TABLE OF CONTENTS

本項で使用する用語・略語.....2
1. 緒言.....3

本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
hATG	Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine)：抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン
IgG	Equine immunoglobulin G：ウマ免疫グロブリン G

1. 緒言

抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン（以下，hATG）は，旧米国アップジョン社（現ファイザー社）により開発された免疫抑制剤で，米国では 1981 年に承認され，再生不良性貧血および腎移植拒絶反応の治療に用いられている。hATG はヒト胸腺リンパ球で免疫されたウマの過免疫血清を精製，濃縮，滅菌して得られた主に単量体免疫グロブリン G（IgG）からなるガンマグロブリンである。リンパ球表面の多様なタンパク質に結合する様々な抗体で構成されており，末梢血中の顆粒球，血小板および骨髄細胞に結合する。

hATG は非臨床試験の結果から強力な T 細胞抑制作用を有すると考えられている。hATG による免疫抑制の機序は完全には明らかになっていないが，公表文献などによれば，血中の T 細胞に最も強く作用し，速やかかつ可逆的にリンパ球を減少させることが示唆されている。リンパ球の減少は，補体依存性の溶解または活性化誘導アポトーシスによって引き起こされる可能性がある。さらに，リンパ球に対する抗体の結合が免疫抑制に介在している可能性があり，免疫不応答が誘導されると考えられる。また，部分的ではあるものの T 細胞活性化の可能性も示唆された。

hATG の非臨床試験は，hATG が 30 年以上前に開発された際に十分と判断された内容に基づいているため，利用可能な非臨床試験情報は限られている。しかしながら，これらの非臨床試験の成績は，海外での豊富な臨床使用実績とともに，中等度以上の再生不良性貧血における hATG の使用を十分に支持するものと考える。

hATG の効能・効果および用法・用量は添付文書（案）（M1.8.1）に記載した。

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 1
LIST OF FIGURES 1
本項で使用する用語・略語 2
1. まとめ 3
2. 効力を裏付ける試験 3
2.1. 細胞表面抗原に対する親和性 3
2.2. 免疫抑制作用 5
2.3. 再生不良性貧血 8
3. 副次的薬理試験 10
4. 安全性薬理試験 10
5. 薬力学的薬物相互作用試験 11
6. 考察及び結論 11
7. 図表 11
参考文献 11

LIST OF TABLES

Table 1. hATG による各種モノクローナル抗体の T 細胞表面抗原に対する結合阻害能 4
Table 2. 末梢血単核リンパ球の hATG による補体依存性細胞毒性 6
Table 3. hATG による補体依存性および補体非依存性細胞毒性 6

LIST OF FIGURES

Figure 1. T 細胞表面抗原に対する hATG の結合 5
Figure 2. 再生不良性貧血患者由来の活性化 PBMC からの IL-2 とインターフェロン(IFN)の産生 7
Figure 3. hATG 刺激による健康被験者由来の PBMC のアポトーシス増加 8
Figure 4. 健康被験者由来 PBMC および再生不良性貧血患者由来 PBMC を hATG により 72 時間刺激した後の細胞増殖 9
Figure 5. hATG および正常ウマガンマグロブリン（hIgG）による骨髄赤血球前駆細胞の in vitro 増殖に及ぼす作用 10

本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
Anti-Leu	Anti-Leucocyte antigens：抗白血球抗原抗体
BFU-E	Burst-forming units-erythroid：赤芽球バースト形成細胞
CD	Cluster of differentiation：分化抗原群，表面抗原
CFU-E	Colony-forming units-erythroid：赤芽球コロニー形成細胞
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor：顆粒球単球コロニー刺激因子
hATG	Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine) : 抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン
hIgG	Equine immunoglobulin G：ウマ免疫グロブリン G
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR isotype：ヒト白血球抗原 DR 型
IC_{50}	50% inhibitive concentration：50%阻害時の濃度
IFN	Interferon：インターフェロン
IgG	Immunoglobulin G：免疫グロブリン G
IL	Interleukin：インターロイキン
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核細胞
TNF	Tumor necrosis factor alpha：腫瘍壊死因子

1. まとめ

抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン（以下，hATG）は，旧米国アップジョン社（現ファイザー社）により開発された免疫抑制剤で，米国では 1981 年に承認され，再生不良性貧血および腎移植拒絶反応の治療に用いられている。hATG はヒト胸腺リンパ球で免疫されたウマの過免疫血清を精製，濃縮，滅菌して得られた主に単量体免疫グロブリン G（IgG）からなるガンマグロブリンであり，非臨床試験結果から強力な T 細胞抑制作用を有すると考えられている。hATG による免疫抑制の機序は完全には明らかにされていないが，公表文献などによれば，血中の T 細胞に最も強く作用し，速やかかつ可逆的にリンパ球を減少させることが示唆されている。リンパ球の減少は，補体依存性の溶解または活性化誘導アポトーシスによって引き起こされる可能性がある。さらに，リンパ球に対する抗体の結合が免疫抑制に介在している可能性があり，免疫不応答が誘導されると考えられる。また，部分的ではあるものの T 細胞活性化の可能性も示唆された。

本項に収載する非臨床試験の成績は，海外での豊富な臨床使用実績とともに，中等度以上の再生不良性貧血における hATG の使用を十分に支持するものと考える。hATG の薬理学的特性は公表文献により評価した。

2. 効力を裏付ける試験

2.1. 細胞表面抗原に対する親和性

hATG を用いた非臨床薬理試験は社内で実施していないが，hATG の薬理学的特性を評価するためにヒト血液細胞および骨髄細胞を用いた複数の in vitro 試験結果が報告されている（M2.6.3.1 および M2.6.3.2）。これらの公表文献において， T 細胞表面抗原に対する hATG の特異的な結合能が評価されている[1,2,3]。そのうちの 1 つの試験では，ヒト末梢血単核細胞（PBMC）の各種 T 細胞表面抗原に対する蛍光標識したそれぞれのモノクローナル抗体の結合能について，hATG とプレインキュベートして評価した[1]。すなわち，PBMC に hATG を添加または非添加の状態でプレインキュベートし，PBMC を洗浄，再懸濁した。その後，フルオレセイン標識モノクローナル抗体を添加し，インキュベートした後，PBMC を洗浄し，蛍光強度を測定した。その結果，プレインキュベーション時の hATG の添加濃度に依存してモノクローナル抗体の T 細胞表面抗原への結合が阻害された。hATG による各種モノクローナル抗体の T 細胞表面抗原への結合に対する 50%阻害濃度（IC_{50} 値）を Table 1 に示した。

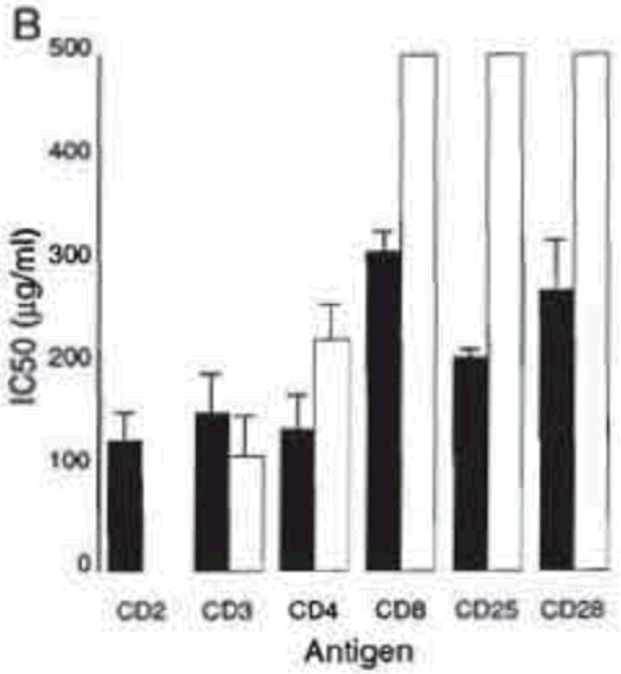
Table 1.　hATG による各種モノクローナル抗体の T 細胞表面抗原に対する結合阻害能

フルオレセイン標識モノクローナル抗体	表面抗原	IC_{50} 値（mg/mL）[a]
Anti-Leu 1（汎 T 細胞抗原）	CD5	5.8 ± 1.1
Anti-Leu 2a（制御性/細胞傷害性 T 細胞）	CD8	0.83 ± 0.34
Anti-Leu 3a（ヘルパーT 細胞）	CD4	1.6 ± 0.7
Anti-Leu 4（T 細胞受容体関連抗原）	CD3	3.8 ± 1.5
Anti-Leu 5b（E ロゼット受容体）	CD2	0.24 ± 0.06
Anti-Leu 7（大型顆粒リンパ球/ナチュラルキラー細胞）	CD57	>50[b]
Anti-HLA-DR（活性化 T 細胞）	DR	104 ± 77
Anti-IL2 受容体	CD25	>50[b]

Raefsky et al, 1986[1]
a. 蛍光標識モノクローナル抗体の蛍光強度が 50%減少したときの hATG 濃度を平均値±標準偏差（N=2～6）で示す。
b. hATG の最高濃度（50 mg/mL）における結合阻害は 10%以下であった。

また，健康被験者から採取した T 細胞上に発現する表面抗原である CD2，CD3，CD4，CD8，CD25 および CD28 に対する hATG の結合能をフローサイトメトリー法により評価[2]した。すなわち，健康被験者から採取した T 細胞を hATG で前処理した後，各種表面抗原に対する蛍光標識した抗体と反応させた。その後，試料を洗浄・固定化しフローサイトメーターで測定し，それぞれの表面抗原に対する蛍光標識抗体の蛍光強度を hATG で前処理しなかった細胞を測定した場合と比較して 50%減弱させるのに必要な hATG 濃度（IC_{50} 値）を算出した（Figure 1）。hATG は CD2，CD3，CD4，CD8，CD25 および CD28 に結合することが示され，それぞれの表面抗原に対する hATG の IC_{50} は hATG を単回投与した腎移植患者から得られた血清中の hATG 濃度範囲内であった。一方，hATG とコンカナバリン A で刺激した T 細胞における表面抗原との結合能を評価したところ，CD8，CD25 および CD28 への結合活性は弱く，この検討結果は hATG の免疫原が刺激を与えていないヒト胸腺細胞であることを支持するものであった。一方，CD3 および CD4 への結合は，コンカナバリン A の刺激に関係なく同様の IC_{50} を示した（Figure 1）ことから，部分的な T 細胞活性化の可能性が示唆された。さらに，T 細胞特異的表面抗原への結合能に加えて，hATG は T 細胞および B 細胞の両方に発現する表面抗原である CD11a，CD18 および CD45 にも結合することが報告されている[3]。

Figure 1.　T 細胞表面抗原に対する hATG の結合



hATG がコンカナバリン A で刺激されていない T 細胞（■）またはコンカナバリン A で刺激した T 細胞（□）における表面抗原と結合することにより，各表面抗原に対応する蛍光強度が 50%減少したときの hATG 濃度（IC_{50} 値）を平均値±標準偏差（N = 4）で示す。なお，コンカナバリン A で刺激した T 細胞の CD8，CD25 および CD28 に対する IC_{50} 値は 500 µg/mL 超（検討した hATG の最高濃度）であり，標準偏差を示すことはできなかった（Merion, et al. 1998[2]）。

2.2. 免疫抑制作用

hATG による免疫抑制の機序は完全には明らかになっていないが，公表文献などによれば，hATG は血中の T 細胞に最も強く作用し，速やかかつ可逆的にリンパ球を減少させることが示唆されている[4,5]。

hATG によるリンパ球減少にはいくつかの機序が関与することが示唆されている。In vitro での補体依存性細胞傷害アッセイにおいて，hATG は ^{51}Cr 標識リンパ球の溶解を誘発した[1,6,7]。そのうちの 1 つの試験では，モルモットの補体存在下において，hATG と ^{51}Cr で標識した健康被験者由来の末梢血単核リンパ球をインキュベートしたところ，hATG による濃度依存的な細胞溶解が認められた（Table 2）[6]。

Table 2.　末梢血単核リンパ球の hATG による補体依存性細胞毒性

hATG 希釈率	細胞溶解（%）[a]
対照（補体のみ）	12.8 ± 0.8
1:320	23.0 ± 3.0
1:160	22.4 ± 1.2
1:80	32.8 ± 2.6
1:40	42.8 ± 2.4
1:20	68.2 ± 4.6
1:10	67.5 ± 5.6

Fisher et al, 1982[6]
a. 5% Triton X-100 添加時の最大 ^{51}Cr 放出量を 100%としたときの ^{51}Cr 放出量（%）を平均値±標準誤差（N=6）で示した。

また，Greco らの報告[7]では，T 細胞，非 T 細胞，血小板および顆粒球を，モルモット補体の存在下または非存在下において hATG とインキュベートし，細胞毒性を評価した。すなわち，^{51}Cr で標識した T 細胞，非 T 細胞，血小板および顆粒球をモルモット補体の存在下または非存在下で hATG と 37℃で 1 時間，攪拌しながらインキュベートし，遠心分離後，その上清をガンマ計数の測定に供した。その結果，細胞毒性を示すのに必要な hATG 濃度および細胞からの ^{51}Cr 放出量として上述の報告[6]に類似した結果が得られた（Table 3）[7]。モルモット補体の代わりにヒト血清またはウサギ血清を用いても同様の結果が得られた。hATG は検討したすべての血球に結合し，特に T 細胞に対して最も高い細胞毒性を示した。補体非存在下においても，高濃度の hATG により細胞溶解が認められた。また，ウサギまたはヒトの補体の存在下において，種々のロットの hATG は濃縮したヒト T 細胞を濃度依存的に溶解した[1]。

Table 3.　hATG による補体依存性および補体非依存性細胞毒性

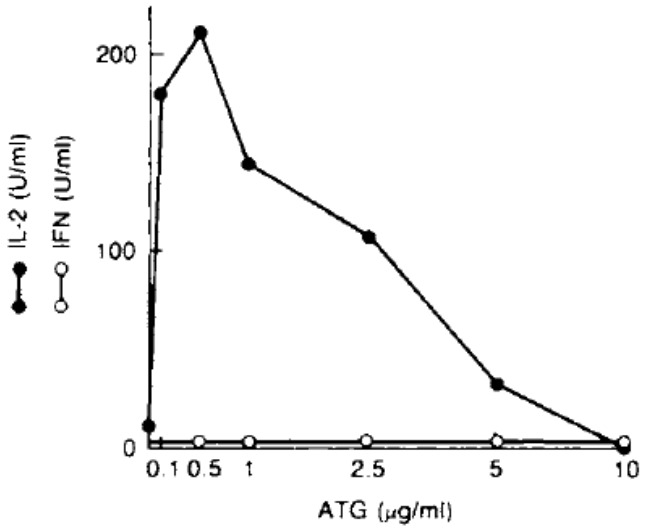
	N 数	hATG 希釈率 [a]	細胞溶解（%）[b]
補体存在下			
総単核細胞	4	1:4	50 ± 3
T細胞	3	1:20	79 ± 9
非T細胞	3	1:40	54 ± 15
血小板	3	1:10	51 ± 10
顆粒球	4	1:4	8 ± 3
対照（補体のみ）	4	-	<3
補体非存在下			
総単核細胞	4	1:10	20 ± 6
T細胞	3	1:10	57 ± 19
非T細胞	3	1:20	31 ± 16
血小板	3	1:40	22 ± 4
顆粒球	4	1:2	3 ± 2

Greco et al, 1983[7]
a. 希釈前 hATG 濃度：50 mg/mL
b. 0.1% Triton X-100 添加時の最大 ^{51}Cr 放出量を 100%としたときの ^{51}Cr 放出量（%）を平均値±標準誤差で示した。

公表文献では, hATG による PBMC のリンホカインおよび造血刺激因子の産生も報告されている。

In vitro で健康被験者または再生不良性貧血患者由来の PBMC を一定の濃度範囲の hATG で処理したところ，インターロイキン（IL）-2，顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）および IL-3 の産生がみられたことから，hATG によりリンパ球が活性化されることが明らかになった[8,9]。すなわち， Gascon らは再生不良性貧血患者由来の PBMC が hATG の濃度範囲 0.1～5 µg/mL において刺激され, PBMC からの IL-2 産生が顕著に増加することを示した（Figure 2）[8]。また，Nimer らは健康被験者または再生不良性貧血患者由来の PBMC が hATG に反応して GM-CSF および IL-3 を産生することを示した[9]。これらの IL-2 および GM-CSF の産生は hATG で処理したすべての被験者由来の PBMC で活性化が認められたわけではなかったものの, 概して健康被験者由来 PBMC に比べて再生不良性貧血患者由来 PBMC でより多くの活性化が認められた。

Figure 2.　再生不良性貧血患者由来の活性化 PBMC からの IL-2 とインターフェロン(IFN)の産生



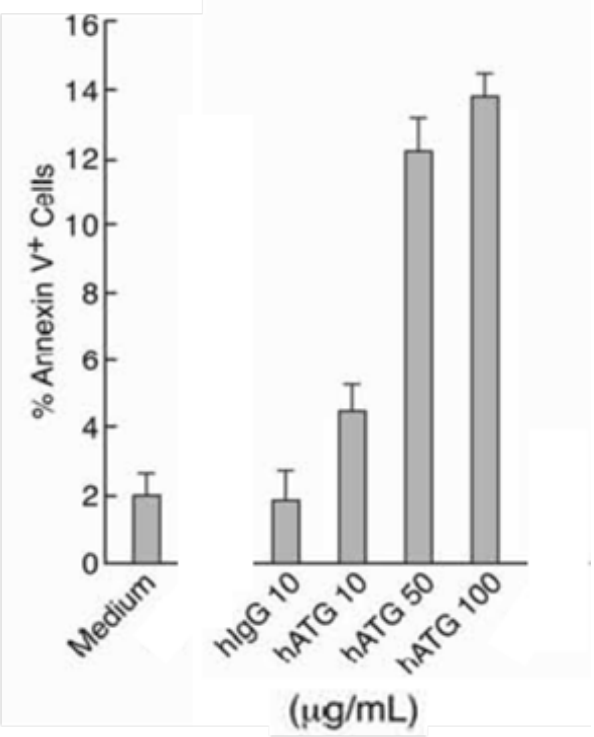
再生不良性患者由来の PBMC を hATG で刺激した際の IL-2（●）およびインターフェロン（○）の産生量を示す（Gascon et al, 1985[8]）。

さらに，公表文献では，hATG によるリンパ球減少の一因として活性化誘導アポトーシスの関与が示唆されている。

Feng ら[10]は，健康被験者由来の PBMC を溶媒のみ，ウマ免疫グロブリン（hIgG）または hATG と 24 時間インキュベートした後，蛍光標識 annexin V で染色し，フローサイトメトリーで測定することでアポトーシス誘導を評価した。その結果，hATG の 50 µg/mL または 100 µg/mL と 24 時間インキュベートした PBMC は, 溶媒対照または hIgG と比較して, アポトーシスが増加した（Figure 3）。また, Genestier ら[11]は, Pasteur Merieux 社製のウマ抗胸腺細胞グロブリン製剤を用いた in vitro

試験においても，活性化 PBMC のアポトーシスが認められることを異なる 3 つの検出手法を用いて示した。すなわち，健康被験者から得られた PBMC を，コンカナバリン A と同様に T 細胞活性化因子として知られるレクチンであるフィトヘマグルチニンと 3 日間インキュベートすることで活性化させた後，細胞を洗浄・再懸濁し，hATG とインキュベート後，3,3-ジヘキシルオキサカルボシアニンおよび蛍光標識 annexin V ならびに Hoechst 33342 で染色し，それぞれフローサイトメトリー法および蛍光顕微鏡検査でミトコンドリア膜電位，細胞膜表面におけるホスファチジルセリンとの結合およびアポトーシスを評価した。その結果，hATG の添加により，ミトコンドリア膜電位の低下，ホスファチジルセリンの発現増加およびアポトーシスがそれぞれ検出され，hATG によるアポトーシス誘導が確認された。

Figure 3.　hATG 刺激による健康被験者由来の PBMC のアポトーシス増加



健康被験者由来の PBMC を hIgG または hATG で 24 時間刺激した際のアポトーシスを評価した。アポトーシスは annexin V 陽性細胞を指標として評価した。平均値±標準誤差（N = 3）（Feng et al, 2008[10] より改変）

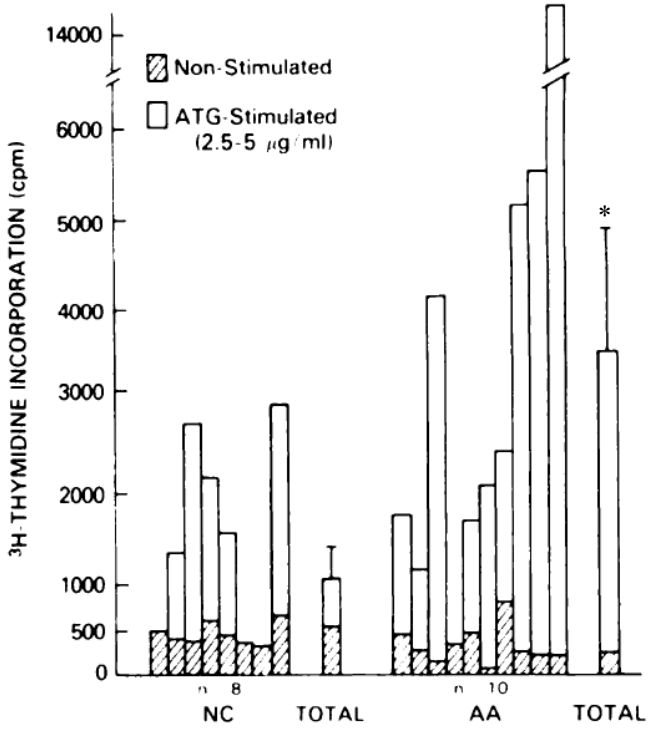
2.3. 再生不良性貧血

再生不良性貧血の原因の多くは，免疫関連の異常に起因したものと考えられている[12]。Th1 細胞の産生するサイトカイン，特にインターフェロン（INF）-γおよび腫瘍壊死因子（TNF）-αにより活性化された細胞傷害性 T 細胞が骨髄造血幹細胞および前駆細胞を破壊するために，骨髄細胞が減少すると考えられている。再生不良性貧血の治療における hATG の作用機序は，上述の免疫抑

制作用が大きく関与していると考えられ，主にエフェクター細胞傷害性 T 細胞に対する作用と考えられる。

hATG は in vitro で造血幹細胞の増殖を直接刺激することも示唆されている [1,7,13]。hATG 刺激に対して再生不良性貧血患者由来の PBMC の感受性が高いことも，hATG の作用機序の一つである可能性がある。Gascon ら [8] は健康被験者および再生不良性貧血患者由来の PBMC を用いて，ATG の増殖刺激能を評価した。すなわち，5%不活化ウシ胎児血清に懸濁した 1×10^5 個の PBMC を 96 ウェルプレートに播種し，複数のロットおよび濃度の hATG と 72 時間インキュベートすることで PBMC を刺激した。細胞を回収する 16 時間前にメチル-^{3}H-チミジンを添加した。細胞を回収後，液体シンチレーションカウンターでメチル-^{3}H-チミジンの細胞への取り込みを測定した。その結果，健康被験者由来および再生不良性貧血患者由来の PBMC を in vitro で 2.5 µg/mL または 5 µg/mL の hATG と 72 時間インキュベートした試料において，[^{3}H]チミジン取り込みが増加し，細胞増殖が亢進した。その際，健康被験者由来の PBMC と比較して再生不良性貧血患者由来の PBMC で，より高い増殖能が認められた（Figure 4）。

Figure 4.　健康被験者由来 PBMC および再生不良性貧血患者由来 PBMC を hATG により 72 時間刺激した後の細胞増殖

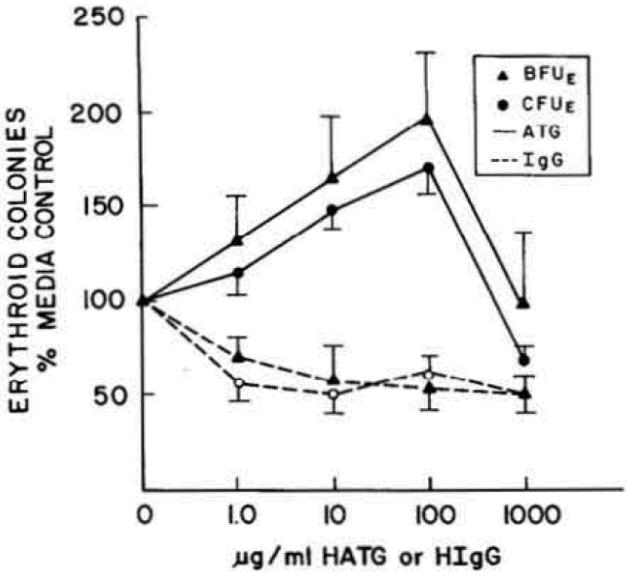


健康被験者由来 PBMC（NC）のチミジン取り込み細胞計数率（N=8）および再生不良性貧血患者由来 PBMC（AA）のチミジン取り込み細胞計数率（N=10）。Total（合計）は平均±標準誤差を示す［*: NC と比較して有意差あり（$p<0.02$，t-検定）］（Gascon et al, 1985[8]）。

また，Mangan ら [13] は健康被験者から得られた骨髄全単核球における赤血球前駆細胞に対する hATG の作用を in vitro で評価した。すなわち，骨髄全単核球をディッシュに播種し，hATG ある

いは hIgG を添加後，7 または 14 日間インキュベートし，それぞれ赤芽球コロニー形成細胞（CFU-E）および赤芽球バースト形成細胞（BFU-E）のコロニー形成を評価した。7 日間のインキュベート後，1 つの凝集あたり少なくとも 8 個の細胞を含むベンジジン染色陽性のコロニーを CFU-E コロニーとしてカウントした。また，14 日間のインキュベート後，1 つの凝集あたり少なくとも 50 個の細胞を含むベンジジン染色陽性のコロニーを BFU-E コロニーとしてカウントした。その結果, PBMC を用いた検討と同様に CFU-E および BFU-E の細胞増殖が亢進した（Figure 5）。

Figure 5.　hATG および正常ウマガンマグロブリン（hIgG）による骨髄赤血球前駆細胞の in vitro 増殖に及ぼす作用



平均値±標準偏差（N = 6）。▲は BFU-E を，●は CFU-E を示す。直線は hATG による処理を，破線は hIgG（非免疫対照物質）による処理を示す。縦軸は溶媒対照との比較（%）を示す（Mangan et al, 1986[13]）

hATG は IL-3 や GM-CSF などの造血成長因子の放出を誘発することが知られている [9]。このような hATG の直接または間接的な刺激による活性は再生不良性貧血における作用機序の一つと考えられる。

3. 副次的薬理試験

hATG を用いた副次的薬理試験は実施していない。

4. 安全性薬理試験

hATG を用いた独立した安全性薬理試験は実施していない。サルに最大 80 mg/kg/日を投与したサル 14 日間反復投与毒性試験では，心電図，心拍数，血圧および呼吸数の変化ならびに中枢神経系に関連する一般状態の変化は認められなかった（M2.6.6.3.2）。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

hATG を用いた薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。しかしながら，hATG とよく併用される薬剤（主に他の免疫抑制剤）との間に生じる相互作用については，海外での長年にわたる臨床使用の間に十分評価されてきたものと考える。

6. 考察及び結論

本項に収載する非臨床薬理試験の成績は，海外での豊富な臨床使用実績とともに，中等度以上の再生不良性貧血における hATG の使用を十分に支持するものと考える。hATG の薬理学的特性は公表文献により評価した。

hATG は，リンパ球およびその他の血球の表面に存在する様々なタンパクに結合し，また，他の組織の表面および細胞質内のタンパクにも結合すると考えられている。hATG による免疫抑制作用は，主に血液中のリンパ球の可逆的な減少によるものであり，特に T 細胞の減少に起因すると考えられる。リンパ球減少は，補体依存性溶解，アポトーシスの活性化誘導，T 細胞の部分的活性化または免疫不応答の誘導に起因するものと考えられる[2]。また別の薬理作用として，造血幹細胞の増殖に対する直接刺激または造血成長因子の放出も，再生不良性貧血の治療に寄与していることが示唆された。

hATG を最大 80 mg/kg/日投与したサル 2 週間反復静脈内投与毒性試験では，心電図，心拍数，血圧および呼吸数の変化ならびに中枢神経系に関連する一般状態変化は認められなかった。

7. 図表

図および表は，本文中の該当箇所に記載した。また，薬理試験概要表（M2.6.3）を参照する場合は参照箇所を本文中に示した。

参考文献

1 Raefsky EL, Gascon P, Gratwohl A, et al. Biological and immunological characterization of ATG and ALG. Blood. 1986;68(3):712-9.

2 Merion RM, Howell T, Bromberg JS. Partial T-cell activation and anergy induction by polyclonal antithymocyte globulin. Transplantation. 1998;65(11):1481-9.

3 Bourdage JS, Hamlin DM. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. Transplantation. 1995;59(8):1194-200.

[4] Abouna GM, Al-Abdullah IH, Kelly-Sullivan D, et al. Randomized clinical trial of antithymocyte globulin induction in renal transplantation comparing a fixed daily dose with dose adjustment according to T cell monitoring. Transplantation. 1995;59(11):1564-68.

[5] Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, et al. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. N Engl J Med. 2011;365(5):430-8.

[6] Fisher RI, Silver BA, Vanhaelen CP, et al. Objective regressions of T- and B-cell lymphomas in patients following treatment with anti-thymocyte globulin. Cancer Res. 1982;42(6):2465-9.

[7] Greco B, Bielory L, Stephany D, et al. Antithymocyte globulin reacts with many normal human cell types. Blood. 1983;62(5):1047-54.

[8] Gascon P, Zoumbos NC, Scala G, et al. Lymphokine abnormalities in aplastic anemia: implications for the mechanism of action of antithymocyte globulin. Blood. 1985;65(2):407-13.

[9] Nimer SD, Golde DW, Kwan K, et al. In vitro production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in aplastic anemia: possible mechanisms of action of antithymocyte globulin. Blood. 1991;78(1):163-8.

[10] Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, et al. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional $CD4^{+}CD25^{high}FOXP3^{+}$ regulatory T cells in vitro. Blood. 2008;111(7):3675-83.

[11] Genestier L, Fournel S, Flacher M, et al. Induction of Fas (Apo 1, CD95) mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. Blood. 1998;91(7):2360-8.

[12] Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. Blood. 2006;108(8):2509-19.

[13] Mangan KF, D'Alessandro L, Mullaney MT. Action of antithymocyte globulin on normal human erythroid progenitor cell proliferation in vitro: erythropoietic growth enhancing factors are released from marrow accessory cells. J Lab Clin Med. 1986;107(4):353-64.

TABLE OF CONTENTS

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS 3

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: hATG

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Reference
Primary Pharmacodynamics				
T cell-specific binding; cytotoxicity; blasotgenesis, complement-mediated lysis assays	Human PBMNC	In vitro	US NIH	Raefsky et al, 1986
T cell-specific binding assay	Human T cells	In vitro; Ex vivo	Univ of Michigan	Merion et al, 1998
T and B cell-specific binding assay	Human PBL	In vitro	Upjohn Company	Bourdage & Hamlin, 1995
Determination of circulating lymphocytes	Human blood	In vivo	Hahnemann Univ	Abouna et al, 1995
Determination of circulating lymphocytes	Human blood	In vivo	US NIH	Scheinberg et al, 2011
Binding to blood cell surface markers; complement-mediated lysis assays	Human PBMNL	In vitro	US NIH	Fisher et al, 1982
Binding to blood cells and tissues; complement-mediated lysis assays	Human PBL; tonsil, thymus, liver, kidney, breast, colon, testes, lung, bone marrow	In vitro	US NIH	Greco et al, 1983
Lymphocyte activation/growth factor release; lymphocyte proliferation assays	Human PBMNC	In vitro	US NIH	Gascon et al, 1985
Lymphocyte activation/growth factor release assays	Human PBMNC	In vitro	UCLA	Nimer et al, 1991
Lymphocyte apoptosis assay	Human PBMNC	In vitro	US NIH	Feng et al, 2008
Lymphocyte apoptosis assay	Human PBL	In vitro	INSERM	Genestier et al, 1998
Hematopoietic stimulation assay	Human bone marrow progenitor cells	In vitro	Univ of Pittsburgh	Mangan et al, 1986
Secondary Pharmacodynamics				
None	NA	NA	NA	NA
Safety Pharmacology				
None	NA	NA	NA	NA
Pharmacodynamic Drug Interactions				
None	NA	NA	NA	NA

INSERM – Institut National de la Sante de de la Rescherche Medicale; NA = Not applicable; PBL = Peripheral blood lymphocytes; PBMNC = Peripheral blood mononuclear cells; PBMNL = Peripheral blood mononuclear lymphocytes; UCLA = University of California Los Angeles; Univ = University;US NIH = United States National Institutes of Health.

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: hATG

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Reference
T cell-specific binding; cytotoxicity; blasotgenesis, complement-mediated lysis assays	Human PBMNC	In vitro	NA	Not available	hATG inhibiting binding of specific T cell mAb (CD2, CD3, CD4, CD5, and CD8), induced blastogenesis at <10 μg/mL, and induced concentration-related complement-mediated cytotoxicity at 2.5 to 80 μg/mL.	No	Raefsky et al, 1986
T cell-specific binding assay	Human T cells	In vitro	NA	Not available	hATG displayed specificity against CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, and CD28 on unstimulated T cells.	No	Merion et al, 1998
T and B cell-specific binding assay	Human PBL	In vitro	NA	Not available	hATG inhibited binding of specific T cell mAb (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, and CD28) and T and B cell mAb CD11a, CD18,and CD45.	No	Bourdage & Hamlin, 1995
Determination of circulating lymphocytes	Human blood	In vivo	Control: 15 mg/kg daily for 7 to 14 days Treatment: variable daily doses for 7 to 14 days to maintain targeted T cell number	N = 22 (control) or 23 (treated); gender information not available.	hATG decreased CD2, CD3, CD4, and CD8 positive T cells with both fixed and variable dose regimens, but only decreased CD19 positive B cells with the fixed dose regimen.	No	Abouna et al, 1995
Determination of circulating lymphocytes	Human blood	In vivo	40 mg/kg for 4 days	34 males; 26 females	hATG induced reversible decreases in absolute lymphocyte count and CD3, CD4, CD8, and CD4 +CD25+CD127 T cells.	No	Scheinberg et al, 2011

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: hATG

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Reference
Binding to blood cell surface markers; complement-mediated lysis assays	Human PBMNL	In vitro	NA	4 males, 2 females	hATG bound to 96% of PBMNL, and demonstrated concentration-dependent complement-mediated lysis of PBMNL over a dilution range of 1:320 to 1:10.	No	Fisher et al, 1982
Binding to blood cells and tissues; complement-mediated lysis assays	Human PBL; tonsil, thymus, liver, kidney, breast, colon, testes, lung, bone marrow	In vitro	NA	Not available	hATG bound to virtually all circulating lymphocytes, granulocytes, and platelets, and bone marrow cells, as well as thymus and testes cell membranes and nuclear and cytoplasmic components of tonsil, kidney, liver, breast, lung and colon. hATG induced concentration-related complement-medicated cytotoxicity of T cells, non-T cells, and platelets; T cells most susceptible.	No	Greco et al, 1983
Lymphocyte activation/growth factor release; lymphocyte proliferation assays	Human PBMNC	In vitro	NA	N =17 to 36 (gender information not available)	hATG induced dose-dependent increases in IL-2 release, and increased proliferation at 2.5 and 5 μg/mL.	No	Gascon et al, 1985
Lymphocyte activation/growth factor release assays	Human PBMNC	In vitro	NA	N = 8 to 29 (complete gender information not available	hATG at 10 μg/mL increased GM-CSF and IL-3 production in PBMNC, and production in PBMNC from aplastic anemia patients was higher than in PBMNC from normal controls.	No	Nimer et al, 1991
Lymphocyte apoptosis assay	Human PBMNC	In vitro	NA	Not available	hATG induced concentration-related increases in apoptosis in PBMNC at 50 and 100 μg/mL.	No	Feng et al, 2008

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: hATG

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Reference
Lymphocyte apoptosis assay	Human PBL	In vitro	NA	Not available	Horse antithymocyte globulin (product of Pasteur Merieux) induced increases in apoptosis in activated PBL.	No	Genestier et al, 1998
Hematopoietic stimulation assay	Human bone marrow progenitor cells	In vitro	NA	Not available	hATG directly induced stimulation of CFU-E and BFU-E from normal human bone marrow cells exposed 10 or 100 µg/mL for 7 (CFU-E) or 14 days (BFU-E).	No	Mangan et al, 1986

BFU-E = Burst-forming units-erythroid; CD = Cluster of differentiation; CFU-E = Colony-forming units-erythroid; GLP = Good Laboratory Practice; mAb = Monoclonal antibody; NA = Not applicable; PBL = Peripheral blood lymphocytes; PBMNC = Peripheral blood mononuclear cell; PBMNL = Peripheral blood mononuclear lymphocytes.