TABLE OF CONTENTS

LIST OF FIGURES 1

1. 緒言 2

LIST OF FIGURES

Figure 1.　イノツズマブ　オゾガマイシンの構造式 2

1. 緒言

イノツズマブ　オゾガマイシンはCD22を標的とするヒトIgG4に属する抗体であるG544に強力な細胞毒性薬であるN-アセチル-γ-カリケアマイシン ジメチルヒドラジド(N-Ac-γ-カリケアマイシンDMH）を，4-(4-アセチルフェノキシ)ブタン酸（AcBut）リンカーを介して共有結合させた抗体薬物複合体（ADC）である。（Figure 1）。

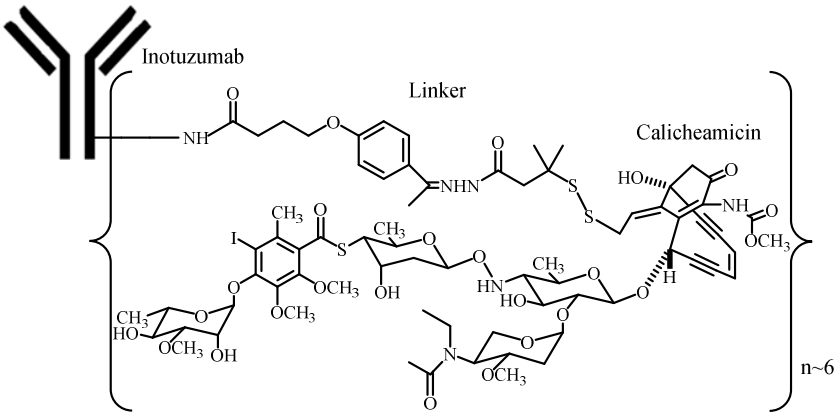


Figure 1.　イノツズマブ　オゾガマイシンの構造式

CD22はB細胞系に選択的に発現するI型膜貫通タンパクで，Siglecファミリーに属する細胞表面抗原である[a]。CD22はB細胞の生存，シグナル伝達，遊走およびホーミングなど，多くのB細胞機能を制御すると考えられている[b]。CD22の発現はB細胞系に選択的で，B細胞の発達の過程で制御を受ける。CD22は他の正常な非リンパ系組織や造血幹細胞には発現していない[a,b]。腫瘍においては，CD22は急性リンパ性白血病（ALL），非ホジキンリンパ腫（NHL），慢性リンパ性白血病（CLL）および有毛細胞白血病（HCL）など，ほとんどのBリンパ性悪性腫瘍で発現している[c]。成熟したALLでは，B細胞性ALLの90～100%の症例でCD22の発現が認められている[d,e]。また，B前駆細胞性ALLにおいても90～100%の症例でCD22が検出されており，個々の

[a] Shor B, Gerber HP, Sapra P. Preclinical and clinical development of inotuzumab-ozogamicin in hematological malignancies. Mol Immunol 2015;67:107-16.

[b] Nitschke L. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. Immunol Rev 2009; 230:128-43.

[c] Olejniczak SH, Stewart CC, Donohue K, et al.　A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. Immunol Invest 2006;35:93-114.

[d] Piccaluga PP, Arpinati M, Candoni A, et al.　Surface antigens analysis reveals significant expression of candidate targets for immunotherapy in adult acute lymphoid leukemia. Leuk Lymphoma 2011;52:325-7.

[e] Raponi S, De Propris MS, Intoppa S, et al.　Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. Leuk Lymphoma 2011;52:1098-107.

症例における検討では 90%以上の芽球で CD22 の発現が認められた[a,b]。このような B 細胞性悪性腫瘍での発現に加え，CD22 はリガンドまたは抗 CD22 モノクローナル抗体が結合すると 1 時間以内の半減期でエンドサイトーシスによって速やかに取り込まれ，細胞外環境では切断されないという性質を持つ[c]。これらの特性により CD22 は，本申請における効能である前駆 B 細胞性 ALL を含む B 細胞性悪性腫瘍の ADC による治療において，有望な標的であると考えられる。

In vitro 薬理試験において，イノツズマブ　オゾガマイシンは B 細胞性 ALL 細胞に対して濃度依存的に強力な増殖阻害作用を示した。In vivo では，皮下移植した異種移植モデルにおいて腫瘍退縮効果を示し，全身播種モデルにおいても延命効果を示した。イノツズマブ　オゾガマイシンの作用機序として，G544 が CD22 に特異的に結合した後，細胞に速やかに取り込まれてリソゾームへ移行して，その酸性環境下でリンカーが開裂し，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が放出されてカリケアマイシンと同様に二本鎖 DNA を切断することが示された。

イノツズマブ　オゾガマイシン効能・効果および用法・用量は添付文書（案）（CTD 1.8.1 項）に記載した。

[a] Shah NN, Stevenson MS, Yuan CM, et al. Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer 2015;62:964-9.

[b] Haso W, Lee DW, Shah NN, et al.　Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood 2013;121:1165-74.

[c] Shan D, Press OW. Constitutive endocytosis and degradation of CD22 by human B cells. J Immunol 1995; 154:4466-75.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 2
略語・用語の定義一覧 4
1. まとめ 5
2. 効力を裏付ける試験 8
2.1. *In vitro* における検討 8
2.1.1. CD22 抗原に対する結合親和性 8
2.1.2. ALL および NHL 細胞株における CD22 発現および G544 の結合能 8
2.1.3. ヒト，カニクイザル，マウス，ラットおよびウサギ B 細胞に対する G544 の結合能 9
2.1.4. G544 の標的細胞における細胞内動態 10
2.1.5. イノツズマブ　オゾガマイシンの作用機序の検討 11
2.1.6. CDC および ADCC 活性 12
2.1.7. イノツズマブ　オゾガマイシンの細胞毒性作用 14
2.2. *In vivo* における検討 16
2.2.1. マウスにおける耐用量の検討 16
2.2.2. B 細胞性 ALL Reh 腫瘍異種移植モデルにおける抗腫瘍効果 16
2.2.3. B 細胞性 ALL Reh 腫瘍播種モデルにおける抗腫瘍効果 18
2.2.4. B 細胞性 NHL 異種移植モデルにおける抗腫瘍効果 19
2.2.5. NHL 播種モデルにおける抗腫瘍効果 23
2.2.6. NHL に対する作用：イノツズマブ　オゾガマイシンと化学療法剤の比較 25
2.2.7. NHL に対する作用：化学療法再発モデル 27
2.2.8. NHL に対する作用：イノツズマブ　オゾガマイシンと化学療法剤の併用 28
3. 副次的薬理試験 31
4. 安全性薬理試験 31
4.1. 心血管系 31
4.1.1. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の hERG 電流に対する作用 31
4.1.2. サル心血管系試験 31
4.2. ラット中枢神経系試験 32
4.3. ラット呼吸系試験 33
5. 薬力学的薬物相互作用試験 33

6. 考察及び結論 33
7. 図表 34

LIST OF TABLES

Table 1. イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の CD22 への結合能 8
Table 2. B 細胞性 ALL および NHL 細胞株における CD22 発現量 9
Table 3. 腫瘍細胞への G544 の取り込み速度 11
Table 4. 各種白血病細胞の増殖に対する作用 15

LIST OF FIGURES

Figure 1. Reh 細胞における PE ラベル G544 の結合曲線 9
Figure 2. 各動物種の B 細胞における PE ラベル G544 の結合曲線 10
Figure 3. Reh 細胞への G544 の取り込み 10
Figure 4. Ramos 細胞における G544 とリソゾームの共存 11
Figure 5. Reh 細胞における 53BP1 フォーカス形成 12
Figure 6. Ramos 細胞に対する CDC 活性 13
Figure 7. Ramos 細胞に対する ADCC 活性 14
Figure 8. Reh ALL 皮下異種移植モデルにおける抗腫瘍効果 17
Figure 9. Reh ALL 播種モデルにおける抗腫瘍効果 18
Figure 10. Reh ALL 播種モデルにおける骨髄へのヒト CD45 陽性細胞の生着に対するイノツズマブ　オゾガマイシンの作用 19
Figure 11. Ramos NHL（小型）の増殖に対する作用 20
Figure 12. RL NHL（小型）の増殖に対する作用：腹腔内投与と静脈内投与の比較 21
Figure 13. RL NHL の増殖に対する作用：カリケアマイシン結合量の異なるロット間の比較 22
Figure 14. 大型の Ramos および RL NHL の増殖に対する作用 23
Figure 15. Ramos NHL 播種モデル（早期病態モデル）における抗腫瘍効果 24
Figure 16. Ramos NHL 播種モデル（進行病態モデル）における抗腫瘍効果 25
Figure 17. Ramos および RL NHL 異種移植モデルにおけるイノツズマブ　オゾガマイシン，CHOP および CVP の作用 26
Figure 18. Ramos NHL 播種モデルにおけるイノツズマブ　オゾガマイシンおよび CHOP の作用 27

Figure 19. CVP またはCHOP による治療から再発したRamos NHL に対するイノツズマブ オゾガマイシンの作用 28
Figure 20. Ramos NHL 異種移植モデルに対するイノツズマブ　オゾガマイシンと CHOP の逐次投与による作用 29
Figure 21. Ramos NHL 異種移植モデルに対するイノツズマブ　オゾガマイシンと CVP の同時投与による作用 30

略語・用語の定義一覧

略号・用語	省略していない表現または用語の定義
AcBut	4-(4-Acetylphenoxy)butanoic acid，4-(4-アセチルフェノキシ)ブタン酸
ADC	Antibody-drug conjugate，抗体薬物複合体
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity，抗体依存性細胞毒性
ALL	Acute lymphatic leukemia，急性リンパ性白血病
AUC	Area under the plasma concentration-time curve，血漿中濃度－時間曲線下面積
CDC	Complement dependent cytotoxicity，補体依存性細胞傷害
CHOP	シクロホスファミド，ドキソルビシン，ビンクリスチンおよび prednisone の 4 剤併用
C_{5min}	Serum concentration at 5 minutes after dosing，投与 5 分後の血清中濃度
C_{max}	Maximum concentration，最高血清中濃度
CVP	シクロホスファミド，ビンクリスチンおよび prednisone の 3 剤併用
GLP	Good Laboratory Practice，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	Human ether-a-go-go related gene，ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
IC_{50}	50% inhibitory concentration，50%阻害濃度
K_D	Dessociation constant，解離定数
Ki	Inhibition constant，阻害定数
NHL	Non-Hodgkin lymphoma，非ホジキンリンパ腫
PE	Phycoerythrin，フィコエリトリン
SCID	Severe combined immunodeficiency，重度複合免疫不全

1. まとめ

イノツズマブ　オゾガマイシン（PF-05208773，CMC-544）は CD22 を標的とするヒト IgG4 に属する抗体である G544 に強力な細胞毒性薬である N-アセチル-γ-カリケアマイシン ジメチルヒドラジド（N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH）を，4-(4-アセチルフェノキシ)ブタン酸（AcBut）リンカーを介して共有結合させた抗体薬物複合体（ADC）である。G544 は CD22 の細胞外領域を標的としている。CD22 は B 細胞系に選択的に発現する I 型膜貫通タンパクで，Siglec ファミリーに属する細胞表面抗原である[a]。CD22 は B 細胞の生存，シグナル伝達，遊走およびホーミングなど，多くの B 細胞機能を制御すると考えられている[b]。CD22 の発現は B 細胞系に選択的で，B 細胞の発達の過程で制御を受ける。CD22 は他の正常な非リンパ系組織や造血幹細胞には発現していない[a,b]。腫瘍においては，CD22 は急性リンパ性白血病（ALL），非ホジキンリンパ腫（NHL），慢性リンパ性白血病（CLL）および有毛細胞白血病（HCL）など，ほとんどの B リンパ性悪性腫瘍で発現している[c]。成熟した ALL では，B 細胞性 ALL の 90～100%の症例で CD22 の発現が認められている[d,e]。また，B 前駆細胞性 ALL においても 90～100%の症例で CD22 が検出されており，個々の症例における検討では 90%以上の芽球で CD22 の発現が認められた[f,g]。このような B 細胞性悪性腫瘍での発現に加え，CD22 はリガンドまたは抗 CD22 モノクローナル抗体が結合すると 1 時間以内の半減期でエンドサイトーシスによって速やかに取り込まれ，細胞外環境では切断されないという性質を持つ[h]。これらの特性により CD22 は，本申請における効能である前駆 B 細胞性 ALL を含む B 細胞性悪性腫瘍の ADC による治療において，有望な標的であると考えられる。

[a] Shor B, Gerber HP, Sapra P. Preclinical and clinical development of inotuzumab-ozogamicin in hematological malignancies. Mol Immunol 2015;67:107-16.

[b] Nitschke L. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. Immunol Rev 2009; 230:128-43.

[c] Olejniczak SH, Stewart CC, Donohue K, et al.　A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. Immunol Invest 2006;35:93-114.

[d] Piccaluga PP, Arpinati M, Candoni A, et al.　Surface antigens analysis reveals significant expression of candidate targets for immunotherapy in adult acute lymphoid leukemia. Leuk Lymphoma 2011;52:325-7.

[e] Raponi S, De Propris MS, Intoppa S, et al.　Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. Leuk Lymphoma 2011;52:1098-107.

[f] Shah NN, Stevenson MS, Yuan CM, et al. Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer 2015;62:964-9.

[g] Haso W, Lee DW, Shah NN, et al.　Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood 2013;121:1165-74.

[h] Shan D, Press OW. Constitutive endocytosis and degradation of CD22 by human B cells. J Immunol 1995; 154:4466-75.

カリケアマイシンはエンジイン類に属する一連の強力な細胞毒性抗生物質で，DNA 切断という独特の作用機序を有する。N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH はイノツズマブ　オゾガマイシンに結合している細胞毒性薬で，γ-カリケアマイシンの誘導体である[a,b,c]。カリケアマイシンは DNA の副溝（minor groove）にオリゴピリミジンーオリゴプリン配列（T-C-C-T および A-G-G-A）に選択的に結合し，転写開始複合体の形成を阻害する[c,d,e]。イノツズマブ　オゾガマイシンは悪性腫瘍細胞の表面で CD22 に結合すると，速やかに細胞内に取り込まれてリソゾーム小胞に移行し，リソゾームの酸性環境下でリンカーのヒドラゾン基が加水分解されてカリケアマイシンが放出される。カリケアマイシンは細胞内のチオール基によってジスルフィド結合が還元的に開裂して活性化され，ビラジカル体を形成する。細胞核において，活性化されたカリケアマイシンは DNA にインターカレートし，DNA 二本鎖切断を引き起こして，その結果細胞はアポトーシスおよび細胞死に至る[f,g]。

イノツズマブ　オゾガマイシンについて一連の *in vitro* および *in vivo* 試験を実施して，その薬理プロファイルを明らかにした。イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 はいずれも，ヒト CD22-Fc 融合タンパクに高い親和性（K_D 値 120～150 pmol/L）で結合した。また，G544 は CD22 を発現する腫瘍細胞に特異的な結合を示した。さらに，G544 はヒト全血中の正常 B 細胞には結合するが，マウス，ラット，ウサギまたはカニクイザルの B 細胞，顆粒球，単球または T 細胞には結合しなかった。G544 は ALL および NHL 細胞株に速やかに取り込まれてリソゾームへ移行することが，LAMP-1（lysosomal-associated membrane protein 1）との共存により示された。作用機序の検討では，ALL 細胞をイノツズマブ　オゾガマイシンとインキュベートした結果，二本鎖 DNA の切断が認められ，カリケアマイシンの主要な作用機序と一致した。また，IgG4 抗体からなるイノツズマブ　オゾガマイシンは補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞毒性（ADCC）活性を有しないことが確認された。イノツズマブ　オゾガマイシンは種々の B 細胞由来の腫瘍細胞株に対して，抗原特異的に強力な細胞毒性を示した。NHL 細胞株は ALL 細胞株に比べて CD22 の発現レベルが高かったにも関わらず，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび非結

---

[a] Hinman LM, Hamann PR, Wallace R, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibody conjugates of the calicheamicins: a novel and potent family of antitumor antibiotics. Cancer Res. 1993;53:3336–42.

[b] Lee MD, Dunne TS, Chang CC, et al. Calicheamicins, a novel family of antitumor antibiotics. 4. Structure elucidation of calicheamicins .beta.1Br, .gamma.1Br, .alpha.2I, .alpha.3I, .beta.1I, .gamma.1I, and .delta.1I. J Am Chem Soc. 1992;114:985–97.

[c] Zein N, Sinha AM, McGahren WJ, et al. Calicheamicin gamma 1I: an antitumor antibiotic that cleaves double-stranded DNA site specifically. Science. 1988;240:1198–1201.

[d] Ho SN, Boyer SH, Schreiber SL, et al. Specific inhibition of formation of transcription complexes by a calicheamicin oligosaccharide: a paradigm for the development of transcriptional antagonists. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:9203-7.

[e] Ikemoto N, Kumar RA, Ling TT, et al. Calicheamicin-DNA complexes: warhead alignment and saccharide recognition of the minor groove. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:10506-10.

[f] Ellestad GA. Structural and conformational features relevant to the anti-tumor activity of calicheamicin gamma(1)(I). Chirality 2011;23:660-71.

[g] Shor B, Gerber HP, Sapra P. Preclinical and clinical development of inotuzumab-ozogamicin in hematological malignancies. Mol Immunol 2015;67:107-16.

合 N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH に対する感受性は ALL 細胞株の方が高く，イノツズマブ　オゾガマイシンに対する感受性に関して，両細胞間で差異のある可能性が示唆された。

In vivo 試験では，1) B 細胞性 ALL モデルにおける単独での抗腫瘍効果，2) B 細胞性 NHL モデルにおける単独での抗腫瘍効果，および 3) イノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果に関する化学療法との比較，化学療法再発モデルでの検討および化学療法剤との併用効果について検討した。

ALL に対するイノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果は，Reh ALL 細胞を用いて，ヌードマウスに皮下移植した異種移植腫瘍および SCID マウスにおける播種モデルで評価した。Reh ALL が皮下に定着したヌードマウスに対して，イノツズマブ　オゾガマイシンは 0.42～6.57 mg/m^2 の用量で用量依存的な抗腫瘍効果を示し，6.57 mg/m^2 では完全な腫瘍退縮が認められた。播種モデルでもイノツズマブ　オゾガマイシンは腫瘍の増殖を抑制し，3.30 mg/m^2 の用量での生存率は 100%であった。さらに，イノツズマブ　オゾガマイシンは播種モデルにおいてヒト CD45 陽性白血病細胞の生着を強く阻害した。

イノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果を NHL の異種移植腫瘍および播種モデルついても評価した。イノツズマブ　オゾガマイシンはヌードマウスに移植した Ramos および RL NHL 異種移植腫瘍に対して用量依存的な腫瘍退縮効果を示した。イノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果は投与開始時の腫瘍サイズに関わらず認められ，体重の約 10%に相当する 2 g の腫瘍に対しても有効性を示した。Ramos および RL モデルに対するイノツズマブ　オゾガマイシンの最小有効量は，4 日ごとに 3 回の投与スケジュールでそれぞれ 0.42 および 0.81 mg/m^2 で，それぞれ 6.57 および 4.92 mg/m^2 の用量で腫瘍の完全退縮が認められた。異種移植モデルにおけるイノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果は，静脈内投与と腹腔内投与の間で同程度であった。全身播種モデルにおいて，腫瘍移植の 3 日後または 9 日後にイノツズマブ　オゾガマイシンを 1.65 mg/m^2 の用量で 4 日ごとに 3 回腹腔内投与したときの生存率は 100%であった。

イノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果を化学療法剤と比較した。イノツズマブ　オゾガマイシンは化学療法剤である CHOP（シクロホスファミド，ドキソルビシン，ビンクリスチンおよび prednisone の 4 剤併用）および CVP（シクロホスファミド，ビンクリスチンおよび prednisone の 3 剤併用）よりも長期間にわたって腫瘍抑制効果を示した。また，化学療法剤による治療後に再発した腫瘍に対しても，イノツズマブ　オゾガマイシンは腫瘍の増殖を阻害した。さらに，イノツズマブ　オゾガマイシンは CHOP または CVP との併用で，いずれかの単独投与に比べてより強い抗腫瘍効果を示した。

一連の安全性薬理試験を実施して，イノツズマブ　オゾガマイシンの心血管系，中枢神経系および呼吸系に対する作用を検討した。カニクイザルを用いた心血管系試験でイノツズマブ　オゾガマイシンは単回静脈内投与により血圧上昇を引き起こしたが，ラットを用いた中枢神経系および呼吸系の評価ではイノツズマブ　オゾガマイシンは作用を示さなかった。hERG 電流に対する阻害を検討した *in vitro* 試験では，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は 6.77 µmol/L までの濃度で作用を示さなかった。

効力を裏付ける試験および安全性薬理試験の概要は，2.6.3 薬理試験概要表のそれぞれ 2.6.3.2 および 2.6.3.4 に示す。

2. 効力を裏付ける試験

2.1. *In vitro* における検討

2.1.1. CD22 抗原に対する結合親和性

RPT-44320, RPT-48437

イノツズマブ　オゾガマイシンおよび非結合抗体（G544）のヒト CD22 に対する結合能を評価した。結合能試験ではヒト CD22-Fc 融合タンパクを用い，表面プラズモン共鳴法（SPR）によって測定した（RPT-44320）。イノツズマブ　オゾガマイシンはヒト CD22 に対して高い親和性で結合し，その解離定数（K_D 値）は 120～150 pmol/L であった。イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 のヒト CD22 に対する親和性は同程度であったことから，カリケアマイシンの結合は親和性に影響しないことが示唆された。また，カリケアマイシン結合量の少ないイノツズマブ　オゾガマイシンと結合量の多いイノツズマブ　オゾガマイシン（抗体 1 mg あたりの N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の平均結合量はそれぞれ 21 および 87 μg）はいずれも，G544 と同程度の親和性を示した（Table 1）。

結合特異性が既知である市販のマウス抗ヒト CD22 モノクローナル抗体を用いて，CD22 に存在する 7 つのイムノグロブリン（Ig）様ドメインのうち G544 がどこに結合するかを検討した（RPT-48437）。その結果，G544 は，CD22 上の 1 番目の Ig 様ドメインのエピトープ A として知られる部位に結合することが示された。Ramos NHL 細胞を用いたフローサイトメトリーによる競合的結合試験の結果，G544 は 1 番目の Ig 様ドメインのエピトープ A に結合することが知られている抗体の結合を阻害することが確認された。

Table 1.　イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の CD22 への結合能

抗 CD22 抗体	結合親和性（K_D 値，mol/L，n=1）
G544	1.3×10^{-10}
イノツズマブ　オゾガマイシン（21 μg カリケアマイシン/mg 抗体）	1.2×10^{-10}
イノツズマブ　オゾガマイシン（87 μg カリケアマイシン/mg 抗体）	1.5×10^{-10}

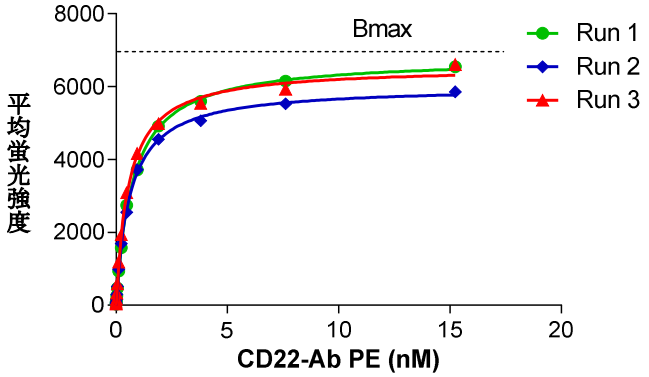
2.1.2. ALL および NHL 細胞株における CD22 発現および G544 の結合能

PF-05208773_[redacted]_145820, PF-05208773_[redacted]_145201

B 細胞性の ALL 細胞株（Reh，RS4;11 および SUP-B15）ならびに NHL 細胞株（Ramos）における，B 細胞特異抗原である CD22 および CD20，ならびに骨髄細胞特異抗原である CD33 の発現を，蛍光活性化セルソーティング（FACS）法により解析した（PF-05208773_[redacted]_145820）。その結果，Reh，RS4;11 および SUP-B15 ALL 細胞の表面における CD20 および CD22 の発現は Ramos 細胞に比べて低かった。CD33 の発現は，いずれの ALL 細胞株においても検出されないか，きわめて低値であった。

定量的フローサイトメトリー法によって，細胞表面上の CD22 数を細胞あたりの抗体結合能を指標として評価した。抗体にはフィコエリトリン（PE）を結合させた G544 を用いた（PF-05208773_[redacted]_145201）。G544 の CD22 陽性細胞に対する結合特異性および CD22 発現量（分子数）を Reh，RS4;11 および Ramos 細胞株で検討したところ，CD22 陽性細胞における G544 の結合は約 5 nmol/L で飽和した（Figure 1）。CD22 発現量は検討した細胞株間で異なり，細胞あたりの CD22 発現量は Ramos 細胞では 36029 であったのに対し，ALL 細胞では少なく，Reh 細胞で 6882，RS4;11 細胞では 5424 であった（Table 2）。これらの結果は上述の FACS 法による結果と一致した。

Figure 1.　Reh 細胞における PE ラベル G544 の結合曲線



CD22-Ab PE: PE ラベルした G544

Table 2.　B 細胞性 ALL および NHL 細胞株における CD22 発現量

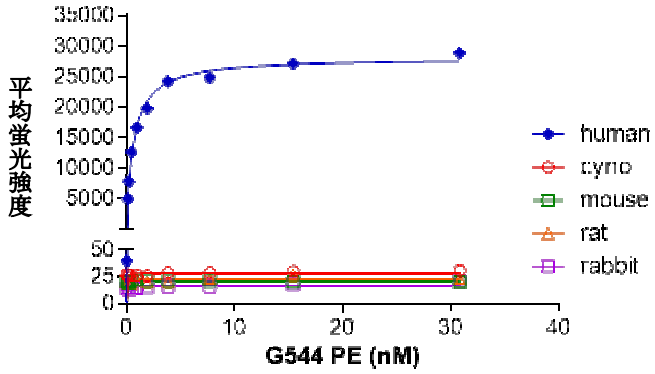
細胞株	細胞あたり CD22 発現量（分子数）（平均 ± 標準偏差，n=3）
Reh	6882 ± 415
RS4;11	5424 ± 297
Ramos	36029 ± 5004

2.1.3. ヒト，カニクイザル，マウス，ラットおよびウサギ B 細胞に対する G544 の結合能

PF-05208773_[redacted]_145201

ヒト，カニクイザル，マウス，ラットおよびウサギの血液細胞における CD22 に対する G544 の交差反応性を定量的フローサイトメトリーによって測定した。PE ラベル G544 は正常ヒト B 細胞に特異的に結合し，カニクイザル，マウス，ラットまたはウサギの B 細胞では結合は認められなかった（Figure 2）。また，ヒトまたはいずれの動物種においても，顆粒球，単球または T 細胞への結合は認められなかった。

Figure 2.　各動物種の B 細胞における PE ラベル G544 の結合曲線



2.1.4. G544 の標的細胞における細胞内動態

PF-05208773_[redacted]_115037

ADC は標的細胞に取り込まれることによって効率的に薬物を送達する。Reh，RS4;11 および Ramos 細胞に結合した G544 の取り込みおよび細胞内輸送を，イメージングフローサイトメトリーによって評価した。G544 の取り込み速度は，細胞を G544 に持続的に曝露させて測定した。細胞内取り込みの指標となる取り込みスコアおよびサイトゾルの蛍光強度を経時的にプロットし，それぞれの飽和度が 50%に達するまでの時間（$t_{½}$）を非線形回帰によって求めた。一例として，Reh 細胞でのそれぞれの経時変化を Figure 3 に示す。B 細胞性 ALL 細胞株である Reh および RS4;11 細胞への取り込みは NHL 細胞株である Ramos 細胞よりも速やかであった（Table 3）。

Figure 3.　Reh 細胞への G544 の取り込み

取り込みスコア　　**サイトゾル蛍光強度**

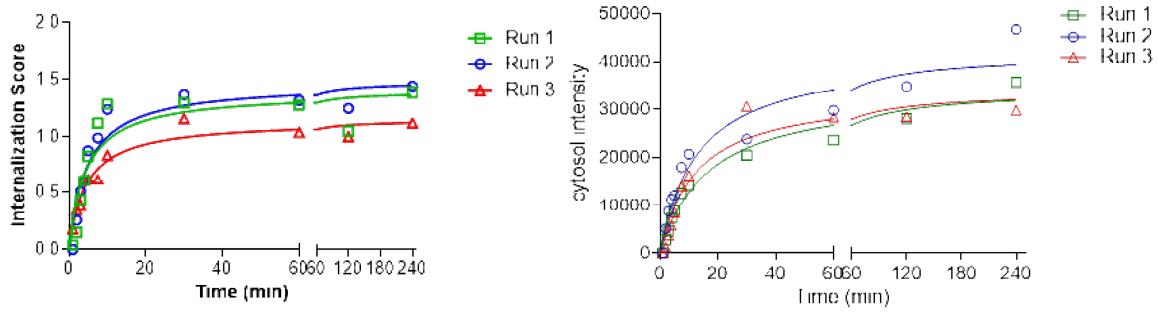


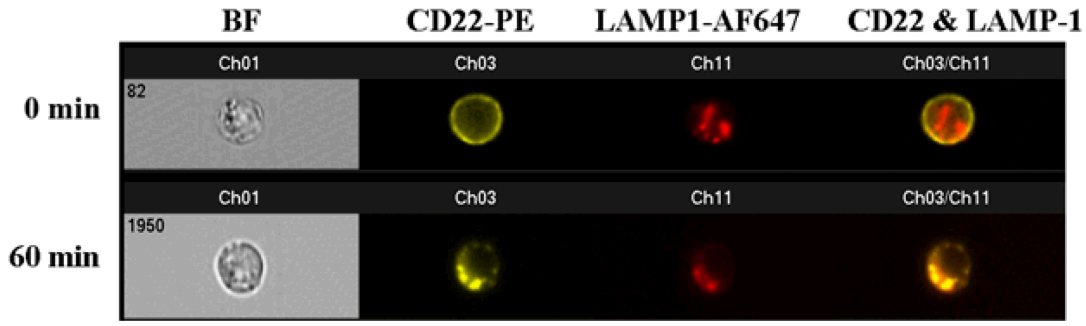
Table 3.　　腫瘍細胞への G544 の取り込み速度

細胞株	取り込みスコア $t_{½}$（分）	サイトゾル蛍光強度 $t_{½}$（分）
Ramos (n=3)	34.3 ± 7.5	44.5 ± 24.9
Reh (n=3)	4.6 ± 0.2	14.5 ± 1.9
RS4;11 (n=3)	6.4 ± 1.1	13.1 ± 1.1
ヒト B 細胞 (n=5)	2.8 ± 0.6	9.3 ± 2.4

数値は平均 ± 標準偏差を示す。

上述のイメージングフローサイトメトリーによって，取り込まれた抗体のリソゾームへの細胞内輸送を検討した。CD22 陽性の Ramos，Reh および RS4;11 の各細胞株において，G544 はリソゾームのマーカーである LAMP-1（lysosomal-associated membrane protein 1）と共存した（Figure 4）。この結果から，イノツズマブ　オゾガマイシンの作用機序として，リソゾームの酸性環境下においてリンカーが開裂し，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が放出されることが示唆される。

Figure 4.　　Ramos 細胞における G544 とリソゾームの共存



BF：明視野像（bright field），CD22-PE：PE ラベル G544，LAMP1-AF647：Alexa Flour 647 ラベル抗ヒト LAMP-1 抗体。

2.1.5. イノツズマブ　オゾガマイシンの作用機序の検討

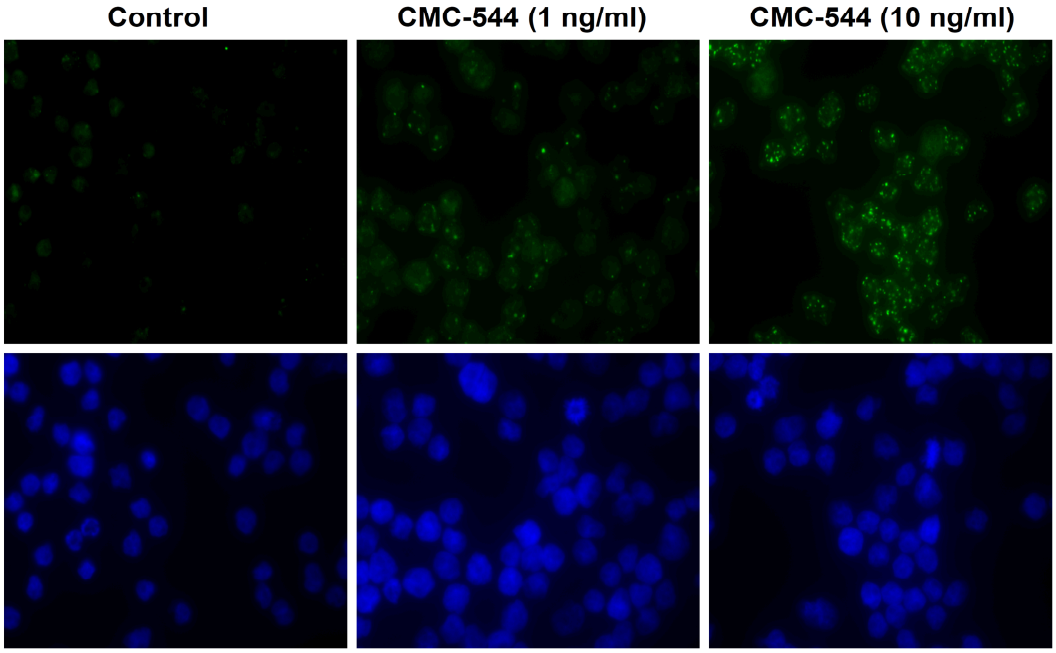
PF-05208773_[redacted]_145820

非結合型のカリケアマイシンは DNA の二本鎖切断（double strand break; DSB）を引き起こし，アポトーシス誘導および細胞死に至ることが知られている。p53 結合タンパク 1（53BP1）は DSB

に対する細胞の反応における重要な因子であり，DNA 損傷のバイオマーカーとして知られている。DSB に至る種々の損傷に反応して，53BP1 は速やかに細胞核にフォーカスを形成する[a]。

イノツズマブ　オゾガマイシンを Reh 細胞株に添加して 1 時間インキュベートしたところ，ほとんどの細胞で核に 53BP1 のフォーカスが認められ，DNA 損傷が示唆された（Figure 5）。この結果から，イノツズマブ　オゾガマイシンの作用機序として，カリケアマイシンと同様に DNA 損傷を誘発して抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

Figure 5.　Reh 細胞における 53BP1 フォーカス形成



上段：53BP1 染色像，下段：上段と同じ視野の DAPI（4’,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール）による核染色像

CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン

2.1.6. CDC および ADCC 活性

RPT-51502

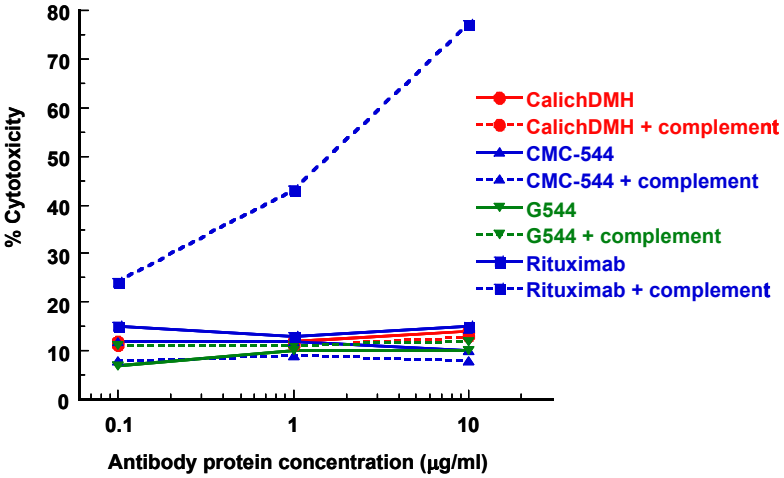
G544 は IgG4 のアイソタイプに属することから，補体結合，補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞毒性（ADCC）などのエフェクター機能を仲介することはないと考えられる。イノツズマブ　オゾガマイシンおよび非結合 G544 について，CD20 および CD22 陽性で，Lewis Y 陰性である Ramos 細胞を用いて CDC および ADCC 活性を評価した。両試験の陽性対照として，IgG1 アイソタイプに属する抗 CD20 抗体で，CDC および ADCC 活性を有することが知られているリツキシマブを用いた。また，ADCC 活性の検討ではリツキシマブに対する陰性対照としてヒ

[a] Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, et al. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. J Cell Biol 2000;151:1381-90.

ト抗 Lewis Y IgG1 モノクローナル抗体である Hu3S193 抗体を，エフェクター細胞としてはヒト末梢血単核細胞（PBMC）を用いた。

CDC 活性の検討では，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 はいずれも，Ramos 細胞に対して，補体結合およびそれに続く細胞毒性（CDC 活性）を示さなかった。一方，リツキシマブは濃度依存的に CDC 活性を示した（Figure 6）。

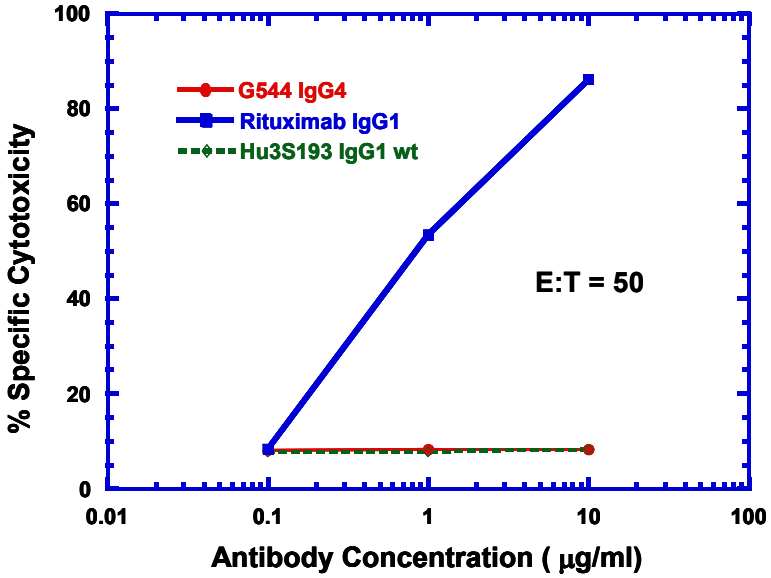
Figure 6.　Ramos 細胞に対する CDC 活性



Ramos 細胞に 0.1, 1 または 10 µg/mL の G544, イノツズマブ　オゾガマイシン（CMC-544），リツキシマブ（rituximab）または非結合 N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（CalichDMH）を補体（最終濃度 1:60 に希釈したヒト血清）存在下または非存在下で添加した後，培養上清中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH；細胞内酵素の指標）の活性を測定した。

ADCC 活性の検討では，G544 および Hu3S193 抗体はいずれも ADCC 活性を示さなかったのに対し，リツキシマブは ADCC 活性を示した。

Figure 7.　Ramos 細胞に対する ADCC 活性



Ramos 細胞を標的細胞, PBMC をエフェクター細胞として用い, G544（G544 IgG4）, リツキシマブ（rituximab IgG1）または Hu3S193 抗体（Hu3S193 IgG1 wt）を 0.1，1 または 10 µg/mL の濃度で添加した。インキュベーション後，培養上清に放出された LDH の活性を測定した。

2.1.7. イノツズマブ　オゾガマイシンの細胞毒性作用

RPT-44320, PF-05208773_[redacted]_145820

イノツズマブ　オゾガマイシンの *in vitro* 細胞毒性を 2 つの試験で評価した。評価した細胞は，CD22 陽性のヒト B 細胞性 ALL 細胞株（Reh，RS4;11 および SUP-B15）および B 細胞性 NHL 細胞株（Daudi，Raji，Ramos および RL），ならびに CD22 陰性で CD33 陽性の急性骨髄性白血病（AML）細胞株（HL-60）であった。イノツズマブ　オゾガマイシンに加え，非結合型の G544 および N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH，ならびに CD33 を標的とする同じアイソタイプに属するカリケアマイシン結合体であるゲムツズマブ　オゾガマイシン（マイロターグ®）についても細胞毒性の評価を実施した。

ALL 細胞株（Reh，RS4;11 および SUP-B15），NHL 細胞株（Ramos）および AML 細胞株（HL-60）に対する細胞毒性を，比色測定法により評価した（PF-05208773_[redacted]_145820）。イノツズマブ　オゾガマイシンは抗原特異的かつ濃度依存的に細胞の増殖を阻害し，CD22 陽性細胞に対する IC_{50} 値は 0.33～2.5 ng/mL と，CD22 陰性の HL-60 細胞よりも 75～570 倍強力な作用を示した。イノツズマブ　オゾガマイシンのこれら CD22 陽性細胞に対する作用は，ゲムツズマブ　オゾガマイシンより 16～63 倍強力であった。ゲムツズマブ　オゾガマイシンは，CD33 陽性の HL-60 細胞に対して強力な細胞増殖阻害作用を示した。また，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は CD22 の発現の有無にかかわらず，すべての細胞株に対して濃度依存的な細胞増殖阻害作用を示したが，ALL 細胞株に対する作用は NHL 細胞株（Ramos）や AML 細胞株（HL-60）より強かった（Table 4）。

Table 4.　　各種白血病細胞の増殖に対する作用

細胞株	細胞の種類	IC_{50} 値 イノツズマブ オゾガマイシン		ゲムツズマブ オゾガマイシン		N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH
		pmol/L (95% CI)	ng/mL	pmol/L (95% CI)	ng/mL	pmol/L (95% CI)
Reh	ALL	13.3[a] (12.5 - 14.1)	0.33	440[b] (380 - 507)	11	66.7[b] (22.3 - 111.0)
RS4;11	ALL	46.7[c] (31.5 - 61.9)	1.17	1060[b] (820 - 1347)	26.5	100[b] (92.7 - 107.3)
SUP-B15	ALL	53.3[a] (29.7 - 77.3)	1.33	846.7[a] (620 - 1153)	21.17	48.5[a] (30.7 - 66.3)
Ramos	NHL	100[d] (89.2 - 112.0)	2.5	6333[a] (5133 - 7800)	158.33	586[c] (499.3 - 671.5)
HL60	AML	7500[e]	187.5	50[e]	1.25	500[e]

a: n＝4
b: n＝3
c: n＝5
d: n＝12
e: n＝1
IC_{50} 値はロジスティック非線形回帰によって求め，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH 相当量（pmol/L）および抗体量（ng/mL）で示した。
95% CI：95%信頼区間

NHL 細胞株（Daudi，Raji，Ramos および RL）および AML 細胞株（HL-60）に対する作用を，ヨウ化プロピジウム（PI）排除法に基づくフローサイトメトリーによって別途評価した（RPT-44320）。比色測定法による結果と一致して，イノツズマブ　オゾガマイシンは CD22 陽性の Daudi，Raji，Ramos および RL 細胞株に対しては濃度依存的な細胞毒性を示したが，CD22 陰性で CD33 陽性の HL-60 細胞株に対する作用は顕著に弱かった。また, 非結合 G544 は, Daudi, Raji，Ramos および RL 細胞株の増殖に対して 100 μg/mL までの濃度で作用を示さなかった。

2.2. *In vivo* における検討[a]

2.2.1. マウスにおける耐用量の検討

RPT-44320, RPT-51502

皮下異種移植腫瘍モデルの試験で用いたヌードマウスにおけるイノツズマブ　オゾガマイシンの耐用量を検討するため，非担癌ヌードマウスにイノツズマブ　オゾガマイシンを投与した（RPT-44320）。イノツズマブ　オゾガマイシンは 3.30～26.28 mg/m^2 の用量で各用量 10 匹のヌードマウスに 4 日ごとに 3 回，腹腔内投与した。生死を 24 日間観察して最大非致死量（MND）を求めたところ，全例が 24 日間生存した MND は 9.87 mg/m^2 であり，1 段階高い 13.14 mg/m^2 では 10 匹中 5 匹が 24 日以内に死亡した。

ALL および NHL の播種モデルには SCID マウスを使用した。SCID マウスにおける忍容性を検討するため，各用量 10 匹の非担癌 SCID マウスにイノツズマブ　オゾガマイシンを 3.30 および 6.57 mg/m^2 の用量で 4 日ごとに 3 回，腹腔内投与して，生死を 84 日間観察した（RPT-51502）。3.30 mg/m^2 では 1 匹が試験 48 日までに死亡したものの残り 9 匹は 84 日間生存したのに対し，6.57 mg/m^2 では試験 48 日までに 2 匹が死亡し，試験 84 日までにはさらに 3 匹が死亡した。

以上のことから，ヌードマウスは SCID マウスに比べ，イノツズマブ　オゾガマイシンに対する忍容性が高いことが示された。SCID マウスは，DNA-PKcs 遺伝子の変異により，電離放射線や DNA 損傷性物質に対する感受性が高いことが知られている[b]。

2.2.2. B 細胞性 ALL Reh 腫瘍異種移植モデルにおける抗腫瘍効果

PF-05208773_[redacted]_190248

B 細胞性 ALL 細胞株である Reh をヌードマウスに移植して，イノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果を評価した。雌 Balb/c nu/nu（ヌード）マウスを全身放射線照射（400 rad）し，3 日後に 5 × 10^6 個の Reh 細胞を皮下移植した。小型（約 0.2 g）の腫瘍が定着したマウス（6～8 匹/群）に溶媒またはイノツズマブ　オゾガマイシンを 0.42, 1.65 または 6.57 mg/m^2（カリケアマイシン相当量として 10, 40 または 160 µg/kg）の用量で 4 日ごとに 3 回，腹腔内投与した。また，対照 ADC としてゲムツズマブ　オゾガマイシンを 13.71 mg/m^2（カリケアマイシン相当量として

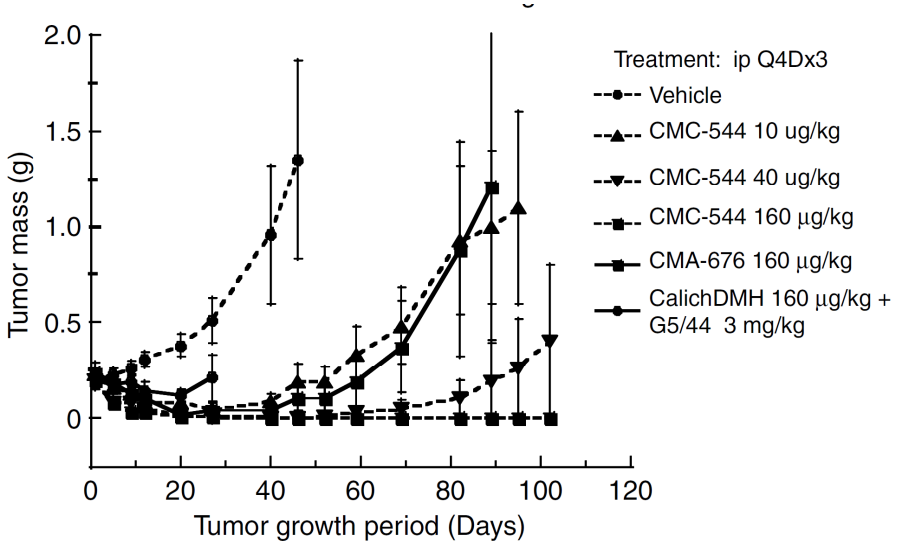
[a] 抗腫瘍効果を検討した *in vivo* 試験において用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの用量は体重あたりのカリケアマイシン量として 4, 10, 16, 20, 40, 80, 120, 160, 240, 320 または 640 µg/kg に相当する。別途記載のない限り，イノツズマブ　オゾガマイシンとしての用量への換算には，抗体 1 mg あたりのカリケアマイシン結合量として 73 µg を用いた。なお，実際の結合量は 65～73 µg であったが，試験結果の解釈には影響していないことから，本項全体を通しての換算値として 73 µg を採用した。上記の用量を G544 の体重あたり用量に換算するとそれぞれ 0.05, 0.14, 0.22, 0.27, 0.55, 1.1, 1.64, 2.19, 3.29, 4.38 または 8.76 mg/kg となり，マウスの換算係数として 3 を用いた体表面積あたり用量は 0.18, 0.42, 0.66, 0.81, 1.65, 3.30, 4.92, 6.57, 9.87, 13.14 または 26.28 mg/m^2 となる。

[b] Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, et al. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. Science 1995; 267:1178-83.

160 µg/kg）の用量で投与し[a]，別の対照として G544（3 mg/kg）と非結合 N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（160 µg/kg）の混合物を投与した。

イノツズマブ　オゾガマイシンは 6.57 mg/m^2 ではすべてのマウスで腫瘍が完全に退縮し，その退縮効果は 102 日間の観察期間を通して持続した。1.65 mg/m^2 では約 60 日間にわたって完全な退縮が認められたが，その後腫瘍は再増殖した。最低用量の 0.42 mg/m^2 では，腫瘍の増殖が溶媒対照に比べて 30 日間遅延した。ゲムツズマブ　オゾガマイシン（13.71 mg/m^2）の作用は，カリケアマイシン相当量として同じ用量（160 µg/kg）を投与したイノツズマブ　オゾガマイシンの 6.57 mg/m^2 に比べて顕著に弱かった。G544（3 mg/kg）と非結合 N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（160 µg/kg）の混合物を投与したマウスは，6 匹すべてが薬物の毒性により死亡した（Figure 8）。これらの結果から，B 細胞性 ALL 異種移植モデルにおいて，イノツズマブ　オゾガマイシンによって CD22 陽性細胞に特異的にカリケアマイシンを送達することで強力な抗腫瘍効果が得られることが示唆された。

Figure 8.　Reh ALL 皮下異種移植モデルにおける抗腫瘍効果



CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン，CMA-676：ゲムツズマブ　オゾガマイシン，CalichDMH：非結合 N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH。図中の各 ADC の用量はカリケアマイシン相当量で示す。

[a] ゲムツズマブ　オゾガマイシンを投与した試験で用いた用量は体重あたりのカリケアマイシン量として 10, 40 または 160 µg/kg に相当する。ゲムツズマブ　オゾガマイシンとしての用量への換算には，抗体 1 mg あたりのカリケアマイシン結合量として 35 µg を用いた。上記の用量を抗 CD33 抗体の体重あたり用量に換算するとそれぞれ 0.29, 1.14 または 4.57 mg/kg となり，体表面積あたり用量に換算すると，マウスの換算係数として 3 を用い，0.87, 3.42 または 13.71 mg/m^2 となる。

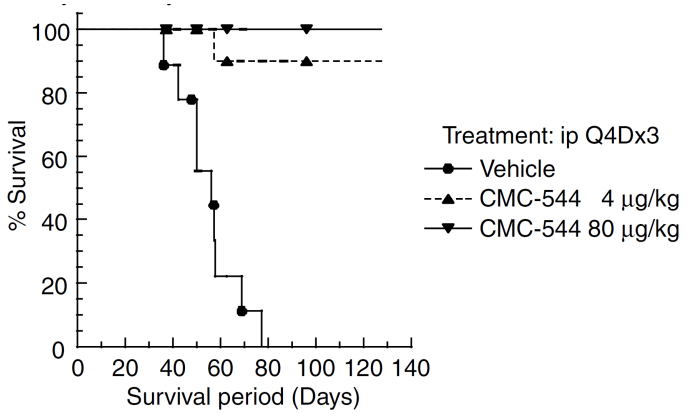
2.2.3. B 細胞性 ALL Reh 腫瘍播種モデルにおける抗腫瘍効果

PF-05208773_[redacted]_190248

Reh 細胞を静脈内に移植すると，骨髄および脊髄に浸潤して後肢麻痺を発症し，その後数日で死亡することが知られている[a]。全身播種した Reh 細胞に対するイノツズマブ　オゾガマイシンの作用を SCID マウスを用いて検討した。雄 SCID マウス（CB17 SCID）に 3×10^6 個の Reh 細胞を尾静脈より静脈内移植した。9 日後より，溶媒（9 匹/群）またはイノツズマブ　オゾガマイシン（0.18 または 3.30 mg/m^2；カリケアマイシン相当量として 4 または 80 µg/kg，10 匹/群）を 4 日ごとに 3 回，腹腔内投与した。マウスの一般状態および後肢麻痺の有無を毎日観察した。

溶媒投与群では後肢麻痺が発症し，試験 77 日までに全例が安楽殺に至り，生存期間の中央値は 55 日であった。イノツズマブ　オゾガマイシンを 3.30 mg/m^2 の用量で投与したマウスは 127 日間の観察期間にわたり全例が生存し，0.18 mg/m^2 の用量でも 90%が生存した（Figure 9）。

Figure 9.　Reh ALL 播種モデルにおける抗腫瘍効果

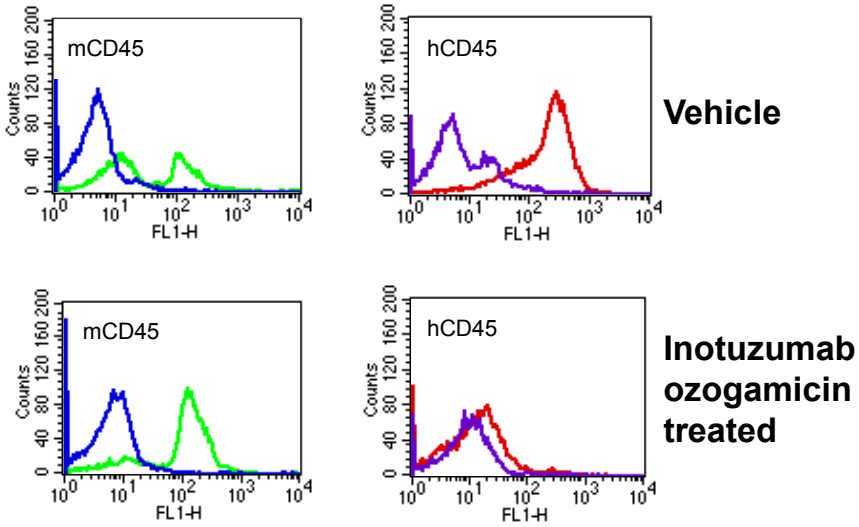


CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン。図中のイノツズマブ　オゾガマイシンの用量はカリケアマイシン相当量で示す。

別途実施した試験では，溶媒を投与した 4 匹のマウスを後肢麻痺が発症した時点で安楽殺し，骨髄におけるヒト CD45 陽性白血病細胞の有無を検討した。また，同時期にイノツズマブ　オゾガマイシン（6.57 mg/m^2；カリケアマイシン相当量として 160 µg/kg）を投与した 3 匹のマウスを安楽殺し，同様にヒト CD45 陽性白血病細胞について評価した。大腿骨から採取した骨髄細胞をフローサイトメトリーによって解析したところ，溶媒投与マウスでは試験 35～43 日にヒト CD45 陽性白血病細胞が認められ，採取した骨髄細胞の 49.9%がヒト CD45 陽性であったのに対し，イノツズマブ　オゾガマイシン投与マウスではその数が 12.5%にまで減少し，ヒト CD45 陽性白血病細胞の生着率において 75%の減少が認められた（Figure 10）。また，イノツズマブ　オゾガマイシン投与マウスでは，ヒト CD45 陽性白血病細胞の減少を反映してマウス CD45 陽性白血球が増加した。

[a] Fukushima S, Yamada T, Hashiguchi A, et al. Augmentation of human leukemic cell invasion by activation of a small GTP-binding protein Rho. Exp Hematol 2000; 28:391-400.

Figure 10.　Reh ALL 播種モデルにおける骨髄へのヒト CD45 陽性細胞の生着に対するイノツズマブ　オゾガマイシンの作用



Reh 細胞を静脈内移植した SCID マウスに溶媒またはイノツズマブ　オゾガマイシン（6.57 mg/m^2）を投与した。骨髄細胞を FITC（フルオレセインイソチオシアネート）ラベルしたラット IgG（対照；左図の青線），ラット抗マウス CD45 抗体（左図の緑線），マウス IgG（対照；右図の紫線）またはマウス抗ヒト CD45 抗体（右図の赤線）で染色した。

2.2.4. B 細胞性 NHL 異種移植モデルにおける抗腫瘍効果

RPT-44320

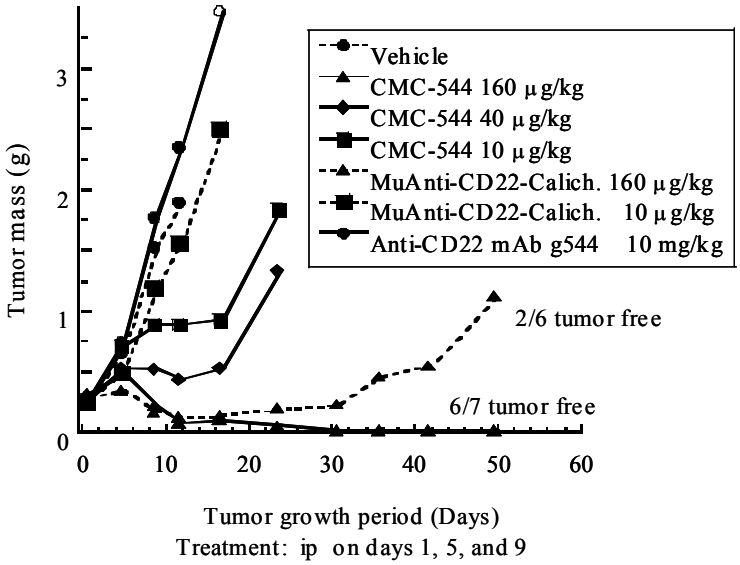
Ramos および RL 細胞を用いた NHL モデルに対するイノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果を検討した。Ramos はバーキットリンパ腫由来で，RL は非バーキット濾胞性リンパ腫由来の細胞である。小型（約 0.3 g）および大型（約 1.5～2 g）の腫瘍が定着したヌードマウスについて評価した。

雌ヌードマウスを全身放射線照射（400 rad）し，3 日後に 1 × 10^7 個の Ramos または RL 細胞を皮下移植した。小型（約 0.3 g）の腫瘍が定着したマウス（6～8 匹/群）に溶媒または薬物の投与を開始した。

Ramos モデルの検討では，マウスに溶媒，0.42, 1.65 または 6.57 mg/m^2（カリケアマイシン相当量として 10, 40 または 160 µg/kg）のイノツズマブ　オゾガマイシン，0.42 または 6.57 mg/m^2（カリケアマイシン相当量として 10 または 160 µg/kg）の N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を結合させたマウス抗ヒト CD22 抗体，あるいは非結合 G544（10 mg/kg）を 4 日ごとに 3 回，腹腔内投与した。イノツズマブ　オゾガマイシンは用量依存的に腫瘍の増殖を阻害し，6.57 mg/m^2 では 7 匹中 6 匹で腫瘍の完全な退縮が認められ，この退縮は 100 日間の観察期間にわたり持続した。一方，G544 は腫瘍の増殖に対してほとんど効果を示さなかった。N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を結合させたマウス抗ヒト CD22 抗体は 6.57 mg/m^2 で腫瘍の増殖を阻害したが，その作用はイノツズマブ　オゾガマイシンより弱かった（Figure 11）。ヒト化抗ヒト CD22 抗体を用いた ADC であるイノ

ツズマブ　オゾガマイシンとマウス抗ヒト CD22 抗体を用いた ADC で抗腫瘍活性が異なった理由は，現時点では明らかでない。

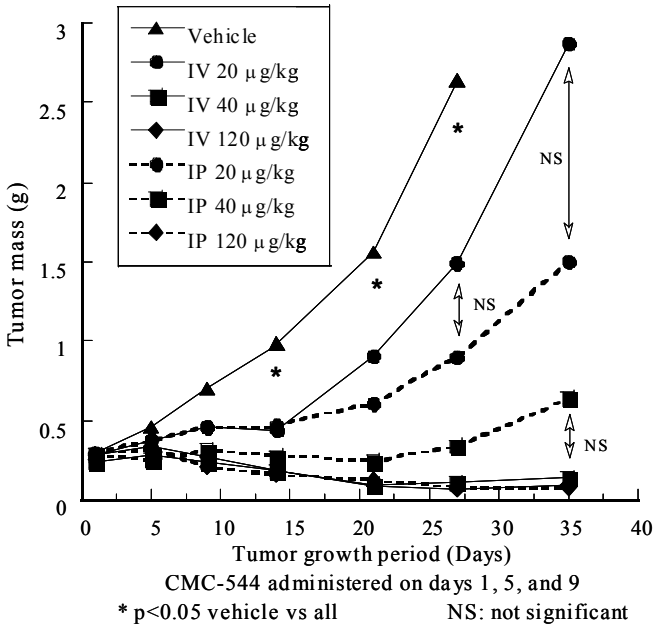
Figure 11.　Ramos NHL（小型）の増殖に対する作用



CMC-544; イノツズマブ　オゾガマイシン，MuAnti-CD22-Calich；N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を結合させたマウス抗ヒト CD22 抗体。図中の各 ADC の用量はカリケアマイシン相当量で示す。

RL モデルの検討では，マウスに溶媒あるいはイノツズマブ　オゾガマイシン（0.81, 1.65 または 4.92 mg/m^2；カリケアマイシン相当量として 20, 40 または 120 µg/kg）を 4 日ごとに 3 回，腹腔内投与した。イノツズマブ　オゾガマイシンは用量依存的な腫瘍増殖阻害または腫瘍退縮効果を示した。また，同用量を静脈内投与したときの作用は腹腔内投与と同程度であった（Figure 12）。

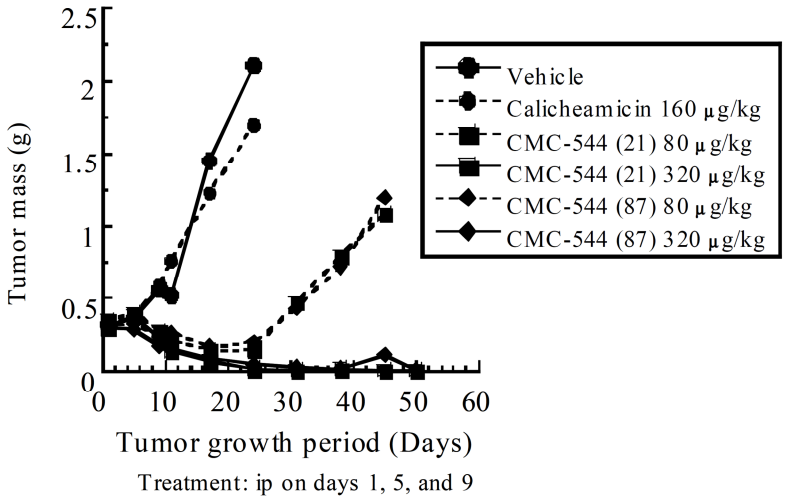
Figure 12.　RL NHL（小型）の増殖に対する作用：腹腔内投与と静脈内投与の比較



IP：　腹腔内投与，IV：静脈内投与，CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン。図中のイノツズマブ　オゾガマイシンの用量はカリケアマイシン相当量で示す。

小型の RL 腫瘍が定着した本モデルを用いて，カリケアマイシン結合量の異なる 2 つのロットのイノツズマブ　オゾガマイシンで抗腫瘍効果を比較した。低結合ロットには抗体 1 mg あたり 21～35 μg のカリケアマイシンが，高結合ロットには 65～87 μg のカリケアマイシンが結合していた。低結合ロットは 11.43 または 45.72 mg/m^2，高結合ロットは 2.76 または 11.04 mg/m^2 の用量（カリケアマイシン相当量としてはいずれも 80 または 320 μg/kg）で 4 日ごとに 3 回，腹腔内投与した。その結果，カリケアマイシン相当量の等しい両ロット間で，腫瘍増殖阻害作用にほとんど差はみられなかった（Figure 13）。

Figure 13.　RL NHL の増殖に対する作用：カリケアマイシン結合量の異なるロット間の比較



CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン，(21)：低結合ロット，(87)：高結合ロット。図中のイノツズマブ　オゾガマイシンの用量はカリケアマイシン相当量で示す。

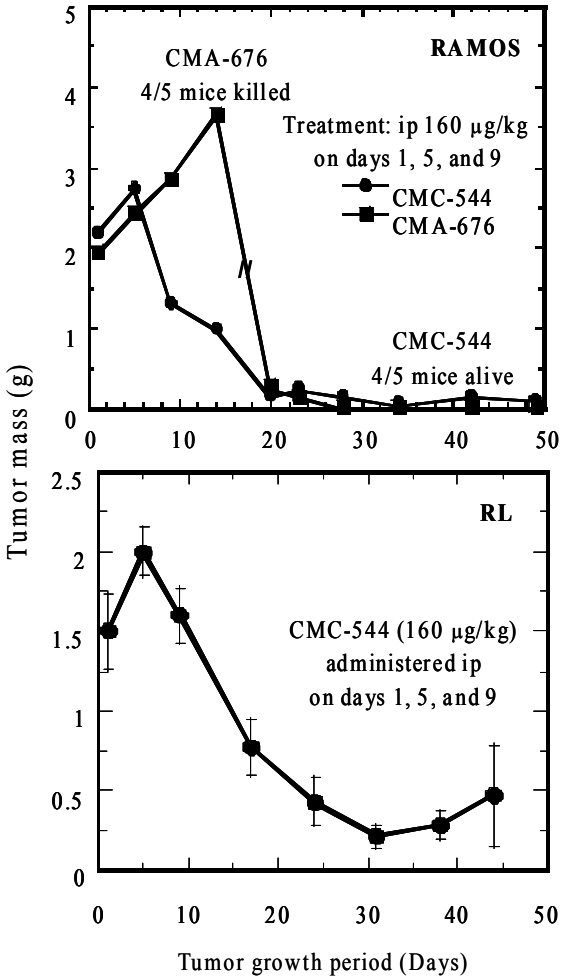
次に，大型の腫瘍が定着した Ramos および RL NHL モデルを用いてイノツズマブ　オゾガマイシンの抗腫瘍効果を検討した。腫瘍重量が 1.5～2 g に達したマウス（5 匹/群）に溶媒，イノツズマブ　オゾガマイシン（6.57 mg/m^2）またはゲムツズマブ　オゾガマイシン（13.71 mg/m^2）（カリケアマイシン相当量としてはいずれも 160 µg/kg）を 4 日ごとに 3 回，腹腔内投与した。

Ramos モデルでは，イノツズマブ　オゾガマイシンの投与によって腫瘍は徐々に退縮し，試験 20 日までには 5 匹中 4 匹で完全な退縮が認められ，この退縮は試験 50 日までの観察期間中持続した。一方，ゲムツズマブ　オゾガマイシンはほとんど作用を示さず，5 匹中 4 匹のマウスは腫瘍重量が体重の 15%近くにまで増加したことから，試験 15 日までに安楽殺に至った（Figure 14）。

RL モデルでは，イノツズマブ　オゾガマイシンの投与によって試験 30 日までに 90%以上の腫瘍退縮が認められたが，5 匹中 2 匹のマウスでは試験 45 日までに腫瘍の再増殖がみられた。

以上の結果から，イノツズマブ　オゾガマイシンは小型および大型のいずれの定着腫瘍に対しても退縮効果を有することが示された。

Figure 14.　大型の Ramos および RL NHL の増殖に対する作用



CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン，CMA-676：ゲムツズマブ　オゾガマイシン。図中の各 ADC の用量はカリケアマイシン相当量で示す。

2.2.5. NHL 播種モデルにおける抗腫瘍効果

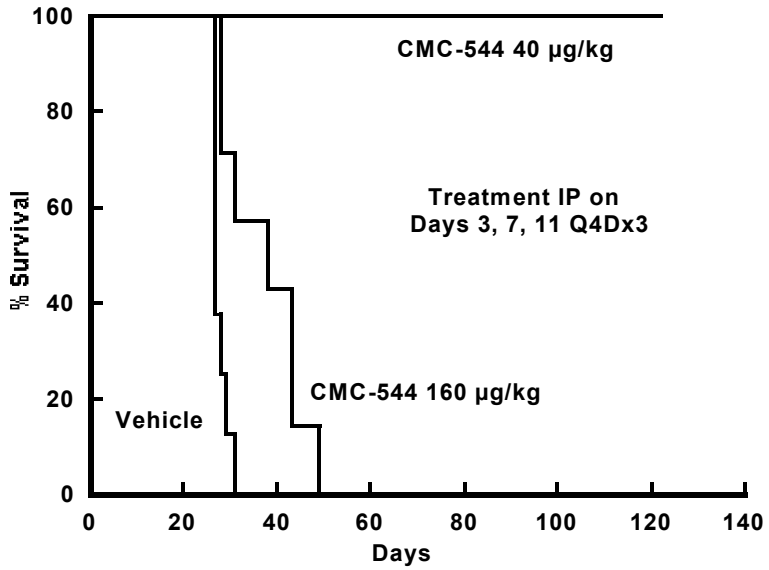
RPT-51502

雄 SCID マウスに 1×10^6 個の Ramos 細胞を尾静脈より静脈内移植した。移植後 3 日（早期病態モデル）または 9 日（進行病態モデル）より，薬物の投与を開始した。早期病態モデルでは，溶媒またはイノツズマブ　オゾガマイシン（1.65 または 6.57 mg/m^2；カリケアマイシン相当量として 40 または 160 µg/kg），進行病態モデルでは溶媒，イノツズマブ　オゾガマイシン（0.42, 1.65 または 6.57 mg/m^2；カリケアマイシン相当量として 10，40 または 160 µg/kg）あるいはゲムツズマブ　オゾガマイシン（0.87, 3.42 または 13.71 mg/m^2；カリケアマイシン相当量として 10，40 または 160 µg/kg）を 4 日ごとに 3 回，腹腔内投与した（7～10 匹/群）。マウスは後肢麻痺の有無について毎日観察し，麻痺が認められたマウスはその時点で安楽殺した。B 細胞リンパ腫（Ramos）

の播種モデルでは，マウスは後肢麻痺を発症して瀕死状態となり，間もなく死亡することが知られている[a]。病理組織学的検査により，これらのマウスにおいて副腎，脾臓およびクモ膜下腔にリンパ腫の転移が高頻度に認められている。

早期病態モデルでは，高用量（6.57 mg/m^2）のイノツズマブ　オゾガマイシンによる延命効果はわずかであったが，低用量（1.65 mg/m^2）では全例が 120 日間以上生存した（Figure 15）。高用量で生存率が低下した理由として，SCID マウスのイノツズマブ　オゾガマイシンに対する忍容性の低さが考えられる（2.6.2.2.2.1 項）。

Figure 15.　Ramos NHL 播種モデル（早期病態モデル）における抗腫瘍効果



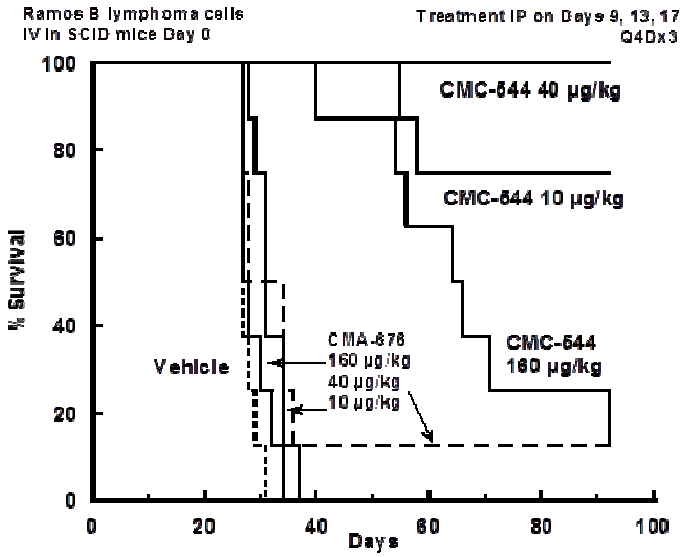
CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン。図中のイノツズマブ　オゾガマイシンの用量はカリケアマイシン相当量で示す。

進行病態モデルでは，溶媒投与群は全例が試験 26 日までに後肢麻痺を発症し，安楽殺された。イノツズマブ　オゾガマイシンの 0.42 mg/m^2 では 75%のマウスが生存し，平均生存期間は 83.1 日であった。1.65 mg/m^2 では全例が観察終了時点である試験 92 日まで生存した。一方，最高用量の 6.57 mg/m^2 での生存率は 12.5%で，平均生存期間は 66.9 日であった（Figure 16）。イノツズマブ　オゾガマイシンのいずれの用量においても後肢麻痺は認められなかった。また，溶媒あるいは 1.65 および 6.57 mg/m^2 のイノツズマブ　オゾガマイシンを投与したマウスで病理組織学的検査を実施した結果，溶媒投与群では脳，脊髄，腎臓または骨髄への腫瘍の浸潤が見られたのに対し，イノツズマブ　オゾガマイシン投与群ではこれらの臓器に腫瘍の浸潤は認められなかった。

[a] Flavell DJ, Boehm DA, Emery L, et al. Therapy of human B-cell lymphoma bearing SCID mice is more effective with anti-CD19- and anti-CD38-saporin immunotoxins used in combination than with either immunotoxin used alone. Int J Cancer 1995; 62:337-44.

ゲムツズマブ　オゾガマイシンは作用を示さず，0.87, 3.42 および 13.71 mg/m^2 の各用量でそれぞれ 87.5%，62.5%および 75%のマウスが後肢麻痺を発症し，安楽殺に至った。

Figure 16.　Ramos NHL 播種モデル（進行病態モデル）における抗腫瘍効果



CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン，CMA-676：ゲムツズマブ　オゾガマイシン。図中の各 ADC の用量はカリケアマイシン相当量で示す。

以上の結果から，イノツズマブ　オゾガマイシンは Ramos NHL の播種モデルにおいて，早期病態モデルおよび進行病態モデルのいずれに対しても有効であることが示された。いずれの病態モデルにおいても，イノツズマブ　オゾガマイシンは 1.65 mg/m^2 で最も良い効果を示した。

2.2.6. NHL に対する作用：イノツズマブ　オゾガマイシンと化学療法剤の比較

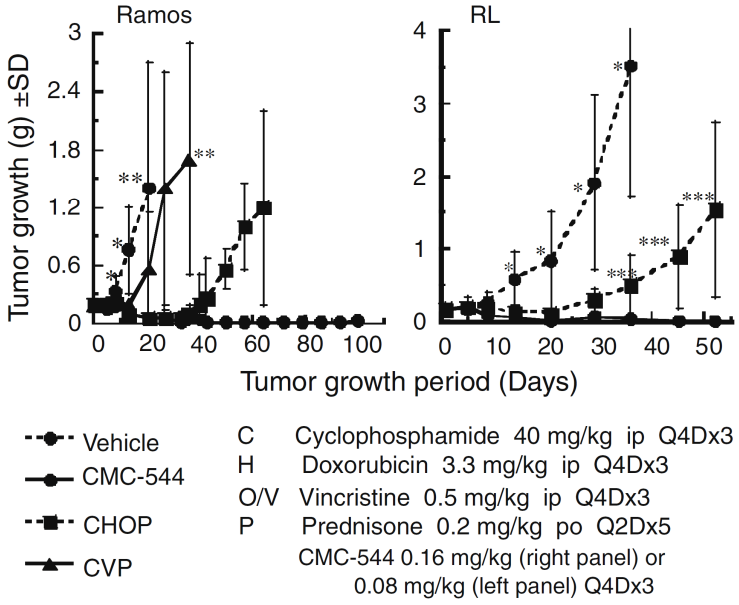
PF-05208773_[redacted]_172726

小型（約 0.1～0.2 g）の腫瘍が定着した Ramos および RL NHL 異種移植モデルにおける抗腫瘍効果を，化学療法剤である CHOP（シクロホスファミド，ドキソルビシン，ビンクリスチンおよび prednisone の 4 剤併用）および CVP（シクロホスファミド，ビンクリスチンおよび prednisone の 3 剤併用）とイノツズマブ　オゾガマイシンで比較した。雌ヌードマウスを全身放射線照射（400 rad）し，3 日後に 5 × 10^6 個の Ramos または RL 細胞を皮下移植した。小型の腫瘍が定着した時点で，溶媒，イノツズマブ　オゾガマイシン，CHOP または CVP の投与を開始した（6～8 匹/群）。CHOP および CVP の投与量はそれぞれの最大耐量（シクロホスファミド：40 mg/kg,

ドキソルビシン : 3.3 mg/kg，ビンクリスチン : 0.5 mg/kg，prednisone : 0.2 mg/kg）[a]とし，prednisone は 2 日ごとに 5 回経口投与，その他は 4 日ごとに 3 回腹腔内投与した。イノツズマブ　オゾガマイシンは Ramos モデルでは 3.30 mg/m^2（カリケアマイシン相当量として 80 µg/kg），RL モデルでは 6.57 mg/m^2（同 160 µg/kg）を 4 日ごとに 3 回腹腔内投与した。

Ramos モデルでは，イノツズマブ　オゾガマイシンは試験期間全体にわたり持続的な腫瘍退縮効果を示したが，CHOP および CVP の効果は一時的で，それぞれ約 40 日および 10 日で腫瘍は再増殖した。RL モデルでもイノツズマブ　オゾガマイシンは試験期間全体にわたり持続的な腫瘍退縮効果を示したが，CHOP は当初は腫瘍増殖阻害を示したものの，約 3 週間で腫瘍は再増殖を開始した（Figure 17）。

Figure 17.　Ramos および RL NHL 異種移植モデルにおけるイノツズマブ　オゾガマイシン，CHOP および CVP の作用



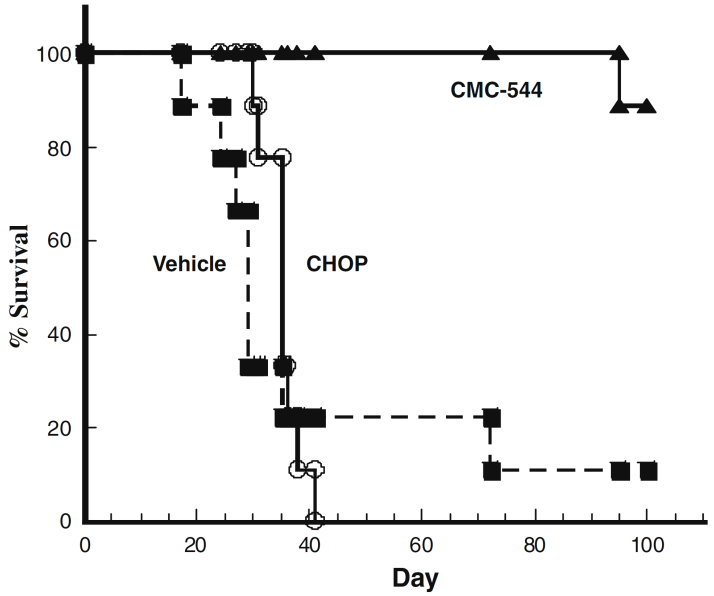
* p < 0.05（他の全投与群との比較），** p < 0.05（イノツズマブ　オゾガマイシンおよび CHOP との比較），*** p < 0.05（イノツズマブ　オゾガマイシンとの比較）。CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン。

Ramos NHL 播種モデルにおける延命効果を CHOP とイノツズマブ　オゾガマイシンで比較した。雄 SCID マウスに 3 × 10^6 個の Ramos 細胞を尾静脈より静脈内移植した。9 日後より溶媒（9 匹/群），CHOP（各薬物の用量は上記最大耐量の半量，10 匹/群）またはイノツズマブ　オゾガマイシン（3.30 mg/m^2；カリケアマイシン相当量として 80 µg/kg，10 匹/群）を 4 日ごとに 3 回，異種移植モデルと同じ経路で投与した。マウスは生死および後肢麻痺の発症について観察した。

[a] Mohammad RM, Wall NR, Dutcher JA, et al. The addition of bryostatin 1 to cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) chemotherapy improves response in a CHOP-resistant human diffuse large cell lymphoma xenograft model. Clin Cancer Res 2000; 6:4950-6.

CHOP は後肢麻痺発症または死亡に対してほとんど効果を示さなかった（$p > 0.05$；溶媒投与群との比較）のに対し，イノツズマブ　オゾガマイシンは播種した腫瘍細胞の増殖をほぼ完全に阻害した（$p < 0.05$；溶媒投与群および CHOP 投与群との比較）（Figure 18）。

Figure 18.　Ramos NHL 播種モデルにおけるイノツズマブ　オゾガマイシンおよび CHOP の作用



CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン

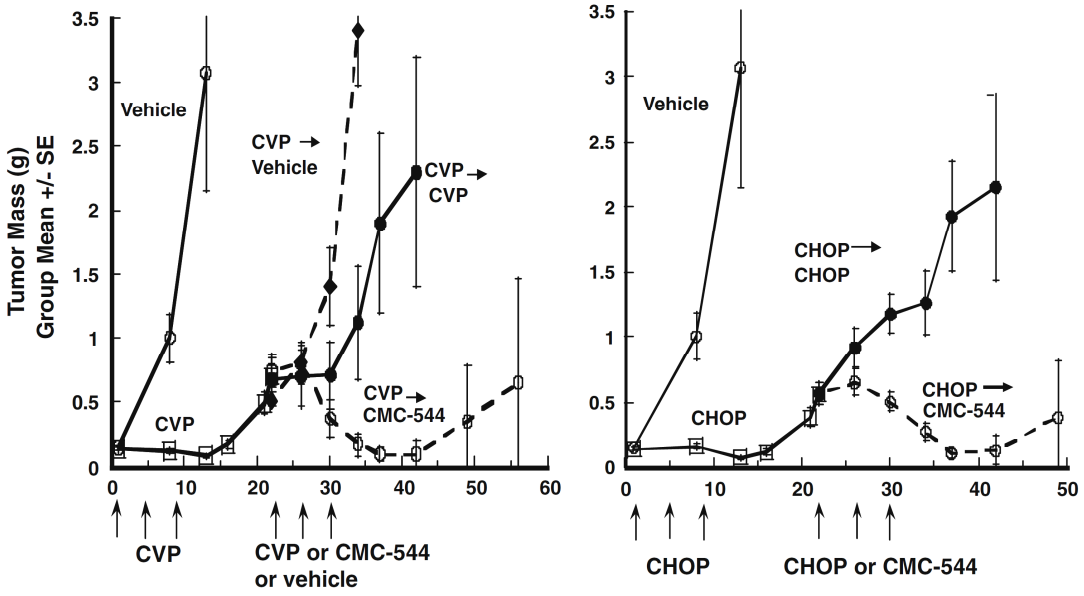
2.2.7. NHL に対する作用：化学療法再発モデル

PF-05208773_[redacted]_172726

CVP または CHOP による治療後に再発した腫瘍に対するイノツズマブ　オゾガマイシンの効果を検討した。小型（0.1～0.2 g）の腫瘍が定着したヌードマウス（6～8 匹/群）に最大耐量の CVP または CHOP（投与用量，経路およびスケジュールは 2.6.2.2.2.6 項参照）を投与した。腫瘍が再増殖を開始した時点で腫瘍サイズに基づいてマウスを群分けし，溶媒，CVP，CHOP またはイノツズマブ　オゾガマイシン（6.57 mg/m^2；カリケアマイシン相当量として 160 µg/kg）を 4 日ごとに 3 回投与した。

CVP および CHOP の投与によって Ramos 腫瘍は最初は退縮したが，投与開始から 20 日以内に再増殖を開始した。再増殖した腫瘍に対して CVP および CHOP はほとんど効果を示さなかったが，イノツズマブ　オゾガマイシンは退縮効果を示した（Figure 19）。これらの結果から，イノツズマブ　オゾガマイシンは化学療法剤による治療後に再発した腫瘍に対しても有効である可能性が示された。

Figure 19.　CVP または CHOP による治療から再発した Ramos NHL に対するイノツズマブ　オゾガマイシンの作用



CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン

2.2.8. NHL に対する作用：イノツズマブ　オゾガマイシンと化学療法剤の併用

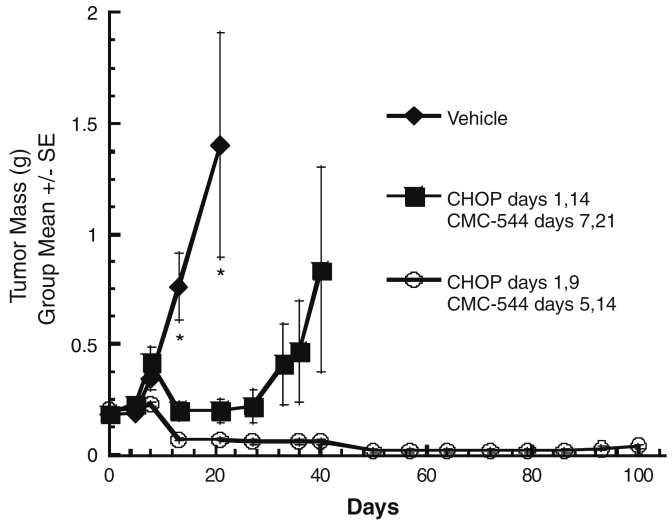
PF-05208773_[redacted]_172726

イノツズマブ　オゾガマイシンと CHOP または CVP との併用効果を検討した。雌ヌードマウスを全身放射線照射（400 rad）し，3 日後に 5×10^6 個の Ramos 細胞を皮下移植した。小型（0.1～0.2 g）の腫瘍が定着した時点より投与を開始した（6～8 匹/群）。投与量は，イノツズマブ　オゾガマイシンは CHOP および CVP との併用でそれぞれ 3.30 および 1.65 mg/m^2（カリケアマイシン相当量としてそれぞれ 80 および 40 μg/kg），CHOP および CVP は最大耐量（2.6.2.2.2.6 項参照）とした。

CHOP との併用試験は，予備検討において CHOP とイノツズマブ　オゾガマイシンを同時に投与したところ 71%（7 匹中 5 匹）のマウスが死亡したことから，逐次投与によるスケジュールで実施した。投与スケジュールは，1) CHOP：試験 1 および 14 日，イノツズマブ　オゾガマイシン：試験 7 および 21 日，2) CHOP：試験 1 および 9 日，イノツズマブ　オゾガマイシン：試験 5 および 14 日の 2 通りで検討した。

両薬物の 1 週間ごとの逐次投与では持続的な腫瘍退縮は認められなかったが，1，5，9 および 14 日の逐次投与では腫瘍退縮効果が 100 日間以上持続した（Figure 20）。

Figure 20.　Ramos NHL 異種移植モデルに対するイノツズマブ　オゾガマイシンと CHOP の逐次投与による作用

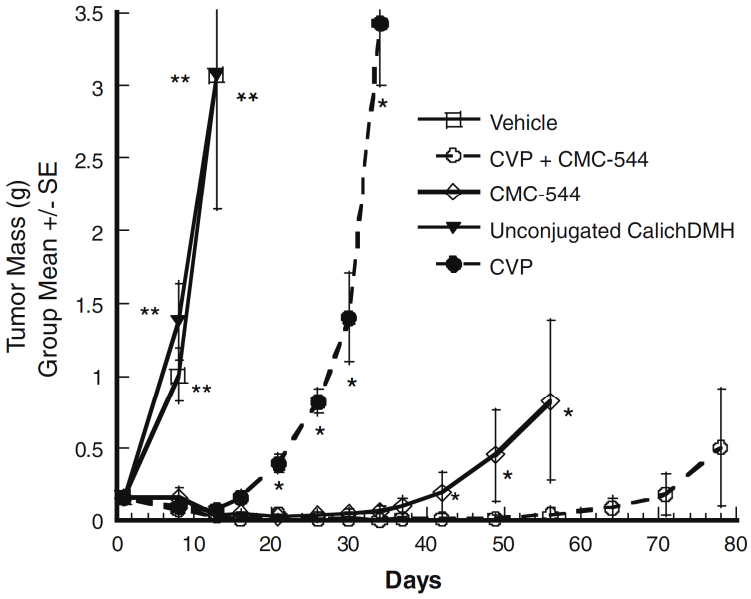


* $p < 0.05$（他の全投与群との比較），CMC-544：イノツズマブ　オゾガマイシン

CVP との併用試験では，CVP（投与用量，経路およびスケジュールは 2.6.2.2.2.6 項参照）およびイノツズマブ　オゾガマイシン（1.65 mg/m^2，4 日ごとに 3 回腹腔内投与）を単独あるいは同時に併用投与した。また，非結合 N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（160 µg/kg）を 4 日ごとに 3 回腹腔内投与した。

イノツズマブ　オゾガマイシン単独による腫瘍増殖阻害効果は約 35 日間持続し，CVP 単独（約 15 日間）よりも強力であった。イノツズマブ　オゾガマイシンおよび CVP の併用では，それぞれの単独投与に比較して統計的に有意に抗腫瘍効果が改善された。一方，非結合 N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は抗腫瘍効果を示さなかった（Figure 21）。

Figure 21.　Ramos NHL 異種移植モデルに対するイノツズマブ　オゾガマイシンと CVP の同時投与による作用



* p < 0.05（他の各群との比較），** p < 0.05（イノツズマブ　オゾガマイシン単独，CVP 単独およびイノツズマブ　オゾガマイシン・CVP 併用との比較）。CMC-544 : イノツズマブ　オゾガマイシン，Unconjugated CalichDMH : 非結合 N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH

3. 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

4. 安全性薬理試験

イノツズマブ　オゾガマイシンの安全性薬理試験として，心血管系，呼吸系および中枢神経系に対する影響を *in vivo* で検討したのに加え，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の hERG 電流に対する阻害作用を *in vitro* で検討した。hERG 試験およびサル心血管系試験を除き，すべての試験は GLP 適用下で実施した。サル心血管系試験は医薬審発第 902 号医薬局審査管理課長通知「安全性薬理試験ガイドラインについて」で規定された適用期日（平成 15 年 7 月 1 日）以前に実施されており，試験実施時期において FDA の GLP 査察を受けていないことから GLP 適合未確認とし，参考資料と位置づけた。

4.1. 心血管系

4.1.1. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の hERG 電流に対する作用

N-acetyl-gamma-calicheamicin-DMHHERG（参考）

hERG 遺伝子を安定的に導入したヒト胎児腎臓（HEK）293 細胞を用いて非結合 N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（1, 3 または 6.77 µmol/L）の hERG カリウムイオンチャネルに対する作用をパッチクランプ法によって検討した。陽性対照にはシサプリドを用いた。

シサプリドは 10.3 nmol/L の IC_{50} 値で hERG 電流を阻害したが，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の hERG 電流に対する阻害率は検討した最高濃度である 6.77 µmol/L でも 1%未満であった。6.77 µmol/L は，臨床試験における非結合カリケアマイシンの C_{max} の平均値［0.050 ng/mL（3.4×10^{-5} µmol/L）未満］[a]の約 200000 倍に相当する。

4.1.2. サル心血管系試験[b]

RPT-47509（参考）

無麻酔のカニクイザルにイノツズマブ　オゾガマイシンを単回静脈内投与して，心血管系に対する影響を評価した。サル（2 匹/性/用量）にテレメトリーを装着し，試験 1 日に溶媒を，試験 3

[a] B1931022 臨床試験において，非結合カリケアマイシンの投与前および点滴終了時（1 時間）の血清中濃度は，評価したほとんどの試料で定量下限値（0.05 ng/mL）未満であった（2.7.2.2.2.1.1.2 項）。

[b] サルの試験で用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの用量は体重あたりのカリケアマイシン量として 10 または 50 µg/kg に相当する。これらの用量を G544 の体重あたり用量に換算するとそれぞれ 0.14 または 0.68 mg/kg となり，サルの換算係数として 12 を用いた体表面積あたり用量は 1.68 または 8.16 mg/m^2 となる。

日に 1.68 または 8.16 mg/m^2 のイノツズマブ　オゾガマイシン（カリケアマイシン相当量として 10 または 50 µg/kg）を投与した。用量は，サルの単回および 4 週間反復投与毒性試験で，それぞれ 16.4 および 4.20 mg/m^2 までの用量で忍容性を示したことから設定した（2.6.6.2.3 項，2.6.6.3.3 項，RPT-46644，RPT-46909）。一般状態は毎日観察し，動脈血圧（収縮期，拡張期および平均），心拍数および心電図を測定した。溶媒および 8.16 mg/m^2 のイノツズマブ　オゾガマイシンを投与した各動物について，投与前および投与後のそれぞれ 3 時点で心拍数ならびに PR，QRS，QT および QTc 間隔を集計した。

イノツズマブ　オゾガマイシンは 1.68 または 8.16 mg/m^2 で心拍数に影響を与えなかった。平均動脈圧は 1.68 mg/m^2 以上で投与後 14～24 時間に 4～6%上昇し，イノツズマブ　オゾガマイシン投与に関連した変化と考えられたが，変化の程度は小さく，用量相関性もなかったことから，毒性学的意義の低い変化と考えられた。PR，QRS，QT または QTc 間隔に変化はみられず，心電図上に心室性不整脈の徴候は認められなかった。カニクイザルの単回投与毒性試験において，イノツズマブ　オゾガマイシンを本試験の最高用量に相当する 8.22 mg/m^2（カリケアマイシン相当量として 50 µg/kg）の用量で投与したときの C_{5min}（雌雄合算値）は 36300 ng/mL で（2.6.4.3.1.3 項），これは再発または難治性 ALL 患者にイノツズマブ　オゾガマイシンを 1.8 mg/m^2/サイクルで反復投与したときのサイクル 4 の第 1 日（投与量 0.8 mg/m^2）における C_{max} の平均値（308 ng/mL；2.7.2.2.2.1.1.2 項）の 118 倍に相当する。

4.2. ラット中枢神経系試験[a]

RPT-47140

雄 Sprague-Dawley ラット（8 匹/群）にイノツズマブ　オゾガマイシン［0（溶媒），0.78，2.4 または 8.46 mg/m^2；カリケアマイシン相当量として 0, 10, 30 または 105.75 µg/kg］を単回静脈内投与して，神経機能に対する影響を評価した。用量は，ラットの忍容性試験および単回投与毒性試験において，最大耐量が 8.34 および 8.22 mg/m^2（いずれもカリケアマイシン相当量として 100 µg/kg）であったことから設定した（2.6.6.2.1 項，2.6.6.2.2 項，RPT-43870，RPT-46645）。生死および一般状態観察，機能観察総合評価（FOB）ならびに後肢開脚，前後肢握力および直腸温について評価した。神経機能評価は投与前および投与後約 0.5，8 および 24 時間に実施した。動物は剖検を行わずに安楽殺した。

イノツズマブ　オゾガマイシン投与に関連した変化は，8.46 mg/m^2 で呼吸数低下（定性的評価）の頻度増加のみで，投与後 8 時間までの観察では 8 匹中 3 匹に，24 時間までの観察では 8 匹中 5 匹に認められた。これらの変化の程度は小さく，動物の全般的な健康状態には影響しなかったこと，また別途実施した呼吸系試験（2.6.2.4.3 項）では再現しなかったことから，毒性学的意義の低い変化と考えられた。

[a] ラットの試験で用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの用量は体重あたりのカリケアマイシン量として 10, 30 または 105.75 µg/kg に相当する。これらの用量を G544 の体重あたり用量に換算するとそれぞれ 0.13, 0.40 または 1.41 mg/kg となり，ラットの換算係数として 6 を用いた体表面積あたり用量は 0.78, 2.4 または 8.46 mg/m^2 となる。

4.3. ラット呼吸系試験

RPT-47139

雄 Sprague-Dawley ラット（8 匹/群）にイノツズマブ　オゾガマイシン［0（溶媒），0.78，2.4 または 8.46 mg/m^2；カリケアマイシン相当量として 0, 10, 30 または 105.75 µg/kg］を単回静脈内投与して，呼吸系に対する影響を評価した。用量は，2.6.2.4.2 項と同様ラットの忍容性試験および単回投与毒性試験における忍容性に基づいて設定した。評価項目は生死，一般状態観察および呼吸パラメータの定量的測定とし，呼吸機能（呼吸数，一回換気量，分時換気量）は，ヘッドアウトプレチスモグラフィにより投与前ならびに投与後約 0.5，8 および 24 時間後に評価した。動物は剖検を行わずに安楽殺した。

8.46 mg/m^2 のイノツズマブ　オゾガマイシンを投与したラットでは投与後 0.5 時間に溶媒対照群と比較して統計的に有意な呼吸数の増加（17%）が認められたが，投与前値との間に差はなかった。同用量群では投与後 8 時間に呼吸数が投与前値と比べて 20%減少し，これに伴い分時換気量も投与前値より統計的に有意に，27%減少した。8.46 mg/m^2 におけるこれらの変化は，呼吸数の投与前値が溶媒対照群より高値であったためと考えられた。2.4 mg/m^2 では投与後 8 時間に呼吸数が投与前値と比べて軽度に（10%）減少したが，毒性学的意義の低い変化と考えられた。0.78 mg/m^2 では投与後 24 時間に一回換気量が投与前値と比べて統計的に有意に増加（12%）したが，同時点の他の群との間に差はなく，概して溶媒投与群における変動の範囲内であった。以上の結果から，イノツズマブ　オゾガマイシンは 8.46 mg/m^2 までの用量で呼吸系に対して毒性学的意義のある影響を与えないと考えられた。

ラットを用いた補助的なトキシコキネティクス試験において，中枢神経系および呼吸系試験で検討した最高用量 8.46 mg/m^2（カリケアマイシン相当量として 105.75 µg/kg）に近似した用量である 7.68 mg/m^2（カリケアマイシン相当量として 100 µg/kg）を単回静脈内投与したときの C_{5min}（雌雄合算値）は 38900 ng/mL で（2.6.4.3.1.2 項），これは再発または難治性 ALL 患者にイノツズマブ　オゾガマイシンを 1.8 mg/m^2/サイクルで反復投与したときのサイクル 4 の第 1 日（投与量 0.8 mg/m^2）における C_{max} の平均値（308 ng/mL；2.7.2.2.2.1.1.2 項）の 126 倍に相当する。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6. 考察及び結論

イノツズマブ　オゾガマイシンの効力を裏付ける試験として，腫瘍細胞への結合能ならびに *in vitro* および *in vivo* での B 細胞性 ALL および NHL に対する作用を評価した。*In vitro* では，イノツズマブ　オゾガマイシンはこれらの腫瘍細胞に対して濃度依存的に強力な増殖阻害作用を示

した。*In vivo* では，皮下移植した異種移植モデルにおいて腫瘍退縮効果を示し，全身播種モデルにおいても延命効果を示した。一方，イノツズマブ　オゾガマイシンのイムノグロブリン部分である非結合 G544 は補体結合，CDC および ADCC 活性を示さず，抗腫瘍効果も示さなかった。

カニクイザルを用いた心血管系安全性薬理試験において，イノツズマブ　オゾガマイシンは 1.68 mg/m^2 以上の用量で軽度の血圧上昇を引き起こしたが，その毒性学的意義は低いと考えられ，心拍数や心電図パラメータ（PR，QRS，QT および QTc 間隔）には影響を与えなかった。なお，ALL 患者を対象とした B1931022 および B1931010 臨床試験において，イノツズマブ　オゾガマイシン投与群では血圧および心拍数を含むバイタルサインの測定値およびベースラインからの変化量に臨床的に意義のある所見は認められておらず，また心電図検査でも QTcF 間隔が 500 msec を超えた被験者は認められなかった（2.7.4.4 項）。N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は hERG カリウムイオンチャネルに対して 6.77 µmol/L までの濃度で作用を示さなかった。ラットを用いた中枢神経系および呼吸系試験において，イノツズマブ　オゾガマイシンを 8.46 mg/m^2 までの用量で投与しても，毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

以上，イノツズマブ　オゾガマイシンは CD22 陽性腫瘍を標的とする，強力かつ特異的な ADC であることが示された。

7. 図表

薬理試験の結果を補足する表は 2.6.3 薬理試験概要表に示す。

TABLE OF CONTENTS

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS 5
2.6.3.3 SECONDARY PHARMACODYNAMICS 15
2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY 16

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PF-05208773

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics				
Binding Properties of G544 Antibody and Inotuzumab Ozogamicin	Biacore 2000	In Vitro	Pfizer WRD (Wyeth Research)	RPT-44320
G544 Antibody Binding Domain Mapping and Blocking Studies Using Murine mAbs of Known Specificity to CD22	Biacore and Flow Cytometry	In Vitro	Pfizer WRD (Wyeth Research)	RPT-48437
Surface Expression of CD22 in B-cell ALL and NHL Cell Lines and G544 Binding Capacity	Flow Cytometry	In Vitro	Pfizer WRD	PF-05208773_[redacted]_145820
Binding of G544 Antibody on Tumor Cell Lines and Normal B Cells From Mouse, Rat, Rabbit, Cynomolgus Monkey and Human Whole Blood	Quantitative Flow Cytometry	In Vitro	Pfizer WRD	PF-05208773_[redacted]_145201
Internalization of G544 Antibody in ALL and NHL Tumor Cell Lines	Imaging Flow Cytometry	In Vitro	Pfizer WRD	PF-05208773_[redacted]_115037
Analysis of ADCC and CDC Activity	Human Peripheral Blood Effector Cells/ CD22-Positive Ramos Target Cells	In Vitro	Pfizer WRD (Wyeth Research)	RPT-51502
Cytotoxicity and DNA Damage in B-cell ALL and Lymphoma Cells	Colorimetric Cell Viability Assay, 53BP1 Foci Formation Assay	In Vitro	Pfizer WRD	PF-05208773_[redacted]_145820
Cytotoxicity in B-cell Lymphoma Cells	Cell Viability by Flow Cytometry	In Vitro	Pfizer WRD (Wyeth Research)	RPT-44320
Maximum Non-lethal Dose	Non-tumor Bearing Nude Mice	In Vivo	Pfizer WRD (Wyeth Research)	RPT-44320

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PF-05208773

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Subcutaneous ALL Tumor Xenografts	Subcutaneous B-cell ALL Tumors in Athymic, Nude Female Mice	IP	Pfizer WRD	PF-05208773_[redacted]_190248
Systemically-disseminated ALL Tumors	Disseminated Reh ALL in Male SCID Mice	IP	Pfizer WRD	PF-05208773_[redacted]_190248
Dose Response in Small and Large B-cell Lymphoma Tumor Xenografts	Subcutaneous Ramos and RL cell Xenografts in Female Athymic Nude Mice	IP	Pfizer WRD (Wyeth Research)	RPT-44320
Dose Response in B-cell Lymphoma Tumor Xenografts	Subcutaneous Ramos Xenografts in Male SCID and Female Athymic Nude Mice	IP	Pfizer WRD (Wyeth Research)	RPT-51502
Comparison of Route of Administration and Drug Antibody Ratios in B-cell Lymphoma Tumor Xenografts	Subcutaneous RL Lymphoma Xenografts in Female Athymic Nude Mice	IP and IV	Pfizer WRD (Wyeth Research)	RPT-44320
Systemically-disseminated B-cell Lymphoma Tumors	Disseminated Ramos B-cell Lymphoma in Male SCID Mice	IP	Pfizer WRD (Wyeth Research)	RPT-51502
Inotuzumab Ozogamicin, CVP and CHOP Chemotherapy in B-cell Lymphoma Xenografts and Disseminated Tumors	Subcutaneous RL B-cell Lymphoma in Female Nude Mice and Disseminated Ramos in Male SCID Mice	IP	Pfizer WRD (Wyeth Research)	PF-05208773_[redacted]_172726
Secondary Pharmacodynamics No formal studies were conducted				

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PF-05208773

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Safety Pharmacology				
hERG patch clamp N-acetyl-gamma-calicheamicin-DMH	HEK293 cells stably expressing hERG	In Vitro	Pfizer WRD	N-acetyl-gamma-calicheamicin-DMHHERG
Respiratory	Rat/Sprague-Dawley	IV	Wyeth Research	RPT-47139
Central Nervous System	Rat/Sprague-Dawley	IV	Wyeth Research	RPT-47140
Cardiovascular	Monkey/Cynomolgus	IV	Wyeth Research	RPT-47509
Pharmacodynamic Drug Interactions				
None				

ADCC = Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ALL = Acute lymphoblastic leukemia; CD = Cluster of differentiation; CDC = Complement-dependent cytotoxicity; CHOP = Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; CVP = Cyclophosphamide, vincristine, and prednisone; DMH = Dimethyl hydrazide; DNA = Deoxyribonucleic acid; HEK = Human embryonic kidney; hERG = Human ether-à-go-go gene; IP = Intraperitoneal; IV = Intravenous; mAb = Monoclonal antibody; NHL = Non-Hodgkin lymphoma; SCID = Severe combined immunodeficiency; WRD = Worldwide Research and Development.

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Binding Affinity to Human CD22	Human CD22-Fc Protein	In Vitro	Lower drug-loaded IO (21 µg of calichDMH/ mg Ab); Higher drug-loaded IO (87 µg of calichDMH/ mg Ab)	NA	G544 Ab: K_D = 1.30 x 10^{-10} M; 21 µg calichDMH/mg Ab: K_D = 1.20 x 10^{-10} M; 87 µg calichDMH/ mg Ab: K_D = 1.50 x 10^{-10} M	Non GLP	RPT-44320
Epitope Comparison for Anti-CD22 mAbs	Murine, Anti-human Anti-CD22 mAbs	In Vitro	NA	NA	G544 antibody-binding site on CD22 was localized to epitope A/Ig-like domain 1 of CD22	Non GLP	RPT-48437
Binding of G544 Ab to B-cell ALL and Lymphoma Cell Lines (FACS)	B-ALL (Reh, RS4;11), Pre-B ALL (SUP-B15), and B-cell Lymphoma (Ramos) Cell Lines	In Vitro	NA	NA	CD22 on cell surface of Ramos > Reh and RS4;11 > SUP-B15 (undetectable)	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_145820
Quantitative Flow Cytometry for Cell Surface CD22 Receptor Density Using Labeled G544 Ab	B-ALL (Reh, RS4;11) and B-cell Lymphoma (Ramos) Cell Lines	In Vitro	NA	NA	CD22 receptors/cell: Reh 6882±415; RS4;11 5424±297; Ramos 36029±5004	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_145201

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
G544 Ab Binding to Normal Cell Subsets in Blood of Nonclinical Species and Human	Whole Blood From CD1 Mice, Sprague-Dawley Rats, New Zealand Rabbits, Cynomolgus Macaque Monkeys, and Healthy Human Donors	In Vitro	NA	NA	Strong saturable binding of G544 antibody to human B-cells; No binding to B-cells from mouse, rat, rabbit or cynomolgus monkey	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_145201
Internalization Kinetics of G544 Antibody	ALL (Reh and RS4;11) and B-cell Lymphoma (Ramos) Cell Lines, as well as Normal Human B-cells	In Vitro	NA	NA	Internalization Score (IS) and Cytosolic Intensity (CI), $t_{½}$ (min): Reh: IS 4.6±0.2, CI 14.5±1.9; RS4;11: IS 6.4±1.1; CI 13.1±1.1; Ramos: IS 34.3±7.5; CI 44.5±24.9 Human B-cells: IS 2.8±0.6; CI 9.3±2.4	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_115037
DNA Double Strand Breaks	53BP1 Foci Formation in Reh ALL Cells	In Vitro	NA	NA	IO treatment induces 53BP1 foci formation	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_145820

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
CDC and ADCC Activity	PBMC Effector Cells; CD20-positive, CD22-positive, Lewis Y-negative Ramos B-cell Lymphoma Target Cells	In Vitro	NA	NA	No CDC or ADCC activity for G544 Ab; Rituximab positive control mediated both CDC and ADCC; Hu3S193 anti-Lewis Y Ab negative control did not show ADCC	Non GLP	RPT-51502
Cytotoxicity	CD-22 Positive B-cell Lymphoma (Daudi, Raji, Ramos, RL); CD33-positive, CD22-negative HL60	In Vitro	NA	NA	IO mediated specific and concentration-dependent cytotoxicity against Daudi, Raji, Ramos or RL CD22-positive cell lines, but was significantly less potent against the CD22-negative, CD33-positive cell line HL-60. Unconjugated G544 antibody, even at a concentration of 100 µg/mL had no effect on the growth of the Daudi, Raji, Ramos, or RL cells.	Non GLP	RPT-44320

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Cytotoxicity	B-ALL (Reh, RS4;11), B-cell Lymphoma (Ramos), And HL60 (CD22-control)	In Vitro	NA	NA	IO IC_{50} (in pM equivalents of N-Ac-γ-calicheamicin DMH, 95% CI): Reh 13.3 pM RS4;11 46.7 pM SUP-B15 53.3 pM Ramos 100 pM HL60 7500 pM N-Ac-γ-calicheamicin DMH IC_{50}: Reh 66.7 pM RS4;11 100 pM SUP-B15 48 pM Ramos 586 pM HL60 500 pM GO Control IC_{50}: Reh 440 pM RS4;11 1,060 pM SUP-B15 846.7 pM Ramos 6,333 pM HL60 50 pM	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_145820
Maximum Non-lethal Dose in Nude Mice	Non-tumor Bearing , Athymic, Nude Mice	IP Q4Dx3	IO Dose range: 3.3-26.28 mg/m^2 IP Q4x3	Female 10/ Group	MND: 9.87 mg/m^2		RPT-44320

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Lethality in Non-tumor Bearing SCID Mice	Non-tumor Bearing, SCID Mice	IP Q4Dx3	IO at 3.3 and 6.57 mg/m^2	Male 10/ Group	Day 84: 3.3 mg/m^2 dose: 1/10 mice died 6.57 mg/m^2 dose: 5/10 mice died		RPT-51502
IO Single Agent in Reh Small, Staged SC Xenografts	BALB/c Irradiated, nu/nu Mice; Reh ALL	IP Q4Dx3	IO: 1.65 and 6.57 mg/m^2; GO: 6.57 mg/m^2; Mix of 160 µg/kg unconjugated calichDMH and 3 mg/kg G544 Ab	Female 6 to 8/ Treatment Group	IO at 6.57 mg/m^2: 100% regression of tumor growth, (tumor-free through 102 days); IO at 1.65 mg/m^2: Tumor growth suppressed for approximately 60 days tumor before regrowth; IO at 0.42 mg/m^2: Tumor growth suppressed for 30 days before regrowth; GO at 13.71 mg/m^2 was much less potent than IO at 6.57 mg/m^2; Mix of G544 and unconjugated CalichDMH admin IP was ineffective.	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_190248
IO Single Agent in Advanced Disseminated Reh	CB17 SCID Mice; Reh ALL	IP Q4Dx3	IO 0.18 or 3.3 mg/m^2; Vehicle (PBS)	Male 9 to 10/ Treatment Group	IO at 3.3 mg/m^2 resulted in 100% survival; IO at 0.18 mg/m^2 resulted in 90% survival over 127-day observation period.	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_190248

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Human CD45-Positive Cells in Bone Marrow of Mice With Advanced Disseminated Reh	CB17 SCID Mice; Reh ALL	IP Q4Dx3	IO 3.3 mg/m^2; Vehicle (PBS)	Male 4 Vehicle Treated, 3 IO-Treated	Flow cytometric analysis of bone marrow at days 35-43 showed: 49.9±17.6% CD45-positive leukemic cells for vehicle-treated; 12.5±1.9% CD45-positive leukemic cells for IO treated.	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_190248
IO Single Agent Activity in Ramos Small, Staged SC Xenografts	Athymic, Irradiated Nude Mice; Ramos B-cell Lymphoma	IP Q4Dx3,	IO:0.42, 1.65, and 6.57 mg/m^2; Mu-Anti-CD22-calichDMH:0.42 and 6.57 mg/m^2; G544 Ab: 10 mg/kg	Female 6 to 8/ Treatment Group	IO: MED of 0.42 mg/m^2 and complete sustained regression at 6.57 mg/m^2; MuAnti-CD22-CalichDMH: Dose-dependent activity, not as effective as IO G544 Ab: No effect on tumor growth.	Non GLP	RPT-44320
IO Single Agent Activity in RL Small, Staged SC Xenografts	Athymic, Irradiated Nude Mice; RL B-cell Lymphoma	IP Q4Dx3,	IO: 0.81, 1.65, and 4.92 mg/m^2; Vehicle	Female 6 to 8/ Treatment Group	IO: MED 0.81 mg/m^2 and complete sustained regression with 4.92 mg/m^2.	Non GLP	RPT-44320
IO Single Agent IV Versus IP Administration in RL Small, Staged SC Xenografts	Athymic, Irradiated Nude Mice; RL B-cell Lymphoma	IV Versus IP Q4Dx3	IO: 0.81, 1.65, and 4.92 mg/m^2	Female 6 to 8/ Treatment Group	IV and IP equally efficacious at all 3 doses; 4.92 mg/m^2 resulted in complete regression by either route.	Non GLP	RPT-44320

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Comparison of IO Drug Loading in RL Small, Staged SC Xenografts	Athymic, Irradiated Nude Mice; RL B-cell Lymphoma	IP Q4Dx3	IO drug load comparison: 11.43 and 45.72 mg/m^2 for lower drug loaded 21 µg calichDMH/mg Ab; 2.76 and 11.03 mg/m^2 for higher loaded 87 µg calichDMH/mg Ab; Unconjugated calich DMH:160 µg/kg	Female 6 to 8/ Treatment Group	No difference in efficacy between the lower load and higher load lots; Unconjugated calichDMH was inactive.	Non GLP	RPT-44320
IO Single Agent in Large Ramos and RL SC Xenografts	Athymic Irradiated Nude Mice; Ramos and RL B-cell Lymphoma	IP Q4Dx3	IO: 6.57 mg/m^2; GO: 13.71 mg/m^2	Female 5/ Treatment Group	IO: tumor regression through day 50; GO: no effect on tumor growth.	Non GLP	RPT-44320

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
IO Single Agent in Early and Advanced Disseminated Ramos	CB17 SCID Mice; Early and Advanced Disseminated Ramos B-cell Lymphoma	IP Q4Dx3	IO in early model: 1.65 and 6.57 mg/m^2; IO in advanced model: 0.42, 1.65 and 6.57 mg/m^2; Vehicle Control	Male 7 to 10/ Treatment Group	IO in early model: 1.65 mg/m^2 had 100% survival over the 120 day observation period; 6.57 mg/m^2 produced only a small increase in survival over the vehicle control (likely due to SCID mouse sensitivity to high dose IO); IO in advanced model: 1.65 mg/m^2 gave best response of 100% survival at 92 days (study termination)	Non GLP	RPT-51502
IO Versus CHOP or CVP in Small, Staged Ramos SC Xenografts	Athymic, Irradiated Nude Mice; Ramos B-cell Lymphoma	IO: IP Q4Dx3; CVP/CHOP: IP Q4Dx3, except P at Q2Dx5	IO 3.3 mg/m^2; CHOP or CVP administered at the MTD of each component; Vehicle	Female 6 to 8 / Treatment Group	CHOP suppressed tumor growth for approximately 40 days before relapse, while CVP only suppressed tumor growth for approximately 10 days before relapse.	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_172726
IO Versus CHOP or CVP in Small, Staged RL SC Xenografts	Athymic, Irradiated Nude Mice; RL B-cell Lymphoma	IO: IP Q4Dx3; CVP/CHOP: IP Q4Dx3, P at Q2Dx5	IO: 6.57 mg/m^2; CHOP or CVP administered at the MTD of each component	Female 6 to 8 / Treatment Group	CHOP led to a significant inhibition of growth; however, 3 weeks later tumors re-grew; Anti-tumor effect of 6.57 mg/m^2 IO lasted throughout the experimental period.	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_172726

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
IO Versus CHOP in Advanced Disseminated Ramos	CB17 SCID Mice; Ramos B-cell Lymphoma	IO: IP Q4Dx3; CHOP: IP Q4Dx3, except P at Q2Dx5	IO: 3.3 mg/m^2; CHOP: C- 60 mg/m^2 IP, H- 4.95 mg/m^2 IP, O- 0.75 mg/m^2 IP, P- 0.3 mg/m^2 PO	Male 9 to 10 / Treatment Group	CHOP was unable to protect from hind-limb paralysis and/or death; IO almost completely protected ($p < 0.05$ versus vehicle- or CHOP-treated)	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_172726
IO Treatment in CHOP or CVP-resistant/ relapsed Small, Staged Ramos SC Xenografts	Athymic, Irradiated Nude Mice; Ramos B-cell Lymphoma	IO: IP Q4Dx3; IP Q4Dx3, except P at Q2Dx5	IO: 6.57 mg/m^2; CHOP or CVP administered at the MTD of each component; Vehicle	Female 6 to 8 / Treatment Group	CVP or CHOP tumors relapsed within approximately 20 days after the initiation treatment; Relapsed Ramos xenografts were poorly responsive to re-treatment with CVP or CHOP but regressed upon further treatment with IO.	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_172726
Combination of CHOP Chemotherapy and IO in Small, Staged Ramos SC Xenografts	Athymic, Irradiated Nude Mice; Ramos B-cell Lymphoma	IP CHOP on d 1, 14, and IO d 7, 21; Or, CHOP d 1,9 and IO on d 5, 14; (P dosed at Q2Dx5)	IO: 3.3 mg/m^2 ; CHOP at the MTD of each component	Female 6 to 8 / Treatment Group	Weekly alternating administration of CHOP and IO was not sufficient to induce sustained tumor regression; Alternating every 4 days caused complete tumor regression- maintained for greater than 100 days.	Non GLP	PF-05208773_[redacted]_172726

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Combination of CVP Chemotherapy and IO in Small, Staged Ramos SC Xenografts	Athymic, Irradiated Nude Mice; Ramos B-cell Lymphoma	IP Q4DxS	IO: 1.65 mg/m^2 ; CVP co-administered with IO at the MTD of each component; Unconjugated calichDMH: 160 µg/kg; Vehicle	Female 6 to 8/ Treatment Group	Unconjugated calichDMH at 160 µg/kg was ineffective against established Ramos xenografts;. Co-administration of CVP and IO caused regression of established Ramos xenografts and significantly ($p < 0.05$) improved the antitumor activity over chemotherapy or IO alone.	Non GLP	PF-05208773_ [redacted]_172726

Ab = Antibody; ADCC = Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ALL = Acute lymphoblastic leukemia; calichDMH = N-Ac-γ-calicheamicin DMH; CD = Cluster of differentiation; CDC = Complement-dependent cytotoxicity; CHOP and CVP (C = cyclophosphamide, H = doxorubicin, O or V = vincristine, P = prednisone); CI = Cytosolic intensity; d = Days; DNA = Deoxyribonucleic acid; FACS = Fluorescence-activated cell sorting; GLP = Good Laboratory Practice; GO = Gemtuzumab Ozogamicin; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; Ig = Immunoglobulin; IO = Inotuzumab Ozogamicin; IP = Intraperitoneal; IS = Internalization score; IV = Intravenous; K_D = Rate of dissociation; MTD = Maximum tolerated dose; NA = Not applicable; No = Number; PBMC = Peripheral blood mononuclear cell; PBS = Phosphate buffered saline; PO = Oral; Q2Dx5 = Once every 2 days for a total of five doses; Q4Dx3 = Once every four days for a total of three doses; SC = Subcutaneous; SCID = Severe combined immunodeficiency.

a Doses of inotuzumab ozogamicin expressed as calicheamicin equivalents on the basis of µg/kg of body weight were 4, 10, 16, 20, 40, 80, 120, 160, 240, 320, and 640 µg/kg with an average loading of 73 µg calicheamicin per mg of antibody. When expressed as dose equivalents of the G544 antibody on the basis of mg/kg of body weight, doses were 0.05, 0.14, 0.22, 0.27, 0.55, 1.1, 1.64, 2.19, 3.29, 4.38, and 8.76 mg/kg. Doses in mg/kg of body weight were converted to mg/m^2 of body surface area using a conversion factor of 3 for mice resulting in stated doses of 0.18, 0.42, 0.66, 0.81, 1.65, 3.3, 4.92, 6.57, 9.87, 13.14, and 26.28 mg/m^2. Gemtuzumab ozogamicin expressed as calicheamicin equivalents on the basis of µg/kg of body weight was 160 µg/kg using an average loading of 35 µg calicheamicin per mg of antibody for the conversion to 4.57 mg/kg and then converted to13.71 mg/m^2.

2.6.3.3 SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-05208773

Secondary pharmacodynamics studies with inotuzumab ozogamicin have not been conducted.

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PF-05208773

In Vitro

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Concentration (µM)	Results	GLP Compliance	Study Number
hERG Patch-Clamp	HEK-293 stably expressing hERG	1, 3, 6.77 N-acetyl-gamma-calicheamicin DMH	0.04%, -0.4%, and -0.5% inhibition of hERG current at 1, 3, and 6.77 µM, respectively; IC_{50} >6.77 µM	No	N-acetyl-gamma-calicheamicin-DMHHERG

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PF-05208773

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] Protein (G544 Antibody) Dose Equivalent (mg/m^2)	Doses[a] Protein (G544 Antibody) Dose Equivalent (mg/kg)	Doses[a] NAc-Gamma Calicheamicin DMH AcBut Dose Equiv. (µg/kg)	Number/ Sex/ Group	Noteworthy Findings	GLP Study	Study Number
Respiratory RR, TV, MV	Rat/ Sprague-Dawley	Intravenous, 1.5 mL/kg (2.78% sucrose, 0.018% polysorbate 80, 0.54% sodium chloride, 0.449% Tris, sterile water for injection, pH 8.0/Solution) Lot L22416-36	0 (vehicle) 0.78 2.4 8.46	0 (vehicle) 0.13 0.40 1.41	0 (vehicle) 10 30 105.75	8M	None	Yes	RPT-47139
Central Nervous System FOB, BT, LA	Rat/ Sprague-Dawley	Intravenous, 1.5 mL/kg (2.78% sucrose, 0.018% polysorbate 80, 0.54% sodium chloride, 0.449% Tris, sterile water for injection, pH 8.0/Solution) Lot L22416-36	0 (vehicle) 0.78 2.4 8.46	0 (vehicle) 0.13 0.40 1.41	0 (vehicle) 10 30 105.75	8M	**≥0.78 mg/m^2:** light-colored feces **8.46 mg/m^2:** ↓ RR	Yes	RPT-47140

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PF-05208773

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] Protein (G544 Antibody) Dose Equivalent (mg/m^2)	Doses[a] Protein (G544 Antibody) Dose Equivalent (mg/kg)	Doses[a] NAc-Gamma Calicheamicin DMH AcBut Dose Equiv. (µg/kg)	Number/ Sex/ Group	Noteworthy Findings	GLP Study	Study Number
Cardiovascular ECG: PR-I, QRS-I, QT-I, QTc, HR Systemic Arterial BP: SBP, DBP, MBP	Monkey/ Cynomolgus (ambulatory telemetry)	Intravenous, 2 mL/kg (2.78% sucrose 1.67% dextran-40, 0.018% polysorbate 80, 0.54% sodium chloride, 0.449% Tris, sterile water for injection, pH 8.0/Solution) Lot PSG 2024-062	0 (vehicle) 1.68 8.16	0 (vehicle) 0.14 0.68	0 (vehicle) 10 50	4 (vehicle); 2 (PF-05208773)	**1.68 mg/m^2:** 14:00-22:15 HPD ↑ BP **8.16 mg/m^2:** 5:15-7:15 HPD ↓ BP 16:15-23:30 HPD ↑ BP	Unconfirmed[b]	RPT-47509

BP = Blood pressure; BT = Body temperature; DMH = Dimethyl hydrazide; DBP = Diastolic blood pressure; ECG = Electrocardiogram; FOB = Functional observational battery; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = Human embryonic kidney; hERG = Human ether-à-go-go gene; HPD = Hours postdose; HR = Heart rate; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; LA = Locomotor activity; M = Male; MBP = Mean blood pressure; MV = Minute volume; PR-I = P-R interval; QRS-I = Q-R-S interval; QTc = Corrected Qt interval; QT-I = Q-T interval; RR = Respiratory rate; SBP = Systolic blood pressure; Tris = Tromethamine; TV = Tidal volume.

a. Doses are expressed as dose equivalents of the G544 antibody protein on the basis of mg/m^2 of body surface area, dose equivalents of the G544 antibody protein on the basis of mg/kg of body weight, and as calicheamicin equivalents on the basis of µg/kg of body weight. Doses in mg protein/kg were converted to mg protein/m^2 using the following conversion factors: 6 for rats and 12 for monkeys.

b. An FDA's GLP inspection was not conducted at the testing facility during the study period.