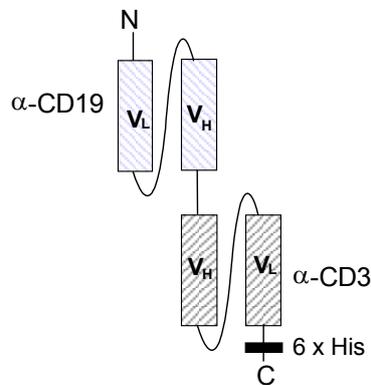


ブリナツモマブ (AMG 103、MT 103 又は MEDI-538) は、二重特異性 T 細胞誘導 (BiTE) 作用を有する新規の一本鎖抗体である。ブリナツモマブは、患者自身の T 細胞を利用して悪性 B 細胞を攻撃する。ブリナツモマブは、CD3 陽性 T 細胞と標的である CD19 陽性 B 細胞を一過性に架橋することにより CD3 陽性 T 細胞を活性化して、標的細胞に結合し殺傷する。

ブリナツモマブは、異なる 2 つの抗原特異性を有するマウスモノクローナル抗体 (B 細胞上に発現する CD19 を抗原とする HD37 抗体及び T 細胞受容体複合体の CD3ε鎖に特異的に結合する L2K-07 抗体) から作製した。グリシン及びセリンアミノ酸からなる短いリンカーペプチドにより、双方の抗体由来の一本鎖可変領域断片 (scFv) を結合させた。精製を容易にするため、ヘキサヒスチジンタグを C 末端に付加した。最終的に、分子量 54 kDa で 504 個のアミノ酸からなるタンパク質が得られた。ブリナツモマブは、一本鎖ポリペプチドとしてチャイニーズハムスター卵巣細胞により産生した。本分子は、非グリコシル化の単量体である。ドメイン構造を図 1 に示す。

図 1 ブリナツモマブのドメイン構造



The immunoglobulin variable heavy (V_H) and variable light chain (V_L) regions are shown as boxes. Connecting lines represent glycine/serine linkers; N, amino terminus; C, carboxyl terminus; 6 x His, hexahistidine sequence

ブリナツモマブは種選択性が高く、ヒト及びチンパンジーの CD19 及び CD3 のみを認識する。マウスを用いた試験には、マウスの CD19 及び CD3 に対するモノクローナル抗体を用いて作製した代替抗体 (muS103new) を使用した。マウスにおける muS103new の効力及び薬理作用は、ヒト及びチンパンジーにおけるブリナツモマブの効力及び薬理作用に相当する。

ブリナツモマブは、再発又は難治性の B 細胞性急性リンパ性白血病患者への治療薬として開発されている。

目次

1.	序論	4
2.	まとめ	7
3.	効力を裏付ける試験	10
3.1	ブリナツモマブと CD3 又は CD19 との相互作用特性	10
3.2	ブリナツモマブの <i>in vitro</i> 生物活性	12
3.2.1	ブリナツモマブの機能的特異性の検討	12
3.2.2	T細胞依存的なブリナツモマブの細胞傷害活性	16
3.2.3	ブリナツモマブ介在性細胞傷害活性における T細胞のドナー間でのばらつき	18
3.2.4	ブリナツモマブ細胞傷害活性に及ぼす E:T比の影響	19
3.2.5	ブリナツモマブによる T細胞の標的細胞依存的活性化及び増殖	21
3.2.6	ブリナツモマブによるグランザイム B の発現	22
3.2.7	B細胞性悪性腫瘍患者の PBMC におけるブリナツモマブの作用	24
3.2.8	ブリナツモマブ活性化 T細胞によるサイトカインの産生	25
3.3	<i>In vivo</i> 生物活性	27
3.3.1	皮下腫瘍形成モデル	28
3.3.2	同所性腫瘍移植モデル	33
3.4	ブリナツモマブの種交差性	35
3.4.1	ブリナツモマブの毒性試験に用いる適切な動物種の決定	35
3.4.2	フローサイトメトリーを用いた、アフリカミドリザル、マーモセット、リスザル、マウス及びラットの PBMC に対するブリナツモマブの交差反応性試験	36
3.4.3	ヒト及びチンパンジー試験系におけるブリナツモマブの <i>in vitro</i> 特性評価	36
3.5	マウス代替抗体 muS103new の特性評価	37
3.5.1	muS103new : 同等の親和性を有するマウス様ブリナツモマブ代替抗体の作製	37
3.5.2	ブリナツモマブ及び muS103new の <i>in vitro</i> 薬力学的作用の比較	37
4.	副次的薬理試験	41
4.1	ブリナツモマブ誘導性 T細胞活性化による内皮細胞の接着分子発現への影響	41
4.1.1	ブリナツモマブによる T細胞の内皮細胞への接着性亢進	44
4.1.2	Pentosan polysulfate、ミノサイクリン及びナタリズマブの、ブリナツモマブ誘導性 T細胞ローリング速度の低下及び内皮細胞への T細胞接着阻止	46
5.	安全性薬理試験	49
5.1	muS103new の呼吸系に及ぼす影響	49
5.2	muS103new の中枢神経系に及ぼす影響	49
5.3	ブリナツモマブの心血管系及び呼吸系に及ぼす影響	49
5.4	マウスを用いた muS103new の探索的 7日間脳室内持続投与試験	50
6.	薬力学的薬物相互作用	51
6.1	ブリナツモマブ介在性リダイレクト細胞溶解及びサイトカイン放出に対するデキサメタゾン及びインドメタシンの影響	51
7.	考察及び結論	55
8.	引用文献	57

略語一覧

本文書では、以下の略語に加えて国際単位系 (SI) で推奨されている用語を用いている。

略語又は用語	定義/説明
ALL	Acute lymphoblastic leukemia (急性リンパ性白血病)
AMG 103	Blinatumomab (ブリナツモマブ)
ANOVA	Analysis of Variance (分散分析)
B-ALL	B-cell acute lymphocytic leukemia (B細胞性急性リンパ性白血病)
B-CLL	B-cell chronic lymphocytic leukemia (B細胞性慢性リンパ性白血病)
BiTE	Bispecific T cell engager (二重特異性 T 細胞誘導)
B _{max}	Maximum number of bound molecules per cell (細胞あたりの最大結合分子数)
CBA	Cytometric bead array (Cytometric bead array 法)
CD3	Surface antigen on T cells, subunit of the T cell receptor complex (T 細胞表面抗原、T 細胞受容体複合体のサブユニット)
CD4	T cell surface antigen specific for the T helper cell subpopulation (ヘルパー T 細胞の亜集団に特異的な T 細胞表面抗原)
CD8	Surface antigen present on most cytotoxic T cells and NK cells (ほとんどの細胞傷害性 T 細胞及び NK 細胞に存在する表面抗原)
CD19	Surface antigen, pan-B cell receptor protein (表面抗原、汎 B 細胞受容体タンパク質)
CD25	Late activation marker of T cells (T 細胞の後期活性化マーカー)
CD28	Surface antigen expressed on T cells (T 細胞に発現している表面抗原)
CD45RA	Naïve CD8 ⁺ T cells (抗原刺激を受けていない CD8 陽性 T 細胞)
CD45RO	Primed CD8 ⁺ T cells (抗原刺激を受けた CD8 陽性 T 細胞)
CD69	Early activation marker of T cells (T 細胞の初期活性化マーカー)
CHO	Chinese hamster ovary (チャイニーズハムスター卵巣)
DNA	deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
EC ₅₀	half-maximal effective concentration (50%効果濃度)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (酵素免疫吸着測定法)
E:T	Effector to target cell ratio (エフェクター細胞と標的細胞の比率)
FACS	Fluorescence-activated cell sorter (蛍光活性化細胞選別法)
Fv	Variable fragment (可変部)
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)
HAS	Human serum albumin (ヒト血清アルブミン)
HD37	Anti-CD19 murine monoclonal antibody (抗 CD19 マウスモノクローナル抗体)
HBMEC	Human Brain Microvascular Endothelial Cells (ヒト脳微小血管内皮細胞)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (ヒト臍帯静脈内皮細胞)
ICAM-1 and -2	Intercellular Adhesion Molecules -1 and -2, aka CD54 (細胞接着分子-1 及び 2、CD54)
ICV	Intracerebroventricular (脳室内)
IFN- α	Interferon- α (インターフェロン- α)
IFN- γ	Interferon- γ (インターフェロン- γ)
IL-2	Interleukin-2 (インターロイキン-2)
IL-4	Interleukin-4 (インターロイキン-4)
IL-6	Interleukin-6 (インターロイキン-6)
IL-10	Interleukin-10 (インターロイキン-10)
IV	intravenous(ly) (静脈内)
L2K-07	Anti-CD3 murine monoclonal antibody (抗 CD3 マウスモノクローナル抗体)
K _D	Equilibrium dissociation constant (平衡解離定数)
kDa	KiloDalton (キロダルトン)
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen-1, aka CD11a (リンパ球機能関連抗原-1、CD11a)
MCL	Mantle cell lymphoma (マントル細胞リンパ腫)
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1 (単球走化性タンパク質-1)
MEDI-538	Blinatumomab (ブリナツモマブ)
MFI	Median fluorescence intensity (蛍光強度の中央値)

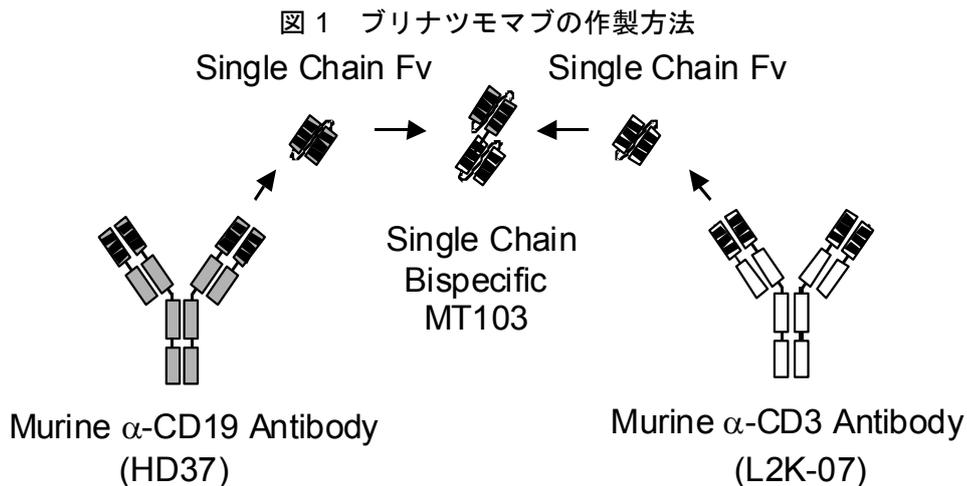
略語又は用語	定義／説明
MHC	Major histocompatibility complex (主要組織適合性遺伝子複合体)
MT102	BiTE antibody; CD3-binding single-chain Fv that recognizes EpCAM (BiTE 抗体 ; EpCAM を認識する CD3 結合性の一本鎖 Fv)
MT103	Blinatumomab (ブリナツモマブ)
pBcALL	Precursor-B cell acute lymphoblastic leukemia (前駆 B 細胞性急性リンパ芽球性白血病)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (末梢血単核球)
PBS	Phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PHA	Phytohemagglutinin (フィトヘマグルチニン)
PKH26	Fluorescent dye for membrane labeling (膜を標識する蛍光色素)
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (P-セレクトリン糖タンパク質リガンド-1)
SC	Subcutaneous(ly) (皮下)
scFv	Single-chain variable (一本鎖可変)
SEM	Standard Error of Mean (平均標準誤差)
TCR	T cell receptor (T 細胞受容体)
TNF	Tumor necrosis factor (腫瘍壊死因子)
TNF- α	Tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子- α)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1, aka CD106 (血管細胞接着分子-1、CD106)
VH	Heavy chain variable region (重鎖可変領域)
VL	Light chain variable region (軽鎖可変領域)
VLA-4	Very Late Antigen-4, aka integrin $\alpha 4\beta 1$ (最晩期抗原 4、別名インテグリン $\alpha 4\beta 1$)

1. 序論

ブリナツモマブ (MT103、AMG 103 又は MEDI-538) は、B 細胞上に発現する CD19 及び T 細胞受容体複合体の CD3 鎖に対し二重特異性 T 細胞誘導 (BiTE[®]) 作用を有する一本鎖抗体である。

CD19 は、B 細胞系に対して特異性の高い普遍的マーカーであり、正常及び悪性の B 細胞表面に発現しているが、造血幹細胞又は非造血細胞系上には発現していない。CD19 は、B 細胞性悪性腫瘍の 90% を超える細胞に、B 細胞性リンパ球性白血病 (B-ALL) では 100% の細胞に高レベルで発現している (Wang et al, 2012 ; Raponi et al, 2011) 。ブリナツモマブは、T 細胞と標的細胞を一過性に架橋し、その結果 T 細胞を活性化することで標的細胞を傷害するように設計されている。

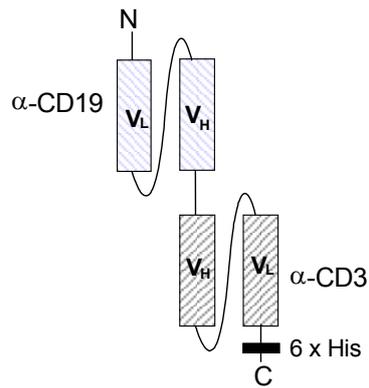
ブリナツモマブは、2 つの異なる抗原特異性を有するモノクローナル抗体から遺伝子工学的手法により作製した、分子量 54 キロダルトン (kDa) の非グリコシル化単量体抗体である。ブリナツモマブは、CD3 及び CD19 を認識する 2 つのマウス一本鎖可変 (scFv) 領域が共有したものである。CD19 を認識するマウスモノクローナル抗体である HD37 の可変部 (Fv) を scFv に変換し、T 細胞受容体関連複合体の CD3 鎖と選択的に結合するマウスモノクローナル抗体である L2K-07 の Fv 断片に由来する scFv と共有結合させた (図 1) 。これら 2 つの抗体由来の融合 scFv 断片は、504 個のアミノ酸からなる 1 本のポリペプチド鎖を形成する。



Blinatumomab was genetically engineered from scFvs of the two murine monoclonal antibodies HD37 (anti-CD19) and L2K-07 (anti-CD3).

ブリナツモマブのドメイン構造は、アミノ末端に CD19 結合 Fv を、カルボキシ末端に CD3 結合 Fv を有する。グリシン及びセリンのアミノ酸残基からなるフレキシブルリンカーにより、2 つの Fv を連結した。得られた 54 kDa の二重特異性分子のドメイン構造を図 2 に示す。

図2 ブリナツモマブのドメイン構造

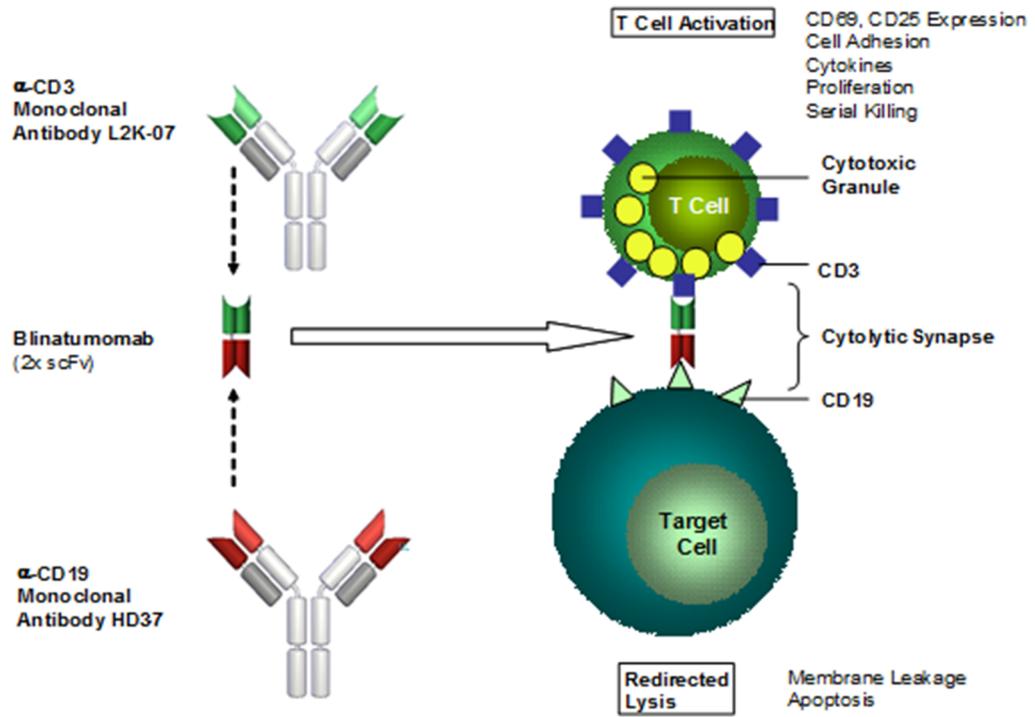


The immunoglobulin domains of heavy (V_H) and light chain variable regions (V_L) are shown as boxes. Connecting lines represent glycine/serine linkers. N, amino terminus; C, carboxyl terminus; 6 x His, hexahistidine sequence.

ブリナツモマブは、細胞傷害性 T リンパ球を特異的にリダイレクトすることにより CD19 陽性細胞を殺傷する (Dreier et al, 2002 ; Löffler et al, 2000) 。ブリナツモマブは、標的細胞を殺傷するために、既に抗原刺激を受けた CD8 陽性又は CD4 陽性 T 細胞を動員する。ブリナツモマブの抗腫瘍活性は、標的細胞上の主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) クラス I 分子を認識する特異的 T 細胞受容体 (TCR) を有する T 細胞、あるいは通常の T 細胞ペプチド抗原の提示及び処理とは関連しない。したがって、ブリナツモマブの薬理活性は、腫瘍が免疫系から逃れるための機序 (MHC クラス I 発現のダウンレギュレーション、ペプチド抗原処理、及び CD28 を刺激するなどの共刺激分子の発現) による影響を受けることはない。

ブリナツモマブの T 細胞活性化過程の一環として、T 細胞と CD19 陽性標的細胞との間に細胞溶解性の免疫シナプスを形成し (図 3) (Offner et al, 2006) 、T 細胞から小孔形成タンパク質であるパーフォリン及びアポトーシス誘導タンパク分解酵素であるグランザイム B を放出させる (Wong et al, 2013 ; 103-PCD-0063 試験) 。ブリナツモマブによる T 細胞活性化は、標的細胞に対する細胞傷害性タンパクの放出を誘発するだけでなく、一過性の炎症性サイトカインの産生及び T 細胞の増殖も引き起こす。ブリナツモマブによる T 細胞増殖には、標的細胞の存在が必要である。

図3 細胞溶解性免疫シナプスの形成によるブリナツモマブ介在性のT細胞活性化による腫瘍細胞のリダイレクト細胞溶解



2. まとめ

ブリナツモマブの非臨床薬理試験を *in vitro* 及び *in vivo* にて実施し、T細胞による CD19 陽性細胞溶解の作用機序並びに、成人及び小児の急性リンパ性白血病 (ALL)、マントル細胞リンパ腫 (MCL) 及びバーキットリンパ腫の異種移植モデルでの有効性について検討した。

ブリナツモマブは、T細胞表面の CD3 並びに悪性及び正常 B細胞表面の CD19 と結合する。ブリナツモマブモノマーは、CD19 に比較的高い親和性 (平衡解離定数 $[K_D]=1.49 \times 10^{-9}$ mol/L) で結合するのに対し、T細胞上の CD3 には CD19 よりも低い親和性 ($K_D=2.6 \times 10^{-7}$ mol/L) で結合した。ブリナツモマブの効力発現には、標的細胞及び T細胞双方への同時結合が必要であり、それに続く、活性化 T細胞による標的腫瘍細胞の溶解過程は、生体で起こる細胞傷害性 T細胞の反応に類似している (Löffler et al, 2000 ; Brandl 2007 ; Hoffmann et al, 2005 ; Dreier et al, 2002)。ブリナツモマブは、免疫シナプスを形成させ、T細胞から標的細胞に向けて細胞傷害性顆粒タンパク質を放出させる。放出された T細胞由来の小孔形成タンパク質であるパーフォリン及びグランザイムが標的細胞のアポトーシスを引き起こす。ブリナツモマブの効力は、エフェクター細胞と標的細胞の幅広い比率 (E:T) において発現し、効率的な T細胞の活性化及び腫瘍細胞の溶解に必要なとされる E:T = 1:10 よりも高い比でも効力を示した。ブリナツモマブは強力な作用を有し、*in vitro* 試験における腫瘍細胞傷害活性の 50%効果濃度 (EC₅₀) 値は 1~1000 pg/mL (0.018~18 pmol/L) の範囲であった (Dreier et al, 2002)。

ブリナツモマブは、様々な白血病及びリンパ腫を用いた *in vivo* モデル (NALM-6 ヒト前駆 B細胞性白血病細胞、小児急性リンパ芽球性白血病の SEMc 細胞及び Raji バーキットリンパ腫細胞等) において腫瘍の増殖を有意に抑制した。また、ブリナツモマブは NALM-6 腫瘍の退縮を誘導し、NALM-6 及び Granta-519 マントル細胞リンパ腫の同所性腫瘍移植モデルにおいて、生存期間を延長した (Dreier et al, 2003)。

腫瘍細胞を殺傷する過程において、ブリナツモマブは新たに活性化された T細胞から炎症性サイトカインの産生及び放出を誘導することが、*in vitro* 及び *in vivo* において示された。例えば、ブリナツモマブにより活性化された T細胞から、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ) 及びインターロイキン-2 (IL-2) の放出が認められている。ブリナツモマブにより活性化された T細胞によるサイトカインの放出はデキサメタゾンにより減少するものの、ブリナツモマブの細胞傷害活性はほとんど影響を受けないことが *in vitro* 試験において確認された。

ブリナツモマブ誘導 T細胞活性化に伴い放出されるサイトカインは、副次的薬理作用を引き起こす可能性がある。*In vitro* 試験において、腫瘍壊死因子 (TNF) の中和剤の 1つであるエタネルセプトが、ブリナツモマブによる接着分子 (細胞接着分子-1 [ICAM-1]、血管細胞接着分子-1 [VCAM-1]) の発現上昇や内皮細胞によるサイトカインの放出をほぼ完全に阻害することが確認された。同様に、動的フローチャンバーを用いた試験において、pentosan polysulfate (P-セレクトリンに結合して P-セレクトリン糖タンパク質リガンド-1 [PSGL-1] への結合を阻害)、ミノサイクリン (リンパ球機能関連抗原-1 [LFA-1] を阻害して ICAM-1/2 への結合を減弱)、及びナタリズマブ (最晩期抗原 4 [VLA-4] に結合して VCAM-1 への結合を阻害) は、ブリナツモマブにより誘導される内皮細胞上での T細胞ローリングの減速及び内皮細胞の接着分子の発現上昇を阻害した。

安全性薬理試験として、マウス CD19 及びマウス CD3 に特異的に結合する代替 BiTE 抗体である muS103new の呼吸系及び中枢神経系への影響はマウスを用い、ブリナツモマブの心血管系及び呼吸系への影響はイヌを用いて検討した。

非臨床薬理試験の一覧を表 1 に示す。

表 1 非臨床薬理試験一覧

Study No.	Study Title	Status
Primary Pharmacodynamics		
103-PCD-0065	In Vitro Characterization of Binding, Cytotoxicity and Mode of Action	Non-GLP
103-PCD-0061	MT103-Mediated Redirected Lysis of B Cell Lymphoma Cell Lines	Non-GLP
103-PCD-0100	In vitro Pharmacology Study of MT103 Material produced by Lonza and MedImmune	Non-GLP
103-PCD-0076	MT103-Mediated Redirected Lysis of Human Pediatric B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines	Non-GLP
103-PCD-0067	Impact of Effector-To-Target Cell Ratio on MT103-Mediated Redirected Lysis and T Cell Activation	Non-GLP
103-PCD-0063	MT103 Mediated Dose and Time Dependent Expression of Granzyme B	Non-GLP
103-PCD-0057	Anti-Tumor Activity of MT103 in a Subcutaneous NALM-6 Xenograft Model in NOD/SCID Mice; Dose-Finding Study	Non-GLP
103-PCD-0058	Impact of Delayed Treatment Initiation on Anti-Tumor Activity of MT103 in a Subcutaneous NALM-6 Xenograft Model in NOD/SCID Mice	Non-GLP
103-PCD-0059	Specificity of Antitumor Activity of MT103 and MT102 in a Subcutaneous NALM-6 Xenograft Model in NOD/SCID Mice	Non-GLP
103-PCD-0099	Efficacy Evaluation of AMG 103 BiTE Antibody in an SEMc Xenograft Model	Non-GLP
103-PCD-0097	Efficacy Evaluation of AMG 103 BiTE Antibody in a Raji Xenograft Model	Non-GLP
R20-0026	AMG 103 Pharmacology Report: Evaluation of the In Vitro Anti-tumor Activity of AMG 103 in a Raji Tumor Formation Model in NOD/SCID Mice after Intravenous Bolus Administration	Non-GLP
103-PCD-0060	Anti-Tumor Activity of MT103 in a Disseminated NALM-6 Xenograft Model in NOD/SCID Mice; Dose-Finding Study	Non-GLP
103-PCD-0098	Evaluation of AMG 103 Anti-tumor Activity in an Orthotopic Granta-519 Advanced Stage Tumor Model in NOD/SCID Mice	Non-GLP
103-PCD-0007	Determination of the Relevant Animal Species for MT103 Toxicology Studies	Non-GLP
103-PCD-0040	Species Cross-Reactivity Study of MEDI-538 to Peripheral Mononuclear Cells in African Green Monkey, Marmoset, Squirrel Monkey, Mouse and Rat Using Flow Cytometry	Non-GLP
103-PCD-0066	In vitro Characterization of MT103 in Human and Chimpanzee Test Systems	Non-GLP
DR-RE-103-001	muS103new BiTE Antibody: Generation of a Murine-Like MT103 Surrogate With Paired Affinities	Non-GLP
103-PCD-0094	Comparison of the Pharmacodynamic Effects of MT103 and its Murine Surrogate muS103new In Vitro	Non-GLP
Secondary Pharmacodynamics		
R20-0012	T Cell Activation by AMG 103 Alters Expression of Adhesion Molecules on Endothelial Cells	Non-GLP
R20-0011	AMG 103-induced T Cell-adhesion to Endothelial Cells and its Mitigation by Anti-adhesive Agents	Non-GLP
Safety Pharmacology		
103-PCD-0077	Evaluation of the Effect of muS103new on Respiratory Function in the Conscious Mouse (Whole body Plethysmography) Following Intravenous (Bolus) Administration	GLP
103-PCD-0078	Evaluation of the Effects of muS103new on Behavior using the Primary Observation (Irwin) Test in the Mouse Following Intravenous (Bolus) Administration	GLP
103-PCD-0103	Exploratory 7 Day Continuous Intracerebroventricular Infusion of muS103new to BALB/c Mice	Non-GLP
103-PCD-0006	Examination of the Influence of MT103 on Several Cardiovascular Parameters and the Respiration in Anaesthetized Beagle Dogs Following Intravenous Administration	GLP
Pharmacodynamic Drug Interactions		
103-PCD-0071	Influence of Dexamethasone and Indomethacin on MT103-mediated Cell Lysis and Cytokine Release	Non-GLP

GLP = Good Laboratory Practice; Blinatumomab = MT103, AMG 103, MEDI-538; Murine surrogate for blinatumomab = muS103new

3. 効力を裏付ける試験

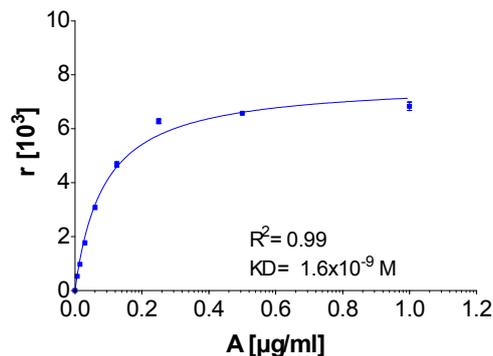
以下に、白血病及びリンパ腫モデルにおけるブリナツモマブの効力を裏付けるための非臨床薬理試験の概要を示す。

3.1 ブリナツモマブと CD3 又は CD19 との相互作用特性

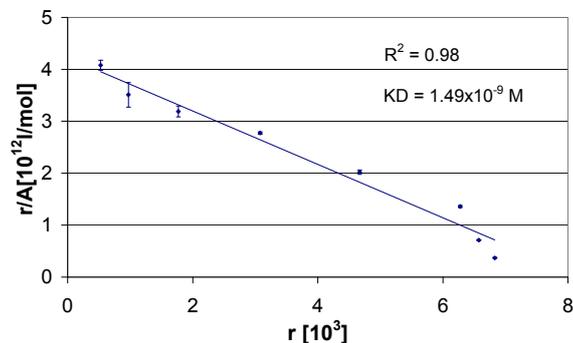
2つの標的抗原（CD19 及び CD3）へのブリナツモマブの結合親和性を検討するため、CD19 及び CD3 を発現している細胞を用い、飽和結合及び競合結合実験をそれぞれ実施した。蛍光色素で標識した二次試薬又は蛍光色素で標識したブリナツモマブのいずれかを用い、標的と結合したブリナツモマブをフローサイトメトリーにより検出した（103-PCD-0065 試験）。ブリナツモマブの CD19 に対する K_D は、ヒト前駆 B 細胞性白血病細胞株である NALM-6 を用いて測定した。また、CD3 に対する結合親和性は精製したヒト T 細胞を用いて測定した。双方とも、非放射性的の蛍光活性化細胞選別法（FACS）を用い、飽和結合曲線の解析により K_D 値を推定した。結果、ブリナツモマブモノマーは、CD19 に対し K_D 値 1.49×10^{-9} mol/L（図 4）で、CD3 に対し K_D 値 2.6×10^{-7} mol/L（図 5）で結合した。

図 4 ブリナツモマブモノマーの CD19 結合親和性の解析

A. NALM-6 Binding



B. Scatchard Plot

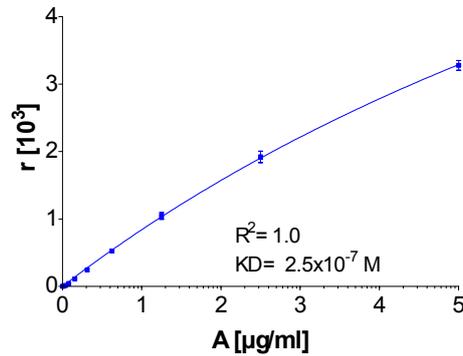


(A) Representative saturation binding of blinatumomab on NALM-6 cells, K_D and B_{max} analysis. Bound molecules of blinatumomab per cell were quantified using Qifikit (Dako) reference beads; B_{max} represents maximum number of bound blinatumomab molecules per cell. Error bars represent the standard deviation of triplicate determinations. (B) Representative Scatchard plot analysis of blinatumomab on NALM-6 cells. Error bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

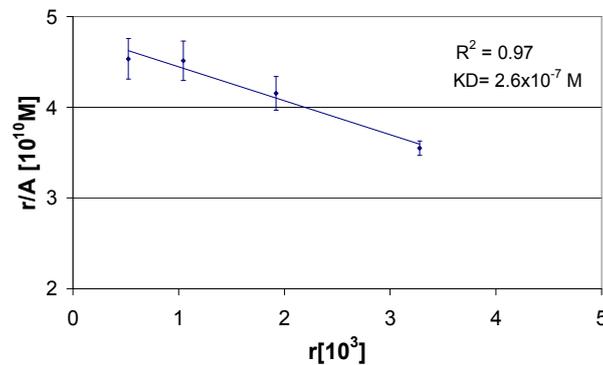
Source: Research Report 103-PCD-0065

図 5 ブリナツモマブモノマーの CD3 結合親和性の解析

A. T Cell Binding



B. Scatchard Plot



(A) Representative saturation binding of blinatumomab on isolated T cells, KD and Bmax analysis. Bound molecules of blinatumomab per cell were quantified using Qifikit (Dako) reference beads; Bmax represents maximum number of bound blinatumomab molecules per cell. Error bars represent the standard deviation of triplicate determinations. (B) Representative scatchard plot analysis of blinatumomab on isolated T cells. Error bars represent the standard deviation of triplicate determinations.

Source: Research Report 103-PCD-0065

CD19は正常及び悪性のヒト B 細胞表面に発現している。そこで、正常ヒト末梢 B 細胞及びヒト B 細胞リンパ腫由来細胞株の双方に対するブリナツモマブの結合性について検討した

(103-PCD-0065 試験)。ブリナツモマブは、ヒト B 細胞リンパ腫の CD19 陽性細胞由来の悪性 B 細胞株 (Raji 及び NALM-6) と濃度依存的に結合した。また、ブリナツモマブは正常のヒト B 細胞を用いた試験においても結合することが示された。

ブリナツモマブの結合特異性を、CD19 及び CD3 のいずれも発現していないチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株を用いて検討した (103-PCD-0065 試験)。ブリナツモマブは、NALM-6 細胞へ濃度依存的に結合したのに対し、CHO 細胞へは結合しなかった。抗 CD3 及び抗 CD19 scFv ドメインに抗原特異性を有するモノクローナル抗体を用いて、NALM-6 及びヒト T 細胞に対しブリナツモマブの結合が特異的に阻害されるかについて検討した。抗 CD19 モノクローナル抗体である HD37 と細胞を共培養することにより、NALM-6 細胞へのブリナツモマブの結合は阻害された。一方、HIB22 (抗 CD22 抗体 ; NALM-6 細胞に結合する) 及び Panorex[®] (抗上皮細胞接着分子抗体 [抗 EpCAM 抗体 ; NALM-6 細胞に結合しない]) は、ブリナツモマブの結合に影響を及ぼさなかった。同様に、ヒト T 細胞へのブリナツモマブの結合は、抗 CD3 モノクローナル抗体 L2K-07 によ

り阻害されたが、BRA 55/2.453（抗 CD45 抗体；T 細胞に結合する）又は Panorex[®]（抗 EpCAM 抗体；T 細胞に結合しない）による阻害は認められなかった。

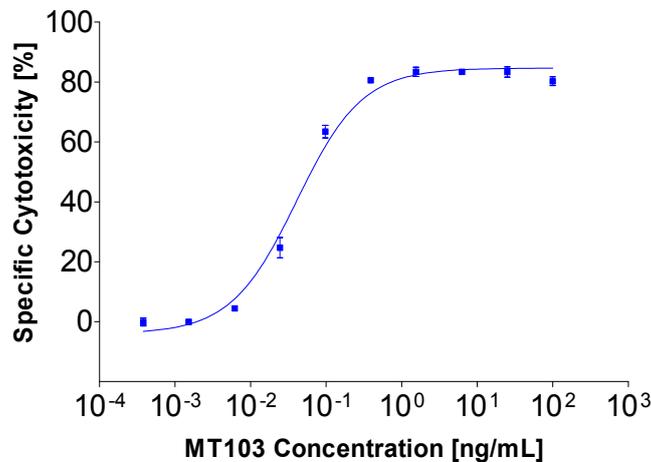
以上のことから、ブリナツモマブが期待する生物活性を発現するために必須と考えられる CD19 陽性 B 細胞及び CD3 陽性 T 細胞の双方に対する選択的な結合が確認された。ブリナツモマブの結合は、CD3 又は CD19 を発現していないヒトの細胞及び CHO 細胞では確認されなかった。

3.2 ブリナツモマブの in vitro 生物活性

3.2.1 ブリナツモマブの機能的特異性の検討

CD19 陽性ヒト腫瘍細胞株パネルを用い、ブリナツモマブの活性について検討した。図 6 に、前駆 B 細胞性白血病細胞株である NALM-6 細胞を用いた代表的な濃度反応曲線を示した。CD3 陽性 T 細胞を健康人ドナーの末梢血単核球（PBMC）から分離し、様々な濃度のブリナツモマブ存在下で標的細胞と共に培養した。24 時間培養した後、フローサイトメトリーにより特異的細胞溶解を測定した（103-PCD-0065 試験）。ブリナツモマブは NALM-6 細胞に対し、濃度依存的な細胞傷害活性を示した（図 6）。

図 6 CD19 陽性前駆 B 細胞性白血病細胞株 NALM-6 細胞に対するブリナツモマブ介在性細胞傷害活性



Representative dose-response curve of blinatumomab-mediated redirected lysis of NALM-6 target cells. CD3⁺ effector cells isolated from a healthy donor were co-cultured with PKH-26-labeled target cells in the presence of the blinatumomab concentrations indicated. After 24 hours, specific cell lysis was determined by means of a flow cytometry-based cytotoxicity assay. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicate determinations.

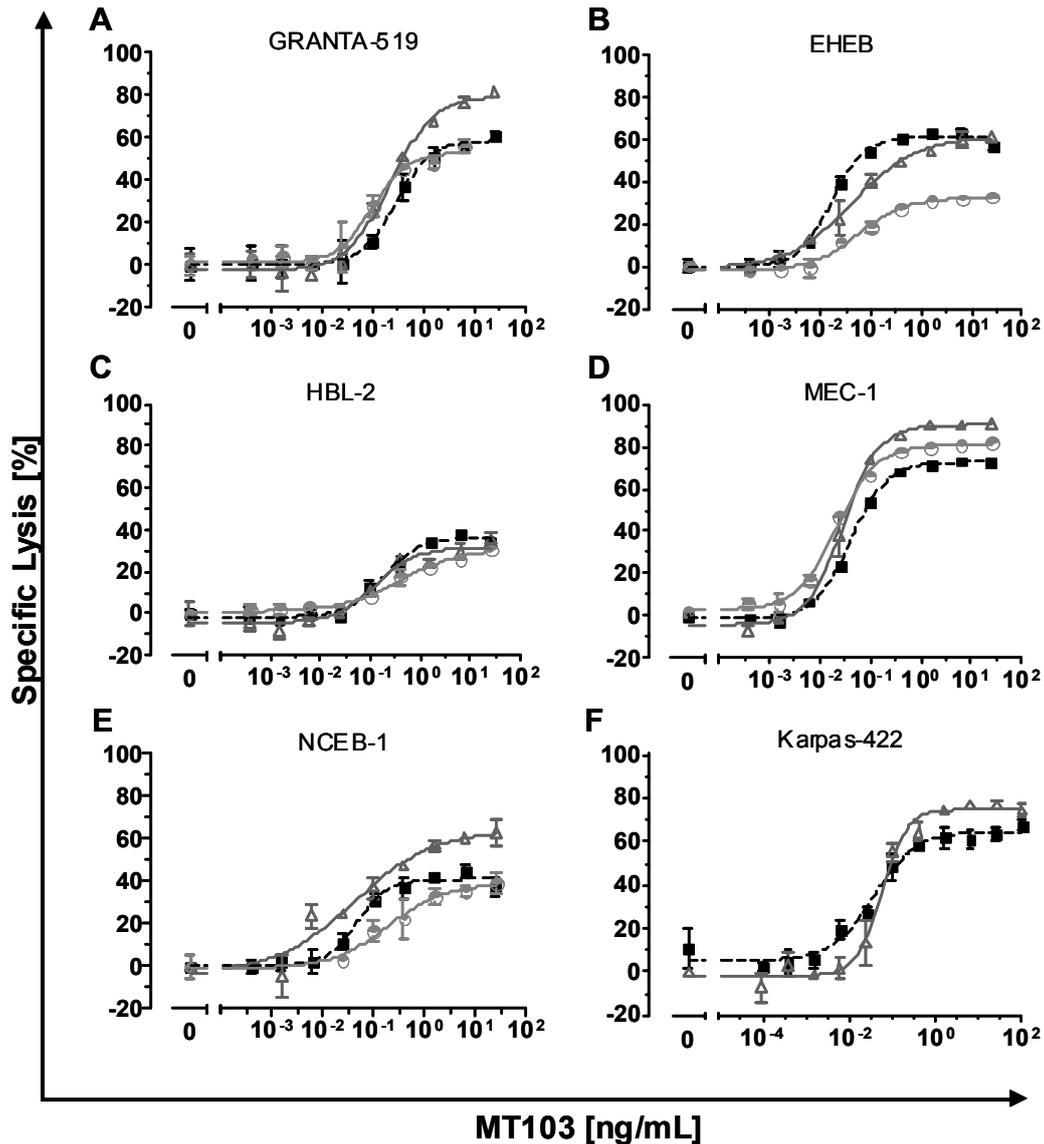
Source: Research Report 103-PCD-0065

マントル細胞リンパ腫（Granta-519、HBL-2、NCEB-1）、慢性リンパ性白血病（EHEB、MEC-1）及び濾胞性リンパ腫（Karpas-422）を含む様々なタイプのヒト B 細胞悪性腫瘍に由来する CD19 陽性細胞株においても、同様な結果が得られた（103-PCD-0061 試験、103-PCD-0100 試験）。

検討した細胞株では、ブリナツモマブによって媒介される T 細胞による細胞溶解の程度及びブリナツモマブの効力は、異なるドナーから分離した T 細胞間で異なっていた（図 7）。このばらつきは、個々のドナーより分離された T 細胞の細胞傷害能の差に起因する可能性が高いと考えられた。

加えて、ブリナツモマブにより媒介される個々の標的細胞リダイレクト細胞溶解作用の EC_{50} 値のばらつきは、細胞表面上での CD19 の発現量の違いによって生じた可能性があり、CD19 の発現量が高い場合に EC_{50} 値は低い値となる (Laszlo et al, 2014)。さらに、例えば抗アポトーシス遺伝子の変異が原因で、ブリナツモマブによるアポトーシス誘導に対する標的細胞の感受性が大きく異なった可能性も考えられる (Hanahan and Weinberg 2011)。

図 7 6 種類の B 細胞株におけるブリナツモマブ介在性細胞溶解
(マントル細胞、濾胞性リンパ腫又は B 細胞慢性リンパ球性白血病由来)



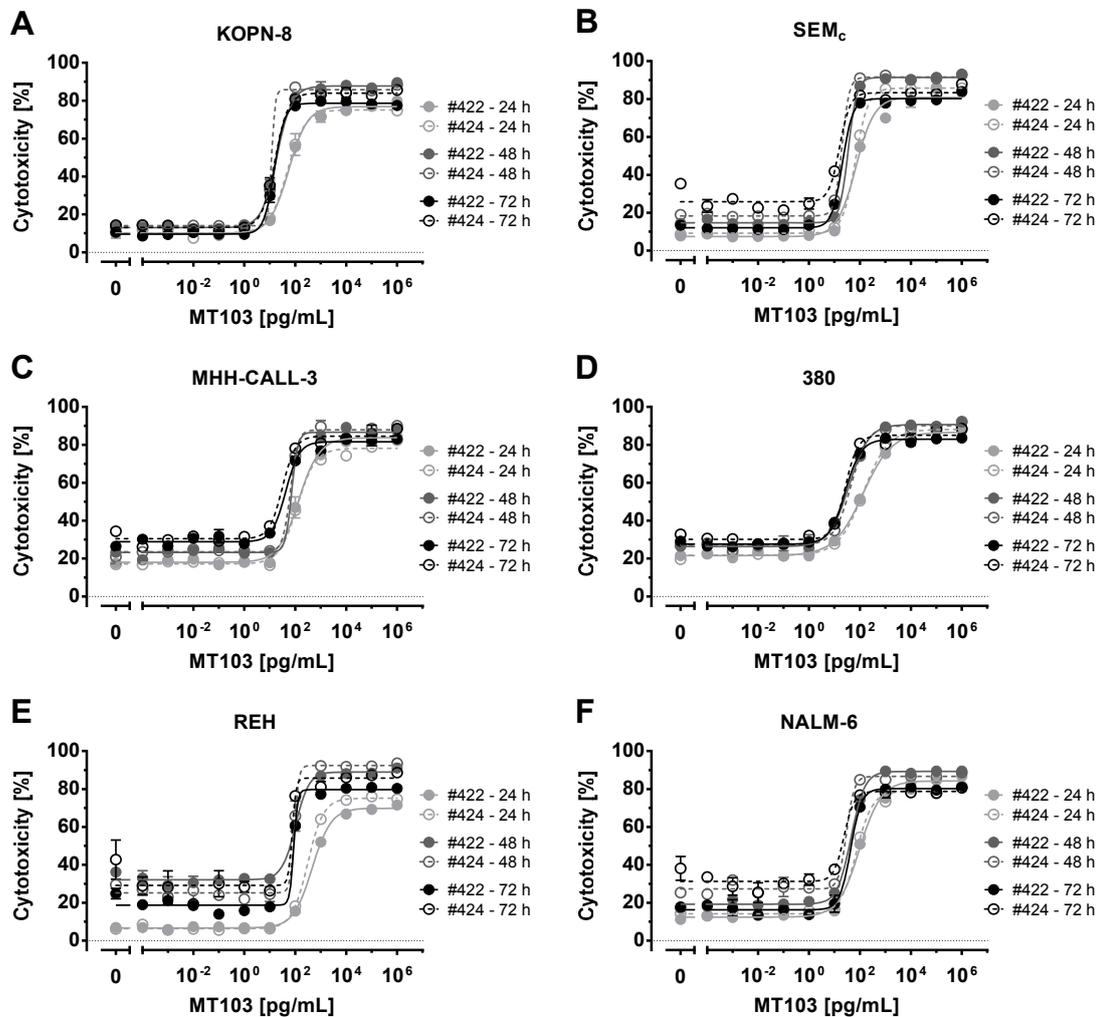
Human lymphoma cell lines GRANTA-519 (A), EHEB (B), HBL-2 (C), MEC-1 (D), NCEB-1 (E) and Karpas-422 (F) were incubated in the presence of freshly isolated PBMC from two or three healthy donors, at an E:T ratio of 10:1 and increasing concentrations of blinatumomab. PBMC of donors #381 (square), #511 (open triangle) and #515 (circle) were used in assays A-F and #584 (square) and #109 (open triangle) in assay. Target cell lysis was determined by flow cytometry as the percentage of target cells becoming propidium iodide-positive after 16 hours (20 hours for the assay with Karpas-422). Each data point represents the mean of duplicates (A - E) or triplicates (F) \pm SEM.

Source: Research Report 103-PCD-0061

小児の B 細胞として 6 種類の急性リンパ芽球性白血病細胞株を用い、ブリナツモマブ介在性のリダイレクト細胞溶解作用について評価した (103-PCD-0076 試験)。

ブリナツモマブは、異なる腫瘍から得た 6 種類すべての CD19 陽性標的細胞のリダイレクト細胞溶解を促進し、最大特異的溶解率は 47%~77%であった。EC₅₀ 値は、15~462 pg/mL (0.27~8.4 pmol/L) の範囲であった (図 8)。ブリナツモマブにより媒介される標的細胞の溶解の程度は、細胞表面上の CD19 の密度の増加に伴い増大し、EC₅₀ 値は低下した。標的細胞存在下で、ブリナツモマブは CD8 陽性及び CD4 陽性 T 細胞の時間及び濃度依存的な活性化を誘導した。これは、活性化マーカーである CD25 及び CD69 の発現上昇により示された (図 9)。発現上昇の EC₅₀ 値は CD4 陽性 T 細胞よりも CD8 陽性 T 細胞の方が低かった。ブリナツモマブは、これらの腫瘍細胞株と共培養した際、活性化された T 細胞からの IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 及び IFN- γ の放出も誘導した。

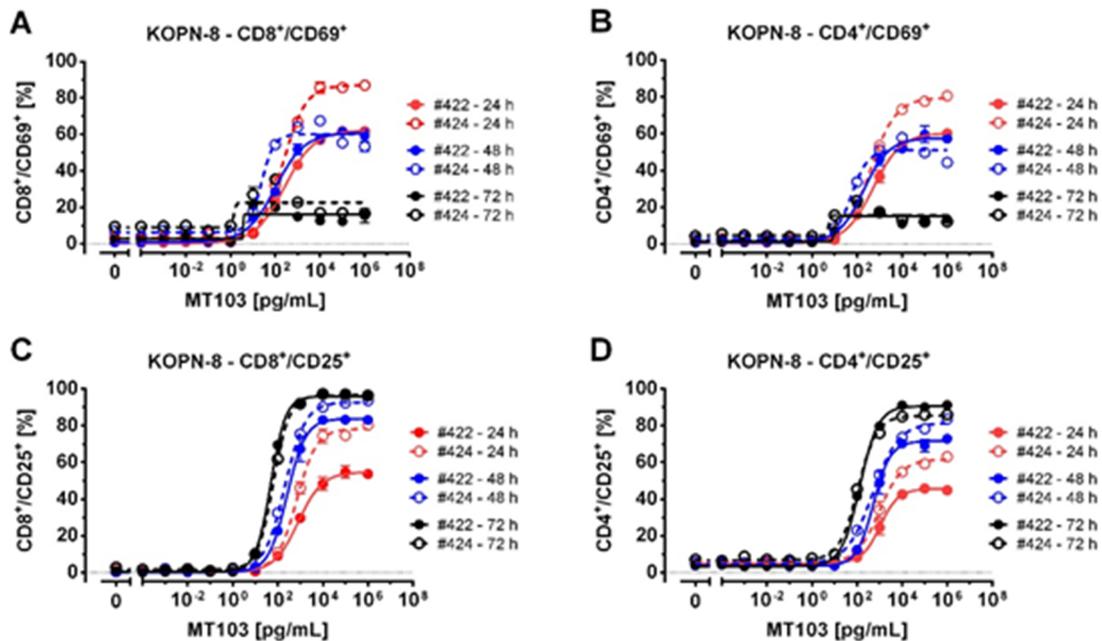
図 8 前駆 B 細胞 ALL 細胞株のブリナツモマブ介在性リダイレクト細胞溶解



The pBcALL cell lines KOPN-8 (A), SEMc (B), MHH-CALL-3 (C), 380 (D), REH (E) and NALM-6 (F) were incubated with human PBMC at an E:T ratio of 10:1 and serial dilutions of blinatumomab. Cytotoxicity was determined by flow cytometry of propidium iodide positive cells as the percentage of target cells at 24 h, 48 h, and 72 h. Data points represent the mean of duplicate measurements. Error bars represent the SEM.

Source: Research Report 103-PCD-0076

図9 ブリナツモマブによる CD8 陽性及び CD4 陽性 T 細胞の活性化



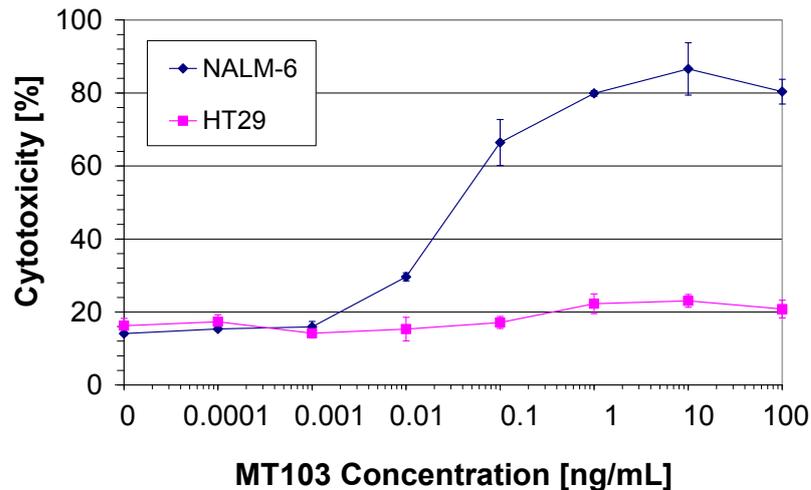
The pBcALL cell line KOPN-8 was incubated with human PBMC at an E:T ratio of 10:1 and serial dilutions of blinatumomab. Activation of CD8⁺ (A, C) and CD4⁺ (B, D) T cells was analyzed in 24, 48 and 72 h FACS-cytotoxicity assays (PBMC donors: #422, #424). After assay incubation cells were stained with directly conjugated antibodies against CD4, CD8, CD69 and CD25 and analyzed by flow cytometry with a BD FACSCanto™ II instrument. Data points represent the mean of duplicate measurements. Error bars represent the SEM.

Source: Research Report 103-PCD-0076

ブリナツモマブ活性の選択性について、CD19を発現していない癌細胞を用いて検討した (103-PCD-0065 試験)。

図10に示すとおり、ブリナツモマブはヒト結腸癌細胞株 HT29 に対して細胞傷害活性を示さなかった。CD19発現細胞で得られる細胞溶解の EC₅₀ 値よりも 1000 倍程度高濃度 (100 ng/mL) のブリナツモマブを曝露した場合でも、HT29 細胞の生存率に変化はみられなかった。陽性対照として NALM-6 細胞を用いた試験を平行して実施したが、NALM-6 細胞はブリナツモマブに対して高い感受性を維持していた。これらの結果は、ブリナツモマブが CD19 発現標的細胞に対して細胞傷害活性を発現するよう T 細胞を選択的にリダイレクトすることを示している。

図 10 CD19 陰性細胞株 HT29 に対するブリナツモマブによる細胞傷害活性の欠如



PBMC effector cells were mixed with PKH26-labeled CD19⁺ NALM-6 (blue diamonds) or CD19⁻ HT29 (magenta squares) target cells in the presence of the blinatumomab concentrations indicated. After 16 hours, specific cell lysis was determined by means of a flow cytometry-based cytotoxicity assay. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicate determinations.

Source: Research Report 103-PCD-0065

ブリナツモマブが B 細胞傷害作用を発揮するために CD19 及び CD3 双方への結合が必要であることを示す目的で、EpCAM を標的とする BiTE 抗体 (MT102) を用い、CD19 陽性細胞株に対する傷害活性を検討した (103-PCD-0065 試験)。MT102 は、ブリナツモマブと同一の CD3 結合一本鎖 Fv を有するが、もう一方の一本鎖 Fv は CD19 ではなく EpCAM を認識する。MT102 が EpCAM 陽性結腸癌細胞株である HT29 に対し、強力な細胞傷害能を示したのに対し、ブリナツモマブは本細胞に対して活性を示さなかった。同一の試験条件下において、MT102 は CD19 陽性 NALM-6 細胞に対して活性を示さなかった。これらの結果は、BiTE 抗体が標的を発現している細胞の存在下においてのみ、細胞傷害作用を発揮する特異性の高い抗体であることを示している。

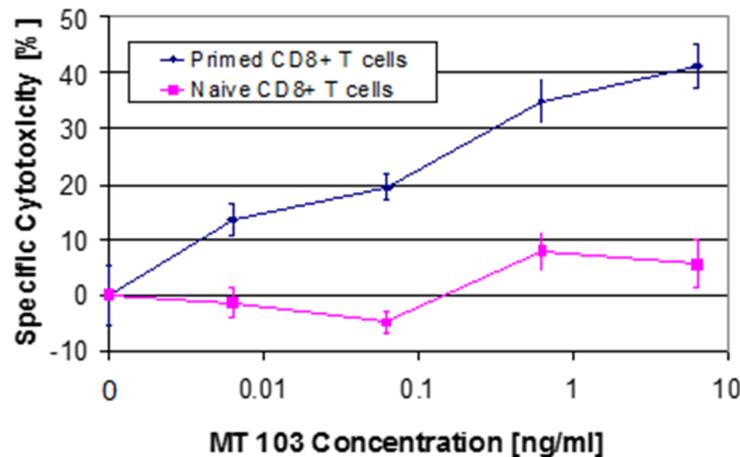
ブリナツモマブを構成する 2 つの異なる可変領域をそれぞれ有するモノクローナル抗体を用いた競合実験を実施し、ブリナツモマブ介在性の細胞傷害性 T 細胞による NALM-6 細胞排除の特異性についてさらに検討した (103-PCD-0065 試験)。抗 CD19 抗体である HD37 存在下では、HD37 非存在下で見られた細胞傷害活性と同等の活性を得るために、より高濃度のブリナツモマブが必要であった。すなわち、HD37 はブリナツモマブの活性を顕著に抑制した。同様に、もう一方の抗 CD3 抗体である L2K-07 存在下では、L2K-07 濃度依存的にブリナツモマブの細胞傷害活性が顕著に低下した。これは、ブリナツモマブにより媒介される細胞傷害活性が、ブリナツモマブの CD19 陽性標的細胞及び CD3 陽性エフェクター細胞双方への特異的な結合に依存していることを示している。

3.2.2 T 細胞依存的なブリナツモマブの細胞傷害活性

TCR/CD3 複合体を有する T 細胞は、CD8 陽性 (MHC クラス I 拘束性) 及び CD4 陽性 T 細胞 (MHC クラス II 拘束性) に分類される。この 2 つの T 細胞亜集団のブリナツモマブ介在性細胞傷害への寄与を検討する目的で、PBMC から CD4 陽性及び CD8 陽性細胞を分離し、ブリナツモマブ存在下で NALM-6 細胞と共培養した (103-PCD-0065 試験)。その結果、ブリナツモマブによる

B細胞傷害作用は主にCD8陽性T細胞により媒介された。まず、抗原刺激を受けていない又は抗原刺激を受けた感作CD8陽性T細胞によるブリナツモマブ介在性細胞傷害活性を評価するために、抗原刺激を受けていない、ナイーブなCD8陽性T細胞（CD45RA）又は抗原刺激を受けた、感作CD8陽性T細胞（CD45RO）をPBMCから分離した。ナイーブCD45RA/CD8陽性T細胞では、顕著なNALM-6細胞の溶解は見られず、一方で、感作CD45RO/CD8陽性T細胞ではNALM-6細胞が傷害された（図11）。これらの結果から、共刺激シグナル非存在下では、感作されたT細胞のみが、ブリナツモマブによる細胞溶解を引き起こすことが示唆された。次に、CD4陽性T細胞を評価したところ、CD4陽性T細胞も標的B細胞に対するブリナツモマブの細胞傷害作用を媒介したが、この作用はCD8陽性T細胞より弱かった（図12）。NALM-6細胞を用い4時間まで検討したが、CD4陽性細胞の活性は弱く、標的細胞の約20%しか溶解しなかった。しかし、CD4陽性細胞により傷害を受けるNALM-6細胞は、16時間までの観察により顕著に増加し、1 ng/mL未満のEC₅₀値で標的細胞の40%以上が溶解した。この結果は、ブリナツモマブが長時間存在する場合、CD4陽性T細胞も細胞傷害作用に寄与することを示している（103-PCD-0065試験）。

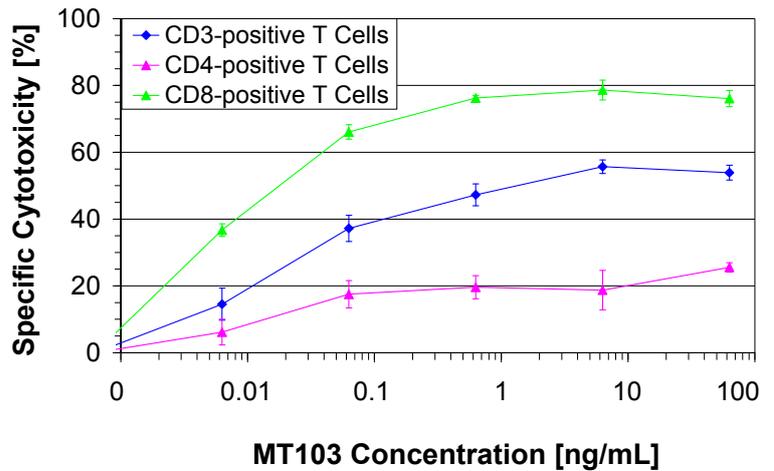
図11 ナイーブ及び感作CD8陽性T細胞に対するブリナツモマブ介在性の特異的細胞傷害活性の比較



NALM-6 target cells were cocultivated with CD8⁺CD45RA⁺ effector cells (magenta) or CD8⁺CD45RO⁺ effector cells (blue) at an E:T ratio of 1:1 and the indicated concentrations of blinatumomab for 4 h. Cytotoxicity was determined by flow cytometry of propidium iodide-positive cells as the percentage of target. Data points represent the mean of duplicate measurements. Error bars represent the SEM.

Source: Research Report 103-PCD-0065

図 12 CD3 陽性、CD4 陽性及び CD8 陽性ヒト T 細胞による CD19 陽性 NALM-6 細胞のブリナツモマブ介在性細胞傷害活性



PBMC enriched for CD3⁺ (blue diamonds), CD4⁺ (magenta triangles) or CD8⁺ (green triangles) effector cells were mixed with PKH26 fluorescently labeled NALM-6 cells at an E:T ratio of 5:1 in the presence of the indicated concentrations of blinatumomab. After 4 hours, specific cell lysis was determined using a flow cytometry-based cytotoxicity assay. Each data point represents the mean result of triplicate wells where 50,000 events were collected from each well. Error bars represent the SEM of triplicate determinations.

Source: Research Report 103-PCD-0065

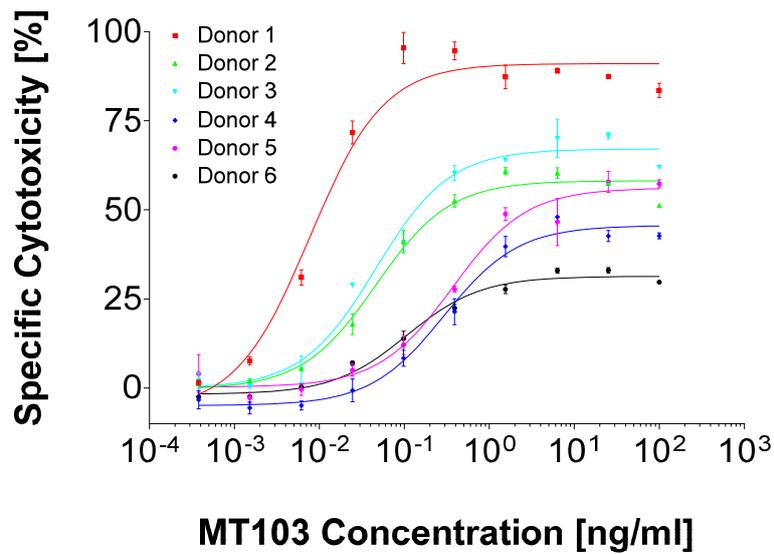
3.2.3 ブリナツモマブ介在性細胞傷害活性における T 細胞のドナー間でのばらつき

86 例のドナーから分離した T 細胞を用い、ブリナツモマブにより媒介される標的細胞のリダイレクト細胞溶解について、NALM-6 細胞及び未刺激 CD3 陽性 T 細胞を用いて 4 時間の観察で検討した (103-PCD-0065 試験)。

86 例中 6 例の T 細胞を用いた濃度反応曲線を図 13 に示す。ドナー 6 例でのブリナツモマブ介在性 NALM-6 細胞リダイレクト細胞溶解作用の EC₅₀ 値は、7~100 pg/mL (0.13~1.8 pmol/L) であった。同様に、4 時間まで観察して得られた標的細胞溶解の最大値は 25~95%程度とばらつきが大きかった (図 13)。EC₅₀ 値と細胞溶解の最大値には相関関係が認められた。

ブリナツモマブ介在性 NALM-6 細胞リダイレクト細胞溶解の EC₅₀ 値を、86 例の各 PBMC ドナーすべてから得られた濃度反応曲線より算出した。大半のドナー (74%) では、EC₅₀ 値が 10~80 pg/mL (0.18~1.45 pmol/L) であった。一部のドナー (20%) では、EC₅₀ 値が >130 pg/mL (>2.36 pmol/L) であった。

図 13 ブリナツモマブ介在性特異的細胞傷害活性に及ぼす PBMC ドナーのばらつきの影響

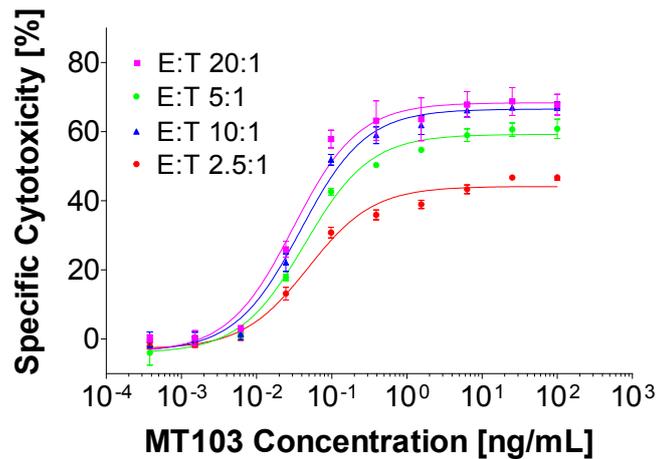


T cells isolated from PBMC of six individual donors were co-cultivated with NALM-6 target cells and serial dilutions of blinatumomab for 4 hours. BiTE[®] antibody-mediated redirected lysis of target cells was determined by a fluorochrome release assay. Error bars represent standard deviation of duplicate (donors 1 and 3) or triplicate (donors 2, 4, 5 and 6) determinations. Source: Research Report 103-PCD-0065

3.2.4 ブリナツモマブ細胞傷害活性に及ぼす E:T 比の影響

多くの抗体の細胞傷害活性は、エフェクター細胞と標的細胞を混合培養する際の比率 (E:T 比) に大きく依存する。ブリナツモマブの E:T 比依存性について、標的細胞である NALM-6 細胞と PBMC 由来のヒトエフェクター T 細胞を用いて解析した (103-PCD-0065 試験)。ブリナツモマブは、広い E:T 比にわたって作用を示した (20:1~2.5:1) (図 14)。E:T 比が低下するにつれ最大細胞溶解率は低下し、EC₅₀ 値は 31 pg/mL から 48 pg/mL へと 55% 増加した。これらの結果は、ブリナツモマブが低い E:T 比でも細胞傷害活性を発揮することを示している。

図 14 ブリナツモマブ介在性細胞傷害活性に及ぼす E:T 比の影響



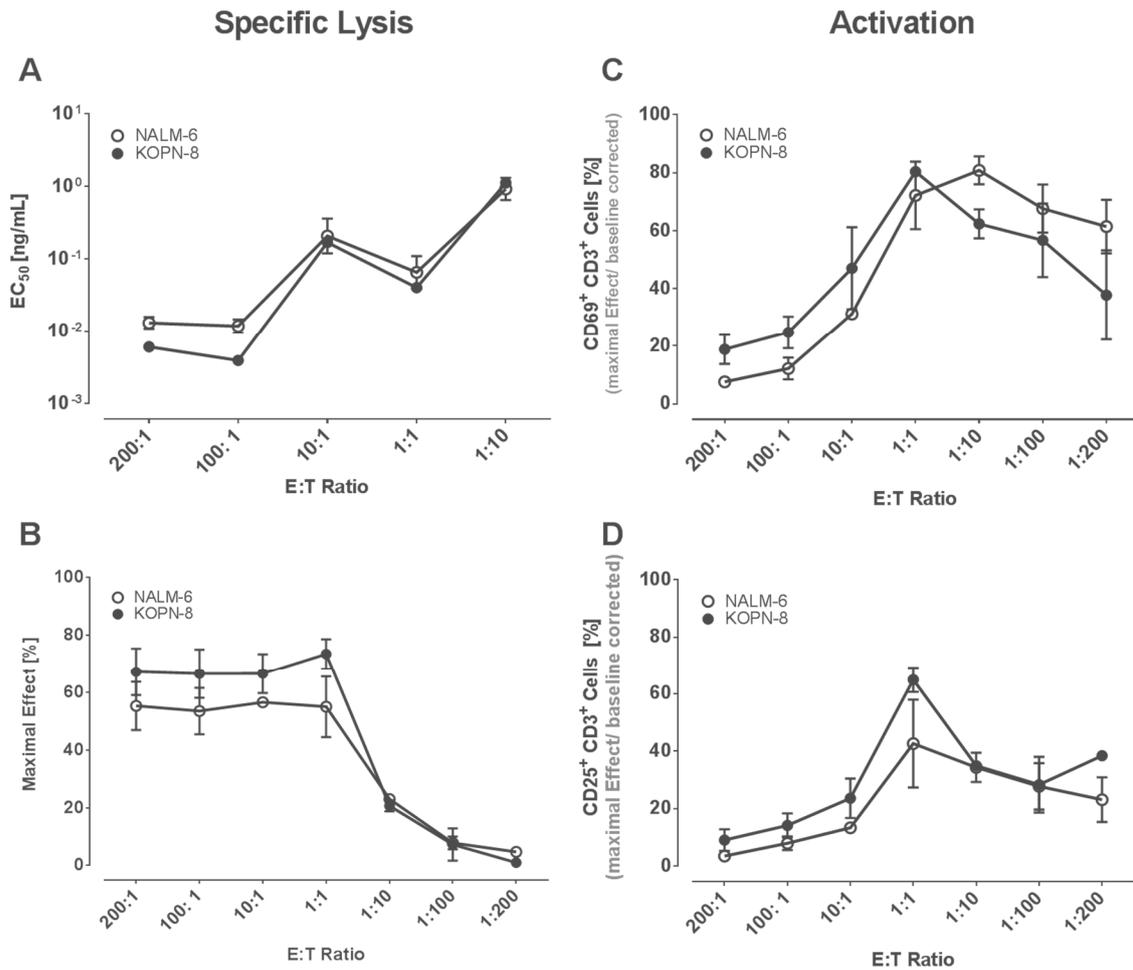
CD3⁺ T cells from PBMC were mixed with calcein AM-labeled NALM-6 cells at different E:T ratios in the presence of the blinatumomab concentrations indicated. After 4 hours, specific cell lysis was determined using a fluorochrome release-based cytotoxicity assay. Each data point represents the mean result of triplicate wells. Error bars represent SEM of triplicate determinations.

Source: Research Report 103-PCD-0065

E:T 比の範囲を 10:1 から 1:10 まで設定して行った試験では、E:T 比が 10:1 から 1:1 の範囲内では、EC₅₀ 値は同等 (10 pg/mL) であり、非常に低い E:T 比である 1:5 及び 1:10 でも、ブリナツモマブは標的細胞の溶解を媒介する (Hoffmann et al, 2005)。また、ビデオ顕微鏡法による試験では、ブリナツモマブにより活性化された T 細胞は標的細胞を次々と溶解するとのエビデンスが得られている (Hoffmann et al, 2005)。このことは、ブリナツモマブがなぜ非常に少ないエフェクター細胞数でも活性を示すのかを説明していると考えられる。

ブリナツモマブにより誘発される細胞傷害性 T 細胞の活性化及び CD19 発現標的細胞に対する細胞傷害活性を、さらに幅広い E:T 比 (200:1~1:200) で検討した (103-PCD-0067 試験)。ブリナツモマブにより媒介される NALM-6 及び KOPN-8 腫瘍細胞のリダイレクト細胞溶解の濃度依存性、最大溶解率及び EC₅₀ 値は同等であった。E:T 細胞比が低いと最大溶解率は低下し、EC₅₀ 値は上昇した。また、E:T 比が 1:10 未満ではリダイレクト細胞溶解はほとんど認められなかった。E:T 比として 10:1 が *in vitro* 試験での検討には最適と考えられた。CD25 及び CD69 発現の変化により測定されるブリナツモマブ介在性 T 細胞活性化は、ドナー間で大きなばらつきが認められた。最も強い CD69 及び CD25 の発現は、ほとんどのドナーにおいて E:T 比が 1:1 の時にみられ、E:T 比が低いあるいは高いほど、活性化の効率が低下した。低い E:T 比と高い E:T 比とで比較すると、低い E:T 比の方が T 細胞活性化率は高かった。E:T 比に対する活性化 T 細胞の割合をプロットしたところ、ベルシェイプを示し、T 細胞活性化が最大を示した E:T 比は 1:1~1:10 であった (図 15)。

図 15 ブリナツモマブ介在性のリダイレクト細胞溶解及び T 細胞活性化に及ぼす E:T 細胞比の影響



The dose-response curves of specific lysis plotted against the logarithm of various blinatumomab concentrations were analyzed with the four-parameter nonlinear fit model integrated into GraphPad Prism version 5.0 to calculate EC₅₀ values. The mean EC₅₀ values of redirected lysis (A) and the maximal percentage of specific lysis (B), CD69 (C) and CD25 (D) positive CD3⁺ T cells were plotted against the respective E:T cell ratio. Error bars show SEM of 3 donors per line.

Source: Research Report 103-PCD-0067

3.2.5 ブリナツモマブによる T 細胞の標的細胞依存的活性化及び増殖

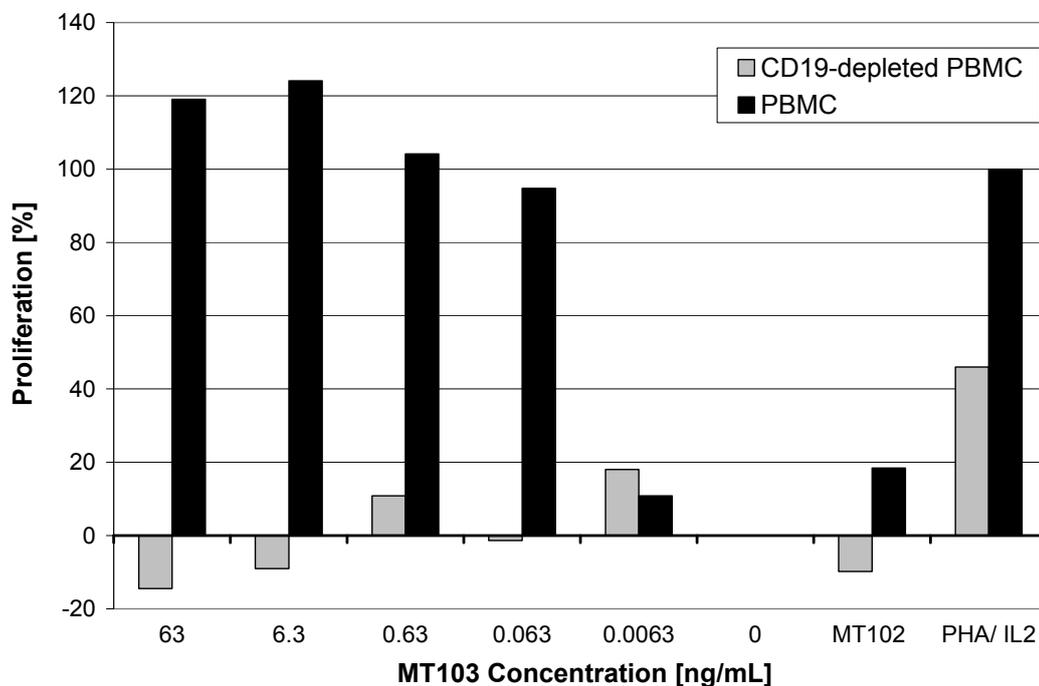
BiTE 抗体は、T 細胞性の免疫療法において抗原特異的細胞傷害性 T 細胞が少なくなる問題を回避できるように設計されている。ブリナツモマブによる T 細胞上の TCR/CD3 複合体と腫瘍細胞上の特異的抗原との架橋形成は、T 細胞の TCR による抗原特異性認識と同じ効果、すなわち、エフェクター T 細胞の活性化、初期のサイトカイン産生、増殖、ひいては標的細胞溶解といった、T 細胞の TCR が特異的に抗原を認識した場合と同じ効果を誘導する。

ブリナツモマブの T 細胞増殖誘発能について検討した (103-PCD-0065 試験)。内因性 B 細胞を抗 CD19 抗体でコーティングされている磁気ビーズを用いて除去したヒト PBMC、若しくは除去しないヒト PBMC を用いて、プロモデオキシウリジンの取込みにより T 細胞増殖能を測定した。正常及び B 細胞除去 PBMC はいずれも T 細胞のマイトジェンであるフィトヘマグルチニン (PHA) と IL-2 の併用添加により強力な増殖反応を示した。対照的に、ブリナツモマブ誘発 T 細胞増殖は、B 細

胞を除去した PBMC では認められず、CD19 陽性 B 細胞存在下のみにみられた (図 16)。B 細胞非存在下では、ブリナツモマブ濃度を 63 ng/mL (リダイレクト細胞溶解を示す EC₅₀ 値の 1000 倍) まで増加しても T 細胞は増殖しなかった。同じ評価系において、ブリナツモマブと同じ CD3 結合 scFv を有する MT102 を用いたところ、CD19 陽性 B 細胞の存在下、非存在下いずれにおいても T 細胞の増殖は誘導されなかった。これらの結果により、ブリナツモマブにより誘発される T 細胞増殖は、T 細胞と B 細胞の双方が関与することが示唆された。

T 細胞活性化は、サイトカインの放出や T 細胞表面活性化マーカーである CD69 及び CD25 の発現を測定することでも評価でき、標的細胞の存在に大きく依存することが知られている (Brischwein et al, 2007)。CD69 の発現誘導及びサイトカインの一過性の放出は、患者へのブリナツモマブ投与開始直後にも認められている (Klinger et al, 2012)。

図 16 CD19 陽性細胞の存在下又は非存在下におけるブリナツモマブ誘発 T 細胞増殖



PBMCs (black bars), or PBMCs depleted of CD19⁺ cells (gray bars), were isolated from different healthy donors and incubated with blinatumomab at the indicated concentrations for three days at 37°C. Bromodeoxyuridine was added to the cultures 24 hours before proliferation was determined. Cells were then washed, lysed, and the amount of DNA-incorporated bromodeoxyuridine was determined according to the manufacturer's protocol (Roche Diagnostics). Additionally PBMCs, or PBMCs depleted of CD19⁺ cells, were cultured in MT102 (63 ng/mL) or phytohemagglutinin (PHA; 5 µg/mL) combined with 60 IU/mL of recombinant human IL-2. Each data point represents the mean result of triplicate wells.

Source: adapted from Research Report 103-PCD-0065

3.2.6 ブリナツモマブによるグランザイム B の発現

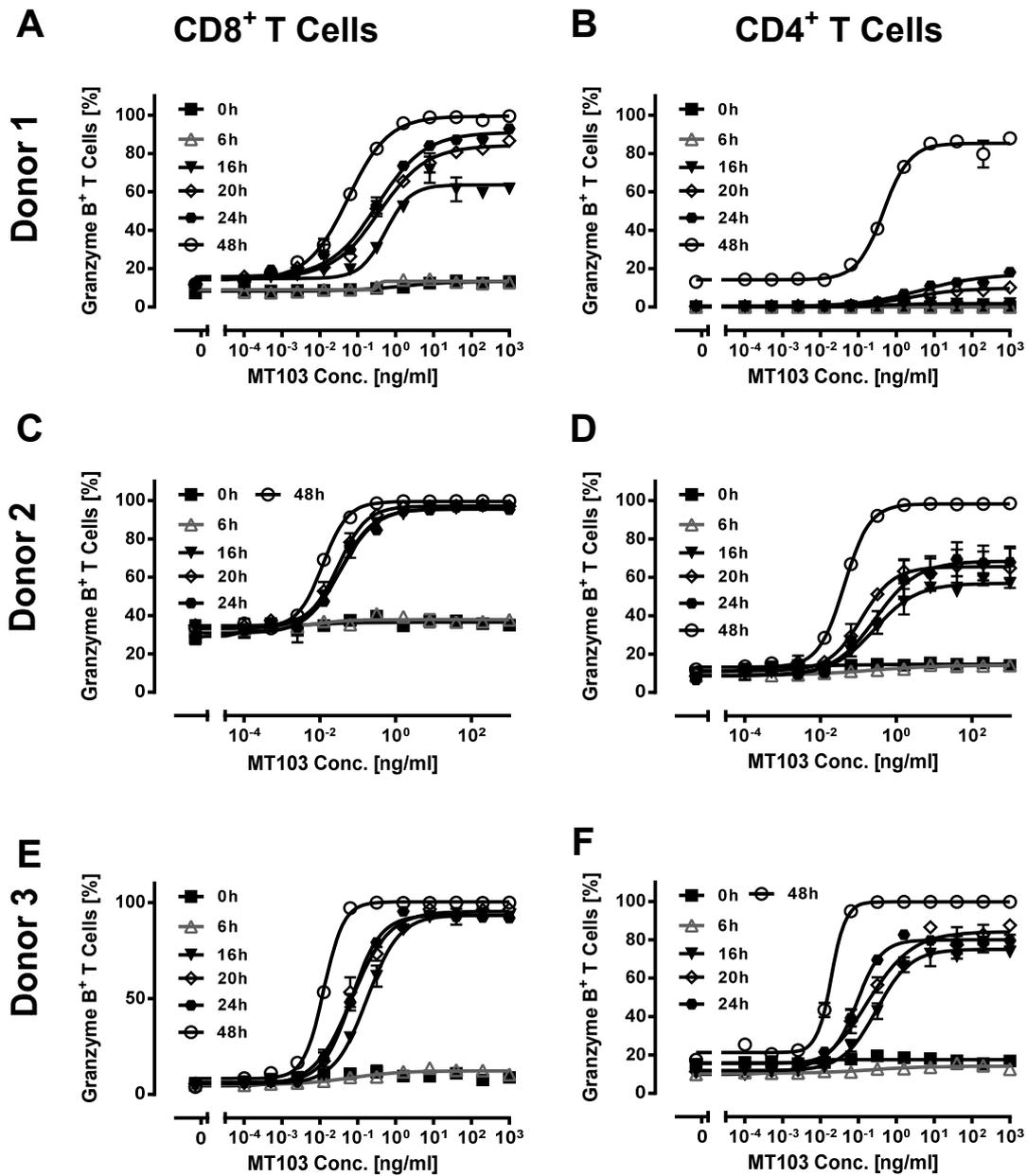
リダイレクト細胞溶解における T 細胞の効力は、細胞溶解性酵素の含有量に依存する。T 細胞の細胞傷害性顆粒は、標的細胞溶解に関与する小孔形成タンパク質パーフォリンやグランザイム B 等の細胞溶解性タンパク質を含み (Millard et al, 1984 ; Lowin et al, 1995)、持続的な TCR 刺激後に免疫シナプスに放出される。パーフォリン分子が標的細胞の細胞膜に重合し小孔を形成することで、グランザイムが細胞内に侵入することができる。グランザイムは、次に細胞内タンパク構造の骨組

み（細胞骨格）の破壊、細胞の核タンパク質の分解、並びに DNA を分解する酵素の活性化により標的細胞のアポトーシスを誘導するカスパーゼカスケードを活性化する（[Talanian et al, 1997](#) ; [Yang et al, 1998](#)）。

ブリナツモマブによる CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞におけるグランザイム B の発現誘導を、種々の濃度のブリナツモマブ存在下で、*in vitro* 試験での最適な E:T 比である 10:1 で NALM-6 細胞とヒト PBMC を最長 48 時間まで共培養することにより評価した（[103-PCD-0063](#) 試験）。CD4 陽性及び CD8 陽性細胞におけるグランザイム B の経時的な発現をフローサイトメトリーで分析した。グランザイム B 陽性 T 細胞の割合は、CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞サブセット双方において、経時的かつブリナツモマブ濃度依存的に増加した（図 17）。グランザイム B の誘導は、CD4 陽性 T 細胞と比較して CD8 陽性 T 細胞で速やか、かつ低濃度のブリナツモマブで発現した。この結果は、ブリナツモマブが両 T 細胞サブセットと共に、BiTE 介在性にエフェクター機能を発現させることを示している。

ブリナツモマブによるプロカスパーゼの活性化は、ドナー T 細胞と共培養した MEC-1 細胞でも確認されている（[d'Argouges et al, 2009](#)）。

図 17 NALM-6 細胞の存在下での CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞におけるブリナツモマブ介在性のグランザイム B の濃度及び時間依存的誘導



Freshly isolated human PBMC from three healthy donors were incubated with NALM-6 target cells at an E:T cell ratio of 10:1 with increasing concentrations of blinatumomab for 0, 6, 16, 20, 24 and 48 hours. T cells were stained for CD4, CD8 and granzyme B, and the respective expressions were determined in permeabilized CD8⁺ (A, C, E) and CD4⁺ (B, D, F) T cells by flow cytometry. Error bars show SEM of duplicate determinations.

Source: Research Report 103-PCD-0063

3.2.7 B 細胞性悪性腫瘍患者の PBMC におけるブリナツモマブの作用

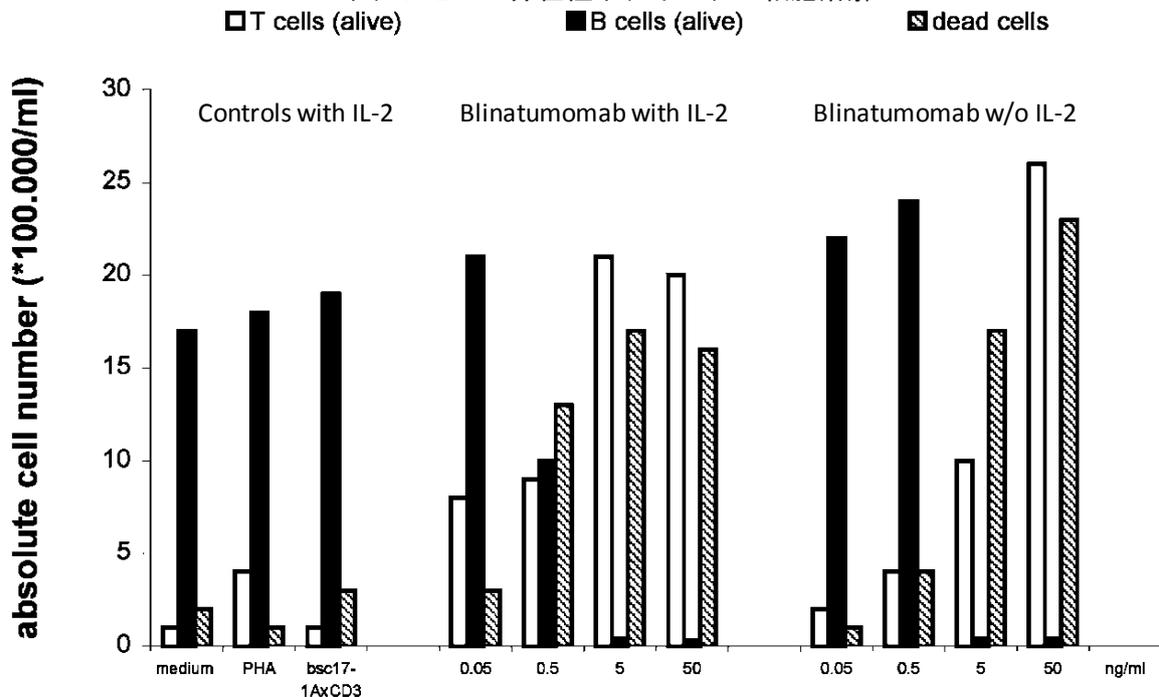
ブリナツモマブは患者末梢血中の E:T 比で、内因性自家 T 細胞をリダイレクトすることにより、患者から分離された PBMC 試料内の標的細胞（正常及び悪性 B 細胞）の溶解を媒介することが示されている (Löffler et al, 2003)。25 例の患者 (B 細胞性慢性リンパ性白血病 [B-CLL] 23 例、免疫細胞腫 1 例、MCL 1 例) から PBMC を分離したところ、その E:T 比は 1:3~1:240 の範囲であった。そ

これらの PBMC をブリナツモマブ存在下又は非存在下で 6 日間培養した後、残存する白血病 B 細胞数を測定した。患者試料採取 0 日目における E:T 比が 1:48 と非常に低くても、ブリナツモマブは 5 ng/mL の濃度で 6 日以内にほぼ完全に白血病 B 細胞を消失させた (図 18)。この評価系に IL-2 を添加することにより、ブリナツモマブの有効性はさらに増強され、ブリナツモマブ濃度 0.5 ng/mL でも顕著な消失効果が認められた。

25 例中 17 例 (68%) において、ブリナツモマブによる標的細胞溶解率は 20~80%であった。ブリナツモマブによる標的細胞溶解を示さなかった 3 例の試料のうち、1 例は急性化学療法を受けている患者のもので、T 細胞機能が損なわれたため効率的な腫瘍細胞溶解が阻止された可能性がある。

ブリナツモマブは極めて低い E:T 比でも活性を示し、大半の患者において内因性自家 T 細胞を腫瘍細胞のリダイレクト細胞溶解に関与させた。

図 18 患者由来の B 細胞慢性リンパ性白血病細胞の自家 T 細胞によるブリナツモマブ介在性リダイレクト細胞溶解



Blinatumomab-mediated depletion of leukemic B cells from PBMC of a B-CLL patient sample. PBMC (adjusted to 3×10^6 cells/mL at day 0) of patient #7 were incubated for 6 days with the indicated blinatumomab concentrations in the presence or absence of IL-2 (60 IU/ml) or with the bsc17-1A_CD3 control BiTE® antibody (500 ng/mL) or PHA (2 µg/mL)+IL-2 (60 IU/mL) as controls. Calculated E:T ratio at day 0 was 1:48 (2% T cells, 96% B cells). Cells were analysed by flow cytometry and viable and dead cells counted after trypan blue staining.

Source: adapted from Löffler et al, 2003

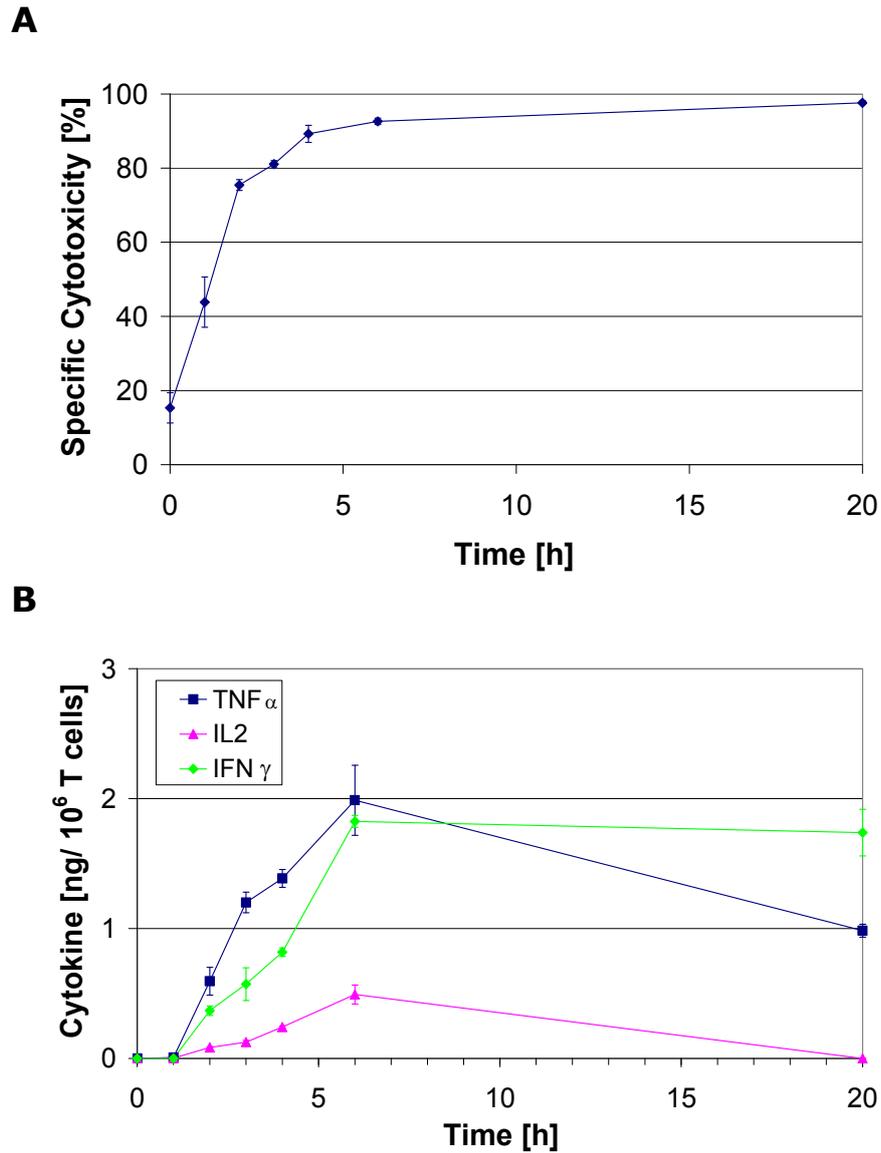
3.2.8 ブリナツモマブ活性化 T 細胞によるサイトカインの産生

細胞傷害性 T 細胞は TCR 刺激により炎症性サイトカインを分泌する。ブリナツモマブの T 細胞サイトカイン放出能を検証した (図 19) (103-PCD-0065 試験)。健常人ドナーの PBMC から得たヒト CD3 陽性 T 細胞と標的 NALM-6 細胞を共培養し、培養上清中の TNF-α、IL-2 及び IFN-γ 濃度を酵素免疫吸着測定法 (ELISA) で測定した。またフローサイトメトリーを用いた細胞傷害測定法によ

り、ブリナツモマブ介在性リダイレクト細胞溶解を測定した。ブリナツモマブ添加から2時間以内にNALM-6細胞の50%に溶解が認められ、4時間までに、最大溶解に達した。ブリナツモマブ添加から2時間以上経過した場合にのみ、培養上清中にTNF- α 、IFN- γ 及びIL-2が検出された。これは、ブリナツモマブによりT細胞シグナル伝達と遺伝子転写が新たに誘発された結果、サイトカインが新たに産生されたことを示唆している。TNF- α 及びIFN- γ は、ブリナツモマブ添加からそれぞれ3時間後及び4時間後に最大濃度の50%に達し、いずれも6時間後に最大濃度となった

(図19)。IL-2濃度は、ブリナツモマブ添加から6時間後に最大に達した。標的としてヒト自家B細胞を用いた別の試験において、T細胞は標的としてNALM-6細胞を用いた時とほぼ同等のサイトカイン放出プロファイルを示した(103-PCD-0065試験)。これらの結果は、T細胞によるサイトカイン放出に先行してCD19陽性標的細胞の溶解が起こること示しており、溶解にはサイトカイン産生を必要としない可能性がある。

図 19 CD19 陽性 NALM-6 標的細胞に対する T 細胞の細胞傷害活性及びサイトカイン分泌に及ぼすブリナツモマブの影響



(A) Time course of blinatumomab-mediated T cell cytotoxicity. PBMC were isolated from healthy donors and were mixed with PKH-26-fluorescently labeled NALM-6 cells at an E:T ratio of 10:1 in the presence of 1 ng/mL of blinatumomab. After 20 hours, specific cell lysis was determined by means of a flow cytometry-based cytotoxicity assay. Error bars represent the SEM of triplicate determinations. (B) Kinetics of blinatumomab-mediated T cell cytokine secretion. Supernatants of the cultures described in panel A were collected prior to flow cytometry analysis and evaluated by ELISA for the amount of TNF- α (blue squares), IL-2 (magenta triangles) and IFN- γ (green diamonds). Error bars represent the SEM of triplicate determinations.

Source: adapted from Research Report 103-PCD-0065

3.3 In vivo 生物活性

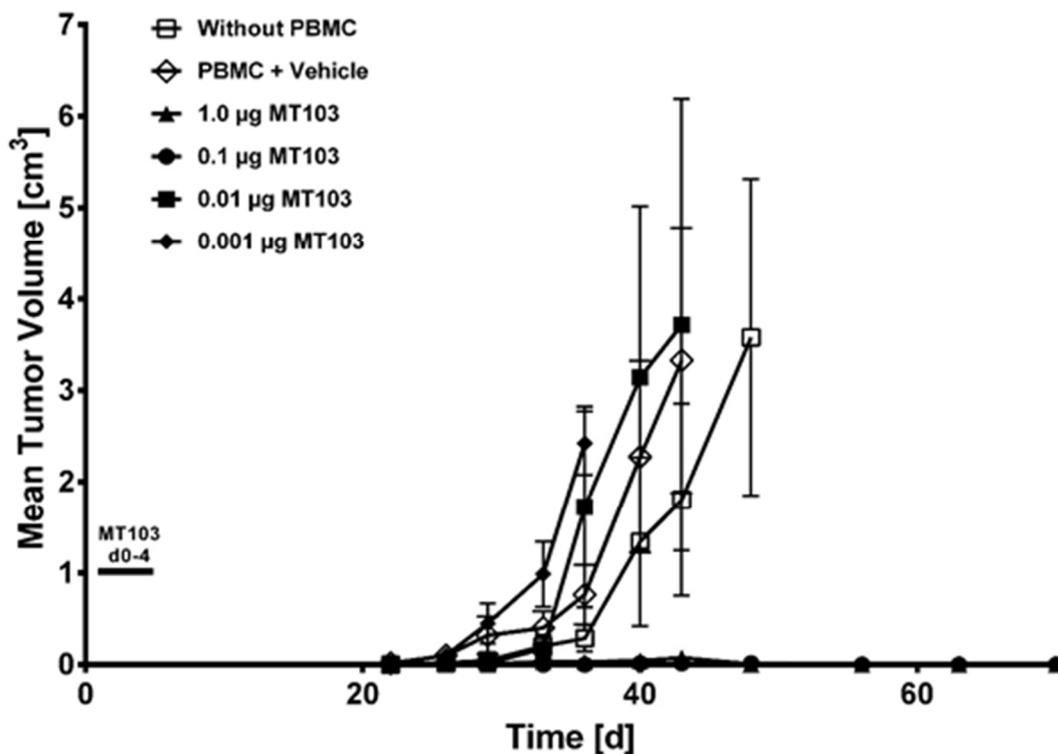
成人及び小児 ALL、MCL 及びバーキットリンパ腫由来のヒト腫瘍細胞株を移植したマウス異種移植モデルを用いて、ブリナツモマブの皮下腫瘍形成の抑制作用を評価した。同所性移植モデルを用いた試験においては生存期間延長作用を評価した。ブリナツモマブはマウス CD3 を認識しないため、ブリナツモマブの抗腫瘍効果を評価するためには、NOD/SCID マウスにヒト T 細胞を移植する必要がある。皮下腫瘍形成モデルでは、ヒト T 細胞及び腫瘍細胞の混合液を皮下に投与した。同所

性移植モデルの生存試験では、ヒト T 細胞及び腫瘍細胞の混合液を側面尾静脈より投与した。マントル細胞リンパ腫異種移植モデルでは、腫瘍細胞を静脈内投与し、その 8 日後にヒト T 細胞を同動物の腹腔内に投与した。

3.3.1 皮下腫瘍形成モデル

ヒト PBMC と NALM-6 細胞の混合液を皮下投与した NOD/SCID マウスにおける、ブリナツモマブの *in vivo* での有効性を検証した (図 20~図 22) (Dreier et al, 2003 ; 103-PCD-0057、103-PCD-0058、及び 103-PCD-0059 試験)。本モデルでは、腫瘍接種当日より、ブリナツモマブを 5 日間連続で 1 日 1 回静脈内投与した。その結果、0.1 及び 1.0 μg においては腫瘍増殖は完全に抑制された (図 20)。ブリナツモマブと同じ CD3 結合ドメインを共有する対照 BiTE 抗体 (MT102、抗 EpCAM 抗体) をブリナツモマブと同等の投与量で投与したとき腫瘍増殖が抑制されなかったことから、認められた作用はブリナツモマブに特異的なものであった (図 21)。

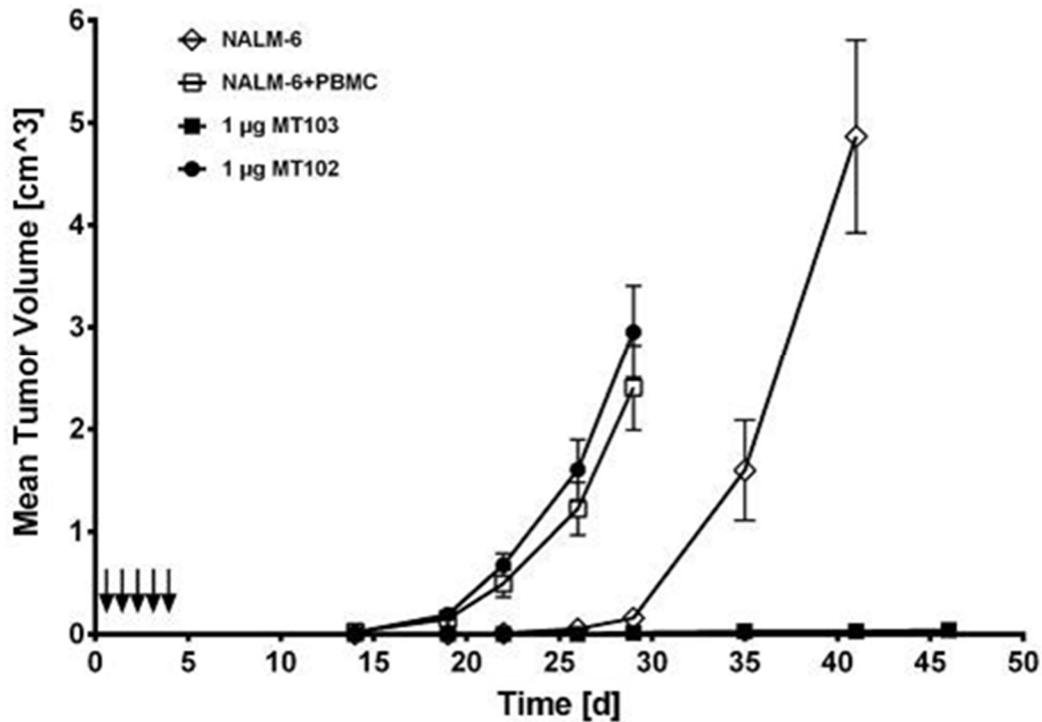
図 20 NOD/SCID マウスにおける NALM-6 細胞増殖に対するブリナツモマブの効果



Cohorts of four NOD/SCID mice were inoculated SC with 10^4 NALM-6 cells in the absence (w/o PBMC) or presence of 10^7 human PBMC from healthy donors. The indicated doses of blinatumomab or a phosphate-buffered saline (PBS) vehicle control were administered IV via the tail vein once daily for 5 consecutive days following tumor cell/PBMC inoculation. Mean values \pm SEM of tumor growth curves are shown.

Source: Research Report 103-PCD-0057

図 21 NOD/SCID マウスにおける NALM-6 細胞増殖に対するブリナツモマブ及び対照 BiTE 抗体 (MT102) の効果



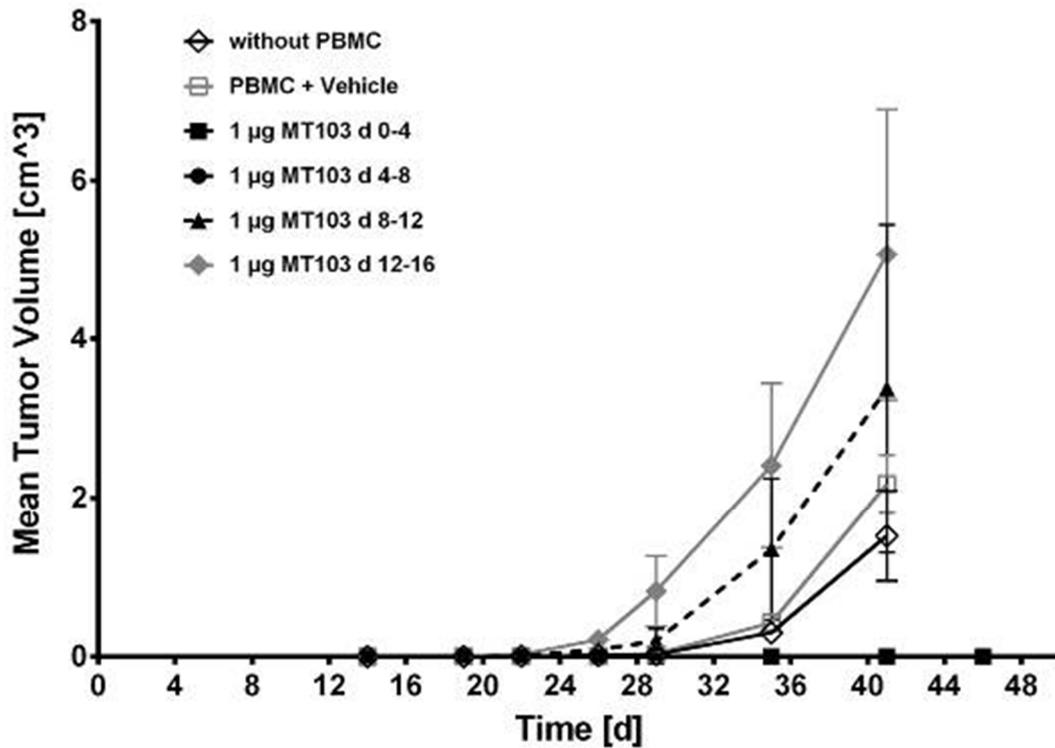
Cohorts of female NOD/SCID mice were inoculated SC with 10^5 NALM-6 cells in the absence (“without PBMC”; $n=9$) or presence of 8×10^6 human PBMC from healthy donors ($n=10$ /group). The indicated doses of blinatumomab (MT103), MT102 or a PBS vehicle control were administered IV on days 0, 1, 2, 3 and 4 following NALM-6/PBMC inoculation (indicated by arrows). Mean values \pm SEM of tumor growth curves are shown. Statistical significance was calculated using one-way ANOVA with Dunnett’s post test, regarding group B (NALM-6+PBMC) as control. The anti-tumor activity of blinatumomab was statistically significant with $p < 0.05$ on day 19, $p < 0.01$ on day 22, $p < 0.001$ on day 26 and $p < 0.0001$ on day 29.

Source: Research Report 103-PCD-0059

本モデルにおけるブリナツモマブの効果に対する、腫瘍の移植から投与開始までの時間の影響を評価した。腫瘍細胞及び PBMC 接種直後から 4 日後までブリナツモマブを連日投与したとき、腫瘍増殖に対する完全抑制が認められた (図 22)。

一方、腫瘍細胞と PBMC の混合液を皮下投与し、接種後 8 日又は 12 日からブリナツモマブ投与を開始したときには、腫瘍増殖抑制は認められなかった。本モデルにおいて腫瘍移植から投与開始までの時間を遅延させると抗腫瘍効果が認められなくなる理由として、NOD/SCID マウスにおいてはヒト T 細胞の半減期が短いため、腫瘍移植時に投与したエフェクター細胞が、投与開始時には減少していた可能性がある (Hammond et al, 2007)。

図 22 NOD/SCID マウスにおける NALM-6 細胞増殖に及ぼすブリナツモマブの投与レジメンの影響

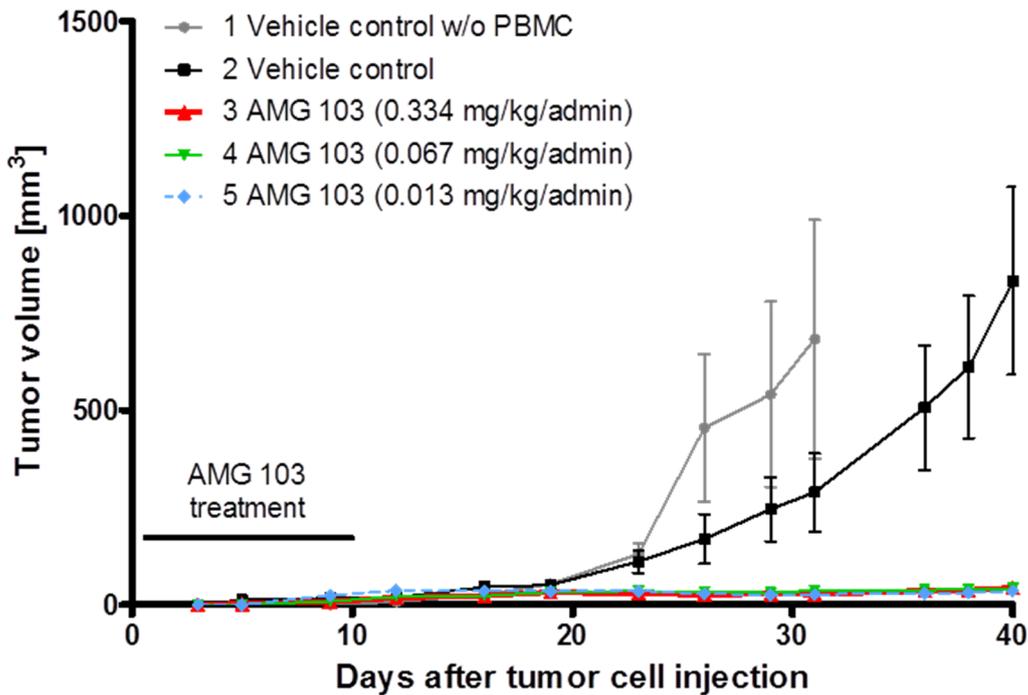


Cohorts of 8 female NOD/SCID mice were inoculated SC with 10^5 NALM-6 cells in the absence ("without PBMC") or presence of 0.78×10^7 human PBMC from healthy donors. The indicated doses of blinatumomab (MT103) or a PBS vehicle control were administered IV beginning on days 0, 4, 8 and 12 following NALM-6/PBMC inoculation and repeated on 4 consecutive days. Mean values \pm SEM of tumor growth curves are shown. Statistical significance was calculated using nonparametric Kruskal-Wallis test, regarding group B (PBMC+Vehicle) as control. The anti-tumor activity of blinatumomab was statistically significant with $p < 0.05$ on day 29 and $p < 0.01$ on days 35 and 41 when treatment was initiated on day 0 or day 4. In contrast, treatment initiation on day 8 or day 12 did not result in a statistically significant anti-tumor activity.

Source: Research Report 103-PCD-0058

NOD/SCID マウスに SEMc ALL 及びヒト PBMC を同時に皮下投与したモデルにおいて、ブリナツモマブは SEMc ALL 腫瘍の形成を抑制した (103-PCD-0099 試験)。小児 ALL の異種移植モデルにおいて、ブリナツモマブを 0.013、0.067 又は 0.334 mg/kg/日で 10 日間にわたって反復静脈内投与した結果、腫瘍形成が有意に抑制され、増殖が遅延した。試験終了時 (40 日) には、0.013 及び 0.067 mg/kg/日投与群の 10 匹中 6 匹、0.334 mg/kg/日投与群の 10 匹中 8 匹の動物で腫瘍が 50 mm^3 未満まで縮小あるいは消失した (図 23)。溶媒対照群と比べて、全投与群で統計学的に有意な腫瘍増殖の抑制 ($p < 0.05$) 又は遅延が認められた。

図 23 SEMc ヒト B 細胞リンパ腫異種移植モデルにおけるブリナツモマブの抗腫瘍作用



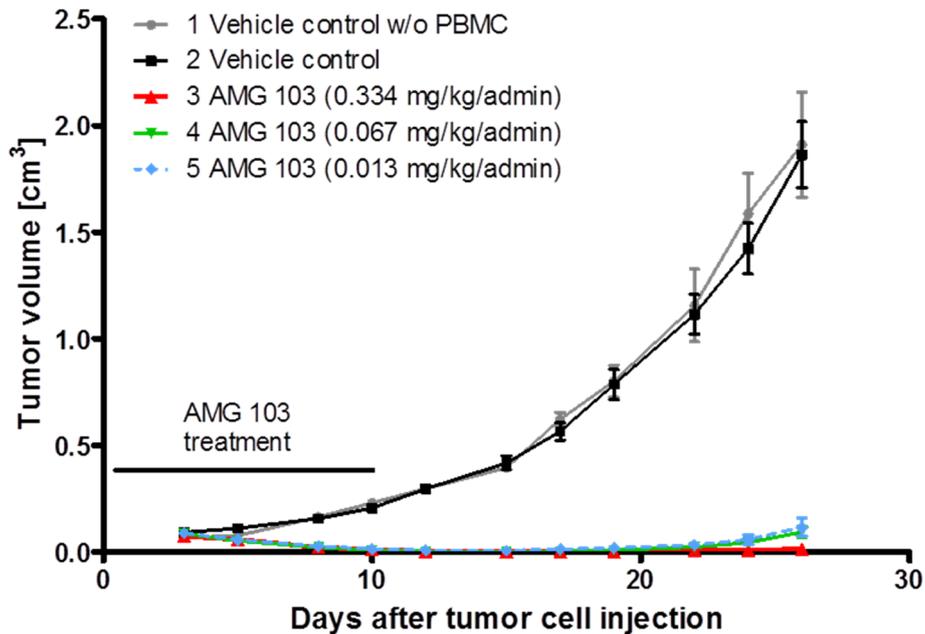
SEMc human B cell lymphoma cells (1×10^7 cells/mouse) were subcutaneously injected with or without PBMC from a healthy human donor at an E:T cell ratio of 1:2 in the right dorsal flank of female NOD/SCID mice ($n = 5$ Group 1; $n = 10$ Groups 2 - 5). Mice were treated from the day of tumor inoculation, with the indicated amounts of blinatumomab or vehicle for 10 consecutive days by IV bolus injection into the lateral tail vein. Tumor growth was determined by external caliper measurements, and tumor volumes were calculated using a standard hemi-ellipsoid formula. Symbols represent mean tumor volume (mm^3) \pm SEM. Statistical significance was calculated using one-way ANOVA with Dunnett's post test, regarding Group 2 as the control. Significant differences ($p < 0.05$) were achieved for all blinatumomab dose groups tested on Days 5, 19, 23 and between Days 36 and 40. At the end of the study, 1/10 (Group 2), 6/10 (Groups 4 and 5) and 8/10 animals (Group 3) had tumors of $< 50 \text{ mm}^3$ or were tumor-free.

Source: Research Report 103-PCD-0099

ブリナツモマブの抗腫瘍効果を Raji バーキットリンパ腫異種移植モデルを用いた 2 試験においても評価した。

Raji 細胞を用いた 1 つ目の試験では、E:T 比を 1:2 となるように調製した腫瘍細胞とヒト PBMC の混合液を NOD/SCID マウスの皮下に投与した (103-PCD-0097 試験)。ブリナツモマブを 10 日間にわたって反復静脈内投与したところ、すべての用量において統計学的に有意な腫瘍形成の遅延が認められた (図 24)。試験終了時 (26 日) には、ブリナツモマブ投与群の平均腫瘍体積は、対照群の平均腫瘍体積よりも小さかった。26 日目には、溶媒投与対照群の全動物で腫瘍が成長したが、ブリナツモマブ 0.013、0.067 及び 0.334 mg/kg/日の投与群では、それぞれ 10 匹中 4 匹、10 匹中 3 匹、及び 10 匹中 9 匹で腫瘍が消失した。

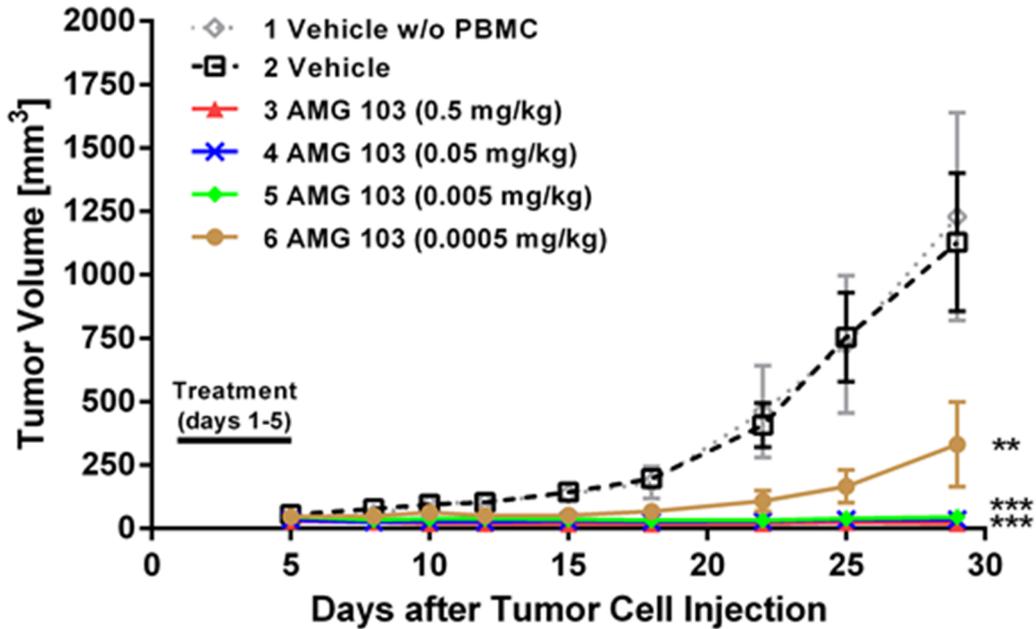
図 24 Raji ヒトバーキットリンパ腫異種移植モデルにおけるブリナツモマブの抗腫瘍作用



Raji, human Burkitt lymphoma cells (5×10^6 cells/mouse) were injected SC with or without PBMC from a healthy human donor at an E:T cell ratio of 1:2 in the right dorsal flank of female NOD/SCID mice ($n = 5$ Group 1; $n = 10$ Groups 2 - 5). Mice were treated, from the day of tumor inoculation, with the indicated amounts of blinatumomab or vehicle for 10 consecutive days by IV bolus injection into the lateral tail vein. Progress of tumors was determined by external caliper measurements, and tumor volumes were calculated using a standard hemi-ellipsoid formula. Values represent mean tumor size [cm^3] \pm SEM. Statistical significance was calculated using one-way ANOVA with Dunnett's post test, regarding Group 2 as the control. Significant differences ($p < 0.05$) were achieved for the 0.334 mg/kg dose group on Day 3 and for all blinatumomab dose groups tested from Day 5 until the end of the study. At the end of the study, 9/10 (Group 3), 3/10 (Group 4) and 4/10 animals (Group 5) were tumor-free. Source: Research Report 103-PCD-0097

2つ目のRaji腫瘍形成試験 (R20-0026試験) では、より低用量のブリナツモマブを用い、投与期間も5日間に短縮した。ブリナツモマブを0.5、0.05、0.005及び0.0005 mg/kg/日の用量で投与したとき、溶媒対照群と比較して、全ブリナツモマブ投与群で統計学的に有意 ($p < 0.05$) な腫瘍形成の抑制が認められ、試験終了時には0.5 mg/kg投与群の8匹中3匹、0.05 mg/kg投与群の8匹中1匹で腫瘍が消失した (図 25)。最も低い用量 (0.0005 mg/kg/日) においても、対照群と比較して腫瘍形成及び増殖が有意 ($p < 0.05$) に遅延した。

図 25 NOD/SCID マウスにおける Raji バーキットリンパ腫細胞増殖に対するブリナツモマブの作用



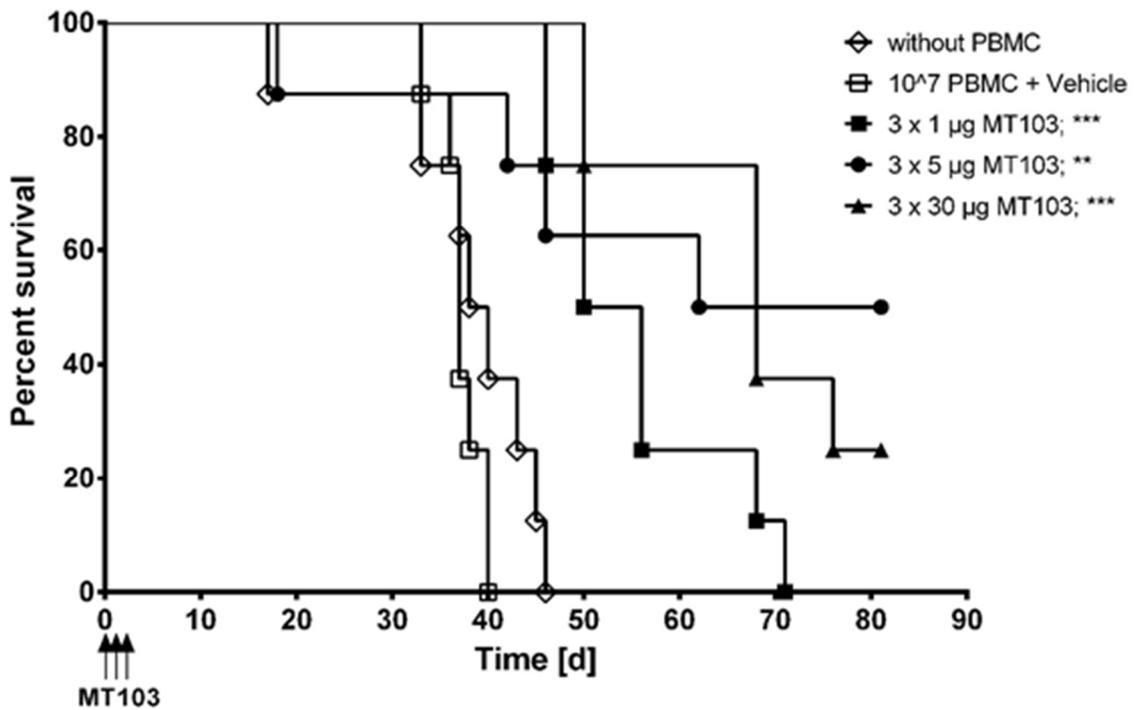
NOD/SCID mice ($n = 5$, Group 1, $n = 8$, Groups 2 to 6) were injected SC with a mix of 1×10^6 Raji cells and 5×10^6 human PBMC (in 50% matrigel) and treated IV with vehicle or blinatumomab at the indicated doses on days 1 to 5, starting ~1h after cell injection. Tumor growth was determined by external caliper measurements, and tumor volumes were calculated using a standard hemi-ellipsoid formula. Values represent mean tumor size (mm^3) \pm SEM. Statistical analysis was calculated using a one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test, using Group 2 as the control. Significant differences ($p < 0.05$) were achieved for all dose groups tested from Day 8 until the end of the study. Significant differences in tumor growth are labeled with asterisks (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Source: Research Report R20-0026

3.3.2 同所性腫瘍移植モデル

同所性腫瘍移植白血病モデルを用い、ブリナツモマブの薬効評価を行った。この試験では NOD/SCID マウスに NALM-6 細胞及び PBMC を静脈内投与し、その日から 3 日間にわたり個体あたり 1、5 及び 30 μg のブリナツモマブを 1 日 1 回反復静脈内投与した。すべての用量において生存期間の延長が認められたが用量依存的ではなかった (図 26) (103-PCD-0060 試験)。

図 26 NALM-6 細胞を静脈内投与したマウスにおけるブリナツモマブによる生存期間の延長



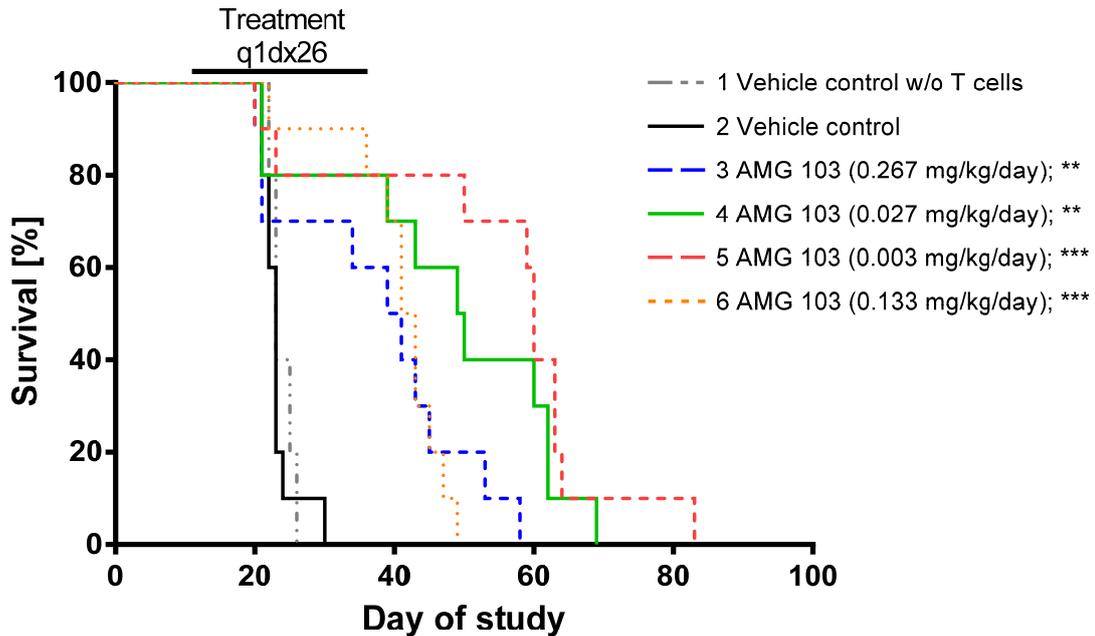
Cohorts of 8 female NOD/SCID mice were inoculated IV with 10^4 NALM-6 cells in the absence (“without PBMC”) or presence of 10^7 human PBMC from healthy donors. The indicated doses of blinatumomab (MT103) or a PBS vehicle control were administered via the tail vein on days 0, 1 and 2 following NALM-6/PBMC inoculation. Asterisks in the figure legend denote statistically significant differences (log-rank test; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) between vehicle and MT103-treated groups.

Source: Research Report 103-PCD-0060

生存期間に対するブリナツモマブの効果を評価するため、マントル細胞リンパ腫の異種移植進行腫瘍モデルを用いた試験を実施した (103-PCD-0098 試験)。放射線を照射した NOD/SCID マウスに Granta-519 細胞を静脈内投与し、8 日後にヒト T 細胞を腹腔内投与した。この進行腫瘍モデルに対しては、単一のドナーから採取したエフェクター細胞を使用した。各動物に多数の T 細胞 (2×10^7 cells) を注射する必要があったため、CD3 陽性細胞を増殖させ、IL-2 並びに抗 CD2、抗 CD3 及び抗 CD28 抗体を用いて *in vitro* で活性化した。ブリナツモマブの投与は腫瘍細胞移植後 11 日目に開始し、臨床における治療サイクルに最も近い 26 日間を投与期間として、1 日 1 回静脈内又は皮下に投与した。

生存期間は、いずれの投与経路においても、すべての用量群で有意に延長された ($p < 0.01$)。ブリナツモマブの静脈内投与時の生存期間の中央値は、0.003、0.027 及び 0.267 mg/kg/日の用量でそれぞれ 60.0、49.5 及び 40.0 日であり、溶媒対照とした vehicle 群の中央値 (23 日) に比べて有意な延長が認められた ($p < 0.01$)。ブリナツモマブを 0.133 mg/kg/日の用量で皮下投与した群の中央値は 42 日であり、溶媒対照群と比べ有意に延長した ($p < 0.001$) (図 27)。

図 27 Granta-519 細胞を異種移植した NOD/SCID マウスにおけるブリナツモマブの静脈内及び皮下投与による生存期間の延長



Granta-519 (5×10^6 cells/mouse), human MCL cells were injected IV into female NOD/SCID mice. Animals were allocated to treatment groups ($n = 5$ for Group 1; $n = 10$ per group for Groups 2 - 6) on Day 8, based on the lambda light chain serum concentrations. In vitro expanded and activated human T cells were transplanted into the peritoneal cavity of mice (Groups 2 - 6) on Day 8. Treatment started on Day 11, before clinical signs of disease became apparent. Blinatumomab (AMG 103) was administered IV (Groups 3 - 5) or SC (Group 6) for a maximum of 26 consecutive days, depending on individual survival. Control animals (Groups 1 and 2) were treated IV with vehicle. Asterisks in the figure legend denote statistically significant differences (log-rank test; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) between vehicle (Group 2) and blinatumomab-treated groups.

Source: Research Report 103-PCD-0098

3.4 ブリナツモマブの種交差性

3.4.1 ブリナツモマブの毒性試験に用いる適切な動物種の決定

ブリナツモマブは、2つの異なる標的、すなわち CD19 及び CD3 に結合する。本薬が活性を示すためには、ブリナツモマブを介した B 細胞と T 細胞との架橋形成が必須条件であり、ブリナツモマブの一方の腕部のみが結合しても、B 細胞の除去には至らず T 細胞の活性化も誘導されないと考えられる。したがって、本抗体の毒性評価を行う上では、ブリナツモマブが CD3 及び CD19 に二重特異的に結合し、なおかつブリナツモマブに対する機能的応答が認められる動物種を選択することが適切である。

交差反応性及び機能的活性を評価するため、フローサイトメトリーを用いて種々の霊長類（チンパンジー、カニクイザル、アカゲザル及びヒヒ）、ビーグル犬並びに SJL マウスの PBMC に対するブリナツモマブの結合性を検討した（103-PCD-0007 試験）。T 細胞及び B 細胞の特異的マーカーである CD4 及び CD20 を認識する抗体で PBMC 中の T 細胞及び B 細胞のそれぞれを標識し、標識された T 細胞及び B 細胞の亜集団においてブリナツモマブの結合性を解析した。また、B 細胞及び T 細胞へのブリナツモマブの二重特異的結合の機能的意義を確認するために、細胞傷害性試験を実施してチンパンジーの PBMC 中の B 細胞のリダイレクト細胞溶解についても検討した。

T細胞及びB細胞への二重特異的結合、並びに *in vitro* での B細胞に対する細胞傷害活性は、チンパンジーのみで認められた。チンパンジーの PBMC に対するブリナツモマブの結合性は、ヒトの PBMC で観察された結合性と同等であった。ヒヒ、カニクイザル及びアカゲザルのようなチンパンジーよりもヒトから遠縁のサル PBMC では、T細胞及びB細胞への結合が認められなかった。同様に、ビーグル犬及び SJL マウスの PBMC においてもブリナツモマブによる交差反応はみられなかった。チンパンジーの PBMC では、*in vitro* においてブリナツモマブが PBMC に結合した結果として自家 B細胞の枯渇が認められ、本薬の機能的活性が証明された。したがって本試験では、チンパンジーが非臨床安全性試験で用いるのに適切な動物種であることが示された。しかし、チンパンジーにおけるブリナツモマブ毒性評価の選択肢は極めて限定されていた。

3.4.2 フローサイトメトリーを用いた、アフリカミドリザル、マーモセット、リスザル、マウス及びラットの PBMC に対するブリナツモマブの交差反応性試験

フローサイトメトリーを用いて、ヒト及びその他の動物種の PBMC に対するブリナツモマブの交差反応性を検討した (103-PCD-0040 試験)。この試験では、アフリカミドリザル、マーモセット、リスザル、ラット及びマウス (ND4 Swiss Webster) の PBMC を用いて B細胞及びT細胞へのブリナツモマブの結合を評価した。動物の PBMC を用いたすべての実験は、ヒト PBMC へのブリナツモマブの結合を陽性対照として実施した。予測されたとおり、いずれの実験においてもブリナツモマブはヒト PBMC に結合した。しかし、アフリカミドリザル、マーモセット、リスザル、ラット及びマウスの PBMC では、ブリナツモマブとの結合はみられなかった。

3.4.3 ヒト及びチンパンジー試験系におけるブリナツモマブの *in vitro* 特性評価

ヒト及びチンパンジーの試験系において、ブリナツモマブの結合特性及び生物活性における相違／類似性の有無を検討した (103-PCD-0066 試験)。

PBMC は、血液バンクより入手した白血球フィルターを用いて Biomedical Primate Research Center (Rijswijk, オランダ) より入手したヘパリン添加チンパンジー全血から調製した。種々の濃度のブリナツモマブを添加して PBMC を培養した結果、ヒト及びチンパンジーの PBMC に対するブリナツモマブの結合性は同等であることが示された。双方の動物種において、最高 50 µg/mL までのブリナツモマブ濃度では、B細胞の結合は飽和又はほぼ飽和したが、T細胞の結合は双方の動物種において飽和に達しなかった。

ブリナツモマブの生物活性は、健常人及びチンパンジーの PBMC 中の自家 B細胞又は NALM-6細胞におけるリダイレクト細胞溶解を測定することによって検討した。自家 B細胞又は NALM-6細胞にヒト又はチンパンジーのエフェクター細胞を添加した場合の特異的な標的細胞溶解作用の EC₅₀ 値間に差は認められなかった。

ブリナツモマブの刺激に反応して誘導されるサイトカイン (TNFα、IFN-γ 及び IL-2) の増加も、両動物種で同等であった。

3.5 マウス代替抗体 muS103new の特性評価

3.5.1 muS103new : 同等の親和性を有するマウス様ブリナツモマブ代替抗体の作製

ブリナツモマブはヒト及びチンパンジー以外の動物種では CD3 及び CD19 に交差反応性を示さないことから、毒性試験に用いる目的で、マウス CD19 及びマウス CD3 に特異的に結合する代替 BiTE 抗体である muS103new をラットのモノクローナル抗体から作製した。muS103new は、マウスの CD19 及び CD3 に特異的に結合し、CD19 を発現した CHO 細胞においてリダイレクト細胞溶解を媒介した (第 3.5.2 項)。

3.5.2 ブリナツモマブ及び muS103new の in vitro 薬力学的作用の比較

ヒトに反応性を示すブリナツモマブ及びマウスに反応性を示す代替抗体である muS103new の結合親和性、細胞傷害性、及びサイトカイン放出について in vitro 試験で比較した (103-PCD-0094 試験)。この試験は、非臨床安全性試験に用いる代替抗体としての muS103new の妥当性を証明するために実施したものである。

ブリナツモマブ及び muS103new が介在する CD3 陽性 T 細胞による細胞溶解、及び T 細胞活性化マーカー (CD69、CD25) の増加について、CD19 陽性 B 細胞及び CD3 陽性 T 細胞をブリナツモマブ又は muS103new のいずれか一方と共培養することにより評価した。細胞溶解及び T 細胞活性化マーカーは、フローサイトメトリーを用いて解析した。

ブリナツモマブ及び muS103new のそれぞれの標的に対する結合親和性は同等であった (表 2)。

表 2 ブリナツモマブ及び muS103new の結合親和性

BiTE Cells	blinatumomab		muS103new	
	CHO-huCD19 cells	Human PBMC (CD3)	CHO-mCD19 cells	Mouse Splenocytes (CD3)
K _D ± SDV (nmol/L)	1.8 ± 0.12	55.4 ± 9.07	2.4 ± 0.29	10.6 ± 1.20

All measurements were performed in triplicate.

CD19 = surface antigen, pan-B cell receptor protein; CHO = Chinese hamster ovary; K_D = equilibrium dissociation constant; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; SDV = Standard deviation

Source: Research Report DR-RE-103-001, 103-PCD-0094

muS103new を用いた細胞傷害性試験により、代替抗体の生物活性が確認された。マウス CD19 を発現したマウス標的細胞株 (A20、BCL-1、CHO-mCD19) とエフェクター細胞としてのマウス CD3 陽性 T 細胞との共培養では、muS103new に対して濃度依存的な反応 (死滅) を示し、EC₅₀ 値は細胞株によって異なっていた (図 28A~C、表 3)。

muS103new により誘導される細胞傷害の特異性を証明するため、CD19 陰性である CHO-DHFR[-] 細胞を用いて muS103new の細胞傷害性試験を実施したところ、この細胞株では標的細胞の溶解が認められなかった (図 28D)。

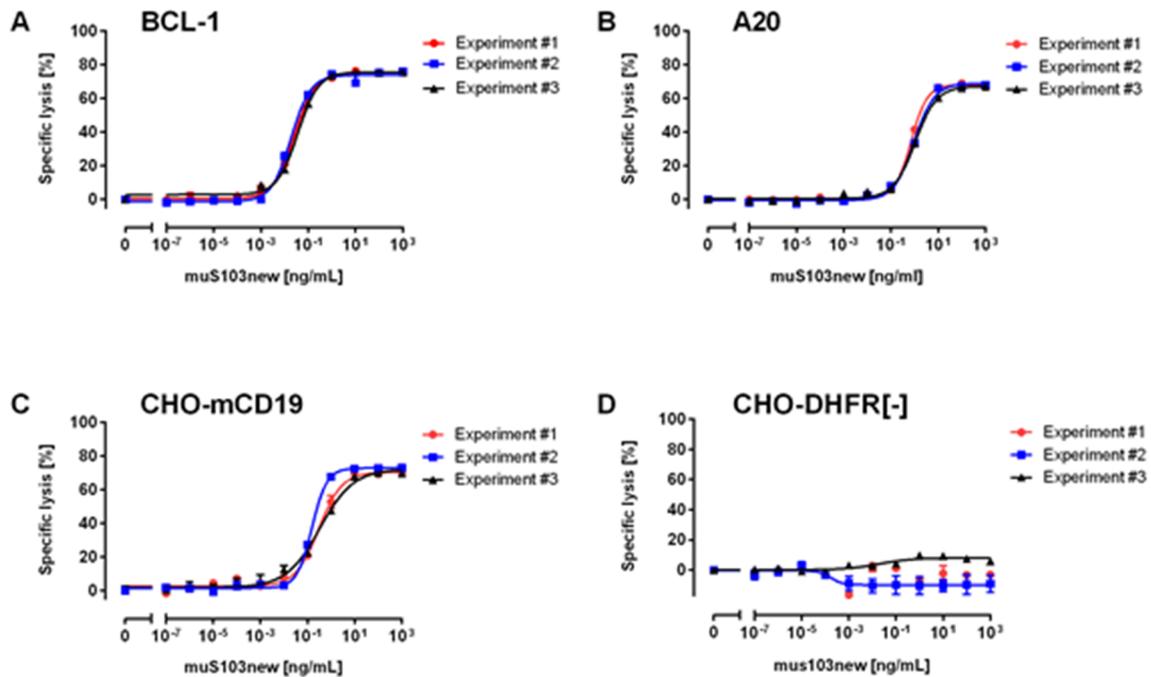
表 3 種々の標的細胞における muS103new 誘導性細胞傷害活性の EC₅₀ 値

Cells	BCL-1	A20	CHO-mCD19
EC ₅₀ ± SEM (pg/mL)	37.9 ± 10.2	1324 ± 373	361 ± 165

The calculated concentrations [pg/mL] of the EC₅₀ values obtained from the cell lysis of different target cells were summarized. EC₅₀ values were calculated with the four parameter nonlinear fit model integrated into GraphPad Prism version 4.0. ± refers to SEM [pg/mL].

Source: Research Report 103-PCD-0094

図 28 種々の標的細胞における muS103new 誘導性のリダイレクト細胞溶解の濃度反応曲線



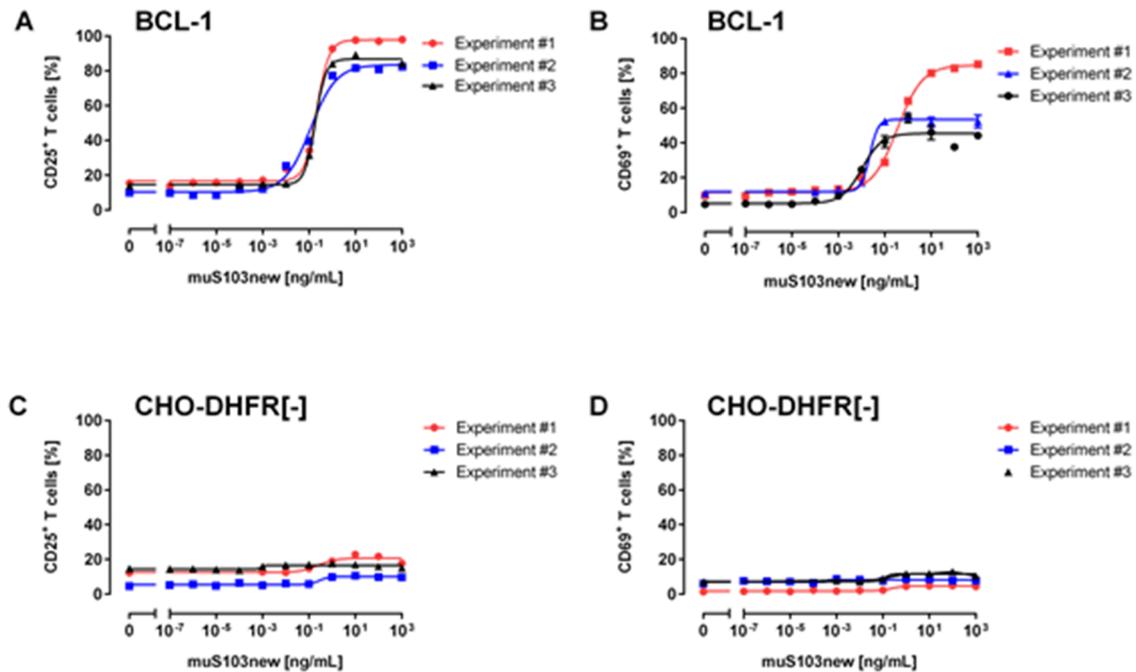
The CD19-expressing murine cell lines BCL-1 (A) or A20 (B), mouse-CD19 transfected CHO cells (CHO-mCD19) (C) or CD19- CHO-DHFR(-) cells (D) were co-cultured with murine CD3⁺ T cells at an E:T cell ratio of 10:1 and increasing concentrations of muS103new for 72 hours. Target cell lysis was determined by flow cytometry as the percentage of target cells becoming PI positive after 72 hours in the presence of BiTE. Specific target cell lysis was calculated by subtracting background lysis in the absence of BiTE. The calculated concentrations of the EC₅₀ were used as an indicator for bioactivity and are summarized in Table 4. Error bars indicate the SEM of duplicate measurements. For each target cell line, three representative cytotoxicity curves are shown.

Source: Research Report 103-PCD-0094

代替抗体による標的細胞と T 細胞との架橋形成の結果として、T 細胞活性化マーカーである CD69 及び CD25 の発現上昇が起こると予測される。そこで、さまざまな濃度のブリナツモマブ又は muS103new を添加して CD19 陽性の標的細胞と CD3 陽性のエフェクター細胞とを共培養したところ、ヒト及びマウスの T 細胞においてそれぞれ CD25 及び CD69 の発現が濃度依存的に誘導された (図 29A、B)。ブリナツモマブの細胞傷害性試験では培養時間を 24 時間としたのに対し、muS103new では 72 時間の培養を行った。このように異なる培養時間を用いた理由は、マウスのエフェクター細胞による標的細胞の溶解はヒトのエフェクター細胞による場合よりも緩徐であることが一般に観察されていたためである。マウス細胞を用いた細胞傷害性試験では、培養時間が長いために、初期活性化マーカーである CD69 が陽性である T 細胞の割合は既に減少していたが、それでもなお muS103new に依存した CD25 の増加が認められた。

ブリナツモマブ及び muS103new のいずれにおいても CD19 を発現した標的細胞の非存在下ではヒト又はマウスの CD3 陽性 T 細胞の活性化が誘導されなかったことから、T 細胞の活性化は特異的であることが示された (図 29C、D)。

図 29 muS103new による T 細胞活性化の濃度依存的誘導の特異性

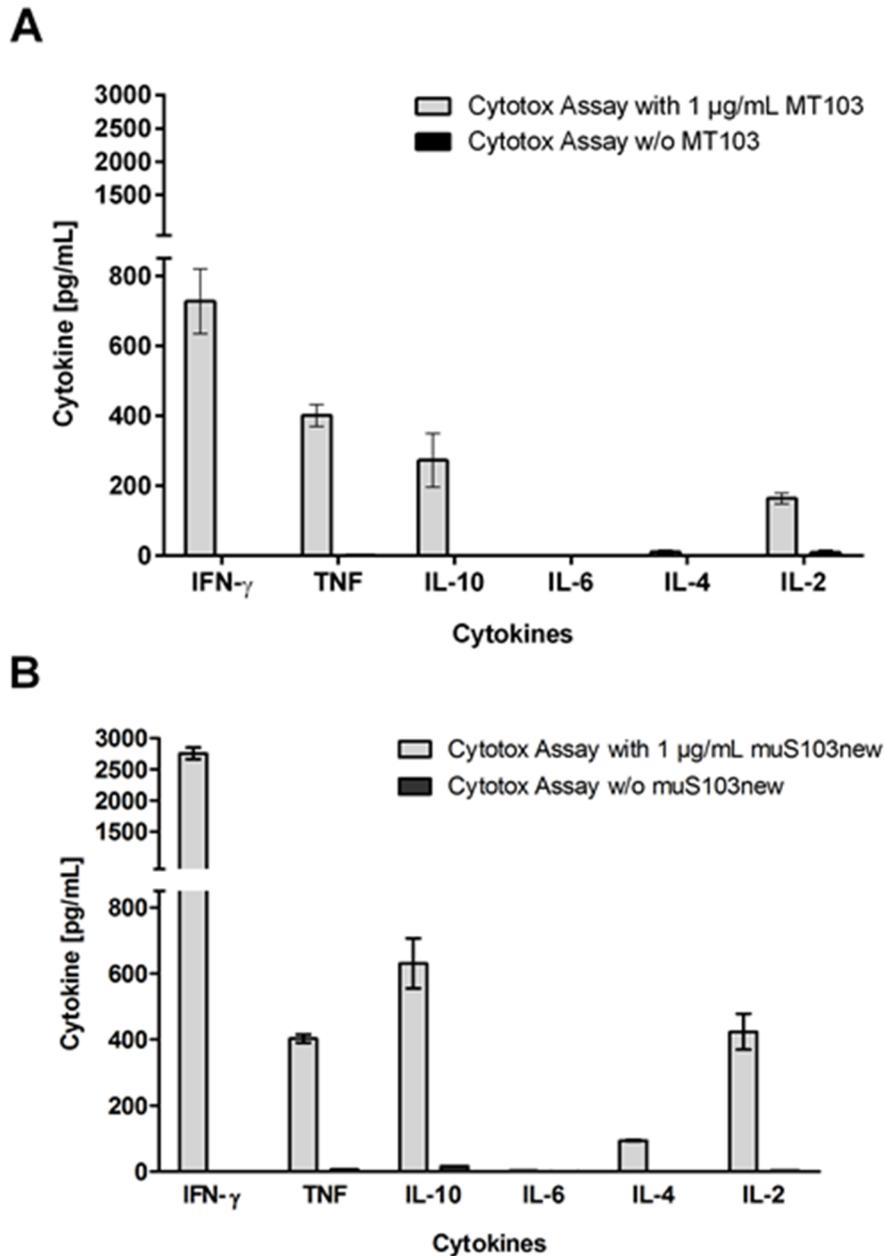


Murine CD19⁺ BCL-1 and CD19-negative CHO-DHFR(-) cells were co-cultivated with murine CD3⁺ T cells at an E:T cell ratio of 10:1 with increasing concentrations of muS103new for 72 hours. Surface expression of CD25 (A, C) and CD69 (B, D) on CD3⁺ T cells was detected by flow cytometry using antigen-specific fluoro-chrome-conjugated monoclonal antibodies. The percentage of CD25⁺ or CD69⁺ cells was plotted against the logarithm of muS103new concentration and analyzed with the four-parameter nonlinear fit model integrated into GraphPad Prism version 4.0. Error bars show the standard error of the mean duplicate measurements. Three representative experiments of muS103new mediated up-regulation of CD25 and CD69 are shown.

Source: Research Report 103-PCD-0094

サイトカインの産生は、T 細胞活性化の特徴である。これまでに行った複数の試験において、ブリナツモマブが標的細胞の存在下で PBMC によるサイトカイン放出を誘導することが示されている (第 3.2.8 項)。このため、ヒト及びマウスの CD3 陽性 T 細胞を用いて、ブリナツモマブ又は muS103new の 1 µg/mL 存在下でのサイトカイン放出を検討した。T 細胞の最大活性化 (CD25 及び CD69 の発現上昇) は、1 µg/mL のブリナツモマブで観察された。ブリナツモマブ及び muS103new は T 細胞による IFN-γ、TNF、IL-10 及び IL-2 の放出を誘導したが、それぞれの細胞傷害性試験において、上清中の IL-4 は少量であり、IL-6 はほとんど検出されなかった (図 30)。それぞれの試験で、ブリナツモマブ及び muS103new の非存在下ではサイトカインが検出されなかったことから、サイトカインの放出は特異的であることが示された。また、IFN-γ、IL-10 及び IL-2 のマウスにおけるサイトカイン濃度は、ヒトにおける各濃度と比べて高い値を示した。

図 30 ブリナツモマブ及び muS103new により誘導されたヒト及びマウスの CD3 陽性 T 細胞からのサイトカイン放出



Effects of blinatumomab and muS103new in the presence of target expressing human KOPN-8 (A) and murine A20 (B) cells on cytokine release. Human or murine CD3⁺ T cells were co-cultivated with the respective target cells (E:T cell ratio 10:1) without or with 1 µg/mL blinatumomab or muS103new. After 24 hours (blinatumomab) and 72 hours (muS103new) of incubation concentrations of the cytokines IFN- γ , TNF, IL-10, IL-4, and IL-2 were determined in the cell culture supernatants using a cytometry-based bead array. Error bars indicate the SEM of three independent experiments.

Source: Research Report 103-PCD-0094

上述のように、それぞれの細胞上の CD19 及び CD3 への結合、CD19 陽性標的細胞のリダイレクト細胞溶解、T 細胞の活性化、並びに T 細胞によるサイトカイン放出等の主要な薬力学的効果は、ブリナツモマブと muS103new とで同等であった。上記のデータは、マウスを用いた個々の非臨床安全性試験において、臨床で使用されるヒト特異的なブリナツモマブの代替抗体として muS103new を用いることの妥当性を示すものである。

4. 副次的薬理試験

副次的薬理試験は、T細胞-内皮細胞間のクロストーク/相互作用に対するブリナツモマブの影響を評価すること、及び内皮細胞へのリンパ球の接着を低減する方法を検討することを目的として計画された。

4.1 ブリナツモマブ誘導性 T細胞活性化による内皮細胞の接着分子発現への影響

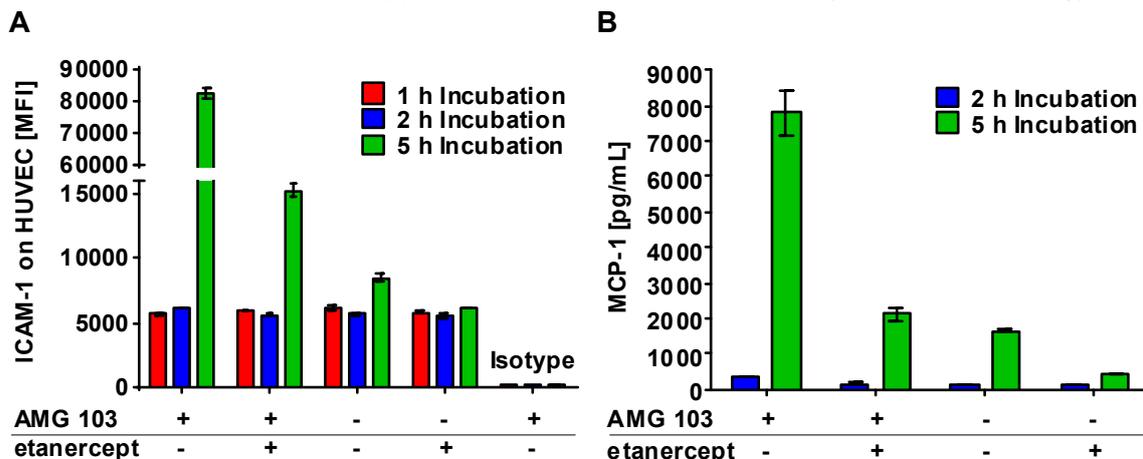
ブリナツモマブ誘導性の T細胞活性化によって TNF- α の放出が起こる (第 3.2.8 項)。放出された TNF- α は 2 つの異なる膜受容体 (TNFR1 及び TNFR2) を介して細胞応答を誘発する (Bradley, 2008)。内皮細胞への白血球の接着は、TNF- α が誘導する多くの影響のうちのひとつであり、ICAM-1 及び VCAM-1 のような内皮細胞表面の接着分子の発現のアップレギュレーションを介して起こる。この試験では、ブリナツモマブ誘導性の T細胞活性化による内皮細胞接着分子への影響を検討した (R200012 試験)。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、PBMC、NALM-6 細胞及びブリナツモマブを共培養したところ、5 時間以内に HUVEC の ICAM-1 発現上昇が認められた (R200012 試験; 図 31A)。TNF 阻害薬の一つであるエタネルセプトにより ICAM-1 の発現上昇が約 80%減少したことから、この作用は主として TNF シグナル伝達によって介在されることが示された。ブリナツモマブの非存在下では ICAM-1 の発現はわずかに増加したが、同様にエタネルセプトによって減少した。

HUVEC、PBMC 及び NALM-6 細胞を 5 時間共培養したところ、ブリナツモマブの存在下では上清中の単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) 濃度が増加したが、エタネルセプトによって約 70%減少した (図 31B)。ブリナツモマブの非存在下においても、ブリナツモマブ存在下に比べて低濃度ではあるが MCP-1 が検出されたものの、エタネルセプトによってほぼ完全に消失した。

ブリナツモマブの非存在下でみられる ICAM-1 の発現上昇及び MCP-1 分泌のわずかな増加は、細胞培養の培地に存在する TNF- α に起因するものであると考えられた。

図 31 ブリナツモマブが介在する HUVEC の ICAM-1 発現上昇及び MCP-1 分泌増加

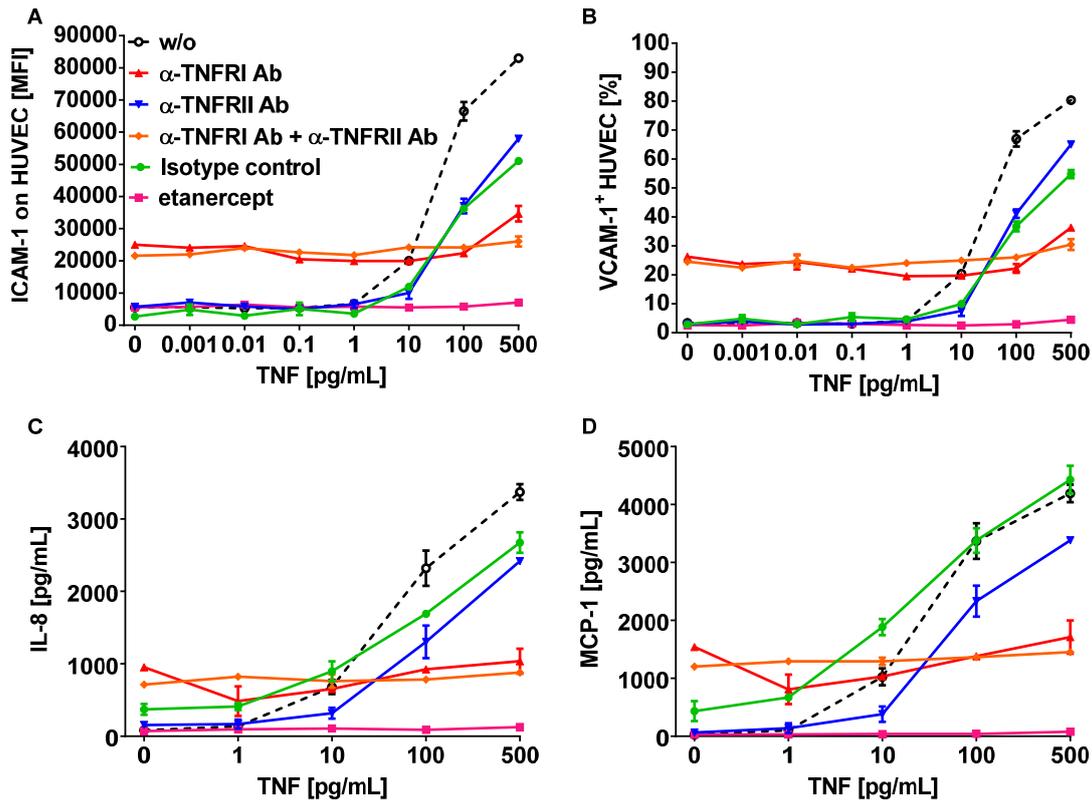


HUVEC (1×10^4) were co-incubated with PBMC (1×10^5), NALM-6 cells (1×10^4) with or without blinatumomab ($1 \mu\text{g/mL}$) and in the presence or absence of etanercept (250 ng/mL), for the indicated times. (A) ICAM-1 expression on CD31+ HUVEC was analyzed by flow cytometry and is expressed as Median Fluorescence Intensity (MFI). (B) MCP-1 concentrations in cell culture supernatants were quantified by the BD Cytometric CBA human MCP-1 Flex Set. Error bars in both graphs indicate the standard error of the mean of duplicate measurements.

Source: Research Report R200012

TNF のシグナル伝達には、TNFR1 及び TNFR2 が介在する。そこで、これらの受容体に対する遮断抗体を用いて、接着分子の発現上昇及びサイトカインの分泌増加に関与するシグナル伝達系を特定した (R200012 試験)。TNFR1 を遮断することにより、TNF による内皮細胞上の接着分子 ICAM-1 (図 32A) 及び VCAM-1 (図 32B) の発現上昇がいずれも抑制され、IL-8 (図 32C) 及び MCP-1 (図 32D) の分泌が共に抑制されたが、TNFR2 の遮断ではこのような抑制は認められなかった。

図 32 TNFR1 介在性の ICAM-1 及び VCAM-1 発現上昇、並びに IL-8 及び MCP-1 の分泌



HUVEC (1×10^4) were pre-incubated with etanercept, blocking antibodies against TNFR1 or TNFR2, or an isotype control for both TNFR antibodies. Increasing concentrations of TNF were added to the cells for 5 hours. (A) ICAM-1 and (B) VCAM-1 expression on CD31+ HUVEC were analyzed by flow cytometry. (C) IL-8 and (D) MCP-1 concentrations in cell culture supernatants were determined by the BD Cytometric CBA human Flex Set system. Error bars in both graphs indicate the standard error of the mean of duplicate measurements.

Source: Research Report R200012

NALM-6 細胞非存在下において、T 細胞の活性化及び内皮細胞上接着分子 (ICAM-1 又は VCAM-1) の発現誘導に対するブリナツモマブの影響を解析した。2名の異なるドナー (No. 381、No. 399) から分離した T 細胞とブリナツモマブを NALM-6 細胞非存在下で共培養したとき、ブリナツモマブは 10 ng/mL を超える濃度で、HUVEC の ICAM-1 の発現をわずかに上昇させた (図 33A)。

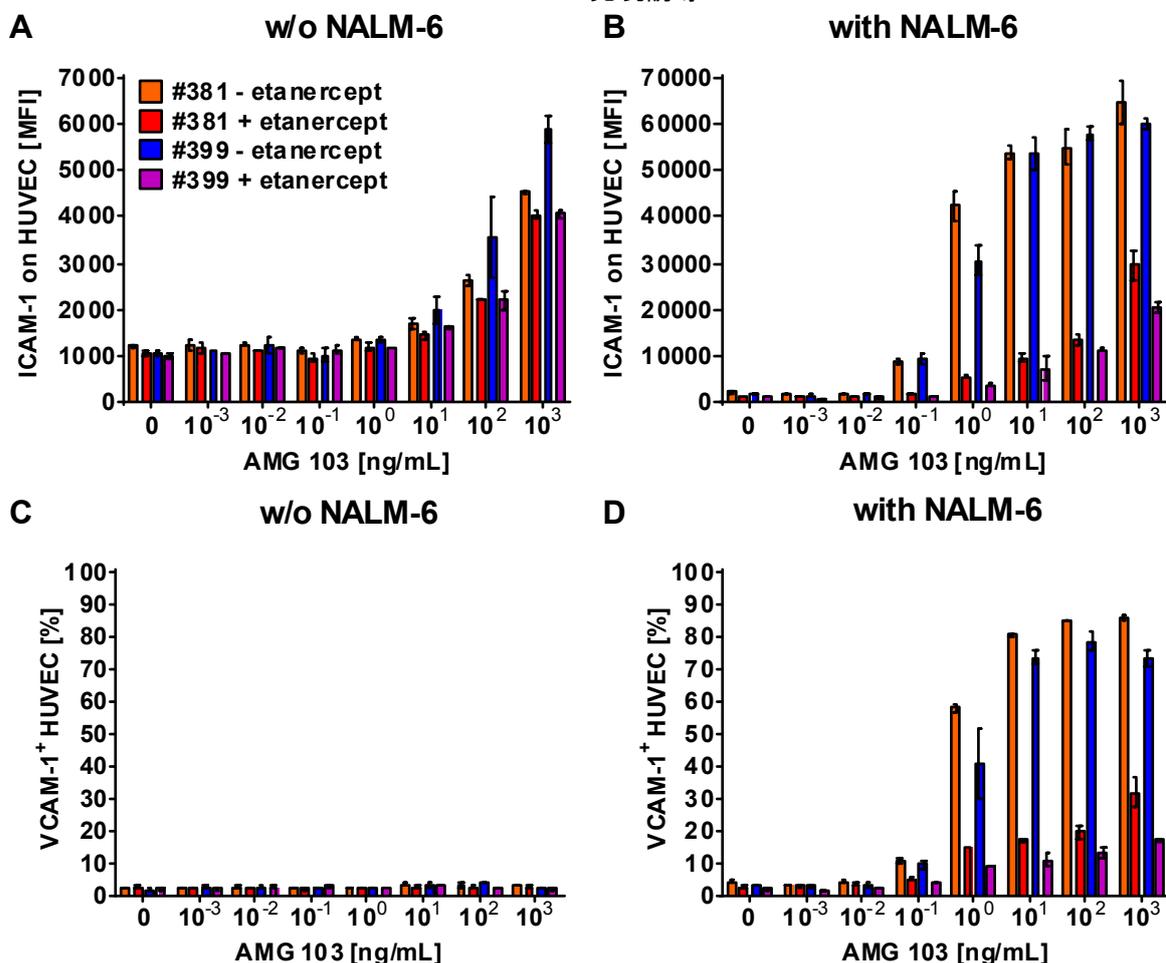
これに対して、NALM-6 細胞存在下では、10 ng/mL のブリナツモマブで最大 30 倍以上の ICAM-1 発現上昇が認められ、はるかに低濃度 (> 100 pg/mL) においても ICAM-1 の発現が誘導さ

れた (図 33B)。また、ICAM-1 の発現がエタネルセプトによって抑制されたことから、NALM-6 細胞の存在下における ICAM-1 の発現上昇は主として TNF によって誘導されたものであった。

NALM-6 細胞非存在下で 2 名の異なるドナーから分離した T 細胞とブリナツモマブを共培養したところ、ブリナツモマブによる HUVEC の VCAM-1 発現上昇は認められなかった (図 33C)。しかし、NALM-6 細胞存在下で観察された VCAM-1 の発現上昇がエタネルセプトで抑制されることから、VCAM-1 の発現上昇には TNF が重要な役割を担っていることが示された (図 33D)。

NALM-6 細胞非存在下でも HUVEC の ICAM-1 の発現誘導がみられたが、この条件下では T 細胞活性化マーカーである CD69 の誘導が認められなかったため、ブリナツモマブによる非特異的な T 細胞活性化に起因するものではないと考えられた (図 34A、B)。

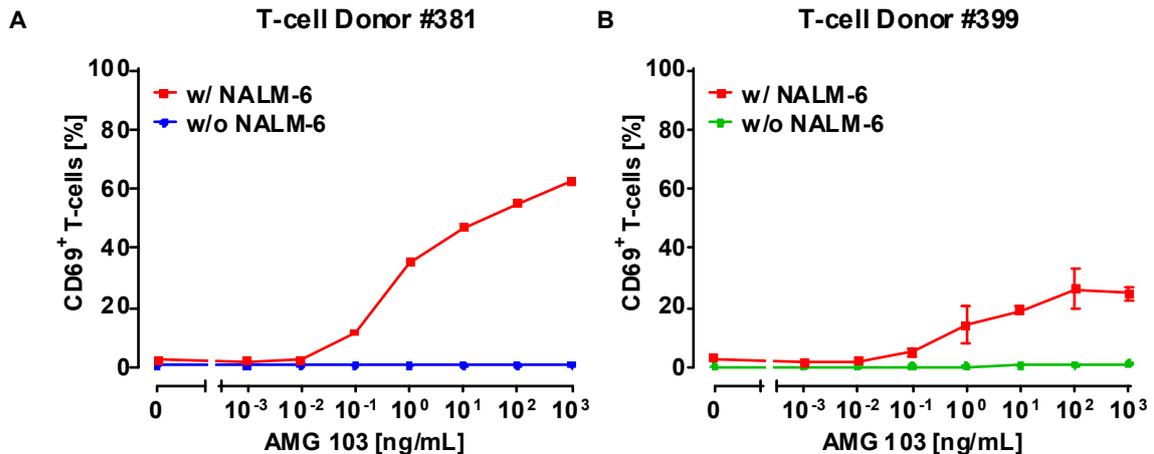
図 33 NALM-6 細胞存在下又は非存在下におけるブリナツモマブによる HUVEC の ICAM-1 及び VCAM-1 発現誘導



HUVEC were co-incubated with isolated T-cells from two donors (#381, #399), and increasing concentrations of blinatumomab in the absence and presence of CD19⁺ NALM-6 cells for 24 hours. CD31⁺ HUVEC were analyzed for ICAM-1 (A, B) and VCAM-1 (C, D) expression by flow cytometry. ICAM-1 expression levels are expressed as Median Fluorescence Intensity (MFI). VCAM-1 expressing HUVEC are expressed as percentage of CD31⁺ HUVEC. Error bars indicate the standard error of the mean of duplicate measurements.

Source: Research Report R200012

図 34 NALM-6 細胞存在下又は非存在下におけるブリナツモマブによる HUVEC の CD69 陽性 T 細胞増加



HUVEC were co-incubated with isolated T-cells from two donors (#381, #399), and increasing concentrations of blinatumomab in the absence and presence of CD19⁺ NALM-6 cells for 24 hours. AMG 103-dependent up-regulation of CD69 was assessed on T-cells from donors #381 (A) and #399 (B) in the presence (red line) and absence (blue and green line) of NALM-6 cells. Error bars indicate the standard error of the mean of duplicate measurements.

Source: Research Report R2000012

総合すると、上記のデータは、ブリナツモマブが NALM-6 細胞存在下で HUVEC における ICAM-1 の発現上昇及び HUVEC からの MCP-1 分泌を誘導したことを示している。これらは、ブリナツモマブ誘導性の T 細胞活性化による TNF の放出の結果、TNFRI の活性化によって誘発された現象であったため、エタネルセプトにより遮断することができたと考えられた。NALM-6 細胞の非存在下でもブリナツモマブによる ICAM-1 の発現上昇がわずかに認められたが、この作用は非常に高濃度のブリナツモマブによって引き起こされたものであった。

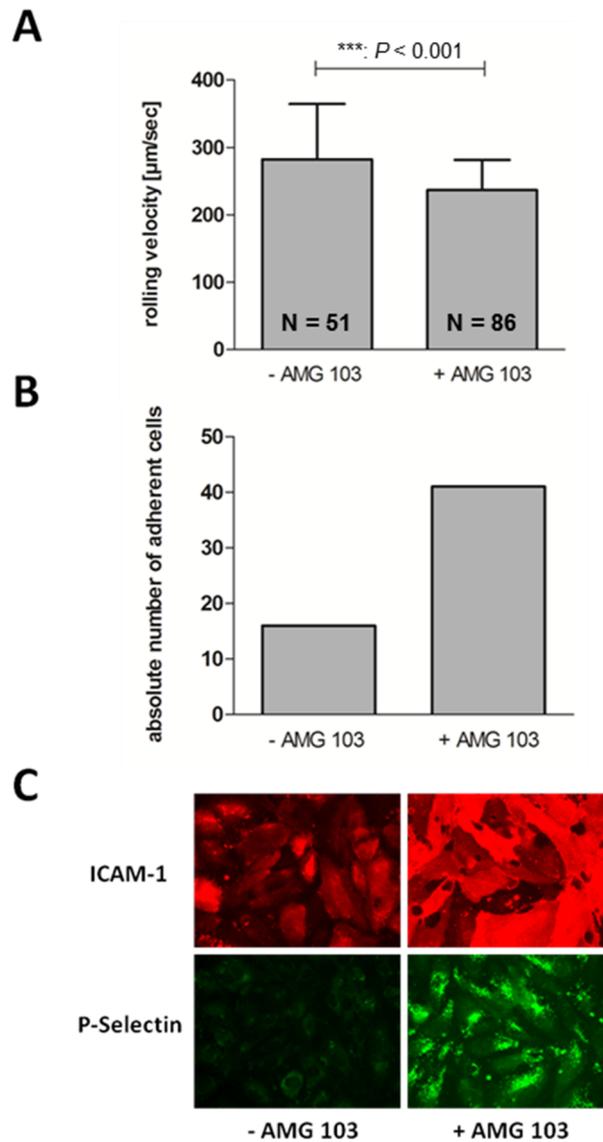
4.1.1 ブリナツモマブによる T 細胞の内皮細胞への接着性亢進

T 細胞の末梢血中への再分布は、ブリナツモマブの臨床試験で観察された最初の薬力学的シグナルである (Klinger et al, 2012)。いずれの細胞接着分子が関与しているのかを明らかにするため、内皮細胞上での T 細胞のローリング速度及び内皮細胞への T 細胞の接着に対するブリナツモマブの CD19 非依存性作用を、in vitro のフローチャンバーシステムを用いて検討した (R2000011 試験)。血管内の状態を模擬した一定の流動条件下において、HUVEC 又はヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMEC) をコンフルエントに達するまで培養した。続いて、分離したヒト T 細胞をフローチャンバーシステムに添加し、後毛細血管の流動条件下 (せん断力は約 1 dyn/cm²) で T 細胞のローリング速度及び内皮細胞への接着を記録した。その結果、HUVEC (図 35A) 及び HBMEC (図 36) のいずれにおいても、ブリナツモマブによって T 細胞のローリング速度が有意に低下した。また、これと同時に、HUVEC に強固に接着している T 細胞数が増加した (図 35B)。上記の結果は、ブリナツモマブが細胞接着分子の発現を上昇させた結果として、T 細胞の内皮細胞への接着性が亢進したことを示している。T 細胞のローリング速度の低下と同様の現象、すなわち T 細胞と内皮細胞の強固な接着及び T 細胞の血管外への遊走は、自然免疫応答の過程であるケモカイン刺激による組織への T 細胞浸潤においても起こるとされている (Langer and Chavakis 2009)。

加えて、免疫蛍光法を用いて内皮細胞における接着分子の発現を解析したところ、ブリナツモマブによる刺激を受けた T 細胞と共培養した HUVEC 表面上の P-セ렉チン及び ICAM-1 の発現が上昇していたが（図 35C）、T 細胞又はブリナツモマブ単独ではこれらの接着分子の発現量に変化を及ぼさなかった。この結果は、ブリナツモマブによって T 細胞と内皮細胞の直接的な接触が増加し、それによって接着分子の発現が上昇（すなわち、内皮細胞の活性化）したことを示唆している。またブリナツモマブは、T 細胞の接着性を亢進させるにもかかわらず、標的細胞の非存在下では T 細胞の活性化をもたらさなかった（活性化マーカーである CD69 及び CD25 を増加させなかった）（R200012 試験）。

結論として、ブリナツモマブが T 細胞の接着性を亢進させることによって、内皮細胞と T 細胞との接着が増加し、また、内皮細胞上での T 細胞ローリングの速度が低下する。そのことが内皮細胞を活性化し、接着分子の発現を増加させると考えられる。

図 35 ブリナツモマブによる HUVEC 上での T 細胞ローリング速度の低下、
接着 T 細胞数の増加、及び HUVEC の接着分子の発現上昇



A. Pre-incubation of T cells with blinatumomab (+ AMG 103) significantly reduces the mean T cell rolling velocity. Number of analyzed cells is shown. $P < 0.05$ is considered significant by unpaired t-test. B. Pre-incubation of T cells with blinatumomab (+ AMG 103) increases the absolute number of adherent T cells. C. Immunofluorescence staining of P-selectin and ICAM-1 on HUVEC. Surface expression of both adhesion molecules is increased on HUVEC which have been in prior contact to blinatumomab-stimulated T cells (+ AMG 103). A-C. “- AMG 103” denotes parallel experiments with non-stimulated T cells.

Source: Research Report R200011

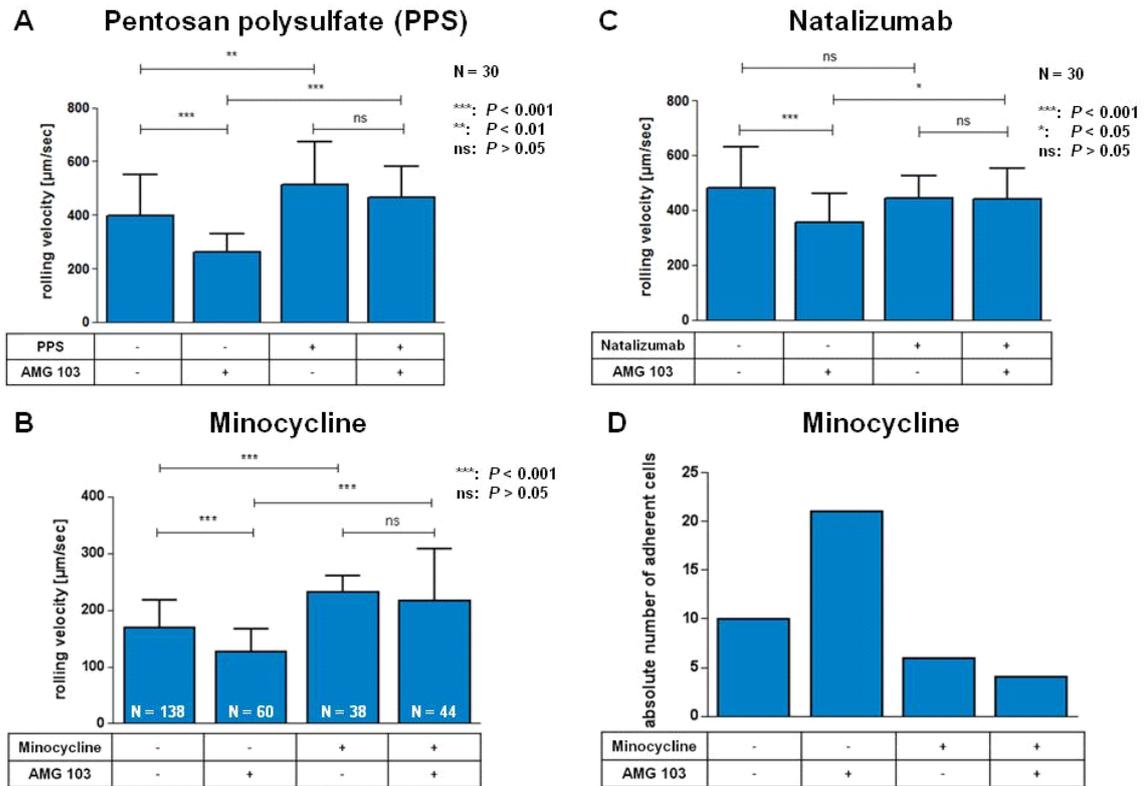
4.1.2 Pentosan polysulfate、ミノサイクリン及びナタリズマブの、ブリナツモマブ誘導性 T 細胞ローリング速度の低下及び内皮細胞への T 細胞接着阻止

臨床で利用することができる 3 種の薬物によって、ブリナツモマブによる T 細胞ローリング速度の低下及び内皮細胞への T 細胞接着が阻止されるか否かを動的フローチャンバーを用いて検討した (R200011 試験)。

- Pentosan polysulfate は、内皮細胞上の P-セレクトリンに結合する。これによって、T細胞上の PSGL-1 への P-セレクトリンの結合を阻害し、T細胞ローリング速度の低下を阻止する可能性がある。
- ミノサイクリンは、T細胞上の LFA-1 の発現及び機能を障害する。これによって、内皮細胞上の ICAM-1/-2 への LFA-1 の結合を減弱させ、T細胞の接着を阻止する可能性がある。
- ナタリズマブは、T細胞上の VLA-4 に結合する。これによって、内皮細胞上の VCAM-1 への VLA-4 の結合を阻害し、T細胞ローリング速度の低下及びT細胞接着の双方を阻止する可能性がある。

第 4.1.1 項に述べたように、ブリナツモマブは HBMEC あるいは HUVEC 上の T細胞ローリング速度を有意に低下させる (図 36A~C、それぞれの図の 2 番目のカラム)。HBMEC については pentosan polysulfate (図 36A、図の 4 番目のカラム) あるいは T細胞とともにナタリズマブ (図 36C、図の 4 番目のカラム) を、HUVEC については T細胞とともにミノサイクリン (図 36B、図の 4 番目のカラム) を添加して共培養した結果、ブリナツモマブ誘導性の T細胞ローリング速度の低下が阻害された。また、上記のいずれかの薬物をフローチャンバーシステムに添加することにより、ブリナツモマブによって誘導される内皮細胞表面接着分子 (P-セレクトリン及び ICAM-1) の発現上昇が抑制された。HUVEC への T細胞接着を解析したところ、内皮細胞に強固に接着している T細胞の数がミノサイクリンによって有意に減少することが示された (図 36D、2 番目のカラム対 4 番目のカラム)。

図 36 ブリナツモマブ誘導性 T 細胞ローリング速度の低下及び T 細胞接着に対する Pentosan polysulfate、ミノサイクリン及びナタリズマブの阻害作用



A-C. Pre-incubation of endothelial cells with PPS (A) or of T cells with either minocycline (B) or natalizumab (C) prevents blinatumomab-induced reduction of T cell rolling velocity on HBMEC (A and C) or HUVEC (B) (2nd vs. 4th columns, respectively). 1st columns show mean rolling velocities of non-stimulated T cells, and 3rd columns show mean rolling velocities of non-stimulated T cells in pre-incubation conditions, respectively. Number of analyzed cells per column is shown. Asterisks in the figure legend denote statistically significant differences (one-way ANOVA with a Tukey post-test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). $P > 0.05$ is considered not significant (ns). D. Pre-incubation of T cells with minocycline reduces the absolute number of adherent T cells to HUVEC even in the presence of blinatumomab (2nd vs. 4th column).

Source: Research Report R200011

結論として、pentosan polysulfate、ミノサイクリン及びナタリズマブは、ブリナツモマブ誘導性の T 細胞ローリング速度の低下及び内皮細胞への T 細胞接着を阻止する可能性がある。

5. 安全性薬理試験

5.1 muS103new の呼吸系に及ぼす影響

覚醒下の雄の BALB/c マウス各群 8 例に muS103new を 0 (溶媒)、0.2、1 及び 5 mg/kg の用量 (投与容量 5 mL/kg) で急速静脈内投与し、呼吸系に及ぼす影響を検討した (103-PCD-0077 試験)。全身プレチスモグラフィを用いて、投与後 120 分間までの吸気時間、呼気時間、最大吸気流量、最大呼気流量、一回換気量、呼吸数、弛緩時間並びに休止時間を評価した。また、relaxation time、pause、enhanced pause も評価した。陽性対照はテオフィリンを用いた。

テオフィリン 50 mg/kg の経口投与により、吸気時間の短縮が認められた。muS103new はいずれの呼吸パラメータにも影響を及ぼさなかった。

5.2 muS103new の中枢神経系に及ぼす影響

覚醒下の雄の BALB/c マウス各群 6 例に muS103new を 0 (生理食塩水)、0 (溶媒)、0.2、1 及び 5 mg/kg の用量 (投与容量 5 mL/kg) で 1 日 1 回 5 日間急速静脈内投与し、Irwin の方法を用いて一般症状・行動の変化及び体重を指標として中枢神経系への影響を検討した (103-PCD-0078 試験)。評価は、すべての投与日の投与前、投与 1 日及び 5 日の投与後 15 分、60 分及び 180 分、並びに投与 2 日から 4 日までの投与後 15 分に実施した。溶媒対照群に加え、陰性対照として生理食塩水を、陽性対照としてミダゾラムをそれぞれ用いた。

溶媒投与群では、投与 1 日から 5 日まで影響は認められなかった。

ミダゾラム投与群では、30 mg/kg を単回静脈内投与したところ、ミダゾラムの薬理学的プロファイルに一致した中枢神経系に対する鎮静作用が認められた。

muS103new の 0.2 及び 5 mg/kg 投与群では、投与 1 日から 5 日まで著変を認めなかった。

muS103new の 1 mg/kg 静脈内投与群では、6 例中 1 例で投与 3 日より鎮静/筋弛緩作用 (自発運動、反応性及び筋緊張の低下、立毛、眼瞼下垂並びに低体温) が認められ、投与 5 日目までに有意な体重減少が認められた。

以上の結果から、muS103new は 1 mg/kg で鎮静/筋弛緩作用及び体重の減少を誘発したものの、最高用量の 5 mg/kg においては明らかな影響が認められなかった。

5.3 ブリナツモマブの心血管系及び呼吸系に及ぼす影響

麻酔した雌のビーグル犬 5 例を用い、ブリナツモマブを 0、1.7、8.5 及び 17 µg/kg の投与量で急速静脈内投与し、心血管パラメータ及び呼吸系に対する影響を評価した (103-PCD-0006 試験)。なお、ブリナツモマブはイヌに対して薬理活性は有していない。溶媒として 0.1% ヒト血清アルブミンを含む等張リン酸緩衝液を用い、投与容量はいずれも 2 mL/kg とした。前処置後に 15 分以上放置し循環機能を安定化させた後、溶媒及び 3 用量のブリナツモマブを漸増的にそれぞれ 2 分間かけ急速静脈内投与した。投与は 60 分間隔で行い、投与後 30 分間を観察期間として末梢動脈圧、肺動脈血圧、心電図、心拍数、心拍出量、収縮期左室圧、中心静脈圧、呼吸数、分時換気量及び血液ガスを測定し、投与前値と比較した。観察終了後から 30 分間を回復時間とした。

その結果、最高用量である 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ まで、いずれの心血管系及び呼吸系パラメータにも有意な変化は認められなかった。

5.4 マウスを用いた muS103new の探索的 7 日間脳室内持続投与試験

ブリナツモマブの臨床試験で複数の神経学的影響が認められたことを受け、高濃度の muS103new を脳に直接投与したときに神経学的影響が誘発されるかを検討するため、マウスを用いて追加の安全性薬理試験を実施した (103-PCD-0103 試験)。

雄の BALB/c マウス各群 10 例を用い、人工脳脊髄液 (Na: 150 mM、K: 3.0 mM、Ca: 1.4 mM、Mg: 0.8 mM、P: 1.0 mM 及び Cl: 155 mM) を充填して皮下に埋め込んだ ALZET[®] ポンプにカテーテルで接続した脳室内 (ICV) カニューレを左 ICV に留置した。6 日間の馴化後、埋め込まれていたポンプを溶媒又は muS103new を充填したポンプと交換して投与を開始した。muS103new は、0.042 mg/kg/日及び技術的に投与可能な最高用量である 0.978 mg/kg/日の用量で少なくとも 7 日間 ICV へ持続投与した。

投与前及び投与 10 日までの各日に最大 6 回、行動への影響 (痙攣、振戦、立毛、跳躍、運動協調性及び自発運動量の変化) を観察した。

溶媒対照群を含め、すべての動物で投与 2 日から 4 日に軽度の立毛がみられた。最高用量である 0.978 mg/kg/日投与群では 3 例で投与 2 日から 4 日に中等度の立毛が認められた。このうち 1 例では投与 2 日から 4 日に、残りの 2 例では投与 3 日に軽度の自発運動量の減少が認められた。これらの所見は、手術後から投与前までに充填されていた人工脳脊髄液が置換されたことにより生じたものと考えられた。

0.042 mg/kg 群の 1 例は、投与 4 日以降 28% の体重減少がみられたため、投与 8 日に安楽死させた。この個体は脱水状態であり、給水ボトルが詰まっていたことから、この死亡は muS103new 投与とは関連しないものと考えられた。

溶媒及び muS103new 投与群のいずれにおいても、投与 2~10 日まで上記以外の行動の変化、生理学的変化又は神経毒性は認められなかった。また、期間を通じて平均体重への影響も認められなかった。

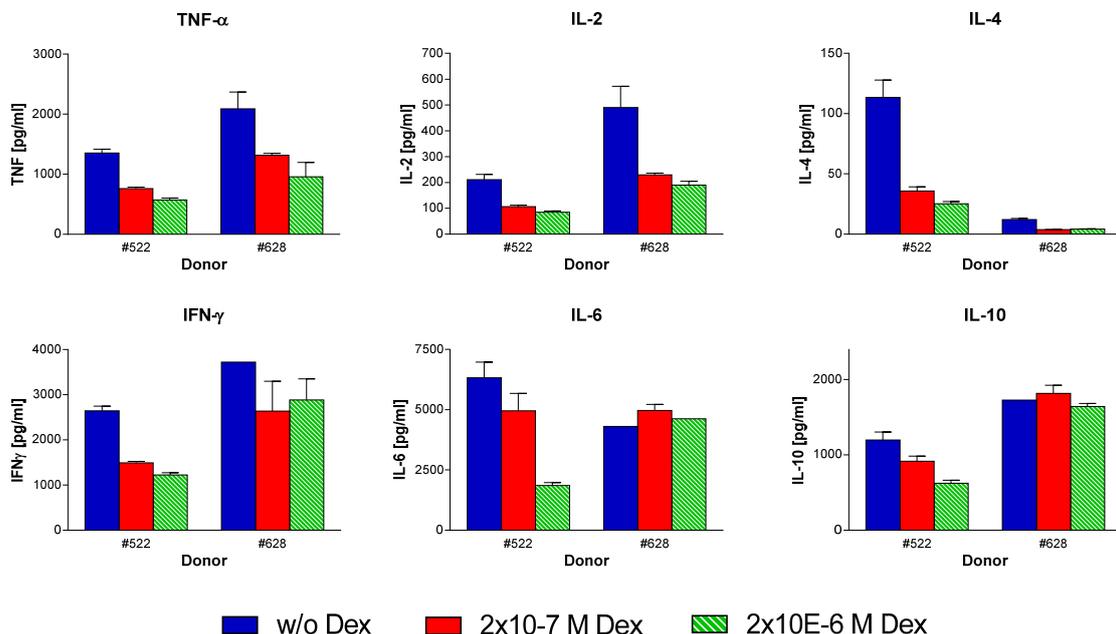
したがって、マウスに muS103new を 7 日間 ICV 持続投与したとき、0.978 mg/kg/日まで muS103new ICV 持続投与に起因した神経学的影響は認められなかった。

6. 薬力学的薬物相互作用

6.1 ブリナツモマブ介在性リダイレクト細胞溶解及びサイトカイン放出に対するデキサメタゾン及びインドメタシンの影響

デキサメタゾンは、ブリナツモマブ誘導性の炎症性サイトカインの放出を抑制し、これに伴う有害事象を軽減するために臨床の現場で用いられる。そこで、*in vitro* 試験において、ブリナツモマブ誘導性のリダイレクト細胞溶解及びT細胞のサイトカイン放出の双方に対するデキサメタゾンの影響を検討した (Brandl et al, 2007 ; 103-PCD-0071 試験)。デキサメタゾンは $2 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-6}$ mol/L において、ブリナツモマブ介在性の T 細胞活性化後の複数のサイトカイン、すなわち IL-2、TNF- α 、IL-6 及び IL-4 の放出量を減少させた (図 37)。また、IFN- γ 及び IL-10 の放出量も減少させたが、その程度は小さかった。この濃度は、デキサメタゾン 7.5 mg を服用した被験者で服用 1 時間後に観察された最高血漿中濃度にほぼ相当する (Weijtens et al, 1998)。ブリナツモマブ介在性の NALM-6 細胞の溶解は 2×10^{-7} mol/L のデキサメタゾン前処置の影響を受けなかったことから、ブリナツモマブの細胞傷害活性はサイトカインの放出に依存しないことが示唆された (図 38)。したがって、デキサメタゾン等の抗炎症薬はブリナツモマブの細胞傷害活性にほとんど又は全く影響を及ぼさないと考えられる。この結果は、炎症性サイトカインによって引き起こされる可能性のある副作用を低減するため、デキサメタゾン等の抗炎症薬を使用することの根拠となる。

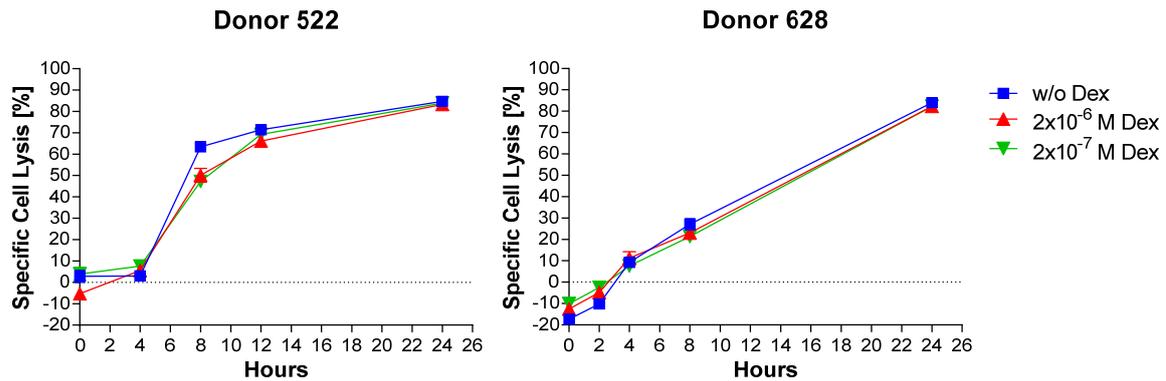
図 37 デキサメタゾンによるブリナツモマブ誘導性サイトカイン放出の減少



PBMCs of two donors were pre-incubated with 2×10^{-6} M and 2×10^{-7} M dexamethasone for 14 hours. Data represent the effects on TNF- α , IL-2 and IL-4 levels 8 hours after blinatumomab (1 ng/mL) addition and on IFN- γ , IL-6 and IL-10 levels after 24 hours. Cytokine concentrations were determined with the CBA assay. Bars represent mean of triplicate measurements. Error bars represent the SEM.

Source: Research Report 103-PCD-0071

図 38 PBMC のデキサメタゾン前処置によるブリナツモマブ誘導性 NALM-6 細胞溶解反応への影響



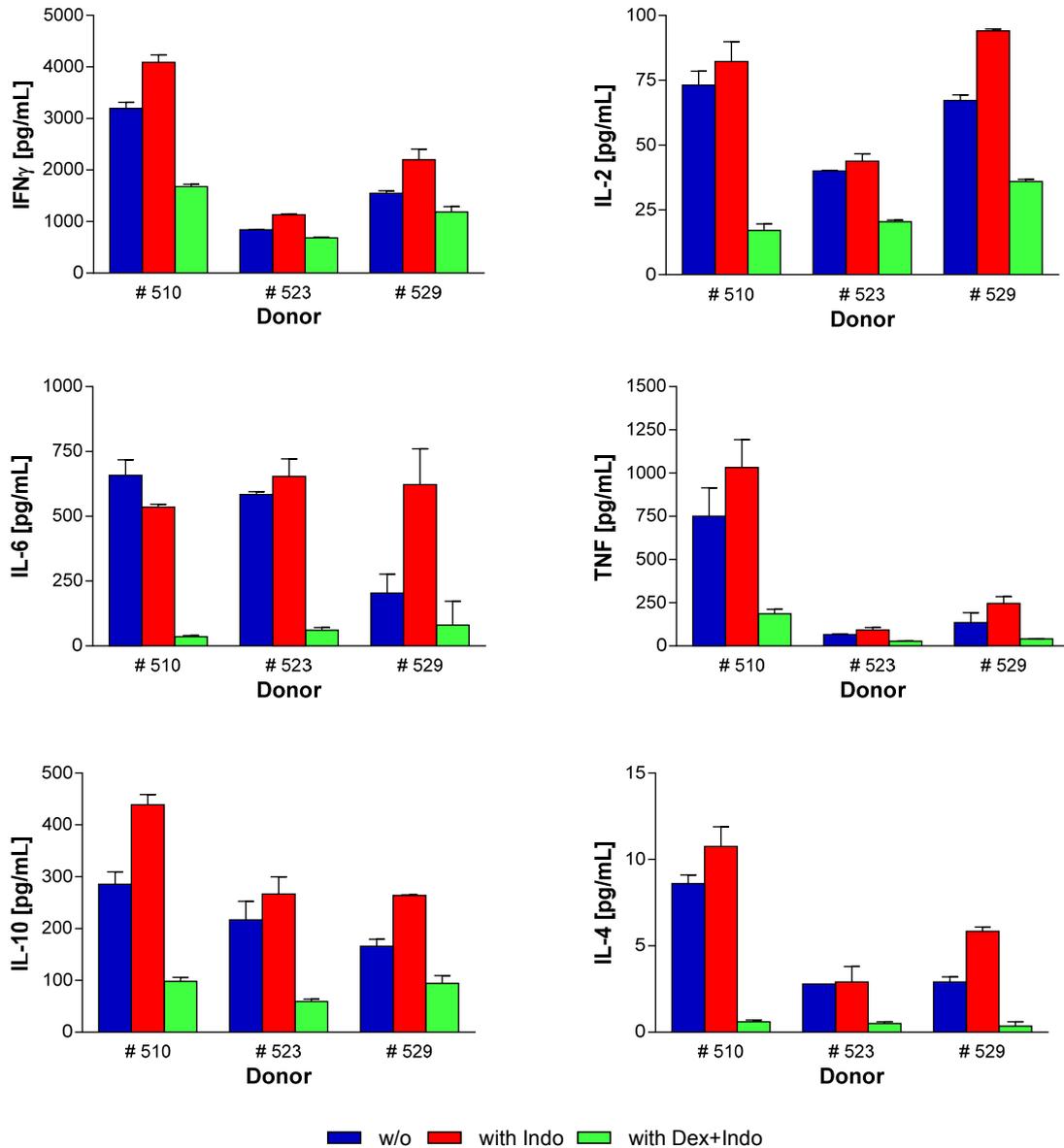
PBMC of two donors were pre-treated for 14 hours with dexamethasone at 2×10^{-6} mol/L or 2×10^{-7} mol/L before addition of blinatumomab (1 ng/mL) and PKH-26-fluorescently labeled NALM-6 target cells. Controls were incubated in culture medium only. Specific cell lysis was determined at 0, 2, 4, 8, 12 and 24 hours after blinatumomab was added. Symbols represent mean of triplicate measurements. Error bars represent the SEM.

Source: Research Report 103-PCD-0071

非ステロイド性抗炎症薬は、プロスタグランジン及びその他の炎症性物質（IL-1、IL-6等）の合成を低下させることによって治療効果あるいは毒性作用を示す。インドメタシンは、シクロオキシゲナーゼを阻害する非ステロイド性抗炎症薬である。ステロイド薬の反復投与によって起こる可能性がある副作用を考慮すると、インドメタシンが代用若しくは併用されることが考えられる。そのため、ブリナツモマブ介在性のサイトカイン放出に対するインドメタシン単独又はデキサメタゾンとの併用の影響を検討することが重要であると考えられた。

インドメタシン単独ではサイトカイン放出の減少は認められず（図 39）、むしろ、インドメタシンの前処置によりわずかに増加する傾向がみられた。インドメタシンとデキサメタゾンとの併用時には、サイトカイン放出の減少が認められた。したがって、観察された作用は、デキサメタゾンに起因するものであると考えられる（図 39）。また、インドメタシン単独又はインドメタシンとデキサメタゾンとの併用においてエフェクター細胞を前処置しても、NALM-6細胞におけるブリナツモマブ介在性リダイレクト細胞溶解にいかなる影響も及ぼさなかった（図 40）。

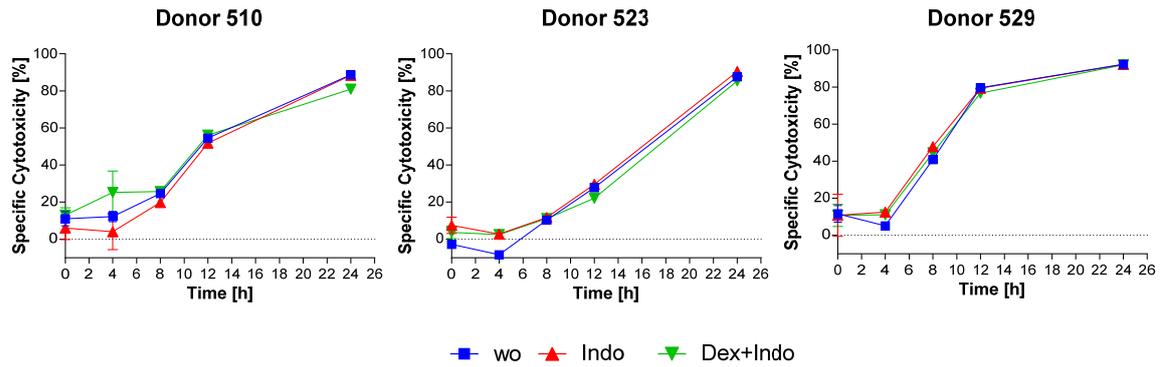
図 39 ブリナツモマブ誘導性サイトカイン放出に対するインドメタシン単独及びデキサメタゾンとの併用効果



PBMCs of 3 donors were pre-incubated for 1 hour with a combination of 1×10^{-7} mol/L indomethacin and 3×10^{-8} mol/L dexamethasone. The cytokine levels of IL-2, TNF- α , and IL-4 were measured 12 hours after incubation in the presence of 1 ng/mL blinatumomab. IFN- γ , IL-10 and IL-6 levels were determined after 24 hours. Cytokine secretion in the supernatant was measured in duplicates using the CBA system. The bar graphs depict the mean cytokine reduction of single donors; error bars represent the SEM.

Source: Research Report 103-PCD-0071

図 40 インドメタシン単独又はデキサメタゾンとインドメタシンとの併用時におけるブリナツモマブによるNALM-6細胞の溶解



PBMCs from 3 human donors were pre-incubated for 1 hour with 1×10^{-7} mol/L indomethacin or indomethacin plus 3×10^{-8} mol/L dexamethasone before blinatumomab (1 ng/mL) and PKH-26-labeled NALM-6 target cell addition. Indomethacin and/or dexamethasone were present during the blinatumomab incubation time. Controls were incubated in culture medium only. Specific cell lysis was determined at 0, 4, 8, 12 and 24 hours after blinatumomab was added. Symbols represent the mean of triplicate measurements. Error bars represent the SEM.

Source: Research Report 103-PCD-0071

7. 考察及び結論

ブリナツモマブは、BiTE 抗体である。柔軟性のあるリンカーで結合された 2 つの異なる一本鎖抗体可変ドメインからなり、一方は B 細胞の CD19 を、他方は T 細胞の CD3 を標的とする。ブリナツモマブは、標的発現細胞に CD19 依存性のリダイレクト細胞溶解を誘導するために、CD19 陽性細胞と T 細胞とを一過性に架橋させる。これは、細胞傷害性 T 細胞の応答に酷似させたものである。ブリナツモマブは標的細胞依存的に T 細胞を活性化することで細胞傷害性を示した。また、標的細胞非存在下においても T 細胞の内皮細胞への接着特性を変化させたが、その機序は明らかにされていない。ブリナツモマブは、CD19 陽性細胞性の悪性腫瘍の治療薬として開発中であり、臨床投与経路は静脈内持続注入である。

ブリナツモマブは、成人及び小児のさまざまな B 細胞性腫瘍細胞株又は患者の腫瘍細胞に対しても細胞傷害活性を示し、EC₅₀ 値は 1~1000 pg/mL (0.018~18 pmol/L) の濃度範囲であった。ブリナツモマブは、他の T 細胞療法とは異なり、共刺激シグナルを必要とすることなく、リダイレクト細胞溶解刺激を受けたことがない T 細胞を活性化する。腫瘍細胞株に対する細胞傷害活性を示す EC₅₀ 値が大きくばらついている。このひとつの要因は、エフェクター T 細胞の反応性がドナーによって異なることである。また、腫瘍細胞株の種類によっても CD19 の発現量が異なることがあり、ブリナツモマブの BiTE 活性が細胞表面の標的分子発現量と相関することを考慮すると、この相違がブリナツモマブの効力に影響を及ぼすことが考えられる (Laszlo et al, 2014)。さらに、細胞株ごとに細胞傷害及びアポトーシスの誘導に対する感受性が異なる可能性があり、これらがブリナツモマブの EC₅₀ 値のばらつきの大きな原因となると考えられる (Hanahan and Weinberg 2011)。

ブリナツモマブは、T 細胞による炎症性サイトカインの産生を誘導する。このようなサイトカインには、発熱又は血圧低下のような臨床症状を誘発する可能性がある TNF- α 、IFN- α 、IL-6 及び IL-2 が含まれる。ブリナツモマブによって誘導されるサイトカイン放出について特に重要な点は以下のとおりである。

(1) 一過性である、(2) ブリナツモマブの細胞傷害作用よりも遅れて放出されることから、リダイレクト細胞溶解には必要とされない、(3) 標的細胞の存在に完全に依存している、及び (4) デキサメタゾンにより、リダイレクト細胞溶解への影響を伴うことなく低減することができる。

ブリナツモマブは、サイトカイン放出に加えて T 細胞の増殖を誘発する。また、T 細胞活性化マーカーである CD69 及び CD25、並びに細胞接着分子である CD2 及び LFA-1 の発現を上昇させ (Brandl et al, 2007)、細胞傷害性タンパク質であるグランザイム B の発現上昇を誘導する。さまざまな E : T 細胞比にわたって一貫して細胞死を誘導し、1 : 10 という非常に低い比率においても有効である。ビデオ顕微鏡を用いた実験 (Hoffmann et al, 2005) と併せ考えると、これらのデータは、ブリナツモマブによって活性化された T 細胞が CD19 陽性細胞を次々と溶解する能力を有することを示唆するものである。

ブリナツモマブが T 細胞に結合することにより、標的細胞の存在下又は非存在下において内皮細胞上の接着分子の発現上昇及び T 細胞のローリング速度の低下のような副次的な薬力学的影響が生じ得る。In vitro 試験において、TNF 阻害薬の 1 つであるエタネルセプトにより、ブリナツモマブ存在性の ICAM-1 及び VCAM-1 の発現上昇、並びに内皮細胞によるサイトカイン分泌の双方がほぼ完全に阻止された。同様に、動的フローチャンバーを用いた試験において、pentosan polysulfate (P-セ

レクチンに結合して PSGL-1 への結合を阻害)、ミノサイクリン (LFA-1 を阻害して ICAM-1/2 への結合を減弱)、及びナタリズマブ (VLA-4 に結合して VCAM-1 への結合を阻害) により、ブリナツモマブによって誘導される内皮細胞上での T 細胞のローリング速度の低下及び内皮細胞の接着因子の発現上昇が阻害された。

In vivo 試験でのブリナツモマブの有効性は、ヒト T 細胞を投与したさまざまなマウス異種移植モデルにおける抗腫瘍効果によって裏付けられている。ブリナツモマブは、0.5 µg/kg/日という低い用量においても、さまざまな B 細胞性白血病及び B 細胞性リンパ腫から樹立された複数の腫瘍細胞株の腫瘍形成を有意に抑制し、増殖を有意に遅延させた。また、同所性腫瘍モデルにおいても、3 µg/kg/日以上用量で生存期間を有意に延長した。

ブリナツモマブが交差反応性を示す動物種は限定されていたため、非臨床での安全性評価に用いるマウス代替抗体 (muS103new) を開発した。muS103new の薬理学的特性はブリナツモマブと同等であることが示され、マウスにおいて使用するブリナツモマブの代替抗体として適切であると判断された。

ヒト初回投与試験に先立ち、イヌにおいてブリナツモマブの心血管系に関する安全性試験を実施したところ、影響は認められなかった。イヌは薬理学的に反応性を示さない動物種であるため、当該試験の意義は限定的である。一方、薬理学的にブリナツモマブに交差反応性を有する動物種であるチンパンジーを用いて、血圧、心拍数及び心電図の測定を含むバイタルサインについて評価した (103-PCD-0009 試験、103-PCD-0015 試験、103-PCD-0016 試験)。ブリナツモマブを 2 時間かけて静脈内投与した結果、体温のわずかな上昇に加え一過性の血圧低下並びに心拍数の増加が認められた。呼吸系及び中枢神経系の安全性薬理の評価については、マウスを対象に muS103new を用いて実施した。Irwin 試験において、muS103new の 1 mg/kg を静脈内投与した 1 例で鎮静/筋弛緩作用が認められ、しかしながら、5 倍高い用量を投与しても同様の所見が認められなかったため、投与との関連はないことが示唆された。この作用は muS103new に対する感受性の個体差であると評価した。また、その後実施した、muS103new の 1 及び 5 mg/kg/日を 28 日間静脈内投与した試験、及び最高用量として 10 mg/kg/日を 13 日間皮下投与した試験からも、安全性薬理試験において本個体で観察された所見が muS103new の投与に関連しないとする結論が裏付けられた。これらの結果、呼吸系及び中枢神経系に対し muS103new の投与に起因した作用はみられなかった。

結論として、ブリナツモマブの有効性は in vitro (細胞株及び患者の腫瘍試料) 及び in vivo のさまざまな腫瘍モデルにおいて検討され、腫瘍増殖の大幅な抑制、腫瘍の根絶、及び生存期間の延長に有効であることが示された。

8. 引用文献

- Bradley, J.R. TNF-mediated inflammatory disease, *J Pathol.* 2008;214(2):149-160.
- Brandl C, Haas C, d'Arquques S, et al. The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Can Imm.* 2007;56(10):1551-1563.
- Brischwein K, Parr L, Pflanz S, et al. Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class. *J Immunother.* 2007;30(8):798-807.
- d'Argouges S, Wissing S, Brandl C, et al. Combination of rituximab with blinatumomab (MT103/MEDI-538), a T cell-engaging CD19-/CD3-bispecific antibody, for highly efficient lysis of human B lymphoma cells. *Leuk Res.* 2009;33:465-473.
- Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, et al. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *Intl J Cancer.* 2002;100(6):690-697.
- Dreier T, Baeuerle P A, Fichtner I. et al. T cell costimulus-independent and very efficacious inhibition of tumor growth in mice bearing subcutaneous or leukemic human B cell lymphoma xenografts by a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *J Immunol.* 2003;170(8):4397-4402.
- Hammond SA, Lutterbuese R, Roff S, et al. Selective Targeting and Potent Control of Tumor Growth Using an EphA2/CD3-Bispecific Single-Chain Antibody Construct. *Cancer Res.* 2007;67(8):3927-3935.
- Hanahan D and Weiberg RA. Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144: 646-674.
- Hoffmann P, Hofmeister R, Brischwein K, et al. Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Int J Cancer.* 2005;115(1):98-104.
- Klinger M, Brand C, Zugmaier G, et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood.* 2012;119(26):6226-6233.
- Langer HF and Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med.* 2009 Jul;13(7):1211-20.
- Laszlo GS, Gudgeon CJ, Harrington KH, et al. Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML. *Blood.* 2014;123(4):554-561.
- Löffler A, Kufer P, Lutterbuse R, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 × CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood.* 2000;95(6):2098-2103.
- Löffler A, Gruen M, Wuchter C, et al. Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. *Leukemia.* 2003;17:900-909.
- Lowin B, Peitsch MC, Tschopp J, et al: Crucial Effector Molecules in Cytolytic T Lymphocyte and Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. Pathways for Cytolysis. *Cur Topics Microbio Immun.* 1995;198:1-24.
- Millard PJ, Henkart MP, Reynolds CW, et al. Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. *J Immunol.* 1984;132(6):3197-3204.
- Offner S, Hofmeister R, Romaniuk A, et al. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol Immun.* 2006;43(6):763-771.

- Raponi S, De Propriis MS, Intoppa S, et al. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk Lymphoma* 2011;52(6):1098-1107.
- Talanian RV, Yang XH, Turbov J, et al. Granule-mediated Killing: Pathways for Granzyme B-initiated Apoptosis. *J Exp Med.* 1997;186(8):1323-1331.
- Wang K, Wei, G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol.* 2012;1(1):1-36.
- Weijtens O, Schoemaker RC, Cohen AF, et al. Dexamethasone concentration in vitreous and serum after oral administration. *Am J Ophthalmol.* 1998;125(5):673-679.
- Wong R, Pepper C, Brennan P, et al. Blinatumomab induces autologous T-cell killing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica.* 2013;98:1930-1938.
- Yang X, Stennicke HR, Wang B, et al. Granzyme B Mimics Apical Caspases: Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J Bio Chem.* 1998;273: 34278-34283.

ブリナツモマブ（AMG 103、MEDI-538 又は MT103）及びマウス代替抗体である muS103new を用いて実施した。主要な薬理試験、安全性薬理試験及び薬理学的薬物相互作用試験の概要を以下の表に示す。

表 1 薬理試験の概要表
被験物質：ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of study	Test System	Method of administration	Testing facility	Report Number
Primary pharmacodynamics in vitro muS103new BiTE Antibody: Generation of a Murine-Like Blinatumomab Surrogate With Paired Affinities	Nine murine-like and affinity-optimized muS103new BiTE antibodies were constructed and tested with regard to bispecific binding, productivity of BiTE monomer, affinities to mouse CD19 and mouse CD3, potency of redirecting stimulated mouse effector T cells against mouse CD19- transfected CHO cells and amino acid sequence identity of VL and VH to mouse antibody germline sequences.	In vitro	Amgen Inc.	DR-RE-103-001
Determination of the Relevant Animal Species for Blinatumomab Toxicology	T and B lymphocytes in PBMC of mouse, dog, and primate were labeled with antibodies recognizing the T and B cell-specific markers CD4 and CD20, respectively. These labeled T and B cell subpopulations were then analyzed for binding of blinatumomab. Redirected lysis of B lymphocytes in chimpanzee PBMC was also studied in a cytotoxicity assay.	In vitro	Amgen Inc.	103-PCD-0007
Species Cross- Reactivity Study of Blinatumomab to Peripheral Mononuclear Cells of Various Species	The cross-reactivity of blinatumomab to PBMC from human and African Green Monkey, Marmoset, Squirrel Monkey, rat, and mouse was determined using flow cytometry. T and B cells in PBMC were labeled by antibodies recognizing T and B cell markers, (CD2, CD4, CD20). These T and B cell subpopulations were then analyzed for bound blinatumomab by Alexa 488 labeled anti-His Tag antibody.	In vitro	Amgen Inc.	103PCD-0040
Blinatumomab-mediated Redirected Lysis of B Cell Lymphoma Cell Lines	Cell surface expression of CD19 by the tumor cell lines was determined by flow cytometry using a specific FITC-conjugated human anti-CD19 antibody. Freshly isolated human PBMCs and target cells were co-cultivated at an E:T cell ratio of 10:1 with serial dilutions of blinatumomab for up to 20 hours. T cell-induced cytotoxicity of cell lymphoma cell lines of different origin (human chronic lymphocytic leukemia lymphoma [EHEB and MEC-1], mantle cell lymphoma [GRANTA-519, HBL-2, and NCEB-1], follicular lymphoma [Karpas-422] and B cell precursor leukemia NALM-6) was evaluated by flow cytometry.	In vitro	Amgen Inc.	103PCD-0061

Footnotes are on the last page of this table.

表 1 薬理試験の概要表 (続き)
被験物質：ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of study	Test System	Method of administration	Testing facility	Report Number
Blinatumomab-Mediated Dose and Time Dependent Expression of Granzyme B	Granzyme B expression in T cells was determined in a flow cytometry-based cytotoxicity assay. Human NALM-6 cells and human PBMC (E:T = 10:1) were cocultured with serial dilutions of blinatumomab for up to 48 hours. Granzyme B positive CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells were quantified by flow cytometry of permeabilized cells stained for CD4, CD8 and granzyme B with fluorescent-labeled antibodies.	In vitro	Amgen Inc.	103-PCD-0063
Characterization of Blinatumomab Binding, Cytotoxicity and Mode of Action	NALM-6 and Raji cell lines were used to study the cell-binding properties and to determine the binding affinities of blinatumomab by flow cytometry. Using the ⁵¹ chromium release and non-radioactive FACS-based PKH-26 assays, the cytotoxicity and cytotoxic mode of action of blinatumomab were evaluated. The cytotoxic action of blinatumomab was also evaluated by testing the effect of the calcium chelator EGTA on in vitro cytotoxicity reaction.	In vitro	Amgen Inc.	103-PCD-0065
Characterization of Blinatumomab in Human and Chimpanzee Test Systems	The binding of blinatumomab on human and chimpanzee PBMC was demonstrated by incubation of PBMC with different blinatumomab concentrations. T and B lymphocytes in PBMC were labeled with antibodies recognizing the T and B cell-specific markers CD4 and CD20 and then analyzed for binding of blinatumomab. Bioactivity of blinatumomab was determined by means of the Calcein Release cytotoxicity assay. Furthermore, blinatumomab was analyzed for its potency to deplete autologous B cells from PBMCs of humans and chimpanzees. Cytokines (IL-2, TNF and IFN- γ) were quantified with commercial ELISA kits.	In vitro	Amgen Inc.	103-PCD-0066
Impact of Effector- to-Target Cell Ratio on Blinatumomab-mediated Redirected Lysis and T Cell Activation	Lysis of CD19- positive tumor cells and up-regulation of T cell activation markers CD25 and CD69 were determined in flow cytometry-based cytotoxicity assays.	In vitro	Amgen Inc.	103-PCD-0067

Footnotes are on the last page of this table.

表 1 薬理試験の概要表 (続き)
被験物質：ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of study	Test System	Method of administration	Testing facility	Report Number
Blinatumomab-mediated Redirected Lysis of Human Pediatric B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines	Cell surface expression of CD19 by the tumor cell lines was determined by flow cytometry and was quantified using a specific PE-conjugated anti-human CD19 antibody and the Dako QIFIKIT [®] . Lysis of target cells was evaluated by cellular uptake of propidium iodide using flow cytometry. T cell activation was analyzed by flow cytometry, using specific antibodies directed against cell surface activation markers. The concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and IFN- γ in supernatants were determined using the BD CBA human Th1/Th2 Cytokine Kit II.	In vitro	Amgen Inc.	103-PCD-0076
Comparison of the Pharmacodynamic Effects of Blinatumomab produced by Lonza and MedImmune	Binding affinities of MT103 to CD3 and CD19, tumor cell lysis by T cells and the up-regulation of T cell activation markers (CD69, CD25) was assessed by flow cytometry. Analysis of cytokine secretion in the supernatants were performed by the CBA Flex set system, respectively.	In vitro	Amgen Inc.	103-PCD-0100
Comparison of the Pharmacodynamic Effects of Blinatumomab and its Murine Surrogate muS103new	Tumor cell lysis by T cells and the up-regulation of T cell activation markers (CD69, CD25) was assessed by flow cytometry. Analysis of cytokine secretion in the supernatants were performed by the CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II and by the CBA Flex set system, respectively.	In vitro	Amgen Inc.	103-PCD-0094
Blinatumomab-Induced T Cell-Adhesion to Endothelial Cells and Its Mitigation by Anti-Adhesive Agents	HUVEC or HBMEC were cultured under physiologic hydrodynamic flow conditions. Isolated human T cells were added to the system with or without blinatumomab, and T cell rolling velocity and T cell adhesion were measured. Expression of cell surface adhesion molecules on endothelial cells was analyzed by immunohistochemistry.	In vitro	Amgen Inc.	R20-0011
T Cell Activation by Blinatumomab Alters Expression of Adhesion Molecules on Endothelial Cells	HUVEC were co-incubated with PBMC or T cells and blinatumomab in the presence or absence of the CD19 ⁺ NALM-6 cells. Up-regulation of surface expression of endothelial cell adhesion markers ICAM-1 and VCAM-1, T cell activation marker CD69, and TNF receptors I and II (TNFRI/II) on T cells and endothelial cells were analyzed by flow cytometry. MCP-1 and IL-8 concentrations in cell culture supernatants were analyzed by flow cytometry.	In vitro	Amgen Inc.	R20-0012

Footnotes are on the last page of this table.

表 1 薬理試験の概要表 (続き)
被験物質：ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of study	Test System	Method of administration	Testing facility	Report Number
Primary pharmacodynamics in vivo Anti-Tumor Activity of Blinatumomab in a Subcutaneous NALM-6 Xenograft Model in Mice	NOD/SCID mice were inoculated SC with 1×10^5 NALM-6 cells mixed with 1×10^7 human PBMC.	IV (0.001, 0.01, 0.1, or 1 μ g) started one hour after NALM-6 inoculation and was repeated QD for 4 days.	[REDACTED], Germany.	103-PCD-0057
Impact of Delayed Treatment Initiation on Anti-Tumor Activity of Blinatumomab in a Subcutaneous NALM-6 Xenograft Model in Mice	NOD/SCID mice were inoculated SC with 1×10^5 NALM-6 cells mixed with 0.78×10^7 human PBMC.	IV (1 μ g) beginning on days 0, 4, 8 and 12 following NALM-6 inoculation for 5 consecutive days.	[REDACTED], Germany.	103-PCD-0058
Specificity of Antitumor Activity of Blinatumomab in a Subcutaneous NALM-6 Xenograft model in Mice	NOD/SCID mice were inoculated SC with 1×10^5 NALM-6 cells mixed with 8×10^6 human PBMC.	IV (1 μ g), started one hour after NALM-6 inoculation on days 0, 1, 2, 3 and 4 and was repeated QD for 4 days.	[REDACTED], Germany.	103-PCD-0059
Anti-tumor Activity of Blinatumomab in a Disseminated NALM-6 Xenograft Model in Mice	NOD/SCID mice were inoculated SC with 1×10^4 NALM-6 cells mixed with 1×10^7 human PBMC.	IV (1, 5, 30 μ g) started 5 minutes after NALM-6 inoculation and was repeated QD for 2 days.	[REDACTED], Germany.	103-PCD-0060

Footnotes are on the last page of this table.

表 1 薬理試験の概要表 (続き)
被験物質：ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of study	Test System	Method of administration	Testing facility	Report Number
Efficacy Evaluation of Blinatumomab in a Raji Xenograft Model	NOD/SCID mice were inoculated SC with 5×10^6 Raji cells mixed with human PBMC.	IV QD (13, 67 and 334 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for 10 consecutive days starting one hour after tumor cell injection.	Amgen Inc.	103-PCD-0097
Evaluation of Blunatumomab Anti-tumor Activity in an Orthotopic Granta-519 Advanced Stage Xenograft Tumor Model in Mice	NOD/SCID mice were inoculated IV with Granta-519 human mantle cell lymphoma cells (5×10^6) on Day 1. Animals were allocated to treatment groups on Day 8, based on their LC λ serum concentrations. In vitro activated and expanded human T cells were administered IP.	IV QD (3, 27 and 267 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or by SC bolus injection (133 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for 26 days, starting on Day 11.	Amgen Inc.	103-PCD-0098
Efficacy Evaluation of Blinatumomab in an SEMc Xenograft Model	NOD/SCID mice were inoculated SC with 1×10^7 SEMc cells mixed with human PBMC.	IV QD (13, 67 and 334 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for 10 consecutive days starting one hour after tumor cell injection.	Amgen Inc.	103-PCD-0099
Evaluation of the In Vivo Anti-Tumor Activity of AMG 103 in a RAJI Tumor Formation Model in Mice	NOD/SCID mice were inoculated SC with 1×10^7 Raji, human Burkitt's lymphoma cells, mixed with or without human PBMC.	IV (0.5, 5, 50, or 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) QD for 5 consecutive days starting on the day of tumor cell injection	Amgen Inc.	R20-0026

Footnotes are on the last page of this table.

表 1 薬理試験の概要表 (続き)
被験物質：ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of study	Test System	Method of administration	Testing facility	Report Number
Safety pharmacology Effects on CNS: Behavioral – Primary observation (Irwin)	Mouse BALB/cJ	IV bolus	[REDACTED], France	103-PCD-0078
Behavioral –Exploratory Effects on respiratory system: Whole Body Plethysmography – Conscious mouse	Mouse BALB/c Mouse BALB/cJ	ICV infusion IV bolus	Amgen Inc. [REDACTED], France	103-PCD-0103 103-PCD-0077
Effects on CV and respiratory system: CV and Respiratory in Anesthetized Beagle Dog	Dog Beagle	IV bolus	[REDACTED], Germany	103-PCD-0006

Footnotes are on the last page of this table.

表 1 薬理試験の概要表 (続き)

被験物質：ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of study	Test System	Method of administration	Testing facility	Report Number
Pharmacodynamic Drug Interactions Influence of Dexamethasone and Indomethacin on Blinatumomab-mediated Cell Lysis and Cytokine Release	PBMC were preincubated in medium or dexamethasone at different concentrations for 1 or 14 hours. PKH-26 labeled NALM-6 cells and blinatumumab were added at time point zero. At the indicated time points thereafter, supernatants were harvested and frozen at -20 °C for later cytokine analysis using the human Th1/Th2 Cytometric Bead Array II kit. PI was added to the remaining cells and cytotoxicity was measured by flow cytometry.	In vitro	Amgen Inc.	103-PCD-0071

BiTE = bispecific T cell engagers; CHO = Chinese Hamster Ovary; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; FITC = fluorescein isothiocyanate; E:T = effector to target cell ratio; FACS = Fluorescence-activated cell sorter; PKH-26 = fluorescent dye for membrane labeling; EGTA = ethylene glycol tetraacetic acid; IL = Interleukin; TNF α = Tumor Necrosis Factor alpha; IFN γ = Interferon gamma; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; PE = Phycoerythrin; QIFIKIT = kit intended for the quantitative determination of cell surface antigens by flow cytometry using indirect immunofluorescence assay; CBA = Cytometric bead array; Th1 = T helper cell type 1; Th2 = T helper cell type 2; HUVEC = Human umbilical vein endothelial cells; HBMEC = Human brain microvascular endothelial cells; ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1 = Vascular cell adhesion molecule-1; IL-8 = Interleukin 8; IV = Intravenous; SC = subcutaneous; ICV = intracerebro-ventricular; IP = intraperitoneal; QD = once daily; LC λ = Lambda light chain immunoglobulins; PI = Propidium iodide

表 2 効力を裏付ける試験 - In vitro 試験
被験物質:ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of Study / Title	Status	Lot Number(s)	Test System	Objective	Methods	Summary of Results
muS103new BiTE Antibody: Generation of a Murine-Like MT103 Surrogate With Paired Affinities (Study DR-RE-103-001)	Non-GLP Final	Not applicable - Blinatumomab not used.	In vitro	The objective was to generate an improved murine surrogate molecule by using rat derived BiTE antibody. The main focus was to generate binding characteristics that were more comparable with blinatumomab. The improved murine surrogate should be less immunogenic in mice.	Nine murine-like and affinity-optimized muS103new BiTE antibodies were constructed and tested with regard to bispecific binding, productivity of BiTE monomer, affinities to mouse CD19 and mouse CD3, potency of redirecting stimulated mouse effector T cells against mouse CD19-transfected CHO cells and amino acid sequence identity of VL and VH to mouse antibody germline sequences.	GB3 x KH6 was chosen as the improved surrogate molecule and designated as muS103new. muS103new showed specificity for mouse CD19 and mouse CD3 with an affinity ratio more closely resembling that of blinatumomab and mediates redirected cell lysis of CD19 expressing CHO cells. The amino acid sequence of muS103new was adapted to mouse antibody sequences and therefore muS103new should be potentially less immunogenic in mice than muS103.
Determination of the Relevant Animal Species for MT103 Toxicology Studies (Study 103-PCD-0007)	Non-GLP Final		In vitro Flow Cytometry	The objective was to use flow cytometry to study the binding of blinatumomab (MT-103) to PBMC from various primate species, dogs and mice to evaluate cross-reactivity and functional activity.	Mouse, dog, and primate PBMC were prepared and analyzed. T and B lymphocytes in PBMC were labeled with antibodies recognizing the T and B cell specific markers CD4 and CD20, respectively. These labeled T and B cell subpopulations were then analyzed for binding of blinatumomab. Redirected lysis of B lymphocytes in chimpanzee PBMC was also studied in a cytotoxicity assay in order to verify that the bispecific binding of blinatumomab to B and T lymphocytes was of functional significance.	The binding of blinatumomab to chimpanzee lymphocytes was comparable to that seen with lymphocytes from humans. B and T lymphocytes from primates (cynomolgus monkey, rhesus monkey and baboon), beagle dogs and SJL mice did not detectably bind blinatumomab. The binding of blinatumomab to B and T lymphocytes of chimpanzees was of functional significance because it resulted in the potent redirected lysis of B lymphocytes by endogenous T lymphocytes in PBMC samples.

GLP = Good Laboratory Practice; BiTE = bispecific T cell engagers; CHO = Chinese Hamster Ovary; PBMC = peripheral blood mononuclear cell

表 2 効力を裏付ける試験 - In vitro 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of Study / Title	Status	Lot Number(s)	Test System	Objective	Methods	Summary of Results
Species Cross-Reactivity Study of MEDI-538 to Peripheral Mononuclear Cells in African Green Monkey, Marmoset, Squirrel Monkey, Mouse and Rat Using Flow Cytometry (Study 103-PCD-0040)	Non-GLP Final	██████	In vitro Flow Cytometry	The objective was to determine the cross-reactivity of blinatumomab (MEDI-538) to PBMC from human and various animal species (African Green Monkey, Marmoset, Squirrel Monkey, rat, and mouse).	The cross-reactivity of blinatumomab to PBMC from human and various animal species (African Green Monkey, Marmoset, Squirrel Monkey, rat, and mouse) was determined using flow cytometry. T and B cells in PBMC were labeled by antibodies recognizing T and B cell markers (CD2, CD4, CD20). These T and B cell subpopulations were then analyzed for bound blinatumomab by Alexa 488 labeled anti-His Tag antibody.	Blinatumomab bound to human lymphocytes. However, B- and T cells from African Green Monkeys, Marmosets, Squirrel Monkeys, rats, and mice did not detectably bind blinatumomab.
MT103-mediated Redirected Lysis of B Cell Lymphoma Cell Lines (Study 103-PCD-0061)	Non-GLP Final	██████	In vitro Flow Cytometry	The objective was to evaluate blinatumomab (MT103)-mediated redirected lysis of B cell lymphoma cell lines of different origin (human chronic lymphocytic leukemia lymphoma [EHEB and MEC-1], mantle cell lymphoma [GRANTA-519,	Cell surface expression of CD19 by the tumor cell lines was determined by flow cytometry using a specific FITC-conjugated human anti-CD19 antibody. Freshly isolated human PBMCs and target cells were co-cultivated at an E:T cell ratio of 10:1 with serial dilutions of blinatumomab for up to 20 hours. T cell-induced cytotoxicity was evaluated by flow cytometry. EC ₅₀ values of blinatumomab	Blinatumomab effectively recruits T cells resulting in lysis of leukemic cell lines of different origin.

PBMC = peripheral blood mononuclear cell; GLP = Good Laboratory Practice; FITC = fluorescein isothiocyanate; E:T = effector to target cell ratio; EC₅₀ = 50% efficacious concentration

表 2 効力を裏付ける試験 - In vitro 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of Study / Title	Status	Lot Number(s)	Test System	Objective	Methods	Summary of Results
(Study 103-PCD-0061 continued)				HBL-2, and NCEB-1], follicular lymphoma [Karpas-422] and B cell precursor leukemia NALM-6) in vitro.	were determined via nonlinear regression (sigmoidal dose response) of cytotoxic data.	
MT103 Mediated Dose and Time Dependent Expression of Granzyme B (Study 103-PCD-0063)	Non-GLP Final	██████████	In vitro Cytotoxicity	The objective was to determine the time- and dose-dependent expression of the cytotoxic protease granzyme B in human T cells induced by blinatumomab (MT103)-mediated target-effector cell interactions.	Blinatumomab-induced granzyme B expression in T cells was determined in a flow cytometry-based cytotoxicity assay. Human NALM-6 cells and human PBMC (E:T = 10:1) were cocultured with serial dilutions of blinatumomab for up to 48 hours. Granzyme B positive CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells were quantified by flow cytometry of permeabilized cells stained for CD4, CD8 and granzyme B with fluorescent-labeled antibodies.	Blinatumomab mediates the time- and dose-dependent expression of granzyme B in CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells. This expression occurred slightly faster and at lower blinatumomab concentrations in CD8 ⁺ than in CD4 ⁺ T cells. The results indicate that both T cell subsets could exert effector function following blinatumomab mediated activation.

GLP = Good Laboratory Practice; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; E:T = effector to target cell ratio; NALM-6=Human B cell precursor leukemia cell line

表 2 効力を裏付ける試験 - In vitro 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of Study / Title	Status	Lot Number(s)	Test System	Objective	Methods	Summary of Results
In Vitro Characterization of Binding, Cytotoxicity and Mode of Action (Study 103-PCD-0065)	Non-GLP Final	[REDACTED]	In vitro Cytotoxicity, binding	The objective was to evaluate the cell-binding properties of blinatumomab (MT103), cytotoxicity and mode of action of blinatumomab in NALM-6 and Raji cell lines.	NALM-6 and Raji cell lines were used to study the cell-binding properties and to determine the binding affinities of blinatumomab by flow cytometry. Using the ⁵¹ chromium release and non-radio-active FACS-based PKH-26 assays, the cytotoxicity and cytotoxic mode of action of blinatumomab were evaluated. The cytotoxic action of blinatumomab was also evaluated by testing the effect of the calcium chelator EGTA on in vitro cytotoxicity reaction.	Blinatumomab monomer has a relatively high affinity for CD19 ($K_D = 1.49 \times 10^{-9}$ M), whereas the affinity for CD3 is lower ($K_D = 2.6 \times 10^{-7}$ M). Blinatumomab displays dual binding specificity for CD3 on T cells and for CD19 on B cells and B lymphoma cells. The cytotoxic activity of blinatumomab against CD19 ⁺ NALM-6, Raji and human peripheral B lymphocytes was very potent. Half maximal cell lysis (EC_{50}) was typically observed at < 1 ng/mL (< 0.02 nM). The mechanism of blinatumomab-mediated redirected lysis is very similar to that of a normal activation of specific T cells; however, blinatumomab-mediated cytotoxicity no longer required T cells with a specific T cell receptor but relied on any primed CD8-positive T cell for killing.

GLP = Good Laboratory Practice; FACS = Fluorescence-activated cell sorter; PKH-26 = fluorescent dye for membrane labeling; EGTA = ethylene glycol tetraacetic acid; K_D = equilibrium dissociation constant; EC_{50} = 50% efficacious concentration

表 2 効力を裏付ける試験 - In vitro 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of Study / Title	Status	Lot Number(s)	Test System	Objective	Methods	Summary of Results
In Vitro Characterization of MT103 in Human and Chimpanzee Test Systems (Study 103-PCD- 0066)	Non-GLP Final	██████████	In vitro Cytotoxicity / cytokine Release	The objective was to investigate potential differences/similarities in binding properties and biological activity of blinatumomab (MT103) in human and chimpanzee.	The binding of blinatumomab on human and chimpanzee PBMC was demonstrated by incubation of PBMC with different blinatumomab concentrations. T and B lymphocytes in PBMC were labeled with antibodies recognizing the T and B cell-specific markers CD4 and CD20 and then analyzed for binding of blinatumomab. Bioactivity of blinatumomab was determined by means of the Calcein Release cytotoxicity assay. Furthermore, blinatumomab was analyzed for its potency to deplete autologous B cells from PBMCs of healthy humans and chimpanzees. Cytokines (IL-2, TNF and IFN- γ) released upon T cell activation into cell culture supernatant were quantified with commercial ELISA kits.	B cell saturation or near saturation occurred in both species while T cell binding was not saturated in either species. Blinatumomab showed no significant differences in the specific target cell lysis and resulting EC ₅₀ . The increase in TNF α , IFN γ , and IL-2 induced in response to blinatumomab stimulation was also comparable between both species.

GLP = Good Laboratory Practice; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; TNF α = Tumor Necrosis Factor alpha; IFN γ = Interferon gamma; IL-2 = Interleukin 2; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; EC₅₀ = 50% efficacious concentration

表 2 効力を裏付ける試験 - In vitro 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of Study / Title	Status	Lot Number(s)	Test System	Objective	Methods	Summary of Results
Impact of Effector-to-Target Cell Ratio on MT103- mediated Redirected Lysis and T Cell Activation (Study 103-PCD-0067)	Non-GLP Final		In vitro Flow cytometry/ cytotoxicity	The objective was to evaluate the impact of the E:T cell ratio on blinatumomab (MT103)-mediated redirected lysis of target cells and T cell activation.	Blinatumomab-mediated redirected lysis of CD19-positive tumor cells and up-regulation of T cell activation markers CD25 and CD69 were determined in flow cytometry-based cytotoxicity assays.	The E:T cell ratio has a significant impact on BiTE-mediated target cell lysis and T cell activation. An E:T cell ratio >1:10 is required to achieve efficient T cell activation and eventually tumor cell lysis.
MT103-mediated Redirected Lysis of Human Pediatric B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines (Study 103-PCD-0076)	Non-GLP Final		In vitro Flow cytometry/ cytotoxicity	The objective was to evaluate blinatumomab (MT103)-mediated redirected lysis of human pediatric pBcALL cell lines (KOPN-8, SEMc, MHH-CALL-3, 380, REH and NALM-6) in vitro.	Cell surface expression of CD19 by the tumor cell lines was determined by flow cytometry and was quantified using a specific PE-conjugated anti-human CD19 antibody and the Dako QIFIKIT [®] . Blinatumomab-mediated lysis of target cells was evaluated by cellular uptake of propidium iodide using flow cytometry. EC ₅₀ of blinatumomab was determined via nonlinear regression of cytotoxic data. T cell activation contributing to blinatumomab-mediated cytotoxicity was analyzed by flow cytometry, using specific antibodies directed against cell surface activation markers. The concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and IFN-γ in supernatants were determined using the BD CBA human Th1/Th2 Cytokine Kit II.	Blinatumomab-mediated redirected lysis of all six CD19-positive target cells with maximal specific lysis ranging from 47 to 77%. EC ₅₀ values were 15 to 462 pg/mL and varied with different target cell lines. The magnitude of lysis mediated by blinatumomab increased with increasing surface target density, while EC ₅₀ values decreased. In the presence of target cells, blinatumomab induced a time- and dose-dependent activation of CD8 ⁺ and CD4 ⁺ T cells, which was indicated by the upregulation of the activation markers CD25 and CD69. CD8 ⁺ T cells were activated at lower EC ₅₀ values when compared with CD4 ⁺ cells. Blinatumomab induced release of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and IFN-γ from activated T cells.

IL = Interleukin; TNFα = Tumor Necrosis Factor alpha; IFNγ = Interferon gamma; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; GLP = Good Laboratory Practice; E:T = effector to target cell ratio; pBcALL = Precursor-B cell acute lymphoblastic leukemia; PE = Phycoerythrin; EC₅₀ = 50% efficacious concentration; QIFIKIT = kit intended for the quantitative determination of cell surface antigens by flow cytometry using indirect immunofluorescence assay; CBA = Cytometric bead array; Th1 = T helper cell type 1; Th2 = T helper cell type 2; NALM-6=Human B cell precursor leukemia cell line

表 2 効力を裏付ける試験 - In vitro 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of Study / Title	Status	Lot Number(s)	Test System	Objective	Methods	Summary of Results
Comparison of the Pharmacodynamic Effects of MT103 and its Murine Surrogate muS103new In Vitro (Study 103-PCD-0094)	Non-GLP Final	██████████	In vitro Flow cytometry	The objective was to compare the human-reactive CD19/CD3-bispecific single chain antibody construct blinatumomab with its mouse-reactive surrogate molecule muS103new with respect to in vitro potency, in vitro T cell activation and in vitro cytokine release.	Blinatumomab- and muS103new-directed tumor cell lysis by CD3 ⁺ T cells and the up-regulation of T cell activation markers (CD69, CD25) was assessed. Cell lysis and T cell activation markers were analyzed by flow cytometry. Analysis of cytokine secretion in the supernatants of co-cultures containing either blinatumomab or muS103new with CD19 ⁺ B cells and CD3 ⁺ T cells were performed by the CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II and by the CBA Flex set system, respectively.	Blinatumomab and muS103new were shown to mediate, in a dose-dependent manner, redirected lysis of CD19 expressing cells in the presence of human and murine T cells, respectively. Both BiTE molecules induced a dose-dependent up-regulation of CD69 and CD25 on T cells. No lysis or up-regulation of T cell activation markers was observed in the presence of CD19-negative cells. Blinatumomab and muS103new induced a similar pattern of cytokine release, with the exception that for some murine cytokines such as IFN- γ , IL-10 and IL-2 the levels were 2- to 3-fold higher than for their human counterparts.

GLP = Good Laboratory Practice; CBA = Cytometric bead array; Th1 = T helper cell type 1; Th2 = T helper cell type 2; IFN- γ = Interferon gamma; IL = Interleukin; BiTE = bispecific T cell engagers

表 2 効力を裏付ける試験 - In vitro 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of Study / Title	Status	Lot Number(s)	Test System	Objective	Methods	Summary of Results
AMG 103-Induced T Cell-Adhesion to Endothelial Cells and Its Mitigation by Anti-Adhesive Agents (Study R20-0011)	Non-GLP Final	██████████	In vitro Flow cytometry	The objective was to establish an in vitro flow chamber system that mimics blinatumomab (AMG 103)-induced T cell-interactions with endothelial cells under physiologic hydrodynamic flow conditions. Furthermore, agents with potential anti-adhesive properties were tested for their ability to interfere with (i.e., reverse) these blinatumomab-induced T cell-interactions with endothelial cells.	HUVEC or HBMEC were cultured under physiologic hydrodynamic flow conditions. Isolated human T cells were added to the system with or without blinatumomab, and T cell-rolling velocity and T cell-adhesion were measured. Expression of cell surface adhesion molecules on endothelial cells was analyzed by immunohistochemistry. Various agents with potential anti-adhesive properties were further added to the flow system to test their ability to interfere with (i.e., reverse) blinatumomab-induced effects on T cell-rolling velocity, T cell-adhesion and endothelial activation.	The in vitro flow chamber system mimicked blinatumomab-induced effects during T cell-redistribution in patients. P-selectin / PSGL-1, ICAM-1 / LFA-1, and VCAM-1 / VLA-4 were identified to play an important role in blinatumomab-induced T cell-interactions with endothelial cells. Agents which interfere with these adhesion molecules on T cells or endothelial cells reversed blinatumomab-induced effects on T cell-rolling velocity and adhesion upon endothelial cells, and on endothelial activation.

GLP = Good Laboratory Practice; HUVEC = Human umbilical vein endothelial cells; HBMEC = Human brain microvascular endothelial cells, PSGL-1= P-Selectin Glycoprotein Ligand-1, LFA-1= Lymphocyte Function Associated Antigen-1, VCAM-1= Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VLA-4=Very Late Antigen-4

表 2 効力を裏付ける試験 - In vitro 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ及び代替抗体

Type of Study / Title	Status	Lot Number(s)	Test System	Objective	Methods	Summary of Results
T Cell Activation by AMG 103 Alters Expression of Adhesion Molecules on Endothelial Cells (Study R200012)	Non-GLP Final	██████	In vitro Flow cytometry	The objective was to investigate the effect of TNF, released upon blinatumomab (AMG 103)-induced T cell activation, on endothelial cells in vitro co-cultures comprising endothelial cells, PBMC/T cells, and blinatumomab in the presence and absence of CD19 ⁺ target cells.	HUVEC were co-incubated with PBMC or T cells and blinatumomab in the presence or absence of the CD19 ⁺ NALM-6 cells. Up-regulation of surface expression of endothelial cell adhesion markers ICAM-1 and VCAM-1, T cell activation marker CD69, and TNF receptors I and II (TNFR) on T cells and endothelial cells was analyzed by flow cytometry. MCP-1 and IL-8 concentrations in cell culture supernatants were analyzed by flow cytometry. Etanercept, as well as neutralizing antibodies directed against TNF receptors, were used to investigate the effect of TNF on endothelial cells.	Blinatumomab induced an up-regulation of ICAM-1 and secretion of MCP-1 by endothelial cells in the presence of CD19 ⁺ target cells. This effect was mediated by TNF released upon blinatumomab-induced T cell activation by TNFR1 activation and was sensitive to etanercept blockage. A slight blinatumomab-dependent up-regulation of ICAM-1 was also observed in the absence of target cells, but was less pronounced and occurred at much higher blinatumomab concentrations.

GLP = Good Laboratory Practice; TNF = Tumor necrosis factor; PBMC = Peripheral blood mononuclear cell(s); HUVEC = Human umbilical vein endothelial cells; ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1 = Vascular cell adhesion molecule-1; IL-8 = Interleukin 8, MCP-1=Monocyte Chemotactic Protein-1; NALM-6=Human B cell precursor leukemia cell line

表 3 効力を裏付ける試験 - In vivo 試験
被験物質:ブリナツモマブ

Study Title	Status	Lot Number	Species	Objective	Methods	Summary of Results
Anti-Tumor Activity of MT103 in a Subcutaneous NALM-6 Xenograft Model in NOD/SCID Mice: Dose-Finding Study (Study 103-PCD-0057)	Non-GLP Final	██████████	NOD/SCID Mouse Female (n=4/gp)	The objective was to determine an efficacious dose of blinatumomab (MT103) in a subcutaneous B lymphoma model (NALM-6).	Mice were inoculated SC with 1×10^5 NALM-6 cells with 1×10^7 PBMC from healthy human donors. IV treatment with blinatumomab (0.001, 0.01, 0.1, or 1 $\mu\text{g}/\text{injection}$) or the vehicle (PBS) started one hour after NALM-6 inoculation and was repeated QD for 4 days. Tumors were measured 2x/week and tumor volumes calculated as a correlate for efficacy.	IV treatment of blinatumomab at 0.01 and 0.001 $\mu\text{g}/\text{injection}$ had no inhibitory effect on SC NALM-6 tumor growth. IV treatment of blinatumomab at 0.1 and 1 $\mu\text{g}/\text{injection}$ induced complete inhibition of SC NALM-6 tumor growth.
Impact of Delayed Treatment Initiation on Anti-Tumor Activity of MT103 in a Subcutaneous NALM-6 Xenograft Model in NOD/SCID Mice (Study 103-PCD-0058)	Non-GLP Final	██████████	NOD/SCID Mouse Female (n=8/gp)	The objective was to determine the optimal time point to beginning the treatment of blinatumomab (MT103) in a subcutaneous B lymphoma model (NALM-6).	Mice were inoculated SC with 1×10^5 NALM-6 cells in the absence or presence of PBMC from healthy donors. Blinatumomab (1 μg) or a PBS vehicle control were administered via the tail vein beginning on days 0, 4, 8 and 12 following NALM-6 inoculation for 4 consecutive days. Tumors were measured 2x/week and tumor volumes calculated as a correlate for efficacy.	IV treatment of blinatumomab at a dose of 1 $\mu\text{g}/\text{injection}$ for 5 days starting one hour post inoculation of NALM-6 cells induced complete inhibition of NALM-6 tumor growth. Later starting points of blinatumomab treatment retarded the tumor growth remarkable but did not inhibit the tumor growth completely. The inhibitory effect of the treatment of blinatumomab was time dependent.

GLP = Good Laboratory Practice; gp = group; SC = subcutaneously; PBMC = Peripheral blood mononuclear cell; IV = intravenous; PBS = phosphate buffered saline; QD = once daily; NALM-6=Human B cell precursor leukemia cell line

表 3 効力を裏付ける試験 - In vivo 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ

Study Title	Status	Lot Number	Species	Objective	Methods	Summary of Results
Specificity of Antitumor Activity of MT103 and MT102 in a Subcutaneous NALM-6 Xenograft Model in NOD/SCID Mice (Study 103-PCD-0059)	Non-GLP Final	██████████	NOD/SCID Mouse Female (n=9-10/gp)	The objective was to investigate the specificity of blinatumomab (MT103) in a subcutaneous B lymphoma model (NALM-6).	Mice were inoculated SC with 1×10^5 NALM-6 cells with 8×10^6 PBMC from healthy donors. Blinatumomab (1 μ g), MT102 (1 μ g), or a PBS vehicle control started one hour after NALM-6 inoculation on days 0, 1, 2, 3 and 4 and was repeated QD for 4 days. Tumors were measured 2x/week and tumor volumes calculated as a correlate for efficacy.	Intravenous treatment of blinatumomab at a dose range of 1 μ g/injection for 5 consecutive days starting one hour post inoculation of NALM-6 tumor cells inhibited the growth of NALM-6 tumors completely.
Anti-tumor Activity of MT103 in a Disseminated NALM-6 Xenograft Model in NOD/SCID Mice: Dose-Finding Study (Study 103-PCD-0060)	Non-GLP Final	██████████	NOD/SCID Mouse Female (n=8/gp)	The objective was to determine an efficacious dose of blinatumomab (MT103) in an intravenous B lymphoma model (NALM-6).	Mice were inoculated SC with 1×10^4 NALM-6 cells with 1×10^7 PBMC from healthy human donors. IV treatment with blinatumomab (1, 5, 30 μ g) or the vehicle (PBS) started 5 minutes after NALM-6 inoculation and was repeated QD for 2 days. Tumors were measured 2x/week and tumor volumes calculated as a correlate for efficacy.	IV treatment of blinatumomab at a dose range of 1 -30 μ g administered for 3 days starting five minutes post inoculation of NALM-6 tumor cells did not provide 100% protection against Nalm-6 tumor growth. Blinatumomab treatment led to retardation of the Nalm-6 tumor growth. The effect was dose independent.

GLP = Good Laboratory Practice; gp = group; SC = subcutaneously; PBMC = Peripheral blood mononuclear cell; MT102 = BiTE antibody; CD3-binding single-chain Fv that recognizes EpCAM; PBS = phosphate buffered saline; QD = once daily; IV = intravenous; NALM-6=Human B cell precursor leukemia cell line

表 3 効力を裏付ける試験 - In vivo 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ

Study Title	Status	Lot Number	Species	Objective	Methods	Summary of Results
Efficacy Evaluation of AMG 103 BiTE Antibody in a Raji Xenograft Model (Study 103-PCD-0097)	Non-GLP Final	██████████	NOD/SCID Mouse Female (n=5-10/gp)	The objective was to evaluate the anti-tumor activity of blinatumomab (AMG 103) following repeated IV bolus injection for 10 consecutive days to a xenograft NOD/SCID mouse model bearing human Raji tumors.	Mice were inoculated SC with 5×10^6 Raji cells with PBMC at an E:T of 1:2, except vehicle control animals. Mice were treated IV QD for 10 consecutive days with vehicle control or blinatumomab (0.013, 0.067 and 0.334 mg/kg) starting one hour after tumor cell injection. Animals were monitored for clinical signs and body weight, and tumor volume was measured 3x/week. Necropsy and macroscopic examinations were conducted.	Administration of blinatumomab at dose levels of 0.013, 0.067 and 0.334 mg/kg/admin completely prevented tumor formation in 4/10, 3/10 and 9/10 animals, respectively.
Evaluation of AMG 103 Anti-tumor Activity in an Orthotopic Granta-519 Advanced Stage Xenograft Tumor Model in NOD/SCID Mice (Study 103-PCD-0098)	Non-GLP Final	██████████	NOD/SCID Mouse Female (n=5-10/gp)	The objective was to evaluate the anti-tumor activity of blinatumomab (AMG 103) in an orthotopic mantle cell lymphoma xenograft model, Granta-519.	Granta-519 human mantle cell lymphoma cells (5×10^6) were injected IV into the lateral tail vein of mice on Day 1. For the evaluation of the anti-tumor activity of blinatumomab, animals were allocated to treatment groups on Day 8, based on their LC λ serum concentrations. In vitro activated and expanded human T cells were injected into the peritoneal cavity of all animals of Groups 2 - 6 on Day 8. Group 1, which did not receive human CD3 ⁺ T cells, served as a control to monitor the impact of human T cells on tumor growth. Animals were treated QD for 26 days by IV bolus injection (Groups 1 - 5) or by SC bolus injection (Group 6) with blinatumomab, starting on Day 11. Animals were monitored for clinical signs and changes in body weight throughout the study.	Blinatumomab had a high anti-tumor activity in an orthotopic Granta-519 model, resulting in a significantly prolonged survival following blinatumomab treatment at all dose levels and routes of administration tested compared to control groups.

PBS = phosphate buffered saline; QD = once daily; GLP = Good Laboratory Practice; gp = group; SC = subcutaneously; PBMC = Peripheral blood mononuclear cell; E:T = effector to target cell ratio; NALM-6=Human B cell precursor leukemia cell line; IV = intravenous or intravenously; LC λ = Lambda light chain immunoglobulins

表 3 効力を裏付ける試験 - In vivo 試験 (続き)
被験物質:ブリナツモマブ

Study Title	Status	Lot Number	Species	Objective	Methods	Summary of Results
Efficacy Evaluation of AMG 103 BiTE Antibody in an SEMc Xenograft Model (Study 103-PCD-0099)	Non-GLP Final	██████████	NOD/SCID Mouse Female (n=5-10/gp)	The objective was to evaluate the anti-tumor activity of blinatumomab (AMG 103) following a repeated IV delivery for 10 consecutive days in a xenograft NOD/SCID mouse model bearing human SEMc tumors.	Mice were inoculated SC with 1×10^7 SEMc cells with PBMC at an effector to target cell ratio of 1:2, except vehicle control animals. Mice were treated IV QD for 10 consecutive days with vehicle control or blinatumomab (0.013, 0.067 and 0.334 mg/kg) starting one hour after tumor cell injection. During the experiment animals were monitored for clinical signs and body weight. Tumor volume was measured 2 to 3x/week.	Treatment of SEMc tumor cell-injected NOD/SCID mice with blinatumomab resulted in a statistically significant delay of tumor formation at all dose levels tested.
AMG 103 Pharmacology Report: Evaluation of the In Vivo Anti-Tumor Activity of AMG 103 in a RAJI Tumor Formation Model in NOD/SCID Mice after Intravenous Bolus Administration (Study R20-██████0026)	Non-GLP Final	██████████	NOD/SCID Mouse Female (n=5-8/gp)	The objective was to evaluate the anti-tumor activity of blinatumomab (AMG 103) in a Raji (human Burkitt's lymphoma) tumor formation model in NOD/SCID mice.	Mice were inoculated SC with 1×10^6 Raji, human Burkitt's lymphoma cells, mixed with or without human PBMC at an E:T cell ratio of 5:1. On the day of tumor cell injection, animals were administered Vehicle (with or without PBMC) or blinatumomab (0.0005, 0.005, 0.05, or 0.5 mg/kg) IV QD for 5 consecutive days. Tumor volume was measured 3x/week. Study was terminated on day 29 and tumors were explanted and weighed post mortem.	Blinatumomab at 0.5, 0.05, 0.005 and 0.0005 mg/kg resulted in a dose-dependent growth delay or complete inhibition of SC Raji tumor formation in NOD/SCID mice. A 5 day treatment period was sufficient to significantly delay the formation of Raji tumors even at 0.0005 mg/kg, the lowest dose level tested in this study.

GLP = Good Laboratory Practice; gp = group; IV = intravenous or intravenously; SC = subcutaneously; PBMC = Peripheral blood mononuclear cell; QD = once daily; SEMc = Serous Effusion Mononuclear cell; E:T = effector to target cell ratio

表 4 安全性薬理試験
被験物質:ブリナツモマブ代替抗体

Organ System Evaluated	Species/ Strain (method)	Method of Administration	Doses (mg/kg) ^a	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
CNS	Mouse/ BALB/cJ (Irwin)	IV bolus daily for 5 days (muS103new and controls) or single dose (Midazolam)	Saline: 0; Vehicle: 0; muS103new: 0.2, 1, and 5; Midazolam: 30	6M	0.2 and 5 mg/kg: no neurobehavioral effects 1 mg/kg: sedative/myorelaxant effects (decreased activity and reactivity, piloerection and motor signs) beginning on the third day of treatment in 1 mouse, suggesting possible inter-individual difference in sensitivity.	GLP	103-PCD-0078
Respiratory system	Mouse/ BALB/cJ (whole body plethysmography)	Single IV bolus (muS103new) or single p.o.(theophylline)	muS103new: 0, 0.2, 1, and 5; Theophylline: 50	8M	Up to 5 mg/kg: no significant effects.	GLP	103-PCD-0077
CNS	Mouse/BALB/c (behavior)	ICV infusion, continuous for 7 days minimum	muS103new: 0, 0.042, and 0.978	10M	Up to 0.978 mg/kg: no effect on behavior, and no evidence of physiological changes or neurotoxicity.	Non-GLP	103-PCD-0103
CV and respiratory system	Dog/ Beagle (under anesthetized)	IV slow bolus dose escalation	MT103: 0, 1.7, 8.5, and 17 µg/kg	5F	Up to 17 µg/kg: no significant changes.	GLP	103-PCD-0006

^a Unless noted otherwise.

CNS = central nervous system; CV = cardiovascular; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; F = female; CV = intracerebro-ventricular; IV = intravenous; p.o.=oral

表 5 薬理的薬物相互作用試験
被験物質：ブリナツモマブ

Study Title	Type of Study / Status	Lot Number(s)	Test System	Objective	Methods	Summary of Results
Influence of Dexamethasone and Indomethacin on MT103-mediated Cell Lysis and Cytokine Release (Study 103-PCD-0071)	Non-GLP Final		In vitro	The objective was to examine the influence of dexamethasone and indomethacin pre-treatment on blinatumomab (MT103)-dependent cell lysis and the cytokine levels resulting from BiTE-mediated T cell activation.	PBMC were prepared from leukocyte filters received from local blood banks and preincubated in medium or dexamethasone at different concentrations for 1 or 14 hours. PKH-26 labeled NALM-6 cells and blinatumumab were added at time point zero. At the indicated time points thereafter, supernatants were harvested and frozen at -20°C for later cytokine analysis using the human Th1/Th2 Cytometric Bead Array II kit. PI was added to the remaining cells and cytotoxicity was measured using a FACS Calibur flow cytometer.	Cytokine levels in patients can be reduced by dexamethasone while preserving the full cytotoxic potency of blinatumomab.

GLP = Good Laboratory Practice; BiTE = bispecific T cell engager; PKH-26 = Fluorescent dye for membrane labeling; NALM-6=Human B cell precursor leukemia cellline; Th1/Th2 = T helper 1/T helper 2; PI = Propidium iodide; FACS = Fluorescence-activated cell sorter