

申請者は、本薬投与で認められたラット及びサル毒性発現は本薬の細胞内への非特異的な取り込みにより発現したものである。その根拠として CD33 抗原陰性 Raji 細胞でも高濃度ではカリケアマイシン誘導体 A の細胞への取り込みが認められる (ホ (1) 1) v) 細胞内への取り込み 参照)、また成人及び小児白血病患者から採取した骨髄細胞でも、CD33 抗原を認識しない抗体とカリケアマイシン誘導体との結合体においてもコロニー結合の阻害が示されている (ホ (1) 1) iii) 白血病患者から採取した骨髄のコロニー形成阻害作用 参照)。さらにラット及びサルの最小毒性発現量は 2.8mg/m²/回及び 7.38mg/m²/回であり、その初回投与時の総カリケアマイシン誘導体の C_{max} はそれぞれ 254 及び 282ng/mL であった。これらの結果から、最小毒性発現量以上の投与量では CD33 抗原の発現していない細胞への非特異的な本薬の取り込みが生じカリケアマイシン誘導体による細胞毒性が誘発されたと考えると回答した。

機構は、説明を了承した。

機構は、 γ -カリケアマイシンの毒性は強く、CD33 抗原を発現していない臓器・組織においても毒性は認められるものの、本薬の適応疾患が致死的なものであることから、その適用は差し支えないものと判断した。しかしながら、本薬の臨床投与量 (9mg/m²) はラットの概略致死量 (14mg/m²) の約 0.6 倍であり、安全域についても存在しないと考えられることから、本薬の臨床使用においては慎重な投与が必要と考える。特に血液・リンパ造血系組織、腎臓、精巣及び肝臓については、臨床投与量においても毒性の発現が予測されるため、十分な注意が必要と考えている。

ホ. 薬理作用に関する資料

(1) 提出された資料の概略

1) 効力を裏付ける試験

i) *in vitro* 抗腫瘍作用

ゲムツズマブオゾガマイシン (遺伝子組換え) (以下、本薬) の抗腫瘍効果は、CD33 抗原陽性ヒト急性前骨髄球性白血病由来細胞 (HL-60) 及び CD33 抗原陰性 Raji 細胞を用いて検討された。各細胞に対して本薬を 1 時間曝露し、その後 3 日間培養し、細胞の [³H]チミジン取り込みを指標として本薬の増殖抑制作用を評価した。

本薬の細胞増殖に対する IC₅₀ 値は、HL-60 では 0.021ng/mL、Raji 細胞では 1.60ng/mL であった。一方、本薬の抗体部分であるヒト化マウス抗 CD33 モノクローナル抗体 (hP67.6) と結合していない 3 種類のカリケアマイシン誘導体 (N-acetyl- γ -Calicheamicin DML: 以下、カリケアマイシン誘導体 A、N-acetyl- γ -Calicheamicin DMH AcBut: 以下、カリケアマイシン誘導体 B、N-acetyl- γ -Calicheamicin) では、HL-60 細胞と Raji 細胞に対する IC₅₀ 値に差は認められなかった。

また、参考資料として提出された公表論文 (Leukemia 14: 1436-1443, 2000) では、各種 CD33 抗原陽性ヒト白血病由来細胞及び CD33 陰性 Daudi 細胞に対する本薬 (1~100ng/mL) の殺細胞活性が検討されている。本薬の殺細胞活性は、CD33 の発現レベルが 99%以上の細胞 (HL-60、NOMO-1、NB4 及び NKM-1) に対して用量依存的に認められたが、CD33 陰性 Daudi 細胞又は CD33 抗原の発現レベルが 62.9%の K562 細胞に対しては最高用量 (100ng/mL) でも殺細胞活性は認められないか又は僅かであった。な

お、多剤耐性株である NOMO-1/ADR 及び NB4/MDR に対しては、本薬 10,000ng/mL の添加でも殆ど殺細胞活性は認められなかったが、多剤耐性を抑制する薬剤（P 糖蛋白の阻害剤）MS209 及び PSC833 を添加することで、本薬の殺細胞活性が認められた。

ii) *in vivo* 抗腫瘍作用

①単回投与

HL-60 細胞をヌードマウスに皮下移植し、その 10 日後に本薬 34、68、102 及び 136mg protein/m²（機構注：投与量はマウスの体重を一律 20g として kg あたりで投与し、体表面積あたりの投与量に換算して表示されている。）を腹腔内投与した。移植から 37 日間、経日的に腫瘍径を測定した。136mg protein/m² の用量では 5 匹中 4 匹の動物が死亡し、過用量と考えられた。34、68 及び 102mg protein/m² の本薬投与では、用量依存的に抗腫瘍効果が認められた。34～102mg protein/m² 投与群では、15 例中 13 例のマウスが腫瘍移植後 37 日目においても生存し、そのうち 8 例は腫瘍径が測定不能まで縮小していた。

②反復投与

HL-60 細胞をヌードマウスに皮下移植し、移植後 7、11 及び 15 日目に本薬 6.8、20 及び 41mg protein/m²（機構注：投与量はマウスの体重を一律 20g として kg あたりで投与し、体表面積あたりの投与量に換算して表示されている。）を腹腔内投与し、移植から 35 日間、経日的に腫瘍径を測定した。本薬投与群では、検討したいずれの用量においても反復投与により全ての動物（1 用量あたり 5 匹）が生存し、かつ腫瘍径が測定不能まで縮小した。

iii) 白血病患者から採取した骨髄のコロニー形成阻害作用

成人急性骨髄性白血病（AML）患者から採取した骨髄細胞に本薬又は対照の CD33 抗原を認識しない抗体 hCTM01 とカリケアマイシン誘導体との結合体を 2 時間曝露した。その後 10～12 日間培養し、コロニー形成阻害作用を検討した。対照のコロニー数に対して 60%以上のコロニー形成阻害が認められたサンプル数は、本薬 90ng/mL では 27 サンプル中 4 サンプル、450ng/mL では 27 サンプル中 12 サンプルであった。また、小児 AML 患者から採取した骨髄細胞においても、本薬のコロニー形成阻害作用が認められた。

表 本薬による骨髄細胞の *in vitro* コロニー形成阻害作用

本薬 (ng protein/mL)	総サンプル 数	コロニー形成阻害サンプル数		
		≥25%	≥60%	≥90%
90 [2 ng/mL]	27	10	4	1
180 [4 ng/mL]	6	1	1	0
270 [6 ng/mL]	6	1	1	0
360 [8 ng/mL]	6	1	1	1
450 [10 ng/mL]	27	15	12	6

[] :カリケアマイシン当量

次に、AML 患者（成人：11 例、小児：4 例）から採取した骨髄細胞に本薬、hP67.6

又は hCTM01 とカリケアマイシンとの結合体を 2 時間曝露した。その後 10~12 日間培養し、抗体及び結合体を添加しない時の出現コロニー数を対照としてコロニー形成阻害作用を検討した。

本薬 (0.5µg protein/mL) は、6 サンプルが 60%以上のコロニー形成を阻害したのに対して、hP67.6 (0.5 及び 50µg protein/mL) では、60%以上のコロニー形成阻害は認められなかった。hCTM01 抗体-カリケアマイシン結合体 (0.5µg protein/mL) は 1 サンプルで 60%以上のコロニー阻害作用を認めた。この結果より、hP67.6 はヒト白血病細胞のコロニー形成を阻害するものの、本薬の作用は主にカリケアマイシンによるものであると申請者は考察している。

表 本薬、hP67.6 及び hCTM01-カリケアマイシン結合体による
骨髄細胞の *in vitro* コロニー形成阻害作用

被験薬	総サンプル数	コロニー形成阻害サンプル数		
		≥25%	≥60%	≥90%
本薬 (0.5 µg protein/mL)	15	11	6	3
hP67.6 (0.5 µg protein/mL)	15	1	0	0
hP67.6 (50 µg protein/mL)	15	2	0	0
hCTM01-カリケアマイシン結合体 (0.5 µg protein/mL)	15	4	1	0

iv) 組織結合性に関する試験

①抗 CD33 モノクローナル抗体に対する結合阻害能 (添付資料ホ参-2)

hP67.6 が CD33 抗原を認識していることが確認されているが (添付資料ホ-6)、一定量の $[^{125}\text{I}]\text{mP67.6}$ を添加したヒト赤白血病由来細胞 HEL92.1.7 に本薬 (最終濃度 0.01~50µg protein/mL) を加え、 $[^{125}\text{I}]\text{mP67.6}$ の結合を 50%阻害する濃度 (IC₅₀) を求めた。その結果、hP67.6 と本薬の $[^{125}\text{I}]\text{mP67.6}$ に対する結合阻害能はほぼ同程度であったが、mP67.6 の約 0.6 倍に低下していた。

②ヒト組織に対する結合性

CD33 抗原は単球や顆粒球等の正常な血液細胞においても発現しているため、これら血液細胞やその他のヒト正常組織に対する本薬及び P67.6 (hP67.6 及び mP67.6) の結合性について検討した。

②-1 ヒト組織への結合性 (添付資料ホ-5~8)

ヒト正常組織の凍結切片を用いて、hP67.6 及び本薬のヒト正常組織への結合性を免疫組織染色により観察した。

・ビオチン化 hP67.6 を用いたアビジン-ビオチン法による染色

ヒトの正常組織 44 標本についてビオチン化 hP67.6 を用いたアビジン-ビオチン法で染色したところ、27 組織 (回腸、結腸、直腸、精巣、睪丸、前立腺、尿道、中脳、下垂体、皮膚、扁桃、リンパ節等) で染色が認められた (添付資料ホ-5)。これにヒト正常組織標本を新たに加え、94 標本について hP67.6 で染色したところ、大脳皮質、心臓、脾臓、胎盤、甲状腺、胆嚢、気道、脈絡叢、網膜、耳下腺、血管以外の組織で染色が認めら

れた。染色の大部分は組織球、血管周囲のマクロファージに認められ、これ以外では脳組織のミクログリアや肥満細胞等でも確認されている（添付資料ホ-6）。

・hP67.6 に対するウサギの抗イディオタイプ抗体とそのウサギ抗体に対するロバ抗ウサギ IgG-ペルオキシダーゼコンジュゲートによる染色

50 種の異なるヒト正常組織を用いて本薬の結合性について検討したところ、reagent control には認められない染色が 18 組織（副腎、小脳、結腸、肺、リンパ節、筋肉、脾臓、上皮小体、下垂体、脊髄、胃、脾臓、回腸等）で認められた。染色の大部分は組織球、マクロファージで、これ以外に肥満細胞等も染色が確認された（添付資料ホ-7）。

次に、34 種の異なるヒト正常組織を用いて申請用の hP67.6 及び本薬の結合性を検討した。hP67.6 については、骨髓、血球、回腸、胃、肝臓、肺、リンパ節、脾臓、胸腺等に染色が認められたが、染色が認められた標本はいずれも reagent control でも同様の染色が認められ、特異的なものはなかった。本薬については、骨髓、血球、回腸、胃、肝臓、肺、リンパ節、脾臓、胸腺等に染色が認められたが、このうち reagent control でも同様の染色が認められない特異的なものは回腸、肺及び脾臓に認められた。これらはムチン、多形核白血球に対する反応であった（添付資料ホ-8）。

②-2 ヒト正常末梢血白血球及び骨髓細胞への結合性（添付資料ホ参-3）

ヒト正常末梢血白血球及び骨髓細胞に 5µg protein/mL となるように mP67.6、hP67.6 あるいは本薬を添加して、フローサイトメトリーにより細胞結合性を検討した。なお、mP67.6 に対する陽性細胞は mP67.6-フィコエリスリンコンジュゲートによる直接染色で検出し、hP67.6 及び本薬は抗 IgG4-ビオチン/ストレプトアビジン-フィコエリスリンによる間接染色により検出した。結果を以下に示す。

表 末梢血白血球に対する結合性

(陽性細胞の%)	末梢血 1			末梢血 2			末梢血 3			末梢血 4			末梢血 5		
	リンパ球	単球	顆粒球	リンパ球	単球	顆粒球	リンパ球	単球	顆粒球	リンパ球	単球	顆粒球	リンパ球	単球	顆粒球
mP67.6	1	97	98	1	99	93	1	99	99	1	99	99	1	98	98
hP67.6	1	96	94	1	97	69	1	96	89	1	98	90	1	93	75
本薬	1	95	95	1	92	74	1	96	90	1	89	91	1	95	83

表 骨髓細胞に対する結合性

(陽性細胞の%)	骨髓 1				骨髓 2				骨髓 3				骨髓 4				骨髓 5			
	骨髓芽球	リンパ球	単球	顆粒球	骨髓芽球	リンパ球	単球	顆粒球	骨髓芽球	リンパ球	単球	顆粒球	骨髓芽球	リンパ球	単球	顆粒球	骨髓芽球	リンパ球	単球	顆粒球
mP67.6	70	1	93	93	71	0	93	90	63	1	69	93	73	3	79	97	72	1	92	89
hP67.6	63	1	88	88	63	0	92	73	59	1	46	79	72	2	82	78	61	0	75	88
本薬	62	1	80	85	61	0	83	68	54	1	49	63	65	2	81	74	56	0	73	75

hP67.6 と本薬の比較では、骨髓 3 の顆粒球における 16% (79%と 63%) の相違が最大であったものの、両者の結合特異性は類似していた。mP67.6、hP67.6 及び本薬の比較

では、骨髄の顆粒球において 30% (93%と 63%) の相違が最大であったものの、リンパ球、単球、顆粒球及び骨髄芽球に対する結合性のパターンは mP67.6、hP67.6 及び本薬でほぼ同様であった。

③サル及びラット正常組織への hP67.6 の結合性 (添付資料ホ-9)

カニクイザル及び Sprague-Dawley ラットの正常組織を用いて、hP67.6 によるアビジン-ビオチン法免疫組織染色を行った。hP67.6 の希釈倍率は 1:50 (72 μ g protein/mL) 及び 1:500 (7.2 μ g protein/mL) とした。

サル及びラットの組織では、いずれの希釈倍率 1:50 (72 μ g protein/mL) 及び 1:500 (7.2 μ g protein/mL) においても hP67.6 に特異的な染色はみられず、測定した全ての組織において交差反応性が認められなかった (機構注:いくつかの組織 (例えば、腸管、尿管、上皮) における背景染色は、実質、脂肪、コラーゲン、筋肉のため「equivocal」から「strong」と判定されているが、HL-60 細胞における染色分布との違い、同じ組織由来の他のサンプルでは染色されていないこと、ヒト化モノクローナル抗体 hCTMO1 による組織染色結果等の情報から、これらの染色は非特異的と判定されている。また、肥満細胞、好酸球及びマクロファージに関しては、いずれの組織においても染色が認められ、非特異的なものと判定されている。)

v) 細胞内への取り込み

①抗 CD33 抗体のインターナリゼーションの電子顕微鏡観察 (添付資料ホ参-4)

HL-60 細胞に P67 (機構注:マウス抗 CD33 抗体の名称である。マウス抗 CD33 抗体の製造ロットとしてロット P67.6 とロット ████████ が作成され、当該試験はロット ████████ が用いられた。ロット P67.6 とロット ████████ は同一であると申請者は述べている。当初 P67 と名付けていたものは、P67.6 と名称を変更され、またその後 mP67.6 と名称を付けられた経緯がある。) を氷冷下 45 分間曝露し、P67 除去後の細胞に新鮮培地と金コロイドと抗マウス IgG 抗体との結合体を 1:25 の割合で加え、30 分間培養した。その後、37°C で 10~180 分間培養し、これを電子顕微鏡観察用サンプルとして調製した。

金粒子は、培養 10 分及び 30 分においては細胞表面にのみ観察されたが、培養 60 分ではエンドソーム内にも観察された。120 分及び 180 分では、金粒子は細胞表面に加えてリソソームの形態学的特徴を持つ細胞質内の大型液胞にも観察された。

②標識した抗 CD33 抗体の細胞内への取り込み (添付資料ホ参-5)

HL-60 細胞に ¹²⁵I 標識 P67 (機構注:マウス抗 CD33 抗体の名称である。マウス抗 CD33 抗体の製造ロットとしてロット P67.6 とロット ████████ が作成され、当該試験はロット ████████ が用いられた。ロット P67.6 とロット ████████ は同一であると申請者は述べている。当初 P67 と名付けていたものは、P67.6 と名称を変更され、またその後 mP67.6 と名称を付けられた経緯がある。なお、当該報告書中での hP67.6 の記載は誤記であると申請者は説明している。) (2 μ g 抗体/10⁶細胞) を氷冷下 45 分間曝露した。新鮮培地に交換し 37°C で培養した時の細胞中及び培養上清中の放射活性を経時的に測定した。

培養上清をトリクロロ酢酸 (TCA) 処理した沈渣の放射能 (解離した抗体) は、新鮮

培地交換後から上昇したが、2 時間以降はプラトーとなり、22 時間後では総放射能の 19%であった。培養上清を TCA 処理した上清の放射能（細胞への取り込み後、分解され排出された抗体）は、新鮮培地交換後から 22 時間後まで上昇を続け、22 時間後は総放射能の 45%となった。細胞を酸処理した後の沈渣の放射能（細胞内の抗体）は経時的に減少し、細胞を酸処理した後の上清の放射能（細胞上の抗体）は新鮮培地交換後から 2 時間までは急激に減少したが、2 時間以降はほぼ一定であった。新鮮培地交換後 22 時間では、細胞を酸処理した後の沈渣と上清の放射能の和は総放射能の 36%であった。以上の結果より、少なくとも 45%の抗 CD33 抗体が細胞内にインターナリゼーションされた後、分解されると述べられている。

③カリケアマイシン誘導体及び結合体の細胞への取り込み（添付資料ホ-参 6）

N-アセチル- γ -カリケアマイシン、カリケアマイシン誘導体 A 及び mP67.6-カリケアマイシン誘導体結合体の ^3H 標識化合物を 13.3×10^6 cell/mL に調整した HL-60 又は Raji 細胞に添加して 37°C で 1 時間培養し、遠心分離及び新鮮培地による再懸濁による洗浄を 3 回繰り返し、各サンプルの 90%を被験液として、その放射活性を測定し、1 細胞あたりに移行した分子数を算出した。

HL-60 及び Raji 細胞において、N-アセチル- γ -カリケアマイシン、カリケアマイシン誘導体 A 及び mP67.6-カリケアマイシン誘導体結合体の細胞内への移行は、いずれも濃度に依存して増加した。HL-60 細胞では、mP67.6-カリケアマイシン誘導体結合体は、低濃度 (0.032~4ng カリケアマイシン当量/mL) において非結合体に比べて移行量は多かったが、20 及び 100ng カリケアマイシン当量/mL の場合には、細胞への移行量は非結合体と同程度であった。Raji 細胞では、mP67.6-カリケアマイシン誘導体結合体 (20、100 及び 500ng カリケアマイシン当量/mL) の細胞内へ移行量は、N-アセチル- γ -カリケアマイシン及びカリケアマイシン誘導体 A より低下していた。

また、各サンプルの残りを被験薬の非存在下で 3 日間培養を継続し、 ^3H チミジンの取り込み量を測定し、殺細胞活性を検討した。

1 細胞あたりに移行した分子数の結果をもとに、HL-60 細胞の増殖に対する N-アセチル- γ -カリケアマイシン、カリケアマイシン誘導体 A 及び mP67.6-カリケアマイシン誘導体結合体の IC_{50} を算出したところ、それぞれ 1780、65900 及び 6140 分子/細胞、Raji 細胞の増殖に対するそれは、それぞれ 3490、28900 及び 23100 分子/細胞であった。

④本薬からのカリケアマイシン誘導体 A の遊離（添付資料ホ-10）

最終濃度 0.5mg protein/mL (9 μg カリケアマイシン当量/mL) の本薬を pH4.5、6.0 及び 7.4 の緩衝液中、37°C でインキュベートした。カリケアマイシン誘導体 A の濃度を経時的に測定し、本薬からのカリケアマイシン A の遊離量を検討した。

その結果、本薬添加後の緩衝液中のカリケアマイシン誘導体 A の濃度は酸性に傾くほど増加した。よって、本薬からのカリケアマイシン誘導体 A の遊離は pH の影響を受け、細胞内に取り込まれた本薬は、酸性環境下のリソソーム中で加水分解され、カリケアマイシン誘導体 A を遊離する可能性が考えられると述べられている。なお、カリケアマイシン誘導体 A 12.5 μg /mL を上記の緩衝液中でインキュベートしたところ、カリケアマイシン

ン誘導体 A 濃度は経時的に減少し、196 時間後のカリケアマイシン誘導体 A 濃度は pH 6.0>pH 4.5>pH 7.4 の順であった。

vi) カリケアマイシン及び誘導体の作用機序

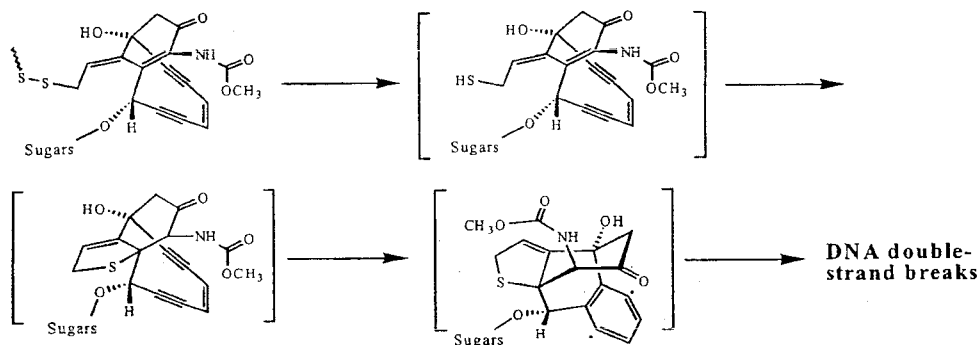


図 カリケアマイシンの活性体への変換反応

カリケアマイシンは、細胞内の還元型グルタチオン等と反応して S-S 結合の還元により活性化され DNA の特定塩基対と結合してジラジカル体が DNA を切断し殺細胞活性を発揮することが報告されている (Science 244: 697-699, 1989、J Am Chem Soc 112: 4554-4556, 1990、Proc Natl Acad Sci USA 89: 4608-4612, 1992)。

①還元型グルタチオンによるカリケアマイシン誘導体 A の還元 (添付資料ホ参-7)

5 μ g/mL のカリケアマイシン誘導体 A と 0.02~20mmol/L の還元型グルタチオンを 20%エタノール、80%リン酸緩衝生理食塩液 (pH 7.4、37 $^{\circ}$ C) 中でインキュベートし、緩衝生理食塩液中のカリケアマイシン誘導体 A 濃度を HPLC 法で経時的に定量した。

還元型グルタチオン濃度が 0.2mmol/L 以下の場合には、カリケアマイシン誘導体 A の濃度はインキュベート中に殆ど減少しなかったが、2 及び 20mmol/L の還元型グルタチオンを添加した場合には、インキュベート中にカリケアマイシン誘導体 A 濃度は経時的に減少した。還元型グルタチオン等の還元型チオール濃度は、血漿中では 15~20 μ mol/L、細胞中には mmol/L 単位の濃度で存在すると報告されていることから、カリケアマイシン誘導体 A は血漿中では安定であるが、細胞中では還元され活性を発揮すると述べられている。

② γ -カリケアマイシングルタチオンジスルフィド体の殺細胞活性 (添付資料ホ参-8)

γ -カリケアマイシンにグルタチオンを付加した誘導体 (γ -カリケアマイシングルタチオンジスルフィド体) を作成した。 γ -カリケアマイシングルタチオンジスルフィド体、N-アセチル γ -カリケアマイシン及び γ -カリケアマイシンを MX-1、Raji、OvCar-3 及び OvCar-3 (R) 細胞に 7 分間 (パルス) 又は 3 日間連続添加した。薬剤曝露後の各細胞の [³H]チミジンの取り込み量から細胞増殖を測定し、各薬剤の IC₅₀ を算出した。

γ -カリケアマイシングルタチオンジスルフィド体の殺細胞活性は、Raji 細胞においては γ -カリケアマイシンより劣るものの、これ以外の細胞株に対しては N-アセチル γ -カリケ

アマイシンと同程度であった。

表 γ -カリケアマイシングルタチオンジスルフィド体の殺細胞活性 (IC₅₀ ng/mL)

細胞	曝露条件	γ -カリケアマイシングルタチオンジスルフィド体	N-アセチル γ -カリケアマイシン	γ -カリケアマイシン
MX-1	連続	0.07	0.04	Not determined
	パルス	0.92	2.2	Not determined
Raji	連続	0.000069	Not determined	0.000002
	パルス	0.05	Not determined	0.000246
OvCar-3	連続	0.0064	Not determined	Not determined
	パルス	20	14.7	Not determined
OvCar-3(R)	連続	14	Not determined	Not determined
	パルス	347	417	Not determined

カリケアマイシンが細胞内で還元型グルタチオンと反応した後に生じる化合物（機構注： γ -カリケアマイシングルタチオンジスルフィド体の生体内での存在は確認されていない。）は、殺細胞活性を保持していることが示された。また、 γ -カリケアマイシングルタチオンジスルフィド体の殺細胞活性が γ -カリケアマイシンより低下した原因として、極性基となるグルタチオンを付加することにより細胞内への取り込み速度が γ -カリケアマイシンより減少したことが推測されると述べられている。

2) 一般薬理試験

本薬の一般薬理試験として、一般症状及び行動、中枢神経系、平滑筋・自律神経系、循環器系、消化器系、腎機能、肝機能及び巨核球の分化に及ぼす影響が検討された。

1) 循環器系及び巨核球の分化に及ぼす影響以外の項目（添付資料ホ-11 及び 13）

マウスにおいては、一般症状及び行動、自発運動量、チオペンタール誘発麻酔、最大電撃痙攣、ペンチレントラゾール誘発痙攣、ストリキニーネ誘発痙攣、侵害受容（ホットプレート法）、消化管輸送能及び尿量・尿中電解質に対して本薬（一般症状及び行動：1、3、10 及び 30mg protein/kg、一般症状及び行動以外の項目：1、3 及び 10 mg protein/kg）の影響は認められなかった。

ラットにおいては、正常体温、尿量・尿中電解質及びスルホプロモフタレイン排泄に対して本薬（0.3、1 及び 3mg protein/kg）の影響は認められなかった。

モルモット摘出回腸においては、自発運動及びアセチルコリン、ヒスタミン、セロトニンクレアチニン硫酸塩、塩化バリウムによる収縮に対して本薬（30 μ g protein/mL）の影響は認められなかった。

ii) 循環器系に及ぼす影響（添付資料ホ-12）

無麻酔のビーグル犬に本薬（0.19、0.63 及び 1.9mg protein/kg）を静脈内投与し、投与開始前 30 分から投与終了後 60 分にわたり平均動脈圧、心拍数、心拍出量及び心電図を測定した。

1.9mg protein/kg の急速静注では、投与後 20 分まで平均動脈圧の低下が見られたが投与後 30 分には正常レベルに回復した。心拍数は投与後 15 分以降増加傾向を示したが有

意なものではなかった。心拍出量は投与後 10 分間減少したが投与後 30 分以内に正常レベルに回復した。心電図の P 波は増大傾向が認められたが、投与後 40 分値以外は有意なものではなかった。T 波は投与後 5 分から 30 分間及び投与後 45 分に有意な増大が認められた。

0.63mg protein/kg の 30 分間持続静注では、平均動脈圧及び心拍出量には影響は認められなかった。心拍数は投与開始後 15 分以降増加が認められた。心電図の P 波は投与開始後 20 分及び投与開始後 30 分（投与終了時）以降に増大が認められた。T 波は投与開始後 15 分以降に増大が認められた。

0.19mg protein/kg の 30 分間持続静注では、平均動脈圧、心拍数、心拍出量及び心電図の P 波及び T 波に影響は認められなかった。

iii) 巨核球の分化に及ぼす影響（添付資料ホ-14）

臨床試験において一部の患者で血小板減少の回復が遅れることが見いだされたことから、正常ヒト巨核球の分化に対する本薬の作用を検討した。

健康者の骨髓からフィコールによって分離した単核細胞より CD34 陽性細胞を単離し、本薬で 2 時間処理した。洗浄後、巨核球の増殖を *in vitro* で最大限促進するサイトカインカクテルを添加し 14 日間培養し、フローサイトメトリーを用いて培地中の CD41a 陽性 CD14 陰性細胞を巨核球として計測した結果、本薬 0.002~0.5µg protein/mL では 4 つの標本において、本薬の巨核球の増殖への影響は認められなかった。

次に、上記より高濃度の本薬を別途単離・調製した CD34 陽性細胞に 2~24 時間曝露し、洗浄後固形培地で 12 日間培養し、コロニー数を観察した。なお、CD41a 陽性コロニーを巨核球コロニーとした。5 つの骨髓サンプルで巨核球のコロニー形成阻害が観察されたが、感受性はサンプル毎に異なっていた。

表 本薬によるヒト骨髓コロニー形成阻害作用

サンプル	全コロニー IC ₅₀ (µg protein/mL)	巨核球コロニー IC ₅₀ (µg protein/mL)
骨髓 1	>10	1
骨髓 2	>10	>10
骨髓 3	1	1
骨髓 4	5	1
骨髓 5	8	10

健康者 6 名からそれぞれ得た CD34 陽性細胞を本薬 2µg protein/mL に 2、6、11 及び 24 時間曝露し、洗浄後固形培地で 14 日間培養し、コロニー数を計測した。なお、CD41a 陽性コロニーを巨核球コロニーとした。検討した 6 つのサンプル中 4 つは、本薬の曝露時間に依存して全コロニー及び巨核球コロニーともに同程度に形成が阻害され、これらのサンプルでは 24 時間曝露によりいずれのコロニーも殆ど認められなくなった。他のサンプルの 1 つは、全コロニー及び巨核球コロニーの形成阻害は同程度ではなく、また 1 つのサンプルでは 24 時間曝露においても巨核球コロニーの形成阻害が 2 時間曝露よりも増強されることはなかった。これらの試験結果より、正常骨髓細胞の本薬に対する反応性は患者毎に様々であり、AML 患者の正常造血幹細胞及び前駆細胞が今回の *in vitro*

試験の CD34 抗原陽性細胞と同様に本薬に応答すれば、血小板の回復は個々の患者により異なり得ることが示唆されたと述べられている。

②) 機構における審査の概略

機構は、主に以下の点について検討した。

1) 本薬の抗腫瘍作用について

機構は、HL-60 細胞移植マウスを用いた単回投与試験において死亡例が認められた理由について、申請者に説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。

HL-60 細胞移植ヌードマウスへの単回投与において、本薬 68mg protein/m² (500µg/kg カリケアマイシン当量) 及び 102mg protein/m² (1000µg/kg カリケアマイシン当量) の腹腔内投与で 5 例中 1 例ずつ、136mg protein/m² で 5 例中 4 例が死亡した。薬理試験では、死亡原因について検討していないが、担癌マウスで死亡がみられた投与量 (500µg/kg カリケアマイシン当量) の 10 分の 1 量がラット単回静脈内投与毒性試験の概略の致死量 (500µg/kg カリケアマイシン当量) であることを考慮すると、高用量の投与においては CD33 抗原陰性細胞への非特異的な取り込み等により本薬の毒性が発現し、死亡したものと考えられる。

機構は、本薬の AML 患者における薬物動態の検討から初回よりも 2 回目の投与の方が曝露量が高くなる傾向が示されていること (へ (1) 2) i) 国内 I/II 相試験 参照)、また *in vivo* 薬理試験における投与経路は臨床投与経路と異なるものの、68mg protein/m² 以上から腹腔内投与で死亡動物が認められていることを踏まえ、CD33 抗原陽性白血病由来細胞に対して *in vitro* で抗腫瘍作用を示す濃度に比較してより高い血漿中濃度となる投与量を臨床用量として設定する理由について、申請者に説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。

本薬の *in vitro* において HL-60 細胞に対する本薬の殺細胞活性が認められる濃度は、試験条件等の違いにより異なっている。また、本薬に対する感受性は、細胞の種類により異なることも報告されている (Blood 101: 4589-4597, 2003)。さらに、本薬のヒトでの組織移行性に関するデータはないが、本邦の臨床試験において 2 サイクル投与患者で認められた本薬の血漿中最高濃度の平均値は 3640ng protein/mL であり、本薬の主な作用部位となる骨髄組織中の本薬濃度は血漿中濃度より低下している可能性も考えられる。これらの理由により、臨床においては、培養細胞に対する *in vitro* での有効濃度より遙かに高い血漿中濃度を必要とするものとする。と考える。

機構は、本薬の CD33 抗原との結合を介さない細胞内への取り込みのメカニズム及び CD33 抗原との結合を介さない非特異的な細胞内への取り込みによるヒトでの安全性について説明を求めた。

申請者は、CD33 を発現していないラット及びカニクイザルにおいても、カリケアマイシン誘導体の細胞毒性に由来した変化が認められたが、本薬の臨床試験における安全性プロフィールからは、臨床使用量においては非特異的な細胞内への取り込みによる重篤な有害事象発現の可能性は低く、非臨床で認められた毒性所見のヒトでの発現は過剰量投与に

において想定されると回答した。

機構は、本薬の毒性試験で認められた肝機能検査値異常（機構注：申請者は毒性所見として扱っていない）、血液毒性等は、臨床試験において重篤な有害事象として発現しており（ト（2）4）安全性について参照）、臨床用量において非特異的な細胞内への取り込みによる重篤な有害事象発現の可能性は低いという申請者の説明は受け入れられない。

機構は、①ヒト体内では白血病細胞以外の CD33 抗原を発現している正常細胞に対しても本薬が作用する可能性があること、②臨床における血漿中総カリケアマイシン誘導体濃度付近の濃度（カリケアマイシン当量 100ng/mL）において、CD33 抗原陰性細胞における本薬の取り込み効率は、遊離型カリケアマイシン誘導体のそれを数倍下回る程度であり（*in vitro*）、CD33 抗原に因らない本薬の非特異的取り込みが認められ（*in vitro*）、CD33 抗原を発現していないラットでは臨床用量の 1.56 倍の投与量で死亡例が認められていることより、本薬の臨床使用においては CD33 抗原陰性細胞における本薬の非特異的取り込みに起因する副作用を含めて安全性について十分な注意喚起が必要であると考えている。

2) 本薬に対する感受性について

機構は、白血病患者から採取した骨髓細胞を用いたコロニー形成阻害作用の検討において認められた被験者間での感受性の違いについて、患者背景を踏まえて考察するように申請者に求めた。

申請者は、FAB 分類と感受性との関係については、サンプル数が 27 と少ないため不明である。また、CD33 抗原の発現レベルとコロニー形成阻害活性には正の相関 ($r=0.546$, $p<0.01$) が認められたが、P 糖蛋白の発現と阻害活性には相関が認められなかったと回答した。

機構は、多剤耐性株である NOMO-1/ADR 及び NB4/MDR に対して本薬の殺細胞活性は殆ど認められないことが *in vitro* で示されており、CD33 抗原の発現レベルを含めて本薬の感受性に影響を及ぼす可能性のある因子については、今後も文献調査等を含めて情報収集を行い、本薬の適応対象がより適切に選択されるように情報提供していくように申請者に指示した。

3) 本薬の一般薬理試験について

機構は、本薬は、ラット及びカニクイザルの正常組織に対して交差反応が認められていないが、マウス、ラット及びモルモットを使用した一般薬理試験結果のヒトへの外挿について申請者の見解を求めた。

申請者は以下のように回答した。

一般薬理試験は、毒性試験と同様に CD33 抗原を発現していない動物を用いて行っている。このような動物では CD33 抗原への結合を介して本薬が細胞へ取り込まれることはなく、ヒトでの作用とは一部異なるものと考えられる。カリケアマイシン誘導体と蛋白の結合体である本薬が特定の細胞内に取り込まれることなく急性作用を示す可能性や、原薬及び製剤に含まれている不純物が薬理作用を示す可能性等を考慮して CD33 抗原を発現していない動物を用いて一般薬理試験を実施した。その結果、一般薬理試験において、

本薬自体の作用は認められておらず、これらの試験で検討された項目についてヒトで CD33 抗原発現細胞への取り込みを介さない急性作用が発現する可能性は少ないものと考えられる。

機構は、CD33 抗原を発現していない動物種を用いて本薬の一般薬理を検討した理由について、了承した。しかし、イヌでは循環器系への本薬の影響が認められており、本薬自体の作用は認められないとする申請者の説明は十分ではないと考え、イヌで認められた変化の機序（原因）について申請者に考察を求めた。また、これに関して、添付文書上で重点的な注意喚起をする旨が示されているが、臨床試験における安全性評価では、循環器系への本薬の有害事象に対して、どのように評価されているのか、申請者に説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。

一般薬理試験においてイヌの血圧、心拍数及び心電図への影響が観察された。本薬 40mg protein/m² の急速静脈内投与後 5～25 分にかけて血圧低下が認められたが、その後は徐々に回復した。心拍数増加は投与後 15 分から、また心拍出量低下は投与後 5～25 分に認められた。これらの変化の時間的経過を考慮すると、一回拍出量の低下に由来する心拍出量の減少によって血圧が低下し、心拍出量を維持するために心拍数が増加したことが考えられるが、一回拍出量低下の理由は不明である。また、心電図では P 波及び T 波の振幅の増大が認められているが、その原因は不明であり、他の心電図パラメータへの影響は認められていない。以上、イヌの循環器系で認められた変化については、作用機序の詳細は不明であるが、いずれの変化も静脈内投与後短時間に出現していること、イヌは CD33 を発現していないこと、血中では本薬からカリケアマイシン誘導体は殆ど遊離しないことから、遊離したカリケアマイシン誘導体の薬理作用によるものとも考え難い。多くの蛋白製剤に共通する副作用として infusion reaction が知られており、実験動物においても IgG の静脈内投与により循環器系への作用が惹起されることが報告されており (Dev Biol Stand 67: 257-265, 1987, Blood 95: 1856-1861, 2000)、ヒト化抗体とカリケアマイシン誘導体の結合体である本薬の投与においても同様の機序により循環器系への作用が惹起された可能性がある。

臨床試験における循環器系への有害事象は国内第 I/II 相試験の I 相部分 (20 例) において頻脈 7 例 (35%)、高血圧 3 例 (15%)、低血圧 2 例 (10%) がみられた。このうち Grade 3 又は 4 の有害事象は高血圧 1 例 (5%) のみであった。海外第 II 相試験 (試験 201、202、203) の 277 例においては、低血圧 55 例 (20%)、高血圧 43 例 (16%)、頻脈 28 例 (10%) が発現した。Grade 3 又は 4 の有害事象は、高血圧及び低血圧がそれぞれ 21 例 (8%) 及び頻脈 1 例 (1%未満) であった。これらの有害事象は主に、点滴投与関連毒性として本薬の投与後 24 時間以内に悪寒、発熱等とともに発現していることから、添付文書には、低血圧や高血圧も含めて「重要な基本的注意」として infusion reaction について注意喚起している。

機構は、イヌへの本薬の投与に伴う循環器系への影響について、静脈内投与後短時間に発現していること、さらに、臨床試験における循環器系への有害事象においても、本薬の投与後 24 時間以内に悪寒、発熱とともに発現していることから、一般薬理試験で認められた本薬の循環器系への影響は infusion reaction によるものとする申請者の考察は妥当なもの判断した。ただし、最終製剤中には最高 µg/mg protein の遊離型カリケアマ

イシン誘導体が含まれており、遊離型カリケアマイシン誘導体の薬理作用（殺細胞作用）に対しても十分な注意喚起が必要であると考え。なお、申請者は本薬の循環器系及び巨核球の分化抑制への影響について、以下のような添付文書における対応を検討している。

本薬の循環器系への作用に関しては添付文書の「用法・用量に関連する使用上の注意」欄に本剤の持続投与中及び投与後 4 時間は、バイタルサインをモニターすること及び「重要な基本的注意」欄に重篤な低血圧があらわれた場合には、本剤の投与を中止し、症状が完全に消失するまで患者を注意深く観察する旨を記載するとともに、「その他の注意」欄に上記イヌ循環器系に対する作用を記載し注意を促す。さらに、血小板減少に関しては、「重要な基本的注意」欄に本剤を投与した全例に骨髄抑制が生じると考えられるため、頻回に臨床検査（血液検査、腎機能・肝機能検査等）を行なう等患者の状態を十分に観察する旨を記載し注意喚起する。

機構は、本剤の循環器系及び巨核球の分化への影響について、添付文書の記載は妥当なものと考え、さらにインタビューフォーム等による適切な情報提供及び注意喚起は必要であると考え。

へ. 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料

(1) 提出された資料の概要

申請者は提出した資料に基づき、主に以下のような考察を行っている。

1) 動物における薬物動態

i) 吸収

① 単回投与（添付資料へー1、2、ニ-4、3）

雄性ラット又は雄性サルに、カリケアマイシン誘導体 B を ^3H 標識した本薬（以下、 ^3H CMA-676）をそれぞれ 11.2 又は 16.0mg protein/m²（カリケアマイシン誘導体 B として 49 又は 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）単回静脈内投与した際、血漿中の総放射能濃度及び総カリケアマイシン誘導体濃度はいずれの動物種においても二相性に減少した。ラットにおける血漿中総放射能及び総カリケアマイシン誘導体の最高濃度（C_{max}）はそれぞれ 1.00 $\mu\text{g eq}/\text{mL}$ 及び 1.28 $\mu\text{g eq}/\text{mL}$ （カリケアマイシン誘導体 A 当量）、半減期（t_{1/2}）はそれぞれ 95hr 及び 66hr、血漿中濃度時間曲線下面積（AUC_{inf}）はそれぞれ 22.9 $\mu\text{g eq}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ 及び 20.1 $\mu\text{g eq}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ であり、総放射能と総カリケアマイシン誘導体は同様の推移を示した。また、サルでは C_{max} はそれぞれ 1.62 $\mu\text{g eq}/\text{mL}$ 及び 1.54 $\mu\text{g eq}/\text{mL}$ 、t_{1/2} はそれぞれ 119hr 及び 162hr、AUC_{inf} はそれぞれ 51.2 $\mu\text{g eq}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ 及び 35.7 $\mu\text{g eq}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ であり、投与後 1～120 時間まで総放射能濃度の方が総カリケアマイシン誘導体濃度より若干高い推移を示したものの、総放射能と総カリケアマイシン誘導体は投与後 0.5 時間まで及び 168 時間以降は同様の推移を示した。ラット及びサルともに、投与後 120 時間までの血漿中 ^3H 非結合カリケアマイシン誘導体は総放射能の 2%以下であり、循環血中では大部分のカリケアマイシン誘導体は hP67.6 と結合していると申請者は考察している。

雄性サルに本薬（2.46、7.38 又は 22.14mg protein/m²、カリケアマイシン誘導体 B として 5、15 又は 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）又は hP67.6（22.14mg protein/m²）を単回静脈内投与した際、総カリケアマイシン誘導体及び hP67.6 の C_{max} 及び AUC_{inf} は用量依存的に増加し、t_{1/2} はそれぞれ 105～173hr 及び 128～169hr であった。最高用量での血漿中非結合カリケア

マイシン誘導体の C_{max} (0.010 μ g eq/mL) は、総カリケアマイシン誘導体の C_{max} (1.31 μ g eq/mL) の 0.8% であり、循環血中では大部分のカリケアマイシン誘導体は hP67.6 と結合していると申請者は考察している。

雌雄のラットに本薬 8.4mg protein/m² (カリケアマイシン誘導体 B として 30 μ g/kg) を単回静脈内投与した際、血漿中総カリケアマイシン誘導体濃度及び hP67.6 濃度推移に性差は認められなかったと申請者は述べている。

②反復投与 (添付資料二-3、5)

雄性ラットに本薬 (0.7、2.8 又は 8.4mg protein/m²、カリケアマイシン誘導体 B として 3、10 又は 30 μ g/kg) 又は hP67.6 (8.4mg protein/m²) を週 1 回 6 サイクル間欠静脈内投与した際、初回投与後の血漿中総カリケアマイシン誘導体及び hP67.6 の C_{max} 及び AUC_{inf} は用量依存的に増加し、 $t_{1/2}$ はそれぞれ 11~38hr 及び 56~85hr であった。最高用量での非結合カリケアマイシン誘導体の C_{max} (0.015 μ g eq/mL) は、総カリケアマイシン誘導体の C_{max} (0.491 μ g eq/mL) の 3.1% であった。また、本薬を 6 回投与後の血漿中総カリケアマイシン誘導体及び hP67.6 濃度の C_{max} は初回投与後に比べて低かった (機構注: 0.7mg protein/m² 投与群の 6 回投与後の血漿中総カリケアマイシン誘導体及び hP67.6 濃度の C_{max} は、それぞれ初回投与時の 184.5% 及び 209.5% であり、初回投与に比べ 6 回投与後の方が高値である。)。この原因は、反復投与によりラット血漿中の本薬に対する抗体が生成したためであると申請者は述べている。

雄性サルに hP67.6 産生細胞株が異なる初期製剤 (6.96mg protein/m²、カリケアマイシン誘導体 B として 15 μ g/kg) 又は申請製剤 (1.92、5.88 又は 17.76mg protein/m²、カリケアマイシン誘導体 B として 5、15 又は 45 μ g/kg) を週 1 回 6 サイクル間欠静脈内投与した際、初回及び 6 回投与後の薬物速度論的パラメータは、初期製剤及び申請製剤で同様であったことから、両製剤は同様の体内動態を示すと申請者は推察している。申請製剤では、初回及び 6 回投与後ともに、 C_{max} 及び AUC に用量依存性が認められた。また、サルでは 6 回投与時の本薬に対する抗体産生は弱~中程度であり、6 回投与後の $AUC_{0-168hr}$ (475~4086 μ g eq·hr/mL) は、初回投与後の血漿中 hP67.6 濃度の AUC_{inf} (332~3986 μ g eq·hr/mL) と同様であったことから、蓄積性はないと申請者は考察している。

ii) 分布

①組織内濃度 (添付資料へ-3)

雄性ラットに [³H]CMA-676 を 9.1mg protein/m² (カリケアマイシン誘導体 B として 29.5 μ g/kg) を単回静脈内投与した際、最高組織内放射能濃度は、血漿、血液、肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓の順に高い値 (431.86~35.16ng eq/mL 又は ng eq/g) を示し、その他の組織では 30ng eq/g 以下であった。また、いずれの組織のいずれの採取時間においても組織内放射能濃度は血漿中放射能濃度に比べて低かった。血液中放射能濃度 (236.25ng eq/mL) は血漿中放射能濃度 (431.86ng eq/mL) の約 1/2 であったことから、血球への移行は低いと申請者は推察している。

②胎盤・胎児への移行性 (添付資料二-8、9)