TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 3
略語・用語の定義一覧 4
パラメータの略号および算出法 5
1. まとめ 6
2. 分析法 9
2.1. ラット，ウサギおよびサルの血清中イノツズマブ　オゾガマイシンの定量 9
2.2. ラットおよびサルの血清中総 G544 の定量 11
2.3. ラット，ウサギおよびサルの血清中総カリケアマイシンの測定 11
2.4. ラットおよびサルの血清中非結合カリケアマイシンの定量 11
2.5. 標識化合物の分析 12
2.6. ラット，ウサギおよびサルの血清中 ADA の検出 13
3. 吸収 14
3.1. 単回投与時の薬物動態およびトキシコキネティクス 14
3.1.1. マウス 14
3.1.2. ラット 14
3.1.3. サル 17
3.2. 反復投与後の薬物動態（トキシコキネティクス） 17
3.2.1. ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験でのトキシコキネティクス 18
3.2.2. ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験でのトキシコキネティクス 18
3.2.3. ラットを用いた受胎能試験 21
3.2.4. ラットを用いた胚・胎児発生試験 21
3.2.5. ウサギを用いた胚・胎児発生試験 22
3.2.6. サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験でのトキシコキネティクス 22
3.2.7. サルを用いた 26 週間反復投与毒性試験でのトキシコキネティクス 23
4. 分布 25
4.1. 組織分布 25
4.2. 血漿タンパク結合率 25
4.3. 赤血球移行性 25
4.4. トランスポーターの基質としての評価 26
4.4.1. 排出トランスポーター 26

4.4.2. 肝取り込みトランスポーター 26
4.5. 胎盤通過性 26
5. 代謝（動物種間の比較） 27
5.1. In vivo 代謝 27
5.1.1. ラット 27
5.1.2. ヒト 29
5.2. [^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンの ex vivo 代謝 32
5.3. [^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の in vitro 代謝 32
6. 排泄 35
7. 薬物動態学的薬物相互作用 36
7.1. CYP を阻害する可能性 36
7.1.1. イノツズマブ　オゾガマイシン 36
7.1.2. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH 36
7.2. CYP を誘導する可能性 37
7.2.1. イノツズマブ　オゾガマイシン 37
7.2.2. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH 38
7.3. UGT を阻害する可能性 38
7.4. 薬物トランスポーターを阻害する可能性 38
7.4.1. 排出トランスポーター 39
7.4.2. 肝取り込みトランスポーター 39
7.4.3. 腎取り込みトランスポーター 39
8. その他の薬物動態試験 40
9. 考察及び結論 41
10. 図表 44

LIST OF TABLES

Table 1. イノツズマブ　オゾガマイシンの分析法の概要 10
Table 2. イノツズマブ　オゾガマイシンを単回腹腔内投与したヌードマウスにおける薬物動態パラメータ（平均値） 14
Table 3. [^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを単回静脈内投与した Sprague-Dawley ラットにおける薬物動態パラメータ（平均値） 16
Table 4. イノツズマブ　オゾガマイシンを単回静脈内投与した CD VAF ラットにおける薬物動態パラメータ（平均値）（RPT-46233） 16

Table 5. イノツズマブ　オゾガマイシンを単回静脈内投与したカニクイザルにおける薬物動態パラメータ（平均値）（RPT-46644） 17
Table 6. イノツズマブ　オゾガマイシンを反復投与した雌雄ラットにおけるトキシコキネティクスパラメータ（平均値 ± 標準誤差） 20
Table 7. 雌ラットを用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの反復投与生殖発生毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ（平均値 ± 標準誤差） 21
Table 8. 雌ウサギを用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの反復投与生殖発生毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ（平均値 ± 標準誤差） 22
Table 9. イノツズマブ　オゾガマイシンを反復投与した雌雄サルにおけるトキシコキネティクスパラメータ（平均値± 標準偏差） 24

LIST OF FIGURES

Figure 1. [^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンの構造 12
Figure 2. [^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の構造 12
Figure 3. イノツズマブ　オゾガマイシンおよび非結合カリケアマイシンの主代謝経路 27
Figure 4. ラットおよびヒトの血中代謝物 30
Figure 5. ラットおよびヒトの排泄物中代謝物 31
Figure 6. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH のラット，サルおよびヒト肝 S9 による代謝 34

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
ALL	Acute lymphatic leukemia：急性リンパ性白血病
AUC	Area under the plasma concentration-time curve：濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistant protein：乳癌耐性タンパク質
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
CL	Clearance：クリアランス
CYP	Cytochrome P450：シトクロム P450
DMH	Dimethylhydrazide：ジメチルヒドラジド
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定法
EMA	European Medicines Agency：欧州医薬品庁
F	Bioavailability：バイオアベイラビリティ
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
f_u	Fraction unbound：非結合型分率
G544	Recombinant humanized IgG4 antibody：遺伝子組換えヒト化 IgG4 抗体
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GSH	Glutathione：還元型グルタチオン
HPLC	High performance liquid chromatography：高速液体クロマトグラフィ
IC_{50}	50% Inhibitory concentration：50%阻害濃度
K_{deg}	Degradation rate constant：酵素分解の速度定数
K_i	Inhibition constant：阻害定数
K_I	Inhibition constant：阻害定数（最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害薬濃度）
k_{inact}	Maximal rate of enzyme inactivation：最大酵素不活性化速度定数
K_m	Michaelis constant：ミカエリス定数
LLOQ	Lower limit of quantitation 定量下限値
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MDR1	Multidrug resistance protein 1：多剤耐性タンパク質 1
mRNA	Messenger ribonucleic acid：メッセンジャーRNA
MS	Mass spectrometry：質量分析法
MS/MS	Tandem mass spectrometry：タンデム質量分析法
NADPH	β-Nicotinamide adenine dinucleotide 2’-phosphate, reduced form：還元型 β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド 2’-リン酸
NHL	Non-Hodgkin lymphoma：非ホジキンリンパ腫
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
PAPS	3’-Phosphoadenosine-5’-phosphosulfate：3’-ホスホアデノシン-5’-ホスホ硫酸
P-gp	P-glycoprotein：P-糖タンパク質
SAM	S-adenosylmethionine：S-アデノシルメチオニン
$t_{½}$	Apparent terminal half-life：終末相の見かけの消失半減期
T_{max}	Time of occurrence of C_{max}：最高濃度到達時間
UDPGA	Uridine diphosphate glucuronic acid：ウリジン二リン酸グルクロン酸

略号・用語	省略していない表現または用語の定義
UGT	Uridine diphosphate glucuronosyl transferase：ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
V_{ss}	Steady-state volume of distribution：定常状態における分布容積

パラメータの略号および算出法

略号・用語	定義および算出法
T_{max}	最高濃度到達時間：(hr)
C_{max}	最高血清中濃度：(ng/mL)
AUC_t	ゼロから最終検出可能また測定時点（t）までの濃度－時間曲線下面積：(ng･hr/mL) 台形法を用いて算出した。
AUC_{inf}	ゼロから無限時間まで外挿した濃度－時間曲線下面積：(ng･hr/mL) $AUC_{inf}= AUC_t + Ct／k_{el}$
$t_{½}$	消失半減期：(hr)　以下の式を用いて算出した。 $t_{½} = \ln 2／k_{el}$　　k_{el}は，消失速度定数：(hr^{-1})
CL_{tot}	全身クリアランス：(mL/min/kg)　以下の式を用いて算出した。 $CL_{tot}=$ 投与量／AUC
V_{ss}	定常状態における分布容積：(L/kg)　以下の式を用いて算出した。 $V_{ss} = CL_{tot}／k_{el}$
F	バイオアベイラビリティ：(%)　以下の式を用いて算出した。 $\text{ﾊﾞｲｵｱﾍﾞｲﾗﾋﾞﾘﾃｨ}\ (\%) = \left(\dfrac{\text{経口投与したときの } AUC_{inf} \times \text{静脈内投与量}}{\text{静脈内投与したときの } AUC_{inf} \times \text{経口投与量}}\right) \times 100$
排泄率	尿中排泄率は以下の式により算出した。 $\text{尿中排泄率（%）} = \Sigma \left(\dfrac{\text{尿中薬物（放射能）濃度} \times \text{尿量}}{\text{投与量（放射能）}}\right) \times 100$ 糞中排泄率および胆汁中排泄率の算出も上式を用いて同様に算出した。
IC_{50}	IC_{50} 値はそれぞれの分子種に特異的な酵素反応または輸送を 50%阻害するときの被験薬物濃度：(μmol/L)
P_{app}	MDCK 細胞などを用いた in vitro 細胞膜透過試験における被験薬物の見かけの透過係数：($\times 10^{-6}$ cm/sec) 頂側膜側に被験薬物を添加したときの頂側膜側から側底膜側への見かけの透過係数は $P_{appA→B}$ と表し，側底膜側に被験薬物を添加したときの側底膜側から頂側膜側への見かけの透過係数は $P_{appB→A}$ と表した。

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（PF-06649266，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。イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の非臨床薬物動態について in vitro および in vivo で広範に検討した。

薬理試験で使用したマウスまたは毒性試験で使用したラットおよびサルにイノツズマブ　オゾガマイシンを単回腹腔内または静脈内投与したとき，イノツズマブ　オゾガマイシンの濃度 - 時間曲線下面積（AUC）は概して G544 の AUC と同程度かそれより低かった。非担癌マウスおよび担癌マウスにイノツズマブ　オゾガマイシンを腹腔内投与したときのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の曝露量は，いずれも担癌マウスの方が低値を示した。イノツズマブ　オゾガマイシンをラットおよびサルに静脈内投与したときのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の全身クリアランス（CL）は低値を示し，定常状態の見かけの分布容積（V_{ss}）は血漿容量と同等～やや高値を示し，見かけの消失半減期（$t_{½}$）は概ね 40 時間～60 時間程度と長かった。[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに単回静脈内投与したときの血漿中放射能の大部分はタンパク質に結合したカリケアマイシン由来であり，非結合カリケアマイシン由来放射能は約 2%と微量であることが示された。

雌雄のラットおよびサルを用いた反復投与毒性試験において，いずれの測定対象物（イノツズマブ　オゾガマイシン, G544 または総カリケアマイシン）の AUC にも一貫した性差は認められず，ラットおよびサルのいずれにおいても非結合カリケアマイシン誘導体の血清中濃度はほとんどの検体で定量限界未満であった。イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 または総カリケアマイシンの AUC は, ラットでは用量にほぼ比例して増加したが, サルでは用量比を超えて増加した。ラットではイノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および総カリケアマイシンの曝露量に顕著な経日的な変化はみられなかったが，サルでは最終投与後の曝露量は初回投与後より高値を示した。抗イノツズマブ　オゾガマイシン抗体の産生率は，ラットでは 10%～13%，サルでは 0%であった。

[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに静脈内投与したときの放射能の組織への分布は限定的であり，肝臓，脾臓，肺および腎臓でやや高い放射能濃度が認められたが，評価したすべての組織において放射能濃度の AUC は血漿中の 0.6 倍以下であった。脳における放射能濃度の AUC は血漿中の 2%未満であり，血液脳関門を通過して脳に分布する[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能はわずかであることが示された。血中の[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能は血漿にほぼ特異的に分布した。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の血漿タンパク結合率は評価したいずれの動物種においても高く，マウス，ラット，ウサギ，サルおよびヒトにおける非結合型分率（f_u）は 0.00094～0.031 であった。遺伝子導入したイヌ腎臓由来 Madin-Darby（MDCK）細胞を用いた in vitro 試験では，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は排出トランスポーターである P-糖タンパク質（P-gp）の基質となったが，乳癌耐性タンパク質（BCRP）の基質とはならないことが示された。サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた試験で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は受動拡散によって肝細胞内に取り込まれたことから，有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1 および OATP1B3 といった肝取り込みトランスポーターの基質となる可能性は低いことが示唆された。

ラットおよびヒトにそれぞれ ^{3}H 標識および非標識のイノツズマブ　オゾガマイシン静脈内投与後の生体試料中の代謝物を検索した。ラットでは，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンから遊離

した[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は広範に代謝された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な代謝経路はジスルフィド基の還元であり，ヒドラジド基の加水分解，酸化およびピルビン酸との付加反応は副次的経路であった。ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与後の血漿中総放射能に占めるイノツズマブ　オゾガマイシンの割合は 66%と見積もられ，その他に構造未同定のより高分子量を示す 2 種の成分が認められた。ヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを投与後の血清中および尿中の代謝物を分析したところ，血清中にはイノツズマブ　オゾガマイシンの加水分解産物である N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH のみが認められ，尿中から検出された代謝物はいずれもラットにおいても認められた。

毒性試験に用いた動物種（ラットおよびサル）とヒトの代謝プロファイルを比較し，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の代謝に関与する酵素を検討するための in vitro 代謝試験を実施した。ラット，サルおよびヒト血漿中で[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを 37°C で 96 時間インキュベートした ex vivo 試験では，90%を超える薬物由来放射能はタンパク質と結合していることが示された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH をラット，サルおよびヒトの肝 S9 画分（グルタチオンなどの各種補因子の存在下）または血漿とインキュベートしたときの代謝物プロファイルはいずれの種においても類似しており，緩衝液中でインキュベートしたときとも同様であったことから，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の生体内における変換の大部分は薬物代謝酵素を介さないことが示唆された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の in vitro 代謝で認められた代謝物は，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与したラットから採取した in vivo 試料でみられたものと質的に類似していた。以上のことから，イノツズマブ　オゾガマイシンの加水分解による N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の遊離はわずかであり，遊離した N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は主に薬物代謝酵素を介さない還元によって代謝されることが示唆された。

ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを静脈内投与したときの放射能の排泄は緩徐であり，投与放射能の約 80%は糞中に排泄され，尿中に排泄された放射能は投与量の 8%～9%程度であった。胆管カニューレ挿入ラットの胆汁中に投与放射能の 53%～64%が排泄されたことから，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを静脈内投与したときの放射能の主排泄経路は，胆汁を介した糞中排泄であると考えられた。

イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な CYP 分子種に対する可逆的または時間依存的阻害能について in vitro で検討し，得られた阻害パラメータとヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを臨床用量で投与したときの定常状態でのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の最高血清中濃度（C_{max}，それぞれ 308 ng/mL＝0.00192 µmol/L および 0.050　ng/mL 以下＝0.000034 µmol/L 以下）に基づき臨床で薬物相互作用が生じる可能性について検討した。その結果，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度で CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 および CYP3A4/5 の活性を阻害する可能性は低いことが示された。また，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度の 50 倍の濃度（それぞれ 0.32 µmol/L および 0.3 µmol/L）においても CYP1A2，CYP2B6 または CYP3A4 の mRNA もしくは酵素活性を誘導しなかった。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は UGT1A4，UGT1A6，UGT1A9 および UGT2B7 の活性に対して可逆的な阻害作用をほとんど示さず，IC_{50} 値はいずれも 10 µmol/L 超であったが，UGT1A1 に対しては阻害作用を示し，2% BSA の非存在下および存在下での IC_{50} 値はそれぞれ 0.61 µmol/L および 1.4 µmol/L であった。この結果とヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを臨床用量で投与したときの定常状態での N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の C_{max} 値に基づき臨床で薬物相互作用が生じる可能性について検討したところ，臨床用量で想定される濃度で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が UGT 分子種を阻害する可能性は低いことが示された。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な薬物トランスポーター分子種に対する阻害能について in vitro で検討し，得られた阻害パラメータとヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを臨床用量で投与したときの定常状態での N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の C_{max} に基づき臨床で薬物相互作用が生じる可能性について検討した。その結果，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度で排出トランスポーターである P-gp および BCRP，肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 および OATP1B3 ならびに腎取り込みトランスポーターであるヒト有機アニオントランスポーター（OAT）1，OAT3 およびヒト有機カチオントランスポーター（OCT）2 を阻害する可能性は低いことが示された。

イノツズマブ　オゾガマイシンの開発に際して実施した非臨床薬物動態試験の一覧を概要表 2.6.5.1 に示す。

2. 分析法

ADC は，その構造が複雑であり，単一の分析法によってその *in vivo* における薬物動態について検討することはできないことから[1]，イノツズマブ　オゾガマイシンの PK/TK プロファイルを総合的に評価するため，複数の分析法を開発した。マウス，ラット，ウサギまたはサルにおける血清中イノツズマブ　オゾガマイシン，総 G544，非結合カリケアマイシンおよび抗薬物抗体（ADA）濃度は酵素免疫測定（ELISA）法により定量した。また，ラットおよびイヌの血漿中カリケアマイシン誘導体濃度も ELISA 法により定量した。ラット，ウサギまたはサルにおける血清中総カリケアマイシン濃度は，高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析（LC-MS/MS）法により定量した。イノツズマブ　オゾガマイシンまたはカリケアマイシン誘導体の定量に用いた分析法の概要を Table 1 および概要表 2.6.5.2A～2.6.5.2D に示す。GLP 適用下で実施した反復投与毒性試験における血清中濃度推移および ADA の評価には，バリデートされた定量法を用い，単回投与による薬物動態試験およびサルを用いた試験を除く毒性試験では，それらに準じた ELISA 法を使用した。

2.1. ラット，ウサギおよびサルの血清中イノツズマブ　オゾガマイシンの定量

RPT-45155，RPT-72216，RPT-45156，RPT-67030，RPT-49930，RPT-79836，RPT-49928，RPT-78684
（概要表 2.6.5.2B）

ラット，ウサギおよびサルの血清中イノツズマブ　オゾガマイシン濃度を定量するため，ELISA 法をバリデートした。これらの分析では，マウス CD22-Fc 融合タンパク質を固相化したマイクロプレート上でイノツズマブ　オゾガマイシンのヒト化抗 CD22 抗体（G544）部分を捕捉した。捕捉したイノツズマブ　オゾガマイシンのカリケアマイシン部分に精製したウサギ抗カリケアマイシン抗体を反応させ，その後西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗ウサギ抗体で検出するか，あるいはビオチン化ウサギ抗カリケアマイシン抗体と反応させた後に HRP 標識ストレプトアビジンで検出した。発色基質には 3,3′,5,5′-テトラメチルベンジジン（TMB）または 2,2′アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS）のいずれかを使用した。検体中濃度は，4-パラメータロジスティック式による検量線から補間法によって算出した。定量範囲は，ラット血清では 3.91～125 ng/mL（RPT-45155），ウサギ血清では 4.68～80.0 ng/mL（RPT-72216）であった。サル血清での定量範囲は，466～7800 ng/mL であったが（RPT-45156），より高感度（定量範囲は 20.4～550 ng/mL）の ELISA 法も開発した（RPT-67030）。ラット，ウサギおよびサルの血清中イノツズマブ　オゾガマイシンの室温保存および凍結融解後の安定性，ならびに長期保存安定性を評価して，検体中のイノツズマブ　オゾガマイシンの保存期間中における安定性を確認した。（RPT-49930，RPT-79836，RPT-49928，RPT-78684）。

[1] Lin K, Tibbitts J. Pharmacokinetic Considerations for Antibody Drug Conjugates. Pharm Res 2012; 29:2354–66.

Table 1.　イノツズマブ　オゾガマイシンの分析法の概要

分析対象	分析法の概要	LLOQ	備考
イノツズマブ　オゾガマイシン（ADC/結合型抗体）	ELISA 捕捉：マウス CD22-Fc 融合タンパク質 検出：ウサギ抗カリケアマイシン抗体/HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体またはビオチン化ウサギ抗カリケアマイシン抗体/HRP 標識ストレプトアビジン	ラット： 3.91 ng/mL ウサギ： 4.68 ng/mL サル： 466 ng/mL または 20.4 ng/mL	1 分子以上の薬物が結合した ADC の混合物を定量。活性を持つ ADC の PK 評価に用いる。ADC の血中からの消失または抗体からの薬物の遊離により変動する。
総 G544 抗体	ELISA 捕捉：マウス CD22-Fc 融合タンパク質 検出：HRP 標識マウス抗ヒト IgG4 抗体	ラット： 1.56 ng/mL サル： 1.56 ng/mL または 8.76 ng/mL	薬物が結合した抗体と，結合していない抗体の総和を定量。ADC のうち抗体に関連した部分の PK 評価に用い，また *in vivo* での抗体の経時的な安定性の評価にも用いる。
総カリケアマイシン	LC-MS/MS 前処理 : DTT によるジスルフィド結合（イノツズマブ　オゾガマイシンのカリケアマイシン部分）の分解，液-液抽出 検出：生成する N-Ac-ε-カリケアマイシンを LC-MS/MS で測定	ラット： 2.00 ng/mL ウサギ： 2.00 ng/mL サル： 2.00 ng/mL	抗体に結合した薬物と遊離した薬物の総和（イノツズマブ　オゾガマイシンでは非結合カリケアマイシン量はわずかであり，実質的には結合カリケアマイシン濃度と考えられる）を定量。結合した薬物分子数が異なる ADC の混合物を測定するという点においては，上記の結合型抗体と同様。抗体に結合した薬物量の変動は，ADC の血中からの消失または抗体からの薬物の遊離により変動する。
非結合カリケアマイシン	ELISA 前処理 : 多価の抗ヒト免疫グロブリンによる結合カリケアマイシンの除去 捕捉：ウサギ抗カリケアマイシン抗体 検出：HRP 標識カリケアマイシンとの競合	ラット： 10.5 ng/mL サル： 70.4 ng/mL	ADC から遊離した薬物を定量。使用した抗カリケアマイシン抗体の特異性が低いことから，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH およびその代謝物を含む複数の種類のカリケアマイシン誘導体が検出される。

2.2. ラットおよびサルの血清中総 G544 の定量

RPT-45153，RPT-45154，RPT-67002，RPT-49932，RPT-49931（概要表 2.6.5.2B）

ラットおよびサルの血清中総 G544 濃度を定量するため，ELISA 法をバリデートした。これらの分析では，マウス CD22-Fc 融合タンパク質を固相化したマイクロプレート上でイノツズマブ　オゾガマイシンの G544 部分を捕捉した。捕捉した G544 を HRP 標識マウス抗ヒト免疫グロブリン G4（IgG4）で検出した。発色基質として TMB を使用した。検体中濃度は，4-パラメータロジスティック式による検量線から補間法によって算出した。定量範囲は，ラット血清では 1.56～100 ng/mL（RPT-45153），サル血清では 1.56～100 ng/mL（RPT-45154）であったが，サル血清では定量下限値（LLOQ）を変更（定量範囲 8.76～100 ng/mL）した ELISA 法も再度バリデートした（RPT-67002）。ラットおよびサルの血清中 G544 の室温保存および凍結融解後の安定性，ならびに長期保存安定性を評価して，検体中の G544 の保存期間中における安定性を確認した（RPT-49932，RPT-49931）。

2.3. ラット，ウサギおよびサルの血清中総カリケアマイシンの測定

RPT-65882，RPT-73451，RPT-65081，RPT-69886，RPT-75554，RPT-69937（概要表 2.6.5.2B）

イノツズマブ　オゾガマイシンを投与したラット，ウサギおよびサル血清中の総カリケアマイシン濃度を定量するため LC-MS/MS 法をバリデートした。これらの分析では，イノツズマブ　オゾガマイシンのカリケアマイシン部分にあるジスルフィド結合を，還元剤であるジチオスレイトールによって切断した。その後，N-Ac-γ-カリケアマイシンの分子内転位および還元反応（フリーラジカルへの水素原子の供与）により N-Ac-ε-カリケアマイシンを生成した。メチル tert-ブチルエーテルを用いた液-液抽出した後，LC-MS/MS 法により分析した。Applied Biosystems/MDS Sciex Analyst ソフトウェアを使用して N-Ac-ε-カリケアマイシンと内標準のピーク面積を測定し，内標準に対する N-Ac-ε-カリケアマイシンのピーク面積比を算出した。$1/x^2$ の重み付き線形回帰により検量線を作成した。標準物質としてイノツズマブ　オゾガマイシンを用いた。本分析法による N-Ac-ε-カリケアマイシンの検出を介した総カリケアマイシンの定量は，ラット，ウサギおよびサルの血清中，イノツズマブ　オゾガマイシンの濃度範囲 2.00～1000 ng/mL においてバリデートされた（RPT-65882，RPT-73451 および RPT-65081）。本分析法により定量された総カリケアマイシン濃度は，カリケアマイシン相当量として示す。室温保存および凍結融解後の安定性を評価して，総カリケアマイシン濃度の測定に必要な検体中のイノツズマブ　オゾガマイシンの安定性を確認した。さらに，ラット，ウサギおよびサルの血清中イノツズマブ　オゾガマイシンに由来する総カリケアマイシンの長期保存安定性を評価して，検体の保存期間中における安定性を確認した（RPT-69886，RPT-75554，RPT-69937）。

2.4. ラットおよびサルの血清中非結合カリケアマイシンの定量

RPT-47430，RPT-47429，RPT-50216，RPT-50217（概要表 2.6.5.2B）

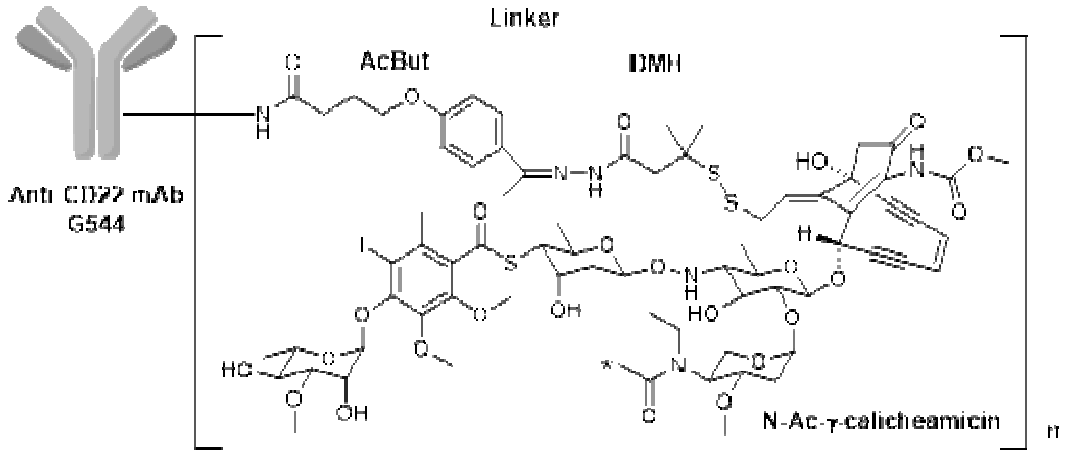
イノツズマブ　オゾガマイシンを投与したラットおよびサルの血清中の非結合カリケアマイシン濃度を定量するために，競合 ELISA 法をバリデートした。これらの分析では，ウサギ抗カリケアマイシン抗体によって非結合カリケアマイシン（N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH またはその誘導体・代謝物など）を捕捉した。まず，多価の抗ヒト免疫グロブリンを固定したアガロースを使用して，結合型カリケアマイシンを検体から除去した。その後，検体を HRP 標識カリケアマイシンと混合し，ウサギ抗カリケアマイシン抗体でコーティングした ELISA プレートに加えた。HRP 標識カリケアマイシンおよび試料中のカリケアマイシンは，プレートに固相化されたウサギ抗カリケアマイシン抗体に対して競合反応を示す。発色基質として TMB を使用して検出した。検体中濃度は，4-パラメータロジスティック式による検量線から補間法によって算出した。定量

範囲は，ラット血清では 10.5～80 ng/mL（RPT-47430），サル血清では 70.4～800 ng/mL（RPT-47429）であった。室温保存および凍結融解後の安定性を評価して，検体中の非結合カリケアマイシン（N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を標準品として測定）の安定性を確認した。さらに，ラットおよびサルの血清中における N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の長期保存安定性を評価して，検体の保存期間中における安定性を確認した（RPT-50216，RPT-50217）。

2.5. 標識化合物の分析

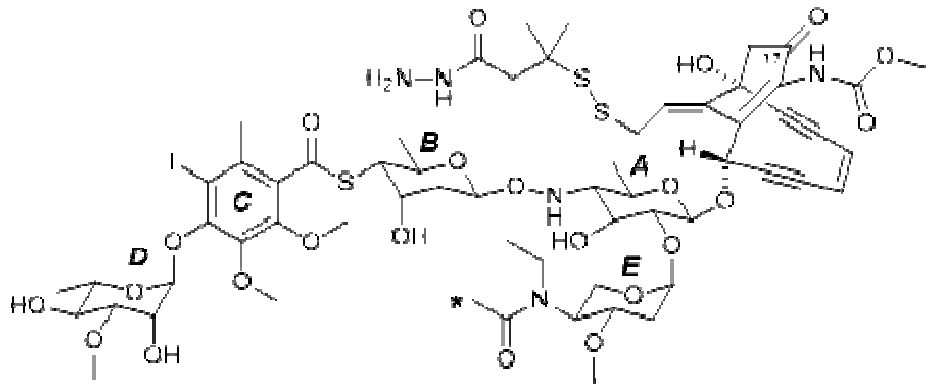
[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン（Figure 1）および[^{3}H]N-Ac-γ-calicheamicin DMH（Figure 2）を用いた薬物動態試験で得られた試料中の放射能濃度の定量には液体シンチレーション計測法（LSC）を用い，一部の試験では放射能検出器を装着した HPLC により放射能濃度を定量した。血漿試料では総放射能に加え，アセトニトリルで除タンパク処理したときの上清および沈殿から，それぞれ非結合カリケアマイシンおよびタンパク質に結合したカリケアマイシンに由来する放射能も測定した。LSC では放射能濃度（dpm）がバックグラウンド値の 2 倍未満の場合は，定量限界未満とみなし，血漿中放射能濃度の定量下限値はカリケアマイシン量として 0.0403 ng/g であった。

Figure 1.　[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンの構造



*：標識位置

Figure 2.　[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の構造



*：標識位置

2.6. ラット，ウサギおよびサルの血清中 ADA の検出

RPT-47310，RPT-72215，RPT-47590（概要表 2.6.5.2C）

ラット, ウサギおよびサルの血清中 ADA を検出するため ELISA 法をバリデートした（RPT-47310, RPT-72215 および RPT-47590）。

分析能をモニタリングするため，2 種類の陽性対照としてウサギ抗 G544 抗体およびウサギ抗カリケアマイシン抗体をラット，ウサギまたはサル血清に添加したものならびに陰性対照としてラット，ウサギまたはサルの保存血清を各プレートに加えた。これらの分析では，イノツズマブ　オゾガマイシンをマイクロプレートに固相化した。プレートに陽性対照，陰性対照または検体にビオチン化イノツズマブ　オゾガマイシンを添加し，インキュベートして抗体を結合させた。結合した免疫グロブリンに HRP 標識アビジンを加え，発色基質として ABTS または TMB を用いて検出した。

検体中の ADA は段階希釈法により測定した。まず, 試料を 25 倍および 75 倍に希釈してスクリーニング分析を行い，吸光度の平均値がカットオフ値未満の検体は ADA 陰性とした。吸光度の平均値がカットオフ値以上の検体について，対応する投与前の検体と共に希釈系列を作成して再分析を行い，抗体価を測定した。抗体価は吸光度がカットオフ値と等しくなるときの試料の希釈倍率の逆数と定義した。各動物における ADA 産生の有無は投与前後の結果を比較して判定した。すなわち，投与前の検体が ADA 陰性で，対応する投与後の検体が ADA 陽性であった場合は，その動物で ADA が産生したと判定し，投与前および投与後とも ADA 陽性であった場合は，投与後の検体の抗体価が投与前よりも希釈系列で 1 段階以上高いとき，その動物で ADA が産生したと判定した。

3. 吸収

3.1. 単回投与時の薬物動態およびトキシコキネティクス

ヌードマウス（薬理試験で使用），Sprague Dawley または CD VAF ラット，ビーグル犬またはカニクイザル（毒性試験で使用）を用いて，単回腹腔内または静脈内投与時のイノツズマブ　オゾガマイシンの薬物動態を検討した。

3.1.1. マウス

RPT-47740（概要表 2.6.5.3A）

イノツズマブ　オゾガマイシンを 9.6 mg/m^2 の用量で CD22 陽性非ホジキンリンパ腫（NHL）B 細胞株 RL 細胞の担癌および非担癌雌ヌードマウスに単回腹腔内投与したときのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび総 G544 の血清中濃度推移を検討した（Table 2）。

担癌および非担癌マウスのいずれにおいても，G544 の AUC はイノツズマブ　オゾガマイシンよりも大きかったが，この原因として，イノツズマブ　オゾガマイシンの分解・代謝の違いによる可能性が考えられた。G544 の $t_{½}$は，イノツズマブ　オゾガマイシンの 1.6～1.8 倍であった。

担癌マウスにおけるイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の曝露量は，非担癌マウスより有意に小さかった（それぞれ 37%および 30%，$p < 0.05$）。担癌および非担癌マウスの曝露量の差は，イノツズマブ　オゾガマイシンの標的を介した消失によると推察される。担癌マウスではイノツズマブ　オゾガマイシンの G544 部分が B 細胞腫瘍の表面の CD22 タンパク質を認識し，特異的に腫瘍細胞へ移行することにより，イノツズマブ　オゾガマイシンのクリアランスが増加し，非担癌マウスより低い血清中濃度を示したと考えられる。

Table 2.　イノツズマブ　オゾガマイシンを単回腹腔内投与したヌードマウスにおける薬物動態パラメータ（平均値）

報告書	用量	測定対象物質	性/n[a]	$t_{½}$ (h)	C_{max} (ng/mL)[b]	AUC_{inf} (ng•h/mL)[b]
RPT-47740（非担癌）	9.6 mg/m^2 [c] 3.2 mg/kg[d] 160 µg/kg[e]	イノツズマブ　オゾガマイシン	雌/4	34.2	51200	2900000
		G544	雌/4	54.6	40000	4040000
RPT-47740（担癌）	9.6 mg/m^2 [c] 3.2 mg/kg[d] 160 µg/kg[e]	イノツズマブ　オゾガマイシン	雌/4	35.0	47800	1860000
		G544	雌/4	64.1	40800	2850000

a. 4 匹/時点。
b. イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の濃度として各タンパク相当量を用いた。
c. G544 タンパク相当量。mg/kg から mg/m^2 への換算には換算係数 3 を用いた。
d. G544 タンパク相当量。mg/kg の算出には抗 CD22 抗体へのカリケアマイシンの結合量（抗体 1 mg につきカリケアマイシン 50 µg）を用いた。
e. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH AcBut 相当量。

3.1.2. ラット

PF-05208773_[redacted]_111700（8296878），PF-05208773_[redacted]_172921，8332989（PF-05208773_[redacted]_094934），PF-05208773_[redacted]_014414，RPT-46233（概要表 2.6.5.3B）

[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを 0.912 mg/m^2［PF-05208773_[redacted]_111700（8296878），PF-05208773_[redacted]_172921］または 0.798 mg/m^2［8332989（PF-05208773_[redacted]_094934），PF-05208773_[redacted]_014414］の用量で雌雄 Sprague-Dawley ラットに単回静脈内投与したとき

のイノツズマブ　オゾガマイシンおよび薬物由来放射能（総放射能，タンパク質に結合したカリケアマイシン由来放射能および非結合カリケアマイシン由来放射能）の血漿中濃度推移を検討した。また，ラットを用いた単回投与による忍容性試験（RPT-43870）における曝露量を推定するため，非標識のイノツズマブ　オゾガマイシンを雌雄 CD VAF ラットに 2.92 mg/m^2 または 7.68 mg/m^2 の用量で単回静脈内投与したときのイノツズマブ　オゾガマイシン, G544 および非結合カリケアマイシンの血清中濃度推移を検討した（RPT 46233）。

イノツズマブ　オゾガマイシンおよび薬物由来放射能の曝露量に明確な性差は認められなかった。イノツズマブ　オゾガマイシンの全身 CL は 0.00195 mL/min/kg～0.0388 mL/min/kg と低値を示し，V_{ss} は 0.0799 L/kg～0.185 L/kg と血漿容量と同等～やや高値であった。イノツズマブ　オゾガマイシンの血漿中濃度は二相性の消失パターンを示し，終末相の $t_{½}$は 39.1 時間～122 時間であった（Table 3，Table 4）。これらの結果はモノクローナル抗体医薬品で予測される薬物動態[2]と一致していた。

非標識のイノツズマブ　オゾガマイシンを投与した試験において，イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および非結合カリケアマイシンの曝露量も一貫した性差は認められず，AUC および C_{max} は用量の増加に伴って増加し，G544 の AUC はイノツズマブ　オゾガマイシンの AUC よりも概して大きかった。イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の CL および V_{ss} は小さく，$t_{½}$ は長かった。非結合カリケアマイシンの濃度は検出可能であったが，低値を示し変動も大きかった（Table 4）。

[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与した試験において，抗体由来放射能と総放射能の AUC は同程度であり，非結合カリケアマイシン由来放射能濃度はそれらよりも顕著に低かった。タンパク質を沈殿させた後の血漿中放射能濃度の測定から，投与後 336 時間までの血漿中放射能の大部分はタンパク質に結合したカリケアマイシン由来であり，非結合カリケアマイシン由来放射能は約 2%とごく微量であることが示された。SE-HPLC を用いた分析結果から求めた血漿中の総放射能に占める[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンの割合は 66%であった。一方，ELISA 法で測定したイノツズマブ　オゾガマイシンの血漿中濃度は，投与後早期では総放射能濃度と同程度であったが時間の経過に伴い相違を示し，AUC 比（イノツズマブ　オゾガマイシン/総放射能）は 50%程度であった。ELISA 法で得られたイノツズマブ　オゾガマイシンの $t_{½}$はやや低値を示したが，その他の $t_{½}$はいずれの測定対象においても 73.3 時間～122 時間と類似していた（Table 3）。非結合カリケアマイシン由来放射能と抗体関連成分の $t_{½}$が類似したことから，非結合カリケアマイシンが他の ADC 医薬品でもみられている生成律速の動態特性[3]を示すことが示唆された。

[2] Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. J Pharm Sci 2004; 93(11):2645-68.

[3] Han TH, Zhao B. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Considerations for the Development of Antibody-Drug Conjugates. Drug Metab Dispos 2014; 42(11):1914–20.

Table 3.　[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを単回静脈内投与した Sprague-Dawley ラットにおける薬物動態パラメータ（平均値）

用量	測定対象物質	性/n[a]	CL (mL/min/kg)	V_{ss} (L/kg)	$t_{½}$ (h)	C_{max} (ng/mL)[b]	AUC_{inf} (ng•h/mL)[b]
0.912 mg/m^2 [c] 0.152 mg/kg[d] 17.6 µg/kg[e]	総放射能	雄/3	-	-	92.5	448	22200
		雌/3	-	-	105	449	23200
	タンパク質に結合したカリケアマイシン由来放射能[f]	雄/3	-	-	98.5	401	20600
		雌/3	-	-	107	413	21800
	非結合カリケアマイシン由来放射能[g]	雄/3	-	-	73.3	7.91	405
		雌/3	-	-	96.8	8.08	361
	イノツズマブ　オゾガマイシン (ELISA)	雄/3	0.0248	0.0799	56.1	387[h]	11900[h]
		雌/3	0.0259	0.0842	54.7	416[h]	11400[h]
0.798 mg/m^2 [c] 0.133 mg/kg[d] 15.6 µg/kg[e]	総放射能	雄/2	-	-	103	385	20100
	イノツズマブ　オゾガマイシン (SE-HPLC)	雄/2	0.0195	0.154	122	279	13300

-：データなし
a. 3 または 2 匹/時点。
b. カリケアマイシン相当量。
c. G544 タンパク相当量。mg/kg から mg/m^2 への換算には換算係数 6 を用いた。
d. G544 タンパク相当量。mg/kg の算出には抗 CD22 抗体へのカリケアマイシンの結合量（抗体 1 mg につきカリケアマイシン 116.6 µg）を用いた。
e. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH AcBut 相当量。
f. 血漿試料を除タンパク処理後の沈殿中の放射能。
g. 血漿試料を除タンパク処理後の上清中の放射能。
h. イノツズマブ　オゾガマイシン標準品を用いて ELISA 法により算出したタンパク相当量の濃度をカリケアマイシン相当量に換算した。

Table 4.　イノツズマブ　オゾガマイシンを単回静脈内投与した CD VAF ラットにおける薬物動態パラメータ（平均値）（RPT-46233）

用量	測定対象物質	性/n	CL (mL/min/kg)	V_{ss} (L/kg)	$t_{½}$ (h)	C_{5min} (ng/mL)[a]	AUC_{inf} (ng•h/mL)[a]
2.92 mg/m^2 [b] 0.49 mg/kg[c] 35 µg/kg[d]	イノツズマブ　オゾガマイシン	雄/3	0.0388	0.185	54.9	7980	209000
		雌/3	0.0352	0.128	41.7	8790	232000
	G544	雄/3	0.0195	0.142	84.8	10000	420000
		雌/3	0.0192	0.130	78.5	10600	429000
	非結合カリケアマイシン	雄/3	ND	ND	ND	3.10[e]	10.6[e,f]
		雌/3	ND	ND	ND	3.76[e]	9.23[e,f]
7.68 mg/m^2 [b] 1.28 mg/kg[c] 100 µg/kg[d]	イノツズマブ　オゾガマイシン	雄/3	0.0237	0.099	48.5	37500	903000
		雌/3	0.0325	0.110	39.1	40300	655000
	G544	雄/3	0.0178	0.139	90.3	22500	1190000
		雌/3	0.0340	0.166	56.2	22000	643000
	非結合カリケアマイシン	雄/3	ND	ND	ND	15.5[e]	257[e,f]
		雌/3	ND	ND	ND	16.2[e]	144[e,f]

ND：算出せず
a. イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の濃度として各タンパク相当量を，非結合カリケアマイシンの濃度としてカリケアマイシン相当量を用いた。
b. G544 タンパク相当量。mg/kg から mg/m^2 への換算には換算係数 6 を用いた。
c. G544 タンパク相当量。
d. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH AcBut 相当量。
e. 平均血清中濃度から求めた。
f. AUC_{last}（0 時間から最終測定可能時間までの AUC）

3.1.3. サル

RPT-46644（概要表 2.6.7.5）

イノツズマブ　オゾガマイシンを雌雄カニクイザルに 4.11，8.22 または 16.4 mg/m^2 の用量で単回静脈内投与し，イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および非結合カリケアマイシンの血清中濃度推移を検討した（Table 5）。

評価したすべての測定対象物質について一貫した性差は認められなかった。イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の曝露量は，イノツズマブ　オゾガマイシンの用量増加に伴って増加した。サルにイノツズマブ　オゾガマイシンを 4.11，8.22 または 16.4 mg/m^2 の用量で単回静脈内投与したとき，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の CL および V_{ss} は低値を示し，両者の $t_{½}$は長かった。非結合カリケアマイシンはいずれの用量においても検出できなかった。

Table 5.　イノツズマブ　オゾガマイシンを単回静脈内投与したカニクイザルにおける薬物動態パラメータ（平均値）（RPT-46644）

用量	測定対象物質	性/n	CL (mL/min/kg)	V_{ss} (L/kg)	$t_{½}$ (h)	C_{5min} (ng/mL)[a]	AUC_{inf} (ng•h/mL)[a]
4.11 mg/m^2 [b] 0.34 mg/kg[c] 25 µg/kg[d]	イノツズマブ　オゾガマイシン	雄/2	ND	ND	ND	18800	260000[e]
		雌/2	ND	ND	ND	16700	246000[e]
	G544	雄/2	0.0185	0.128	86.9	6160	310000
		雌/2	0.0198	0.136	90.9	6120	290000
8.22 mg/m^2 [b] 0.68 mg/kg[c] 50 µg/kg[d]	イノツズマブ　オゾガマイシン	雄/2	0.0230[f]	0.0911[f]	64.0[f]	35200	449000[e]
		雌/2	ND	ND	ND	37400	718000[e]
	G544	雄/2	0.0177	0.137	105	11800	649000
		雌/2	0.0143	0.104	102	14500	800000
16.4 mg/m^2 [b] 1.37 mg/kg[c] 100 µg/kg[d]	イノツズマブ　オゾガマイシン	雄/2	0.0205	0.0701	60.0	66000	1125000
		雌/2	0.0175	0.0541	51.3	64200	1311000
	G544	雄/2	0.0183	0.139	103	22400	1320000
		雌/2	0.0205	0.125	78.2	22500	1120000

a. イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の濃度として各タンパク相当量（ng/mL）を用いた。
b. G544 タンパク相当量を示す。mg/kg から mg/m^2 への換算には換算係数 12 を用いた。
c. G544 タンパク相当量を示す（mg/kg）。
d. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH AcBut 相当量を示す（µg/kg）。
e. AUC_{336}
f. n = 1

3.2. 反復投与後の薬物動態（トキシコキネティクス）

ラットおよびサルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験，ラットを用いた受胎能および胚・胎児発生（EFD）試験ならびにウサギを用いた EFD 試験の一部として，イノツズマブ　オゾガマイシンの血清中濃度推移および ADA 産生率を検討した（概要表 2.6.7.2 および 2.6.7.3）。GLP 適用下で実施したラットおよびサルを用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの 4 および 26 週間反復静脈内投与毒性試験の一部として得られた TK データから，イノツズマブ　オゾガマイシン，G544，非結合カリケアマイシンまたは総カリケアマイシンの曝露量の性差，用量比例性および経日変化について検討した。また，イノツズマブ　オゾガマイシンを静脈内投与した雌ラットを用いた受胎能および EFD 試験ならびに雌ウサギを用いた EFD 試験の一部として得られた TK データから，イノツズマブ　オゾガマイシンまたは総カリケアマイシンの用量比例性について検討した。

3.2.1. ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験でのトキシコキネティクス

RPT-46910（概要表 2.6.7.7A）

雄または雌 CD-VAF ラットに 0.41，1.24 または 4.07 mg/m^2/週のイノツズマブ　オゾガマイシンあるいは 4.01 mg/m^2/週の G544 のみを 4 週間静脈内投与（週 1 回，試験 1，8，15 および 22 日に投与）した後に 4 週間の回復期間を設ける毒性試験の一部として，イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および非結合カリケアマイシンの血清中濃度推移ならびに ADA の有無を検討した（Table 6）。

イノツズマブ　オゾガマイシンを 1.24 mg/m^2/週の用量で反復投与したところ，イノツズマブ　オゾガマイシンまたは G544 の曝露量（C_{5min} および AUC_{168}）に明確な性差は認められなかった。イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の曝露量は用量にほぼ比例して増加した。イノツズマブ　オゾガマイシンの反復投与後にイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の蓄積はほとんど認められず，AUC_{168} の比較により求めた 4 週間後の蓄積比はイノツズマブ　オゾガマイシンでは 1.19～1.57，G544 では 1.35～1.70 であった。非結合カリケアマイシンの血清中濃度が測定可能であったのは，イノツズマブ　オゾガマイシンを 4.07 mg/m^2/週の用量で投与した 3 例における試験 4 週の 0.083 時間のみであり，非結合カリケアマイシンの平均濃度は 16.3 ng/mL であった。

G544 のみ 4.01 mg/m^2/週の用量で投与した雄ラットで測定された G544 の曝露量は，タンパク相当量でほぼ同一用量（4.07 mg/m^2/週）のイノツズマブ　オゾガマイシンを投与したラットで測定された曝露量よりも大きかった。G544 のみ反復投与したときに G544 の蓄積はほとんど認められず，4 週間後の G544 の蓄積比は 1.37 であった。

イノツズマブ　オゾガマイシンまたは G544 のみを投与した動物における ADA 産生率の合計は，10%（20 例中 2 例）であった。4.07 mg/m^2/週のイノツズマブ　オゾガマイシンを投与した動物での ADA 産生率は 25%（4 例中 1 例）であり，4.01 mg/m^2/週の G544 のみを投与した動物では 25%（4 例中 1 例）であった。0.41 mg/m^2/週群および 1.24 mg/m^2/週群に ADA 陽性の動物はいなかった。

3.2.2. ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験でのトキシコキネティクス

RPT-65042（概要表 2.6.7.7B）

雄 Sprague-Dawley ラットにイノツズマブ　オゾガマイシンを 0.073，0.218 または 0.727 mg/m^2/週の用量で週 1 回 26 週間静脈内投与する毒性試験の一部として，イノツズマブ　オゾガマイシン，G544，非結合カリケアマイシンおよび総カリケアマイシンの血清中濃度推移ならびに ADA の有無を検討した（Table 6）。

イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および総カリケアマイシンの AUC_{168} は用量にほぼ比例して増加した。イノツズマブ　オゾガマイシンの反復投与後にイノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および総カリケアマイシンの蓄積は認められず，AUC_{168} の比較により求めた 25 週間後の蓄積比はイノツズマブ　オゾガマイシンでは 0.762～0.851，G544 では 0.973～0.767，総カリケアマイシンでは 0.018～0.936 であった。この試験では TK 評価は雄のみで実施したことから曝露量の性差については検討できなかった。

試験 25 週に，0.073 mg/m^2/週群および 0.218 mg/m^2/週群の数例に測定可能な濃度の非結合カリケアマイシンが検出された。これらの試料中イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および総カリケアマイシンの濃度ならびにより高用量の投与で非結合カリケアマイシンが検出されなかったことを考慮すると，検出された非結合カリケアマイシンの濃度は実際の値よりも高い可能性が考えられた。これらの試料中の ADA を分析した結果，全試料とも ADA 陽性であり，抗体価の対数

値は 4.00 を上回った。ADA のカリケアマイシン部分への特異性については不明であるが，非結合カリケアマイシンの定量が競合 ELISA 法であることを考慮すると，試料中に共存する ADA の影響により非結合カリケアマイシン濃度が実際よりも高値を示す可能性も考えられる。

イノツズマブ　オゾガマイシンを投与した動物における ADA 産生率の合計は，13%（15 例中 2 例）であった。0.073，0.218 および 0.727 mg/m^2/週のイノツズマブ　オゾガマイシンを投与したラットでの ADA 産生率は，それぞれ 40%（5 例中 2 例），0%（5 例中 0 例）および 0%（5 例中 0 例）であった。イノツズマブ　オゾガマイシンの存在が ADA の検出を妨げた可能性がある。

Table 6.　イノツズマブ　オゾガマイシンを反復投与した雌雄ラットにおけるトキシコキネティクスパラメータ（平均値 ± 標準誤差）

試験	用量			試験日	性[c]	イノツズマブ	オゾガマイシン[d]	G544[d]		総カリケアマイシン[e]	
	(mg/m^2/週)[a]	(mg/kg/週)[a]	(μg/kg/週)[b]			C_{5min} (ng/mL)	AUC_{168} (ng•h/mL)	C_{5min} (ng/mL)	AUC_{168} (ng•h/mL)	C_{5min} (ng/mL)	AUC_{168} (ng•h/mL)
4 週間毒性[f]	4.01[g]	0.68[g]	0[g]	1	雄	NA	NA	11900±2170	595000±37100	NA	NA
(RPT-46910)	0.41	0.07	5	1	雄	1780±73	42600±1220	1140±77	50000±2150	-	-
	1.24	0.21	15	1	雄	3370±1180	116000±5660	1910±618	117000±4280	-	-
					雌	5080±1570	113000±10900	3010±835	142000±5220	-	-
	4.07	0.69	50	1	雄	19700±660	461000±19600	10600±1280	483000±32800	-	-
	4.01[g]	0.68[g]	0[g]	22	雄	NA	NA	12700±1180	815000±57400	NA	NA
	0.41	0.07	5	22	雄	1980±24	50700±1770	1510±75	74400±4470	-	-
	1.24	0.21	15	22	雄	4560±1800	182000±7920	3010±1130	200000±9620	-	-
					雌	5610±518	160000±6200	4010±377	195000±12300	-	-
	4.07	0.69	50	22	雄	17600±2320	619000±26300	12000±2090	654000±59700	-	-
26 週間毒性[h]	0.073	0.012	1	1	雄	252±6	7630±340	262±7	9550±365	21.3±0.7	657±35
(RPT-65042)	0.218	0.036	3	1	雄	806±22	23700±679	838±33	31900±1080	68.1±5.1	2530±79
	0.727	0.121	10	1	雄	2760±85	83900±8200	4710±789	142000±19500	266±20	9840±1040
	0.073	0.012	1	169	雄	NM	NM	NM	NM	3.90±2.46	NA[i]
	0.218	0.036	3	169	雄	325±167	20200±4650	862±436	31000±7070	42.4±12.6	2370±536
	0.727	0.121	10	169	雄	2790±187	64000±10600	5370±1300	109000±18100	258±21	8270±1480

NA：該当せず，NM：測定不能，-：該当データなし
a. G544 タンパク相当量を示す。mg/kg から mg/m2 への換算には換算係数として RPT-46910 試験では 5.9 を，RPT-65042 試験では 6 を用いた。
b. N-Ac-γ カリケアマイシン DMH AcBut 相当量を示す（μg/kg）。
c. 3 匹/時点/性/用量群
d. イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の濃度は各タンパク相当量（ng/mL）を示す。
e. 総カリケアマイシン濃度はカリケアマイシン相当量（ng/mL）を示す。
f. 週 1 回投与。抗 CD22 抗体へのカリケアマイシンの結合量は，抗体 1 mg につきカリケアマイシン 73 μg であった。を用いた。
g. カリケアマイシンと結合していない G544 のみを投与した。
h. 週 1 回投与。抗 CD22 抗体へのカリケアマイシンの結合量は，抗体 1 mg につきカリケアマイシン 82.5 μg であった。
i. RPT-65042 試験で報告した AUC は，定量可能であった 1 時点のデータのみを用いて算出した。

3.2.3. ラットを用いた受胎能試験

RPT-69733（概要表 2.6.7.12）

雌 Sprague-Dawley ラットにイノツズマブ　オゾガマイシンを 0.011，0.036 または 0.109 mg/m^2/日の用量で反復静脈内投与（1 日 1 回，3～6 週間）する受胎能試験の一部として，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび総カリケアマイシンの血清中濃度推移ならびに ADA の有無を検討した（Table 7）。

イノツズマブ　オゾガマイシンおよび総カリケアマイシンの AUC_{24} は用量比を超えて増加した。イノツズマブ　オゾガマイシンを投与した動物における ADA 産生率の合計は，50%（18 例中 9 例）であった。イノツズマブ　オゾガマイシンを 0，0.011，0.036 および 0.109 mg/m^2/日の用量で投与したラットでの ADA 産生率は，それぞれ 0%（3 例中 0 例），33%（6 例中 2 例），40%（5 例中 2 例）および 83%（6 例中 5 例）であった。試験 14 日のイノツズマブ　オゾガマイシン濃度が ADA の検出を妨げた可能性がある。

Table 7.　雌ラットを用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの反復投与生殖発生毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ（平均値 ± 標準誤差）

試験	用量			試験日	性[c]	イノツズマブ オゾガマイシン[d]		総カリケアマイシン[e]	
	(mg/m^2/日)[a]	(mg/kg/日)[a]	(μg/kg/日)[b]			C_{5min} (ng/mL)	AUC_{24} (ng•h/mL)	C_{5min} (ng/mL)	AUC_{24} (ng•h/mL)
受胎能[f] (RPT-69733)	0.011	0.0018	0.15	14	雌	33.6±6.2	441±40	1.83±0.93	NA[g]
	0.036	0.0061	0.5	14	雌	126±1	1720±203	11.0±0.8	157±20
	0.109	0.018	1.5	14	雌	626±64	9670±946	54.4±5.1	941±92
EFD[h] (RPT-68342)	0.011	0.0018	0.15	GD 15	雌	28.6±1.1	364±20	-	-
	0.036	0.0061	0.5	GD 15	雌	145±12	1680±130	-	-
	0.109	0.018	1.5	GD 15	雌	533±26	6900±420	-	-

EFD：胚・胎児発生，GD：妊娠日，NA：該当せず，-：該当データなし
a. G544 タンパク相当量を示す。mg/kg から mg/m^2 への換算には換算係数 6 を用いた。
b. N-Ac-γ カリケアマイシン DMH AcBut 相当量を示す（μg/kg）。
c. 3 匹/時点/用量群
d. イノツズマブ　オゾガマイシン濃度はタンパク相当量（ng/mL）を示す。
e. 総カリケアマイシン濃度はカリケアマイシン相当量（ng/mL）を示す。
f. 1 日 1 回，3～6 週間投与。抗 CD22 抗体へのカリケアマイシンの結合量は，抗体 1 mg につきカリケアマイシン 82.5 μg であった。
g. RPT-69733 試験で報告した AUC は，定量可能であった 1 時点のデータのみを用いて算出した。
h. 妊娠 6～15 日に 1 日 1 回投与。抗 CD22 抗体へのカリケアマイシンの結合量は，抗体 1 mg につきカリケアマイシン 82.5 μg であった。

3.2.4. ラットを用いた胚・胎児発生試験

RPT-68342（概要表 2.6.7.13A）

雌 Sprague-Dawley ラットにイノツズマブ　オゾガマイシンを 0.011，0.036 または 0.109 mg/m^2/日の用量で反復静脈内投与（妊娠 6～15 日に 1 日 1 回）する胚・胎児発生試験の一部として，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび非結合カリケアマイシンの血清中濃度推移ならびに ADA の有無を検討した（Table 7）。

採取したいずれの試料も，非結合カリケアマイシンの血清中濃度は定量限界（10.5 ng/mL）未満であった。イノツズマブ　オゾガマイシンの AUC_{24} は用量比を超えて増加した。

3.2.5. ウサギを用いた胚・胎児発生試験

RPT-72134（概要表 2.6.7.13B）

雌 New Zealand White ウサギにイノツズマブ　オゾガマイシンを 0.015, 0.044 または 0.145 mg/m^2/日の用量で反復静脈内投与（妊娠 6～15 日に 1 日 1 回）する胚・胎児発生試験の一部として，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび総カリケアマイシンの血清中濃度推移を検討した（Table 8）。

イノツズマブ　オゾガマイシンおよび総カリケアマイシンの AUC_{24} は用量にほぼ比例して増加した。妊娠 29 日に，イノツズマブ　オゾガマイシンを投与した全動物における ADA 産生率の合計は，41.4%（58 例中 24 例）であった。イノツズマブ　オゾガマイシンを 0，0.015，0.044 および 0.145 mg/m^2/日の用量で投与したウサギでの ADA 産生率は，それぞれ 0%（18 例中 0 例），50%（20 例中 10 例），26.3%（19 例中 5 例）および 47.4%（19 例中 9 例）であった。妊娠 15 日に ADA 陽性の動物はいなかったため，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび総カリケアマイシンの TK プロファイルに ADA が及ぼす影響は不明である。さらに，イノツズマブ　オゾガマイシンを投与した動物から妊娠 15 日に採取した試料中の薬物濃度は，試料採取時点で ADA 反応の検出を妨げた可能性がある。

Table 8.　雌ウサギを用いたイノツズマブ　オゾガマイシンの反復投与生殖発生毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ（平均値 ± 標準誤差）

試験	用量 (mg/m^2/日)[a]	用量 (mg/kg/日)[a]	用量 (µg/kg/日)[b]	試験日	性[c]	イノツズマブ オゾガマイシン[d] C_{5min} (ng/mL)	イノツズマブ オゾガマイシン[d] AUC_{24} (ng•h/mL)	総カリケアマイシン[e] C_{5min} (ng/mL)	総カリケアマイシン[e] AUC_{24} (ng•h/mL)
EFD[f] (RPT-72134)	0.015	0.0012	0.1	GD 15	雌	81.8±9.9	1350±47	6.01±0.85	106±10
	0.044	0.0036	0.3	GD 15	雌	254±15	4190±254	25.8±0.9	452±25
	0.145	0.012	1	GD 15	雌	977±62	13300±872	67.5±3.7	1050±34

EFD：胚・胎児発生，GD：妊娠日
a. G544 タンパク相当量を示す，mg/kg から mg/m^2 への換算には換算係数 12 を用いた。
b. N-Ac-γ カリケアマイシン DMH AcBut 相当量を示す（µg/kg）。
c. 4 匹/時点/性/用量群
d. イノツズマブ　オゾガマイシンの濃度は各タンパク相当量（ng/mL）を示す。
e. 総カリケアマイシン濃度はカリケアマイシン相当量（ng/mL）を示す。
f. 妊娠 6～15 日に 1 日 1 回投与。抗 CD22 抗体へのカリケアマイシンの結合量は，抗体 1 mg につきカリケアマイシン 82.5 µg であった。

3.2.6. サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験でのトキシコキネティクス

RPT-46909（概要表 2.6.7.7C）

雌雄カニクイザルに 0.36，1.32 または 4.20 mg/m^2/週のイノツズマブ　オゾガマイシンあるいは 4.08 mg/m^2/週の G544 のみを週 1 回 4 週間静脈内投与した後に 4 週間の回復期間を設ける毒性試験の一部として，イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および非結合カリケアマイシンの血清中濃度推移ならびに ADA の有無を検討した（Table 9）。

イノツズマブ　オゾガマイシンを反復投与したところ，イノツズマブ　オゾガマイシンまたは G544 の AUC_{168} に一貫した明らかな性差は認められなかった。イノツズマブ　オゾガマイシンの AUC_{168} は用量比を超えて増加したが，G544 の AUC_{168} は用量にほぼ比例して増加した。サルではイノツズマブ　オゾガマイシンの反復投与後にイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の蓄積が認められ，AUC_{168} の比較により求めた 4 週間後の蓄積比はイノツズマブ　オゾガマイシンでは 2.03～7.33，G544 では 1.72～2.00 であった。非結合カリケアマイシン濃度が測定可能であった

のは, 4.20 mg/m^2/週群の 1 例で 0.083 時間のみであり, 非結合カリケアマイシン濃度は 75.5 ng/mL であった。

G544 のみ 4.08 mg/m^2/週の用量で投与した雌サルで測定された G544 の曝露量は雄サルで測定された曝露量よりも大きかったが，雌サルで測定された曝露量は一定でなかった。G544 のみ（4.08 mg/m^2/週）を投与した雄サルで測定された G544 の曝露量は，タンパク相当量でほぼ同一用量（4.20 mg/m^2/週）のイノツズマブ　オゾガマイシンを投与したサルで測定された曝露量よりも小さかった。G544 のみを 4 週間反復投与したときの G544 の蓄積比は，雌では 1.43，雄では 1.96 であった。

イノツズマブ　オゾガマイシンまたは G544 のみを投与した動物における ADA 産生率は 0%であった。生理食塩水を投与した対照群の 1 例およびイノツズマブ　オゾガマイシン 4.20 mg/m^2/週群の 1 例では，試験-12，-5 または 15 日に ADA 陽性であったが，いずれの動物も試験 29 日までに ADA は陰性になったため，これらの動物では ADA は産生されなかったと考えられた。

3.2.7. サルを用いた 26 週間反復投与毒性試験でのトキシコキネティクス

6617-260（RPT-65773）（概要表 2.6.7.7D）

雌雄カニクイザルに 0.072，0.216 または 0.732 mg/m^2/週のイノツズマブ　オゾガマイシンを週 1 回 26 週間静脈内投与する毒性試験の一部として，イノツズマブ　オゾガマイシン，G544，非結合カリケアマイシンおよび総カリケアマイシンの血清中濃度推移ならびに ADA の有無を検討した（Table 9）。

イノツズマブ　オゾガマイシンを反復投与したところ，イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 または総カリケアマイシンの AUC_{168} に一貫した明らかな性差は認められなかった。イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および総カリケアマイシンの AUC_{168} は用量比を超えて増加した。サルではイノツズマブ　オゾガマイシンの反復投与後にイノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および総カリケアマイシンの蓄積が認められ，AUC_{168} の比較により求めた 25 週間後の蓄積比はイノツズマブ　オゾガマイシンでは 3.07～6.74，G544 では 3.04～5.68，総カリケアマイシンでは 4.81～8.34 であった。大部分のサルでは非結合カリケアマイシンの血清中濃度は定量限界未満（70.4 ng/mL 未満）であった。

本試験では，投与前の全動物で ADA が検出された割合は 2.8%（36 例中 1 例）であった。全動物での ADA 産生率の合計は 0%（32 例中 0 例）であった。0.216 mg/m^2/週群または 0.732 mg/m^2/週群では, 試験 169 日のイノツズマブ　オゾガマイシン濃度が ADA の検出を妨げた可能性がある。

Table 9.　イノツズマブ　オゾガマイシンを反復投与した雌雄サルにおけるトキシコキネティクスパラメータ（平均値± 標準偏差）

試験	用量			試験日	性[c]	イノツズマブ	オゾガマイシン[d]	G544[d]		総カリケアマイシン[e]	
	(mg/m^2/週)[a]	(mg/kg/週)[a]	(μg/kg/週)[b]			C_{5min} (ng/mL)	AUC_{168} (ng•h/mL)	C_{5min} (ng/mL)	AUC_{168} (ng•h/mL)	C_{5min} (ng/mL)	AUC_{168} (ng•h/mL)
4 週間毒性[f] (RPT-46909)	4.08[g]	0.34[g]	0[g]	1	雄	NA	NA	4040±370	115000±12000	NA	NA
					雌	NA	NA	7530±3110	352000±180000	NA	NA
	0.36	0.03	2.5	1	雄	1350±110	6240±4580	508±96	14100±1900	-	-
					雌	1310±90	7970±3770	426±128	11600±700	-	-
	1.32	0.11	8	1	雄	5440±1740	51500±19200	2020±180	57700±6000	-	-
					雌	3590±1810	38800±30500	2100±90	54200±14300	-	-
	4.20	0.35	25	1	雄	15600±3500	314000±44000	6830±730	230000±16000	-	-
					雌	14100±800	282000±88000	6090±220	213000±40000	-	-
	4.08[g]	0.34[g]	0[g]	22	雄	NA	NA	4280±130	225000±20000	NA	NA
					雌	NA	NA	8810±4050	509000±275000	NA	NA
	0.36	0.03	2.5	22	雄	1550±90	33000±30800	576±93	25000±4700	-	-
					雌	1320±110	20000±9300	497±74	19900±1200	-	-
	1.32	0.11	8	22	雄	4820±260	145000±31000	2160±30	114000±11000	-	-
					雌	4340±1040	92800±22300	2290±300	97400±3400	-	-
	4.20	0.35	25	22	雄	13600±2300	628000±102000	7110±260	416000±17000	-	-
					雌	13900±2500	576000±104000	6820±850	385000±44000	-	-
26 週間毒性[h] (6617-260 [RPT-65773])	0.072	0.006	0.5	1	雄	123±48	837±360	149±35	1520±471	12.7±1.5	87.8±14.5
					雌	156±69	1030±643	142±41	1260±447	15.2±3.2	98.3±27.8
	0.216	0.018	1.5	1	雄	424±177	4650±2490	413±50	5800±1870	49.1±10.2	727±356
					雌	457±81	6710±2950	429±46	11500±4520	40.8±8.3	890±422
	0.732	0.061	5.0	1	雄	2590±989	24200±5530	1530±144	27800±3950	154±24	2670±123
					雌	1590±416	22300±4880	1450±175	32800±8830	129±17	2400±589
	0.072	0.006	0.5	169	雄	187±32	4430±1910	183±16	6470±2950	18.5±2.0	737±441
					雌	181±29	3230±604	183±18	6270±3320	17.2±3.0	667±498
	0.216	0.018	1.5	169	雄	614±139	23200±6500	479±60	24400±5870	57.4±11.1	3680±432
					雌	504±136	20200±10400	444±69	32200±4590	50.7±4.3	3430±727
	0.732	0.061	5.0	169	雄	1770±77	86100±2520	1610±95	100000±4600	203±19	15600±800
					雌	1980±NC	95200±NC	1950±NC	126000±NC	193±NC	15600±NC

NA：該当せず，NC：算出せず（n <3），-：該当データなし

a. G544 タンパク相当量を示す，mg/kg から mg/m^2 への換算には換算係数 12 を用いた。b. N-Ac-γ カリケアマイシン DMH AcBut 相当量を示す（μg/kg）。c. 4 週間毒性試験では 3～5 匹/性/用量群，26 週間毒性試験では 4 匹/性/用量群。d. イノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の濃度は各タンパク相当量（ng/mL）を示す。e. 総カリケアマイシン濃度はカリケアマイシン相当量（ng/mL）を示す。f. 週 1 回投与。抗 CD22 抗体へのカリケアマイシンの結合量は，抗体 1 mg につきカリケアマイシン 72 μg であった。g. カリケアマイシンと結合していない G544 のみを投与した。h. 週 1 回投与。抗 CD22 抗体へのカリケアマイシンの結合量は，抗体 1 mg につきカリケアマイシン 82.5 μg であった。

4. 分布

4.1. 組織分布

RPT-62496（概要表 2.6.5.5）

[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン（1.88 mg/m^2，62.8 µCi/kg）を雄 Sprague-Dawley ラットに単回静脈内投与後 0.083～336 時間に組織を摘出/燃焼処理した後，LSC 法により放射能濃度を測定して，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能の組織分布を検討した。

[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能の組織への分布は限定的であり，評価したいずれの組織においても AUC_{inf} の組織/血漿比は 0.6 未満と，ラットの V_{ss} が血漿容量と同等～やや高値と低値を示した（2.6.4.3.1.2 項）ことと符合していた。組織/血漿比が高かった主な組織は，肝臓（0.6），血液（0.5），脾臓（0.4），肺（0.3）および腎臓（0.3）であった。脳中放射能濃度は血漿中の 2%未満であったことから，血液脳関門を通過して分布するイノツズマブ　オゾガマイシンおよびその代謝物はわずかであることが示された。[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能の $t_{½}$は，血漿中および血液中ではいずれも約 73 時間と同等であったが，評価した他の組織における $t_{½}$はいずれも血漿中より長かった（骨格筋の 87.7 時間～腎臓の 265 時間）。投与後 336 時間において，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来の放射能濃度は，下垂体，胸腺，脾臓，皮膚，眼，リンパ節，腎臓，前立腺，肝臓，唾液腺，ハーダー腺，膀胱，精巣および大腸を除き各組織の C_{max} の 10%以下まで低下しており，肝臓および脾臓では血漿中濃度よりもやや高値を示したが，その他の組織では血漿中濃度よりも低かった。

4.2. 血漿タンパク結合率

PF-06649266_[redacted]_160926（YDP067/044）（概要表 2.6.5.6）

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（濃度 1.8 µmol/L，2660 ng/mL）の血漿タンパク結合率をマウス，ラット，ウサギ，サルおよびヒト血漿を用いて in vitro で平衡透析法により測定した。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の血漿タンパク結合率は，評価したすべての動物種において高く，マウス，ラット，ウサギ，サルおよびヒト血漿中での非結合型分率（f_u）は，それぞれ 0.000942，0.00679，0.0263，0.0310 および 0.0279 であった。

4.3. 赤血球移行性

RPT-62496（概要表 2.6.5.5）

イノツズマブ　オゾガマイシンまたは N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の in vitro での赤血球への移行に関する試験は実施していないが，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに単回静脈内投与したときの血液および血漿中放射能濃度から血球移行性を検討した。

放射能濃度の AUC_{inf} 比（血液/血漿）は約 0.5 であり，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能は血漿中にほぼ選択的に分布することが示された。

4.4. トランスポーターの基質としての評価

4.4.1. 排出トランスポーター

PF-06649266_[redacted]_131956，PF-06649266_[redacted]_120849（概要表 2.6.5.15A）

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（10 µmol/L）が P-gp または BCRP の基質となる可能性について，P-gp または BCRP の遺伝子を導入した MDCK 細胞での双方向の透過性を測定することにより検討した。

P-gp を発現させた MDCK タイプ II 細胞では，flux ratio（基底膜側から頂端膜側への透過性と頂端膜側から基底膜側への透過性の比）は 4.76 であったが，P-gp の阻害薬である PSC 833 によりほぼ 1 まで減少した。一方，BCRP を発現させた MDCK 細胞では，flux ratio は 1.20 であった。これらの結果から，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は P-gp の基質となるが，BCRP の基質とはならないと考えられた。

4.4.2. 肝取り込みトランスポーター

PF-06649266_[redacted]_113941（概要表 2.6.5.15A）

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（0.3 µmol/L）が肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 および OATP1B3 の基質となる可能性について，リファマイシン SV（肝取り込みトランスポーター OATP1B1 および OATP1B3 の既知の阻害薬）の存在下および非存在下でサンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いて検討した。

リファマイシン SV によって陽性対照であるロスバスタチン（OATP1B1 および OATP1B3 の既知の基質）の肝取り込みはほぼ完全に阻害されたが，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の肝取り込みは阻害されなかった。これらの結果から，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は受動拡散によってヒト肝細胞へと取り込まれ，肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 および OATP1B3 の寄与は低いことが示唆された。

4.5. 胎盤通過性

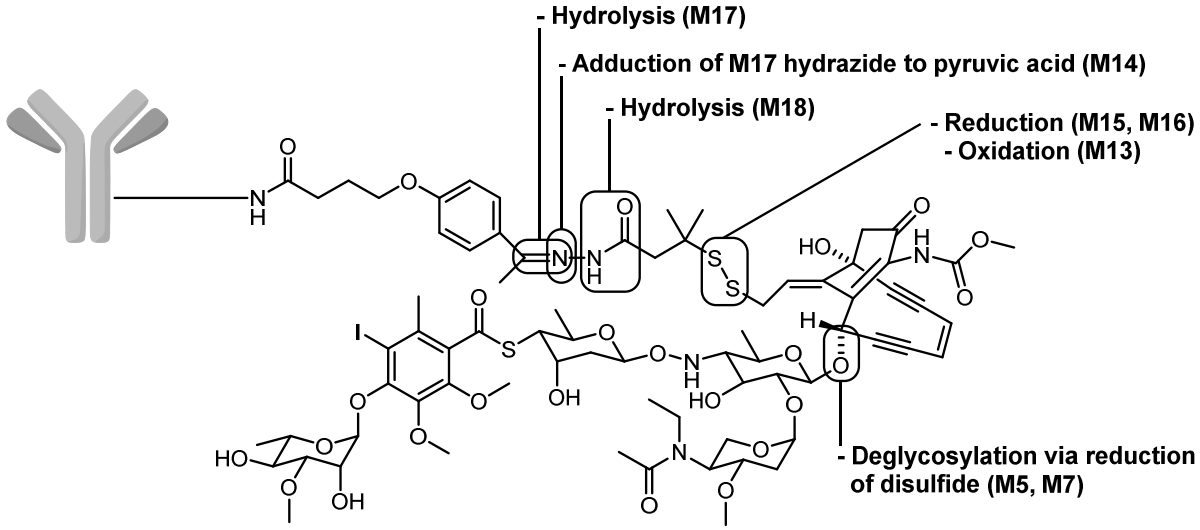
妊娠ラットを用いた，イノツズマブ　オゾガマイシンまたは N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の胎盤通過に関する試験は実施していない。

5. 代謝（動物種間の比較）

^{3}H 標識または非標識のイノツズマブ　オゾガマイシンをラットおよびヒトに単回静脈内投与したときの in vivo 代謝を検討した。また，in vitro または ex vivo での代謝試験として，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを毒性評価動物種であるラットおよびサルならびにヒト血漿中で，[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を肝 S9 および血漿中でインキュベートした。

イノツズマブ　オゾガマイシンの主代謝経路は N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を遊離するヒドラゾン部分の加水分解である。遊離した N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な代謝経路はジスルフィド基の還元であり，ヒドラジド基の加水分解，酸化およびピルビン酸との付加反応は副次的経路であった。イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の推定代謝経路を Figure 3 に示す。

Figure 3.　イノツズマブ　オゾガマイシンおよび非結合カリケアマイシンの主代謝経路



5.1. In vivo 代謝

5.1.1. ラット

PF-05208773_[redacted]_130045（YDP/003/249），PF-05208773_[redacted]_014414
（概要表 2.6.5.9A，2.6.5.9B，2.6.5.11A，2.6.5.11B）

雌雄の胆管カニューレ挿入および非挿入ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを 0.91 mg/m^{2}（47.3 μCi/kg）の用量で単回静脈内投与した排泄試験（2.6.4.6 項）で得られた血漿，尿，糞および胆汁試料を用いて代謝物の検索および同定を行った。

上記の排泄試験において，胆管カニューレ非挿入の Sprague-Dawley ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを単回静脈内投与したところ，投与放射能の約 98%が試験期間中（504 時間）に回収され，その大部分（約 80%）は糞中に排泄された。胆管カニューレ挿入ラットでは胆汁中に，雄では 52.5%，雌では 63.5%の放射能が排泄された。尿中には投与放射能の約 8%～9%が排泄された。これらのデータから，胆汁排泄を介した糞中排泄がイノツズマブ　オゾガマイシンの主要な排泄経路であることが示された。

排泄物中および血中の代謝物を同定するため，放射化学検出器を接続した SE-HPLC または LC-MS で糞，尿，胆汁および血漿を分析した。しかし，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンの用量が低いことによる分析感度の問題のため，採取された生体試料からは質量分析データを得ることができなかった。そのため，一連の in vitro 試験（2.6.4.5.3 項）で[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH のインキュベートにより同定された代謝物とクロマトグラム上の保持時間を比較して，生体試料中の代謝物を同定した。

雌雄ラット胆汁中の主代謝物は還元型 N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH である N-Ac-ε-カリケアマイシン（M16，PF-06691414）で，雄および雌ラットでは投与量のそれぞれ 7.5%および 8.0%を占めた。N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（M17）およびそのカルボン酸体である M18（ヒドラジド基の加水分解により生成）は，雄ラットでは投与量のそれぞれ 3.1%および 4.1%，雌ラットではそれぞれ 7.0%および 1.7%を占めた。その他の代謝物として，M14（M17 にピルビン酸が付加したヒドラゾン体），M13（M17 のアリルアルコール体），M12（M16 の酸化的代謝物）ならびに四糖部分を含む代謝物である M1 および M5 があり，いずれも投与量の 3%未満であった。他にも少量存在する多数の代謝物が胆汁中から同定されたが，それらはいずれも投与量の 1%以下であった。

雌雄ラットの糞中と胆汁中の代謝物プロファイルは類似していなかった。糞中からは M1（四糖部分の一酸化体）および M5 のみが同定され，胆管カニューレ非挿入の雄ラットでは投与量のそれぞれ 5.5%および 2.8%を，雌ラットではそれぞれ 4.2%および 3.3%を占めた。N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（M17）は検出されなかった。糞中における薬物由来放射能の大部分（雄および雌ラットでそれぞれ投与量の 40.6%および 40.0%）は，クラマトグラム上で早期に溶出される未同定の極性成分からなり，カリケアマイシンのアリル四糖部分が消化管中のバクテリアまたは消化酵素によって代謝されて生じたものと推定される。

胆管カニューレ非挿入ラットの尿中から回収された少量の薬物関連物質は複数の代謝物からなり，それぞれ投与量の 1%以下であった。雄および雌ラットの尿中では，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（M17）はそれぞれ投与量の 0.3%および 0.1%を占めた。主な代謝物は，M14（雄および雌ラットでそれぞれ投与量の 1.2%および 1.0%）および M1（同じくそれぞれ投与量の 0.8%および 0.6%）であった。M12，M13 および N-Ac-ε-カリケアマイシン（M16）は，いずれも投与量の 0.5%～0.6%であった。胆管カニューレ挿入ラットから採取された尿中の代謝物プロファイルは，胆管カニューレ非挿入ラットとほぼ同様であった。

血中放射能の大部分（約 98%）はタンパク質と結合しており，非結合カリケアマイシン由来放射能は総血中放射能の約 2%であり，SE-HPLC を用いた検討からは総放射能に占めるイノツズマブオゾガマイシンの割合は 66%と見積もられた（2.6.4.3.1.2 項）。SE-HPLC の結果から，主成分であるイノツズマブ　オゾガマイシンの他に構造未同定のより高分子量を示す 2 種の成分が認められた（PF-05208773_[redacted]_014414）。

血漿中に検出された主代謝物は，M13，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（M17）および M11 であり，雄ラットではそれぞれ試料中放射能の 0.4%，0.3%および 0.2%，雌ラットではそれぞれ 0.3%，0.1%未満および 0.3%を占めた。M1 および M15（M17 のアリル型アルデヒド/ヘミアセタール）も血中の主な代謝物であり，雄ラットではそれぞれ総血漿中放射能の 0.2%および 0.1%を占め，雌ラットではいずれも 0.1%を占めた。胆汁中の主代謝物である N-Ac-ε-カリケアマイシン（M16）は，雌雄ラットともに総血漿中放射能の 0.1%を占めた。雌雄ラットの血漿中の代謝物プロファイルに質的な性差はみられなかった。

いずれの試料中の代謝物プロファイルにおいても，主要ピークの放射能は回収された総放射能より少なく，主代謝物以外の多数の代謝物が残りの放射能を占めていると考えられた。

ラットでは，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンから遊離された[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は広範に代謝された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な代謝経路は，N-Ac-ε-カリケアマイシン（M16）を生成し，四糖部分の代謝物（M1 および M5）を生成する脱グリコシル化にも関与していると推定されるジスルフィド基の還元であった。加水分解（ヒドラジド基），酸化およびピルビン酸との付加反応による代謝はわずかであった。

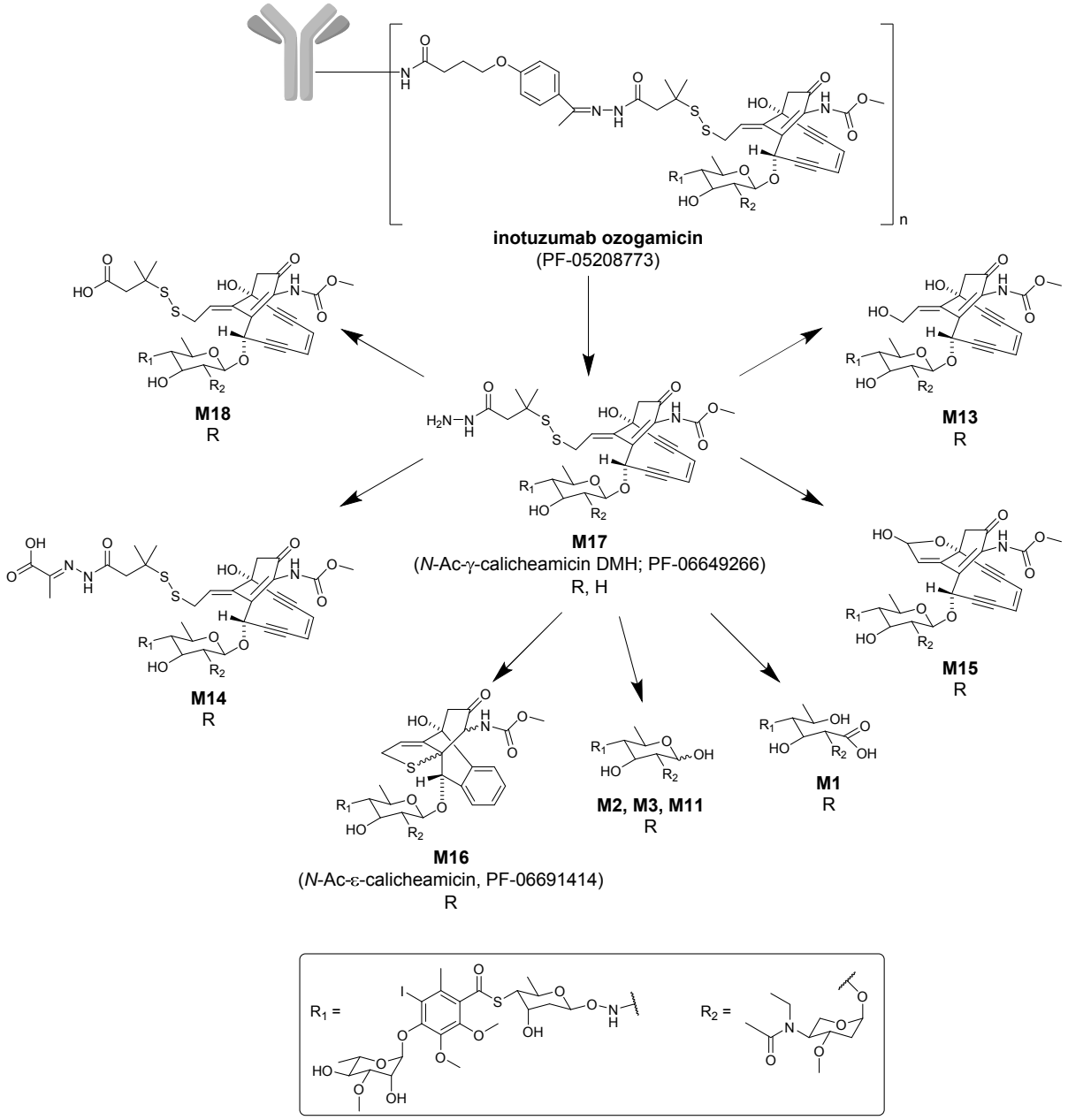
5.1.2. ヒト

PF-05208773_[redacted]_124138（概要表 2.6.5.9C，2.6.5.11A，2.6.5.11B）

B1931007 試験で治療の一部として，再発または難治性 NHL 患者にイノツズマブ　オゾガマイシン（1.8 mg/m^2，4 週間に 1 回）を 3 サイクル静脈内投与し，イノツズマブ　オゾガマイシンの in vivo 代謝を検討した。第 3 サイクルのイノツズマブ　オゾガマイシン投与後 1 時間（点滴終了直前），3 時間および 48 時間に血清および尿試料を採取してプールし，試料中に存在する代謝物プロファイルを定性的に検討した。イノツズマブ　オゾガマイシンの用量が低いことによる分析感度の問題から，特定の代謝物のみの検出となるがより高感度な LC-MS/MS を用いた多重反応モニタリング（MRM）法による分析も実施した。

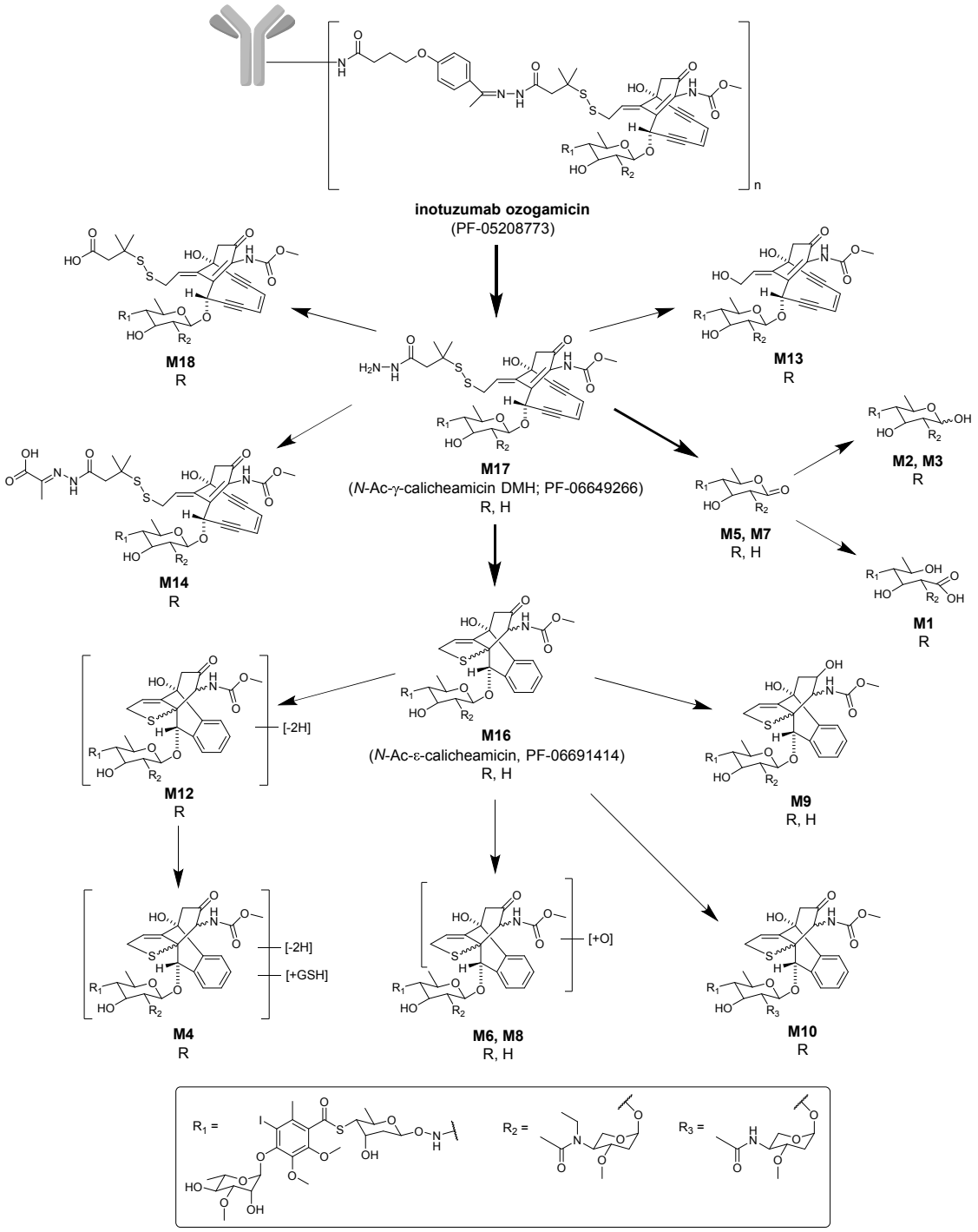
血清中に検出された代謝物は，イノツズマブ　オゾガマイシンの加水分解産物として予測される N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（M17）のみであった。尿中の代謝物として，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH，それが還元された N-Ac-ε-カリケアマイシン（M16），N-Ac-ε-カリケアマイシンの一酸化体（M8），N-Ac-ε-カリケアマイシンの還元体（M9，アグリコンの C-11 位カルボニル基の還元により生成すると推測される第 2 級アルコール体）および脱グリコシル化により生成する四糖部分を含む代謝物（M7）が検出された。ヒトで検出された代謝物では N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH のみがカリケアマイシン分子の四糖部分をそのまま保持しており活性（細胞毒性）を有すると考えられた。ヒトで検出された代謝物はすべてラットにおいても検出された代謝物であった。

Figure 4.　ラットおよびヒトの血中代謝物



H = Human; R = ラット

Figure 5.　ラットおよびヒトの排泄物中代謝物



H = ヒト; R = ラット

5.2. [^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンの ex vivo 代謝

PF-05208773_[redacted]_110807（概要表 2.6.5.10A）

[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンおよび[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH をラット，サルおよびヒト血漿中または 1%ウシ血清アルブミン（BSA）を含むリン酸緩衝食塩水中でインキュベートしたときの安定性を ex vivo で検討した。血漿試料をアセトニトリルで除タンパク処理した後，LSC または放射化学検出器を接続した SE-HPLC により測定した。

ラット，サルおよびヒト血漿中に[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを加え 37°C で 96 時間インキュベートしたとき，アセトニトリルで除タンパク処理した沈殿中に 90%を超える薬物由来放射能が存在したことから，カリケアマイシン部分に由来する放射能の大部分はタンパク質と結合していることが示された。このことは，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに単回静脈内投与後の血漿中放射能の約 98%がタンパク質と結合していた（2.6.4.3.1.2 項）ことと符合した。

[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットおよびヒト血漿中でインキュベートして SE-HPLC で分析したところ，イノツズマブ　オゾガマイシンの経時的な減少と，放射性の高分子成分の生成が認められ，[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン部分と高分子量タンパク質の付加体が生成することが示された。最も大きなピークはイノツズマブ　オゾガマイシンよりも早く溶出し，200 kDa より大きい分子量に相当した。72 時間インキュベート後のイノツズマブ　オゾガマイシンおよびその構造未知の主成分は，ラット血漿中ではそれぞれ試料中放射能の 46%および 35%を，ヒト血漿中ではそれぞれ 49%および 33%を占めた。[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを血漿中でインキュベート後の SE-HPLC 分析においては，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH に由来する低分子量の成分は検出されず，ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与後の血漿中代謝物と質的に類似していた。

これらの試験の結果を総合すると，血漿中ではイノツズマブ　オゾガマイシンの加水分解による N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の遊離は限られることが示された。

5.3. [^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の in vitro 代謝

PF-06649266_[redacted]_130246（概要表 2.6.5.10B）

毒性試験に用いたラットおよびサルとヒトにおける代謝プロファイルを比較し，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の生体内での変換への薬物代謝酵素の関与について検討するため，in vitro 代謝試験を実施した。まず，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の代謝経路について検討するため，ラット，サルおよびヒトの肝 S9 画分または血漿と[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（10 µmol/L）をインキュベートした。また，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを静脈内投与したラットの糞中での代謝物プロファイルをより詳細に検討するため，[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH をラット糞中でインキュベートした。

各種補因子（NADPH，UDPGA，PAPS，SAM，GSH，アセチル CoA およびアラメシチン）存在下のヒト肝 S9 画分中で[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は主に還元および加水分解により代謝された。反応液中にみられた主成分は N-Ac-ε-カリケアマイシン（M16），四糖部分の一酸化体（M1），N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（未変化体，M17）および M17 のアリル型アルコール体（M13）であり，それぞれ総放射能の 20.3%，11.4%，7.1%および 6.8%を占めた。その他の代謝物としては，四糖部分の代謝物（M2，M3，M5 および M7），M16 がさらに代謝された M4，M6，M8，M9 および M12 ならびに M17 のアリル型アルデヒド/ヘミアセタール（M15）およびカルボン酸体（M18）が認められ，いずれも総放射能の 5%未満であった。GSH のみ存在下で[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH をヒト肝 S9 画分中でインキュベートしたときの主代謝物は

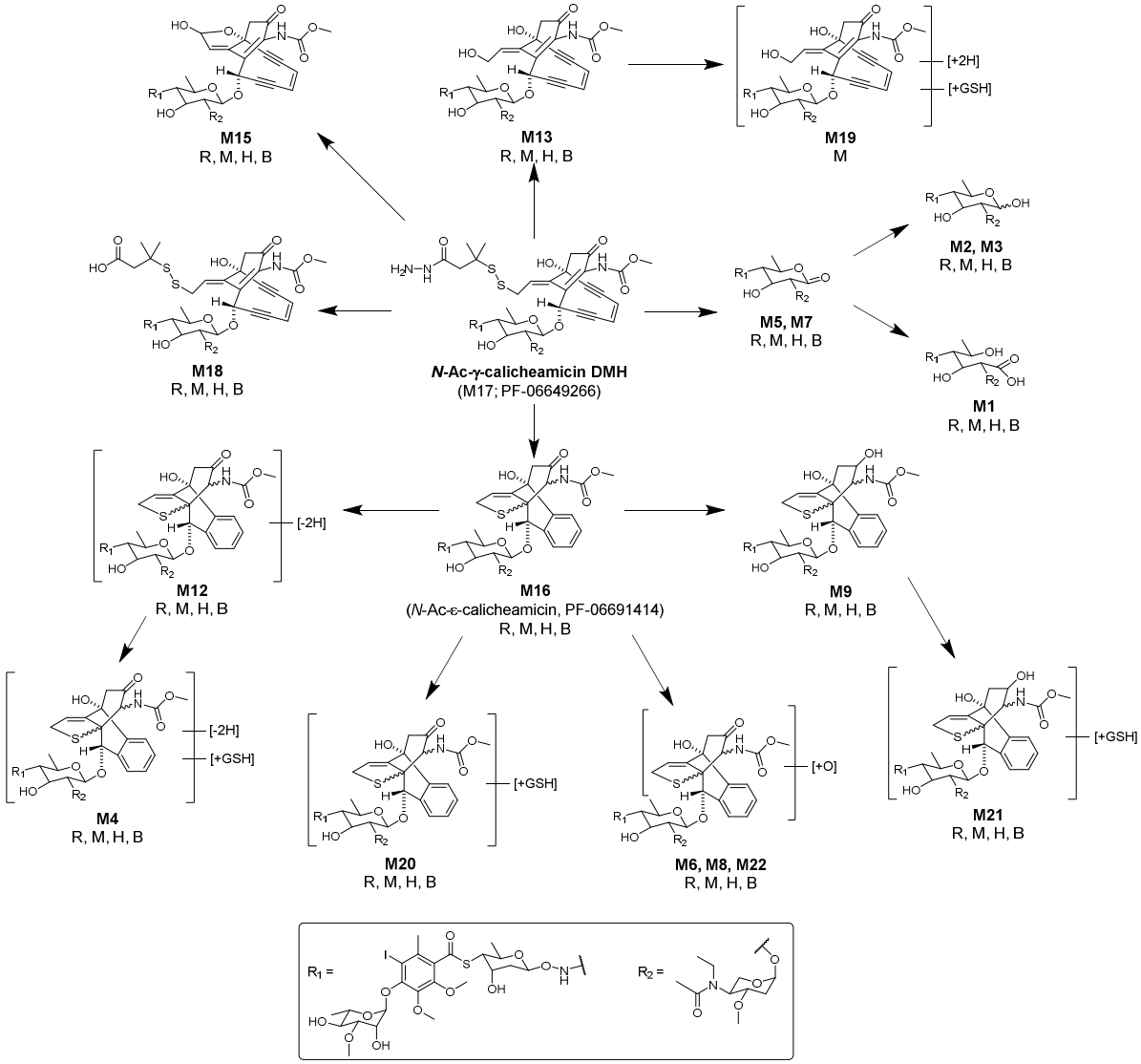
M16 ならびに四糖部分の代謝物である M1 および M7 であり，それぞれ総放射能の 23.4%，13.1%および5.0%を占めた。GSH 非存在下ではこれらの 3 代謝物の生成量はそれぞれ総放射能の 3.4%，1.7%および 1.7%であったことから，M16 の生成と脱グリコシル化には主として GSH が関与していることが示唆された。GSH のみの存在下でヒト肝 S9 画分とインキュベートした結果は，すべての補因子存在下でインキュベートした結果と類似しており，緩衝液中で GSH 非存在下でインキュベートした対照実験の結果も類似していたが，GSH 非存在下では基質である[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の減少は顕著に低下した。これらの試験結果は，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH を細胞内濃度付近（2 mmol/L～30 mmol/L）の GSH を含むリン酸緩衝液中でインキュベートしたとき M16 が高率に生成した試験成績（RPT-50556，MIRACL-26755）と符合した。

ヒト血漿中で[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH をインキュベートしたとき，反応液中にみられた主成分は未変化体（M17）であった（総放射能の 27.1%）。代謝物としては，加水分解（カルボン酸体の M18），還元［M16 およびそれがさらに代謝された M6，M17 のアリル型アルデヒド/ヘミアセタール（M15）ならびに四糖部分の代謝物である M1 および M2］および酸化（M17 のアリルアルコール体である M13）により生成する複数の代謝物が認められ，肝 S9 画分とインキュベートしたときと類似していた。血漿中では M17 のピルビン酸付加体（M14）も認められた。

ラットの糞と[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH をインキュベートしたとき，反応液中の主要な成分はクロマトグラム上で早期に溶出される複数の極性成分であり，これらを同定することはできなかった。加熱処理した糞とインキュベートした場合はこれらの生成量が減少したことから，これらの成分はカリケアマイシンのアリル四糖部分が腸内のバクテリアまたは消化酵素によって代謝されることにより生成したものと推定された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH をラットの糞中でインキュベートしたときの生成物は，ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与後の糞中代謝物と質的に類似していた（2.6.4.5.1.1 項）。

ラット，サルおよびヒトにおける代謝物プロファイルは同様であり，緩衝液とインキュベートした対照実験の結果は肝 S9 画分または血漿とインキュベートした場合と同様であったことから，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の生体内での変換の大部分は薬物代謝酵素を介さないことが示唆された。In vitro 試験でみられた[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の代謝物は，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与したラットから採取した in vivo 試料中で認められたものと質的に類似していた。以上の結果から，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は主に薬物代謝酵素を介さない還元および加水分解によって代謝されることが示された。したがって，イノツズマブ　オゾガマイシンを CYP または UGT といった薬物代謝酵素の阻害薬または誘導薬と併用投与しても，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の曝露量が変化する可能性は低いと考えられる。

Figure 6.　N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH のラット，サルおよびヒト肝 S9 による代謝



B = 緩衝液; H = ヒト; M = サル; R = ラット

6. 排泄

PF-05208773_[redacted]_111700 [8296878]（概要表 2.6.5.13，2.6.5.14）

雌雄の胆管カニューレ挿入および非挿入 Sprague-Dawley ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを 0.912 mg/m^2 の用量で単回静脈内投与し，イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能の排泄について検討した。

胆管カニューレ非挿入ラットでは放射能はほぼ完全に回収され，回収率は雄および雌ラットでそれぞれ投与放射能の 98.4%および 97.7%であった。主な排泄経路は糞中であり，雄および雌ラットでそれぞれ投与放射能の 79.5%および 80.1%が糞中から回収された。雄および雌ラットでそれぞれ投与放射能の 9.09%および 8.38%が尿中から回収された。投与後 504 時間（21 日），雄および雌ラットの屍体中にそれぞれ投与放射能の 8.54%および 7.40%が残存していた。放射能の排泄は緩徐であり，投与後 168 時間（7 日）までに雌雄ラットで投与放射能の約 64%～67%が排泄された。

胆管カニューレ挿入ラットでは放射能はほぼ完全に回収され，総回収率は雄および雌ラットでそれぞれ 96.6%および 96.7%であった。投与後 168 時間まで（全採取期間）に，雄および雌ラットでそれぞれ投与放射能の 52.5%および 63.5%が胆汁から回収された。雄および雌ラットでそれぞれ投与放射能の 5.62%および 4.71%が糞中に, 投与放射能の 3.00%および 3.55%が尿中に排泄された。

胆管カニューレ非挿入ラットの糞中および胆管カニューレ挿入ラットの胆汁中に放射能は主として排泄されたことから，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能の主な消失経路は肝消失および胆汁排泄であり，尿中排泄は主な消失経路ではないと考えられた。

非臨床試験に用いた動物種では，イノツズマブ　オゾガマイシンが乳汁中に排泄される可能性について検討していない。

7. 薬物動態学的薬物相互作用

日本，米国および欧州の薬物相互作用に関するガイダンスに従って，イノツズマブ　オゾガマイシンが主な CYP 分子種を，また，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が主な CYP および UGT 分子種ならびに薬物トランスポーターを介した薬物相互作用を引き起こす可能性について検討した。臨床でのイノツズマブ　オゾガマイシンの曝露量として，患者にイノツズマブ　オゾガマイシン 1.8 mg/m^2（各サイクルの第 1，8 および 15 日に 0.8，0.5 および 0.5 mg/m^2 を投与）を反復投与（B1931022 試験，2.7.2.2.2.1.1 項）したときの定常状態における C_{max} である約 308 ng/mL（約 0.00192 µmol/L）を，*N*-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の曝露量としては，上記の臨床試験においてほとんどの被験者で検出限界未満であったことから，定量下限値である 0.050 ng/mL（総濃度，0.000034 µmol/L，非結合型濃度としては 9.5×10^{-7} µmol/L）を用いた。

7.1. CYP を阻害する可能性

7.1.1. イノツズマブ　オゾガマイシン

RPT-79110（概要表 2.6.5.12A）

ヒト肝ミクロソームを用いて，イノツズマブ　オゾガマイシンが 8 種類の CYP 分子種（CYP1A2，CYP2A6，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 および CYP3A4）の活性を可逆的に阻害する可能性について検討した。

イノツズマブ　オゾガマイシンを 0.01～10 µmol/L の範囲で阻害剤として添加し，K_m 値付近の濃度の各 CYP 分子種特異的なマーカー基質を NADPH 再生系の存在下，プールしたヒト肝ミクロソーム中でインキュベートした。イノツズマブ　オゾガマイシンは検討した CYP 分子種の酵素活性をほとんど阻害せず，IC_{50} 値は検討した最高濃度である 10 µmol/L を上回り，K_i は 5 µmol/L 超であった。

ヒトにおけるイノツズマブ　オゾガマイシンの C_{max}（約 308 ng/mL＝約 0.00192 µmol/L）と in vitro 試験で得られた IC_{50} 値に基づき臨床で可逆的な CYP 阻害を介した薬物相互作用が生じる可能性について検討したところ，イノツズマブ　オゾガマイシンが CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 または CYP3A の活性を阻害する可能性は低いことが示された（R_1 <1.1，C_{max}/K_i <0.02）（概要表 2.6.5.15E，2.6.5.15F）。

プールしたヒト肝ミクロソームを用いて，いくつかの CYP 分子種の酵素活性に対するイノツズマブ　オゾガマイシンの時間依存的阻害作用についても検討した。

イノツズマブ　オゾガマイシンは CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 または CYP3A の活性に対する時間依存的阻害作用をほとんど示さなかったことから，イノツズマブ　オゾガマイシンが CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 または CYP3A の活性を時間依存的に阻害することによって薬物相互作用が生じる可能性は低いことが示唆された。

7.1.2. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH

PF-06649266_[redacted]_134026（XT[redacted]5091），PF-06649266_[redacted]_084941（XT[redacted]5115），PF-06649266_[redacted]_100129（概要表 2.6.5.12B，2.6.5.12C）

ヒト肝ミクロソームを用いて，*N*-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が 7 種類の CYP 分子種（CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 および CYP3A4/5）の活性を可逆的に阻害する可能性について検討した。

NADPH 再生系および *N*-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（0.01～10 μmol/L）の存在下で，プールしたヒト肝ミクロソームを分子種選択的なマーカー基質（K_m 値付近の濃度）とともにインキュベートした。N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19 または CYP2D6 に対して可逆的阻害作用をほとんど示さず，IC_{50} 値は 10 μmol/L（検討した最高濃度）超，阻害定数（K_i）は 5 μmol/L 超と推定された。しかし，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は CYP3A4/5 に対して可逆的阻害作用を示し，CYP3A4/5 によるテストステロン-6β-水酸化，ミダゾラム 1'-水酸化およびニフェジピン酸化に対する N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の IC_{50} 値は，それぞれ 5.5，0.42 および 0.40 μmol/L であった（PF-06649266_[redacted]_134026）。

ヒトにおける N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の C_{max} は総濃度として 0.050 ng/mL（0.000034 μmol/L，非結合型濃度としては 9.5×10^{-7} μmol/L）以下であり，in vitro 試験で得られた CYP 分子種に対する IC_{50} 値に基づき臨床で可逆的な CYP 阻害を介した薬物相互作用が生じる可能性について検討したところ，臨床用量で想定される濃度で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 または CYP3A4/5 の活性を可逆的に阻害する可能性は低いことが示された（R_1 <1.1，非結合型 C_{max}/K_i <0.02）（概要表 2.6.5.15G，2.6.5.15H）。

プールしたヒト肝ミクロソームを使用して，いくつかの CYP 分子種の酵素活性に対する N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の時間依存的阻害作用についても検討した。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は CYP1A2，CYP2B6，CYP2C9，CYP2C19 または CYP2D6 の活性に対する時間依存的阻害作用をほとんど示さなかったが，CYP2C8 および CYP3A4/5 の活性（テストステロン-6β-水酸化およびミダゾラム 1'-水酸化によって測定）に対しては時間依存的阻害作用が認められた。CYP2C8 に対する時間依存的阻害作用は非常に弱く，最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害薬濃度（K_I）は 30 μmol/L 超であり，正確な不活性化速度パラメータは算出できなかった（PF-06649266_[redacted]_084941）。CYP3A4/5 に対する K_I 値および最大不活性化速度定数（k_{inact} 値）は，ミダゾラムでそれぞれ 0.077 μmol/L および 0.00368 min^{-1}，テストステロンでそれぞれ 0.237 μmol/L および 0.00434 min^{-1} であった（PF-06649266_[redacted]_100129）。

In vitro で得られた不活性化パラメータ，CYP3A4/5 の k_{deg} 値（0.00032 min^{-1}）およびヒトにおける C_{max}（総濃度，0.050 ng/mL＝0.000034 μmol/L 以下）に基づき臨床で CYP3A4/5 の時間依存的阻害を介した薬物相互作用が生じる可能性について検討したところ，臨床用量で想定される濃度で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が CYP3A4/5 の活性を時間依存的に阻害する可能性は低いことが示された（R_2 <1.1）（概要表 2.6.5.15I）。

7.2. CYP を誘導する可能性

7.2.1. イノツズマブ　オゾガマイシン

RPT-78474（概要表 2.6.5.12E）

3 ロットのヒト凍結肝細胞を用いて，イノツズマブ　オゾガマイシンによる CYP1A2，CYP2B6 および CYP3A4 の mRNA 発現または活性を誘導する可能性について，0.003～0.32 μmol/L の濃度範囲で検討した。陽性対照として，CYP1A2 に対してはオメプラゾール（30 μmol/L），CYP2B6 に対してはフェノバルビタール（1000 μmol/L），CYP3A4 に対してはリファンピシン（10 μmol/L）を使用した。

評価した 3 ロットの肝細胞のいずれにおいても，イノツズマブ　オゾガマイシンは評価した最高濃度である 0.32 μmol/L まで CYP1A2，CYP2B6 または CYP3A4 の mRNA 発現または活性を誘導しなかった。

イノツズマブ　オゾガマイシンは評価した CYP 分子種に対してヒトにおける C_{max}（約 308 ng/mL＝約 0.00192 µmol/L）の 50 倍を超える 0.32 µmol/L の濃度まで誘導能を示さなかったことから，臨床用量で想定される濃度でイノツズマブ　オゾガマイシンが CYP1A2, CYP2B6 または CYP3A の活性を誘導する可能性は低いと考えられる。

7.2.2. N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH

PF-06649266_[redacted]_121216（概要表 2.6.5.12F）

3 ロットのヒト凍結肝細胞または新鮮肝細胞を用いて，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH による CYP1A2，CYP2B6 および CYP3A4 の mRNA 発現または活性を誘導する可能性について，0.001～0.3 µmol/L の濃度範囲で検討した。陽性対照として，CYP1A2 に対してはオメプラゾール（30 µmol/L），CYP2B6 に対してはフェノバルビタール（750 µmol/L），CYP3A4 に対してはリファンピシン（10 µmol/L）を使用した。

評価した 3 ロットの肝細胞のいずれにおいても，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は評価した最高濃度である 0.3 µmol/L まで CYP1A2, CYP2B6 または CYP3A4 の mRNA 発現または活性を誘導しなかった。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は評価した CYP 分子種に対して，ヒトにおける C_{max}（総濃度，0.050 ng/mL＝0.000034 µmol/L 以下）の 50 倍を超える 0.3 µmol/L の濃度まで誘導能を示さなかったことから，臨床用量で想定される濃度で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が CYP1A2，CYP2B6 または CYP3A4 の活性を誘導する可能性は低いと考えられる。

7.3. UGT を阻害する可能性

PF-06649266_[redacted]_142000（概要表 2.6.5.12D）

ヒト肝ミクロソームを用いて，2%ウシ血清アルブミン（BSA）の存在下および非存在下で，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が主な UGT 分子種の活性を阻害する可能性について，0.01 µmol/L～10 µmol/L の濃度範囲で検討した。評価した UGT 分子種に対するマーカー基質として，β-エストラジオール（UGT1A1），トリフルオペラジン（UGT1A4），5-ヒドロキシトリプトフォール（UGT1A6），プロポフォール（UGT1A9）およびジドブジン（UGT2B7）を使用した。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は 2% BSA の存在下および非存在下で UGT1A4，UGT1A6, UGT1A9 および UGT2B7 の活性に対して可逆的な阻害作用をほとんど示さず，IC_{50} 値はいずれも 10 µmol/L 超であったが，UGT1A1 に対しては阻害作用を示し，2% BSA の非存在下および存在下での IC_{50} 値はそれぞれ 0.61 µmol/L および 1.4 µmol/L であった。5 時間の in vitro ヒト肝ミクロソーム中での BSA 結合試験において，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は不安定であったことから，非結合型濃度の IC_{50} 値を算出することはできなかった。

ヒトにおける N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の C_{max} 値（総濃度および非結合型濃度としてそれぞれ 3.4×10^{-5} µmol/L 以下および 9.5×10^{-7} µmol/L 以下）と in vitro 試験で得られた IC_{50} 値に基づき臨床で UGT 阻害を介した薬物相互作用が生じる可能性について検討したところ，臨床用量で想定される濃度で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が UGT 分子種を阻害する可能性は低いことが示された（R_1 <1.1，C_{max}（総濃度または非結合濃度）/K_i <0.02）（概要表 2.6.5.15J，2.6.5.15K）。

7.4. 薬物トランスポーターを阻害する可能性

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な排出，肝取り込みおよび腎取り込みトランスポーターに対する阻害作用について in vitro で検討した。

7.4.1. 排出トランスポーター

PF-06649266_[redacted]_131956（概要表 2.6.5.15B）

排出トランスポーターである P-gp および BCRP を発現させた低透過性 MDCKII 細胞を用いて，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が P-gp および BCRP を阻害する可能性について，0.002～0.3 µmol/L の濃度範囲で検討した。P-gp および BCRP の典型的基質としてそれぞれジゴキシン（10 µmol/L）およびピタバスタチン（0.5 µmol/L）を使用した。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（0.3 µmol/L）の非存在下および存在下でのジゴキシンの排出比はそれぞれ 39.1 および 48.2 であったことから，評価した最高濃度においてもジゴキシンの排出比を低下させないことが示された。また，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH（0.3 µmol/L）の非存在下および存在下でのピタバスタチンの排出比はそれぞれ 9.52 および 7.99 であり，評価した最高濃度の N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH によりピタバスタチンの排出比は 16%低下した。これらの結果から N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH による P-gp および BCRP に対する IC_{50} 値はいずれも 0.3 µmol/L 超（K_i 値は 0.15 µmol/L 超）と推定された。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が臨床で P-gp または BCRP を阻害する可能性について検討したところ，C_{max}（総濃度）/K_i 値は 0.1 未満であり，推定 K_i 値（0.15 µmol/L 超）は非結合型濃度の C_{max}（9.5×10^{-7} µmol/L）の 50 倍を上回ったことから，臨床用量で想定される濃度で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH がこれらのトランスポーターを阻害する可能性は低いことが示唆された（概要表 2.6.5.15C，2.6.5.15D）。

7.4.2. 肝取り込みトランスポーター

PF-06649266_[redacted]_160005（概要表 2.6.5.15B）

肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 または OATP1B3 を発現させたヒト胎児由来腎臓（HEK）293 細胞を用いて，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が OATP1B1 および OATP1B3 を阻害する可能性について，0.00005～0.1 µmol/L の濃度範囲で検討した。OATP1B1 および OATP1B3 の典型的基質としてそれぞれプラバスタチン（10 µmol/L）およびロスバスタチン（5 µmol/L）を使用した。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は OATP1B1 および OATP1B3 を介したプラバスタチンおよびロスバスタチンの輸送を濃度依存的に阻害し，評価した最高濃度（0.1 µmol/L）における OATP1B1 および OATP1B3 の阻害率はそれぞれ 30%および 16%であった。これらの結果から，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH による OATP1B1 および OATP1B3 に対する IC_{50} 値はいずれも 0.1 µmol/L 超（K_i 値は 0.05 µmol/L 超）と推定された。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が臨床で OATP1B1 または OATP1B3 を阻害する可能性について検討したところ，C_{max}（総濃度）/IC_{50} 値は 0.1 未満であり，推定 K_i 値（0.05 µmol/L 超）は非結合型濃度の C_{max}（9.5×10^{-7} µmol/L）の 50 倍を上回ったことから，臨床用量で想定される濃度で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH がこれらのトランスポーターを阻害する可能性は低いことが示された（概要表 2.6.5.15C，2.6.5.15D）。

7.4.3. 腎取り込みトランスポーター

PF-06649266_[redacted]_144223（概要表 2.6.5.15B）

腎取り込みトランスポーターである OAT1，OAT3 または OCT2 を発現させた HEK293 細胞を用いて，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が OAT1，OAT3 および OCT2 を阻害する可能性について，

OAT1 に対しては 0.002～0.5 μmol/L，OAT3 および OCT2 に対しては 0.0004～0.1 μmol/L の濃度範囲で検討した。OAT1，OAT3 および OCT2 の典型的基質としてそれぞれ p-アミノ馬尿酸（2 μmol/L），エストロン-3-硫酸（0.2 μmol/L）およびメトホルミン（10 μmol/L）を使用した。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は評価した最高濃度においても OAT1，OAT3 および OCT2 を阻害しなかったことから，OAT1 に対する IC_{50} 値は 0.5 μmol/L 超（K_i は 0.25 μmol/L 超），OAT3 および OCT2 に対する IC_{50} 値は 0.1 μmol/L 超（K_i は 0.05 μmol/L 超）と推定された。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が臨床で OAT1，OAT3 または OCT2 を阻害する可能性について検討したところ，C_{max}（非結合型濃度）/IC_{50} 値は 0.1 未満であり，推定 K_i 値（0.05 μmol/L 超～0.25 μmol/L 超）は非結合型濃度の C_{max}（9.5×10^{-7} μmol/L）の 50 倍を上回ったことから，臨床用量で想定される濃度で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH がこれらのトランスポーターを阻害する可能性は低いことが示された（概要表 2.6.5.15C，2.6.5.15D）。

8. その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施していない。

9. 考察及び結論

イノツズマブ　オゾガマイシンおよびその細胞傷害性ペイロードである N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の非臨床薬物動態について in vitro および in vivo で広範に検討した。イノツズマブ　オゾガマイシンの構成成分である G544（抗 CD22 抗体）は非臨床薬理および毒性試験で使用したいずれの動物種（マウス，ラット，ウサギ，イヌおよびサル）の CD22 抗原にも結合しない（2.6.2.2.1.1 項）ことから，これらの動物種を用いた薬物動態試験は，主としてイノツズマブ　オゾガマイシンまたはそれから遊離した N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の標的を介さない薬物動態について評価したものと考えられる。

薬理試験で使用したマウスまたは毒性試験で使用したラットおよびサルにイノツズマブ　オゾガマイシンを単回腹腔内または静脈内投与したとき，イノツズマブ　オゾガマイシンの AUC は概して G544 の AUC と同程度かそれより低かった。非担癌マウスおよび CD22 陽性非ホジキンリンパ腫（NHL）B 細胞株 RL 細胞の担癌マウスにイノツズマブ　オゾガマイシンを腹腔内投与したときのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の曝露量は，いずれも担癌マウスの方が低値を示した。このことは，担癌マウスではイノツズマブ　オゾガマイシンの G544 部分が B 細胞腫瘍の表面の CD22 タンパク質を認識し，特異的に腫瘍細胞へ移行したことによると推察される。イノツズマブ　オゾガマイシンをラットおよびサルに静脈内投与したときのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび G544 の全身 CL は低値を示し，定常状態の V_{ss} は血漿容量と同等～やや高値を示し，モノクローナル抗体医薬品で予想される結果を示した。$t_{½}$は概ね 40 時間～60 時間程度と長かった。[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに単回静脈内投与したときの血漿中放射能の大部分はタンパク質に結合したカリケアマイシン由来であり，非結合カリケアマイシン由来放射能は約 2%と微量であることが示された。

雌雄のラットおよびサルを用いた反復投与毒性試験において，いずれの測定対象物（イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 または総カリケアマイシン）の AUC にも一貫した性差は認められず，ラットおよびサルのいずれにおいても非結合カリケアマイシン誘導体の血清中濃度は概して定量限界未満であった。イノツズマブ　オゾガマイシン，G544 または総カリケアマイシンの AUC は，ラットでは用量にほぼ比例して増加したが，サルでは用量比を超えて増加した。ラットではイノツズマブ　オゾガマイシン，G544 および総カリケアマイシンの曝露量に顕著な経日的な変化はみられなかったが，サルでは最終投与後の曝露量は初回投与後より高値を示した。抗イノツズマブ　オゾガマイシン抗体の産生率は，ラットでは 10%～13%，サルでは 0%であったが，高用量群では血中のイノツズマブ　オゾガマイシン濃度が抗イノツズマブ　オゾガマイシン抗体の検出を妨げた可能性がある。

[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンをラットに静脈内投与したときの放射能の組織への分布は限定的であり，肝臓，脾臓，肺および腎臓でやや高い放射能濃度が認められたが，評価したすべての組織において放射能濃度の AUC は血漿中の 0.6 倍以下であった。脳における放射能濃度の AUC は血漿中の 2%未満であり，血液脳関門を通過して脳に分布する[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能はわずかであることが示された。血中の[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシン由来放射能は血漿にほぼ特異的に分布した。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の血漿タンパク結合率は評価したいずれの動物種においても高く，マウス，ラット，ウサギ，サルおよびヒトにおける f_u は 0.00094～0.031 であった。N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は排出トランスポーターである P-gp の基質となったが，BCRP の基質とはならず，OATP1B1 および OATP1B3 といった肝取り込みトランスポーターの基質とはならず主として受動拡散により肝細胞内に取り込まれると考えられた。

イノツズマブ　オゾガマイシンの主代謝経路はヒドラゾン部分の加水分解による N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の遊離であるが，標的介在性および非介在性の両経路も循環血中からの消失に寄与していると考えられている[4,5]。標的介在性の経路にはイノツズマブ　オゾガマイシンの CD22 発現細胞の表面抗原への結合とそれに続く受容体を介した内在化，エンドソームからリソソームへの移行およびリソソーム内での N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の細胞内放出（水解）が含まれる。標的非介在性の経路は IgG の異化経路であり，肝臓など複数の器官において内皮細胞による飲作用を介した非特異的取り込みなどにより ADC であるイノツズマブ　オゾガマイシンも消失すると考えられる。細胞内に取り込まれたイノツズマブ　オゾガマイシンは胎児性 Fc 受容体（FcRn）を介して循環血中へ再放出されるか，リソソームへ移行し N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の遊離および IgG4 部分の異化作用を受けると考えられる。

ラットおよびヒトにそれぞれ ^{3}H 標識および非標識のイノツズマブ　オゾガマイシン静脈内投与後の生体試料中の代謝物を検索した。ラットでは，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンから遊離した[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は広範に代謝された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な代謝経路はジスルフィド基の還元であり，ヒドラジド基の加水分解，酸化およびピルビン酸との付加反応は副次的経路であった。ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与後の血漿中総放射能に占めるイノツズマブ　オゾガマイシンの割合は 66%と見積もられ，その他に構造未同定のより高分子量を示す 2 種の成分が認められた。ヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを投与後の血清中および尿中の代謝物を分析したところ，血清中にはイノツズマブ　オゾガマイシンの加水分解産物である N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH のみが認められ，尿中から検出された代謝物はいずれもラットにおいても認められた。

毒性試験に用いた動物種（ラットおよびサル）とヒトの代謝プロファイルを比較し，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の代謝に関与する酵素を検討するための in vitro 代謝試験を実施した。ラット，サルおよびヒト血漿中で[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを 37°C で 96 時間インキュベートした ex vivo 試験では，90%を超える薬物由来放射能はタンパク質と結合していることが示された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH をラット，サルおよびヒトの肝 S9 画分（グルタチオンなどの各種捕因子の存在下）または血漿とインキュベートしたときの代謝物プロファイルはいずれの種においても類似しており，緩衝液中でインキュベートしたときとも同様であったことから，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の生体内における変換の大部分は薬物代謝酵素を介さないことが示唆された。[^{3}H]N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の in vitro 代謝で認められた代謝物は，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを投与したラットから採取した in vivo 試料でみられたものと質的に類似していた。以上のことから，イノツズマブ　オゾガマイシンの加水分解による N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の遊離はわずかであり，遊離した N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は主に薬物代謝酵素を介さない還元によって代謝されることが示唆された。したがって，イノツズマブ　オゾガマイシンを CYP または UGT といった薬物代謝酵素の阻害薬または誘導薬と併用投与しても，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の曝露量が変化する可能性は低いと考えられた。

ラットに[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを静脈内投与したときの放射能の排泄は緩徐であり，投与放射能の約 80%は糞中に排泄され，尿中に排泄された放射能は投与量の 8%～9%程度であっ

[4] Gerber HP, Koehn FE, Abraham RT. The Antibody-Drug Conjugate: An Enabling Modality for Natural Product-Based Cancer Therapeutics. Nat Prod Rep 2013; 30(5):625-39.

[5] Kraynov E, Kamath AV, Walles M, et al. Current Approaches for Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Characterization of Antibody-Drug Conjugates: An Industry White Paper. Drug Metab Dispos 2016; 44(5):617–23.

た。胆管カニューレ挿入ラットの胆汁中に投与放射能の 53%～64%が排泄されたことから，[^{3}H]イノツズマブ　オゾガマイシンを静脈内投与したときの放射能の主排泄経路は，胆汁を介した糞中排泄であると考えられた。

イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な CYP 分子種に対する可逆的または時間依存的阻害能について in vitro で検討し，得られた阻害パラメータとヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを臨床用量で投与したときの定常状態でのイノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の C_{max}（それぞれ 308 ng/mL＝0.00192 μmol/L および 0.050　ng/mL 以下＝0.000034 μmol/L 以下）に基づき臨床で薬物相互作用が生じる可能性について検討した。その結果，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度で CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 および CYP3A4/5 の活性を阻害する可能性は低いことが示された。また，イノツズマブ　オゾガマイシンおよび N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度の 50 倍の濃度（それぞれ 0.32 μmol/L および 0.3 μmol/L）においても CYP1A2，CYP2B6 または CYP3A4 の mRNA もしくは酵素活性を誘導しなかった。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は UGT1A4，UGT1A6，UGT1A9 および UGT2B7 の活性に対して可逆的な阻害作用をほとんど示さず，IC_{50} 値はいずれも 10 μmol/L 超であったが，UGT1A1 に対しては阻害作用を示し，2% BSA の非存在下および存在下での IC_{50} 値はそれぞれ 0.61 μmol/L および 1.4 μmol/L であった。この結果とヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを臨床用量で投与したときの定常状態での N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の C_{max} 値に基づき臨床で薬物相互作用が生じる可能性について検討したところ，臨床用量で想定される濃度で N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH が UGT 分子種を阻害する可能性は低いことが示された。

N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の主な薬物トランスポーター分子種に対する阻害能について in vitro で検討し，得られた阻害パラメータとヒトにイノツズマブ　オゾガマイシンを臨床用量で投与したときの定常状態での N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH の C_{max} に基づき臨床で薬物相互作用が生じる可能性について検討した。その結果，N-Ac-γ-カリケアマイシン DMH は臨床用量で想定される濃度で排出トランスポーターである P-gp および BCRP，肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 および OATP1B3 ならびに腎取り込みトランスポーターである OAT1，OAT3 および OCT2 を阻害する可能性は低いことが示された。

10. 図表

薬物動態試験の結果を補足する表は本文中および 2.6.5 薬物動態試験概要表に示す。

TABLE OF CONTENTS

2.6.5.1. Pharmacokinetics Overview ... 3
2.6.5.2A. Overall Summary of Analytical Method Validation Reports, Nonclinical ... 7
2.6.5.2B. Analytical Methods and Validation Reports ... 9
2.6.5.2C. Analytical Methods and Validation Reports -ADA ... 12
2.6.5.2D. Overall Summary of Non-Clinical Pharmacokinetic and Toxicokinetic Studies and Associated Analytical Methods ... 13
2.6.5.3A. Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose in Mice ... 16
2.6.5.3B. Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose in Rats ... 17
2.6.5.4. Pharmacokinetics: Absorption after Repeat Doses ... 22
2.6.5.5. Pharmacokinetics: Organ Distribution ... 23
2.6.5.6. Pharmacokinetics: Protein Binding ... 25
2.6.5.7. Pharmacokinetics: Study in Pregnant or Nursing Animals ... 26
2.6.5.8. Pharmacokinetics: Other Distribution Studies ... 27
2.6.5.9A. Pharmacokinetics: Metabolism In Vivo ... 28
2.6.5.9B. Pharmacokinetics: Metabolism In Vivo ... 30
2.6.5.9C. Pharmacokinetics: Metabolism In Vivo ... 31
2.6.5.10A. Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro/Ex Vivo ... 32
2.6.5.10B. Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro ... 33
2.6.5.11A. Pharmacokinetics: Proposed Metabolic Pathways, Rat and Human Plasma/Serum ... 35
2.6.5.11B. Pharmacokinetics: Proposed Metabolic Pathway, Rat and Human Excreta ... 36
2.6.5.11C. Pharmacokinetics: Proposed Metabolic Pathway, Rat, Monkey, Human Liver S9 ... 37
2.6.5.12A. Pharmacokinetics: Inhibition of CYP Enzymes ... 38
2.6.5.12B. Pharmacokinetics: Inhibition of CYP Enzymes ... 39
2.6.5.12C. Pharmacokinetics: Time-Dependent Inhibition of CYP Enzymes ... 40
2.6.5.12D. Pharmacokinetics: Inhibition of UGT Enzymes ... 41
2.6.5.12E. Pharmacokinetics: Induction of CYP Enzymes ... 42
2.6.5.12F. Pharmacokinetics: Induction of CYP Enzymes ... 43
2.6.5.13. Pharmacokinetics: Excretion ... 44
2.6.5.14. Pharmacokinetics: Excretion into Bile ... 46
2.6.5.15A. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Transporter Substrate ... 47
2.6.5.15B. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Transporter Inhibition ... 48
2.6.5.15C. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Transporter Inhibition ... 49
2.6.5.15D. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Transporter Inhibition ... 50
2.6.5.15E. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Reversible CYP Inhibition ... 51
2.6.5.15F. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Reversible CYP Inhibition ... 52
2.6.5.15G. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Reversible CYP Inhibition ... 53
2.6.5.15H. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Reversible CYP Inhibition ... 54

2.6.5.15I. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Time-Dependent CYP Inhibition 55
2.6.5.15J. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, UGT Inhibition..... 56
2.6.5.15K. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, UGT Inhibition..... 57

2.6.5.1. Pharmacokinetics Overview

Test Article: PF-05208773

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number
Analytical Method Validation[a]				
Absorption and Pharmacokinetics				
Single-Dose Pharmacokinetics and Toxicokinetics				
Single-Dose Pharmacokinetics of Inotuzumab ozogamicin	Female Mice, (Nude)	IP	Wyeth[b]	RPT-47740
Pharmacokinetics of [^{3}H]Inotuzumab ozogamicin	Male and Female Rats, (Sprague-Dawley)	IV	[redacted][c]/Pfizer[d,e]	PF-05208773_[redacted]_172921
Single-Dose Toxicokinetics of Inotuzumab ozogamicin	Male and Female Rats, (CD VAF)	IV	Wyeth[b]	RPT-46233
	Male and Female Monkeys, (cynomologus)	IV	Wyeth[b,f]	RPT-46644
Repeat-Dose Toxicokinetics				
4-Week Repeat-Dose Toxicokinetics of Inotuzumab ozogamicin	Male and Female Rats, (CD VAF)	IV	Wyeth[b, f]	RPT-46910
	Male and Female Monkeys, (cynomolgus)	IV	Wyeth[b,f]	RPT-46909
26-Week Repeat-Dose Toxicokinetics of Inotuzumab ozogamicin	Male and Female Rats, (Sprague-Dawley)	IV	Wyeth[b,g]	RPT-65042
	Male and Female Monkeys, (cynomolgus)	IV	[redacted][c]/Wyeth[b]	6617-260 (RPT-65773)
Fertility Toxicokinetics of Inotuzumab ozogamicin	Female Rats, (Sprague-Dawley)	IV	Wyeth[b,g]	RPT-69733
Embryo Development Toxicokinetics of Inotuzumab ozogamicin	Female Rats, (Sprague-Dawley)	IV	Wyeth[b,g]	RPT-68342
	Female Rabbits, (New Zealand White)	IV	Wyeth[b,g]	RPT-72134

2.6.5.1. Pharmacokinetics Overview (Continued) **Test Article: PF-05208773**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number
Distribution				
Tissue Distribution of [^{3}H]Inotuzumab ozogamicin	Male Rats, (Sprague-Dawley)	IV	Wyeth[b]	RPT-62496
Hepatic uptake of PF-06649266	Sandwich-cultured human hepatocytes	In Vitro	Pfizer[h]	PF-06649266_[redacted]_113941
Plasma Protein Binding of PF-06649266	Mouse, Rat, Rabbit, Monkey, and Human plasma	In Vitro	[redacted]	PF-06649266_[redacted]_160926 [YDP067 044]
P-gp Substrate Potential (PF-06649266)	MDCKII-MDR1 cells	In Vitro	Pfizer[h]	PF-06649266_[redacted]_131956
BCRP Substrate Potential	MDCK-BCRP cells	In Vitro	Pfizer[h]	PF-06649266_[redacted]_120849
Metabolism				
In Vivo Metabolism				
Metabolism of [^{3}H]Inotuzumab ozogamicin	Male and Female Rats, (Sprague-Dawley)	IV	[redacted]	PF-05208773_[redacted]_130045 [YDP/003 249]
Metabolic Profiling of [^{3}H]Inotuzumab ozogamicin	Male Rats, (Sprague-Dawley)	IV	Pfizer [redacted] (In-life)	PF-05208773_[redacted]_014414 8332989 (PF-05208773_[redacted]_094934)
Metabolic profiling of Inotuzumab ozogamicin from Study B1931007	Human Patients with Non-Hodgkin's Lymphoma	IV	Pfizer[e]	PF-05208773_[redacted]_124138
Ex Vivo Metabolism				
Metabolic plasma stability of [^{3}H]Inotuzumab ozogamicin	Rat, Monkey, and Human plasma, 1% BSA	Ex Vivo	Pfizer[e,h]	PF-05208773_[redacted]_110807

2.6.5.1. Pharmacokinetics Overview (Continued) **Test Article: PF-05208773**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number
In Vitro Metabolism				
Metabolism of [^{3}H]PF-06649266	Rat, Monkey, and Human liver S9 fractions; Rat and Human plasma	In Vitro	[redacted][i]	PF-06649266_[redacted]_130246 [YDP/003 257]
Reaction of PF-06649266 with GSH	Reduced GSH buffer	In Vitro	American Cyanamid Company/Wyeth[b]	MIRACL-26755
	Physiological concentrations of reduced GSH buffer	In Vitro	Wyeth[b]	RPT-50556
Characterization of Metabolite (M5) of PF-06691414	Human liver cytosol	In Vitro	Wyeth[b]	RPT-39439
Excretion				
Excretion and Mass Balance of [^{3}H]Inotuzumab ozogamicin	Male and Female Rats, (Sprague-Dawley)	IV	[redacted][c]	PF-05208773_[redacted]_111700
Pharmacokinetic Drug Interactions				
Enzyme-Mediated Interactions In Vitro				
CYP Enzyme Inhibition (Inotuzumab ozogamicin)	Human liver microsomes	In Vitro	Wyeth[j]	RPT-79110
CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A2 Induction (Inotuzumab ozogamicin)	Cryopreserved human hepatocytes	In Vitro	Wyeth[j]	RPT-78474
CYP Enzyme Inhibition (PF-06649266)	Human liver microsomes	In Vitro	[redacted][k]	PF-06649266_[redacted]_134026 (XT[redacted]5091)
CYP3A4 Time-Dependent Inhibition (PF-06649266)	Human liver microsomes	In Vitro	Pfizer[h]	PF-06649266_[redacted]_100129
CYP2C8 Metabolism-Dependent Inhibition (PF-06649266)	Human liver microsomes	In Vitro	[redacted][k]	PF-06649266_[redacted]_084941 (XT[redacted]5115)
CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A2 Induction (PF-06649266)	Cryopreserved human hepatocytes	In Vitro	[redacted][k]	PF-06649266_[redacted]_121216 (XT[redacted]3106)
UGT Inhibition (PF-06649266)	Human liver microsomes	In Vitro	Pfizer[h]	PF-06649266_[redacted]_142000

2.6.5.1. Pharmacokinetics Overview (Continued) **Test Article: PF-05208773**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number
Transporter-Mediated Interactions In Vitro				
P-gp and BCRP Inhibition (PF-06649266)	MDCKII-MDR1 MDCKII-LE-BCRP	In Vitro	Pfizer[h]	PF-06649266_[redacted]_131956
OATP1B1 and OATP1B3 Inhibition (PF-06649266)	Transfected HEK293	In Vitro	Pfizer[h]	PF-06649266_[redacted]_160005
OAT1, OAT3, and OCT2 Inhibition (PF-06649266)	Transfected HEK293	In Vitro	Pfizer[h]	PF-06649266_[redacted]_144223

Notes: The rat strain was reported as CD VAF in some single-dose and the 4-week repeat-dose toxicokinetic studies. CD VAF rats are Sprague-Dawley rats that are cesarean-derived virus antibody free (CD VAF); therefore, for consistency, rats are referred to as Sprague-Dawley.
PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH, CL-184,538.
PF-06691484 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut, CL-191,305.
PF-06691414 = N-Ac-ε-calicheamicin DMH, CL-190,396.
Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; BCRP = Breast cancer resistance protein; BSA = Bovine serum albumin; CYP = Cytochrome P450; DMH = Dimethylhydrazide; ε = Epsilon; γ = Gamma; GSH = Glutathione; HEK293 = Human embryonic kidney cells; IV = Intravenous; IP = Intraperitoneal; LE = Low efflux; MDCK = Madin-Darby canine kidney cells; MDR1 = Multi-drug resistance gene that encodes human P-gp; N-Ac = N-acetyl; OAT = Organic anion transporter; OATP = O ganic anion transporting po ypeptide; OCT = Organic cation transporter; P-gp = P-glycoprotein; UGT = Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase; [redacted].

a. Analytical Method Validation Reports are presented in Tabulated Summary 2.6.5.2A and all reports are listed in Module 4.2.2.1.
b. Pearl R ver, NY.
c. [redacted]
d. Bioanalytical support conducted in Andover, MA.
e. La Jolla, CA.
f. In life conducted in Chazy, NY.
g. In life conducted in Catania Italy.
h. Gro on CT
i. [redacted] UK.
j. Col egeville, PA.
k. [redacted]

2.6.5.2A. Overall Summary of Analytical Method Validation Reports, Nonclinical **Test Article: PF-05208773**

Species	Report Number	Report Issue Date	Type of Analytical Method	Matrix/ Anticoagulant	Range (ng/mL)[a]	Comments
			Inotuzumab ozogamicin[b] (PF-05208773)			
Rat	RPT-45155	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	3.91 to 125	Method Validation
Rat	RPT-49930	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-45155
Rabbit	RPT-72216	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	4.68 to 80.0	Method Validation
Rabbit	RPT-79836	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-72216
Monkey	RPT-45156	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	466 to 7800	Method Validation
Monkey	RPT-49928	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-45156
Monkey	RPT-67030	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	20.4 to 550	Method Revalidation to improve assay sensitivity
Monkey	RPT-78684	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-67030
			G544 antibody[c]			
Rat	RPT-45153	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	1.56 to 100	Method Validation
Rat	RPT-49932	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-45153
Monkey	RPT-45154	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	1.56 to 100	Method Validation
Monkey	RPT-49931	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-45154
Monkey	RPT-67002	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	8.76 to 100	Partial Revalidation to change LLOQ and modify standard and QC concentrations.

Notes: Analytical Method Validation reports are located in Module 4.2.2.1. All analytical methods were conducted at Wyeth (Pearl River, NY).
Abbreviations: CD22 = Cluster of differentiation-22; ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay; LLOQ = Lower limit of quantitation; NA = Not applicable; QC = Quality control.
a. Range in 100% serum.
b. Inotuzumab ozogamicin = PF-05208773, CMC-544, or WAY-207294.
c. G544 antibody = Anti-CD22 antibody, total antibody.

2.6.5.2A. Overall Summary of Analytical Method Validation Reports, Nonclinical (Continued) **Test Article: PF-05208773**

Species	Report Number	Report Issue Date	Type of Analytical Method	Matrix/ Anticoagulant	Range (ng/mL)[a]	Comments
			Anti-Inotuzumab ozogamicin[b] Antibodies (ADA)			
Rat	RPT-47310	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Method Validation
Rabbit	RPT-72215	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Method Validation
Monkey	RPT-47590	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Method Validation
			Unconjugated calicheamicin			
Rat	RPT-47430	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	10.5 to 80	Method Validation
Rat	RPT-50216	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-47430
Monkey	RPT-47429	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	70.4 to 800	Method Validation
Monkey	RPT-50217	[redacted]20[redacted]	ELISA	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-47429
			Total calicheamicin[c]			
Rat	RPT-65882	[redacted]20[redacted]	LC-MS/MS	Serum	2.00 to 1000	Method Validation
Rat	RPT-69886	[redacted]20[redacted]	LC-MS/MS	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-65882
Rabbit	RPT-73451	[redacted]20[redacted]	LC-MS/MS	Serum	2.00 to 1000	Method Validation
Rabbit	RPT-75554	[redacted]20[redacted]	LC-MS/MS	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-73451
Monkey	RPT-65081	[redacted]20[redacted]	LC-MS/MS	Serum	2.00 to 1000	Method Validation
Monkey	RPT-69937	[redacted]20[redacted]	LC-MS/MS	Serum	NA	Long Term Stability for RPT-65081

Notes: Analytical Method Validation reports are located in Module 4.2.2.1. All analytical methods were conducted at Wyeth (Pearl River, NY).
Abbreviations: ADA = Anti-drug antibodies; ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; NA = Not applicable.
a. Range in 100% serum.
b. Inotuzumab ozogamicin = PF-05208773, CMC-544, or WAY-207294.
c. Total calicheamicin = Unconjugated calicheamicin + conjugated calicheamicin.

2.6.5.2B. Analytical Methods and Validation Reports **Test Article: PF-05208773**

Report Number	RPT-45155[a]	RPT-72216[b]	RPT-45156[c]	RPT-67030[d]
Species:	Rat	Rabbit	Monkey	Monkey
Analyte[e]:	Inotuzumab ozogamicin	Inotuzumab ozogamicin	Inotuzumab ozogamicin	Inotuzumab ozogamicin
Sample:	Serum	Serum	Serum	Serum
Method:	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
Range of Quantitation[f] (LLOQ-ULOQ) [ng/mL]:	3.91 to 125	4.68 to 80.0	466 to 7800	20.4 to 550
QC Nominal Concentration[f] (ng/mL):	8.00, 40.0, and 100	12.0, 30.0, and 60.0	950, 2500, and 6500	50, 200, and 400
Precision Range (%CV)[g]:	2.99 to 5.73	4.1 to 6.7	9.0 to 12.0	3.7 to 7.0
Accuracy Range (%Bias)[g]:	-5.40 to -0.625	-9.3 to 9.5	-9.1 to -2.0	-14.6 to 2.8

Abbreviations: CV = Coefficient of variation; ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay; LLOQ = Lower limit of quantitation; QC = Quality control; ULOQ = Upper limit of quantitation.

a. Long term stability presented in RPT-49930 (9 Months [278 Days] at -70°C).

b. Long term stability presented in RPT-79836 (13 Months [12, 30, and 60 ng/mL] and 8 Months [1000 ng/mL] at -70°C).

c. Long term stability presented in RPT-49928 (13 Months [398 Days] at -70°C).

d. Revalidation of method described in RPT-45156 to improve assay sensitivity. Long term stability presented in RPT-78684 (13 Months [408 Days] at -70°C).

e. Inotuzumab ozogamicin = PF-05208773, CMC-544, or WAY-207294.

f. 100% serum.

g. Inter-day and/or inter-plate.

2.6.5.2B. Analytical Methods and Validation Reports (Continued) **Test Article: PF-05208773**

Report Number	RPT-45153[a]	RPT-45154[b]	RPT-67002[c]
Species:	Rat	Monkey	Monkey
Analyte[d]:	G544 antibody	G544 antibody	G544 antibody
Sample:	Serum	Serum	Serum
Method:	ELISA	ELISA	ELISA
Range of Quantitation[e] (LLOQ-ULOQ) [ng/mL]:	1.56 to 100	1.56 to 100	8.76 to 100
QC Nominal Concentration[e] (ng/mL):	4.00, 20.0, and 80.0	4.00, 20.0, and 80.0	18.0, 36.0, and 72.0
Precision Range (%CV)[f]:	3.89 to 4.48	4.00 to 6.24	2.2 to 5.1
Accuracy Range (%Bias)[f]:	-10.3 to 6.25	-12.9 to -2.50	0.6 to 3.1

Abbreviations: CD22 = Cluster of differentiation-22; CV = Coefficient of variation; ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay; LLOQ = Lower limit of quantitation; QC = Quality control; ULOQ = Upper limit of quantitation.

a. Long term stability presented in RPT-49932 (6 Months [187 Days] at -70°C).

b. Long term stability presented in RPT-49931 (12 Months [366 Days] at -70°C).

c. Partial revalidation of method described in RPT-45154 due to a change in the LLOQ and modification of standard and QC concentrations.

d. G544 antibody = Anti-CD22 antibody, total antibody.

e. 100% serum.

f. Inter-day and/or inter-plate.

2.6.5.2B. Analytical Methods and Validation Reports (Continued) **Test Article: PF-05208773**

Report Number	RPT-47430[a]	RPT-47429[b]	RPT-65882[c]	RPT-73451[d]	RPT-65081[e]
Species:	Rat	Monkey	Rat	Rabbit	Monkey
Analyte[f]:	Unconjugated calicheamicin	Unconjugated calicheamicin	Total calicheamicin	Total calicheamicin	Total calicheamicin
Sample:	Serum	Serum	Serum	Serum	Serum
Method:	ELISA	ELISA	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Range of Quantitation[g] (LLOQ-ULOQ) [ng/mL]:	10.5 to 80	70.4 to 800	2.00 to 1000	2.00 to 1000	2.00 to 1000
QC Nominal Concentration[g] (ng/mL):	12, 30, and 60	160, 300, and 600	6.00, 125, and 750	6.00, 125, and 750	6.00, 125, and 750
Precision Range (%CV)[h]:	8.4 to 16.4	7.1 to 8.8	6.8 to 10.6	11.7 to 14.3	2.9 to 8.0
Accuracy Range (%Bias)[h]:	-3.8 to 1.6	-20.1 to -14.5	-8.5 to 9.9	-1.2 to 7.1	-6.5 to 2.6

Abbreviations: CV = Coefficient of variation; ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLOQ = Lower limit of quantitation; QC = Quality control; ULOQ = Upper limit of quantitation.

a. Long term stability presented in RPT-50216 (6 Months [179 Days] at -70°C).
b. Long term stability presented in RPT-50217 (13 Months [397 Days] at -70°C).
c. Long term stability presented in RPT-69886 (10 Months [301 Days] at -70°C).
d. Long term stability presented in RPT-75554 (5 Months [165 Days] at -70°C).
e. Long term stability presented in RPT-69937 (12 Months [364 Days] at -70°C).
f. Total calicheamicin = Unconjugated calicheamicin + conjugated calicheamicin.
g. 100% serum.
h. Inter-day and/or inter-plate.

2.6.5.2C. Analytical Methods and Validation Reports -ADA **Test Article: PF-05208773**

Report Number	RPT-47310	RPT-72215	RPT-47590
Species:	Rat	Rabbit	Monkey
Analyte:	Anti-Inotuzumab ozogamicin Antibodies (ADA)	Anti-Inotuzumab ozogamicin Antibodies (ADA)	Anti-Inotuzumab ozogamicin Antibodies (ADA)
Sample:	Serum	Serum	Serum
Method:	ELISA	ELISA	ELISA
Positive Control 1[a]	Rabbit polyclonal antibody to G544 antibody spiked into pooled rat serum (25000 ng/mL)	Rabbit polyclonal antibody to G544 antibody spiked into pooled rabbit serum (25000 ng/mL)	Rabbit polyclonal antibody to G544 antibody spiked into pooled monkey serum (100000 ng/mL)
Positive Control 2	Rabbit anti-calicheamicin antibody spiked into pooled rat serum (25000 ng/mL)	Rabbit anti-calicheamicin antibody spiked into pooled rabbit serum (200000 ng/mL)	Rabbit anti-calicheamicin antibody spiked into pooled monkey serum (500000 ng/mL)
Negative Control	Pooled rat serum	Pooled rabbit serum	Pooled monkey serum
Inter-Assay Precision of Positive Control 1: Mean Log Titer ± SD	3.20 ± 0.04	3.19 ± 0.039	2.86 ± 0.12
Inter-Assay Precision of Positive Control 2: Mean Log Titer ± SD	-	Positive screen >1.88	-
Inter-Assay Precision of Positive Control 1: Mean Maximum OD ± SD	2.43 ± 0.232	2.27 ± 0.154	2.10 ± 0.345
Inter-Assay Precision of Positive Control 2: Mean Maximum OD ± SD	0.295 ± 0.041	0.454 ± 0.028	0.148 ± 0.037
Inter-Assay Precision of Negative Control: Mean Cutpoint ± SD (% CV)	0.130 ± 0.005 (4.0)	0.144 ± 0.004 (3.1[b])	0.105 ± 0.005 (4.9)
Inter-Assay Precision of Negative Control: Mean OD ± SD (% CV)	0.065 ± 0.003 (4.0)	0.072 ± 0.002 (3.0[b])	0.052 ± 0.003 (4.9)

Abbreviations: ADA = Anti-drug antibody; CD22 = Cluster of differentiation-22; CV = Coefficient of variance; ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay; OD = Optical density; SD = Standard deviation; - = Data not available.
a. G544 antibody = Anti-CD22 antibody.
b. Difference in %CV due to rounding difference of the cutpoint value.

2.6.5.2D. Overall Summary of Non-Clinical Pharmacokinetic and Toxicokinetic Studies and Associated Analytical Methods

Test Article: PF-05208773

Study Description Report Number	Analyte	Type of Analytical Method	Matrix/ Anticoagulant	Method Report Number	Quantitation Range (ng/mL)[a]	Regulatory Status
Mouse						
Single-Dose IP PK RPT-47586	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-47586	1.96 to 250	Non-validated method
	G544 antibody	ELISA	Serum	RPT-47586	0.78 to 200	Non-validated method
Single-Dose IP PK RPT-47740	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-47740	3.91 to 250	Non-validated method
	G544 antibody	ELISA	Serum	RPT-47740	1.56 to 100	Non-validated method
Rat						
Single-Dose IV PK PF-05208773_[redacted]_172921	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Plasma/ K_2EDTA	PF-05208773_[redacted]_172921	9.3 to 97.7	Non-validated method
Single-Dose IV TK RPT-46233	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-46233	3.91 to 250	Non-validated method
	G544 antibody	ELISA	Serum	RPT-46233	1.56 to 100	Non-validated method
	Unconjugated calicheamicin	ELISA	Serum	RPT-46233	1.56 to 100	Non-validated method
4-Week (1 dose/week) Repeat-Dose IV TK with 4-Week recovery RPT-46910	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-45155	3.91 to 125	Validated method
	G544 antibody	ELISA	Serum	RPT-45153	1.56 to 100	Validated method
	Unconjugated calicheamicin	ELISA	Serum	RPT-47430	10.5 to 80	Validated method
	Anti-Inotuzumab ozogamicin antibodies	ELISA	Serum	RPT-47310	NA	Validated method
26-Week (1 dose/week) Repeat-Dose IV TK RPT-65042	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-45155	3.91 to 125	Validated method
	G544 antibody	ELISA	Serum	RPT-45153	1.56 to 100	Validated method
	Unconjugated calicheamicin	ELISA	Serum	RPT-47430	10.5 to 80	Validated method
	Total calicheamicin	LC-MS/MS	Serum	RPT-65882	2.00 to 1000	Validated method
	Anti-Inotuzumab ozogamicin antibodies	ELISA	Serum	RPT-47310	NA	Validated method

2.6.5.2D. Overall Summary of Non-Clinical Pharmacokinetic and Toxicokinetic Studies and Associated Analytical Methods (Continued)

Test Article: PF-05208773

Study Description Report Number	Analyte	Type of Analytical Method	Matrix/ Anticoagulant	Method Report Number	Quantitation Range (ng/mL)[a]	Regulatory Status
Fertility IV TK RPT-69733	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-45155	3.91 to 125	Validated method
	Total calicheamicin	LC-MS/MS	Serum	RPT-65882	2.00 to 1000	Validated method
	Anti-Inotuzumab ozogamicin antibodies	ELISA	Serum	RPT-47310	NA	Validated method
Embryo-fetal development TK RPT-68342	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-45155	3.91 to 125	Validated method
	Unconjugated calicheamicin	ELISA	Serum	RPT-47430	10.5 to 80	Validated method
Rabbit						
Embryo-fetal development TK RPT-72134	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-72216	4.68 to 80.0	Validated method
	Total calicheamicin	LC-MS/MS	Serum	RPT-73451	2.00 to 1000	Validated method
	Anti-Inotuzumab ozogamicin antibodies	ELISA	Serum	RPT-72215	NA	Validated method
Monkey						
Single-Dose IV TK RPT-46644	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-45156	466 to 7800	Validated method
	G544 antibody	ELISA	Serum	RPT-45154	1.56 to 100	Validated method
	Unconjugated calicheamicin	ELISA	Serum	RPT-47429	70.4 to 800	Validated method
4-Week (1 dose/week) Repeat-Dose IV TK with 4-Week recovery RPT-46909	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-45156	466 to 7800	Validated method
	G544 antibody	ELISA	Serum	RPT-45154	1.56 to 100	Validated method
	Unconjugated calicheamicin	ELISA	Serum	RPT-47429	70.4 to 800	Validated method
	Anti-Inotuzumab ozogamicin antibodies	ELISA	Serum	RPT-47590	NA	Validated method

2.6.5.2D. Overall Summary of Non-Clinical Pharmacokinetic and Toxicokinetic Studies and Associated Analytical Methods (Continued)

Test Article: PF-05208773

Study Description Report Number	Analyte	Type of Analytical Method	Matrix/ Anticoagulant	Method Report Number	Quantitation Range (ng/mL)[a]	Regulatory Status
26-Week (1 dose/week) Repeat-Dose IV TK 6617-260 (RPT-65773)	Inotuzumab ozogamicin	ELISA	Serum	RPT-67030	20.4 to 550	Validated method
	G544 antibody	ELISA	Serum	RPT-67002	8.76 to 100	Validated method
	Unconjugated calicheamicin	ELISA	Serum	RPT-47429	70.4 to 800	Validated method
	Total calicheamicin	LC-MS/MS	Serum	RPT-65081	2.00 to 1000	Validated method
	Anti-Inotuzumab ozogamicin antibodies	ELISA	Serum	RPT-47590	NA	Validated method

Notes: Inotuzumab ozogamicin = PF-05208773, CMC-544, or WAY-207294.
G544 antibody = Anti-CD22 antibody.
Total calicheamicin = Unconjugated calicheamicin + conjugated calicheamicin.
Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; CD22 = Cluster of differentiation-22; ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay; IV = Intravenous; IP = Intraperitoneal; K_2EDTA = Dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLOQ = Lower limit of quantitation; NA = Not applicable; PK = Pharmacokinetics; TK = Toxicokinetics; - = Data not available.
a. 100% serum or plasma; Inotuzumab ozogamicin and G544 reported as $ng_{protein}$/mL; Unconjugated and total calicheamicin reported as $ng_{calicheamicin}$/mL.

2.6.5.3A. Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose in Mice **Test Article: PF-05208773**

Report Number:		RPT-47740			
Species (Strain):		Mice (Nude)			
Sex/Number of Animals:		Female/4[a]			
Treatment Condition:		Non-Tumor Bearing		Tumor Bearing	
Vehicle/Formulation:		-		-	
Method of Administration:		Intraperitoneal		Intraperitoneal	
Protein (G544 antibody)	(mg/m^2)[b]	9.6		9.6	
Dose Equivalent	(mg/kg)	3.2[c]		3.2[c]	
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent	(μg/kg)	160		160	
Sample Matrix:		Serum		Serum	
Analyte[d]:		Inotuzumab ozogamicin	G544 antibody	Inotuzumab ozogamicin	G544 antibody
Assay:		ELISA		ELISA	
Mean Pharmacokinetic Parameters[e]:					
C_{max} (ng/mL) ± SE[f]		51200 ± 2900	40000 ± 2300	47800 ± 3600	40800 ± 3800
T_{max} (h)		8.0	8.0	4.0	4.0
AUC_{inf} (ng•h/mL)		2900000	4040000	1860000	2850000
AUC_{336} (ng•h/mL) ± SE		2900000 ± 194000	4040000 ± 237000	1860000 ± 209000	2850000 ± 225000
$t_{½}$ (h)		34.2	54.6	35.0	64.1

Notes: PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
G544 antibody = Anti-CD22 antibody.
Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; AUC_{inf} = Area under concentration-time curve from time 0 to infinity; AUC_{336} = Area under concentration-time curve from time 0 to 336 hours postdose; CD22 = Cluster of differentiation-22; C_{max} = Peak plasma concentration; ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay; eq = Equivalent; SE = Standard error; $t_{½}$ = Apparent terminal elimination half-life; T_{max} = Time to reach C_{max}; - = Data not available.
a. 4 animals/time point
b. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 3 for mice (k_m = 3).
c. Loading of calicheamicin onto the CD22 antibody was 50 μg of calicheamicin per mg of antibody.
d. Inotuzumab ozogamicin and G544 concentrations are expressed as $ng_{protein}$ equivalents/mL measured using the respective inotuzumab ozogamicin or G544 reference standard.
e. Determined from mean concentration-time profiles.
f. SE not reported for RPT-47586.

2.6.5.3B. Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose in Rats **Test Article: PF-05208773**

Report Number:		PF-05208773_[redacted]_111700 (8296878)				
Species (Strain):		Rat (Sprague-Dawley)				
Sex/Number of Animals:		Male and Female/3[a]				
Feeding Condition:		Fed ad libitum				
Vehicle/Formulation:		5% sucrose, 0.01% Tween 80, 10 mM sodium chloride, and 20 mM Tris adjusted to pH 8.0				
Method of Administration:		Intravenous				
Protein (G544 antibody)	(mg/m^2)[b]	0.912				
Dose Equivalent	(mg/kg)	0.152 (47.3 μCi/kg)				
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent	(μg/kg)	17.6 (47.3 μCi/kg)				
Specific activity	$mCi/mg_{protein}$	0.312				
	$mCi/mg_{calicheamicin}$	2.68				
Sample Matrix:		Plasma				
Analyte[c]:		Total Radioactivity		Unconjugated Calicheamicin-Associated Radioactivity		Antibody-Associated Radioactivity
Mean Pharmacokinetic Parameters[d]:		M	F	M	F	M	F
C_{max} (ng/g)		448	449	7.91	8.08	401	413
T_{max} (h)		0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
AUC_{inf} (ng•h/g)		22200	23200	405	361	20600	21800
AUC_{336} (ng•h/g)		20800	21400	393	335	19100	19900
$t_{½}$ (h)		92.5	105	73.3	96.8	98.5	107

Notes: Concentrations expressed as $ng_{calicheamicin}$ eq/g; 1 male rat and 1 female rat were excluded from pharmacokinetic calculations.
Inotuzumab ozogamicin = PF-05208773, CMC-544, or WAY-207294.
G544 antibody = Anti-CD22 antibody.
Abbreviations: AUC_{inf} = Area under concentration-time curve from time 0 to infinity; AUC_{336} = Area under concentration-time curve from time 0 to 336 hours postdose; CD22 = Cluster of differentiation-22; C_{max} = Maximum observed plasma concentration; DMH = Dimethylhydrazide; eq = Equivalent; F = Female; M = Male; N-Ac = N-acetyl; $t_{½}$ = Apparent terminal elimination half-life; T_{max} =Time of first C_{max} occurance.
a. 3 animals/sex/time point.
b. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 6 for rat (k_m = 6).
c. Total radioactivity (inotuzumab ozogamicin) was measured before protein precipitation; unconjugated calicheamicin-associated radioactivity was measured in the supernatant after protein precipitation; and antibody-associate radioactivity (G544 antibody) was measure in the pellet after protein precipitation.
d. Determined from mean concentration-time profiles.

2.6.5.3B. Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose in Rats (Continued) **Test Article: [^{3}H]PF-05208773**

Report Number:		PF-05208773_[redacted]_172921				
Species (Strain):		Rat (Sprague-Dawley)				
Sex/Number of Animals:		Male and Female/3[a]				
Feeding Condition:		Fed ad libitum				
Vehicle/Formulation:		5% sucrose, 0.01% Tween 80, 10 mM sodium chloride, and 20 mM Tris adjusted to pH 8.0				
Method of Administration:		Intravenous				
Protein (G544 antibody)	(mg/m^2)[b]	0.912				
Dose Equivalent	(mg/kg)	0.152 (47.3 μCi/kg)				
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent	(μg/kg)	17.6 (47.3 μCi/kg)				
Specific activity	$mCi/mg_{protein}$	0.312				
	$mCi/mg_{calicheamicin}$	2.68				
Sample Matrix:		Plasma				
Analyte:		Inotuzumab ozogamicin ($ng_{protein}$/mL)[c]			Inotuzumab ozogamicin ($ng_{calicheamicin}$/mL)[d]	
Assay:		ELISA			ELISA	
Mean Pharmacokinetic Parameters[e]:		M	F	Overall	M	F	Overall
C_{max} (ng/mL)		3320	3570	3450	387	416	402
T_{max} (h)		0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
AUC_{inf} (ng•h/mL)		102000	97900	99800	11900	11400	11600
AUC_{336} (ng•h/mL)		101000	97100	98900	11800	11300	11500
CL (mL/min/kg)		0.0248	0.0259	0.0254	0.0248	0.0259	0.0254
V_{ss} (L/kg)		0.0799	0.0842	0.0821	0.0799	0.0842	0.0821
$t_{½}$ (h)		56.1	54.7	55.2	56.1	54.7	55.2

Notes: Inotuzumab ozogamicin = PF-05208773, CMC-544, or WAY-207294.
G544 antibody = Anti-CD22 antibody.

Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; AUC_{inf} = Area under concentration-time curve from time 0 to infinity; AUC_{336} = Area under concentration-time curve from time 0 to 336 hours postdose; CD22 = Cluster of differentiation-22; CL = Systemic plasma clearance; C_{max} = Maximum observed plasma concentration; DMH = Dimethylhydrazide; ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay; eq = Equivalent; F = Female; M = Male; N-Ac = N-acetyl; Overall = Male and female combined; $t_{½}$ = Apparent terminal elimination half-life; T_{max} =Time of first C_{max} occurance; V_{ss} = Apparent volume of distribution at steady state.

a. 3 animals/sex/time point.
b. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 6 for rat (k_m = 6).
c. Inotuzumab ozogamicin concentrations are expressed as $ng_{protein}$ equivalent/mL measured using an inotuzumab ozogamicin reference standard.
d. $ng_{protein}$/mL converted to $ng_{calicheamicin}$/mL by multiplying by the loading of calicheamicin onto the CD22 antibody (0.1166 $ng_{calicheamicin}/ng_{protein}$).
e. Determined from mean concentration-time profiles.

2.6.5.3B. Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose in Rats (Continued) **Test Article: [^{3}H]PF-05208773**

Report Number:		PF-05208773_[redacted]_014414; 8332989 (PF-05208773_[redacted]_094934)	
Species (Strain):		Rat (Sprague-Dawley)	
Sex/Number of Animals:		Male/2[a]	
Feeding Condition:		Fed ad libitum	
Vehicle/Formulation:		5% sucrose, 0.01% Tween 80, 10 mM sodium chloride, and 20 mM Tris adjusted to pH 8.0	
Method of Administration:		Intravenous	
Protein (G544 antibody)	(mg/m^2)[b]	0.798	
Dose Equivalent	(mg/kg)	0.133[c] (38.1 µCi/kg)	
N-Ac-γ-calicheamicin DMH	(µg/kg)	15.6 (38.1 µCi/kg)	
AcBut Dose Equivalent			
Specific activity	$mCi/mg_{protein}$	0.286	
	$mCi/mg_{calicheamicin}$	2.45	
Sample Matrix:		Plasma	
Analyte:		Total Radioactivity[d]	[^{3}H]Inotuzumab ozogamicin[e]
Assay:		LSC	SE-HPLC with offline radiochemical detection
Composite Plasma Pharmacokinetic Parameters:			
C_{max} (ng eq/mL)		385	279
T_{max} (h)		0.083	0.083
AUC_{inf} (ng eq•h/mL)		20100	13300
AUC_{336} (ng eq•h/mL)		18400	11800
CL (mL/min/kg)		--	0.0195
V_{ss} (L/kg)		--	0.154
$t_{½}$ (h)		103	122

Notes: Inotuzumab ozogamicin = PF-05208773, CMC-544, or WAY-207294.
G544 antibody = Anti-CD22 antibody.

Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; AUC_{inf} = Area under concentration-time curve from time 0 to infinity; AUC_{336} = Area under concentration-time curve from time 0 to 336 hours postdose; CD22 = Cluster of differentiation-22; CL = Systemic plasma clearance; C_{max} = Maximum observed plasma concentration; DMH = Dimethylhydrazide; F = Female; HPLC = High performance liquid chromatography; M = Male; N-Ac = N-acetyl; SE = Size exclusion; $t_{½}$ = Apparent terminal elimination half-life; T_{max} = Time of first C_{max} occurance; V_{ss} = Apparent volume of distribution at steady state; -- = Not applicable.

a. 2 animals/time point; non-serial sampling.
b. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 6 for rat (k_m = 6).
c. Loading of [^{3}H]calicheamicin onto the CD22 antibody was 116.6 µg of [^{3}H]calicheamicin per mg of antibody.
d. Concentrations reported as ng $_{calicheamicin}$ equivalents/g.
e. Concentrations reported as ng $_{calicheamicin}$ equivalents/mL.

2.6.5.3B. Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose in Rats (Continued) **Test Article: PF-05208773**

Report Number:				RPT-46233			
Species (Strain):				Rat (CD VAF)			
Sex/Number of Animals:				Male and Female/3[a]			
Feeding Condition:				Fed ad libitum			
Vehicle/Formulation:				1.0% Rat Serum Albumin in Phosphate Buffered Saline			
Method of Administration:				Intravenous			
Protein (G544 antibody)	(mg/m^2)[b]			2.92			
Dose Equivalent	(mg/kg)			0.487			
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent	(μg/kg)			35			
Sample Matrix:				Serum			
Analyte[c]:		Inotuzumab ozogamicin		G544		Unconjugated Calicheamicin	
Assay:		ELISA		ELISA		ELISA	
Mean ± SD Pharmacokinetic Parameters:		M	F	M	F	M	F
$C_{5\ min}$ (ng/mL)		7980 ± 383	8790 ± 619	10000 ± 1460	10600 ± 570	3.10[d]	3.76[d]
AUC_{inf} (ng•h/mL)		209000 ± 8650	232000 ± 19100	420000 ± 50600	429000 ± 56000	10.6[d,e]	9.23[d,e]
CL (mL/min/kg)		0.0388 ± 0.0017	0.0352 ± 0.0030	0.0195 ± 0.0025	0.0192 ± 0.0027	ND	ND
V_{ss} (L/kg)		0.185 ± 0.018	0.128 ± 0.031	0.142 ± 0.093	0.130 ± 0.016	ND	ND
$t_{½}$ (h)		54.9 ± 5.8	41.7 ± 6.2	84.8 ± 12.7	78.5 ± 5.2	ND	ND

Notes: Inotuzumab ozogamicin = PF-05208773, CMC-544, or WAY-207294.
G544 anitbody = Anti-CD22 antibody.

Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; AUC_{inf} = Area under concentration-time curve from time 0 to infinity; AUC_{last} = Area under concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; CD22 = Cluster of differentiation-22; CL = Systemic serum clearance; $C_{5\ min}$ = Serum concentration at 5 minutes postdose; DMH = Dimethylhydrazide; ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay; eq = Equivalent; F = Female; M = Male; N-Ac = N-acetyl; ND = Not determined due to insufficient data in the terminal phase; SD = Standard deviation; $t_{½}$ = Apparent terminal elimination half-life; V_{ss} = Apparent volume of distribution at steady state.

a. 3 animals/sex

b. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 6 for rat (k_m = 6).

c. Inotuzumab ozogamicin and G544 antibody concentrations are expressed as $ng_{protein}$ equivalents/mL measured using the respective inotuzumab ozogamicin or G544 antibody reference standard. Unconjugated calicheamicin concentrations are reported as $ng_{calicheamicin}$ equivalents/mL measured using an N-Ac-γ-calicheamicin DMH reference standard.

d. Determined from mean concentration-time profiles; SD not reported.

e. AUC_{last}

2.6.5.3B. Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose in Rats (Continued) **Test Article: PF-05208773**

Report Number:				RPT-46233			
Species (Strain):				Rat (CD VAF)			
Sex/Number of Animals:				Male and Female/3[a]			
Feeding Condition:				Fed ad libitum			
Vehicle/Formulation:				1.0% Rat Serum Albumin in Phosphate Buffered Saline			
Method of Administration:				Intravenous			
Protein (G544 antibody)	(mg/m^2)[b]			7.68			
Dose Equivalent	(mg/kg)			1.28			
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent	(μg/kg)			100			
Sample Matrix:				Serum			
Analyte[c]:		Inotuzumab ozogamicin		G544		Unconjugated Calicheamicin	
Assay:		ELISA		ELISA		ELISA	
Mean ± SD Pharmacokinetic Parameters:		M	F	M	F	M	F
$C_{5\ min}$ (ng/mL)		37500 ± 5770	40300 ± 2100	22500 ± 681	22000 ± 3050	15.5[d]	16.2[d]
AUC_{inf} (ng•h/mL)		903000 ± 53300	655000 ± 24200	1190000 ± 64600	643000 ± 138000	257[d,e]	144[d,e]
CL (mL/min/kg)		0.0237 ± 0.0013	0.0325 ± 0.0012	0.0178 ± 0.0010	0.0340 ± 0.0068	ND	ND
V_{ss} (L/kg)		0.099 ± 0.010	0.110 ± 0.013	0.139 ± 0.004	0.166 ± 0.036	ND	ND
$t_{½}$ (h)		48.5 ± 3.8	39.1 ± 3.2	90.3 ± 7.6	56.2 ± 1.5	ND	ND

Notes: Inotuzumab ozogamicin = PF-05208773, CMC-544, or WAY-207294.
G544 = Anti-CD22 antibody.
Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; AUC_{inf} = Area under concentration-time curve from time 0 to infinity; AUC_{last} = Area under concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; CD22 = Cluster of differentiation-22; CL = Systemic serum clearance; $C_{5\ min}$ = Serum concentration at 5 minutes postdose; DMH = Dimethylhydrazide; ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay; F = Female; M = Male; N-Ac = N-acetyl; ND = Not determined due to insufficient data in the terminal phase; SD = Standard deviation; $t_{½}$ = Apparent terminal elimination half-life; V_{ss} = Apparent volume of distribution at steady state.
a. 3 animals/sex
b. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 6 for rat (k_m = 6).
c. Inotuzumab ozogamicin and G544 antibody concentrations are expressed as $ng_{protein}$ equivalents/mL uing the respective inotuzumab ozogamicin or G544 antibody reference standard. Unconjugated calicheamicin concentrations are reported as $ng_{calicheamicin}$ equivalents/mL using a N-Ac-γ-calicheamicin DMH reference standard.
d. Determined from mean concentration-time profiles.
e. AUC_{last}

2.6.5.4. Pharmacokinetics: Absorption after Repeat Doses

Test Article: PF-05208773

Repeat-dose pharmacokinetic studies were not conducted with inotuzumab ozogamicin. Toxicokinetic results from repeat-dose toxicity studies are presented in 2.6.7 Toxicology Tabulated Summary.

2.6.5.5. Pharmacokinetics: Organ Distribution

Test Article: [^{3}H]PF-05208773
Report Number: RPT-62496

Species (Strain):		Rat (Sprague-Dawley)
Sex/Number of Animals:		Male/3[a]
Feeding Condition:		Fed ad libitum
Vehicle/Formulation:		0.02M Tris buffer, pH 8.0
Method of Administration:		Intravenous (single dose)
Protein (G544 antibody) Dose Equivalent	(mg/m^2)[b]	1.88
	(mg/kg)	0.313[c]
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent	(µg/kg)	15
Radionuclide:		[^{3}H]
Specific Activity:		6.98 Ci/mmol (4.19 mCi/mg) before conjugation to antibody
Sampling Time (h):		0.083, 1, 8, 24, 72, 168, and 336

Tissues/Organs	C_{max} (ng eq/g)	T_{max} (h)	$t_{½}$ (h)	AUC_{336} (ng eq•h/g)	AUC_{inf} (ng eq•h/g)	T:P (AUC_{inf})	C_{336} (ng eq/g)
Plasma	307[d]	0.083	73.0	14000	14500	1.0	5.12
Blood	145	0.083	73.4	7220	7470	0.5	2.29
Adrenal gland	31.6	0.083	115	2240	2560	0.2	1.95
Bone	10.3	1	124	792	909	0.1	0.654
Bone marrow	34.5	0.083	149	1790	2180	0.2	1.81
Brain	3.11	1	104	210	235	<0.1	0.168
Eye	4.51	24	108	771	878	0.1	0.683
Fat	3.39	24	88.2	478	516	<0.1	0.294
Harderian gland	9.96	24	110	1280	1450	0.1	1.07
Heart	25.3	1	101	2120	2310	0.2	1.33
Kidney	30.1	0.083	265	2680	4410	0.3	4.53
Large intestine	8.18	24	107	1080	1210	0.1	0.833
Liver	68.4	0.083	179	5910	8230	0.6	9.00
Lung	117	0.083	104	4360	4760	0.3	2.72
Lymph node	12.7	24	134	1940	2310	0.2	1.92
Pancreas	7.93	8	101	1040	1150	0.1	0.722
Pituitary gland	20.9	0.083	216	2670	4220	0.3	4.99
Prostate gland	8.21	24	120	1240	1450	0.1	1.20
Salivary gland	9.06	24	97.5	1430	1590	0.1	1.09
Skeletal muscle	3.25	24	87.7	501	539	<0.1	0.297
Skin	7.83	24	116	1270	1480	0.1	1.27
Small Intestine	11.2	1	102	927	1030	0.1	0.690

2.6.5.5. Pharmacokinetics: Organ Distribution (Continued)

Test Article: [^{3}H]PF-05208773
Report Number: RPT-62496

Tissues/Organs	C_{max} (ng eq/g)	T_{max} (h)	$t_{½}$ (h)	AUC_{336} (ng eq•h/g)	AUC_{inf} (ng eq•h/g)	T:P (AUC_{inf})	C_{336} (ng eq/g)
Spleen	33.0	1	209	4000	6070	0.4	6.87
Stomach	7.71	8	111	764	861	0.1	0.600
Testis	14.8	8	150	1470	1800	0.1	1.52
Thymus	8.40	1	193	1150	1630	0.1	1.75
Thyroid	22.3	0.083	94.5	1870	2030	0.1	1.21
Urinary bladder	17.0	24	99.8	2380	2630	0.2	1.75

Notes: [^{3}H]Inotuzumab ozogamicin concentrations are expressed as total [^{3}H]calicheamicin equivalents.
PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
G544 antibody = Anti-CD22 antibody.
Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; AUC_{inf} = Area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; AUC_{336} = Area under the concentration-time curve from time 0 to 336 hours postdose; CD22 = Cluster of differentiation-22; C_{max} = Peak concentration; C_{336} = Concentration at 336 hours postdose; DMH = Dimethylhydrazide; N-Ac = N-acetyl; $t_{½}$ = Apparent terminal elimination half-life; T:P = Tissue/plasma; T_{max} = Time to reach C_{max}.
a. 3 animals per time point; total number of animal = 21.
b. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 6 for rat (k_m = 6).
c. Loading of [^{3}H]calicheamicin onto the CD22 antibody was 48 µg of [^{3}H]calicheamicin per mg of antibody.
d. Concentration at 5 minute time point (C_{5min}).

2.6.5.6. Pharmacokinetics: Protein Binding

Test Article: PF-06649266
Report Number: PF-06649266_[redacted]_160926 YDP067/044]

Study System:	In Vitro
Test system:	Mouse, rat, rabbit, monkey, and human plasma
Method:	Rapid equilibrium dialysis (RED) assay
Analytical Method	LC-MS/MS
Concentration:	1.8 µM (2660 ng/mL)
Duration of Incubation (hours)	4

Species (Strain)	Fraction Unbound	
	Geometric Mean[a]	95% Confidence Interval
Mouse (CD-1)	0.000942[b]	0.000400-0.00222
Rat (Wistar Han)	0.0145[b]	0.00859-0.0245
Rat (Sprague-Dawley)	0.00679	0.00288-0.0160
Rabbit (New Zealand White)	0.0263	0.0106-0.0649
Monkey (Cynomolgus)	0.0310	0.0152-0.0633
Human	0.0279	0.0116-0.0672

Notes: Calculated molecular weight = 1478.4 g/mole.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: DMH = Dimethylhydrazide; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; N-Ac = N-acetyl.
a. Data are mean of 12 replicates, except where noted.
b. Data are mean of 10 replicates.

2.6.5.7. Pharmacokinetics: Study in Pregnant or Nursing Animals — Test Article: PF-05208773

The potential for inotuzumab ozogamicin or its metabolites to cross the placenta or transfer into the milk of pregnant animals has not been evaluated. Toxicokinetic results from embryo-fetal developmental studies are presented in 2.6.7 Toxicology Tabulated Summary

2.6.5.8. Pharmacokinetics: Other Distribution Studies — Test Articles: PF-05208773; PF-06649266

In vitro red blood cell partitioning studies were not conducted with inotuzumab ozogamicin or PF-06649266. An in vivo estimation of the blood to plasma ratio of [^{3}H]inotuzumab ozogamicin (as [^{3}H]PF-06649266) in rats is presented in 2.6.4.4.3 Pharmacokinetics Written Summary.

2.6.5.9A. Pharmacokinetics: Metabolism In Vivo

Test Article: [^{3}H PF-05208773
Report Number: PF-05208773_[redacted]_130045
[YDP/003/249]

Species (Strain):		Rat (Sprague-Dawley)
Sex/Number of Animals:		Male and Female/2-4[a]
Feeding Condition:		Fed ad libitum
Vehicle/Formulation:		20 mM Tris, 10 mM sodium chloride, 5% (w/v) sucrose, 0.01% (w/v) Tween 80, pH 8.0
Method of Administration:		Intravenous
Protein (G544 antibody) Dose Equivalent:	(mg/m^2)[b]	0.912
	(mg/kg)	0.152 (47.3 µg/kg)
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent:	(µg/kg)	17.6 (47.3 µg/kg)
Radionuclide:		[^{3}H]PF-05208773
Specific Activity:	$mCi/mg_{protein}$	0.312
	$mCi/mg_{calicheamicin}$	2.68

Metabolite Label	Description	m/z	Metabolite Abundance Derived from [^{3}H]PF-05208773 (Mean % of Dose/Total Radioactivity)							
			Plasma (% of Total Radioactivity)[c]		Urine (% of Dose)		Feces (% of Dose)		Bile (% of Dose)	
			Male (0-336 h)	Female (0-336 h)	Male (0-384 h)[d]	Female (0-384 h)	Male (0-336 h)	Female (0-312 h)	Male (0-168 h)	Female (0-168 h)
M1	Tetrasaccharide +O	1021	0.2	0.1	0.8	0.6	5.5	4.2	1.9	2.1
M2	Tetrasaccharide	1005	<0.1	<0.1	-	-	-	-	0.4	0.3
M3	Tetrasaccharide	1005	<0.1	<0.1	-	-	-	-	0.7	0.6
M4	M12 +GSH	1637	-	-	-	-	-	-	0.5	1.5
M5	Tetrasaccharide -2H	1003	-	-	0.2	0.2	2.8	3.3	2.0	2.0
M6	M16 +O	1350	-	-	0.2	-	-	-	0.7	0.6
M7	Tetrasaccharide -2H	1003	-	-	0.3	0.5	-	-	0.6	0.7
M8	M16 +O	1350	-	-	-	-	-	-	0.8	0.8
M9	M16 +2H	1336	-	-	-	-	-	-	0.9	0.8
M10	N-desethyl M16	1306	-	-	-	-	-	-	1.1	0.8
M11	Tetrasaccharide	1005	0.2	0.3	-	-	-	-	-	-
M12	M16 -2H	1332	-	-	0.6	-	-	-	2.3	2.7
M13	Allylic alcohol of M17	1316	0.4	0.3	0.6	-	-	-	2.5	2.3
M14	M17 pyruvic acid hydrazone	1548	<0.1	-	1.2	1.0	-	-	2.2	2.3

2.6.5.9A. Pharmacokinetics: Metabolism In Vivo (Continued)

Test Article: [^{3}H PF-05208773
Report Number: PF-05208773_[redacted]_130045
[YDP/003/249]

Metabolite Label	Description	m/z	Metabolite Abundance Derived from [^{3}H]PF-05208773 (Mean % of Dose/Total Radioactivity)							
			Plasma (% of Total Radioactivity)[c]		Urine (% of Dose)		Feces (% of Dose)		Bile (% of Dose)	
			Male (0-336 h)	Female (0-336 h)	Male (0-384 h)[d]	Female (0-384 h)	Male (0-336 h)	Female (0-312 h)	Male (0-168 h)	Female (0-168 h)
M15	Allylic aldehyde/ hemiacetal of M17	1314	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-
M16[e]	N-Ac-ε-calicheamicin	1334	0.1	0.1	0.6	0.5	-	-	7.5	8.0
M17[f]	N-Ac-γ-calicheamicin DMH	1478	0.3	<0.1	0.3	0.1	-	-	3.1	7.0
M18	M17 acid/ loss of hydrazine	1464	<0.1	<0.1	-	-	-	-	4.1	1.7

Notes: PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
G544 antibody = Anti-CD22 antibody.
Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; CD22 = Cluster of differentiation-22; DMH = Dimethylhydrazide; h = Hour; m/z = Mass-to-charge ratio; M = Metabolite; N-Ac = N-acetyl; - = Not detected/not applicable.
a. 3 animals/sex/time point for plasma; 4 animals/sex for urine and feces; 2 males and 4 females for bile.
b. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 6 for rat (k_m = 6).
c. Most circulating radioactivity (~98%) was associated with conjugated [^{3}H]N-Ac-γ-calicheamicin.
d. Urine from 1 animal was pooled from 0-408 h.
e. Data for M16 was the sum of two isomers (M16a and M16b); M16 = PF-06691414 or CL-190,396.
f. M17 = PF-06649266 or CL-184,538.

2.6.5.9B. Pharmacokinetics: Metabolism In Vivo

Test Article: [^{3}H PF-05208773
Report Number: PF-05208773_[redacted]_014414

Species (Strain):		Rat (Sprague-Dawley)
Sex/Number of Animals:		Male/2[a]
Feeding Condition:		Fed ad libitum
Vehicle/Formulation:		20 mM Tris, 10 mM sodium chloride, 5% (w/v) sucrose, 0.01% (w/v) Tween 80, pH 8.0
Method of Administration:		Intravenous
Protein (G544 antibody) Dose Equivalent:	(mg/m^2)[b]	0.798
	(mg/kg)	0.133 (38.1 µCi/kg)
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent:	(µg/kg)	15.6 (38.1 µCi/kg)
Radionuclide:		[^{3}H]
Specific Activity:	mCi/mg $_{protein}$	0.286
	mCi/mg $_{calicheamicin}$	2.45

Metabolite Label	Metabolite Abundance Derived from [^{3}H]PF-05208773 (Mean % Total Radioactivity) in Rat Plasma					
	0.083 h	8 h	24 h	72 h	168 h	336 h
Unknown 1	5.4	6.0	8.0	7.9	4.3	3.5
Unknown 2	14.6	16.6	23.5	29.9	23.7	13.8
PF-05208773	72.6	70.4	62.5	56.3	66.2	74.8

Notes: PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
G544 antibody = Anti-CD22 antibody.
Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; CD22 = Cluster of differentiation-22; DMH = Dimethylhydrazide; h = Hour; N-Ac = N-acetyl.
a. 2 animals/time point.
b. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 6 for rat (k_m = 6).

2.6.5.9C. Pharmacokinetics: Metabolism In Vivo

Test Article: PF-05208773
Report Number: PF-05208773_[redacted]_124138

Species:	Human
Study Number:	Phase 2 Study B1931007
Patient Indication:	Non-Hodgkin's lymphoma
Number of Patients:	7
Method of Administration:	Intravenous
Protein Dose Equivalent:	3 cycles of 1.8 mg/m^2 inotuzumab ozogamicin once every 4 weeks
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent:	3 cycles of 250 µg once every 4 weeks
Assay:	High sensitivity LC-MS/MS

Metabolite Label	Composition/Proposed Identification	RT (min)	$[M+H]^+$ (m/z)	Product Ion[a] (m/z)	Serum	Urine
M17; PF-06649266	N-Ac-γ-calicheamicin DMH	14.6[b], 15.2[c]	1478	200	+	+
M16[d]; PF-06691414	N-Ac-ε-calicheamicin (and isomer)	15.5 (14.5)	1334	200	ND	+
M9	M16 + 2H (ketone-reduced)	12.2	1336	200	ND	+
M8	M16 + O	11.4	1350	200	ND	+
M7	Tetrasaccharide -2H	10.2	1003	200	ND	+

Notes: PF-06649266 = CL-184,538; PF-06691414 = CL-190,396; PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; DMH = Dimethylhydrazide; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; m/z = Mass-to-charge ratio; M = Metabolite; min = Minute; N-Ac = N-acetyl; ND = Not detected; RT = Retention time; + = Metabolite was detected the sample from at least 1 patient.
a. Product ion at m/z = 200 represents loss of aminosugar moiety of calicheamicin.
b. RT in serum samples.
c. RT in urine samples.
d. M16 includes both isomers (M16a and M16b).

2.6.5.10A. Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro/Ex Vivo

Test Article: [^{3}H]PF-05208773
Report Number: PF-05208773_[redacted]_110807

Type of Study:	Metabolite Abundance Derived from [^{3}H]PF-05208773 Ex Vivo			
Study System:	In Vitro: PBS Buffer	In Vitro: 1% BSA	Ex Vivo: Rat Plasma	Ex Vivo: Human Plasma
[^{3}H]PF-05208773 Concentration (ng/mL):	4000	4000	4000	4000
Duration of Incubation (h):	72	72	72	72
Method of Analysis:	SE-HPLC using UV detection and offline radiochemical detection			

Metabolite	RT (min)	Metabolite Abundance Derived from [^{3}H]PF-05208773 (% Radioactivity)							
		PBS		1% BSA		Rat Plasma		Human Plasma	
		0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h
Protein Adduct	7.7	-	-	-	-	-	35	-	33
PF-05208773 (Parent)	8.6	93	95	85	89	93	46	86	49

Notes: PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
Abbreviations: BSA = Bovine serum albumin; h = Hour; HPLC = High performance liquid chromatography; min = Minute; PBS = Phosphate buffered saline; RT = Retention time; SE = Size-exclusion; UV = Ultraviolet; - = Not detected/not applicable.

2.6.5.10B. Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro

Test Article: [^{3}H]PF-06649266
Report Number: PF-06649266_[redacted]_130246
[YDP/003/257]

Type of Study: Identification of [^{3}H]PF-06649266 Metabolites In Vitro
Study System: 1) Liver S9 with cofactors; 2) Liver S9 with cofactors w/o GSH; 3) Liver S9 w/ and w/o GSH; 4) Plasma
[^{3}H]PF-06649266 Concentration: 10 µM (14790 ng/mL)
Method of Analysis: HPLC-MS with offline radiochemical detection

Metabolite Label	m/z	Metabolite Abundance (% of Total Radioactivity)														
		Liver S9 with Cofactors				Liver S9 with Cofactors w/o GSH				Human Liver S9			Plasma			
		Rat	Monkey	Human	Buffer	Rat	Monkey	Human	Buffer	+GSH	-GSH	Buffer +GSH	Rat (6 h)	Rat (24 h)	Human (6 h)	Buffer (6 h)
M1	1021	10.8	10.1	11.4	7.7	1.6	1.7	2.5	1.4	13.1	1.7	10.2	1.6	4.7	2.3	2.5
M2	1005	0.6	0.9	0.8	0.6	0.1	0.3	0.4	0.2	0.9	0.3	0.9	--	0.4	--	--
M3	1005	0.6	0.9	0.9	0.8	0.3	0.6	0.5	0.6	1.8	0.3	1.4	--	0.7	--	--
M4	1637	2.0	1.3	1.0	3.7	1.0	--	--	--	0.8	--	1.5	--	--	--	--
M5	1003	0.9	0.9	0.9	0.5	--	0.5	0.6	--	2.2	--	0.5	--	--	--	--
M6	1350	0.6	0.6	0.7	0.6	0.8	0.7	0.6	--	1.1	--	--	--	--	1.4	--
M7	1003	3.2	3.2	3.3	4.6	1.9	3.7	4.7	0.7	5.0	1.7	5.3	--	--	--	1.4
M8	1350	2.0	1.9	2.4	2.2	--	--	0.5	--	2.7	--	--	--	--	--	--
M9	1336	4.9	2.4	2.4	1.1	0.7	0.7	0.9	--	--	--	--	--	--	--	--
M10	1306	--	--	--	--	--	--	--	--	0.6	--	0.4	--	--	--	--
M11	1005	--	--	--	--	--	--	--	0.9	--	2.1	0.4	1.7	9.7	3.4	--
M12	1332	1.1	0.8	1.1	1.4	--	0.8	--	--	0.9	--	1.5	--	--	--	--
M13	1316	7.8	7.4	6.8	6.4	4.2	2.4	3.2	1.8	1.9	8.4	2.2	8.4	10.3	10.7	6.9
M14	1548	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	10.0	8.1	7.0	--
M15	1314	1.5	0.6	1.7	3.5	3.2	4.0	4.0	4.0	--	3.7	--	2.3	--	2.1	8.1
M16[a]	1334	18.8	18.7	20.3	20.5	7.5	12.2	19.4	2.1	23.4	3.4	17.6	2.4	2.5	2.4	--
M17[b]	1478	8.8	10.7	7.1	9.7	38.8	30.7	28.0	42.4	2.4	41.4	6.7	22.6	11.2	27.1	35.5
M18	1464	1.3	1.4	1.5	1.1	2.6	4.1	2.4	3.6	0.4	2.5	1.0	4.9	5.5	2.1	--
M19	1623	--	2.5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
M20	1639	4.9	5.3	5.4	4.6	--	--	--	--	6.3	--	5.5	--	--	--	--
M21	1641	1.2	1.7	1.8	1.0	--	--	--	--	0.9	--	0.8	--	--	--	--
M22	1350	0.8	1.2	1.6	1.4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
M23	1898	--	--	--	--	4.8	6.1	2.4	--	--	--	--	--	--	--	--
M24	1421	--	--	--	--	1.1	0.5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
M25	1490	--	--	--	--	5.0	3.3	1.0	--	--	--	--	--	--	--	--

2.6.5.10B. Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro (Continued)

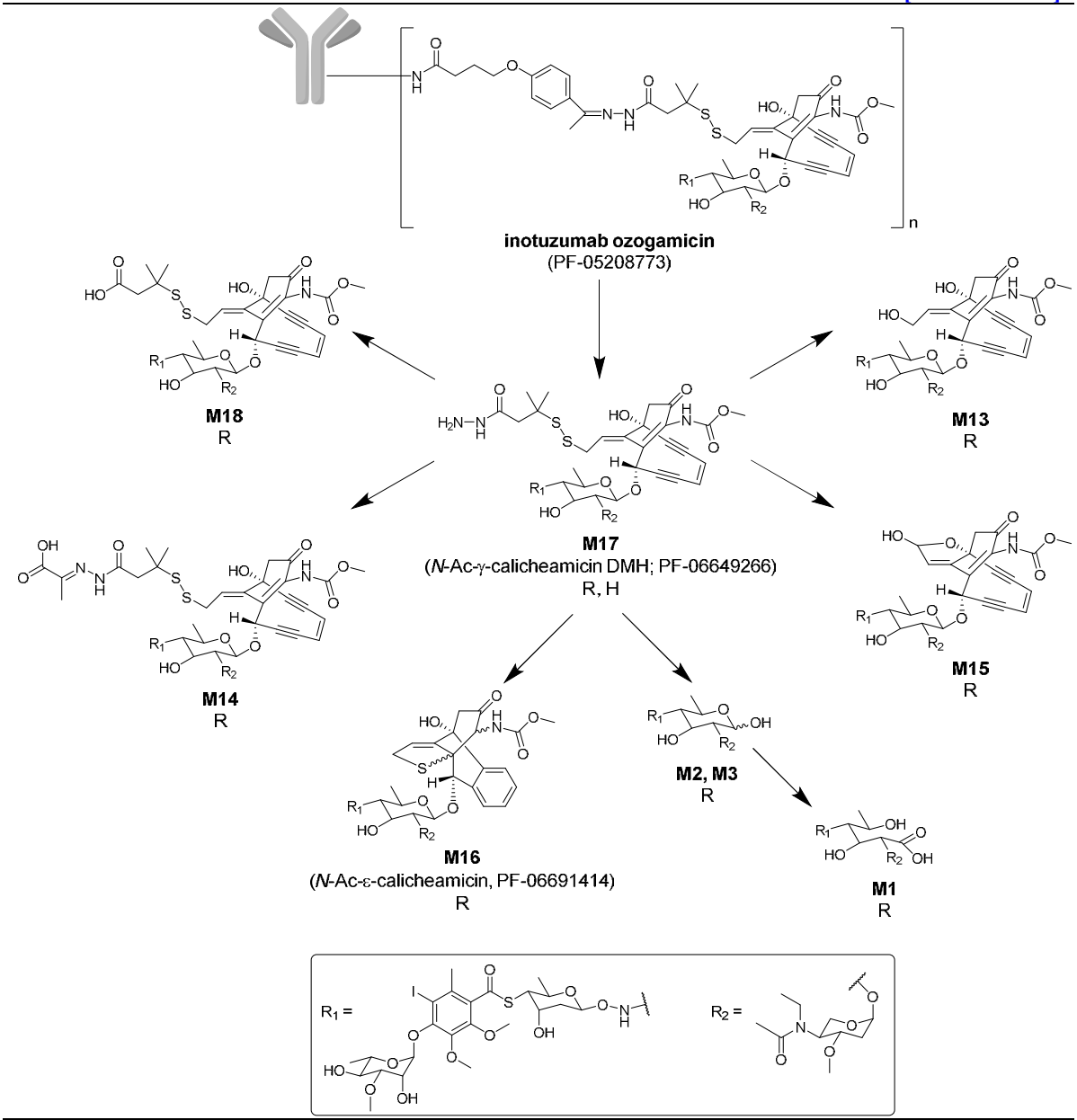
Test Article: [^{3}H]PF-06649266
Report Number: PF-06649266_[redacted]_130246
[YDP/003/257]

Metabolite Label	m/z	Metabolite Abundance (% of Total Radioactivity)														
		Liver S9 with Cofactors				Liver S9 with Cofactors w/o GSH				Human Liver S9			Plasma			
		Rat	Monkey	Human	Buffer	Rat	Monkey	Human	Buffer	+GSH	-GSH	Buffer +GSH	Rat (6 h)	Rat (24 h)	Human (6 h)	Buffer (6 h)
M26	1797	--	--	--	--	1.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
M27	1688	--	--	--	--	1.1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
M28	1490	--	--	--	--	2.3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Notes: Liver S9 was incubated for 90 minutes; Cofactors include: NADPH, UDPGA, PAPS, SAM, acetyl coenzyme A, alamethicin, and GSH; PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH; PF-06691414 = N-Ac-ε-calicheamicin.
Abbreviations: DMH = Dimethylhydrazide; GSH = Glutathione; h = Hour; HPLC-MS = High performance liquid chromatography- mass spectrometry; m/z = Mass to charge ratio; M = Metabolite; N-Ac = N-acetyl; NADPH = Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PAPS = 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate; SAM = S-Adenosyl methionine; UDPGA = Uridine 5'-diphospho-glucuronic acid; w/ = With; w/o = Without; -- = Not detected/not applicable.
a. % total radioactivity for M16 is the sum of two isomers (M16a and M16b); M16 = PF-06691414 or CL-190,396.
b. M17 = PF-06649266 or CL-184,538.

2.6.5.11A. Pharmacokinetics: Proposed Metabolic Pathways, Rat and Human Plasma/Serum

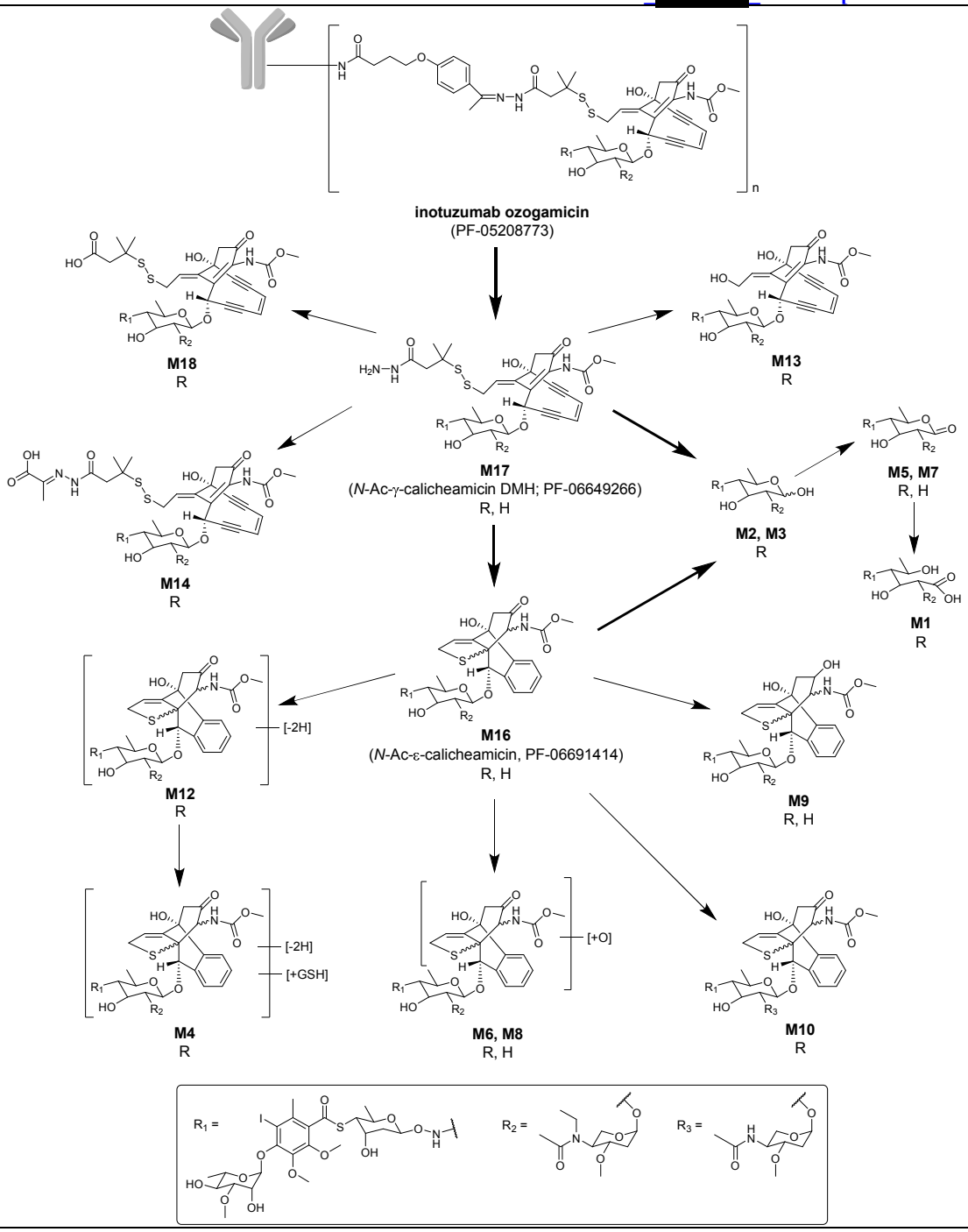
Test Article: PF-05208773
Report Numbers:
PF-05208773_[redacted]_124138
PF-05208773_[redacted]_130045
[YDP/003/249]



Note: Human serum from patients with Non-Hodgkin's lymphoma (Study B1931007).
Abbreviations: DMH = Dimethylhydrazide; H = Human; M = Metabolite; N-Ac = N-acetyl; R = Rat.

2.6.5.11B. Pharmacokinetics: Proposed Metabolic Pathway, Rat and Human Excreta

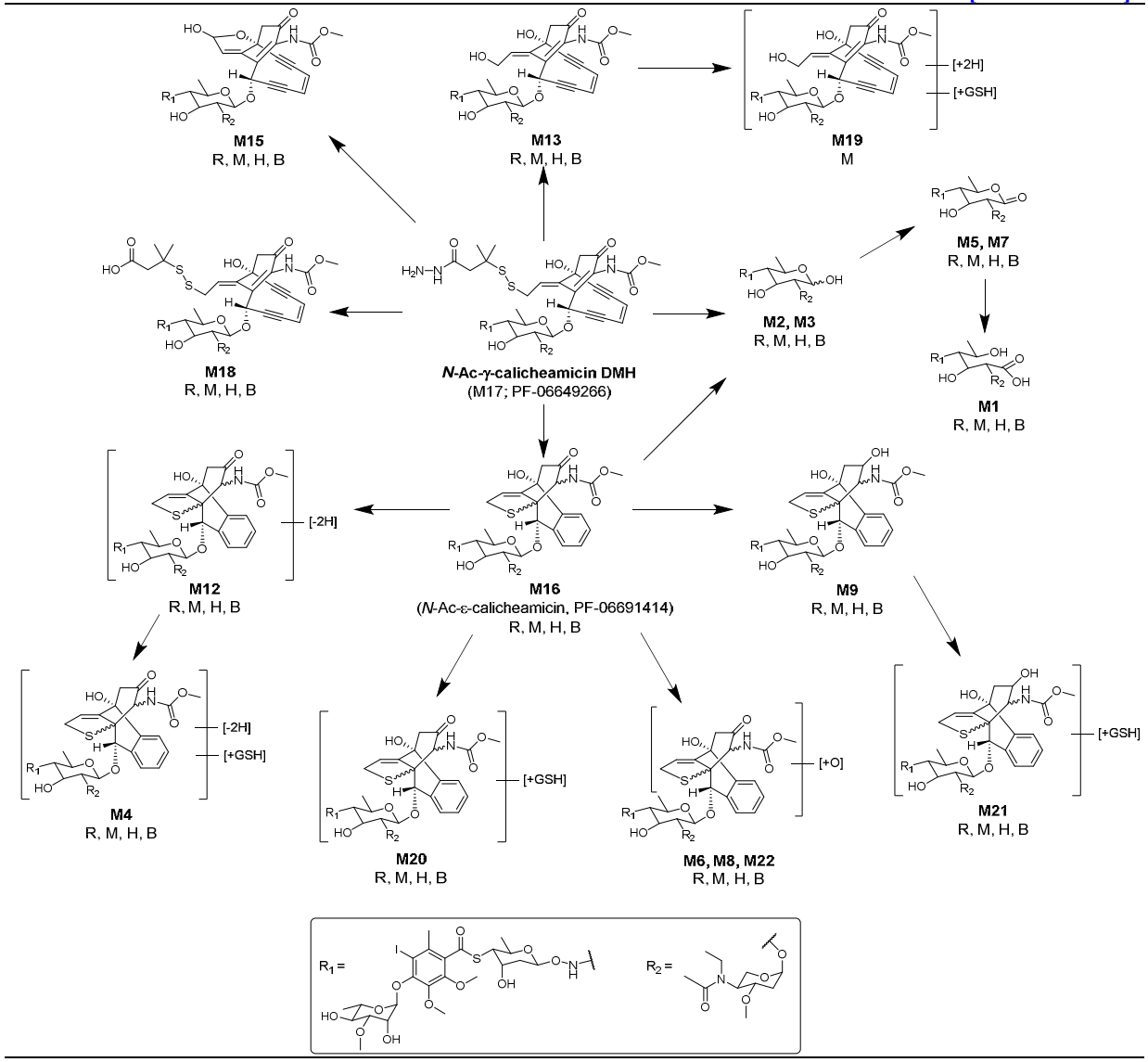
Test Article: PF-05208773
Report Numbers:
PF 05208773_[redacted]_124138
PF-05208773_[redacted]_130045 [YDP/003/249]



Note: Human urine from patients with Non-Hodgkin's lymphoma (Study B1931007).
Abbreviations: DMH = Dimethylhydrazide; H = Human; M = Metabolite; N-Ac = N-acetyl; R = Rat.

2.6.5.11C. Pharmacokinetics: Proposed Metabolic Pathway, Rat, Monkey, Human Liver S9

Test Article: PF-06649266
Report Numbers:
PF-06649266_[redacted]_130246
[YDP/003/257]



Note: PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: B = Buffer control; DMH = Dimethylhydrazide; H = Human; M = Monkey; M1-M22 = Metabolite 1-22; N-Ac = N-acetyl; R = Rat.

2.6.5.12A. Pharmacokinetics: Inhibition of CYP Enzymes

Test Article: PF-05208773
Report Number: RPT-79110

Type of Study: Evaluation of the inhibition of CYP enzymes by Inotuzumab ozogamicin
Method: In vitro incubation with human liver microsomes and individual substrates of CYP enzymes in the presence of NADPH
Analytical Method: LC-MS/MS
Concentration of Inotuzumab ozogamicin: 0.01 – 10 µM

CYP	Enzyme Reaction	Zero-Minute Preincubation	30-Minute Preincubation without NADPH	30-Minute Preincubation with NADPH	Potential for TDI[a] (NADPH-Independent)	Potential for MDI[a] (Time-& NADPH-Dependent)
		IC_{50} (µM)	Inhibition at 10 µM (%)[b]	Inhibition at 10 µM (%)[b]		
1A2	Resorufin	NC	NA	NA	NA	NA
2A6	Coumarin 7-hydroxylation	NC	NA	NA	NA	NA
2B6	Bupropion hydroxylation	NC	NA	NA	NA	NA
2C8	Amodiaquine *N*-dealkylation	NC	NA	NA	NA	NA
2C9	Diclofenac 4′-hydroxylation	NC	-	3	No	No
2C19	*S*-Mephenytoin 4′-hydroxylation	NC	-	-	No	No
2D6	Bufuralol 1′-hydroxylation	NC	1	13	No	No
3A4/5	Testosterone 6β-hydroxylation	NC	-	13	No	No
3A4/5	Midazolam 1′-hydroxylation	NC				

Notes: An assessment of risk for in vivo DDI between inotuzumab ozogamicin and coadministered substrates of CYP enzymes, based on the 2012 FDA and EMA guidances, are provided in Tabulated Summaries 2.6.5.15E and 2.6.5.15F, respectively.
PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
Abbreviations: CYP = Cytochrome P450; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; MDI = Metabolism-dependent inhibition; NADPH = Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NA = Not applicable as inotuzumab ozogamicin was not tested for TDI or MDI for this enzyme; NC = Not calculated as no inhibition was observed at highest concentration testsed (10 µM); TDI = Time-dependent inhibition; - = No inhibition observed.
a. Potential for TDI and MDI was determined by comparison of IC_{50} values both with and without preincubation and with and without NADPH-generating system present in the preincubation, by comparison of the observed inhibition (%) for all preincubation conditions and by visual inspection of the IC_{50} plots.
b. Inhibition observed (%) is calculated with the following formula (results are rounded to two significant figures): Inhibition observed (%) = 100% − Percent solvent control.

2.6.5.12B. Pharmacokinetics: Inhibition of CYP Enzymes

Test Article: PF-06649266
Report Number: PF-06649266_[redacted]_134026 (XT[redacted]5091)

Type of Study: Evaluation of the inhibition of CYP enzymes by PF-06649266
Method: In vitro incubation with human liver microsomes and individual substrates of CYP enzymes in the presence of NADPH
Analytical Method: LC-MS/MS
Concentration of PF-06649266: 0.01 – 10 µM

CYP	Enzyme Reaction	Zero-Minute Preincubation			30-Minute Preincubation without NADPH			30-Minute Preincubation with NADPH			Potential for TDI[a] (NADPH-Independent)	Potential for MDI[a] (Time-& NADPH-Dependent)
		IC_{50} (µM)[b]	Inhibition at 10 µM (%)[c]	r^2	IC_{50} (µM)[b]	Inhibition at 10 µM (%)[c]	r^2	IC_{50} (µM)[b]	Inhibition at 10 µM (%)[c]	r^2		
1A2	Phenacetin *O*-dealkylation	>10	13	NC	>10	13	NC	>10	23	0.886	No	No
2B6	Bupropion hydroxylation	>10	NA	NC	>10	6	NC	>10	20	NC	No	No
2C8	Amodiaquine *N*-dealkylation	>10	37	0.975	>10	43	0.933	6.2	59	0.995	No	22%[d]
2C9	Diclofenac 4′-hydroxylation	>10	15	NC	>10	13	NC	>10	24	0.974	No	No
2C19	*S*-Mephenytoin 4′-hydroxylation	>10	13	NC	>10	16	NC	>10	20	NC	No	No
2D6	Dextromethorphan *O*-demethylation	>10	11	NC	>10	16	NC	>10	25	0.946	No	No
3A4/5	Testosterone 6β-hydroxylation	5.5	68	0.988	4.9	63	0.975	1.4	82	0.971	No	3.9[e]
3A4/5	Midazolam 1′-hydroxylation	0.42	94	0.999	0.52	94	0.999	0.20	96	0.998	No	2.1[e]
3A4/5	Nifedipine oxidation	0.40	89	0.990	0.49	89	0.985	0.27	92	0.991	No	No

Notes: An assessment of risk for in vivo DDI between PF-06649266 and co-administered substrates of CYP enzymes, based on the 2012 FDA and EMA guidances, are provided in Tabulated Summaries 2.6.5.15G and 2.6.5.15H, respectively.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: CYP = Cytochrome P450; DMH = Dimethylhydrazide; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; MDI = Metabolism-dependent inhibition; N-Ac = N-acetyl; NADPH = Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NC = Not calculated; r^2 = Regression coefficient; TDI = Time-dependent inhibition.
a. Potential for TDI and MDI was determined by comparison of IC_{50} values both with and without preincubation and with and without NADPH-generating system present in the preincubation, by comparison of the observed inhibition (%) for all preincubation conditions and by visual inspection of the IC_{50} plots.
b. Average data (ie, percent of control activity) obtained from duplicate samples for each test article concentrations were used to calculate IC_{50} values.
c. Inhibition observed (%) is calculated with the following formula (results are rounded to two significant figures): Inhibition observed (%) = 100% − Percent solvent control.
d. This number represents the difference in percent of control activity after preincubation of 10 µM PF-06649266 with NADPH-fortified human liver microsomes for 30 minutes.
e. This number represents the fold shift of the IC_{50} value to a lower number after preincubation.

2.6.5.12C. Pharmacokinetics: Time-Dependent Inhibition of CYP Enzymes

Test Article: PF-06649266

Report Numbers: PF-06649266_[redacted]_084941 (XT[redacted]5115)
PF-06649266_[redacted]_100129

Type of Study:	Evaluation of time-dependent inhibition of CYP2C8 and CYP3A by PF-06649266
Method:	In vitro incubation with HLM and individual substrates of CYP2C8 or CYP3A in the presence of NADPH
Analytical Method:	LC-MS/MS
Concentrations of PF-06649266:	2-30 μM for CYP2C8; 0.01-20 μM for CYP3A
Concentrations of CYP Substrates:	9 μM Amodiaquine; 23 μM Midazolam; 440 μM Testosterone

CYP	Probe Substrate	k_{inact} ± SE (min^{-1})	K_I ± SE (μM)	k_{inact} / K_I (mL/μmol/min)
2C8[a]	Amodiaquine	NC	NC	NC
3A	Midazolam	0.00368 ± 0.00253	0.0768 ± 0.0217	47.9
3A	Testosterone	0.00434 ± 0.00036	0.237 ± 0.088	18.3

Notes: An assessment of risk for in vivo TDI between PF-06649266 and co-administered substrates of CYP enzymes, based on the 2012 FDA and EMA guidances, are provided in Tabulated Summary 2.6.5.15I. PF-06649266 = NAc-γ calicheamicin DMH;
Abbreviations: CYP = Cytochrome P450; DMH = Dimethylhydrazide; HLM = Human liver microsomes; K_I = Apparent inactivation constant at half-maximal rate of inactivation; k_{inact} = Maximal rate of enzyme inactivation; k_{inact}/K_I = Measure of inactivator efficiency (composite slope); LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; NAc = N-acetyl; NADPH = Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NC = Not calculated; SE = Standard error; TDI = Time-dependent inhibition.
a. Limited metabolism-dependent inhibition of CYP2C8 was observed; The inactivation rate constant (k_{obs}) was only statistically different from solvent control at the highest PF-06649266 concentration tested (30 μM).

2.6.5.12D. Pharmacokinetics: Inhibition of UGT Enzymes

Test Article: PF-06649266
Report Number: PF-06649266_[redacted]_142000

Type of Study: Evaluation of UGT Inhibition by PF-06649266
Method: In vitro incubation with HLM and individual substrates of UGT enzymes in the presence of UDPGA ± 2% BSA
Analytical Method: LC-MS/MS
Concentration of PF-06649266: 0.01-10 µM

UGT Enzyme	Enzyme Reaction	PF-06649266				Positive Controls[a]			
		Without 2% BSA[b]		With 2% BSA		Without 2% BSA[b]		With 2% BSA	
		IC_{50} (µM)	Inhibition at 10 µM (%)[c]	Total IC_{50} (µM)[d]	Inhibition at 10 µM (%)[c]	IC_{50} (µM)	Inhibition at Maximum[I] (%)[c,e]	Total IC_{50} (µM)[b]	Inhibition at Maximum[I] (%)[c,e]
1A1	β-Estradiol-3-Glucuronidation	0.61	84	1.4	89	0.20	100	2.2	94
1A4	Trifluorperazine-*N*-Glucuronidation	>10	33	>10	41	0.30	86	1.1	89
1A6	5-Hydroxytryptophol-*O*-Glucuronidation	>10	17	>10	-	6.5	88	78	86
1A9	Propofol-*O*-Glucuronidation	>10	-	>10	4	6.2	89	2.7	93
2B7	Zidovudine-5'-Glucuronidation	>10	15	>10	30	0.022	99	0.11	97

Notes: An assessment of risk for in vivo DDI between PF-06649266 and co-administered substrates of UGT enzymes, based on the 2012 FDA guidance in the absence or presence of BSA, are provided in Tabulated Summaries 2.6.5.15J and 2.6.5.15K.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: BSA = Bovine serum albumin; DDI = Drug-drug interaction; DMH = Dimethylhydrazide; f_u = Fraction unbound; HLM = Human liver microsome; [I] = Inhibitor concentration; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; N-Ac = N-acetyl; UDPGA = Uridine diphosphate glucuronic acid; UGT = Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase; - = No inhibition observed.
a. Positive controls (1A1 = Nicardipine; 1A4 = Hecogenin; 1A6 = Nicardipine; 1A9 = Digoxin; 2B7 = β-Phenyllongifolol-1).
b. Incubations without 2% BSA, PF-06649266 f_u assumed to be 1 due to minimal amount of protein (0.025 mg/mL) present.
c. Inhibition observed (%) is calculated with the following formula (rounded to two significant figures): Inhibition observed (%) = 100% − Percent solvent control.
d. Unbound IC_{50} was not reported because PF-06649266 was not stable in the in vitro HLM-BSA protein binding assay. PF-06649266 was stable for at least 60 minutes using the BSA assay conditions for this experiment.
e. Maximum positive control concentrations for 1A1 = 30 µM, 1A4 = 10 µM; 1A6 = 75 µM, 1A9 = 60 µM, and 2B7 = 3 µM.

2.6.5.12E. Pharmacokinetics: Induction of CYP Enzymes

Test Article: PF-05208773
Report Number: RPT-78474

Type of Study: Evaluation of CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A2 induction by inotuzumab ozogamicin
Method: In Vitro incubation with cryopreserved human hepatocytes and quantitated by LC-MS and Quantitative RT-PCR
Concentration of Inotuzumab ozogamicin: 0.003 – 0.32 μM
Concentrations of CYP Substrates: 200 μM Testosterone, 200 μM Bupropion, 50 μM Phenacetin

Hepatocyte Subject	Inotuzumab ozogamicin Concentration (μM)	CYP3A4 mRNA Fold Induction	CYP2B6 mRNA Fold Induction	CYP1A2 mRNA Fold Induction	CYP3A4 1′-Hydroxymidazolam Activity Fold Induction	CYP2B6 Hydroxybupropion Activity Fold Induction	CYP1A2 Phenacetin O-Dealkylation Activity Fold Induction
1	0.003	0.74	1.33	1.25	0.77	1.04	1.37
1	0.032	0.38	1.20	1.25	0.82	0.67	1.34
1	0.32	0.37	0.87	1.00	0.55	0.56	0.82
2	0.003	0.85	0.86	1.00	1.01	0.79	0.32
2	0.032	0.65	0.76	1.27	0.56	0.44	0.21
2	0.32	0.79	0.43	1.09	0.90	0.33	0.47
3	0.003	0.86	1.13	1.67	0.73	0.83	1.25
3	0.032	0.69	1.06	1.67	0.62	1.06	1.12
3	0.32	0.37	0.88	1.17	0.52	0.70	0.76

Notes: Reported values are a mean of n= 3.
PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
Abbreviations: CYP = Cytochrome P450; LC-MS = Liquid chromatography-mass spectrometry; mRNA = Messenger ribonucleic acid; NA = Not applicable; RT-PCR = Reverse transcription-polymerase chain reaction.

2.6.5.12F. Pharmacokinetics: Induction of CYP Enzymes

Test Article: PF-06649266

Report Number: PF-06649266_[redacted]_121216 (XT[redacted]3106)

Type of Study: Evaluation of CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A2 induction by PF-06649266
Method: In Vitro incubation with cryopreserved human hepatocytes and quantitated by LC-MS/MS and Quantitative RT-PCR
Concentrations of CYP Substrates: 30 µM Midazolam, 500 µM Bupropion, 100 µM Phenacetin

Hepatocyte Lot	PF-06649266 Concentration (µM)	CYP3A4 mRNA Fold Induction	CYP2B6 mRNA Fold Induction	CYP3A4 1′-Hydroxymidazolam Activity Fold Induction	CYP2B6 Hydroxybupropion Activity Fold Induction	CYP1A2 Phenacetin O-Dealkylation Activity Fold Induction
H1178	0.001	0.955	1.10[a]	0.833	0.937[a]	0.895
H1178	0.003	0.695	1.15	0.737	1.02	0.918
H1178	0.007	0.441	0.909	0.619	0.914	0.834
H1178	0.01	0.627	0.992	0.641	0.977	0.866
H1178	0.03	0.227	0.321[a]	0.242	0.555[a]	1.38
H1178	0.07	0.126	0.209	0.235	0.575	1.27
H1178	0.1	0.111	0.173	0.203	0.415	1.12
H1178	0.3	<0.1	0.118	0.0879	0.258	0.552
Hu1434	0.001	1.18	1.13	0.770	0.809	0.860
Hu1434	0.003	0.775	1.23	0.763	0.786	0.830
Hu1434	0.007	0.574	1.22	0.583	0.637	0.556[a]
Hu1434	0.01	0.470	1.13[a]	0.570	0.698[a]	0.653
Hu1434	0.03	0.282	0.434	0.306	0.209	0.387
Hu1434	0.07[b]	0.182	0.309	0.212	NA	0.327
Hu1434	0.1[b]	0.147	0.442	0.181	NA	0.254
Hu1434	0.3[b]	0.155	0.445	0.0791	NA	0.144
HC7-4	0.001	0.612	1.42	0.704	0.936	1.08
HC7-4	0.003	0.339	1.57	0.470	0.861	1.00
HC7-4	0.007	0.355	1.90	0.365	0.748	1.13
HC7-4	0.01	0.281	1.80	0.252	0.607	0.926
HC7-4	0.03	0.103[a]	0.404	0.129[a]	0.157	0.550
HC7-4	0.07[b]	<0.1	0.178[a]	0.0898	<0.1[a]	0.319
HC7-4	0.1[b]	<0.1	0.105	0.0848	<0.1	0.290
HC7-4	0.3[b]	<0.1	<0.1	0.0230	<0.1	0.0294

Notes: Reported values are a mean of n= 3 except those noted as n=2.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: CYP = Cytochrome P450; DMH = Dimethylhydrazide; γ = Gamma; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mRNA = Messenger ribonucleic acid; NA = Not applicable; N-Ac = N-acetyl; RT-PCR = Reverse transcription-polymerase chain reaction.
a. n=2.
b. Low cell viability.

2.6.5.13. Pharmacokinetics: Excretion

Test Article: [^{3}H]PF-05208773
Report Number: PF-05208773_[redacted]_111700 (8296878)

Species (Strain):		Rats (Sprague-Dawley)
Sex/Number of Animals:		M/4, F/4 (Group 2 animals)
Feeding Condition:		Fed ad libitum
Vehicle/Formulation:		20 mM Tris, 10 mM NaCl, 5% (w/v) sucrose, and 0.01% (w/v) Tween 80, pH 8.0
Method of Administration:		Intravenous, Single dose
Protein (G544 antibody) Dose Equivalent	**(mg/m^2)**[a]	0.912
	(mg/kg)	0.152 (47.3 µCi/kg)
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent	**(µg/kg)**	17.6 (47.3 µCi/kg)
Specific activity	**mCi/mg$_{protein}$**	0.312
	mCi/mg$_{calicheamicin}$	2.68
Analyte:		[^{3}H]PF-05208773
Assay:		Liquid scintillation counting

	Mean Cumulative Excretion of [^{3}H]Inotuzumab ozogamicin-Derived Radioactivity (% of Dose)											
	Male						**Female**					
Time (hours)	**Urine**	**Feces**	**Cage Rinse**	**Cage Wash**	**Cage Wipe**	**Carcass**	**Urine**	**Feces**	**Cage Rinse**	**Cage Wash**	**Cage Wipe**	**Carcass**
0-24	1.12	7.86	0.0821	-	-	-	1.02	5.57	0.185	-	-	-
0-48	2.35	24.5	0.180	-	-	-	2.42	21.8	0.461	-	-	-
0-72	3.12	33.8	0.250	-	-	-	3.31	34.2	0.602	-	-	-
0-96	4.02	41.3	0.311	-	-	-	4.09	44.5	0.700	-	-	-
0-120	4.64	48.4	0.391	-	-	-	4.62	50.9	0.810	-	-	-
0-144	5.17	53.3	0.456	-	-	-	5.05	56.1	0.917	-	-	-
0-168	5.65	58.1	0.515	-	-	-	5.49	60.2	0.993	-	-	-
0-192	6.06	61.3	0.565	-	-	-	5.88	63.1	1.04	-	-	-
0-216	6.45	64.4	0.610	-	-	-	6.19	66.2	1.07	-	-	-
0-240	6.76	66.7	0.647	-	-	-	6.47	68.6	1.12	-	-	-
0-264	7.08	68.7	0.688	-	-	-	6.75	70.3	1.16	-	-	-
0-288	7.35	70.5	0.727	-	-	-	6.98	71.9	1.20	-	-	-
0-312	7.62	72.1	0.766	-	-	-	7.21	73.5	1.23	-	-	-
0-336	7.83	73.5	0.805	0.134	0.151	-	7.39	74.7	1.27	0.220	0.228	-
0-360	8.05	74.7	0.816	-	-	-	7.57	75.7	1.28	-	-	-
0-384	8.27	75.8	0.833	-	-	-	7.74	76.7	1.30	-	-	-
0-408	8.47	76.7	0.852	-	-	-	7.88	77.5	1.32	-	-	-
0-432	8.65	77.5	0.868	-	-	-	8.04	78.3	1.33	-	-	-

2.6.5.13. Pharmacokinetics: Excretion (Continued)

Test Article: [^{3}H]PF-05208773

Report Number: PF-05208773_[redacted]_111700 (8296878)

	Mean Cumulative Excretion of [^{3}H]Inotuzumab ozogamicin-Derived Radioactivity (% of Dose)											
	Male						Female					
Time (hours)	Urine	Feces	Cage Rinse	Cage Wash	Cage Wipe	Carcass	Urine	Feces	Cage Rinse	Cage Wash	Cage Wipe	Carcass
0-456	8.81	78.2	0.885	-	-	-	8.16	79.0	1.35	-	-	-
0-480	8.95	78.9	0.901	-	-	-	8.27	79.5	1.37	-	-	-
0-504	9.09	79.5	-	0.146	0.151	8.54	8.38	80.1	-	0.220	0.228	7.40
Total:	**98.4**						**97.7**					

Notes: PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
G544 antibody = Anti-CD22 antibody.
Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; CD22 = Cluster of differentiation-22; DMH = Dimethylhydrazide; F = Female; M = Male; N-Ac = N-acetyl; NaCl = Sodium chloride; - = No sample taken.
a. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 6 for rat (k_m = 6).

2.6.5.14. Pharmacokinetics: Excretion into Bile **Test Article: PF-05208773**

Report Number: PF-05208773_[redacted]_111700 (8296878)

Species (Strain):		Rats (Sprague-Dawley)
Sex/Number of Animals:		M/4, F/4 (Group 3 animals)
Feeding Condition:		Fed ad libitum
Vehicle/Formulation:		20 mM Tris, 10 mM NaCl, 5% (w/v) sucrose, and 0.01% (w/v) Tween 80, pH 8.0
Method of Administration:		Intravenous, Single dose
Protein (G544 antibody) Dose Equivalent	**(mg/m^2)[a]**	0.912
	(mg/kg)	0.152 (47.3 µCi/kg)
N-Ac-γ-calicheamicin DMH AcBut Dose Equivalent	**(µg/kg)**	17.6 (47.3 µCi/kg)
Specific activity	**mCi/mg$_{protein}$**	0.312
	mCi/mg$_{calicheamicin}$	2.68
Analyte:		[^{3}H]PF-05208773
Assay:		Liquid scintillation counting

Mean Cumulative Excretion of [^{3}H]Inotuzumab ozogamicin-Derived Radioactivity (% of Dose)

Collection Time (h)	Male					Female				
	Urine	**Feces**	**Cage Rinse**	**Bile**	**Carcass**	**Urine**	**Feces**	**Cage Rinse**	**Bile**	**Carcass**
0-8	-	-	-	4.67	-	-	-	-	9.71	-
0-24	0.628	0.489	0.0169	15.6	-	0.619	0.627	0.0357	27.7	-
0-48	1.12	1.97	0.0463	26.5	-	1.12	1.38	0.0904	39.8	-
0-72	1.53	2.77	0.0722	34.3	-	1.59	2.34	0.125	47.3	-
0-96	1.85	3.45	0.0899	40.3	-	2.05	2.89	0.164	53.0	-
0-120	2.20	4.06	0.113	45.3	-	2.52	3.41	0.198	57.5	-
0-144	2.50	4.94	0.160	49.4	-	3.15	4.00	0.252	60.6	-
0-168[b]	3.00	5.62	-	52.5	35.2	3.55	4.71	-	63.5	24.5
Total:	**96.6**					**96.7**				

Notes: PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
G544 antibody = Anti-CD22 antibody.
Abbreviations: AcBut = 4-(4′-acetylphenoxy) butanoic acid; CD22 = Cluster of differentiation-22; DMH = Dimethylhydrazide; F = Female; M = Male; N-Ac = N-acetyl; NaCl = Sodium chloride; - = No sample taken.
a. mg protein/kg was converted to mg protein/m^2 using a conversion factor of 6 for rat (k_m = 6).
b. Mean cumulative excretion in the cage wash, cage wipe, bile cannula, and jacket rinse was <0.15% of dose for both male and female animals.

2.6.5.15A. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Transporter Substrate **Test Article: PF-06649266**

Summary Results: PF-06649266 as a Substrate of Transporters In Vitro

Transporter	Report Numbers	Test System	B-A/A-B Ratio[a]	Substrate (Yes/No)
P-gp	PF-06649266_[redacted]_131956	MDCKII-MDR1	4.76	Yes
BCRP	PF-06649266_[redacted]_120849	MDCK-BCRP	1.20	No
OATP1B1	PF-06649266_[redacted]_113941	SCHH	-	No[b]
OATP1B3	PF-06649266_[redacted]_113941	SCHH	-	No[b]

Notes: PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: A-B = Apical to basolateral apparent permeability; B-A = Basolateral to apical apparent permeability; BCRP = Breast cancer resistance protein; DMH = Dimethylhydrazide; MDCK-BCRP = Madin-Darby canine kidney cells overexpressing human BCRP; MDCKII-MDR1 = Madin-Darby canine kidney II cells transfected with the gene for human multidrug resistance protein 1 (also known as P-gp); N-Ac = N-acetyl; OATP = Human organic anion-transporting polypeptide; P-gp = P-glycoprotein; SCHH = Sandwich-cultured human hepatocytes; - = Data not available or not applicable.
a. B-A/A-B ratios of >2.5 are considered conclusive for active efflux (positive for substrate potential). The B-A/A-B efflux ratio for the P-gp positive control, quinidine (0.5μM), was 12.1 and efflux was completely inhibited by the P-gp inhibitor PSC 833. The B-A/A-B efflux ratios for the BCRP positive controls, topotecan (0.5 μM) and pitavastatin (0.5 μM), were 22.9 and 26.0, respectively. Pitavastatin efflux was completely inhibited by the BCRP inhibitor Ko143.
b. No transporter-mediated/rifamycin SV-inhibitable uptake of PF-06649266 into SCHH was observed. Thus, OATP1B1 and OATP1B3 are unlikely to play a role in the hepatic uptake of PF-06649266.

2.6.5.15B. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Transporter Inhibition **Test Article: PF-06649266**

Summary Results: PF-06649266 as an Inhibitor of Transporters In Vitro

Transporter	Report Numbers	Test System	Probe Substrate	IC_{50} (μM)	% of Control at Highest Concentration Tested[a]	Inhibitor (Yes/No)[b]
P-gp	PF-06649266_[redacted]_131956	MDCKII-MDR1	Digoxin	>0.3	-	No
BCRP	PF-06649266_[redacted]_131956	MDCKII-LE-BCRP	Pitavastatin	>0.3	83.9[c]	No
OAT1	PF-06649266_[redacted]_144223	HEK293	[^{3}H]PAH	>0.5	99.6	No
OAT3	PF-06649266_[redacted]_144223	HEK293	[^{3}H]E3S	>0.1	94.7	No
OCT2	PF-06649266_[redacted]_144223	HEK293	[^{14}C]Metformin	>0.1	95.8	No
OATP1B1	PF-06649266_[redacted]_160005	HEK293	Pravastatin	>0.1	69.7	No
OATP1B3	PF-06649266_[redacted]_160005	HEK293	Rosuvastatin	>0.1	83.9	No

Notes: Calculated molecular weight of PF-06649266 = 1478.4 g/mole.
PF-06649266 = N-Ac-γ calicheamicin DMH.
Abbreviations: BCRP = Breast cancer resistance protein; DMH = Dimethylhydrazide; E3S = Estrone-3-sulfate; HEK293 = Human embryonic kidney 293 cells; IC_{50} = Half maximal inhibitory concentration; MDCKII-LE-BCRP = Madin-Darby canine kidney II cells (low efflux) transfected with the gene for BCRP; MDCKII-MDR1 = Madin-Darby canine kidney II cells transfected with the gene for multidrug resistance protein 1 (also known as P-gp); N-Ac = N-acetyl; OAT = Human organic anion transporter; OATP = Human organic anion transporting polypeptide; OCT = Human organic cation transporter; PAH = p-Aminohippuric acid; P-gp = P-glycoprotein (also known as MDR1); - = No inhibition observed.
a. P-gp, BCRP = 0.300 μM; OAT1 = 0.500 μM; OAT3, OCT2, OATP1B1, OATP1B3 = 0.100 μM
b. An assessment of risk for in vivo DDI between PF-06649266 and co-administered substrates of these transporters, based on the 2012 FDA and EMA guidances, are provided in Tabulated Summaries 2.6.5.15C and 2.6.5.15D, respectively.
c. Calculated as 100*(efflux ratio at the highest concentration/efflux ratio for the control).

2.6.5.15C. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Transporter Inhibition **Test Article: PF-06649266**

Summary Results: Assessment of Risk for In Vivo DDIs Between PF-06649266 and Co-Administered Substrates of Various Transporters, based on the draft FDA guidance (2012).[a]

Transporter	Report Numbers	[I] (μM)	IC_{50} (μM)	[I]/IC_{50}	Threshold Cutoff For Potential DDI
P-gp	PF-06649266_[redacted]_131956	≤0.000034	>0.3	0.0001	[I]/IC_{50} ≥0.1
BCRP	PF-06649266_[redacted]_131956	≤0.000034	>0.3	0.0001	[I]/IC_{50} ≥0.1
OAT1	PF-06649266_[redacted]_144223	≤0.000034	>0.5	0.00007	[I]/IC_{50} ≥0.1
OAT3	PF-06649266_[redacted]_144223	≤0.000034	>0.1	0.0003	[I]/IC_{50} ≥0.1
OCT2	PF-06649266_[redacted]_144223	≤0.000034	>0.1	0.0003	[I]/IC_{50} ≥0.1
OATP1B1	PF-06649266_[redacted]_160005	≤0.000034	>0.1	0.0003	[I]/IC_{50} ≥0.1
OATP1B3	PF-06649266_[redacted]_160005	≤0.000034	>0.1	0.0003	[I]/IC_{50} ≥0.1

Notes: Calculated molecular weight of PF-06649266 = 1478.4 g/mol.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: BCRP = Breast cancer resistance protein; C_{max} = Maximum observed concentration; DMH = Dimethylhydrazide; DDI = Drug-drug interaction; [I] = Total C_{max} in patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with therapeutic doses inotzumab ozogamicin (Study B1931022 CSR, Table 14.4.3.2, ≤0.000034 μM [0.05 ng/mL[b]]); IC_{50} = 50% inhibitory concentration; N-Ac = N-acetyl; OAT = Human organic anion transporter; OATP = Human organic anion-transporting polypeptide; OCT = Human organic cation transporter; P-gp = P-glycoprotein.
a. Draft guidance for industry: drug interaction studies – study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. In: U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Feb 2012: 75 pages.
b. Since the serum unconjugated calicheamicin concentrations for most patients (>90%) were below the limit of quantitation, the mean steady-state total C_{max} for N-Ac-γ-calicheamicin DMH used for DDI determinations was based on the clinical assay lower limit of quantitation and differs from the mean values reports in Table 14.4.3.2 in Study B1931022 CSR.

2.6.5.15D. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Transporter Inhibition **Test Article: PF-06649266**

Summary Results: Assessment of Risk for In Vivo DDIs Between PF-06649266 and Co-Administered Substrates of Various Transporters, based on the EMA guideline (2012).[a]

Transporter	Report Numbers	K_i[b] (μM)	50 x $C_{max,u}$[c] (μM)	Threshold Cutoff For Potential DDI
P-gp	PF-06649266_[redacted]_131956	>0.15	4.8×10^{-5}	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
BCRP	PF-06649266_[redacted]_131956	>0.15	4.8×10^{-5}	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OAT1	PF-06649266_[redacted]_144223	>0.25	4.8×10^{-5}	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OAT3	PF-06649266_[redacted]_144223	>0.05	4.8×10^{-5}	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OCT2	PF-06649266_[redacted]_144223	>0.05	4.8×10^{-5}	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OATP1B1	PF-06649266_[redacted]_160005	>0.05	4.8×10^{-5}	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OATP1B3	PF-06649266_[redacted]_160005	>0.05	4.8×10^{-5}	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$

Notes: Calculated molecular weight of PF-06649266 = 1478.4 g/mol.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: BCRP = Breast cancer resistance protein; C_{max} = Maximum observed concentration; $C_{max,u}$ = Unbound C_{max} in patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with therapeutic doses inotzumab ozogamicin (Study B1931022 CSR, Table 14.4.3.2, $\leq 9.5 \times 10^{-7}$ μM [Total ≤0.000034 μM[d]]); DDI = Drug-drug interaction; DMH = Dimethylhydrazide; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; K_i = Inhibition constant; N-Ac = N-acetyl; OAT = Human organic anion transporter; OATP = Human organic anion-transporting polypeptide; OCT = Human organic cation transporter; P-gp = P-glycoprotein.
a. Guideline on the investigation of drug interactions. In: European Medicines Agency. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 1June 2012: 60 pages.
b. Assume $K_i = IC_{50}/2$.
c. PF-06649266 human plasma $f_u = 0.0279$.
d. Since the serum unconjugated calicheamicin concentrations for most patients (>90%) were below the limit of quantitation, the mean steady-state total C_{max} for N-Ac-γ-calicheamicin DMH used for DDI determinations was based on the clinical assay lower limit of quantitation and differs from the mean values reports in Table 14.4.3.2 in Study B1931022 CSR.

2.6.5.15E. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Reversible CYP Inhibition

Test Article: PF-05208773
Report Number: RPT-79110

Summary Results: Assessment of Risk for In Vivo DDIs Based on Reversible Inhibition Between PF-05208773 and Co-Administered Substrates of CYP Enzymes, Based on the Draft FDA Guideline (2012).[a]

Model	CYP	K_i[b] (μM)	[I] (μM)	1+ [I]/K_i	Threshold Cutoff For Potential DDI
Basic (R_1)	CYP1A2	>5	0.00192	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2A6	>5	0.00192	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2B6	>5	0.00192	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2C8	>5	0.00192	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2C9	>5	0.00192	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2C19	>5	0.00192	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2D6	>5	0.00192	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP3A Midazolam	>5	0.00192	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP3A Nifedipine	>5	0.00192	1.00	1+ [I]/K_i >1.1

Notes: PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
Abbreviations: C_{max} = Maximum observed concentration; CYP = Cytochrome P450 enzymes; DDI = Drug-drug interaction; DMH = Dimethylhydrazide; [I] = Total C_{max} in patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with therapeutic doses inotzumab ozogamicin (Study B1931022 CSR, Table 14.4.3.1, observed C_{max} 0.00192 μM [308 ng/mL]); IC_{50} = 50% inhibitory concentration; K_i = Inhibition constant; N-Ac = N-acetyl; R_1 = Reversible inhibition.
a. Draft guidance for industry: drug interaction studies – study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. In: U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Feb 2012: 75 pages.
b. Assume $K_i = IC_{50}/2$

2.6.5.15F. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Reversible CYP Inhibition

Test Article: PF-05208773
Report Number: RPT-79110

Summary Results: Assessment of Risk for In Vivo DDIs Based on Reversible Inhibition Between PF-05208773 and Co-Administered Substrates of CYP Enzymes, Based on the EMA Guideline (2012).[a]

Model	CYP	K_i[b] (μM)	[I] (μM)	$[I]_u$[c]/K_i	Threshold Cutoff For Potential DDI
Basic (R_1)	CYP1A2	>5	0.00192	0.0004	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2A6	>5	0.00192	0.0004	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2B6	>5	0.00192	0.0004	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2C8	>5	0.00192	0.0004	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2C9	>5	0.00192	0.0004	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2C19	>5	0.00192	0.0004	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2D6	>5	0.00192	0.0004	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP3A Midazolam	>5	0.00192	0.0004	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP3A Nifedipine	>5	0.00192	0.0004	$[I]/K_i \geq 0.02$

Notes: PF-05208773 = Inotuzumab ozogamicin, CMC-544, or WAY-207294.
Abbreviations: C_{max} = Maximum observed concentration; CYP = Cytochrome P450 enzymes; DDI = Drug-drug interaction; DMH = Dimethylhydrazide; [I] = Total C_{max} in patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with therapeutic doses inotzumab ozogamicin (Study B1931022 CSR, Table 14.4.3.1, observed C_{max} 0.00192 μM [308 ng/mL]); IC_{50} = 50% inhibitory concentration; $[I]_u$ = Unbound C_{max} in patients; K_i = Inhibition constant; N-Ac = N-acetyl; R_1 = Reversible inhibition.
a. Guideline on the investigation of drug interactions. In: European Medicines Agency. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 1 June 2012: 60 pages.
b. Assume $K_i = IC_{50}/2$.
c. PF-05208773 was not assessed for plasma protein binding; therefore, total C_{max} concentrations are used.

2.6.5.15G. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Reversible CYP Inhibition

Test Article: PF-06649266
Report Number:
PF-06649266_[redacted]_134026 (XT[redacted]5091)

Summary Results: Assessment of Risk for In Vivo DDIs Based on Reversible Inhibition Between PF-06649266 and Co-Administered Substrates of CYP Enzymes, Based on the Draft FDA Guideline (2012).[a]

Model	CYP	K_i[b] (μM)	[I] (μM)	1+ [I]/K_i	Threshold Cutoff For Potential DDI
Basic (R_I)	CYP1A2	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2B6	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2C8	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2C9	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2C19	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP2D6	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP3A Testosterone	2.75	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP3A Midazolam	0.21	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	CYP3A Nifedipine	0.20	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1

Notes: Calculated molecular weight of PF-06649266 = 1478.4 g/mol.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: C_{max} = Maximum observed concentration; CYP = Cytochrome P450 enzymes; DDI = Drug-drug interaction; DMH = Dimethylhydrazide; [I] = Total C_{max} in patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with therapeutic doses inotzumab ozogamicin Study B1931022 CSR, Table 14.4.3.2, ≤0.000034 μM [0.05 ng/mL[c]]); IC_{50} = 50% inhibitory concentration; K_i = Inhibition constant; N-Ac = N-acetyl; R_I = Reversible inhibition.
a. Draft guidance for industry: drug interaction studies – study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. In: U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Feb 2012: 75 pages.
b. Assume $K_i = IC_{50}/2$
c. Since the serum unconjugated calicheamicin concentrations for most patients (>90%) were below the limit of quantitation, the mean steady-state total C_{max} for N-Ac-γ-calicheamicin DMH used for DDI determinations was based on the clinical assay lower limit of quantitation and differs from the mean values reports in Table 14.4.3.2 in Study B1931022 CSR.

2.6.5.15H. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Reversible CYP Inhibition

Test Article: PF-06649266
Report Number:
PF-06649266_[redacted]_134026 (XT[redacted]5091)

Summary Results: Assessment of Risk for In Vivo DDIs Based on Reversible Inhibition Between PF-06649266 and Co-Administered Substrates of CYP Enzymes, Based on the EMA Guideline (2012).[a]

Model	CYP	K_i[b] (μM)	$[I]_u$ (μM)	$[I]_u$[c]/K_i	Threshold Cutoff For Potential DDI
Basic (R_1)	CYP1A2	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2B6	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2C8	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2C9	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2C19	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP2D6	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP3A Testosterone	2.75	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 3.5 \times 10^{-7}$	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP3A Midazolam	0.21	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 4.5 \times 10^{-6}$	$[I]/K_i \geq 0.02$
	CYP3A Nifedipine	0.20	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 4.8 \times 10^{-6}$	$[I]/K_i \geq 0.02$

Notes: Calculated molecular weight of PF-06649266 = 1478.4 g/mol.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: C_{max} = Maximum observed concentration; CYP = Cytochrome P450 enzymes; DDI = Drug-drug interaction; DMH = Dimethylhydrazide; f_u = Fraction unbound; $[I]_u$ = Inhibitor unbound C_{max} in patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with therapeutic doses inotzumab ozogamicin (Study B1931022 CSR, Table 14.4.3.2, $\leq 9.5 \times 10^{-7}$ μM [Total ≤0.000034 μM[d]]); K_i = Inhibition constant; N-Ac = N-acetyl; R_1 = Reversible inhibition.
a. Guideline on the investigation of drug interactions. In: European Medicines Agency. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 1 June 2012: 60 pages.
b. Assume $K_i = IC_{50}/2$
c. PF-06649266 human plasma f_u = 0.0279.
d. Since the serum unconjugated calicheamicin concentrations for most patients (>90%) were below the limit of quantitation, the mean steady-state total C_{max} for N-Ac-γ-calicheamicin DMH used for DDI determinations was based on the clinical assay lower limit of quantitation and differs from the mean values reports in Table 14.4.3.2 in Study B1931022 CSR

2.6.5.15I. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, Time-Dependent CYP Inhibition

Test Article: PF-06649266
Report Number:
PF-06649266_[redacted]_100129

Summary Results: Assessment of Risk for In Vivo DDIs Between PF-06649266 and Co-Administered Substrates of CYP3A[a], Based on the Draft FDA Guidance (2012)[b] and EMA Guideline (2012)[c]

Model	Probe Substrate	$[I]_1$ (μM)	k_{inact} (min^{-1})	K_I (μM)	K_{obs} (k_{inact} x [I]) / (K_I + [I])	R (K_{obs} + K_{deg}) / K_{deg}	Threshold Cutoff For Potential DDI
Basic (TDI)							
	Midazolam	≤0.000034	0.00368	0.0768	0.0000016	1.01	R >1.1[b]; R ≥1.25[c]
	Testosterone	≤0.000034	0.00434	0.237	0.00000062	1.00	R >1.1[b]; R ≥1.25[c]

Note: Calculated molecular weight of PF-06649266 = 1478.4 g/mol.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: C_{max} = Maximum observed concentration; CYP = Cytochrome P450; DDI = Drug-drug interaction; DMH = Dimethylhydrazide; $[I]_1$ = Total C_{max} in patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with therapeutic doses inotzumab ozogamicin (Study B1931022 CSR, Table 14.4.3.2, ≤0.000034 μM [0.05 ng/mL[d]]); K_{deg} = Apparent first order degradation rate constant of the CYP3A (0.00032 min^{-1}; Fahmi OA et al. A Combined Model for Predicting CYP3A4 Clinical Net Drug-Drug Interaction Based on CYP3A4 Inhibition, Inactivation, and Induction Determined In Vitro. Drug Metab Dispos 2008; 36(8):1698–708 and Obach RS et al. Mechanism-Based Inactivation of Human Cytochrome P450 Enzymes and the Prediction of Drug-Drug Interactions. Drug Metab Dispos 2007; 35(2):246–55; K_I = Concentration of inactivator at half-maximal rate of inactivation; k_{inact} = Maximal rate of enzyme inactivation; N-Ac = N-acetyl; TDI = Time-dependent inhibition.
a. K_I and k_{inact} parameters could not be calculated for CYP2C8 (PF-06649266_[redacted]_084941 [XT[redacted]5115]).
b. Draft guidance for industry: drug interaction studies – study design, data analys s implications for dosing, and labeling recommendations. In: U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Feb 2012: 75 pages.
c. Guideline on the investigation of drug interactions. In: European Medicines Agency. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 1 June 2012: 60 pages.
d. Since the serum unconjugated calicheamicin concentrations for most patients (>90%) were below the limit of quantitation, the mean steady-state total C_{max} for N-Ac-γ-calicheamicin DMH used for DDI determinations was based on the clinical assay lower limit of quantitation and differs from the mean values reports in Table 14.4.3.2 in Study B1931022 CSR.

2.6.5.15J. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, UGT Inhibition

Test Article: PF-06649266
Report Number:
PF-06649266_[redacted]_142000

Summary Results: Assessment of Risk for In Vivo DDIs Between PF-06649266 and Co-Administered Substrates of UGT enzymes, based on the draft FDA guidance (2012).[a]

Model	UGT	K_i[b] (μM)	[I] (μM)	1+ [I]/K_i	Threshold Cutoff For Potential DDI
Basic (R_1)					
Without 2% BSA	1A1	0.305	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	1A4	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	1A6	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	1A9	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	2B7	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
With 2% BSA	1A1	0.700	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	1A4	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	1A6	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	1A9	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1
	2B7	>5	≤0.000034	1.00	1+ [I]/K_i >1.1

Note: Calculated molecular weight of PF-06649266 = 1478.4 g/mol.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: BSA = Bovine serum albumin; C_{max} = Maximum observed concentration; DDI = Drug-drug interaction; DMH = Dimethylhydrazide; HLM = Human liver microsome; [I] = Total C_{max} in patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with therapeutic doses inotzumab ozogamicin (Study B1931022 CSR, Table 14.4.3.2, ≤0.000034 μM [0.05 ng/mL[c]]); K_i = Inhibition constant; N-Ac = N-acetyl; UGT = Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase.
a. Draft guidance for industry: drug interaction studies – study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. In: U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Feb 2012: 75 pages.
b. Assume $K_i = IC_{50}/2$; Unbound IC_{50} values in the presence of 2% BSA not reported because PF-06649266 was not stable in the HLM-UGT binding assay.
c. Since the serum unconjugated calicheamicin concentrations for most patients (>90%) were below the limit of quantitation, the mean steady-state total C_{max} for N-Ac-γ-calicheamicin DMH used for DDI determinations was based on the clinical assay lower limit of quantitation and differs from the mean values reports in Table 14.4.3.2 in Study B1931022 CSR.

2.6.5.15K. Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions, UGT Inhibition

Test Article: PF-06649266
Report Number:
PF-06649266_[redacted]_142000

Summary Results: Assessment of Risk for In Vivo DDIs Between PF-06649266 and Co-Administered Substrates of UGT enzymes, based on the EMA guideline (2012).[a]

Model	UGT	K_i[b] (μM)	$[I]_u$ (μM)	$[I]_u$[c]/K_i	Threshold Cutoff For Potential DDI
Basic (R_I)					
Without 2% BSA	1A1	0.305	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 3.1 \times 10^{-6}$	$[I]_u/K_i \geq 0.02$
	1A4	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]_u/K_i \geq 0.02$
	1A6	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]_u/K_i \geq 0.02$
	1A9	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]_u/K_i \geq 0.02$
	2B7	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]_u/K_i \geq 0.02$
With 2% BSA	1A1	0.700	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.4 \times 10^{-6}$	$[I]_u/K_i \geq 0.02$
	1A4	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]_u/K_i \geq 0.02$
	1A6	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]_u/K_i \geq 0.02$
	1A9	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]_u/K_i \geq 0.02$
	2B7	>5	$\leq 9.5 \times 10^{-7}$	$\leq 1.9 \times 10^{-7}$	$[I]_u/K_i \geq 0.02$

Note: Calculated molecular weight of PF-06649266 = 1478.4 g/mol.
PF-06649266 = N-Ac-γ-calicheamicin DMH.
Abbreviations: BSA = Bovine serum albumin; C_{max} = Maximum observed concentration; DDI = Drug-drug interaction; DMH = Dimethylhydrazide; f_u = Fraction unbound; HLM = Human liver microsome; $[I]_u$ = Inhibitor unbound C_{max} in patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with therapeutic doses inotzumab ozogamicin (Study B1931022 CSR, Table 14.4.3.2, $\leq 9.5 \times 10^{-7}$ μM [Total ≤0.000034 μM[d]]); K_i = Inhibition constant; N-Ac = N-acetyl; UGT = Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase; R_I = Reversible inhibition.
a. Guideline on the investigation of drug interactions. In: European Medicines Agency. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 1 June 2012: 60 pages.
b. Assume K_i = Unbound $IC_{50}/2$; Unbound IC_{50} values in the presence of 2% BSA not available because PF-06649266 was not stable in the HLM-UGT binding assay; therefore, Total IC_{50} values are used.
c. PF-06649266 human plasma f_u = 0.0279.
d. Since the serum unconjugated calicheamicin concentrations for most patients (>90%) were below the limit of quantitation, the mean steady-state total C_{max} for N-Ac-γ-calicheamicin DMH used for DDI determinations was based on the clinical assay lower limit of quantitation and differs from the mean values reports in Table 14.4.3.2 in Study B1931022 CSR.