

ポマリストカプセル 1mg
ポマリストカプセル 2mg
ポマリストカプセル 3mg
ポマリストカプセル 4mg

第 2 部（モジュール 2） CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

セルジーン株式会社

目次

2.6.1	緒言	5
2.6.1.1	医薬品の構造及び薬理的特性に関する簡潔な情報	5
2.6.1.2	申請された臨床適応, 用量及び投与期間に関する情報	6
2.6.1.2.1	予定する効能・効果	6
2.6.1.2.2	予定する用法・用量	6

図目次

図 2.6.1-1 ポマリドミドの構造式	5
----------------------------	---

略号一覧表

略 号	説 明
CC-4047	ボマリドミド（ラセミ体）の開発コード番号
GLP	Good Laboratory Practice 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	Human ether-a-go-go-related gene ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IL	Interleukin インターロイキン
IMiD	A proprietary series of drugs with immunomodulatory and other properties 免疫調節薬
LPS	Lipopolysaccharide リポ多糖
MCP	Monocyte chemoattractant protein 単球遊走因子
MIP	Macrophage inflammatory protein マクロファージ炎症性タンパク
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell 末梢血単核球
TNF	Tumor necrosis factor 腫瘍壊死因子

2.6.1 緒言

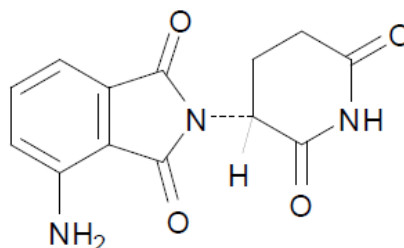
2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理的特性に関する簡潔な情報

ポマリストカプセルは、有効成分としてポマリドミド（一般名英名：Pomalidomide，開発番号：CC-4047，ラセミ体）を1，2，3又は4 mg 含有する硬カプセル剤である。

ポマリドミドは IMiD[®]化合物として知られている免疫調節薬に属する新規化合物であり、多発性骨髄腫（MM）、骨髄増殖性腫瘍に関連する骨髄線維症、固形腫瘍及び自己免疫性炎症性疾患の治療に有用であることが期待されている。またポマリドミドは、非臨床試験において、レナリドミドに抵抗性を獲得した MM 細胞に対しても、高い抗腫瘍活性を示した。同様に臨床試験においても、ボルテゾミブやレナリドミドに耐性となった MM に対し良好な結果が認められていることから、再発又は難治性に移行した MM に対して有効であることが期待されている。

ポマリドミドの化学名は 4-Amino-2-[(3*RS*)-2,6-dioxopiperidin-3-yl]-2*H*-isoindole-1,3-dione であり、化学構造的にサリドマイドに類似している。ポマリドミドは不斉炭素を有し、光学活性体 S (-)体及び R (+)体が存在するが、ラセミ体として合成される。分子量は 273.24 である。構造式を [図 2.6.1-1](#) に示す。

図 2.6.1-1 ポマリドミドの構造式



及び鏡像異性体

ポマリドミドを用いた非臨床試験として、薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験を実施した。

ポマリドミドの薬理学的特性を評価した結果、MM 及びリンパ腫系腫瘍細胞に対して著しい抗腫瘍活性を有することが明らかとなった。また、ポマリドミドの腫瘍細胞に対する直接的な抗腫瘍活性に加え、間接的に腫瘍細胞に作用する免疫調節活性が認められた。リポ多糖

(Lipopolysaccharide, LPS) で刺激したヒト末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) でのインターロイキン (Interleukin, IL) -1 β , IL-6, IL-12, TNF (Tumor necrosis factor) - α , 単球遊走因子 (Monocyte chemoattractant protein, MCP) -1, マクロファージ炎症性タンパク (Macrophage inflammatory protein, MIP) -1 α 等の炎症性サイトカインやケモカインの産生を阻害し、IL-10 や RANTES の産生を促進した。

ポマリドミドの薬物動態学的特性（吸収、分布、代謝及び排泄）を、各種 *in vitro* 及び *in vivo* 試験並びに毒性試験と並行して行った TK 試験で検討した。加えて、ポマリドミドと他剤との薬物相互作用の評価を *in vitro* 試験で実施し、サルを用いた *in vitro* 及び *in vivo* 試験で、ポマリドミドの両エナンチオマーの異性化を評価した。

ポマリドミドの安全性薬理試験として、ラットを用いた中枢神経系及び呼吸器系、麻酔イヌ及び覚醒サルを用いた心血管系及び呼吸器系に対する影響を評価した。さらに、*in vitro* 試験を実施

し、ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (human ether-a-go-go-related gene, hERG) カリウムチャンネル電流に対する影響を評価した。

ポマリドミドの毒性評価では、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験（マウスで 13 週、ラットで 6 ヶ月、サルで 9 ヶ月まで）、*in vitro* 及び *in vivo* での遺伝毒性試験、ラットでの受胎能及び初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギでの胚及び胎児発生に関する試験、並びにサルでの免疫毒性試験を実施した。重要な毒性試験及び安全性薬理試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice, GLP）に準じて実施した。

2.6.1.2 申請された臨床適応、用量及び投与期間に関する情報

2.6.1.2.1 予定する効能・効果

再発又は難治性の多発性骨髄腫

2.6.1.2.2 予定する用法・用量

デキサメタゾンとの併用において、通常、成人にはポマリドミドとして 1 日 1 回 4 mg を 21 日間連日経口投与した後、7 日間休薬する。これを 1 サイクルとして投与を繰り返す。なお、患者の状態により適宜減量する。

ポマリストカプセル 1mg
ポマリストカプセル 2mg
ポマリストカプセル 3mg
ポマリストカプセル 4mg

第 2 部（モジュール 2） CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

セルジーン株式会社

目次

2.6.2	薬理試験の概要文	10
2.6.2.1	まとめ	10
2.6.2.1.1	効力を裏付ける試験	10
2.6.2.1.1.1	<i>in vitro</i> 試験	10
2.6.2.1.1.1.1	分子作用機序	10
2.6.2.1.1.1.2	腫瘍細胞増殖阻害作用	10
2.6.2.1.1.1.3	免疫調節作用	11
2.6.2.1.1.1.4	血管新生阻害作用	11
2.6.2.1.1.1.5	赤血球及び顆粒球前駆細胞に対する作用	12
2.6.2.1.1.1.6	サイトカイン産生制御作用	12
2.6.2.1.1.1.7	シクロオキシゲナーゼ発現阻害作用	12
2.6.2.1.1.1.8	正常 B 細胞に対する作用	13
2.6.2.1.1.1.9	ポマリドミド代謝物の薬理活性	13
2.6.2.1.1.2	<i>in vivo</i> 試験	13
2.6.2.1.2	副次的薬理試験	14
2.6.2.1.3	安全性薬理試験	15
2.6.2.1.4	薬力学的薬物相互作用試験	15
2.6.2.2	効力を裏付ける試験	17
2.6.2.2.1	<i>in vitro</i> 試験	17
2.6.2.2.1.1	分子作用機序	17
2.6.2.2.1.2	腫瘍細胞増殖阻害作用	18
2.6.2.2.1.2.1	MM 細胞	18
2.6.2.2.1.2.2	急性骨髄性白血病細胞	22
2.6.2.2.1.2.3	5q 欠損型腫瘍細胞	23
2.6.2.2.1.3	免疫調節作用	24
2.6.2.2.1.3.1	T 細胞活性化促進作用	24
2.6.2.2.1.3.2	NK 細胞活性化促進作用	29
2.6.2.2.1.3.3	ADCC 活性増強作用	30
2.6.2.2.1.4	血管新生阻害作用	31
2.6.2.2.1.4.1	ヒト臍帯動脈組織を用いた検討	31
2.6.2.2.1.4.2	HUVEC 浸潤阻害作用	32
2.6.2.2.1.4.3	微小血管形成阻害作用	33
2.6.2.2.1.5	赤血球及び顆粒球前駆細胞に対する作用	34

2.6.2.2.1.6	サイトカイン産生制御作用.....	35
2.6.2.2.1.7	COX 発現阻害作用.....	36
2.6.2.2.1.8	正常 B 細胞に対する作用.....	37
2.6.2.2.1.9	ポマリドミド代謝物の薬理活性	37
2.6.2.2.2	<i>in vivo</i> 試験	39
2.6.2.2.2.1	抗腫瘍作用	39
2.6.2.2.2.1.1	MM 細胞	39
2.6.2.2.2.1.2	バーキットリンパ腫細胞.....	42
2.6.2.2.2.1.3	B 前駆細胞性急性リンパ性白血病細胞	45
2.6.2.2.2.2	血管新生阻害作用	46
2.6.2.3	副次的薬理試験	47
2.6.2.3.1	固形腫瘍由来細胞に対する増殖阻害作用	47
2.6.2.3.2	HbF 産生促進作用	47
2.6.2.3.3	皮膚線維症に対する作用.....	48
2.6.2.3.3.1	ブレオマイシン誘発性皮膚線維症マウスに対する作用.....	48
2.6.2.3.3.2	Tsk-1 マウスでの作用	49
2.6.2.3.4	内皮細胞分化に対する作用	49
2.6.2.3.5	抗炎症作用.....	50
2.6.2.3.6	中枢神経系に対する作用.....	50
2.6.2.3.7	UVB 惹起 TNF- α 産生に対する阻害作用.....	51
2.6.2.4	安全性薬理試験	53
2.6.2.4.1	中枢神経系に対する作用.....	54
2.6.2.4.2	心血管系に対する作用	55
2.6.2.4.2.1	hERG チャンネルに対する作用	55
2.6.2.4.2.2	麻酔イヌでの心血管系に対する作用	55
2.6.2.4.2.3	覚醒カニクイザルでの心血管系に対する作用（テレメトリー法）	56
2.6.2.4.3	呼吸器系に対する作用	56
2.6.2.4.3.1	ラットでのプレチスモグラフによる呼吸器系評価	56
2.6.2.4.3.2	麻酔イヌでの呼吸器系に対する作用	57
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用	58
2.6.2.5.1	各種 MM 細胞に対するポマリドミドと Dex の併用効果.....	58
2.6.2.5.2	レナリドミド耐性 MM 細胞でのポマリドミドと Dex との併用作用.....	59
2.6.2.5.3	MM 細胞移植 SCID マウスでのポマリドミドと Dex の併用作用.....	64

2.6.2.5.4	MM 細胞移植 SCID マウスでのポマリドミド, ボルテゾミブ又は Dex の 単剤又は併用作用	66
2.6.2.6	考察及び結論	67
2.6.2.7	図表	69
2.6.2.8	参考文献	70

図目次

図 2.6.2-1	H929 細胞でのポマリドミドの処理時間と細胞増殖阻害活性	20
図 2.6.2-2	レナリドミド感受性及び耐性 H929 細胞でのポマリドミドの細胞増殖阻害作用	21
図 2.6.2-3	レナリドミド感受性及び耐性細胞での細胞周期及び細胞死に関連する因子に対するポマリドミドの作用	22
図 2.6.2-4	CD3 抗体で刺激した末梢血での Th1 サイトカイン産生に対するポマリドミドの作用	26
図 2.6.2-5	CD3 抗体で刺激した末梢血での Th2 サイトカイン産生に対するポマリドミドの作用	27
図 2.6.2-6	CD3 抗体刺激 Th1 及び Th2 でのサイトカイン産生に対するポマリドミドの作用	28
図 2.6.2-7	ポマリドミドによる CD4 ⁺ 細胞及び CD8 ⁺ 細胞での IL-2 産生増強作用	28
図 2.6.2-8	<i>in vitro</i> ヒト臍帯動脈組織の血管新生（発芽領域）に対するポマリドミドの作用	32
図 2.6.2-9	HUVEC の浸潤（フィブロネクチン・コート系）に対するポマリドミドの作用	33
図 2.6.2-10	H929 細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドの作用	40
図 2.6.2-11	レナリドミド耐性 H929 細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドの作用	41
図 2.6.2-12	Hs Sultan 腫瘍細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドの作用（腫瘍細胞移植後 1 日目に投与開始）	42
図 2.6.2-13	Hs Sultan 腫瘍細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドの作用（腫瘍定着後に投与開始）	43
図 2.6.2-14	Hs Sultan 腫瘍細胞移植マウスの血管新生に対するポマリドミドの作用	43
図 2.6.2-15	ポマリドミドとリツキシマブの併用投与による Raji 細胞移植 SCID マウスでの生存期間改善作用	44
図 2.6.2-16	白血病性芽球細胞移植 NOD/SCID マウスでの腫瘍体積に対するポマリドミドの作用	46
図 2.6.2-17	レナリドミド感受性及び耐性細胞での細胞増殖及び細胞死誘導に対するポマリドミドと Dex との併用作用	60
図 2.6.2-18	レナリドミド感受性及び耐性細胞での細胞増殖に対するポマリドミドと Dex との併用作用	61
図 2.6.2-19	レナリドミド感受性細胞での細胞死誘導に対するポマリドミドと Dex との併用作用	61
図 2.6.2-20	レナリドミド耐性細胞での細胞死誘導に対するポマリドミドと Dex との併用作用	62
図 2.6.2-21	細胞周期制御因子に対するポマリドミド単独及び Dex 併用作用	62

図 2.6.2-22 細胞死・細胞生存関連因子に対するポマリドミド単独及び Dex との併用作 用.....	63
図 2.6.2-23 H929 細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドと Dex の併用作用	65
図 2.6.2-24 レナリドミド耐性 H929 細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミド と Dex の併用作用	66

表目次

表 2.6.2-1	ポマリドミドの MM 細胞増殖阻害活性.....	19
表 2.6.2-2	ポマリドミド又はレナリドミド存在下で培養した KMS-12-BM 細胞及び H929 細胞での両剤に対する耐性獲得に関する時間経過	22
表 2.6.2-3	細胞生存率に対するポマリドミドの効果.....	23
表 2.6.2-4	各種腫瘍細胞に対する PBMC/NK 細胞の細胞障害性に対するポマリドミド の作用	30
表 2.6.2-5	腫瘍細胞株に対するポマリドミドと抗体治療薬の併用での ADCC 活性の増 強.....	31
表 2.6.2-6	ヒト PBMC を LPS で刺激した際のサイトカイン産生に対するポマリドミド の作用	36
表 2.6.2-7	ポマリドミド及びその代謝物の薬理活性一覧	38
表 2.6.2-8	乳がん及び NSCLC 細胞に対するポマリドミドの増殖阻害効果.....	47
表 2.6.2-9	ポマリドミドの安全性薬理試験一覧	53
表 2.6.2-10	ポマリドミドと Dex の単独または併用による細胞増殖に対する作用.....	59
表 2.6.2-11	ポマリドミド又はレナリドミド存在下で培養した KMS-12-BM 細胞及び H929 細胞での両薬剤に対する耐性獲得までの時間経過（Dex 併用試験）	64

略号一覧表

略 号	説 明
7-AAD	7-Amino-actinomycin D 7-アミノアクチノマイシン D
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity 抗体依存性細胞障害
AML	Acute myeloid leukemia 急性骨髄性白血病
BAFF	B cell activating factor B 細胞活性化因子
BCP-ALL	B cell precursor acute lymphocytic leukemia B 前駆細胞性急性リンパ性白血病
BCR	B cell antigen receptor B 細胞抗原受容体
bFGF	Basic fibroblast growth factor 塩基性線維芽細胞増殖因子
BFU-E	Burst-forming unit-erythroid 赤芽球バースト形成細胞 (赤血球前駆細胞)
BNX	Beige-nude-xid
BrdU	Bromodeoxyuridine ブロモデオキシウリジン
CC-4047	ポマリドミド (ラセミ体) の開発コード番号
CD31	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) 血小板内皮細胞接着分子-1
CD144	Vascular endothelial-cadherin 血管内皮細胞カドヘリン
CDK	Cyclin dependent kinase サイクリン依存性キナーゼ
CFU-E	Colony forming unit-erythroid 赤芽球コロニー形成細胞
CFU-GM	Colony forming unit-granulocyte, monocyte 顆粒球コロニー形成細胞
CFU-MK	Colony forming unit-megakaryocyte 巨核球コロニー形成細胞
CMC	Carboxymethylcellulose カルボキシメチルセルロース
Con A	Concanavalin A コンカナバリリン A
COX	Cyclooxygenase シクロオキシゲナーゼ
DC	Dendritic cell 樹状細胞
DDB	DNA damage-binding protein 損傷 DNA 結合タンパク
DMSO	Dimethyl sulfoxide ジメチルスルホキシド
Dex	Dexamethasone デキサメタゾン
EC ₁₅₀	Effective concentration at 150% 150%有効濃度
EC ₅₀	Effective concentration at 50% 50%有効濃度
ECG	Electrocardiogram 心電図
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay エンザイムイムノアッセイ (酵素免疫測定法)
FGFR	Fibroblast growth factor receptor 線維芽細胞増殖因子受容体
FIt	FMS-like tyrosine kinase FMS 様チロシンキナーゼ
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor 顆粒球コロニー刺激因子
GLP	Good Laboratory Practice 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HbA	Adult hemoglobin 成人ヘモグロビン
HbF	Fetal hemoglobin 胎児ヘモグロビン
HbS	Sickle cell hemoglobin, 鎌状赤血球ヘモグロビン
HEK	Human embryonic kidney ヒト胎児腎臓細胞
HEKn	Human epidermal neonatal keratinocytes ヒト新生児表皮角化細胞
hERG	Human ether-a-go-go-related gene ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC ₂₅	Concentration of drug producing 25% inhibition 25%阻害濃度
IC ₅₀	Concentration of drug producing 50% inhibition 50%阻害濃度
Ig	Immunoglobulin 免疫グロブリン
IL	Interleukin インターロイキン
IMiD	A proprietary series of drugs with immunomodulatory and other properties 免疫調節薬
IFN	Interferon インターフェロン
LPS	Lipopolysaccharide リポ多糖
MCP	Monocyte chemoattractant protein 単球遊走因子
MDS	Myelodysplastic syndromes 骨髄異形成症候群
MEK	Mouse epidermal keratinocytes マウス表皮角化細胞
MIP	Macrophage inflammatory protein マクロファージ炎症性タンパク
MM	Multiple myeloma 多発性骨髄腫
MVD	Microvessel density 微小血管密度
NHL	Non-Hodgkin's lymphoma 非ホジキンリンパ腫

略 号	説 明
NK	Natural killer ナチュラルキラー
NOEL	No-observed-effect level 無影響量
NOD	Non Obese Diabetes 非肥満性糖尿病
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell 末梢血単核球
PG	Prostaglandin プロスタグランジン
PHA	Phytohaemagglutinin フィトヘマグルチニン
QTc	Corrected QT interval 補正 QT 間隔
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted 血小板や T 細胞由来の好酸球走化性物質
SCF	Stem cell factor 幹細胞因子
SCID	Severe combined immunodeficiency 重症複合免疫不全
SD	Sprague-Dawley
siRNA	Small interfering RNA 低分子干渉 RNA
α -SMA	Alpha-smooth muscle actin α 平滑筋アクチン
SSc	Systemic sclerosis 全身性強皮症
Th1	T helper cell type 1 1 型ヘルパー T 細胞
Th2	T helper cell type 2 2 型ヘルパー T 細胞
TLR	Toll-like receptor Toll 様受容体
TNF	Tumor necrosis factor 腫瘍壊死因子
UVB	Ultraviolet B 紫外線 B 波
VEGF	Vascular endothelial growth factor 血管内皮細胞増殖因子
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor 血管内皮細胞増殖因子受容体

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ボマリドミド（開発番号：CC-4047，ラセミ体）はサリドマイドの構造類似体であり，IMiD[®]化合物として知られる免疫調節薬に属する新規化合物である。

2.6.2.2 項『効力を裏付ける試験』では，造血器腫瘍の治療に関連したボマリドミドの薬理作用に焦点をあて，また 2.6.2.3 項『副次的薬理試験』では，固形腫瘍，非腫瘍性の血液・造血性疾患及び自己免疫性炎症性疾患の治療に関連したボマリドミドの薬理作用に焦点をあてた。ボマリドミドを用いた安全性薬理試験は，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice, GLP）の遵守下で実施し，その結果を 2.6.2.4 項『安全性薬理試験』に記載した。さらに，デキサメタゾン（Dexamethasone, Dex）との併用効果を検討し，2.6.2.5 項『薬力学的薬物相互作用』に記載した。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

2.6.2.1.1.1 *in vitro* 試験

2.6.2.1.1.1.1 分子作用機序

ボマリドミドは，多発性骨髄腫（Multiple myeloma, MM）細胞に対する直接的な抗腫瘍作用，並びに T 細胞及びナチュラルキラー（Natural killer, NK）細胞性免疫に対する直接的な免疫調節作用を併せ持つ。MM 細胞及び T 細胞を用いた *in vitro* 試験の結果から，ボマリドミドの持つ多面的な作用機構の一部が明らかになった。

ボマリドミドは，ユビキチン E3 リガーゼ複合体の構成タンパクである CRBN（別名 Cereblon）を標的分子とし，結合により分子機能を阻害する。さらに，CRBN の発現量が MM 細胞のボマリドミド感受性に重要であることも明らかにした [報告書番号 DM2528]。

2.6.2.1.1.1.2 腫瘍細胞増殖阻害作用

ボマリドミドは，MM 細胞に対して細胞増殖を阻害（G1 期細胞周期停止），さらに細胞死を誘導した [報告書番号 5286-186；報告書番号 1110-038]。また MM 細胞（H929 細胞）に対するボマリドミドの最大の細胞増殖阻害活性は，48 時間以上の処理により得られた [報告書番号 5710-048]。さらに，レナリドミドに耐性を示す細胞を調製し（H929 細胞及び KMS-12-BM 細胞を使用）ボマリドミドを作用させたところ，増殖阻害が認められた [報告書番号 1785-4047; 報告書番号 7596-01]。

急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia, AML）細胞（HNT-34, KG-1a, MOLM-13, OCI-AML3, THP-1, HL-60, KASUMI-3），骨髄異形成症候群（Myelodysplastic syndromes, MDS）細胞（MDS-L）及び MM 細胞（U266）に対しボマリドミドを作用させた結果，AML 細胞では HL-60, KG-1a 及び OCI-AML3 細胞で細胞障害が認められた（それぞれの細胞の生存率は 70%未満）。また，MDS-L 細胞及び U266 細胞に対する効果はさらに強く，生存率はそれぞれ 40.05%及び 20.84%であった。なお，CRBN の発現量とボマリドミドに対する感受性との間に明らかな相関性は認められなかった [報告書番号 SF-ALM-0012]。

5 番染色体長腕部 (5q) 欠損とボマリドミドに対する感受性との関連性を検討するため、5q 欠損型の Namalwa 細胞 (バーキットリンパ腫細胞) 及び KG-1 細胞 (AML 細胞) に対するボマリドミドの細胞増殖阻害作用を評価した。また、Namalwa 細胞及び KG-1 細胞の対照として、それぞれ MUTZ-5 細胞 (急性リンパ芽球性白血病細胞; 5 番染色体正常) 及び UT-7 細胞 (AML 細胞; 5q13 遺伝子座欠損) を用いた。その結果、ボマリドミドは 5q 欠損型の Namalwa 細胞及び KG-1 細胞に対し増殖阻害活性を示したが、それぞれの対照である MUTZ-5 細胞及び UT-7 細胞の増殖に対しては効果を示さなかった [報告書番号 5232-59-76]。

2.6.2.1.1.1.3 免疫調節作用

ボマリドミドは、CD3 抗体で刺激した CD4⁺T 細胞でのインターフェロン (Interferon, IFN) - γ , インターロイキン (Interleukin, IL) -2 及び血小板や T 細胞由来の好酸球走化性物質 (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES) の産生を促進し、IL-10 の産生を抑制することで T 細胞活性を増強した [報告書番号 PD365; 報告書番号 5043-152-5119-172]。またボマリドミドは、フィトヘマグルチニン (Phytohaemagglutinin, PHA) 又はコンカナバリン A (Concanavalin A, Con A) で刺激したヒト末梢血中 T 細胞での IL-2 産生も促進した [報告書番号 5304-79; 報告書番号 5197-189-5226-016]。さらに、IL-2 の産生促進は CD4⁺ 及び CD8⁺T 細胞の両サブセットでも認められた (Schafer, 2003)。ボマリドミドは、CD3 抗体で刺激したヒト末梢血での 1 型ヘルパー T 細胞 (T helper cell type 1, Th1) 性サイトカイン [顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), IFN- γ , 腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) - α 及び IL-2] 産生を促進し、その作用は 0.029~0.116 $\mu\text{mol/L}$ の範囲で濃度依存的であった。またボマリドミドは、IL-10 以外の 2 型ヘルパー T 細胞 (T helper cell type 2, Th2) 性サイトカイン (IL-4, IL-5 及び IL-13) 産生を有意に促進した [報告書番号 7596-09]。さらにボマリドミドは、Th1 分化のマスター転写因子である T-bet の発現を促進させることを明らかにした。この結果、IFN- γ , TNF- α 及び IL-12R β 2 の産生が促進され、Th1 細胞へ分化誘導すると考えられる [報告書番号 PD522]。

ヒト末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 共培養系を用いた試験から、ボマリドミドが様々な腫瘍細胞に対して NK 細胞介在性の細胞障害を促進することが示された [報告書番号 PD465; 報告書番号 PD466; 報告書番号 PD467; 報告書番号 PD468; 報告書番号 PD469]。

さらにボマリドミドは、腫瘍特異表面抗原に対する抗体治療薬との併用により、標的腫瘍細胞に対する抗体依存性細胞障害 (Antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 活性を促進することが示唆された [報告書番号 5422-8-CC-4047]。

2.6.2.1.1.1.4 血管新生阻害作用

ヒト臍帯動脈リング標本を用いた試験でボマリドミドは、微小血管形成を有意かつ用量依存的に阻害した (IC_{50} 値: 0.33 $\mu\text{mol/L}$) [報告書番号 5071-180; 報告書番号 5127-132]。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) を用いた細胞浸潤試験 (フィブロネクチン・コート系) から、血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF),

塩基性線維芽細胞増殖因子 (Basic fibroblast growth factor, bFGF) 及び TNF- α による血管内皮細胞の浸潤が、ボマリドミドにより抑制されることが明らかとなった[報告書番号 5239-92-5239-188]。

2.6.2.1.1.1.5 赤血球及び顆粒球前駆細胞に対する作用

ヒト正常骨髄由来の低密度骨髄細胞を用いた試験でボマリドミドは、ヒト赤血球前駆細胞 [赤芽球バースト形成細胞 (Burst-forming unit-erythroid, BFU-E), 赤芽球コロニー形成細胞 (Colony forming unit-erythroid, CFU-E)] の増殖を阻害したが (IC₅₀ 値: 0.07 μ mol/L), 顆粒球コロニー形成細胞 (Colony forming unit-granulocyte, monocyte, CFU-GM) の増殖には影響しなかった。またボマリドミドは、初期段階の巨核球コロニー形成細胞 (Colony forming unit-megakaryocyte, CFU-MK) の増殖を 1.0 及び 10 μ mol/L で有意に阻害したが, IC₅₀ 値は 10 μ mol/L を超えた [報告書番号 CGN-04]。異なる 3 例のドナーから採取した正常骨髄細胞を用いた別試験でボマリドミドは, 3 例中 1 例のサンプルで初期段階の CFU-MK の増殖を有意に阻害した (IC₅₀ 値: 0.35 μ mol/L) [報告書番号 CLG-10]。

さらに、ヒト骨髄由来 CD34⁺造血幹細胞を用いた試験でボマリドミドは、初期段階の造血幹細胞 (CD34⁺CD38⁻) を増加させ、CD34⁺細胞の樹状細胞への分化を阻害、顆粒球細胞系への分化を促進した [報告書番号 1110-028]。

2.6.2.1.1.1.6 サイトカイン産生制御作用

ボマリドミドは、リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) で刺激したヒト PBMC での IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , 単球遊走因子 (Monocyte chemoattractant protein, MCP) -1, マクロファージ炎症性タンパク (Macrophage inflammatory protein, MIP) -1 α 等の炎症性サイトカインやケモカインの産生を阻害し、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生を促進した [報告書番号 5374-10; 報告書番号 PD365]。別試験でもボマリドミドは、LPS 刺激ヒト PBMC での顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 産生を阻害し、IL-10 産生を濃度依存的に促進した [報告書番号 5127-53]。

ラット及びヒトから採取したヘパリン処理末梢血 (粗血球群) に対しボマリドミドは、LPS 刺激による TNF- α 産生を濃度依存的に阻害した (ラット IC₅₀ 値: 12 μ mol/L; ヒト IC₅₀ 値: 0.14 μ mol/L)。特にヒト末梢血に対する TNF- α の産生阻害活性は、ラットに対する活性と比較し約 86 倍強いものであった [報告書番号 5196-175]。

2.6.2.1.1.1.7 シクロオキシゲナーゼ発現阻害作用

ボマリドミドは、LPS で刺激した PBMC でのシクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase, COX) -2 発現 (10 μ mol/L で 64%阻害) 及びプロスタグランジン (Prostaglandin, PG) E2 産生 (IC₅₀: 50 μ mol/L) を阻害した [報告書番号 5197-130]。またボマリドミドは、COX-2 mRNA の安定性維持を阻害することで、COX-2 の発現そのものを抑制していることが示唆された [報告書番号 5116-86]。

一方ボマリドミドは、COX-1 及び COX-2 いずれの酵素活性も阻害しなかった [報告書番号 5116-86]。

2.6.2.1.1.1.8 正常 B 細胞に対する作用

ポマリドミドは、B 細胞抗原受容体 (B cell antigen receptor, BCR) や CD40 の刺激を介した CD69 及び Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) 9 の発現, TNF- α 及び IL-6 の産生並びに CD19⁺B 細胞の増殖を促進した [報告書番号 PD408]。またポマリドミドは、LPS や B 細胞活性化因子 (B cell activating factor, BAFF) で刺激した CD19⁺B 細胞の増殖も促進した。一方、CD19⁺B 細胞を IL-4 (及び CD40 抗体) で刺激した場合、ポマリドミドはシグナル伝達兼転写活性化因子 (Signal transducers and activator of transcription, STAT) 6 のリン酸化を抑制し、細胞増殖や IgG₁ 及び IgE を含む免疫グロブリンの産生を減少させた。

以上の結果より、ポマリドミドは B 細胞の活性化、増殖及びクラススイッチを惹起する様々な B 細胞刺激因子との併用で免疫調節作用を発揮すると考えられる。

2.6.2.1.1.1.9 ポマリドミド代謝物の薬理活性

ポマリドミドの代謝物である水酸化体、加水分解物及び N-アセチル化体の MM 細胞増殖, T 細胞での IL-2 産生及び LPS 刺激 PBMC での TNF- α 産生に対する効果を検討し、ポマリドミドと比較した。その結果、いずれの代謝物も MM 細胞増殖に対する阻害活性並びに T 細胞及び PBMC に対する免疫調節活性は、ポマリドミド本体と比較して非常に弱いものであった。したがって、ポマリドミドの薬理活性に代謝物は関与しないと考えられる [報告書番号 7600-025]。

2.6.2.1.1.2 *in vivo* 試験

各種腫瘍細胞を移植したマウスにポマリドミドを腹腔内又は経口投与したところ、抗腫瘍活性、血管新生阻害活性及び生存期間延長活性が認められた。

MM 細胞 (レナリドミド感受性又は耐性 H929 細胞) を移植した重症複合免疫不全 (Severe combined immunodeficiency, SCID) マウスに対しポマリドミド (0.003~10 mg/kg/day) を経口投与した結果、両系統 (レナリドミド感受性及び耐性 H929 細胞移植マウス) で用量依存的な抗腫瘍活性が認められた。感受性細胞移植マウスでは 0.1 mg/kg, 耐性細胞移植マウスでは 3 mg/kg を、1 日 1 回 14 日間経口投与することで、腫瘍体積がそれぞれ 41.5%及び 37.9%減少した [報告書番号 AP3975/4416/4462/4479/4524]。また、各種 MM 細胞 (LAG κ -1A, LAG κ -1B 又は LAG λ -1) を SCID マウスに移植し、ポマリドミド (0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg, 経口投与) の効果を検討した結果、LAG κ -1B 及び LAG λ -1 細胞移植マウスでは、いずれも有意な効果が認められなかった。また、LAG κ -1A 細胞を移植したマウスにポマリドミド 10 mg/kg を投与すると、腫瘍体積減少及び IgG 量の低下傾向が認められたが、これらの効果は溶媒投与群と比較して統計学的に有意ではなかった [報告書番号 IMBCR-03162010]。

Hs Sultan 細胞 (バーキットリンパ腫細胞) を移植した beige-nude-xid (BNX) マウスでポマリドミド (50 mg/kg/day, 腹腔内投与) は、抗腫瘍活性及び血管新生阻害活性を示した (Lentzsch, 2003)。また、Raji 細胞 (バーキットリンパ腫細胞) を移植した SCID マウスでは、ポマリドミドの投与 (0.5 mg/kg 腹腔内投与又は 0.5 及び 5 mg/kg 経口投与) により、生存期間の延長が認められた [報告書番号 CLG-4 Raji B-e200 ; Hernandez-Ilizaliturri, 2005]。さらに、ポマリドミドとリツキシマブ

との併用投与により、同マウスの生存期間がリツキシマブ単独と比較して有意に延長した (Hernandez-Ilizaliturri, 2005)。

白血病患者由来のリンパ球性白血病細胞を移植した非肥満性糖尿病 (Non Obese Diabetes, NOD) /SCID マウスでポマリドミド (50 mg/kg/day, 腹腔内投与) は、抗腫瘍活性及び血管新生阻害活性を示した (Shalapour, 2006)。

マウス Matrigel plug アッセイを用い、ポマリドミドの *in vivo* 微小血管形成阻害効果を評価した結果、ポマリドミド (30 mg/kg/day, 経口投与) は血管新生を有意に阻害した [報告書番号 SRI-P10.0101]。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

固形腫瘍、非腫瘍性の血液・造血器疾患、皮膚線維化、内皮前駆細胞の分化、自己免疫性炎症性疾患、ミクログリア及びアストロサイトでのサイトカイン産生並びに紫外線 B 波 (Ultraviolet B, UVB) 照射によるケラチノサイトでの TNF- α 産生に対するポマリドミドの効果を評価した。

乳がん細胞 6 種 (SKBR3, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 及び BT-474) 及び肺がん細胞 (非小細胞性) 2 種 (NCI-H460 及び A549) を用いて検討した結果、ポマリドミドは乳がん細胞 2 種 (MDA-MB-468 及び MCF-7) に対し、造血器腫瘍細胞と比較すると感受性は低いものの、細胞増殖阻害活性を示した。他の細胞に対する IC₅₀ 値は、> 100 μ mol/L であった [報告書番号 PD385]。また、5q 欠損型の固形腫瘍細胞 5 種 (PC-3, HN, LCLC103H, SW480 及び SK-MES-1) では、ポマリドミド 100 μ mol/L までの濃度で明らかな増殖阻害は認められなかった [報告書番号 5286-14]。

CD34⁺細胞の赤血球分化実験系を用い、胎児ヘモグロビン (Fetal hemoglobin, HbF) 産生促進に対するポマリドミドの効果を検討した。その結果、ポマリドミドは HbF 発現を濃度依存的に促進し、赤血球生成を制御することが示された。したがって、ポマリドミドが鎌状赤血球症や β -サラセミアに関連する疾患に対する予防又は治療に有効である可能性が示唆される [報告書番号 1200-066]。

また 2 種類の皮膚線維化モデルを用い、ポマリドミドの効果を検討した。ブレオマイシン誘発性皮膚線維症モデルでポマリドミド (3 及び 30 mg/kg/day, 経口投与) は、強力な抗線維化効果を発揮した。さらに、線維化の進行を抑制するだけでなく、既に発症している線維化をも退縮させた [報告書番号 UEN11162010JD]。また、全身性強皮症モデル動物である Tsk-1 マウスを用いた試験でポマリドミド (0.3, 3 及び 30 mg/kg, 経口投与) は、皮膚肥厚を減少させるだけでなく、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を抑制し、皮膚中のヒドロキシプロリン量を減少させた [報告書番号 UEN07052012JD]。

血管内皮前駆細胞の分化に対するポマリドミドの効果を検討した。その結果、ポマリドミドは CD133⁺造血幹細胞の血管内皮細胞系列への分化を亢進した [報告書番号 2231-24]。

ポマリドミドの抗炎症効果を、カラゲニン誘発性痛覚過敏足浮腫ラットモデルを用いて検討した結果、ポマリドミド (50 mg/kg, 腹腔内投与) は足浮腫に対して有効であった。しかしながら、熱性及び機械的刺激による痛覚過敏に対しては、明らかな効果が認められなかった [報告書番号 1270RC35.001]。

中枢神経系疾患を対象とし、グリア細胞でのサイトカイン産生に対するポマリドミドの効果を検討した。ポマリドミドは、IL-1 β で刺激したヒトアストロサイトでの RANTES 産生を促進し、LPS で刺激したヒトミクログリアでの TNF- α 産生を阻害した [報告書番号 PD444]。また、LPS で刺激したマウスミクログリアでの IL-6、TNF- α 及び RANTES 産生、並びに TNF- α ・IFN- γ の共刺激によるヒトアストロサイトでの IL-6 及び RANTES 産生のいずれも阻害した [報告書番号 5572-001]。

ポマリドミド (0.1 及び 1 μ mol/L) は、UVB 照射によるケラチノサイトでの TNF- α 産生を阻害した [報告書番号 5448-74]。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験を実施し、中枢神経系、ヒト ether a go go 関連遺伝子 (human ether-a-go-go-related gene, hERG) カリウムチャンネル電流、循環器系 (心機能及び血行動態評価を含む) 及び呼吸器系に対するポマリドミドの影響を検討した。

ポマリドミド (250, 1000 及び 2000 mg/kg) を経口投与しても、雌雄ラットの行動、自律神経性機能、外観及び握力に対し、有害な影響は認められなかった。したがって、本試験での無影響量 (No-observed-effect level, NOEL) は最高投与量である 2000 mg/kg と判断した [報告書番号 CC-4047-TOX-011]。

hERG チャンネルを発現するヒト胎児腎臓細胞 (Human embryonic kidney, HEK) -293 細胞をポマリドミドで処理したとき、最大 87.5 μ mol/L までの濃度で統計学的に有意な hERG 電流の阻害は認められなかった。この結果から、*in vitro* でポマリドミドが心筋遅延整流性カリウムイオンチャンネル電流を阻害することで心筋細胞の電気生理学的機能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた [報告書番号 CC-4047-TOX-009]。

さらに、雌雄の麻酔イヌにポマリドミド (2.5, 10 及び 25 mg/kg) を静脈内投与したとき、補正 QT 間隔 (Corrected QT interval, QTc) に影響は認められなかったが、25 mg/kg 群の 4 匹中 1 匹で呼吸数及び血圧に変化が認められた。したがって、本試験での NOEL は 10 mg/kg と判断した [報告書番号 1398/110-D6146]。

テレメトリーを装着した覚醒雄サルを用いた試験では、ポマリドミド (0.2, 2.0 及び 10 mg/kg) を経口投与しても、血管系、心電図 (Electrocardiogram, ECG) で評価した心機能系、血行動態パラメータ及び呼吸器系に影響は認められなかった [報告書番号 CC-4047-TOX-012]。

また雄ラットを用い、呼吸器系 (呼吸数、1 回換気量、分時換気量) に対する影響を検討した結果、ポマリドミド (250, 1000 及び 2000 mg/kg, 経口投与) による有害な影響は認められなかった。したがって、本試験での NOEL も最高投与量である 2000 mg/kg と判断した [報告書番号 CC-4047-TOX-014]。

2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験

各種 MM 細胞に対し、Dex 併用下でのポマリドミドによる細胞増殖及びシグナル伝達に対する効果を検討した結果、H929, LP-1 及び OPM-2 細胞に対し、ポマリドミドと Dex との併用で相乗的な増殖阻害が認められた [報告書番号 7609-111]。また Dex との相乗効果は、レナリドミドに耐

性を有する MM 細胞でも認められている [報告書番号 1785-4047 ; 報告書番号 DM2775-49 ; 報告書番号 7596-01]。さらにこれらの試験では、細胞死や細胞増殖に関与する因子の解析も行なわれている。ポマリドミドと Dex との併用により、癌遺伝子 c-Myc 及び骨髓腫細胞生存因子 IRF-4 の発現低下に加え、細胞周期停止に関与する反応 (Rb のリン酸化抑制, p21^{WAF1} 及び p27^{Kip1} の発現増加) や細胞生存活性に対する阻害反応 (細胞死抑制因子 Bcl-2 及び Survivin の発現低下や細胞死促進因子 Bim の発現増加) で相乗効果が認められている。

H929 細胞 (レナリドミド感受性又は耐性 MM 細胞) 移植 SCID マウスに対し、Dex とポマリドミドの併用効果を検討した結果、レナリドミド耐性 H929 細胞を移植したマウスでは、ポマリドミド (3 mg/kg) と Dex (5 mg/kg) の併用投与による相乗効果が認められた [報告書番号 AP3975/4416/4462/4479/4524]。

MM 細胞移植 SCID マウスを用いて、ポマリドミド単独あるいはポマリドミドと Dex 又はボルテゾミブとの併用投与による MM.1S 細胞増殖に対する効果を検討した結果、ポマリドミドの抗腫瘍活性は、ボルテゾミブ併用、Dex 併用又は Dex とボルテゾミブの両併用によりさらに増強した [報告書番号 SALA-151008]。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *in vitro* 試験

2.6.2.2.1.1 分子作用機序

[報告書番号 [DM2528](#), 添付資料 4.2.1.1.1, 評価資料]

ポマリドミドを含む IMiD 化合物は、主に 2 つの作用機序により抗腫瘍効果を発現する。1 つは MM 細胞に対する直接的な抗腫瘍活性であり、もう 1 つは T 細胞性及び NK 細胞性の免疫反応に対し直接的に作用する免疫調節活性である。このようにポマリドミドは、MM 細胞や免疫エフェクター細胞を含む様々なタイプの細胞に対し多彩な作用を示すことから、複数の標的分子が存在し、様々な細胞内シグナル伝達経路（特に、腫瘍細胞の細胞周期停止、細胞死誘導及び免疫エフェクター細胞の活性化に関わる細胞内シグナル伝達経路）に影響することが示唆される。

ゼブラフィッシュ胚及びニワトリ胚を用いた研究から、サリドマイドの催奇形性に関与する因子として、CRBN（別名 Cereblon）が同定された。CRBN は、損傷 DNA 結合タンパク（DNA damage-binding protein, DDB）1, cullin4 及び Roc1 タンパクとともにユビキチン E3 リガーゼ複合体を形成する。サリドマイドは CRBN に結合することにより、この複合体のユビキチンリガーゼ活性を阻害する（[Ito, 2010](#)）。本試験では、ポマリドミドと CRBN の結合親和性及びポマリドミドの細胞増殖阻害作用に対する CRBN の関与を検討した。

[方法]

グルタルイミド骨格を持つサリドマイド構造類似体（ポマリドミド、レナリドミド）、及びグルタルイミド骨格を持たないフタルイミドの CRBN に対する親和性を 2 種類の実験手技で検討した（ただし、フタルイミドに関しては蛍光熱シフトアッセイ法のみ実施した）。ヒト組換え体 CRBN-DDB1（複合体）に対する親和性を蛍光熱シフトアッセイ法で解析し、MM 細胞（U266）の内在性 CRBN に対する親和性を化合物にビーズを付加したもの（プローブ）を用い、最終的には免疫ブロット法（Immunoblotting analysis）で解析した。また、H929 細胞をレナリドミド（1～10 $\mu\text{mol/L}$ ）存在下、DF15 細胞をポマリドミド（0.1～100 $\mu\text{mol/L}$ ）存在下で長期間培養することにより各薬剤抵抗性細胞を調製し、U266、レナリドミド耐性 H929 及びポマリドミド耐性 DF15 細胞での CRBN 発現量を測定した。さらに、CRBN に対する低分子干渉 RNA (Small interfering RNA, siRNA) を用いて CRBN 発現量を一過的に減少させた U266 細胞に対し、増殖及び遺伝子発現に対するポマリドミドの影響を検討した。加えて、CRBN siRNA を導入した T 細胞に対し、サイトカイン産生に対するポマリドミドの作用を検討した。

[結果]

ポマリドミド及びレナリドミドは、ヒト組換え体 CRBN-DDB1 に対し、同程度の親和性で結合した（いずれも IC_{50} 値：約 3 $\mu\text{mol/L}$ ）が、フタルイミドは結合を示さなかった。またポマリドミド及びレナリドミドは、U266 細胞中の CRBN にも同程度の親和性で結合し、 IC_{50} 値はそれぞれ 2.1 及び 2.3 $\mu\text{mol/L}$ であった。したがって、CRBN との結合にはグルタルイミド骨格が必須であることが示唆された。

CRBN siRNA を導入した U266 細胞では、CRBN 発現量の減少に応じてボマリドミドの細胞増殖阻害活性が減弱した。また CRBN siRNA は、ボマリドミドによる遺伝子・タンパク発現変動を抑制した。レナリドミド耐性 H929 細胞では、CRBN の発現量が低下していた。このレナリドミド耐性 H929 細胞に対して、ボマリドミドは若干有効性が低下したものの、明らかな増殖阻害性を示した。一方レナリドミドは、ボマリドミド耐性 DF15 細胞に対して増殖阻害作用を示さず、同細胞では CRBN が検出されなかった。さらに、CRBN siRNA を導入した活性化ヒト T 細胞では、ボマリドミドによる IL-2 及び TNF- α の産生促進が著しく低下した。

[小括]

CRBN siRNA 導入により CRBN の発現が減少した U266 細胞は、ボマリドミドへの感受性が減弱したことから、MM 細胞内の CRBN 発現量がボマリドミドの活性に重要である可能性が強く示唆された。

また、活性化 T 細胞による腫瘍認識には IL-2 及び TNF- α が重要であり、ボマリドミドはこれらサイトカインの産生を促進するが、CRBN の発現を減少させた活性化ヒト T 細胞では、ボマリドミドに対する反応性 (IL-2 及び TNF- α 産生促進) が低下していた。したがって、ボマリドミドの免疫調節活性の一部に CRBN が関与していると考えられる。

レナリドミドの臨床上の問題として、時間の経過に伴う同剤への耐性が挙げられる。本試験でも、レナリドミド存在下で長期間培養した H929 細胞がレナリドミド耐性を獲得した。同細胞では、CRBN の発現量が減少している。しかし、そのようなレナリドミド耐性 H929 細胞に対しても、ボマリドミドは明かな増殖阻害活性を有する。なお、レナリドミド及びボマリドミドの両方に耐性を示すボマリドミド耐性 DF15 細胞では、CRBN が検出されなかった。

以上の結果は、IMiD 化合物の細胞増殖阻害活性に CRBN が重要であることを裏付けるものである。

一方、CRBN の発現量が低下した細胞に対しても、ボマリドミドは依然として有効性を示す。この理由は明らかになっていない。CRBN は、ボマリドミドの薬効発現に重要な因子ではあるが、あくまで作用機序の一端を担う因子であり、活性に関与する別の因子の存在が十分に考えられる。

2.6.2.2.1.2 腫瘍細胞増殖阻害作用

2.6.2.2.1.2.1 MM 細胞

2.6.2.2.1.2.1.1 各種 MM 細胞での増殖阻害作用

[報告書番号 5286-186, 添付資料 4.2.1.1.2, 評価資料]

[報告書番号 1110-038, 添付資料 4.2.1.1.3, 評価資料]

[論文: Hideshima, 2000, 添付資料 4.3.8, 参考資料]

[方法]

線維芽細胞増殖因子受容体 (Fibroblast growth factor receptor, FGFR) 3 の遺伝子型が異なる 3 種類の MM 細胞である H929 (野生型 FGFR3), OPM-2 (FGFR3 恒常的活性型変異体), LP-1 (FGFR3 非恒常的活性型変異体), 並びに FGFR3 欠損 MM 細胞 (RPMI-8226) を、0.0001~100 $\mu\text{mol/L}$ のボマリドミドで 72 時間処理した。処理後、 ^3H -チミジンを添加し (6 時間), チミジン取り込みを

指標に細胞増殖を評価し、ボマリドミドの細胞増殖阻害率を算出した〔報告書番号 5286-186〕。なお、MM 細胞 (MM.1S) 及びバーキットリンパ腫細胞 (Hs Sultan) をボマリドミド存在下で 48 時間処理した同様の試験結果は、論文 (Hideshima, 2000) として公表されている。

また、12 種類の MM 細胞 (Arp-1, U266, Norway U266, UUN, ARK, CAG, DF-15, H929, RPMI-8226, ANBL-6, W182, MM.1S) を 1 $\mu\text{mol/L}$ のボマリドミド存在下で 2~4 日間処理し、細胞増殖、G1 期細胞周期停止及び細胞死誘導に対する活性を評価した〔報告書番号 1110-038〕。

[結果]

それぞれ異なる FGFR3 遺伝子型を有する H929, OPM-2 及び LP-1 並びに FGFR3 を欠損した RPMI-8226 細胞をボマリドミド存在下で 72 時間処理した結果、いずれの細胞でも細胞増殖が阻害された。この時、ボマリドミドに対する感受性の程度は、H929 > LP-1 > RPMI-8226 > OPM-2 の順であった (表 2.6.2-1)〔報告書番号 5286-186〕。特に、H929 細胞 (野生型) 及び LP-1 細胞 (FGFR3 非恒常的活性型変異体) に対するボマリドミドの感受性は、RPMI-8226 細胞 (FGFR3 欠損変異体) と比較してそれぞれ 70 倍及び 28 倍高かった。また、MM.1S 細胞及び Hs Sultan 細胞もボマリドミド処理により増殖が阻害された (Hideshima, 2000) (表 2.6.2-1)。

表 2.6.2-1 ボマリドミドの MM 細胞増殖阻害活性

MM 細胞	H929 (野生型 FGFR3) ^a	LP-1 (FGFR3 非恒常的活性 型変異体) ^a	OPM-2 (FGFR3 恒 常的活性型変 異体) ^a	RPMI-8226 (FGFR3 欠 損変異体) ^a	MM.1S MM 細胞 ^b	Hs Sultan バーキットリ ンパ腫細胞 ^b
IC ₅₀ 値 ($\mu\text{mol/L}$)	0.02	0.05	3.4	1.4	0.01~0.1	0.1

a : 報告書番号 5286-186 (Table 1 より抜粋) での結果

b : 論文 (Hideshima, 2000) での報告

また、試験に供した 12 種類の MM 細胞のうち 3 種類の MM 細胞 (DF-15, H929 及び MM.1S) でボマリドミドによる G1 期細胞周期停止及び細胞死誘導が認められた。ボマリドミド処置後 2 日以内に G1 期で細胞周期が停止、3 日以内に細胞死が誘導され、その効果は処置後 4 日目に最大に達した〔報告書番号 1110-038〕。G1 期の細胞周期停止は、サイクリン依存性キナーゼ (Cyclin dependent kinase, CDK) 分子種のうち、CDK4 及び CDK6 の減少並びに Rb リン酸化の抑制と関連する。

2.6.2.2.1.2.1.2 MM 細胞での処理時間と細胞増殖阻害作用との関係

[報告書番号 5710-048, 添付資料 4.2.1.1.4, 評価資料]

[方法]

ボマリドミドの処理時間と細胞増殖阻害活性の関係を明確にする目的で試験を実施した。MM 細胞 (H929) をボマリドミド 0.0001~10 $\mu\text{mol/L}$ で処理、本試験での全処理時間を 72 時間とし、処理開始後 6, 24, 28, 32, 48, 52 又は 72 時間後に培養培地へ交換した。処理開始 72 時間後、[³H]-チミジンを添加し (取り込み処理時間は 6 時間)、チミジンの取り込みを指標に細胞増殖を評価し、ボマリドミドの細胞増殖阻害率を算出した。

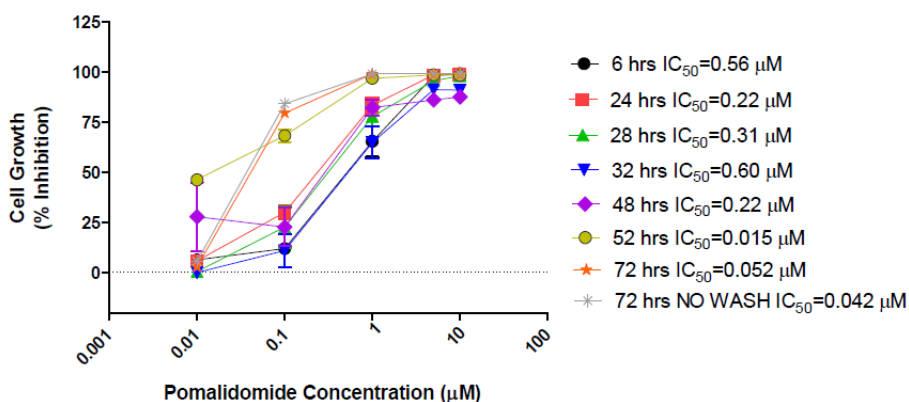
[結果]

結果を図 2.6.2-1 に示す。

ポマリドミドは、48 時間以上の処理で強い増殖阻害活性を示し、特に 52 及び 72 時間の処理で最大の増殖阻害活性を示した。

図 2.6.2-1 H929 細胞でのポマリドミドの処理時間と細胞増殖阻害活性

[報告書番号 5710-048 の Figure 3 より引用]



2.6.2.2.1.2.1.3 レナリドミド又はポマリドミド耐性 MM 細胞での増殖阻害作用

[報告書番号 1785-4047, 添付資料 4.2.1.1.5, 評価資料]

[報告書番号 7596-01, 添付資料 4.2.1.1.6, 評価資料]

[方法]

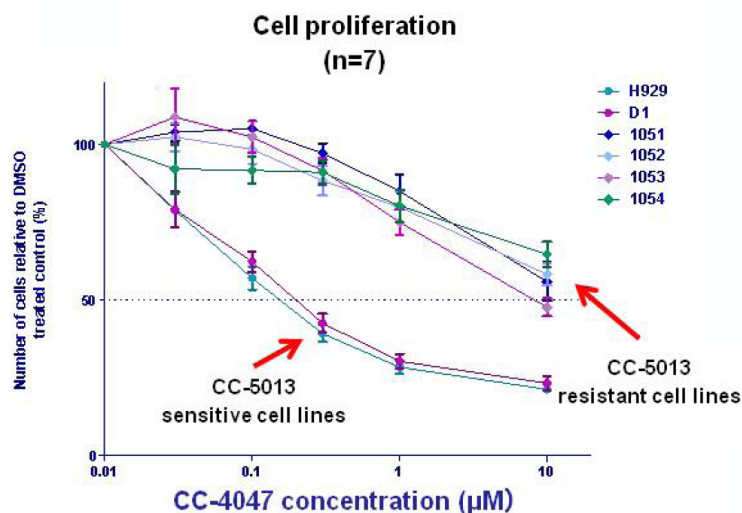
レナリドミドに耐性な MM 細胞 (H929) を調製し、ポマリドミドの効果を検討した [報告書番号 1785-4047]。本試験では、1~10 μmol/L のレナリドミド存在下で H929 細胞を 5 ヶ月間以上培養することにより、レナリドミド耐性 H929 細胞亜株 (1051, 1052, 1053 及び 1054 亜株) を獲得している。なお、H929 細胞親株及び 0.1%ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 存在下で同様に 5 ヶ月間以上培養した H929-D1 亜株はレナリドミドに感受性を示した。レナリドミド感受性及びレナリドミド耐性 H929 細胞をレナリドミド非存在下で 3~5 日間培養した後、ポマリドミド (0.01~10 μmol/L) で 5 日間処理し、処理後トリパンブルーで死細胞を判別して、細胞生存率を算出した。また、ポマリドミドによる細胞周期停止及び細胞死誘導を解析した (細胞周期及び細胞死関連因子の免疫ブロッティング)。

一方、別試験 [報告書番号 7596-01] では、MM 細胞 (KMS-12-BM 及び H929) をレナリドミド (1 μmol/L)、ポマリドミド (0.1 μmol/L) 又は DMSO (0.01%) のいずれかの薬剤 (溶媒) 存在下で 3 又は 4 ヶ月間継続培養し、1 ヶ月ごとに被験物質で 72 時間処理した際の IC₅₀ 値を算出、耐性獲得に要する時間を検討した。

[結果]

ポマリドミドは、レナリドミド感受性 H929 細胞 (IC_{50} 値: $0.2 \mu\text{mol/L}$) 及びレナリドミド耐性細胞 (1051 亜株: IC_{50} 値: $7.9 \mu\text{mol/L}$) のいずれでも、明かな増殖阻害活性を示した (図 2.6.2-2) [報告書番号 1785-4047]。

図 2.6.2-2 レナリドミド感受性及び耐性 H929 細胞でのポマリドミドの細胞増殖阻害作用



CC-4047: ポマリドミド, CC-5013: レナリドミド

H929, D1: レナリドミド感受性細胞

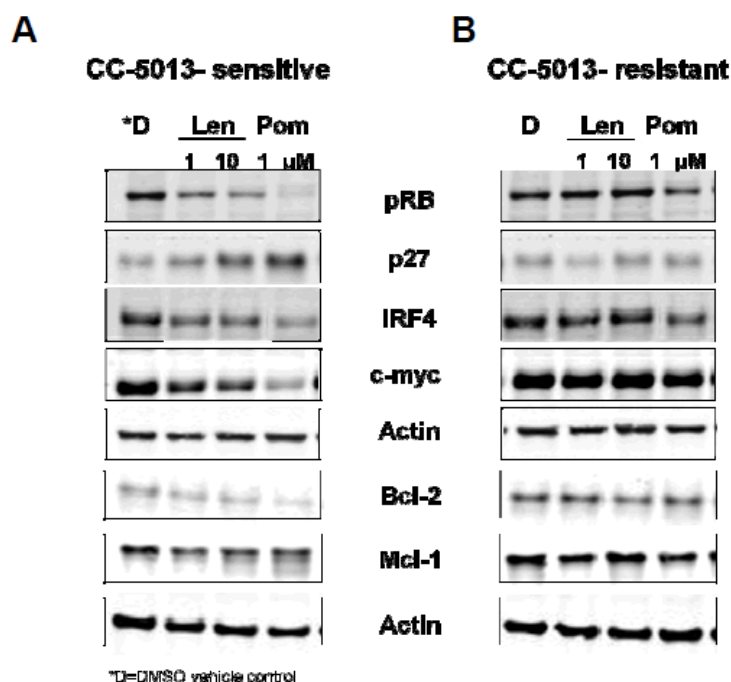
1051, 1052, 1053 及び 1054: レナリドミド耐性細胞亜株

[報告書番号 1785-4047 の Figure 3A より引用]

またポマリドミド処理により, Rb のリン酸化が低下 (G1 期細胞周期停止に関与), 細胞死抑制因子 (Bcl-2 や Mcl-1), 癌原遺伝子 (c-Myc) 及び骨髓腫細胞生存因子 IRF-4 の発現が減少し, 一方で細胞周期停止因子である p27^{Kip-1} の発現増加が認められた (図 2.6.2-3)。これらは, 程度が弱くなるものの, レナリドミドに耐性を有する細胞 (1051 亜株) でも同様に認められた。

近年, レナリドミドに対する耐性獲得の機序の 1 つとして, Wnt シグナル系が活性化することが報告された (Bjorklund, 2011)。したがって本試験でも, レナリドミド耐性 H929 細胞 (1051 亜株) での Wnt シグナル分子の状態やポマリドミド (単独又は Dex 併用) 処理による Wnt シグナル分子の変化を検討した。しかしながら, レナリドミド耐性 H929 細胞と対照細胞 (DMSO 処理 H929 細胞) との間で, β -catenin 及び GSK-3 α/β の発現量並びに GSK-3 α/β のリン酸化に変化は認められず, ポマリドミド処理を行っても, Wnt シグナル経路への影響は認められなかった。したがって, 少なくとも本試験での H929 細胞レナリドミド耐性獲得機序に Wnt シグナル系は関与しないと考えられた。

図 2.6.2-3 レナリドミド感受性及び耐性細胞での細胞周期及び細胞死に関連する因子に対するポマリドミドの作用



D : DMSO, CC-5013 及び Len : レナリドミド, Pom : ポマリドミド (1 μmol/L)

[報告書番号 1785-4047 の Figure 4 より引用]

耐性獲得時間を評価した別試験では、レナリドミド又はポマリドミドの存在下で培養した細胞は、いずれも早期にレナリドミド耐性 (IC₅₀ 値 : >100 μmol/L) を獲得した [報告書番号 7596-01]。一方、ポマリドミドに対する耐性獲得は、レナリドミドと比較し緩徐であった。(表 2.6.2-2)。

表 2.6.2-2 ポマリドミド又はレナリドミド存在下で培養した KMS-12-BM 細胞及び H929 細胞での両剤に対する耐性獲得に関する時間経過

	被験物質	感受性細胞	IC ₅₀ 値 (μmol/L)			
			1 カ月目	2 カ月目	3 カ月目	4 カ月目
レナリドミド耐性	レナリドミド	8.8	>100	>100	>100	NT
KMS-12-BM 細胞	ポマリドミド	0.56	12.3	4.9	5.7	NT
ポマリドミド耐性	レナリドミド	8.8	>100	48.2	>100	NT
KMS-12-BM 細胞	ポマリドミド	0.56	0.20	0.41	6.5	NT
レナリドミド耐性	レナリドミド	0.024	1.5	35.5	65.4	>100
H929 細胞	ポマリドミド	0.0026	0.089	2.1	0.82	11.3
ポマリドミド耐性	レナリドミド	0.024	0.66	60.5	40.4	>100
H929 細胞	ポマリドミド	0.0026	0.057	1.8	7.9	17.9

IC₅₀ 値 : 被験物質を 72 時間処置した際に細胞増殖を 50%阻害する濃度

NT : 実施せず

[報告書番号 7596-01 の Table 2~Table 5 より作成]

2.6.2.2.1.2.2 急性骨髄性白血病細胞

[報告書番号 SF-ALM-0012, 添付資料 4.2.1.1.7, 評価資料]

[方法]

各種 AML 細胞 (HNT-34, KG-1a, MOLM-13, OCI-AML3, THP-1, HL-60 及び KASUMI-3), MDS 細胞 (MDS-L) 及び MM 細胞 (U266) を溶媒又はポマリドミド (1 又は 10 μmol/L) 存在下

で10日間培養し、3日ごと（3、6及び9日目）に薬剤を添加した。培養開始から3、5、7及び10日目に細胞を回収し、細胞染色後、細胞の生死をVi-CELL XRを用いて解析、溶媒対照群に対するボマリドミド群の生存率を算出した。

また、CRBN発現量とボマリドミド処置によるAML細胞生存率との相関性を検討するため、AML細胞でのCRBN発現量を免疫プロット法で測定した。

[結果]

各細胞の生存率を表 2.6.2-3 に示す。AML細胞では、HL-60、KG-1a 及び OCI-AML3 細胞に対しボマリドミド（10 $\mu\text{mol/L}$ ）が細胞障害活性を示し、それぞれの細胞の生存率は70%未満であった。MDS-L細胞及びU266細胞に対するボマリドミドの活性はさらに強く、生存率はそれぞれ40.05%及び20.84%であった。なお、いずれの細胞でも、ボマリドミド1 $\mu\text{mol/L}$ と10 $\mu\text{mol/L}$ の作用に大きな差は認められなかった。

表 2.6.2-3 細胞生存率に対するボマリドミドの効果

		10日目の生存率（コントロール%）	
		ボマリドミド 1 $\mu\text{mol/L}$	ボマリドミド 10 $\mu\text{mol/L}$
AML 細胞	HL-60	61.00 $\pm$ 1.78	66.17 $\pm$ 2.25
	HNT-34	86.49 $\pm$ 4.14	84.79 $\pm$ 2.13
	KASUMI-3	73.49 $\pm$ 3.19	73.49 $\pm$ 10.17
	KG-1a	63.62 $\pm$ 4.95	64.74 $\pm$ 2.52
	MOLM-13	135.55 $\pm$ 9.38	134.64 $\pm$ 1.79
	OCI-AML3	77.63 $\pm$ 1.55	69.27 $\pm$ 2.44
	THP-1	75.06 $\pm$ 5.32	77.39 $\pm$ 5.33
MDS 細胞	MDS-L	43.72 $\pm$ 4.69	40.05 $\pm$ 2.01
MM 細胞	U266	29.69 $\pm$ 4.72	20.84 $\pm$ 1.50

平均値 $\pm$ 標準誤差

[報告書番号 SF-ALM-0012 Table 6 より引用]

各種AML細胞のCRBN発現量（内部標準 GAPDH）には、ばらつきが認められた。いくつかの細胞（HNT-34、KASUMI-3、KG-1a）ではCRBNの強い発現が認められたが、ほとんど発現していない細胞（HL-60、MOLM-13）も認められた。CRBN発現量とボマリドミド（1 $\mu\text{mol/L}$ ）処置10日目の細胞生存率との相関性を検討した結果、明らかな相関性は認められなかった（ $R^2 = 0.1626$ ）。

2.6.2.2.1.2.3 5q欠損型腫瘍細胞

[報告書番号 5232-59-76, 添付資料 4.2.1.1.8, 評価資料^{*}]

[方法]

5q欠損とボマリドミドに対する感受性との関連性を検討するため、5q欠損型のNamalwa細胞（バーキットリンパ腫細胞）及びKG-1細胞（AML細胞）に対するボマリドミドの細胞増殖阻害作用を検討した。なお、Namalwa細胞及びKG-1細胞の対照として、それぞれMUTZ-5細胞（急性リンパ芽球性白血病細胞；5番染色体正常）及びUT-7細胞（AML細胞；5q13遺伝子座欠損）を用いた。各種腫瘍細胞をボマリドミド（0.0001～100 $\mu\text{mol/L}$ ）存在下で72時間処理し、³H-チミ

^{*} レブラミド[®]カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

ジンを添加した後、さらに 6 時間処理した。チミジン取り込みを指標に細胞増殖を評価し、細胞増殖阻害率を算出した。

[結果]

5q を欠損した Namalwa 細胞の増殖はボマリドミドによって強く阻害され、その IC_{50} 値は $0.2 \mu\text{mol/L}$ であった。また、ボマリドミド処理によって Namalwa 細胞の細胞周期は G0/G1 期で停止、しかしながら細胞死はほとんど認められなかった。同様にボマリドミドは、5q 欠損型 KG-1 細胞に対して増殖阻害を誘導したが、Namalwa 細胞に対する活性より弱かった ($100 \mu\text{mol/L}$ で約 40%の抑制率)。一方、対照細胞である MUTZ-5 細胞及び UT-7 細胞の増殖は、ボマリドミド $100 \mu\text{mol/L}$ でもほとんど抑制されなかった (いずれも $100 \mu\text{mol/L}$ で約 25%の抑制率)。

以上より、Namalwa 及び KG-1 細胞のボマリドミドに対する感受性は 5q 欠損と関連している可能性が示された。これは 5q 欠損型の MDS 患者がレナリドミドに対して感受性を示した結果と類似している (List, 2005a ; List, 2005b ; List, 2006)。

2.6.2.2.1.3 免疫調節作用

2.6.2.2.1.3.1 T 細胞活性化促進作用

2.6.2.2.1.3.1.1 CD3 抗体刺激ヒト T 細胞での各種サイトカイン産生

[報告書番号 PD365, 添付資料 4.2.1.1.9, 評価資料*]

[報告書番号 5043-152-5119-172, 添付資料 4.2.1.1.10, 評価資料*]

[方法]

ボマリドミドで前処理したヒト PBMC より単離した $CD4^+$ T 細胞を CD3 抗体で 40 時間刺激し、 $IFN-\gamma$, IL-2, RANTES 及び IL-10 産生等を解析した [報告書番号 PD365]。また、ヒト PBMC から単離した T 細胞に CD3 抗体を添加 (3~6 時間) し、その後ボマリドミドを添加、さらに 2 日間又は 3 日間処理して、IL-2 産生に対するボマリドミドの作用を検討した [報告書番号 5043-152-5119-172]。

[結果]

ボマリドミドは、ヒト $CD4^+$ T 細胞での CD3 抗体刺激による $IFN-\gamma$ (EC_{50} 値 : $0.005 \mu\text{mol/L}$), IL-2 (EC_{50} 値 : $0.01 \mu\text{mol/L}$) 及び RANTES ($6 \mu\text{mol/L}$ で 443%の増加) 産生を促進し、IL-10 (IC_{50} 値 : $0.02 \mu\text{mol/L}$) 産生を抑制することで T 細胞刺激を増強した [報告書番号 PD365]。また、ヒト T 細胞の IL-2 産生に対する EC_{50} 値は 2 日間培養で $0.01 \mu\text{mol/L}$, 3 日間培養ではさらに促進され、 EC_{50} 値は $0.0075 \mu\text{mol/L}$ であった [報告書番号 5043-152-5119-172]。

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

2.6.2.2.1.3.1.2 フィトヘマグルチニン刺激ヒト T 細胞での IL-2 産生

[報告書番号 5304-79, 添付資料 4.2.1.1.11, 評価資料]

[方法]

ヒト PBMC より単離した T 細胞とポマリドミド (1 $\mu\text{mol/L}$) を 37°C で 1 時間処理した後, PHA (最大 10 $\mu\text{g/mL}$) で最大 72 時間処理し, IL-2 産生量を T 細胞活性の指標として測定した。また, PHA (5 $\mu\text{g/mL}$) 刺激による PBMC 増殖に対するポマリドミド (0.0001~100 $\mu\text{mol/L}$) の作用を, [^3H]-チミジン取り込みを指標として評価した。

[結果]

PHA 存在下でのヒト T 細胞処理 2 日目に, ポマリドミドによる IL-2 産生促進が認められ, PHA を漸増させることによりポマリドミドの T 細胞活性増強の程度も増大した。一方, 培養 3 日目の [^3H]-チミジン取り込み試験では, ポマリドミドが PHA 刺激による PBMC 増殖を阻害 (IC_{50} 値: 0.095 $\mu\text{mol/L}$) するという結果が得られたが, これは培養 3 日目で細胞が過増殖した結果, みかけ上の阻害が起きたと考えられる。

2.6.2.2.1.3.1.3 ConA 刺激ヒト末梢血での IL-2 産生

[報告書番号 5197-189-5226-016, 添付資料 4.2.1.1.12, 評価資料*]

[方法]

ヒト末梢血を用いて, Con A 刺激による IL-2 産生に対するポマリドミドの作用を検討した。IL-2 産生惹起に用いる Con A 濃度は 5 $\mu\text{g/mL}$ とした。Con A 添加 1 時間前にポマリドミド (0.00001~10 $\mu\text{mol/L}$) で前処理し, Con A 添加 2 日後に IL-2 産生量を測定した。本試験では, ポマリドミド添加時の IL-2 産生量が非添加時の IL-2 産生量 (コントロール値) の 150%になる濃度 (Effective concentration at 150%, EC_{150}) を算出した。

[結果]

ポマリドミドは, Con A によるヒト末梢血中 T 細胞での IL-2 産生を促進した (EC_{150} 値: 0.012 $\mu\text{mol/L}$)。

2.6.2.2.1.3.1.4 CD3 抗体刺激ヒト末梢血での Th1 及び Th2 サイトカイン産生

[報告書番号 7596-09, 添付資料 4.2.1.1.13, 評価資料]

[方法]

ヒト末梢血を用い, CD3 抗体刺激による Th1 サイトカイン (GM-CSF, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-2) 及び Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) 産生に対するポマリドミドの作用を検討した。6 名のドナーから採取した末梢血にポマリドミド (0.029, 0.058, 0.116 及び 1 $\mu\text{mol/L}$) を添加して 1 時間処理した。その後, CD3 抗体で被覆したシリンジ内蔵型白血球細胞培養システム (CD3 TruCulture システム) に試料を移し, さらに 42 時間処理した。処理後, 末梢血中の T 細胞から産

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

生される各種サイトカインを測定し、ポマリドミドの各種サイトカイン産生に対する作用を溶媒群（0.25% DMSO 溶液）と比較・評価した。

なお、本試験に用いたポマリドミドの濃度 0.029, 0.058 及び 0.116 $\mu\text{mol/L}$ は、ヒトにポマリドミド 0.5, 1 及び 2 mg を投与した際の最高血漿中濃度にそれぞれ相当する。

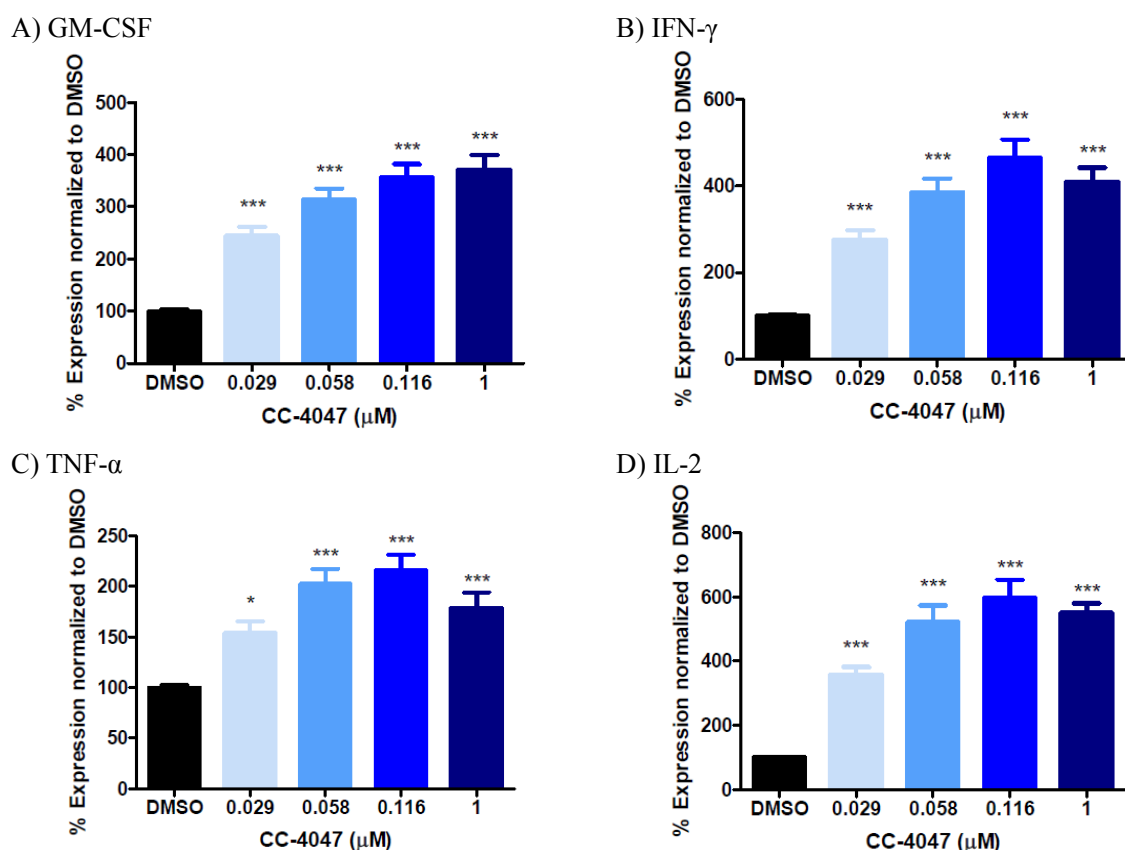
[結果]

Th1 及び Th2 サイトカイン産生に対するポマリドミドの作用を図 2.6.2-4 及び図 2.6.2-5 に示す。

Th1 サイトカイン GM-CSF, IFN- γ , TNF- α 及び IL-2 産生をポマリドミドは促進し、特に 0.029 ~ 0.116 $\mu\text{mol/L}$ では濃度依存性の促進が認められた。

またポマリドミドは、Th2 サイトカイン IL-4, IL-5 及び IL-13 の産生を有意に増強した。一方 IL-10 産生に対しては、ポマリドミド 0.029 ~ 0.116 $\mu\text{mol/L}$ では有意な増強は認められず、逆に 1 $\mu\text{mol/L}$ で溶媒（DMSO）対照群の 80%に減少した（ $p < 0.05$ ）。

図 2.6.2-4 CD3 抗体で刺激した末梢血での Th1 サイトカイン産生に対するポマリドミドの作用



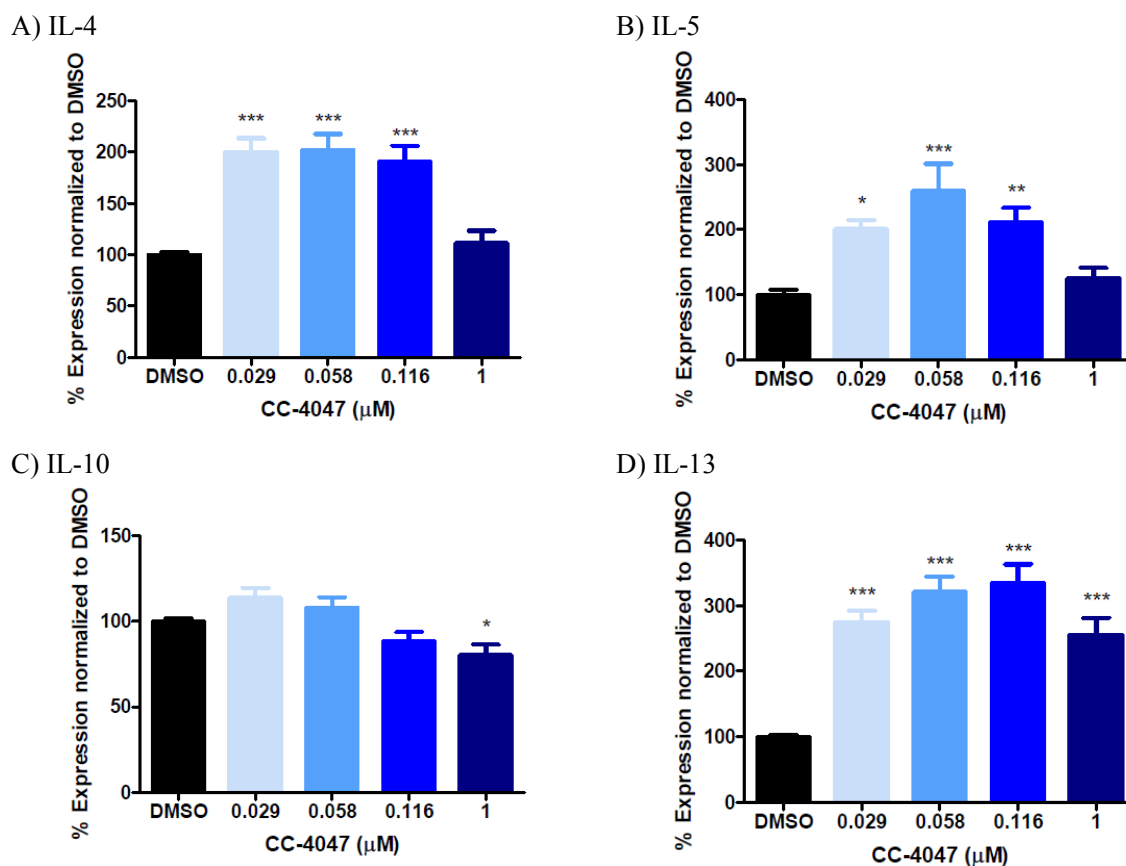
CC-4047 : ポマリドミド

* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$ vs 溶媒（DMSO）対照群（一元配置分散分析後、Dunnnett 検定）

各ドナーからの末梢血で 4 回測定した。溶媒（DMSO）対照群を 100%として、平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。

[報告書番号 7596-09 の Figure 1 (A), Figure 2 (B), Figure 8 (C) 及び Figure 5 (D) より引用]

図 2.6.2-5 CD3 抗体で刺激した末梢血での Th2 サイトカイン産生に対するポマリドミドの作用



CC-4047 : ポマリドミド

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs 溶媒 (DMSO) 対照群 (一元配置分散分析後, Dunnett 検定)

各ドナーからの末梢血で 4 回測定した。溶媒 (DMSO) 対照群を 100% として, 平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。

[報告書番号 7596-09 の Figure 6 (A), Figure 7 (B), Figure 3 (C) 及び Figure 4 (D) より引用]

2.6.2.2.1.3.1.5 CD3 抗体刺激によるヒト T 細胞での Th1 及び Th2 サイトカイン産生

[論文 : Schafer, 2003, 添付資料 4.3.17, 参考資料]

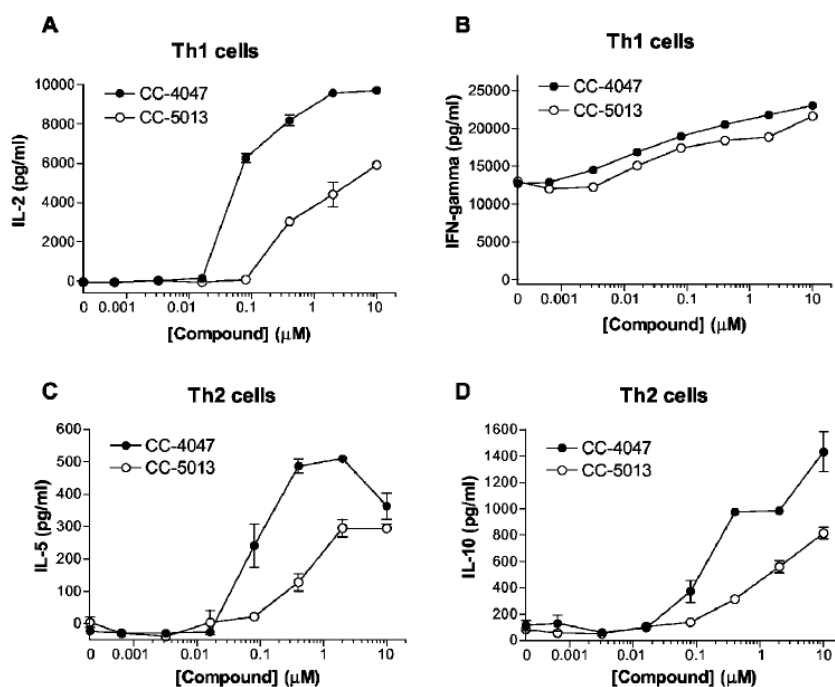
[方法]

ヒト PBMC を, PHA, 組換え体ヒト IL-2 及び IL-12 並びに IL-4 受容体抗体で処理し, Th1 細胞へ分化誘導した。また, PHA, 組換え体ヒト IL-2 及び IL-4 並びに IL-12 抗体で処理し, Th2 細胞に分化誘導した。ポマリドミド存在下, CD3 抗体で刺激し, Th1 細胞での IL-2 及び IFN- γ 産生, 並びに Th2 細胞での IL-5 及び IL-10 産生に対するポマリドミドの作用を検討した。また, ヒト白血球から CD4⁺T 細胞及び CD8⁺T 細胞をネガティブセレクションにより単離し, ポマリドミド存在下, CD3 抗体で刺激し (1 日, 2 日又は 3 日間), IL-2 産生量を測定した。

[結果]

ポマリドミドは Th1 細胞での IL-2 及び IFN- γ 産生, 及び Th2 細胞での IL-5 及び IL-10 産生のいずれも促進した (図 2.6.2-6)。

図 2.6.2-6 CD3 抗体刺激 Th1 及び Th2 でのサイトカイン産生に対するポマリドミドの作用

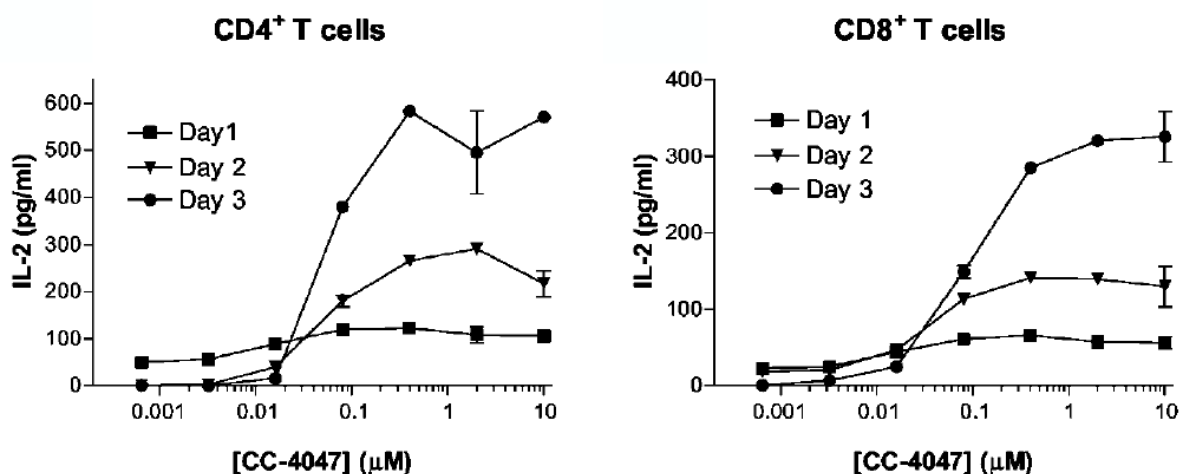


CC-4047 : ポマリドミド, CC-5013 : レナリドミド

測定値は1回の実験ごとに2検体の平均値±標準偏差で示す。なお、4回の実験とも同様の結果であった。

[Schafer, 2003 の Figure 2 より引用]

また、CD4⁺T 細胞及び CD8⁺T 細胞サブセットのいずれでもポマリドミドによる IL-2 の産生促進が認められた (図 2.6.2-7)。また別の試験から、IL-2 の産生促進は mRNA の発現増強に関連しており、T 細胞の増殖とは無関係であることが示された (Payvandi, 2005)。

図 2.6.2-7 ポマリドミドによる CD4⁺細胞及び CD8⁺細胞での IL-2 産生増強作用

CC-4047 : ポマリドミド

測定値は1回の実験ごとに2検体の平均値±標準偏差で示す。2回の実験とも同様の結果であった。

[Schafer, 2003 の Figure 1 より抜粋]

2.6.2.2.1.3.1.6 CD4⁺T 細胞での T-bet 及び GATA-3 の発現

[報告書番号 PD522, 添付資料 4.2.1.1.14, 評価資料]

[方法]

ポマリドミドの Th1 分化誘導に対する作用を検討する目的で, Th1 分化のマスター転写因子である T-bet の発現及びリン酸化, 並びに Th2 分化のマスター転写因子である GATA-3 の発現を評価した。また, IFN- γ , TNF- α 及び IL-12R β 2 も測定した。

単離した CD4⁺T 細胞をポマリドミド (1 μ mol/L) 又は IL-12 存在下で, CD3 抗体刺激 (48 時間) した。上清を回収し, サイトカインを測定した。また細胞は, 溶解して T-bet 及び GATA-3 の測定に使用した。

[結果]

ポマリドミド処理により, T-bet の発現がタンパク・レベルで増加し, 逆に GATA-3 の発現は減少した。両因子の発現比 (T-bet : GATA-3) は, 対照群では約 1 : 1 であったが, ポマリドミド処理により約 2 : 1 となった。T-bet mRNA 解析の結果からポマリドミドは, 処理後 4 時間で作用することが明らかとなった。また T-bet の発現に関連し, Th1 サイトカインの産生 (7 日間処理: IFN- γ で約 2.4 倍, TNF- α で約 30 倍) 及び細胞表面の IL-12R β 2 量 (4 日間処理: 約 2 倍) が増加した。これらのことからポマリドミドは, T-bet の発現を増加し, Th1 系列への分化を促進することが示された。

2.6.2.2.1.3.2 NK 細胞活性化促進作用

[報告書番号 PD465, 添付資料 4.2.1.1.15, 評価資料*]

[報告書番号 PD466, 添付資料 4.2.1.1.16, 評価資料*]

[報告書番号 PD467, 添付資料 4.2.1.1.17, 評価資料*]

[報告書番号 PD468, 添付資料 4.2.1.1.18, 評価資料*]

[報告書番号 PD469, 添付資料 4.2.1.1.19, 評価資料*]

[方法]

NK 細胞は, 生体の自然免疫に対し重要な役割を果たす。活性化した NK 細胞は, 様々な腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対し攻撃的に作用する。また IL-2 が NK 細胞を活性化することが明らかにされており, これが腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対する自然免疫応答に寄与している。そのため, ポマリドミドによる IL-2 産生促進が抗腫瘍効果の機序となっている可能性が考えられる。

PBMC 共培養モデルを用いて, 様々な腫瘍細胞に対する NK 細胞介在性細胞障害へのポマリドミドの影響を検討した。標的腫瘍細胞として肺がん細胞 (非小細胞性: A549 及び NCI-H460) [報告書番号 PD465], 前立腺がん細胞 (PC3 及び DU145) [報告書番号 PD466], 慢性骨髄性白血病細胞 (K562) [報告書番号 PD467], 非ホジキンリンパ腫 (Non Hodgkin's lymphoma, NHL) 細胞 (Raji) [報告書番号 PD468] 並びに卵巣がん細胞 (OVCAR3, SKOV3 及び CaOV3) [報告書番号 PD469] を用いた。肺がん細胞 [報告書番号 PD465], 前立腺がん細胞 [報告書番号 PD466] 及び卵巣がん細胞 [報告書番号 PD469] に対する試験では, それぞれの標的腫瘍細胞の DNA をプロ

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

モデオキシウリジン (Bromodeoxyuridine, BrdU) で標識 (24 時間処理) し, ヒト PBMC との 6 時間共培養後, エンザイムイムノアッセイ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法により断片化した DNA を定量化することで細胞死の程度を測定した。また, 慢性骨髄性白血病細胞 [報告書番号 PD467] 及び NHL 細胞 [報告書番号 PD468] に対する試験では, 標的腫瘍細胞を PKH26 赤色蛍光色素で標識 (40 分間処理) 後, ヒト PBMC と 3 時間共培養し, Annexin システムを用いた細胞死のアッセイを実施した。

[結果]

肺がん細胞を除きボマリドミドは, PBMC の細胞障害活性を促進した。肺がん細胞 (A549 及び NCI-H460) は, PBMC の細胞障害に耐性であり, 他の化学療法薬併用下でもボマリドミドの影響は認められなかった (表 2.6.2-4)。

表 2.6.2-4 各種腫瘍細胞に対する PBMC/NK 細胞の細胞障害性に対するボマリドミドの作用

がんの種類 報告書番号	細胞	PBMC による 障害作用	濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	細胞障害性の 最大増加	他剤併用時の作用
非小細胞性 肺がん PD465	A549	作用なし	3 及び 30	作用なし	パクリタキセル単独, パクリタキセル+カルボプラチン, ゲムシタビン+シスプラチンで作用なし
	NCI-H460	作用なし	3 及び 30	作用なし	パクリタキセル単独, パクリタキセル+カルボプラチン, ゲムシタビン+シスプラチンで作用なし
前立腺がん PD466	PC3	↑ *	0.003~30	10 倍 (0.3~30 $\mu\text{mol/L}$ 添加時)	パクリタキセルと相乗効果
	DU145	↑ *	0.003~30	約 2 倍 (3 及び 30 $\mu\text{mol/L}$ 添加時)	パクリタキセルと相乗効果
慢性骨髄性 白血病 PD467	K562	↑	1 及び 10	2.9 倍 (1 $\mu\text{mol/L}$ 添加時)	検討せず
NHL PD468	Raji	↑ *	0.003~30	2.5 倍 (0.3 $\mu\text{mol/L}$ 添加時)	リツキシマブと作用を高める
卵巣がん PD469	OVCAR3	↑ *	0.003~30	約 2 倍 (3.0 $\mu\text{mol/L}$ 添加時)	パクリタキセル又はカルボプラチンとで作用を高めることなし
	SKOV3	↑ *	0.003~30	1.5 倍 (3.0 $\mu\text{mol/L}$)	検討せず
	CaOV3	↑ *	0.003~30	2 倍 (30.0 $\mu\text{mol/L}$)	検討せず

NHL: 非ホジキンリンパ腫, ↑: 融解を増強, *: $p < 0.05$ (DMSO 対照群との比較)

[各報告書から抜粋して作表]

2.6.2.2.1.3.3 ADCC 活性増強作用

[報告書番号 5422-8-CC-4047, 添付資料 4.2.1.1.20, 評価資料]

[方法]

抗体治療薬のトラスツマブ, セツキシマブ又はリツキシマブとボマリドミドを併用したときの ADCC 活性の増強を, 乳がん細胞 (SK-BR-3 及び MCF-7), 結腸直腸がん細胞 (HCT-116 及び HT-29), NHL 細胞 (Namalwa, Farage 及び Raji) を用いて *in vitro* で検討した。ヒト末梢血より単離した

NK 細胞をポマリドミド (0.001~10 $\mu\text{mol/L}$) 存在下並びに IL-2 又は IL-12 (いずれも 10 ng/mL) 存在下で一晩処理した。各腫瘍細胞は、トラスツズマブ (20 又は 100 $\mu\text{g/mL}$)、セツキシマブ (20 $\mu\text{g/mL}$) 又はリツキシマブ (20 $\mu\text{g/mL}$) で前処理し、これに上記の前処理した NK 細胞を用させた。各腫瘍細胞に対する NK 細胞の ADCC 活性は、乳酸脱水素酵素の遊離で測定した。

[結果]

ポマリドミド処理した NK 細胞の ADCC 活性は、いずれの細胞、いずれの抗体治療薬併用でも、ポマリドミドの濃度依存的かつ有意に増強された (最大で 6 倍 : 表 2.6.2-5)。抗体のみ、又は抗体を加えないときの ADCC 活性はわずかであった。また、ポマリドミドが ADCC 活性を増強するためには IL-2 又は IL-12 が必須であった。これらのことからポマリドミドは、腫瘍特異的表面抗原に対する抗体治療薬との併用で、標的腫瘍細胞に対する NK 細胞の ADCC 活性を増強することが示唆された。

表 2.6.2-5 腫瘍細胞株に対するポマリドミドと抗体治療薬の併用での ADCC 活性の増強

細胞株	がん種	抗体治療薬	ポマリドミドの ADCC 活性増強作用
Farage	NHL	リツキシマブ	2~4 倍
Raji	NHL	リツキシマブ	2 倍
Namalwa	NHL	リツキシマブ	4 倍
SK-BR-3	乳がん	トラスツマブ	3~6 倍
MCF-7	乳がん	トラスツマブ	2.3~2.4 倍
HCT-116	結腸直腸がん	セツキシマブ	1.6 倍
HT-29	結腸直腸がん	セツキシマブ	2 倍

NHL : 非ホジキンリンパ腫

[報告書番号 5422-8-CC-4047 図表等より引用して作表]

2.6.2.2.1.4 血管新生阻害作用

血管新生は腫瘍の増殖や悪性化に重要と考えられており、主として血管内皮細胞の活性化 (増殖, 細胞間相互作用, 遊走など) によって行われる。したがって、内皮細胞反応, マトリックスメタロプロテアーゼの発現・活性化, 及び増殖因子の作用・発現を阻害することが血管新生の抑制につながる。本試験ではヒト臍帯を入手し、血管新生及び内皮細胞の浸潤に対するポマリドミドの作用を検討した。

2.6.2.2.1.4.1 ヒト臍帯動脈組織を用いた検討

[報告書番号 5071-180, 添付資料 4.2.1.1.21, 評価資料*]

[報告書番号 5127-132, 添付資料 4.2.1.1.22, 評価資料*]

[方法]

ポマリドミドの血管新生阻害活性を、ヒト臍帯動脈リング標本を用いて検討した。血管内皮細胞用増殖培地 (EGM-2) で 24 時間培養した後、ポマリドミドを添加した。その後、培養液を週 2 回交換しながら、曝露処理を 3 週間 [報告書番号 5071-180] 又は 4 週間 [報告書番号 5127-132]

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

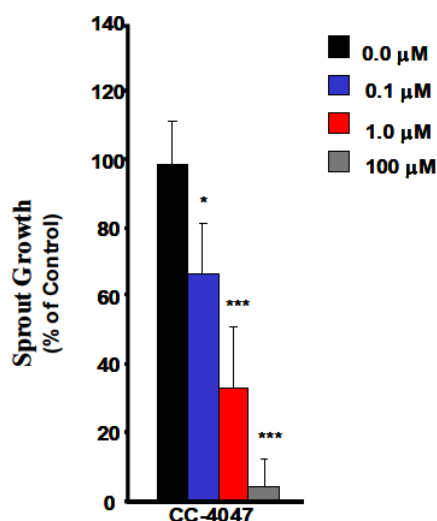
行った。血管芽形成を画像で解析し、血管新生阻害作用を陰性対照（DMSO 溶媒群）と比較して評価した。

[結果]

ポマリドミド（0.1～100 $\mu\text{mol/L}$ ）は、溶媒（DMSO）対照群と比較して、ヒト臍帯動脈リング標本からの微小血管形成を有意かつ濃度依存的に阻害した（図 2.6.2-8）[報告書番号 5071-180]。別試験でもポマリドミドは、血管芽形成を濃度依存的に抑制し、その IC_{50} 値は 0.33 $\mu\text{mol/L}$ であった[報告書番号 5127-132]。またポマリドミドは、ヒト臍帯動脈組織を用いた試験と同じ濃度範囲（0.1～100 $\mu\text{mol/L}$ ）で、HUVEC の管腔形成を濃度依存的に阻害した。しかし、HUVEC の増殖に対してポマリドミドは影響を及ぼさなかった[報告書番号 5071-180]。

以上の結果から、ポマリドミドの血管新生阻害作用は、細胞増殖を直接阻害するというよりもむしろ、血管内皮細胞の遊走促進や細胞間相互作用を阻害することによって生じる可能性が示唆された。

図 2.6.2-8 *in vitro* ヒト臍帯動脈組織の血管新生（発芽領域）に対するポマリドミドの作用



CC-4047: ポマリドミド, 平均値 $\pm$ 標準偏差

*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ vs 陰性対照群 (一元配置分散分析後, Newman-Keuls 多重比較検定)

[報告書番号 5071-180 Figure 2B より抜粋]

2.6.2.2.1.4.2 HUVEC 浸潤阻害作用

[報告書番号 5239-92-5239-188, 添付資料 4.2.1.1.23, 評価資料*]

[方法]

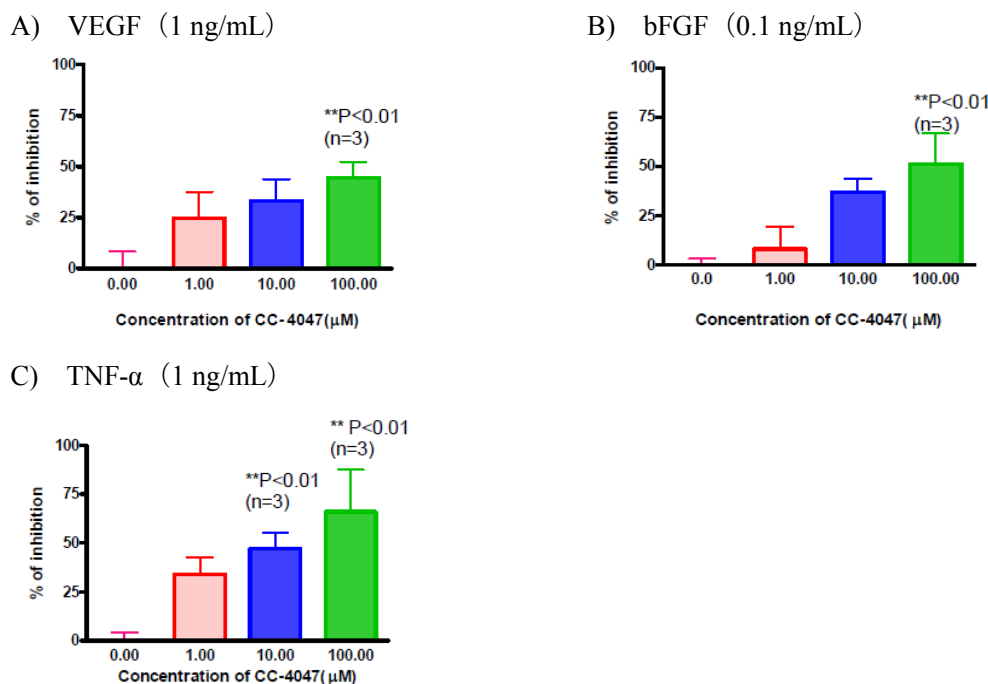
HUVEC の浸潤反応に対するポマリドミドの作用を、細胞浸潤試験 [フィブロネクチン・コート系; BD BioCoat™ Angiogenesis System (BD Bioscience, Bedford, MA)] で検討した。本試験では、VEGF, bFGF 及び $\text{TNF-}\alpha$ を用いて浸潤誘発を行っている。ポマリドミド (1, 10 又は 100 $\mu\text{mol/L}$) 存在下, 37°C, 5% CO_2 環境下で細胞を 22 ± 1 時間処置し、フィブロネクチン・コート膜を通過した浸潤細胞数を測定した。

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

[結果]

ポマリドミドは、VEGF、bFGF 又は TNF- α による HUVEC の浸潤反応を有意に阻害した (図 2.6.2-9)。ポマリドミドの血管新生阻害活性は、内皮細胞の浸潤阻害によることが示唆された。

図 2.6.2-9 HUVEC の浸潤 (フィブロネクチン・コート系) に対するポマリドミドの作用



CC-4047 : ポマリドミド

平均値±標準誤差

3名の異なるドナーから HUVEC を採取し、各試験は duplicate に 3 回の独立した試験を実施した。

** : p<0.01 (Dunnett の多重比較検定)

[報告書番号 5239-92-5239-188 の 4 頁の図から抜粋]

2.6.2.2.1.4.3 微小血管形成阻害作用

[論文 : Dredge, 2002, 添付資料 4.3.4, 参考資料]

[方法]

ラット大動脈モデル及びヒト臍帯静脈モデルを用いて、微小血管形成に対するポマリドミドの作用を検討した。ポマリドミド (1 又は 10 μg/mL) を 48 時間ごとに添加し計 10 日間の処理を行った。ヒト臍帯静脈モデルでは、11 日目に細胞を 70%エタノールで固定、顕微鏡下スコアリング用グリッドレンズにより分岐数を測定して、微小管形成を評価した。ラット大動脈モデルでは、48 時間ごとの培地交換時に微小管形成を評価した。

[結果]

ラット大動脈モデルでは、ポマリドミド 1 μg/mL で微小血管形成に対する阻害効果は認められなかったが、10 μg/mL では添加 4 日目に微小血管形成が阻害され、10 日目では 90%の阻害に達した。添加したポマリドミドを除去し、VEGF で再刺激したところ、新規の微小血管が形成されたことから、ポマリドミドの血管新生阻害活性は可逆的なものと考えられた。ヒト血管新生モデル

でも同様であり、ポマリドミド 1 µg/mL で阻害は認められなかったが、10 µg/mL で有意 ($p<0.05$) な阻害が認められた。

2.6.2.2.1.5 赤血球及び顆粒球前駆細胞に対する作用

[報告書番号 CGN-04, 添付資料 4.2.1.1.24, 評価資料]

[報告書番号 CLG-10, 添付資料 4.2.1.1.25, 評価資料]

[報告書番号 1110-028, 添付資料 4.2.1.1.26, 評価資料]

[方法]

各種骨髓系前駆細胞増殖に対するポマリドミドの作用を検討するため、ヒト正常骨髓由来の低密度骨髓細胞を、ポマリドミド (0.001~10 µmol/L) 存在下でメチルセルロース含有培地を用い分化誘導した (14~16 日間)。分化誘導後、BFU-E, CFU-E 及び CFU-GM 由来コロニーを解析した [報告書番号 CGN-04]。また同様に、骨髓由来細胞をポマリドミド (0.001~10 µmol/L) 存在下でコラーゲン含有培地を用い分化誘導し (14~16 日間)、CFU-MK 増殖を評価した [報告書番号 CGN-04 ; 報告書番号 CLG-10]。

さらに、樹状細胞 (dendritic cell, DC) の分化に対するポマリドミドの作用を検討するため、ヒト骨髓由来 CD34⁺造血幹細胞をポマリドミド (0.01~10 µmol/L) 及び各種成長因子 [幹細胞因子 (Stem cell factor, SCF), Flt3 リガンド (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, Flt3-L), GM-CSF 及び TNF-α] 存在下で 6 日間分化誘導し、GM-CSF 及び TNF-α 存在下で 6 日間処理した。CD34⁺細胞の表面マーカー発現プロファイルをフローサイトメトリーにより解析した [報告書番号 1110-028]。

[結果]

ポマリドミドは、BFU-E 及び CFU-E の増殖を有意に阻害し (0.1 µmol/L で $p<0.01$, 1.0 及び 10 µmol/L で $p<0.005$)、その IC₅₀ 値は 0.07 µmol/L であった [報告書番号 CGN-04]。本試験では、ポマリドミド処理によりコロニー数が減少し、0.1 及び 1.0 µmol/L ではコロニーのサイズも小さくなったことから、ポマリドミドは分化の系列が決定した細胞の増殖を阻害することが示唆された。一方、CFU-GM の増殖は阻害しなかった。またポマリドミドは、1.0 及び 10 µmol/L でコロニー数が 50 より多い初期段階の CFU-MK (>50) の増殖のみを有意に阻害したが ($p<0.005$)、IC₅₀ 値は算出できなかった (>10 µmol/L)。

異なる 3 例のドナーから採取した正常骨髓細胞を用いた別試験では、ポマリドミドは 3 例中 1 例のサンプルで CFU-MK (>50) の増殖を有意に阻害した (IC₅₀ 値 : 0.35 µmol/L) [報告書番号 CLG-10]。

ポマリドミドは、初期段階の造血幹細胞 (CD34⁺CD38⁻) を増加させることで顆粒球細胞への分化を促進した。またポマリドミドは、CD34⁺細胞から DC 前駆細胞への分化を阻害したが、この阻害作用は、DC 前駆細胞の細胞死誘導に起因するものではなかった [報告書番号 1110-028]。

2.6.2.2.1.6 サイトカイン産生制御作用

[報告書番号 5374-10, 添付資料 4.2.1.1.27, 評価資料]

[報告書番号 PD365, 添付資料 4.2.1.1.9, 評価資料*]

[報告書番号 5196-175, 添付資料 4.2.1.1.28, 評価資料*]

[報告書番号 5127-53, 添付資料 4.2.1.1.29, 評価資料*]

[方法]

がん、骨髄線維症、全身性硬化症など多くの疾患で、炎症が重要な役割を果たしている。LPS 刺激によるヒト PBMC での各種サイトカイン産生に対するポマリドミドの効果を検討した。ポマリドミドでヒト PBMC を 1 時間処理し、その後 LPS (終濃度: 1 ng/mL) 刺激 18 時間後に産生される各サイトカイン量を測定した [報告書番号 5374-10]。また、LPS の濃度 (終濃度: 100 ng/mL) やポマリドミドの処理時間を変更して、同様の実験を行った [報告書番号 PD365]。さらに別試験では、LPS 刺激によるヒト PBMC での G-CSF 及び IL-10 産生に対するポマリドミドの効果を検討した。ポマリドミド (0.01~100 µmol/L) でヒト PBMC を 1 時間処理した後、LPS (終濃度: 10 ng/mL) で 24 時間刺激し産生される G-CSF 及び IL-10 量を測定した [報告書番号 5127-53]。

加えて、ラット及びヒトより採取されたヘパリン処理末梢血を用いて、LPS 刺激による TNF-α 産生に対するポマリドミドの効果を検討することで、ポマリドミドの種特異性を評価した。ポマリドミド (0.01~100 µmol/L) は、LPS 刺激 1 時間前に処理し、16 時間後の TNF-α 量を測定した [報告書番号 5196-175]。

[結果]

LPS で刺激したヒト PBMC より産生される IL-12, IL-1β, IL-6, MCP-1, MIP-1α, TNF-α 及び GM-CSF に対して、ポマリドミドは濃度依存的な阻害活性を示し、IC₅₀ 値はそれぞれ、0.010, 0.020, 0.040, 1.3, 0.91, 0.016 及び 0.15 µmol/L であった。RANTES 及び IL-8 産生に対する効果は、100 µmol/L までの濃度で認められなかった。一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生は増強され、EC₅₀ 値は 0.041 µmol/L であった [報告書番号 5374-10]。LPS の濃度を変更して実施した別試験でも、ポマリドミドは炎症性サイトカイン及びケモカインの産生を阻害し、抗炎症性サイトカインの産生を促進した [報告書番号 PD365] (表 2.6.2-6)。

またポマリドミドは、LPS で刺激したヒト PBMC での G-CSF 産生を阻害 (IC₅₀ 値: 0.1 µmol/L) し、IL-10 産生を濃度依存的に増強した (EC₅₀ 値: 0.079 µmol/L) [報告書番号 5127-53]。

ポマリドミドは、LPS で刺激したラット末梢血 (IC₅₀ 値: 12 µmol/L) 及びヒト末梢血 (IC₅₀ 値: 0.14 µmol/L) での TNF-α 産生を濃度依存的に阻害した。ヒト末梢血での TNF-α 産生阻害活性は、ラットに比べ約 86 倍強かった [報告書番号 5196-175]。

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

表 2.6.2-6 ヒト PBMC を LPS で刺激した際のサイトカイン産生に対するポマリドミドの作用

サイトカイン	抑制作用 (IC ₅₀ 値) (μmol/L)	
	LPS (1 ng/mL) 刺激時 (報告書番号 5374-10)	LPS (100 ng/mL) 刺激時 (報告書番号 PD365)
TNF-α	0.016	0.01
IL-1β	0.020	0.02
IL-6	0.040	0.02
IL-12	0.010	0.002
MCP-1	1.3	0.2
MIP-1α	0.91	0.02
増強作用		
	EC ₅₀ 値 (μmol/L)	6 μmol/L 時の増加%
IL-10	0.041	416%
RANTES	作用なし	241%

[報告書番号 5127-53 の Figure 1 及び 2 に示されている数値及び報告書番号 PD365 の 5 頁の表から抜粋して作表]

2.6.2.2.1.7 COX 発現阻害作用

[報告書番号 5197-130, 添付資料 4.2.1.1.30, 評価資料]

[報告書番号 5116-86, 添付資料 4.2.1.1.31, 評価資料*]

サリドマイドは、COX-2 mRNA の安定化を阻害することで COX-2 の発現を抑制、PGE2 産生を阻害する (Payvandi, 2004)。LPS で刺激したヒト PBMC を用いて、COX-2 発現及び PGE2 産生に対するポマリドミドの効果を検討した。

[方法]

LPS で刺激したヒト PBMC での COX-2 発現に対するポマリドミドの効果を検討した [報告書番号 5197-130]。ポマリドミド (0.0001~100 μmol/L) でヒト PBMC を処理し、LPS (終濃度: 1 ng/mL) 刺激 20 時間後に、COX-2 発現量を免疫ブロット法により、また PGE2 産生量を ELISA 法により測定した。

また別試験では、LPS (終濃度: 10 ng/mL) で刺激したヒト PBMC に対し、COX-2 発現量 (タンパク及び mRNA 発現量) 及び COX-1, 2 活性に対するポマリドミドの効果を検討した [報告書番号 5116-86]。COX mRNA の発現量に対するポマリドミド (1 及び 10 μmol/L) の効果はノーザンブロッティング法により、COX-1, 2 酵素活性に対するポマリドミド (0.01~1000 μmol/L) の作用は比色定量法により、それぞれ測定・評価した。

[結果]

ポマリドミドは、LPS で刺激した PBMC での COX-2 発現 (10 μmol/L で 64% の阻害) 及び、PGE2 産生 (IC₅₀: 50 μmol/L) を阻害した [報告書番号 5197-130]。また、ポマリドミド (1 及び 10 μmol/L) は濃度依存的に COX-2 mRNA の半減期を短縮した。ポマリドミドによる COX-2 mRNA の発現抑制は、COX-2 mRNA の安定性阻害に起因するものと考えられる。一方ポマリドミドは、COX-1 及び COX-2 いずれの酵素活性に対しても阻害効果を示さなかった [報告書番号 5116-86]

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

2.6.2.2.1.8 正常 B 細胞に対する作用

[報告書番号 [PD408](#), 添付資料 4.2.1.1.32, 評価資料]

液性免疫は、活性化された B 細胞から分化した形質細胞が産生する抗体により媒介される。B 細胞の活性化には 2 つの主要なシグナルが必要である。1 次シグナルは BCR への抗原結合により伝達され、2 次シグナルはサイトカインの存在下で CD40L/CD40 シグナル伝達を通じて同一抗原活性化 T 細胞により伝達される。BCR を介した 1 次シグナルは、B 細胞の発達と抗原に対する B 細胞の応答に極めて重要である。したがって、BCR を介するシグナル伝達の不全は免疫不全や自己免疫疾患に繋がる可能性がある。本試験では、ポマリドミドの B 細胞シグナル伝達に対する作用を検討した。

[方法]

健康人ドナーから採取した B 細胞を、ポマリドミド (0.06~60 $\mu\text{mol/L}$) で 30 分間処理した後、IgM 抗体 (2 $\mu\text{g/mL}$), CD40 抗体 (2 $\mu\text{g/mL}$), IL-4 (40 ng/mL), BAFF (100 ng/mL) 及び LPS (0.5 $\mu\text{g/mL}$) で刺激した。B 細胞は 3 日間処理し、B 細胞の活性化の指標として CD69 及び TLR9 をフローサイトメトリーで測定した。また、TNF- α 及び IL-6 の産生量を測定した。次に、刺激ヒト B 細胞の増殖に対するポマリドミドの作用を、BrdU を用いて評価した。また、ヒト PBMC を CD40 抗体 (2 $\mu\text{mol/L}$) 及び IL-4 (40 ng/mL) で刺激し、3 週間処理による IgE 産生に対するポマリドミドの効果を評価した。さらに、CD19⁺B 細胞を IL-4 (100 ng/mL) で 30 分間刺激した時の STAT6 リン酸化に対するポマリドミド (1 又は 10 $\mu\text{mol/L}$) の効果を免疫ブロット法により評価した。

[結果]

ポマリドミドは、BCR や CD40 の刺激による CD69 及び TLR9 の発現、TNF- α 及び IL-6 の産生並びに CD19⁺B 細胞の増殖を増強した。またポマリドミドは、LPS や BAFF で刺激した CD19⁺B 細胞の増殖も増強した。一方、CD19⁺B 細胞を IL-4 (及び CD40 抗体) で刺激した場合、STAT6 のリン酸化がポマリドミドで抑制され、また細胞増殖や IgG1 及び IgE を含む免疫グロブリンの産生が低下していた。

以上の結果より、ポマリドミドは B 細胞の活性化、増殖及びクラススイッチを惹起する様々な B 細胞刺激因子との併用で免疫調節活性を発揮することが示唆された。

2.6.2.2.1.9 ポマリドミド代謝物の薬理活性

[報告書番号 [7600-025](#), 添付資料 4.2.1.1.33, 評価資料]

[方法]

ポマリドミド代謝物の薬理活性を *in vitro* 試験で検討した。代謝物として、6-ヒドロキシポマリドミド (CC-17372), 7-ヒドロキシポマリドミド (M16 : CC-17369), 5-ヒドロキシポマリドミド (M17 : CC-17368) 及びヒドロキシポマリドミド (M19 : CC-12074) の水酸化体代謝物に加え、加水分解物 M10 (CC-15262) 及び M11 (CC-8017), 並びに N アセチル化体代謝物 M18 (CC-4067) を用いた。

MM 細胞 (OPM-2, H929 及び U266) をポマリドミド又は代謝物で 3 日間処理し、³H-チミジン取り込みを指標に細胞増殖を評価、各化合物の細胞増殖阻害率を算出した。

ヒト T 細胞での IL-2 産生に対するポマリドミド及び代謝物の活性を検討するため、CD3 抗体でコートした 96 穴プレートに T 細胞を播種しポマリドミド又は代謝物を添加、48 時間後に IL-2 の産生量を測定した。

LPS (1 ng/mL) で刺激した PBMC での TNF- α 産生に対するポマリドミド及び代謝物 (18 時間処理) の作用を検討した。

[結果]

試験に用いた代謝物は、いずれも細胞増殖に全くあるいはほとんど影響を示さなかった (IC_{50} 値 : $>1 \mu\text{mol/L}$)。一方ポマリドミドは、OPM-2 細胞、H929 細胞及び U266 細胞の細胞増殖をそれぞれ IC_{50} 値 0.038, 0.035 及び $0.028 \mu\text{mol/L}$ で阻害した。MM 細胞の増殖に対する代謝物の阻害活性は、ポマリドミドの 1/26 以下であった (表 2.6.2-7)。また、代謝物の免疫調節活性測定では、水酸化体代謝物 M19 が T 細胞による IL-2 産生を EC_{50} 値 $1.5 \mu\text{mol/L}$ で増強し (ポマリドミドの 1/68 の活性)、LPS で刺激した PBMC による TNF- α 産生を阻害した (IC_{50} 値 $2.3 \mu\text{mol/L}$ でポマリドミドの 1/742 の活性)。また、加水分解物 M10 が T 細胞による IL-2 産生を EC_{50} 値 $0.72 \mu\text{mol/L}$ で増強した (ポマリドミドの 1/32 の活性)。その他の水酸化体、N アセチル化体及び加水分解物の免疫調節活性はいずれも極めて弱く、 EC_{50} 値又は IC_{50} 値は $10 \mu\text{mol/L}$ を超えるものであった (表 2.6.2-7)。これらの結果から、ポマリドミド代謝物の MM 細胞増殖に対する阻害活性並びに T 細胞及び PBMC に対する免疫調節活性は、ポマリドミドと比較して極めて弱いものであった。したがってポマリドミドの薬理活性に代謝物は関与しないと考えられる。

表 2.6.2-7 ポマリドミド及びその代謝物の薬理活性一覧

化合物	コード番号	OPM-2 細胞増殖阻害 IC_{50} 値 ($\mu\text{mol/L}$)	H929 細胞増殖阻害 IC_{50} 値 ($\mu\text{mol/L}$)	U266 細胞増殖阻害 IC_{50} 値 ($\mu\text{mol/L}$)	IL-2 産生増大 (T 細胞) EC_{50} 値 ($\mu\text{mol/L}$)	TNF- α 産生阻害 (LPS 刺激 PBMC) IC_{50} 値 ($\mu\text{mol/L}$)
ポマリドミド	CC-4047	0.038	0.035	0.028	0.022	0.0031
M16	CC-17369	>1	>1	>1	>10	>10
7-hydroxylated M17	CC-17368	>1	>1	>1	>10	>10
5-hydroxylated	CC-17368	>1	>1	>1	>10	>10
6-hydroxylated ^a	CC-17372	>1	>1	>1	>10	>10
M19 水酸化体	CC-12074	>1	>1	>1	1.5	2.3
M11 加水分解物	CC-8017	>1	>1	>1	>10	>10
M10 加水分解物	CC-15262	>1	>1	>1	0.72	>10
M18 N アセチル化体	CC-4067	>1	>1	>1	>10	>10

a : 代謝物としての番号はない (ヒトでは認められていない代謝物)

[報告書番号 7600-025 の Table 2 を改変して作表]

2.6.2.2.2 *in vivo* 試験

2.6.2.2.2.1 抗腫瘍作用

2.6.2.2.2.1.1 MM 細胞

2.6.2.2.2.1.1.1 H929 細胞移植 SCID マウス

[報告書番号 [AP3975/4416/4462/4479/4524](#), 添付資料 4.2.1.1.34, 評価資料]

[方法]

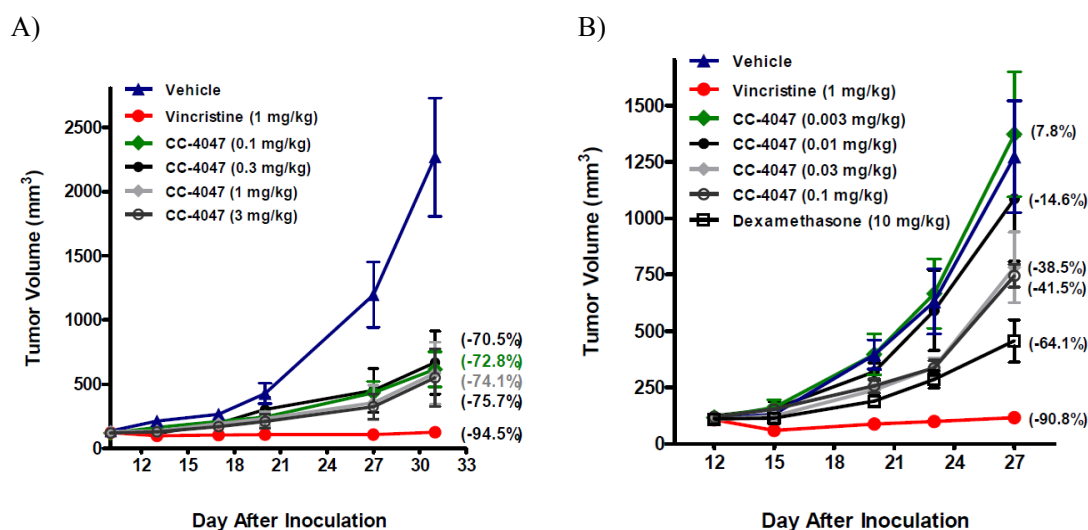
H929 細胞又はレナリドミド耐性 H929 細胞を移植した SCID マウス (6~8 週齢) を用いて, ポマリドミド (0.003~10 mg/kg/day) の抗腫瘍効果を *in vivo* で検討した。H929 細胞又はレナリドミド耐性 H929 細胞を雌性 CB17-SCID マウス (8~12 匹/群) に移植し, 10~12 日後に腫瘍体積が約 125 mm³ (75~200 mm³) になった動物を選択し, ランダムに溶媒対照, ポマリドミド又は陽性対照 (ビンクリスチン) 投与群に群分けした。溶媒又はポマリドミドは, 1 日 1 回で 14 日間又は 20 日間経口投与した。またビンクリスチンは, 4 日に 1 回, 計 2 回静脈内投与した。

1 週間に 2 回の頻度で腫瘍体積を測定し, 溶媒対照群と比較することにより, 抗腫瘍効果を評価した。また腫瘍体積測定時に体重を測定し, 全身毒性の指標とした。

[結果]

H929 細胞を移植したマウスでの, ポマリドミド経口投与による抗腫瘍効果を図 2.6.2-10 に示す。腫瘍体積が約 125 mm³ (119~137 mm³) になった日 (移植 10 日後) からポマリドミド 0.1~3 mg/kg を 1 日 1 回で 20 日間経口投与した場合, いずれの投与群も溶媒対照群と比較して腫瘍体積の増加が抑制され, 移植 31 日後では 70.5%~75.7%減少した (いずれも $p<0.001$)。また, 腫瘍体積が 107~124 mm³ になった日 (移植 12 日後) からポマリドミド 0.003~0.1 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間経口投与した場合, 0.01, 0.03 及び 0.1 mg/kg 投与で用量に依存した腫瘍の増加抑制が認められた (移植 27 日後の減少率はそれぞれ 14.6%, 38.5%及び 41.5%)。ポマリドミド 0.003 mg/kg 投与では溶媒対照群と差が認められなかった。また, 両実験系いずれのポマリドミド投与群でも顕著な体重変化は認められなかった。

図 2.6.2-10 H929 細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドの作用



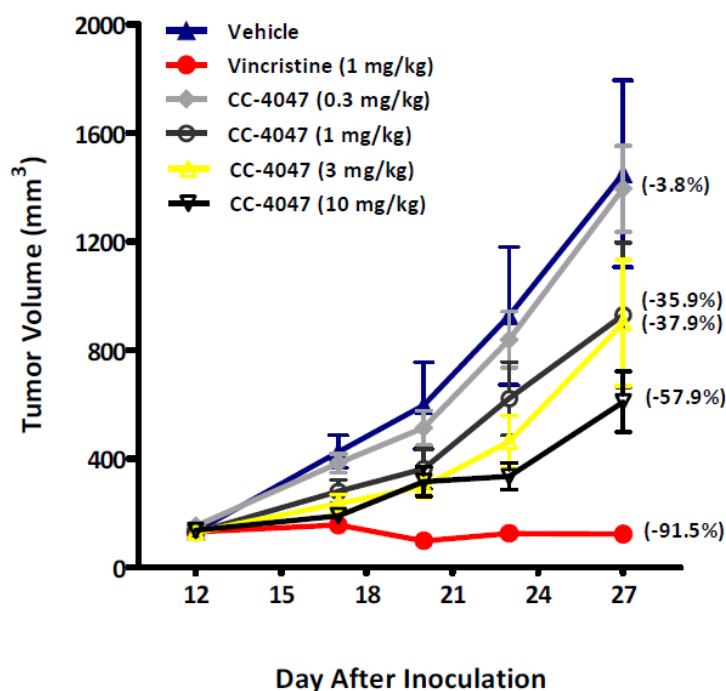
CC-4047 : ポマリドミド

パネル A はポマリドミド 0.1~3 mg/kg を 1 日 1 回 20 日間経口投与した結果を、パネル B は 0.003~0.1 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間経口投与した結果を示す。括弧内の数値は試験最終日（パネル A では Day 31, パネル B では Day 27）の溶媒対照群の腫瘍体積を基にした腫瘍体積の相対的変化を百分率で示した。

[報告書番号 AP3975/4416/4462/4479/4524 の Figure 1 及び 2 より引用]

レナリドミド耐性 H929 細胞を移植したマウスでのポマリドミド経口投与の効果を図 2.6.2-11 に示す。腫瘍体積が 119~160 mm³ になった日（移植 12 日後）からポマリドミド 0.3~10 mg/kg を 1 日 1 回で 14 日間経口投与した場合、1, 3 及び 10 mg/kg 投与で溶媒対照群と比較して腫瘍体積の増加が抑制され、移植 27 日後ではそれぞれ 35.9%, 37.9% 及び 57.9% 減少した。0.3 mg/kg 投与では溶媒対照群と差は認められなかった。また、いずれのポマリドミド投与群でも体重に顕著な変化は認められなかった。なお、H929 細胞のレナリドミド耐性は同マウスを用いた *in vivo* 試験で確認した。

図 2.6.2-11 レナリドミド耐性 H929 細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドの作用



CC-4047 : ポマリドミド

ポマリドミド 0.3～10 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間経口投与した結果を示す。括弧内の数値は試験最終日 (Day 27) の溶媒対照群の腫瘍体積を基にした腫瘍体積の相対的变化を示した。

[報告書番号 AP3975/4416/4462/4479/4524 の Figure 5 より引用]

2.6.2.2.1.1.2 MM 細胞移植 SCID マウス (その他の MM 細胞)

[報告書番号 [IMBCR-03162010](#), 添付資料 4.2.1.1.35, 評価資料]

[方法]

MM 細胞 (LAGκ-1A, LAGκ-1B 及び LAGλ-1) 移植 SCID マウスを用いて、ポマリドミド (0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg) の抗腫瘍効果を検討した。各種 MM 細胞を雄性 SCID マウス (6～8 週齢) に移植し (20～40 mm³), 移植 7 日目に免疫グロブリン G (IgG) 濃度測定後、動物をランダムに群分けした。ポマリドミドは、1 日 1 回で 8 週間経口投与した (9～10 匹/群)。投与開始後、1 週間に 1 回、IgG 濃度及び腫瘍体積を測定した。

[結果]

LAGκ-1B 及び LAGλ-1 細胞移植マウスに対し、ポマリドミドはいずれの投与量でも効果が認められなかった。LAGκ-1A 細胞移植マウスでは、溶媒対照群と比べ、ポマリドミド 10 mg/kg 投与で腫瘍体積の減少と IgG 量の低下傾向が認められたが、統計学的に有意なものではなかった。

2.6.2.2.2.1.2 バーキットリンパ腫細胞

2.6.2.2.2.1.2.1 Hs Sultan 細胞移植 BNX マウス

[論文：Lentzsch, 2003, 添付資料 4.3.10, 参考資料]

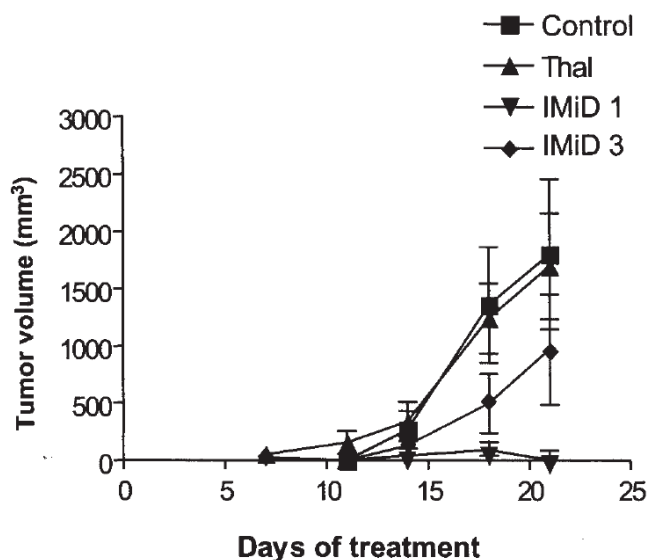
[方法]

Hs Sultan (バーキットリンパ腫細胞) 細胞を移植した雌性 BNX マウス (5~8 週齢) を用いて、ポマリドミド腹腔内投与 (50 mg/kg/day) の抗腫瘍効果を検討した。ポマリドミドの投与開始日を 2 種類に設定する [腫瘍細胞移植後 1 日目から投与を開始する試験及び腫瘍が触知可能 (平均サイズ: 177 mm³) になった日 (中央値: 腫瘍接種から 6 日後, 範囲: 4~15 日) から投与開始する試験] ことで、ポマリドミドの薬理学的特性を評価した。両試験とも腫瘍体積を指標として、ポマリドミドの抗腫瘍効果を評価した。また、微小血管密度 (Microvessel density, MVD) を CD31 抗体を用いた免疫組織化学的染色により測定した。

[結果]

ポマリドミドの腹腔内投与を、腫瘍細胞移植後 1 日目から開始した結果を図 2.6.2-12 に示す。溶媒対照群で腫瘍が一定の大きさに達するまでの期間の中央値は 15 日間 (範囲: 7~18 日間) であった。溶媒対照群と比較して、ポマリドミドによる抗腫瘍効果は、投与 18 日目以降に有意なものとなった ($p < 0.05$)。また、腫瘍細胞移植後 35 日目に屠殺するまで、ポマリドミドはほぼ完全に腫瘍成長を抑制した。

図 2.6.2-12 Hs Sultan 腫瘍細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドの作用 (腫瘍細胞移植後 1 日目に投与開始)



IMiD1: ポマリドミド, IMiD3: レナリドミド, Thal: サリドマイド
 平均値±標準誤差 (各群 5 匹)

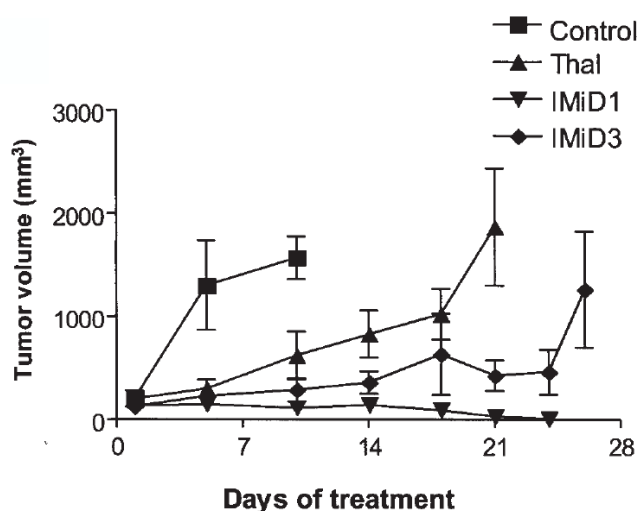
[Lentzsch, 2003 の Figure 1 より引用]

また、生着・成長した腫瘍に対するポマリドミドの抗腫瘍効果を検討した試験 (触診により腫瘍が確認できるようになってから腹腔内投与したポマリドミドの効果を検討) では、ポマリドミド投与群の腫瘍体積が、投与 10 日目で溶媒対照群と比べ有意に減少した ($p=0.0002$) (図 2.6.2-13)。

溶媒（12 匹）及びサリドマイド（11 匹）投与群は、腫瘍増殖による早期屠殺（全例）を行ったのに対し、ポマリドミド投与群（6 匹）は腫瘍細胞移植後 45 日目まで全ての動物が生存した。また、ポマリドミド及びレナリドミド（8 匹）投与群の計 14 匹中 5 匹では、腫瘍が完全に退縮した。完全な腫瘍退縮が認められた 5 匹に対し、さらに 10 日間ポマリドミド又はレナリドミドを連日投与した。その結果、5 匹中 2 匹で投与中止から 16 及び 27 日後に腫瘍が再発したが、残りの 3 匹では 102 日間の追跡調査まで腫瘍の完全な寛解が認められた。溶媒及びポマリドミド投与群では、いずれも毒性又は体重減少の徴候は認められなかった。

MVD 評価による血管新生に対するポマリドミドの作用を図 2.6.2-14 に示す。溶媒対照群に比べてポマリドミド投与群では、MVD が有意に低下していた ($p=0.0022$)。

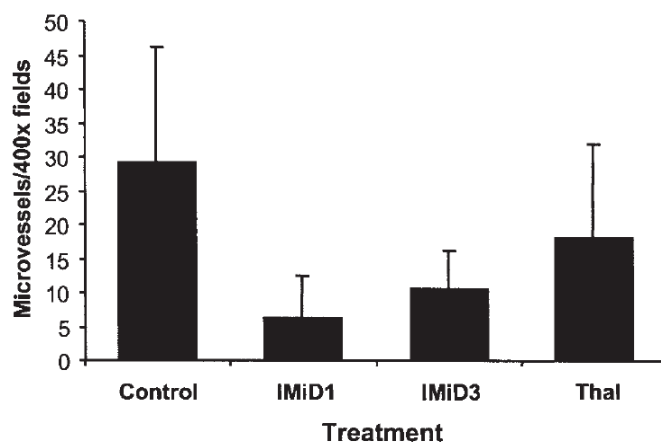
図 2.6.2-13 Hs Sultan 腫瘍細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドの作用（腫瘍定着後に投与開始）



IMiD1：ポマリドミド，IMiD3：レナリドミド，Thal：サリドマイド
 平均値±標準誤差

[Lentzsch, 2003 の Figure 2b より引用]

図 2.6.2-14 Hs Sultan 腫瘍細胞移植マウスの血管新生に対するポマリドミドの作用



IMiD1：ポマリドミド，IMiD3：レナリドミド，Thal：サリドマイド
 平均値±標準偏差

[Lentzsch, 2003 の Figure 3 より引用]

2.6.2.2.1.2.2 Raji 細胞移植 SCID マウス

[論文 : [Hernandez-Ilizaliturri, 2005](#), 添付資料 4.3.7, 参考資料]

[報告書番号 CLG-4 Raji B-e200, 添付資料 4.2.1.1.36, 評価資料]

[方法]

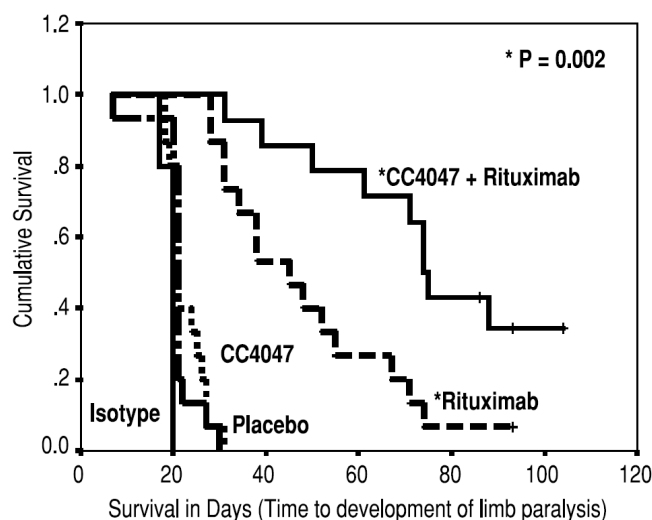
ポマリドミドの単独又はリツキシマブとの併用による抗腫瘍効果を Raji 細胞（バーキットリンパ腫細胞）を移植した SCID マウスで検討した。SCID マウス（6～8 週齢，15 匹／群）に Raji 細胞を移植（第 0 日）した後，ポマリドミド単独，リツキシマブ単独あるいは両薬剤併用での投与を実施した。リツキシマブ（10 mg/kg）は，第 5，10，15 及び 20 日に尾静脈内投与した。一方ポマリドミド（0.5 mg/kg）は，各リツキシマブ投与日の投与前 2 日間に腹腔内投与した。本試験で評価項目とした生存期間は，四肢麻痺を指標とする中枢神経系症状を発症するまでの期間と定義した（[Hernandez-Ilizaliturri, 2005](#)）。また，SCID マウスの末梢血を採取し，CD49 染色及びフローサイトメトリーで NK 細胞の割合を測定した。

フォローアップ試験では同様のマウスを用い，ポマリドミド（0.5 及び 5 mg/kg）を第 3，4，8，9，13，14，18，19 日に 1 日 1 回経口投与し，第 103 日までの生存期間に対する作用を検討した [報告書番号 CLG-4 Raji B-e200]。

[結果]

ポマリドミドとリツキシマブを併用投与した SCID マウスでは，リツキシマブの単独投与と比べ，生存期間の中央値が約 2 倍に延長した（リツキシマブ+ポマリドミド併用投与：74 日間，リツキシマブ単独投与：38 日間）。3 カ月間のフォローアップ期間終了時点で，リツキシマブ単独投与群の生存率（5.3%）と比べ，ポマリドミドとリツキシマブの併用投与群では高い生存率（30%）が認められた（[図 2.6.2-15](#)）（[Hernandez-Ilizaliturri, 2005](#)）。これらの結果は，リツキシマブ単独投与よりもポマリドミドとの併用投与が，リンパ腫の増殖を制御し，より延命効果に有効であることを示唆するものである。

図 2.6.2-15 ポマリドミドとリツキシマブの併用投与による Raji 細胞移植 SCID マウスでの生存期間改善作用



CC-4047 : ポマリドミド

Log-rank 検定

[Hernandez-Ilizaliturri, 2005 の Figure 4 より引用]

また、同マウスでの NK 細胞増殖に対するポマリドミドの効果を検討した結果、ポマリドミド投与（0.5 mg/kg/day）により、NK 細胞の有意な増加が認められた（ $p<0.001$ ）。ポマリドミド投与群の末梢血中 NK 細胞の割合（ $86 \pm 2.5\%$ ）は、溶媒対照群（ $36 \pm 11.62\%$ ）の 2 倍以上であった（平均値 $\pm$ 標準偏差）（Hernandez-Ilizaliturri, 2005）。

フォローアップ試験では、ポマリドミド（5 mg/kg）の経口投与とリツキシマブ（10 mg/kg）の腹腔内投与を併用することにより、Raji 細胞移植 SCID マウスの生存期間が未処置動物の生存期間と比べ有意に延長した（ $p<0.001$ ）。ポマリドミド投与では生存期間の中央値が 103 日間であり、これは未処置群と比べて 312%の生存期間延長に相当した [報告書番号 CLG-4 Raji B-e200]。

2.6.2.2.2.1.3 B 前駆細胞性急性リンパ性白血病細胞

[論文：Shalapour, 2006, 添付資料 4.3.18, 参考資料]

[方法]

治療抵抗性の急性リンパ性白血病に対するポマリドミドの作用を検討するため、雌性 NOD/SCID マウス（5～8 週齢，8 匹／群）に白血病患者由来の B 前駆細胞性急性リンパ性白血病細胞（B-cell precursor acute lymphocytic leukemia, BCP-ALL 細胞）を移植した。腫瘍体積が 200 mm³ となった日（第 1 日）からポマリドミド（50 mg/kg）の腹腔内投与を開始し，1 日 1 回で 19 日間投与した（皮下投与移植モデル）。

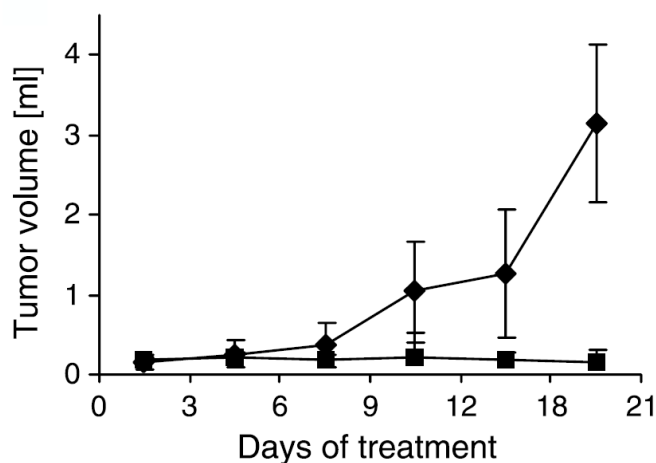
また，別の NOD/SCID マウスに再発急性リンパ芽球性白血病患者から採取した BCP-ALL 細胞を静脈内注射し，移植 3 日後からポマリドミド（50 mg/kg）の腹腔内投与を開始し，1 日 1 回で 27 日間投与した（静脈内投与移植モデル）。

腫瘍体積を指標として，ポマリドミドの抗腫瘍効果を評価した。また，切除した腫瘍組織中の MVD を組織学的に測定するとともに，活性型カスパーゼ 3 を認識する抗体を用いた免疫組織化学を実施した。

[結果]

皮下投与移植モデルでのポマリドミド投与による抗腫瘍効果を図 2.6.2-16 に示す。ポマリドミド投与群では，腫瘍体積の増加抑制作用が認められ，投与開始後 20 日目の対照群との比較で，その差は有意なものであった（ $p<0.001$ ）。ポマリドミド投与群では，MVD が対照群より有意に低く（ $p=0.021$ ），また活性型カスパーゼ 3 が検出された。

図 2.6.2-16 白血病性芽球細胞移植 NOD/SCID マウスでの腫瘍体積に対するポマリドミドの作用



■：ポマリドミド投与群，◆：溶媒対照群
平均値±標準偏差

[Shalapour, 2006 の Figure 6A より引用]

静脈内投与移植モデルでは、対照群の28日目で最初の瀕死マウスが認められ切迫屠殺したが、ポマリドミド投与群では異常所見が認められなかった。マウスを屠殺し剖検を行ったところ、白血病細胞のマウス脾臓への播種が、ポマリドミドによって顕著に抑制されていた。

2.6.2.2.2.2 血管新生阻害作用

[報告書番号 [SRI-P10.0101](#)，添付資料 4.2.1.1.37，評価資料]

[方法]

マウス Matrigel plug アッセイを用いて、ポマリドミドの *in vivo* 血管新生阻害効果を評価した。本試験では、血管新生誘発因子としてヒト VEGF (50 ng/mL)，ヒト bFGF (50 ng/mL) 及びヘパリン (3 ng/mL) を含有するマトリゲルを雌性 C57BL/6 マウス (4 匹/群) の両側腹部にそれぞれ 0.5 mL ずつ皮下注入した。ポマリドミド (3 及び 30 mg/kg) は、マトリゲルを注入した日から 1 日 1 回で 10 日間経口投与した。血管新生の程度は、CD31 抗体を用いた免疫組織化学的染色で測定した。

[結果]

ポマリドミド 3 及び 30 mg/kg 投与群では、微小血管形成がそれぞれ 15% 及び 47% 阻害され、30 mg/kg 投与群での阻害作用は対照群と比較して有意であった ($p < 0.001$)。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 固形腫瘍由来細胞に対する増殖阻害作用

[報告書番号 PD385, 添付資料 4.2.1.2.1, 評価資料*]

[報告書番号 5286-14, 添付資料 4.2.1.2.2, 評価資料*]

[方法]

6種の乳がん細胞（SKBR3, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 及び BT-474）及び2種の肺がん細胞〔非小細胞性（non-small cell lung carcinoma, NSCLC）：NCI-H460 及び A549〕を、0.3～100 µmol/L のポマリドミドで 72 時間処理した。処理後、MTT 測定を実施した〔報告書番号 PD385〕。

また、5q 欠損型の固形腫瘍細胞（PC-3, HN, LCLC103H, SW480 及び SK-MES-1）を、0.0001～100 µmol/L のポマリドミド存在下で 72 時間処理した。処理後、³H]-チミジン取り込みを指標に細胞増殖阻害率を算出した〔報告書番号 5286-14〕。

[結果]

ポマリドミドは、乳がん細胞である MDA-MB-468 細胞及び MCF-7 細胞に対し、増殖阻害活性を示した。ただし乳がん細胞は、造血器由来腫瘍細胞と比べ感受性は低かった（IC₅₀ 値は MDA-MB-468 細胞及び MCF-7 細胞でそれぞれ約 18～39 µmol/L 及び約 95 µmol/L であった）。また、他の細胞株での IC₅₀ 値は 100 µmol/L を超えていた（表 2.6.2-8）。

さらに、5q 欠損型の固形腫瘍細胞株（PC-3, HN, LCLC103H, SW480 及び SK-MES-1）に対し、ポマリドミドは 100 µmol/L までの濃度で、ほとんど増殖阻害を示さなかった。

表 2.6.2-8 乳がん及び NSCLC 細胞に対するポマリドミドの増殖阻害効果

細胞	IC ₅₀ 値 (µmol/L)
NCI-H460	>100
A549	>100
SKBR3	>100
ZR-75-1	>100
MDA-MB-231	>100
MDA-MB-468†	38.55/17.98
MCF-7†	94.09/96.22
BT-474	>100

†：2 試験で得られた値を示す。

[報告書番号 PD385 Table 2 より引用]

2.6.2.3.2 HbF 産生促進作用

[報告書番号 1200-066, 添付資料 4.2.1.2.3, 評価資料]

[方法]

ポマリドミドが HbF 産生を促進して赤血球生成を調節できるか、CD34⁺細胞の赤血球分化の実験系（*in vitro* 試験）を用いて検討した。

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

ヒト骨髄由来 CD34⁺造血幹細胞を SCF (100 ng/mL), Flt3-L (100 ng/mL) 及び IL-3 (20 ng/mL) で 6 日間処理した後, ポマリドミド (0.01~10 µmol/L) 存在または非存在下で SCF (50 ng/mL) 及びエリスロポエチン (2 または 4 U/mL) でさらに 6 日間曝露することで赤血球系細胞への分化誘導を行った。トロンボスポンジン受容体 (CD36), グリコホリン A (CD235a) 及びトランスフェリン受容体 (CD71) といった赤血球マーカーの発現を解析した。HbF 発現に対するポマリドミドの効果は, フローサイトメトリーを用いて HbF 発現細胞の割合 [HbF/成人ヘモグロビン (Adult hemoglobin, HbA) 比] として評価した。

[結果]

ポマリドミド処理により, 溶媒対照群と比べ赤血球分化が遅延した。これは, 後期赤血球マーカーである CD235a の発現が弱く, 赤血球分化初期マーカーである CD71 の発現が強く維持されていたことから裏付けられた。またポマリドミド処理では, CD34⁺細胞から赤血球への分化過程で, グロビンを含む赤血球特異的な表面マーカーの増加が認められた。フローサイトメトリー解析の結果, ポマリドミド存在下 SCF で処理した CD34⁺細胞では, HbF 発現及びエリスロポエチンが濃度依存的に増加することが認められた。

鎌状赤血球症は, 鎌状赤血球ヘモグロビン変異体 (Sickle cell hemoglobin, HbS) により生じる遺伝病である。また β-サラセミアは, 突然変異のために β-グロビン鎖が低下する又は産生されないという特徴を有している (Weatherall, 2001)。治療法としては, 内因性 HbF の再活性化が有用と報告されている (Steinberg, 2003)。ポマリドミドは, HbF 発現を濃度依存的に促進し, 結果として赤血球の生成を制御したことから, 鎌状赤血球症及び β-サラセミアに関連する疾患を予防又は軽減する可能性が示唆された。

2.6.2.3.3 皮膚線維症に対する作用

2.6.2.3.3.1 ブレオマイシン誘発性皮膚線維症マウスに対する作用

[報告書番号 UEN11162010JD, 添付資料 4.2.1.2.4, 評価資料]

[方法]

ブレオマイシン誘発性皮膚線維症マウスモデルを用い, ポマリドミドの線維化に対する予防効果及び既に発症している線維化に対する治療効果を検討した。線維症の予防効果評価では, ブレオマイシンの初回投与と同時にポマリドミドの投与を開始した。また治療効果評価では, ブレオマイシンを 3 週間隔日投与して皮膚線維化を惹起した後, ポマリドミドの投与を開始した。

DBA/2 マウス (1 群 8 匹) に対し, ブレオマイシン (0.5 mg/mL) 100 µL を上背部に皮内投与した。ポマリドミド (0.3, 3 及び 30 mg/kg) は, 1 日 1 回で経口投与した。ヘマトキシリン・エオジン染色により組織標本を作成し, 皮膚肥厚を測定した。また, α-平滑筋アクチン (Alpha-smooth muscle actin, α-SMA) の免疫組織化学染色により活性型の線維芽細胞 (筋線維芽細胞) 数を計測した。

[結果]

予防効果評価では、プレオマイシンのみを投与した対照群と比較し、ボマリドミド 0.3 mg/kg では皮膚肥厚に対する効果は認められなかった（皮膚肥厚を $6 \pm 0.35\%$ 抑制；平均値 $\pm$ 標準偏差）。しかしながら、3.0 及び 30 mg/kg では、皮膚肥厚がそれぞれ $31 \pm 0.47\%$ 及び $51 \pm 0.42\%$ と有意に抑制された（いずれも $p < 0.0001$ ）。また筋線維芽細胞数は、ボマリドミド 0.3, 3.0 及び 30 mg/kg の投与により、それぞれ $28 \pm 0.18\%$ ($p < 0.05$)、 $62 \pm 0.11\%$ ($p < 0.0001$) 及び $68 \pm 0.14\%$ ($p < 0.0001$) と有意に抑制された。

治療効果評価では、プレオマイシン投与のみのマウスと比べて、ボマリドミド 0.3 mg/kg では皮膚肥厚の退縮は認められなかったが、3.0 及び 30 mg/kg の投与により、皮膚肥厚はそれぞれ $33 \pm 0.54\%$ 及び $42 \pm 0.42\%$ 抑制された ($p < 0.0001$)。またボマリドミド 3.0 及び 30 mg/kg 投与群での筋線維芽細胞数は、それぞれ $58 \pm 0.20\%$ 及び $61 \pm 0.14\%$ と有意に抑制された（いずれも $p < 0.0001$ ）。

以上の結果より、皮膚線維症の非臨床モデルでボマリドミドは、予防効果だけでなく治療効果をも有することが明らかとなった。

2.6.2.3.3.2 Tsk-1 マウスでの作用

[報告書番号 [UEN07052012JD](#)，添付資料 4.2.1.2.5，評価資料]

[方法]

SSc モデル動物として知られる Tsk-1 マウスを用いて、ボマリドミドの線維化に対する効果を評価した。5 週齢 Tsk-1 マウス（1 群 8 匹）に対し、ボマリドミド 0.3, 3 及び 30 mg/kg を 1 日 1 回で 5 週間経口投与した。ヘマトキシリン・エオジン染色により組織標本を作成し皮膚肥厚を測定、また α -SMA の免疫組織化学染色により活性型の線維芽細胞（筋線維芽細胞）数を計測し、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化の指標とした。また、病変部位の皮膚組織中コラーゲン量として、ヒドロキシプロリン量を測定した。

[結果]

ボマリドミドの投与により、強力な抗線維化効果が認められた。ボマリドミド 0.3～30 mg/kg の経口投与により用量依存的な皮膚肥厚の減少が認められ、30 mg/kg 投与で最大効果となる $54 \pm 6\%$ の減少が認められた ($p = 0.001$)。皮膚肥厚の減少に加えボマリドミドは、用量依存的に線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を阻害し、また皮膚中のヒドロキシプロリン量を減少させた。

2.6.2.3.4 内皮細胞分化に対する作用

[報告書番号 [2231-24](#)，添付資料 4.2.1.2.6，評価資料]

[方法]

創傷治癒の過程では、血管内皮前駆細胞による血管の構築（血管新生）が行われる。内皮前駆細胞の分化に対するボマリドミドの効果を検討するため、ヒト臍帯血由来 CD133⁺前駆細胞を VEGF, SCF 及びボマリドミド（1 $\mu\text{mol/L}$ ）に 31 日間曝露し、造血細胞マーカー及び内皮細胞マーカー〔血小板内皮細胞接着分子-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1 : CD31)，血管内皮細胞カドヘリン (Vascular endothelial-cadherin : CD144)，血管内皮細胞増殖因子受容体

(Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) -2] の発現をフローサイトメトリー法で測定した。

[結果]

CD133⁺前駆細胞は、ポマリドミド処理により内皮細胞系列へ分化した。特に、内皮前駆細胞の増殖を増強が認められた。これは、内皮前駆細胞の形態が変化し紡錘形の細胞が増加して索状構造が形成されたこと及び内皮細胞表面マーカー (CD31, CD144 及び VEGFR-2) が増加したことから明らかである。

ポマリドミドは、血管新生全般に対して相反する効果を引き起こすように見える。前述のように、ポマリドミドは血管内皮細胞の浸潤活性を阻害し、結果として血管新生を阻害するが、脈管形成 (血管構造の再構築) に必要な内皮前駆細胞の分化を促進する。したがってポマリドミドは、創傷治癒を遅延させる可能性は低く、むしろ血管損傷を修復する可能性があると考えられる。

2.6.2.3.5 抗炎症作用

[報告書番号 1270RC35.001, 添付資料 4.2.1.2.7, 評価資料]

[方法]

ポマリドミドの抗炎症作用を、カラゲニン誘発性痛覚過敏足浮腫ラットモデルで検討した。雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (1 群 13 匹) に対しポマリドミド (50 mg/kg) を腹腔内投与、投与 30 分後に 1%カラゲニン 0.1 mL を左側後肢に皮下投与した。カラゲニン投与 3 時間後、左側後肢の体積を測定し、ポマリドミドの浮腫抑制効果を評価した。また、ポマリドミド投与 2, 3 及び 4 時間後に、熱性及び機械的刺激に対する痛覚閾値をそれぞれプランター試験法及び Randall-Selitto 試験法により測定した。

[結果]

ポマリドミド (50 mg/kg) は、カラゲニン誘発性後肢浮腫を有意に抑制した (42%抑制; $p \leq 0.05$)。またカラゲニン誘発性痛覚過敏に対し、ポマリドミドは熱性刺激による痛覚閾値を 70%, 機械的刺激による痛覚閾値を 45%上昇させたが (いずれも投与 3 時間後), いずれも統計学的に有意なものではなかった。

2.6.2.3.6 中枢神経系に対する作用

[報告書番号 PD444, 添付資料 4.2.1.2.8, 評価資料*]

[報告書番号 5572-001, 添付資料 4.2.1.2.9, 評価資料*]

[方法]

ポマリドミドの有する抗炎症活性が、中枢神経系疾患の治療に有効であるかを、ミクログリア及びアストロサイトをを用いた *in vitro* で評価した。

ヒトミクログリア初代培養細胞をポマリドミド (0.0006~60 $\mu\text{mol/L}$) で処理、30 分後に LPS (100 ng/mL) で 24 時間刺激し、サイトカイン産生を測定した。また、ヒトアストロサイト初代

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

培養細胞をポマリドミド (0.0006~60 $\mu\text{mol/L}$) で処理, 30 分後に IL-1 β (20 ng/mL) 又は LPS (100 ng/mL) で 24 時間刺激し, サイトカイン産生を測定した [報告書番号 PD444]。

さらに, マウスミクログリア細胞 (BV-2) 及びヒトアストロサイト初代培養細胞をポマリドミド (0.00001~10 $\mu\text{mol/L}$) で処理し, 30 分後に BV-2 細胞を LPS (10 ng/mL) で, ヒトアストロサイトを TNF- α (10 ng/mL) 及び IFN- γ (10 U/mL) で 24 時間刺激, 産生サイトカインを測定した [報告書番号 5572-001]。

[結果]

ポマリドミドは, LPS 刺激によるヒトミクログリアでの TNF- α 産生を阻害したが (IC₅₀ 値: 6 $\mu\text{mol/L}$), IL-6, MIP-1 α 及び IL-10 産生に対しては抑制効果を示さなかった (IC₅₀ 値:>60 $\mu\text{mol/L}$)。また, 同細胞での MCP-1, IL-8 及び RANTES 産生にも効果を示さなかった。IL-1 β 刺激によるヒトアストロサイトでの TNF- α , IL-6, MCP-1 及び IL-8 産生に対し, ポマリドミドは効果を示さなかったが, RANTES 産生を増強した。また, LPS で刺激した同細胞での IL-6, IL-8, MCP-1 及び RANTES 産生に対し, 効果は認められなかった [報告書番号 PD444]。

ポマリドミドは, LPS で刺激したマウスミクログリア及び TNF- α ・IFN- γ で共刺激したヒトアストロサイトでの IL-6 産生をそれぞれ IC₅₀ 値 3.0 及び 5.6 $\mu\text{mol/L}$ で阻害した。ポマリドミド 10 $\mu\text{mol/L}$ を添加した場合, マウスミクログリアでの TNF- α 産生は 43%阻害され, さらにマウスミクログリア及びヒトアストロサイトでの RANTES 産生をそれぞれ 10%及び 69%阻害した。しかしながら, MCP-1 に対する阻害効果は認められなかった [報告書番号 5572-001]。

2.6.2.3.7 UVB 惹起 TNF- α 産生に対する阻害作用

[報告書番号 5448-74, 添付資料 4.2.1.2.10, 評価資料*]

[方法]

ヒト新生児表皮角化細胞 (Human epidermal neonatal keratinocytes, HEKn) 及びマウス表皮角化細胞 (Mouse epidermal keratinocytes, MEK) を用い, UVB (50 mJ/cm²) 照射によって惹起される TNF- α の産生及び細胞障害に対するポマリドミドの作用を検討した。いずれの細胞もポマリドミド (0.1, 1 又は 10 $\mu\text{mol/L}$) で 1 時間処理した後 UVB を照射, さらに 1 時間の処理後に測定した。

[結果]

ポマリドミド 0.1 及び 1 $\mu\text{mol/L}$ は, HEKn での UVB 惹起による TNF- α 産生をそれぞれ約 45% 及び 98%抑制した。同様にポマリドミド 0.1~10 $\mu\text{mol/L}$ は, MEK での UVB 惹起による TNF- α 産生を約 90%抑制した。また, それぞれの試験で用いた細胞を回収し, ポマリドミド処理による細胞障害を検討した。その結果, MEK での UVB 誘発性細胞障害は, DMSO で処理した対照群 (溶媒対照群) と比較し, ポマリドミド処理により 26% (1.0 $\mu\text{mol/L}$) から 34% (0.1 $\mu\text{mol/L}$) 阻害された。一方, ポマリドミド (0.1~10 $\mu\text{mol/L}$) は HEKn での UVB 誘発性細胞障害に対しては阻害作用を示さなかった。

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

以上の結果より, HEK α 及び MEK の両角化細胞に対しポマリドミドは, UVB 照射による TNF- α 産生を強く阻害することが明らかとなった。したがって, UVB 照射後の TNF- α による自己及び周囲への影響（炎症や細胞障害など）に対しポマリドミドは, 防護効果として有効であると考えられる。しかしながら, TNF- α は UVB 照射による細胞障害誘導の主要因子ではない (TNF- α 中和抗体でも UVB 照射による細胞障害は抑制できないため)。したがって, UVB 照射によって直接障害（細胞死）を受ける細胞に対しては, ポマリドミドは効果を有さないと考えられる。

2.6.2.4 安全性薬理試験

ポマリドミドの安全性薬理試験として、ラットを用いて中枢神経系及び呼吸器系に対する作用を評価した。また、心血管系に対する作用の評価では、麻酔下イヌ及び覚醒下サルを用いた血行動態に対する作用 (*in vivo*)、及び hERG カリウムチャンネル電流に対する作用 (*in vitro*) を検討した。なお、麻酔下イヌを用いた *in vivo* 試験では心血管系パラメータと同時に呼吸器パラメータも測定した。すべての試験は GLP に準拠して実施した。

試験の一覧を表 2.6.2-9 に示す。

表 2.6.2-9 ポマリドミドの安全性薬理試験一覧

評価系	試験項目	試験系	投与量 (投与経路)	試験成績	報告書番号
中枢神経系					
<i>in vivo</i> 試験	行動, 外観, 自律神経性機能, 握力, 体重, 体温測定	ラット (雌雄 Crl:CD(SD)ラット)	250, 1000 及び 2000 mg/kg (経口投与)	2000 mg/kg まで統計学的に有意な作用は認められず, 生物学的にも意味のある作用は認められなかった。	CC-4047-TOX-011
心血管系					
<i>in vitro</i> 試験	hERG カリウムチャンネル電流に対する作用	<i>in vitro</i> (hERG チャンネル発現 HEK-293 細胞)	10 及び 100 µmol/L (実測値 7.9 及び 87.5 µmol/L)	それぞれの濃度で 0.8% 及び 0.9% の阻害活性のみ。	CC-4047-TOX-009
<i>in vivo</i> 試験	麻酔下イヌでの血行動態パラメータ (動脈圧, 心拍数, 左室圧, 最大立ち上がり速度, 大腿動脈血流量及び大腿動脈抵抗の最大値及び平均値) 及び ECG パラメータの評価	イヌ (雌雄ビーグル犬)	2.5, 10 及び 25 mg/kg (静脈内投与)	2.5 及び 10 mg/kg 投与で作用なし。 25 mg/kg 投与で 1 匹 (雌性, 1/4 匹) に動脈圧, 大腿動脈血流量及び最大立ち上がり速度の低下が認められたが, 中断後再投与しても変化は認められなかった。	1398/110-D6146
	覚醒下サル (テレメトリー法) の血行動態パラメータ (収縮期血圧, 拡張期血圧, 平均動脈圧, 脈圧), 心拍数, 呼吸数及び ECG パラメータの評価	サル (雄性カニクイザル)	0.2, 2.0 及び 10 mg/kg (経口投与)	0.2 及び 2.0 mg/kg では作用なし。 10 mg/kg で共変量で調整した脈圧の平均値がわずかに低値を示したが, 意義のある作用とは考えなかった。	CC-4047-TOX-012

表 2.6.2- 9 ポマリドミドの安全性薬理試験一覧（続き）

評価系	試験項目	試験系	投与量 (投与経路)	試験成績	報告書番号
呼吸器系					
in vivo 試験	ラットでの呼吸器パラメータの評価	ラット (雄性 CrI:CD(SD)ラット)	250, 1000 及び 2000 mg/kg (経口投与)	2000 mg/kg まで呼吸数, 1 回換気量又は分時換気量に対する作用は認められなかった。	CC-4047-TOX-014
	麻酔下イヌでの呼吸器パラメータの評価	イヌ (雌雄ビーグル犬)	2.5, 10 及び 25 mg/kg (静脈内投与)	2.5 及び 10 mg/kg 投与で作用なし。 25 mg/kg 投与の 1 匹で血行動態に変化が認められ投与を中止したが, 再投与しても変化は認められなかった。	1398/110-D6146

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

[報告書番号 CC-4047-TOX-011, 添付資料 4.2.1.3.1, 評価資料]

[方法]

ポマリドミドの中枢神経系に対する試験では, 59 日～61 日齢の CrI:CD(SD)ラット (雌雄各 10 匹/群) にポマリドミドを 0 (溶媒対照), 250, 1000 及び 2000 mg/kg の用量で経口単回投与した。投与容量は各群とも 12 mL/kg とした。溶媒対照群には, 1.0%カルボキシメチルセルロース

(Carboxymethylcellulose, CMC) 水溶液を投与した。試験期間中, 毎日少なくとも 2 回の生死観察を行い, 一般症状及び外観観察を試験期間中 1 日 1 回観察した (投与日は, 投与前後に複数回実施)。体重は投与日及び投与 24 時間後に測定した。自律神経性機能, 反応性, 感受性, 握力, 感覚運動状態, 一般症状の評価は, 最高血中濃度に達すると考えられる投与 3 時間後 (±5 分) 及び回復性の評価として投与 24 時間後 (±5 分) に実施した。

[結果]

試験期間中に死亡例はなく, 切迫屠殺した動物もいなかった。投与 3 時間後の評価で, 尿の変色 (緑色を呈する) がいずれの投与量でも雌雄ともに 1～3 匹に認められた。2000 mg/kg を投与した雄ラット 1 匹では, 24 時間後まで尿の変色が認められた。剖検で異常は認められなかった。体重及び体温は, 2000 mg/kg まで雌雄ラットともに変化は認められなかった。投与後 3～24 時間で, 行動, 自律神経性機能, 外観及び握力に統計学的に有意な変化はなく, 生物学的及び毒性学的意義のある所見は認められなかった。

以上より, 本試験での NOEL は最高投与量である 2000 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.2 心血管系に対する作用

2.6.2.4.2.1 hERG チャンネルに対する作用

[報告書番号 [CC-4047-TOX-009](#), 添付資料 4.2.1.3.2, 評価資料]

[方法]

hERG チャンネルを発現する HEK-293 細胞を用いた試験で、hERG チャンネル電流に対するポマリドミド (10 及び 100 $\mu\text{mol/L}$) の影響を検討した。陽性対照としてテルフェナジン (60 nmol/L) を用いた。各投与群で、3~4 回の繰り返し実験を行った。

HPLC で解析した最終濃度 (実測濃度) は、“10 $\mu\text{mol/L}$ ”が 7.9 $\mu\text{mol/L}$ 、“100 $\mu\text{mol/L}$ ”が 87.5 $\mu\text{mol/L}$ であった。したがって、すべての記載でこの実測値を記載することとした。

[結果]

hERG チャンネル電流は、ポマリドミド 7.9 $\mu\text{mol/L}$ (2169 ng/mL) で $0.8 \pm 0.4\%$ ($n = 3$), 87.5 $\mu\text{mol/L}$ (23,914 ng/mL) で $0.9 \pm 0.3\%$ ($n = 4$) の阻害であり、統計学的に有意な hERG チャンネル電流の抑制は認められなかった。陽性対照のテルフェナジン (60 nmol/L) は $78.8 \pm 3.1\%$ の阻害を示した (いずれも平均値 $\pm$ 標準誤差)。

この結果から、*in vitro* で心筋遅延整流性カリウムイオンチャンネル電流をポマリドミドが阻害する可能性は低いことが示された。したがって、心筋細胞の電気生理学的機能に影響を及ぼす可能性も低いと考えられる。

2.6.2.4.2.2 麻酔イヌでの心血管系に対する作用

[報告書番号 [1398/110-D6146](#), 添付資料 4.2.1.3.3, 評価資料]

[方法]

ビーグル犬 (雌雄各 2 匹/ポマリドミド又は溶媒投与群: 6~7 ヶ月齢) を用い、麻酔下でのポマリドミドの心血管系に対する影響を検討した。ポマリドミドの投与量は、2.5, 10 及び 25 mg/kg とした。同一濃度の投与溶液 (5 mg/mL) を同一の投与速度 (200 mL/h) で静脈内投与、投与量は投薬している時間を変更することで調整した。2.5 mg/kg 投与から実施し、投与終了後から次の投与開始まで少なくとも 30 分間の間隔を置いた。なお、溶媒対照群として 20 v/v% ポリエチレングリコール 400 濃度のイントラリピッド溶液を用いて、ポマリドミド投与群と同じ投与スケジュールで静脈内投与した。本試験での血行動態パラメータは、動脈圧 (収縮期血圧、拡張期血圧及び平均血圧)、心拍数、左室圧、最大立ち上がり速度 (dP/dt_{max})、大腿動脈血流量及び大腿動脈抵抗の最大値及び平均値並びに心電図パラメータ [RR 時間, ST 時間, QRS 幅, PR 時間, QT 時間及び QTc 並びに R 波, P 波及び T 波の振幅] とした。

[結果]

試験期間中に死亡例は認められなかった。ポマリドミド 2.5 及び 10 mg/kg では、溶媒対照群と比較して心血管系に特記すべき所見は認められず、QTc をはじめとする各心電図パラメータにも異常は認められなかった。また、本試験の最高投与量 25 mg/kg の静脈内投与でも、4 匹中 3 匹に生物学的及び毒性学的に意義のある所見は認められなかった。しかし、25 mg/kg 投与群の雌性イ

ヌ 1 匹で投与開始 7 分後に、呼吸率上昇、血圧低下、大腿動脈血流量低下及び dP/dtmax 低下といった有害所見が認められた。したがって投与を中止、人工呼吸を行ったことで上記パラメータが安定したため、投与を再開したところ、再開後 45 分間は更なる変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験での NOEL は 10 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.2.3 覚醒カニクイザルでの心血管系に対する作用（テレメトリー法）

[報告書番号 CC-4047-TOX-012, 添付資料 4.2.1.3.4, 評価資料]

[方法]

テレメトリーを装着した覚醒サルを用いた試験では、雄性カニクイザル 4 匹（試験開始時 4.4～4.9 年齢）を用い、投与量 0.2, 2.0 及び 10 mg/kg でポマリドミドを、また溶媒対照として 1%CMC 水溶液を、いずれも投与容量 5 mL/kg で経口単回投与した。少なくとも 7 日間の休薬期間を設け、第 1 日、8 日、15 日及び 25 日にラテン方格交叉方法で投与した。心血管系機能に対するポマリドミドの影響は、質的及び量的な ECG パラメータの変化に基づき評価した。ECG パラメータとして、PR 時間、QT 時間、QTc、QRS 幅、血行動態パラメータ（収縮期血圧、拡張期血圧、平均動脈圧、脈圧）及び心拍数並びに呼吸率を測定した。また、生存率、体重、体温、摂餌量及び一般症状も評価した。

投与前 90 分間以上（ベースライン）、少なくとも投与 7 時間後、及びその後 1 時間ごとに 15 分間以上少なくとも 25 時間後まで、テレメトリーによりデータを収集した。ECG パラメータの解析は、投与前、投与 1, 2, 4, 8, 12 及び 24 時間後に実施した。血行動態パラメータ、腹腔内体温及び呼吸率は投与 7 時間後までは 1 時間平均値、投与 7 時間後から 25 時間後までは 3 時間平均値を解析した。

[結果]

試験期間中に死亡例は認められなかった。摂餌量、体重、一般症状、体温、心拍数、呼吸率に有害な所見は認められず、ECG パラメータでも異常は認められなかった。血行動態パラメータでは、ポマリドミド 10 mg/kg 投与群の共変量で調整した脈圧の平均値が低値を示したが、変化量は 3 mmHg であり、その割合は約 10%と小さく、同様の小さな変化は溶媒対照群でも認められたことから、この変化はポマリドミド投与に起因するものではないと判断した。

以上の結果から、本試験での NOEL は最高投与量である 10 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.3 呼吸器系に対する作用

2.6.2.4.3.1 ラットでのプレチスモグラフによる呼吸器系評価

[報告書番号 CC-4047-TOX-014, 添付資料 4.2.1.3.5, 評価資料]

[方法]

ポマリドミドの呼吸器系に対する試験では、雄性 Crl:CD(SD)ラット（8 匹／群：約 11 週齢）にポマリドミドを 0（溶媒対照）、250, 1000 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与した。投与容量は、各群とも 10 mL/kg とした。溶媒対照群として 1.0%CMC 水溶液を用いた。呼吸数、1 回換気量及び分時換気量の測定にはプレチスモグラフを用い、投与前 60 分間及び投与後 6 時間以上収集した。

[結果]

試験期間中に死亡例は認められなかった。いずれの投与量でも、呼吸数、1回換気量及び分時換気量にポマリドミド投与の影響は認められなかった。また、投与後の一般症状で有害所見も認められなかったことから、本試験でのNOELは検討した最高投与量である2000 mg/kgと判断した。

2.6.2.4.3.2 麻酔イヌでの呼吸器系に対する作用

[報告書番号 1398/110-D6146, 添付資料 4.2.1.3.3, 評価資料]

[方法]

ビーグル犬を用い、麻酔下での *in vivo* 心血管系に対するポマリドミドの影響を検討した試験(2.6.2.4.2.2 項)では、呼吸器系に対する作用も同時に検討した。測定した呼吸器系パラメータは、最大呼気流量、最大吸気流量、1回換気量、分時換気量及び呼吸数であった。

[結果]

ポマリドミド2.5及び10 mg/kgの静脈内投与では呼吸器系に明らかな影響は認められなかった。最高投与用量25 mg/kg投与でも、4匹中3匹で生物学的及び毒性学的意義のある所見は認められなかった。25 mg/kg投与群の雌性イヌ1匹では、血行動態に対する影響により投与を中断したが、投与再開後に同様の影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

ポマリドミドによる NK 細胞活性化促進に対する各種化学療法薬との併用効果 (2.6.2.2.1.3.2 項), ADCC 活性に対する各種抗体治療薬との併用効果 (2.6.2.2.1.3.3 項) 及びバーキットリンパ腫移植 SCID マウスでのリツキシマブとの併用効果 (2.6.2.2.1.2.2 項) に関しては、既に「効力を裏付ける試験」として記した。本項では、Dex との併用効果を中心に、2.6.2.2 項に記載していないその他の結果を記す。

2.6.2.5.1 各種 MM 細胞に対するポマリドミドと Dex の併用効果

[報告書番号 7609-111, 添付資料 4.2.1.4.1, 評価資料]

[方法]

ポマリドミドの細胞増殖阻害活性に対する Dex 併用の効果を明確にする目的で、各種 MM 細胞 (H929, KMS-12-BM, LP-1 及び OPM-2) を用いて試験を実施した。

Dex 存在下又は非存在下、それぞれの細胞をポマリドミドで 3 日間処理した。また Dex 存在下の検討では、Dex 濃度を変化させ、さらに 2 日間処理した。同様に、ポマリドミド存在下又は非存在下、Dex で 3 日間処理した。ポマリドミド存在下の検討ではポマリドミド濃度を変化させ、さらに 2 日間処理した。5 日間の処理終了後、細胞内 ATP 濃度を指標とし、細胞増殖を測定した。

また、H929, LP-1 及び OPM-2 細胞を用い、Dex 存在下又は非存在下、ポマリドミドで 48 時間処理した。処理後、細胞抽出液を調製し免疫ブロット法 [対象因子: GR (Glucocorticoid receptor NR3C1), IRF-4, Aiolos, Rb (pS608, pS807/811 及び total form), c-Myc, p21^{WAF-1}, p27^{Kip-1} 及び CRBN] を実施した。

[結果]

細胞増殖に対するポマリドミド、Dex 及び両薬剤併用時の作用を表 2.6.2-10 に示す。

H929 細胞では、ポマリドミド単独処置による IC₅₀ 値が 0.14 µmol/L、Dex (0.0001 µmol/L) 併用下で 0.19 µmol/L と、併用による相加効果は認められなかった。一方、Dex 単独処置による IC₅₀ 値は 0.046 µmol/L、ポマリドミド (0.03 µmol/L) 併用下で 0.0011 µmol/L と、ポマリドミドと Dex との併用による相乗効果が認められた。同様に、LP-1 細胞及び OPM-2 細胞でも、ポマリドミドと Dex との併用による相乗効果が認められた。しかしながら、Dex 非感受性である KMS-12-BM 細胞ではポマリドミド併用による相加効果も認められなかった。

表 2.6.2-10 ポマリドミドと Dex の単独または併用による細胞増殖に対する作用

	IC ₅₀ 値 (μmol/L)			
	H929	KMS-12-BM	LP-1	OPM-2
ポマリドミド単独	0.14	0.031	>100	17.3
Dex 単独	0.046	>100	52.0	0.18
ポマリドミド+Dex (固定濃度 ¹⁾)	0.19 (相加効果なし)	0.055 (相加効果なし)	0.0083 (相乗効果)	0.031 (相乗効果)
Dex+ポマリドミド (固定濃度 ²⁾)	0.0011 (相乗効果)	>100 (相加効果なし)	0.00013 (相乗効果)	0.00011 (相乗効果)

[報告書番号 7609-111 Table 2, 3, 4 及び 5 より抜粋]

3 種類の MM 細胞 (H929, LP-1 及び OPM-2 細胞) を用いた免疫ブロット法の結果を総括すると、骨髄腫細胞生存因子 IRF-4 及び癌遺伝子 c-Myc の発現低下, Rb のリン酸化抑制, 及び p27^{Kip-1} の発現増加作用に両薬剤併用による相乗効果が認められた。さらに, LP-1 細胞では, ポマリドミドの標的分子の 1 つである CRBN の発現増加に両薬剤併用による相乗効果が認められた。

2.6.2.5.2 レナリドミド耐性 MM 細胞でのポマリドミドと Dex との併用作用

[報告書番号 1785-4047, 添付資料 4.2.1.1.5, 評価資料]

[報告書番号 DM2775-49, 添付資料 4.2.1.4.2, 評価資料]

[報告書番号 7596-01, 添付資料 4.2.1.1.6, 評価資料]

[方法]

レナリドミド感受性及び耐性 MM 細胞に対する, ポマリドミドでの増殖阻害を 2.6.2.2.1.2.1.3 項に示した。本項では, ポマリドミドと Dex との併用効果を記載する。

レナリドミド感受性及び耐性 H929 細胞を用いて実施した Dex 併用によるポマリドミドの細胞増殖阻害活性, 細胞周期制御活性及び細胞死誘導活性に関する試験では, ポマリドミド (0.01～10 μmol/L) と Dex の併用処理を 5 日間行った。処理後, トリパンブルー染色及び 7-アミノアクチノマイシン D (7-Amino-actinomycin D, 7-AAD) 染色を行った。また, ポマリドミド (1 及び 10 μmol/L) と Dex (1 μmol/L) 併用で MM 細胞を 48 時間処理し, 細胞周期及び細胞死関連因子に対する免疫ブロット法を行った [報告書番号 1785-4047]。

同様の方法を用いた確認試験 [報告書番号 DM2775-49] として, ポマリドミド (0.001～100 μmol/L) に Dex を併用して 5 日間処理し, 処理後 7-AAD 染色を実施した。細胞死誘導活性は, カスパーゼ 3/7 活性 (72 時間併用処理), 7-AAD/Annexin V 染色 (5 日間併用培養) で評価した。

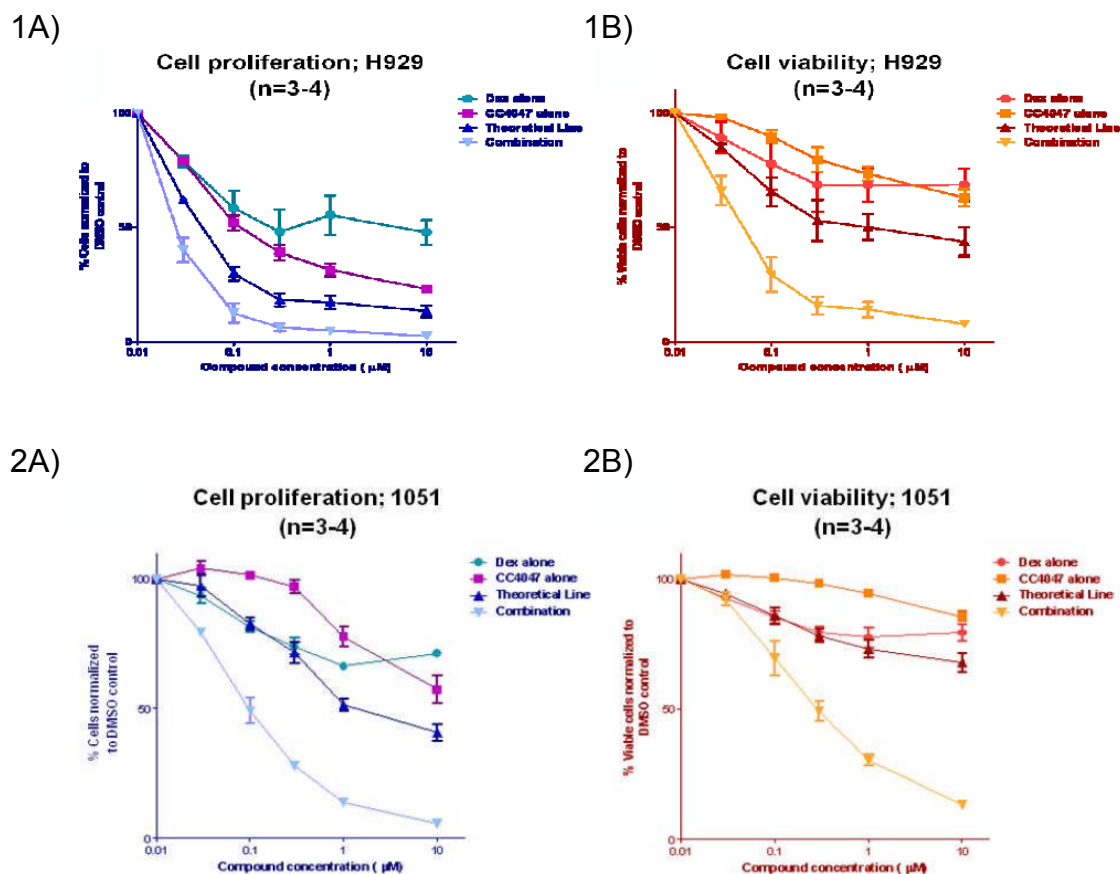
別試験では, レナリドミド又はポマリドミド耐性 H929 細胞及び KMS-12-BM 細胞を用い, Dex (100 nmol/L) 併用下での薬剤耐性獲得に関する時間経過を検討した [報告書番号 7596-01]。

[結果]

Dex は, レナリドミド耐性 H929 細胞の増殖を単独で阻害した [25%阻害濃度 (Concentration of drug producing 25% inhibition, IC₂₅) 値 : 0.8 μmol/L]。また Dex とポマリドミドとの併用で, レナリドミド感受性及び耐性 H929 細胞のいずれに対しても強力な相乗効果が認められ, 増殖阻害とともに, 細胞死誘導が認められた (図 2.6.2-17) [報告書番号 1785-4047]。

別試験でも、Dex とポマリドミドとの併用で、細胞増殖阻害活性（図 2.6.2-18）及び細胞死誘導活性（図 2.6.2-19 及び図 2.6.2-20）に対する強力な相乗効果が認められた [報告書番号 DM2775-49]。

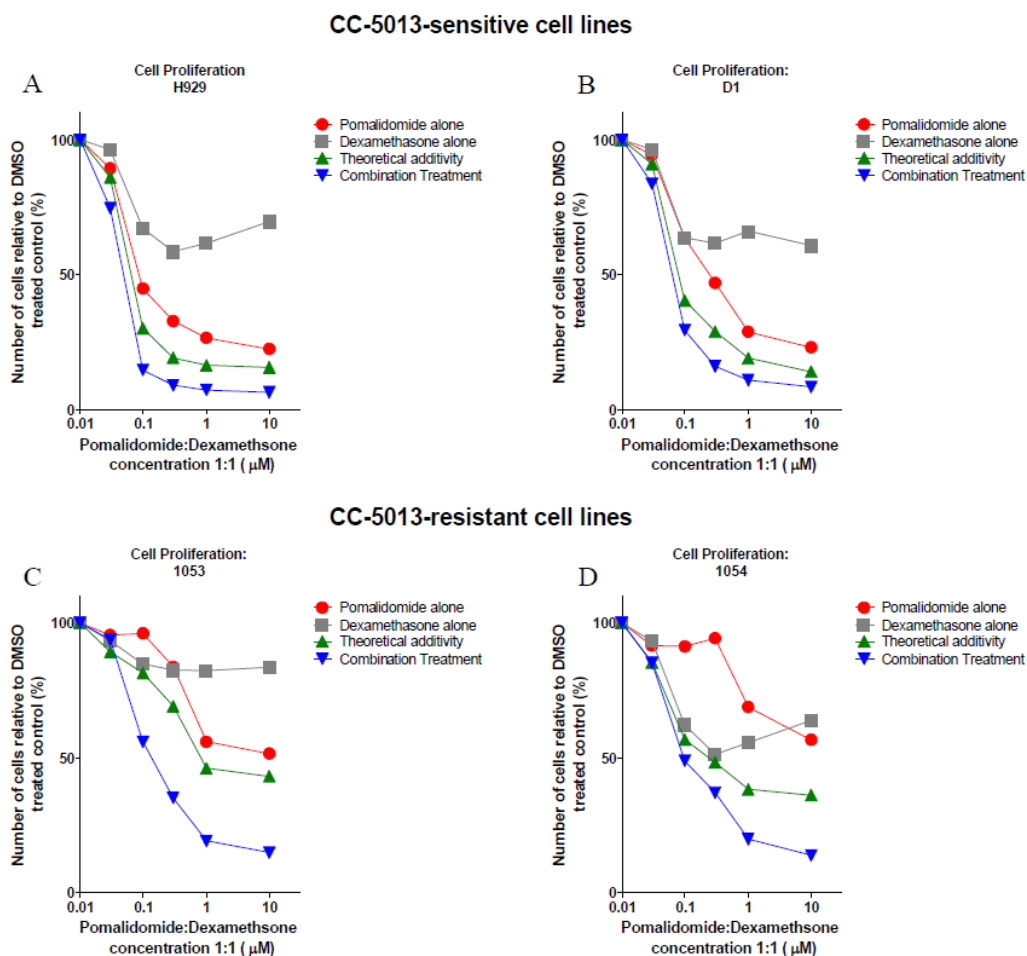
図 2.6.2-17 レナリドミド感受性及び耐性細胞での細胞増殖及び細胞死誘導に対するポマリドミドと Dex との併用作用



1A)及び 1B) : レナリドミド感受性細胞
2A)及び 2B) : レナリドミド耐性細胞 (亜株 1051 での結果)

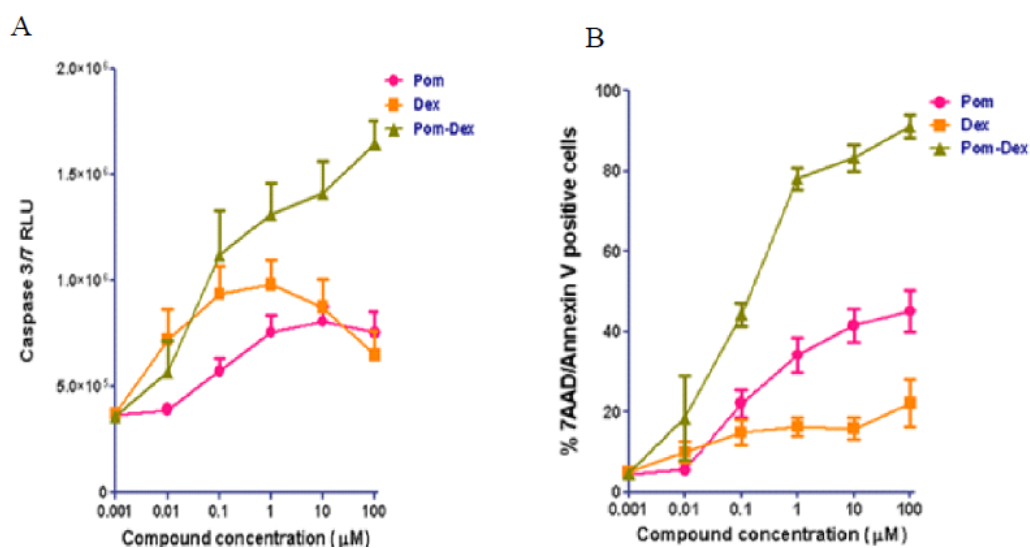
[報告書番号 1785-4047 の Figure 7 より抜粋]

図 2.6.2-18 レナリドミド感受性及び耐性細胞での細胞増殖に対するポマリドミドとDexとの併用作用



[報告書番号 DM2775-49 の Figure 2 より引用]

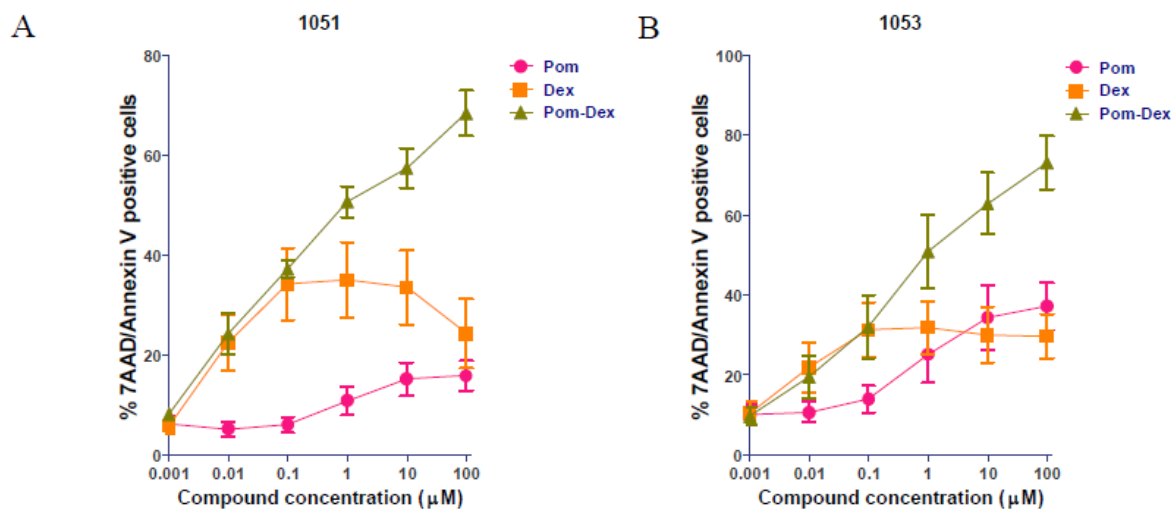
図 2.6.2-19 レナリドミド感受性細胞での細胞死誘導に対するポマリドミドとDexとの併用作用



パネル A ではカスパーゼ 3/7 活性を指標とした評価。また、パネル B では 7-AAD/Annexin V 共染色による評価。どちらの評価でも強力な相乗効果が認められた。

[報告書番号 DM2775-49 の Figure 4 より引用]

図 2.6.2-20 レナリドミド耐性細胞での細胞死誘導に対するポマリドミドと Dex との併用作用

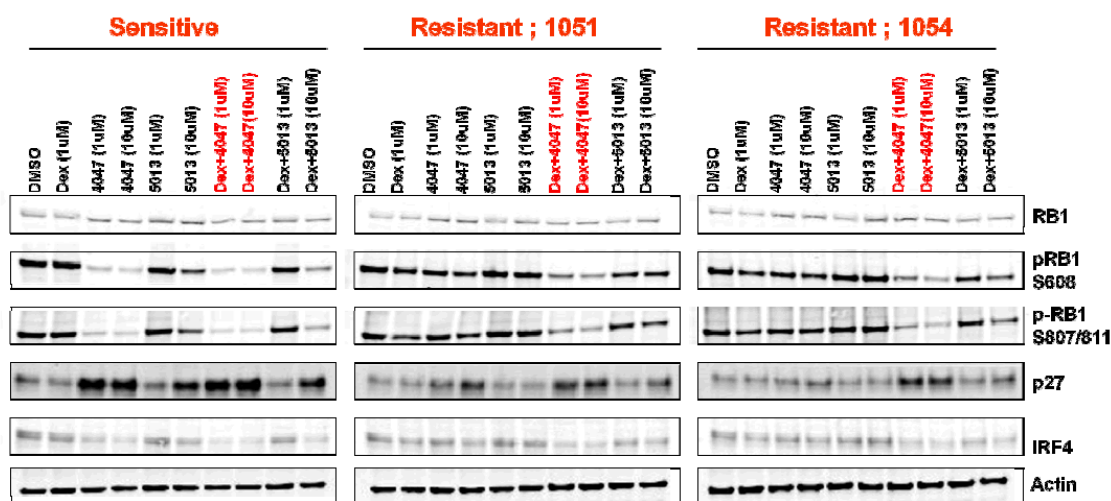


パネル A は 1051 亜株, パネル B は 1053 亜株を用いた際の 7-ADD/Annexin V 共染色による評価。いずれのレナリドミド耐性細胞でも強力な相乗効果が認められた。

[報告書番号 DM2775-49 の Figure 5 より引用]

MM 細胞での細胞周期及び細胞死関連因子を免疫ブロット法により評価した結果, レナリドミド耐性 H929 細胞亜株 (1051 及び 1054) に対するポマリドミドと Dex との併用により, Rb のリン酸化阻害, p27^{Kip-1} の増加, 細胞死抑制因子 (Survivin 及び Bcl-2) の減少, 骨髓腫細胞生存因子 (IRF-4) の減少並びに細胞死促進因子 Bim の増加が認められた (図 2.6.2-21 及び図 2.6.2-22) [報告書番号 1785-4047]。

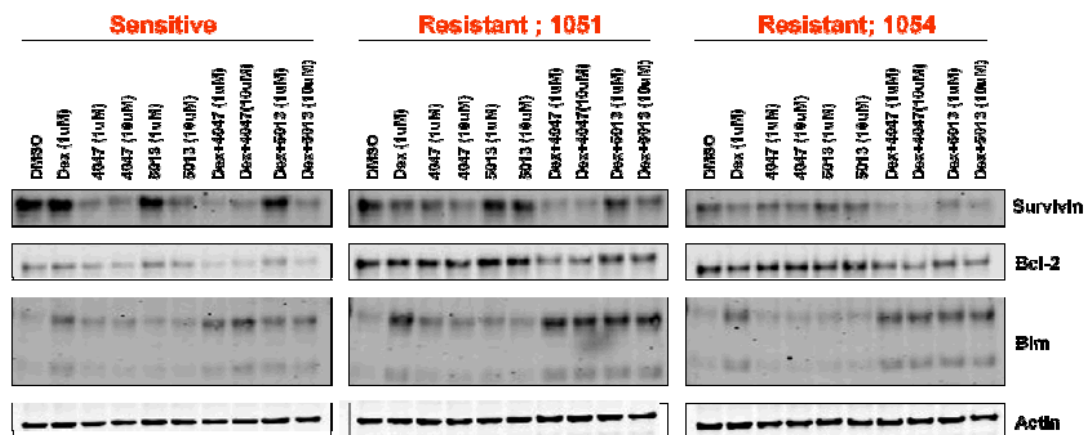
図 2.6.2-21 細胞周期制御因子に対するポマリドミド単独及び Dex 併用作用



RB1 : Rb

[報告書番号 1785-4047 の Figure 9 より引用]

図 2.6.2-22 細胞死・細胞生存関連因子に対するポマリドミド単独及び Dex との併用作用



[報告書番号 1785-4047 の Figure 10 より引用]

ポマリドミド又はレナリドミド耐性 MM 細胞亜株 (KMS-12-BM 及び H929 由来) を用いて, Dex (100 nmol/L) 併用下でのポマリドミド又はレナリドミドに対する感受性を検討した [報告書番号 7596-01]。その結果, いずれのレナリドミド耐性細胞亜株でも, レナリドミドに対する感受性は Dex 併用下でも認められなかった (IC_{50} 値: $> 100 \mu\text{mol/L}$)。ポマリドミドに対する感受性は Dex 併用下でも低下し, IC_{50} 値は KMS-12-BM 細胞及び H929 細胞でそれぞれ 48.3 及び $3.9 \mu\text{mol/L}$ であった。同様に, ポマリドミド耐性 KMS-12-BM 細胞では, Dex 併用下でもレナリドミドに対し非感受性 (IC_{50} 値: $> 100 \mu\text{mol/L}$) であり, H929 細胞でも Dex 併用下でのレナリドミドに対する感受性が低下した。また, Dex 併用下のポマリドミドに対する感受性もポマリドミド存在下での培養前と比較して, KMS-12-BM 細胞及び H929 細胞でそれぞれ約 1/130 及び約 1/418 と低下し, IC_{50} 値はそれぞれ 0.17 及び $0.67 \mu\text{mol/L}$ であった (表 2.6.2-11)。

以上の結果より, ポマリドミド又はレナリドミドの存在下でこれらの MM 細胞を継続的に培養することにより, 両薬剤に対する耐性は増強するが, ポマリドミドに対する耐性獲得の方が緩徐であることが示された。

表 2.6.2-11 ポマリドミド又はレナリドミド存在下で培養した KMS-12-BM 細胞及び H929 細胞での両薬剤に対する耐性獲得までの時間経過 (Dex 併用試験)

	被験薬	感受性細胞	IC ₅₀ 値 (μmol/L)			
			1 ヶ月目	2 ヶ月目	3 ヶ月目	4 ヶ月目
レナリドミド耐性 KMS-12-BM 細胞	レナリドミド+	3.3	6.8	4.8	>100	NT
	Dex (100 nmol/L)					
	ポマリドミド+	0.0019	0.099	0.18	48.3	NT
ポマリドミド耐性 KMS-12-BM 細胞	レナリドミド+	0.55	30.5	54.4	>100	NT
	Dex (100 nmol/L)					
	ポマリドミド+	0.0013	0.46	0.19	0.17	NT
レナリドミド耐性 H929 細胞	レナリドミド+	0.0037	0.068	56.5	3.7	>100
	Dex (100 nmol/L)					
	ポマリドミド+	0.0016	0.0023	0.082	0.048	3.9
ポマリドミド耐性 H929 細胞	レナリドミド+	0.0037	0.011	1.1	0.15	36.6
	Dex (100 nmol/L)					
	ポマリドミド+	0.0016	0.00077	0.029	0.054	0.67

IC₅₀ 値：被験物質を 72 時間処置した際に細胞増殖を 50%阻害する濃度

NT：実施せず

[報告書番号 7596-01 の Table 2～Table 5 より作成]

2.6.2.5.3 MM 細胞移植 SCID マウスでのポマリドミドと Dex の併用作用

[報告書番号 AP3975/4416/4462/4479/4524, 添付資料 4.2.1.1.34, 評価資料]

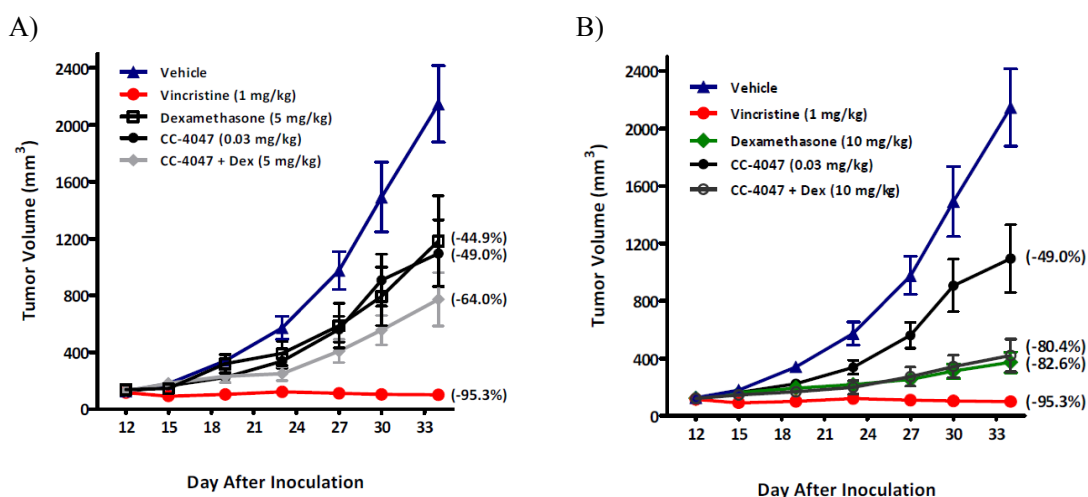
[方法]

2.6.2.2.2.1.1 項で記載したヒト MM 細胞に由来するレナリドミド感受性又は耐性 (1051 亜株) H929 細胞を移植した雌性 CB-17-SCID マウスに対し、ポマリドミドと Dex との併用効果を検討した。H929 細胞移植マウスでは、腫瘍体積が約 125 mm³ (116～137 mm³) になった日 (移植 12 日後) からポマリドミド (0.03 mg/kg) 単独, Dex (5 又は 10 mg/kg) 単独及び両薬剤併用を 1 日 1 回で 21 日間経口投与し、最終評価を移植 34 日後に実施した。また、レナリドミド耐性 H929 細胞移植マウスでは、腫瘍体積が 137～166 mm³ になった日 (移植 12 日後) からポマリドミド (1 又は 3 mg/kg) 単独, Dex (5 mg/kg) 単独及び両薬剤併用を 1 日 1 回で 14 日間経口投与し、最終評価を移植 27 日後に実施した。

[結果]

H929 細胞 (レナリドミドに対し感受性を有する) 移植マウスでのポマリドミドと Dex の併用投与の作用を図 2.6.2-23 に示す。ポマリドミド (0.03 mg/kg) 単独投与により腫瘍体積の縮小が認められ、移植 34 日後での減少率は 49%であった (p<0.01)。Dex (5 又は 10 mg/kg) 単独投与でも、腫瘍体積の縮小が認められ、移植 34 日後での減少率はそれぞれ 44.9%(p<0.01) 及び 82.6%(p<0.001) であった。ポマリドミド (0.03 mg/kg) 及び Dex (5 mg/kg) 単独投与での腫瘍減少率 (49%及び 44.9%) と比較し、併用投与では 64%と減少率の増加が認められた。一方、ポマリドミド (0.03 mg/kg) と Dex (10 mg/kg) との併用投与では 80.4%であり、Dex (10 mg/kg) 単独投与時の値 (82.6%) と差はなかった。

図 2.6.2-23 H929 細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドと Dex の併用作用



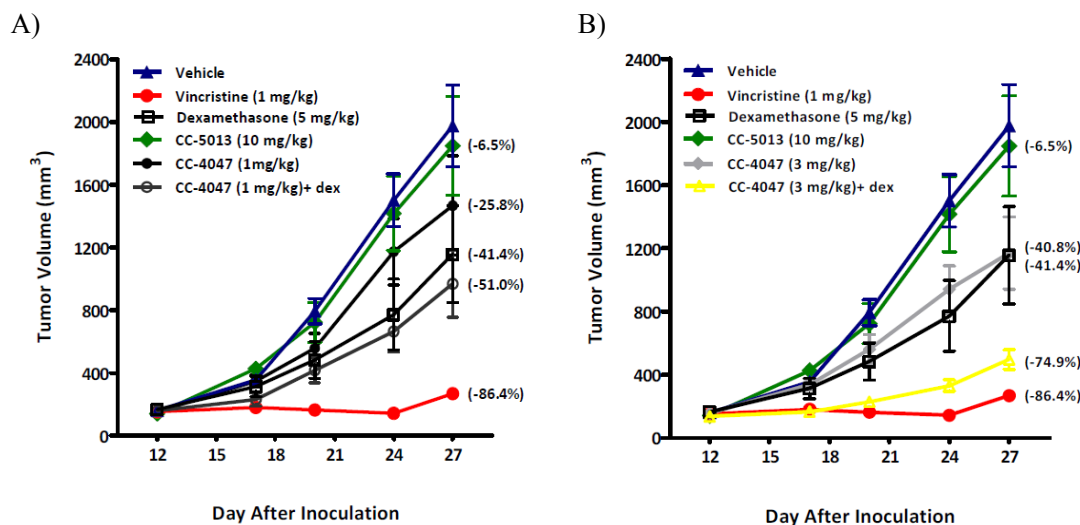
CC-4047 : ポマリドミド

パネルAではポマリドミド0.03 mg/kgとDex 5 mg/kgを併用した際の結果を、パネルBではポマリドミド0.03 mg/kgとDex 10 mg/kgを併用した際の結果を示す。対照群やポマリドミド単独に関するデータはいずれのパネルでも同一データを示している。

[報告書番号 AP3975/4416/4462/4479/4524 の Figure 3 及び 4 より引用]

レナリドミド耐性 H929 細胞移植マウスでのポマリドミドと Dex との併用作用を図 2.6.2-24 に示す。ポマリドミド (1 又は 3 mg/kg) 単独投与により腫瘍体積の縮小が認められ、移植 27 日後での減少率はそれぞれ 25.8%及び 40.8%であった。また、Dex (5 mg/kg) 単独投与でも、腫瘍体積の縮小が認められ、移植 27 日後での減少率は 41.4%であった。両薬剤とも用いた用量での腫瘍体積の縮小は溶媒対照群と比較して有意ではなかった。ポマリドミド (1 mg/kg) 及び Dex (5 mg/kg) 単独投与での腫瘍減少率 (25.8%及び 41.4%) と比較し、併用投与では 51.0%に上昇し、溶媒対照群との比較で有意であったが、相乗的な変化ではなかった。一方、ポマリドミド (3 mg/kg) と Dex (5 mg/kg) との併用投与では、腫瘍減少率は 74.9%まで上昇し、それぞれの単独投与と比較して有意であり、相乗効果が認められた。

図 2.6.2-24 レナリドミド耐性 H929 細胞移植マウスの腫瘍体積に対するポマリドミドと Dex の併用作用



CC-4047 : ポマリドミド

パネル A ではポマリドミド 1 mg/kg と Dex 5 mg/kg を併用した際の結果を示す。パネル B ではポマリドミド 3 mg/kg と Dex 5 mg/kg を併用した際の結果を示す。対照群や Dex 単独に関するデータはいずれのパネルでも同一データを示している。

[報告書番号 AP3975/4416/4462/4479/4524 の Figure 7 及び 8 より引用]

2.6.2.5.4 MM 細胞移植 SCID マウスでのポマリドミド、ボルテゾミブ又は Dex の単剤又は併用作用

[報告書番号 SALA-151008, 添付資料 4.2.1.4.3, 評価資料*]

[方法]

MM 細胞 (MM.1S 細胞) 移植 SCID マウス (9 匹/群) を用いて、ポマリドミド、Dex 又はボルテゾミブの単剤投与又は併用投与 (2 種又は 3 種) での抗腫瘍作用を検討した。

CB17-SCID マウスに MM.1S 細胞を移植し、触診で腫瘍定着が確認できた後、マウスを各投与群に割り付け、投与を開始した。ポマリドミド (25 mg/kg/day) 単独、Dex (1 mg/kg/day) 単独、ボルテゾミブ (0.5 mg/kg/day) 単独又はそれぞれの併用で、週に 5 日間 (月～金曜日) 1 日 1 回腹腔内投与した。週に 3 回腫瘍体積を測定して、薬剤の抗腫瘍活性を評価した。

[結果]

ポマリドミド、Dex 及びボルテゾミブの単剤投与で、いずれも対照群と比較し、投与開始 8 日後から抗腫瘍効果が認められた。ポマリドミド+ボルテゾミブ、ポマリドミド+Dex、及びポマリドミド+ボルテゾミブ+Dex の併用投与により抗腫瘍効果は増強されたが、その効果はいずれの処理法でも同程度であった。

* レブラミド®カプセル 5mg 承認審査時に提出済み

2.6.2.6 考察及び結論

ポマリドミドは、IMiD 化合物に分類されるサリドマイドの構造類似体である。サリドマイドや同じサリドマイド構造類似体であるレナリドミドと同様に様々な細胞種に対し多彩な生理活性を有する。本申請書でも明らかにしたように、ポマリドミドは（１）腫瘍細胞の増殖を抑制（２）免疫反応を促進（３）血管新生を阻害するなど、様々な種類の細胞反応に関与することで MM に対する抗腫瘍効果を発揮する。これらの活性は、細胞の種類や状況に依存しているため (Bartlett, 2004 ; Davies, 2001 ; Dredge, 2002 ; Escoubet-Lozach, 2009 ; Teo, 2005 ; Xu, 2009), 複数の標的分子が存在し、かつ複数の細胞内シグナル伝達に影響すると考えられる。現在、抗腫瘍活性に関与する作用として、細胞周期停止因子 $p21^{WAF-1}$ の増加による G1 期細胞周期停止 (Escoubet-Lozach, 2009), MM 細胞での骨髓腫細胞生存因子 IRF-4 の抑制 (Li, 2011), アクチンの過重合と免疫シナプスの形成に重要な Rho GTPase の制御 (Xu, 2009) など、主に細胞周期停止に関連するものが挙げられる。また近年、腫瘍細胞の増殖阻害や細胞死誘導、さらに免疫エフェクター細胞の活性化など、異なるシステムに共通する分子やシグナル伝達が存在が示唆されており、サリドマイドを用いた研究から、CRBN が標的となる共通分子として同定された。ポマリドミド及びレナリドミドはいずれもヒト CRBN に対し親和性を有する。さらに、MM 細胞内の CRBN 量がポマリドミドの増殖阻害活性に関与することや、ポマリドミドの免疫調節作用の少なくとも一部に CRBN との相互作用が関与する可能性が示された。

ポマリドミドは、*in vitro* で各種 MM 細胞の増殖を強力に阻害し、さらに *in vivo* 腫瘍モデル（移植モデル）でも抗腫瘍活性を発揮した。ポマリドミドの抗腫瘍機序の一つとして、 $p21^{WAF-1}/p27^{Kip-1}$ 発現増加による G1 期細胞周期停止作用が挙げられるが、Dex との併用による相乗効果が認められている。さらに、ポマリドミドはレナリドミドに対し耐性を獲得した細胞に対しても増殖阻害活性を有し、Dex 併用による相乗効果も認められた。

ポマリドミドは T 細胞の増殖を促進し、CD3 抗体で刺激した $CD4^+$ T 細胞からの Th1 サイトカイン (IL-2 及び IFN- γ) 産生を増強、また Th2 サイトカイン (IL-10) 産生を抑制した。ポマリドミドは、T-bet を増加し、GATA-3 を減少させる。また、Th1 サイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-12R β 2) 産生の増強が T-bet 発現と一致していた。したがって、ポマリドミドは T-bet の発現を亢進し、Th1 による T 細胞応答を増強する可能性が示唆された。

また、上述のような T 細胞増殖やサイトカイン産生に加え、ポマリドミドが腫瘍細胞に対し NK 細胞介在性の細胞障害を増強することが明らかとなった。

これら（１） $p21^{WAF-1}/p27^{Kip-1}$ 発現増加による G1 期細胞周期停止（２）サイトカイン産生促進や NK 細胞介在性の腫瘍細胞障害促進など免疫応答増強に加え（３）血管新生阻害がポマリドミドの有する抗腫瘍活性の重要な機序と考えられた。また、少なくともこれらいくつかの細胞反応が CRBN との結合を介して誘起されていると考えられる。

また今回、MM 細胞に対してだけではなく、一部の固形腫瘍に対してもポマリドミドは抗腫瘍活性（増殖阻害作用）を示し、カラゲニン誘発性痛覚過敏足浮腫ラットモデルでは後肢浮腫を有意に阻害するなど、抗炎症効果も認められた。この他、2 種類の皮膚線維化モデルでポマリドミドの効果を検討した試験では、ポマリドミドが強力な抗線維化活性を有することが明らかとなった。線維化の進行を抑制するだけでなく、既に発症している線維化をも退縮させる。

ポマリドミドの安全性薬理試験データからは、QTc 延長の可能性を示す兆候は認められなかった。hERG カリウムチャンネルに対する影響も認められていないことから、ポマリドミドが心筋細胞の電気生理学的機能に影響する可能性は低いと考えられる。また、中枢神経系及び呼吸器系に対してもポマリドミドによる有害な影響は認められなかった。

以上に示したとおり、*in vitro* 及び *in vivo* 非臨床薬理試験の結果から明らかとなった薬理学的特性から、ポマリドミドは MM をはじめとする血液腫瘍の治療に対して臨床的に有用であることが期待される。特に、レナリドミドに対し耐性を獲得した MM 細胞に対しても抗腫瘍効果 (*in vitro* 及び *in vivo*) を発揮することは、臨床的意義が高い。また、一部の固形腫瘍、非腫瘍性の血液疾患、並びに全身性硬化症などの線維症疾患の治療に対しても臨床的な有用性を有すると考えられる。安全性薬理試験の結果から、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対するリスクも低いものと思われる。

2.6.2.7 図表

図表は本文中の適切な場所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

- Bartlett JB, Dredge K and Dalglish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):314-22.
- Bjorklund CC, Ma W, Wang ZQ, Davis RE, Kuhn DJ, Kornblau SM, et al. Evidence of a role for activation of wnt/ β -catenin signaling in the resistance of plasma cells to lenalidomide. *J Biol Chem* 2011;286(13):11009-20.
- Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(1):210-6.
- Dredge K, Marriott JB, Macdonald CD, Man HW, Chen R, Muller GW, et al. Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *Br J Cancer*. 2002;87(10):1166-72.
- Escoubet-Lozach L, Lin IL, Jensen-Pergakes K, Brady HA, Gandhi AK, Schafer PH, et al. Pomalidomide and lenalidomide induce p21^{WAF-1} expression in both lymphoma and multiple myeloma through a LSD1-mediated epigenetic mechanism. *Cancer Res*. 2009;69(18):7347-56.
- Hernandez-Ilizaliturri FJ, Reddy N, Holkova B, Ottman E and Czuczman MS. Immunomodulatory drug CC-5013 or CC-4047 and rituximab enhance antitumor activity in a severe combined immunodeficient mouse lymphoma model. *Clin Cancer Res*. 2005;11(16):5984-92.
- Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies FE, Tai YT, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood*. 2000;96(9):2943-50.
- Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*. 2010;327(5971):1345-50.
- Lentzsch S, LeBlanc R, Podar K, Davies F, Lin B, Hideshima T, et al. Immunomodulatory analogs of thalidomide inhibit growth of Hs Sultan cells and angiogenesis in vivo. *Leukemia*. 2003;17(1):41-4.
- Li S, Pal R, Monaghan SA, Schafer P, Ouyang H, Mapara M, et al. IMiD immunomodulatory compounds block C/EBP β translation through eIF4E down-regulation resulting in inhibition of MM. *Blood*. 2011;117(19):5157-65.
- List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med*. 2006;355(14):1456-65.
- List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D, et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2005a;352(6):549-57.
- List AF. Emerging data on IMiDs in the treatment of myelodysplastic syndromes (MDS). *Semin Oncol*. 2005b;32(4 Suppl 5):S31-5.
- Payvandi F, Wu L, Haley M, Schafer PH, Zhang LH, Chen RS, et al. Immunomodulatory drugs inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF- α , IL-1 β , and LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner. *Cell Immunol*. 2004;230(2):81-8.
- Payvandi F, Wu L, Naziruddin SD, Haley M, Parton A, Schafer PH, et al. Immunomodulatory drugs (IMiDs) increase the production of IL-2 from stimulated T cells by increasing PKC- θ activation and enhancing the DNA binding activity of AP-1 but not NF- κ B, OCT-1, or NF-AT. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25(10):604-16.
- Schafer PH, Gandhi AK, Loveland MA, Chen RS, Man HW, Schnetkamp PP, et al. Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;305(3):1222-32.
- Shalapour S, Zelmer A, Pfau M, Moderegger E, Costa-Blehschmidt C, van Landeghem FK, et al. The thalidomide analogue, CC-4047, induces apoptosis signaling and growth arrest in childhood acute lymphoblastic leukemia cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2006;12(18):5526-32.

Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. JAMA. 2003;289(13):1645-51.

Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: Implications for anticancer therapy. AAPS J. 2005;7(1):E14-9.

Weatherall DJ and Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bull World Health Organ. 2001;79(8):704-12.

Xu Y, Li J, Ferguson GD, Mercurio F, Khambatta G, Morrison L, et al. Immunomodulatory drugs reorganize cytoskeleton by modulating Rho GTPases. Blood. 2009;114(2):338-45.

Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Bruins LA, Schmidt JE, Van Wier S, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. Blood 2011;118(18):4771-79.

ポマリストカプセル 1mg
ポマリストカプセル 2mg
ポマリストカプセル 3mg
ポマリストカプセル 4mg

第 2 部（モジュール 2） CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

セルジーン株式会社

目次

2.6.3	薬理試験概要表.....	3
2.6.3.1	薬理試験：一覧表	3
2.6.3.1.1	効力を裏付ける試験	3
2.6.3.1.2	副次的薬理試験	8
2.6.3.1.3	安全性薬理試験	10
2.6.3.1.4	薬力学的薬物相互作用	11
2.6.3.2	効力を裏付ける試験.....	12
2.6.3.3	副次的薬理試験	23
2.6.3.4	安全性薬理試験	26
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用	28

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

2.6.3.1.1 効力を裏付ける試験

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Report Number	Location in CTD
Study Reports					
Cereblon is required for anti-proliferative and immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide and decreased cereblon expression correlates with acquisition of lenalidomide resistance in myeloma cells	U266, H929 and DF15 cell lines Human T cells	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	DM2528	4.2.1.1.1
Combination studies of CC-5013 with chemotherapeutic agents on FGFR3 ⁺ and FGFR3 ⁻ multiple myeloma (MM) cell proliferation	H929, OPM-2, LP-1 and RPMI-8226 cell lines	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5286-186	4.2.1.1.2
The effect of IMiDs on MM cell lines	DF-15, H929, MM-1S, RPMI-8226, U266, Arp-1, Norway U266, UUN, ARK, CAG, ANBL-6, W182 cell lines	<i>in vitro</i>	Signal Pharmaceuticals, LLC (USA)	1110-038	4.2.1.1.3
Effect of duration of exposure of lenalidomide and pomalidomide on MM cell proliferation	H929 cell line	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5710-048	4.2.1.1.4
Evaluation of anti-proliferative effect of CC-4047 in cellular models of MM	H929 and lenalidomide-resistant cell lines (named: 1051, 1052, 1053 and 1054)	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	1785-4047	4.2.1.1.5
Effects of lenalidomide, pomalidomide, and CC-122 on MM cell lines that have been made resistant to lenalidomide or pomalidomide	H929, KMS-12-BM cell lines	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	7596-01	4.2.1.1.6
Effects of CC-5013 and CC-4047 on the viability of acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) cell lines expressing different levels of cereblon	HNT-34, KG-1a, MOLM-13, OCI-AML3, THP-1, HL-60, KASUMI-3, MDS-L, U266 cell lines	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	SF-ALM-0012	4.2.1.1.7
Anti-proliferative activity and mechanism of action of thalidomide, CC-4047, CC-5013 and CC-11006 in chromosome 5 deleted cells Namalwa and KG-1 and control cell lines MUTZ-5 and UT-7 <i>in vitro</i>	Namalwa, MUTZ-5, KG-1, UT-7 cell lines	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5232-59-76	4.2.1.1.8

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Report Number	Location in CTD
Cytokine profiling for five classes of IMiDs in primary human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) s and CD4 ⁺ T lymphocytes	Purified peripheral blood CD4 ⁺ T cells	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	PD365	4.2.1.1.9
Inhibition of TNF- α production by PBMC and elevation of IL-2 and MIP-3 α production by T cells by CC-4047, CC-5013 and CC-11006 <i>in vitro</i> .	Purified peripheral blood T cells	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5043-152-5119-172	4.2.1.1.10
Effect of IMiDs CC-4047, CC-10015, CC-11006 and CC-5013 on PBMC and T cell proliferation <i>in vitro</i>	Purified peripheral blood T cells	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5304-79	4.2.1.1.11
Elevation of IL-2 production by CC-4047, CC-5013 and CC-11006 from human and rat whole blood stimulated with Concanavalin A	Human and rat whole blood	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5197-189-5226-016	4.2.1.1.12
Testing of Pomalidomide in the Whole Blood CD3 TruCulture Assay	Human whole blood	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	7596-09	4.2.1.1.13
IMiD increases T-bet expression mediated by TCR signaling in CD4 ⁺ T cells	Purified peripheral blood CD4 ⁺ T cells	<i>in vitro</i>	Celgene Signal Research Division (USA)	PD522	4.2.1.1.14
Evaluation of NSCLC/PBMC co-culture models for their sensitivities to IMiDs	A549, NCI-H460 cell lines Human PBMC	<i>in vitro</i>	Celgene Signal Research Division (USA)	PD465	4.2.1.1.15
Effects of IMiDs on prostate tumor cell apoptosis in co-culture models	PC3, DU145 cell lines Human PBMC	<i>in vitro</i>	Celgene Signal Research Division (USA)	PD466	4.2.1.1.16
Development and validation of K562/PBMC co-culture model	K562 cell line Human PBMC	<i>in vitro</i>	Celgene Signal Research Division (USA)	PD467	4.2.1.1.17
Effects of IMiDs on Raji cell apoptosis in co-culture model	Raji cell line Human PBMC	<i>in vitro</i>	Celgene Signal Research Division (USA)	PD468	4.2.1.1.18
Effects of IMiDs on ovarian cancer cell apoptosis in co-culture models	OVCAR-3, SKOV3, CaOV3 cell lines Human PBMC	<i>in vitro</i>	Celgene Signal Research Division (USA)	PD469	4.2.1.1.19

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Report Number	Location in CTD
CC-4047 in combination with the therapeutic antibodies, trastuzumab, cetuximab and rituximab, enhances <i>in vitro</i> antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in breast cancer, colorectal cancer and NHL cell lines, respectively.	SK-BR-3, MCF-7, HCT-116, HT-29, Farage, Namalwa, Raji cell lines NK cells	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5422-8-CC-4047	4.2.1.1.20
Lenalidomide inhibits angiogenesis <i>in vitro</i> and reduces lung metastasis of mouse melanoma cells in an animal model	Human umbilical cord arterial rings HUVEC	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5071-180	4.2.1.1.21
Screening of IMiDs [®] and PDE4 inhibitor compounds for anti-angiogenic activity in the human umbilical cord vessel ring assay	Human umbilical cord artery rings	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5127-132	4.2.1.1.22
Inhibition of endothelial cell migration by thalidomide, CC-4047, and CC-5013	HUVEC	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5239-92-5239-188	4.2.1.1.23
Effect of test compounds on human myeloid, erythroid, and megakaryocytic progenitors	Human bone marrow light density cells	<i>in vitro</i>	██████████ (USA)	CGN-04	4.2.1.1.24
Effect of test compounds on human megakaryocytic progenitors from three distinct normal bone marrow donor cells as assessed in the colony forming cell assay	Human bone marrow light density cells	<i>in vitro</i>	██████████ (USA)	CLG-10	4.2.1.1.25
Effects of CC-4047 on CD34 ⁺ hematopoietic progenitor differentiation and maturation to dendritic cells (DC)	Human bone marrow-derived (BM) CD34 ⁺ hematopoietic progenitor cells	<i>in vitro</i>	Celgene Signal Research Division (USA)	1110-028	4.2.1.1.26
Multiple cytokine and chemokine profiling for IMiDs CC-5013, CC-4047, CC-2001, CC-11006 and CC-10015 in LPS-stimulated human PBMC	Human PBMC	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5374-10	4.2.1.1.27
Cytokine profiling for five classes of IMiDs in primary human PBMCs and CD4 ⁺ T lymphocytes	Human PBMC	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	PD365	4.2.1.1.9
Inhibition of TNF- α production by CC-4047, CC-5013, and CC-11006 from human and rat whole blood stimulated with lipopolysaccharide	Human and rat whole blood	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5196-175	4.2.1.1.28
Anti-inflammatory effects of CC-4047, CC-5013 and CC-11006 on G-CSF, IL-10 and COX-2 expression by LPS-stimulated PBMC	Human PBMC	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5127-53	4.2.1.1.29

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Report Number	Location in CTD
Effect of IMiDs, PDE4 inhibitors, and tubulin inhibitors on COX-2 expression and PGE ₂ production by human PBMC	Human PBMC	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5197-130	4.2.1.1.30
Immunomodulatory drugs (IMiDs TM) inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF- α -, IL-1 β - and LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner	Human PBMC	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5116-86	4.2.1.1.31
Role of IMiDs in B cell signaling	Human peripheral blood B cells	<i>in vitro</i>	Celgene Signal Research Division (USA)	PD408	4.2.1.1.32
Pomalidomide metabolite pharmacological effects in MM cells, T cells and PBMCs	U266, OPM-2, H929 cell lines Human PBMC Human T cells	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	7600-025	4.2.1.1.33
Antitumor activity of CC-4047 in the parental and lenalidomide-refractory NCI-H929 human plasma cell myeloma xenograft model	Female C.B17/SCID mice	<i>in vivo</i> oral (PO) once a day (QD)	Celgene Corporation (USA)	AP3975/ 4416/ 4462/ 4479/ 4524	4.2.1.1.34
Evaluation of lenalidomide and pomalidomide using SCID-hu models of MM	Male SCID mice	<i>in vivo</i> PO, QD	 (USA)	IMBCR- 03162010	4.2.1.1.35
Evaluation of PB13, PB14, PB15, PB19 and PB20, in combination with rituximab against Raji B human lymphoma in a survival study with C.B17/SCID mice	Male C.B17/SCID mice	<i>in vivo</i> PO	 (USA)	CLG-4 Raji B-e200	4.2.1.1.36
Evaluation of Celgene compounds using <i>in vivo</i> angiogenesis matrigel plug assay	Female C57BL/6 mice	<i>in vivo</i> PO, QD	 (USA)	SRI-P10.0101	4.2.1.1.37

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Report Number	Location in CTD
Literature (Title of publication)					
Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy	MM and Burkitt's lymphoma cell lines	<i>in vitro</i>	Dana-Farber Cancer Institute and Harvard Medical School Celgene Corporation (USA)	Publication (Hideshima, 2000)	4.3.8
Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs	Human PBMC Human CD4 ⁺ /CD8 ⁻ T cells	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA) University of Calgary (Canada)	Publication (Schafer, 2003)	4.3.17
Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects	HUVEC Rat aorta	<i>in vitro</i>	St. George's Hospital Medical School (UK) Celgene Corporation (USA)	Publication (Dredge, 2002)	4.3.4
Immunomodulatory analogs of thalidomide inhibit growth of Hs Sultan cells and angiogenesis <i>in vivo</i>	Beige-nude-xid (BNX) mice	<i>in vivo</i> intraperitoneal (IP)	Dana-Farber Cancer Institute and Harvard Medical School Celgene Corporation (USA) Humboldt University (Germany)	Publication (Lentzsch, 2003)	4.3.10
Immunomodulatory drug CC-5013 or CC-4047 and rituximab enhance antitumor activity in a severe combined immunodeficient mouse lymphoma model	SCID mice	<i>in vivo</i> IP	Roswell Park Institute State University of New York (USA)	Publication (Hernandez-Ilizaliturri, 2005)	4.3.7
The thalidomide analogue, CC-4047, induces apoptosis signaling and growth arrest in childhood acute lymphoblastic leukemia cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Non-obese diabetic (NOD)/SCID mice female	<i>in vivo</i> IP	Charite-Universitätsmedizin Max-Delbrück Center for Molecular Medicine (Germany) University Children's Hospital (Switzerland)	Publication (Shalapour, 2006)	4.3.18

2.6.3.1.2 副次的薬理試験

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Report Number	Location in CTD
Study Reports					
Effects of IMiDs on proliferation of breast cancer, NSCLC, CML and NHL cell lines <i>in vitro</i>	SKBR3, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, BT-474, NCI-H460, A549 cell lines	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	PD385	4.2.1.2.1
Anti-proliferative activity of IMiDs in 5q ⁻ solid tumor cell lines PC-3, HN, LCLC103H, SW480, and SK-MES-1	PC-3, HN, LCLC103H, SW480, SK-MES-1 cell lines	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5286-14	4.2.1.2.2
CC-4047 increases the expression of fetal hemoglobin in myeloid and erythroid differentiation models	BM CD34 ⁺ hematopoietic progenitor cells	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	1200-066	4.2.1.2.3
Effects of pomalidomide on prevention and treatment of bleomycin-induced dermal fibrosis	DBA/2 mice	<i>in vivo</i> PO, QD	 (Germany)	UEN11162010JD	4.2.1.2.4
Effects of pomalidomide, CC-220, and CC-122 on the treatment of dermal fibrosis in the Tsk-1 tight skin mouse	Tsk-1 mice	<i>in vivo</i> PO, QD	 (Germany)	UEN07052012JD	4.2.1.2.5
CC-10015 activity in the endothelial progenitor cells assay	Human cord blood-derived CD133 ⁺ progenitor cells	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	2231-24	4.2.1.2.6
Effects of CC-2001, CC-4047, CC-5013, CC-11006, CC-10004, CC-11050, CC-401, and CC-145715 on carrageenan-induced hyperalgesia in rats	Sprague Dawley (SD) Rat	<i>in vivo</i> IP	Calvert Laboratories (USA)	1270RC35.001	4.2.1.2.7
Effects of IMiDs on cytokine expression in primary human microglia and astrocytes	Human primary microglia astrocytes	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	PD444	4.2.1.2.8
Effect of CC-11006, CC-5013, CC-2001, CC-4047, CC-10015 and CC-16057 on cytokine/chemokine production by BV-2 mouse microglial cells and primary human astrocytes	Primary human astrocytes BV-2 mouse microglia	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5572-001	4.2.1.2.9

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Report Number	Location in CTD
Inhibition of ultraviolet light B induced TNF- α production by thalidomide (CC-2001), pomalidomide (CC-4047), lenalidomide (CC-5013), apremilast (CC-10004), CC-10015, CC-11006, CC-11050, CC-13097, CC-15965, CC-16016, CC-16057, CC-16122, CC-16123, and/or CC-16125 in primary human neonatal epidermal keratinocytes and primary mouse epidermal keratinocytes.	Human primary neonatal epidermal keratinocytes (HEKn) primary mouse epidermal keratinocytes (MEK)	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	5448-74	4.2.1.2.10

2.6.3.1.3 安全性薬理試験

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Report Number	Location in CTD
Study Reports					
Central nervous system	Rat	<i>in vivo</i> PO	██████████ (USA)	CC-4047-TOX-011	4.2.1.3.1
Cardiovascular system	HEK293/hERG	<i>in vitro</i>	██████████ (USA)	CC-4047-TOX-009	4.2.1.3.2
Cardiovascular and respiratory systems	Dog	<i>in vivo</i> Intravenous (IV)	██████████ (UK)	1398/110-D6146	4.2.1.3.3
Cardiovascular system	Monkey	<i>in vivo</i> PO	██████████ (USA)	CC-4047-TOX-012	4.2.1.3.4
Respiratory system	Rat	<i>in vivo</i> PO	██████████ (USA)	CC-4047-TOX-014	4.2.1.3.5

2.6.3.1.4 薬力学的薬物相互作用

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Test System	Route of Administration	Testing Facility	Study Report Number	Location in CTD
Study Reports					
Effects of lenalidomide, pomalidomide and thalidomide alone or in combination with dexamethasone (Dex) on cell proliferation and signaling pathways in MM cell lines	H929, KMS-12-BM, OPM-2, LP-1 cell lines	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	7609-111	4.2.1.4.1
Evaluation of anti-proliferative effect of CC-4047 in cellular models of MM	H929 and lenalidomide-resistant cell lines (named: 1051, 1052, 1053 and 1054)	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	1785-4047	4.2.1.1.5
Evaluation of the effects of CC-4047 in combination with Dex in cellular models of lenalidomide refractory MM – A gene expression study	H929 and lenalidomide-resistant cell lines (named: 1051, 1053 and 1054)	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	DM2775-49	4.2.1.4.2
Effects of Lenalidomide, Pomalidomide, and CC-122 on MM cell lines that have been made resistant to lenalidomide or pomalidomide	H929, KMS-12-BM cell lines	<i>in vitro</i>	Celgene Corporation (USA)	7596-01	4.2.1.1.6
Antitumor activity of CC-4047 in the parental and lenalidomide-refractory NCI-H929 human plasma cell myeloma xenograft model	Female C.B17/SCID mice	<i>in vivo</i> PO, QD	Celgene Corporation (USA)	AP3975/ 4416/ 4462/ 4479/ 4524	4.2.1.1.34
Efficacy of lenalidomide and pomalidomide in combination with Dex and bortezomib in the MM.1S xenograft mouse model of MM	C.B17/SCID mice	<i>in vivo</i> IP	 (Spain)	SALA-151008	4.2.1.4.3

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Study Reports						
Cereblon is required for anti-proliferative and immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide and decreased cereblon expression correlates with acquisition of lenalidomide resistance in myeloma cells	U266, H929 , DF15 cell lines Human T cells	Not applicable (N/A)	<i>in vitro</i>	Up to 100 µmol/L	Pomalidomide and lenalidomide interact with human cereblon (CRBN). The expression of CRBN in myeloma cells is linked to both the efficacy of pomalidomide and lenalidomide and to the acquisition of resistance to lenalidomide. The glutarimide structure in these IMiDs is needed for the specificity of their interaction with CRBN, which is, in turn, essential for the anti-proliferative activity in H929 cells. Despite reduced expression of CRBN, lenalidomide-resistant H929 cells remained responsive to pomalidomide, with a lower potency. Cereblon protein was not detected in DF15R cell line which exhibits the resistance to pomalidomide. Furthermore, an expression of CRBN was necessary for induction of IL-2 and TNF-α in activated human T cells, indicating that some of the immunomodulatory effects of pomalidomide are promoted by the initial binding to CRBN.	DM2528 (4.2.1.1.1)
Combination studies of CC-5013 with chemotherapeutic agents on FGFR3 ⁺ and FGFR3 ⁻ MM cell proliferation	H929, OPM-2, LP-1, RPMI-8226 cell lines	N/A	<i>in vitro</i>	0.0001 to 100 µmol/L/ 72 hours	Pomalidomide inhibited MM cell proliferation with the order of sensitivity being H929 > LP-1 > RPMI-8226 > OPM-2 with IC ₅₀ values of 0.02, 0.05, 1.4 and 3.4 µmol/L, respectively. Notably, the MM cell lines containing the wild-type (H929) and biologically and constitutively active mutant (LP-1) FGFR3 were 70- and 28-fold more sensitive to the effects of pomalidomide relative to the cells lacking FGFR3 (RPMI-8226).	5286-186 (4.2.1.1.2)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
The effect of IMiDs on MM cell lines	DF-15, H929, MM-1S, RPMI-8226, U266, Arp-1, Norway U266, UUN, ARK, CAG, ANBL-6, W182 cell lines	N/A	<i>in vitro</i> :	1 µmol/L/ 2-4 days	Pomalidomide arrested the DF-15, H929, and MM-1S cell lines at G ₁ phase within 2 days (77% at 1 µmol/L pomalidomide versus 56% DMSO control) and induced cell deaths within 3 days, reaching a maximum level at treatment day 4. The cellular mechanism for pomalidomide-induced cell cycle arrest was correlated with the downregulation of cyclin-dependent kinases CDK4 and CDK6 within 24 hours following subsequent Rb hypophosphorylation.	1110-038 (4.2.1.1.3)
Effect of duration of exposure of lenalidomide and pomalidomide on MM cell proliferation	H929 cell line	N/A	<i>in vitro</i> :	0.00001 - 10 µmol/L/ 0.5-72 hours	H929 MM cells required at least 48 hours of drug exposure to maximize the inhibitory effects of pomalidomide. Pomalidomide had the strongest anti-proliferative activity when the cells were exposed for 72 hours.	5710-048 (4.2.1.1.4)
Evaluation of anti-proliferative effect of CC-4047 in cellular models of MM	H929 and lenalidomide-resistant cell lines (named: 1051, 1052, 1053 and 1054)	N/A	<i>in vitro</i> :	0.01 to 10 µmol/L/ 5 days for proliferation assay, 48 hours for Immunoblotting	In lenalidomide-sensitive cells, pomalidomide inhibited cell proliferation (IC ₅₀ = 0.2 µmol/L), induced G ₁ cell cycle arrest by reducing Rb phosphorylation, induced the expression of interferon regulatory factor 4 (IRF4), B cell lymphoma 2, myeloid cell leukemia sequence 1, c-Myc, and increased the expression of p27 ^{Kip-1} . In lenalidomide-resistant cells, pomalidomide treatment inhibited cell proliferation (IC ₅₀ = 7.9 µmol/L).	1785-4047 (4.2.1.1.5)
Effects of lenalidomide, pomalidomide, and CC-122 on MM cell lines that have been made resistant to lenalidomide or pomalidomide	H929, KMS-12-BM cell lines	N/A	<i>in vitro</i> :	0.0001 to 100 µmol/L/ 72 hours for assay 0.1 µmol/L/ 4 months	Long term exposure of MM cell lines to lenalidomide or pomalidomide promoted the resistance to each compounds in cell lines. However, the term for the acquisition of resistance was slower in pomalidomide-exposed cellss	7596-01 (4.2.1.1.6)
Effects of CC-5013 and CC-4047 on the viability of AML and MDS cell lines expressing different levels of cereblon	HNT-34, KG-1a, MOLM-13, OCI-AML3, THP-1, HL-60, KASUMI-3, MDS-L, MM cell lines.	N/A	<i>in vitro</i> :	1, 10 µmol/L/ 10 days	Pomalidomide decreased cell-viability of AML and MDS cell lines. However, no correlation between basal CRBN protein expression level and sensitivity to pomalidomide was observed.	SF-ALM-0012 (4.2.1.1.7)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Anti-proliferative activity and mechanism of action of thalidomide, CC-4047, CC-5013 and CC-11006 in chromosome 5 deleted cells Namalwa and KG-1 and control cell lines MUTZ-5 and UT-7 <i>in vitro</i>	Namalwa, MUTZ-5, KG-1, UT-7 cell lines	N/A	<i>in vitro</i> :	0.0001 to 100 µmol/L/ 72 hours (3 days)	Pomalidomide inhibited Namalwa cells proliferation with an IC ₅₀ = 0.2 µmol/L. Pomalidomide also promoted G ₀ /G ₁ cell cycle arrest in Namalwa cells with little cell death. Pomalidomide anti-proliferative activities were observed to a lesser extent in KG-1 (del 5q) cells, demonstrating approximately 40% activity at 100 µmol/L. Minimal anti-proliferative activity was observed in the UT-7 (del 5q13) and MUTZ-5 control (normal chromosome 5q) cell lines with pomalidomide at 100 µmol/L.	5232-59-76 (4.2.1.1.8)
Cytokine profiling for five classes of IMiDs in primary human PBMCs and CD4 ⁺ T lymphocytes	Purified peripheral blood CD4 ⁺ T cells	N/A	<i>in vitro</i>	(Pomalidomide concentrations tested were not clearly described in the study report)/ 40 hours for CD4 ⁺ T cells	In anti-CD3 mAb and pomalidomide co-stimulated CD4 ⁺ T cells, an enhanced production was observed for IL-2 (EC ₅₀ = 0.01 µmol/L), IFN-γ (EC ₅₀ = 0.005 µmol/L) and RANTES (elevation 443% at 6 µmol/L) in a dose dependent manner. No inhibition was seen for TNF-α, IL-8 or MIP-1α. In contrast, IL-10 was inhibited (IC ₅₀ = 0.02 µmol/L).	PD365 (4.2.1.1.9)
Inhibition of TNF-α production by PBMC and elevation of IL-2 and MIP-3α production by T cells by CC-4047, CC-5013 and CC-11006 <i>in vitro</i>	Purified peripheral blood T cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.00064 to 10 µmol/L/ 2-3 days for peripheral blood T cells	Pomalidomide enhanced IL-2 secretion in purified human T cells with EC ₅₀ values of 0.010 and 0.0075 µmol/L, respectively, in 2- and 3-day cultures.	5043-152-5119-172 (4.2.1.1.10)
Effect of IMiDs CC-4047, CC-10015, CC-11006 and CC-5013 on PBMC and T cell proliferation <i>in vitro</i>	Human PBMC Purified peripheral blood T cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.0001 to 100 µmol/L/ 72 hours (3 days)	Pomalidomide enhanced PHA-triggered T cell activity which was accompanied by IL-2 production. Pomalidomide also inhibited PBMC proliferation with an IC ₅₀ = 0.095 µmol/L.	5304-79 (4.2.1.1.11)
Elevation of IL-2 production by CC-4047, CC-5013 and CC-11006 from human and rat whole blood stimulated with Concanavalin A	Human whole blood	N/A	<i>in vitro</i>	0.00001 to 10 µmol/L/ 2 days	Pomalidomide enhanced IL-2 production in concanavalin A-stimulated human whole blood cells (EC ₁₅₀ = 0.012 µmol/L).	5197-189-5226-016 (4.2.1.1.12)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Testing of Pomalidomide in the whole blood CD3 TruCulture assay	Human whole blood	N/A	<i>in vitro</i>	0.029, 0.058, 0.116, 1 µmol/L/ 1+42 hours	Pomalidomide tested at final concentration 0.029, 0.058, and 0.116 µmol/L, corresponding to estimated maximum plasma levels at clinical doses of 0.5, 1 and 2 mg, respectively, was capable of elevating T cell-derived cytokines. Pomalidomide increased secretion of all Th1 and Th2 cytokines with the exception of IL-10. Five of the six healthy donor blood samples responded with significant cytokine elevation.	7596-09 (4.2.1.1.13)
IMiD increases T-bet expression mediated by TCR signaling in CD4 ⁺ T cells	Purified peripheral blood CD4 ⁺ T cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.1 and 1 µmol/L/ 5-48 hours	Pomalidomide promoted Th1 cell-differentiation upregulating Th1 transcriptional factor T-bet, enhanced T-bet phosphorylation, altered the ratio of T-bet vs. GATA-3, and increased expression of IL-12Rβ2. All pomalidomide effects were observed at sub micromolar concentration suggesting activity as a potent inducer of Th1 and repressor of Th2 cell differentiation.	PD522 (4.2.1.1.14)
Evaluation of NSCLC/PBMC co-culture models for their sensitivities to IMiDs	A549, NCI-H460 cell lines Human PBMC	N/A	<i>in vitro</i>	3 and 30 µmol/L/ 3 days	The NSCLC cell lines were resistant to PBMC-mediated cytotoxicity, and pomalidomide showed no effect on this resistance, even in the presence of chemotherapeutic agents, such as Paclitaxel, Carboplatin, Cisplatin and Gemzar.	PD465 (4.2.1.1.15)
Effects of IMiDs on prostate tumor cell apoptosis in co-culture models	PC3, DU145 cell lines Human PBMC	N/A	<i>in vitro</i>	0.003 to 30 µmol/L/ 3 days	Pomalidomide significantly enhanced PBMC-mediated cytotoxicity in PC3 cells at 0.03 - 30 µmol/L by up to 10-fold. In addition, pomalidomide significantly enhanced cytotoxicity in DU145 cells by approximately 2-fold at 3 and 30 µmol/L. The combination of pomalidomide and paclitaxel potentiated cytotoxicity in both these tumor cell types.	PD466 (4.2.1.1.16)
Development and validation of K562/PBMC co-culture model	K562 cell line Human PBMC	N/A	<i>in vitro</i>	1 and 10 µmol/L/ 3 days	Pomalidomide at 1 µmol/L, not at 10 µmol/L, showed the maximum effect and enhanced the PBMC-mediated cytotoxicity in K562 cells by approximately 2.9-fold.	PD467 (4.2.1.1.17)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Effects of IMiDs on Raji cell apoptosis in co-culture model	Raji cell line Human PBMC	N/A	<i>in vitro</i>	0.003 to 30 $\mu\text{mol/L}$ / 3 days	Pomalidomide significantly enhanced the PBMC-mediated cell death in Raji NHL cells at 0.03 - 30 $\mu\text{mol/L}$ by up to about 2.5-fold (at 0.3 $\mu\text{mol/L}$), and enhanced the anti-tumor activity of rituximab.	PD468 (4.2.1.1.18)
Effects of IMiDs on ovarian cancer cell apoptosis in co-culture models	OVCAR-3, SKOV-3, CaOV-3 cell line Human PBMC	N/A	<i>in vitro</i>	0.003 to 30 $\mu\text{mol/L}$ / 3 days	Pomalidomide (0.3 - 30 $\mu\text{mol/L}$) significantly enhanced the PBMC-mediated cytotoxicity in OVCAR-3, SKOV-3 and CaOV-3 tumor cells by approximately 1.5-2 fold.	PD469 (4.2.1.1.19)
CC-4047 in combination with the therapeutic antibodies, trastuzumab, cetuximab and rituximab, enhances <i>in vitro</i> ADCC in breast cancer, colorectal cancer and NHL cell lines, respectively.	SK-BR-3, MCF-7, HCT-116, HT-29, Farage, Namalwa, Raji cell line NK cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.001 to 10 $\mu\text{mol/L}$ / 4 hours for ADCC assay	Pomalidomide-treated NK cells in the presence of IL-2 or IL-12 synergistically enhanced the cytotoxicity in trastuzumab-treated SK-BR-3 and MCF-7 cells by 2 to 6-fold. Pomalidomide-treated NK cells in the presence of IL-2 produced a partially additive 1.6- to 2-fold cytotoxicity-enhancement of cetuximab-treated HCT-116 and HT-29 cells. Pomalidomide increased NK cell mediated cytotoxicity in rituximab-coated NHL cell lines Farage, Namalwa and Raji cells, by 4- and 2-fold in the presence of IL-2 and IL-12, respectively.	5422-8-CC-4047 (4.2.1.1.20)
Lenalidomide inhibits angiogenesis <i>in vitro</i> and reduces lung metastasis of mouse melanoma cells in an animal model	Human umbilical cord arterial rings HUVEC	N/A	<i>in vitro</i>	0.1 to 100 $\mu\text{mol/L}$ / 3 weeks	Pomalidomide inhibited arterial explant angiogenesis at 0.1, 1 and 100 $\mu\text{mol/L}$ and inhibited HUVEC tubule formation at 100 $\mu\text{mol/L}$.	5071-180 (4.2.1.1.21)
Screening of IMiDs [®] and PDE4 inhibitor compounds for anti-angiogenic activity in the human umbilical cord vessel ring assay	Human umbilical cord artery rings	N/A	<i>in vitro</i>	0.1 to 100 $\mu\text{mol/L}$ / 28 days	Pomalidomide inhibited sprout formation in dose-dependent manner with an IC_{50} = 0.33 $\mu\text{mol/L}$. At 100 $\mu\text{mol/L}$, sprout formation was completely inhibited.	5127-132 (4.2.1.1.22)
Inhibition of endothelial cell migration by thalidomide, CC-4047, and CC-5013	HUVEC	N/A	<i>in vitro</i>	1 to 100 $\mu\text{mol/L}$ / 22 $\pm$ 1 hours	Pomalidomide significantly inhibited VEGF-, TNF- α or bFGF-promoted endothelial cell invasion in fibronectin-coated invasion assay system.	5239-92-5239-188 (4.2.1.1.23)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Effect of test compounds on human myeloid, erythroid and megakaryocytic progenitors	Human bone marrow light density cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.001 to 10 µmol/L/ 14-16 days	Pomalidomide significantly inhibited erythroid progenitor proliferation at 0.1 ($p < 0.01$), 1.0 and 10 µmol/L ($p < 0.005$), and resulted in an erythroid progenitor proliferation IC_{50} values of 0.07 µmol/L. In this assay pomalidomide reduced the number of colonies and the colony size was also compromised at 0.1 and 1.0 µmol/L concentrations suggesting that pomalidomide interfered with proliferation of the lineage committed cells. Also pomalidomide significantly inhibited only the most primitive megakaryocyte progenitor proliferation at 1.0 and 10 µmol/L ($p < 0.005$). The pomalidomide IC_{50} value was > 10 µmol/L in the megakaryocyte progenitor proliferation assay.	CGN-04 (4.2.1.1.24)
Effect of test compounds on human megakaryocytic progenitors from three distinct normal bone marrow donor cells as assessed in the colony forming assay	Human bone marrow light density cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.001 to 10 µmol/L/ 14-16 days	Pomalidomide significantly inhibited colony-forming unit-megakaryocyte (CFU-MK) progenitor proliferation in one of the three bone marrow samples.	CLG-10 (4.2.1.1.25)
Effects of CC-4047 on CD34 ⁺ hematopoietic progenitor differentiation and maturation to DC	BM CD34 ⁺ hematopoietic progenitor cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.01 to 10 µmol/L/ 6, 12 days	Pomalidomide increased the CD34 ⁺ CD38 ⁻ cell population, and modulated lineage-specific gene expression and subsequent myeloid differentiation. Pomalidomide blocked the generation of DC progenitors and increased differentiation of CD34 ⁺ cells into the granulocytic lineage. The pomalidomide inhibitory effect on CD34 ⁺ cell differentiation to DC was not due to an increased sensitivity of DC progenitors to cell death.	1110-028 (4.2.1.1.26)
Multiple cytokine and chemokine profiling for IMiDs CC-5013, CC-4047, CC-2001, CC-11006 and CC-10015 in LPS-stimulated human PBMC	hPBMC	N/A	<i>in vitro</i>	0.0001 to 100 µmol/L/ 1+18 hours	Pomalidomide inhibited IL-1 β , IL-6, IL-12, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 α and TNF- α production. Pomalidomide had no effect on IL-8 or RANTES production but enhanced IL-10 production.	5374-10 (4.2.1.1.27)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Cytokine profiling for five classes of IMiDs in primary human PBMCs and CD4 ⁺ T lymphocytes	hPBMC	N/A	<i>in vitro</i>	(Pomalidomide concentrations tested were not clearly described in the study report)/ 24 hours for hPBMC	Pomalidomide caused a dose dependent inhibition of TNF- α (IC ₅₀ = 0.01 μ mol/L), IL-1 β (IC ₅₀ = 0.02 μ mol/L), IL-6 (IC ₅₀ = 0.02 μ mol/L), IL-12 (IC ₅₀ = 0.002 μ mol/L), MCP-1 (IC ₅₀ = 0.2 μ mol/L) and MIP-1 α (IC ₅₀ = 0.02 μ mol/L) and a dose dependent stimulation of RANTES (elevation = 241% at 6 μ mol/L) and IL-10 (elevation = 416% at 6 μ mol/L) production in LPS-stimulated hPBMC.	PD365 (4.2.1.1.9)
Inhibition of TNF- α production by CC-4047, CC-5013, and CC-11006 from human and rat whole blood stimulated with lipopolysaccharide	Human and rat whole blood	N/A	<i>in vitro</i>	0.01 to 100 μ mol/L/ 1+16 hours	Pomalidomide inhibited TNF- α production in LPS-stimulated human whole blood (IC ₅₀ = 0.14 μ mol/L) more potently than LPS-stimulated rat whole blood (IC ₅₀ = 12 μ mol/L), demonstrating a difference in potency of approximately 86-fold between the human and rat species for TNF- α inhibition.	5196-175 (4.2.1.1.28)
Anti-inflammatory effects of CC-4047, CC-5013 and CC-11006 on G-CSF, IL-10 and COX-2 expression by LPS-stimulated PBMC	Human PBMC	N/A	<i>in vitro</i>	0.01 to 100 μ mol/L/ 1+24 hours (overnight)	Pomalidomide inhibited G-CSF production (IC ₅₀ = 0.1 μ mol/L) and elevated IL-10 production (EC ₅₀ = 0.079 μ mol/L) in a dose dependent manner. These results show that pomalidomide has anti-inflammatory activities against these effectors <i>in vitro</i> .	5127-53 (4.2.1.1.29)
Effect of IMiDs, PDE4 inhibitors, and tubulin inhibitors on COX-2 expression and PGE ₂ production by human PBMC	Human PBMC	N/A	<i>in vitro</i>	10 μ mol/L for COX-2 expression 1+20 hours (overnight) 0.0001 to 100 μ mol/L for PGE ₂ production/ 1+20 hours (overnight)	Pomalidomide (10 μ mol/L) inhibited COX-2 protein expression by 64%. Pomalidomide inhibited PGE ₂ production (IC ₅₀ = 50 μ mol/L).	5197-130 (4.2.1.1.30)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Immunomodulatory drugs (IMiDs TM) inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF- α -, IL-1 β - and LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner	hPBMC	N/A	<i>in vitro</i>	1 and 10 μ mol/L/ 1+24 hours for COX-2 protein 1 and 10 μ mol/L/ 1+2/4/8/20 hours for COX-2 mRNA 0.01 - 1000 μ mol/L/ 1+3+3 hours for COX activity	Pomalidomide decreased $t_{1/2}$ of COX-2 mRNA in dose dependent manner, suggesting that pomalidomide-induced COX-2 downregulation is caused by the altered mRNA stability.	5116-86 (4.2.1.1.31)
Role of IMiDs in B cell signaling	Human peripheral blood B cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.0006 to 60 μ mol/L/30 min+72 hours	Pomalidomide enhanced B cell activation through BCR stimulation (primary signaling) leading cell proliferation and cytokine production. However, pomalidomide inhibited IgG ₁ and IgE production induced by anti-CD40 and IL-4.	PD408 (4.2.1.1.32)
Pomalidomide metabolite pharmacological effects in MM cells, T cells and PBMCs	MM cell lines U266, OPM-2 and H929. hPBMC and T cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.00001 to 10 μ mol/L/ 3 days for proliferation assay, 48 hours for T cell IL-2 assay, 1+18 hours for hPBMC TNF- α assay	In cell proliferation assays using the MM cell lines OPM2, H929 and U266, all pomalidomide metabolites and hydrolysis products tested had little or no activity, with IC ₅₀ values >1 μ mol/L. By comparison, pomalidomide inhibited proliferation of the MM cell lines with IC ₅₀ values in the 0.028 to 0.038 μ mol/L range, indicating that the metabolites and hydrolysis products are at least 26-fold less potent than pomalidomide for direct inhibition of MM cell proliferation. Immunomodulatory activity (elevation of T cell IL-2 production and inhibition of peripheral blood mononuclear cell TNF- α production) of the metabolites was at least 32-fold less potent than pomalidomide.	7600-025 (4.2.1.1.33)
Antitumor activity of CC-4047 in the parental and lenalidomide-refractory NCI-H929 human plasma cell myeloma xenograft model	C.B17/SCID mice	8-12 Female	<i>in vivo</i> PO, QD	0.003 to 10 mg/kg/ 14 or 20 days	Pomalidomide inhibited tumor growth in a dose-dependent manner in mice with parental and lenalidomide-resistant H929 cell.	AP3975/ 4416/ 4462/ 4479/ 4524 (4.2.1.1.34)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Evaluation of lenalidomide and pomalidomide using SCID-hu models of MM	SCID mice	9-10 Male	<i>in vivo</i> PO daily	0.3, 1, 3 and 10 mg/kg/ 8 weeks	Results from studies using the SCID-hu model of human MM, demonstrated that pomalidomide had no significant efficacy at any of the tested doses in the LAGλ-1 and the non-secretory LAGκ-1B the tumor-bearing mice. However, pomalidomide at 10 mg/kg reduced tumor volume growth and IgG levels in mice bearing the LAGκ-1A tumors, when compared to mice treated with vehicle alone but these results were not significant (p = 0.07).	IMBCR-03162010 (4.2.1.1.35)
Evaluation of PB13, PB14, PB15, PB19 and PB20, in combination with rituximab against Raji B human lymphoma in a survival study with C.B17/SCID mice	C.B17/SCID mice	10 Male	<i>in vivo</i> PO on Days 3, 4, 8, 9, 13, 14, 18, 19	0.5 and 5 mg/kg/ 20 days	Pomalidomide (PB19) treatment in combination with rituximab resulted in a significant extension of survival (p < 0.001) compared with untreated mice. The pomalidomide group had a median time to endpoint of 103 days, corresponding to 312% increase in lifespan (p < 0.001 compared with non-treatment animals), with eight animals surviving to Day-103.	CLG-4 Raji B-e200 (4.2.1.1.36)
Evaluation of Celgene compounds using <i>in vivo</i> angiogenesis matrigel plug assay	C57BL/6 mice	4 Female	<i>in vivo</i> PO, QD	3 and 30 mg/kg/ 10 days	In the mouse matrigel plug assay, pomalidomide at 3 and 30 mg/kg showed a 15% and 47% inhibition of microvessel formation respectively, as measured by CD31 immunohistochemical staining. The 47% inhibition of microvessel formation obtained with the 30 mg/kg treatment was significant compared with control (p < 0.001).	SRI-P10.0101 (4.2.1.1.37)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Literature (Title of publication)						
Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy	MM (MM.1S) and Burkitt's lymphoma (Hs Sultan) cell lines	N/A	<i>in vitro</i>	0.0001 to 100 µmol/L (0.1% DMSO)/ 48 hours	A dose dependent inhibition by pomalidomide (IMiD1) was noted in the ³ H-thymidine uptake in MM.1S and Hs Sultan cell lines. Fifty percent inhibition of proliferation of MM.1S cells was noted at 0.01-0.1 µmol/L (p<0.001). For the Hs Sultan cell line, 0.1 µmol/L caused a fifty percent inhibition of cell proliferation (p<0.001).	Hideshima, 2000 (4.3.8)
Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs	hPBMC and human CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.0064 to 10 µmol/L/ 1-3 days	Pomalidomide increased IL-2 production in both CD4 ⁺ and CD8 ⁺ cells. Pomalidomide enhanced production of IL-2 and IFN-γ by Th1 cells and IL-5 and IL-10 by Th2 cells	Schafer, 2003 (4.3.17)
Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects	HUVECs and rat aorta	N/A	<i>in vitro</i>	1 or 10 µg/mL at every 48 hours for 10 days	In the rat aortic model, pomalidomide (IMiD2) at 10 µg/mL significantly inhibited microvessel outgrowth (p < 0.05) with 90% inhibition achieved by Day 10. The pomalidomide antiangiogenic effects were reversible, since drug withdrawal and subsequent stimulation of the aortic explants with VEGF led to the development of new microvessels. In the human angiogenesis model, the pomalidomide (10 µg/mL) anti-angiogenic effects were demonstrated by a significant 36% reduction (p < 0.05) in tubule formation	Dredge, 2002 (4.3.4)
Immunomodulatory analogs of thalidomide inhibit growth of Hs Sultan cells and angiogenesis <i>in vivo</i>	BNX mice	5 (for the first experiment) or 6 (for the second experiment) Female	<i>in vivo</i> IP	50 mg/kg, daily <First Exp.> Approx. 21 days treatment beginning 1 day after tumor challenge. <Second Exp.> Approx. 26 days for treatment of established tumors	Pomalidomide caused a significant inhibition of tumor growth. Pomalidomide treatment on grown tumors led to complete tumor regression. Pomalidomide significantly decreased mean vascular density (MVD) compared to controls demonstrating anti-angiogenic activity <i>in vivo</i> .	Lentzsch, 2003 (4.3.10)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Immunomodulatory drug CC-5013 or CC-4047 and rituximab enhance antitumor activity in a severe combined immunodeficient mouse lymphoma model	SCID mice	15 (sex of used animal was not clearly described in the article)	<i>in vivo</i> IP	0.5 mg/kg/ 19 days; administered 2 consecutive days before each dose of rituximab or placebo	Pomalidomide/rituximab combination significantly increased median survival time to 74 days compared to rituximab (38 days) or pomalidomide (21 days) alone. At the end of a 3-month follow-up period, a higher survival rate was observed in the pomalidomide/rituximab group (30%), compared to the rituximab alone group (5.3%).	Hernandez-Ilizaliturri, 2005 (4.3.7)
The thalidomide analogue, CC-4047, induces apoptosis signaling and growth arrest in childhood acute lymphoblastic leukemia cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	NOD/SCID mice	8 Female	<i>in vivo</i> IP	50 mg/kg/ 19 days for SC model, or 27 days for IV model	Pomalidomide inhibited tumor growth, increased caspase-3 activation, and reduced microvessel density in NOD/SCID mice inoculated SC with childhood human B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) cells. After IV BCP-ALL xenotransplantation, CC-4047 reduced splenic dissemination.	Shalapour, 2006 (4.3.18)

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Study Reports						
Effects of IMiDs on proliferation of breast cancer, NSCLC, CML and NHL cell lines <i>in vitro</i>	SKBR3, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 BT-474, NCI-H460, A549 cell lines	N/A	<i>in vitro</i>	0.3 to 100 $\mu\text{mol/L}$ / 72 hours (3 days)	Anti-proliferative activity of pomalidomide was observed in MDA-MB-468 (IC_{50} = 18 - 39 $\mu\text{mol/L}$) and MCF-7 cells (IC_{50} = about 95 $\mu\text{mol/L}$).	PD385 (4.2.1.2.1)
Anti-proliferative activity of IMiDs in 5q ⁻ solid tumor cell lines PC-3, HN, LCLC103H, SW480 and SK-MES-1	PC-3, HN, LCLC103H, SW480, SK-MES-1 cell lines	N/A	<i>in vitro</i>	0.0001 to 100 $\mu\text{mol/L}$ / 72 hours (3 days)	Pomalidomide was ineffective in blocking proliferation in the 5q ⁻ solid tumor cell lines PC-3, HN, LCLC103H, SW480 and SK-MES-1 (IC_{50} values: > 100 $\mu\text{mol/L}$).	5286-14 (4.2.1.2.2)
CC-4047 increases the expression of fetal hemoglobin in myeloid and erythroid differentiation models	BM CD34 ⁺ hematopoietic progenitor cells	N/A	<i>in vitro</i>	0.01 to 10 $\mu\text{mol/L}$ / 6 days	Pomalidomide treatment increased the percentage of cells expressing HbF (EC_{50} = 0.07 $\mu\text{mol/L}$) and decreased adult hemoglobin (HbA) expression in a dose-dependent manner. Expression of transferrin and glycophorin A cell surface markers was reduced.	1200-066 (4.2.1.2.3)
Effects of pomalidomide on prevention and treatment of bleomycin-induced dermal fibrosis	DBA/2 mice	8 (sex of used animal was not clearly described in the study report)	<i>in vivo</i> PO, QD	0.3, 3 and 30 mg/kg/ 3 weeks	In the prevention models of bleomycin-induced dermal fibrosis, dermal thickening was prevented dose-dependently at 3 and 30 mg/kg compared to mice receiving bleomycin and treated with vehicle only. Pomalidomide (0.3, 3, and 30 mg/kg) also reduced the numbers of myofibroblasts. In the regression models of bleomycin induced dermal fibrosis, pomalidomide treatment decreased the dermal thickness and numbers of myofibroblasts dose-dependently at 30 mg/kg compared with mice receiving bleomycin treatment. The data show that pomalidomide treatment prevented not only the development of fibrosis, but also induced regression of pre-established dermal fibrosis.	UEN11162010JD (4.2.1.2.4)

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Effects of pomalidomide, CC-220, and CC-122 on the treatment of dermal fibrosis in the Tsk-1 tight skin mouse	Tsk-1 mice	8 (sex of used animal was not clearly described in the study report)	<i>in vivo</i> PO, QD	0.3, 3 and 30 mg/kg/ 5 weeks	Treatment with pomalidomide in doses from 0.3 to 30 mg/kg prevented skin fibrosis in Tsk-1 mice in a dose-dependent manner, was effective in reducing dermal thickness, myofibroblast counts, and hydroxyproline content (3 and 30 mg/kg only).	UEN07052012JD (4.2.1.2.5)
CC-10015 activity in the endothelial progenitor cells assay	Human cord blood-derived CD133 ⁺ progenitor cells	N/A	<i>in vitro</i>	1 µmol/L/ 31 days	Pomalidomide increased endothelial progenitor cell (EPC) proliferation and directed differentiation towards the endothelial lineage <i>in vitro</i> . This effect was characterized by EPC morphology changes that included increased spindle-shaped cells, and cord-like structure formations. The cellular phenotype displayed increased surface expression of endothelial markers such as vascular endothelial (VE)-cadherin (CD144), vascular endothelial growth factor receptor-2/kinase insert domain receptor/fetal liver kinase 1, and platelet/endothelial cell adhesion molecule-1.	2231-24 (4.2.1.2.6)

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Effects of CC-2001, CC-4047, CC-5013, CC-11006, CC-10004, CC-11050, CC-401, and CC-145715 on carrageenan-induced hyperalgesia in rats	SD Rat	13 Male	<i>in vivo</i> IP	50 mg/kg/ up to 4 hours	Pomalidomide increased the pain threshold to thermal hyperalgesia by 70% at 3 hours, but reduced it by 9% and 30% at 2 hours and 4 hours, respectively. Pomalidomide increased the mechanical hyperalgesia pain threshold by 12%, 45% and 2% at 2, 3 and 4 hours, respectively. Pomalidomide significantly reduced paw edema by 42% at 3 hours ($p \leq 0.05$).	1270RC35.001 (4.2.1.2.7)
Effects of IMiDs on cytokine expression in primary human microglia and astrocytes	Human primary microglia and astrocytes	N/A	<i>in vitro</i>	0.0006 to 60 $\mu\text{mol/L}$ / 30 min +24 hours	In LPS-stimulated microglia, pomalidomide inhibited TNF- α ($\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{mol/L}$), MIP-1 α ($\text{IC}_{50} > 60 \mu\text{mol/L}$) and increased IL-10 ($\text{IC}_{50} > 60 \mu\text{mol/L}$). Pomalidomide had no effect on MCP-1, IL-8 or RANTES. In IL-1 β -stimulated astrocytes pomalidomide had no effect TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-8, but it elevated RANTES production. In LPS-stimulated astrocytes, pomalidomide had no effect on IL-6, IL-8, MCP-1 or RANTES.	PD444 (4.2.1.2.8)
Effect of CC-11006, CC-5013, CC-2001, CC-4047, CC-10015 and CC-16057 on cytokine/chemokine production by BV-2 mouse microglial cells and primary human astrocytes	Normal primary human astrocytes and BV-2 mouse microglia	N/A	<i>in vitro</i>	0.00001 to 10 $\mu\text{mol/L}$ / 30 min+ 24 hours	Pomalidomide treatment inhibited IL-6 production from BV-2 mouse microglia and human astrocytes with an $\text{IC}_{50} = 3.0$ and 5.6 $\mu\text{mol/L}$, respectively. At the 10 $\mu\text{mol/L}$ concentration, pomalidomide inhibited TNF- α production by 43% (microglia), RANTES production was inhibited by 10% and 69% in microglia and astrocytes, respectively. No inhibition of MCP-1 was observed.	5572-001 (4.2.1.2.9)
Inhibition of ultraviolet light B induced TNF- α production by thalidomide (CC-2001), pomalidomide (CC-4047), lenalidomide (CC-5013), apremilast (CC-10004), CC-10015, CC-11006, CC-11050, CC-13097, CC-15965, CC-16016, CC-16057, CC-16122, CC-16123, and/or CC-16125 in primary human neonatal epidermal keratinocytes and primary mouse epidermal keratinocytes	Human primary neonatal epidermal keratinocytes and primary mouse epidermal keratinocytes	N/A	<i>in vitro</i> :	0.1 to 10 $\mu\text{mol/L}$ / 2 hours	Pomalidomide reduced the HEKn UVB-induced TNF- α release by 45% at 0.1 $\mu\text{mol/L}$ and 98% at 1 $\mu\text{mol/L}$. Similarly, pomalidomide significantly reduced MEK UVB-induced TNF- α release by 90% at both the low (0.1 $\mu\text{mol/L}$) and high (10 $\mu\text{mol/L}$) concentrations. Cells collected from the HEKn and MEK UVB-induced TNF- α release experiments were examined for general cytotoxicity. The results showed that pomalidomide treatment led to significant inhibition of MEK cytotoxicity at all tested concentrations that ranged from 26% (1.0 $\mu\text{mol/L}$) to 34% (0.1 $\mu\text{mol/L}$) compared with the DMSO UVB control but had no effect on UVB-induced HEKn cytotoxicity.	5448-74 (4.2.1.2.10)

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: Pomalidomide

Organ Systems Evaluated (Study Title)	Species/Strain	Route of Administration	Doses/ Concentration	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Report Number/ References
Study Reports							
Central nervous system (Acute oral (gavage) CNS safety pharmacology study of CC-4047 in rats)	Rat/ SD	PO	0 (1% w/v CMC), 250, 1000 or 2000 mg/kg	10 Males and 10 Females	NOEL = 2000 mg/kg No effects up to 2000 mg/kg	Yes	CC-4047-TOX-011 (4.2.1.3.1)
Cardiovascular system (CC-4047: effect on cloned hERG channels expressed in human embryonic kidney HEK293 cells)	Human embryonic kidney cells (HEK 293)	<i>in vitro</i>	7.9 and 87.5 µmol/L	-	0.9% inhibition at 87.5 µmol/L (23,914 ng/mL) IC ₅₀ value was not determined.	Yes	CC-4047-TOX-009 (4.2.1.3.2)
Cardiovascular system and Respiratory system (CC-4047: cardiovascular and respiratory effects in the anesthetized dog following intravenous infusion)	Dog / Beagle	IV	0 (20% PEG 400 in Intralipid), 2.5, 10 or 25 mg/kg	2 Males and 2 Females	NOEL = 10 mg/kg <u>2.5 and 10 mg/kg:</u> No Effects <u>25 mg/kg:</u> 1 of 4 dogs had ↑ respiration rate and suppression of the cardiovascular system. Infusion stopped 7 minutes after start due to ↑ respiration rate, ↓ blood pressure, ↓ femoral artery blood flow, ↑ resistance. Some ECG parameters were variable. Animal was artificially ventilated. Infusion restarted 40 minutes after cessation of the first administration, and was dog was euthanized after 120 minutes. Large red patch found post mortem on posterior lung lobe indicating possible pulmonary embolism. The observed changes were considered to be due to prolonged artificial ventilation rather than anesthetics or test article-related effects.	Yes	1398/110-D6146 (4.2.1.3.3)

Test Article: Pomalidomide

Organ Systems Evaluated (Study Title)	Species/Strain	Route of Administration	Doses/ Concentration	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Report Number/ References
Cardiovascular system (Cardiovascular safety pharmacology evaluation of CC-4047 administered by oral gavage to telemetry-instrumented conscious cynomolgus monkeys)	Monkey/ Cynomolgus	PO	0 (1% w/v CMC), 0.2, 2 or 10 mg/kg	4 Males	NOEL = 10 mg/kg <u>10 mg/kg:</u> Pulse pressure was ↓ 10% (3 mm Hg), but not considered adverse pharmacodynamic effect. No other effects.	Yes	CC-4047-TOX-012 (4.2.1.3.4)
Respiratory system (Respiratory assessment following oral gavage administration of CC-4047 to plethysmograph-restrained male SD rats)	Rat/ SD	PO	0 (1% w/v CMC), 250, 1000 or 2000 mg/kg	8 Males	NOEL = 2000 mg/kg No effects	Yes	CC-4047-TOX-014 (4.2.1.3.5)

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用

Test Article: Pomalidomide

Study Title	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Concomitant Drug	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Study Reports							
Effects of lenalidomide, pomalidomide and thalidomide alone or in combination with Dex on cell proliferation and signaling pathways in MM cell lines	Human MM cell lines: H929, KMS-12-BM, OPM-2, and LP-1	N/A	<i>in vitro</i> :	0.0001 - 100 µmol/L / 5 days for Proliferation assay, 0.03-1 µmol/L/ 48 hours for Immunoblotting	Dex	Pomalidomide acted synergistically with Dex to inhibit MM cell proliferation in H929, LP-1, and OPM-2 cell lines, but not KMS-12-BM cell line which is Dex-insensitive. The mechanism of synergy involves down-regulation of IRF4/c-Myc expression, and Rb phosphorylation, and up-regulation of p21 ^{WAF-1} and p27 ^{Kip-1} .	7609-111 (4.2.1.4.1)
Evaluation of antiproliferative effect of CC-4047 in cellular models of MM	H929 and lenalidomide-resistant cell lines (named: 1051, 1052, 1053 and 1054)	N/A	<i>in vitro</i> :	0.01 - 10 µmol/L / 5 days for Proliferation assay), 1 and 10 µmol/L / 48 hours for Immunoblotting	Dex	The combination of pomalidomide and Dex synergistically acts in both lenalidomide-sensitive and -resistant H929 cells, by inhibiting cell proliferation and inducing cell death. The mechanism of pomalidomide with Dex synergy in these H929 lenalidomide-resistant cell lines involves the reduction of Rb phosphorylation, decreased expression of Survivin, IRF-4, and Bcl-2, and increased expression of p27 ^{Kip-1} and BIM when compared to either agent alone.	1785-4047 (4.2.1.1.5)
Evaluation of the effects of CC-4047 in combination with Dex in cellular models of lenalidomide-refractory MM: A Gene Expression Study	Human MM cell lines: H929 and lenalidomide-resistant cell lines (named: 1051, 1053 and 1054)	N/A	<i>in vitro</i> :	0.001 - 100 µmol/L / 5 days	Dex	The combination of pomalidomide and Dex induces strong synergistic, antiproliferative, and tumoricidal effects in lenalidomide-sensitive and -resistant MM cell lines.	DM2775-49 (4.2.1.4.2)

Test Article: Pomalidomide

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Route of Administration	Dose/ Duration	Concomitant Drug	Noteworthy Findings	Study Report Number/ References
Effects of lenalidomide, pomalidomide, and CC-122 on MM cell lines that have been made resistant to lenalidomide or pomalidomide	H929, KMS-12-BM cell lines	N/A	<i>in vitro</i>	0.0001 - 100 µmol/L / 72 hours (for assay) 0.1 µmol/L / 4 months (culture)	Dex	H929 and KMS-12-BM cells grown continuously in pomalidomide were approximately 130- and 418-fold less sensitive to pomalidomide + Dex, respectively, than prior to continuous growth in pomalidomide. Both KMS-12-BM and H929 cells continuously exposed to pomalidomide became much more resistant to lenalidomide + Dex than pomalidomide + Dex.	7596-01 (4.2.1.1.6)
Antitumor Activity of CC-4047 in the parental and lenalidomide refractory NCI-H929 human plasma cell myeloma xenograft model	C.B17/SCID mice	8-12 Female	<i>in vivo</i> PO, QD	LEN - sensitive cells: 0.03 mg/kg / 21 days LEN - refractory cells: 1 or 3 mg/kg / 14 days	Dex	Both pomalidomide (0.03 mg/kg) and Dex (5 or 10 mg/kg) showed significant tumor inhibition as single agents; however, no significant synergy with respect to tumor volume reduction was observed with the combination in the parental H929 xenograft model. In lenalidomide-refractory H929 tumor-bearing animals, the combination of pomalidomide (3 mg/kg) and Dex produced a highly significant inhibition of tumor growth (approx. 75%).	AP3975/ 4416/ 4462/ 4479/ 4524 (4.2.1.1.34)
Efficacy of lenalidomide and pomalidomide in combination with Dex and bortezomib in the MM.1S xenograft mouse model of MM	C.B17/SCID mice	9 (sex of used animal was not clearly described in the study report)	<i>in vivo</i> IP, QD for 5 of 7 days (Monday - Friday)	25 mg/kg/ 26 days	Dex at 1 mg/kg Bortezomib at 0.5 mg/kg	Pomalidomide as a single agent inhibited tumor growth from Day 8 compared with the control. The addition of Dex or Dex with bortezomib further increased the tumor suppression compared with pomalidomide treatment alone. Less than 15% body weight loss was observed in all treatment groups.	SALA-151008 (4.2.1.4.3)