## 2.6.4 及び 2.6.5 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 |
| AUC | Area under the plasma concentration verses time curve | 血漿中濃度－時間曲線下面積 |
| BCMA | B-cell maturation antigen | B 細胞成熟抗原 |
| BCRP | Breast cancer resistance protein | 乳癌耐性蛋白質 |
| BSEP | Bile salt export pump | 胆汁酸塩排出ポンプ |
| CIC | Circulating immune complex(es) | 循環性免疫複合体 |
| Cmax | Maximum observed plasma drug concentration | 最高血漿中薬物濃度 |
| CL | Clearance | クリアランス |
| Cys | Cysteine | システイン |
| Cys-mcMMAF | Cysteine maleimidocaproyl MMAF, the active cytotoxic moiety released from belantamab mafodotin (also known as SGD-1362) | ベランタマブ　マホドチンから遊離し、細胞毒性作用を示す活性部分（別名 SGD-1362） |
| CYP | Cytochrome | チトクロム P450 |
| DAR | Drug-antibody ratio | 薬物抗体比 |
| DB | Dutch belted | ダッチベルテッド |
| ECLIA | Electrochemiluminescent immunoassay | 電気化学発光免疫測定法 |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid | エチレンジアミン四酢酸 |
| EIPA | 5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride | 5-（N-エチル-N-イソプロピル）アミロリド |
| ER | Efflux ratio | 排出比 |
| 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 |
| GSK2857914 | Belantamab (the parent, unconjugated anti-BCMA antibody) | Belantamab（親抗体、非抱合型抗 BCMA 抗体） |
| HCEC | Human corneal epithelial cells | ヒト角膜上皮細胞 |
| HSA | Human serum albumin | ヒト血清アルブミン |
| ICH | International Council for Harmonisation | 医薬品規制調和国際会議 |
| INN | International non-proprietary name | 国際一般名称 |
| ISR | Incurred sample reanalysis | 実試料の再分析 |
| IVIG | Intravenous immunoglobulin | 静注用免疫グロブリン |
| LSC | Liquid scintillation counting | 液体シンチレーション計数 |
| LC/MS | Liquid chromatography-mass spectrometry | 液体クロマトグラフィー／質量分析 |
| LC/MS/MS | Liquid chromatography tandem mass spectrometry detection | 液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析 |
| mAb | Monoclonal antibody | モノクローナル抗体 |
| mc | Maleimidocaproyl | マレイミドカプロイル |
| MALDI-MSI | Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging | マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング |
| MATE | Multidrug and toxin extrusion protein | 多剤・毒性化合物排出蛋白質 |
| MDCK II | Madin-Darby canine kidney type II | Madin-Darby イヌ腎臓由来タイプ II |
| MDR | Multidrug resistance protein | 多剤耐性蛋白質 |

| | | |
|---|---|---|
| MRD | Minimum required dilution | 最小希釈倍率 |
| MRP | Multidrug resistance associated protein | 多剤耐性関連蛋白質 |
| MMAE | Monomethyl auristatin E | 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 |
| NADPH | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate | ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 |
| NZW | New Zealand white | ニュージーランドホワイト |
| OAT | organic anion transporter | 有機アニオントランスポーター |
| OATP | organic anion transporting polypeptide | 有機アニオン輸送ポリペプチド |
| OCT | organic cation transporter | 有機カチオントランスポーター |
| OECD | Organisation for Economic Co-operation and Development | 経済協力開発機構 |
| PBS | Phosphate-buffered saline | リン酸緩衝生理食塩水 |
| PCR | polymerase chain reaction | ポリメラーゼ連鎖反応 |
| P-gp | P-glycoprotein | P-糖蛋白質 |
| PK | Pharmacokinetic(s) | 薬物動態 |
| RPTEC | Renal proximal tubule epithelial cells | 腎近位尿細管上皮細胞 |
| SCID | Severe combined immune-deficient | 重度複合免疫不全 |
| SD | Sprague Dawley | スプレイグドーリー |
| Sf9 | Spodoptera frugiperda | ツマジロクサヨトウ |
| SIMS | Secondary ion mass spectrinetry | 二次イオン質量分析 |
| SPE | Solid phase extraction | 固相抽出 |
| TK | Toxicokinetic(s) | トキシコキネティクス |
| Tmax | Time at which Cmax occurred | 最高血漿中濃度到達時間 |
| t1/2 | Terminal elimination half-life | 消失半減期 |
| UDPGA | Uridine 5'-diphosphate glucuronic acid | ウリジン 5'-二リン酸グルクロン酸 |
| UHPLC/MS/MS | Ultra-high-performance liquid chromatography-MS/MS | 超高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析 |
| Vss | Volume of distribution at steady state | 定常状態における分布容積 |

## 2.6.4. 薬物動態試験の概要文

### 2.6.4.1. まとめ

ベランタマブ　マホドチン［GSK2857916、抗体薬物複合体（ADC）］、GSK2857914［親抗体、非抱合型抗 B 細胞成熟抗原（BCMA）抗体］及び cys-mcMMAF（別名 SGD-1362、ベランタマブ　マホドチンから遊離し、細胞毒性作用を示す活性部分）の薬物動態（PK）、吸収、生体内分布及び排泄について、一連の in vivo 静脈内投与試験及び単回腹腔内投与試験により評価した。臨床投与経路として静脈内投与を予定している。血漿（ラット、サル、ヒト）及び血清（ヒト）中でのベランタマブ　マホドチンの安定性を評価するために in vitro 試験も実施した。また、cys-mcMMAF を用いた in vitro 試験を実施し、血漿蛋白結合、チトクロム P450（CYP）による代謝及び CYP 分子種との相互作用、肝 S9 画分（ラット、サル、ヒト）とのインキュベート後の代謝プロファイル並びに様々なトランスポーターとの相互作用についても検討した。ベランタマブ　マホドチンは抗腫瘍薬としての使用を予定しているため、非臨床試験は医薬品規制調和国際会議（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[ICH, 2016]に従い、適宜、ICH S6(R1)ガイドライン及び抗体薬物複合体であることを考慮して計画した。

すべての試験は社内各部門の標準作業手順書及び方針を遵守し、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）におおむね準拠して実施した。反復投与毒性試験のトキシコキネティクス（TK）試験、排泄試験及び一部 PK 試験は GLP に完全に準拠して実施し、経済協力開発機構（OECD）加盟国においては OECD の規制に従って実施した。実験データの品質及び完全性に悪影響を及ぼす事態は発生しなかった。これらの試験では、毒性試験と同じ動物種及び系統の動物（Wistar Han ラット、SD ラット及びカニクイザル）を用いた。そのため、これらの結果に基づき毒性試験の曝露量評価を実施した。また、探索的眼毒性試験（非 GLP）で実施した TK 試験ではニュージーランドホワイト（NZW）及びダッチベルテッド（DB）ウサギ、薬理評価をサポートするために実施した PK 試験では C57BL/6 及び CB17 系の重度複合免疫不全（SCID）マウスを用いた。

主要薬物動態試験の概要を以下に示す。 2.6.4.3～2.6.4.8 では試験のデザイン及び結果、2.6.4.9「考察及び結論」では包括的評価の結果を記載する。なお、各試験の概要表は 2.6.5、報告書は 4.2.2 に提示する。実施した試験の報告書の添付箇所（モジュール 4 番号）及び GLP 適用状況をまとめた一覧表を、表 2.6.4.1、表 2.6.4.9、表 2.6.4.12 及び表 2.6.4.13 に示す。ベランタマブ　マホドチンを用いて実施したが、後に代替試験が実施された試験及び PK に関する考察に寄与しない試験については、 Appendix 2 に列挙する。

#### 2.6.4.1.1. 被験物質

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免疫グロブリン（Ig）G1 ADC である。親抗体である非抱合型アフコシル化抗 BCMA 抗体（GSK2857914、belantamab）を製造した後に部分的還元処理を行い、プロテアーゼ耐性マレイミドカプロイル（mc）リンカーを介してチューブリン重合阻害剤であるモノメチルアウリスタチン F（MMAF）を鎖内システイン残基に結合させることにより、ADC であるベランタマブ　マホドチンを製造する。モノクローナル抗体（mAb）部分の蛋白質分解を介して

細胞内で細胞毒性作用を示す活性部分（cys-mcMMAF）が遊離し、微小管の破壊を通して細胞死が誘導されることにより、細胞周期の停止及びアポトーシスに至る[Doronina, 2006]。ベランタマブ　マホドチンの薬物抗体比（DAR）は約 4 である［3.2.S.1.3 一般特性（ベランタマブ　マホドチン）］。

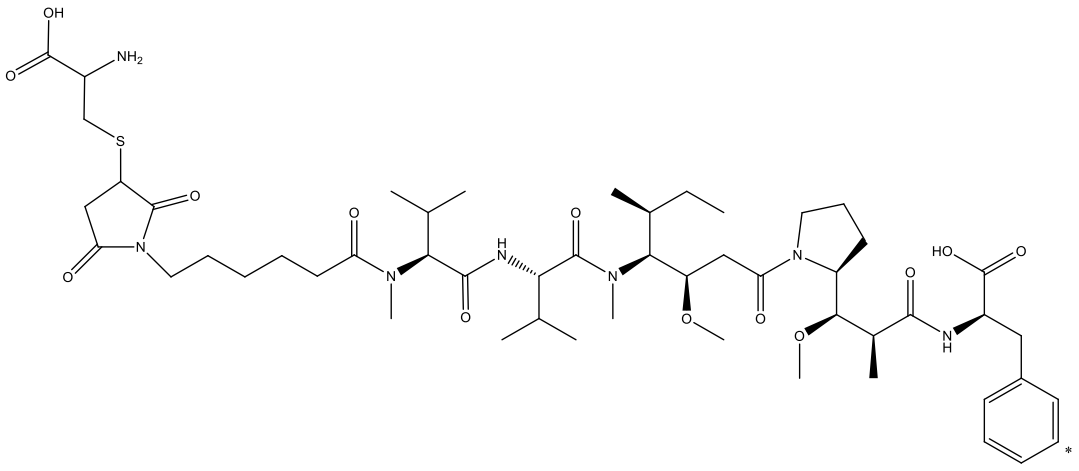
ベランタマブ　マホドチン（2.6.4 を通してベランタマブ　マホドチンと記載する）の非臨床試験では、市販予定製剤と同等の被験物質を使用した。2.6.4 に記載する試験では、ベランタマブ　マホドチン及び親抗体以外の抗 BCMA mAb、ADC 及びそのほかの関連製剤を使用した。また、ベランタマブ　マホドチンの非臨床プロファイルを更に評価するために、cys-mcMMAF 及び GSK2857914 を用いた吸収、分布、代謝及び排泄試験も実施した。各試験で使用した被験物質の情報を表 2.6.2.1 に示す。

本概要文（2.6.4）に示す用量及び濃度はすべて、ベランタマブ　マホドチン、cys-mcMMAF 又は GSK2857914 の名目濃度で表示する。

ベランタマブ　マホドチンの in vitro 及び in vivo 試験で使用されている被験物質及び分析対象物質の名称は必ずしも統一されていない。各試験報告書及び本概要書で使用している被験物質及び分析対象物質の名称の対照表を Appendix 3 に示す。

GSK2857914［国際一般名（INN）：belantamab］は、ベランタマブ　マホドチンの開発に際して多くの非臨床試験で使用された。本項では belantamab は GSK2857914 と表記する。

ベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 に関する試験はすべて非放射性標識体を使用して実施し、cys-mcMMAF に関するほとんどの試験でも同様に非放射性標識体を使用した。Cys-mcMMAF の代謝及び排泄試験については、[3H] cys-mcMMAF を用いた試験も実施した。[3H] cys-mcMMAF の標識位置を図 2.6.4.1 に示す。なお、望ましい比放射能が得られるように、[3H] cys-mcMMAF を非標識 cys-mcMMAF を用いて希釈した。更に、蛍光標識ベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 を用いた試験も実施した。




* [3H] 標識位置

**図 2.6.4.1　[3H] cys-mcMMAF の構造**

**試験結果の概要**

PK、分布、代謝及び排泄試験で得られた重要な結果の概要を以下に示す。試験デザイン及び試験結果の詳細については 2.6.4.3～2.6.4.6、試験結果についての重要な評価は 2.6.4.9「考察及び結論」に示す。

**PK 及び吸収**

- マウス、ラット及びサルにベランタマブ　マホドチンを静脈内投与したときの ADC 及び総 mAb の PK は、ヒト化 mAb で予想される PK に特徴的なものであり[Wang, 2008]、CL 及び Vss は小さく、半減期はサル（約 4 日）に比べてげっ歯類で長かった（約 9～13 日）。

**分布**

- ラットに蛍光標識ベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 を静脈内投与した結果、眼球、眼瞼、眼窩外涙腺及びハーダー腺の結合組織、肝臓並びに眼瞼の筋肉において蛍光シグナルが検出された。一方、角膜及び眼瞼腺では蛍光シグナルは検出されなかった。肝臓及び腎臓での蛍光シグナルは、眼球に比べて高かった。GSK2857914 との比較から、ベランタマブ　マホドチンの生体内分布が mcMMAF の有無による影響を受けないことが確認された。
- ラットにベランタマブ　マホドチンを静脈内投与した結果、肝臓、骨髄、腎臓、ハーダー腺及び眼窩外涙腺に非常に低濃度の cys-mcMMAF が検出されたが、角膜、眼瞼及び眼球全体には cys-mcMMAF は検出されなかった。
- ヒト角膜上皮細胞及び腎近位尿細管上皮細胞に蛍光標識ベランタマブ　マホドチンを添加してインキュベートした結果、いずれの細胞においてもリソソーム内に蛍光標識ベランタマブ　マホドチンが取り込まれ、また、異化作用により cys-mcMMAF が遊離することが確認された。
- マウス、ラット、サル及びヒト血漿蛋白に対する cys-mcMMAF の結合率は低かった。
- In vitro において cys-mcMMAF は、多剤・毒性化合物排出蛋白質（MATE）1、MATE2-K、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3、有機カチオントランスポーター（OCT）1、OCT2、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1、OATP1B3、乳癌耐性蛋白質（BCRP）、胆汁酸排出トランスポーター（BSEP）、P-糖蛋白質［P-gp、多剤耐性蛋白質（MDR）1 としても知られる］、多剤耐性関連蛋白質（MRP）1、MRP2、MRP3、MRP4 及び MRP5 に対して、阻害作用を示さなかった。
- In vitro において cys-mcMMAF は、OATP1B1、OATP1B3、MRP1、MRP2 及び MRP3 の基質であり、BSEP の候補基質であったが、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、BCRP、MRP4 及び MRP5 の基質ではなかった。
- In vitro において矛盾するデータが得られたものの、cys-mcMMAF は P-gp の基質であると判断した。

**代謝**

- ベランタマブ　マホドチンをラット、サル及びヒト血漿中でインキュベート後、96 時間までに遊離型 cys-mcMMAF として放出されたのは抗体に結合していた総 MMAF の約 3%未満であったことから、ベランタマブ　マホドチンはおおむね安定であることが確認された。
- In vitro において、ヒト血清アルブミンへの mcMMAF のマレイミド交換が確認された。
- [3H] cys-mcMMAF をラット、サル及びヒト肝 S9 画分とともにインキュベートしたときの代謝は主に非酵素的変換であり、酸化的代謝及び抱合代謝による副次的代謝も認められた。Cys-mcMMAF（直鎖異性体、SGD-1362）は、主にその飽和マレイミド環部分で加水分解され、次いで脱水反応を受けることにより 3-オキソチオモルホリン体［cys-mcMMAF の環状異性体（SGD-1462 としても知られる）］を生成した。
- In vitro において cys-mcMMAF は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 に対して、直接的、時間依存的及び代謝依存的阻害作用を示さなかった。
- In vitro において、cys-mcMMAF とのインキュベートによる CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4/5 の誘導は確認されなかった。
- ラットに[3H] cys-mcMMAF を単回静脈内投与したとき、放射能は主に cys-mcMMAF の直鎖又は環状異性体として排泄された。

**排泄**

- ラットに[3H] cys-mcMMAF を単回静脈内投与したとき、投与した放射能の約 83%が糞中に排泄された。尿中排泄（約 13%）は副次的排泄経路であった。放射能は速やかに排泄され、投与後最初の 48 時間で投与量の 94%が回収された。投与後 168 時間までの放射能の総回収率は 96%であった。

**薬物相互作用**

- In vitro において、cys-mcMMAF は OATP1B1、OATP1B3、MRP1、MRP2 及び MRP3 の基質であり、BSEP の候補基質であった。Cys-mcMMAF が P-gp の基質かどうかに関しては矛盾するデータが得られた。
- In vitro において、CYP 分子種による cys-mcMMAF の酸化的代謝は限定的であった。また、cys-mcMMAF は MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、BCRP、MRP4 及び MRP5 の基質ではなかった。したがって、併用薬による CYP 又はこれらのトランスポーターの阻害が、cys-mcMMAF の PK に影響を与える可能性は低い。
- In vitro において、cys-mcMMAF は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 に対して、直接的、時間依存的及び代謝依存的阻害作用を示さず、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4/5 誘導作用も示さなかった。また、cys-mcMMAF は MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、BCRP、BSEP、P-gp、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4 及び MRP5 に対して阻

害作用を示さなかった。これらのデータから、cys-mcMMAF が併用薬の PK に影響を及ぼす可能性は低いことが示唆された。

### 2.6.4.2. 分析法

本項では、ベランタマブ　マホドチンの PK 及び免疫原性を評価するために使用したベランタマブ　マホドチン濃度及び抗薬物抗体（ADA）測定法について概説する。これらの分析法の概要及びバリデーション報告書一覧を Appendix 1 に示し、バリデーション報告書を 4.2.2.1「分析法及びバリデーション報告書」に示した。

PK 及び毒性試験を評価するために使用した分析法は、対応する試験に応じて適宜バリデーションを実施した。主要な試験、すなわち Wistar Han ラット及びカニクイザルを用いたベランタマブ　マホドチンの反復静脈内投与毒性試験、SD ラット及びカニクイザルを用いた cys-mcMMAF の反復静脈内投与毒性試験、並びにカニクイザルを用いた GSK2857914 の反復静脈内投与毒性試験の一部として実施した血漿中 TK 評価は、OECD の試験ガイドライン及び GLP の原則に従って OECD 加盟国で実施した。

ヒト安全性／PK 試験の評価には別途開発した分析法を用いて、ヒト血漿中のベランタマブ　マホドチン（ADC）、ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）及び cys-mcMMAF、並びにヒト尿中の cys-mcMMAF を定量した。これらの分析法のバリデーションについては、2.7.1 に示した。

#### 2.6.4.2.1. PK 用分析法

動物及びヒトにベランタマブ　マホドチンを投与した後、血中及び尿中の 3 つの分析対象物質、すなわち、ADC［ベランタマブ　マホドチン（ADC）］、総 mAb［ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）］及び cys-mcMMAF を定量した。ベランタマブ　マホドチン（ADC）とは、1 つ以上の mcMMAF が結合した GSK2857914（DAR >0）と定義し、ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）とは、mcMMAF 結合及び非結合の GSK2857914 と定義した。

##### 2.6.4.2.1.1. ベランタマブ　マホドチン（ADC）

GLP 適用の毒性試験でベランタマブ　マホドチンを投与した後のラット、ウサギ及びサル血漿中ベランタマブ　マホドチン（ADC）濃度は、[redacted]を用いて、蛍光又は化学発光標識体のいずれかと組み合わせた免疫測定法により測定した。この分析法では、[redacted]を用いることで DAR が 1 以上のベランタマブ　マホドチン（ADC）が検出可能となり、遊離型 BCMA に結合しているかどうかにかかわらずベランタマブ　マホドチン（ADC）を検出できる。これらの分析法について、分析時点で有効なガイドラインに従って、検量線、真度、精度及び様々な条件下での安定性に関するバリデーションを行った。また、予備的 PK 試験及び GLP 非適用の毒性試験を評価するため、血液：水（マウス）、血清（マウス、ラット及びサル）、血漿（ラット及びサル）及び涙液（ウサギ）中濃度測定用に同様の分析法を開発した。ベランタマブ　マホドチンの開発

中に実施した GLP 適用試験で使用したベランタマブ　マホドチン（ADC）用の PK 分析法の概要を Table A1.2 及び Table A1.6 に示した。

#### 2.6.4.2.1.2. ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）

毒性試験においてベランタマブ　マホドチンを投与した後のラット、ウサギ及びサル血漿中ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）濃度は、捕捉試薬として[redacted]、検出抗体として[redacted]を用いて、蛍光又は化学発光標識体のいずれかと組み合わせた免疫測定法により測定した。捕捉試薬として[redacted]を用いることで、mcMMAF 付加の有無にかかわらずベランタマブ　マホドチン（総 mAb）が検出可能となり、遊離型 BCMA に二価結合していない場合にのみベランタマブ　マホドチン（総 mAb）を検出できる。これらの分析法について、分析時点で有効なガイドラインに従って、検量線、真度、精度及び様々な条件下での安定性に関するバリデーションを行った。また、予備的 PK 試験及び GLP 非適用の毒性試験を評価するため、血液：水（マウス）、血清（マウス、ラット及びサル）及び血漿（ラット及びサル）中濃度測定用に同様の分析法を開発した。ベランタマブ　マホドチンの開発中に実施した GLP 適用試験で使用したベランタマブ　マホドチン（総 mAb）用の PK 分析法の概要を Table A1.3 及び Table A1.7 に示した。

#### 2.6.4.2.1.3. Cys-mcMMAF

Cys-mcMMAF は 2 種類の異性体として存在する。Cys-mcMMAF の直鎖異性体（SGD-1362）は、マレイミド環部分で化学的加水分解され、その後、脱水反応を経て、直鎖異性体に比べて安定な環状異性体（SGD-1462）となる（2.6.4.5）。Cys-mcMMAF 用の分析法では、分析対象物質の安定性を保証するため、SGD-1462 となるように加水分解を促進させる。したがって、cys-mcMMAF 定量用の分析法では、異性体 SGD-1362 と SGD-1462 の合計として定量される。GLP 適用の毒性試験でベランタマブ　マホドチン又は cys-mcMMAF を投与した後のラット血漿中、ウサギ血漿及び涙液中、サル及びヒト血漿中、ラット及びヒト尿中 cys-mcMMAF 濃度は、除タンパクもしくは固相抽出（SPE）後、液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析（LC/MS/MS）法を用いて定量した。これらの分析法について、分析時点で有効なガイドラインに従って、検量線、真度、精度、選択性、回収率及び様々な条件下での安定性に関するバリデーションを行った。また、GLP 非適用の毒性試験を評価するため、血漿（ラット及びサル）及び尿（ラット）中濃度測定用に同様の分析法を開発した。ベランタマブ　マホドチンの開発中に実施した GLP 適用試験で使用した cys-mcMMAF 用の PK 分析法の概要を Table A1.4 及び Table A1.8 に示した。

#### 2.6.4.2.1.4. GSK2857914

GLP 適用のサルを用いた毒性試験における GSK2857914 を投与した後の血漿中 GSK2857914 濃度は、4 週間試験では捕捉試薬として[redacted]、検出抗体として[redacted]を用いて、化学発光標識体を組み合わせた免疫測定法により測定した。また、13 週間試験では捕捉試薬として[redacted]、検出試薬として[redacted]を用いて、免疫測定法により測定した。これらの分析法について、分析時点で有効な

ガイドラインに従って、検量線、真度、精度及び様々な条件下での安定性に関するバリデーションを行った。また、予備的 PK 試験を評価するため、マウス、ラット及びサル血清中濃度測定用に同様の分析法を開発した。ベランタマブ　マホドチンの開発中に実施した GLP 適用毒性試験で使用した GSK2857914 用の PK 分析法の概要を Table A1.10 に示した。

#### 2.6.4.2.2. 免疫原性評価用分析法

4 種類のバリデーション済み免疫測定法を用いて、非臨床試験における抗ベランタマブ　マホドチン抗体の検出及び特性を評価した。カニクイザル血清の分析では、ブリッジング免疫測定法を使用した（2.6.4.2.2.1）。第一世代の免疫測定法は、薬物干渉により使用に制限があったため（2.6.4.2.2.1.1）、[redacted]を組み込んで drug tolerance を向上させた第二世代の免疫測定法が必要であった（2.6.4.2.2.1.2）。ラット血清中抗ベランタマブ　マホドチン抗体の評価にも、[redacted]を組み込んだブリッジング免疫測定法を使用した（2.6.4.2.2.1.3）。更に、段階的免疫測定法を用いて、サル血清中の循環性免疫複合体（CIC）を検出した（2.6.4.2.2.2）。[redacted]又は[redacted]、この方法は[redacted]又は[redacted]で実施した。これらの方法の詳細について以下の項で解説するとともに、概要を Table A1.5、Table A1.9 及び Table A1.11 に示す。

#### 2.6.4.2.2.1. 抗ベランタマブ　マホドチン抗体分析法

ラット及びサルの試験における抗ベランタマブ　マホドチン抗体検出用の分析フォーマットは、Meso Scale Discovery 社のプラットフォームを用いたブリッジング電気化学発光免疫測定法（ECLIA）であった。[redacted]及び[redacted]。[redacted]、[redacted]。[redacted]、[redacted]。[redacted]。

#### 2.6.4.2.2.1.1. 第一世代の抗ベランタマブ　マホドチン抗体分析法

サル血清用の第一世代のバリデーション済み抗ベランタマブ　マホドチン抗体分析法は、上述のとおりブリッジング免疫測定法を用いた。Minimum required dilution（MRD）は 10 倍、drug tolerance については 0.1 µg/mL のベランタマブ　マホドチン存在下で 100 ng/mL の陽性対照が検出可能であった。バリデーションパラメータ及びこの分析法を適用した試験を要約して Table A1.9 に示した。

#### 2.6.4.2.2.1.2. 第二世代の抗ベランタマブ　マホドチン抗体分析法

サル血清用の第二世代のバリデーション済み抗ベランタマブ　マホドチン抗体分析法は、分析時のベランタマブ　マホドチンに対する drug tolerance を向上させるため、[redacted]を組み込んだ方法であり、MRD は 100 倍であった。まず[redacted]を[redacted]、[redacted]及

び[redacted]。これらの条件により、400 µg/mL のベランタマブ　マホドチン存在下で、100 ng/mL の陽性対照を検出することが可能となった。バリデーションパラメータ及びこの分析法を適用した試験を要約して Table A1.9 に示した。

#### 2.6.4.2.2.1.3. [redacted]抗ベランタマブ　マホドチン抗体分析法（ラット血清）

ラット血清で使用したバリデーション済み抗ベランタマブ　マホドチン抗体法も、サル血清用の第二世代のバリデーション済み抗ベランタマブ　マホドチン抗体分析法と同じフォーマットを用いた[redacted]を組み込んだ方法であり、MRD は 100 倍であった。まず[redacted]。これらの条件により、2000 µg/mL のベランタマブ　マホドチン存在下で、100 ng/mL の陽性対照を検出することが可能となった。バリデーションパラメータ及びこの分析法を適用した試験を要約して Table A1.5 に示した。

#### 2.6.4.2.2.2. ベランタマブ　マホドチン特異的循環性免疫複合体及び抗ベランタマブ　マホドチン抗体分析法

ベランタマブ　マホドチンを投与したサルにおける免疫原性の影響を追加で評価し、また免疫原性評価におけるベランタマブ　マホドチンの drug tolerance を向上させる目的で、サル血清用のバリデーション済みベランタマブ　マホドチン特異的 CIC 及び抗ベランタマブ　マホドチン抗体分析法を用いた。ベランタマブ　マホドチン特異的 CIC 及び抗ベランタマブ　マホドチン抗体用の分析法は、Meso Scale Discovery 社のプラットフォームを用いた方法であり、[redacted]。これらの条件により、3.8 mg/mL のベランタマブ　マホドチン存在下でも、ベランタマブ　マホドチン特異的 CIC 及び抗ベランタマブ　マホドチン抗体を検出することが可能となった。バリデーションパラメータ及びこの方法を適用した試験を要約して Table A1.9 に示した。

ラット及びサルにおける血清中 ADA の有無を評価するための分析法について、2.6.4 で解説するとともに、ADA データを要約して 2.6.6.2.2、2.6.6.3.2 及び 2.6.6.3.4 に示す。

### 2.6.4.3. 吸収

ラット、ウサギ及びサルにベランタマブ　マホドチンを単回及び反復静脈内投与したときのベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の吸収及び PK を評価する試験を実施した。更に、薬理評価のサポートデータとして、マウスにベランタマブ　マホドチンを単回静脈内及び腹腔内投与したときの PK を評価する試験を実施した。また、ラット及びサルに cys-mcMMAF を静脈内投与したときの cys-mcMMAF の PK、並びにマウス、ラット及びサルに GSK2857914 を静脈内投与したときの GSK2857914 の PK を評価する試験も実施した。これらの試験の一覧表を、本概要書内での報告書の添付箇所と併せて、表 2.6.4.1 に示す。

ベランタマブ　マホドチンを静脈内投与したときのベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）と cys-mcMMAF の全身曝露量比較を、2.6.4.9「薬物動態試験の考察及び結論」の表 2.6.4.14 及び表 2.6.4.15 に示す。毒性試験で得られた反復投与時の TK データに関する概要を 2.6.7-Table 3.1 及び 2.6.7-Table 3.2 に示す。

なお、ベランタマブ　マホドチンの開発に関連しない PK 試験データ［GSK2857915：モノメチルアウリスタチン E（MMAE）を結合させた ADC の評価を含む］は本概要では提示しない。

#### 2.6.4.3.1. 単回投与時の薬物動態

##### 2.6.4.3.1.1. マウス

###### 2.6.4.3.1.1.1. 静脈内投与

マウスにベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 を単回投与したときの PK を評価した（2013N175927、4.2.2.2）。各群 12 匹の雄 C57BL/6 マウス（n=3/時点、コンポジットサンプリング法）に 1 mg/kg のベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 を単回静脈内ボーラス投与した。投与後 0.25、3、6、24、48、72、96、168、240、336、408 及び 504 時間に採血し、PK 分析用の血清試料を採取した。この試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び GSK2857914 の PK パラメータを 2.6.5-Table 3.1 に示す。

ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び GSK2857914 の血清中濃度は、適格な又はバリデートされたアッセイ方法を用いて測定した（2.6.4.2.1）。

ADC 及び総 mAb の血清 CL はそれぞれ 0.564 及び 0.463 mL/h/kg と低く、また、Vss はそれぞれ 129 及び 122 mL/kg と小さかったことから、ベランタマブ　マホドチンの分布は主に全身循環血中に限定されることが示唆された。ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の血清中半減期（t1/2）は、いずれも約 9 日であった。ADC 及び総 mAb の Cmax はそれぞれ 19.6 及び 18.3 µg/mL、AUC0-t はそれぞれ 1530 及び 1810 µg.h/mL であった。ADC と総 mAb の PK が類似しており、生体内における MMAF と抗体との結合に不安定性は確認されなかった。

GSK2857914 の PK はベランタマブ　マホドチンと類似していたが、CL がわずかに低く（0.313 mL/h/kg）、その結果 AUC0-t はわずかに高値を示し（2430 µg.h/mL）、t1/2 は長かっ

た（約 13 日）。Vss（109 mL/kg）及び Cmax（20.7 µg/mL）は、ベランタマブ　マホドチンと同程度であった。

#### 2.6.4.3.1.1.2. 腹腔内投与

雄 CB17 SCID マウス 3 匹に 4 mg/kg のベランタマブ　マホドチンを単回腹腔内投与した（2013N176011、4.2.2.2）。投与後 0.25、3、6、24、48、72、96、168、240、336、408 及び 504 時間に採血を行った（n=3/時点）。

ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の血漿中濃度は、適格な又はバリデートされたアッセイ方法を用いて測定した（2.6.4.2.1）。この試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の PK パラメータを 2.6.5-Table 3.1 に示す。

4 mg/kg のベランタマブ　マホドチンを単回腹腔内投与したときの ADC 及び総 mAb の Cmax はそれぞれ 23.5 及び 24.1 µg/mL、AUC0-t はそれぞれ 4820 及び 5120 µg.h/mL であった。ADC と総 mAb の PK は類似しており、生体内における MMAF と抗体との結合に不安定性はみられなかった。Tmax は 17～24 時間であり、ベランタマブ　マホドチン（ADC）の t1/2 は約 8 日であった。2.6.4.3.1.1.1 に記載した静脈内投与後のベランタマブ　マホドチン（ADC）の AUC0-t との比較から、腹腔内投与したときの ADC の相対的バイオアベイラビリティは約 80%であることが示された。

#### 2.6.4.3.1.2. ラット

#### 2.6.4.3.1.2.1. 静脈内投与（ベランタマブ　マホドチン）

ラットにベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 を単回投与したときの PK を評価した（2012N140200、4.2.2.2）。雄ラット 3 匹／群に 1 mg/kg のベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 を単回静脈内ボーラス投与した。投与後 0.25、3、6、24、48、72、96、168、240、336、408 及び 504 時間に採血し、PK 分析用の血清試料を採取した（n=3/時点）。血清中ベランタマブ　マホドチン（ADC）濃度は、[redacted]及び蛍光標識[redacted]を用いて測定した。ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）及び GSK2857914 の血清中濃度は、適格な又はバリデートされたアッセイ方法を用いて測定した（2.6.4.2.1）。この試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び GSK2857914 の PK パラメータを 2.6.5-Table3.2 に示す。

ベランタマブ　マホドチン（ADC）の血清 CL（0.333 mL/h/kg）は緩徐であり、Vss（103 mL/kg）は小さかったことから、ベランタマブ　マホドチンの分布は主に全身循環血中に限定されることが示唆された。ベランタマブ　マホドチン（ADC）の血清 t1/2 は、約 11 日であった。用量補正した全身曝露量 Cmax 及び AUC0-t は、それぞれ 33.3 µg/mL 及び 2400 µg.hr/mL であった。ベランタマブ　マホドチン ADC と総 mAb の AUC0-t に顕著な差はみられなかったが（1.4 倍）、ADC の血清中濃度は総 mAb に比べて一貫して低かった。

GSK2857914 の PK は、ベランタマブ　マホドチンの PK と同様に CL（0.289 mL/h/kg）及び Vss（97.6 mL/kg）は小さく、AUC0-t（2670 µg.h/mL）、Cmax（27.0 µg/mL）及び t1/2（約 11 日）もベランタマブ　マホドチンと同程度であった。

#### 2.6.4.3.1.2.2. 静脈内投与（cys-mcMMAF）

ラットに cys-mcMMAF を単回静脈内ボーラス投与したときの PK を評価した（GLP 適用）。雄 SD ラット（n=6/群）に 0.3、1 又は 3 mg/kg の cys-mcMMAF［リン酸緩衝生理食塩水（PBS）溶液］を投与した（2019N415388、4.2.2.2）。投与前並びに投与後 2、5、15、30 分及び 1、2、4、8、12、18、24、36、48 時間に採血した血液試料から PK 分析用の血漿を採取した（n=3/時点、コンポジットサンプリング法）。バリデーション済みの LC/MS/MS 法を用いて、血漿中 cys-mcMMAF 濃度を測定した（2.6.4.2.1）。

全身曝露量（AUClast 及び Cmax）は用量比をわずかに上回り増加した。データの頑健性が十分でなかったため、終末消失相のパラメータ（AUClast 、CL、Vss 及び t1/2）は算出することができなかった。この試験で得られた cys-mcMMAF の PK パラメータを 2.6.5-Table 3.3 に示す。

### 2.6.4.3.1.3. サル

#### 2.6.4.3.1.3.1. 静脈内投与（ベランタマブ　マホドチン）

サルにベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 を単回投与したときの PK を評価した（2013N157994、2012N143303、4.2.2.2）。雄サル（n=3）に 1 mg/kg（PBS 溶液）のベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 を単回静脈内ボーラス投与した。投与後 0.08、0.5、1、3、6、24、48、72、96、120、168、336、504、672、1008、1176、1344 及び 1680 時間に採血し、PK 分析用の血清を採取した（n=3/時点）。更に、投与後 4800 時間にも試料を採取したが、分析は行わなかった。血清中ベランタマブ　マホドチン（ADC）濃度は、[redacted]及び蛍光標識[redacted]を用いて測定した。ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）及び GSK2857914 の血清中濃度は、適格な又はバリデートされたアッセイ方法を用いて測定した（2.6.4.2.1）。この試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び GSK2857914 の PK パラメータを 2.6.5-Table 3.2 に示す。

ベランタマブ　マホドチン（ADC）の血清 CL（1.07 mL/h/kg）は緩徐であり、Vss（105 mL/kg）は小さかったことから、本化合物の分布は主に全身循環血中に限定されることが示唆された。ベランタマブ　マホドチン（ADC）の t1/2 は、約 4 日であった。Cmax 及び AUC0-t は、それぞれ 29.2 µg/mL 及び 912 µg.h/mL であった。ADC と総 mAb の PK は類似しており、MMAF の生体内における不安定性は確認されなかった。

GSK2857914 の PK はベランタマブ　マホドチンの PK と類似していたが、CL（0.616 mL/h/kg）がやや小さかったため、AUC0-t（1600 µg.h/mL）はわずかに高値を示した。Vss（70 mL/kg）、Cmax（30.7 µg/mL）及び t1/2（4 日）はベランタマブ　マホドチンと同程度であった。

#### 2.6.4.3.1.3.2. 静脈内投与（cys-mcMMAF）

雄カニクイザル（n=3/群）に 0.3、1 及び 3 mg/kg の cys-mcMMAF（PBS 溶液）を単回静脈内ボーラス投与した（2019N415363、4.2.2.2）。投与前並びに投与後 2、5、15、30 分及び 1、2、4、8、12、18、24、36、48 時間に採血し、PK 分析用の血漿を採取した（n=3/時

点）。バリデーション済みの LC/MS/MS 法を用いて、血漿中 cys-mcMMAF 濃度を測定した（2.6.4.2.1）。

全身曝露量（AUClast 及び Cmax）は用量にほぼ比例して増加した。0.3、1 及び 3 mg/kg 投与時の t1/2 はそれぞれ 8.75、5.42 及び 4.62 時間と算出された。この試験で得られた cys-mcMMAF の PK パラメータを 2.6.5-Table 3.3 に示す。

#### 2.6.4.3.2. 単回投与後のトキシコキネティクス

単回投与毒性試験において、ベランタマブ　マホドチン［媒体：PBS 溶液（pH 7.4）］を、ラットに 5 mL/kg［0（媒体）、10 及び 30 mg/kg］及び 6 mL/kg（100 mg/kg）、サルに 1.86 mL/kg［0（媒体）及び 30 mg/kg］、0.62 mL/kg（10 mg/kg）及び 0.186 mL/kg（3 mg/kg）の投与容量で静脈内ボーラス投与した。また、cys-mcMMAF［媒体：PBS 溶液（pH 7.1）］をラット及びサルにそれぞれ 5 mL/kg 及び 2 mL/kg の投与容量で静脈内ボーラス投与した。

##### 2.6.4.3.2.1. ラット

###### 2.6.4.3.2.1.1. 静脈内投与（ベランタマブ　マホドチン）

**ベランタマブ　マホドチンの単回静脈内投与毒性試験**

TK 及び忍容性試験の一部として、Wistar Han ラット（n=4/性/群）に 0（媒体）、10、30 及び 100 mg/kg のベランタマブ　マホドチンを単回静脈内（尾静脈）ボーラス投与した。休薬 14 日後の標的臓器毒性の回復性を評価するため、0（媒体）、30 及び 100 mg/kg 群に各群雌雄各 4 匹のラットを追加した。TK 評価のため、各投薬群（10、30 及び 100 mg/kg）に各群雌雄各 3 匹のラットを追加した（2012N134122、4.2.3.1）。この試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の TK パラメータを 2.6.7-Table 5.1 に、毒性データの概要を 2.6.6.2.2.1 に示す。

TK 評価には、雌雄ともに投与前（−3 日）及び投与後 0.25、3、6、24、48、168、336、504 時間に採取した血漿を用いた（n=3/性/群/時点）。雄ラットについては、投与後 72 時間にも試料を追加採取した。主試験用動物からは投与前及び投与後 168 時間に血漿を採取した。休薬群からは投与前及び投与後 504 時間に血漿を採取した。また、休薬群の 100 mg/kg 群については投与後 168 時間にも血漿を採取した。

ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の血漿中濃度及び cys-mcMMAF の血漿中濃度は、適格な又はバリデートされたアッセイ方法を用いて定量した（2.6.4.2.1）。なお、尿中濃度測定には、血漿を用いて作成した検量線を使用した。

ラットに 10、30 及び 100 mg/kg のベランタマブ　マホドチンを静脈内ボーラス投与したとき、ADC 及び総 mAb の血漿中濃度は 504 時間の試料採取期間全体にわたって定量可能であった。すべてのラットで投与後 0.25 時間に最高血漿中濃度が認められた。ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の全身曝露量（Cmax 及び AUC0-t）は、用量にほぼ比例して増加し、顕著な性差は認められなかった。ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の血漿中濃度は、TK 評価用動物と主試験用動物で同程度であった。ベランタマブ　マホドチン（ADC）の血漿 CL は用量増加に伴って上昇し、10 mg/kg 群と比較して

100 mg/kg 群では最大 2 倍高値を示した。各用量において ADC 及び総 mAb の血漿中濃度が同程度であったことから、ベランタマブ　マホドチンの多くは血漿中で未変化体として存在することが示唆された。

Cys-mcMMAF の血漿中濃度は定量下限に近く、定量下限未満又は定量可能であってもその頻度は散発的であったため、TK パラメータは算出しなかった。

主試験用動物では投与後 8 日に、休薬群では投与後 8 及び 22 日に、それぞれ約 16 時間にわたり尿を採取した。投与後 8 日の尿中 cys-mcMMAF 総排泄量は、用量に伴って増加した。

投与前血漿及び媒体対照群の血漿中にベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）は検出されなかった。また、媒体対照群の尿中に cys-mcMMAF は検出されなかった。投与前（74 検体中 13 検体）及び媒体対照群（16 検体中 2 検体）の血漿中に 0.944～4.013 ng/mL の範囲で定量可能な cys-mcMMAF が検出されたが、散発的であり、また、同試料中にベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）は検出されなかったことから、これらの所見がデータの妥当性及び試験の完全性に影響を及ぼすことはないと考えられた。

免疫原性評価のため、投与初日の投与前並びに投与後 8 日及び 22 日に採取した血清試料を用いて、ブリッジング ECLIA により ADA を分析した。30 mg/kg 群の 1 例及び 100 mg/kg 群の 7 例（雌雄含む）では ADA 陽性の可能性が示唆されたが、30 mg/kg 群の 1 例（同群の他の 3 匹と比較して血漿中曝露量が低かった）を除き、ベランタマブ　マホドチンの血漿中濃度に対する影響は認められなかった。これらのデータについて 2.6.6.2.2 で詳細に考察する。

#### 2.6.4.3.2.1.2. 静脈内投与（cys-mcMMAF）

**Cys-mcMMAF の単回静脈内投与毒性試験**

用量設定毒性試験（非 GLP）の一部として、cys-mcMMAF を単回静脈内ボーラス投与したときの TK を評価した。雌 SD ラット（n=6/群）に 0（媒体）、2.5、10、17.5 及び 25 mg/kg の cys-mcMMAF を単回静脈内ボーラス投与した（2013N177526、4.2.3.1）。Cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 5.3 に、毒性データの概要を 2.6.6.2.3.1 に示す。

Cys-mcMMAF の血漿中濃度は、固相抽出 LC/MS/MS 法を用いて定量した（2.6.4.2.1）。投与後 1 及び 5 分、並びに 2 及び 6 時間に、1 群当たり 2 例のラットからコンポジットサンプリングにより採取した血漿を用いて、TK 評価を実施した。ラットに単回静脈内ボーラス投与したときの cys-mcMMAF の平均濃度から、2.5～25 mg/kg の用量範囲で曝露量は用量に比例して増加することが示唆された。データが不十分であったため、ラットにおける cys-mcMMAF に関するこれ以上の TK パラメータを算出できなかった。

### 2.6.4.3.2.2. サル

#### 2.6.4.3.2.2.1. 静脈内投与（ベランタマブ　マホドチン）

**ベランタマブ　マホドチンの単回静脈内投与毒性試験**

TK 及び忍容性試験の一部として、雌雄のサル（n=1/性/群）に 0（媒体）、3、10 及び 30 mg/kg のベランタマブ　マホドチンを単回静脈内ボーラス投与した。休薬 14 日後の標的

器官毒性の回復性を評価するため、0（媒体）、3 及び 30 mg/kg 群に各群雌雄各 1 匹のサルを追加した（2012N133495、4.2.3.1）。この試験で得られたベランタマブ　マホドチンの TK パラメータを 2.6.7-Table 5.2 に、毒性データの概要を 2.6.6.2.2.2 に示す。

TK 評価には、3 及び 30 mg/kg 群（n=2/性/群）並びに 10 mg/kg 群（n=1/性/群）において投与後 0.25、3、6、24、48、72、96 及び 144 時間に採取した血漿を用いた。休薬群（3 及び 30 mg/kg 群、n=1/性/群）からは、投与後 312 及び 480 時間に血漿を採取した。

ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の血漿中濃度は、適格な又はバリデートされたアッセイ方法を用いて定量した（2.6.4.2.1）。

サルに 3、10 及び 30 mg/kg のベランタマブ　マホドチンを単回静脈内ボーラス投与したときの血漿中濃度は、全分析対象物質について 144 時間の試料採取期間中、おおむね定量可能であった。ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の最高血漿中濃度は投与後 0.25～6 時間、cys-mcMMAF の最高血漿中濃度は投与後 0.25～24 時間に認められた。

すべての分析対象物質について、全身曝露量（AUC0-144 及び Cmax）に顕著な性差（2 倍以上）は認められなかった。雌雄平均全身曝露量は 3～30 mg/kg の範囲で用量に比例して増加した。投与量を 3 mg/kg から 30 mg/kg へ 10 倍増加させると、雌雄平均 AUC 及び Cmax は、ベランタマブ　マホドチン（ADC）はそれぞれ 15.3 及び 13.6 倍、ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）はそれぞれ 12.1 及び 12.4 倍、cys-mcMMAF はそれぞれ 11.2 及び 9.5 倍、増加した。

免疫原性評価について、投与開始前並びに投与後 7 及び 21 日に採取した血清試料を用いて、ブリッジング ECLIA により ADA を分析した（2.6.4.2.2）。ベランタマブ　マホドチンを投与したサルで、ADA は検出されなかった。

#### 2.6.4.3.2.2.2. 静脈内投与（cys-mcMMAF）

**Cys-mcMMAF の単回静脈内投与毒性試験**

サルを用いた用量設定毒性試験（GLP）の一部として、cys-mcMMAF を単回静脈内ボーラス投与したときの TK を評価した。サル（n=1/性/群）に 1、3、6 及び 10 mg/kg の cys-mcMMAF（PBS 溶液）を単回静脈内ボーラス投与し、投与後 2 週間、全動物の観察を行った（2013N177529、4.2.3.1）。この試験で得られた cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 5.4 に、毒性データの概要を 2.6.6.2.3.2 に示す。

Cys-mcMMAF の血漿中濃度は、固相抽出 LC/MS/MS 法を用いて定量した（2.6.4.2.1）。投与前並びに投与後 1、5、10、30 分及び 1、2、4、8、12、18、24、36、48 時間に採取した血漿を用いて TK 評価を実施した。

サルに cys-mcMMAF を単回静脈内ボーラス投与したときの cys-mcMMAF の TK パラメータに雌雄で顕著な差及び一貫した差は認められなかった。全身 CL は 262～961 mL/h/kg、t1/2 は 6.16～13.7 時間、Vss は 45.3～483 mL/kg であった。用量間で CL、t1/2 及び Vss に一貫した差は認められなかった。各用量群の動物数が少なかったことから（n=1/性/群）、用量比例性に関して明確な評価を行うことはできなかった。

#### 2.6.4.3.3. 反復投与後のトキシコキネティクス

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（GLP）並びにウサギを用いた忍容性及び眼毒性試験では、0.05 mM EDTA、200 mM トレハロース及び 0.02%ポリソルベート 80 を含有する 25 mM クエン酸緩衝液（pH 約 6）を媒体として、ベランタマブ　マホドチンを静脈内投与した。投与容量は、ラットは 10 mL/kg（10 分間注入）、ウサギは 2 mL/kg/回（ボーラス投与）、サルは 4 mL/kg/回（伏在静脈及び/又は上腕静脈への緩やかなボーラス単回及び/又は反復投与）とした。

ラット及びサルを用いた cys-mcMMAF の 5 日間反復投与毒性試験では、PBS（pH 7.2）を媒体として cys-mcMMAF を静脈内ボーラス投与した。投与容量は、ラットは 5 mL/kg、サルは 2 mL/kg とした。

サルを用いた GSK2857914 の 4 週間反復投与毒性試験では、50 mM 酢酸ナトリウム三水和物、0.05 mM EDTA、1%（w/v）L-アルギニン、51 mM 塩化ナトリウム及び 0.02%ポリソルベート 80 を含有する注射用水（pH 5.5±0.2）を媒体として、GSK2857914 を容量 4 mL/kg/回でサルに投与（緩やかなボーラス投与）した。

#### 2.6.4.3.3.1. ラット

##### 2.6.4.3.3.1.1. 静脈内投与（ベランタマブ　マホドチン）

**ベランタマブ　マホドチンの 3 週間（週 1 回）静脈内投与毒性試験**

Wistar Han ラット（n=10/性/群）にベランタマブ　マホドチン［0（媒体）、3、10 及び 30 mg/kg/週］を週 1 回の頻度で 3 週間（試験 1、8 及び 15 日）、静脈内投与した。休薬 12 週後に投与関連所見の回復性を評価するため、媒体対照群に雌雄各 12 匹、3 及び 30 mg/kg/週群に各群雌雄各 6 匹のラットを追加した。更に TK 評価のため、各群雌雄各 6 匹のラットを追加した（2013N174857、4.2.3.2）。この試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 7.1 に、毒性データの概要を 2.6.6.3.2.1 に示す。

試験 1 及び 15 日の投与後 0.25、3、6、24、48、72、96 及び 168 時間に採取した血漿を用いて TK 評価を実施した（最大 n=6/性/群）。また、休薬期間中（試験 29、36、43、50、64、78 及び 106 日）にも血漿を採取した。試験 1 日及び 15 日では、雄は 3、4 又は 8 時点から血漿を採取し、雌はコンポジットサンプリング法により 4 時点から血漿を採取した。休薬期間の血漿採取では、各回雌雄の各動物から 1 回ずつ採血した。

ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の血漿中濃度並びに cys-mcMMAF の血漿中及び尿中濃度は、バリデーション済みの分析法を用いて定量した（2.6.4.2.1）。

媒体対照群の血漿中には、ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF は検出されなかったが、例外として、試験 1 日の投与後 24 時間に雌 1 例でベランタマブ　マホドチン（総 mAb）が検出され、その濃度は 194 ng/mL であった。ADC 及び総 mAb ともに、全身曝露量（AUC0-168 及び Cmax）は用量に比例して増加し、全身曝露量に顕著な性差は認められなかった。全体的に試験 15 日の全身曝露量は試験 1 日に比べてわずかに高値（最大 2.4 倍）を示した。Tmax は投与後 0.25 時間（最初の試料採取時点）であった。休薬期間中（試験 29～106 日）に採取した試料については、低用量、中用量及び高用量

群の試料のほとんどでベランタマブ　マホドチンの血漿中濃度の定量が可能であり、経時的に継続的な減少を示した。同じ用量群内でも、他の動物に比べて濃度減少が速い動物も認められた。

ベランタマブ　マホドチンの AUC は、試験 1 日ではいずれの用量群でも ADC と総 mAb とで同程度であったが、試験 15 日では ADC に比べて総 mAb の方が概して高値を示した。Cmax は、試験 1 日では ADC に比べて総 mAb の方が概して低値を示したが、試験 15 日では同程度であった。試験 29～106 日の休薬動物のデータから算出した平均 t1/2 は、ADC と総 mAb ともに 11 日であった。

Cys-mcMMAF についてはデータが不十分であったため、3 mg/kg/週群の試験 1 日における AUC を算出できなかった。全身曝露量は用量に比例して増加し、全身曝露量に顕著な性差は認められなかった。試験 15 日の全身曝露量は試験 1 日に比べて高値（最大 6.4 倍）を示した。Tmax は 0.25～48 時間であった。休薬期間中（試験 29～106 日）の血漿中 cys-mcMMAF 濃度は、すべての雄及び 3 mg/kg/週群の雌で定量下限未満であった。10 及び 30 mg/kg/週群の一部の雌並びに 30 mg/kg/週群の雌 1 例では、それぞれ試験 29 及び 36 日に定量可能であった。

尿中 cys-mcMMAF 濃度は、試験 7、14 及び 22 日並びに休薬期間中である試験 43、64、85 及び 106 日に定量可能であった。尿中の総 cys-mcMMAF 平均濃度は、概してベランタマブ　マホドチンの用量に比例して増加した（2.6.4.6.1.1）。

ADA に関する分析は実施しなかったが、本試験においては、ADA に起因するものとみられる、ベランタマブ　マホドチンのラット TK 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 13 週間（3 週に 1 回）静脈内投与毒性試験**

Wistar Han ラット（n=12/性/群）にベランタマブ　マホドチン［0（媒体）、3、10 及び 30 mg/kg/回］を 3 週に 1 回の頻度で 3 ヵ月間（試験 1、4、7 及び 10 週）、尾静脈内投与した。12 週間の休薬期間後に投与関連所見の回復性を評価するため、0、10 及び 30 mg/kg/回群に各群雌雄各 6 匹を追加した。TK 評価のため、各群に雌雄各 6 匹を追加した（2018N374327、4.2.3.2）。この試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 7.2 に、毒性データの概要を 2.6.6.3.2.1 に示す。

試験 4 及び 10 週の投与後 0.25、6、24、48、96、168、336 及び 504 時間に採取した血漿を用いて TK 評価を実施した（n=3/性/群/時点）。また、媒体対照群並びに 10 及び 30 mg/kg/回群（n=6/性/群）では、雄は休薬 4、8 及び 12 週、雌は休薬 4、8 及び 13 週に追加の血液試料を採取した。ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の血漿中濃度は、試料希釈後に免疫測定法を行う、バリデーション済みの方法を用いて測定した。Cys-mcMMAF の血漿中濃度は、バリデーション済みの分析法を用いて定量した（2.6.4.2.1）。

投与時の問題により正確な用量を投与できなかったため、試験 4 週の平均濃度の算出から 2 例を除外し、試験 10 週の平均濃度の算出から 1 例を除外した。また、2 例では試験 4 及び 10 週の遅い時点でベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の血漿中濃度が急激に減少したため、全身曝露量の平均濃度の算出から両動物を除外した。

ADC 及び総 mAb のいずれについても、全身曝露量に顕著な性差（2 倍超）は認められなかった。雌雄平均全身曝露量（AUC0-504 及び Cmax）は用量に比例して増加した。各用量群における試験 4 及び 10 週の反復投与後の全身曝露量は、同程度であった。10 及び 30 mg/kg/回群で休薬 4、8 及び 12（雄）／13（雌）週に採取した試料中のベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の血漿中濃度は、ほとんどの試料で定量可能であり、経時的な持続的減少を示した。同じ用量群内で、他の動物に比べて濃度減少が速い動物も認められた。試験 4 及び 10 週のいずれにおいても、総 mAb の AUC0-504 は ADC の AUC0-504 に比べて概して高値を示した（最大 1.2 倍）。各用量群における試験 4 及び 10 週の ADC の Cmax と総 mAb の Cmax は、おおむね同程度であった。Tmax は投与後 0.25 時間（最初の試料採取時点）であった。Cys-mcMMAF については、3 mg/kg 群ではほとんどの試料が定量下限未満であったため、試験 4 及び 10 週の AUC を算出することができなかった。全身曝露量に顕著な性差は認められなかった。雌雄平均全身曝露量は用量に比例して増加した。全般的に、試験 10 週の雌雄平均全身曝露量は、試験 4 週に比べてわずかに高値を示した（最大 2.3 倍）。Tmax は 0.25～48 時間であった。また、cys-mcMMAF は 10 及び 30 mg/kg/回群の休薬 4、8 及び 12（雄）／13（雌）週に採取したすべての試料において、定量下限未満であった。

媒体対照群の血漿では 1 例を除き、ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF 濃度は定量下限未満であった。例外とした休薬 4 週の雄 1 例では cys-mcMMAF 濃度は定量下限未満であったが、極めて高い ADC 及び総 mAb 濃度（それぞれ 10900 及び 13300 ng/mL）を示し、本測定結果については再分析により正確性が確かめられた。また、休薬 4 週の 10 mg/kg 群の雄 1 例で ADC 及び総 mAb 濃度は定量下限未満であった。両動物については、平均濃度の算出から除外した。

免疫原性評価のため、試験 1、4 及び 12 週（休薬群及び TK 評価群の全生存動物）並びに試験 13 週（主試験群の全生存動物）に血清を採取した。休薬期間中の試料採取は、休薬 4、8 及び 12（雄）／13（雌）週に実施した。採取した試料について、ECLIA により ADA を分析した（2.6.4.2.2）。30 mg/kg/回群の雄 2 例で試験 4 週から 12 週の間で抗体価が上昇し、ADA 陽性が確認された。これは ADC 及び mAb の血漿中濃度の低下と関連しており、ADC 及び総 mAb の平均全身曝露量の算出から両動物を除外した。休薬期間中、更に 1 例の雄が ADA 陽性と確認された。これらのデータについては、2.6.6.3.2.1 で詳細に考察する。

#### 2.6.4.3.3.1.2. 静脈内投与（cys-mcMMAF）

**Cys-mcMMAF の 5 日間静脈内投与毒性試験**

SD ラット（n=15/性/群）に cys-mcMMAF［0（媒体）、1、5 及び 10 mg/kg/日］を 1 日 1 回の頻度で 5 日間、静脈内ボーラス投与した。試験 8 日（n=10/性/群）又は休薬 14 日後（n=5/性/群）に動物を安楽死させた。TK 評価のため、サテライト群を設け、各群雌雄各最大 12 匹を追加した（2013N177527、4.2.3.2）。この試験で得られた cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 7.5 に、毒性データの概要を 2.6.6.3.3.1 に示す。

Cys-mcMMAF の血漿中濃度は、固相抽出 LC/MS/MS 法を用いて定量した（2.6.4.2.1）。

TK 評価動物の雌雄各 3 匹を 1 つのコホートとした。媒体対照群については 2 つのコホートから、投与前並びに試験 1 及び 5 日の投与後 1 分及び 10 時間に血漿を採取して TK 評価に用いた。Cys-mcMMAF 投与群についてはそれぞれ 4 つのコホートから、試験 1 及び 5 日の投与後 1 及び 5 分、2、10 及び 24 時間、並びに試験 2、3 及び 4 日の投与後 1 分及び 10 時間に血漿を採取して TK 評価に用いた。

試験 1 及び 5 日の cys-mcMMAF の TK パラメータに顕著な差及び一貫した差は認められなかった。試験 1 及び 5 日の AUC0-24 h は用量比を上回る増加を示し、投与量が 5 及び 10 倍増加したとき、雌雄平均 AUC0-24h はそれぞれ約 4～9 倍及び 26～32 倍増加した。Cmax は用量にほぼ比例して増加した。Cys-mcMMAF を連日反復投与しても蓄積は認められず、各用量群における AUC0-24 h 及び Cmax は試験 1 日と 5 日で同程度であった。

#### 2.6.4.3.3.2. ウサギ

##### 2.6.4.3.3.2.1. 静脈内投与（ベランタマブ　マホドチン）

**ベランタマブ マホドチンの NZW ウサギにおける 4 週間静脈内投与毒性試験**

雌 NZW ウサギ（n=3/群）にベランタマブ　マホドチンを 2 週間［0（媒体）及び 30 mg/kg/週；第 1 相］又は 4 週間［0（媒体）、15 及び 30 mg/kg/週；第 2 相］、静脈内ボーラス投与した（2018N385412、4.2.3.2）。この試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 17.12 に、毒性データの概要を 2.6.6.8.4.2 に示す。

ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の血漿中濃度は、適格な又はバリデートされたアッセイ法により定量した（2.6.4.2.1）。

投与前及び試験 1 及び 8 日の投与後 168 時間まで（第 1 相）並びに試験 1 及び／又は 22 日の投与後 168 時間まで（第 2 相）にすべてのウサギから採取した血漿を用いて、TK 評価を行った。また、第 2 相の眼科学的検査日（15 mg/kg/週群では試験 13 及び 20 日、30 mg/kg/週群では試験 6、13 及び 20 日）に追加の血漿を採取し、TK 評価に用いた。

ADC 及び総 mAb の全身曝露量（AUC0-t 及び Cmax）は同程度で、用量に比例して増加した。30 mg/kg/週群の平均曝露量（AUC0-t）は、試験 1 日に比べて試験 8 日で 2 倍弱、試験 22 日で約 2 倍であり、一貫して高値を示した。Tmax の中央値は一貫して投与後 0.25 時間（最初の試料採取時点）であった。

Cys-mcMMAF の全身曝露量（AUC0-t 及び Cmax）は、用量に比例して増加した。30 mg/kg/週群の平均曝露量は、試験日間で同程度であった。Tmax 中央値は概して投与後 24 時間に認められた。

なお、上記 TK 評価は忍容性及び眼毒性試験の一部として実施した。本試験では、涙液を採取し、涙液中のベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の濃度を定性的に評価した。評価結果の概要は 2.6.4.4.2.2 に示した。

**ベランタマブ　マホドチンの DB ウサギにおける 7 週間静脈内投与毒性試験**

雌 DB ウサギ（n=6/群）に週 1 回の頻度でベランタマブ　マホドチンの 0 mg/kg/週（媒体）を 7 回、又は 30 mg/kg/週を 4 回（1～4 週）投与した後に 15 mg/kg/週を 3 回（5～7

週）、静脈内ボーラス投与した（2021N465838、4.2.3.2）。本試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 17.13 に示し、毒性データの要約を 2.6.6.8.4.2 に示す。

ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の血漿中濃度は、適格な又はバリデートされたアッセイ法により定量した（2.6.4.2.1）。

ADC 及び cys-mcMMAF の TK 評価は、投薬群の初回投与前、初回（試験 1 日）投与、4 回目（試験 22 日）投与及び 6 回目（試験 36 日）投与後 168 時間まで、並びに最終投与（試験 43 日）後 24 及び 120 時間に採取した血漿を用いて実施した。

ベランタマブ　マホドチン（ADC）及び cys-mcMMAF の全身曝露量（血漿中 AUC0-t 及び Cmax）は、30 mg/kg/週（試験 1 及び 22 日）及び 15 mg/kg/週（試験 36 日）群のそれぞれにおいて同程度であった。ベランタマブ　マホドチン（ADC）及び cys-mcMMAF の Tmax は、それぞれおおむね投与後 0.5 及び 24 時間であった。

なお、上記評価は DB ウサギを用いたベランタマブ　マホドチンの 7 週間投与による忍容性及び眼毒性試験の一部として実施した。本試験では、初回投与前、投与後 1、5 及び 24 時間、並びに最終投与後 120 時間に全例から涙液を採取し、涙液中のベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF 濃度を定性的に評価した。評価結果の概要は 2.6.4.4.2.2 に示した。

#### 2.6.4.3.3.3. サル

##### 2.6.4.3.3.3.1. 静脈内投与（ベランタマブ　マホドチン）

**ベランタマブ　マホドチンの 3 週間（週 1 回）静脈内投与毒性試験（GLP）**

サル（n=3/性/群）にベランタマブ　マホドチン［0（媒体）、1、3 及び 10 mg/kg/週］を週 1 回の頻度で 3 週間、静脈内投与（伏在静脈及び/又は上腕静脈への緩やかなボーラス単回及び/又は反復投与）した。休薬 12 週後の被験物質関連所見の回復性を評価するため、0 及び 3 mg/kg/週群に各群雌雄各 2 例を追加した（2013N158643、4.2.3.2）。

試験 1 週（試験 1 日）及び 3 週（試験 15 日）の投与前（0 時間；3 週のみ）並びに投与後 0.25、3、6、24、48、72、96 及び 167 時間に全例から採取した血漿を用いて TK 評価を実施した（n=3 又は 5/性/群）。12 週間の休薬期間中、媒体対照群及び 3 mg/kg/週群の雌雄各 2 例から、試験 3 週の最終投与後 336、504、672、840、1176、1512、1848 及び 2184 時間に血液を採取し、追加の血漿を得た。この試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 7.3 に、毒性データの概要を 2.6.6.3.2.2 に示す。

ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の血漿中濃度は、バリデーション済みの分析法により定量した（2.6.4.2.1）。

ベランタマブ　マホドチンを静脈内ボーラス投与したときの ADC 及び総 mAb の Tmax は、ほとんどの動物で投与後 0.25 時間（最初の試料採取時点）であったが、一部の動物では、試験 1 及び 3 週の Tmax は投与後 3、6 又は 24 時間であった。Cys-mcMMAF については Tmax にばらつきが認められたが、ほとんどの動物で試験 1 及び 3 週の Tmax は投与後 6 時間以内であった。

各用量群において試験 1 週と 3 週のベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の全身曝露量（AUC0-167 及び Cmax）及び cys-mcMMAF の全身曝露量（AUC0-t 及び Cmax）に差は認められなかった。ADC と総 mAb の全身曝露量は同程度であったが、総 mAb は ADC に比べて一貫してわずかに高値を示した。

ベランタマブ　マホドチンを静脈内投与したときのベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の雌雄平均全身曝露量は、概して用量に比例して増加した。投与量が 1 mg/kg/週から 10 mg/kg/週に 10 倍増加したとき、ADC 及び総 mAb の AUC0-167 はいずれも試験 1 及び 3 週でそれぞれ 13 倍及び 17 倍増加し、ADC 及び総 mAb の Cmax はいずれも試験 1 及び 3 週でともに 11 倍増加した。また、cys-mcMMAF については、投与量が 1 mg/kg/週から 10 mg/kg/週に 10 倍増加したとき、雌雄平均全身曝露量 AUC0-t は試験 1 及び 3 週でそれぞれ 13 倍及び 29 倍増加し、Cmax は試験 1 及び 3 週でそれぞれ 6.6 倍及び 11 倍増加した。

ベランタマブ　マホドチンを 1、3 又は 10 mg/kg/週の用量で反復静脈内ボーラス投与したとき、試験 3 週の ADC 及び総 mAb の雌雄平均全身曝露量は、試験 1 週と比べて 1.1 倍から 2.1 倍の範囲で増加した。Cys-mcMMAF については、試験 1 週から試験 3 週の雌雄平均全身曝露量の変化は 2 倍未満であった。

12 週間の休薬期間中、3 mg/kg/週群の動物においてベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の血漿中濃度は、2184 時間の試料採取期間のうち 336 時間（5 週）から 672 時間（7 週）まで定量可能であった。

ADA に関する分析は実施しなかったが、ベランタマブ　マホドチンの TK 評価に対する ADA に起因する影響は認められなかった。

**ベランタマブ　マホドチンの 13 週間（週 1 回）静脈内投与毒性試験**

サル（n=3/性/群）にベランタマブ　マホドチン［0（媒体）、1、3 及び 10 mg/kg/週］を週 1 回の頻度で 13 週間、静脈内ボーラス投与した。0（媒体）、3 及び 10 mg/kg/週群に各群雌雄各 2 匹を追加し、休薬 12 週後に投薬関連所見の回復又は進行を評価した（2018N375127、4.2.3.2）。本試験で得られたベランタマブ　マホドチンの TK パラメータを 2.6.7-Table 7.4 に、毒性データの概要を 2.6.6.3.2.2 に示す。

試験 4 週（22 日）及び 13 週（85 日）に採取した血漿（最大 n=5/性/群/時点）を用いて TK 評価を実施した。投与前並びに投与後約 0.25、3、6、24、48、96 及び 168 時間に採血を行った。また、10 mg/kg/週群及び媒体対照群の試験 6 週又は 5 週（雄は試験 36 日、雌は試験 34 日）及び試験 7 週（雄は試験 45 日、雌は試験 43 日）、10 mg/kg/週群の試験 17 週（試験 113 日）、並びに 1 及び 3 mg/kg/週群の試験 7 週（試験 43 日）、試験 9 週（試験 57 日）、3 mg/kg/週群の試験 17 週（試験 113 日）、21 週（試験 141 日）及び 25 週（試験 169 日）から血漿を採取して TK 評価に用いた。免疫原性評価のため、試験初日の投与前並びに投与後 4、6、7 及び 9 時間、試験 13 週の投与前及び投与後、並びに試験 17、21 及び 25 週に血清試料を採取した。

ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の血漿中濃度は、適格な又はバリデートされたアッセイ法を用いて定量した（2.6.4.2.1）。

Cys-mcMMAF 濃度について、1 及び 3 mg/kg/週群の結果は報告対象としたが、10 mg/kg/週群の結果は、実試料の再分析（ISR）結果に基づいた検討により試料中のベランタマブ　マホドチンが cys-mcMMAF 濃度を増加させた可能性が示されたため、報告対象としなかった。低用量群ではベランタマブ　マホドチン濃度が低かったため、cys-mcMMAF 濃度に顕著な影響を及ぼさなかった。

ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の Tmax は、ほとんどの動物で投与後 0.25 時間（最初の試料採取時点）であったが、少数の動物で投与後 3 時間であった。Cys-mcMMAF の Tmax にはばらつきがみられたが、ほとんどの動物で Tmax は投与後 24 時間であった。雄 1 例（1 mg/kg/週群）の AUC が同用量群の他の動物に比べて 2～60 倍低い値を示したため、試験 4 及び 13 週における AUC 平均値の算出からこの動物を除外した。

各投薬群においてベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の平均全身曝露量（AUC0-t 及び Cmax）に性差は認められなかった。ADC 及び総 mAb の平均全身曝露量は同程度であったが、総 mAb は ADC に比べて一貫してわずかに高値を示した。

概して、ベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の雌雄平均全身曝露量は、用量に伴って増加した。投与量が 1 mg/kg/週から 3 mg/kg/週及び 3 mg/kg/週から 10 mg/kg/週にそれぞれ 3 倍及び 3.3 倍増加したとき、試験 4 及び 13 週のベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の雌雄平均全身曝露量は、いずれも用量に比例して増加した。投与量が 1 mg/kg/週から 10 mg/kg/週に 10 倍増加したとき、ADC 及び総 mAb の雌雄平均 AUC0-t はそれぞれ 18.4 倍及び 21.5 倍増加し、雌雄平均 Cmax はそれぞれ 11.6 倍及び 13.9 倍増加した。ベランタマブ　マホドチンを 1 又は 3 mg/kg/週で投与したとき、試験 7 週及び 9 週におけるベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の投与前雌雄平均血漿中濃度は、試験 4 及び 13 週における投与前雌雄平均血漿中濃度と同程度であった。

試験 29 日の投与終了後、10 mg/kg/週群の試験 6 週の血漿中濃度は、ADC で 59600～128000 ng/mL、総 mAb で 72700～174000 ng/mL であった。同用量群の試験 7 週の血漿中濃度は、ADC で 17700～68400 ng/mL、総 mAb で 28500～79600 ng/mL であった。

3 mg/kg/週群では、休薬期間中の試験 17 週における血漿中濃度は、ADC で 1680～5120 ng/mL、総 mAb で 2290～6500 ng/mL であった。試験 21 及び 25 週においてすべての試料で ADC 及び総 mAb の血漿中濃度は定量下限未満であった。10 mg/kg/週群では、試験 17 週において血漿 ADC 及び総 mAb の血漿中濃度はいずれも定量下限未満であった。

1 mg/kg/週から 3 mg/kg/週に投与量が 3 倍増加したとき、cys-mcMMAF の雌雄平均 AUC0-t は試験 4 週で 10.6 倍増加し、雌雄平均 Cmax は試験 4 週で 2.3 倍、13 週で 3.3 倍増加した。試験 13 週の AUC0-t は算出できなかったため、比較できなかった。

1 及び 3 mg/kg/週のベランタマブ　マホドチンを反復静脈内ボーラス投与したときのベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の雌雄平均全身曝露量は、試験 4 週と 13 週で同程度であった。Cys-mcMMAF 濃度は、3 mg/kg/週群の試験 17、21 及び 25 週の休薬期間中に採取した全血漿において定量下限未満であった。

試験初日の投与前、試験 4、6、7、9 及び 13 週の投与前及び投与後、並びに試験 17、21 及び 25 週に血清を採取し、バリデーション済みのブリッジング免疫測定法を用いて ADA 分析を行った（2.6.4.2.2）。その結果、36 例中 24 例が少なくとも 1 回の分析において陽性を示

し、36 例中 1 例が第一世代の分析法で投与期間中に ADA 陽性となり、36 例中 21 例が drug tolerance の高い第二世代の分析法で ADA 陽性となった。休薬期間中、12 例中 4 例が ADA 陽性であった。CIC 法では、36 例中 12 例がいずれかの時点で CIC 陽性となり、7 例ではいずれかの時点で遊離型 ADA を検出した。1 mg/kg/週群の雄 1 例は、複数の時点で 3 つの分析法すべてで陽性となり、投与回数の増加に伴い抗体価が上昇した。これらのデータについて、2.6.6.3.2.2.2 で詳細に考察する。

#### 2.6.4.3.3.3.2. 静脈内投与（cys-mcMMAF）

**Cys-mcMMAF の 5 日間静脈内投与毒性試験**

サルに cys-mcMMAF［0（媒体）、0.5、2 及び 5 mg/kg/日］を 1 日 1 回の頻度で 5 日間、静脈内ボーラス投与した。試験 8 日（n=3/性/群）又は休薬 14 日後（n=2/性/群）に、動物を安楽死させた（2013N177530、4.2.3.2）。この試験で得られた cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 7.6 に、毒性データの概要を 2.6.6.3.3.2 に示す。

Cys-mcMMAF の血漿中濃度は、固相抽出 LC/MS/MS 法を用いて定量した（2.6.4.2.1）。

媒体対照群雄の血漿 95 検体中 13 検体及び媒体対照群雌の血漿 95 検体中 15 検体において、低濃度の cys-mcMMAF が検出された。これらのデータは TK 解析には用いず、本試験の TK 評価には影響しないと考えられた。試験初日の投与前、投与後 1 及び 5 分、2、8 及び 24 時間、試験 2、3 及び 4 日の投与後 1 分及び 24 時間、並びに試験 5 日の投与後 1 及び 5 分並びに 2、8、24、36 及び 48 時間に採取した血漿を用いて、TK 評価を実施した。試験 1 及び 5 日の cys-mcMMAF の TK パラメータに顕著な差及び一貫した差は認められなかった。試験 5 日の t1/2 は試験 1 日に比べて長かったが、試験 5 日の試料採取時点がより遅かったためと考えられる。各用量群の AUC0-24 h 及び Cmax は試験 1 日と 5 日で同程度であり、両試験日ともに用量にほぼ比例して増加した。

#### 2.6.4.3.3.3.3. 静脈内投与（GSK2857914）

**GSK2857914 の 4 週間（週 1 回）静脈内投与毒性試験**

サル（n=3/性/群）に GSK2857914［0（媒体）、10、30 及び 100 mg/kg/週］を週 1 回の頻度で 4 週間、静脈内ボーラス投与した（2012N150466、4.2.3.2）。この試験で得られた GSK2857914 の TK パラメータを 2.6.7-Table 7.7 に、毒性データの概要を 2.6.6.3.4.1 に示す。

GSK2857914 の血漿中濃度は、バリデーション済みの分析法を用いて測定した（2.6.4.2.1）。

媒体対照群及び GSK2857914 投与群の動物から試験 1 日（1 週）及び 22 日（4 週）の投与前（0 時間；4 週のみ）並びに投与後 15 分並びに 3、6、24、48、72、96 及び 168 時間に採取した血漿を用いて TK 評価を実施した。更に、試験 15 日（3 週）の投与前（0 時間）に採取した血漿も評価に供した。

試験 1 及び 4 週に投与後 168 時間にわたり採取した血漿において、GSK2857914 の濃度は定量可能であった。試験 1 及び 4 週の Tmax は概して投与後 0.25 時間（最初の試料採取時点）であった。各群において試験 1 週と 4 週の GSK2857914 の全身曝露量（AUC0-t 及び Cmax）に差は認められなかった。雌雄平均全身曝露量は、試験 1 及び 4 週ともに用量に比

例して増加した。10 mg/kg/週から 100 mg/kg/週に投与量が 10 倍増加したとき、試験 1 及び 4 週の AUC0-t はそれぞれ 9.2 倍及び 9.6 倍増加し、Cmax はそれぞれ 8.4 倍及び 9.2 倍増加した。試験 1 週と 4 週における GSK2857914 の雌雄平均全身曝露量に顕著な差（2 倍超）は認められなかった。試験 3 週（15 日）及び 4 週（22 日）の投与前の血漿中 GSK2857914 濃度は、概して各動物で同程度であった。

免疫原性評価のため、試験開始前（−6 日）及び試験 29 日に採取した血清を用いてブリッジング ECLIA（2.6.4.2.2）により分析した結果、ADA は検出されなかった。

**GSK2857914 の 13 週間（週 1 回）皮下及び静脈内投与毒性試験**

サル（n=3 又は 4/性/群）に GSK2857914 を週 1 回の頻度で 13 週間、皮下投与［0（媒体）、2 及び 10 mg/kg/週］又は静脈内ボーラス投与［0（媒体）及び 40 mg/kg/週］した（2023N536587、4.2.3.2）。この試験で得られた GSK2857914 の TK パラメータを 2.6.7-Table 7.8 に、毒性データの概要を 2.6.6.3.4.1 に示す。

GSK2857914 の血漿中濃度は、バリデーション済みの分析法を用いて測定した（2.6.4.2.1）。

媒体対照群及び GSK2857914 投与群の動物から、試験 22 日（4 週）及び試験 85 日（13 週）の投与前（0 時間）、投与後 15 分並びに 3、6、24、48、96 及び 168 時間に採取した血漿を用いて TK 評価を実施した。更に、試験 57 日（9 週）の投与前（0 時間）に採取した血漿も評価に供した。

皮下投与 2 mg/kg/週群では、GSK2857914 の血漿中濃度は、試験 22 日（4 週）の雄 3 例及び試験 85 日（13 週）の雄 2 例において、投与後 168 時間まで定量可能であった。そのほかの動物における GSK2857914 の血漿中濃度は、投与後 48 時間まで定量可能であったか、あるいは定量下限未満であった。皮下投与 10 mg/kg/週群及び静脈内投与 40 mg/kg/週群では、GSK2857914 の血漿中濃度は、試験 22 日（4 週）及び 85 日（13 週）の投与後 168 時間まで、おおむね定量可能であった。例外として、皮下投与 10 mg/kg 群の雄 1 例では試験 85 日の投与後 48 時間まで定量可能であり、静脈内投与 40 mg/kg 群の雌 1 例では試験 22 日の投与後 48 時間まで、試験 85 日の投与後 6 時間まで、定量可能であった。

皮下投与 2 mg/kg/週から 10 mg/kg/週への用量増加に伴い、全身曝露量（雌雄平均 AUC 及び Cmax）は用量に比例して増加した。雌雄平均全身曝露量は、GSK2857914 を皮下及び静脈内投与した 3 群のいずれにおいても試験 22 日（4 週）と試験 85 日（13 週）で同程度であった。血漿中濃度はほとんどの動物で試験 4 週までにおおむね定常状態に達した。

免疫原性評価のため、投与開始前、試験 5 週及び 14 週に採取した血清をブリッジング ECLIA（2.6.4.2.2）により分析した。その結果、投与開始前の検体からは ADA は検出されなかった。また、GSK2857914 投与群の半数以上（すべての投与群を含む）において試験 5 週に ADA が検出されたが、試験 14 週に ADA が検出された動物は概して少なかった。皮下投与 2 mg/kg/週群の雌全例で試験 4 週から曝露量の減少がみられ、試験 5 週（最初の評価時点）に ADA が検出されたことから、ADA がこれらの雌における毒性評価に影響を及ぼしたと考えられた。GSK2857914 の他の投与群の一部の動物においても ADA による曝露量の減

少が認められたが、各群雌雄ともに曝露された動物数が十分であったことから、これらの群では ADA による毒性評価への影響はなかったと考えられた。

**表 2.6.4.1　ベランタマブ　マホドチン吸収試験一覧**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/Group | Method of Administration | Test Article | Dose (mg/kg/week) | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pharmacokinetics | Mouse (C57/BL6) | 12M | IV (bolus) | ADC MAB | 1 mg/kg | Single | No | GSK | 2013N175927 (DT/Mouse/ PK/2011/007) | m4.2.2.2 |
| Pharmacokinetics | Mouse (CB17 SCID) | 3M | IP | ADC | 4 mg/kg | Single | No | GSK | 2013N176011 BD/2012/M005) | m4.2.2.2 |
| Pharmacokinetics | Rat (Strain not recorded) | 3M | IV (bolus) | ADC, MAB | 1 mg/kg | Single | No | GSK | 2012N140200 | m4.2.2.2 |
| Pharmacokinetics | Rat (SD) | 6M | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 0.3, 1, 3 mg/kg | Single | Yes | [redacted] | 2019N415388 (1019-012) | m4.2.2.2 |
| Pharmacokinetics | Monkey (cynomolgus) | 3M | IV (bolus) | ADC, MAB | 1 mg/kg | Single | No | [redacted]/GSK[d] | 2013N157994 and 2012N143303 | m4.2.2.2 |
| Pharmacokinetics | Monkey (cynomolgus) | 3M | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 0.3, 1, 3 mg/kg | Single | Yes | [redacted] | 2019N415363 (1019-013) | m4.2.2.2 |
| Toxicokinetics[a] | Rat (Wistar Han) | 3M/3F | IV (bolus) | ADC | 10, 30, 100 mg/kg | Single | No | GSK | 2012N134122 (R29778) | m4.2.3.1 |
| Toxicokinetics[a] | Rat (Sprague Dawley) | 6F | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 2.5, 10, 17.5, 25 mg/kg | Single | No | [redacted] | 2013N177526 (R-TOX-44) | m4.2.3.1 |

**表 2.6.4.1　ベランタマブ　マホドチン吸収試験一覧（続き）**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/ Group | Method of Administration | Test Article | Dose (mg/kg/week) | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Toxicokinetics[a] | Monkey (cynomolgus) | 1 or 2 M/F | IV (bolus) | ADC | 3, 10, 30 mg/kg | Single | No | GSK | 2012N133495 (D11146) | m4.2.3.1 |
| Toxicokinetics | Monkey (cynomolgus) | 1M/1F | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 1, 3, 6, 10 mg/kg | Single | Yes | [redacted] | 2013N177529 (1019-008) | m4.2.3.1 |
| Toxicokinetics[b] | Rat (Wistar Han) | Up to 6M/6F | IV (infusion) | ADC | 3, 10, 30[f] | 3 Weeks[c] (Days 1 and 15) | Yes | GSK | 2013N174857 (R30467G) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[b] | Rat (Wistar Han) | 6M/6F | IV (infusion) | ADC | 3, 10, 30 | 13 Weeks[e] (Weeks 4 and 10) | Yes | [redacted] | 2018N374327 (R32025G) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[a] | Rat (SD) | Up to 12M/12F | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 1, 5, 10 mg/kg/day | 5 Days (Days 1 and 5) | Yes | [redacted] | 2013N177527 (1019-010) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[c] | Rabbit (NZW) | 3F | IV (bolus) | ADC | 30 | 2 weeks (Day 1 and 8) | No | GSK | 2018N385412 (L32295N) | m4.2.3.2[f] |
| | | | | | 15 | 4 weeks (Day 1 and 22) | | | | |
| | | | | | 30 | 4 weeks (Day 22) | | | | |

**表 2.6.4.1 ベランタマブ マホドチン吸収試験一覧（続き）**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/ Group | Method of Administration | Test Article | Dose (mg/kg/week) | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Toxicokinetics[c] | Rabbit (DB) | 6F | IV (bolus) | ADC | 30<br>15 | 4 weeks (Day 1 and 22)<br>3 weeks (Day 36 and 43) | No | GSK | 2021N465838 (L71822N) | m4.2.3.2[f] |
| Toxicokinetics[b] | Monkey (cynomolgus) | 3M/3F | IV (bolus) | ADC | 1, 3, 10[f] | 3 Weeks[c] (Weeks 1 and 3) | Yes | GSK | 2013N158643 (P70260G) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[b] | Monkey (cynomolgus) | 3 or 5 M/F | IV (bolus) | ADC | 1, 3, 10 | 13 Weeks[c] (Weeks 4 and 13) | Yes | [redacted] | 2018N375127 (P71346G) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[a] | Monkey (cynomolgus) | 5M/5F | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 0.5, 2, 5 mg/kg/day | 5 Days (Days 1 and 5) | Yes | [redacted] | 2013N177530 (1019-009) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[b] | Monkey (cynomolgus) | 3M/3F | IV (bolus) | MAB | 10, 30, 100 | 4 Weeks[c] (Weeks 1,3 and 4) | Yes | GSK | 2012N150466 (P70204G) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics | Monkey (cynomolgus) | 3M/3F, 4M/4F<br>3M/3F | SC<br>IV (bolus) | MAB | 2, 10<br>40 | 13 Weeks[c] (Weeks 4 and 13) | Yes | [redacted] | 2023N536587 (P73042G) | m4.2.3.2 |

**表 2.6.4.1　ベランタマブ　マホドチン吸収試験一覧（続き）**

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

**Key:**
a = Dosing was followed by a 2 week off period.
b = Dosing was followed by a 12 week off dose period.
c = Animals were dosed once weekly.
d = The serum samples analysed in GSK Report 2012N143303 were obtained from a separate study conducted at [redacted] France (Report 2013N157994).
e = Animals were dosed once every 3 weeks.
f = The report for this study has been placed in m4.2.3.2 rather than m4.2.3.7.3 for administrative purposes only.
DB = Dutch Belted; mAb = Monoclonal antibody.
MMAF = Monomethyl auristatin F. IP = Intraperitoneal; IV = Intravenous.
SD = Sprague Dawley; NZW = New Zealand White.

**Test Article:**
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]
[redacted] = [redacted]
(On [redacted] the legal entity [redacted] was renamed as [redacted]).
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]

### 2.6.4.4. 分布

ベランタマブ　マホドチンは分子サイズが大きく（約 150kDa）、天然に存在するアミノ酸で構成されているため、動物を用いた標準的な分布試験を実施する必要はない[ICH S6(R1)]。しかしながら、細胞毒性作用を示す活性部分にあたる cys-mcMMAF については、血漿蛋白質結合率及び排出・取り込みトランスポーターとの相互作用を検討するために複数の in vitro 試験を実施した。更に、蛍光標識されたベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 を静脈内投与したときのラットにおける体内分布を検討するために in vivo 試験を実施した。これらの試験の概要を表 2.6.4.9 に示す。

#### 2.6.4.4.1. In vitro 分布試験

##### 2.6.4.4.1.1. 蛋白結合

マウス、ラット、サル及びヒト血漿蛋白質に対する cys-mcMMAF（直鎖及び環状異性体）の結合性について、0.001～1 µM の濃度範囲で平衡透析法を用いて検討した（2020N438179、4.2.2.3）。試験結果の概要を表 2.6.4.2 及び 2.6.5-Table 6.2 に示す。

検討したすべての動物種で血漿蛋白結合率は低く、0.001～1 µM の範囲で濃度依存性は認められなかった。

**表 2.6.4.2　Cys-mcMMAF の in vitro 血漿蛋白非結合型分率の平均値**

| Isomer | Mean unbound fraction | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Mouse | Rat | Monkey | Human |
| Linear (SGD-1362) | 0.68 | 0.33 | 0.88 | 0.86 |
| Cyclised (SGD-1462) | 0.65 | 0.36 | 0.89 | 0.84 |

別の試験において、ドナー3 例由来のヒト血漿を用いて、0.5、5 及び 50 ng/mL の濃度で平衡透析法により、cys-mcMMAF のヒト血漿蛋白結合率を測定した（2019N400355、4.2.2.3）。試験結果の概要を 2.6.5-Table 6.1 に示す。

本試験では、ヒト血漿蛋白結合率に濃度依存性がみられたが、検討したすべての濃度において結合率は低かった。ドナー3 例由来のヒト血漿中での非結合型分率は、0.5 ng/mL で 49.1～61.8%、5 ng/mL で 68.8～70.7%、50 ng/mL で 80.9～88.7%であった。

##### 2.6.4.4.1.2. ヒト細胞内への取り込み

Vivotag-680 標識ベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 の、ヒト角膜上皮細胞（HCEC）及び腎近位尿細管上皮細胞（RPTEC）への取り込みを検討するため、スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いた 2 つの試験を実施した（2019N409936、2020N451323、4.2.2.3）。更に、被験物質存在下で 12.5 µM の EIPA（一般的なマクロピノサイトーシス阻害剤）による前処理をしてマクロピノサイトーシスを遮断し、非特異的な取り込み機構について検討した。10 及び 100 µg/mL の濃度において、Vivotag-680 標識ベランタマブ　マホドチ

ン及び GSK2857914 の細胞内取り込みに、濃度及び時間依存性が認められた。概して、ベランタマブ　マホドチンの取り込みは、RPTEC に比べて HCEC で高く、被験物質の蛍光シグナルに大きな差がみられた。HCEC 及び RPTEC のリソソーム内での Vivotag-680 標識ベランタマブ　マホドチンの細胞内共局在については、リソソームマーカーとして lysotracker green を使用して確認した。これらの試験の概要を 2.6.5-Table 8.1 及び 2.6.5-Table 8.2 に示す。

ベランタマブ　マホドチンの HCEC への取り込みは、EIPA 処理後に 23～25.9%有意に減少した。EIPA は、ベランタマブ　マホドチンの RPTEC への取り込みに影響を及ぼさなかった。これらの知見は、ベランタマブ　マホドチンの HCEC への取り込みがマイクロピノサイトーシス経路を介していることを示唆している。しかし、EIPA はマクロピノサイトーシスの陽性対照である分子量 10000 の Alexa488 標識デキストランの、HCEC 及び RPTEC への取り込みを有意に阻害しなかったことから、使用した EIPA の濃度が低すぎた可能性が考えられたが、高濃度の EIPA は HCEC 及び RPTEC に対して細胞毒性を示すため、使用できなかった。

EIPA を 3 又は 47 時間処理後に検討した試験（2020N451323、4.2.2.3）において、EIPA はベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 の HCEC への取り込みを低下（最大 23%）させた。そこで、本結果に EIPA の安定性が関係している可能性について検討するため、追加試験（2021N462413、4.2.2.3）を実施した。本試験では、EIPA のインキュベート時間を 1.5 又は 4 時間（EIPA による 30 分又は 3 時間のプレインキュベート後、被験物質及び EIPA を添加して 1 時間インキュベート）に短縮した検討を行い、また、処理後 47 時間まで保存条件の異なる EIPA の新旧バッチを比較した検討を実施した。その結果、EIPA の安定性は、保存条件（凍結融解の有無）により影響を受けなかったため、EIPA を用いた以前の in vitro 試験の結果は妥当であると考えられた。本試験の概要を 2.6.5-Table 8.3 に示す。

そのほかのエンドサイトーシス経路の寄与も評価した。クラスリン介在性エンドサイトーシス（CME）の関与する可能性について、HCEC（4 ドナー）と RPTEC（1 ドナー）を用いて検討した（2.6.5-Table 8.4、2021N468100）。Rab5-RFP 発現 HCEC において Rab5-RFP とトランスフェリン-488（CME により取り込まれる）が共局在することから、HCEC では CME が機能していることが確認されており、また、以前に報告されたように、HCEC は RPTEC よりもベランタマブ　マホドチンを多く取り込んだ。しかし、同じ細胞集団でベランタマブ　マホドチンとトランスフェリンが共局在しなかったことから、ベランタマブ　マホドチンは異なるエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれたことが示唆された（2.6.5-Table 8.4、2021N468100）。

マクロピノサイトーシスを含むそれぞれ異なる取り込み経路を阻害することが報告されている 5 つの化合物［ワートマニン 400 nM、イミプラミン 10 μM、フェノキシベンザミン 10 μM、カベオリン（ナイスタチン）100 μM、及びクラスリン（クロルプロマジン）10 μM］[Lin, 2018]を HCEC 及び RPTEC にベランタマブ　マホドチンと共処理した。ナイスタチン又はクロルプロマジンとの共処理により、HCEC におけるベランタマブ　マホドチンの取り込みはそれぞれ 18.5%及び 20.4%減少した。RPTEC におけるベランタマブ　マホドチンの取り込みは、ワートマニンを除くほとんどの阻害剤によって減少した（2.6.5-Table 8.5、

2021N483916）。更に、クロルプロマジン（5 μM）、ナイスタチン（50 μM）、イミプラミン（5 μM）の 3 種類の化合物を併用処理した結果、ベランタマブ　マホドチンの取り込みが HCEC では約 31%、RPTEC では約 50%、有意に減少した（2.6.5-Table 8.6、2022N506651）。これらのことから、ベランタマブ　マホドチンの HCEC への取り込みには、複数のエンドサイトーシス経路が関与している可能性が示唆された。細胞毒性に関する更なる詳細は、2.6.6.8.4.1 で考察する。

エンドサイトーシス経路の阻害剤の対象経路に対する特異性は完全ではない。そこで、複数のエンドサイトーシス経路（カベオリン、クラスリン、マクロピノサイトーシス、Arf6、フロチリン、CLIC/GEEC）が GSK2857914 の取り込みに関与している可能性について、HCEC において siRNA を用いた蛋白質ノックダウン法により検討した（2023N539431、4.2.2.3）。その結果、検討したいずれのエンドサイトーシス関連蛋白質をノックダウンさせても、GSK2857914 の取り込みは減少しなかった。これらのことから、GSK2857914 の HCEC への取り込みには、複数のエンドサイトーシス経路が関与している可能性が示唆された。

いくつかの既知のヒスタミン H1 受容体拮抗薬について、ベランタマブ　マホドチンの HCEC 及び RPTEC への取り込みに対する作用を検討した。角膜細胞に発現しているヒスタミン H1 受容体は、刺激を受けると PKC を介してアップレギュレーションされることが報告されているが[Fukui, 2016]、PKC はマクロピノサイトーシスを誘導する。本検討で評価したヒスタミン H1 受容体拮抗薬は、ヒトへの点眼による局所投与が承認されているものである。そのうち、デスロラタジン、ケトチフェン及びフェキソフェナジンは、ベランタマブ　マホドチンの HCEC への取り込みをそれぞれ 34%、24.1%及び 26.6%減少させた。一方、レボカバスチンはベランタマブ　マホドチンの取り込みを 25.6%～27.8%増加させた。なお、取り込みを減少させたデスロラタジン、ケトチフェン及びフェキソフェナジンに細胞保護効果は認められなかった（2.6.6.8.4.1 で詳述）。一方、IVIG については、Vivotag-680 標識ベランタマブ　マホドチンと HCEC 及び RPTEC に共処理した結果、ベランタマブ　マホドチンの細胞内蛍光シグナルはそれぞれ 36%及び 31.4%減少し、IVIG には細胞保護効果が認められた（2.6.6.8.4.1 で詳述）（2023N528252、4.2.2.3）。これらのことから、ベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 の HCEC への取り込みには、複数のエンドサイトーシス経路が関与している可能性が示唆された。

#### 2.6.4.4.1.3. P-糖蛋白質輸送及び膜透過性

ヒト排出トランスポーターP-gp（別名 MDR1）を過剰発現する Madin-Darby イヌ腎臓由来タイプ II（MDCKII）細胞（MDCKII-MDR1）を用いて、P-gp を介した cys-mcMMAF の輸送を検討した（2013N177541、4.2.2.3）。試験条件の概要を表 2.6.4.3 に示す。100 nM の cys-mcMMAF を添加して 120 分までインキュベートしたときの頂端膜側から基底膜側（A→B）及び基底膜側から頂端膜側（B→A）への輸送速度を測定した。Cys-mcMMAF 濃度は LC/MS 法により測定した。Cys-mcMMAF の B→A：A→B の見かけの透過性の比として efflux ratio（ER；排出比）を算出した。試験の概要を 2.6.5-Table 8.9 に示す。

MDCKII-MDR1 細胞における cys-mcMMAF の透過性は低く（<10 nm/s）、ER は 34±1.4 であった。ベラパミル存在下では cys-mcMMAF の ER は 31 分の 1 に低下して 1.1±0.2 となった。このことから、本試験条件下では、cys-mcMMAF は P-gp の基質であることが示唆された。

**表 2.6.4.3　　単層膜アッセイにおける透過性及び排出比の試験条件**

| Compound | Test System | Concentration | Incubation Time (minutes) |
|---|---|---|---|
| Cys-mcMMAF | MDCKII-MDR1 cells | 100 nM | 15, 30, 60 and 120 |
| Digoxin (P-gp probe substrate) | MDCKII-MDR1 cells | 10 μM | 30 and 120 |
| Verapamil (P-gp inhibitor) | MDCKII-MDR1 cells | 60 μM | 30 and 120 |

**Key:** P-gp = P-glycoprotein.
Report 2013N177541, m4.2.2.3

2 つ目の試験では乳癌耐性蛋白質（BCRP）及び P-gp（報告書では MDR1 として詳述）を導入した MDCKII 細胞単層膜（MDCKII-BCRP 及び MDCKII-MDR1）を用いて、[3H] cys-mcMMAF の双方向輸送について検討した（2018N393080、4.2.2.3）。[3H] cys-mcMMAF を最大 14.4 nM の濃度で添加してインキュベートした。試験条件の概要を表 2.6.4.4 に示す。Cys-mcMMAF 濃度は液体シンチレーション計数（LSC）法により測定した。試験の概要を 2.6.5-Table8.10 に示す。

いずれの試験系においても、cys-mcMMAF が A→B 方向に比べて B→A 方向で高い透過性を示さなかったことから、本試験条件下では、cys-mcMMAF は P-gp 及び BCRP の基質ではないことが示唆された。

**表 2.6.4.4 単層膜アッセイにおける透過性及び排出比の試験条件**

| Compound | Test System[a] | Concentration | Incubation Time (minutes) |
|---|---|---|---|
| Cys-mcMMAF | MDCKII-MDR1 and MDCKII-BCRP cells | 0.72, 7.2 and 14.4 nM | 15, 30, 60 and 120 |
| Digoxin (P-gp probe substrate) | MDCKII-MDR1 cells | 5 μM | 120 |
| PSC833 (P-gp inhibitor) | MDCKII-MDR1 cells | 10 μM | 120 |
| Prazoin (BCRP probe substrate) | MDCKII-BCRP cells | 1 μM | 60 |
| Ko143 (BCRP inhibitor) | MDCKII-BCRP cells | 1 μM | 60 |
| Lucifer Yellow (low permeability control) | MDCKII-MDR1 and MDCKII-BCRP cells | 40 μg/mL | 120 |

**Key:**
a = Transfected MDCKII cell monolayers (MDCKII-BCRP and MDCKII-MDR1); BCRP = Breast cancer resistance protein; MDCKII = Madin-Darby canine kidney type II cells; P-gp = P-glycoprotein
Report 2018N393080, m4.2.2.3

3 つ目の試験では、MDCKII-MDR1 細胞に cys-mcMMAF を添加して 120 分間インキュベートした（2019N398699、4.2.2.3）。試験条件の概要を表 2.6.4.5 に示す。Cys-mcMMAF 濃度は LC/MS/MS 法により測定した。試験の概要を 2.6.5-Table 8.11 に示す。試料のほとんどが定量下限未満であったことから、結論を導き出すことはできなかった。

**表 2.6.4.5 単層膜アッセイにおける透過性及び排出比の試験条件**

| Compound | Test Systema | Concentration | Incubation Time (minutes) |
|---|---|---|---|
| Cys-mcMMAF | MDCKII-MDR1 cells | 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 and 10 μM | 120 |
| Digoxin (P-gp probe substrate) | MDCKII-MDR1 cells | 5 μM | 120 |
| Valspodar (P-gp inhibitor) | MDCKII-MDR1 cells | 10 μM | 120 |
| Lucifer Yellow (low permeability control) | MDCKII-MDR1 cells | 40 μg/mL | 120 |
| Antipyrine (high permeability control) | MDCKII-MDR1 cells | 50 μM | 30 |

**Key:**
MDCKII = Madin-Darby canine kidney type II cells.
P-gp = P-glycoprotein
a = Transfected MDCKII cell monolayers (MDCKII-MDR1).
Report 2019N398699, m4.2.2.3.

上記のとおり、cys-mcMMAF が P-gp の基質である可能性を検討した 3 試験において矛盾する結果が得られた。最初の試験では、cys-mcMMAF は P-gp の良好な基質との結果が得られたが、2 つ目の試験では P-gp の基質ではないとの結果が得られた。また、3 つ目の試験では結論を得ることができなかった。これらのことから、cys-mcMMAF は P-gp の基質と判断することとするが、薬物相互作用を引き起こすリスクは限定的であると考えられた。

#### 2.6.4.4.1.4. Cys-mcMMAF が排出トランスポーターの基質及び阻害剤となる可能性に関する検討

Cys-mcMMAF が P-gp、BCRP、BSEP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4 又は MRP5 の基質又は阻害剤である可能性について、各排出トランスポーターを発現させた膜小胞を用いて検討した（2018N393080、4.2.2.3）。本試験は、各ヒトトランスポーターを過剰発現する細胞から調製した反転膜小胞（inside-out membrane vesicle）を用いて実施した。各トランスポーターの過剰発現細胞として、MRP1 については組換えバキュロウイルスを感染させた Spodoptera frugiperda（Sf9）昆虫細胞を用いた。また、P-gp、BCRP、BSEP、MRP2、MRP3、MRP4 又は MRP5 については、HEK293 細胞への遺伝子導入により樹立した安定発現細胞を用いた。試験の概要を 2.6.5-Table 8.10 に示す。

**Cys-mcMMAF が BSEP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4 及び MRP5 の基質となる可能性**

Cys-mcMMAF が排出トランスポーターの基質である可能性について検討するため、各排出トランスポーター発現細胞及びコントロール細胞から調製した膜小胞内における cys-mcMMAF の蓄積量を測定した。単一濃度（14.4 nM）の[3H] cys-mcMMAF を ATP 及び AMP 存在下、既知のトランスポーター特異的阻害剤非存在下又は存在下でインキュベート後、小胞内に蓄積した[3H] cys-mcMMAF 量を LSC 法により測定した。試験条件の概要を表 2.6.4.6 に示す。

MRP4 及び MRP5 については、ATP 及び AMP 存在下で cys-mcMMAF の ATP 依存的蓄積が同程度であり、これらのトランスポーターを介した能動的な蓄積は認められなかった。更に、各トランスポーター特異的阻害剤は、AMP 又は ATP 存在下での蓄積に影響しなかった。MRP1、MRP2、MRP3 及び BSEP については、cys-mcMMAF のトランスポーター発現小胞への ATP 依存的な蓄積が認められた（蓄積倍数はそれぞれ、11.17、13.5、4.21 及び 1.89 倍）。特異的阻害剤存在下では、蓄積倍数がそれぞれ、0.82、0.9、1.18 及び 0.95 倍に低下した。

以上より、in vitro において、cys-mcMMAF は MRP4 及び MRP5 の基質ではないが、MRP1、MRP2 及び MRP3 の基質であり、BSEP の候補基質と考えられた。

**表 2.6.4.6　排出トランスポーター小胞輸送アッセイの試験条件**

| Transporter | Incubation Time (minutes) | Probe Substrate (concentration) | Reference Inhibitor (concentration) |
|---|---|---|---|
| P-gp [a] | 1 | N-methyl quinidine (1 μM) | PSC833 (1 μM) |
| BCRP [a] | 1 | Estrone-3-sulfate (1 μM) | Ko134 (1 μM) |
| BSEP | 5 | Taurocholate (0.2 μM) | Cyclosporin A (10 μM) |
| MRP1 | 1 | Leukotriene $C_4$ (50 nM) | MK571 (150 μM) |
| MRP2 | 5 | $E_2$17βG (100 μM) | Benzbromarone (200 μM) |
| MRP3 | 10 | $E_2$17βG (10 μM) | Sulfasalazine (1000 μM) |
| MRP4 | 4 | DHEAS (0.5 μM) | MK571 (150 μM) |
| MRP5 | 20 | CDCF (5 μM) | Benzbromarone (150 μM) |

**Key:**
DHEAS = Dehydroepiandrosterone sulfate, $E_2$17βG = Estradiol 17β-D-glucuronide.; BCRP = Breast cancer resistance protein; BSEP = Bile salt export pump; MRP = Multidrug resistance associated protein
P-gp = P-glycoprotein.
a = Inhibition assays only, CDCF = 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein
Report 2018N393080, m4.2.2.3

**Cys-mcMMAF が P-gp、BCRP、BSEP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4 及び MRP5 の阻害剤となる可能性**

Cys-mcMMAF が各排出トランスポーターの阻害剤である可能性を検討するため、プローブ基質（表 2.6.4.6）取り込みに対する cys-mcMMAF の阻害能を測定した。各トランスポーター特異的プローブ基質存在下、各トランスポーターを発現する細胞から調製した膜小胞に cys-mcMMAF（濃度 20 又は 200 nM）を添加してインキュベートした。トランスポーターを介する取り込みと受動拡散を識別するため、ATP 又は AMP 存在下でインキュベートした。インキュベート後、小胞内のプローブ基質量を LSC 法により測定した。ただし、MRP5 のプローブ基質量の測定には蛍光法を使用した。

Cys-mcMMAF は P-gp、BCRP、BSEP、MRP1、MRP3、MRP4 及び MRP5 を介するプローブ基質の取り込みに影響しなかった。MRP2 については、プローブ基質の取り込みが 54%増加した。

以上より、in vitro において cys-mcMMAF は P-gp、BCRP、BSEP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4 及び MRP5 の阻害剤ではないと考えられた。

#### 2.6.4.4.1.5. Cys-mcMMAF が取り込みトランスポーターの基質及び阻害剤となる可能性に関する検討

Cys-mcMMAF が OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 又は MATE2-K の基質又は阻害剤である可能性を検討した（2018N393080、4.2.2.3）。本試験は、各取り込みトランスポーターを安定的に発現する MDCKII（MATE1/2-K）細胞又は HEK293（OAT/OCT）細胞を用いて実施した。試験の概要を 2.6.5-Table 8.10 に示す。

**OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の基質となる可能性**

Cys-mcMMAF が取り込みトランスポーターの基質である可能性を検討するため、各取り込みトランスポーター発現細胞及びコントロール細胞における cys-mcMMAF の細胞内蓄積量を測定した。単一濃度（14.4 nM）の[3H] cys-mcMMAF を既知のトランスポーター特異的阻害剤存在下又は非存在下で 10 分間インキュベート後、細胞内の cys-mcMMAF 量を LSC 法により測定した。試験条件の概要を表 2.6.4.7 に示す。

OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K 発現細胞では、コントロール細胞と比べて cys-mcMMAF の蓄積が同程度（対コントロール：2 倍未満）であり、いずれのトランスポーターを介した cys-mcMMAF の能動的な蓄積は認められなかった。更に、各トランスポーター特異的阻害剤は、これらのトランスポーター発現細胞及びコントロール細胞内における cys-mcMMAF の蓄積に影響を及ぼさなかった。一方、OATP1B1/OATP1B3 発現細胞ではトランスポーター依存的な蓄積が認められた。蓄積量は、コントロール細胞のそれぞれ 13.28 及び 4.94 倍であり、既知のトランスポーター特異的阻害剤（リファンピシン）存在下では、コントロール細胞の 0.93 及び 0.82 倍に低下した。

以上より、in vitro において、cys-mcMMAF は OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の基質ではないが、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質と考えられた。

**表 2.6.4.7　取り込みトランスポーター基質である可能性を検討する試験の条件**

| Transporter | Incubation Time (minutes) | Probe Substrate (concentration) | Reference inhibitor (concentration) |
|---|---|---|---|
| MATE1 | 15 | Metformin (10 μM) | Pyrimethamine (1 μM) |
| MATE2-K | 15 | Metformin (10 μM) | Pyrimethamine (10 μM) |
| OATP1B1 | 3 | $E_2$17βG (1 μM) | Rifampicin (50 μM) |
| OATP1B3 | 2 | Cholecystokinine-8 (0.1 μM) | Rifampicin (50 μM) |
| OAT1 | 2 | p-Aminohippuric acid (5 μM) | Benzbromarone (300 μM) |
| OAT3 | 1 | Estrone-3-sulfate (1 μM) | Probenecid (500 μM) |
| OCT1 | 5 | Metformin (10 μM) | Verapamil (300 μM) |
| OCT2 | 1 | Metformin (10 μM) | Verapamil (300 μM) |

**Key:**
$E_2$17βG = Estradiol 17β-D-glucuronide.
MATE = Multidrug and toxin extrusion protein.
OAT = Organic anion transporter.
OATP = Organic anion transporting polypeptide.
OCT = Organic cation transporter.
Report 2018N393080, m4.2.2.3

2 つ目の試験では、OAT1、OAT3 もしくは OCT2 発現 HEK293 細胞又はコントロール細胞に cys-mcMMAF（濃度 0.01、0.1、1 又は 3 μM）を添加して 10 分間インキュベートした（2019N398699、4.2.2.3）。試験条件の概要を表 2.6.4.8 に示すとともに、試験結果の概要を 2.6.5-Table 8.11 に示す。

Cys-mcMMAF の蓄積がトランスポーター発現細胞とコントロール細胞で同程度（2 倍未満）であり、トランスポーター特異的阻害剤は蓄積に影響せず、これらのいずれのトランスポーターを介した cys-mcMMAF の能動的な蓄積は認められなかった。

以上より、cys-mcMMAF はヒト OAT1、OAT3 及び OCT2 の基質ではないと考えられた。

**表 2.6.4.8 取り込みトランスポーターの基質である可能性を検討する試験の条件**

| Transporter | Incubation Time (minutes) | Probe Substrate (concentration) | Reference inhibitor (concentration) |
|---|---|---|---|
| OAT1 | 10 | Tenofovir (5 μM) | Probenecid (300 μM) |
| OAT3 | 10 | Estrone-3-sulfate (1 μM) | Probenecid (500 μM) |
| OCT2 | 10 | Metformin (10 μM) | Verapamil (300 μM) |

**Key:**
OAT = Organic anion transporter.
OCT = Organic cation transporter.
Report 2019N398699, m4.2.2.3

**OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K に対する阻害能の検討**

Cys-mcMMAF が取り込みトランスポーターの阻害剤である可能性を検討するため、プローブ基質（表 2.6.4.7）取り込みに対する cys-mcMMAF の阻害能を測定した。20 又は 200 nM cys-mcMMAF の非存在下又は存在下、各取り込みトランスポーターを過剰発現する細胞又はコントロール細胞に各トランスポーターに特異的なプローブ基質を添加してインキュベート後、細胞内の基質量を LSC 法により測定した（2018N393080、4.2.2.3）。この試験の概要を 2.6.5-Table 8.10 に示す。

Cys-mcMMAF は検討した濃度において、いずれのトランスポーターにも影響を及ぼさなかった。

以上より、in vitro において cys-mcMMAF は OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の阻害剤ではないと考えられた。

### 2.6.4.4.2. In vivo 分布試験

#### 2.6.4.4.2.1. ラット

ラットに蛍光標識ベランタマブ　マホドチン、GSK2857914 又は IgG コントロール抗体を投与したときの組織分布を蛍光イメージング法により検討する試験を 2 試験実施した。なお、蛍光標識は抗体のバックボーンに行った。

1 つ目の試験では、雌 Wistar Han ラット 3 例に蛍光標識ベランタマブ　マホドチン又は IgG コントロール抗体（30 mg/kg）を単回静脈内投与（緩やかなボーラス投与）し、投与後 35 日まで蛍光イメージング法により評価した。なお、すべての動物について、投与前にベースラインの蛍光イメージング画像を撮影した（2018N358667、4.2.2.3）。更に、免疫測定法を用いて（2.6.4.2.1）、投与後 35 日の剖検時に採取した血清、眼球、腎臓及び肝臓中のベランタマブ　マホドチン（ADC）濃度を測定した。試験の概要を 2.6.5-Table 8.12 に示す。

いずれの組織においても蛍光標識ベランタマブ　マホドチンと IgG コントロール抗体の蛍光強度に差がなかったことから、両化合物の体内分布は同様であることが示唆された。また、ベランタマブ　マホドチンの 30 mg/kg を単回投与しても眼球で濃縮されることはなく、投与 14 日までに消失することが示唆された。免疫測定法により測定したベランタマブ　マホドチン（ADC）の平均濃度は、血清中では 70 µg/mL であるのに対し、眼球及び肝臓ではそれぞれ 749 ng/g 及び 462 ng/g であった。腎臓については、再現性が低く分析法を確立することができなかったため、報告可能なデータを得ることができなかった。なお、3 例目から採取したすべての組織及び血清中濃度は定量下限未満であったため、平均値算出には含めなかった。

2 つ目の試験では、蛍光イメージング法により蛍光標識ベランタマブ　マホドチン投与後 48 時間の組織分布について更に評価し、また、眼球及びその他の組織（眼瞼、涙腺、ハーダー腺、眼窩外涙腺、骨髄、肝臓及び腎臓）への cys-mcMMAF の分布を評価した。雌 Wistar Han ラット 9 匹に蛍光標識ベランタマブ　マホドチン又はコントロールとして蛍光標識 GSK2857914 を 30 mg/kg で単回静脈内投与（緩やかなボーラス投与）した（2018N394006、4.2.2.3）。投与後の in vivo 画像及び試験終了時に採取した組織の ex vivo 画像より蛍光強度（total fluorescence radiant efficiency）解析を実施した。更に、MALDI-MSI 法、LC/MS 法、SIMS 法及び蛍光顕微鏡を用いた観察等の分析法及びバイオイメージング法による評価も実施した。試験の概要を 2.6.5-Table 5.1 に示す。

ベランタマブ　マホドチンの in vivo 蛍光シグナルは投与後 24 及び 48 時間に両眼で認められ、左眼と右眼の間で蛍光強度に差はなかった。ベランタマブ　マホドチンの蛍光イメージ画像データは GSK2857914 と類似していた。いずれの組織においても、投与 24 時間と 48 時間の蛍光強度に差は認められなかった。

ベランタマブ　マホドチンの ex vivo 蛍光シグナルは、肝臓及び腎臓で高かった。これらの組織の蛍光強度は、眼球と比較して、それぞれ 3 倍以上及び 2 倍高かった。このシグナルと in vivo 蛍光データの間に相関性が認められた。いずれの組織についても、ベランタマブ　マホドチン（24 及び 48 時間）と GSK2857914（48 時間）の間で蛍光強度に差は認められなかった。

蛍光顕微鏡での観察の結果、ベランタマブ　マホドチン及び GSK2857914 は眼球、眼瞼、眼窩外涙腺及びハーダー腺の結合組織、肝臓並びに眼瞼の筋肉に分布することが示された。角膜及び眼瞼腺には蛍光シグナルは認められなかった。

Cys-mcMMAF については、MALDI-MSI 法を用いた検討において、眼球、眼瞼、眼窩外涙腺及び肝臓に検出されなかった。SIMS 法を用いた検討では、眼球及び眼瞼に検出されなかった。ナノ液体クロマトグラフィー／質量分析（nano-LC/MS）法を用いた検討では、角膜、眼球全体及び眼瞼に検出されなかったが、骨髄試料中には投与後 24 及び 48 時間にそれぞれ 154 及び 137 ng/g の濃度で検出された。そのほかの組織について、時点ごとにプールして測定した結果、ハーダー腺では 15 ng/g（24 及び 48 時間）、肝臓では 968 ng/g（24 時間）及び 196 ng/g（48 時間）、眼窩外涙腺では 5 ng/g（24 時間）及び 4 ng/g（48 時間）、腎臓では 40 ng/g（24 時間）及び 30 ng/g（48 時間）の濃度で検出された。なお、本測定は対応する

各組織ではなく水を用いて作成した検量線で実施したことから、測定値は過小評価されている可能性が考えられる。

#### 2.6.4.4.2.2. ウサギ

NZW ウサギを用いたベランタマブ　マホドチンの忍容性及び眼毒性試験において涙液を採取し、涙液中のベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の濃度を定性的に評価した（2018N385412、4.2.3.7.3）。雌 NZW ウサギ（n=3/群）に 0（媒体）、15 又は 30 mg/kg/週のベランタマブ　マホドチンを 2 週間［0（媒体）及び 30 mg/kg/週；第 1 相］又は 4 週間［0（媒体）、15 及び 30 mg/kg/週；第 2 相］、静脈内投与した。シルマー涙液検査試験において涙液を採取したシルマー試験紙の一部を用いて、ベランタマブ　マホドチン及び cys-mcMMAF を測定した。本試験で得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 17.12 に、毒性試験成績の概要を 2.6.6.8.4.2 に示す。

投薬群の涙液 126 検体中 91 検体及び 64 検体でそれぞれ ADC 及び総 mAb が検出された。媒体対照群の涙液では、ADC は検出されなかったが、60 検体中 4 検体で総 mAb が検出された。媒体対照群では当初、合計 75 検体の涙液で ADC 及び総 mAb を測定する予定であったが、15 検体では測定不可能であった。Cys-mcMMAF は、投薬群の涙液 81 検体中 76 検体で検出され、媒体対照群の涙液では 45 検体中 1 検体で検出された。正確な涙液採取量が不明であったため、涙液中の分析対象物質の定量的評価は不可能であった。投薬群で涙液産生（シルマー涙液試験紙を用いて測定）に対する影響は認められなかった。

DB ウサギに最高 30 mg/kg/週のベランタマブ　マホドチンを 7 週間反復静脈内投与した後、シルマー涙液試験紙に採取した涙液から ADC、総 mAb 及び cys-mcMMAF を検出した（2021N465838、4.2.3.7.3）。雌 DB ウサギ（n=6/群）にベランタマブ　マホドチン 0（媒体）及び 30 mg/kg/週（試験 1～4 週）、続いて 15 mg/kg/週（試験 5～7 週）を静脈内ボーラス投与した。本試験から得られたベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-table 17.13 に、毒性データの概要を 2.6.6.8.4.2 に示す。

涙液中のベランタマブ　マホドチン及び cys-mcMMAF の濃度には、ばらつきがみられた。ベランタマブ　マホドチンはすべての涙液でおおむね定量可能であったが、cys-mcMMAF は涙液の約 45%でのみ定量可能であった。血漿中のベランタマブ　マホドチン濃度は、投与後同時間に採取した涙液中濃度と比べて高い値を示した。更に、血漿及び涙液におけるベランタマブ　マホドチンと cys-mcMMAF のモル比から、ベランタマブ　マホドチンの割合が cys-mcMMAF と比べて一貫して高いことが示された。Cys-mcMMAF の相対モル比（ベランタマブ　マホドチンと比較した場合）は血漿中よりも涙液中の方が高かった。

**表 2.6.4.9　ベランタマブ　マホドチンを用いた分布試験一覧**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/ Group | Method of Administration | Test Article | Dose (mg/kg) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Protein binding | Human plasma | NA | In vitro | cys-mcMMAF | Up to 50 ng/mL | NA | No | [redacted] | 2019N400355 (8392093) | m4.2.2.3 |
| Protein binding | Mouse, rat, monkey and human plasma | NA | In vitro | cys-mcMMAF | 0.001 to 1 μM | NA | No | NA[f] | 2020N438179 | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | NA | In vitro | ADC, MAB[c] | 10 and 100 μg/mL | NA | No | GSK | 2019N409936 (N71801-15) | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | Up to 5 donors[h] | In vitro | ADC, MAB[c] | 10 and 100 μg/mL | NA | No | GSK | 2020N451323 (N70440-40) | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | Up to 4 donors[h] | In vitro | ADC, MAB[c] | 10 and 100 μg/mL | NA | No | GSK | 2021N462413 | m4.2.2.3 |
| Clathrin-mediated endocytosis | Human HCEC and RPTEC | Up to 4 donors[h] | In vitro | ADC | Up to 1000 μg/mL | NA | No | GSK | 2021N468100 | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | Up to 4 donors[h] | In vitro | ADC, MAB | Up to 100 μg/mL | NA | No | GSK | 2021N483916 | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | Up to 6 donors[h] | In vitro | ADC, MAB | Up to 100 μg/mL | NA | No | GSK | 2022N506651 | m4.2.2.3 |
| Endocytic pathway SiRNA assessment | HCEC | Up to 3 donors | In vitro | ADC, MAB | Up to 100 μg/mL | NA | No | [redacted] | 2023N539431 | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | Up to 5 donors | In vitro | ADC, MAB | Up to 100 μg/mL | NA | No | GSK | 2023N528252 | m4.2.2.3 |

**表 2.6.4.9 ベランタマブ マホドチンを用いた分布試験一覧（続き）**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/ Group | Method of Administration | Test Article | Dose (mg/kg) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Interaction with P-glycoprotein (MDR1) | In vitro MDCKII cells transfected with P-gp | NA | In vitro | cys-mcMMAF | 100 nM | NA | No | [redacted] | 2013N177541 (PDM-001) | m4.2.2.3 |
| Transporter-mediated uptake and inhibition[a] | MDCKII, Sf9 or HEK293 cells | NA | In vitro | $^{3}$H-cys-mcMMAF | Up to 200 nM | NA | No | [redacted] | 2018N393080 (SeaGen-13-06Dec2016) | m4.2.2.3 |
| Transporter-mediated uptake[a] | MDCKII or HEK293 cells | NA | In vitro | cys-mcMMAF | Up to 10 µM | NA | No | [redacted] | 2019N398699 (GSK-32-25May2018) | m4.2.2.3 |
| Biodistribution | Rat (Wistar Han) | 3F | IV (slow bolus) | ADC, MAB[b] | 30 | Single | No | GSK | 2018N358667 (N6469-10) | m4.2.2.3 |
| Biodistribution | Rat (Wistar Han) | 9F | IV (slow bolus) | ADC, MAB[c] | 30 | Single | No | GSK | 2018N394006 (N41556-21) | m4.2.2.3 |
| Distribution into tears | Rabbit (NZW) | 3F | IV (bolus) | ADC | 15, 30 mg/kg/week | Up to 4 weeks[d] | No | GSK | 2018N385412 (L32295N) | m4.2.3.2[e] |

**表 2.6.4.9 ベランタマブ マホドチンを用いた分布試験一覧（続き）**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/ Group | Method of Administration | Test Article | Dose (mg/kg) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Distribution into tears | Rabbit (DB) | 6F | IV (bolus) | ADC | 15, 30 mg/kg/week | Up to 7 weeks[g] | No | GSK | 2021N465838 (L71822N) | m4.2.3.2[e] |

**Key:**
a = Transporters investigated included some or all of the following:
Breast cancer resistance protein (BCRP); Bile salt export pump (BSEP);
Multidrug resistance protein 1 (MDR1), also known as P-glycoprotein (P-gp).
Multidrug resistance associated protein (MRP)1, MRP2, MRP3, MRP4 and MRP5.
Organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3 (OATP1B1 and OATP1B3).
Organic anion transporter (OAT) OAT1 and OAT3.
Organic cation transporter (OCT) OCT1 and OCT2.
Multidrug and toxin extrusion proteins 1 and 2-K (MATE1 and MATE2-K).
b = Belantamab mafodotin and GSK2857914 were conjugated to a fluorescent probe (VivoTag 750).
c = Belantamab mafodotin and GSK2857914 were conjugated to a fluorescent probe (Vivotag 680).
d = Assessed as part of a non-GLP tolerability and ocular toxicity study in rabbits. Animals were dosed once weekly for 2 (0 or 30 mg/kg/week) or 4 weeks (0, 15 or 30 mg/kg/week).
e = The report for this study has been placed in m4.2.3.2 rather than m4.2.3.7.3 for administrative purposes only.
f = Study conducted by a partner company and a redacted report is available; test facility information has been redacted.
g = Assessed as part of a non-GLP ocular toxicity study in DB rabbits. Animals received a dose of 30 mg/kg once weekly for the first four doses and 15 mg/kg once weekly thereafter (total 7 doses).
h = Variable number of donors used in experiments.
DB = Dutch Belted. HCEC = human corneal epithelial cells.
HEK293 = Human embryonic kidney cells stably transfected with BCRP, BSEP, MDR1, MRP2/3/4/5, OATP1B1/1B3, OAT1/3 or OCT1/2. IV = Intravenous. MDCKII = Madin Darby Canine Kidney II cells transfected with MATE1 or MATE2-K. NZW = New Zealand White. RPTEC = renal proximal tubule epithelial cells.
Sf9 = Spodoptera frugiperda transfected with MRP1.

**Test Article:**
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].
$^{3}$H-cys-mcMMAF = Radiolabelled cys-mcMMAF.
MAB = GSK2857914, unconjugated afucosylated mAb (parent anti-BCMA antibody).

**Testing Facility:**
[redacted]

### 2.6.4.5. 代謝

ベランタマブ　マホドチンは高分子であり（約 150 kDa）、天然アミノ酸で構成されることから、非臨床試験動物種を用いた標準的な代謝試験を実施する必要はないと考える[ICH S6(R1)]。しかし、ベランタマブ　マホドチン及び細胞毒性作用を有する活性部分である cys-mcMMAF の異化作用及び代謝を評価するため、in vitro 及び in vivo 試験を実施した。これらの試験を表 2.6.4.12 に示す。

#### 2.6.4.5.1. In vitro 代謝試験

##### 2.6.4.5.1.1. 動物及びヒト由来の血漿及び血清中での安定性

ラット、サル及びヒト血漿中でのベランタマブ　マホドチンのリンカーの安定性について、各動物種の血漿にベランタマブ　マホドチン（濃度 100 µg/mL）を添加し、最大 96 時間インキュベート後、血漿中遊離型 cys-mcMMAF（ADC 抱合型ではない）の量を測定することにより評価した。遊離型 cys-mcMMAF の分析は、各動物種について適切にバリデートされた UHPLC/MS/MS 法を用いて実施した（2014N206529、4.2.2.4）。試験の概要を 2.6.5-Table 10.1 に示す。

抗体結合型総 MMAF に対する遊離型 cys-mcMMAF の割合は、いずれの動物種の血漿を添加した場合でも 96 時間インキュベート後に最大値を示し、ラット血漿で 0.24%、サル血漿で 1.48%、ヒト血漿で 3.08%であった。総じて、遊離型 cys-mcMMAF の抗体結合型総 MMAF に占める割合は少なく（3.08%以下）、これら動物種の血漿においてベランタマブ　マホドチンはおおむね安定であった。

In vitro でベランタマブ　マホドチンから cys-mcMMAF が消失する可能性について検討した。ヒト血清に単一濃度（100 µg/mL）のベランタマブ　マホドチンを添加し、最大 96 時間インキュベート後、抗リンカーペイロード抗体により捕捉し、ヒト血清アルブミン（HSA）-mcMMAF のインタクト質量分析を行った。HSA-mcMMAF 標準物質は、PBS 中で HSA（1 mg/mL）をモル換算で 15 倍過剰量の mcMMAF とともに 1 時間インキュベートすることにより作製した。HSA-mcMMAF の測定には、インタクト蛋白質の LC/MS 法を使用した（2018N388212、4.2.2.4）。試験の概要を 2.6.5-Table 10.2 に示す。

96 時間インキュベート後の試料中に HSA-mcMMAF が検出されたが、0 時間試料中には検出されなかった。このことは、マレイミド交換（ベランタマブ　マホドチンから HSA への mcMMAF 移行により HSA-mcMMAF が生成すること）が生じたことを示している。なお、これまでにマレイミド交換は mcMMAF 含有 ADC で生じることが報告されている[Alley, 2008; Shen, 2012; Tumey, 2014]。

##### 2.6.4.5.1.2. ベランタマブ　マホドチンの細胞内異化

HCEC 及び RPTEC を用いた in vitro 試験で、ベランタマブ　マホドチンが異化されて cys-mcMMAF が遊離することが LC/MS/MS 法を用いた分析により確認された（2019N409936、4.2.2.3）。HCEC 及び RPTEC に 100 µg/mL のベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 を添加し、48 時間インキュベートした。超音波処理により細胞から氷冷緩衝液に cys-

mcMMAF を抽出後、遠心分離により得られた上清中の cys-mcMMAF 濃度を LC/MS/MS 法により測定した。試験の概要を 2.6.5-Table 8.1 に示す。

未処理の対照細胞及び GSK2857914 処理細胞では cys-mcMMAF は検出されなかったが、ベランタマブ　マホドチン処理細胞では、RPTEC 及び HCEC のすべての測定試料中に cys-mcMMAF が検出された。

このことから、細胞にはベランタマブ　マホドチンを異化して cys-mcMMAF を遊離させる作用があることが示された。

#### 2.6.4.5.1.3. 動物及びヒト由来肝 S9 画分を用いた代謝試験

[3H] cys-mcMMAF の代謝プロファイルを評価し、in vitro での代謝物を同定し特徴づけるため、ラット、サル及びヒトの肝 S9 画分を用いて、単一濃度（10 μM）で試験を実施した。異化補因子である NADPH 及び UDPGA の存在下又は非存在下、試料を 120 分間インキュベート後、放射能検出による正確な質量分析を行う LC/MS 法による分析を行った（2018N393077、4.2.2.4）。試験の概要を 2.6.5-Table 10.3 に示す。

Cys-mcMMAF は 2 種類の異性体、すなわち、直鎖異性体（SGD-1362）及び環状異性体（SGD-1462）として存在しうる。[3H] cys-mcMMAF（直鎖異性体、SGD-1362）をラット、サル及びヒトの肝 S9 画分とともにインキュベートしたとき、cys-mcMMAF は主に非酵素的反応により代謝され、酸化的代謝及び抱合反応による代謝もわずかに認められた。SGD-1362 は主に飽和マレイミド環部分で加水分解され、その後、脱水反応を経て 3-オキソチオモルホリン体（SGD-1462）が生成した。この加水分解過程では、様々な立体異性体が生成した。また、グリシン抱合、N-脱メチル化及び酸化等複数の副次的代謝経路が特定されたが、これらの代謝物の総量は総放射能の 5%未満であった。

#### 2.6.4.5.1.4. 動物及びヒト肝細胞並びに組換えヒト酵素を用いた代謝試験

[3H] cys-mcMMAF の代謝プロファイルを評価するため、マウス、ラット、サル及びヒトの肝細胞、並びに遺伝子組換えヒト CYP（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4）及びフラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO3）を用いた in vitro 試験を実施した。[3H] cys-mcMMAF の処理濃度は 10 μM（肝細胞での試験）又は 1 μM（組換え酵素での試験）とした。肝細胞の場合は 4 時間、組換え酵素の場合は 1 時間、試料をインキュベート後、放射能検出を伴う LC/MS 法により測定した（2020N438184、4.2.2.4）。試験の概要を 2.6.5-Table 10.4 に示す。

酸化代謝物及び抱合代謝物は認められなかった。マウス肝細胞のみでアセチル化体が認められ、総放射能の 3.7%を占めていた。コントロールを含むすべてのインキュベート混合液中に、未変化 cys-mcMMAF（SGD-1362）に加えて環状異性体（SGD-1462）、並びに 2 種類の加水分解生成物が検出されたことから、これらは非酵素的過程による生成物であることが示唆された。

#### 2.6.4.5.1.5. ヒト肝ミクロソーム中での cys-mcMMAF による CYP 阻害

ヒト CYP 分子種（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5）に対する、cys-mcMMAF の直接的、時間依存的及び代謝依存的阻害作用を評価した（2013N177537、4.2.2.4）。試験の概要を 2.6.5-Table 12.1 に示す。CYP 活性に対する直接的阻害作用を評価するため、0.001～1 μM の cys-mcMMAF 存在下又は非存在下、16 人分のヒト肝ミクロソームをプールした試料に適切なプローブ基質を添加してインキュベートした。また、時間依存的及び代謝依存的阻害作用を評価するため、NADPH 生成系非存在下又は存在下、cys-mcMMAF をヒト肝ミクロソームとともに 30 分間プレインキュベートした後、適切なプローブ基質を添加してインキュベートした。陽性対照として、各 CYP 分子種の既知の直接的阻害剤及び代謝依存的阻害剤を使用した。試験条件の概要を 表 2.6.4.10 に示す。すべての分析は、適切な HPLC/MS/MS 法を用いて実施した。

Cys-mcMMAF は 1 μM までの処理において、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 に対して直接的、時間依存的及び代謝依存的阻害作用を示さなかった。

**表 2.6.4.10 ミクロソーム CYP 活性の測定条件 - 直接的、時間依存的及び代謝依存的阻害**

| CYP isoform [a] | Probe Substrate (concentration) | Reaction | Reference DI inhibitor (concentration) | Reference MDI inhibitor (concentration) |
|---|---|---|---|---|
| 1A2 | Phenacetin (40 μM) | Phenacetin O-dealkylation | α-Naphthoflavone (0.5 μM) | Furafylline (1 μM) |
| 2B6 | Efavirenz (3 μM) | Efavirenz 8-hydroxylation | Orphenadrine (750 μM) | Phencyclidine (30 μM) |
| 2C8 | Amodiaquine (1.5 μM) | Amodiaquine N-dealkylation | Montelukast (0.05 μM) | Gemfibrozil glucuronide (5 μM) |
| 2C9 | Diclofenac (6 μM) | Diclofenac 4'-hydroxylation | Sulfaphenazole (2 μM) | Tienilic acid (0.25 μM) |
| 2C19 | S-Mephenytoin (40 μM) | S-Mephenytoin 4'-hydroxylation | Modafinil (250 μM) | S-Fluoxetine (20 μM) |
| 2D6 | Dextromethorphan (7.5 μM) | Dextromethorphan O-demethylation | Quinidine (0.5 μM) | Paroxetine (0.3 μM) |
| 3A4/5 | Testosterone (70 μM) | Testosterone 6β-hydroxylation | Ketoconazole (0.15 μM) | Troleandomycin (25 μM) |
| 3A4/5 | Midazolam (4 μM) | Midazolam 1'-hydroxylation | Ketoconazole (0.075 μM) | Troleandomycin (7.5 μM) |

**Key:**
CYP = Cytochrome P450. DI = Direct inhibition. MDI = Metabolism-dependent inhibition.
a = The human liver microsomal sample used was a pool of sixteen individuals,
Report 2013N177537, m4.2.2.4

#### 2.6.4.5.1.6. 凍結ヒト肝細胞中での cys-mcMMAF による CYP 誘導

Cys-mcMMAF の CYP 誘導作用について、凍結ヒト肝細胞を用いて CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4/5 の in situ 酵素活性及び mRNA 発現量を測定することにより評価した（2013N177532、4.2.2.4）。試験の概要を 2.6.5-Table 12.2 に示す。

凍結ヒト肝細胞（ドナー3 例）に 10、100 又は 1000 nM の cys-mcMMAF を添加し、72 時間インキュベート後、肝細胞を洗浄し、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4/5 特異的プローブ基質、並びに CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4/5 の陽性対照誘導剤存在下、更に 30 分間インキュベートした。酵素活性は、LC/MS/MS 法を用いて各基質代謝物の生成量を測定することにより評価した。Cys-mcMMAF 処理肝細胞中での代謝物生成量を媒体対照（0.1%ジメチルスルホキシド）と比較して、酵素活性の変化倍率を求めた。72 時間インキュベート後の肝細胞中での mRNA 発現量の測定には、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用した。試験条件の概要を表 2.6.4.11 に示す。

**表 2.6.4.11 ミクロソーム CYP 誘導の試験条件概要**

| CYP isoform | Probe Substrate (concentration) | Reaction | Reference Inducer (concentration) |
|---|---|---|---|
| 1A2 | Phenacetin (100 μM) | Phenacetin O-dealkylation | Omeprazole (50 μM) |
| 2B6 | Bupropion (500 μM) | Bupropion hydroxylation | Phenobarbital (1000 μM) |
| 3A4 | Midazolam (25 μM) | Midazolam 1-hydroxylation | Rifampicin (10 μM) |

**Key:**
CYP = Cytochrome P450.
Report 2013N177532, m4.2.2.4

Cys-mcMMAF を処理したときの酵素活性の変化倍率は 1.3 未満であった。Cys-mcMMAF 濃度が 10 nM から 1000 nM に増加すると、酵素活性の変化倍率は低下した。mRNA 発現量の変化倍率は 1.8 未満であった。Cys-mcMMAF 処理肝細胞中での酵素活性の変化倍率は、陽性対照処理肝細胞での変化倍率の 40%未満であった。

以上より、cys-mcMMAF は凍結ヒト肝細胞において CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4/5 に対する誘導作用を示さなかった。

### 2.6.4.5.2. In vivo 代謝試験

#### 2.6.4.5.2.1. ラット

#### 2.6.4.5.2.1.1. 静脈内投与後の代謝プロファイル

ラットに 10 mg/kg の[3H] cys-mcMMAF（媒体：PBS）を単回静脈内投与したときの尿及び糞中の代謝物プロファイルを評価した（2018N393078、4.2.2.5）。尿及び糞中の cys-mcMMAF 及び代謝物の分析を行った。試験の概要を 2.6.5-Table 13.1 に示す。

投与後 0～8 時間及び 8～24 時間のプール尿の放射能プロファイルから、未変化体（SGD-1362）が尿中の主要薬物関連物質であり、投与した放射能の 9.3%を占めていた（合計では、投与した放射能の 12.1%がプール尿中に回収され、11.6%を定量することが可能であった）。未変化 SGD-1362 の他に特定された代謝物が、投与した放射能に占める割合はそれぞれ 1%未満であった。

投与後 0～24 時間及び 24～48 時間のプール糞試料の放射能プロファイルから、未変化体（SGD-1362）は糞中では微量にしか存在せず、投与した放射能に占める割合は 1%未満であった。投与後 0～48 時間の糞中の主要薬物関連物質は cys-mcMMAF の環状異性体である SGD-1462 であり、投与した放射能の 13.8%を占めた（合計では、投与した放射能の 81.4%がプール糞中に回収され、定量可能な放射能は、抽出率が低かったため 40.1%であった）。その他に特定された糞中代謝物については、いずれも投与した放射能に占める割合はそれぞれ 5%未満であった。

**表 2.6.4.12　ベランタマブ　マホドチンを用いた代謝試験一覧**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/Group | Method of Administration | Test Article | Dose (mg/kg) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Stability in plasma | Rat, Monkey, Human | NA | In vitro | ADC | 100 μg/mL | NA | No | GSK | 2014N206529 (14DMM005) | m4.2.2.4 |
| Stability in serum | Human | NA | In vitro | ADC | 100 μg/mL | NA | No | GSK | 2018N388212 | m4.2.2.4 |
| Cellular catabolism | Human HCEC and RPTEC | NA | In vitro | ADC, MAB | 10 and 100 μg/mL | NA | No | GSK | 2019N409936 (N71801-15) | m4.2.2.3 |
| Cellular catabolism | Human HCEC and RPTEC | NA | In vitro | ADC, MAB | 10 and 100 μg/mL | NA | No | GSK | 2020N451323 (N70440-40) | m4.2.2.3 |
| Metabolite profiling | Rat, Monkey, Human (hepatic S9) | NA | In vitro | $^{3}$H-cys-mcMMAF | 10 μM | NA | No | [redacted] | 2018N393077 (8348052) | m4.2.2.4 |
| Metabolite profiling[b] | Mouse, Rat, Monkey, Human hepatocytes and recombinant human enzymes | NA | In vitro | $^{3}$H-cys-mcMMAF | 1 or 10 μM | NA | No | NA | 2020N438184 | m4.2.2.4 |
| CYP Inhibition | Human liver microsomes | NA | In vitro | cys-mcMMAF | 0.001 to 1 μM | NA | No | [redacted] | 2013N177537 (XT105075) | m4.2.2.4 |
| CYP Induction | Human cryopreserved hepatocytes | NA | In vitro | cys mcMMAF | 10 to 1000 nM | NA | No | [redacted] | 2013N177532 (SEGI-20100616D-HI) | m4.2.2.4 |

**表 2.6.4.12 ベランタマブ マホドチンを用いた代謝試験一覧（続き）**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/Group | Method of Administration | Test Article | Dose (mg/kg) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Metabolite profiling[a] | Rat (SD) | 4M | IV | $^{3}$H-cys-mcMMAF | 10 | Single | No | [redacted] | 2018N393078 (8348051) | m4.2.2.5 |

**Key:**
a = This was a two part protocol which generated two separate reports. Only the report on $^{3}$H-cys-mcMMAF is listed.
b = Study conducted by a partner company and a redacted report is available; test facility information has been redacted.
C2D1 = Cycle 2, Day 1; CYP = Cytochrome P450;
HCEC = human corneal epithelial cells; IV = Intravenous;
NA = Not applicable; MMAF = Monomethyl auristatin F.
RPTEC = renal proximal tubule epithelial cells;
SD = Sprague Dawley;
S9 = Hepatic post-mitochondrial supernatant.

**Test Article:**
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].
$^{3}$H-cys-mcMMAF = Radiolabelled cys-mcMMAF.

**Testing Facility:**
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]

### 2.6.4.6. 排泄

ベランタマブ　マホドチンは高分子であり（約 150 kDa）、天然アミノ酸で構成されることから、非臨床試験動物種を用いた標準的代謝試験を実施する必要はない[ICH S6(R1)]。しかし、放射性標識 cys-mcMMAF の排泄及びマスバランスを評価するため、1 試験を実施した。この試験を表 2.6.4.13 に示す。

#### 2.6.4.6.1. ラット

##### 2.6.4.6.1.1. 静脈内投与後の排泄

雄 SD ラット（n=4）に 10 mg/kg の[3H] cys-mcMMAF（媒体：PBS）として単回静脈内ボーラス投与したときの、[3H] cys-mcMMAF の排泄を評価した。尿及び糞中への放射能排泄について、投与後 168 時間まで測定した。尿、糞、ケージすすぎ液、ケージ洗液、ケージ拭取り紙及び残存屍体の総放射能量を、LSC 法により測定した（2018N393078、4.2.2.5）。試験の概要を 2.6.5-Table 13.1 に示す。

[3H] cys-mcMMAF を単回静脈内投与したときの、投与放射能の平均総回収率（±標準偏差）は 96.1±2.77%であった。放射能は速やかに排泄され、投与後 48 時間までに投与した放射能の 94%が回収された。糞中排泄が主な排泄経路であった。尿及び糞中回収率は、それぞれ投与放射能の 12.5±2.29%及び 82.7±1.74%であった。毎日のケージすすぎ液、ケージ拭取り紙及びケージ洗液が総放射能に占める割合は約 0.76%であり、残存屍体中の放射能が投与した放射能に占める割合は平均で 0.142±0.0196%であった。[3H] cys-mcMMAF を単回静脈内投与したときの総放射能の排泄プロファイルより、肝胆汁／糞中排泄（糞中に約 83%）及び腎／尿中排泄（尿中に約 13%）が、ラットにおける cys-mcMMAF の排泄を担っていることが示唆された。

雌雄の Wistar Han ラットにベランタマブ　マホドチン［0（媒体）、3、10 及び 30 mg/kg/週］を週 1 回の頻度で 3 週間（試験 1、8 及び 15 日）静脈内投与した、3 週間毒性試験（2013N174857、4.2.3.2、2.6.6.3.2.1）の一部として、尿を採取して cys-mcMMAF の分析を行った。この試験で得られたベランタマブ　マホドチン及び cys-mcMMAF の TK パラメータを 2.6.7-Table 7.1 に、毒性データの概要を 2.6.6.3.2.1 に示す。試験前［−6、−5 及び−1 日（投与前）］並びに試験 7、14、22、43、64、85 及び 106 日に、媒体対照群及び投薬群の動物から個別採尿ケージを用いて尿を一晩（約 16 時間）採取した。試験 7、14、22、43、64、85 及び 106 日に毒性試験用動物から採取した尿中に、定量可能な濃度の cys-mcMMAF が存在していた。尿中に回収された cys-mcMMAF 平均総量は、ベランタマブ　マホドチンの用量にほぼ比例して増加した。なお、投薬群及び媒体対照群において試験前［−6、−5 又は−1 日（投与前）］に採取した尿中の cys-mcMMAF の濃度は定量下限未満であった。

**表 2.6.4.13　ベランタマブ　マホドチンを用いた排泄試験一覧**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/ Group | Method of Administration | Test Article | Dose (mg/kg/week) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Excretion and mass balance[a] | Rat (SD) | 4M | IV | $^{3}$H-cys-mcMMAF | 10 mg/kg | Single | No | [redacted] | 2018N393078 (8348051) | m4.2.2.5 |
| Urinary excretion | Rat (Wistar Han) | 6M/6F | IV (infusion) | ADC | 3, 10, 30 | 3 Weeks[b] | Yes | GSK | 2013N174857 (R30467G) | m4.2.3.2 |

**Key:**
a = This was a two-part protocol which generated two separate reports. Only the report on $^{3}$H-cys-mcMMAF is listed.
b = Animals were dosed once weekly.
mAb = Monoclonal antibody; MMAF = Monomethyl auristatin F.
IV = Intravenous; SD = Sprague Dawley.

**Test Article:**
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].
$^{3}$H-cys-mcMMAF = Radiolabelled cys-mcMMAF.

**Testing Facility:**
[redacted]=[redacted]

### 2.6.4.7. 薬物動態学的薬物相互作用

薬物動態学的薬物相互作用は、被相互作用又は相互作用のいずれかに分類される。被相互作用は、併用薬物が被験薬（ベランタマブ　マホドチン）の PK に影響を与える相互作用であるのに対して、相互作用は併用薬物の PK が被験薬（ベランタマブ　マホドチン）により影響を受ける相互作用である。

ベランタマブ　マホドチンと併用投与される可能性がある薬物との薬物動態学的相互作用について検討するための in vivo 非臨床試験は特に実施していない。しかし、cys-mcMMAF（ベランタマブ　マホドチンの細胞毒性成分）については、in vitro CYP 阻害／誘導試験及び in vitro トランスポーター試験において関連データが得られている（それぞれ、2.6.4.4 及び 2.6.4.5）。このうち、臨床使用に影響を及ぼす可能性のある検討結果については、2.6.4.9「考察及び結論」及び 2.4「非臨床に関する概括評価」で考察する。

### 2.6.4.8. その他の薬物動態試験

ベランタマブ　マホドチンの開発を目的とした、本項に分類される試験は実施していない。

### 2.6.4.9. 考察及び結論

ベランタマブ　マホドチンの PK を評価した。ヒト PK プロファイル（2.5）はラット及びサルと同様であり、ベランタマブ　マホドチンの毒性評価にこれらの非臨床試験動物種を使用することの妥当性を確認した。これらのデータから、ベランタマブ　マホドチンは対象患者に予定している用法・用量で安全に使用できることが裏付けられた。

マウス、ラット及びサルにベランタマブ　マホドチンを静脈内投与したときの ADC 及び総 mAb の PK を評価した結果、血漿 CL は低く Vss は小さかった。このことから、全身循環以外での分布は限られていることが示唆された。ADC と総 mAb の濃度が同程度であったことから、循環血中での薬物複合体の安定性が示唆された。このことと一致して血漿中及び尿中の cys-mcMMAF 濃度は低値を示した。

ラット及びカニクイザルにベランタマブ　マホドチンを最長 13 週間反復投与した毒性試験の TK 評価では、全身曝露量に顕著な性差はみられず、ADC、総 mAb 及び cys-mcMMAF の曝露量はおおむね用量に比例して増加した。ADC の推定半減期は、ラットで約 11 日、サルで約 4 日であった。ウサギ（NZW と DB の両系統）では、ADC と総 mAb の曝露量は同程度で、ADC、総 mAb 及び cys-mcMMAF の全身曝露量はおおむね用量に比例して増加し、初回投与時と反復投与時（最大 30mg/kg/週、試験 2～7 週）で同程度であった。

ベランタマブ　マホドチンをラット、サル又はヒト血漿と 37℃でインキュベートした結果、いずれの動物種の血漿中でもベランタマブ　マホドチンはおおむね安定であり、処理後 96 時間に放出された遊離型 cys-mcMMAF は、抗体結合型総 MMAF の約 3%未満であった。ベランタマブ　マホドチンをヒト血清とともにインキュベートしたとき、マレイミド交換が認められ、ベランタマブ　マホドチンから HSA へ mcMMAF が移行することにより HSA-mcMMAF が生成した。マレイド交換は mcMMAF を含む ADC でも報告されている[Shen, 2012]。

ベランタマブ　マホドチンを HCEC 及び RPTEC とインキュベートしたとき、リソソーム内にベランタマブ　マホドチンが取り込まれ、また、異化作用により cys-mcMMAF が遊離することが確認された。

ラットに蛍光標識ベランタマブ　マホドチン又は GSK2857914 を単回静脈内投与したときの肝臓、腎臓及び眼球内での両抗体の蛍光シグナルは同程度であり、ベランタマブ　マホドチンの組織分布は結合ペイロードの有無により影響を受けないことが示唆された。両抗体は眼球、眼瞼、眼窩外涙腺及びハーダー腺の結合組織に加えて、肝臓並びに眼瞼の筋肉にも分布したが、角膜及び眼瞼の腺組織には分布しなかった。肝臓及び腎臓での蛍光シグナルは、眼球に比べて高かった。ベランタマブ　マホドチンから遊離した cys-mcMMAF は、肝臓、骨髄、腎臓、ハーダー腺及び眼窩外涙腺において非常に低濃度で認められたが、角膜、眼瞼及び眼球全体では検出されなかった。ウサギにベランタマブ　マホドチンを静脈内投与したとき、涙液中にベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）及び cys-mcMMAF が検出された。

Cys-mcMMAF の代謝クリアランスはわずかであった。In vitro（ラット、サル及びヒト）及び in vivo（ラット）において、cys-mcMMAF の直鎖異性体は主に化学的加水分解及び脱水反応を受けて cys-mcMMAF の環状異性体を生成し、非常に微量の第 I 相／第 II 相酵素的代謝反応生成物が認められた。Cys-mcMMAF の生物学的分析では、直鎖異性体と環状異性体の合計が測定される。ラットに[3H] cys-mcMMAF を静脈内投与したとき、放射能は主に cys-mcMMAF の直鎖異性体又は環状異性体として、糞（83%）及び尿（13%）中に排泄された。

概して、これらのデータは既に報告されているように[Doronina, 2006]、ADC の蛋白質分解によりペイロードが遊離すること、及び遊離 cys-mcMMAF の代謝クリアランスが限定的であることと一致していた。

ヒトにおけるベランタマブ　マホドチン及び cys-mcMMAF の消失経路（代謝／異化及び薬物トランスポーター）に関する詳細な評価は実施していない。In vitro において、cys-mcMMAF は CYP 阻害作用及び誘導作用を示さず、CYP による cys-mcMMAF の酸化的代謝は限定的であった。In vitro において、cys-mcMMAF は、OATP1B1、OATP1B3、MRP1、MRP2 及び MRP3 の基質であり、BSEP の候補基質であった。In vitro において、cys-mcMMAF が P-gp の基質となる可能性に関して矛盾するデータが得られたが、保守的に P-gp 基質と判断した。In vitro において、cys-mcMMAF は MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、BCRP、MRP4 及び MRP5 の基質ではなかった。

In vitro において、cys-mcMMAF は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 に対して、直接的、時間依存的及び代謝依存的阻害作用を示さず、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4/5 誘導作用は確認されなかった。また、in vitro において、cys-mcMMAF は、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、BCRP、BSEP、P-gp、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4 及び MRP5 に対して阻害作用を示さなかった。蛋白質医薬品は CYP 及び薬物トランスポーターの活性及び発現を抑制することが示されている[Huang, 2010; Lee, 2010]。しかし、ベランタマブ　マホドチンがこのメカニズムに関与するサイトカインを変化させる可能性は低い。これらのデータを総合し

て、ベランタマブ　マホドチン及び cys-mcMMAF が併用薬物に対して相互作用を引き起こすリスクは低いことが示唆された。

**表 2.6.4.14　ベランタマブ　マホドチン静脈内投与後のベランタマブ　マホドチン（ADC 及び総 mAb）の雌雄平均全身曝露量比較**

| Study | Dose (mg/kg/week) | End of study data | | | | Exposure multiple (animal:human)[f] | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | AUC0-τ[a] (µg.h/mL) | | Cmax (µg/mL) | | AUC | | Cmax | |
| | | ADC | mAb | ADC | mAb | ADC | mAb | ADC | mAb |
| Rat 3 week[b] | **3** | **6100** | **7160** | **103** | **105** | **1.0** | **0.6** | **2.0** | **1.8** |
| (R30467G) | 10 | 21750 | 25750 | 303 | 300 | 3.5 | 2.0 | 5.8 | 5.2 |
| 2013N174857 | 30 | 48600 | 57000 | 764 | 771 | 7.8 | 4.4 | 14.7 | 13.5 |
| Rat 13 week[cg] | 3 | 10500 | 12700 | 131 | 133 | 1.7 | 1.0 | 2.5 | 2.3 |
| (R32025G) | 10 | 37300 | 42400 | 451 | 406 | 6.0 | 3.3 | 8.7 | 7.1 |
| 2018N374327 | 30 | 90200 | 107000 | 1250 | 1160 | 14.5 | 8.2 | 24.1 | 20.2 |
| Monkey 3 week[b] | **1** | **1240** | **1520** | **27.5** | **27.3** | **0.2** | **0.1** | **0.5** | **0.5** |
| (P70260G) | 3 | 3760 | 4620 | 63.3 | 68.2 | 0.6 | 0.4 | 1.2 | 1.2 |
| 2013N158643 | 10 | 21500 | 25900 | 292 | 306 | 3.5 | 2.0 | 5.6 | 5.3 |
| Monkey 13 week[b] | **1** | **1130** | **1500** | **27.3** | **29.0** | **0.2** | **0.1** | **0.5** | **0.5** |
| P71346G | 3 | 6720 | 8030 | 93.9 | 103 | 1.1 | 0.6 | 1.8 | 1.8 |
| 2018N375127 | 10[h] | 21500 | 29400 | 311 | 368 | 3.5 | 2.3 | 6.0 | 6.4 |
| Human[di] | 2.5[e] | 6203 | 12999 | 51.8 | 57.3 | | | | |

**Key:**

a = AUC0-τ – Area under the curve at steady state over the dosing interval. Equivalent to AUC0-∞ on Day 1 for humans.
b = Animals dosed once a week.
c = Animals dosed every 3 weeks.
d = Geometric mean data from clinical Study 207495 Cycle 3; m5.3.5.1.
e = 2.5 mg/kg every 3 weeks.
f = Exposure multiples given to 2 significant figures or a maximum of 1 decimal place. No correction has been made to consider the difference in dosing interval between animals and human and assumes that dose intervals are equivalent between animals and humans. Where dose intervals are shorter in animals compared to humans, a multiplication factor can be applied used to adjust exposures upwards.
g = NOAEL not defined
h = Exposure data from Week 4 as animals in this group were terminated early due to findings related to immune complex disease as a result of anti-drug antibodies.
i = Human exposure data from clinical studies 207503 and 207499 where belantamab mafodotin was given in combination settings were similar to human exposure data from clinical study 207495 where belantamab mafodotin was given in monotherapy setting.
ADC = Antibody-drug conjugate [belantamab mafodotin (ADC)];
mAb = total monoclonal antibody [belantamab mafodotin (total mAb)].
NA = Not Applicable – animals were last dosed during Week 5
NOAEL = No observed adverse effect level (in **bold**).

**表 2.6.4.15 ベランタマブ マホドチン静脈内投与後の cys-mcMMAF の雌雄平均全身曝露量比較**

| Study | Dose of Belantamab mafodotin (mg/kg/week) | End of study data | | Exposure multiple (animal:human)[f] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | AUC0-τ[a] (ng.h/mL) | Cmax (ng/mL) | AUC | Cmax |
| Rat 3 week[b] | **3** | **258** | **3.90** | **3.1** | **4.9** |
| (R30467G) | 10 | 1245 | 16.6 | 15.1 | 20.7 |
| 2013N174857 | 30 | 2785 | 53.4 | 33.8 | 66.6 |
| Rat 13 week[c] | 3 | NC | NQ | NC | NC |
| (R32025G) | 10 | 66.0 | 1.71 | 0.8 | 2.1 |
| 2018N374327 | 30 | 391 | 6.81 | 4.7 | 8.5 |
| Monkey 3 week[b] | **1** | **12.1** | **0.499** | **0.1** | **0.6** |
| (P70260G) | 3 | 73.6 | 1.97 | 0.9 | 2.5 |
| 2013N158643 | 10 | 350 | 5.40 | 4.2 | 6.7 |
| Monkey 13 week[b] | **1** | **NC** | **0.125** | **NC** | **0.2** |
| (P71346G) | 3 | 25.3 | 0.415 | 0.3 | 0.5 |
| 2018N375127 | 10 | NA | NA | NA | NA |
| Human[d] | 2.5[e] | 82.5[g] | 0.802 | | |

**Key:**

a = AUC0-τ – area under the curve at steady state over the dosing interval.
b = Animals dosed once a week.
c = Animals dosed every 3 weeks
d = Geometric mean data from clinical Study 207495 Cycle 3, m5.3.5.1.
e = 2.5 mg/kg every 3 weeks.
f = Exposure multiples given to 2 significant figures or a maximum of 1 decimal place. No correction has been made to consider the difference in dosing interval between animals and human.
g = AUC0-168hr.
h = Human exposure data from clinical studies 207503 and 207499 where belantamab mafodotin was given in combination settings were similar to human exposure data from clinical study 207495 where belantamab mafodotin was given in monotherapy setting.
NA = Not Applicable – animals were last dosed during Week 5.
NC = Not Calculated; NQ = Not Quantifiable.
NOAEL = No observed adverse effect level (in **bold**).

### 2.6.4.10. 参考文献

#### Key Literature References

Alley S C, Benjamin D R, Jeffrey S C, Okeley N M, Meyer D L, Sanderson R J, Senter P D. Contribution of Linker Stability to the Activities of Anticancer Immunoconjugates. Bioconjugate Chemistry. 2008;19:759–765.

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;17:114-127.

Fukui, H., et al. Histamine H1 Receptor Gene Expression and Drug Action of Antihistamines. In: Hattori, Y., Seifert, R. (eds) Histamine and Histamine Receptors in Health and Disease (2016). Handbook of Experimental Pharmacology, vol 241. Springer, Cham.

Huang S M, Zhao H, Lee J I, Reynolds K, Lesko L J. Therapeutic Protein–Drug Interactions and Implications for Drug Development. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2010, 87(4);497-503.

Lee JI, Zhang L, Men AY, Kenna LA and Huang SM. CYP-mediated therapeutic protein-drug interactions: Clinical findings, proposed mechanisms and regulatory implications. Clinical Pharmacokinetics, 2010;49:295-310.

Lin H-P, Singla B, Ghoshal P, Faulkner J, Cherian-Shaw M, O'Connor P, She J-X, Belin de Chantemele E, Csanyi G. Identification of novel macropinocytosis inhibitors using a rational screen of Food and Drug Administration-approved drugs. Br J Pharmacol, 2018, 175;3640-3655.

Shen B Q, Xu K, Liu L, et al. Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. Nature Biotechnology, 2012;30 (2);184-189.

Tumey LN, Charati M, He T, et al. Mild method for succinimide hydrolysis on ADCs: impact on ADC potency, stability, exposure, and efficacy. Bioconjugate Chemistry. 2014;25:1871-1880.

Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2008; 84(5): 548- 558.

#### Regulatory Guidelines (Not provided)

ICH Guidelines. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6(R1). 2011.

ICH Guidelines. Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals S(9). 2013.

ICH S9 Implementation Working Group ICH S9 Guideline: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals Questions and Answers. 2018.

# Appendix 1 ANALYTICAL METHODS USED FOR THE DETERMINATION OF BELANTAMAB MAFODOTIN IN BIOLOGICAL FLUIDS

**Table A1.1 List of Analytical Method and Validation Reports used to Support the Development of Belantamab Mafoditin**

| Type of Study | Species | Quantification Limits | Report No. (Method Reference) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|
| **Bioanalysis Validation Reports (Rat ADC)** | | | | |
| Method for the determination of GSK2857916 (ADC) in Rat Plasma (range 50 to 15000 ng/mL) using a Gyrolab Fluorescent Immunoassay | Rat | 50 to 15000 ng/mL | 2012N156879 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Supplemental Validation Data to "The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 (ADC) in Rat Plasma (range 50 – 15000 ng/mL) using a Gyrolab Fluorescent Immunoassay" | Rat | 50 to 15000 ng/mL | 2013N175800 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Method for the Determination of GSK2857916 (ADC) in Rat Plasma (Range 250 to 5000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay | Rat | 250 to 5000 ng/mL | 2018N369048 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (Rat total mAb)** | | | | |
| Method for the determination of GSK2857916 (TOTAL) in Rat Plasma (range 50 to 15000 ng/mL) using a Gyrolab Fluorescent Immunoassay | Rat | 50 to 15000 ng/mL | 2012N156875 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Supplemental Validation Data to "The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 (Total) in Rat Plasma (range 50 – 15000 ng/mL) using a Gyrolab Fluorescent Immunoassay" | Rat | 50 to 15000 ng/mL | 2013N175799 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Method for the Determination of GSK2857916 (mAb) in Rat Plasma (Range 250 to 5000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay | Rat | 250 to 5000 ng/mL | 2018N369049 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (Rat cys-mcMMAF)** | | | | |
| The Validation of a Method for the Determination of CYS-MCMMAF in Rat Plasma (range 0.5 to 500 ng/mL) using HPLC/MS/MS | Rat | 0.5 to 500 ng/mL | 2013N171243 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| The Validation of a Method for the Determination of CYS-MCMMAF in Rat Urine (range 0.5 to 500 ng/mL) using HPLC/MS/MS | Rat | 0.5 to 500 ng/mL | 2013N173108 ([redacted]) | m4.2.2.1 |

**List of Analytical Method and Validation Reports used to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)**

| Type of Study | Species | Quantification Limits | Report No. (Method Reference) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|
| HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys-mcMMAF from Rat $K_2$EDTA Plasma | Rat | 0.05 to 10 ng/mL | 2018N376609 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys-mcMMAF from Rat $K_2$EDTA Plasma | Rat | 0.5 to 5000 ng/mL | 2019N415409 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Addendum to HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys-mcMMAF from Rat $K_2$EDTA Plasma | Rat | 0.5 to 5000 ng/mL | 2019N415376 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (Monkey ADC)** | | | | |
| Method for the Determination of GSK2857916 ADC in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500-10000 ng/mL using a Chemiluminescent Immunoassay | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2013N159339 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Supplemental Validation Data to 'The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 ADC in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 to 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay' | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2013N183711 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (Monkey total mAb)** | | | | |
| The Method for the Determination of GSK2857916 MAb in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500-10000 ng/mL using a Chemiluminescent Immunoassay | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2013N160140 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Supplemental Validation Data to 'The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 mAb in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 to 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay' | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2013N183813 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (GSK2857914)** | | | | |
| The Validation of a Method for the Determination of GSK2857914 in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 – 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2012N155837 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Full Validation of a Method for the Determination of GSK2857914 in Cynomolgus Monkey Plasma using a Gyrolab Immunoassay | Monkey | 5 to 250 µg/mL | 2023N535109 ([redacted]) | m4.2.2.1 |

## List of Analytical Method and Validation Reports used to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

| Type of Study | Species | Quantification Limits | Report No. (Method Reference) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|
| Supplemental Validation Data to 'The Validation of a Method for the Determination of GSK2857914 in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 to 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay' | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2014N198075 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (Monkey cys-mcMMAF)** | | | | |
| The Validation of a Method for the Determination of Cys-mc-MMAF in Cynomolgus Plasma (range 150 to 10000pg/mL) using HPLCMS/MS | Monkey | 150 to 10000 pg/mL | 2013N173798 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys mcMMAF from Cynomolgus Monkey $K_2$EDTA Plasma | Monkey | 0.05 to 10 ng/mL | 2018N376610 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys mcMMAF from Cynomolgus Monkey $K_2$EDTA Plasma | Monkey | 0.5 to 1000 ng/mL | 2019N415366 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Addendum to HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys mcMMAF from Cynomolgus Monkey $K_2$EDTA Plasma | Monkey | 0.5 to 1000 ng/mL | 2019N415308 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Immunogenicity Validation Reports** | | | | |
| The Validation of a Method for the Determination of Anti-GSK2857916 Antibodies in Rat Serum by an [redacted] Homogeneous Bridging Electrochemiluminescent Immunoassay | Rat | NA | 2018N371901 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Validation Report for an Electrochemiluminescent Immunoassay Method for the Detection of Antibodies Against GSK2857916 in Cynomolgus Monkey Serum | Monkey | NA | 2017N344874 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Validation of a Method for the Determination of Anti-GSK2857916 Antibodies in Cynomolgus Serum by an [redacted] Electrochemiluminescent Immunoassay | Monkey | NA | 2018N371414 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| The Validation of a Method for the Determination of Anti-GSK2857916 Antibodies in Cynomolgus Serum using an Electrochemiluminescent Homogeneous Bridging Immunoassay | Monkey | NA | 2018N365647 ([redacted]) | m4.2.2.1 |

**List of Analytical Method and Validation Reports used to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)**

| Type of Study | Species | Quantification Limits | Report No. (Method Reference) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|
| Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 Specific Circulating Immune Complexes and GSK2857916 Anti-Drug Antibodies in Cynomolgus Monkey Serum using an Electrochemiluminescent Immunoassay | Monkey | NA | 2018N371395 ([redacted]) | m4.2.2.1 |

**Key:**

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 = Monoclonal antibody; NA = Not Applicable. HPLC/MS/MS = High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

**薬物動態分析（ラット）**

ラット血漿中ベランタマブ　マホドチン（ADC）、ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）及び cys-mcMMAF の定量法並びにラット尿中 cys-mcMMAF の定量法、ベランタマブ　マホドチンに対する ADA 検出法について、それぞれバリデーションを実施した。GLP 適用の毒性試験及び PK 試験で使用した分析法のバリデーションデータの概要を以下の表に示す。

**Table A1.2 Pharmacokinetic Assays for Belantamab Mafodotin (ADC) Used to Support Rat GLP Studies with Belantamab Mafodotin**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2012N156879<br>Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 (ADC) in Rat Plasma (range 50 – 15000 ng/mL) using Gyrolab Fluorescent Immunoassay (Method Reference Number: [redacted])<br><br>2013N175800<br>Supplemental Validation Data | 2013N174857<br>3 week repeat dose toxicity study in rats with belantamab mafodotin | Belantamab mafodotin (ADC) was captured from rat plasma using an [redacted] and detected using a [redacted] conjugated to an AlexaFluor 647 reporter tag. | |
| | | LLQ | 50 ng/mL |
| | | Validated Range | 50 to 15000 ng/mL |
| | | Minimum Dilution Required | 10-fold in assay buffer |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤13.6% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤4.8% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -15.9% to +8.2% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -9.9% to +4.4% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Rat Plasma | 3 freeze-thaw cycles from -80°C to ambient temperature<br>18 hours at ambient temperature<br>153 days at -80°C |
| | | Stability in Rat Whole Blood | 2 hours at 37°C |

**Pharmacokinetic Assays for Belantamab Mafodotin (ADC) Used to Support Rat GLP Studies with Belantamab Mafodotin (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2018N369048<br>The Full Validation of a Method for the Conjugated Antibody (ADC) of GSK2857916 (range 250 – 5000 ng/mL) in Rat Plasma by Chemiluminescent Immunoassay (Method Reference Number: [redacted]) | 2018N374327<br>13 week repeat dose toxicity study in rats with belantamab mafodotin | Belantamab mafodotin (ADC) was captured from rat plasma using an [redacted] and detected using a [redacted] conjugated to a Horseradish Peroxidase reporter tag. | |
| | | LLQ | 250 ng/mL |
| | | Validated Range | 250 to 5000 ng/mL |
| | | Minimum Dilution Required | 200-fold in assay buffer |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤12.4% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤7.6% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -17.2% to +7.6% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -6.2% to -1.3% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Rat Plasma | 5 freeze-thaw cycles from -80°C to ambient temperature<br>25 hours at ambient temperature<br>116 days at -80°C |
| | | Stability in Rat Whole Blood | Assessed in 2012N156879; 2 hours at 37°C |

**Table A1.3 Pharmacokinetic Assays for Belantamab Mafodotin (total mAb) Used to Support Rat GLP Studies with Belantamab Mafodotin**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2012N156875<br>The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 (Total) in Rat Plasma (range 50 – 15000 ng/mL) using a Gyrolab Fluorescent Immunoassay (Method Reference Number: [redacted])<br><br>2013N175799 Supplemental Validation Data | 2013N174857<br>3 week repeat dose toxicity study in rats with belantamab mafodotin | Belantamab mafodotin (total mAb) was captured from rat plasma using [redacted] and detected using a [redacted] conjugated to an AlexaFluor 647 reporter tag. | |
| | | LLQ | 50 ng/mL |
| | | Validated Range | 50 to 15000 ng/mL |
| | | Minimum Dilution Required | 10-fold in assay buffer |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤16.0% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤10.1% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -9.8% to +14.4% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -2.4 to +6.5% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Rat Plasma | 3 freeze-thaw cycles from -80°C to ambient temperature<br>18 hours at ambient temperature<br>153 days at -80°C |
| | | Stability in Rat Whole Blood | 2 hours at 37°C |

**Pharmacokinetic Assays for Belantamab Mafodotin (total mAb) Used to Support Rat GLP Studies with Belantamab Mafodotin (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2018N369049<br><br>The Full Validation of a Method for the Total Antibody (MAB) of GSK2857916 (range 250 – 5000 ng/mL) in Rat Plasma by Chemiluminescent Immunoassay (Method Reference Number: [redacted]) | 2018N374327<br><br>13 week repeat dose toxicity study in rats with belantamab mafodotin | Belantamab mafodotin (total mAb) was captured from rat plasma using [redacted] and detected using a [redacted] conjugated to a Horseradish Peroxidase reporter tag. | |
| | | LLQ | 250 ng/mL |
| | | Validated Range | 250 to 5000 ng/mL |
| | | Minimum Dilution Required | 100-fold in assay buffer |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤12.9% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤10.9% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -16.3% (-24.0% at LLQ) to +11.4% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -13.3% to -0.5% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Rat Plasma | 5 freeze-thaw cycles from -80°C to ambient temperature<br>25 hours at ambient temperature<br>110 days at -80°C |
| | | Stability in Rat Whole Blood | Assessed in 2012N156875; 2 hours at 37°C |

**Table A1.4 Pharmacokinetic Assays for Cys-mcMMAF Used to Support Rat GLP Studies with Belantamab Mafodotin or Cys-mcMMAF**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2019N415409<br>HLPC/MS/MS Assay Validation for the Determination of cys-mcMMAF from Rat $K_2$EDTA Plasma ([redacted] Validation Study: [redacted])<br><br>2019N415376<br>Supplemental Validation Data | 2019N415388<br>IV bolus PK study in male rats with cys-mcMMAF (Study 1019-012) | Cys-mcMMAF was extracted from 50 µL rat plasma by methanolic protein precipitation using [$^{15}N^{13}C_3D_3$]-cys-mcMMAF as an internal standard. Extracts were analyzed by HPLC/MS/MS using an electrospray interface and multiple reaction monitoring. | |
| | | LLQ | 0.5 ng/mL |
| | | Validated Range | 0.5 to 5000 ng/mL |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ±15% or ±20% at LLQ) | ≤ 8.5% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ±15% or ±20% at LLQ) | ≤ 11.3% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ±15% or ±20% at LLQ) | -3.4% to +14.2% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ±15% or ±20% at LLQ) | -1.8% to +8.6% |
| | | Recovery of cys-mcMMAF | ≥ 92.3% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Rat Plasma | 4 freeze-thaw cycles from -70°C to ambient temperature<br>6 hours at ambient temperature<br>130 days at -70°C |
| | | Stability in Rat Whole Blood | 1 hour at ambient temperature and at 4°C |

**Pharmacokinetic Assays for Cys-mcMMAF Used to Support Rat GLP Studies with Belantamab Mafodotin or Cys-mcMMAF (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2018N376609<br>HLPC/MS/MS Assay Validation for the Determination of cys-mcMMAF from Rat K2EDTA Plasma ([redacted]Validation Study: [redacted] | 2013N177527<br>5 day repeat dose toxicity study in rats with cys-mcMMAF | Cys-mcMMAF was extracted from 50 µL rat plasma by solid phase extraction on C8 tubes using [$^{15}N^{13}C_3D_3$]-cys-mcMMAF as an internal standard. Extracts were analyzed by HPLC/MS/MS using an electrospray interface and multiple reaction monitoring. | |
| | | LLQ | 0.05 ng/mL |
| | | Validated Range | 0.05 to 10 ng/mL |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | ≤9.6% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | ≤14.8% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | -8.7% (-16.6% at LLQ) to +15.0% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | -2.0% to +9.0% |
| | | Recovery of cys-mcMMAF | ≥72.6% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Rat Plasma | 4 freeze-thaw cycles from -70°C to ambient temperature<br>7 hours at ambient temperature |
| | | Stability in Rat Whole Blood | 4 hours at ambient temperature and at 4°C |

**Pharmacokinetic Assays for Cys-mcMMAF Used to Support Rat GLP Studies with Belantamab Mafodotin or Cys-mcMMAF (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2013N171243<br>The Validation of a Method for the Determination of cys-mcMMAF in Rat Plasma (range 0.5 to 500 ng/mL) using HPLC/MS/MS (Method Reference Number: [redacted]) | 2013N174857<br>3 week repeat dose toxicity study in rats with belantamab mafodotin<br><br>2018N374327<br>13 week repeat dose toxicity study in rats with belantamab mafodotin | Cys-mcMMAF was extracted from 25 µL rat plasma by solid phase extraction on HLB plates using [$^{15}N^{13}C_3D_3$]-cys-mcMMAF as an internal standard. Extracts were analyzed by HPLC/MS/MS using a TurbolonSpray™ interface and multiple reaction monitoring. | |
| | | LLQ | 0.5 ng/mL |
| | | Validated Range | 0.5 to 500 ng/mL |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | ≤6.3% (≤15.6% at LLQ) |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | ≤3.0% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | -6.1% to +7.4% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | -2.3% to +5.3% |
| | | Tolerance to 1500 µg/mL belantamab mafodotin | 3 freeze-thaw cycles from -70°C to ambient temperature or wet ice<br>6 hours at ambient temperature or wet ice |

**Pharmacokinetic Assays for Cys-mcMMAF Used to Support Rat GLP Studies with Belantamab Mafodotin or Cys-mcMMAF (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| | | Recovery of cys-mcMMAF | ≥89.5% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Rat Plasma | 3 freeze-thaw cycles from -20°C to ambient temperature *<br>3 freeze-thaw cycles from -80°C to ambient temperature *<br>24 hours at ambient temperature *<br>199 days at -80°C |
| | | Stability in Rat Whole Blood | 4 hours at 37°C *<br>* Data from validation report 2013N159206 (Method Reference Number [redacted], but not used to support toxicity studies) |

**Pharmacokinetic Assays for Cys-mcMMAF Used to Support Rat GLP Studies with Belantamab Mafodotin or Cys-mcMMAF (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2013N173108<br>The Validation of a Method for the Determination of cys-mcMMAF in Rat Urine (range 0.5 to 500 ng/mL) using HPLC/MS/MS (Method Reference Number: [redacted]) | 2013N174857<br>3 week repeat dose toxicity study in rats with belantamab mafodotin | Cys-mcMMAF was extracted from 25 µL rat urine by solid phase extraction on HLB plates using [$^{15}N^{13}C_3D_3$]-cys-mcMMAF as an internal standard. Extracts were analyzed by HPLC/MS/MS using a TurbolonSpray™ interface and multiple reaction monitoring. | |
| | | LLQ | 0.5 ng/mL |
| | | Validated Range | 0.5 to 500 ng/mL |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | ≤7.0% (≤17.8% at LLQ) |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | ≤13.4% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | -2.7% (-16.5% at LLQ) to +13.2% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | -4.1% to +10.9% |
| | | Tolerance to belantamab mafodotin | Not assessed |
| | | Recovery of cys-mcMMAF | ≥72.9% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Rat Urine | 209 days at -80°C |

**Table A1.5 Immunogenicity Assays Used to Support Rat GLP Studies with Belantamab Mafodotin**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2018N371901<br><br>Validation of a Method for the Determination of Anti-GSK2857916 Antibodies in Rat Serum using an [redacted] Homogeneous Bridging Electrochemiluminescent Immunoassay | 2018N374327<br><br>13 week repeat dose toxicity study in rats with belantamab mafodotin | Following [redacted] ADA were captured with [redacted] and detected with [redacted] | |
| | | Sensitivity | 1.95 ng/mL |
| | | Precision Within-run | ≤17.9% |
| | | Precision Between-run | ≤26.4% |
| | | Cut Point for Screen | 1.15 rECL |
| | | Cut Point for Confirmation | 21.65% inhibition |
| | | Cut Point for Titration assay | 1.39 rECL |
| | | Belantamab mafodotin tolerance | ≤ 2000 µg/mL belantamab mafodotin at HQC (4000 ng/mL PC)<br>≤ 1000 µg/mL belantamab mafodotin at LQC (40 ng/mL PC)<br>≤ 2000 µg/mL belantamab mafodotin 100 ng/mL PC |
| | | sBCMA tolerance | ≤ 1000 ng/mL sBCMA at HQC<br>≤ 10 ng/mL sBCMA at LQC<br><1 ng/mL at NC |
| | | Stability | 3 freeze-thaw cycles from -70°C to ambient<br>7 days refrigerated<br>5 days ambient |

**Key**:
rECL = relative electrochemiluminescent response
HQC = high quality control
LQC = low quality control
PC = positive control
NC = negative control

**薬物動態分析（サル）**

サル血漿中ベランタマブ　マホドチン（ADC）、ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）、cys-mcMMAF 及び GSK2857914 の定量法並びにベランタマブ　マホドチン特異的 CIC 及び ADA を検出する方法について、それぞれバリデーションを実施した。GLP 適用の毒性試験及び PK 試験で使用した分析法のバリデーションデータの概要を以下の表に示す。

**Table A1.6 Pharmacokinetic Assays for Belantamab Mafodotin (ADC) Used to Support Monkey GLP Studies with Belantamab Mafodotin**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2013N159339<br>The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 ADC in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 – 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay (Method Reference Number: [redacted])<br><br>2013N183711<br>Supplemental Validation Data | 2013N158643<br>3 week repeat dose toxicity study in monkeys with belantamab mafodotin<br><br>2018N375127<br>13 week repeat dose toxicity study in monkeys with belantamab mafodotin | Belantamab mafodotin (ADC) was captured from monkey plasma using [redacted] and detected using a [redacted] conjugated to a Horseradish Peroxidase reporter tag. | |
| | | LLQ | 500 ng/mL |
| | | Validated Range | 500 to 10000 ng/mL |
| | | Minimum Dilution Required | 100-fold or 200-fold in assay buffer |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤11.7% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ±20% or ±25% at LLQ) | ≤7.2% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -3.5% to +11.6% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | +0.9% to +8.3% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Monkey Plasma | 10 freeze-thaw cycles from -20°C to ambient temperature<br>3 freeze-thaw cycles from -80°C to ambient temperature<br>24 hours at ambient temperature<br>184 days at -20°C |
| | | Stability in Monkey Whole Blood | 2 hours on wet ice |

**Table A1.7 Pharmacokinetic Assays for Belantamab Mafodotin (total mAb) Used to Support Monkey GLP Studies with Belantamab Mafodotin**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2013N160140<br>The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 mAb in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 – 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay (Method Reference Number: [redacted])<br><br>2013N183813<br>Supplemental Validation Data | 2013N158643<br>3 week repeat dose toxicity study in monkeys with belantamab mafodotin<br><br>2018N375127<br>13 week repeat dose toxicity study in monkeys with belantamab mafodotin | Belantamab mafodotin (total mAb) was captured from monkey plasma using [redacted] and detected using a [redacted] conjugated to a Horseradish Peroxidase reporter tag. | |
| | | LLQ | 500 ng/mL |
| | | Validated Range | 500 to 10000 ng/mL |
| | | Minimum Dilution Required | 100-fold in assay buffer |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤20.4% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤2.7% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -7.9% to +10.5% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -1.6% to +13.4% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Monkey Plasma | 10 freeze-thaw cycles from -20°C to ambient temperature<br>3 freeze-thaw cycles from -80°C to ambient temperature<br>24 hours at ambient temperature<br>184 days at -20°C |
| | | Stability in Monkey Whole Blood | 2 hours on wet ice |

**Table A1.8 Pharmacokinetic Assays for Cys-mcMMAF Used to Support Monkey GLP Studies with Belantamab Mafodotin or Cys-mcMMAF**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2019N415366<br>HLPC/MS/MS Assay Validation for the Determination of cys-mcMMAF from Cynomolgus Monkey $K_2$EDTA Plasma ([redacted] Validation Study: [redacted])<br><br>2019N415308<br>Supplemental Validation Data | 2019N415363<br>IV bolus PK study in male monkeys with cys-mcMMAF<br>(Study 1019-013) | Cys-mcMMAF was extracted from 50 µL monkey plasma by methanolic protein precipitation using [$^{15}N^{13}C_3D_3$]-cys-mcMMAF as an internal standard. Extracts were analyzed by HPLC/MS/MS using an electrospray interface and multiple reaction monitoring. | |
| | | LLQ | 0.5 ng/mL |
| | | Validated Range | 0.5 to 1000 ng/mL |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ±15% or ±20% at LLQ) | ≤12.1% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ±15% or ±20% at LLQ) | ≤14.6% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ±15% or ±20% at LLQ) | -7.4% to +12.7% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ±15% or ±20% at LLQ) | +3.0% to +10.0% |
| | | Recovery of cys-mcMMAF | ≥97.9% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Monkey Plasma | 4 freeze-thaw cycles from -70°C to ambient temperature<br>6 hours at ambient temperature<br>131 days at -70°C |
| | | Stability in Monkey Whole Blood | 1 hour at ambient temperature and at 4°C |

**Pharmacokinetic Assays for Cys-mcMMAF Used to Support Monkey GLP Studies with Belantamab Mafodotin or Cys-mcMMAF (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2018N376610<br>HLPC/MS/MS Assay Validation for the Determination of cys-mcMMAF from Cynomolgus Monkey $K_2$EDTA Plasma ([redacted] Validation Study: [redacted]) | 2013N177529<br>Single dose toxicity study in monkeys with cys-mcMMAF<br><br>2013N177530<br>5 day repeat dose toxicity study in monkeys with cys-mcMMAF | Cys-mcMMAF was extracted from 50 µL monkey plasma by solid phase extraction on C8 tubes using [$^{15}N^{13}C_3D_3$]-cys-mcMMAF as an internal standard. Extracts were analyzed by HPLC/MS/MS using an electrospray interface and multiple reaction monitoring. | |
| | | LLQ | 0.05 ng/mL |
| | | Validated Range | 0.05 to 10 ng/mL |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | ≤4.4% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | ≤12.6% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | -14.1% to +14.0% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | -7.3% to +8.5% |
| | | Recovery of cys-mcMMAF | ≥61.9% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Monkey Plasma | 4 freeze-thaw cycles from -70°C to ambient temperature<br>6 hours at ambient temperature |
| | | Stability in Monkey Whole Blood | 4 hours at ambient temperature and at 4°C |

**Pharmacokinetic Assays for Cys-mcMMAF Used to Support Monkey GLP Studies with Belantamab Mafodotin or Cys-mcMMAF (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2013N173798<br>The Validation of a Method for the Determination of cys-mcMMAF in Cynomolgus Plasma (range 150 to 10000 pg/mL) using HPLC/MS/MS (Method Reference Number: [redacted]) | 2013N158643<br>3-week repeat dose toxicity study in monkeys with belantamab mafodotin<br><br>2018N375127<br>13-week repeat dose toxicity study in monkeys with belantamab mafodotin | Cys-mcMMAF was extracted from 50 µL monkey plasma by solid phase extraction on HLB plates using [$^{15}N^{13}C_3D_3$]-cys-mcMMAF as an internal standard. Extracts were analyzed by HPLC/MS/MS using an electrospray interface and multiple reaction monitoring. | |
| | | LLQ | 150 pg/mL |
| | | Validated Range | 150 to 10000 pg/mL |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | ≤12.8% (≤20.0% at LLQ) |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | ≤2.1% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | -4.8% to +7.5% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 15% or ± 20% at LLQ) | -3.7% to +3.5% |
| | | Recovery of cys-mcMMAF | ≥71.2% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Monkey Plasma | 6 freeze-thaw cycles from -20°C to ambient temperature<br>24 hours at ambient temperature<br>256 days at -20°C<br>20.75 hours at -80°C |

**Pharmacokinetic Assays for Cys-mcMMAF Used to Support Monkey GLP Studies with Belantamab Mafodotin or Cys-mcMMAF (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| | | Stability in Monkey Whole Blood | 4 hours at ambient temperature, on wet ice and at 37°C |
| | | Tolerance to belantamab mafodotin | Stability demonstrated with 300 µg/mL belantamab mafodotin for 3 freeze-thaw cycles from -20°C to wet ice<br>Stability demonstrated with 30 µg/mL belantamab mafodotin at ambient temperature and on wet ice for 6 hours<br>Stability demonstrated with 100 µg/mL belantamab mafodotin at ambient temperature<br>Stability demonstrated with 300 µg/mL belantamab mafodotin on wet ice for 6 hours, but not at ambient temperature for >2 hours |

**Table A1.9 Immunogenicity Assays Used to Support Monkey GLP Studies with Belantamab Mafodotin**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2018N365647<br>The Validation of a Method for the Determination of Anti-GSK2857916 Antibodies in Cynomolgus Serum using an Electrochemiluminescent Homogeneous Bridging Immunoassay | 2018N375127<br>13 week repeat dose toxicity study in monkeys with belantamab mafodotin | ADA were captured with [redacted] and detected with [redacted] | |
| | | Sensitivity | 2.97 ng/mL |
| | | Precision Within-run | ≤ 22.4% |
| | | Precision Between-run | ≤ 16.7% |
| | | Cut Point for Screen | 1.16 rECL |
| | | Cut Point for Confirmation | 16.29% inhibition |
| | | Cut Point for Titration assay | 1.72 rECL |
| | | Belantamab mafodotin tolerance | ≤ 10 µg/mL belantamab mafodotin at HQC (3800 ng/mL PC)<br>≤ 0.01 µg/mL belantamab mafodotin at LQC (38 ng/mL PC)<br>≤ 0.1 µg/mL belantamab mafodotin at 100 ng/mL PC |
| | | sBCMA tolerance | ≤ 1000 ng/mL sBCMA at HQC<br>≤ 10 ng/mL sBCMA at LQC<br>≤ 1 ng/mL sBCMA at NC |
| | | Stability | 5 freeze-thaw cycles from -70°C to ambient<br>1 day refrigerated<br>4 hours ambient |

**Immunogenicity Assays Used to Support Monkey GLP Studies with Belantamab Mafodotin (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2018N371414<br>Validation of a Method for the Determination of Anti-GSK2857916 Antibodies in Cynomolgus Serum by an [redacted] Electrochemiluminescent Immunoassay | 2018N375127<br>13 week repeat dose toxicity study in monkeys with belantamab mafodotin | Following [redacted], ADA were captured with [redacted] and detected with [redacted] | |
| | | Sensitivity | 4.88 ng/mL |
| | | Precision Within-run | ≤ 22.6% |
| | | Precision Between-run | ≤ 17.0% (≤ 32.3% at BC) |
| | | Cut Point for Screen | 1.12 rECL |
| | | Cut Point for Confirmation | 22.42% inhibition |
| | | Cut Point for Titration assay | 1.26 rECL |
| | | sBCMA tolerance | ≤ 1000 ng/mL sBCMA at HQC (2500 ng/mL PC)<br>≤ 1000 ng/mL sBCMA at LQC (25 ng/mL PC)<br>≤ 10 ng/mL sBCMA at NC |
| | | Belantamab mafodotin tolerance | 400 µg/mL belantamab mafodotin at HQC, LQC and 100 ng/mL PC |
| | | Stability | 4 cycles from -70°C to ambient<br>7 days refrigerated<br>24 hours ambient |

**Immunogenicity Assays Used to Support Monkey GLP Studies with Belantamab Mafodotin (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2018N371395<br>Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 Specific Circulating Immune Complexes and GSK2857916 Anti-Drug Antibodies in Cynomolgus Monkey Serum using an Electrochemiluminescent Immunoassay | 2018N375127<br>13 week repeat dose toxicity study in monkeys with belantamab mafodotin | Belantamab mafodotin was captured with a [redacted] Captured immune complexes were detected with a [redacted] | |
| | | Limit of Detection | 1.93 rECL |
| | | Precision Within-run | ≤ 21.2% |
| | | Precision Between-run | ≤ 15.9% |
| | | Belantamab mafodotin tolerance | 3.8 mg/mL belantamab mafodotin |
| | | sBCMA tolerance | 1000 ng/mL sBCMA |
| | | Stability | 5 freeze-thaw cycles from -70°C to ambient<br>7 days refrigerated<br>24 hours ambient |

**Key:**
rECL = relative electrochemiluminescent response
HQC = high quality control
LQC = low quality control
NC = negative control
PC = positive control
sBCMA = Soluble BCMA

**Table A1.10 Pharmacokinetic Assays for GSK2857914 Used to Support Monkey GLP Studies with GSK2857914**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2012N155837<br>The Validation of a Method for the Determination of GSK2857914 in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 – 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay (Method Reference Number: [redacted])<br><br>2014N198075<br>Supplemental Validation Data | 2012N150466<br>4 week repeat dose toxicity study in monkeys with GSK2857914 | GSK2857914 was captured from monkey plasma using [redacted] and detected using a [redacted] conjugated to a Horseradish Peroxidase reporter tag. | |
| | | LLQ | 500 ng/mL |
| | | Validated Range | 500 to 10000 ng/mL |
| | | Minimum Dilution Required | 100-fold in assay buffer |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤4.6% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤4.1% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -3.6% to +4.9% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -0.8% to +1.4% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | Passed |
| | | Stability in Monkey Plasma | 3 freeze-thaw cycles from -20°C to ambient temperature<br>3 freeze-thaw cycles from -80°C to ambient temperature<br>24 hours at ambient temperature<br>49 days at -20°C |
| | | Stability in Monkey Whole Blood | Stability of unconjugated belantamab mafodotin demonstrated in 2013N160140; 2 hours on wet ice |

**Pharmacokinetic Assays for GSK2857914 Used to Support Monkey GLP Studies with GSK2857914 (Continued)**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2023N535109Full Validation of a Method for the Determination of GSK2857914 in Cynomolgus Monkey Plasma using a Gyrolab Immunoassay | 2023N536587<br>13-week repeat dose toxicity study in monkeys with GSK2857914 | GSK2857914 was captured from monkey plasma using biotinylated [redacted] and detected using [redacted] | |
| | | LLQ | 5 µg/mL |
| | | Validated Range | 5 to 250 µg /mL |
| | | Minimum Dilution Required | 200-fold in sample diluent |
| | | Within-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤18.5% |
| | | Between-run Precision (%CV)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | ≤8.2% |
| | | Within-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | -1.1% to +15.3% |
| | | Between-run Accuracy (%Bias)<br>(Target ± 20% or ± 25% at LLQ) | +4.7% to +10.2% |
| | | Incurred Sample Reproducibility | N/A |
| | | Stability in Monkey Plasma | 6 freeze-thaw cycles from -20°C to ambient temperature<br>6 freeze-thaw cycles from -70°C to ambient temperature<br>24 hours at ambient temperature<br>120 days at -20°C<br>120 days at -70°C |
| | | Stability in Monkey Whole Blood | N/A |

**Table A1.11 Immunogenicity Assays Used to Support Monkey GLP Study with GSK2857914**

| Validation Report Number | Study supported | Validation parameters | |
|---|---|---|---|
| 2017N344874<br>Validation Report for an Electrochemiluminescent Immunoassay Method for the Detection of Antibodies Against GSK2857916 in Cynomolgus Monkey Serum | 2012N150466<br>4 week repeat dose toxicity study in monkeys with GSK2857914 | ADA were captured with [redacted] and detected with [redacted] | |
| | | Sensitivity | 3.8 ng/mL |
| | | Precision Within-run | ≤ 8.6% |
| | | Precision Between-run | ≤ 8.5% |
| | | Cut Point for Screen | 79 ECL |
| | | Cut Point for Confirmation | 20% inhibition |
| | | GSK2857914 tolerance | 100 ng/mL GSK2857914 at 3.8 ng/mL PC |

**ヒトでの試験**

ヒトの安全性／薬物動態（PK）試験で使用したヒト血漿中ベランタマブ　マホドチン（ADC）、ベランタマブ　マホドチン（総 mAb）及び cys-mcMMAF 並びにヒト尿中 cys-mcMMAF を定量するための分析法については、バリデーションを実施しており、その概要を 2.7.1.に示した。報告書は 5.3.1.4 に添付した。

## Appendix 2 ADDITIONAL INFORMATION

以下の検討はグラクソ・スミスクライン（GSK）社内で確認し、ベランタマブ　マホドチンの安全性評価に影響するものではないと判断したため、これらの報告書はベランタマブ　マホドチンの評価に供した試験の一覧表には含めていない。なお、これらの試験には、候補化合物選定段階で複数の化合物を対象に実施された初期スクリーニング試験は含まれていない。

| Report No. (Study No.) | Title | Reason for Exclusion from Study Listing Tables |
|---|---|---|
| 2013N159206 | The Validation of a Method for the Determination of cys-mcMMAF in Rat Plasma (range 0.5 to 500 ng/mL) using HPLC/MS/MS | Considered unsuitable to support toxicity studies |
| 2013N160169 | The Validation of a Method for the Determination of cys-mcMMAF in Rat Urine (range 0.5 to 500 ng/mL) using HPLC/MS/MS | |
| 2018N371757 | Statistical Report: Determination of Cut Points and Assay Acceptance Ranges for GSK2857916 Anti-Drug Antibody (ADA) Assay in Rat Serum | Statistical support for validation reports |
| 2018N371412 | Statistical Report: Determination of Cut Points and Assay Acceptance Ranges for GSK2857916 Anti-Drug Antibody (ADA) Assay in Cynomolgus Monkey Serum | |
| 2018N364601 | Statistical Report: Determination of Cut Points and Assay Acceptance Criteria for GSK2857916 Anti-Drug Antibody (ADA) Assay in Cynomolgus Monkey Serum | |
| 2018N371325 | Statistical Report: Determination of Limit of Detection and Assay Acceptance Ranges for GSK2857916 Circulating Immune Complex (CIC) Assay in Cynomolgus Monkey Serum | |
| 2014N193821 | Determination of cys-mcMMAF in Serum using Solid Phase Extraction and LC/MS/MS Detection | Early method development |
| 2013N161804 | The Abbreviated Validation of a Method for the Determination of Cys-MCMMAF (range 20 to 5000 pg/mL) in Cynomolgus Monkey Plasma using HPLC-MS/MS. Method Reference Number: MMAFCYPLVALB | Not used to support toxicity studies |
| 2017N322393 | Preliminary Characterisation of Metabolites of Cys-mcMMAF related metabolites of GSK2857916 in Human Urine | No metabolites identified, only release of small molecule payload confirmed. |

| Report No. (Study No.) | Title | Reason for Exclusion from Study Listing Tables |
|---|---|---|
| 2022N511986 | Feasibility Assessment to Evaluate the Non-specific Binding of CYS-MCMMAF in Human Dialysate by UHPLC-MS/MS Analysis | Accurate and precise analysis in human dialysate determined not feasible. |

# Appendix 3 TEST ARTICLE AND ANALYTE DESCRIPTIONS

## Table A3.1 Test Article and Analyte Descriptions for In Vitro Studies

| Report No | Study | Description of test article in report | Description of test article in submission documents | Analyte description in report | Analyte description in submission documents |
|---|---|---|---|---|---|
| 2014N206529 | Plasma stability | GSK2857916 (ADC) | Belantamab mafodotin | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF |
| 2018N388212 | Plasma stability | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | Not applicable | Not applicable |
| 2013N177537 | CYP450 inhibition | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF | Not applicable | Not applicable |
| 2013N177532 | CYP450 induction | cys-mcMMAF (SGD-1362) | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF |
| 2018N393077 | Hepatic S9 metabolism | $^{3}$H-SGD-1362 | $^{3}$H-cys-mcMMAF | SGD-1362 | cys-mcMMAF |
| 2019N400355 | Plasma protein binding | SGD-1362 (cys-mcMMAF) | cys-mcMMAF | SGD-1362 | cys-mcMMAF |
| 2013N177541 | P-glycoprotein interaction | cys-mcMMAF (SGD-1362) | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF |
| 2018N393080 | Transporter interaction | $^{3}$H-SGD-1362 | $^{3}$H-cys-mcMMAF | SGD-1362 | cys-mcMMAF |
| 2019N398699 | Transporter interaction | SGD-1362 (cys-mcMMAF) | cys-mcMMAF | SGD-1362 | cys-mcMMAF |
| 2019N409936 | Cellular uptake | GSK2857916A | Belantamab mafodotin | GSK2857916A<br>cys-mcMMAF | Belantamab mafodotin (Total mAb)<br>cys-mcMMAF |

**Table A3.2 Test Article and Analyte Descriptions for In Vivo Studies Following Administration of Belantamab Mafodotin**

| Report No | Study | Description of test article in report | Description of test article in submission documents | Analyte description in report | Analyte description in submission documents |
|---|---|---|---|---|---|
| 2012N134122 | Rat MTD | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916<br>Total mAb<br>cys-mcMMAF | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb)<br>cys-mcMMAF |
| 2013N174857 | 3 week rat | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916 (ADC)<br>GSK2857916 (Total)<br>cys-mcMMAF | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb)<br>cys-mcMMAF |
| 2018N374327 | 13 week rat | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916 (ADC)<br>GSK2857916 (mAb)<br>cys-mcMMAF | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb)<br>cys-mcMMAF |
| 2012N133495 | Monkey MTD | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916<br>GSK2857914<br>MMAF | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb)<br>cys-mcMMAF |
| 2013N158643 | 3 week monkey | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916 (ADC)<br>GSK2857916 (Total)<br>cys-mcMMAF | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb)<br>cys-mcMMAF |
| 2018N375127 | 13 week monkey | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916 (ADC)<br>GSK2857916 (mAb)<br>MMAF | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb)<br>cys-mcMMAF |
| 2018N385412 | 2/4 week rabbit | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916 (ADC)<br>GSK2857916 (Total mAb)<br>cys-mcMMAF | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb)<br>cys-mcMMAF |
| 2013N175927 | Mouse IV PK | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916 (ADC)<br>GSK2857916 (Total) | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb) |
| 2013N176011 | Mouse IP PK | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916 (ADC)<br>GSK2857916 (Total) | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb) |

**Test Article and Analyte Descriptions for In Vivo Studies Following Administration of Belantamab Mafodotin (Continued)**

| Report No | Study | Description of test article in report | Description of test article in submission documents | Analyte description in report | Analyte description in submission documents |
|---|---|---|---|---|---|
| 2012N140200 | Rat IV PK | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916 (ADC)<br>GSK2857916 (total mAb) | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb) |
| 2013N157994<br>2012N143303 | Monkey IV PK | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916 (ADC)<br>GSK2857916 (total mAb) | Belantamab mafodotin (ADC)<br>Belantamab mafodotin (Total mAb) |
| 2018N358667 | Rat distribution | GSK2857916 | Belantamab mafodotin | GSK2857916 | Belantamab mafodotin (Total mAb) |
| 2018N394006 | Rat distribution | GSK2857916A | Belantamab mafodotin | GSK2857916A<br>cys-mcMMAF | Belantamab mafodotin (Total mAb)<br>cys-mcMMAF |

**Table A3.3 Test Article and Analyte Descriptions for In Vivo Studies Following Administration of Cys-mcMMAF**

| Report No | Study | Description of test article in report | Description of test article in submission documents | Analyte description in report | Analyte description in submission documents |
|---|---|---|---|---|---|
| 2013N177526 | Rat DRF | SGD-1362 (cys-mcMMAF) | cys-mcMMAF | SGD-1362 (cys-mcMMAF) | cys-mcMMAF |
| 2013N177527 | 5 day rat | SGD-1362 (cys-mcMMAF) | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF |
| 2013N177529 | Monkey DRF | SGD-1362 (cys-mcMMAF) | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF |
| 2013N177530 | 5 day monkey | SGD-1362 (cys-mcMMAF) | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF | cys-mcMMAF |
| 2019N415388 | Rat IV PK | SGD-1362 | cys-mcMMAF | SGD-1362 or cys-mcMMAF | cys-mcMMAF |
| 2019N415363 | Monkey IV PK | SGD-1362 | cys-mcMMAF | SGD-1362 or cys-mcMMAF | cys-mcMMAF |
| 2018N393078 | Rat excretion | $^{3}$H-SGD-1362 | $^{3}$H-cys-mcMMAF | $^{3}$H-SGD-1362 | cys-mcMMAF |

**Table A3.4 Test Article and Analyte Descriptions for In Vivo Studies Following Administration of GSK2857914**

| Report No | Study | Description of test article in report | Description of test article in submission documents | Analyte description in report | Analyte description in submission documents |
|---|---|---|---|---|---|
| 2012N150466 | 4-week monkey | GSK2857914 | GSK2857914 | GSK2857914 | GSK2857914 |
| 2013N175927 | Mouse PK | GSK2857914 | GSK2857914 | GSK2857914 | GSK2857914 |
| 2012N140200 | Rat IV PK | GSK2857914 | GSK2857914 | GSK2857914 | GSK2857914 |
| 2013N157994<br>2012N143303 | Monkey IV PK | GSK2857914 | GSK2857914 | GSK2857914 | GSK2857914 |
| 2023N536587 | 13-week monkey | GSK2857914 | GSK2857914 | GSK2857914 | GSK2857914 |

## 2.6.5. 薬物動態試験概要表

# 1. PHARMACOKINETICS: OVERVIEW FOR BELANTAMAB MAFODOTIN

**Table 1.1 Listing of Absorption 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) | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pharmacokinetics | Mouse (C57/BL6) | 12M | IV (bolus) | ADC MAB | 1 mg/kg | Single | No | GSK | 2013N175927 (DT/Mouse/ PK/2011/007) | m4.2.2.2 |
| Pharmacokinetics | Mouse (CB17 SCID) | 3M | IP | ADC | 4 mg/kg | Single | No | GSK | 2013N176011 BD/2012/M005) | m4.2.2.2 |
| Pharmacokinetics | Rat (Strain not recorded) | 3M | IV (bolus) | ADC, MAB | 1 mg/kg | Single | No | GSK | 2012N140200 | m4.2.2.2 |
| Pharmacokinetics | Rat (SD) | 6M | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 0.3, 1, 3 mg/kg | Single | Yes | [redacted] | 2019N415388 (1019-012) | m4.2.2.2 |
| Pharmacokinetics | Monkey (cynomolgus) | 3M | IV (bolus) | ADC, MAB | 1 mg/kg | Single | No | [redacted]/GSK[d] | 2013N157994 and 2012N143303 | m4.2.2.2 |
| Pharmacokinetics | Monkey (cynomolgus) | 3M | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 0.3, 1, 3 mg/kg | Single | Yes | [redacted] | 2019N415363 (1019-013) | m4.2.2.2 |
| Toxicokinetics[a] | Rat (Wistar Han) | 3M/3F | IV (bolus) | ADC | 10, 30, 100 mg/kg | Single | No | GSK | 2012N134122 (R29778) | m4.2.3.1 |
| Toxicokinetics[a] | Rat (SD) | 6F | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 2.5, 10, 17.5, 25 mg/kg | Single | No | [redacted] | 2013N177526 (R-TOX-44) | m4.2.3.1 |

## List of Absorption Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/ Group | Method of Administration | Form | Dose (mg/kg/week) | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Toxicokinetics[a] | Monkey (cynomolgus) | 1 or 2 M/F | IV (bolus) | ADC | 3, 10, 30 mg/kg | Single | No | GSK | 2012N133495 (D11146) | m4.2.3.1 |
| Toxicokinetics | Monkey (cynomolgus) | 1M/1F | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 1, 3, 6, 10 mg/kg | Single | Yes | [redacted] | 2013N177529 (1019-008) | m4.2.3.1 |
| Toxicokinetics[b] | Rat (Wistar Han) | Up to 6M/6F | IV (infusion) | ADC | 3, 10, 30[f] | 3 Weeks[c] (Days 1 and 15) | Yes | GSK | 2013N174857 (R30467G) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[b] | Rat (Wistar Han) | 6M/6F | IV (infusion) | ADC | 3, 10, 30 | 13 Weeks[e] (Weeks 4 and 10) | Yes | [redacted] | 2018N374327 (R32025G) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[a] | Rat (SD) | Up to 12M/12F | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 1, 5, 10 mg/kg/day | 5 Days (Days 1 and 5) | Yes | [redacted] | 2013N177527 (1019-010) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[c] | Rabbit (NZW) | 3F | IV (bolus) | ADC | 30<br>15<br>30 | 2 weeks (Day 1 and 8)<br>4 weeks (Day 1 and 22)<br>4 weeks (Day 22) | No | GSK | 2018N385412 (L32295N) | m4.2.3.2[f] |
| Toxicokinetics[c] | Rabbit (DB) | 6F | IV (bolus) | ADC | 30<br>15 | 4 weeks (Day 1 and 22)<br>3 weeks (Day 36 and 43) | No | GSK | 2021N465838 (L71822N) | m4.2.3.2[f] |
| Toxicokinetics[b] | Monkey (cynomolgus) | 3M/3F | IV (bolus) | ADC | 1, 3, 10[f] | 3 Weeks[c] (Weeks 1 and 3) | Yes | GSK | 2013N158643 (P70260G) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[b] | Monkey (cynomolgus) | 3 or 5 M/F | IV (bolus) | ADC | 1, 3, 10 | 13 Weeks[c] (Weeks 4 and 13) | Yes | [redacted] | 2018N375127 (P71346G) | m4.2.3.2 |

## List of Absorption Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/ Group | Method of Administration | Form | Dose (mg/kg/week) | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Toxicokinetics[a] | Monkey (cynomolgus) | 5M/5F | IV (bolus) | cys-mcMMAF | 0.5, 2, 5 mg/kg/day | 5 Days (Days 1 and 5) | Yes | [redacted] | 2013N177530 (1019-009) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics[b] | Monkey (cynomolgus) | 3M/3F | IV (bolus) | MAB | 10, 30, 100 | 4 Weeks[c] (Weeks 1,3 and 4) | Yes | GSK | 2012N150466 (P70204G) | m4.2.3.2 |
| Toxicokinetics | Monkey (cynomolgus) | 3M/3F, 4M4F[g]<br>3M/3F | SC<br>IV (bolus) | MAB | 2, 10<br>40 | 13 Weeks[c] (Weeks 4 and 13) | Yes | [redacted] | 2023N536587 (P73042G) | m4.2.3.2 |

**Key:**
a = Dosing was followed by a 2 week off period.
b = Dosing was followed by a 12 week off dose period.
c = Animals were dosed once weekly.
d = The serum samples analysed in GSK Report 2012N143303 were obtained from a separate study conducted at [redacted] France (Report 2013N157994).
e = Animals were dosed once every 3 weeks.
f = The report for this study has been placed in m4.2.3.2 rather than m4.2.3.7.3 for administrative purposes only.
g = SC 2 mg/kg/week dose only.
DB = Dutch Belted; mAb = Monoclonal antibody.
MMAF = Monomethyl auristatin F.
IP = Intraperitoneal; IV = Intravenous.
SD = Sprague-Dawley; NZW = New Zealand White.

**Forms:**
ADC = Belantamab mafodotin.
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].
(On [redacted] the legal entity [redacted] was renamed as [redacted]).
GSK = GlaxoSmithKline.
[redacted] = [redacted].

**Table 1.2 Listing of Distribution 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) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Protein binding | Human plasma | NA | In vitro | cys-mcMMAF | Up to 50 ng/mL | NA | No | [redacted] | 2019N400355 (8392093) | m4.2.2.3 |
| Protein binding | Mouse, rat, monkey and human plasma | NA | In vitro | cys-mcMMAF | 0.001 to 1 µM | NA | No | NA[f] | 2020N438179 | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | NA | In vitro | ADC, MAB[c] | 10 and 100 µg/mL | NA | No | GSK | 2019N409936 (N71801-15) | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | Up to 5 donors[h] | In vitro | ADC, MAB[c] | 10 and 100 µg/mL | NA | No | GSK | 2020N451323 (N70440-40) | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | Up to 4 donors[h] | In vitro | ADC, MAB[c] | 10 and 100 µg/mL | NA | No | GSK | 2021N462413 | m4.2.2.3 |
| Clathrin-mediated endocytosis | Human HCEC and RPTEC | Up to 4 donors[h] | In vitro | ADC | Up to 1000 µg/mL | NA | No | GSK | 2021N468100 | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | Up to 6 donors[h] | In vitro | ADC, MAB | Up to 100 µg/mL | NA | No | GSK | 2021N483916 | m4.2.2.3 |
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | Up to 6 donors[h] | In vitro | ADC, MAB | Up to 100 µg/mL | NA | No | GSK | 2022N506651 | m4.2.2.3 |
| Endocytic pathway siRNA assessment | HCEC | Up to 3 donors | In vitro | ADC, MAB | Up to 100 µg/mL | NA | No | [redacted] | 2023N539431 | m4.2.2.3 |

## Listing of Distribution 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) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occanasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cellular uptake | Human HCEC and RPTEC | Up to 5 donors | In vitro | ADC, MAB | Up to 100 µg/mL | NA | No | GSK | 2023N528252 | m4.2.2.3 |
| Interaction with P-glycoprotein (MDR1) | In vitro MDCKII cells transfected with P-gp | NA | In vitro | cys-mcMMAF | 100 nM | NA | No | [redacted] | 2013N177541 (PDM-001) | m4.2.2.3 |
| Transporter-mediated uptake and inhibition[a] | MDCKII, Sf9 or HEK293 cells | NA | In vitro | $^{3}$H-cys-mcMMAF | Up to 200 nM | NA | No | [redacted] | 2018N393080 (SeaGen-13-06Dec2016) | m4.2.2.3 |
| Transporter-mediated uptake[a] | MDCKII or HEK293 cells | NA | In vitro | cys-mcMMAF | Up to 10 µM | NA | No | [redacted] | 2019N398699 (GSK-32-25May2018) | m4.2.2.3 |
| Biodistribution | Rat (Wistar Han) | 3F | IV (slow bolus) | ADC, MAB[b] | 30 | Single | No | GSK | 2018N358667 (N6469-10) | m4.2.2.3 |
| Biodistribution | Rat (Wistar Han) | 9F | IV (slow bolus) | ADC, MAB[c] | 30 | Single | No | GSK | 2018N394006 (N41556-21) | m4.2.2.3 |
| Distribution into tears | Rabbit (NZW) | 3F | IV (bolus) | ADC | 15, 30 mg/kg/week | Up to 4 weeks[d] | No | GSK | 2018N385412 (L32295N) | m4.2.3.2[e] |

## Listing of Distribution 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) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occanasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Distribution into tears | Rabbit (DB) | 6F | IV (bolus) | ADC | 15, 30 mg/kg/week | Up to 7 weeks[g] | No | GSK | 2021N465838 (L71822N) | m4.2.3.2[e] |

**Key:**
a = Transporters investigated included some or all of the following:
Breast cancer resistance protein (BCRP)
Bile salt export pump (BSEP)
Multidrug resistance protein 1 (MDR1), also known as P-glycoprotein (P-gp).
Multidrug resistance associated protein (MRP)1, MRP2, MRP3, MRP4 and MRP5.
Organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3 (OATP1B1 and OATP1B3).
Organic anion transporter (OAT) OAT1 and OAT3.
Organic cation transporter (OCT) OCT1 and OCT2.
Multidrug and toxin extrusion proteins 1 and 2-K (MATE1 and MATE2-K).
HEK293 = Human embryonic kidney cells stably transfected with BCRP, BSEP, MDR1, MRP2/3/4/5, OATP1B1/1B3, OAT1/3 or OCT1/2.
MDCKII = Madin Darby Canine Kidney II cells transfected with MATE1 or MATE2-K
Sf9 = Spodoptera frugiperda transfected with MRP1.
b = Belantamab mafodotin and GSK2857914 were conjugated to a fluorescent probe (VivoTag 750).
c = Belantamab mafodotin and GSK2857914 were conjugated to a fluorescent probe (Vivotag 680).
d = Assessed as part of a non-GLP tolerability and ocular toxicity study in rabbits. Animals were dosed once weekly for two (0 or 30 mg/kg/week) or four weeks (0, 15 or 30 mg/kg/week).
e = The report for this study has been placed in m4.2.3.2 rather than m4.2.3.7.3 for administrative purposes only.
f = Study conducted by a partner company and a redacted report is available; test facility information has been redacted.
g = Assessed as part of a non-GLP ocular toxicity study in DB rabbits. Animals received a dose of 30 mg/kg once weekly for the first four doses and 15 mg/kg once weekly thereafter (total 7 doses).
h = Variable number of donors used in experiments.
DB = Dutch Belted; MAB = Monoclonal antibody; MMAF = Monomethyl auristatin F.
HCEC = human corneal epithelial cells; RPTEC = renal proximal tubule epithelial cells
IV = Intravenous; NZW = New Zealand White.

**Forms:**
ADC = Belantamab mafodotin.
cys-mcMMAF = Microtubule inhibitor MMAF conjugated to cysteine via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker [The active cytotoxic moiety released from belantamab mafodotin].
$^{3}$H-cys-mcMMAF = Radiolabeled cys-mcMMAF.
MAB = GSK2857914, unconjugated mAb (parent anti-BCMA antibody).

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

**Table 1.3 Listing of Metabolism 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) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Stability in plasma | Rat, Monkey, Human | NA | In vitro | ADC | 100 µg/mL | NA | No | GSK | 2014N206529 (14DMM005) | m4.2.2.4 |
| Stability in serum | Human | NA | In vitro | ADC | 100 µg/mL | NA | No | GSK | 2018N388212 | m4.2.2.4 |
| Cellular catabolism | Human HCEC and RPTEC | NA | In vitro | ADC, MAB | 10 and 100 µg/mL | NA | No | GSK | 2019N409936 (N71701-15) | m4.2.2.3 |
| Cellular catabolism | Human HCEC and RPTEC | NA | In vitro | ADC, MAB | 10 and 100 µg/mL | NA | No | GSK | 2020N451323 (N70440-40) | m4.2.2.3 |
| Metabolite profiling | Rat, Monkey, Human (hepatic S9) | NA | In vitro | $^{3}$H-cys-mcMMAF | 10 µM | NA | No | [redacted] | 2018N393077 (8348052) | m4.2.2.4 |
| Metabolite profiling | Mouse, Rat, Monkey, Human hepatocytes and recombinant human enzymes | NA | In vitro | $^{3}$H-cys-mcMMAF | 1 or 10 µM | NA | No | NA | 2020N438184 | m4.2.2.4 |
| CYP Inhibition | Human liver microsomes | NA | In vitro | cys-mcMMAF | 0.001 to 1 µM | NA | No | [redacted] | 2013N177537 (XT105075) | m4.2.2.4 |
| CYP Induction | Human cryopreserved hepatocytes | NA | In vitro | cys mcMMAF | 10 to 1000 nM | NA | No | [redacted] | 2013N177532 (SEGI-20100616D-HI) | m4.2.2.4 |

**Listing of Metabolism Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/Group | Method of Administration | Form | Dose (mg/kg) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Metabolite profiling[a] | Rat (SD) | 4M | IV | $^{3}$H-cys-mcMMAF | 10 | Single | No | [redacted] | 2018N393078 (8348051) | m4.2.2.5 |

**Key:**
a = This was a two part protocol which generated two separate reports. Only the report on $^{3}$H-cys-mcMMAF is listed.
b = Study conducted by a partner company and a redacted report is available; test facility information has been redacted.
CYP = Cytochrome P450;
HCEC = human corneal epithelial cells; IV = Intravenous;
NA = Not applicable; MMAF = Monomethyl auristatin F.
RPTEC = renal proximal tubule epithelial cells;
SD = Sprague-Dawley;
S9 = Hepatic post-mitochondrial supernatant.

**Forms:**
ADC = Belantamab mafodotin.
cys-mcMMAF = Microtubule inhibitor MMAF conjugated to cysteine via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker [The active cytotoxic moiety released from belantamab mafodotin].
$^{3}$H-cys-mcMMAF = Radiolabeled cys-mcMMAF.

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

**Table 1.4 Listing of Excretion Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin**

| Type of Study | Species (Strain)/ Test System | No./Sex/ Group | Method of Administration | Form | Dose (mg/kg/week) or Concentration | Duration of Dosing (Sampling Occasions) | GLP | Testing Facility | Report No. (Study No.) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Excretion and mass balance[a] | Rat (SD) | 4M | IV | $^{3}$H-cys-mcMMAF | 10 mg/kg | Single | No | [redacted] | 2018N393078 (8348051) | m4.2.2.5 |
| Urinary excretion | Rat (Wistar Han) | 6M/6F | IV (infusion) | ADC | 3, 10, 30 | 3 Weeks[b] | Yes | GSK | 2013N174857 (R30467G) | m4.2.3.2 |

**Key:**
a = This was a two-part protocol which generated two separate reports. Only the report on $^{3}$H-cys-mcMMAF is listed.
b = Animals were dosed once weekly.
mAb = Monoclonal antibody; MMAF = Monomethyl auristatin F.
IV = Intravenous; SD = Sprague-Dawley.

**Forms:**
ADC = Belantamab mafodotin.
cys-mcMMAF = Microtubule inhibitor MMAF conjugated to cysteine via a protease resistant maleimidocaproyl (mc) linker [The active cytotoxic moiety released from belantamab mafodotin].
$^{3}$H-cys-mcMMAF = Radiolabeled cys-mcMMAF.

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

**Table 1.5　Listing of Pharmacokinetic Drug-Drug Interaction Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin**

No studies of this type were conducted to support the development of belantamab mafodotin.

**Table 1.6　　Listing of Other Pharmacokinetic Studies Performed to Support the Development of Belantamab Mafodotin**

No studies of this type were conducted to support the development of belantamab mafodotin.

# 2. ANALYTICAL METHODS AND VALIDATION REPORTS

## Table 2.1 Pharmacokinetics: Analytical Methods and Validation Reports

| Type of Study | Species | Quantification Limits | Report No. (Method Reference) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|
| **Bioanalysis Validation Reports (Rat ADC)** | | | | |
| Method for the determination of GSK2857916 (ADC) in Rat Plasma (range 50 to 15000 ng/mL) using a Gyrolab Fluorescent Immunoassay | Rat | 50 to 15000 ng/mL | 2012N156879 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Supplemental Validation Data to "The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 (ADC) in Rat Plasma (range 50 – 15000 ng/mL) using a Gyrolab Fluorescent Immunoassay" | Rat | 50 to 15000 ng/mL | 2013N175800 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Method for the Determination of GSK2857916 (ADC) in Rat Plasma (Range 250 to 5000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay | Rat | 250 to 5000 ng/mL | 2018N369048 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (Rat total mAb)** | | | | |
| Method for the determination of GSK2857916 (TOTAL) in Rat Plasma (range 50 to 15000 ng/mL) using a Gyrolab Fluorescent Immunoassay | Rat | 50 to 15000 ng/mL | 2012N156875 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Supplemental Validation Data to "The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 (Total) in Rat Plasma (range 50 – 15000 ng/mL) using a Gyrolab Fluorescent Immunoassay" | Rat | 50 to 15000 ng/mL | 2013N175799 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Method for the Determination of GSK2857916 (mAb) in Rat Plasma (Range 250 to 5000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay | Rat | 250 to 5000 ng/mL | 2018N369049 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (Rat cys-mcMMAF)** | | | | |
| The Validation of a Method for the Determination of CYS-MCMMAF in Rat Plasma (range 0.5 to 500 ng/mL) using HPLC/MS/MS | Rat | 0.5 to 500 ng/mL | 2013N171243 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| The Validation of a Method for the Determination of CYS-MCMMAF in Rat Urine (range 0.5 to 500 ng/mL) using HPLC/MS/MS | Rat | 0.5 to 500 ng/mL | 2013N173108 ([redacted]) | m4.2.2.1 |

## List of Analytical Method and Validation Reports used to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

| Type of Study | Species | Quantification Limits | Report No. (Method Reference) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|
| HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys-mcMMAF from Rat $K_2$EDTA Plasma | Rat | 0.05 to 10 ng/mL | 2018N376609 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys-mcMMAF from Rat $K_2$EDTA Plasma | Rat | 0.5 to 5000 ng/mL | 2019N415409 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Addendum to HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys-mcMMAF from Rat $K_2$EDTA Plasma | Rat | 0.5 to 5000 ng/mL | 2019N415376 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (Monkey ADC)** | | | | |
| Method for the Determination of GSK2857916 ADC in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500-10000 ng/mL using a Chemiluminescent Immunoassay | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2013N159339 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Supplemental Validation Data to 'The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 ADC in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 to 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay' | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2013N183711 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (Monkey total mAb)** | | | | |
| The Method for the Determination of GSK2857916 MAb in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500-10000 ng/mL using a Chemiluminescent Immunoassay | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2013N160140 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Supplemental Validation Data to 'The Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 mAb in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 to 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay' | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2013N183813 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (GSK2857914)** | | | | |
| The Validation of a Method for the Determination of GSK2857914 in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 – 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2012N155837 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Full Validation of a Method for the Determination of GSK2857914 in Cynomolgus Monkey using a Gyrolab Immunoassay | Monkey | 5 to 250 µg/mL | 2023N535109 ([redacted]) | m4.2.2.1 |

## List of Analytical Method and Validation Reports used to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

| Type of Study | Species | Quantification Limits | Report No. (Method Reference) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|
| Supplemental Validation Data to 'The Validation of a Method for the Determination of GSK2857914 in Cynomolgus Monkey Plasma (range 500 to 10000 ng/mL) using a Chemiluminescent Immunoassay' | Monkey | 500 to 10000 ng/mL | 2014N198075 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Bioanalysis Validation Reports (Monkey cys-mcMMAF)** | | | | |
| The Validation of a Method for the Determination of Cys-mc-MMAF in Cynomolgus Plasma (range 150 to 10000 pg/mL) using HPLCMS/MS | Monkey | 150 to 10000 pg/mL | 2013N173798 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys mcMMAF from Cynomolgus Monkey $K_2$EDTA Plasma | Monkey | 0.05 to 10 ng/mL | 2018N376610 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys mcMMAF from Cynomolgus Monkey $K_2$EDTA Plasma | Monkey | 0.5 to 1000 ng/mL | 2019N415366 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Addendum to HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of Cys mcMMAF from Cynomolgus Monkey $K_2$EDTA Plasma | Monkey | 0.5 to 1000 ng/mL | 2019N415308 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| **Immunogenicity Validation Reports** | | | | |
| The Validation of a Method for the Determination of Anti-GSK2857916 Antibodies in Rat Serum by an [redacted] Homogeneous Bridging Electrochemiluminescent Immunoassay | Rat | NA | 2018N371901 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Validation Report for an Electrochemiluminescent Immunoassay Method for the Detection of Antibodies Against GSK2857916 in Cynomolgus Monkey Serum | Monkey | NA | 2017N344874 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| Validation of a Method for the Determination of Anti-GSK2857916 Antibodies in Cynomolgus Serum by an [redacted] Electrochemiluminescent Immunoassay | Monkey | NA | 2018N371414 ([redacted]) | m4.2.2.1 |
| The Validation of a Method for the Determination of Anti-GSK2857916 Antibodies in Cynomolgus Serum using an Electrochemiluminescent Homogeneous Bridging Immunoassay | Monkey | NA | 2018N365647 ([redacted]) | m4.2.2.1 |

## List of Analytical Method and Validation Reports used to Support the Development of Belantamab Mafodotin (Continued)

| Type of Study | Species | Quantification Limits | Report No. (Method Reference) | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|
| Validation of a Method for the Determination of GSK2857916 Specific Circulating Immune Complexes and GSK2857916 Anti-Drug Antibodies in Cynomolgus Monkey Serum using an Electrochemiluminescent Immunoassay | Monkey | NA | 2018N371395 ([redacted]) | m4.2.2.1 |

**Key:**

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 = Monoclonal antibody; NA = Not Applicable. HPLC/MS/MS = High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

# 3. PHARMACOKINETICS: ABSORPTION AFTER A SINGLE DOSE

## Table 3.1 Pharmacokinetics: Absorption after a Single Intravenous or Intraperitoneal Dose (Mouse)

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914 [Batch numbers [redacted] and [redacted], study 2013N175927, batch numbers not recorded for report 2013N176011]
**Location in CTD:** m4.2.2.2
**Studies in compliance with GLP:** No

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Species (Strain):** | **Mouse (C57BL/6)** | | | **Mouse (CB17 SCID)** | |
| **Report No. (Study No.):** | 2013N175927 (DT/Mouse/PK/2011/007) | | | 2013N176011 (BD/2012/M005) | |
| **Gender (M/F)/No. of Animals:** | 12M/group | | | 3M | |
| **Vehicle/Formulation:** | Not stated in the report | | | Not stated in the report | |
| **Method of Administration:** | Intravenous | | | Intraperitoneal | |
| **Dose (mg/kg):** | 1 | | | 4 | |
| **Sample:** | Serum | | | Blood | |
| **Sampling time points:** | 0.25, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 408, and 504 hours | | | 0.25, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 408, and 504 hours | |
| **Assay:** | Gyrolab based immunoassay | | | Gyrolab based immunoassay | |
| **Analyte:** | **GSK2857914** | **Belantamab mafodotin[a]** | | **Belantamab mafodotin[a]** | |
| | | **Total mAb** | **ADC** | **Total mAb** | **ADC** |
| **PK Parameters** | | | | | |
| **Cmax (µg/mL)** | 20.7 | 18.3 | 19.6 | 24.1 | 23.5 |
| **Tmax (h)** | 3 | 3 | 3 | 17 | 24 |
| **AUC0-t (µg.h/mL)** | 2430 | 1810 | 1530 | 5120 | 4820 |
| **AUCinf (µg.h/mL)** | 3190 | 2160 | 1770 | NC | 5790 |
| **t½ (h)** | 319 | 214 | 204 | NC | 182 |
| **MRT (h)** | 154 | 156 | 140 | NC | 174 |
| **Cl (mL/h/kg)** | 0.313 | 0.463 | 0.564 | NC | 0.692 |
| **Vss(mL/kg)** | 109 | 122 | 129 | NC | 183 |

**Additional Information:** There was no evidence of in vivo instability of the conjugated mcMMAF, as the pharmacokinetics of ADC and total mAb were similar. Relative bioavailability for the IP route was approximately 80%.

**Key:**

a = For bioanalytical purposes, belantamab mafodotin is quantified as belantamab mafodotin (ADC) and belantamab mafodotin (total mAb). Belantamab mafodotin (ADC) is defined as GSK2857914 conjugated to one or more mcMMAF groups (DAR >0) and belantamab mafodotin (total mAb) is defined as GSK2857914 with or without conjugated mcMMAF (DAR≥0).

AUC = area under the serum or blood concentration time curve; BCMA = B-cell maturation antigen; Cmax = Maximum observed serum or blood drug concentration.

Cl = clearance; MRT = Mean residence time; NA = Not available; NC = Not calculated; PK= Pharmacokinetics; SCID = Severe combined immunodeficiency.

t½ = Terminal elimination half-life; Tmax = Time at which Cmax occurred; Vss = Volume of distribution at steady-state.

## Table 3.2 Pharmacokinetics: Absorption after a Single Intravenous Dose (Rat and Monkey)

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914 [Batch numbers [redacted] and [redacted], report 2012N140200; Batch numbers [redacted] and [redacted], report 2013N157994]
**Location in CTD:** m4.2.2.2
**Studies in compliance with GLP:** No

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Species (Strain):** | **Rat** (Strain not recorded) | | | **Monkey (cynomolgus)** | | |
| **Report No. (Study No.):** | 2012N140200 (DT/Rat/PK/2011/015; DT/Rat/PK/2011/020) | | | 2013N157994 [in life phase and sample acquisition (A113598)] 2012N143303 [sample analysis (A113598)] | | |
| **Gender (M/F)/No. of Animals:** | 3M/group | | | 3M/group | | |
| **Vehicle/Formulation:** | Not stated in the report | | | Phosphate buffered saline/Solution | | |
| **Method of Administration:** | Intravenous | | | Intravenous | | |
| **Dose (mg/kg):** | 1 | | | 1 | | |
| **Sample:** | Serum | | | Serum | | |
| **Sampling time points:** | 0.25, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 408, and 504 hours. | | | 0.08, 0.5, 1, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 336, 504, 672, 1008, 1176, 1344, and 1680 hours[c] | | |
| **Assay:** | Gyrolab fluorescent immunoassay | | | Gyrolab fluorescent immunoassay | | |
| **Analyte:** | **GSK2857914[a]** | **Belantamab mafodotin[b,d]** | | **GSK2857914** | **Belantamab mafodotin[d]** | |
| | | **ADC** | **Total mAb** | | **ADC** | **Total mAb** |
| **PK Parameters:** | | | | | | |
| **Cmax (µg/mL)** | 27 | 33.3 | 32.7 | 30.7 | 29.2 | 26.8 |
| **Tmax (h)** | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.22 | 0.08 | 0.08 |
| **AUC0-t (µg.h/mL)** | 2670 | 2400 | 3380 | 1600 | 912 | 1040 |
| **AUCinf (µg.h/mL)** | 3460 | 3050 | NC | 1630 | 944 | NC |
| **t½ (h)** | 255 | 252 | NC | 96.1 | 102 | NC |
| **MRT (h)** | 180 | 160 | NC | 105 | 81.7 | NC |

## Pharmacokinetics: Absorption after a Single Intravenous Dose (Rat and Monkey)(Continued)

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914 [Batch numbers [redacted] and [redacted], report 2012N140200; Batch numbers [redacted] and [redacted], report 2013N157994]
**Location in CTD:** m4.2.2.2
**Studies in compliance with GLP:** No

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Species (Strain):** | **Rat** (Strain not recorded) | | | **Monkey (cynomolgus)** | | |
| **Report No. (Study No.):** | 2012N140200 (DT/Rat/PK/2011/015; DT/Rat/PK/2011/020) | | | 2013N157994 [in life phase and sample acquisition (A113598)] 2012N143303 [sample analysis (A113598)] | | |
| **Gender (M/F)/No. of Animals:** | 3M/group | | | 3M/group | | |
| **Vehicle/Formulation:** | Not stated in the report | | | Phosphate buffered saline/Solution | | |
| **Method of Administration:** | Intravenous | | | Intravenous | | |
| **Dose (mg/kg):** | 1 | | | 1 | | |
| **Sample:** | Serum | | | Serum | | |
| **Sampling time points:** | 0.25, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 408, and 504 hours. | | | 0.08, 0.5, 1, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 336, 504, 672, 1008, 1176, 1344, and 1680 hours[c] | | |
| **Assay:** | Gyrolab fluorescent immunoassay | | | Gyrolab fluorescent immunoassay | | |
| **Analyte:** | **GSK2857914[a]** | **Belantamab mafodotin[b,d]** | | **GSK2857914** | **Belantamab mafodotin[d]** | |
| | | **ADC** | **Total mAb** | | **ADC** | **Total mAb** |
| **PK Parameters:** | | | | | | |
| **Cl (mL/h/kg)** | 0.289 | 0.333 | NC | 0.616 | 1.07 | NC |
| **Vss (mL/kg)** | 97.6 | 103 | NC | 70 | 105 | NC |

**Key:**
a = Due to rapid decline in serum concentrations from 504 hours in two of the animals dosed with GSK2857914 the PK parameters for GSK2857914 are based on the data from only one animal.
b = Data dose normalised as belantamab mafodotin dosed at 0.6 mg/kg.
c = Samples also taken at 4800 hours, but not analyzed.
d = 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).
AUC0-t = Area under the serum concentration time curve (from time 0 to last time point); AUCinf = Area under the plasma concentration time curve extrapolated to infinity.
Cmax = Maximum observed serum drug concentration; Cl = Clearance; mAb = Monoclonal antibody; MRT = Mean residence time; NC = Not Calculated.
t½ = Terminal elimination half-life; Tmax = Time at which Cmax occurred; Vss = Volume of distribution at steady-state.

## Table 3.3 Pharmacokinetics: Absorption after a Single Intravenous Dose (Rat and Monkey)

**Test Article:** Cys-mcMMAF[a] [Batch number [redacted]]
**Location in CTD:** m4.2.2.2
**Studies in compliance with GLP:** Yes

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Species (Strain):** | **Rat (Sprague Dawley)** | | | **Monkey (cynomolgus)** | | |
| **Report No. (Study No.):** | 2019N415388 (1019-012) | | | 2019N415363 (1019-013) | | |
| **Gender (M/F)/No. of Animals:** | 6M/group | | | 3M/group | | |
| **Vehicle/Formulation:** | Phosphate buffered saline/Solution | | | Phosphate buffered saline/Solution | | |
| **Method of Administration:** | Intravenous | | | Intravenous | | |
| **Dose (mg/kg):** | 0.3, 1, 3 | | | 0.3, 1, 3 | | |
| **Sample:** | Plasma | | | Plasma | | |
| **Sampling time points:** | 0.03, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36 and 48 hours. | | | 0.03, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36 and 48 hours. | | |
| **Assay:** | HPLC/MS/MS | | | HPLC/MS/MS | | |
| **Analyte:** | Cys-mcMMAF | | | Cys-mcMMAF | | |
| **PK Parameters:** | | | | | | |
| **Dose (mg/kg)** | **0.3** | **1** | **3** | **0.3** | **1** | **3** |
| **Cmax (ng/mL)** | 867 | 1880 | 15000 | 1560 | 1750 | 13900 |
| **Tmax (h)** | 0.0333 | 0.0670 | 0.0443 | 0.0373 | 0.0333 | 0.0333 |
| **AUC0-t (ng.h/mL)** | 124 | 629 | 2520 | 309 | 595 | 2390 |
| **AUCinf (ng.h/mL)** | NR | NR | NR | 330 | 604 | 2390 |
| **t½ (h)** | NR | NR | NR | 8.75 | 5.42 | 4.62 |
| **Cl (mL/h/kg)** | NR | NR | NR | 910 | 1660 | 1250 |
| **Vss (mL/kg)** | NR | NR | NR | 2050 | 1960 | 600 |

**Key:**
a = Cys-mcMMAF exists in two isomeric forms, the linear isomer was administered in these studies.
AUC0-t = Area under the plasma concentration time curve (from time 0 to last time point); AUCinf = Area under the plasma concentration time curve extrapolated to infinity.
Cl = Clearance; Cmax = Maximum observed plasma drug concentration; HPLC/MS/MS = High-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.
NR = No Result since data were not sufficiently robust to derive PK parameters from the terminal elimination phase.
Tmax = Time at which Cmax occurred; t½ = Terminal elimination half-life; Vss = Volume of distribution at steady-state.

Toxicokinetic parameters determined following single administration during toxicology studies are summarized in the individual report tables in m2.6.7, Tables 5.1 to 5.3.

## 4. PHARMACOKINETICS: ABSORPTION AFTER REPEATED DOSES

Toxicokinetic parameters determined following repeated administration of belantamab mafodotin during the definitive toxicology studies are summarized in m2.6.7, Table 3.1 and Table 3.2, Overview of Toxicokinetic Data. Toxicokinetic parameters determined following repeated administration of belantamab mafodotin, cys-mcMMAF or GSK2857914 are summarized in the individual report tables in m2.6.7, Tables 7.1 to 7.8.

# 5. PHARMACOKINETICS: ORGAN DISTRIBUTION

## Table 5.1 Pharmacokinetics: Organ Distribution

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914

**Study Title: Investigation into the distribution of GSK2857916 and cleaved cys-mcMMAF in Rat Eye and other Tissues Following Single IV Bolus Administration at a Target Dose of 30 mg/kg**

**Report date:** January 2019
**Report Number**: 2018N394006
**Study No.:** N41556-21
**Study in compliance with GLP:** No
**Location in CTD**: m4.2.2.3

**Species/Strain:** Rat / Wistar Han
**No. of animals/sex/dose:** 9 (Sex of animals not stated in the report).
**Method of administration:** Single intravenous bolus administration
**Dose (mg/kg):** 30
**Vehicle/Formulation:** Not stated in the report

**Batch numbers:** Belantamab mafodotin [redacted], GSK2857914 [redacted].
**Analytical method:** Fluorescent probe (Vivotag 680 XL), MALDI-MS, SIMS and nano-LCMS

**Sampling Times (hours):** 24 and 48 hours

| | Belantamab mafodotin | | cys-mcMMAF | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Methods:** | **Tissue distribution** | **Comparison to GSK2587914** | **Tissue** | **MALDI-MSI** | **SIMS** | **nano-LCMS** |
| Fluorescent signal | Fluorescent signal: liver>kidney>eye | No difference in amount of signal | Bone marrow | NA | NA | 154 ng/g (24h), 137 ng/g (48h) |
| | | | Cornea | NA | NA | ND |
| Fluorescence microscopy | Connective tissue in eye, lids, EO lacrimal, harderian glands, liver and muscles in the eyelids. Fluorescence intensity: liver>others | No difference in intensity or distribution | EO lacrimal glands | ND | ND | 5 ng/g (24h), 4 ng/g (48h) |
| | | | Eye | ND | ND | ND |
| | | | Lid | ND | ND | ND |
| | | | Liver | ND | NA | 968 ng/g (24h), 196 ng/g (48h) |
| | | | Harderian gland | NA | NA | 15 ng/g (24h), 15 ng/g (48h) |
| | | | Kidney | NA | NA | 40 ng/g (24h), 30 ng/g (48h) |

**Key:**
EO = Extra-orbital; MALDI MSI = Matrix assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry;
NA = Not available; nano-LCMS = Nano-liquid chromatography mass spectrometry; ND = Not detected; SIMS = Secondary ion mass spectrometry.

# 6. PHARMACOKINETICS: PLASMA PROTEIN BINDING

## Table 6.1 Pharmacokinetics: Plasma Protein Binding

**Test Article:** cys-mcMMAF[a]

**Study Title: A Study to Investigate the In Vitro Plasma Protein Binding of SGD-1362 (cys-mcMMAF) in Human Plasma**

**Report date:** March 2019 **Report Number:** 2019N400355 **Study No.:** 8392093
**Study in compliance with GLP:** No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** Human plasma (3 male donors) **Batch number cys-mcMMAF:** [redacted]
**Method of administration:** In vitro **Vehicle/Formulation:** Reverse osmosis water
**Concentrations:** 0.5, 5, and 50 ng/mL **Analytical method:** LC/MS/MS

**Methods:** Plasma protein binding by equilibrium dialysis with cys-mcMMAF incubated for 8 hours at 37°C, warfarin (positive control) incubated for 5 hours, and quantitated by LC/MS/MS.

**Results:**

| Test Article | Test System | Concentration(s) Tested (ng/mL) | Mean % Unbound ± SD |
|---|---|---|---|
| cys-mcMMAF | Male Human Donor 1 Plasma | 0.5 | 61.8 ± 20.8 (n=3) |
| | | 5 | 69.3 ± 1.72 (n=3) |
| | | 50 | 80.9 ± 4.09 (n=3) |
| cys-mcMMAF | Male Human Donor 2 Plasma | 0.5 | 56.7 ± 13.3 (n=3) |
| | | 5 | 68.8 ± 5.33 (n=3) |
| | | 50 | 87.6 ± 3.11 (n=3) |
| cys-mcMMAF | Male Human Donor 3 Plasma | 0.5 | 49.1 ± 11.2 (n=3) |
| | | 5 | 70.7 ± 1.34 (n=3) |
| | | 50 | 88.7 ± 3.38 (n=3) |
| Warfarin (Positive Control) | Male Human Donors 1, 2, and 3 Plasma | 3000 | 98.2 to 99.3 (n=3) |

**Additional information:** The % unbound for cys-mcMMAF indicates concentration dependence over the concentration range tested.

**Key:**

a = Cys-mcMMAF exists in two isomeric forms, the linear isomer was used in this study.
LC/MS/MS = Liquid chromatography with tandem mass spectrometry; SD = Standard deviation.

## Table 6.2 Pharmacokinetics: Plasma Protein Binding

**Test Article:** cys-mcMMAF[a]

**Study Title: Determination of the Unbound Fraction in Plasma.**

**Report date:** January 2016 **Report Number:** 2020N438179 **Study No.:** NA
**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** Plasma [mouse (CD-1), rat (SD), monkey (cynomolgus) and human]
**Method of administration:** In vitro
**Concentrations:** 0.001, 0.01, 0.1 and 1 μM

**Batch number cys-mcMMAF:** [redacted] (SGD-1362) and [redacted] (SGD-1462)
**Vehicle/Formulation**: Not stated
**Analytical method**: HPLC/MS/MS

**Methods:** Plasma protein binding by equilibrium dialysis with cys-mcMMAF incubated for 5 hours at 37°C and quantitated by HPLC/MS/MS.

**Results:**

| Test Article | Mean unbound fraction | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Mouse | Rat | Monkey | Human |
| Linear (SGD-1362)[b] | 0.68 | 0.33 | 0.88 | 0.86 |
| Cyclised (SGD-1462)[c] | 0.65 | 0.36 | 0.89 | 0.84 |

**Findings:** Cys-mcMMAF (linear and cyclic isomers) has low protein binding in all species and no concentration dependence was observed from 0.001 to 1 μM.

**Key:**

a = Cys-mcMMAF exists in two isomeric forms, both were used in this study.
b = The linear isomer of cys-mcMMAF is designated as SGD-1362.
c = The cyclic isomer of cys-mcMMAF is designated as SGD-1462.
HPLC/MS/MS = High performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA = Not applicable; SD = Standard deviation.

## 7.　PHARMACOKINETICS:  OTHER DISTRIBUTION STUDIES

No studies appropriate to this category have been performed to support the development of belantamab mafodotin.

# 8. PHARMACOKINETICS: OTHER DISTRIBUTION STUDIES

## Table 8.1 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914

**Study Title:** Investigation of Uptake of Vivotag-680 Labelled GSK2857916A into Human Corneal Epithelial Cells and Renal Proximal Tubule Epithelial Cells

**Report date:** October-2019 **Report Number:** 2019N409936 **Study No.:** N71801-15
**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** HCEC or RPTEC
**Method of administration:** In vitro
**Concentration:** 10 and 100 µg/mL.

**Batch numbers:** Belantamab mafodotin [redacted]; GSK2857914 [redacted]
**Vehicle/Formulation**: Not stated in the report
**Analytical method**: Fluorescent probe (Vivotag 680 XL); Fluorescence microscopy.

**Results:**

Conclusion: The uptake of belantamab mafodotin into HCEC was significantly reduced by 25.9% following treatment with EIPA [5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride; commonly used as a macropinocytosis inhibitor]. EIPA appeared to have no effect on uptake of belantamab mafodotin into RPTEC. Further, EIPA did not significantly inhibit 10,000 MW Alexa488-labelled dextran uptake in HCEC or RPTEC. These findings suggest that an uptake route of belantamab mafodotin into HCEC was micropinocytosis-mediated. Intracellular co-localisation of vivotag-680 labelled belantamab mafodotin within lysosomes of HCEC and RPTEC was demonstrated using lysotracker green as a marker of lysosomes.

HCEC and RPTEC were incubated with 100 µg/mL belantamab mafodotin or GSK2857914 for 48 hours. Cys-mcMMAF was not detected in the untreated control or the GSK2857914-dosed control, but it was detected for all biological replicates in belantamab mafodotin-dosed cells, both RPTEC and HCEC. Thus, demonstrating the capacity of the cells to catabolise belantamab mafodotin, releasing cys-mcMMAF.

**Key:**
HCEC = Human corneal epithelial cells
LC/MS/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry.
RPTEC = Renal Proximal Tubule Epithelial Cells

## Table 8.2 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914

**Study Title:** Investigation of uptake of Vivotag-680 labelled GSK2857916A into Human Corneal Epithelial Cells and Renal Proximal Tubule Epithelial Cells

**Report date:** August-2020 **Report Number:** 2020N451323 **Study No.:** N70440-40
**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** HCEC or RPTEC **Batch numbers:** Belantamab mafodotin [redacted]; GSK2857914 [redacted]
**Method of administration:** In vitro **Vehicle/Formulation**: Not stated in the report
**Concentration:** 10 and 100 µg/mL. **Analytical method**: Fluorescent probe (Vivotag 680 XL); LC/MS/MS. Spinning disc confocal microscopy

**Results:**

The primary objective of this study was to assess the uptake of fluorescently labelled belantamab mafodotin and GSK2857914 into HCEC and RPTEC in the presence and absence of EIPA, a known inhibitor of macropinocytosis. Uptake was detected after 20 hours or 44 hours at two concentrations, 10 µg/mL and 100 µg/mL. Uptake was found to be concentration dependent as well as time-dependent. Overall, uptake of belantamab mafodotin was higher in HCEC compared to RPTEC. EIPA (12.5 µM) treatment of HCEC incubated with belantamab mafodotin led to a significant reduction of fluorescent signal inside the cells, indicating a reduction in uptake of belantamab mafodotin . However, treatment of HCEC with EIPA did not alter dextran uptake, which was used as a positive control marker for macropinocytosis. At 12.5 µM, EIPA did not affect the uptake of belantamab mafodotin in RPTEC. However, treatment of RPTEC with EIPA also did not alter dextran uptake, which was used as a positive control marker for macropinocytosis, possibly because the concentration of EIPA (12.5 µM) was too low. The uptake of belantamab mafodotin was higher in HCEC than in RPTEC, however that same increase was not seen for GSK2857914.

**Key:**
EIPA= 5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride
HCEC = Human corneal epithelial cells
LC/MS/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry.
RPTEC = Renal Proximal Tubule Epithelial Cells

## Table 8.3 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914

**Study Title:** Investigation of uptake of Vivotag-680 labelled GSK2857916A into Human Corneal Epithelial Cells and Renal Proximal Tubule Epithelial Cells treated with EIPA

**Report date:** November-2020 **Report Number:** 2021N462413 **Study No.:** NA
**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** HCEC or RPTEC **Batch numbers:** Belantamab mafodotin [redacted]; GSK2857914 [redacted]
**Method of administration:** In vitro **Vehicle/Formulation**: Not stated in the report
**Concentration:** 10 and 100 μg/mL. **Analytical method**: Fluorescent probe (Vivotag 680 XL); Fluorescence microscopy.

**Results:**

This investigative study follows on from the work in report 2020N451323 where the effect of EIPA was investigated post-treatment for 3 or 47 hours. It was shown that EIPA reduced the uptake of both belantamab mafodotin and GSK2857914 by 23% in HCEC. The effect was modest, due to either the compound uptake not being fully macropinocytosis mediated or to the poor stability of EIPA. A follow up study was therefore performed including reduced EIPA incubation times of 1.5 or 4 hours (30 minutes or 3 hours preincubation with EIPA followed by 1 hour incubation with EIPA post treatment), as well as 47 hours post-treatment in which batches of EIPA were compared, to determine if the discrepancy was caused by stability of EIPA.

This subsequent investigative study using two different batches of EIPA held under different storage conditions demonstrated that EIPA stability was unaffected by freeze/thaw regimens, therefore the results from the previous in vitro experiments using EIPA are considered to be valid.

**Key:**

EIPA= 5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride
HCEC = Human corneal epithelial cells
LC/MS/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry
RPTEC = Renal Proximal Tubule Epithelial Cells

## Table 8.4 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914

**Study Title:** Investigating the Activity of Clathrin-Mediated Endocytosis in Fixed and Live Primary Human Corneal Epithelial Cells and Renal Proximal Tubule Cells.

**Report date:** December-2020 **Report Number:** 2021N468100 **Study No.:** NA
**Study in compliance with GLP:** No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** HCEC or RPTEC **Batch numbers:** Belantamab mafodotin [redacted]
**Method of administration:** In vitro **Vehicle/Formulation**: Not stated in the report
**Concentration:** Up to 1000 µg/mL. **Analytical method**: Fluorescent probe (Vivotag 680 XL); Fluorescence microscopy.

**Results:**

Four HCEC donors and one RPTEC donor were used to investigate the activity of CME, in addition to the localisation and internalisation of belantamab mafodotin. CME was confirmed in HCEC as demonstrated by colocalization of Rab5-RFP expression transferrin-488 following treatment for 30 minutes at 25 µg/mL. Belantamab mafodotin localized in early endosomes after internalization with two different phenotypes distinguished based on belantamab mafodotin subcellular distribution. The first of these phenotypes is characterized by a high level of belantamab mafodotin internalisation in which it is distributed throughout the cytoplasm and accumulated in the nucleus. However, further analysis demonstrated that transferrin was not localised in the Rab5-positive endosomes indicating that CME may not be functional in these cells. In the second population of cells which showed a comparatively low level of belantamab mafodotin internalization, the compound accumulated in discrete cytoplasmic puncta without obvious colocalization with Rab5-RFP even though there was a high level of transferrin and Rab5-RFP co-localization, indicating active CME in this cell population. This may indicate that belantamab mafodotin and transferrin enter this population of HCEC by different endocytic pathways. Similarly, dextran (10 kDa) and belantamab mafodotin appear to follow different internalization pathway in HCEC. Using time-lapse analysis of HCEC and RPTEC live cells transiently expressing Rab5-RFP, increased belantamab mafodotin internalization over time and increasing concentrations was demonstrated. Under the same conditions HCEC incorporated more belantamab mafodotin than RPTEC as previously reported. In one population of HCEC and in RPTEC, discrete cytoplasmic accumulation followed by nuclear translocation of belantamab mafodotin was observed. Whereas, in the HCEC subpopulation showing strong nuclear accumulation early on did not show any obvious change in intensity or location over time. In conclusion, although the mechanism of CME was demonstrated in HCEC in bioimaging experiments, lack of colocalization of belantamab mafodotin and transferrin (internalised by CME) in the same cell populations, suggested belantamab mafodotin was internalized by different endocytic pathway(s).

**Key:**

CME = Clathrin-mediated endocytosis
HCEC = Human corneal epithelial cells
RFP = Red fluorescent protein
RPTEC = Renal Proximal Tubule Epithelial Cells

## Table 8.5 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914

**Study Title:** Investigation of uptake of Vivotag-680 labelled GSK2857916A and GSK2857914A into Human Corneal Epithelial Cells and Renal Proximal Tubule Epithelial Cells treated with commercially available uptake inhibitors

**Report date:** May-2021 **Report Number:** 2021N483916 **Study No.:** NA
**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** HCEC or RPTEC
**Method of administration:** In vitro
**Concentration:** Up to 100 µg/mL.

**Batch numbers:** Belantamab mafodotin [redacted]; GSK2857914 [redacted]
**Vehicle/Formulation**: Not stated in the report
**Analytical method**: : Fluorescent probe (Vivotag 680 XL); Fluorescence microscopy

**Results:**

Five commercially available compounds reported to inhibit different uptake pathways including macropinocytosis (wortmannin [400 nM], imipramine [10 µM], phenozybenzamine [10 µM]), caveolin (nystatin [100 µM]) and clathrin (chlorpromazine [10 µM])-mediated uptake, were co-treated with belantamab mafodotin in HCEC (4 donors) and RPTEC (2 donors).

Co-treatment with nystatin or chlorpromazine reduced the uptake of belantamab mafodotin into HCEC by 18.5% and 20.4%, respectively. The uptake of belantamab mafodotin in RPTEC was reduced by most of the inhibitors, except wortmannin. These data indicate that there are different uptake mechanisms between RPTEC and HCEC.

**Key:**
HCEC = Human corneal epithelial cells
RPTEC = Renal Proximal Tubule Epithelial Cells

## Table 8.6 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914

**Study Title:** Investigation of uptake of Vivotag-680 labelled GSK2857916A and GSK2857914A into Human Corneal Epithelial Cells and Renal Proximal Tubule Epithelial cells cassette dosed with commercially available uptake inhibitors

**Report date:** April-2022 **Report Number:** 2022N506651 **Study No.:** NA
**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** HCEC or RPTEC
**Method of administration:** In vitro
**Concentration:** Up to 100 µg/mL.

**Batch numbers:** Belantamab mafodotin [redacted]; GSK2857914 [redacted]
**Vehicle/Formulation**: Not stated in the report
**Analytical method**: Fluorescent probe (Vivotag 680 XL); Fluorescence microscopy.

**Results:**

Following on from report 2021N483916, cassette dosing of three compounds together was investigated in HCEC (6 donors) and RPTEC (2 donors) at concentrations of chlorpromazine (5µM), nystatin (50 µM) and imipramine (5 µM). The cassette dosing significantly reduced intracellular belantamab mafodotin concentration in HCEC by 31%, and in RPTEC by 50%. These data suggest that uptake of belantamab mafodotin into HCEC may be mediated by multiple endocytic pathways.

**Key:**
HCEC = Human corneal epithelial cells
LC/MS/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry.
RPTEC = Renal Proximal Tubule Epithelial Cells

## Table 8.7 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914

**Study Title:** Investigation into the effects of knockdown of trafficking pathways on the internalisation of Vivotag-680 labelled GSK2857914A and Vivotag-680 labelled GSK2857916A in Human Corneal Epithelial Cells

**Report date:** September-2023 **Report Number:** 2023N539431 **Study No.:** NA
**Study in compliance with GLP:** No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** HCEC
**Method of administration:** In vitro
**Concentration:** Up to 100 µg/mL.

**Batch numbers:** Belantamab mafodotin [redacted]; GSK2857914 [redacted]
**Vehicle/Formulation**: Not stated in the report
**Analytical method**: Fluorescent probe (Vivotag 680 XL); siRNA analysis via flow cytometry and high-res imaging

**Results:**

To study uptake of Vivotag-680 labelled GSK2857914 and Vivotag-680 labelled belantamab mafodotin, key proteins involved with different endocytic pathways were successfully targeted in human corneal epithelial cells (HCEC) by siRNA depletion. HCEC treated with siRNA were incubated with Vivotag-680 labelled GSK2857914, Vivotag-680 labelled belantamab mafodotin, transferrin (a marker for clathrin-mediated endocytosis) and 10 kDa dextran (a marker for constitutive or fluid phase endocytosis) and uptake analyzed by flow cytometry and high resolution imaging. Chemical inhibitors of endocytic pathways do not possess absolute specificity to the pathway of interest and the uptake of GSK2857914 by multiple endocytic pathways (caveolin, clathrin, macropinocytosis, Arf6, flotillin, CLIC/GEEC) was also investigated using siRNA protein depletion in HCEC. No significant reduction in uptake was observed following depletion of the any of the tested endocytic proteins.

**Key:**
HCEC = Human corneal epithelial cells
IVIG = Intravenous immunoglobulin
LC/MS/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry

## Table 8.8 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** Belantamab mafodotin or GSK2857914

**Study Title:** Investigation of uptake of Vivotag-680 labelled GSK2857916A and GSK2857914A into Human Corneal Epithelial Cells and Renal Proximal Tubule Epithelial cells dosed with commercially available H1 inhibitors and IVIG

**Report date:** September-2023 **Report Number:** 2023N528252 **Study No.:** NA
**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** HCEC or RPTEC
**Method of administration:** In vitro
**Concentration:** Up to 100 µg/mL.

**Batch numbers:** Belantamab mafodotin [redacted]; GSK2857914 [redacted]
**Vehicle/Formulation**: Not stated in the report
**Analytical method**: Fluorescent probe (Vivotag 680 XL); Fluorescence microscopy

**Results:**

An assessment of whether the co-administration of five commercially available H1 inhibitors (ketotifen 520 nM, levocabastine 1.8 µM, desloratadine 2.2 µM, levocetirizine 1.2 µM and fexofenadine 34.1 µM) or IVIG inhibited the uptake of Vivotag-680 labelled belantamab mafodotin or GSK2857914 into HCEC and RPTEC and reduced belantamab mafodotin-related cytotoxicity in up to 5 donors was conducted. Desloratadine, fexofenadine and ketotifen were shown to reduce the uptake of belantamab mafodotin in HCEC by 34%, 24.1% and 26.6%, respectively, but had no effect in reducing cytotoxicity. In general, no significant protective effect of H1 inhibitors in HCEC was observed as there was no reduction in intracellular fluorescence compound intensity nor increase in nuclei counts (cell number) when compared to cells treated with belantamab mafodotin alone. For RPTEC, none of the H1 inhibitors ameliorated the cytotoxicity associated to belantamab mafodotin. Co-treatment with IVIG did produce a protective effect, inhibiting uptake of belantamab mafodotin in HCEC as indicated by a reduction of intracellular fluorescence of 36%, which resulted in an increase in cell number by 23%, when compared to cells treated with belantamab mafodotin alone. The results were similar in RPTEC in which a reduction of 31.4% in cell-associated compound fluorescence was observed with a 28% increase in cell numbers, when compared to cells treated with belantamab mafodotin alone.

**Key:**
HCEC = Human corneal epithelial cells
IVIG = Intravenous immunoglobulin
LC/MS/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry.
RPTEC = Renal Proximal Tubule Epithelial Cells

## Table 8.9 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** cys-mcMMAF[d]

**Study Title:** ***In vitro* Interaction of cys-mcMMAF with Human P-glycoprotein (P-gp, MDR-1)**

**Report date:** April 2012 **Report Number:** 2013N177541 **Study No.:** PDM-0001
**Study in compliance with GLP:** No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** MDCKII cells transfected with P-gp **Batch number cys-mcMMAF:** [redacted]
**Method of administration:** In vitro **Vehicle/Formulation:** DMSO
**Concentration:** 100 nM **Analytical method:** LC/MS/MS

**Results:**

| Test Article | $P_{app}$, A to B[b] x $10^{-6}$ (cm/sec)[a] | $P_{app}$, B-to-A[c] x $10^{-6}$ (cm/sec) | Efflux Ratio (B:A) | P-gp substrate |
|---|---|---|---|---|
| cys-mcMMAF | 0.60 ± 0.2 | 20.4 ± 0.8 | 34 ± 1.4 | Yes |
| cys-mcMMAF (in the presence of 60 μM verapamil) | 0.70 ± 0.2 | 0.8 ± 0.1 | 1.1 ± 0.2 | |
| Digoxin | 1.8 ± 0.4 | 45.1 ± 0.8 | 25 ± 1.3 | Yes |
| Digoxin (in the presence of 60 μM verapamil)) | 2.1 ± 0.2 | 4.8 ± 0.2 | 2.3 ± 0.4 | |

**Key:**

a = data expressed as mean ± SD (n=3).
b = Directional transport A-to-B is apical to basolateral.
c = Directional transport B-to-A is basolateral to apical.
d = Cys-mcMMAF exists in two isomeric forms, the linear isomer was used in this study.
DMSO = Dimethyl sulfoxide; MDCKII = Madin Darby Canine Kidney II cells; MDR1 = Multidrug resistance protein 1, also known as P-glycoprotein (P-gp).
LC/MS/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry; $P_{app}$= Apparent permeability coefficient.

## Table 8.10 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** cys-mcMMAF or $^{3}$H-cys-mcMMAF[a]

**Study Title:** ***In vitro*** **Interaction Studies of SGD-1362 with human BSEP, BCRP, MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 and MRP5 Efflux (ABC) Transporters, and with Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2 Uptake Transporters**

**Report date:** October 2017 **Report Number:** 2018N393080 **Study No.:** SeaGen-13-06Dec2016

**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** Spodoptera frugiperda (Sf9), MDCKII or HEK293 cells overexpressing respective transporters.

**Batch number:** cys-mcMMAF [redacted]; $^{3}$H-cys-mcMMAF [redacted]

**Vehicle/Formulation**: DMSO containing no more than 1.5% (v/v) ethanol

**Method of administration:** In vitro

**Analytical method**: Liquid scintillation counting or fluorescence depending on assay.

**Concentration:** Up to 200 nM

**Summary of the obtained results:**

| Substrate results | | | Inhibition results | |
|---|---|---|---|---|
| **Transporter and assay type** | **Maximum fold accumulation/net ER** | **Substrate** | **Transporter and assay type** | **Maximum inhibition at 200 nM (% of control)** |
| BSEP VT | 1.89 [reduced to 0.95 with cyclosporine A] | Borderline | BCRP VT | NIO |
| MRP1 VT | 11.17 [reduced to 0.82 with MK571] | Yes | BSEP VT | NIO |
| MRP2 VT | 13.5 [reduced to 0.9 with Benzbromarone] | Yes | MDR1 VT | NIO |
| MRP3 VT | 4.21 [reduced to 1.18 with Sulfasalazine] | Yes | MRP1 VT | NIO |
| MRP4 VT | <2 | Unlikely | MRP2 VT | -54 |
| MRP5 VT | <2 | Unlikely | MRP3 VT | NIO |
| MATE1 UPT | 2.19 [no change in the presence of Pyrimethamine] | Unlikely | MRP4 VT | NIO |
| MATE2-K UPT | <2 | Unlikely | MRP5 VT | NIO |
| OAT1 UPT | <2 | Unlikely | MATE1 UPT | NIO |
| OAT3 UPT | <2 | Unlikely | MATE2-K UPT | NIO |
| OATP1B1 UPT | 13.28 [reduced to 0.93 with Rifampicin] | Yes | OAT1 UPT | NIO |
| OATP1B3 UPT | 4.94 [reduced to 0.82 with Rifampicin] | Yes | OAT3 UPT | NIO |
| OCT1 UPT | <2 | Unlikely | OATP1B1 UPT | NIO |

## Pharmacokinetics: Other Distribution Studies (Continued)

| Substrate results | | | Inhibition results | |
|---|---|---|---|---|
| **Transporter and assay type** | **Maximum fold accumulation/net ER** | **Substrate** | **Transporter and assay type** | **Maximum inhibition at 200 nM (% of control)** |
| OCT2 UPT | <2 | Unlikely | OATP1B3 UPT | NIO |
| BCRP ML | <2 | Unlikely | OCT1 UPT | NIO |
| MDR1 ML | <2 | Unlikely | OCT2 UPT | NIO |

**Key:**

a = Cys-mcMMAF exists in two isomeric forms, the linear isomer was used in this study.
ABC = ATP-Binding Cassette; BCRP =Breast cancer resistance protein; BSEP = Bile salt export pump.
DMSO = Dimethyl sulfoxide; ER = efflux ratio; HEK293 = Human embryonic kidney cells; MATE1 and MATE2-K = Multidrug and toxin extrusion proteins 1 and 2-K.
MDR1 = Multidrug resistance protein 1; MRP1/2/3/4/5 = Multidrug resistance associated protein 1/2/3/4/5; ML= Monolayer; NA = Not available.
NIO = No interaction observed; OATP1B1 and OATP1B3 = Organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3; OAT1/3 = Organic anion transporters1/3.
OCT1/2 = Organic cation transporters1/2; UPT= Uptake assay; VT= Vesicular transport assay.

## Table 8.11 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** cys-mcMMAF[b]

**Study Title: In vitro Evaluation of SGD-1362 (cys-mcMMAF) as a Substrate of Human MDR1 Efflux (ABC) Transporter and Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3 and OCT2 Uptake Transporters**

**Report date:** February 2019 **Report Number:** 2019N398699 **Study No.:** GSK-32-25May2018
**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.3

**Species/Strain:** MDCKII or HEK293 cells **Batch number cys-mcMMAF:** not stated
**Method of administration:** In vitro **Vehicle/Formulation**: Water/Solution
**Concentration:** 0.003 to 10 µM **Analytical method**: LC/MS/MS

**Results:**

| Transporter and assay type | Maximum fold accumulation | Substrate |
|---|---|---|
| MDR1 | - | Inconclusive[a] |
| OAT1 | 0.78 at 3 µM | No |
| OAT3 | 1.02 at 3 µM | No |
| OCT2 | 1.35 at 1 µM | No |

**Key:**
a = Most of the samples of cys-mcMMAF were below the limit of quantification therefore a result could not be concluded.
b = Cys-mcMMAF exists in two isomeric forms, the linear isomer was used in this study.
HEK293 = Human embryonic kidney cells; MDCKII = Madin Darby Canine Kidney II cells; MDR1 = Multidrug resistance protein 1;
LC/MS/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry; OAT = Organic anion transporter; OCT = Organic cation transporter

## Table 8.12 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

**Test Article:** Belantamab mafodotin and an IgG control antibody

**Study Title: Study to Investigate Biodistribution of Fluorescently Labelled GSK2857916 (30 mg/kg) in Rats Using Optical Imaging**

**Report date:** November 2018
**Report Number**: 2018N358667
**Study No.:** N6469-10
**Study in compliance with GLP:** No
**Location in CTD**: m4.2.2.3

**Species/Strain:** Rat / Wistar Han
**No. of animals/sex/dose:** 3F
**Method of administration:** Single intravenous bolus administration
**Dose (mg/kg):** 30
**Vehicle/Formulation:** Not stated in the report

**Batch number** Belantamab mafodotin [redacted]; –IgG control antibody [redacted]
**Analytical method:** Fluorescent probe (VivoTag 750)

**Summary of the obtained results:**

| Methods | Time points | Key findings |
|---|---|---|
| Fluorescent optical Imaging | 2, 6, 10, 14, 21 and 35 days | Biodistribution profile of belantamab mafodotin was similar to the ImmunoglobulinG control antibody in rats. Belantamab mafodotin (30 mg/kg) did not accumulate in the eye and was cleared by Day 14. |
| PK analysis | 35 days | Belantamab mafodotin in the eye, liver and serum of Rat 1 and 2 were 687.2 and 810.1 ng/g, 390.0 and 534.0 ng/g, 44 and 95 µg/mL respectively. Data in Rat 3 was non-quantifiable. |

## 9.　PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VIVO

Metabolism In Vivo studies are reported and described in Table 13.1.

# 10. PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VITRO

## Table 10.1 Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro – Plasma Stability

**Test Article:** Belantamab mafodotin

**Study Title: An Investigation into the Stability of GSK2857916 in vitro in Rat, Monkey and Human Plasma at 37°C**

**Report date:** June 2014 **Report Number:** 2014N206529 **Study No.:**14DMM005
**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.4

**Species/Strain:** Rat (Wistar Han), Monkey (cynomolgus), Human
**Method of administration:** In vitro
**Concentration:** 100 µg/mL

**Batch number** [redacted]
**Vehicle/Formulation**: Not stated in the report
**Analytical method**: Analysis of free cys-mcMMAF was performed using an appropriately validated UHPLC/MS/MS method for each species.

| | Mean Free cys-mcMMAF Plasma Concentrations (ng/mL)[a] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **0 hours** | **24 hours** | **48 hours** | **72 hours** | **96 hours** |
| Rat | BQL | 0.895 (0.032%) | 1.71 (0.0615%) | 3.04 (0.109%) | 6.67 (0.240%) |
| Monkey | BQL | 9.75 (0.351%) | 19.7 (0.709%) | 27.6 (0.993%) | 41.1 (1.48%) |
| Human | 0.479 (0.0172%) | 54.4 (1.96%) | 83.9 (3.02%) | 85.0 (3.06%) | 85.7 (3.08%) |

**Summary of findings:** The maximum % of free cys-mcMMAF in terms of the total MMAF conjugated to the antibody for each species were observed at 0.24% for incubated rat plasma at 96 hours, 1.48% for incubated monkey plasma at 96 hours, and 3.08% for incubated human plasma at 96 hours. Overall, the detected free cys-mcMMAF accounted for a small percentage of total MMAF conjugated to the antibody (≤3.08%) and belantamab mafodotin was largely stable in the three species at 37°C

**Key:**
a = Data in parenthesis is % of cys-mcMMAF relative to total MMAF (Monomethyl auristatin F) conjugated to the antibody from 100 µg/mL ADC at spiking.
BQL = Below quantifiable limits; UHPLC/MS/MS = Ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

## Table 10.2 Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro

**Test Article:** Belantamab mafodotin

**Study Title: Exploratory Investigation into the Potential Formation of Glutathione and Human Serum Albumin Adducts from MMAF-conjugated BCMA (GSK2857916) and Assessment of Drug-to-antibody Ratio (DAR)**

**Report date:** January 2019 **Report Number:** 2018N388212 **Study No.:** NA
**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.4

**Species/Strain:** Human
**Method of administration:** In vitro
**Concentration:** 100 μg/mL

**Batch number:** Not stated in the report
**Vehicle/Formulation**: Phosphate buffered saline/Solution
**Analytical method**: Belantamab mafodotin was spiked into human serum at a concentration of 100 μg/mL, capture was by anti-linker-payload antibodies prior to intact mass analysis for human serum albumin (HSA)-mcMMAF.
Intact protein LC/MS methods were used for the measurement of HSA-mcMMAF.

| | |
|---|---|
| **Summary of findings:** | Following incubation of belantamab mafodotin in human serum for 96 hours at 37°C, maleimide exchange was observed; the transfer of mcMMAF from belantamab mafodotin onto human serum albumin (HSA) to form HSA-mcMMAF.<br>In the presence of glutathione (GSH), at high pH, glutathione adduct formation was observed (GSH-mcMMAF). However, the presence of free mcMMAF in the belantamab mafodotin stock solution was likely responsible for adduct formation. |

**Key:**
HSA = Human serum albumin.
LC/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry.
mcMMAF = Maleimidocaproyl monomethyl auristatin F.
NA = Not applicable.

## Table 10.3 Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro - Studies with Liver S9 Derived from Animals and Humans

**Test Article:** $^{3}$H-cys-mcMMAF

**Study Title: Metabolism of $^{3}$H-SGD-1362 in Rat, Monkey, and Human Hepatic S9**

**Report date:** January 2017 **Report Number:** 2018N393077 **Study No.:** 8348052

**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.4

**Species/Strain:** Rat (Sprague-Dawley), Monkey (cynomolgus), Human

**Test system:** Hepatic postmitochondrial supernatant (S9) fractions from male and female Sprague-Dawley rats (pooled by gender), cynomolgus monkeys (pooled by gender), and human subjects (mixed-gender pool)

**Method of administration:** In vitro

**Concentration:** 10 μM

**Batch number:** [redacted]

**Vehicle/Formulation**: Methanol/Solution

**Radionuclide:** $^{3}$H

**Specific Activity:** 23.1 Ci/mmol

**Analytical method**: LC/MS analysis, including accurate mass determination in conjunction with radioactivity detection.

**Method:** The metabolic profiles of $^{3}$H-cys-mcMMAF and its metabolites were investigated (in vitro) using rat, monkey, and human hepatic S9. The samples were incubated for 120 minutes in the presence/absence of catalytic cofactors, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and uridine 5'-diphospho-glucuronic acid (UDPGA).

**Results**

| Parent and Metabolites | RT[a] (Minutes) | Proposed Identification | Rat | Monkey | Human |
|---|---|---|---|---|---|
| cys-mcMMAF (parent)[b] | 33.7 to 34.2 | cys-mcMMAF | ✓ | ✓ | ✓ |
| SGD-1462[c] | 39.0 to 39.7 | Hydrolysis and dehydration | ✓ | ✓ | ✓ |
| M1 | 3.2 | Unknown | ND | ND | RP |
| M2 | 19.3 | Unknown | RP | ND | RP |
| M3 | 20.3 to 20.7 | Unknown | RP | RP | RP |
| M5 | 28.2 to 28.3 | *N*-demethylation | MS | MS | ✓ |
| M6 | 29.2 | Unknown | ND | ✓ | ND |
| M7 | 29.5 | Glycine conjugation | MS | ✓ | ✓ |
| M8 | 29.7 to 30.3 | Hydroxylation | ✓ | ✓ | ✓ |
| M9 | 30.5 to 30.8 | Hydrolysis | ✓ | ✓ | ✓ |
| M11 | 31.5 | Unknown | ND | ND | RP |
| M12 | 31.7 to 32.0 | *O*-dealkylation | MS | MS | RP |
| M13 | 31.8 to 32.7 | Hydrolysis | ✓ | ✓ | ✓ |
| M14 | 32.5 to 32.7 | Unknown | ND | ND | RP |
| M15 | 32.7 to 32.8 | Unknown | RP | ND | RP |
| M16 | 35.0 to 35.5 | Impurity (possible stereoisomer of cys-mcMMAF) | ✓ | ✓ | ✓ |

## Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro - Studies with Liver S9 Derived from Animals and Humans (Continued)

**Test Article:** cys-mcMMAF

**Study Title:** Metabolism of $^{3}$H-SGD-1362 in Rat, Monkey, and Human Hepatic S9

**Report date:** January 2017 **Report Number:** 2018N393077 **Study No.:** 8348052

**Study in compliance with GLP:** No **Location in CTD:** m4.2.2.4

**Results (continued):**

| Parent and Metabolites | RT[a] (Minutes) | Proposed Identification | Rat | Monkey | Human |
|---|---|---|---|---|---|
| M17 | 36.0 to 36.8 | Unknown | ✓ | ✓ | ✓ |
| M18 | 36.7 to 37.2 | Hydroxylation and dehydrogenation | ✓ | ✓ | ✓ |
| M19 | 37.3 | Glycine conjugation | ND | MS | ✓ |
| M20 | 37.8 to 38.2 | Unknown | RP | RP | RP |
| M21/M22[d] | 38.3 to 38.7 | Unknown | ✓ | ✓ | ✓ |
| M22 | 38.5 to 38.7 | Unknown | ✓ | ND | ND |
| M23 | 38.7 | Unknown | ND | RP | ND |
| M24 | 40.3 | Unknown | RP | ND | RP |
| M25 | 40.5 to 41.0 | Stereoisomer of SGD-1462[c] | ND | ✓ | ✓ |
| M26 | 41.0 to 41.2 | Unknown | RP | ND | ND |
| M27 | 41.8 to 42.0 | Unknown | RP | ND | MS |
| M28 | 42.5 to 42.7 | Unknown | ✓ | ✓ | ✓ |

## Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro - Studies with Liver S9 Derived from Animals and Humans (Continued)

**Test Article: cys-mcMMAF**

**Study Title: Metabolism of $^{3}$H-SGD-1362 in Rat, Monkey, and Human Hepatic S9**

**Report date:** January 2017 **Report Number:** 2018N393077 **Study No.:** 8348052

**Study in compliance with GLP:** No **Location in CTD:** m4.2.2.4

**Results (continued):**

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| M29 | 42.8 to 43.3 | Unknown | ND | RP | ✓ |
| M30 | 43.7 | Unknown | ND | ND | ✓ |
| M31 | 44.0 to 44.2 | Unknown | MS | ND | ✓ |
| M33 | 51.3 to 51.7 | Unknown | RP | RP | RP |

**Summary of Findings:** Following incubation of $^{3}$H-cys-mcMMAF (as the linear isomer, SGD-1362) with rat, monkey and human hepatic S9, the metabolism was characterized primarily by non-enzymatic transformations and to a minor degree by oxidative and conjugative metabolism. SGD-1362 underwent mainly hydrolysis on its saturated maleimide ring, which then dehydrated to form a 3-oxo thiomorpholine moiety (SGD-1462). Variations of stereoisomers were formed during the hydrolysis process and several minor metabolic pathways were identified, including glycine conjugation, *N*- and *O*- demethylation, and oxidation, although together, these metabolites only accounted for <5% of the total radioactivity.

**Key:**

a = Retention time (RT) ranges are from profiling analyses of all matrices.
b = cys-mcMMAF (parent) as the linear isomer.
c = SGD-1462 is the cyclic isomer of cys-mcMMAF formed by hydrolysis and subsequent dehydration of the linear isomer.
d = M21 and M22 co-eluted in monkey and human; M21 was not detected in rat.
✓ = Metabolite identified.
LC/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry.
MS = Metabolite was detected by LC/MS but not detected by radio-profiling analysis.
ND = Metabolite was not detected.
RP = Metabolite was detected following radio-profiling analysis but not detected by LC/MS.

## Table 10.4 Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro - Studies with Animal and Human Hepatocytes and Recombinant Human Enzymes

**Test Article:** $^{3}$H-cys-mcMMAF

**Study Title: In vitro biotransformation of $^{3}$H-SGD-1362**

**Report date:** June 2017 **Report Number:** 2020N438184 **Study No.:** NA

**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.4

**Species/Strain:** Mouse (CD-1), Rat (Sprague-Dawley), Monkey (cynomolgus), Human.

**Test system:** Cryopreserved hepatocytes from male mice, male rats, male monkeys, and human subjects (mixed-gender pool). Recombinant human FMO3 and CYPs; 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4.

**Method of administration:** In vitro

**Concentration:** 10 μM (hepatocytes) or 1 μM (recombinant enzymes)

**Batch number:** [redacted]

**Vehicle/Formulation**: DMSO

**Radionuclide:** $^{3}$H

**Specific Activity:** 18.7 Ci/mmol

**Analytical method**: LC/MS analysis in conjunction with radioactivity detection.

**Method:** The metabolic profile of $^{3}$H-cys-mcMMAF was investigated in vitro using mouse, rat, monkey, and human hepatocytes and recombinant human cytochrome P450 (multiple CYPs) and flavine-containing monooxygenase (FMO3). The hepatocyte samples were incubated for up to 4 hours and recombinant enzyme samples for 1 hour.

**Results:**

| Peak ID | Proposed Identification | Hepatocytes (4h) | | | | | Recombinant enzymes (1h) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Mouse | Rat | Monkey | Human | Control | 1A2 | 2B6 | 2C8 | 2C19 | 2D6 | 3A4 | FMO3 | Controls |
| cys-mcMMAF[a] | cys-mcMMAF | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| SGD-1462[b] | Hydrolysis and dehydration | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Hyd1 | Partial hydrolysis of maleimide | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Hyd2 | Partial hydrolysis of maleimide | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| M1 | Acetylation | ✓ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| U1 | Unknown | ND | ND | ND | ND | ✓ | ✓ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| U2 (a & b) | Unknown | ✓ | ND | ✓ | ND | ✓ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

**Summary of Findings:**

Neither oxidative nor conjugated metabolites were observed except M1, an acetylated product, that was only observed in mouse hepatocytes and accounted for <4% of the total radioactivity. In addition to parent (the linear isomer of cys-mcMMAF), the cyclic isomer of cys-mcMMAF and two hydrolysis products were detected in all incubation mixtures, including controls, suggesting that they are products of non-enzymatic processes.

## 11. PHARMACOKINETICS: POSSIBLE METABOLIC PATHWAYS

No studies were conducted to investigate possible metabolic pathways.

# 12. PHARMACOKINETICS: INDUCTION/INHIBITION OF DRUG METABOLISING ENZYMES

## Table 12.1 Pharmacokinetics: Induction/Inhibition of Drug Metabolising Enzymes - Human Liver Microsomes

**Test Article: cys-mcMMAF[d]**

**Study Title: In Vitro Evaluation of Cys-mcMMAF as an Inhibitor of Cytochrome P450 (CYP) Enzymes in Human Liver Microsomes**

**Report date:** December 2011 **Report Number:** 2013N177537 **Study No.:** XT105075

**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.4

**Species/Strain:** Human /Selection of characterised human liver microsomes **Batch number:** [redacted]

**Vehicle/Formulation**: Phosphate buffered saline/Solution

**Method of administration:** In vitro **Analytical method**: HPLC/MS/MS.

**Concentrations:** 0.001 to 1 µM

**Method:** To evaluate direct inhibition of CYP activity, human liver microsomes from a pool of 16 individuals were incubated with suitable probe substrates, in the presence or absence of cys-mcMMAF; to evaluate time- and metabolism-dependent inhibition, cys-mcMMAF was preincubated with human liver microsomes in the absence or presence of an NADPH-generating system for 30 minutes prior to incubation with the appropriate probe substrate. Known direct and metabolism-dependent inhibitors of CYP isoforms were included as positive controls

| | | Direct inhibition | | Time-dependent inhibition | | Metabolism-dependent inhibition | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Zero-minute pre-incubation | | 30-minute pre-incubation without NADPH | | 30-minute pre-incubation with NADPH | | |
| CYP Isoform | Enzyme reaction | IC50 (µM)[a] | Inhibition observed at 1 µM (%)[b] | IC50 (µM) [a] | Inhibition observed at 1 µM (%)[b] | IC50 (µM)[a] | Inhibition observed at 1 µM (%)[b] | Potential for time- and/or metabolism dependent inhibition[c] |
| CYP1A2 | Phenacetin O-dealkylation | >1 | NA | >1 | NA | >1 | NA | Little or no |
| CYP2B6 | Efavirenz 8-hydroxylation | >1 | 1.4 | >1 | 1.8 | >1 | 1.2 | Little or no |
| CYP2C8 | Amodiaquine N-dealkylation | >1 | 4.6 | >1 | 6.7 | >1 | 6.0 | Little or no |
| CYP2C9 | Diclofenac 4'-hydroxylation | >1 | 1.2 | >1 | NA | >1 | NA | Little or no |
| CYP2C19 | S-Mephenytoin 4'-hydroxylation | >1 | NA | >1 | 1.7 | >1 | 9.2 | Little or no |
| CYP2D6 | Dextromethorphan O-demethylation | >1 | 1.2 | >1 | 4.5 | >1 | 5.0 | Little or no |

## Pharmacokinetics: Induction/Inhibition of Drug Metabolising Enzymes - Human Liver Microsomes(Continued)

**Test Article: cys-mcMMAF[d]**

**Study Title: In Vitro Evaluation of Cys-mcMMAF as an Inhibitor of Cytochrome P450 (CYP) Enzymes in Human Liver Microsomes**

**Report date:** December 2011 **Report Number:** 2013N177537 **Study No.:** XT105075

**Study in compliance with GLP**: No **Location in CTD:** m4.2.2.4

**Species/Strain:** Human /Selection of characterised human liver microsomes **Batch number:** [redacted]

**Method of administration:** In vitro **Vehicle/Formulation**: Phosphate buffered saline/Solution

**Concentrations:** 0.001 to 1 μM **Analytical method**: HPLC/MS/MS.

**Method:** To evaluate direct inhibition of CYP activity, human liver microsomes from a pool of 16 individuals were incubated with suitable probe substrates, in the presence or absence of cys-mcMMAF; to evaluate time- and metabolism-dependent inhibition, cys-mcMMAF was preincubated with human liver microsomes in the absence or presence of an NADPH-generating system for 30 minutes prior to incubation with the appropriate probe substrate. Known direct and metabolism-dependent inhibitors of CYP isoforms were included as positive controls

| | | Direct inhibition | | Time-dependent inhibition | | Metabolism-dependent inhibition | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Zero-minute pre-incubation | | 30-minute pre-incubation without NADPH | | 30-minute pre-incubation with NADPH | | |
| CYP Isoform | Enzyme reaction | IC50 (μM)[a] | Inhibition observed at 1 μM (%)[b] | IC50 (μM) [a] | Inhibition observed at 1 μM (%)[b] | IC50 (μM)[a] | Inhibition observed at 1 μM (%)[b] | Potential for time- and/or metabolism dependent inhibition[c] |
| CYP3A4/5 | Testosterone 6β-hydroxylation | >1 | 2.4 | >1 | 5.2 | >1 | 3.4 | Little or no |
| CYP3A4/5 | Midazolam 1'-hydroxylation | >1 | NA | >1 | 0 | >1 | 5.7 | Little or no |

**Summary of findings:** Cys-mcMMAF, at concentrations up to 1 μM, did not appear to be a direct, time- or metabolism-dependent inhibitor of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 or CYP3A4/5.

**Key:**

a = Average data (i.e., percent of control activity) obtained from duplicate samples for each test article concentration were used to calculate IC50 values.

b = Maximum inhibition (%) is calculated with the following formula and data for the highest concentration of test article evaluated.

Maximum inhibition (%) = 100% − Percent solvent control.

c = Time-and metabolism-dependent inhibition was determined by comparison of IC50 values with and without preincubation and NADPH, by comparison of the maximum inhibition (%) with and without preincubation and NADPH and by visual inspection of the IC50 plot.

d = Cys-mcMMAF exists in two isomeric forms, the linear isomer was used in this study.

HPLC/MS/MS = High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

NA = Not applicable; NADPH = β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form).

## Table 12.2 Pharmacokinetics: Induction/Inhibition of Drug Metabolising Enzymes - Human Hepatocytes

**Test Article: cys-mcMMAF**[d]

**Study Title: CYP 1A2, 2B6 and 3A4/5 Induction Evaluation of Cys-mcMMAF in Cryopreserved Human Hepatocytes**

**Report date:** December 2011 **Report Number:** 2013N177532 **Study No.:** SEGI-20100616D-HI

**Study in compliance with GLP:** No **Location in CTD:** m4.2.2.4

**Species/Strain:** Human / cryopreserved hepatocytes **Batch number:** [redacted]

**Method of administration:** In vitro **Vehicle/Formulation:** DMSO/Solution

**Concentrations:** 10, 100 or 1000 nM **Analytical method:** LC/MS/MS

**Method:** The effect of cys-mcMMAF on cytochrome P450 induction was determined by measuring in situ enzymatic activity and changes in mRNA expression level of the target genes for CYP 1A2, 2B6 and 3A4/5.

| | | | Fold increase in enzyme activity (treated/vehicle control) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Treatment** | **Concentration (nM)** | **Hu0874x** | **Hu4187** | **Hu8080** | **Mean** | **SD** |
| **CYP1A2** | Omeprazole[a] | 50 μM | 7.2 | 11.7 | 37.5 | 18.8 | 16.4 |
| | Cys-mcMMAF | 10 | 1.0 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 0.1 |
| | Cys-mcMMAF | 100 | 0.8 | 0.8 | 0.6 | 0.7 | 0.1 |
| | Cys-mcMMAF | 1000 | 0.2 | 0.3 | 0.2 | 0.2 | 0.1 |
| **CYP2B6** | Phenobarbital[b] | 1000 μM | 10.4 | 9.7 | 37.4 | 19.2 | 15.8 |
| | Cys-mcMMAF | 10 | 1.1 | 1.0 | 1.3 | 1.1 | 0.2 |
| | Cys-mcMMAF | 100 | 1.0 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.2 |
| | Cys-mcMMAF | 1000 | 0.9 | 0.4 | 0.3 | 0.5 | 0.3 |
| **CYP3A4/5** | Rifampicin[c] | 10 μM | 4.2 | 6.3 | 33.1 | 14.5 | 16.1 |
| | Cys-mcMMAF | 10 | 1.0 | 0.9 | 1.2 | 1.1 | 0.1 |
| | Cys-mcMMAF | 100 | 1.0 | 0.8 | 1.0 | 0.9 | 0.1 |
| | Cys-mcMMAF | 1000 | 0.9 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.0 |

## Pharmacokinetics: Induction/Inhibition of Drug Metabolising Enzymes (Continued)

Test Article: cys-mcMMAF[d]

**Study Title:** CYP 1A2, 2B6 and 3A4/5 Induction Evaluation of Cys-mcMMAF in Cryopreserved Human Hepatocytes

**Report date:** December 2011 **Location in CTD:** m4.2.2.4

**Study in compliance with GLP:** No **Report No.:** 2013N177532 **Study No.:** SEGI-20100616D-HI

**The effects of treating human hepatocytes with cys-mcMMAF, rifampicin, omeprazole, or pherobarbital on microsomal cytochrome P450 (CYP) enzyme activity: Comparison with the appropriate control (prototypical inducer)**

| | | | Fold increase in gene expression (treated/vehicle control) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Treatment | Concentration (nM) | Hu0874x | Hu4187 | Hu8080 | Mean | SD |
| CYP1A2 | Omeprazole[a] | 50 μM | 19.1 | 6.1 | 27.5 | 17.5 | 10.8 |
| | Cys-mcMMAF | 10 | 1.7 | 0.3 | 1.2 | 1.1 | 0.7 |
| | Cys-mcMMAF | 100 | 0.5 | 0.3 | 0.4 | 0.4 | 0.1 |
| | Cys-mcMMAF | 1000 | 0.3 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.1 |
| CYP2B6 | Phenobarbital[b] | 1000 μM | 43.2 | 7.3 | 46.9 | 32.4 | 21.9 |
| | Cys-mcMMAF | 10 | 1.8 | 0.4 | 1.3 | 1.2 | 0.7 |
| | Cys-mcMMAF | 100 | 0.9 | 0.2 | 0.4 | 0.5 | 0.3 |
| | Cys-mcMMAF | 1000 | 1.1 | 0.1 | 0.2 | 0.5 | 0.5 |
| CYP3A4/5 | Rifampicin[c] | 10 μM | 141.1 | 81.5 | 443.3 | 222.0 | 194.0 |
| | Cys-mcMMAF | 10 | 1.8 | 0.7 | 1.3 | 1.2 | 0.6 |
| | Cys-mcMMAF | 100 | 0.2 | 0.1 | 0.4 | 0.2 | 0.2 |
| | Cys-mcMMAF | 1000 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.0 |

**Key:**

a = Omeprazole is a positive control inducer of CYP1A2;
b = Phenobarbital is a positive control inducer of CYP2B6;
c = Rifampicin is a positive control inducer of CYP 3A4/5.
d = Cys-mcMMAF exists in two isomeric forms, the linear isomer was administered in this study.
CYP = cytochrome P450; DMSO = dimethylsulphoxide; LC/MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry, SD = Standard deviation.

# 13. PHARMACOKINETICS: EXCRETION

## Table 13.1 Pharmacokinetics: Excretion (Rat)

**Test Article: cys-mcMMAF[b]**

**Study Title: Metabolism and Excretion of $^{3}$H-SGN-CD19A and $^{3}$H-SGD-1362 ($^{3}$H-cys-mcMMAF) Following Intravenous Administration to Rats[a]**

**Report date:** July 2017 **Report Number**: 2018N393078[a] **Study No.:** 8348051

**Study in compliance with GLP:** No **Location in CTD**: m4.2.2.5

**Species/Strain:** Rat / Sprague Dawley **Batch number cys-mcMMAF:** [redacted]

**No. of animals/sex/dose:** 4M (excretion balance and metabolite profiling) **Analytical method:** LC/MS or liquid scintillation counting

**Method of administration:** Intravenous **Radionuclide:** $^{3}$H

**Dose:** 10 mg/kg **Specific Activity in the intravenous dose:** 19.1 μCi/mg

**Vehicle/Formulation:** Phosphate buffered saline/Solution

**Summary of Results - Excretion following a single 10 mg/kg intravenous dose of $^{3}$H-cys-mcMMAF**

**Sampling Times (hours):** At 8 or 24 hour intervals through to 168 hours after dosing

| | Percentage of Administered Dose | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Urine | | Feces | | Cage Rinse | |
| **Sampling Time:** | **Mean** | **SD** | **Mean** | **SD** | **Mean** | **SD** |
| 0 to 8 hours | 11.0 | 2.86 | 76.2 | 9.00 | 0.373 | 0.420 |
| 8 to 24 hours | 1.13 | 1.25 | | | | |
| 24 to 48 hours | 0.135 | 0.0464 | 5.24 | 6.26 | 0.129 | 0.169 |
| 48 to 72 hours | 0.0656 | 0.0220 | 0.811 | 1.33 | 0.0943 | 0.105 |
| 72 to 96 hours | 0.0528 | 0.0527 | 0.301 | 0.490 | 0.00771 | 0.00496 |
| 96 to 120 hours | 0.0350 | 0.0405 | 0.0616 | 0.0546 | 0.00514 | 0.00699 |
| 120 to 144 hours | 0.0284 | 0.0242 | 0.0239 | 0.0123 | 0.00785 | 0.00970 |
| 144 to 168 hours | 0.0137 | 0.00922 | 0.0160 | 0.00390 | ND | ND |
| 0 to 168 hours | 12.5 | 2.29 | 82.7 | 1.74 | 0.617 | 0.531 |

**Summary of findings:**

The majority of the radioactive dose was excreted in the feces (approximately 83%). Urinary excretion (approximately 13%) was a minor route. Radioactivity was excreted rapidly, with 94% of the administered dose recovered in the first 48 hours after dosing. The total recovery of radioactivity over the 168 hour collection period was 96%.

## Pharmacokinetics: Excretion (Rat) (Continued)

**Test Article: cys-mcMMAF[b]**

**Study Title: Metabolism and Excretion of $^{3}$H-SGN-CD19A and $^{3}$H-SGD-1362 Following Intravenous Administration to Rats**

**Report date:** July 2017 **Location in CTD**: m4.2.2.5

**Study in compliance with GLP:** No **Report Number:** 2018N393078[a] **Study No.:** 8348051

**Results:** In vivo Metabolism

| Sample | Sampling Period | % of Dose in Sample | % of Dose Quantitated | Cys-mcMMAF (SGD-1362) | Cys-mcMMAF (SGD-1462) | M15 | M16 | M25 | M35 | M36 | M37 | M38 | M39 | M31 | M40 | M41/42 | M43 | M44 | M45 | M46 | M47 | M48 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Urine | 0 to 24 hours | 12.1 | 11.6 | 9.33 | 0.95 | 0.14 | 0.99 | 0.16 | - | - | - | - | - | - | -- | - | - | - | - | - | - | - |
| Feces | 0 to 48 hours | 81.4 | 40.1 | 0.75 | 13.80 | - | - | 1.92 | 1.24 | 4.02 | 0.14 | 3.53 | 0.16 | 3.68 | 3.11 | 1.09 | 0.66 | 0.72 | 2.28 | 1.71 | 0.69 | 0.69 |

**Additional Information:** Unchanged SGD-1362 was a major component in urine, accounting for 9.33% of the radioactive dose (compared to a total of 12.1% of radioactive dose in the pooled urine samples and 11.6% of radioactive dose quantitated). In feces, the unchanged SGD-1362 was a minor component, accounting for 0.75% of the radioactive dose (compared to a total of 81.4% of radioactive dose in the pooled feces samples and 40.1% of radioactive dose quantitated due to low extraction recoveries). SGD-1462, the cyclic isomer of SGD-1362, was the only major component in feces, which accounted for 13.8% of radioactive dose. All other identified metabolites in feces accounted for less than 5% of radioactive dose.

**Key:**

a = This was a two part protocol which generated two separate reports. Only the report on $^{3}$H-cys-mcMMAF is listed.

b = Cys-mcMMAF exists in two isomeric forms, the linear isomer was administered in this study.

LC/MS = Liquid chromatography with mass spectrometry; ND = Not determined; SD = Standard deviation.

**Note:** $^{3}$H-SGN-CD19A is a ADC conjugated to cys-mcMMAF developed by Seattle Genetics (now named Seagen) which not relevant to this application.

## 14.　PHARMACOKINETICS:  EXCRETION INTO BILE

No studies appropriate to this category have been performed to support the development of belantamab mafodotin.

## 15. PHARMACOKINETICS: DRUG-DRUG INTERACTIONS

No studies appropriate to this category have been performed to support the development of belantamab mafodotin.

## 16.　PHARMACOKINETICS: OTHER

No studies appropriate to this category have been performed to support the development of belantamab mafodotin.