

ドキシル注 20mg

## 第 2 部 CTD の概要

### 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

- 緒言 -

ヤンセン ファーマ株式会社



## 2.6.1 緒言

JNS002（一般名：塩酸ドキソルビン<sup>#</sup> リポソーム注射剤；以下，本剤）は，水素添加大豆リン脂質（以下，HSPC），コレステロール及び *N*-(Carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine sodium salt (Sodium MPEG-2000-Carbonyl-DSPE，以下 MPEG-DSPE)（図 2.6.1-1）を■として構成した STEALTH<sup>®</sup>リポソームにドキソルビンを封入した静脈内投与製剤（図 2.6.1-2）である。通常のリポソームは網内系細胞に異物として認識され貪食されやすいが，STEALTH<sup>®</sup>リポソームはその膜表面を被覆している MPEG-DSPE 由来の Methoxypolyethylene Glycol（以下，MPEG）により，異物として認識されにくいので貪食細胞によるリポソームの取り込みが抑制され，血流中に留まり全身に循環する時間が延長される。STEALTH<sup>®</sup>リポソームの平均粒子径は 150 nm 以下であり，透過性が異常に亢進した腫瘍内の毛細血管系を通じ，腫瘍組織の間質に選択的に滲出する<sup>1)</sup>。腫瘍部位に蓄積した後，リポソーム膜が徐々に分解され，腫瘍組織にドキソルビンが放出されるものと考えられる。本剤はこのような機序により腫瘍部位への選択性を示すため，リポソームで封入されていない塩酸ドキソルビン製剤に比較し，強い抗腫瘍効果を示すものと考えられている。更に，本剤において血流中の遊離型ドキソルビン濃度が抑えられるため，骨髄抑制，心毒性等の有害反応が塩酸ドキソルビンに比較して低減していると考えられている。

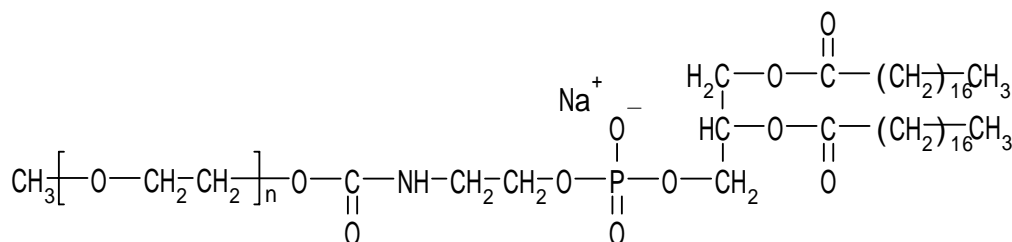
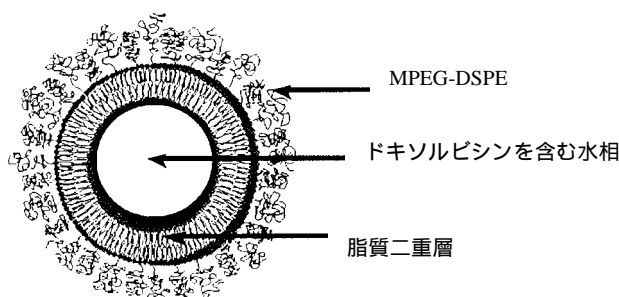


図 2.6.1-1 MPEG-DSPE の構造式

図 2.6.1-2 本剤(JNS002)の STEALTH<sup>®</sup>リポソームの構造

悪性新生物による死亡の中，卵巣癌の割合は3.45%であるが，国内における卵巣癌患者数は年々増加傾向にあり，罹患数は1992年の5,406人に対し，2020年には推定で8,922人に達すると報告されている。卵巣癌は，FIGO<sup>\*</sup>による分類の 期といった早期の段階で診断できれば，手術療法単独又は手術療法と白金製剤を中心とする術後化学療法との組合せによる集学的な治療により，その5年生存率は89.3%と良好な治療成績が得られている。しかしながら，早期の段階で発見するための十分なスクリーニング検査が確立しておらず，また，早期の段階では自覚症状に乏しいため，約半数が 期， 期といった進行した状態で癌が発見されることが多い。そのような場合，手術適応があれば可能な限り切除したうえで全身化学療法の対象となる。しかし，上皮性卵巣癌

<sup>#</sup> 第15改正日本薬局方ではドキソルビン塩酸塩

<sup>\*</sup> 国際産科婦人科連合: International Federation of Gynecology and Obstetrics

は再発・再燃を繰り返しやすいため、5年生存率が 期で23.8%， 期で11.6%と、非常に予後不良の癌であり、更なる化学療法の改良が必要と考えられている<sup>2)</sup>。

本剤は白金製剤及びパクリタキセルに難治性の上皮性卵巣癌に有効性が示されたことから、米国では優先審査品目として、第 相試験（30-06/30-13 試験）、第 相試験（30-22 試験）、及び第 相試験（30-47 試験及び 30-47E 試験）の結果に基づき、1999 年 6 月に「パクリタキセル及び白金製剤を基本とする化学療法に難治性の転移性卵巣癌」の適応で承認（accelerated approval）された。更に、第 相試験（30-22 試験、30-47 試験及び 30-47E 試験）、第 相試験（30-49 試験及び 30-57 試験）の結果に基づき、米国では、医薬品承認事項変更申請（accelerated approval から full approval への変更）が行われ、2005 年 1 月に「白金製剤を基本とする化学療法後に進行したか、あるいは再発した卵巣癌」の適応が取得されている。EU 諸国においては 2000 年 10 月に「白金製剤を基本とする 1 次化学療法に無効となった進行卵巣癌」の適応が取得されている。本剤は 2006 年 9 月 18 日現在、世界 75 カ国で承認されている。

国内においては、エイズ関連カポジ肉腫に対する承認を取得しているが、婦人科領域において白金製剤を含む化学療法の治療歴を有する Müllerian carcinoma（上皮性卵巣癌、原発性卵管癌、腹膜癌）患者を対象として、本剤 50 mg/m<sup>2</sup> を 4 週間隔にて静脈内投与した際の有効性（奏効率等）及び安全性を検討する試験を実施した。その結果、本剤は Müllerian carcinoma に対しても有効な薬剤であると判断し、効能・効果（案）及び用法・用量（案）を以下のとおり設定し承認事項の一部変更承認申請することとした。

#### 【効能・効果（案）】

再発卵巣癌（ミューラー管を発生起源とした卵管癌、腹膜癌を含む）

#### 【用法・用量（案）】

再発卵巣癌

ドキソルビシン塩酸塩として 1 日 1 回 50 mg/m<sup>2</sup> を 1 mg/分の速度で静脈内投与し、その後 4 週間休薬する。これを 1 コースとして投与を繰り返す。

なお、年齢、症状により適宜減量する。

#### 参考文献

- 1) Gabizon AA. Stealth liposomes and tumor targeting: One step further in the quest for the magic bullet. Clin Cancer Res. 2001;7: 223-5.
- 2) Averette HE, Hoskins W, Nguyen HN, Boike G, Flessa HC, Chmiel JS, et al. National survey of ovarian carcinoma. A patient care evaluation study of the American College of Surgeons. Cancer. 1993;71:1629-38.

ドキシル注 20mg

CTD 第2部 資料概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

－薬理－

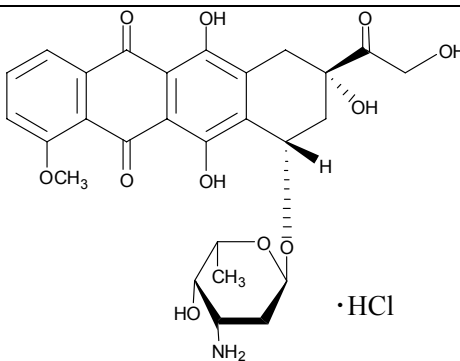
ヤンセン ファーマ株式会社



## 目次

2.6.2	薬理試験の概要文.....	5
2.6.2.1	まとめ.....	5
2.6.2.2	効力を裏付ける試験.....	6
2.6.2.3	副次的薬理試験.....	14
2.6.2.4	安全性薬理試験.....	15
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	20
2.6.2.6	考察及び結論.....	22
2.6.2.7	図表.....	25
2.6.2.8	参考文献.....	26
2.6.3	薬理試験概要表.....	1

## 略号一覧表

略号又は略称	化学名又は一般名	構造式	由来
塩酸ドキソルビン <sup>a</sup>	(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-4-( 3-Amino-2,3,6-trideoxy- $\alpha$ -L- <i>xyo</i> -hexopyranosyloxy)-2,5,12-trihydroxy-2-hydroxyacetyl-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydrotetracene-6,11-dione monohydrochloride 分子式： C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>11</sub> ・HCl=579.98		主薬

a：第 14 改正日本薬局方では塩酸ドキソルビン、第 15 改正日本薬局方ではドキソルビン塩酸塩

略号又は略称	名称及び内容
A2780	ヒト卵巣癌細胞株
A2780/AD	A2780 由来アドリアマイシン（ドキソルビン）耐性ヒト卵巣癌細胞株
A2780/CDDP	A2780 由来シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株
AUC (0→t)	0 時点から t 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
C26	マウス結腸癌細胞株
CR	完全退縮（Complete remissions）
HEY	ヒト卵巣癌細胞株
HSPC	水素添加大豆ホスファチジルコリン
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令 (good laboratories practice)
JNS002	塩酸ドキソルビン リポソーム注射剤
MPEG-DSPE	<i>N</i> -(Carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine sodium salt (Sodium MPEG-2000-Carbonyl-DSPE)
PC-3	ヒト前立腺癌細胞株
SD	Sprague-Dawley
SLD	STEALTH <sup>®</sup> Liposomal Doxorubicin
SPL	STEALTH <sup>®</sup> プラセボリポソーム (STEALTH <sup>®</sup> placebo liposomes)



## 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.1 まとめ

本剤(JNS002, DOXIL<sup>®</sup>, CAELYX<sup>®</sup>)は水素添加大豆ホスファチジルコリン(HSPC), コレステロール及び *N*-(Carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine sodium salt (Sodium MPEG-2000-Carbonyl-DSPE, MPEG-DSPE) を<sup>■</sup>として構成された脂質二重層 (リポソーム) にドキソルビシンを封入し, ドキソルビシンの体内動態を変化させることにより従来の塩酸ドキソルビシン製剤に比較して抗腫瘍効果の増強及び毒性の軽減を図った製剤である。従って, 抗腫瘍効果の本体はドキソルビシンによるものである。塩酸ドキソルビシンは国内では 1975 年に販売が開始され, 現在では悪性リンパ腫, 肺癌, 胃癌, 胆のう・胆管癌, 膵臓癌, 肝癌, 結腸癌, 直腸癌, 乳癌, 膀胱腫瘍, 骨肉腫, 子宮体癌, 悪性骨・軟部腫瘍, 悪性骨腫瘍, 多発性骨髄腫, 小児悪性固形腫瘍など広い適応を有している<sup>1)</sup>。

また, 本剤の開発初期の製剤として, <sup>■</sup>である硫酸アンモニウム濃度が <sup>■</sup> mg/mL の Doxil-1 が使用された。開発途中で硫酸アンモニウム濃度を 2 mg/mL とし塩酸ドキソルビシンの<sup>■</sup>を上げ, <sup>■</sup>として<sup>■</sup>を使用している Doxil-2 に処方を変更した。非臨床試験においては, 主にこれらの開発初期の製剤である Doxil-1 及び Doxil-2 を用いて検討を行い, 更に, <sup>■</sup>として L-ヒスチジンを用最適な配合である本剤 (JNS002) を臨床開発製剤とした。これら Doxil-1, Doxil-2 及び JNS002 の組成比較を表 2.6.2-1 に示す。安全性薬理試験に用いた STEALTH<sup>®</sup> プラセボリポソーム (SPL) はドキソルビシンを含有しないことを除いて, JNS002 と同一の処方である。

表 2.6.2-1 Doxil-1, Doxil-2 及び JNS002 の組成比較 (mg/mL)

成分	Doxil-1	Doxil-2	本剤 (JNS002)
塩酸ドキソルビシン	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	2.00
MPEG-DSPE	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	3.19
HSPC	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	9.58
コレステロール	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	3.19
硫酸アンモニウム	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	2
精製白糖	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	94
<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	NA
<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	NA
<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	NA
L-ヒスチジン	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	1.55
最終製剤の pH	<sup>■</sup>	<sup>■</sup>	6.5
ロット番号	E G H J I F	B	C A K
ロット番号 (SPL <sup>a</sup> )	NA	NA	M N L

NA : 使用せず

a : 塩酸ドキソルビシンを含まないことを除いて, 本剤と同一の処方

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

#### (1) 効力を裏付ける試験

本剤の抗腫瘍効果をマウス結腸癌細胞株 C26 の同系皮下移植モデルを用いて検討した。本剤は, 週 1 回 6 mg/kg を静脈内投与することにより有意な腫瘍増殖抑制作用及び生存期間の延長を示した。また, ヒト卵巣癌細胞株 HEY 及び A2780/AD (A2780 由来ドキソルビシン耐性株) の異種皮下移植モデルを用いて抗腫瘍効果を検討したところ, Doxil-2 又は本剤は有意に高い増殖抑制作

用を示し、塩酸ドキソルビンと比較しても有意な増殖抑制作用が認められた。更に、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を皮下移植したマウスを用い本剤の有効成分であるドキソルビシンの腫瘍への分布を共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて検討した。本剤投与群では、塩酸ドキソルビン投与群と比較して腫瘍内に長期間かつ高濃度にドキソルビン由来の蛍光が検出され、腫瘍への高い集積性が確認された。

## (2) 安全性薬理試験

本剤及び本剤の有効成分であるドキソルビンを含まないリポソーム (STEALTH® プラセボリポソーム (SPL)) の中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する作用をラット及びイヌを用いて検討した。中枢神経系及び呼吸系に対し本剤及び SPL は影響を示さなかった。一方、心血管系に対し、本剤及び SPL 投与群のすべての動物で、投与直後から収縮期及び拡張期血圧の低下が観察された。血圧の低下は投与終了時までにはブドウ糖注射液投与群の血圧と同程度に回復する可逆的な反応であった。また、心電図の波形に影響は認められず、ブドウ糖注射液投与群と比較して、PR 間隔、RR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc には有意な変化はみられなかった。本剤及び SPL の溶血性及び血液適合性を調べた結果、溶血性は認められず、血液に対しても適合であると判断された。

更に、SPL のみを用いて、反復投与における心血管系への影響及びヒスタミン拮抗薬の影響を調べた。SPL を 1 回目に投与した際の血圧低下よりも、2 回目の方が最低平均動脈圧、最低拡張期血圧及び最低収縮期血圧のいずれの低下も大きかった。ヒスタミン拮抗薬の前処理により、SPL による血圧低下は部分的に抑制された。

## (3) 薬力学的薬物相互作用試験

シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株 A2780/CDDP をヌードマウスの皮下に移植したモデルに対する本剤の抗腫瘍効果及び代謝拮抗剤であるゲムシタビンと併用した際の抗腫瘍効果を Gallo らの公表論文から引用した。本剤とゲムシタビンを併用することにより、それぞれの単剤よりも強い抗腫瘍効果が認められた。

### 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

#### (1) 抗腫瘍効果

##### 1) 本剤の頻回投与によるマウス結腸癌細胞株 C26 に対する抗腫瘍効果 (参考資料 4.2.1.1.1)

##### a) 耐用量の検討

本剤の C26 に対する抗腫瘍効果を検討するにあたり、腫瘍を移植していないマウスを用いて頻回投与に対する毒性の評価検討を行った。

##### [方法]

本剤 (Lot **A**) の 1.5, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 及び 15.0 mg/kg を週 1 回 (Day 0, 7 及び 14) 又は週 2 回 (Day 0, 3, 7, 10, 14 及び 17) 雌 Balb/c マウス (n=5) に静脈内投与した。マウスの体重を週 2 回計測し、生存期間を Day 120 まで観察した。

**\* 新薬承認情報提供時に置き換え**

##### [結果]

本剤の 12.0 及び 15.0 mg/kg を週 1 回投与した群において、図 2.6.2-1.A) に示すように有意な体重減少が認められたが、両群とも投与終了後に体重の回復傾向が認められた。週 1 回投与群ではいずれも死亡は認められなかった。一方、図 2.6.2-1.B) に示すように週 2 回投与により、9, 12 及び 15 mg/kg で有意な体重減少及び死亡が認められた。9, 12 及び 15 mg/kg 投与群の平均生存期間はそれぞれ 39, 37 及び 15 日であった。

以上の結果より、抗腫瘍試験として、1.5, 3.0 及び 6.0 mg/kg の投与量を用いて週 1 回及び 2 回投与の比較試験を実施することとした。

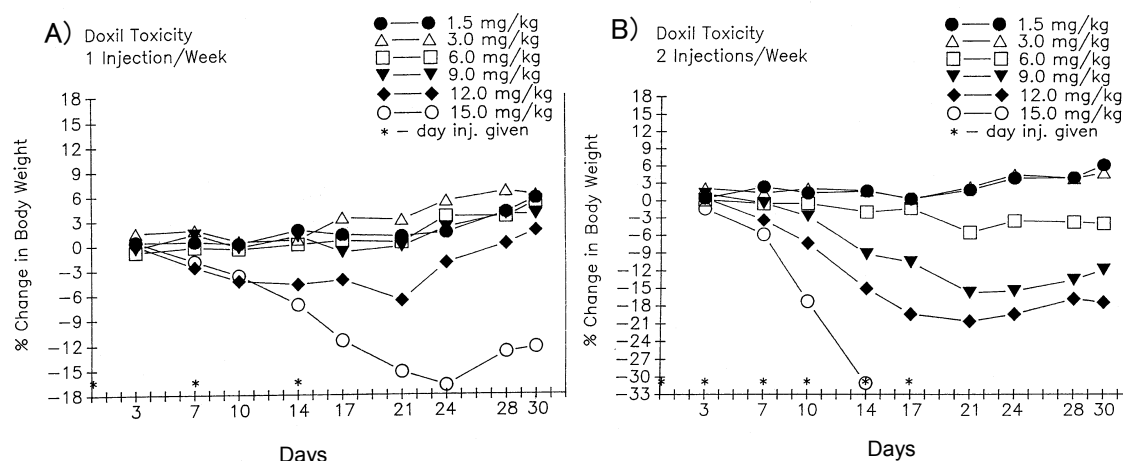


図 2.6.2-1 各用量の本剤を A) 週 1 回又は B) 2 回投与した際の Balb/c マウスの体重変動

#### b) C26 に対する抗腫瘍効果

上記の試験の結果に基づき、週 1 回又は週 2 回投与の異なるスケジュールにおける本剤の抗腫瘍効果を比較した。

##### [方法]

Balb/c マウスで移植継代された C26 の腫瘍組織より癌細胞を分離し、各群 8 匹として雌 Balb/c マウスの左側腹部皮下に  $1 \times 10^6$  個の C26 を移植した。移植日を Day 0 とし、週 1 回投与群には 3.0 又は 6.0 mg/kg の本剤 (Lot A) を Day 10, 17 及び 24 の計 3 回、また週 2 回投与群には、1.5 又は 3.0 mg/kg の本剤を Day 10, 13, 17, 20, 24 及び 27 の計 6 回、更に 6.0 mg/kg の週 2 回投与群では Day 10, 13 及び 17 の計 3 回、本剤を静脈内投与した。対照群には、生理食塩液を投与した。腫瘍の生着及び体積の計測は毎週 2 回実施した。腫瘍の体積は、直交する腫瘍径 a, b, c を測定し、その体積を  $0.5 \times a \times b \times c$  として算出した。いずれかの腫瘍径が 2 cm に達するまで腫瘍体積の測定を行った。マウスの生存期間は移植後 120 日まで観察した。腫瘍の大きさ及び平均生存日数の有意差は Student's t-test によって検定した。

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

##### [結果]

投与スケジュールによる抗腫瘍効果の違いを、本剤の総投与量が 18 mg/kg である 3 群間で比較した場合、6.0 mg/kg の本剤を週 1 回計 3 回投与した群において、最も顕著な腫瘍の増殖抑制作用 (図 2.6.2-2) 及び平均生存期間の延長作用 (表 2.6.2-2) が認められた。総投与量が同じ 18 mg/kg である 3.0 mg/kg を週 2 回計 6 回投与した群においては、対照群に比較して有意な平均生存期間の延長作用及び腫瘍の増殖抑制作用が認められたが、いずれの作用とも 6.0 mg/kg を週 1 回投与した群には及ばなかった。一方、6.0 mg/kg を週 2 回 Day 10, 13 及び 17 (計 3 回) に投与した群では総投与量が 18 mg/kg であるが、対照群と比較して腫瘍増殖抑制作用は認められたものの平均生存期間の延長作用は認められなかった。総投与量が 9 mg/kg である 3.0 mg/kg を週 1 回計 3 回投与した群及び 1.5 mg/kg を週 2 回計 6 回投与した群では対照群と比較して平均生存期間の延長作用は認められたが、腫瘍の増殖抑制作用は認められなかった。本モデルにおいて、本剤は週 1 回の投与によって高い抗腫瘍効果が得られることが示された。

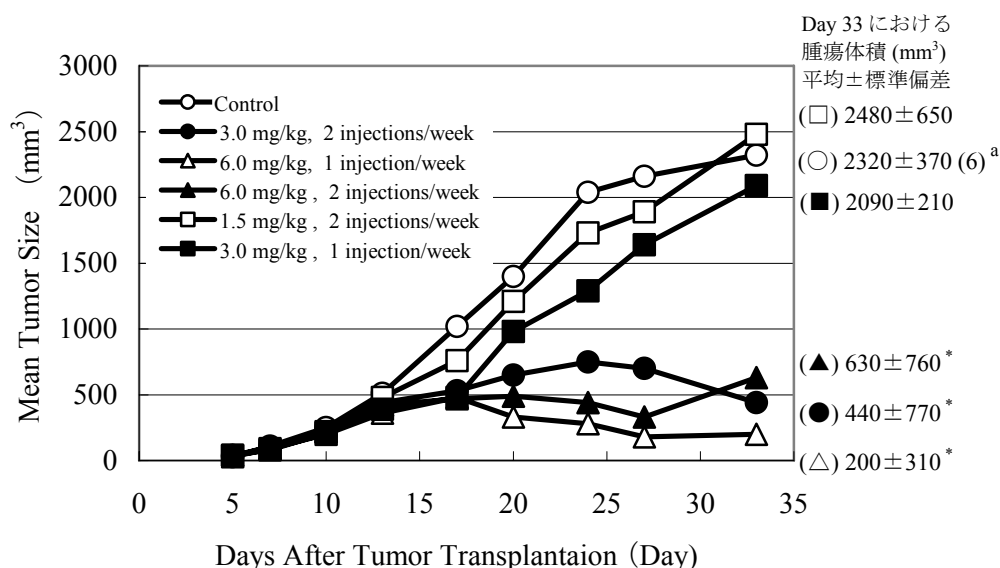


図 2.6.2-2 マウス結腸癌 C26 移植マウスに本剤を週 1 回又は週 2 回投与した際の腫瘍増殖曲線

a: 群の匹数, 但し括弧内にその群の匹数を示していないものは各群 8 匹

\* p<0.05 対照群(placebo)に対する有意差 (Student's t-test)

表 2.6.2-2 マウス結腸癌 C26 移植マウスに本剤を週 1 回又は週 2 回投与した際の平均生存期間

用量 (mg/kg)	投与回数/週	総投与量 (mg/kg)	平均生存期間 (日) 平均±標準誤差 (範囲)
0	—	0	40.5±5.3 (24-59)
1.5	2	9	54.6±1.3 (47-61)
3.0	1	9	50.1±1.9 (45-59)
3.0	2	18	56.1±1.6 (47-61)
6.0	1	18	74.3±8.8 (52-120)
6.0	2 <sup>a</sup>	18	41.5±13.8 (34-61)

各群 8 匹

a: Day 10, 13, 17 の計 3 回投与

## 2) ヒト卵巣癌細胞株 HEY 移植マウスにおける抗腫瘍効果 (参考資料 4.2.1.1.2)

ヒト卵巣癌細胞株 HEY を異種移植したマウスを用いて Doxil-2 及び塩酸ドキソルビシンの抗腫瘍効果を比較した。

### [方法]

Swiss nu/nu マウスに移植継代して維持された HEY の腫瘍組織を分離し、1 mm<sup>3</sup> の大きさに細切して Swiss nu/nu マウスの左右の臀部皮下に移植した。Doxil-2 (Lot B) 及び塩酸ドキソルビシンの 6.0 又は 9.0 mg/kg 及び対照として生理食塩水を腫瘍移植後 1, 8 及び 15 日目 (Day 1, Day 8 及び Day 15) に静脈内投与し、週 1 回腫瘍体積の計測及び腫瘍の生着を判定した。腫瘍の長径及び短径を計測し、その体積を  $0.4 \times \text{長径} \times (\text{短径})^2$  として算出し、Student's t-test によって有意差検定を行った。また、2×2 contingency test によって腫瘍の生着率の有意差検定を行った。P 値が 0.05 以下である場合に有意な差があったとした。

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

### [結果]

皮下移植した HEY に対する Doxil-2 及び塩酸ドキソルビシンの腫瘍増殖抑制効果を図 2.6.2-3 に示す。Doxil-2 の 6.0 mg/kg 及び 9.0 mg/kg は対照群と比較し、試験期間を通じて顕著な増殖抑

制効果を示した。一方、塩酸ドキソルビシンの 9.0 mg/kg は、Day 21 に対照群と比較し有意な増殖抑制効果を示したが ( $p<0.01$ )、Day 42 には有意差は認められなかった ( $p=0.2$ )。Doxil-2 の 9.0 mg/kg は塩酸ドキソルビシンの 9.0 mg/kg に対し Day 42 においても有意な増殖抑制効果を示した ( $p<0.001$ )。

表 2.6.2-3 に腫瘍の生着率を示す。塩酸ドキソルビン投与群においては、有意な腫瘍の生着抑制作用は認められなかったが、Doxil-2 の 6.0 mg/kg 及び 9.0 mg/kg において対照群に比較し Day 42 において有意な生着の阻害が認められた。投与期間を通じ、Doxil-2 投与群では平均 5% の体重減少が認められたが、投与終了後 5 週間で回復した。一方、塩酸ドキソルビン投与群では平均 11% の体重減少が認められ、Day 42 において 15% まで減少し、Day 70 においても体重の回復が認められなかった。

以上より、Doxil-2 は HEY に対し塩酸ドキソルビンよりも強い増殖抑制効果が認められた。

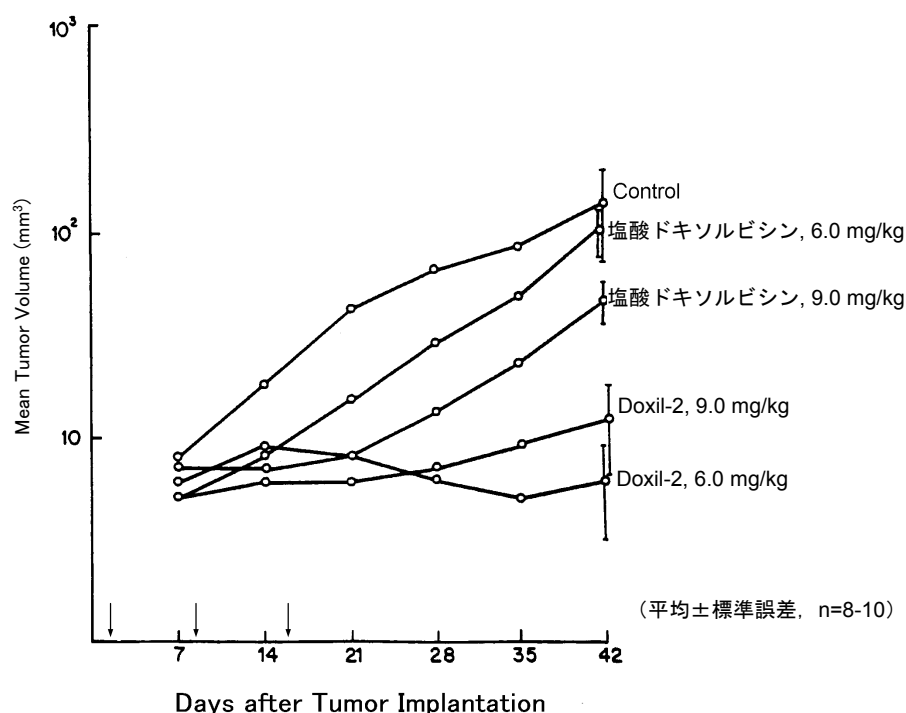


図 2.6.2-3 ヒト卵巣癌細胞株 HEY 皮下移植マウスの腫瘍増殖に対する Doxil-2 及び塩酸ドキソルビシンの作用

表 2.6.2-3 ヒト卵巣癌細胞株 HEY を皮下移植したマウスにおける腫瘍生着率に対する Doxil-2 及び塩酸ドキソルビシンの作用

処置	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35	Day 42
対照群	3/16	7/16	10/16	11/16	10/16	9/16
塩酸ドキソルビン 6.0 mg/kg	1/20	2/20	6/20	9/20	10/20	12/20
塩酸ドキソルビン 9.0 mg/kg	2/20	3/20	3/20	8/20	10/20	13/20
Doxil-2 6.0 mg/kg	2/18	4/18	4/18	4/18	4/18	3/18 <sup>a,b</sup>
Doxil-2 9.0 mg/kg	1/20	1/20	1/20	2/20	5/20	3/20 <sup>a,c</sup>

各群 n=8~10 匹、各マウスの左右の臀部に腫瘍を移植した。

a: 対照群に対して有意差 ( $p<0.05$ )

b: 塩酸ドキソルビン 6.0 mg/kg に対して有意差 ( $p<0.05$ )

c: 塩酸ドキソルビン 9.0 mg/kg に対して有意差 ( $p<0.005$ )

### 3) アドリアマイシン（ドキソルビシン）耐性ヒト卵巣癌細胞株 A2780/AD 移植マウスにおける抗腫瘍効果（評価資料 4.2.1.1.3）

ヒト卵巣癌細胞株 A2780/AD を皮下移植したマウスを用いて本剤及び塩酸ドキソルビシンの抗腫瘍効果を検討した。

#### 〔方法〕

A2780/AD の  $5 \times 10^6$  個を各ヌードマウス（雌，6~8 週齢）の腹部皮下に移植した。腫瘍体積が約  $120 \text{ mm}^3$  に達した時点で腫瘍の大きさに基づいて群分けし，被験物質である本剤 (Lot XXXXXXXXXX) 10 mg/kg 又は塩酸ドキソルビシン 2.5 mg/kg を Day 0 及び Day 7 に静脈内投与した。塩酸ドキソルビシンの投与量 (2.5 mg/kg) は，Minko らの報告<sup>2)</sup>において推定された最大耐用量 (MTD) に基づいている。これらは，薬剤投与終了後の 1 週間に体重の減少が認められない用量として設定した。本剤の投与量 (10 mg/kg) も同様に設定した。対照群には生理食塩液を投与した。腫瘍の長径，短径及び高さ並びにマウスの体重を毎週 2 又は 3 回計測した。腫瘍体積は  $0.5 \times \text{長径} \times \text{短径} \times \text{高さ}$  として算出し，腫瘍体積が  $2000 \text{ mm}^3$  に達するか又は Day 41 まで測定した。腫瘍体積の有意差検定は Tukey's multiple comparison post-test によって行った。

#### 〔結果〕

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

各群の腫瘍体積は，図 2.6.2-4 に示すように，対照群では Day 10 に  $2016 \pm 120 \text{ mm}^3$  に達し，塩酸ドキソルビシン投与群でも，Day 10 に  $912 \pm 53.7 \text{ mm}^3$ ，Day 14 に  $2121 \pm 137 \text{ mm}^3$  に達した。一方，本剤投与群においては，Day 10 に  $200 \pm 13.2 \text{ mm}^3$ ，Day 41 においても  $1103 \pm 66.3 \text{ mm}^3$  であり，腫瘍の増殖を遅延させた。Day 10 における塩酸ドキソルビシン及び本剤投与群の腫瘍体積は，対照群との間に有意な差 ( $p < 0.001$ ) がみとめられ，また本剤及び塩酸ドキソルビシン投与群との間にも有意な差 ( $p < 0.001$ ) が認められた。各群の体重変化を図 2.6.2-5 に示した。対照群は Day 10 までに腫瘍重量を含めて約 6% の体重の増加が認められたが，塩酸ドキソルビシン及び本剤投与群においては，試験開始時点から Day 10 までほとんど体重の変化は認められなかった。

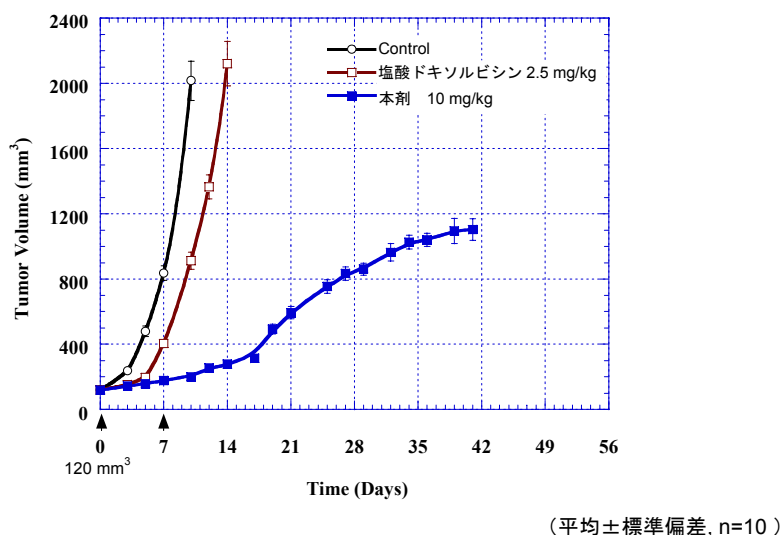
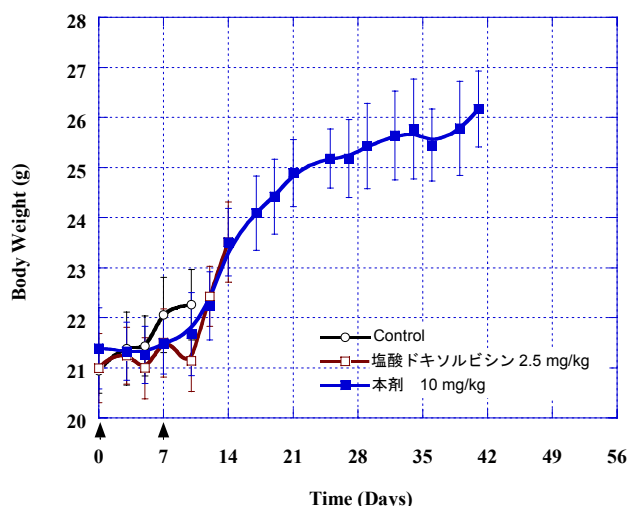


図 2.6.2-4 ヒト卵巣癌細胞株 A2780/AD 移植マウスの腫瘍増殖に対する本剤及び塩酸ドキソルビシンの作用





(平均±標準偏差, n=10)

図 2.6.2-5 ヒト卵巣癌細胞株 A2780/AD 移植マウスの体重に対する  
本剤及び塩酸ドキソルビン投与の影響

## (2) 腫瘍組織への分布及び抗腫瘍効果 (参考資料 4.2.1.1.4)

ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を移植したマウスを用いて Doxil-2 及び塩酸ドキソルビシンの抗腫瘍効果及びドキソルビシンの腫瘍組織への集積性を比較検討した。

### [方法]

Swiss nu/nu マウスに移植して継代維持した前立腺癌 PC-3 の腫瘍組織を分離し、1 mm<sup>3</sup> の大きさに細切し、Swiss nu/nu マウスの左右の臀部皮下に移植した。Doxil-2 (Lot B) 及び塩酸ドキソルビシンの 6.0 及び 9.0 mg/kg を、腫瘍移植後 1, 8, 15 及び 22 日目 (Day 1, 8, 15 及び 22) に静脈内投与した。対照群には生理食塩液を投与した。腫瘍体積の計測及び腫瘍の生着の判定を毎週 1 回行った。腫瘍の長径及び短径を測定し、その体積を  $0.4 \times \text{長径} \times (\text{短径})^2$  として算出し、Student's t-test によって有意差検定を行った。また、腫瘍の生着率は 2×2 contingency test によって有意差検定した。

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

移植後 30 日で腫瘍径が 9~10 mm になった無処置の担癌マウスに 9.0 mg/kg の Doxil-2 又は塩酸ドキソルビシンを静脈内投与し、1, 2, 6, 16, 24, 48, 72, 120, 168 及び 216 時間後に腫瘍を採取した。腫瘍を凍結切片としてからカルノア液で固定し、リン酸緩衝生理食塩液にて洗浄しグリセロールゼラチン液で封入した。ドキソルビシンの蛍光を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で測定し、蛍光画像を解析した。単位湿組織重量あたりのドキソルビン含有量を標準曲線より算出した。それぞれの組織でランダムに 10 ヶ所を解析し、各画像範囲の蛍光強度より含有量を求め、その組織間の有意差を Student's t-test により検定した。

### [結果]

PC-3 移植マウスの腫瘍増殖に対する Doxil-2 及び塩酸ドキソルビシンの効果を比較した独立した 2 回の試験の結果を図 2.6.2-6A) 及び B) に示す。いずれの試験においても、Doxil-2 は塩酸ドキソルビン投与群よりも強い増殖抑制効果を示した (9 mg/kg 投与の Day 29 において  $p=0.05$ )。また、試験 1 及び 2 の Day 29 における腫瘍体積を合算し、Doxil-2 投与群又は塩酸ドキソルビン投与群と対照群の腫瘍体積を比較すると、両剤とも腫瘍体積の増加の有意な抑制が認められた (それぞれ  $p<0.0003$  及び  $p<0.002$ )。また、表 2.6.2-4A) 及び B) に試験 1 及び 2 の腫瘍生着率を示す。試験 1 の Doxil-2 の 9 mg/kg 投与群において腫瘍生着の阻止が認められたが、塩酸ドキソルビン投与群ではその毒性のため、マウスが死亡し、長期の観察はできなかった。試験 2 においては、試験 1 よりも腫瘍の増殖が早く、Doxil-2 及び塩酸ドキソルビンによる腫瘍生着の阻止は認められなかったが、図 2.6.2-6 B) に示すように、明確な腫瘍増殖の抑制が観察された。

表 2.6.2-4 ヒト前立腺癌 PC-3 移植マウスにおける腫瘍生着率に対する  
Doxil-2 及び塩酸ドキソルビシンの作用

## A)試験 1

処置	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 36	Day 64
対照群	15/20	15/20	14/20	14/20	13/20	13/20
塩酸ドキソルビシン 9mg/kg	16/20	17/20	11/16	8/14		
Doxil-2 9mg/kg	15/20	16/20	13/20	11/20	10/20	4/18 <sup>a</sup>

各群 n=10 匹, 各マウスの左右の臀部にそれぞれ腫瘍を移植した。

a: 対照群に対して有意差 ( $p<0.05$ )

## B)試験 2

処置	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 36	Day 64
対照群	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	17/20
塩酸ドキソルビシン 6mg/kg	20/20	20/20	20/20	18/18	18/18	18/18
塩酸ドキソルビシン 9mg/kg	19/20	18/18	18/18	16/16	4/4	4/4
Doxil-2 6mg/kg	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	15/20
Doxil-2 9mg/kg	18/18	18/18	18/18	18/18	18/18	16/18

各群 n=9~10 匹, 各マウスの左右の臀部にそれぞれ腫瘍を移植した。

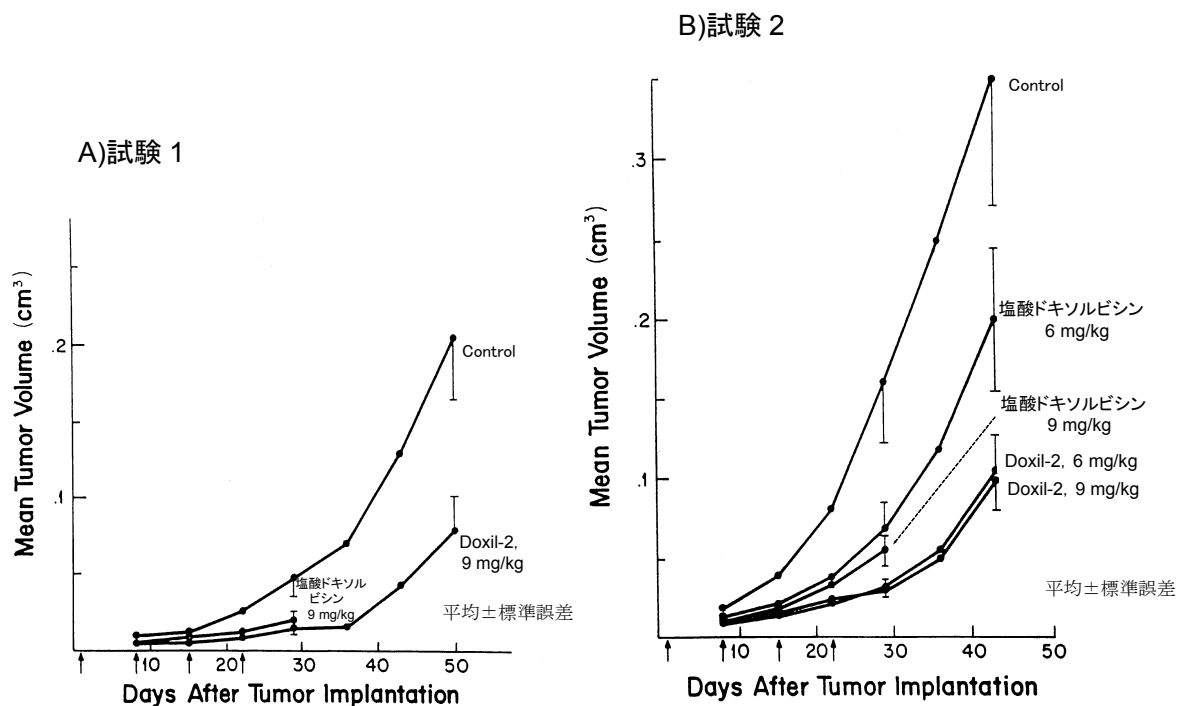


図 2.6.2-6 ヒト前立腺癌細胞 PC-3 移植マウスの腫瘍増殖に対する  
Doxil-2 及び塩酸ドキソルビシンの作用

試験 2 におけるマウスの体重の変動を図 2.6.2-7 に示す。Doxil-2 の体重減少は塩酸ドキソルビシンよりも少なく、特に、塩酸ドキソルビシンの 9 mg/kg 投与群においては、著しい体重の減少が認められ、最終投与後にも回復は認められなかった。一方、35 日目以降の体重減少は腫瘍の増殖による悪液質が関与していると考えられた。また、Doxil-2 の 9mg/kg 投与群では試験 1, 2 を合わせて、移植後 64 日までに 19 匹中 18 匹生存していたが、塩酸ドキソルビシン 9 mg/kg 投与群では 20 匹中 19 匹が死亡（瀕死状態で安楽死を含む）した。



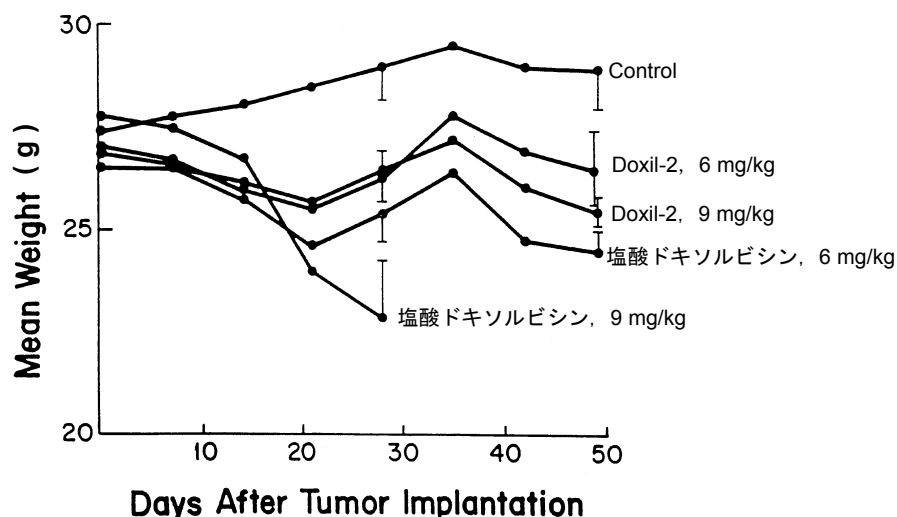


図 2.6.2-7 ヒト前立腺癌細胞 PC-3 移植マウスの体重に対する Doxil-2 及び塩酸ドキソルビシンの影響

図 2.6.2-8 に腫瘍の単位湿組織重量あたりのドキソルビシンの分布量の変化を示す。塩酸ドキソルビン投与では腫瘍内にドキソルビンが投与後 24 時間後まで検出されたのに対し、Doxil-2 投与では投与後 216 時間後まで検出された。また、それぞれの時間曲線下面積を算出すると Doxil-2 投与では  $919 \mu\text{g}\cdot\text{h/g}$  及び塩酸ドキソルビン投与では  $36.5 \mu\text{g}\cdot\text{h/g}$  であり、Doxil-2 の方が腫瘍部位における薬剤量が 25 倍高値であった。

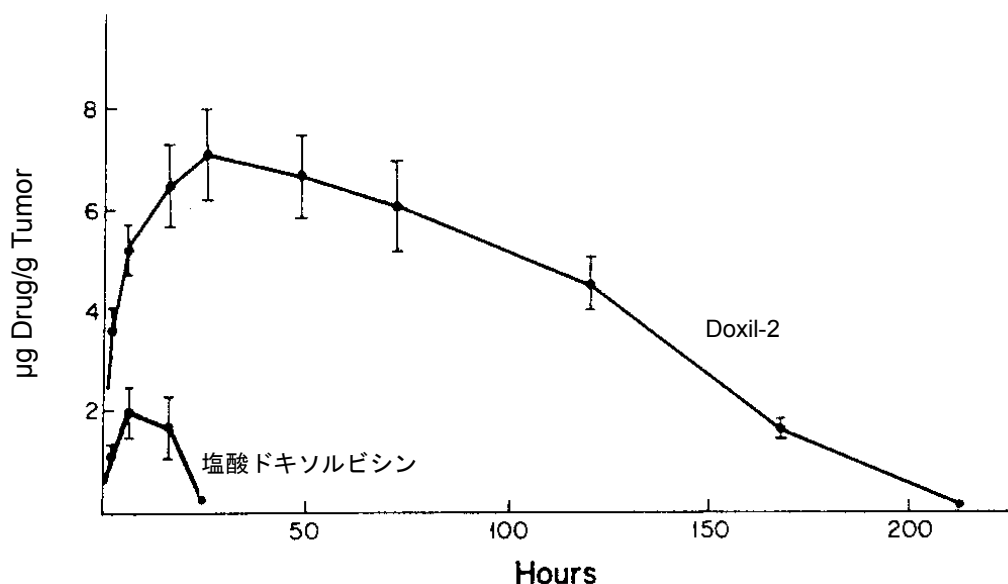


図 2.6.2-8 ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 移植マウスに Doxil-2 又は塩酸ドキソルビン 9.0 mg/kg を投与した際の腫瘍におけるドキソルビン量の変化

### (3) 他の癌種を移植したマウスでの Doxil-1 及び 2 の抗腫瘍効果 (参考資料 4.2.1.1.5-13)

上記で示した担癌マウスを用いた試験以外に表 2.6.2-5 に示す薬効薬理試験を、本剤の開発試験製剤である Doxil-2 及び Doxil-1 (表 2.6.2-1) を用いて実施した。これらの試験結果より、① Doxil-1 及び 2 は塩酸ドキソルビンよりも強い抗腫瘍効果を示す。②塩酸ドキソルビシンの封入率の高い Doxil-2 は Doxil-1 よりも強い抗腫瘍効果を示す。③ステルス化リポソームに封入され

たドキソルビンとはステルス化されていないリポソーム (Lip-Dox) に封入されたドキソルビンと比べて強い抗腫瘍効果を示す。ことが明らかとなった。

表 2.6.2-5 担癌マウスにおける Doxil-2 及び Doxil-1 の抗腫瘍効果

腫瘍 (移植部位)	動物種/ 系統/ 一群匹 数	投与量 (mg/kg)	投与 回数	薬剤 Lot	結果	参考 資料 番号
C26 結腸癌 (sc)	マウス Balb/c n=5	サイズの異なる Doxil 6	3	D	3 種類の大きさのリポソーム (96, 121 及び 158 nm) の抗腫瘍効果を比較したが、抗腫瘍効果に差はなかった。	4.2.1 .1.5
C26 結腸癌 (sc)	マウス Balb/c n=10	Doxil-1 及び Doxil-2 3, 6, 9 塩酸ドキソルビン 6	3	B (Doxil-2) E (Doxil-1)	Doxil-1 及び Doxil-2 は塩酸ドキソルビンより強い抗腫瘍効果を示した。	4.2.1 .1.6
MC2/2105 乳癌 (sc)	マウス C3H/He n=10	Doxil-1 及び Doxil-2 3, 6 塩酸ドキソルビン 6	4	B (Doxil-2) E (Doxil-1)	・ Doxil-1 及び Doxil-2 は塩酸ドキソルビンより強い抗腫瘍効果を示した。 ・ 6 mg/kg において Doxil-2 は Doxil-1 よりも強い抗腫瘍効果が認められた。	4.2.1 .1.7
Doxil-1						
C26 結腸癌 (sc)	マウス Balb/c n=10	Doxil-1 6, 9 塩酸ドキソルビン 6	3	F	・ Doxil-1 は塩酸ドキソルビンより有意に強い腫瘍増殖抑制効果を示した。 ・ Doxil-1 は 6 及び 9mg/kg で平均生存日数が 120 日以上であったが、塩酸ドキソルビンは 6mg/kg で 49 日であった。	4.2.1 .1.8
C26 結腸癌 (sc)	マウス Balb/c n=10	Doxil-1 3, 6, 9 塩酸ドキソルビン 6	3	G H I	Doxil-1 は 6mg/kg 以上で腫瘍の増殖を完全に抑制した。塩酸ドキソルビンでは有意な抑制効果が認められなかった。	4.2.1 .1.9
MC2/MC65 乳癌 (sc)	マウス C3H/He n=10	Doxil-1 6, 9 塩酸ドキソルビン 6, 9 Lip-Dox 6, 9	3 又は 4	J	・ Doxil-1 は性質の異なる 3 種類の腫瘍に対し、塩酸ドキソルビン及びステルスタイプではない塩酸ドキソルビン含有リポソーム(Lip-Dox)に比較して強い抗腫瘍効果を示した。 ・ Doxil-1 は増殖の早い腫瘍よりも遅い腫瘍により強い効果が認められた。	4.2.1 .1.10
MC19/MC 65 乳癌・転移 (sc)	マウス C3H/He n=10	Doxil-1 6, 9 塩酸ドキソルビン 6	4	J	・ Doxil-1 は自然転移及び転移が生着した腫瘍いずれに対しても塩酸ドキソルビンよりも強い抑制効果を示した。	4.2.1 .1.11
P388 リンパ性 白血病 (ip)	マウス CDF <sub>1</sub> n=6	Doxil-1 0.6, 1, 2, 4, 10, 15, 22, 30 塩酸ドキソルビン 0.6, 1, 2, 4, 10, 15, 22	1	J	・ Doxil-1 及び塩酸ドキソルビンはいずれも用量に依存して平均生存日数を延長した。 ・ Doxil-1 は 4 mg/kg 以上の用量において塩酸ドキソルビンよりも平均生存日数の延長が認められた。	4.2.1 .1.12
ヒト 肺がん 異種移植 (sc)	マウス C.B-17 scid/scid n=3-8	Doxil-1 0.5, 1, 2, 3, 6, 9 塩酸ドキソルビン 3, 6, 9 Lip-Dox 0.5, 1, 2	2 又は 10-16	E	・ Doxil-1 は 1 及び 2 mg/kg では腫瘍増殖の抑制が認められ、顕著な毒性は認められなかったが、3 mg/kg 以上の複数回投与により毒性が認められた。 ・ 塩酸ドキソルビンは腫瘍増殖の抑制作用を示したが、ステルスタイプではない含有リポソーム(Lip-Dox)は抗腫瘍作用を示さなかった。	4.2.1 .1.13

### 2.6.2.3 副次的薬理試験

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

該当する資料なし

#### 2.6.2.4 安全性薬理試験

##### (1) 本剤の安全性薬理試験

###### 1) 本剤の一般症状及び神経行動学的機能に及ぼす影響（評価資料 4.2.1.3.1）

本剤及び STEALTH<sup>®</sup> プラセボリポソーム（SPL）の神経行動学的機能に及ぼす影響をラットを用いて検討した。

###### [方法]

本剤 (Lot **K**) の 1, 3 及び 9 mg/kg を SD ラットに単回静脈内投与したときの一般症状及び神経行動学的機能を FOB 法<sup>3)</sup>の変法を用いて観察し、中枢神経系に対する作用について検討した。また、対照物質にはブドウ糖注射液及び SPL (Lot **L**) を被験物質と同様に静脈内投与した。

\* 新薬承認情報提供時に置き換

###### [結果]

ブドウ糖注射液及び SPL の投与は一般症状及び神経行動学的機能に影響を及ぼさなかった。また、本剤の 1, 3 及び 9 mg/kg の用量の投与も一般症状及び神経行動学的機能に影響を及ぼさなかった。なお、本剤の 9 mg/kg の投与では投与 0.25 及び 1 時間後に被験物質由来の色と思われる赤橙色の尿を認めたが、投与 3 時間後には消失した。

以上の結果より、本試験条件下では本剤は 9 mg/kg まで一般症状及び神経行動学的機能に作用を示さなかったことから、中枢神経系に影響を及ぼさないことが示唆された。

###### 2) 本剤の心血管系に及ぼす影響（評価資料 4.2.1.3.2, 及び 4.2.1.3.3）

本剤及び SPL の心血管系及び呼吸系に及ぼす影響をイヌで検討した。同時にドキソルビシンの全身曝露量も測定した。

###### [方法]

本剤 (Lot **K**) の 1 及び 3 mg/kg を覚醒下のイヌに 1 時間静脈内持続投与したときの心血管に対する作用をテレメトリーシステムにより検討した。対照物質にはブドウ糖注射液及び SPL (Lot **L**) を被験物質と同様の方法で、1 群あたり 4 匹の雄ビーグル犬に投与した。心血管系のパラメーターとして血圧、心拍数及び心電図に対する作用を検討し、そのときのドキソルビシンの全身曝露量との関連についても評価した。また、体温、運動量及び一般状態に対する作用も検討した。

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

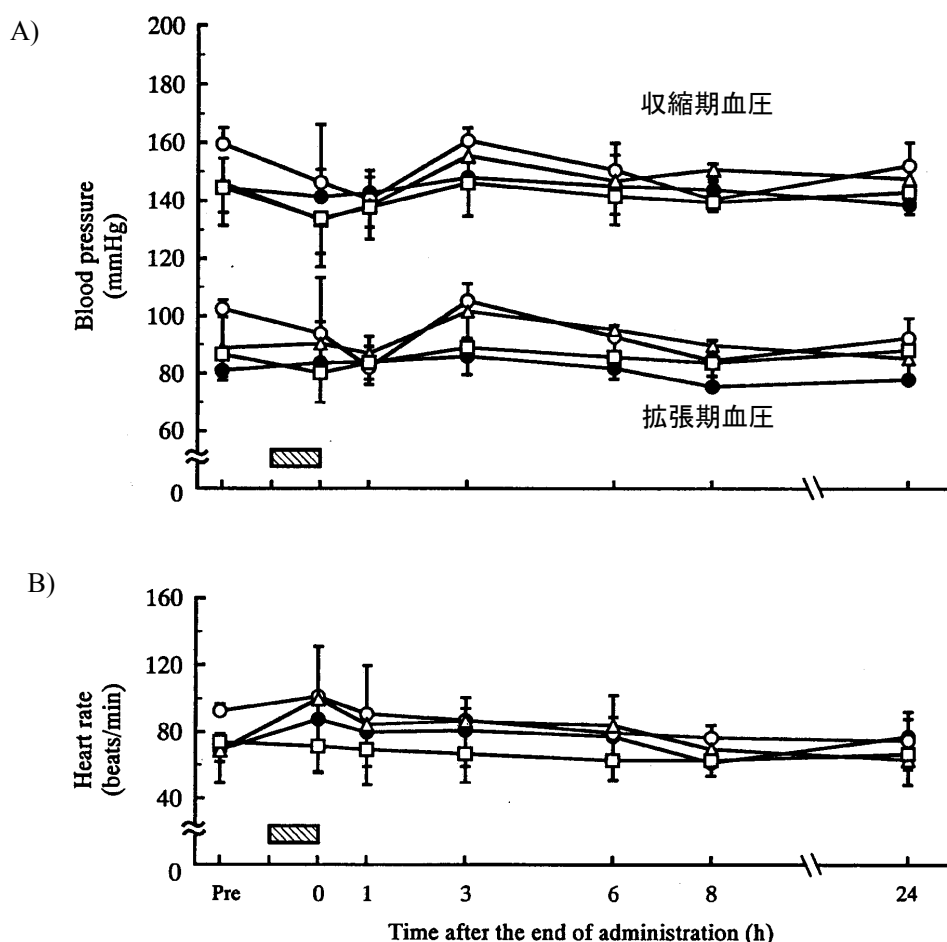
###### [結果]

###### a) 心血管系に対する作用

###### ① 血圧及び心拍数

本剤の 1 mg/kg 及び 3 mg/kg 並びに SPL 投与群において投与期間中にすべての試験動物で血圧の低下が観察された（図 2.6.2-9）。すなわち、ブドウ糖注射液投与群の収縮期及び拡張期血圧はそれぞれ  $130.8 \pm 7.8$  及び  $73.0 \pm 11.7$  mmHg であったのに対して、本剤の 1 及び 3 mg/kg 並びに SPL の投与開始後の収縮期血圧がそれぞれ  $79.8 \pm 20.7$ ,  $87.8 \pm 31.0$  及び  $98.8 \pm 29.2$  mmHg まで、拡張期血圧がそれぞれ  $61.3 \pm 19.4$ ,  $57.8 \pm 25.6$  及び  $68.5 \pm 15.4$  mmHg まで低下した。これらの血圧の低下は、投与終了時までにブドウ糖注射液投与群の血圧と同程度に回復する可逆的な反応であった。なお、投与終了後の観察において、本剤の 3 mg/kg 投与群の拡張期血圧が投与終了 8 時間後にブドウ糖注射液投与群と比較して有意な高値 (Dunnett's test,  $p < 0.05$ ) を示したが、収縮期血圧には有意な変化はみられなかった。拡張期血圧の有意な変化は、投与前値と同程度であることから偶発的な変化と考えられた。個別値として本剤の 3 mg/kg 投与群で、収縮期及び拡張期血圧の低下が 4 例中 1 例で投与終了直後及び 1 時間後にみられ、同一の個体において心拍数の増加が投

与終了直後, 1, 3 及び 6 時間後にみられた。しかし, 本剤の 1 及び 3 mg/kg, SPL 投与群間では, ブドウ糖注射液投与群と比較して心拍数に有意な変化はみられなかった。



平均±標準偏差 (n=4), pre: 薬剤投与開始 1 時間前, 0: 投与終了時, : 1 時間薬剤投与  
●: グルコース投与, ○: 本剤 1 mg/kg, △: 本剤 3 mg/kg, □: SPL

図 2.6.2-9 血圧 A)及び心拍数 B)に対する本剤及び SPL の作用

## ② 心電図

本剤の 1 及び 3 mg/kg, SPL 投与群はブドウ糖注射液投与群と比較して, PR 間隔, RR 間隔, QRS 時間, QT 間隔及び QTc に有意な変化はみられなかった。心電図の各解析ポイントにおいて波形に対し影響は認められなかった。

### b) 体温及び運動量に対する作用

本剤の 1 及び 3 mg/kg, SPL 投与群の体温の変動はブドウ糖注射液投与群と同程度に推移しており有意な変化はみられなかった。また, 運動量の変化についても, 本剤の 1, 3 mg/kg 及び SPL 投与では, ブドウ糖注射液投与群と同程度に推移しており影響は認められなかった。

### c) 一般状態に対する作用

本剤の 1 及び 3 mg/kg 投与群において, それぞれ 4 例中 1 例で投与開始直後に嘔吐が発現した。SPL 投与群においても, 4 例中 1 例で投与開始直後に嘔吐が発現した。しかし, いずれの群においても嘔吐以外には特記すべき変化は観察されなかった。

なお, 本剤 3 mg/kg 投与群において, 試験系から除外後 (投与終了 7~9 日後) すなわち観察終了日以降に全例において死亡が確認された。投与終了 3 日目から死亡に至るまでに, 嘔吐, 流

涎、吐血、便の異常（軟便、血便、肛門周囲の汚れ、粘液便、下血）、自発運動の減少、刺激に対する反応性低下、起立不能、体温低下、食欲低下及び廃絶、浅呼吸、口腔粘膜の蒼白化などの諸症状が観察された。また、本剤の1 mg/kg 投与群1例において、投与終了4～7日後に便の異常（軟便及び血便）が観察されたが、投与8日目以降には特記すべき症状は観察されなかった。これら観察終了後に認められた症状及び死亡はSPLに封入されているドキシソルビシンに知られている作用であり、これらの原因は心血管系の影響というよりは消化器系への作用が考えられる。

#### d) 血漿中薬物濃度測定

本剤の1及び3 mg/kg 投与群における投与終了1～24時間後における血漿中ドキシソルビシン濃度の平均値は、それぞれ10.8～18.9 µg/mL 及び34.7～54.2 µg/mL であり、時間の経過に伴いわずかに減少する傾向であった。T<sub>max</sub>の平均値は、それぞれ1.0及び2.8時間であり、投与量の増加に伴い、わずかに遅延する傾向であった。C<sub>max</sub>の平均値は、それぞれ18.9及び55.1 µg/mL であった。AUC<sub>0-25h</sub>の平均値は、1及び3 mg/kg の投与量で、それぞれ336.8及び1050.2 µg·h/mL であった。C<sub>max</sub>及びAUC<sub>0-25h</sub>の平均値は、いずれも用量比に応じて増加した。

### 3) 呼吸系に及ぼす影響（評価資料4.2.1.3.2）

CTD2.6.2.4,(1),2)の心血管系に対する本剤の作用を検討した試験において、同時に呼吸系に対する作用も検討した。

#### [方法]

本剤の1及び3 mg/kg を覚醒下のイヌに単回静脈内1時間持続投与し、呼吸系のパラメータとして呼吸数、動脈血pH、血液ガス分圧及びヘモグロビン酸素飽和度に対する作用を検討した。また、対照物質にはブドウ糖注射液及びSPLを被験物質と同様の方法で投与した。

#### [結果]

本剤の1及び3 mg/kg, SPL 投与では、ブドウ糖注射液投与群と比較して呼吸数、動脈血pH、動脈血酸素分圧、動脈血炭酸ガス分圧及びヘモグロビン酸素飽和度に有意な変化はみられなかった。

個別値として本剤の1 mg/kg 投与群で、4例中1例で動脈血酸素分圧の低値が投与終了1時間後にみられたが、用量に依存しない変化であること、あるいは他の呼吸系パラメータに影響が認められていないことから被験物質に関連した変化ではないと判断した。

以上の結果より、本剤は呼吸系に対する影響は認められなかった。

### 4) 溶血試験（評価資料4.2.1.3.4）

ヒト全血を用い、本剤及びSPLの溶血作用を評価した。

#### [方法]

ヒト全血に2 mg/mLの本剤(Lot **A**)又は本剤の2 mg/mLに相当する脂質で構成されるSPL(Lot **M**)を1:1の容量で混和し、37℃で40分間保温した後に、約17,000×gで5分間遠心して、上清の血漿中のヘモグロビン量を測定した。陰性対照としてヒト血漿を、陽性対照として脱イオン水を添加した。溶血は上清中のヘモグロビンが500 mg/dL以上になった場合に陽性と判定した。

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

#### [結果]

本剤及びSPLと同容量のヒト全血を混和しても溶血を起こさなかった（表2.6.2-6）。本剤を添加した全血由来のサンプルは対照と比べて高いヘモグロビン濃度を示したが、これはドキシソルビシン由来の赤色によりヘモグロビンの定量が妨害されたものと考えられた。

表 2.6.2-6 ヒト全血に同容量の各検体を加えたときの溶血反応

検体	ヘモグロビン濃度 (mg/dL)	結果
本剤	339	陰性
SPL	24	陰性
ヒト血漿	21	陰性
脱イオン水	4,872	陽性

#### 5) 沈殿・凝集に関する試験（評価資料 4.2.1.3.4）

ヒト血清及び血漿を用い、本剤及び SPL の血液適合性を調べた。

##### 〔方法〕

ヒト血清又は血漿に同容量の 2 mg/mL の本剤 (Lot **A**) 又は本剤の 2 mg/mL に相当する脂質で構成される SPL (Lot **M**) を添加して混和し、室温 (21.2℃) で 25 分間 放置した後、沈殿物又は凝集塊を肉眼及び顕微鏡にて調べた。明らかな沈殿物又は凝集塊が認められた場合に不適合と判定し、認められなければ適合と判定した。

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

##### 〔結果〕

本剤及び SPL は同容量の血漿又は血清を混和しても沈殿物及び凝集塊は認められず、適合であると判断された。

#### (2) SPL の安全性薬理試験

本剤は有効成分である塩酸ドキシソルビンと SPL より構成されているが、本剤を大量投与又は反復投与した際の、SPL の薬理的な影響を明らかにするために、ドキシソルビンを含む SPL を用いて以下の安全性薬理試験を実施した。

##### 1) SPL の中枢神経系に及ぼす影響（評価資料 4.2.1.3.5）

##### 〔方法〕

雄の SD ラット (150～250g, 6～8 週齢) を 1 群 10 匹とし、体重が均等になるように 4 群に分けた。生理食塩液、ドキシソルビンを含まない SPL (Lot **M**), 本剤の 2 mg/mL に相当するプラセボ STEALTH<sup>®</sup> リポソーム, 生理食塩液で 50% に希釈した SPL 及び生理食塩液で 10% に希釈した SPL の 15 mL/kg を約 1～2 mL/min の速度で単回静脈内投与した。この用量はこの大きさのラットが耐えうる最大用量であり、ドキシソルビンを含む Doxil-2 を用いて推定した本剤の最大耐用用量よりも多い量の脂質で構成されている。50% 及び 10% に希釈した SPL は用量反応性を検討するために設定した。これらの SPL を投与 5 分後より FOB, 運動性及び驚愕反応を観察し、神経行動学的機能に及ぼす影響を評価した。

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

##### 〔結果〕

各 SPL 投与群の外見、行動及び機能的統合性を検討した FOB による評価は対照群と同様であった。また、急速な SPL の投与による神経行動学的機能の変化も認められなかった。また、いずれの群においても試験期間中の死亡、毒性所見は認められなかった。

##### 2) SPL の心血管系に及ぼす影響（評価資料 4.2.1.3.6）

SPL が心血管系に及ぼす影響をイヌに反復静脈内投与して評価した。更に、本剤が示す血圧低下作用に対するヒスタミン H<sub>1</sub> 及び H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬による前処理の影響を調べた。

##### 〔方法〕

9 匹の雄ビーグル犬に薬物注入ポンプ及びテレメーターシステムを装着し、収縮期血圧、拡張期血圧、平均動脈圧、心拍数及び心電図を測定した。表 2.6.2-7 に示す群構成とスケジュールで被験物質の投与を行った。すなわち、Phase 1 (Day 1) にすべてのイヌに 1.0 mL/分の速度で生理食



塩液を静脈内投与し、投与手順と静脈内投与による影響を確認した。Phase 2 (Day 2)には本剤と同量の SPL (Lot **N**) 1 mL/kg (本剤の 2 mg/kg に相当するプラセボ STEALTH<sup>®</sup>リポソーム) を 1.0 mL/分 の速度で静脈内投与した。SPL による血圧低下作用は、先にプライミングすることで増強されるので (参考資料 4.2.1.3.7), Phase 2 (Day 2)では、すべてのイヌに 1 mL/分 の速度で静脈内投与しプライミングした。これら Phase 1 及び 2 はこの試験の主目的である Phase 3 及び 4 の前処理である。Phase 3 (Day 9)には、各群 3 匹として SPL を 0.25, 0.5, 1.0 mL/分 (それぞれ本剤の 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg に相当するプラセボ STEALTH<sup>®</sup>リポソーム) の速度で静脈内投与した。Phase 4 (Day 16)では、Phase 3 のときの第 1~3 群を第 4 及び 5 群に分けて SPL を 1 mL/分 の速度で静脈内投与した。第 5 群には SPL を投与する約 30 分前にジフェンヒドラミン塩酸塩 (4 mg/kg, H<sub>1</sub> 拮抗薬) 及びラニチジン塩酸塩 (2 mg/kg, H<sub>2</sub> 拮抗薬) を静脈内投与した。第 4 群には SPL を投与する約 30 分前に対照として生理食塩液を静脈内投与した。

\* 新薬承認情報提供時に置き換え

表 2.6.2-7 SPL の静脈内投与による心血管系に及ぼす影響の評価を実施した際の群構成と投与スケジュール

群番	一群の匹数	生理食塩液 (mL/kg) Phase 1 (Day 1)	SPL 投与速度 (mL/分)		
			Phase 2 (Day 2 <sup>a</sup> )	Phase 3 (Day 9 <sup>a</sup> )	Phase 4 (Day 16 <sup>a</sup> )
第 1	3	1	1.0	0.25	—
第 2	3	1	1.0	0.5	—
第 3	3	1	1.0	1.0	—
第 4 <sup>b</sup>	5	—	—	—	1.0
第 5 <sup>b</sup>	4	—	—	—	1.0

a: SPL を 1 mL/kg (本剤の 2 mg/kg に相当するプラセボ STEALTH<sup>®</sup>リポソーム) の用量で投与した。

b: 第 4 群には SPL を投与する前に 0.16 mL/kg の生理食塩液を投与した。第 5 群には SPL を投与する前に、ジフェンヒドラミン塩酸塩 (4 mg/kg) 及び ラニチジン塩酸塩 (2 mg/kg) を静脈内投与した。第 4 群は 1 群及び 2 群の各 2 匹並びに 3 群の 1 匹から構成し、第 5 群は 1 群及び 2 群の各 1 匹並びに 3 群の 2 匹より構成した。

#### [結果]

Phase 2 (Day 2)においては、SPL の 1 mL/kg を 1.0 mL/分 の速度で静脈内投与した。1 匹を除いて、投与開始後すぐに、血圧の低下が観察され、心拍数の増加も認められた (表 2.6.2-8)。しかしながら、血圧の最小と心拍数の最大となる時点は必ずしも一致しておらず、心拍数の増加は、SPL の投与が直接の原因ではないと思われる。

表 2.6.2-8 Phase 2 (Day 2) 及び Phase 3 (Day 9) における最低平均動脈圧、最低拡張期血圧及び最低収縮期血圧並びに心拍数の変化

測定項目	Phase 2 (Day 2) — 基準値 <sup>a</sup>	Phase 3 (Day 9) — Phase 2 (Day 2)
	平均 (S.E.)	平均 (S.E.)
最低平均動脈圧 (mmHg)	-51.38* (6.63)	-11.55* (5.97)
最低拡張期血圧 (mmHg)	-39.24* (5.31)	-8.60* (4.61)
最低収縮期血圧 (mmHg)	-77.58* (10.16)	-18.71* (8.98)
最大心拍数 (bpm)	56.12 <sup>#</sup> (7.64)	1.41 (9.77)

a: 各個体の基準値は、Phase 1 (Day 1) の生理食塩液投与から 16 時間までの平均値より求めた。

\* p<0.05 ; paired t-test で有意に 0 よりも低い。<sup>#</sup> p<0.05 ; paired t-test で有意に 0 よりも高い。

Phase 3 (Day 9)において投与速度を 0.25, 0.5, 1.0 mL/分として、各群 3 匹のイヌに SPL を投与した。この範囲では投与速度の違いによる血圧の低下に差は認められなかった (表 2.6.2-9)。Phase 2 (Day 2)と Phase 3 (Day 9)における血圧の変化には有意差が認められ、Phase 3 (Day 9)の低下の方が大きかったが、心拍数に差は認められなかった (表 2.6.2-8)。この結果はプライミングすることで増強されるという以前の結果と同様であった。また、Phase 2 (Day 2) 及び Phase 3 (Day 9)の最低血圧は SPL 投与開始後 45 分以内で観察されているが、心拍数の変化は最低血圧と

必ずしも同期して認められておらず、この反射性の頻脈は必ずしも SPL の投与による血圧の低下に関連するものではないと考えられる。SPL の投与による血圧の変化は SPL 投与後から 3～6 時間で基準値 (Phase 1 (Day 1)) において生理食塩液投与から 16 時間後までの平均値) まで回復した。

表 2.6.2-9 SPL を各速度で投与したときの最低平均動脈圧、最低拡張期血圧及び最低収縮期血圧並びに心拍数の Phase 1 (Day 1) からの変化: (Phase 3 (Day 9) – 基準値<sup>a</sup>)

測定項目	SPL 投与速度 (mL/分)		
	0.25	0.5	1.0
最低平均動脈圧 (mmHg)	-66.42	-55.50	-66.86
最低拡張期血圧 (mmHg)	-49.69	-41.23	-52.61
最低収縮期血圧 (mmHg)	-102.32	-87.45	-99.09
最大心拍数 (bpm)	67.97	55.81	48.80

a: 各個体の基準値は、Phase 1 (Day 1) の生理食塩液投与から 16 時間後までの平均値より求めた。

Phase 4 (Day 16) において、SPL 投与による血圧低下に対するヒスタミン拮抗薬 ジフェンヒドรามミン塩酸塩 (4 mg/kg, H<sub>1</sub> 拮抗薬) 及びラニチジン塩酸塩 (2 mg/kg, H<sub>2</sub> 拮抗薬) の前処理による影響を調べた (表 2.6.2-10)。ヒスタミン拮抗薬の前処理により最低平均動脈圧、最低拡張期血圧及び最低収縮期血圧の低下は生理食塩液前処理群よりも有意に小さく、また血圧低下の持続時間はヒスタミン拮抗薬の前処理により短縮する傾向が認められた。しかしながら、心拍数の増加に対しては有意な抑制は認められなかった。

表 2.6.2-10 SPL 投与による最低平均動脈圧、最低拡張期血圧及び最低収縮期血圧並びに心拍数の変化に対するヒスタミン拮抗薬前処理の影響: Phase 4 (Day 16)

測定項目	SPL 投与直後 2 時間	
	生理食塩液前処理	ヒスタミン拮抗薬前処理 <sup>a</sup>
	平均 (S.E.)	平均 (S.E.)
最低平均動脈圧 (mmHg)	-42.82 (9.45)	-18.43* (4.64)
最低拡張期血圧 (mmHg)	-31.51 (7.29)	-13.40* (3.81)
最低収縮期血圧 (mmHg)	-69.61 (13.4)	-33.89* (6.03)
最大心拍数 (bpm)	49.82 (8.51)	25.77 (10.7)

基準値は Phase 1 (Day 1) において生理食塩液投与後 16 時間までの平均値より求めた。

a: ジフェンヒドรามミン塩酸塩 (4 mg/kg) 及びラニチジン塩酸塩 (2 mg/kg) 投与

\*: 生理食塩液前処理に対する有意差,  $p < 0.05$  (2 標本 t-test 片側検定)

## 2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

### (1) ゲムシタビンとの併用 (参考資料 4.2.1.4.1)

シスプラチン耐性のヒト卵巣癌 (A2780/CDDP) に対する本剤の抗腫瘍効果及びゲムシタビンとの併用効果を、Gallo らの公表論文より引用した。

#### [方法]

ヒト卵巣癌細胞株 A2780 由来のシスプラチン耐性株 (A2780/CDDP) を 10  $\mu$ M のシスプラチン存在下で継代培養した。A2780/CDDP をヌードマウス (雌, 4 週齢) の右側腹部皮下に各  $8 \times 10^6$  個ずつ移植した。被験物質である本剤は、5% グルコース溶液で使用濃度に希釈して静脈内投与した。また、併用するゲムシタビンは生理食塩液に溶解及び希釈して腹腔内投与した。腫瘍重量が約 100 mg に達した時点 (腫瘍移植 4 日後) より、本剤を 7 日ごとに 3 回、ゲムシタビンは 3 又は 4 日ごとに 4 回投与した。腫瘍重量は長径及び短径を計測し、 $0.5 \times \text{長径} \times (\text{短径})^2$  として算出した。最大腫瘍重量抑制率 (TWI%) 及び Log<sub>10</sub> cell kill (LCK) は以下の式より算出し、抗腫瘍作用の指標とした。



$$TWI\% = 100 - t/c \times 100$$

t ; 被験薬投与群の腫瘍重量の中央値, c ; 対照群の腫瘍重量の中央値

$$LCK = (T - C) / (3.32 \times Td)$$

T ; 被験薬投与群の腫瘍重量の中央値が 1000 mg に達する日数

C ; 対照群の腫瘍重量の中央値が 1000 mg に達する日数

Td ; 腫瘍倍化時間

#### [結果]

本剤の 0.5, 1, 2, 5 mg/kg/day (総投与量 1.5, 3, 6, 15 mg/kg) を静脈内投与した群における抗腫瘍効果を表 2.6.2-11 に示す。TWI はそれぞれ 0, 25, 73, 98%, LCK は 0, 0.1, 0.5, 2.9 と用量に依存した抗腫瘍効果が認められた。特に, 5 mg/kg/day 投与群において 5 匹中 1 匹に腫瘍の完全退縮が認められた。この用量においても薬剤による体重の減少や死亡は認められなかった。一方ゲムシタビン 5, 10, 20 mg/kg/day (総投与量 20, 40, 80 mg/kg) を腹腔内投与した群における抗腫瘍効果を表 2.6.2-12 に示す。TWI はそれぞれ 91, 99, 100%, LCK は 1.2, 2.1, 3.0 と用量に依存した明確な抗腫瘍効果が認められた。

表 2.6.2-11 A2780/CDDP 移植マウスにおける本剤の抗腫瘍効果 (1 群 5 匹)

薬剤	用量 (mg/kg/day)	総投与量 (mg/kg)	TWI%	T-C <sup>b</sup> (日数)	LCK	CR <sup>c</sup>
本剤	0.5	1.5	0	0	0	0
本剤	1	3	25(20) <sup>a</sup>	1	0.1	0
本剤	2	6	73(18) <sup>a</sup>	5	0.5	0
本剤	5	15	98(20) <sup>a</sup>	34	2.9	1

a: 最大の腫瘍増殖抑制が認められた日

b: 16 日後に対照群の腫瘍重量の中央値が 1000mg に達した。

c: 移植 61 日後における腫瘍の有無を評価した。

表 2.6.2-12 A2780/CDDP 移植マウスにおけるゲムシタビンの抗腫瘍効果 (1 群 5 匹)

薬剤	用量 (mg/kg/day)	総投与量 (mg/kg)	TWI%	T-C <sup>b</sup> (日数)	LCK	CR <sup>c</sup>
ゲムシタビン	5	20	91(15) <sup>a</sup>	9	1.2	0
ゲムシタビン	10	40	99(18) <sup>a</sup>	16	2.1	0
ゲムシタビン	20	80	100(18) <sup>a</sup>	23	3.0	0

a: 最大の腫瘍増殖抑制が認められた日

b: 16 日後に対照群の腫瘍重量の中央値が 1000 mg に達した。

c: 移植 43 日後における腫瘍の有無を評価した。

本剤 5 mg/kg/day 及びゲムシタビン 20 mg/kg/day を併用した場合の抗腫瘍効果を表 2.6.2-13 に示す。本剤及びゲムシタビンの単剤投与は TWI が 96 及び 100% で腫瘍増殖の抑制作用が認められた。本剤とゲムシタビンを同時併用で投与を開始した群及びゲムシタビン投与した 24 時間後に本剤を投与する 2 種類のスケジュールで投与した。両併用群及びそれぞれの単剤投与群の腫瘍増殖曲線を Steel Dwass test により比較すると、いずれの併用群においても、単剤投与群に比較して有意な差が認められた (P<0.001)。更に、同時併用開始群で 10 匹中 7 匹、24 時間の間隔をあけた群で 10 匹中 9 匹の完全退縮が認められ、Fisher's exact test により単剤投与群に比較して有意な差が認められた。投与スケジュールを変えた両群の間には、腫瘍増殖抑制作用に有意な差は認められなかった。また、本剤及びゲムシタビンを併用することによる明確な毒性所見及び薬剤に関連した毒性によるマウスの死亡は認められなかった。

表 2.6.2-13 A2780/CDDP 移植マウスにおける本剤及びゲムシタビン  
併用の抗腫瘍効果 (1 群 10 匹)

薬剤	用量 (mg/kg/day)	総投与量 (mg/kg)	TWI%	T-C <sup>b</sup> (日数)	LCK	CR <sup>c</sup>
本剤	5	15	96(27) <sup>a</sup>	29	3.1	0
ゲムシタビン	20	80	100(18) <sup>a</sup>	20	2.1	1
ゲムシタビン +本剤	20+5	80+15	100(18) <sup>a</sup>	—	—	7*
ゲムシタビン +本剤 <sup>d)</sup>	20+5	80+15	100(25) <sup>a</sup>	—	—	9**

a: 最大の腫瘍増殖抑制が認められた日

b: 21 日後に対照群の腫瘍重量の中央値が 1000 mg に達した。

c: 移植 78 日後における腫瘍の有無を評価した。

d: ゲムシタビン投与 24 時間後に本剤を投与した。

\*: p<0.05, \*\*: p<0.005 単剤に対する統計学的有意水準 (Fisher's exact test)

## 2.6.2.6 考察及び結論

### (1) 効力を裏付ける試験

本剤の抗腫瘍作用の検討に先立ち、正常の Balb/c マウスを用いて、耐用量の検討を行った。その結果、週 1 回静脈内投与では 12 mg/kg 以上で、週 2 回では 9 mg/kg 以上で有意な体重減少が認められた。この結果に基づき、マウス結腸癌細胞株 C26 を皮下移植したマウスに 1.5~6.0 mg/kg の本剤を週 1 回又は 2 回投与し、腫瘍増殖抑制作用及び生存期間の延長作用を調べたところ、6.0 mg/kg を週 1 回 3 週間投与した群に最も顕著な抗腫瘍効果が認められた。マウスにおいては前回の投与の毒性から回復するために 1 週間という期間が必要であると思われ、週 1 回の投与スケジュールを設定した。

ヒト卵巣癌 HEY を皮下移植したヌードマウスに対し、Doxil-2 又は塩酸ドキソルビシンの 6 mg/kg 又は 9 mg/kg を週 1 回静脈内投与し、腫瘍生着率及び腫瘍増殖抑制作用を調べた。Doxil-2 の 6 mg/kg 及び 9 mg/kg は、塩酸ドキソルビシン 6 mg/kg 及び 9 mg/kg に対し、それぞれ有意な腫瘍生着阻害及び増殖抑制作用を示し、Doxil-2 の方が高い有効性を有することが示唆された。更に、ヒト卵巣癌細胞株 A2780 由来のドキソルビシン耐性株 A2780/AD を皮下移植したヌードマウスに対し、本剤は腫瘍増殖抑制作用を示した。A2780/AD は P 糖タンパクを発現しており、ドキソルビシンに対し耐性を示すが、本剤が有効性を示したことから、本剤が癌組織に集積し、長期にわたり癌組織に存在することにより、癌細胞のみならず癌組織内の間質の血管内皮細胞や線維芽細胞の増殖を抑制することにより、癌組織の構築を阻害していたと推測される。

その他の腫瘍に対する効果について、本剤の開発初期の製剤である Doxil-2 を用いてマウスの結腸癌由来 C26、マウス乳癌由来 MC2/2105 及びヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を移植したマウスを用いた抗腫瘍試験が、更に、Doxil-2 以前の開発の製剤である Doxil-1 を用い、マウス乳癌 MC2/MC65, MC19/MC65, マウスリンパ性白血病 P388, ヒト肺がん (臨床分離組織) を移植したマウスを用いた抗腫瘍試験を実施した (表 2.6.2-5)。また、前臨床の薬効薬理試験の公表論文としてマウスリンパ腫<sup>4)</sup>、マウス肺癌<sup>5)</sup>、ラットグリオーマ<sup>6)</sup>、ヒト乳癌<sup>7)</sup>、ヒト膵臓癌<sup>8)</sup>、ヒト結腸癌<sup>9)</sup>などに対する効果が報告されている。いずれの試験及び論文でも、リポソーム化した製剤は塩酸ドキソルビシンに比較して同等以上の抗腫瘍効果を示すことが報告されている。

### (2) 本剤の特徴と作用メカニズム

#### 1) ドキソルビシンの作用メカニズム

本剤は塩酸ドキソルビシンをメトキシポリエチレングリコール (MPEG) で表面を修飾したリポソームで封入し、ドキソルビシンの体内動態を変えることにより、従来のドキソルビシン製剤に比較して、強い抗腫瘍効果及び毒性の軽減を図った製剤である。従って、抗腫瘍効果の本体はドキソルビシンによるものである。ドキソルビシンの作用機序として、2 本鎖 DNA へのインター

カレーションによる DNA, RNA 及びタンパクの合成阻害<sup>10,11)</sup>, DNA トポイソメラーゼ II 反応の阻害による 2 本鎖 DNA の切断<sup>12,13)</sup>, 並びにアントラサイクリンによるフリーラジカルの発生による DNA の傷害などが報告されている<sup>14,15)</sup>。近年, ドキソルビンなどの DNA に障害を与える薬剤のアポトーシス誘導のメカニズムとして, DNA の傷害による ataxia telangiectasia, mutated (ATM: 毛細血管拡張性運動失調症原因遺伝子)<sup>16,17,18)</sup>, DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK)<sup>18,19)</sup> 及びプロテインキナーゼ C $\delta$ <sup>20)</sup> (PKC  $\delta$ ) などのタンパク質リン酸化酵素の活性化を介して p53 のリン酸化がおり, p53 の下流にある bcl-2-associated X protein (BAX), p53-regulated apoptosis-inducing protein 1 (p53AIP1), p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) などのアポトーシス関連遺伝子の発現を誘導する経路<sup>21)</sup>が注目されている。しかし, p53 を介さない経路も存在し<sup>22)</sup>, そのメカニズムは完全には解明されていない。

## 2) リポソーム化によるドキソルビシンの分布の違い及びそのメカニズム

ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を皮下移植したヌードマウスを用い, Doxil-2 及び塩酸ドキソルビシンの抗腫瘍作用を調べ, 両剤の有効成分であるドキソルビシンの腫瘍への集積性を比較した。Doxil-2 の 9 mg/kg は, 塩酸ドキソルビン 9 mg/kg と比較し有意な腫瘍生着阻害及び増殖抑制作用を示した。また, Doxil-2 の 9 mg/kg 投与群は移植後 64 日までに 19 匹中 18 匹生存していたが, 塩酸ドキソルビン 9 mg/kg 投与群では 20 匹中 19 匹が死亡したことからリポソームに封入することで塩酸ドキソルビシンの毒性は低下するものと考えられる。腫瘍内のドキソルビン含有量を共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて定量すると, Doxil-2 投与群では塩酸ドキソルビン投与群に比較して腫瘍内に長期に高濃度のドキソルビン由来の蛍光が認められたことから, リポソームに封入することにより有効成分であるドキソルビシンを腫瘍内へ集積させることが確認された。塩酸ドキソルビンに比べて, 長期に腫瘍組織がドキソルビンに曝露されることが抗腫瘍効果の向上に寄与しているものと推察される。

本剤はリポソームを MPEG によって被覆することで, 血清タンパク並びに血管内皮細胞及び血球などの細胞表面の分子との相互作用を減少させている。特に, 通常のリポソーム製剤では脾臓や肝臓に多く存在するマクロファージなどの細網内皮系の細胞により捕獲され投与後早期に血中から消失するが, ポリエチレングリコールや MPEG などで被覆されたリポソームはこれらの細網内皮系の細胞との相互作用を減弱させることにより, 血流循環時間が著しく延長している<sup>23)</sup>。静脈内投与 2~3 分後においてほぼ 100% のドキソルビンがリポソームに封入されたまま血流中に安定に存在し, 96 時間後においても血漿中にリポソームに封入された状態で認められることから, この STEALTH<sup>®</sup> リポソームを用いることで血中又は組織中で徐々にドキソルビンが放出されることが考えられる。(CTD2.6.4.9,(1))。

リポソーム製剤は腫瘍組織への集積が見られることを CTD2.6.4.4,(1),1) に示しているが, このメカニズムについては腫瘍組織の特徴に起因していると考えられている。すなわち, 固形腫瘍では組織の異常な増殖の結果, 血管新生が生じ, この新生血管の内皮細胞の間に比較的大きな間隙が生じ, 血管透過性の亢進が認められることがある。この血管内皮細胞の間隙の大きさは, 腫瘍タイプによって異なるが, 約 200~1,200 nm であると推定されている<sup>24)</sup>。本剤のリポソームは, これらの間隙を通して腫瘍間質へ到達する。更に, 腫瘍組織では漏出した物質を回収し, 循環させる機能をもつリンパ系が未発達のためリポソームは腫瘍組織から排出されず, 腫瘍部位に集積し投与後長時間に渡り腫瘍部位に滞留するものと考えられている<sup>25)</sup>。そのため, 本剤を投与した場合は, 塩酸ドキソルビシンを投与した場合よりも, 腫瘍細胞が長時間ドキソルビンに曝露されることとなり, 優れた抗腫瘍効果が発揮されるものと考えられている。

## 3) リポソームからの薬剤の放出

生体内における本剤からのドキソルビシンの実際の放出メカニズムについては明確になっていない。マクロファージなどの単核食食系細胞により捕獲される速度は通常のリポソーム製剤よりは遅いものの, 本剤も単核食食系細胞に捕獲され細胞中で崩壊して薬剤が放出されるものと考えられる。一方, 本剤と同様に PEG で被覆されたリポソームにおいて, ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> によって脂質膜のホスファチジルコリンが分解され, リポソームが崩壊することが報告されている<sup>26,27,28)</sup>。CTD2.6.4.3,(1),1),a),⑤に示すように, ホスファチジルコリンのホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 分解産物であるリソホスファチジルコリンを含有させたりポソームは生体内でドキソルビシンの保持能力が劣ることが示されている。これに基づき本剤のドキソルビシンの放出機序について

考察すると、腫瘍組織に集積した本剤は、炎症や癌組織などの局所に多く存在するホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 等の酵素により、リポソームを構成しているホスファチジルコリンなどの脂質が分解される。その結果、リポソーム膜が崩壊してドキソルビンが腫瘍組織の間質に放出される。放出されたドキソルビンは、通常の塩酸ドキソルビン製剤を投与した場合と同様の機序で、腫瘍細胞に取り込まれるという機構も存在すると推察される。

### (3) 安全性薬理試験

本剤の 1, 3 及び 9 mg/kg をラットに単回静脈内投与したときの一般症状及び神経行動学的機能を FOB 法の変法を用いて観察し、中枢神経系に対する作用について検討した。本剤は 9 mg/kg まで一般症状及び神経行動学的機能に作用を示さなかったことから、中枢神経系に影響を及ぼさないことが示唆された。

本剤の 1 及び 3 mg/kg を覚醒下のイヌに単回静脈内 1 時間持続投与したときの心血管に対する作用をテレメトリーシステムにより検討した。対照物質にはブドウ糖注射液及び SPL を用い被験物質と同様の方法で投与した。心血管系のパラメーターとして血圧、心拍数及び心電図に対する作用を検討した。本剤の 1 及び 3 mg/kg 並びに SPL 投与群において、投与直後にすべての試験動物で、収縮期及び拡張期血圧の低下が観察された。血圧の低下は投与終了時までにはブドウ糖注射液投与群における血圧と同程度に回復する可逆的な反応であった。本剤の 1 及び 3 mg/kg, SPL 投与では、ブドウ糖注射液投与群と比較して心拍数に有意な変化はみられなかった。また、心電図の各解析ポイントにおいて心電図の波形に影響は認められず、ブドウ糖注射液投与群と比較して、PR 間隔、RR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc に有意な変化はみられなかった。

上記の心血管系に対する本剤の作用を検討した試験において、同時に呼吸系に対する作用も検討した。すなわち、本剤の 1 及び 3 mg/kg を覚醒下のイヌに単回静脈内 1 時間持続投与し、呼吸系のパラメーターとして呼吸数、動脈血 pH、血液ガス分圧及びヘモグロビン酸素飽和度に対する作用を検討した。本剤の 1 及び 3 mg/kg, SPL 投与では、ブドウ糖注射液投与群と比較して呼吸数、動脈血 pH、動脈血酸素分圧、動脈血炭酸ガス分圧及びヘモグロビン酸素飽和度に有意な変化はみられなかった。以上の結果より、呼吸系に対し本剤は影響を示さなかった。

SPL をイヌに反復静脈内投与し、心血管系に及ぼす影響を評価すると共に、SPL の血圧低下作用に対するヒスタミン拮抗薬の影響を調べた。9 匹のイヌに 1 mL/分の速度で SPL を投与したところ、投与開始後すぐに血圧と脈圧の低下が観察され、心拍数の増加も認められた。しかし、心拍数の変化は最低血圧と必ずしも同期して認められておらず、この反射性の頻脈は必ずしも投与に関連するものではないと考えられる。また、その 7 日後に投与速度を 0.25, 0.5, 1.0 mL/分として、各群 3 匹のイヌに SPL を投与した。この範囲では投与速度の違いによる血圧の低下に差は認められなかった。また、初回の SPL の投与に比べ 2 回目の方が血圧の低下が大きかった。この血圧低下の機序を調べるために、ヒスタミン H<sub>1</sub> 及び H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の前処理を行った。この前処理により血圧の低下は生理食塩液前処理群よりも有意に軽減された。この血圧低下にはヒスタミン遊離が関与していると考えられたが、完全な血圧低下の抑制は示しておらず、心拍数の増加に対しては有意な低下は認められなかった。また、ヒスタミン拮抗薬前処理及び生理食塩液前処理群間で症状に明かな違いが認められず、紅潮などショック様症状などの所見はヒスタミン拮抗薬による前処理では軽減されなかった。何故、ヒスタミン拮抗薬が完全な抑制効果を示さないのかは不明であるが、心血管系に対するリポソームの作用機序は部分的にヒスタミンの関与はあると推察されるものの、より複雑なものであると予想される。

ヒト全血を用い、本剤及び SPL の溶血試験を実施したが、同容量の本剤及び SPL には溶血性は認められなかった。また、ヒト血清及び血漿を用い、本剤及び SPL の血液適合性についても調べたが、適合であると判断された。更に、SPL のホスファチジルコリンがホスホリパーゼで分解されリソホスファチジルコリンとなるが、5.7%又は 3.6%のリソホスファチジルコリンを構成成分として含むリポソームの溶血性をラットの血液を用いて調べたところ、溶血作用は認められなかった（参考資料 4.2.1.3.8）。

### (4) 薬力学的薬物相互作用試験

初発卵巣癌では、白金製剤単剤又は白金製剤及びタキソールの併用療法が行われる。本剤はこれらの化学療法剤とは異なるメカニズムを有しており、白金製剤に対し抵抗性の卵巣癌に対して

も、本剤が効果を示す可能性があり、非臨床試験においてシスプラチン耐性の A2780/CDDP を用いてその効果が示唆されている。更に、この A2780/CDDP を用い、本剤と代謝拮抗剤であるゲムシタビンの併用で、より強い抗腫瘍効果が認められることを示唆する報告を引用した（参考資料 4.2.1.4.1）。また、本剤とゲムシタビンとの併用により、白金製剤治療後に再発した患者に対し 64%の奏効率が得られたことが報告されており、本剤とゲムシタビンの併用は予後が不良の患者に対しても有効であることが示されている<sup>29)</sup>。

一方、非臨床試験においては白金製剤やタキソールとの併用試験結果は報告されていないが、白金製剤又はタキソールと本剤の併用の臨床試験結果が報告されている<sup>29)</sup>。白金製剤治療後再発した患者に対しカルボプラチンと本剤を併用することで無増悪生存期間の延長及び全生存期間の延長が認められている。また、白金製剤-タキソール治療後に再発したミューラー管腫瘍に対しても、本剤及びタキソールの併用により、29%の奏効率が得られている。

#### 2.6.2.7 図表

本文中に記載した。

## 2.6.2.8 参考文献

- 1) アドリアシン注<sup>®</sup>添付文書
- 2) Pakunlu RI, Wang Y, Saad M, Khandare JJ, Starovoytov V, Minko T. *In vitro* and *in vivo* intracellular liposomal delivery of antisense oligonucleotides and anticancer drug. *J Control Release*. 2006;114:153-62.
- 3) Mattsson JL, Spencer PJ, Albee RR. A performance standard for clinical and functional observational battery examinations of rats. *J Am Coll Toxicol*. 1996;15:239-54.
- 4) Cabanes A, Tzemach D, Goren D, Horowitz AT, Gabizon A. Comparative study of the antitumor activity of free doxorubicin and polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin in a mouse lymphoma model. *Clin Cancer Res*. 1998;4:499-505.
- 5) Parr MJ, Masin D, Cullis PR, Bally MB. Accumulation of liposomal lipid and encapsulated doxorubicin in murine Lewis lung carcinoma: the lack of beneficial effects by coating liposomes with poly(ethylene glycol). *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280:1319-27.
- 6) Sharma US, Sharma A, Chau RI, Straubinger RM. Liposome-mediated therapy of intracranial brain tumors in a rat model. *Pharm Res*. 1997;14:992-8.
- 7) Colbern GT, Hiller AJ, Musterer RS, Pegg E, Henderson IC, Working PK. Significant increase in antitumor potency of doxorubicin HCl by its encapsulation in pegylated liposomes. *J Liposome Res*. 1999;9:523-38.
- 8) Vaage J, Donovan D, Uster P, Working P. Tumour uptake of doxorubicin in polyethylene glycol-coated liposomes and therapeutic effect against a xenografted human pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*. 1997;75:482-6.
- 9) Vaage J, Donovan D, Wipff E, Abra R, Colbern G, Uster P, et al. Therapy of a xenografted human colonic carcinoma using cisplatin or doxorubicin encapsulated in long-circulating pegylated STEALTH liposomes. *Int J Cancer*. 1999;80:134-7.
- 10) 根岸嗣治, 高平汎志. Adriamycin の細胞核への取り込み, および DNA との相互作用. *薬学雑誌* 1973;93,1498-508.
- 11) Zhang H, Gao Y-G, Van der Marel GA, Van Boom JH, Wang AH-J. Simultaneous incorporations of two anticancer drugs into DNA. The structures of formaldehyde-cross linked adducts of daunorubicin-d(CG(araC)GCG) and doxorubicin-d(CA(araC)GTG) complexes at high resolution. *J Biol Chem*. 1993; 268: 10095-101.
- 12) Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*. 1984;226:466-8.
- 13) Capranico G, Kohn KW, Pommier Y. Local sequence requirements for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of doxorubicin. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:6611-9.
- 14) Bachur NR, Gordon SL, Gee MV, Kon H. NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:954-7.
- 15) Berlin V, Haseltine WA. Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. *J Biol Chem*. 1981;256:4747-56.
- 16) Banin S, Moyal L, Shieh S-Y, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998;281:1674-7.
- 17) Canman CE, Lim D-S, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*. 1998;281:1677-9.
- 18) Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis*. 2003;24:1571-80.
- 19) Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, Rancourt DE, Lee PWK. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature*. 1998;394:700-3.
- 20) Yoshida K, Liu H, Miki Y. Protein kinase C  $\delta$  regulates Ser<sup>46</sup> phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2006;281:5734-40.
- 21) Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol*. 2004;24:6728-41.
- 22) Gartenhaus RB, Wang P, Hoffmann P. Induction of the WAF1/CIP1 protein and apoptosis in human T-cell leukemia virus type I-transformed lymphocytes after treatment with adriamycin by using a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 ;93:265-8.
- 23) Gabizon AA, Barenholz Y, Bialer M. Prolongation of the circulation time of doxorubicin encapsulated in liposomes containing a polyethylene glycol-derivatized phospholipid: pharmacokinetic studies in rodents and dogs. *Pharm Res*. 1993;10:703-8.

- 24) Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95: 4607-12.
- 25) Gabizon AA. Stealth liposomes and tumor targeting: One step further in the quest for the magic bullet. *Clin Cancer Res*. 2001;7: 223-5.
- 26) Jørgensen K, Kiebler T, Hylander I, Vermehren C. Interaction of a lipid-membrane destabilizing enzyme with PEG-liposomes. *Int J Pharm*. 1999;183:21-4.
- 27) Vermehren C, Jørgensen K, Frokjaer S. Influence of lipopolymer concentration on liposome degradation and blood clearance. *Int J Pharm*. 1999;183:13-6.
- 28) Jørgensen K, Davidsen J, Mouritsen OG. Biophysical mechanisms of phospholipase A2 activation and their use in liposome-based drug delivery. *FEBS Lett*. 2002;531:23-7.
- 29) Rose PG. Pegylated liposomal doxorubicin: optimizing the dosing schedule in ovarian cancer. *Oncologist*. 2005 ;10:205-14.

## 2.6.3 薬理試験概要表

## 2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：SLD

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
<b>効力を裏付ける試験</b>					
抗腫瘍効果 (アドリアマイシン耐性ヒト卵巣癌細胞株 A2780/AD 移植マウスにおける抗腫瘍効果)	マウス	静脈内	■■■■■	BIO-06-B007-2520A	4.2.1.1.3
<b>副次的薬理試験</b>					
該当資料なし					
<b>安全性薬理試験</b>					
中枢神経系に対する作用 <sup>a)</sup> (一般症状及び神経行動学的機能に及ぼす影響)	ラット	静脈内	■■■■■	■■77-45	4.2.1.3.1
心血管系に対する作用 <sup>a)</sup> (無麻酔, テレメトリー法)	イヌ	静脈内	■■■■■	■■77-44	4.2.1.3.2
試験番号: SBL77-44 における血漿中薬物濃度測定 <sup>a)</sup>	イヌ	静脈内	■■■■■	■■77-44	4.2.1.3.3
呼吸系に対する作用 <sup>a)</sup>	イヌ	静脈内	■■■■■	■■77-44	4.2.1.3.2
溶血試験 <sup>a)</sup>	ヒト血液	<i>In vitro</i>	■■■■■	LTI-30-92-15	4.2.1.3.4
血液適合性(沈殿・凝集) <sup>a)</sup>	ヒト血漿及び血清	<i>In vitro</i>	■■■■■	LTI-30-92-15	4.2.1.3.4
SPL の中枢神経系に対する作用 <sup>a)</sup> (一般症状及び神経行動学的機能に及ぼす影響)	ラット	静脈内	■■■■■	LTI-30-93-25	4.2.1.3.5
SPL の心血管系に対する作用 <sup>a)</sup> (無麻酔, テレメトリー法)	イヌ	静脈内	■■■■■	LTI-30-94-10	4.2.1.3.6
<b>薬力学的薬物相互作用試験</b>					
該当資料なし					

a) : GLP 適合試験,

## 2.6.3.2 効力を裏付ける試験

概要文中に記載



## 2.6.3.3 副次的薬理試験

該当資料なし

## 2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：SLD

評価対象 となる組織	動物種/系統	投与方法	投与量	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
中枢神経	SD ラット	静脈内	JNS002 : 1 , 3 , 9 mg/kg SPL : 5 mL/kg	雄 : 6	JNS002 及び SPL は神経行動学的機能及び一般症状に対し作用を示さなかった。	適	■■■■ 77-45
心血管	ビーグル犬 (無麻酔)	静脈内	JNS002 : 1 , 3 mg/kg SPL : 2 mL/kg	雄 : 4	<p>血圧：JNS002 の 1 及び 3 mg/kg 並びに SPL 投与群において投与開始直後に，収縮期及び拡張期血圧の低下が観察されたが，投与終了時までには回復した。</p> <p>心拍数：JNS002 の 1 及び 3 mg/kg，SPL 投与では，ブドウ糖注射液投与群に比較して心拍数に有意な変化はみられなかった。</p> <p>心電図：心電図の波形に影響は認められず，PR 間隔，RR 間隔，QRS 時間，QT 間隔及び QTc に有意な変化はみられなかった。</p> <p>体温及び運動量：影響は認められなかった</p> <p>一般状態：JNS002 1 及び 3 mg/kg に各々 1/4 例に嘔吐が発現した以外に特記すべき変化は観察されなかった。</p>	適	■■■■ 77-44 ■■■■ 77-44
呼吸器	ビーグル犬 (無麻酔)	静脈内	JNS002 : 1 , 3 mg/kg SPL : 2 mL/kg	雄 : 4	呼吸数，動脈血 pH，動脈血酸素分圧，動脈血炭酸ガス分圧及びヘモグロビン酸素飽和度に有意な変化はみられなかった。	適	■■■■ 77-44

評価対象 となる組織	動物種/系統	投与 方法	投与量	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
血液	ヒト血液	<i>In vitro</i>	JNS002 2 mg/mL 及びそれに相当す る量の SPL と、等 量の血液若しくは 血清又は血漿を混 和	-	溶血:溶血は認められなかった。 血液適合性:沈殿・凝集は認められなかった。	適	LTI-30-92-15
中枢神経	SD ラット	静脈内	SPL : 1.5, 7.5, 15 mL/kg <sup>a)</sup>	雄: 10	SPL に神経行動学的機能の変化及び毒性所見は認められ なかった。	適	LTI-30-93-25
心血管	ビーグル犬 (無麻酔)	静脈内 (反復)	SPL : 1 mL/kg  投与速度 0.25, 0.5, 1.0 mL/min	雄: 3 ~ 5	SPL ( 1 mL/kg , 1.0 mL/min )投与開始後、ベースラインに 対し有意な血圧低下及び心拍数の増加がみられた。投与 終了後、血圧は、3 ~ 6 時間でベースラインまで回復し た。心拍数の増加は、血圧が最小となる時点とは一致し ていなかった。 投与速度の違いは血圧低下の程度に影響を与えなかつ た。 抗ヒスタミン剤 ( H <sub>1</sub> 及び H <sub>2</sub> ) の前投与は血圧低下の程 度を減少させたが、心拍数の増加には影響を及ぼさなかつ た。	適	LTI-30-94-10

特記しない限り単回投与

a) : SPL を生理食塩液で希釈 ( 10, 50 及び 100% ) し , 15 mL/kg の容量で投与 ( それぞれ SPL 1.5, 7.5 及び 15 mL/kg に相当 )

### 2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし