

2.4 非臨床試験の概括評価

目 次

目 次	2
表一覧	3
図一覧	3
略号一覧	4
1 緒言	5
2 非臨床試験計画の概要	6
3 薬理試験	6
3.1 効力を裏付ける試験	8
3.1.1 各種腫瘍モデルにおける有効性と耐容性	8
3.1.2 腎細胞癌モデルにおける有効性と耐容性	9
3.1.3 作用機序に関する試験	10
3.2 バイオマーカー	12
3.3 安全性薬理試験	13
3.4 薬力学的薬物相互作用試験	13
4 薬物動態試験	13
4.1 分析法	14
4.2 吸収及び生物学的利用性	14
4.3 分布	14
4.4 妊娠及び授乳動物	14
4.5 代謝	14
4.6 排泄	14
4.7 薬物動態学的薬物相互作用	14
4.7.1 P 糖蛋白を介する薬物間相互作用	14
4.7.2 エベロリムスによる代謝阻害	14
4.8 トキシコキネティクス	15
5 毒性試験	15
5.1 単回投与毒性試験	15
5.2 反復投与毒性試験	15
5.3 遺伝毒性試験	15
5.4 がん原性試験	15
5.5 生殖発生毒性試験	15

5.6	全身曝露量の比較	16
5.7	局所刺激性試験	17
5.8	その他の毒性試験	17
6	不純物及び分解物	17
7	安全性に関する総合評価	23
8	結論	23
9	参考文献	23

表一覧

Table 5-1	全身曝露量の比較	16
Table 6-1	不純物の規格値及び毒性試験に供試した被験物質中の不純物の最大含有量	18
Table 6-2	サルを用いた反復投与毒性試験の無毒性量における不純物用量	19
Table 6-3	反復投与毒性試験（バッチ比較試験）における不純物用量	20
Table 6-4	復帰突然変異試験における不純物用量	21
Table 6-5	染色体異常試験における不純物用量	22

図一覧

Figure 1-1	エベロリムスの化学構造	5
Figure 3-1	細胞内 mTOR 経路とエベロリムス（RAD001）の作用機序	7
Figure 3-2	ヒト腎細胞癌モデル（RXF393）に対するエベロリムスの有効性と耐容性	9
Figure 3-3	エベロリムス単独，ベバシズマブ単独及びエベロリムスとベバシズマブ併用投与による腫瘍増殖抑制効果	10

略号一覧

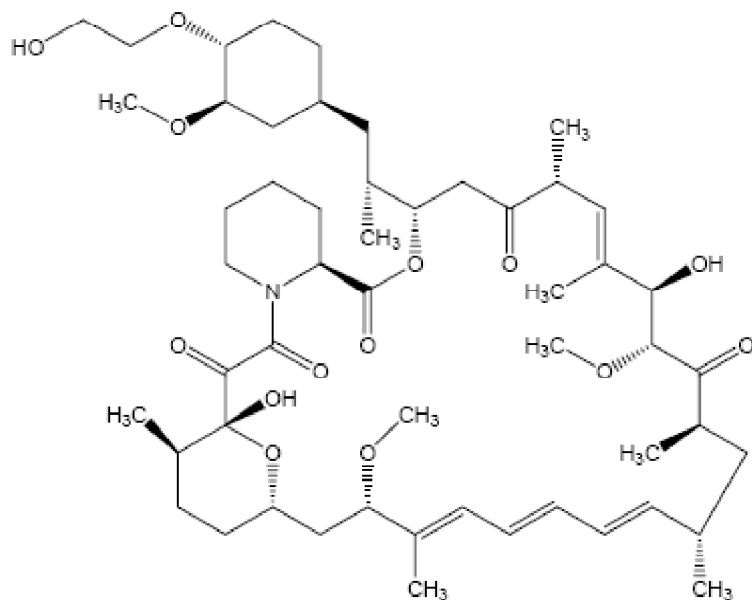
略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
4E-BP	eIF-4E binding protein	eIF-4E 結合蛋白質
bFGF	basic fibroblast growth factor	塩基性線維芽細胞増殖因子
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
DCE-MRI	dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging	ダイナミックコントラスト強調磁気共鳴画像
EC ₅₀	50% effective concentration	50%有効濃度
EGFR	epidermal growth factor receptor	上皮増殖因子受容体
eIF-4E	eukaryotic initiation factor 4E	真核細胞開始因子 4E
FKBP	FK506 binding protein	FK506 結合蛋白質
HIF	hypoxia inducible factor	低酸素誘導因子
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
K _i	inhibition constant	阻害定数
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
MCT	monocarboxylate transporter	モノカルボン酸輸送体
mTOR	mammalian target of rapamycin	哺乳類ラパマイシン標的蛋白質
mTORC	mTOR complex	mTOR 複合体
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核球
P-gp	P-glycoprotein	P 糖蛋白
PI3K	phosphoinositol-3-kinase	ホスホイノシトール-3-キナーゼ
PTEN	phosphatase and tensin homolog	ホスファターゼ・テンシン・ホモログ
RAPTOR	regulatory-associated protein of mTOR	調節性 mTOR 関連蛋白質
RICTOR	rapamycin-insensitive companion of mTOR	ラパマイシン非感受性 mTOR 結合蛋白質
S6	40S ribosomal protein S6	40S リボソーム S6 蛋白質
S6K	S6 kinase	S6 キナーゼ
SEM	standard error of the mean	平均値の標準誤差
TSC	tuberous sclerosis	結節性硬化症
TV	tumor volume	腫瘍体積
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子

1 緒言

エベロリムスを有効成分とするサーティカン錠は、臓器移植時に用いる免疫抑制剤として 80 カ国以上で承認されており、本邦においては心移植における拒絶反応の抑制を効能・効果として 2007 年 1 月に製造販売承認を取得している。今回、エベロリムスを有効成分とした新たな製剤を抗悪性腫瘍薬として開発した。

エベロリムス (Figure 1-1) は、sirolimus の誘導体であり、哺乳類ラパマイシン標的蛋白質 (Mammalian target of rapamycin, mTOR) の選択的阻害薬である。mTOR は、増殖因子や栄養素などによる刺激により蛋白質の合成を調節する主要なセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞の成長、増殖、生存、及び血管新生を調節する。エベロリムスは、mTOR に対する阻害作用を介して細胞増殖抑制効果を発揮すると考えられる。臓器移植時の急性拒絶反応は、抗原を認識した T 細胞の急速な増殖が原因であり、エベロリムスは、主に IL-2 (T 細胞増殖因子) 受容体シグナル伝達を阻害し、T 細胞の増殖を抑制することにより免疫抑制作用を発揮するものと推察された。一方、PI3K/AKT 下流に位置する mTOR は、PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路の構成要素であり、癌患者ではその経路の制御異常が知られていることから (Luo et al 2003) , mTOR 阻害薬は抗悪性腫瘍薬として使用できる可能性が考えられている。

Figure 1-1 エベロリムスの化学構造



2 非臨床試験計画の概要

本薬の非臨床試験である薬理試験（主に免疫抑制作用）、薬物動態試験及び毒性試験については、サーティカン錠申請時に既に提出し評価されている。また、20 年 月 日に実施した医薬品医療機器総合機構との 相談において、 との見解（5.4-44 相談記録書）が得られたことから、本概括評価には、サーティカン錠の申請後に新たに実施した試験、特にエベロリムスの薬理作用である腫瘍増殖抑制効果を中心に記載した。今回の申請資料は、20 年から 20 年にかけてノバルティスファーマ社又は受託試験機関において実施した試験の成績、並びに公表論文より作成した。

添付資料とした社内報告書（Module 4）では、エベロリムスを、PKF222-666, 222-666, RAD-666, SDZ RAD 666, SDZ RAD, RAD001, あるいは RAD と記載している。また、必要に応じてサーティカン錠の承認申請書から引用を行った。

薬理試験では、主に多くのヒト腫瘍細胞を用いた *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験によりエベロリムスの腫瘍増殖抑制効果について検討した。また、エベロリムスに対する感受性、又は耐性を決定する腫瘍関連分子についても検討した。さらに、薬力学的相互作用に関しては、*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験において一般的な作用機序を有する抗悪性腫瘍薬及び分子標的阻害薬を用いてエベロリムスとの併用効果について検討した。安全性薬理試験については、新たな試験は実施しなかった。

薬物動態試験として、サーティカン錠の申請後に新たに実施したヒト血液中エベロリムスの定量分析法及び薬物動態学的薬物相互作用に関する試験成績を、今回の承認申請に際して提出した。

毒性試験については、これまでに実施した毒性試験により本薬の毒性は既に評価されているものと判断し、新たな試験は実施しなかった。

3 薬理試験

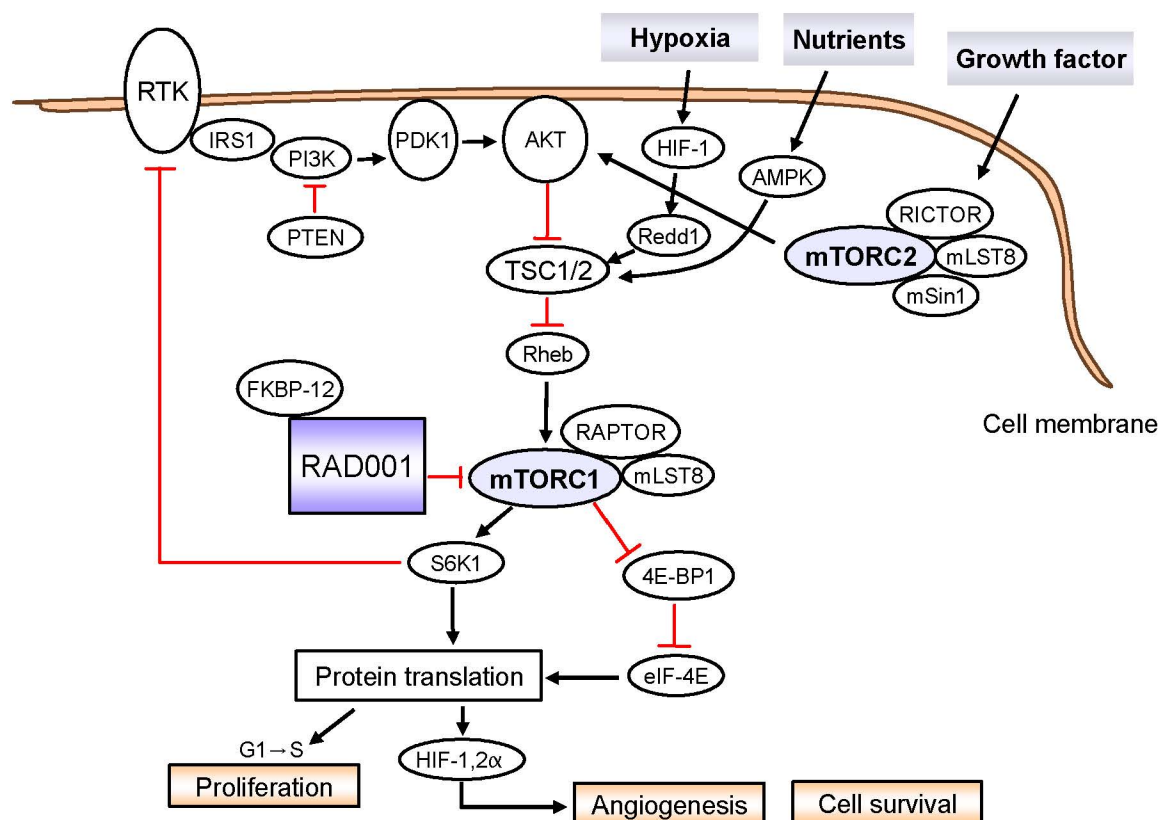
エベロリムスは、シグナル伝達阻害薬として作用する **sirolimus** 誘導体であり、このクラスに属する薬物の標的は **mTOR** である。**mTOR** は、多機能性シグナル伝達蛋白質として作用するセリン／スレオニンキナーゼであり、上流の多数の刺激からシグナルを受容し、その下流に続く多数の経路へと情報を伝達する。**mTOR** は、栄養素のセンサー及び細胞代謝モニターとして機能し、蛋白質合成を調節することによって、細胞の成長、増殖、血管新生、及び生存を調節する（Figure 3-1）。最近、**mTOR** が腫瘍細胞の生理機能においても中心的な役割を果たしていることが明らかとなり、**mTOR** 阻害薬は癌を制御するためのアプローチとして注目されている（Bjornsti and Houghton 2004, Abraham and Gibbons 2007）。

エベロリムス（及び **sirolimus** とその構造関連化合物）は、細胞内イムノフィリン受容体である **FKBP-12** と結合し、**mTORC1** を直接阻害する。また、**mTORC2** に対する間接的な阻害作用とし

て、エベロリムスと FKBP-12 の複合体が遊離 mTOR と結合する結果、mTORC2 形成が低下することが考えられている (Sarbassov et al 2004)。

エベロリムスは、良好な耐容性とともな腫瘍増殖抑制効果を有する。その作用機序として、mTOR 阻害を介する直接的な腫瘍増殖抑制効果と間接的な血管新生抑制作用が考えられた。

Figure 3-1 細胞内 mTOR 経路とエベロリムス (RAD001) の作用機序



mTOR は、上流の多くの因子からシグナルを受容し、複数の下流経路を調節する多機能性シグナル伝達蛋白質である。mTOR は、栄養素などの外部刺激に応じさまざまな蛋白質の合成を制御し、細胞の成長、増殖、血管新生、及び生存を調節する。エベロリムスは、FKBP-12 との結合を介して mTORC1 活性を直接阻害し、さらに遊離型 mTOR を減少させるため間接的に mTORC2 も阻害する。

黒色矢印は促進／活性化作用、赤色は抑制／不活性化作用を示す。

AMPK: adenosine monophosphate-activated protein kinase, 4E-BP1: eIF-4E binding protein 1, eIF-4E: eukaryotic initiation factor 4E, FKBP-12: FK506 binding protein-12, HIF-1,2 α: hypoxia inducible factor-1,2 α, IRS1: insulin receptor substrate 1, mLST8: mammalian lethal with SEC Thirteen 8, mSin1: mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1, mTOR: mammalian target of rapamycin, mTORC1/2: mTOR complex 1/2, PDK1: phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PI3K: phosphoinositide-3 kinase, PTEN: phosphatase and tensin homolog, RAPTOR: regulatory-associated protein of mTOR, Redd1: regulated in development and DNA damage 1, Rheb: Ras homologue enriched in brain, RICTOR: rapamycin-insensitive companion of mTOR, RTK: receptor tyrosine kinase, S6K1: S6 kinase 1, TSC1/2: tuberous sclerosis complex 1/2

Source: Bjornsti and Houghton 2004, Abraham and Gibbons 2007

3.1 効力を裏付ける試験

3.1.1 各種腫瘍モデルにおける有効性と耐容性

エベロリムスの FKBP-12 に対する IC_{50} 値は sirolimus と同程度であり、FKBP-12 に対する高い親和性が示された[2.6.2.2.1-Table 2-1]。

エベロリムス/FKBP-12 複合体の mTOR に対する EC_{50} 値は sirolimus/FKBP-12 複合体と同程度であった[2.6.2.2.1-Table 2-2]。

一方、エベロリムスの HER-1, KDR, IGF1-R などのプロテインキナーゼに対する阻害活性はほとんど示されなかった[2.6.2.2.1-Table 2-3]。

ヒト由来の腫瘍細胞株を用いた *in vitro* の増殖抑制試験において、エベロリムスの IC_{50} 値は広範な値 (1 nM 未満から 1 μ M 超まで) を示した。多くの腫瘍細胞株は、エベロリムスに対し高い感受性を示したが (IC_{50} : < 50 nM), IC_{50} が 1 μ M を超える非感受性細胞株もみられた[2.6.2.2.1-Table 2-4]。エベロリムスの腫瘍組織型による反応性の違いは認められなかった[Table 2.6.3.1-RD-20-03223], [Table 2.6.3.1-RD-20-02213]。また、正常造血幹細胞のエベロリムスに対する感受性は低く、その IC_{50} 値は 2.542 μ M であった[Table 2.6.3.1-RD-20-00291]。

ヒト及びげっ歯類由来の細胞株による実験的腫瘍モデルを用い、エベロリムス、シスプラチン、ドキシソルビシン、パクリタキセル、若しくはフルオロウラシルの有効性と耐容性を検討した[2.6.2.2.2-Table 2-5]。エベロリムス (5~60 mg/kg, 1 日 1 回) を経口投与したマウスの耐容性は、概ね良好であった[Table 2.6.3.1-RD-20-02547]。エベロリムスは、腫瘍細胞の増殖を抑制し、最終的には腫瘍体積を減少させた。*In vitro* 試験においてエベロリムスに感受性を示した腫瘍細胞株 (A549, NCI-H596, NCI-H520) だけでなく、非感受性細胞株 (HCT116, KB-31, KB-8511) に対しても有効であった[Table 2.6.3.1-RD-20-03223], [Table 2.6.3.1-RD-20-02548], [Table 2.6.3.1-RD-20-02549], [Table 2.6.3.1-RD-20-02550], [Table 2.6.3.1-RD-20-00860], [Table 2.6.3.1-RD-20-00002], [Table 2.6.3.1-RD-20-03237], [1.13-3-サーティカン錠 CTD2.6.3.1-RD-20-00848]。

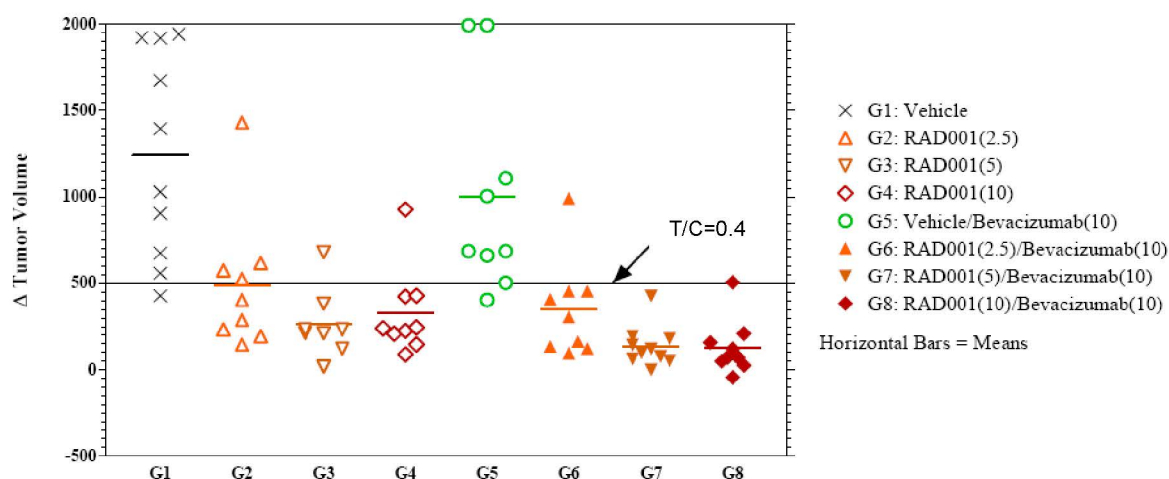
ヒト由来腫瘍組織を *in vivo* で継代し、確立した異種移植モデルを用いてエベロリムスの腫瘍増殖抑制効果を検討した。概して、エベロリムス 10 mg/kg の 1 日 1 回経口投与は有効性を示した。薬物処置群 (T) と対照群 (C) の腫瘍体積増加量の比である T/C 値 0.4 未満を有効性基準とした。エベロリムスは、全般的に T/C 値を低下させた。ここで示した総数 58 モデルの中で、T/C 値 0.4 未満を示したモデル数は 43 (74%) であり、T/C 値 0.4 未満が 100% となった腫瘍は、乳癌、胃癌、肺大細胞癌、肺小細胞癌、卵巣癌、膵臓癌であった[2.6.2.2.3-Table 2-6]。エベロリムス投与後のマウスの平均体重は安定しており、本薬の耐容性は概ね良好であった[Table 2.6.3.1-RD-20-01486]。

Source: [Table 2.6.3.1-RD-20[REDACTED]-00256]

RXF393 モデルにおける有効性と耐受性の結果をFigure 3-2に示した。対照群の腫瘍体積が 10 日目まで直線的に増加したのに対し、エベロリムス群の腫瘍体積にほとんど変化はなく（Figure 3-2A），エベロリムス群の最終腫瘍体積変化量は有意に減少した（Figure 3-2B）。体重変化をみると、対照群では 10 日目で著明な低下がみられたのに対し、エベロリムス群の体重に明らかな変化はみられなかった（Figure 3-2C, D）[Table 2.6.3.1-RD-20-00256]。

ヒト腎細胞癌 Caki-1 細胞株は、*in vitro* 試験ではエベロリムス非感受性である（IC₅₀ 値：> 2500 nM）[2.6.2.2.1-Table 2-4]。Caki-1 細胞株を移植した腎細胞癌モデル（Caki-1 モデル）を確立し、エベロリムス単独投与、ベバシズマブ単独投与、及びエベロリムスとベバシズマブとの併用投与における有効性及び耐受性を検討した。薬物の有効性水準を、T/C 値 0.4 未満とした。エベロリムスは用量に応じ有効性を示したが、ベバシズマブに有効性はみられなかった。両薬物併用群では、エベロリムス単独群を上回る有効性が認められた（Figure 3-3）。耐受性については、いずれの処置群も良好であった[Table 2.6.3.1-RD-20-02211]。

Figure 3-3 エベロリムス単独、ベバシズマブ単独及びエベロリムスとベバシズマブ併用投与による腫瘍増殖抑制効果



各薬物若しくは溶媒処置群の腫瘍体積変化量の個別値を示した。各群の平均値はバーで示した。矢印は、溶媒群の最終腫瘍体積変化量（平均値）1245 mm³を基準としたときの T/C = 0.4（Delta TV として 498 mm³）の水準。

Source: [Table 2.6.3.1-RD-20-02211]

3.1.3 作用機序に関する試験

エベロリムス非感受性のヒト腫瘍細胞株から確立した *in vivo* 異種腫瘍移植モデルのいくつかでは、エベロリムスは薬効を発揮する。この事実、エベロリムスの腫瘍増殖抑制効果には、直接的な腫瘍増殖阻害作用のみでなく、間接的な作用機序も関与していることを示唆する。その機序として、エベロリムスの VEGF に対する選択的な阻害作用が血管新生を抑制し、*in vivo* でみられ

た腫瘍増殖抑制効果に関与する可能性が考えられた[1.13-3-サーティカン錠 CTD 2.6.3.1-RD-2000852]。

血管新生が過剰な腫瘍モデルである腭臓癌 CA20948 担癌 Lewis ラット (CA20948 モデル) , 及び下垂体腫瘍 GH3 担癌 Wistar-Furth ラット (GH3 モデル) を用い, エベロリムスの有効性と耐容性を検討した。CA20948 モデルでは, エベロリムスの連日投与試験と週 1 回又は 2 回投与でいずれも, フルオロウラシルと同様の腫瘍増殖抑制効果が観察された。これより, エベロリムスは, 血管新生が過剰な腫瘍に対し有効な薬物であり, 本薬の間欠投与法の有効性も示唆された[Table 2.6.3.1-RD-20003707] (Boulay et al 2004)。GH3 モデルにおいて, エベロリムスの耐容性は良好であり, 強い腫瘍増殖抑制作用を示した。このことから, エベロリムスは, 血管新生が過剰な腫瘍に対し有効である可能性が示唆された[Table 2.6.3.1-RD-20000255]。

細胞増殖因子を含有するチャンバーを皮下に移植したマウスモデルを使用して, *in vivo* におけるエベロリムスの血管新生抑制作用を検討した。エベロリムスは, VEGF 依存性の血管新生を選択的に阻害し, 腫瘍増殖を抑制した[Table 2.6.3.1-RD-20000853]。マウスメラノーマ B16/BL6 細胞を C57BL/6 マウスに移植した同所性移植モデルでは VEGF と bFGF の発現が増加することから, 血管新生阻害の評価に使用できる。エベロリムスは, 腫瘍増殖を用量依存的に抑制し, 原発腫瘍及び転移腫瘍の血管密度も有意に低下させた[1.13-3-サーティカン錠 CTD 2.6.3.1-RD-20000854]。さらに, エベロリムスは VEGF 産生を顕著に抑制し, 血管成熟のマーカーである平滑筋アクチンも減少させた[Table 2.6.3.1-RD-200002016]。B16/BL6 モデルを用いたエバンスブルー又は DCE-MRI 解析では, エベロリムスの腫瘍の血管透過性に対する影響は認められなかった[Table 2.6.3.1-RD-200002016], [Table 2.6.3.1-RD-200001547]。

CA20948 モデルを用い, エベロリムスを単回経口投与し, 腫瘍組織, 皮膚組織及び末梢血単核球 (PBMC) 抽出液の S6 並びに 4E-BP1 のリン酸化レベルを解析した。エベロリムスにより腫瘍組織中の S6 リン酸化は顕著に低下したが, 皮膚組織及び PBMC 抽出液にその低下は観察されず, 対照群でも S6 リン酸化は検出されなかった。すべての組織において 4E-BP1 の 70 位スレオニンのリン酸化が減少した[Table 2.6.3.1-RD-200003817] (Boulay et al 2004)。CA20948 モデルにおいて, エベロリムスを週 1 回, 又は週 2 回投与したとき, 腫瘍増殖の有意な抑制がみられた[Table 2.6.3.1-RD-200003707]。このような腫瘍増殖抑制効果と一致して, エベロリムスの単回投与 12 時間後の腫瘍組織及び皮膚組織の S6K1 は不活性化され, その作用は腫瘍組織においては 48 時間後まで持続した。一方, 皮膚組織の S6K1 の不活性化は 72 時間後まで持続した。エベロリムスの腫瘍組織中の S6K1 に対する持続的な抑制作用は, 間欠投与スケジュールにおける腫瘍増殖抑制効果の作用機序を示唆し, 皮膚組織中の S6K1 に対する作用は, 皮膚がバイオマーカーの評価試料となる可能性を示すと考えられた[Table 2.6.3.1-RD-20000450]。エベロリムスは, KB-31 モデルにおいても腫瘍増殖を有意に阻害し[Table 2.6.3.1-RD-200002549], エベロリムス投与 1 時間後の腫瘍及び皮膚組織中 S6K1 の不活性化が観察された[Table 2.6.3.1-RD-200002541]。

3.2 バイオマーカー

エベロリムスの作用機序の解明は、臨床的な活性の指標となるバイオマーカー開発と密接に関連する。適切なバイオマーカーは、エベロリムスに反応する患者の選択を可能にする。さらに、バイオマーカーは、用量の最適化及び患者の反応性の早期評価を可能とし、耐性の程度を推測するために有益な情報を提供する。バイオマーカーの開発は、新しい分子標的療法には特に重要である。

mTOR は、栄養状態を感知して細胞増殖を調節し、さらにアミノ酸、酸素、及びエネルギー状態のセンサーとしても働き、S6K1 は直接糖のホメオスタシスに関与する (Pende et al 2000, Bjornsti and Houghton 2004, Abraham and Gibbons 2007)。最近、mTOR 阻害薬に対する耐性は、mTOR の下流にある S6K1 のリン酸化レベルや 4E-BP1 と eIF-4E レベルの比だけでなく、標的分子である FKBP-12 又は mTOR への結合ドメインの特異的変異も関与することも報告されている (Kurmasheva et al 2006)。また、mTOR の上流に位置する TSC1/2, PTEN, AKT リン酸化、あるいは下流に位置する HIF-1 やこれが制御するさまざまな転写因子も耐性に関与する可能性が考えられる。

感受性及び非感受性にかかわらず、エベロリムスは mTOR から下流に存在する S6K1 及び 4E-BP1 の活性化を阻害する。また、腫瘍組織や PBMC の S6 リン酸化は、エベロリムスの有効性よりも、mTOR 系の活性化マーカーとして有用である可能性が考えられた [Table 2.6.3.1-RD-20-02632] (Tanaka et al 2008)。ヒト腫瘍細胞株のリン酸化 S6 レベルはエベロリムスの IC₅₀ 値と関連するため、腫瘍生検で検出されるリン酸化 S6 のベースラインレベルは、患者の選別に有用と考えられる [Table 2.6.3.1-RD-20-03252], [Table 2.6.3.1-RD-20-03495]。しかしながら、一般的な抗悪性腫瘍薬やその他新規の抗悪性腫瘍薬と本薬が併用された場合、併用薬が mTOR 阻害に依存せずに S6 リン酸化レベルを低下させると、その活性化マーカーとしての意義は低下する (Wan and Helman 2002)。

S6K1 活性は、エベロリムスの第 I 相臨床試験 (2101/2102 試験) に登録された患者の PBMC で検討された [Table 2.6.3.1-RD-20-02632]。この試験の目的は、週 1 回の投与スケジュールで、PBMC の S6K1 活性を阻害するために必要なエベロリムスの最適用量を検討することであった。すべての患者で、エベロリムス投与 24 時間後の S6K1 は顕著に低下し、活性の回復には用量依存性が認められた。この試験結果から、エベロリムスの投与間隔を 1 週間としても患者の S6K1 を十分に不活性化できるものと考えられた。

リン酸化 AKT/リン酸化 S6 のベースラインレベルが、シグナル伝達経路の活性化とエベロリムスに対する感受性の指標として有用であることが示唆された [Table 2.6.3.1-RD-20-03252]。前立腺癌及び膠芽腫のパネルにおいて TSC2 蛋白質の発現レベルとエベロリムス感受性に相関が認められ、AKT のリン酸化レベルに逆相関が認められた。シグナル伝達経路の活性化及び反応性を正確に評価するため、TSC2 レベルの解析はリン酸化 AKT/リン酸化 S6 とともに利用可能な二次的マーカーとなる可能性が示唆された [Table 2.6.3.1-RD-20-03495]。

マイクロアレイの解析結果から、MCT4（モノカルボン酸輸送体 4）がエベロリムス耐性のマーカーとなりうる可能性が示された[Table 2.6.3.1-RD-20-04320]。MCT4 は、ケトン体、乳酸、ピルビン酸などのトランスポーターであり、最終産物である乳酸の除去を介し解糖系と関連する（Enerson and Drewes 2003）。エベロリムスは、その構造内に乳酸様モジュールを有することから、MCT4 は細胞からのエベロリムスの排泄に関連し得る。そこで MCT4 をクローン化し、これをエベロリムス感受性腫瘍である A549 及び MCF7 細胞株に導入し、本薬の増殖抑制作用を検討した。両細胞株は、エベロリムス非感受性結腸癌 HCT116 細胞株と同レベルの MCT4 を発現することが確認されたが、エベロリムスの増殖抑制効果に対する感受性に影響を与えなかった。

3.3 安全性薬理試験

追加する資料はなし。

3.4 薬力学的薬物相互作用試験

エベロリムスは単独投与の場合でも腫瘍増殖抑制効果を示すが、PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路が、癌細胞の増殖及び生存に関与する多くのエフェクター分子の下流に位置していることから、エベロリムスと、作用機序の異なる他の抗悪性腫瘍薬との併用による作用の増強が期待される（Abraham and Gibbons 2007）。そこで、a) 一般的な標的に対する抗悪性腫瘍薬、すなわちパクリタキセル、ドキソルビシン、ゲムシタビン、シスプラチン、テモゾロミド、及びフルオロウラシル、さらに b) シグナル伝達分子標的阻害薬、すなわちアロマターゼ阻害薬のレトロゾール、ErbB1/EGFR 阻害薬のエルロチニブ及びゲフィチニブのほか、VEGF を標的とした抗体ベバシズマブなどとの併用を検討した。

エベロリムスと抗悪性腫瘍薬との併用において、弱い相加作用から相乗作用まで多様な併用効果を示したが、ほとんどの組み合わせの耐容性の認められる投与スケジュールにおいて腫瘍増殖抑制効果の増強がみられた。*In vitro* では、腫瘍増殖抑制効果と拮抗する併用の組み合わせはなかったが、*in vivo* ではエベロリムスとパクリタキセルとの併用において、腫瘍増殖抑制効果が減弱（拮抗的作用）する場合があった[Table 2.6.3.1-RD-20-03251]。投与スケジュールの検討では、概ね、同時投与以外の投与スケジュールは、併用による腫瘍増殖抑制効果の増強にほとんど影響を及ぼさなかったが、終了時の体重減少に軽度の影響がみられ、特にエベロリムス投与前にゲムシタビンを投与した場合、耐容性は低下した[Table 2.6.3.1-RD-20-03254]。これらの試験で認められた協力的相互作用は、mTOR を介した細胞の生存関連メカニズムの阻害、主要な作用機序である PI3K/AKT/mTOR 経路の阻害、及び血管新生阻害作用の結果と考えられた。

4 薬物動態試験

エベロリムスの薬物動態試験の成績については、サーティカン錠の申請時に既に評価されている[1.13-3-サーティカン錠 CTD2.6.4]。今回のアフィニートール錠の申請に際し、サーティカン錠の申請資料に加えて LC-MS/MS 法によるヒト血液中エベロリムスの定量分析法、P 糖蛋白（P-gp）

に関する薬物間相互作用 (*in vitro*) 及びワルファリンとの薬物間相互作用 (*in vitro*) について評価した。

4.1 分析法

サーティカン錠の申請後に、ヒト血液中エベロリムスの定量分析法として新規の LC-MS/MS 法 [Table 2.6.5.2-DMPK R ■■■00750, DMPK R ■■■00750-01] を開発し、臨床試験の血液中濃度測定に使用した。新規 LC-MS/MS 法は FDA のガイダンス “Bioanalytical Method Validation” に従いバリデートされ、定量下限は ■■■ ng/mL で、十分な精度、感度、特異性が確認されている。

4.2 吸収及び生物学的利用性

追加する資料はなし。

4.3 分布

追加する資料はなし。

4.4 妊娠及び授乳動物

追加する資料はなし。

4.5 代謝

追加する資料はなし。

4.6 排泄

追加する資料はなし。

4.7 薬物動態学的薬物相互作用

4.7.1 P 糖蛋白を介する薬物間相互作用

エベロリムスは P-gp の基質であることから [1.13-3-サーティカン錠 CTD2.6.4-3.1 項], エベロリムスの P-gp を介する薬物間相互作用の可能性を検討した。

エベロリムスは、P-gp を過剰発現した細胞株を用いた *in vitro* 試験において P-gp 活性を阻害した。IC₅₀ 値は 9.4 µmol/L であり、陽性対照として使用したシクロスポリンの IC₅₀ 値 (0.87～1.7 µmol/L) よりも高かった [Table 2.6.5.15(2)-DMPK R ■■■00777]。日本人癌患者に臨床用量であるエベロリムス 10 mg を 1 日 1 回反復経口投与したときの定常状態における最高血液中濃度は 65.9 ng/mL (約 0.07 µmol/L) [5.3.3.2-1-1101 試験] と IC₅₀ 値の 1/100 以下であることから、エベロリムスが P-gp の基質となる薬剤の組織分布に影響を及ぼす可能性は低いものと考えられた。

4.7.2 エベロリムスによる代謝阻害

サーティカン錠申請時に示したとおり、チトクローム P450 の各分子種に対するエベロリムスの阻害活性をヒト肝ミクロソームを用いて *in vitro* で検討した結果、エベロリムスはシクロスポ

リンの CYP3A による代謝を競合的に阻害 ($K_i = 2.3 \mu\text{mol/L}$) したほか、デキストロメトルファン
の CYP2D6 による代謝の混合型阻害薬 ($K_i = 1.7 \mu\text{mol/L}$) となることが示唆された[1.13-3-サー
ティカン錠 CTD2.6.4-7.1 項]。

さらに、ヒト肝ミクロソームを用いて CYP2C9 の基質であるワルファリンの代謝に対する阻害
作用を追加検討したところ、主代謝物である 7-ヒドロキシワルファリンの生成に対する阻害の
 IC_{50} 値は $106 \mu\text{mol/L}$ であった[Table 2.6.5.15(1)-DMPK R00186]。

日本人癌患者にエベロリムス 10 mg を 1 日 1 回反復経口投与したときの定常状態における最高
血液中濃度は K_i 値の $1/25$ 以下であることから、エベロリムスが他の薬剤の代謝に顕著な影響を
及ぼす可能性は低いものと考えられた。

4.8 トキシコキネティクス

追加する資料はなし。

5 毒性試験

エベロリムスの単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発
生毒性試験、局所刺激性試験及びその他の毒性試験の成績については、サーティカン錠の承認申
請時にすべて提出し既に審査されていることから[1.13-3-サーティカン錠 CTD 2.6.6], [1.13-3-サ
ーティカン錠 CTD2.6.7], 今回の承認申請に際しては、新たな毒性試験は実施しなかった。一方、
動物とヒトの全身曝露量の比較並びに不純物の安全性評価に関しては、臨床用量及び製剤の変更
に伴い差異が生じることから、既提出資料を用いて再度検討した。

5.1 単回投与毒性試験

追加する資料はなし。

5.2 反復投与毒性試験

追加する資料はなし。

5.3 遺伝毒性試験

追加する資料はなし。

5.4 がん原性試験

追加する資料はなし。

5.5 生殖発生毒性試験

追加する資料はなし。

5.6 全身曝露量の比較

毒性試験におけるエベロリムスの全身曝露量を予想最大臨床用量（10 mg/日）を投与したヒトの全身曝露量と比較し、さらに、動物と同等の曝露量を示すヒトの用量を算出した（Table 5-1）。その結果、供試動物の中で最も低い曝露量を示したラットでは、いずれの試験においても無毒性量における曝露量がヒトの曝露量を下回ることが確認された。しかしながら、いずれの動物種においても高用量群ではヒトを上回る曝露量（マウス：87 倍、ラット：12 倍、カニクイザル：14 倍）が認められており、本薬の毒性プロファイルは把握されているものと考えられた。サーティカン錠承認申請時に示したとおり[1.13-3-サーティカン錠 CTD2.4 表 5-1]、高用量群における毒性変化として、本薬の免疫抑制作用若しくは免疫抑制状態における二次的変化と考えられるリンパ器系組織の萎縮性変化、皮膚・消化管の炎症性変化、及び心筋・膵島細胞の変性がみられ、さらに内分泌系への影響を示唆する生殖器系の変化が認められた。この他に種特異的な変化として、マウス及びラットでは肺のマクロファージ集簇が、ラットでは眼の水晶体の変化が観察された。これらのことから、高用量投与によりヒトにおいても本薬の免疫抑制作用に関連した毒性が発現する可能性が示唆された。

Table 5-1 全身曝露量の比較

動物種	用量 (mg/kg)	投与期間 (週)	AUC _{0-24h} (ng·h/mL)			動物／ヒトの 曝露量比 ^{a)}	動物と同等の曝 露量を示すヒト 用量 ^{a, b)} (mg)
			雄	雌	平均		
マウス	0.15	13	803 ^{e)}	362	583	1.1	11.3
	0.5		1174	1258	1216	2.4	23.7
	1.5		3472	4877	4175	8.1	81.2
	5		19420	11363	15392	29.9	299.5
	15		45955	43206	44581	86.7	867.3
マウス	0.1	101/104	169.5	150.5	160	0.3	3.1
	0.3		412.8	346.4	380	0.7	7.4
	0.9		1377.8 ^{e)}	3084.2 ^{e)}	2231 ^{e)}	4.3 ^{e)}	43.4 ^{e)}
ラット	0.5	4	102	56	79	0.2	1.5
	1.5		321.4	548.6	435	0.8	8.5
	5		1686.7	1249.0	1468	2.9	28.6
	15		4912.3	7239.4	6076	11.8	118.2
ラット	0.15	26	7.1	8.1	8	0.02	0.16
	0.5		44.1	13.1	29	0.06	0.6
	1.5		92.7	50.8	72	0.1	1.4
ラット	0.1	104	2.5	1.0	2	0.004	0.04
	0.3		25.7	11.4	19	0.04	0.4
	0.9		138.2 ^{e)}	42.9 ^{e)}	91 ^{e)}	0.2 ^{e)}	1.8 ^{e)}
ミニブタ	1.5	4	2937.2 ^{d)}	2402.8 ^{d)}	2670 ^{d)}	5.2	51.9
	5		6163.7 ^{d)}	5950.9 ^{d)}	6057 ^{d)}	11.8	117.8
	15		7982.6 ^{d)}	7729.5 ^{d)}	7856 ^{d)}	15.3	152.8

動物種	用量 (mg/kg)	投与期間 (週)	AUC _{0-24h} (ng·h/mL)			動物／ヒトの 曝露量比 ^{a)}	動物と同等の曝 露量を示すヒト 用量 ^{a, b)} (mg)
			雄	雌	平均		
カニクイ ザル	1.5	4	<u>974.8</u>	<u>1196.3</u>	<u>1086</u>	<u>2.1</u>	<u>21.1</u>
	5		3140.4	3267.1	3204	6.2	62.3
	15		8112.5	5843.9	6978	13.6	135.8
カニクイ ザル	0.1	26	145	233	189	0.4	3.7
	0.5		<u>358</u>	<u>466</u>	<u>412</u>	<u>0.8</u>	<u>8.0</u>
	1.5		1106	1218	1162	2.3	22.6
カニクイ ザル	0.1	52	<u>98.0</u>	<u>59.6</u>	<u>79</u>	<u>0.2</u>	<u>1.5</u>
	0.3		275.6	176.2	226	0.4	4.4
	(0.9)	(39)	941.3	471.8	707	1.4	13.7

a) 10 mg/日を投与した固形がん患者における AUC_{0-24h}: 514 ng·h/mL (C2102 試験) を用いて算出。

b) 毒性試験の AUC / 514 (ng·h/mL) × 10 (mg/日)。

c) 無毒性量における曝露量, 対応するヒト用量及び曝露量比に下線を付す。

d) AUC_{1-24h}。

e) 腫瘍非発現最高用量。

Source: [1.13-3-サーティカン錠 CTD2.6.6-表 7-1]

5.7 局所刺激性試験

追加する資料はなし。

5.8 その他の毒性試験

追加する資料はなし。

6 不純物及び分解物

エベロリムスの予想最大臨床用量は 10 mg であることから, 不純物に関する ICH ガイドライン「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン (ICH Q3A)」及び「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン (ICH Q3B)」に従って, 安全性確認の必要な不純物の閾値を, 原薬では 0.15%, 製剤では 0.5%と設定した。安全性の確認が必要とされる原薬及び製剤中の不純物の規格値, 並びに毒性試験で使用した被験物質中の不純物の最大含有量をTable 6-1に示す。

安全性の確認が必要とされる原薬及び製剤中の不純物について, カニクイザルを用いた反復投与毒性試験の無毒性量における含有量を算出し, 予想臨床用量及び規格値から算出されるヒトの不純物最大用量と比較した。その結果, 一部の不純物 (502-95, 804-95, 012-99 及び 008-96) を除いて, いずれもヒト最大用量を上回る用量であることが確認された (Table 6-2)。

一方, 不純物 502-95, 804-95, 012-99 及び 008-96 については, 不純物含有量の異なるバッチを被験物質としたラットを用いた 2 及び 4 週間反復経口投与毒性試験 (バッチ比較試験) により, 安全性の確認を行った (Table 6-3)。その結果, ヒト予想不純物最大用量の 40 倍を上回る不純

物用量を投与したにもかかわらず、いずれの試験においてもほぼ同様の毒性徴候が認められたことから、不純物特異的な毒性は発現しないものと推察された。

遺伝毒性試験の最高用量における不純物用量（濃度）をTable 6-4及びTable 6-5に示す。復帰突然変異試験及び染色体異常試験では、最高用量においても本薬の遺伝毒性を示唆する結果は認められなかった。規格値の不純物がすべて吸収されて血液に分布したと仮定し、遺伝毒性試験で供試した本薬中の不純物濃度と比較すると、遺伝毒性試験における不純物濃度はヒト血液中不純物濃度に比べて極めて高いものと考えられた。

また、エペロリムス原薬中の残留溶媒に関しては、残留溶媒に関する ICH ガイドライン「医薬品の残留溶媒ガイドライン（ICH Q3C）」で規定される限度値の範囲内であることが確認された。

以上のことから、原薬及び製剤中の不純物、並びに残留溶媒の規格値までの安全性は確認されているものと判断した。

Table 6-1 不純物の規格値及び毒性試験に供試した被験物質中の不純物の最大含有量

不純物	規格値		被験物質中不純物最大含有量	
	原薬	製剤	反復投与毒性試験	遺伝毒性試験
502-95	■%以下	-	■%	■%
804-95	■%以下	■%以下	■%	■%
211-97	■%以下	-	■%	■%
009-96	■%以下	-	■%	■%
Q1	■%以下	-	■%	■%
Q2	■%以下	-	■%	■%
Q3	■%以下	-	■%	■%
029-99 + Q4	■%以下	-	■%	■%
030-99 (Q5)	■%以下	-	■%	■%
012-99 ^{a)}	-	■%以下	■%	■%
013-99 ^{a)}	-	■%以下	■%	■%
008-96	-	■%以下	■%	■%

a) 新たに安全性確認の必要な閾値を超えた不純物。

Source: [2.3.P.5.6-Table 2.3.P.5-19], [1.13-3-サーティカン錠 CTD2.6.6-表 10-5], [1.13-3-サーティカン錠 CTD2.6.7.4]

Table 6-2 サルを用いた反復投与毒性試験の無毒性量における不純物用量

試験の種類 (試験番号)	不純物	原薬由来							製剤由来				
		502-95	211-97	009-96	Q1	Q2	Q3	029-99 +Q4	030-99	804-95	012-99	013-99	008-96
	規格 (%)	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤
4 週間, 経口 ( /SPM049/1008)	不純物含有量 (%)												
	不純物用量 ^a (μg/kg)												
26 週間, 経口 ( /SPM078/1067)	不純物含有量 (%)												
	不純物用量 ^b (μg/kg)												
サル不純物最大用量 (μg/kg)													
ヒト不純物用量 ^c (μg/kg)													
用量比 (サル/ヒト)		0.7	3.2	1.6	10.2	2.6	4.1	1.2	1.2	–	–	3.0	–

a : 無毒性量 1.5 mg/kg を用いて算出

b : 無毒性量 0.5 mg/kg を用いて算出

c : 予想最大臨床用量 10 mg/day, 体重 60 kg, 規格値上限の含有を想定し算出

na : 該当なし

source : [1.13-3-サートィカン錠 CTD2.6.7.4]

Table 6-3 反復投与毒性試験（バッチ比較試験）における不純物用量

試験の種類（試験番号）	被験物質 Batch no.		不純物			
			502-95	804-95	012-99	008-96
2週間, ラット (634678)	X096 07	不純物含有量 (%)				
		不純物用量 ^a (μg/kg)				
	X081 05	不純物含有量 (%)				
		不純物用量 ^a (μg/kg)				
2週間, ラット (/SPM091/0532)	Y003 01	不純物含有量 (%)				
		不純物用量 ^b (μg/kg)				
	Y254 12	不純物含有量(%)				
		不純物用量 ^b (μg/kg)				
4週間, ラット (1094)	X033 01	不純物含有量 (%)				
		不純物用量 ^b (μg/kg)				
	X153 10	不純物含有量(%)				
		不純物用量 ^b (μg/kg)				
ラット不純物最大用量 (μg/kg)						
ヒト不純物用量 ^c (μg/kg)						
用量比 (ラット/ヒト)			46	112	62	68

a : 最高用量 15 mg/kg を用いて算出

b : 最高用量 5 mg/kg を用いて算出

c : 予想最大臨床用量 10 mg/day, 体重 60 kg, 規格値上限の含有を想定し算出

source : [1.13-3-サーティカン錠 CTD2.6.7.4]

Table 6-4 復帰突然変異試験における不純物用量

試験番号	用量 ^a (µg/plate)	不純物	原薬由来								製剤由来				
			502-95	804-95	211-97	009-96	Q1	Q2	Q3	029-99 + Q4	030-99 (Q5)	804-95	012-99	013-99	008-96
		規格 (%)	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤
Mut. Bakt. 10/		不純物含有量 (%)													
	2500 (±S9)	曝露濃度 (ng/mL)													
Mut. Bakt. 52/		不純物含有量 (%)													
	2500 (±S9)	曝露濃度 (ng/mL)													
Mut. Bakt. 66/		不純物含有量 (%)													
	909 (±S9)	曝露濃度 (ng/mL)													
1801		不純物含有量 (%)													
	200 (±S9)	曝露濃度 (ng/mL)													
ヒト不純物用量 ^b (mg/day)															
ヒト血液中不純物濃度 ^c (ng/mL)															

a : 各試験における遺伝毒性のみられなかった最高用量

b : 予想最大臨床用量 10 mg/day 及び規格値上限の含有を想定し算出

c : 規格上限値の不純物がすべて吸収され血液中（全血液量：5 L）に分布したものと仮定して算出

source : [1.13-3-サーディカン錠 CTD2.6.7.4]

Table 6-5 染色体異常試験における不純物用量

試験番号	用量 ^a (µg/mL)	不純物	原薬由来								製剤由来				
			502-95	804-95	211-97	009-96	Q1	Q2	Q3	029-99 + Q4	030-99 (Q5)	804-95	012-99	013-99	008-96
Z63		規格 (%)	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤
		不純物含有量 (%)													
	33.5 (-S9)	曝露濃度 (ng/mL)													
	90.9 (+S9)	曝露濃度 (ng/mL)													
1831		不純物含有量 (%)													
	40.0 (±S9)	曝露濃度 (ng/mL)													
ヒト不純物用量 ^b (mg/day)															
ヒト血液中不純物濃度 ^c (ng/mL)															

a : 各試験における遺伝毒性のみられなかった最高用量

b : 予想最大臨床用量 10 mg/day 及び規格値上限の含有を想定し算出

c : 規格上限値の不純物がすべて吸収され血液中（全血液量：5 L）に分布したものと仮定して算出

source : [1.13-3-サーティカン錠 CTD2.6.7.4]

7 安全性に関する総合評価

エベロリムスの安全性薬理試験、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験及びその他の毒性試験の成績については、サーティカン錠の承認申請時にすべての資料を提出し既に審査されており、今回の承認申請に際して新たな非臨床安全性試験は実施しなかった。一方、動物とヒトの全身曝露量の比較並びに不純物の安全性評価においては、臨床用量及び製剤の変更に伴い差異が生じることから、既提出資料を用いて再度検討した。その結果、曝露量の比較に関しては、無毒性量における曝露量が予想最大臨床用量を投与したヒトにおける曝露量を下回る試験がみられたが、高用量群ではヒトを上回る曝露量が認められており、本薬の毒性プロファイルは把握されているものと考えられた。また、不純物の安全性評価については、毒性試験において予想最大臨床用量における不純物量を上回る不純物が投与され評価されていることから、原薬及び製剤中の不純物の規格値までの安全性は確認されているものと判断した。

8 結論

エベロリムスは、FKBP-12 に結合し mTOR を阻害することによって癌細胞の増殖を抑制する。エベロリムスは、*in vitro* 試験では、腎細胞癌などのヒト由来の腫瘍を含む多くの腫瘍細胞株の増殖を抑制し、腫瘍組織型の違いによる抑制作用に差は認められなかった。エベロリムスの耐容性は概ね良好であった。*In vitro* 試験において非感受性を示した腫瘍に対しても、*in vivo* 試験では腫瘍増殖抑制効果が認められた。この理由として、エベロリムスの血管新生抑制作用が考えられた。エベロリムスの作用機序は、腫瘍細胞のシグナル伝達経路の阻害による直接的な腫瘍増殖抑制だけでなく、間接的な血管新生抑制作用も関与することが考えられた。

エベロリムスに対する非感受性腫瘍が存在することから、エベロリムスの効果を予測できるバイオマーカーの必要性が示唆された。PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路を構成する種々の分子とその下流の活性化レベルが、エベロリムス非感受性腫瘍の指標になることが示唆された。しかしながら、単独で有効なバイオマーカーは見出されておらず、その検討は継続されている。

PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路は、癌細胞の増殖因子などに関与しているエフェクター分子の下流に位置しているため、エベロリムスは作用機序の異なる他の抗悪性腫瘍薬との併用により、さらに高い効果を示すことが期待された。

以上の非臨床試験成績から、エベロリムスは腎細胞癌治療においても安全かつ有効な、経口投与可能な薬剤となる可能性が示された。

9 参考文献

[Abraham RT, Gibbons JJ (2007)] The Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway: Twists and Turns in the Road to Cancer Therapy. Clin Cancer Res 13; 3109-14.

- [Bjornsti M-A, Houghton PJ (2004)] The TOR pathway: A target for cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*; 4:335-48.
- [Boulay A, Zumstein-Mecker S, Stephan C, et al (2004)] Antitumor Efficacy of Intermittent Treatment Schedules with the Rapamycin Derivative RAD001 Correlates with Prolonged Inactivation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Cancer Res*; 64:252-61.
- [Enerson BE, Drewes LR. (2003)] Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *J Pharm Sci*; 92:1531-44.
- [Kurmasheva RT, Huang S, Houghton PJ (2006)] Predicted mechanisms of resistance to mTOR inhibitors. *Brit J Cancer*; 95:955-60.
- [Luo J, Manning BD, Cantley LC (2003)] Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*; 4:257-62
- [Pende M, Kozma SC, Jaquet M, et al (2000)] Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished β -cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*; 408:994-7.
- [Sarbasov DD, Ali SM, Kim DH, et al (2004)] Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*; 14(14):1296-302.
- [Tanaka C, O'Reilly T, Kovarik JM, et al (2008)] Identifying optimal biologic doses of everolimus (RAD001) in patients with cancer based on the modeling of preclinical and clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *J Clin Oncol*; 26:1596-1602.
- [Wan X, Helman LJ. (2002)] Effect of insulin-like growth factor II on protecting myoblast cells against cisplatin-induced apoptosis through p70 S6 kinase pathway. *Neoplasia*; 4:400-8.
- [■■■■■■■■■■ 相談記録書] 薬機審長発第 ■■■■ 号; 平成 ■■ 年 ■■ 月 ■■ 日