

# ベルケイド注射用 3 mg

## CTD 第2部 資料概要

### 2.4 非臨床試験の概括評価

ヤンセン ファーマ株式会社



## 目 次

<b>2.4</b>	<b>非臨床試験の概括評価</b>	
2.4.1	非臨床試験計画概略 .....	5
2.4.2	薬理試験 .....	6
2.4.3	薬物動態試験 .....	11
2.4.4	毒性試験 .....	17
2.4.5	総括及び結論 .....	24
2.4.6	参考文献 .....	28



### 2.4.1 非臨床試験計画概略

ボルテゾミブ (Bortezomib, JNJ-26866138, PS-341, 以下, 本薬) はプロテアソームの蛋白分解活性を強力かつ特異的に阻害する新規化学物質である。プロテアソームは, 細胞内の正常な立体構造や会合体を形成できない蛋白質あるいは老化した蛋白質の分解に関与するとともに, 多くの細胞内蛋白質の恒常性を維持するための高度に制御された過程に関与することが示されており, 正常な細胞生理において必須の役割を果たしている。細胞周期の制御やアポトーシスに関与している多数の蛋白質は, プロテアソームを介した分解により制御されていることが示されている。腫瘍細胞では, 細胞の増殖と細胞死に係わる正常な恒常性維持の過程に変化がみられ, 種々の腫瘍細胞でプロテアソームを阻害するとアポトーシスが誘導される。プロテアソームを強力に阻害する本薬は腫瘍細胞が生存及び増殖する経路に作用すると考え, 抗腫瘍剤として開発を開始した。本薬の抗腫瘍剤としての開発に際して, 欧米の規制当局のガイダンスに適合した一連の非臨床薬理, 薬物代謝, 薬物動態及び毒性試験を実施するとともに, 必要と考えられる追加試験を実施した。

本薬について, プロテアソームに対する効力と特異性を評価すること, *in vitro* 及び *in vivo* での抗腫瘍作用を確認すること, 多発性骨髄腫 (以下, MM) に対する抗腫瘍作用の機序について理解を深めること, 腫瘍が耐性を獲得する可能性を検討すること, モニター可能なバイオマーカーを確立すること及び薬理的な安全性を確認することを目的として一連の薬理試験を実施した。

本薬の曝露や薬力学的作用を検討すること, 非臨床試験での薬物動態及びトキシコキネティクスを検討すること, 体内動態及び代謝の種差を検討すること, 体内分布について検討すること, 体内からの消失の速度, 経路及び機序について検討すること, 薬物・薬物相互作用の可能性を予知すること及び用量, 曝露及び作用 (効能あるいは毒性) について関連づけることを目的として一連の薬物代謝及び薬物動態試験を実施した。

本薬の非臨床毒性試験の目的は, 遺伝毒性, 生殖発生毒性, 標的器官の特定, 毒性所見の可逆性, 曝露量と毒性所見との関連性, 及び重要な毒性の発現機序を解明することを目的として一連の毒性試験を実施した。

非臨床試験は, 細胞毒性型抗がん剤についての規制ガイダンス<sup>注1), 注2), 注3)</sup>に準拠し, また主要な毒性試験及び安全性薬理試験は, GLP を遵守し実施した。本薬の薬理学, 薬物代謝, 薬物動態及び毒性学での基本的な特性は十分に検討されており, 本薬を臨床使用すること, また添付文書に記載する非臨床試験の知見として十分かつ適切であると考えられる。

注1) CPMP, Note for guidance on the pre-clinical evaluation of anticancer medicinal products, EMEA, CPMP/SWP/997/96, 23 July, 1998.

注2) DeGeorge JJ et al. Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs, Cancer Chemother Pharmacol, 41, 173-185, 1998.

注3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課 平成 16 年 8 月 9 日 事務連絡「抗がん剤の臨床試験実施及び承認申請のために実施される毒性試験に関する Q & A について」

## 2.4.2 薬理試験

本薬のプロテアソーム活性に対する選択的、可逆的阻害作用を含む作用機序、腫瘍移植モデルにおける抗腫瘍作用、化学療法剤耐性株を含む骨髄腫細胞株における抗腫瘍作用及び薬力学的薬物相互作用を評価するため、種々の*in vitro*及び*in vivo*試験を実施した。また、薬理的な安全性を評価するため、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する安全性薬理試験をGLPに準拠して実施した(表2.4.2.-1)。

表 2.4.2-1 ボルテゾミブに関する薬理試験の一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	記載箇所
<b>効力を裏付ける試験</b>			
<i>In vitro</i> 酵素活性阻害作用	精製酵素	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.1
プロテアソーム活性阻害の可逆性	精製酵素	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.2
受容体及び酵素に対する作用	受容体・酵素標本	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.3
IκBα分解及びNF-κB活性化に対する作用	多発性骨髄腫細胞株	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.4
<i>In vitro</i> 抗腫瘍活性	骨髄腫細胞株, 多発性骨髄腫患者分離細胞	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.4
アポトーシス誘導作用	骨髄腫細胞株, 多発性骨髄腫患者分離細胞	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.4
腫瘍周囲微小環境に及ぼす影響	多発性骨髄腫細胞株, 骨髄ストローマ細胞	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.4
化学療法剤耐性細胞に対する作用	化学療法剤耐性骨髄腫細胞株	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.4
多剤耐性細胞に対する作用	遺伝子組み換え細胞株	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.5
骨髄細胞株のボルテゾミブに対する耐性獲得とその特性	薬剤耐性骨髄腫細胞株及び 異種移植マウス腫瘍モデル	<i>In vitro</i> 静脈内	4.2.1.1.6
Mタンパク産生に対する作用	多発性骨髄腫細胞株	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.7
腫瘍増殖に対する作用	骨髄腫細胞株: 異種移植マウス腫瘍モデル	静脈内	4.2.1.1.6
	骨髄腫細胞株: 異種移植マウス腫瘍モデル	静脈内	4.2.1.1.8
	Lewis肺がん: マウス腫瘍モデル	静脈内	4.2.1.1.9
	Lewis肺がん: マウス腫瘍モデル	静脈内	4.2.1.1.10
	結腸がん: 異種移植マウス腫瘍モデル	腹腔内	4.2.1.1.11
造血幹細胞機能に対する作用	正常マウス及び致死線量X線照射マウス	静脈内	4.2.1.1.12
類縁物質のプロテアソーム活性阻害作用	精製酵素	<i>In vitro</i>	4.2.1.1.13
<b>副次的薬理試験</b>			
プリオン蛋白質に及ぼす影響	神経細胞株	<i>In vitro</i>	4.2.1.2.1
<b>安全性薬理試験</b>			
中枢神経系に関する試験 <sup>a)</sup>	ラット	静脈内	4.2.1.3.1
心血管系に関する試験 <sup>a)</sup> (無麻酔, テレメータ)	ビーグル犬	静脈内	4.2.1.3.2
心血管系に関する試験 (無麻酔, テレメータ)	カニクイザル	静脈内	4.2.1.3.3
	カニクイザル	静脈内	4.2.1.3.4
心血管系に関する試験 (麻酔)	カニクイザル	静脈内	4.2.1.3.5
心血管系に関する試験 (膜カリウムイオン電流に対する作用)	hERGを形質移入したヒト胎児腎臓細胞株	<i>In vitro</i>	4.2.1.3.6

a): GLP適合試験

表 2.4.2-1 ボルテゾミブに関する薬理試験の一覧表（続き）

試験の種類	試験系	投与方法	記載箇所
心血管系に関する試験 <sup>a)</sup> (Langendorff法)	灌流モルモット心臓	<i>In vitro</i>	4.2.1.3.7
心血管作用に対する処置法の検討 (無麻酔, テレメータ)	ビーグル犬	静脈内	4.2.1.3.8
心血管作用の検討 (無麻酔)	マウス	静脈内	4.2.1.3.9
心血管作用の検討 (Langendorff法)	灌流マウス心臓 (本薬投与後心臓摘出)	<i>Ex vivo</i>	4.2.1.3.9
呼吸系に関する試験 <sup>a)</sup>	ラット	静脈内	4.2.1.3.10
<b>薬力学的薬物相互作用</b>			
化学療法剤との併用における <i>In vitro</i> 抗腫瘍活性	骨髄腫細胞株	<i>In vitro</i>	4.2.1.4.1
	多発性骨髄腫細胞株	<i>In vitro</i>	4.2.1.4.2
化学療法剤との併用における 腫瘍増殖抑制作用	Lewis肺がん: マウス腫瘍モデル	腹腔内	4.2.1.4.3
	結腸がん: 異種移植マウス腫瘍モデル	静脈内	4.2.1.4.4

a): GLP適合試験

## (1) 効力を裏付ける試験

1) *In vitro*試験

本薬は20Sプロテアソームに対して選択的かつ可逆的な阻害作用 ( $K_{iapp}=0.62$  nmol/L) を示し, 20Sプロテアソームに次いで本薬に感受性の高いキモトリプシンと比較して1500倍以上活性が強かった。その他の酵素に対しては阻害作用を示さないか, 弱い作用であった。また, 種々の受容体のリガンドとの結合に対して影響を及ぼさなかった。本薬はI $\kappa$ B $\alpha$ の分解を抑制して, がん細胞のアポトーシス, 血管新生及びサイトカインの産生などに関与するNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制した。

米国国立癌研究所 (National Cancer Institute) のがん細胞パネルを用いた抗腫瘍作用の検討において, 本薬は広範なヒト腫瘍細胞株に対して増殖抑制作用を示し, 約60,000種類の化合物の細胞毒性プロファイルと比較して本薬は独特な細胞毒性パターンを示した。骨髄腫細胞株及びMM患者由来の骨髄腫細胞に対して2.5 ~ 30 nmol/Lの50%細胞増殖阻害濃度(GI<sub>50</sub>)で増殖抑制作用を示した。

本薬存在下に培養した骨髄腫細胞においてsub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期の細胞の増加及びカスパーゼ3の活性化が認められ, 本薬はアポトーシスを誘導することが示された。更に, 本薬存在下に骨髄腫細胞を培養した後, 培地から本薬を除去しても24時間後の細胞生存率が低下し, 本薬のアポトーシス誘導作用は不可逆的であることが示唆された。

本薬存在下に培養した骨髄腫細胞を, 骨髄ストローマ細胞 (以下, BMSCs) をコートしたプレートに添加して培養した結果, 本薬は骨髄腫細胞のBMSCsへの接着を抑制した。また, 本薬は骨髄腫細胞存在下又は非存在下におけるBMSCsからのIL-6分泌を抑制した。

これらの結果から, 本薬が骨髄腫細胞にアポトーシスを誘導して直接細胞毒性作用を示すのに加え, 腫瘍周囲微小環境に作用して骨髄腫細胞の増殖を抑制することが示唆された。

本薬はデキサメタゾン並びにドキソルビシン、メルファラン及びミトキサントロンに耐性を示す骨髄腫細胞株に対して、3.0～40 nmol/LのGI<sub>50</sub>で増殖抑制作用を示した。更に、本薬はP-糖蛋白(以下、P-gp)又は多剤耐性関連蛋白質(以下、MRP)3及びMRP5を発現させた細胞株に対しても腫瘍の増殖を抑制し、薬物排出ポンプによる影響を受けないことが示され、多剤耐性を獲得している腫瘍に対しても抗腫瘍効果を示すことが期待された。

本薬存在下に培養した骨髄腫細胞は、本薬に対する耐性を獲得した。この耐性株において、P-gp、MRP3、MRP4及びMRP5の発現は認められず、本薬のプロテアソーム活性阻害作用は親株と同程度であった。更に本薬存在下に培養して耐性を獲得した骨髄腫細胞(RPMI8226)を移植したマウス腫瘍モデルでは、本薬は耐性骨髄腫細胞の増殖を抑制した。

MタンパクはMMなどの形質細胞性腫瘍から分泌される単クローン性の免疫グロブリン蛋白質であり、臨床上、血清中Mタンパクの濃度をMM患者における重症度の指標としている。本薬はMMのMタンパク産生そのものには影響を及ぼさなかったことから、本剤の臨床試験においても血清中Mタンパク濃度が重症度の適切な指標となることが示された。

ボルテゾミブ原薬中の類縁物質のうち、          を含む2化合物(類縁物質F及びJ)は本薬よりプロテアソーム阻害作用が3～4倍強かったが、他の          を含む類縁物質はプロテアソーム阻害活性を示さなかった。また、          を含まない類縁物質もプロテアソーム阻害活性を示さなかった。

高純度ボルテゾミブ(純度:>99%)のプロテアソーム活性阻害作用は本薬の代表例(純度:>98%)と同程度であり、類縁物質F及びJによるプロテアソーム阻害活性の本薬全体の活性に対する寄与はごく軽微であると推測された。

## 2) *In vivo*試験

本薬は、ヒト骨髄腫細胞を移植した異種移植マウス腫瘍モデルにおいて、用量依存的に腫瘍体積の増加を抑制し、生存日数を延長させた。このとき、骨髄腫細胞中のプロテアソーム活性は本薬の用量に依存して抑制された。また本薬は骨髄腫瘍中の血管新生も抑制しており、*in vivo*試験においても、本薬の腫瘍周囲の微小環境への影響が抗腫瘍効果に関与することが示唆された。

骨髄腫細胞以外の肺がん細胞及び結腸がん細胞を移植したマウス腫瘍モデルにおいても、本薬は用量依存的に腫瘍体積の増加を抑制した。

以上の結果から、本薬は異種移植マウス腫瘍モデルにおいて、*in vivo*で抗腫瘍効果を示すことが確認された。

本薬の造血幹細胞機能に対する作用をマウスを用いて検討した。本薬を投与した動物の造血前駆細胞数(CFU数)は、対照群と同程度であった。更に、本薬を投与したマウスから得た骨髄細胞を致死量の放射線を照射されたマウスに移植したとき、末梢血液細胞は、無処置マウスの骨髄細胞を移植した場合と同程度に再生した。すなわち、本薬により造血幹細胞機能は損なわれないことが示唆された。



## (2) 副次的薬理試験

本薬の神経細胞株におけるプリオン蛋白質に及ぼす影響を検討した結果、対照群と同様に内因性プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)が検出され、本薬存在下においてもPrP<sup>C</sup>は増加せず、proteinase K抵抗性プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)への変換もみられなかった。

## (3) 安全性薬理試験

### 1) 中枢神経系に関する試験

本薬の中枢神経系に対する作用を、Sprague-Dawleyラットを用いてIrwin変法により検討した。本薬の0.10及び0.25 mg/kg投与により軽微な眼瞼下垂がみられた。また、0.25 mg/kg投与により軽微な一過性の体温低下がみられたが、いずれの用量でも、異常行動、神経障害を示唆する所見及び一般状態に対する作用はみられず、観察期間終了時に遅発性の神経毒性はみられなかった。

### 2) 心血管系に関する試験

本薬の心血管系に対する作用を、テレメータを装着した無麻酔ビーグル犬を用いて検討した。本薬の0.065 mg/kg投与により、血圧、心拍数並びにECGパラメータ及びECG波形やリズムに変化はみられなかったが、0.2 mg/kgでは瀕死状態の動物がみられ、血圧の低下、心拍数の増加並びにQTc間隔の延長及びECG波形やリズムの変化が認められた。

また、モルモット摘出心臓を用いた検討で、蛋白質を含まない緩衝液を溶媒とした本薬を灌流したとき、陰性変時作用及び陰性変力作用を示した。一方、膜カリウムイオン電流に対する本薬の直接作用はみられなかった。

本薬をテレメータ装着無麻酔ビーグル犬に投与した後、陽性変力作用を示す薬剤(ドパミン)及び昇圧薬(フェニレフリン)を投与したとき、これらの薬剤による心血管系作用に対して本薬は影響を及ぼさなかった。また、本薬投与群で認められたECGの変化は陰性変伝導作用及び心室再分極の遅延であり、状態悪化による電解質異常に関連すると推察される。

更にBALB/cマウスを用いた検討において、本薬を投与したマウスから摘出した心臓の心収縮パラメータは対照群と同様であった。本薬を投与したマウスの心拍数の変化はマウスの体温を37℃に維持することにより消失し、アトロピンの併用では消失しなかった。すなわち、マウスにおける本薬の心拍数に対する作用は、迷走神経緊張によるものではないと推察された。

本薬投与による心血管作用は心臓への直接作用ではないと推察され、また、本薬投与により心血管系の変化がみられた時にはドパミンやフェニレフリンを対症療法として使用できる可能性が示唆された。

### 3) 呼吸系に関する試験

本薬の呼吸系に対する作用をSprague-Dawleyラットの呼吸数及び換気容量で評価した。本薬は呼吸系に対して作用を示さなかった。また、横隔膜にも病理組織学的変化は認められなかった。

#### (4) 薬力学的薬物相互作用

*In vitro*試験において、メルファラン又はドキソルビシン耐性骨髄腫細胞に対して、作用発現濃度以下の本薬とメルファラン又はドキソルビシンを併用すると、骨髄腫細胞のメルファラン又はドキソルビシンに対する感受性が改善した。また、本薬はデキサメタゾンと併用したとき、それぞれ単独での作用以上に骨髄腫細胞の増殖を抑制した。

*In vivo*試験において、肺がん細胞、結腸がん細胞及び膵臓がん細胞を移植したマウス腫瘍モデルに対して、本薬をそれぞれ5-フルオロウラシル(5-FU)、イリノテカン(CPT-11)及びゲムシタピンと併用したとき、本薬又は化学療法剤単独における作用以上の抗腫瘍効果を示した。

すなわち、本薬は化学療法剤と併用することで単独以上の抗腫瘍効果を発揮することが示された。

本薬における種々の薬理的検討の結果、本薬は選択的、可逆的にプロテアソーム活性を阻害して抗腫瘍効果を発揮することが示され、*in vivo*試験においても単独で腫瘍増殖を抑制することが確認された。また、本薬は化学療法剤と併用することにより、それぞれの単独以上の作用を示し、多剤耐性腫瘍細胞に対しても抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

安全性薬理試験において、心血管系に対して作用が認められたが、これらは本薬の直接作用ではないと推察され、また、本薬投与により心血管系の変化がみられた時にはドパミンやフェニレフリンを対症療法として使用できる可能性が示唆された。

以上のことから、本薬はMM患者に対して治療効果を示すことが示唆された。

## 2.4.3 薬物動態試験

ボルテゾミブ(以下,本薬)の薬物動態を検討するため,<sup>14</sup>C-標識したボルテゾミブ(以下,<sup>14</sup>C-ボルテゾミブ)及び非標識体を用いて表 2.4.3-1 に示す一連の試験を実施した。なお,胎盤胎児移行及び乳汁中移行に関する試験は実施しなかった。

表 2.4.3-1 ボルテゾミブに関する薬物動態試験の一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	記載箇所
<b>吸収</b>			
単回投与			
血漿中未変化体濃度	ラット	静脈内	4.2.2.2.1
血漿中放射能濃度	サル	静脈内	4.2.2.2.2
反復投与			
血漿中未変化体濃度	妊娠ラット	静脈内	4.2.2.2.3
血漿中未変化体濃度	ラット	静脈内	4.2.2.2.4
血漿中未変化体濃度	妊娠ウサギ	静脈内	4.2.2.2.5
血漿中未変化体濃度	サル	静脈内	4.2.2.2.6
<b>分布</b>			
単回投与			
組織内放射能濃度	マウス	静脈内	4.2.2.3.1
QWBA (L-フェニルアラニン標識体)	ラット	静脈内	4.2.2.3.2
QWBA 及び摘出法 (カルボニル標識体)	ラット	静脈内	4.2.2.3.3
摘出法 (L-フェニルアラニン標識体)	サル	静脈内	4.2.2.3.5
QWBA 及び摘出法 (カルボニル標識体)	サル	静脈内	4.2.2.3.6
反復投与			
組織内放射能濃度及び未変化体濃度	ラット	静脈内	4.2.2.3.4
血漿蛋白結合	ラット, イヌ及びサル	<i>In vitro</i>	4.2.2.3.7
血漿蛋白結合	ラット, サル及びヒト	<i>In vitro</i>	4.2.2.3.8
血球移行性	ラット及びサル	<i>In vitro</i>	4.2.2.3.9
血球移行性	ヒト	<i>In vitro</i>	4.2.2.3.10
血球移行性	ラット	静脈内	4.2.2.3.3
血球移行性; <i>ex vivo</i>	ラット	静脈内	4.2.2.3.11
血球移行性; 未変化体	サル	静脈内	4.2.2.3.12
血球移行性; 放射能	サル	静脈内	4.2.2.3.6
<b>代謝</b>			
<i>In vitro</i> 代謝	マウス及びヒト肝ミクロソーム	<i>In vitro</i>	4.2.2.4.1
<i>In vitro</i> 代謝	ラット	<i>In vitro</i>	4.2.2.4.2
<i>In vitro</i> 代謝	ヒト肝及び発現系ミクロソーム	<i>In vitro</i>	4.2.2.4.3

QWBA: 定量的全身オートラジオグラフィ

(次頁に続く)

表 2.4.3-1 ボルテゾミブに関する薬物動態試験の一覧表（続き）

試験の種類	試験系	投与方法	記載箇所
<b>代謝</b>			
代謝に關与する CYP 分子種の同定	ヒト発現系ミクロソーム	<i>In vitro</i>	4.2.2.4.4
代謝に關与する CYP 分子種の同定	ヒト肝ミクロソーム	<i>In vitro</i>	4.2.2.4.5
代謝に關与する CYP 分子種の同定	ヒト肝及び発現系ミクロソーム	<i>In vitro</i>	4.2.2.4.6
血漿中代謝物	ラット	静脈内	4.2.2.4.7
血球中代謝物	ラット	静脈内	4.2.2.4.8
尿中代謝物	ラット	静脈内	4.2.2.4.7
胆汁中代謝物	ラット	静脈内	4.2.2.4.2
組織内放射能に対する未変化体 AUC(0-72)比	ラット	静脈内	4.2.2.4.9
血漿中代謝物	サル	静脈内	4.2.2.4.10
尿糞中代謝物	サル	静脈内	4.2.2.4.10
脳内代謝物	サル	静脈内	4.2.2.4.11
組織内代謝物	サル	静脈内	4.2.2.4.12
血漿中代謝物	ヒト	静脈内	4.2.2.4.13
酵素阻害；未変化体	ヒト肝ミクロソーム	<i>In vitro</i>	4.2.2.4.14
酵素阻害；代謝物	ヒト肝ミクロソーム	<i>In vitro</i>	4.2.2.4.15
酵素阻害；mechanism-based inhibition の検討	ヒト肝ミクロソーム	<i>In vitro</i>	4.2.2.4.16
酵素誘導	初代培養ヒト肝細胞	<i>In vitro</i>	4.2.2.4.17
酵素誘導； <i>ex vivo</i>	ラット	静脈内	4.2.2.4.18
<b>排泄</b>			
単回投与			
尿糞中排泄（L-フェニルアラニン標識体）	ラット	静脈内	4.2.2.5.1
尿糞中排泄（カルボニル標識体）	ラット	静脈内	4.2.2.5.2
尿糞中排泄（L-フェニルアラニン標識体）	サル	静脈内	4.2.2.5.3
尿糞中排泄（カルボニル標識体）	サル	静脈内	4.2.2.5.4
胆汁中排泄（L-フェニルアラニン標識体）	ラット	静脈内	4.2.2.5.1
胆汁中排泄（カルボニル標識体）	ラット	静脈内	4.2.2.5.2
胆汁中排泄（L-フェニルアラニン標識体）	サル	静脈内	4.2.2.5.3
<b>薬物動態学的薬物相互作用</b>			
Caco-2 単層膜に対する透過性	Caco-2 単層膜	<i>In vitro</i>	4.2.2.6.1
トランスポーターを介する相互作用	Caco-2 単層膜	<i>In vitro</i>	4.2.2.6.2
<b>その他の薬物動態試験</b>			
薬力学			
プロテアソーム活性（ChT）	ラット	静脈内	4.2.2.7.1
プロテアソーム活性（ChT）	妊娠ラット	静脈内	4.2.2.7.2
プロテアソーム活性（ChT）	サル	静脈内	4.2.2.7.3
プロテアソーム活性（ChT：T 比）	ラット	静脈内	4.2.2.7.4
プロテアソーム活性（ChT：T 比）	妊娠ウサギ	静脈内	4.2.2.7.5
プロテアソーム活性（ChT：T 比）	サル	静脈内	4.2.2.7.6
プロテアソーム活性（ChT：T 比）	サル	静脈内	4.2.2.7.7

ChT：キモトリプシン様活性，ChT：T 比：トリプシン様活性に対するキモトリプシン様活性比

## (1) 分析法

### 1) 非標識体

血漿，血液及び血球中ボルテゾミブ（以下，本薬）濃度の測定は，内標準物質として本薬の構造類似体である [REDACTED] 又は [REDACTED] を用いて，固相抽出又は除蛋白した後，高速液体クロマトグラフ - 質量分析計（以下，LC/MS，定量下限： [REDACTED] ng/mL）又は高速液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計（以下，LC/MS/MS，定量下限： [REDACTED] ng/mL）を用いて測定した。

組織内ボルテゾミブ濃度の測定は，内標準物質として [REDACTED] を用いて，除蛋白あるいは除蛋白後，液 - 液抽出した後，LC/MS/MS を用いて測定した（定量下限： [REDACTED] ng/g）。

### 2) 放射性標識体

<sup>14</sup>C-標識体は，主としてピラジン環に隣接するカルボニル基を標識した <sup>14</sup>C-ボルテゾミブを使用し，一部の試験では，L-フェニルアラニンの炭素全てを <sup>14</sup>C-標識した化合物又は L-フェニルアラニンのフェニル基の炭素全てを <sup>14</sup>C-標識した化合物を使用した。血漿中，尿中，胆汁中，糞中及び組織中の <sup>14</sup>C-ボルテゾミブ及びその代謝物は，ラジオクロマトグラフィ，液体シンチレーションカウンター（LSC）及びイメージングアナライザーを用いた定量的全身オートラジオグラフィ（以下，QWBA）で測定した。

### 3) プロテアソーム活性

本薬は，26S プロテアソームの触媒ユニットである 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性部位に特異的かつ可逆的に結合することでプロテアソーム活性を阻害する。初期の試験では，20S プロテアソームのキモトリプシン様活性（以下，ChT）を測定するため，合成基質 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC を用い，試料中の蛋白濃度を測定して，比活性を評価した。しかし，試料中のプロテアソーム/蛋白比は，細胞によって変動するため，試料中の蛋白濃度で補正した比活性では，プロテアソーム阻害の程度を正確に評価することが困難になる。20S プロテアソームのトリプシン様活性（以下，T）は，本薬による阻害の影響を受けないことから，合成基質 Bz-Val-Gly-Arg-AMC を用いて T を測定してプロテアソーム含量を推定した。後期の試験では，トリプシン様活性に対するキモトリプシン様活性比（ChT : T 比）から本薬によるプロテアソーム阻害活性を評価した。

## (2) 薬物動態モデル

本薬の薬物動態は，モデルに依存しないノンコンパートメントモデルによって解析した。

## (3) 血漿中濃度

ラット，ウサギ及びサルに本薬を静脈内投与したとき，いずれの動物種においても本薬の血漿中濃度は，速やかな分布相とその後の緩慢な消失相からなる 2 相性の消失を示した。特に，消失

相では本薬の血漿中濃度は、ほぼ一定に推移した。投与量の増加あるいは反復静脈内投与によって、消失半減期（以下、 $t_{1/2}$ ）は遅延し、全身クリアランス（以下、CL）は低下（又は AUC は増大）したことから、本薬の薬物動態は非線形であると考えられた。本薬の薬物動態が非線形になる原因として、プロテアソーム阻害に起因するチトクロム P450（以下、CYP）3A 含量の減少及び消化管内に分泌されたボルテゾミブが、消化管から吸収されたことによる血漿中濃度の上昇が考えられた。また、この血漿中濃度の上昇のために、特に  $t_{1/2}$  などの薬物動態パラメータにばらつきが生じたものと考えられた。終末相における分布容積（ $V_z$ ）は、サルでは約 11 ~ 53 L/kg と大きく、本薬は広範な組織に分布していることが示唆された。

ラット、サル及びヒトに本薬を反復静脈内投与したときの血漿中濃度推移は、いずれの動物種においても速やかな分布相とその後の緩慢な消失相を示した（図 2.4.3-1）。また、反復投与による CL の低下（又は AUC の増大）は、いずれの動物種においても認められた。しかし、ラット及びサルにおいて反復静脈内投与したとき、血漿中未変化体濃度は定常状態に到達することが確認された。

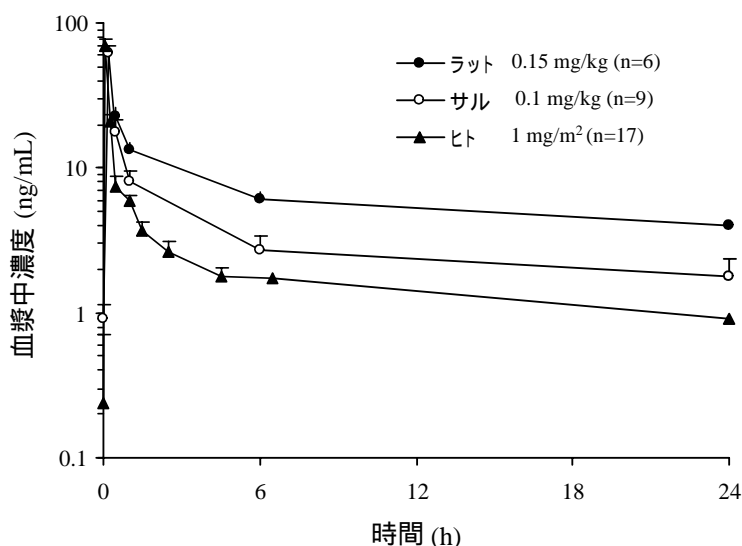


図 2.4.3-1 ラット（26 w）、サル（38 w）及びヒト（8 d）にボルテゾミブを反復静脈内投与したときの血漿中未変化体濃度（平均値 + 標準偏差）

#### (4) 分布

Lewis 肺癌細胞移植マウスに  $^{14}\text{C}$ -ボルテゾミブを単回静脈内投与したとき、放射能濃度は副腎、肝臓及び前立腺で高かったが、腫瘍内放射能濃度は血液中濃度と同程度であった。カルボニル基を標識した  $^{14}\text{C}$ -ボルテゾミブをラット及びサルに単回静脈内投与したとき、放射能は広範な組織に分布したが、小脳、大脳、脊髄、房水及び硝子体などの組織では放射能はほとんど検出されなかった。生体内では本薬は大部分が非イオン形として存在し、広範な組織内分布を示すが、脳、房水、硝子体などの組織には、血液との間に関門が存在しており、P-gp 及び MRP2 以外の何らかの排出トランスポーターによって排出されているものと推察された。ラット又はサルにおいて、放射能濃度が高かった組織は、腎臓、副腎、肝臓、脾臓、肺、骨髄、胃粘膜であった。ラットに

カルボニル基を標識した  $^{14}\text{C}$ -ボルテゾミブを4回反復静脈内投与したとき 組織内放射能濃度は、3 回目の投与でほぼ定常状態に到達したと判断された。反復静脈内投与時においても、放射能は広範な組織に分布することが確認された。一方、中枢神経系における組織内放射能濃度は低く、反復静脈内投与後も同様であった。

本薬のラット、イヌ、サル及びヒトにおける血漿蛋白結合率は、それぞれ 80.8~87.4%、80.2~84.4%、67.2~84.8%及び 78.9~85.7%であり、血漿蛋白結合率は90%未満であったことから、蛋白結合種の同定は実施しなかった。ラット及びサルに  $^{14}\text{C}$ -ボルテゾミブを静脈内投与したとき、血液中放射能濃度は、血漿中濃度よりも2倍以上高かったが、*in vitro* でラット、サル及びヒトにおける血漿/血球中濃度比は1.15~1.43であったことから、未変化体以外に代謝物が血球中に移行していることが示唆された。

本薬の放射性標識体を用いた胎盤胎児移行性試験は実施していないが、生殖毒性試験における胎児血液中プロテアソーム活性に低下が認められたことから、本薬は胎盤を通過し、胎児に移行している可能性が示唆された。

#### (5) 代謝

ラット、サル及びヒトにおける本薬の代謝パターンは定性的には類似しており、ヒトにおける主要な代謝物は、ラットあるいはサルにおいて、全て認められた。ラット及びサル血漿における主代謝物はM4であり、ヒト血漿中における主代謝物は、M2、M4及びM1であった。尿中には未知の高極性代謝物が多く排泄され、その他にラットでは、M1及びM4が多かった。糞中には、M1、M2及びM15が排泄された。胆汁中の主代謝物はM10、M14及びM15であった。なお、未変化体は、尿、糞及び胆汁中には検出されなかった。

ヒト発現系 CYP 分子種及びヒト肝ミクロソームを用いた一連の試験から、本薬の代謝に関与する分子種は主として CYP3A4 であり、次いで、CYP2C19 の寄与が大きいと考えられた。

未変化体、主代謝物である M1 及び M2 には、CYP2C19 に対する中程度の阻害がみられた。本薬の CL の低下（又は AUC の増大）は、CYP 分子種の代謝阻害によるものではなく、プロテアソーム阻害に起因する CYP3A 含量の減少によるものと考えられた。本薬及び主要な代謝物には CYP3A に対する阻害はほとんどないが、プロテアソーム阻害に起因する CYP3A 含量の減少に基づく薬物相互作用の可能性が示唆された。

#### (6) 排泄

カルボニル基を標識した  $^{14}\text{C}$ -ボルテゾミブをラットに単回静脈内投与したとき、投与後 72 時間までに尿及び糞中に、投与量のそれぞれ 21.10%及び 38.61%が排泄された。また、投与量の 6.12%が呼気中へ排泄された。一方、サルにカルボニル基を標識した  $^{14}\text{C}$ -ボルテゾミブを単回静脈内投与したとき、投与後 144 時間までに尿及び糞中に、投与量のそれぞれ 10.59~25.34%及び 12.96~14.94%が排泄された。投与した放射能の多くは、カーカス中に残存した。

胆管カニュレーションを施したラットにカルボニル基を標識した  $^{14}\text{C}$ -ボルテゾミブを単回静脈内投与したとき、投与後 72 時間までに投与量の 35.10%が胆汁中に、16.16%が尿中に、7.75%が糞

中に、1.20%が呼気中に排泄された。胆管カニュレーションを施した動物において、放射能の糞中への排泄がみられたことから、本薬あるいは代謝物の一部は、消化管から分泌されているものと考えられた。薬物に由来する放射能は、主に胆汁を経由して糞中に排泄されたと考えられた。

本薬の<sup>14</sup>C-標識体を用いた乳汁排泄試験は実施していないが、Henderson-Hasselbalch式による予測から、乳汁中濃度は血漿中濃度と同程度であり、本薬は乳汁移行する可能性が示唆された。

#### (7) 薬物動態学的薬物相互作用

Caco-2 単層膜による試験から、本薬の輸送は、P-糖蛋白質（以下、P-gp）の阻害剤、MRP2 の阻害剤、アジ化ナトリウムあるいはEDTAの添加による影響を受けなかったことから、本薬は薬物排出ポンプであるP-gp及びMRP2の基質ではないことが示唆された。本薬は、ビンブラスチンのP-gpによる輸送を $K_i=13 \mu\text{mol/L}$ で阻害した。

#### (8) 薬力学

ラット、ウサギ及びサルに本薬を静脈内投与したとき、用量依存的なプロテアソーム活性の阻害がみられた。プロテアソーム活性阻害は投与後5分～1時間で最大となった。サルにおいて、血漿中未変化体濃度推移とほぼ平行していた。プロテアソーム活性阻害率は血漿中ボルテゾミブ濃度が0.5～5 ng/mLの範囲から急速に80%まで上昇し、10～60 ng/mLではプラトーになった。また、ラット及びサルにおいて、プロテアソーム阻害活性に性差はみられず、最大阻害率には投与回数による違いはみられなかった。



## 2.4.4 毒性試験

ボルテゾミブ（以下本薬）の毒性評価として、GLPを遵守し、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験（胚・胎児発生毒性試験）、更にウサギを用いた局所刺激性試験、モルモットを用いた抗原性試験（ASA試験、PCA試験）及びマウスを用いた免疫毒性試験を実施した。がん原性試験は、本薬の臨床適用を考慮し、実施しなかった。また、生殖発生毒性試験の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験については、本薬のラットにおける26週間反復静脈内投与試験で、精巣に精上皮の変性/萎縮及び卵巣に黄体の単細胞壊死がみられていること、及び本薬が細胞毒性を有する抗がん剤であることを考慮し、実施しなかった。

表 2.4.4-1 ボルテゾミブに関する毒性試験の一覧表

試験の種類	動物種	投与方法	投与量	CTDにおける記載箇所
単回投与毒性試験	ラット	静脈内	0, 0.03, 0.10, 0.30 mg/kg (0, 0.18, 0.60, 1.80 mg/m <sup>2</sup> )	4.2.3.1.2
	サル	静脈内(持続)	0, 0.10, 0.30 mg/kg (0, 1.2, 3.6 mg/m <sup>2</sup> )	4.2.3.1.4
反復投与毒性試験 (予備試験)	マウス	腹腔内	0, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10 mg/kg/d (0, 0.09, 0.3, 0.9, 3.0, 9.0, 30.0 mg/m <sup>2</sup> /d)	4.2.3.1.1
(予備試験)	ラット	静脈内	0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 mg/kg/回 (0, 0.06, 0.18, 0.30, 0.60, 0.90, 1.20, 1.50, 1.80, 2.10 mg/m <sup>2</sup> /回)	4.2.3.1.1
(週2回, 2週間)	ラット	静脈内	0, 0.10, 0.20 及び 0.25 mg/kg/回 (0, 0.60, 1.20 及び 1.50 mg/m <sup>2</sup> /回)	4.2.3.2.1
(26週間: 14週間中間報告) <sup>a)</sup>	ラット	静脈内	0, 0.05, 0.10 及び 0.20/0.15 mg/kg/回 (0, 0.30, 0.60 及び 1.20/0.90 mg/m <sup>2</sup> /回)	4.2.3.2.2
(26週間: 最終報告) <sup>a)</sup>	ラット	静脈内	0, 0.05, 0.10 及び 0.20/0.15 mg/kg/回 (0, 0.30, 0.60 及び 1.20/0.90 mg/m <sup>2</sup> /回)	4.2.3.2.3
(14日間)	サル	静脈内	0, 0.045, 0.067 及び 0.100 mg/kg/d (0, 0.54, 0.80 及び 1.20 mg/m <sup>2</sup> /d)	4.2.3.2.5
(週2回, 4週間)	サル	静脈内	0, 0.045, 0.067 及び 0.100 mg/kg/回 (0, 0.54, 0.80 及び 1.20 mg/m <sup>2</sup> /回)	4.2.3.2.6
(38週間) <sup>a)</sup>	サル	静脈内	0, 0.050, 0.075 及び 0.100 mg/kg/回 (0, 0.6, 0.9 及び 1.20 mg/m <sup>2</sup> /回)	4.2.3.2.7
遺伝毒性試験				
(復帰突然変異試験)	<i>Salmonella typhimurium</i>	In vitro	1.0 ~ 1000 µg/plate	4.2.3.3.1.1
(復帰突然変異試験)	<i>Salmonella typhimurium</i> 及び <i>Escherichia coli</i>	In vitro	0.33 ~ 5000 µg/plate	4.2.3.3.1.2
(染色体異常試験)	チャイニーズハムスター卵巣細胞	In vitro	3.125, 12.5, 100 µg/mL	4.2.3.3.1.3
(小核試験)	マウス	単回静脈内	0, 0.25, 0.5 及び 1.0 mg/kg (0, 0.75, 1.5 及び 3.0 mg/m <sup>2</sup> )	4.2.3.3.2.1

a) 3週間を1サイクル(週2回, 2週間投与後, 1週間休薬)として、ラット26週間反復投与毒性試験は9サイクル、サル38週間反復投与試験は13サイクル投与した。

表 2.4.4-2 ボルテゾミブに関する毒性試験の一覧表（続き）

試験の種類	動物種	投与方法	投与量	CTD における記載箇所
生殖発生毒性試験				
（胚・胎児発生毒性試験）	ラット	静脈内	0, 0.025, 0.050 及び 0.075 mg/kg/d (0, 0.15, 0.30 及び 0.45 mg/m <sup>2</sup> /d)	4.2.3.5.2.2
（胚・胎児発生毒性試験）	ウサギ	静脈内	0, 0.010, 0.025 及び 0.050 mg/kg/d (0, 0.11, 0.28 及び 0.55 mg/m <sup>2</sup> /d)	4.2.3.5.2.4
局所刺激性試験	ウサギ	血管周囲, 静脈内, 皮下及び筋肉内単回投与	0, 0.1 mg/kg (0, 1.1 mg/m <sup>2</sup> )	4.2.3.6.1
その他の毒性試験				
抗原性試験	モルモット	ASA 感作 静脈内 惹起 静脈内 PCA 感作 皮内 惹起 静脈内	0, 3, 7, 10 日, 計 4 回 初回感作の 28 日後 ASA 試験の動物の初回感作 25 日後の血清 感作の 4 時間後 0.17 mg/kg 0.17 mg/kg	4.2.3.7.1.1
免疫毒性試験（週 2 日, 28 日間）	マウス	腹腔内	0, 0.3 及び 0.6 mg/kg/回 (0, 0.90 及び 1.8 mg/m <sup>2</sup> /回)	4.2.3.7.2.1

#### 2.4.4.1 単回投与毒性試験

本薬の単回投与での最大耐量 (MTD)<sup>注1)</sup>を明らかにする目的で、ラット及びサルにおける単回静脈内投与毒性試験を実施した。

ラット及びサルで 0.30 mg/kg (1.80 及び 3.6 mg/m<sup>2</sup>)投与群に死亡がみられ、概略の致死量はラット及びサルともに 0.30 mg/kg (1.80 及び 3.6 mg/m<sup>2</sup>)と判断された。ラットでは 0.30 mg/kg (1.80 mg/m<sup>2</sup>)投与群で消瘦、排糞減少、被毛の黄色化及び耳の蒼白化がみられた以外、一般状態に本薬投与に関連した変化はみられなかった。サルでは 0.30 mg/kg (3.6 mg/m<sup>2</sup>)投与群で死亡前の動物に活動性低下が認められた以外、一般状態に異常な変化はみられなかった。

#### 2.4.4.2 反復投与毒性試験

臨床での予定投与経路及び投与方法を用いて本薬を反復投与したときの毒性を検討する目的で、ラットを用いて週 2 回投与での 2 週間静脈内投与毒性試験及び 3 週間で 1 サイクル (週 2 回, 2 週間投与後, 1 週間休薬)とした 26 週間静脈内投与毒性試験 (14 週間中間屠殺群及び 8 週間回復性試験群を含む)を、サルを用いて週 2 回投与での 4 週間静脈内投与毒性試験及び 3 週間で 1 サイクル (週 2 回, 2 週間投与後, 1 週間休薬)とした 38 週間静脈内投与毒性試験 (8 週間回復性試験群を含む)を実施した。

ラットでは、2 週間投与試験の MTD は 0.25 mg/kg/回 (1.50 mg/m<sup>2</sup>/回)、26 週間投与試験の MTD は 0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m<sup>2</sup>/回)であり、主要な標的器官は、消化管、造血器系及びリンパ系であった。サルでは、4 週間投与試験の MTD は 0.067 mg/kg/回 (0.80 mg/m<sup>2</sup>/回)、38 週間投与試験の MTD は 0.050 mg/kg/回 (0.60 mg/m<sup>2</sup>/回)であり、主要な標的器官は、消化管、造血器系、リンパ系、

<sup>注1)</sup> 動物に薬物を投与したとき、その動物が強い毒性症状を現さず、耐え得る (死亡しない) 最大用量。

末梢神経系及び腎臓であった。観察されたそれぞれの所見は、休薬により回復あるいは回復傾向が認められた。なお、本薬の毒性はいずれの動物種においても特に違いは認められなかった。本薬の毒性は立ち上がりの急な用量反応が特徴であり、MTD よりわずかに高い用量で死亡がみられた。

#### 2.4.4.3 遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames 試験)、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験を行った結果、Ames 試験は陰性であったが、*in vitro* 染色体異常試験では染色体構造異常誘発性が認められた。この所見は本薬の細胞周期に対する作用から予測されるものであった(2.4.2の項参照)。

また、*in vivo* のマウスを用いた小核試験においては陰性であった。

#### 2.4.4.4 がん原性試験

「抗がん剤の臨床試験実施及び承認申請のために実施される毒性試験に関する Q & A について」<sup>1)</sup>の抗がん剤の毒性試験に関する Q & A の Q8, A8 を参考にし、本薬が細胞毒性を有する抗がん剤であるため、がん原性試験は実施しなかった。

#### 2.4.4.5 生殖発生毒性試験

本薬は細胞毒性を有する抗がん剤であることを考慮し、生殖発生毒性試験として、ラット及びウサギを用いた胚・胎児毒性試験のみ実施した。

ラットの妊娠 6 日から 17 日に本薬を 0, 0.025, 0.050 及び 0.075 mg/kg/d (0, 0.15, 0.30 及び 0.45 mg/m<sup>2</sup>/d) で連日静脈内投与した結果、0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m<sup>2</sup>/d) 投与群で投与初期に母動物の体重及び摂餌量に一過性の影響が認められた。そのほか、本薬投与に関連した死亡及び剖検所見は認められなかった。胎児では、生存胎児数、死亡胎児数、性比及び着床後死亡率に本薬の影響は認められず、また、本薬に催奇形性は認められなかった。以上より、母動物の一般毒性学的無毒性量は 0.050 mg/kg/d (0.30 mg/m<sup>2</sup>/d)、生殖機能並びに胎児に対する無毒性量は、いずれも 0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m<sup>2</sup>/d) と判断した。

ウサギの妊娠 7 日から 19 日に本薬を連日静脈内投与した結果 0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m<sup>2</sup>/d) で母動物の死亡、体重増加抑制及び摂餌量の減少、剖検所見及び流産が認められた。0.050 mg/kg/d (0.55 mg/m<sup>2</sup>/d) で、吸収胚数の増加とそれに伴う生存胎児数の減少及び生存胎児体重の低値がみられたが、催奇形性作用は認められなかった。以上より母動物の一般毒性、生殖機能及び胎児に対する無毒性量は、いずれも 0.025 mg/kg/d (0.28 mg/m<sup>2</sup>/d) と判断した。

#### 2.4.4.6 局所刺激性試験

ウサギを用いて、血管周囲、静脈内、筋肉内及び皮下投与による本薬の局所刺激性を検討した。皮下投与を除くいずれの投与経路においても軽度な組織刺激性がみられたが、投与 72 時間後には回復が認められた。

#### 2.4.4.7 その他の毒性試験

##### (1) 抗原性試験

全身性アナフィラキシー反応及び受動的皮膚アナフィラキシー反応ともに陰性であった。

##### (2) 免疫毒性試験

本薬のマウスにおける免疫毒性試験において、0.6 mg/kg/回 (1.8 mg/m<sup>2</sup>/回)までの用量では、免疫毒性作用を示さなかった。

#### 2.4.4.8 毒性試験の総括及び考察

本薬の非臨床毒性試験は、遺伝毒性、生殖発生毒性、標的器官の特定、毒性所見の可逆性、曝露量と毒性所見との関連性、及び重要な毒性の発現機序を解明することを目的として実施した。

##### (1) 総括

###### 1) 単回投与毒性

本薬の単回静脈内投与毒性をラット及びサルを用いて検討した結果、概略の致死量は、ラット及びサルともに0.30 mg/kg (1.80 及び 3.6 mg/m<sup>2</sup>)であった。また、MTDは、ラット及びサルともに0.10 mg/kg (0.60 及び 1.20 mg/m<sup>2</sup>)であり、動物種間でMTDと概略の致死量の間大きな差はないと推察された。

###### 2) ラット反復投与毒性

ラットの反復投与毒性試験における主要な所見として、消化管で用量依存的な粘膜過形成、血小板減少、リンパ系組織の萎縮並びに肝細胞の肥大又は空胞化、肝臓重量の増加がみられ、ラット反復投与毒性試験における死亡又は瀕死状態の原因と考えられた。すべての所見は、投与終了後の休薬期間中に、部分的又は完全に回復することが確認された。最も重要な標的器官の変化は消化管粘膜の増殖性変化であると考えられた。消化管にみられた変化は、組織における軽度のアポトーシス及びそれに関連する再生性過形成によるものと推察される。用量依存的な血小板減少の原因は不明であるが、病理組織学的検査において造血細胞密度低下が認められたことから、骨髄抑制に起因する可能性が考えられた。

また、ラットのQWBA試験において、消化管及びリンパ節に本薬由来の放射能濃度が高く認められたため、これらの器官を標的器官と推定した(2.4.3(4)の項参照)。

###### 3) サル反復投与毒性

カニクイザルの反復投与毒性試験における主要な所見として、骨髄抑制に関連した重篤な貧血

及び血小板減少，消化管粘膜の過形成と関連性のある嘔吐及び下痢を特徴とする消化管毒性，循環リンパ球の減少及びリンパ系組織萎縮/単細胞壊死，腎尿細管変性/肥大又は糸球体腎症，並びに末梢神経の軸索変性を特徴とする末梢性ニューロパシーが認められた。8 週間の回復期間終了後で，末梢神経，腎臓及びリンパ系組織における変化は完全には回復しなかったが，回復傾向がみられた。38 週間反復投与試験での切迫屠殺例に血小板減少を伴う重篤な貧血が認められたことから，これらの変化が状態悪化の原因であると推察される。この変化の発現機序は，本薬の造血器系に対する影響と考えられる。なお，この造血器系に対する影響は，休薬によって回復が認められた。

消化管毒性は用量依存性の毒性であり，ラットと同様に，消化管毒性に関連する組織学的変化は，消化管粘膜過形成であり，この組織における軽度のアポトーシス及び再生性過形成に起因する二次的变化と考えられる。

循環リンパ球の減少及びリンパ系組織の萎縮は，本薬の直接作用並びに骨髄及び二次リンパ器官の抑制に関連している可能性もあるが，影響のみられたすべての投与量で他に毒性変化もみられていることから，全身性ストレスに関わる副次的影響も考えられた。

#### 4) 神経毒性

末梢神経の軸索変性が，カニクイザルの 4 週間及び 38 週間反復投与試験で認められ，解剖学的に感覚神経の通る部位のみに影響を与え，感覚神経軸索の神経細胞体には変性はみられなかった。8 週間の回復期間後には完全な回復はみられなかったが回復傾向は認められた。中枢神経系には本薬の影響による変化は認められなかった。

本薬の投与に関連する末梢性ニューロパシーの作用機序を検討する目的で，マウス GT-1 神経細胞を用い，*in vitro* における本薬の影響が検討されている<sup>2)</sup>。その結果，ユビキチン化蛋白質が核周囲へ蓄積したことから，軸索輸送に關与する蛋白質の恒常性維持の阻害及び小胞体における蛋白質の品質管理機構(quality-control mechanism)の阻害に關与し，これらの作用により細胞骨格の変化及びストレス応答を引き起こすことが考えられた。

本薬の臨床試験においても末梢神経ニューロパシー-NEC が高頻度に認められたが，本薬の減量による回復または軽快が認められている。

### (2) 考察

#### 1) 安全域

非臨床試験及び臨床試験とも薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験のデータ量が限られていることから，投与量を用いて安全域を解析及び推測した。一般的に，細胞毒性を有する抗がん剤の動物種間の安全域は MTD を用いて比較されている。

ラットに本薬を 26 週間(9 サイクル)投与したときの MTD は 0.10 mg/kg/回 (0.6 mg/m<sup>2</sup>/回)であった。また，サルに本薬を 38 週間(13 サイクル)投与したときの MTD は 0.050 mg/kg/回 (0.6 mg/m<sup>2</sup>/回)であった。多発性骨髄腫における予定臨床用量は 1.3 mg/m<sup>2</sup>/回である。非臨床試験及び臨床試験の MTD の比較から用量に基づいた安全域は 1 未満である。非臨床試験の最終的な目的は臨床

試験のための安全な投与開始用量を決めること、ヒトでの毒性発現の可能性を予測すること、毒性の標的器官の特定及び毒性所見の可逆性について検討を行うこと、非臨床所見とヒトでの事象との関連付けを行うこと及び重要な毒性の発現機序を明らかにすることである。本薬はヒトにおいてみられた副作用から判断すると、細胞毒性を有する化学療法剤として比較的高い忍容性を持つものと思われる。これらのことを考慮すると、非臨床から推定する臨床投与量の安全域が1未満であることは問題はないと考えられる。

ラットにおける26週間反復投与試験において、MTDである0.10 mg/kg/回 (0.60 mg/m<sup>2</sup>/回)の投与26週におけるAUC<sub>(0-24)</sub>及びC<sub>0.5h</sub>はそれぞれ134 ng·h/mL及び10.9 ng/mLであった。サルにおける38週間反復投与試験において、MTDは最低用量の0.050 mg/kg/回 (0.6 mg/m<sup>2</sup>/回)で、投与38週におけるAUC<sub>(0-24)</sub>及びC<sub>0</sub>はそれぞれ45.4 ng·h/mL及び48.2 ng/mLであった。また、ヒトにおけるC<sub>0</sub>に基づいた安全域は1未満であったが、ヒトのAUCをラット及びサルのMTDにおけるAUCと比較すると、安全域はそれぞれ2.5及び0.8倍であった。

## 2) 生殖発生毒性の評価

ラット及びウサギを用いて胚・胎児発生毒性試験を実施した。本薬を器官形成期に連日投与した。ウサギの高用量で、母動物毒性並びに胚・胎児致死又は発育遅延が認められた。催奇形性はラット及びウサギともに認められず、また、母動物毒性が発現しなかった用量では、胚・胎児への影響もみられなかった。母動物の一般毒性に対する無毒性量は、ラットでは0.050 mg/kg/d (0.30 mg/m<sup>2</sup>/d)、ウサギでは0.025 mg/kg/d (0.28 mg/m<sup>2</sup>/d)であった。また、母動物の生殖機能及び胚・胎児に対する無毒性量はラットでは0.075 mg/kg/d (0.45 mg/m<sup>2</sup>/d)、ウサギでは0.025 mg/kg/d (0.28 mg/m<sup>2</sup>/d)であった。これらの用量は臨床用量1.3 mg/m<sup>2</sup>/回の0.35倍及び0.22倍に相当する。

## 3) 遺伝毒性の評価

CHO細胞を用いた*in vitro*染色体異常試験において本薬は検討した最低用量である3.125 µg/mL以上で構造的な染色体異常を誘発した。100 µg/mL以上の濃度では細胞の周期は停止状態にあり、評価可能な分裂中期の細胞がなかったことから、染色体の評価をすることができなかった。これらの所見は、プロテアソームの細胞周期調節に起因すると考えられる(2.6.2.2(1)の項参照)。染色体異常の誘発がみられた濃度はMTDで達成される血漿中濃度をいずれの動物種でも大きく超えており、臨床的には遺伝毒性のリスクは高くないものと考えられる。マウスにおける小核試験では、本薬のMTDである1 mg/kg (3 mg/m<sup>2</sup>)まで小核の誘発はみられなかった。

## 4) プロテアソーム阻害剤と中枢神経系の変性性障害

プロテアソームは細胞内酵素複合体であり、中枢神経系全体のニューロン及びグリア細胞に認められている<sup>3),4)</sup>。いくつかの中枢性の神経変性性疾患では、病理組織学的に細胞内封入体あるいは細胞外の濃縮蛋白質として認識されているポリユビキチン化した蛋白質の凝集体が存在してい

る<sup>5)</sup>。したがって、これらの疾患の病因にユビキチン - プロテアソーム系が関与している可能性が推測されている。

プロテアソーム阻害剤は、ニューロン細胞株及び初代培養ニューロン細胞で直接的な細胞毒性がみられ、その細胞死はアポトーシスによって起きることが報告されている<sup>6), 7), 8), 9), 10), 11)</sup>。一方、細胞外カリウムの低値で誘発されるニューロン細胞のアポトーシスの場合、プロテアソーム阻害はカスパーゼが介するアポトーシス経路を阻害し、その結果として細胞を細胞死から保護することが報告<sup>12)</sup>されている。プロテアソームと神経変性の作用機序について明確な見解は得られていないが、ニューロン由来の細胞は条件の違いによって、プロテアソーム阻害剤の直接的な細胞毒性作用に対する感受性を変化させる。この細胞毒性には、作用機序の複数の経路（2.6.2.6 の項参照）が関与している可能性も推察される。

また、静脈内投与後の組織内分布試験において、本薬は正常なラット及びサルの中樞神経系に移行はみられなかった（2.4.3(4) の項参照）。更に、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験において、本薬投与に関連する中樞神経系の変性性病変はみられなかった。

したがって、本薬に関連した毒性所見は、末梢神経系に限定して発現し、また、本薬が中樞神経系に分布しないことから、ヒトにおいて、本薬により中樞神経系の変性性障害が発現する可能性は低いと考えられる。

### 2.4.5 総括及び結論

本薬の非臨床試験は、細胞毒性型抗がん剤についての欧米の規制ガイダンスに準拠した。また、主要な毒性試験及び安全性薬理試験は、GLP を遵守し実施した。本薬の薬理学、薬物代謝、薬物動態及び毒性における基本的な特性は十分に検討されており、本薬を臨床使用すること、また添付文書に記載する非臨床試験の知見として十分かつ適切であると考えられる。

#### 2.4.5.1 本薬の特徴

本薬はプロテアソームに対し選択的・可逆的な阻害作用を有する新規作用機序の分子標的薬である。プロテアソームは、腫瘍組織において異常をきたしている細胞周期の調節に関与しており、更に腫瘍細胞の増殖、転移、細胞浸潤、血管新生などに重要な役割を果たす転写因子 NF- $\kappa$ B の調節にも関与している。本薬は、これらを阻害することにより、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導すると考えられる。

非臨床薬理試験の結果：

- 1) 本薬はプロテアソーム活性に対する選択的かつ強力な阻害作用を示した。
- 2) 多発性骨髄腫患者から分離した骨髄腫細胞を含む広範な腫瘍細胞に対し *in vitro* , *in vivo* において抗腫瘍作用を示した。
- 3) 本薬の抗腫瘍作用は、他剤との併用により、それぞれを単独で用いたときの効果よりも強い効果を示した。
- 4) 薬剤耐性腫瘍においても抗腫瘍作用を示した。
- 5) 本薬は、骨髄腫細胞に直接作用して増殖を抑制するのみでなく、腫瘍細胞周囲の微小環境に作用して骨髄腫細胞の増殖を間接的に抑制した。
- 6) 神経芽細胞腫及び神経細胞株を用いて本薬のプリオンタンパク質への影響を検討した結果、内因性プリオン蛋白質の量に影響はなく、proteinase K 抵抗性のプリオン蛋白質への変換もみられなかった。
- 7) 本薬の高用量投与により低血圧、心拍数増加及び心筋収縮力の減弱が認められた。また、陰性変伝導作用及び心室再分極の遅延に起因すると考えられる ECG の変化が認められたが、これらの作用は心臓への直接作用ではなく、状態悪化による電解質異常に関連すると推察された。

非臨床薬物動態試験の結果：

- 1) ラット、ウサギ及びサルいずれの動物種においても本薬の血漿中濃度は、速やかな分布相とその後の緩慢な消失相からなる 2 相性の消失を示した。
- 2) ボルテゾミブの薬物動態は非線形であると考えられた。
- 3) ラット及びサルにおいて、放射能は広範な組織に分布し、特に高かった組織は、腎臓、副腎、肝臓、脾臓、肺、骨髄、胃粘膜であり、小脳、大脳、脊髄及び硝子体では放射能はほとんど検出されなかった。



- 4) 本薬のラット、イヌ、サル及びヒトにおける血漿蛋白結合率は、それぞれ 80.8~87.4%、80.2~84.4%、67.2~84.8%及び 78.9~85.7%であり、結合率は濃度に依存しなかった。未変化体以外に代謝物が血球中に移行していることが示唆された。
- 5) ラット、サル及びヒトにおける本薬の代謝パターンは定性的には類似していた。ラット、及びサルにおける血漿中主代謝物は、M4 であり、ヒトでは M2、M4 及び M1 であった。
- 6) 本薬の代謝に関与する分子種は主として CYP3A4 であると考えられた。CL の低下(又は、AUC の増大)は、プロテアソーム阻害に起因する CYP3A 含量の低下によるものと考えられた。
- 7) 本薬及び主要な代謝物には、CYP2C19 に対する中程度の阻害がみられた。
- 8) <sup>14</sup>C-ボルテゾミブをラット及びサルに単回静脈内投与したとき、薬物に由来する放射能は、主に胆汁を經由して糞中に排泄されることが考えられた。一方で、多くの放射能が、カーカス中に残存した。
- 9) 胆管カニュレーションを施したラット及びサルに本薬を投与したとき、糞中に放射能が排泄されたことから、本薬あるいは代謝物の一部は、消化管から分泌されているものと考えられた。
- 10) 本薬は排出トランスポーターである P-gp 及び MRP2 の基質ではないことが示唆された。また、本薬はビンブラスチンの P-gp による輸送を  $K_i=13 \mu\text{mol/L}$  で阻害した。
- 11) ラット、ウサギ及びサルに本薬を静脈内投与したとき、用量依存的なプロテアソーム活性の阻害がみられた。サルにおいて、その作用強度は本薬の血漿中濃度推移とほぼ平行していた。

#### 非臨床毒性試験の結果：

- 1) ラット及びサルに単回静脈内投与を実施したところ、概略の致死量はともに 0.30 mg/kg であった。主な所見として、ラットに消瘦、排糞減少、被毛の黄色化及び耳の蒼白化が、サルでは死亡前に活動性の低下が認められた。
- 2) ラット及びサルに週 2 回の間欠投与により反復静脈内投与を実施したところ、ラットでの主な標的器官は、消化管、造血器系及びリンパ系であり、サルではこれらの器官に加え、末梢神経系及び腎臓であった。
- 3) 反復投与試験で見られた所見は、休薬により回復あるいは回復傾向を示した。
- 4) 生殖発生毒性試験として、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験を実施したところ、ウサギの高用量で母動物毒性並びに胚・胎児致死作用又は発育遅延が認められたが、催奇形性はラット及びウサギともに認められなかった。
- 5) 染色体異常試験において、最低用量以上で構造的な染色体異常を誘発したが、染色体異常を誘発した濃度は臨床での MTD で達成される血漿中濃度を上回る高濃度であった。
- 6) 本薬に免疫毒性は認められなかった。
- 7) サルにおいて、末梢神経系の軸索変性を特徴とする末梢性ニューロパシーが認められたが、回復傾向が示された。
- 8) 本薬の作用機序から、中枢神経系における神経変性性疾患への影響が懸念されたが、中枢

神経系への分布も認められず、中枢神経系の変性性病変は認められなかった。

#### 2.4.5.2 臨床における投与レジメンの理論的根拠

大多数の癌化学療法剤は、最大耐量及び経験に基づき、作用強度を最大化すると想定されるレジメンに従って投与されている。本薬は新規的作用機序を有するため、従来の最大耐量に基づく設定が適切か否かを検討するため、種々の投与レジメンを試行した。本薬を *in vivo* マウス腫瘍モデルに投与し、最大耐量を超えるまでは用量を増量するにつれて抗腫瘍作用がより強くなること、最大耐量を超えると本薬に関連した毒性が急激に増悪し、動物の一般状態を悪化させ、ひいては生存を脅かすことが示された。これらの知見から、本薬の臨床使用においては最大耐量を投与することとした。また、全身循環中の本薬が血中から消失しても、プロテアソーム阻害は持続したため、プロテアソーム阻害を薬力学的な指標として用い、投与間隔を設定した。サルに本薬 0.045 ~ 0.100 mg/kg を週 2 回、4 週間静脈内投与したとき、プロテアソーム活性は、投与後 72 ~ 96 時間までに対照群と同程度まで回復した。したがって、投与レジメンを週 2 回にすることによってプロテアソーム活性は各投与の間にベースラインに復帰し、細胞のプロテアソーム機能の一部が回復するとともに、毒性の部分的回復も得られるため、最大耐量の投与が可能となる。

投与レジメンが本薬の忍容性に及ぼす影響を検討するため、本薬を 1 日 1 回、2 日に 1 回、週 2 回（少なくとも 72 時間間隔）及び週 1 回静脈内投与して比較するラットにおける予備試験を実施した。その結果、本薬を週 2 回で 7 ~ 14 日間投与する方が、1 日 1 回あるいは 2 日に 1 回投与する場合より忍容性が高かった。

ラットにおける 2 週間反復投与毒性試験では、週 2 回の投与による最大耐量は 0.25mg/kg/回 (1.50 mg/m<sup>2</sup>/回)であった。胚・胎児発生毒性の用量設定試験で妊娠ラットに 1 日 1 回、妊娠 6 日から 17 日に静脈内投与したところ、最大耐量は 0.05 mg/kg/d (0.3 mg/m<sup>2</sup>/回)であった。したがって、ラットでの週 2 回投与による最大耐量は、同様の試験期間で 1 日 1 回投与に比較して 5 倍高かった。これらの知見から、週 2 回投与の方が 1 日 1 回連日投与より全体としての用量を高く設定できることが示された。

これらの毒性試験成績、本薬の薬力学試験成績及び異種移植の薬理試験成績を併せて考えると、本薬の週 2 回投与がヒトにおいても適切な投与方法であることが示唆された。更に本薬の外国第 I 相試験では、週 2 回で 2 週間投与後 10 日間休薬するサイクルのレジメン（98-104A 試験）の方が、週 2 回で 4 週間投与後 2 週間休薬するサイクルのレジメン（LCCC9834/MSKCC00-31 試験）よりも、投与休止や投与中止の割合を考慮した場合、全体的な忍容性を向上できる成績が得られた。

#### 2.4.5.3 製品の添付文書に反映させる非臨床の問題点

慢性的に適用する医薬品で通常実施される試験のうち、受胎能、妊娠前及び授乳期並びに胎盤及び乳汁への移行性など生殖発生毒性を評価する試験、及びがん原性試験については実施しなかった。本薬の特性及び臨床適用を考慮すると、これらを除外しても評価上支障はないと考えるが、生殖発生毒性に関しては製品の添付文書に当該情報がない旨を記載している。

薬物相互作用に関しては、*in vitro* 薬物代謝試験が実施されており、その成績では本薬及び主要な代謝物には、CYP2C19 に対する中程度の阻害がみられたが、他の CYP 分子種に対する阻害は弱いことから、概ね薬物相互作用の可能性は低いと予想されている。しかし、一部の試験結果からは、プロテアソーム阻害に基づく CYP3A4 含量の減少によって、CYP3A4 活性を低下させることが示唆されているので、CYP3A4 単独で代謝される薬剤と薬物相互作用を生じる可能性もある。この作用については臨床試験が現在実施中であるが、現在のところ確立したデータがないので、使用上の注意には、CYP3A4 の阻害剤又は誘導剤を併用している場合には、副作用又は効果の減弱について注意深く観察するよう添付文書中で注意喚起を行っている。

本薬が染色体異常誘発性を有することが *in vitro* 染色体異常試験で示されている。染色体異常の誘発は、本薬の薬理作用機序に基づく細胞周期停止作用によるアポトーシスの結果、発現したものと考えられる。細胞毒性型抗がん剤においては、遺伝毒性が陽性になる場合が多いものの、本剤の添付文書にはこの危険性について記載し、注意を喚起している。

受胎能の評価に関する試験は実施されていないが、ラットにおける 26 週間反復投与毒性試験では精巣及び卵巣に病理組織学的な病変がみられており、受胎能に対する影響が示唆された。また、ラット及びウサギの胚・胎児発生毒性試験において、催奇形性は認められなかったが、ウサギでは母体の最大耐量を超える投与量で着床後死亡率の増加及び生存胎児数の減少が認められた。なお、精巣及び卵巣への影響については添付文書に記載し、注意を喚起している。

本薬のサルにおける反復投与試験において、末梢神経障害が認められた。本障害は同様の副作用が臨床においても認められており、本薬との因果関係は明白であると思われる。添付文書では、臨床的な注意及び処置について詳細に記載したため、非臨床試験の成績については特に記載はしていない。

サル及びイヌを用いた心血管系に関する安全性薬理試験において、本薬の高用量投与により、低血圧、心拍数増加、心筋収縮力の減弱及び一般状態の著しい悪化が認められている。また、イヌでは QTc 間隔の延長もみられている。これらについては、使用上の注意に記載し、注意喚起を行っている。

## 2.4.6 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局審査管理課 平成 16 年 8 月 9 日 事務連絡「抗がん剤の臨床試験実施及び承認申請のために実施される毒性試験に関する Q & A について」
- 2) ██████████ Effect of bortezomib on the cytoskeleton, cytosolic protein turnover, and induction in neuronal cells *in vitro*. Millennium Pharmaceuticals Inc. Toxicology Study Report RPT-00307 2004 (社内資料)
- 3) Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2000; 75: 436-9.
- 4) Ding Q, Keller JN. Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 574-84.
- 5) Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 2001; 292: 1552-5.
- 6) Qiu JH, Asai A, Chi S, Saito N, Hamada H, Kirino T. Proteasome inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 2000; 20:259-65.
- 7) Rockwell P, Yuan H, Magnusson R, Figueiredo-Pereira ME. Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates, and production of the prostaglandin PGE<sub>2</sub>. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374:325-33.
- 8) Keller JN, Markesbery WR. Proteasome inhibition results in increased poly-ADP-ribosylation: implications for neuron death. *J Neurosci Res* 2000; 61:436-42.
- 9) Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Tsuji S, Yabe I, Niino M, *et al.* Effect of geranylgeranylacetone on cellular damage induced by proteasome inhibition in cultured spinal neurons. *J Neurosci Res* 2002; 69:373-81.
- 10) Snider BJ, Tee LY, Canzoniero LMT, Babcock DJ, Choi DW. NMDA antagonists exacerbate neuronal death caused by proteasome inhibition in cultured cortical and striatal neurons. *Eur J Neurosci* 2002; 15:419-28.
- 11) Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. p53-Dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem* 1997; 272:12893-6.
- 12) Canu N, Barbato C, Ciotti MT, Serafino A, Dus L, Calissano P. Proteasome involvement and accumulation of ubiquitinated proteins in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci* 2000; 20:589-99.