Cancer Immunol Res. 2016;4(11):895-902. Review. PubMed PMID: 27803050.

Laabi Y, Gras MP, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, Tsapis A. The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed. Nucleic Acids Res. 1994;22(7):1147-54.

Rickert, R C, Jellusova, J and Miletic, A. V. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. Immunological reviews, 2011;244(1):115-33.

Sanguinetti M C, Chen J, Fernandez D, Kamiya K, Mitcheson J and Sanchez-Chapula J A. Physicochemical basis for binding and voltage-dependent block of hERG channels by structurally diverse drugs. In: The hERG Cardiac Potassium Channel: Structure, Function, and Drug-Induced Long QT Syndrome. West Sussex:J Wiley & Sons, 2005:159-70.

Smith P, DiLillo DJ, Bournazos S, Li F, Ravetch J. Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity. PNAS. 2012;109:6181-86.

Tai YT, Mayes PA, Acharya C, Zhong MY, Cea M, Cagnetta A, Craigen J, Yates J, Gliddon L, Fieles W, Hoang B. Novel anti–B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma. Blood. 2014;123(20):3128-38.

Tai Y T and Anderson K C. Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma. Immunotherapy. 2015;7(11):1187-99.

Vargas H M, Bass A S, Breidenbach A, Feldman H S, Gintant G A, Harmer AR et al. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2008;58:72-6.

Appendix 1 ADDITIONAL INFORMATION

The following reports have been reviewed within GSK and the information is considered to have no bearing on safety. These reports are not included in the study listing tables for the following reasons:

Report No. (Study No.)	Title	Reason for Exclusion from Study Listing Tables
2011N125951	Chimerisation and humanisation of anti- BCMA antibodies GSK2800525 and defucosylated GSK2857914	Generation of the unconjugated monoclonal antibody, GSK2857914
2011N125953	Cloning, expression and purification of wild-type and Potelligent™ anti-BCMA monoclonal antibodies, GSK2800525 and GSK2857914	
2011N125954	Production of BCMA transfected cell lines for ADCC assays	Reagent development
2011N125956	Anti-BCMA reagent generation	
2013N163511	Method for flow cytometric analysis of cynomolgus macaque plasma cells in peripheral blood and bone marrow including free and GSK2857914 or GSK2857916 drug bound BCMA expression and absolute TBNK cell counts	Method development
2018N376165	Use of Imaging Flow Cytometry to Evaluate Calreticulin Surface Translocation Over a 3-Day Exposure to Oxaliplatin, Etoposide and/or GSK2857916	
2014N219883 (X70272N)	Co-staining of BCMA with CD20 and BLIMP-1 antibodies	
2012N136580 (M12068)	Development of an Immunohistochemical method to detect B cell maturation antigen in normal monkey spleen	
2011N127135 (M11225)	GSK2857916A:Development and validation of Methods to Measure BCMA+ B cells and plasma cells in the Cynomolgus Monkey	
2013N169586	Evaluation of BCMA expression in MM cells from patient bone marrow and cytotoxic effects of GSK2857914 and GSK2857916 on MM tumour cells	Of a general research nature that yielded no significant safety or efficacy information or was superseded by other studies.
2013N186572	Studies to Investigate the Depletion in vitro of IgG and IgM Secreting Plasmablasts in Primary Human Tonsillar Cells by GSK2857914	
2013N178416	Indications of BCMA in other tumor types	
2018N372067	Characterisation of the in vitro CDC activity of GSK2857914	
2013N178353	BCMA ADC combinations with other agents in DLBCL	
2013N171068	Assessment of BCMA Expression in Primary Human B Cells from Tonsil, and B Cells and Other Leukocyte Subsets from Peripheral Blood	
2011N125950	In vivo Activity of BCMA Antibodies	
2018N359714	Analysis of the Effect of CD4, CD8 or Dual CD4/CD8 Depletion on the Anti-Tumor Activity of GSK2857916 in the EL4-hBCMA Model	
2015N268326	Screening of Targeted Anticancer Molecules for Their Capacity to Induce a Signature of Immunogenic Cell Death	
2024N547632	Efficacy Studies of Test Compounds GSK2857916 and GSK2857914 in the Treatment of Subcutaneous NCI-H929 Cancer Model in SCID Mice and MM.1S-Luc Systemic Model in NOG Mice	Of a general research nature that yielded no significant efficacy information.
2024N550733	In Vivo Efficacy Study of Test Compounds GSK2857914 and GSK2857916 in the Treatment of MM.1S-Luc Systemic Model in NOG Mice	

Note:
Early screening assays undertaken to identify pharmacological targets of opportunity, and GSK internal/status reports, have not been included in this listing of additional information. However, this information has been reviewed within GSK and is considered to have no bearing on safety.

Appendix 2 Test Article Descriptions

Table A2.1 Test Article Descriptions for In Vitro/In Vivo Pharmacology Studies

Report No	Study	Description of test article in report	Description of test article in submission documents
2011N125945	In vitro ADCC	CA8 J6M0 or J6M0 or J6M0WT	GSK2800525
2011N125945	In vitro ADCC	CA8 J6M0 Potelligent-MMAF or J6M0 Potelligent MMAF or J6M0 Biowa MMAF	Belantamab mafodotin
2011N125945	In vitro ADCC	CA8 J6M0 Potelligent- or J6M0 Potelligent or J6M0 Biowa	GSK2857914
2011N125948	In vitro ADC	J6M0	GSK2800525
2011N125948	In vitro ADC	Potelligent J6M0 or J6M0 (DG44)	GSK2857914
2011N125950	In vivo MM xenograft	Anti-BCMA CA8 J6M0	GSK2800525
2011N125950	In vivo MM xenograft	Anti-BCMA J6M0 DG44	GSK2857914
2011N125952	In vitro	J6M0 BCMA or J6M0 WT BCMA	GSK2800525
2011N125952	In vitro	J6M0 potelligent BCMA	GSK2857914
2013N169586	In vitro	J6M0 WT	GSK2800525
2013N175478	In vivo MM xenograft	CA8 J6M0 Potelligent	GSK2857914
2013N175478	In vivo MM xenograft	CA8 J6M0 Potelligent-MMAF	Belantamab mafodotin
2013N175851	In vitro	CA8 J6M0	GSK2800525
2013N175851	In vitro	CA8 J6M0 Potelligent	GSK2857914
2013N176110 2013N176111	In vitro/In vivo	J6M0-mcMMAF	Belantamab mafodotin
2013N176111	In vitro/In vivo	J6M0	GSK2857914
2013N176111	In vitro/In vivo	J6M0-normal Fc	GSK2800525
2013N176113	In vitro	WT J6M0	GSK2800525
2013N176113	In vitro	aBCMA J6M0	GSK2800525
2013N183018	In vitro	CA8 J6M0 Potelligent MMAF	Belantamab mafodotin
2013N183018	In vitro	CA8 J6M0 Potelligent	GSK2857914
2013N183018	In vitro	CA8 J6M0 wild type	GSK2800525
2014N219883	In vitro	J6M0-MMAF	Belantamab mafodotin

2.6.3. 薬理試験概要表

1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW FOR BELANTAMAB MAFODOTIN

Table 1.1 List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Binding affinity by surface plasmon resonance	Monkey, Human	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2013N175824	m4.2.1.1
Cell line and cell free neutralization assays (sBCMA and BCMA ligands)	Human MM NCI-H929, ARH77-10B5 and OPM-2 cell lines	In vitro	MAB	No	GSK	2011N125952	m4.2.1.1
ADC activity: internalization and apoptosis	Human MM NCI-H929 line	In vitro	MAB	No	GSK	2013N177426	m4.2.1.1
ADC activity: internalization and apoptosis	Human MM cell lines	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2013N176113	m4.2.1.1
ADC activity: G2/M arrest and apoptosis; ADCC potency studies	Human MM cell lines ± BMSC, PBMC, or plasmablasts from healthy donors or MM patients	In vitro, Ex vivo	ADC	No	[redacted], GSK	2013N176111	m4.2.1.1
ADC potency studies, and effect of sBCMA and BCMA ligands on potency	Human MM cell lines	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2011N125948	m4.2.1.1
GSK2857916 treatment decreased cell viability of murine EL4 cells expressing human BCMA-luciferase	EL4 BCMA-luc	In vitro	ADC	No	GSK	2017N312863	m4.2.1.1
Evaluation of BCMA as a target for ADC mediated cytotoxicity	Human MM patients	Ex vivo	ADC	No	[redacted]	2014N219883	m4.2.1.1
ADCC potency studies, and effect of sBCMA and BCMA ligands on potency	Human MM cell lines or ARH-77-10B5 B cell line transfected with BCMA ± PBMCs	Ex vivo/In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2011N125945	m4.2.1.1

List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
ADCC potency studies	Human whole blood plasmablasts	Ex vivo	MAB	No	GSK	2013N183018	m4.2.1.1
Induction of Immunogenic Cell Death	Human MM NCI-H929 cell line	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2019N397960	m4.2.1.1
Induction of Immunogenic Cell Death	EL4 BCMA-luc	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2019N400866	m4.2.1.1
Characterization of the effect of GSK2857916 on human T cell activation in PBMC with anti-CD3/anti-CD28 stimulation	Human PBMC	In vitro	ADC	No	GSK	2015N249192	m4.2.1.1
In vitro human T cell functional assays	Human CD4+ or CD8+ T cells	In vitro	ADC	No	GSK	2014N224675	m4.2.1.1, m4.2.1.2
Effect of GSK2857916 treated NCI-H929 cells on the activation of immature dendritic cells	Human MM NCI-H929	In vitro	ADC	No	GSK	2016N304715	m4.2.1.1
BCMA ADC combinations with other agents	Human MM cell lines	In vitro	ADC	No	GSK	2013N178354	m4.2.1.1
BCMA ADC combinations with cancer epigenetic agents	Human MM and lymphoma cell lines	In vitro	ADC, MAB	No	GSK	2018N392007	m4.2.1.1
In vitro Cell Kill and in vivo Efficacy of GSK2857916 and Standard of Care as Single Agents and in Combination, in Two Human Multiple Myeloma Murine Xenograft Models	OPM-2 and MOLP8 cell lines	In vitro	ADC, MAB	No	[redacted]	2019N395340	m4.2.1.1
	Mouse (NOD/SCID) with OPM-2 and MOLP-8 xenografts	IP					

List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Evaluation of GSK2857916 in combination with gamma-secretase inhibitors in ADC, ADCC assays and release of soluble BCMA.	Human MM and lymphoma cell lines	In vitro	ADC	No	GSK	2019N415573	m4.2.1.1
Assessment of in vivo activity of GSK285916 and GSK2857914 in CB17 SCID mice	Mouse (CB17 SCID) NCI-H929 and OPM-2 human MM cell xenograft	IP	ADC MAB	No	GSK	2013N175478	m4.2.1.1
sBCMA free and complex assay development and analysis of BCMA expression in cynomolgus and human serum	Mouse (CB17 SCID) NCI-H929 and OPM-2 human MM cell xenograft	IP	ADC	No	GSK	2013N167720	m4.2.1.1
Analysis of the effect of DAR variance on in vivo anti-tumor activity	Mouse (CB17 SCID)[b]	IP	ADC	No	GSK	2017N317971	m4.2.1.1
Histopathology and IHC Evaluation in NCI-H929 Xenograft model.	Mouse (CB17 SCID)	IP	ADC MAB	No	GSK	2019N395917	m4.2.1.1
In vivo efficacy of GSK2857916 and Related Antibodies in the EL4-hBCMA model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC, MAB	No	[redacted]	2019N396819	m4.2.1.1
CD4/CD8 depletion in the EL4-hBCMA model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2018N359715	m4.2.1.1
Histopathology and IHC Evaluation in the EL4-hBCMA syngeneic tumor model with GSK2857916.	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC MAB	No	GSK	2019N395916	m4.2.1.1
Effect of anti-PD-1 on the anti-tumor activity of GSK2857916 in the EL4-hBCMA model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2017N345016	m4.2.1.1

List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Evaluation of changes in PD markers following treatment with GSK2857916 alone and in combination with anti-PD-1 in the EL4-hBCMA model	Mouse (C57BL/6)	NR	ADC	No	GSK	2018N380821	m4.2.1.1
Histopathology and IHC Evaluation in the EL4-hBCMA syngeneic tumor model with GSK2857916 and/or PD-1	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2019N395913	m4.2.1.1
Effect of GSK2857916 monotherapy or combination with TLR4 agonist, an anti-mouse ICOS antibody clone 7E.17G9, or anti-mouse OX40 antibody clone OX86 on tumor growth in the EL4-hBCMA syngeneic tumor model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2017N348146	m4.2.1.1
Evaluation of changes in PD markers following treatment with GSK2857916 alone and in combination with anti-murine OX40 Surrogate antibodies in the EL4-hBCMA syngeneic tumor model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2018N384579	m4.2.1.1
In vivo efficacy of GSK2857916, mouse anti-OX40 and/or mouse anti-ICOS as single agents or in combination in the EL4-hBCMA syngeneic model.	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	[redacted]	2019N398617	m4.2.1.1
Evaluation of changes in PD markers following treatment with GSK2857916 alone and in combination with a TLR4 agonist in the EL4-hBCMA syngeneic lymphoma model	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2018N384601	m4.2.1.1

List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Effect of GSK2857916 monotherapy or combination with cancer epigenetic agents on tumor growth in the EL4-hBCMA syngeneic tumor model.	Mouse (C57BL/6)	IP	ADC	No	GSK	2018N393779	m4.2.1.1
In vivo efficacy of GSK2857916 with other anti-tumor therapies in the EL4-hBCMA syngeneic model or the NCI-H929 xenograft model	Mouse (C57BL/6) or (CB17 SCID)	IP	ADC	No	[redacted]	2019N398490	m4.2.1.1
Efficacy Study of anti-BCMA GSK2857916 (Belantamab mafodotin-blmf) and GSK2857914 (Belantamab) in combination with Gamma Secretase Inhibitor Nirogacestat in Female NOD/Scid Mice Bearing NCI-H929 and OPM-2 Multiple Myeloma Xenografts	Mouse (NOD/SCID)	IP	ADC, MAB	No	[redacted]	2023N528894	m4.2.1.1
Efficacy Study of GSK2857914 (Belantamab) as a single agent and in Combination with anti-BCMA GSK2857916 (Belantamab mafodotin-belmaf) in Female NOD/Scid Mice Bearing NCI-H929 and OPM-2 Multiple Myeloma Xenografts	Mouse (NOD/SCID)	IP	ADC, MAB	No	[redacted]	2023N528895	m4.2.1.1
Pharmacodynamic biomarker analysis of monkey plasma cells in peripheral whole blood, serum and bone marrow.	Monkey (cynomolgus)	IV[a]	ADC MAB	No	GSK	2013N163514	m4.2.1.1

List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD

Key:
ADCC = Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity;
BCMA = B cell maturation antigen; BMSC = Bone marrow stromal cells;
DAR = Drug antibody ratio.
EL4-hBCMA = EL4 lymphoma tumors expressing human BCMA.
EL4 BCMA-luc = Murine lymphoma cell line with stable expression of human BCMA with luciferase reporter gene; IgG = Immunoglobulin G;
IgM = Immunoglobulin; IHC – Immunohistochemistry;
IP = Intraperitoneal; IV = Intravenous; ;luc =luciferase;
MM = Multiple myeloma; PBMC = Peripheral blood mononuclear cells;
PD = Pharmacodynamic(s)
PD-1 = Programmed cell death protein; NR = Not recorded;
SCID = Severe combined immune-deficient; sBCMA = Soluble BCMA;
TLR4 = Toll-like receptor 4.
a = Single dose of 1 mg/kg
b = NCI-H929 human myeloma SCID mouse xenograft model.

Test Articles:
ADC = Belantamab mafodotin (GSK2857916).
MAB = GSK2857914, unconjugated afucosylated mAb (parent anti-BCMA antibody).

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
GSK = GlaxoSmithKline.
[redacted] = [redacted]

Table 1.2 List of Secondary Pharmacodynamic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Test Article	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
GSK2857914 inhibition of ligand binding to BCMA	Human MM cell lines	In vitro	MAB	No	GSK	2011N125952	m4.2.1.1
Potential for agonism: NF-kB activation	Human MM cell lines	In vitro	MAB	No	GSK	2013N175851	m4.2.1.2
In vitro human T cell functional assays	Human CD4+ or CD8+ T cells	In vitro	ADC	No	GSK	2014N224675	m4.2.1.2
Selective cytotoxicity assay	Human PBMC, NK cells, CD14+ monocytes, BMSC (healthy donor and MM patient cells)	Ex vivo	ADC	No	GSK	2013N176111	m4.2.1.1, m4.2.1.2
MM Bone Marrow Methylcellulose Colony Formation Assay	Bone marrow mononuclear cells from normal and MM subjects	Ex vivo	ADC	No	[redacted]	2013N176110	m4.2.1.2

Key:
BMSC = Bone marrow stromal cells.
MM = Multiple myeloma.
NF-kB = Nuclear factor-kappaB.
NK = Natural killer cells.
PBMC = Peripheral blood mononuclear cells.

Test Articles:
ADC = Belantamab mafodotin (GSK2857916).
MAB = GSK2857914, unconjugated afucosylated mAb (parent anti-BCMA antibody).

Testing Facility:
GSK = GlaxoSmithKline.
[redacted] = [redacted]

Table 1.3 List of Safety Pharmacology Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Test Article	Dose (mg/kg/week) or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
hERG assay	HEK-293 cells	NA	In vitro	cys-mcMMAF	10 and 100 μM	NA	Yes	[redacted]	2018N376608 (130913.TFD)	m4.2.1.3
Cardiovascular monitoring[a]	Monkey (cynomolgus)	Up to 5M/5F	IV (bolus)	ADC	1, 3, 10	3 Weeks[b] (once weekly)	Yes	GSK	2013N158643 (P70260G)	m4.2.3.2
Cardiovascular monitoring[a]	Monkey (cynomolgus)	Up to 5M/5F	IV (bolus)	ADC	1, 3, 10	13 Weeks[b] (once weekly)	Yes	[redacted]	2018N375127 (P71346G)	m4.2.3.2
Cardiovascular and respiratory monitoring[a]	Monkey (cynomolgus)	Up to 5M/5F	IV (bolus)	cys-mcMMAF	0.5, 2, 5 mg/kg/day	5 Days	Yes	[redacted]	2013N177530 (1019-009)	m4.2.3.2
Cardiovascular monitoring[a]	Monkey (cynomolgus)	3M/3F	IV (bolus)	MAB	10, 30, 100	4 Weeks (once weekly)	Yes	GSK	2012N150466 (P70204G)	m4.2.3.2
Cardiovascular monitoring[a]	Monkey (cynomolgus)	3M/3F, 4M/4F[c] 3M/3F	SC IV (bolus)	MAB	2, 10 40	13 Weeks (once weekly)	Yes	[redacted]	2023N536587 (P73042G)	m4.2.3.2

List of Safety Pharmacology Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Test Article	Dose (mg/kg/week) or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD

Key:
a = No standalone in vivo safety pharmacology studies were conducted, evaluations of potential respiratory and/or cardiovascular effects were conducted as part of the GLP repeat dose toxicology studies conducted in cynomolgus monkeys.
b = Dosing was followed by a 12 week off dose period
c = SC 2 mg/kg/week dose group only.
HEK-293 = Human embryonic kidney cell line.
hERG = Human ether-à-go-go-related gene.
IV = Intravenous; NA = Not Applicable.

Test Articles:
ADC = Belantamab mafodotin (GSK2857916).
cys-mcMMAF = Microtubule inhibitor MMAF conjugated to cysteine via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker [The active cytotoxic moiety released from belantamab mafodotin].
MAB = GSK2857914, unconjugated afucosylated mAb (parent anti-BCMA antibody).

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
GSK = GlaxoSmithKline
[redacted] = [redacted]

2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Not applicable.

3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Not applicable.

4. SAFETY PHARMACOLOGY

Table 4.1 Safety Pharmacology Studies Performed to Support the Development of Belantamab mafodotin

Organ Systems Evaluated[a]	Species (Strain)	Method of Admin.	Doses (mg/kg/week) or concentration	No./Sex/ Group	Noteworthy Findings	GLP	Report No. (Study No.)
hERG assay (Cys-mcMAFF)	HEK293 cells	In vitro	10 and 100 μM	NA	cys-mcMMAF had no detectable effect on ionic currents in human embryonic kidney (HEK)293 cells stably expressing human ether-à-go-go-related gene (hERG) channels at concentrations up to 100 μM.	Yes	2018N376608 (130913.TFD)
Cardiovascular monitoring	Monkey (cynomolgus)	IV (bolus)	1, 3, 10	Up to 5M/5F	Quantitative assessments conducted on ECGs from males following the second weekly dose (Day 8) showed no apparent belantamab mafodotin-related effects on heart rate or RR, PR, QRS, QT or QTc interval durations. There were no abnormal ECG findings detected from the administration of belantamab mafodotin	Yes	2013N158643[b] (P70260G)
Cardiovascular monitoring	Monkey (cynomolgus)	IV (bolus)	1, 3, 10	Up to 5M/5F	ECGs were monitored and did not produce any evidence of belantamab mafodotin-induced ECG waveform abnormalities, arrhythmias or QTc changes. Increases in heart rate (16%) observed in male monkeys after 5 weekly doses of 10 mg/kg were considered related to their deteriorating clinical condition. No changes in heart rate were noted in female animals.	Yes	2018N375127[c] (P71346G)

Safety Pharmacology Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

Organ Systems Evaluated[a]	Species (Strain)	Method of Admin.	Doses (mg/kg/week) or concentration	No./Sex/ Group	Noteworthy Findings	GLP	Report No. (Study No.)
Cardiovascular and respiratory monitoring	Monkey (cynomolgus)	IV (bolus)	0.5, 2, 5 mg/kg/day	5M/5F	There was no effect on qualitative or quantitative ECG parameters or respiratory rate following IV administration of cys-mcMMAF. Although there was a dose related trend towards increased systolic, diastolic and mean blood pressure readings on Day 1 and Day 7 when the pooled (male and female) data were evaluated, these changes were not statistically significant when the data were assessed by sex.	Yes	2013N177530[d] (1019-009)
Cardiovascular monitoring (GSK2857914)	Monkey (cynomolgus)	IV (bolus)	10, 30, 100	3M/3F	All ECGs were within normal limits with no evidence of any GSK2857914-related electrocardiographic findings.	Yes	2012N150466[e] (P70204G)
Cardiovascular monitoring	Monkey (cynomolgus)	SC IV (bolus)	2, 10 40	3M/3F, 4M/4F[f] 3M/3F	All ECGs were within normal limits with no evidence of any GSK2857914-related electrocardiographic findings.	Yes	2023N536587 (P73042G)

Key:

a = No standalone in vivo safety pharmacology studies were conducted, evaluations of potential respiratory and/or cardiovascular effects were conducted as part of the GLP repeat dose toxicology studies conducted in cynomolgus monkeys.
b = Belantamab mafodotin was given to cynomolgus monkeys once weekly for 3 weeks by IV injection, ECG intervals were monitored.
c = Belantamab mafodotin was given to cynomolgus monkeys once weekly for up to 13 weeks by IV injection, ECG intervals were monitored.
d = Cys-mcMMAF was given once daily for 5 days by IV bolus injection; cardiovascular and respiratory evaluation was conducted [ECG (lead), blood pressure, respiratory rate and heart rate.
e = GSK2857914 was given once weekly for 4 weeks by IV bolus injection; ECG intervals were monitored
f = SC 2 mg/kg/week dose group only
cys-mcMMAF = Microtubule inhibitor MMAF conjugated to cysteine via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker; ECG = electrocardiogram;
HEK-293 = Human embryonic kidney cell line. hERG = Human ether-à-go-go-related gene; IV = Intravenous; NA = Not applicable

5. PHARMACODYNAMIC DRUG INTERACTIONS

Not applicable.