2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

小野薬品工業株式会社

目次

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表.....3
2.6.1　緒言.....3

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

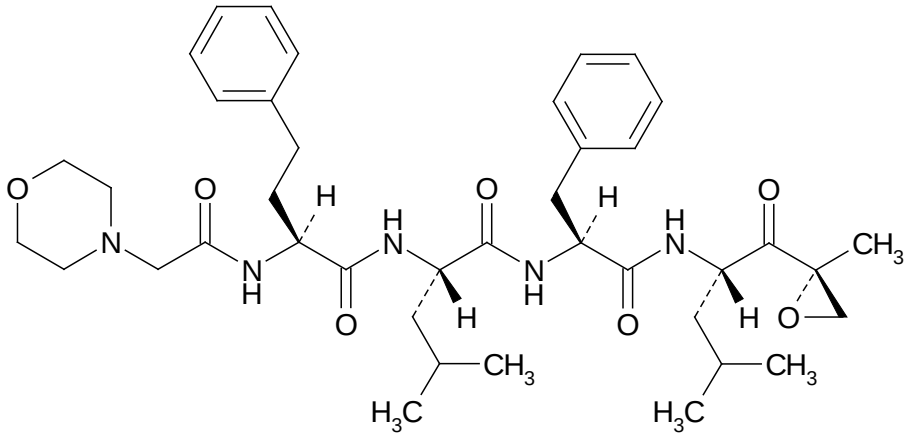
カルフィルゾミブはテトラペプチドエポキシケトン骨格を有し，20S プロテアソームのキモトリプシン様活性を選択的かつ不可逆的に阻害するプロテアソーム阻害剤である．

プロテアソームは細胞内に存在する酵素複合体であり，ポリユビキチン化された不要なタンパクを特異的かつ急速に分解することで細胞の増殖及び恒常性維持に寄与している．ポリユビキチン化を受けるタンパクとしては，細胞周期制御因子，シグナル伝達因子及び転写因子などが知られている．

腫瘍細胞では細胞の増殖が亢進しかつ恒常性維持機構に変化がみられプロテアソームへの依存性が亢進していることから，腫瘍細胞におけるプロテアソーム阻害は，細胞内にユビキチン化タンパクを過剰に蓄積させ，腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する．

カルフィルゾミブはプロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害し，細胞内にポリユビキチン化タンパクを蓄積させることで増殖が亢進している各種がん細胞株（骨髄腫細胞株を含む）においてアポトーシスを誘導した．また，カルフィルゾミブはプロテアソーム活性を不可逆的に阻害することで公知の多発性骨髄腫治療薬であるボルテゾミブやメルファラン，デキサメタゾンに耐性を示すがん細胞株においても細胞傷害作用を示した．これらのことから，カルフィルゾミブは多発性骨髄腫に対する新たな治療薬になり得ると考えた．

【構造式】



【化学名】

N-{(2*S*)-2-[(Morpholin-4-ylacetyl)amino]-4-phenylbutanoyl}-L-leucyl-L-phenylalanin-*N*-{(2*S*)-4-methyl-1-[(2*R*)-2-methyloxiran-2-yl]-1-oxopentan-2-yl}amide

2.6.1 緒言
カルフィルゾミブ

本申請における効能・効果及び用法・用量の案は以下のとおりである.

【効能・効果（案）】

再発又は難治性の多発性骨髄腫

【用法・用量（案）】

通常，成人には 1 日 1 回，本剤を 1，2，8，9，15，16 日目に投与し，12 日間休薬する．この 28 日間を 1 サイクルとして投与を繰り返す.

本剤の投与量はカルフィルゾミブとして，1 サイクル目の 1，2 日目のみ 20 mg/m^2（体表面積），それ以降は 27 mg/m^2（体表面積）とし，10 分かけて静脈内投与する.

2.6.2 薬理試験の概要文

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.3 副次的薬理試験 31
2.6.2.4 安全性薬理試験 37
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 39
2.6.2.6 考察及び結論 39
2.6.2.7 図表 45
2.6.2.8 参考文献 45

2.6.2 薬理試験の概要文

本項で使用した用語及び略号を表 2.6.2-1 に，関連化合物の名称を表 2.6.2-2 に示す.

表 2.6.2-1 用語及び略号一覧

用語及び略号	内容又は日本語名称
8226.Dox40	ドキソルビシン耐性ヒト骨髄腫細胞株
8226.LR5	メルファラン耐性ヒト骨髄腫細胞株
A549	ヒト非小細胞肺がん細胞株
ABP	Activity-based protein profiling
AMC	Amino-4-methylcoumarin
ANBL-6	ヒト多発性骨髄腫細胞株
AUClast	時間 0 から濃度定量可能最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積
Bax	BCL2-associated X protein
BIW，BIW d1/d4	週 2 回投与（週の 1 及び 4 日目）
Bz-VGR-AMC	Benzyl-Val-Gly-Arg-AMC
C0	時間 0 における血漿中濃度の外挿値
C-L	カスパーゼ様（活性）
CatA	カテプシン A
CatG	カテプシン G
CD138	Syndecan 1，膜貫通ヘパラン硫酸プロテオグリカンの 1 つ
ChT-L	キモトリプシン様（活性）
Cmax	最高血漿中濃度
CT-L	キモトリプシン様（活性）
D1/D4，d1/d4	週 2 回投与（週の 1 及び 4 日目）
DPPⅡ	ジペプチジルペプチダーゼⅡ
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FOB	機能観察総合評価
FP-ビオチン	フルオロホスホン酸ビオチン
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HS-Sultan	ヒトバーキットリンパ腫細胞株
HT-29	ヒト大腸がん細胞株
HT-29 PS 100	ボルテゾミブ耐性ヒト大腸がん細胞株
HT-29 PS 200	ボルテゾミブ耐性ヒト大腸がん細胞株
HT-29 PS 300	ボルテゾミブ耐性ヒト大腸がん細胞株
HtrA2/Omi	HtrA serine peptidase 2/Omi stress-regulated endopeptidase
HUVEC	ヒト正常臍帯静脈内皮細胞
IC_{50}	50%阻害濃度
Ki	阻害定数
kinact	最大酵素不活性化速度定数
LMP7	Low molecular mass polypeptide 7
MLL	Mixed Lineage Leukemia
MM1.R	デキサメタゾン耐性ヒト多発性骨髄腫細胞株
MM1.S	ヒト多発性骨髄腫細胞株
MM.1S	ヒト多発性骨髄腫細胞株
MiaPaCa-2	ヒト膵臓がん細胞株

用語及び略号	内容又は日本語名称
Molt4，Molt-4	ヒト急性リンパ性白血病細胞株
NHDF	ヒト正常皮膚線維芽細胞
NK_1	ニューロキニン-1
NK_2	ニューロキニン-2
PBMC	末梢血単核球
PGPH	カスパーゼ様（活性）
PI	ヨウ化プロピジウム
QD×2	週 2 回投与（週の 1 及び 2 日目）
QW	週 1 回投与
RFU	相対蛍光強度
RL	ヒト非ホジキンリンパ腫細胞株
RPMI-8226，RPMI8226	ヒト骨髄腫細胞株
RPMI-8226.wt	ヒト骨髄腫細胞株（親株）
RTV	相対腫瘍体積
SBECD	スルホブチルエーテルβ-シクロデキストリンナトリウム
SD	Sprague Dawley
SDS-PAGE	ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動
SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫細胞株
Suc-LLVY-AMC	Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC
TGI	腫瘍増殖抑制率
T-L	トリプシン様（活性）
Ub Protein	ポリユビキチン化タンパク
Z-LLE-AMC	Z-Leu-Leu-Glu-AMC

表 2.6.2-2　関連化合物の一覧

名称	その他の名称
カルフィルゾミブ	Carfilzomib, CFZ, ONO-7057, ONO-7057（[redacted]1159503）， PR-171, 171
ボルテゾミブ	Bortezomib, BTZ, PS-341

2.6.2.1 まとめ

薬理試験では *in vitro* 及び *in vivo* 試験でカルフィルゾミブの作用を検討した．

In vitro 試験でカルフィルゾミブは，公知のプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブと同程度にプロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害した．一方，カルフィルゾミブはカスパーゼ様活性を阻害したボルテゾミブと異なり，プロテアソームのカスパーゼ様活性を阻害せず，またプロテアソームのトリプシン様活性も阻害しなかった．カルフィルゾミブは腫瘍由来細胞株と 1 時間培養したとき，プロテアソームのキモトリプシン様活性を速やかに阻害し，続いてポリユビキチン化タンパクを蓄積させ，アポトーシスを誘導した．カルフィルゾミブはその濃度及び曝露時間に依存して細胞傷害作用を示した．カルフィルゾミブはボルテゾミブ耐性細胞株，メルファラン耐性細胞株及びデキサメタゾン耐性細胞株に対して，また，ボルテゾミブが非奏効であった多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞に対して細胞傷害作用を示した．

In vivo 試験でカルフィルゾミブは，ラットの血中及び脳を除く組織中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を用量依存的に阻害した．カルフィルゾミブ投与後の全血でのプロテアソーム活性の回復は，組織に比べ緩やかであった．また，組織中でのプロテアソーム活性の回復は，単回投与後と 5 日間連日投与後で同様であった．カルフィルゾミブはラットに 30 分かけて静脈内持続投与又は静脈内急速投与したとき，血中及び組織中におけるプロテアソームのキモトリプシン様活性を両投与方法において同程度に阻害した．カルフィルゾミブはヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S，ヒト大腸がん細胞株 HT-29 などのヒト腫瘍細胞株を皮下移植したマウス担がんモデルにおいて，抗腫瘍作用を示した．

カルフィルゾミブはプロテアソーム以外の検討したプロテアーゼに対して阻害作用を示さなかった．また，カルフィルゾミブは検討した 16 種類の酵素及び 67 種類の受容体／リガンド結合のうち，NK_1及び NK_2受容体並びにナトリウムチャンネル（site 2）結合に対して阻害作用を示し，少なくとも NK_2受容体に対しては拮抗作用を示した．カルフィルゾミブはボルテゾミブと同程度に神経細胞に分化させたヒト神経芽細胞腫細胞株 SH-SY5Y のプロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害したが，ボルテゾミブと異なり神経突起の変性を示さなかった．また，カルフィルゾミブはボルテゾミブと異なり，神経細胞の生存促進活性を有するとされているセリンプロテアーゼの HtrA2/Omi の活性を阻害しなかった．

安全性薬理試験では *in vitro* で hERG チャネル電流に対する作用を，サルへの単回投与により中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対する作用を評価した．また，ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験の中で機能観察総合評価（FOB）又は神経行動学的検査を実施し，反復投与後の中枢神経系に対する作用を評価した．その結果，中枢神経系及び呼吸系に対して，カルフィルゾミブはサルにおいて最高投与量の 3 mg/kg（36 mg/m^2）まで影響しなかった．

また，ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験においても，それぞれ最高投与量の 6 mg/kg（36 mg/m^2）及び 2 mg/kg（24 mg/m^2）まで中枢神経系に影響しなかった．一方，心血管系に対して，カルフィルゾミブはサルにおいて 3 mg/kg で心筋への影響に基づくと考えられる血圧低下や ST 上昇及び T 波増高の虚血性の心電図変化などの心機能障害を示した．カルフィルゾミブは hERG チャネル電流を阻害したが，サルにおいて最高投与量である 3 mg/kg まで心電図の QT 間隔を延長させなかった．カルフィルゾミブの心血管系に対する無影響量は 2 mg/kg（24 mg/m^2）であった．

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

In vitro プロテアソーム阻害作用試験では，精製ヒトプロテアソーム及び細胞中のプロテアソームの酵素活性に対する阻害作用について検討し，*in vitro* 細胞傷害作用試験では，腫瘍細胞株に対する細胞傷害作用について検討した．*In vivo* 試験ではヒト腫瘍細胞株をマウスに移植した担がんモデルを用いて抗腫瘍効果を評価し，またマウス，ラット及びサルにおける血中又は組織中のプロテアソームの酵素活性に対する阻害作用を評価した．

2.6.2.2.1 *In vitro* プロテアソーム阻害作用

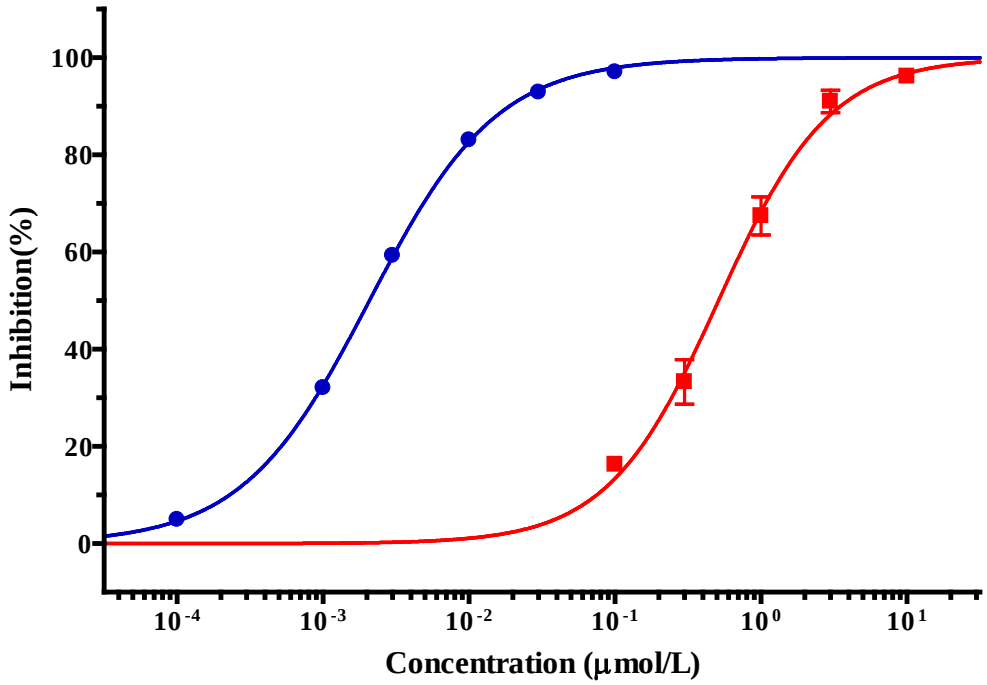
2.6.2.2.1.1 精製ヒト構成プロテアソーム及び免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する阻害作用

［評価資料 4.2.1.1-1］

精製ヒト構成プロテアソーム及び精製ヒト免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性に対するカルフィルゾミブの阻害作用を *in vitro* にて検討した．

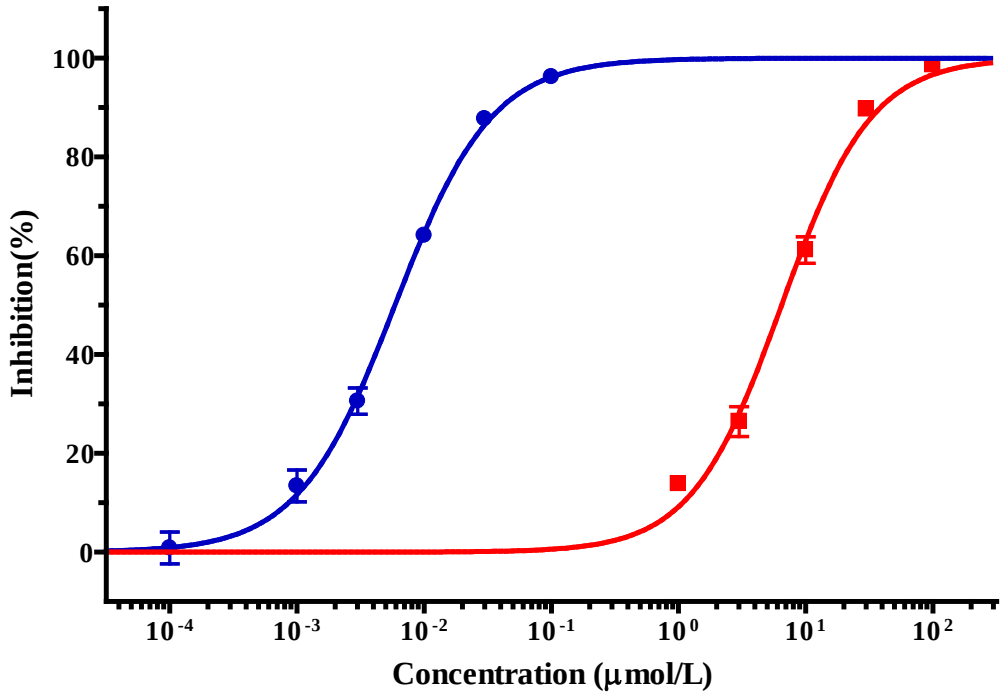
プロテアソームのキモトリプシン様活性の測定には，基質として Suc-LLVY-AMC を用いた．蛍光強度からカルフィルゾミブの各濃度における阻害率を求め，濃度・阻害曲線から IC_{50}値を算出した．陽性対照として公知のプロテアソーム阻害剤の lactacystin を用いた．結果を図 2.6.2.2.1.1-1 及び図 2.6.2.2.1.1-2 に示した．

カルフィルゾミブは精製ヒト構成プロテアソーム及び精製ヒト免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害し，その IC_{50}値はそれぞれ 2.08 及び 5.89 nmol/L であった．



Compound Name	IC_{50}
● ONO-7057 (■1159503)	2.08 ± 0.0478 nmol/L
■ Lactacystin	526 ± 83.0 nmol/L

図 2.6.2.2.1.1-1　ヒト構成プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する阻害作用
各濃度での阻害率及び IC_{50} 値は 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差を示す.
ONO-7057（■1159503）：カルフィルゾミブ



Compound Name	IC_{50}
● ONO-7057 (■1159503)	5.89 ± 0.532 nmol/L
■ Lactacystin	6.52 ± 0.639 μmol/L

図 2.6.2.2.1.1-2　ヒト免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する阻害作用
各濃度での阻害率及び IC_{50}値は 3 回の独立した実験の平均値±標準誤差を示す.
ONO-7057（■1159503）：カルフィルゾミブ

2.6.2.2.1.2　プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用

［参考資料 4.2.1.1-2］

ヒト 20S プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対するカルフィルゾミブ及びボルテゾミブの阻害作用を *in vitro* にて検討した.

実験には精製ヒト 20S プロテアソームを用いた．また，プロテアソームのキモトリプシン様活性の基質として Suc-LLVY-AMC を，カスパーゼ様活性の基質として Z-LLE-AMC を，トリプシン様活性の基質として Bz-VGR-AMC をそれぞれ用いた．蛍光強度を測定し，カルフィルゾミブ及びボルテゾミブの各濃度における反応進行曲線の傾きから IC_{50}値を算出した．また，カルフィルゾミブ及びボルテゾミブの kinact/Ki 値を算出した.

プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する IC_{50}値を表 2.6.2.2.1.2-1 に，プロテアソーム活性阻害の kinact/Ki 値を表 2.6.2.2.1.2-2 に示した．カルフィルゾミブは精製ヒト 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害し，その IC_{50}値は 4.4 nmol/L であった．また，プロテアソームの他の活性（カスパーゼ様及びトリプシン様活性）に対する IC_{50}値は 1 μ mol/L 以上であり，キモトリプシン様活性に対する IC_{50}値に比べ 300 倍以上乖離していた．一方，ボルテゾミブではプロテアソームのキモトリプシン様活性に対する IC_{50}値は 3.9 nmol/L，カスパーゼ様活性に対する IC_{50}値は 75 nmol/L，トリプシン様活性に対する IC_{50}値は 1 μ mol/L 以上であった．なお，カルフィルゾミブ及びボルテゾミブのプロテアソームのキモトリプシン様活性に対する阻害作用は共に時間依存的であり，kinact/Ki 値は 30000 $(mol/L)^{-1}s^{-1}$を超えた．

表 2.6.2.2.1.2-1　プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用

	キモトリプシン様活性	カスパーゼ様活性		トリプシン様活性	
阻害剤	IC_{50}値（nmol/L）	IC_{50}値（nmol/L）	キモトリプシン様活性に対する比	IC_{50}値（nmol/L）	キモトリプシン様活性に対する比
カルフィルゾミブ	4.4 ± 2.7（n = 43）	1650 ± 480（n =6）	375	2400 ± 60（n = 2）	545
ボルテゾミブ	3.9 ± 1.7（n = 24）	75 ± 28（n = 7）	19	2840 ± 1740（n = 4）	728

表 2.6.2.2.1.2-2　プロテアソーム活性阻害の kinact/Ki 値

阻害剤	プロテアソーム活性阻害 kinact/Ki（$(mol/L)^{-1}s^{-1}$）		
	キモトリプシン様	カスパーゼ様	トリプシン様
カルフィルゾミブ	33800	<100	<100
ボルテゾミブ	38000	5700	<100

2.6.2.2.1.3　プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する各種プロテアソーム阻害剤の作用

［参考資料 4.2.1.1-3[1)] ］

カルフィルゾミブと公知のプロテアソーム阻害剤（ボルテゾミブ，*Clasto*-lactacystin β-lactone 及び Salinosporamide A）のプロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用を *in vitro* にて検討した．実験には精製ヒト 20S プロテアソーム及び精製ヒト 20S 免疫プロテアソーム並びにヒト大腸がん細胞株 HT-29 の細胞溶解液を用いた．

結果を表 2.6.2.2.1.3-1 に示した．カルフィルゾミブは精製ヒト 20S プロテアソーム及び精製ヒト 20S 免疫プロテアソーム並びにヒト大腸がん細胞株 HT-29 の細胞溶解液のキモトリプシン様活性を選択的に阻害し，その IC_{50}値はそれぞれ 6，33 及び 4 nmol/L であった．一方，ボルテゾミブはキモトリプシン様活性に加え，カスパーゼ様活性も阻害した．また，*Clasto*-lactacystin β-lactone は，キモトリプシン様活性に選択的であったが，IC_{50}値はカルフィルゾミブに比べ 10 倍程度高かった．Salinosporamide A は，プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性のすべての活性を阻害した．

表 2.6.2.2.1.3-1　各種プロテアソーム阻害剤のプロテアソーム阻害作用

Active site	Chymotrypsin-like				Caspase-like			Trypsin-like		
Inhibitory parameter	k_{inact}/K_i (M^{-1} s^{-1})	1 h IC_{50} (nmol/L)			k_{inact}/K_i (M^{-1} s^{-1})	1 h IC_{50} (nmol/L)		k_{inact}/K_i (M^{-1} s^{-1})	1 h IC_{50} (nmol/L)	
Proteasome preparation	20S	20S	Cell lysate	Immuno 20S	20S	20S	Cell lysate	20S	20S	Cell lysate
Inhibitor										
PR-171	33,000	6 ± 2	4 ± 2	33 ± 17	<100	2,400 ± 500	1,000 ± 550	<100	3,600 ± 850	1,100 ± 470
Bortezomib	38,000	7 ± 2	6 ± 1	4 ± 2	5,700	74 ± 36	55 ± 22	<100	4,200 ± 1,900	600 ± 190
Clasto-lactacystin β-lactone	ND	62 ± 18	37 ± 24	440 ± 180	ND	14,000 ± 9,000	4,200 ± 1,500	ND	2,000 ± 700	860 ± 200
Salinosporamide A †	ND	3.5 ± 0.3	ND	ND	ND	430 ± 34	ND	ND	28 ± 2	ND

各値は 4 例以上の平均値±標準偏差を示す．PR-171；カルフィルゾミブ
†Salinosporamide A の IC_{50}値は，Chauhan らの報告 [2] を引用した．

2.6.2.2.1.4 細胞溶解液中のプロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用

［参考資料 4.2.1.1-4[3)] ］

細胞溶解液中のプロテアソーム活性に対するカルフィルゾミブの作用を検討した．

ヒト多発性骨髄腫細胞株 ANBL-6 の細胞溶解液をカルフィルゾミブ（終濃度 0.1 から 250 nmol/L）及び蛍光基質と混合し，生じた蛍光強度からプロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性を算出した．

結果を図 2.6.2.2.1.4-1 に示した．カルフィルゾミブは 10 nmol/L 以上の濃度でプロテアソームのキモトリプシン様活性を 80%以上阻害した．一方，カルフィルゾミブは 100 nmol/L でプロテアソームのカスパーゼ様及びトリプシン様活性を 30%以上阻害しなかった．

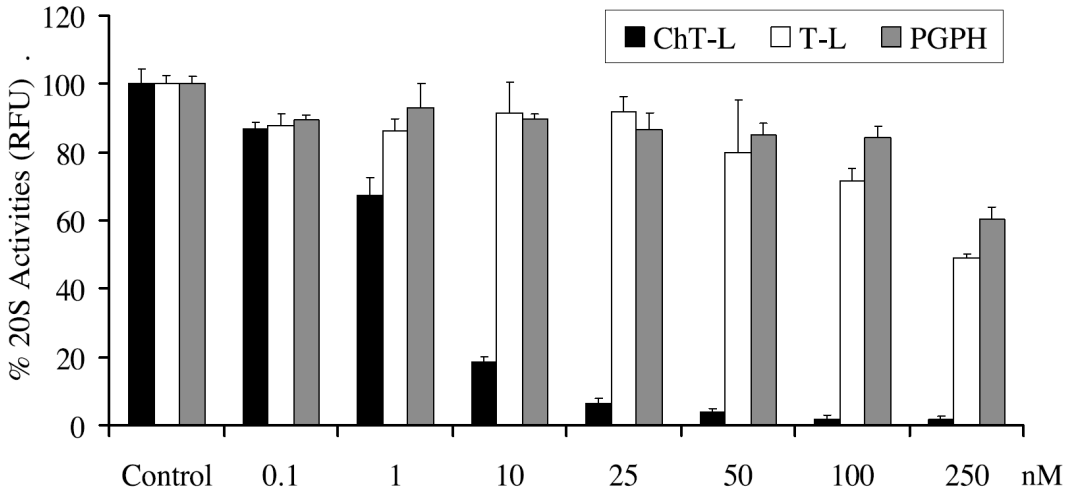


図 2.6.2.2.1.4-1 細胞溶解液中のプロテアソーム活性に対する作用
各カラムは平均値＋標準偏差を示す．RFU；相対蛍光強度
ChT-L；キモトリプシン様，T-L；トリプシン様，PGPH；カスパーゼ様

2.6.2.2.1.5 腫瘍細胞中のプロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用

［参考資料 4.2.1.1-3[1)] ，4.2.1.1-4[3)] ］

腫瘍細胞中のプロテアソーム活性に対するカルフィルゾミブの作用を検討した．

ヒト大腸がん細胞株 HT-29 又はヒト多発性骨髄腫細胞株 ANBL-6 を，カルフィルゾミブ又はボルテゾミブを含む培地で 1 時間培養した後に細胞溶解液を調製した．HT-29 細胞の細胞溶解液では，プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性を蛍光法で測定した．また，ANBL-6 細胞の細胞溶解液では，構成プロテアソーム及び免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性部位（β5 及びβ5i），カスパーゼ様活性部位（β1

及びβ1i）及びトリプシン様活性部位（β2 及びβ2i）に対する結合を活性部位特異的なプローブを用いた ELISA 法で測定した．

結果を図 2.6.2.2.1.5-1 及び図 2.6.2.2.1.5-2 に示した．カルフィルゾミブは HT-29 細胞中のプロテアソーム活性を用量依存的に阻害し，キモトリプシン様活性に対する阻害活性が最も高かった．一方，ボルテゾミブはカルフィルゾミブと同様に HT-29 細胞中のプロテアソーム活性を用量依存的に阻害したが，キモトリプシン様活性及びカスパーゼ様活性を同程度に阻害した．また，カルフィルゾミブは ANBL-6 細胞中の構成プロテアソーム及び免疫プロテアソームの各サブユニットの活性部位に用量依存的に結合し，キモトリプシン様活性部位（β5 及びβ5i）に対する選択性が高かった．

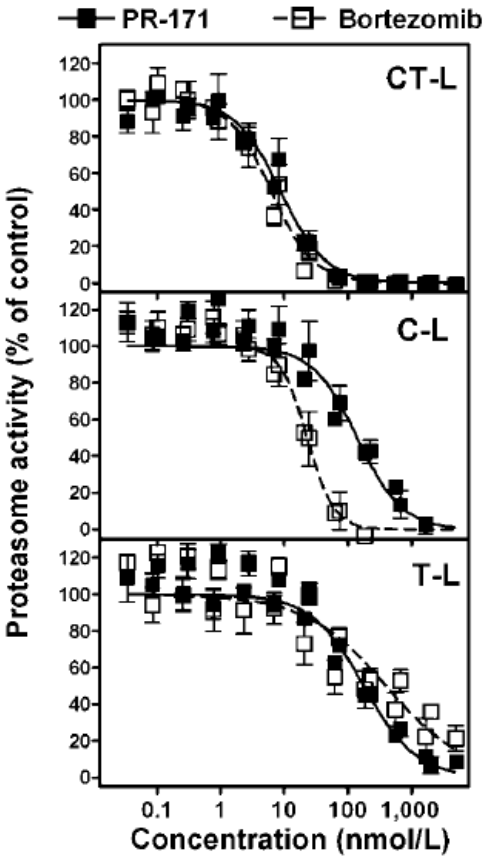


図 2.6.2.2.1.5-1　HT-29 細胞中のプロテアソーム活性に対する作用
各点は 3 例以上の平均値±標準誤差を示す．PR-171；カルフィルゾミブ
CT-L；キモトリプシン様活性，C-L；カスパーゼ様活性，T-L；トリプシン様活性

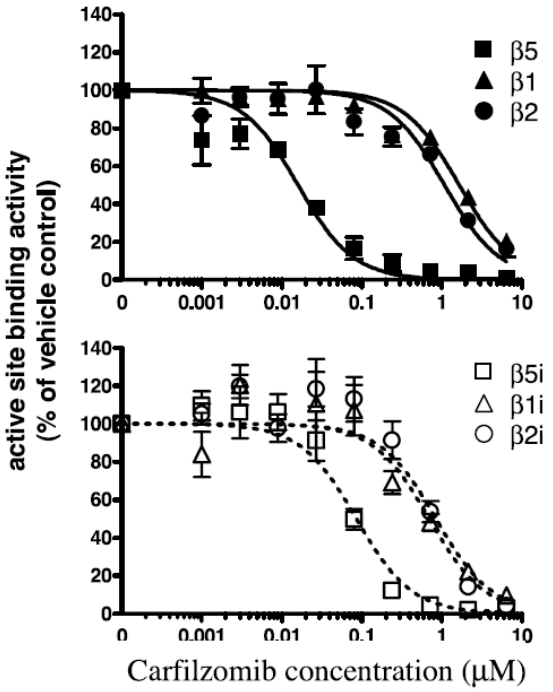


図 2.6.2.2.1.5-2　ANBL-6 細胞中の構成及び免疫プロテアソームに対する作用
各点は平均値±標準偏差を示す.
上図：構成プロテアソーム活性部位
（β5；キモトリプシン様，β1；カスパーゼ様，β2；トリプシン様）に対する作用
下図：免疫プロテアソーム活性部位
（β5i；キモトリプシン様，β1i；カスパーゼ様，β2i；トリプシン様）に対する作用

2.6.2.2.1.6　腫瘍細胞中のプロテアソームのキモトリプシン様活性の回復性

［参考資料 4.2.1.1-3[1)] ］

カルフィルゾミブ又はボルテゾミブを曝露した後の腫瘍細胞中のプロテアソームのキモトリプシン様活性の回復性について検討した.

ヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226 及びヒト大腸がん細胞株 HT-29 を，カルフィルゾミブ（終濃度 32 nmol/L）又はボルテゾミブ（終濃度 32 nmol/L）を含む培地で 1 時間培養した後，化合物を含まない培地に交換した．培地交換後 0，4，24 及び 72 時間に細胞溶解液を調製し，細胞溶解液中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した.

結果を図 2.6.2.2.1.6-1 に示した．カルフィルゾミブ及びボルテゾミブを除去することで，腫瘍細胞中のプロテアソームのキモトリプシン様活性は，経時的に回復した.

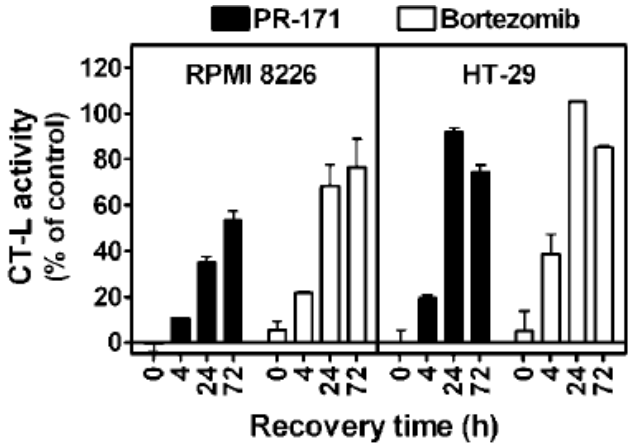


図 2.6.2.2.1.6-1　腫瘍細胞中のプロテアソームのキモトリプシン様活性の回復性
各カラムは媒体群に対する各時点での平均値＋標準誤差を示す.
PR-171；カルフィルゾミブ，CT-L activitiy；キモトリプシン様活性

2.6.2.2.2　*In vitro* 細胞傷害作用

2.6.2.2.2.1　腫瘍細胞株における細胞死誘導機序

［参考資料 4.2.1.1-4[3)]，4.2.1.1-5］

腫瘍細胞株におけるカルフィルゾミブの細胞死誘導機序について検討した.

ヒト大腸がん細胞株 HT-29，ヒト急性リンパ性白血病細胞株 Molt4 又はヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226 を，カルフィルゾミブを 100 又は 500 nmol/L 含む培地で 1 時間培養した後，化合物を含まない培地に交換した．イムノブロット法により，ポリユビキチン化タンパク及びアポトーシス誘導タンパクである Bax の蓄積，並びにカスパーゼ 3 活性を測定した．また，フローサイトメトリーによりアポトーシスを評価した.

結果を図 2.6.2.2.2.1-1 から図 2.6.2.2.2.1-4 に示した．HT-29，Molt4 及び RPMI-8226 にカルフィルゾミブを曝露後 4 時間において，ポリユビキチン化タンパクが蓄積した．また，RPMI-8226 にカルフィルゾミブを曝露後 24 及び 48 時間において，ポリユビキチン化タンパク及び Bax が蓄積した．更に，Molt4 及び RPMI-8226 にカルフィルゾミブを曝露後 4 時間においてカスパーゼ 3 の活性化は認められなかったが，曝露後 24 時間では認められた．また，Molt4 にカルフィルゾミブを曝露後 24 時間において，アネキシンＶ陽性細胞及びアネキシンＶ/PI 二重陽性細胞が明らかに増加し，アポトーシスの誘導が示唆された．なお，アポトーシスに至る時間は Molt4 で曝露後 24 時間，HT-29 では曝露後 72 時間と，細胞株によって異なった．以上，カルフィルゾミブは各種がん細胞株において，ポリユビキチン化タンパクを蓄積させ，アポトーシスを誘導した.

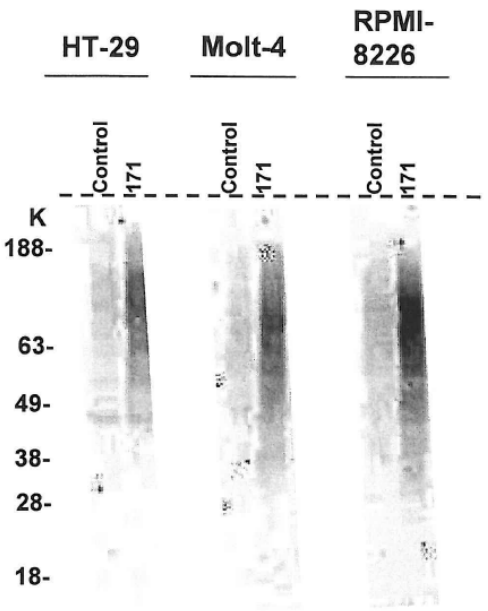


図 2.6.2.2.2.1-1　ポリユビキチン化タンパクの蓄積
HT-29，Molt4 及び RPMI-8226 をカルフィルゾミブ（終濃度：500 nmol/L）を含む培地で 1 時間培養した後，化合物を含まない培地に交換した．曝露後 4 時間に細胞を回収し，細胞中のポリユビキチン化タンパクをイムノブロット法で検出した．171；カルフィルゾミブ

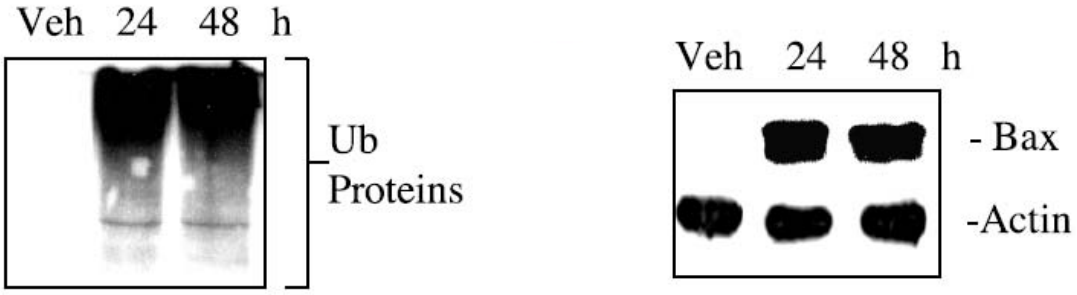


図 2.6.2.2.2.1-2　ポリユビキチン化タンパク及び Bax の蓄積
RPMI-8226 を，カルフィルゾミブ（終濃度：100 nmol/L）を含む培地で 1 時間培養した後，化合物を含まない培地に交換した．曝露後 24 及び 48 時間に細胞を回収し，細胞中のポリユビキチン化タンパク又は Bax をイムノブロット法で検出した．内在性コントロールとしてアクチンを用いた．

2.6.2 薬理試験の概要文
カルフィルゾミブ

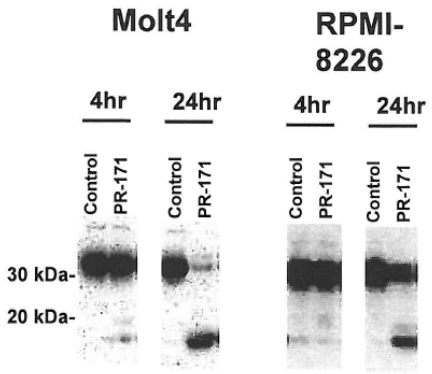


図 2.6.2.2.2.1-3　カスパーゼ 3 の活性化
Molt4 及び RPMI-8226 を，カルフィルゾミブ（終濃度：500 nmol/L）を含む培地で 1 時間培養した後，化合物を含まない培地に交換した．曝露後 4 及び 24 時間に細胞を回収し，細胞中のカスパーゼ 3 をイムノブロット法で検出した．
32 kDa；intact caspase 3，17 kDa；active form of caspase 3
PR-171；カルフィルゾミブ

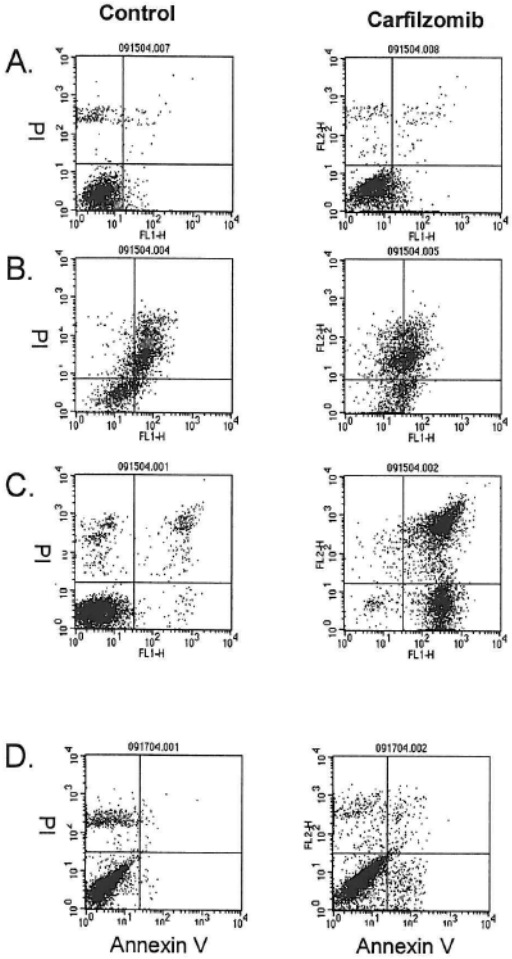


図 2.6.2.2.2.1-4　アポトーシスの誘導
HT-29（A 及び D），RPMI-8226（B）及び Molt4（C）を，カルフィルゾミブ（終濃度：500 nmol/L）を含む培地で 1 時間培養した後，化合物を含まない培地に交換した．曝露後 24 時間（A, B 及び C）又は曝露後 72 時間（D）に細胞を回収し，アネキシン及びヨウ化プロピジウム（PI）で染色後フローサイトメトリーによりアポトーシスを評価した．

2.6.2.2.2.2 多発性骨髄腫細胞株に対する細胞傷害作用

［評価資料 4.2.1.1-6］

多発性骨髄腫細胞株に対するカルフィルゾミブの細胞傷害作用を検討した.

ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S を，カルフィルゾミブを含む培地で 1 時間培養した後，化合物を含まない培地に交換し，化合物処置後 24 時間に細胞生存率を測定した（1 時間処置）．また，MM.1S をカルフィルゾミブを含む培地で 24 時間培養した後に細胞生存率を測定した（24 時間持続処置）.

結果を表 2.6.2.2.2.2-1 に示した．カルフィルゾミブを 1 又は 24 時間処置した際の細胞生存に対する IC_{50}値はそれぞれ 35.7 及び 5.9 nmol/L であった.

表 2.6.2.2.2.2-1　多発性骨髄腫細胞株に対する細胞傷害作用

カルフィルゾミブ（nmol/L）		1 時間処置（N=4） Mean	S.D.	24 時間持続処置（N=4） Mean	S.D.
細胞生存率（%）	0	100.0	± 6.22	100.0	± 7.11
	1	90.9	± 5.33	103.3	± 6.30
	2.5	98.2	± 6.35	90.3	± 8.52
	5	89.6	± 2.83	66.7	± 2.39
	10	106.6	± 3.32	17.8	± 2.02
	25	75.3	± 3.48	3.9	± 1.20
	50	34.4	± 3.09	4.1	± 1.15
	100	15.0	± 2.34	5.4	± 1.64
IC_{50}値（nmol/L）		35.7		5.9	

2.6.2.2.2.3 各種細胞に対する細胞傷害作用

［参考資料 4.2.1.1-3[1)] ］

各種細胞に対するカルフィルゾミブの細胞傷害作用を検討した.

ヒト血液腫瘍細胞株（RPMI-8226，HS-Sultan，Molt4 及び RL），ヒト固形腫瘍細胞株（HT-29，MiaPaCa-2 及び A549）並びにヒト正常細胞（NHDF 及び HUVEC）を，カルフィルゾミブ又はボルテゾミブを含む培地で 1 時間培養した後，化合物を含まない培地に交換し，培地交換後 72 時間に細胞生存率を測定した（1 時間処置）．また，これらの細胞をカルフィルゾミブ又はボルテゾミブを含む培地で 72 時間培養した後に細胞生存率を測定した（72 時間持続処置）.

結果を表 2.6.2.2.2.3-1 に示した．カルフィルゾミブを 72 時間持続処置したとき，各種がん細胞の細胞生存に対する IC_{50}値は 2.4～20 nmol/L であり，その細胞傷害作用はボルテゾミブと同程度であった．一方，1 時間処置ではカルフィルゾミブがボルテゾミブに比べより強力な細胞傷害作用を示した．また，同条件でのカルフィルゾミブの細胞生存に対する IC_{50}値は，

固形腫瘍細胞株及び正常細胞に比べ血液腫瘍細胞株で低値であり，血液腫瘍細胞株はカルフィルゾミブに対する感受性が高かった.

表 2.6.2.2.2.3-1　各種細胞株に対する細胞傷害作用

細胞分類	細胞株名	由来	IC_{50}（nmol/L）			
			1 時間処置		72 時間持続処置	
			カルフィルゾミブ	ボルテゾミブ	カルフィルゾミブ	ボルテゾミブ
血液腫瘍細胞株	RPMI-8226	骨髄腫	71±22	303±52	10±3.3	4.5±2.5
	HS-Sultan	バーキットリンパ腫	135±30	454±60	5.2±2.3	5.4±2.0
	Molt4	急性リンパ性白血病	31±17	126±52	3.1±1.6	6.2±2.7
	RL	非ホジキンリンパ腫	164±92	814±476	2.4±0.4	3.4±2.0
固形腫瘍細胞株	HT-29	大腸がん	350±84	2190±390	6.2±3.9	5.0±2.6
	MiaPaCa-2	膵臓がん	1110±240	＞6500	8.9±6.5	8.3±2.3
	A549	非小細胞肺がん	1200±900	4600±1900	20±8	13±8
正常細胞	NHDF	正常皮膚	389±128	2460±1120	14±4.5	6.3±4.1
	HUVEC	正常臍帯静脈内皮	455±45	3510±390	7.2±1.3	3.5±0.5

各値は 3 例以上の IC_{50}値（単位は nmol/L）の平均値±標準偏差を示す.

2.6.2.2.2.4　ボルテゾミブ耐性細胞株に対する細胞傷害作用

［参考資料 4.2.1.1-7］

ボルテゾミブ耐性細胞株に対するカルフィルゾミブの細胞傷害作用を検討した.

ヒト大腸がん細胞株 HT-29 をボルテゾミブを含む培地で持続的に培養し，ボルテゾミブ耐性細胞株を樹立した．樹立したボルテゾミブ耐性細胞株又は親細胞株を，カルフィルゾミブ又はボルテゾミブを含む培地で 72 時間培養し，細胞生存率を測定した．各薬剤におけるボルテゾミブ耐性細胞株の耐性度を Resistance Factor（ボルテゾミブ耐性細胞株における IC_{50}値／親細胞株における IC_{50}値）として算出した.

結果を表 2.6.2.2.2.4-1 に示した．カルフィルゾミブはボルテゾミブ耐性細胞株に対して細胞傷害作用を示した．IC_{50}値を耐性細胞株と親細胞株で比較した結果，100 及び 200 nmol/L のボルテゾミブに曝露させることで樹立した HT-29 のボルテゾミブ耐性細胞株では，ボルテゾミブの Resistance Factor がそれぞれ 18.1 及び 17.2 であった．カルフィルゾミブの Resistance Factor は 3.2 以下であった．300 nmol/L のボルテゾミブに曝露させることで樹立した HT-29 のボルテゾミブ耐性細胞株では，ボルテゾミブの Resistance Factor が 114 であったのに対し，カルフィルゾミブの Resistance Factor は 4.3 であった.

表 2.6.2.2.2.4-1　ボルテゾミブ耐性細胞株におけるボルテゾミブ及びカルフィルゾミブの作用

細胞株 （ボルテゾミブ濃度）	ボルテゾミブ		カルフィルゾミブ	
	IC_{50}値	Resistance Factor[a]	IC_{50}値	Resistance Factor[a]
HT-29 親細胞株 （0 nmol/L）	17.3 nmol/L	－	32.9 nmol/L	－
HT-29 PS 100 （100 nmol/L）	313.4 nmol/L	18.1	104.2 nmol/L	3.2
HT-29 PS 200 （200 nmol/L）	298.6 nmol/L	17.2	41.7 nmol/L	1.3
HT-29 親細胞株 （0 nmol/L）	20.7 nmol/L	－	14.9 nmol/L	－
HT-29 PS 300 （300 nmol/L）	2,373 nmol/L	114	64.4 nmol/L	4.3

[a] Resistance Factor＝（ボルテゾミブ耐性細胞株における IC_{50}値）／（親細胞株における IC_{50}値）

2.6.2.2.2.5　　薬剤耐性細胞株に対する細胞傷害作用

［参考資料 4.2.1.1-4[3)] ］

各種薬剤耐性細胞株に対するカルフィルゾミブの細胞傷害作用を検討した．

ボルテゾミブ非奏効の多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞，ボルテゾミブによる治療中に進行した多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞，ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM1.S，デキサメタゾン耐性ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM1.R，ヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226.wt（親株），メルファラン耐性ヒト骨髄腫細胞株 8226.LR5 及びドキソルビシン耐性ヒト骨髄腫細胞株 8226.Dox40 を実験に用いた．カルフィルゾミブ又はボルテゾミブを含む培地で 1 時間培養した後，化合物を含まない培地に交換し，交換後 24 時間に細胞生存率を測定した．あるいは，化合物を含む培地で 24 又は 48 時間培養した後に細胞生存率を測定した．

結果を図 2.6.2.2.2.5-1 及び表 2.6.2.2.2.5-1 に示した．カルフィルゾミブはボルテゾミブ非奏効の多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞，ボルテゾミブの治療中に進行した多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞に対して細胞傷害作用を示した．また，カルフィルゾミブはボルテゾミブの治療中に進行した多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞に対してボルテゾミブよりも強い細胞傷害作用を示した．更に，カルフィルゾミブは MM1.S，MM1.R，RPMI-8226.wt，8226.LR5 に対しても細胞傷害作用を示した．一方，カルフィルゾミブは 8226.Dox40 に対して細胞傷害作用を示さなかった．なお，P-gp 阻害薬であるベラパミルを前処置することで，カルフィルゾミブは 8226.Dox40 に対して細胞傷害作用を示した．

2.6.2 薬理試験の概要文
カルフィルゾミブ

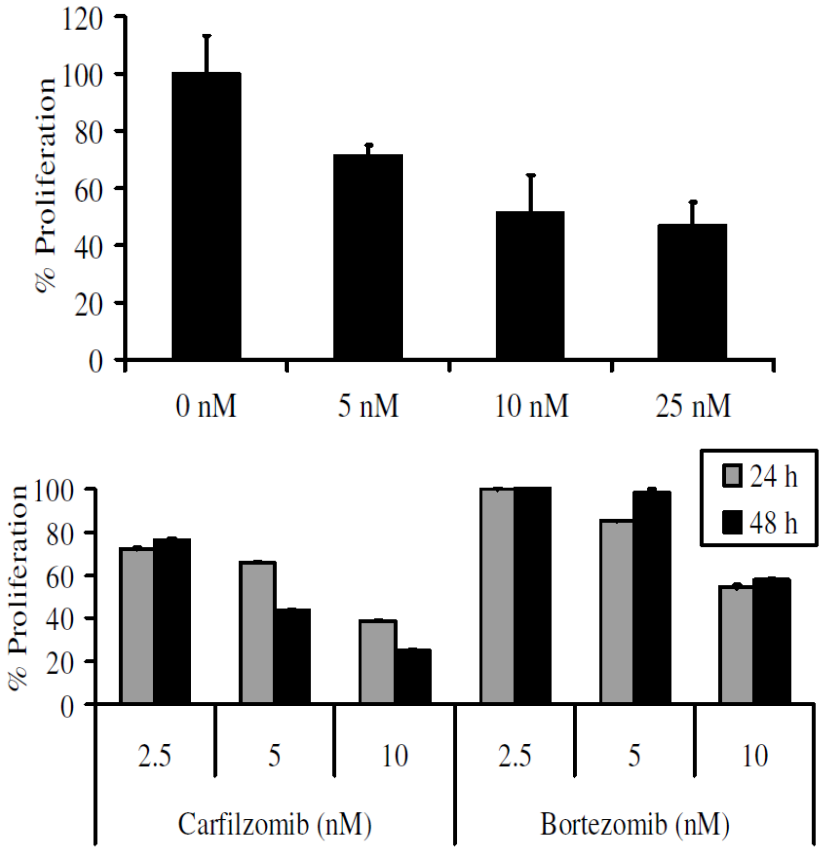


図 2.6.2.2.2.5-1　多発性骨髄腫患者由来細胞に対する細胞傷害作用

上図　　ボルテゾミブに非奏効であり，第 13 染色体を欠失している多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞を，カルフィルゾミブを含む培地で 24 時間培養した後に細胞生存率を測定した．

下図　　ボルテゾミブによる治療中に進行が認められた多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞を，カルフィルゾミブ又はボルテゾミブを含む培地で 24 時間又は 48 時間培養した後に細胞生存率を測定した．

各カラムは媒体群に対する各時点の平均値＋標準偏差を示す．

表 2.6.2.2.2.5-1　薬剤耐性細胞株に対する細胞傷害作用

細胞株名	IC_{50}値（nmol/L）
MM1.S（ヒト多発性骨髄腫細胞株）	29.3
MM1.R（デキサメタゾン耐性ヒト多発性骨髄腫細胞株）	15.2
RPMI-8226.wt［ヒト骨髄腫細胞株（親株）］	89.9
8226.LR5（メルファラン耐性ヒト骨髄腫細胞株）	83.3
8226.Dox40（ドキソルビシン耐性ヒト骨髄腫細胞株）	>1000
8226.Dox40（ドキソルビシン耐性ヒト骨髄腫細胞株）（P-gp 阻害薬ベラパミル 15 μmol/L 前処置）	829

各細胞株をカルフィルゾミブを含む培地で 1 時間培養した後，化合物を含まない培地に交換した．培地交換後 24 時間に細胞生存率を測定した．P-gp 阻害薬であるベラパミルは，24 時間前処置した．

2.6.2.2.3 *In vivo* 試験

2.6.2.2.3.1 抗腫瘍試験

1） ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S 皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果

［評価資料 4.2.1.1-8］

ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S を雌免疫不全マウス（Crl:NIH-*Lyst*^{bg} *Foxn1*^{nu} *Btk*^{xid}）の皮下に移植し，カルフィルゾミブの抗腫瘍効果を検討した．MM.1S は 1×10^7 cells/0.1mL/body で移植し，平均腫瘍体積が 82.5 mm^{3}に到達した移植後 16 日に，各群の腫瘍体積が均等になるよう 1 群あたり 15 例を割付けた（Day 1）．Day 1 から媒体あるいはカルフィルゾミブを 3 又は 5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 2 日目）静脈内急速投与し，これを 5 週間繰り返した．最終評価日（Day 36）まで，一般状態観察，体重測定を実施し，腫瘍サイズ（長径及び短径）を測定して腫瘍体積を算出した．主評価項目は最終評価日の腫瘍体積とし，副次評価項目は，最終評価日以外の腫瘍体積，相対腫瘍体積（RTV），腫瘍増殖抑制率（TGI），一般状態，体重及び体重変化率とした．

結果を図 2.6.2.2.3.1-1 及び図 2.6.2.2.3.1-2 に示した．カルフィルゾミブは一般状態及び体重推移に重篤な影響を及ぼすことなく，忍容性は良好であった．カルフィルゾミブの 3 及び 5 mg/kg 群の腫瘍体積は，実験期間を通じて対照群の腫瘍体積より低値で推移した．最終評価日（Day 36）における対照群，カルフィルゾミブの 3 及び 5 mg/kg 群の腫瘍体積の平均値は，それぞれ 6320.0，4890.0 及び 3955.8 mm^{3}であり，カルフィルゾミブの 5 mg/kg 群の腫瘍体積の平均値は対照群と比較して有意に低値であった．カルフィルゾミブの 3 及び 5 mg/kg 群の RTV の平均値は，実験期間を通じて対照群の RTV の平均値より低値で推移し，Day 36 における TGI は，3 mg/kg 群で 24.0%，5 mg/kg 群で 40.9%であった．

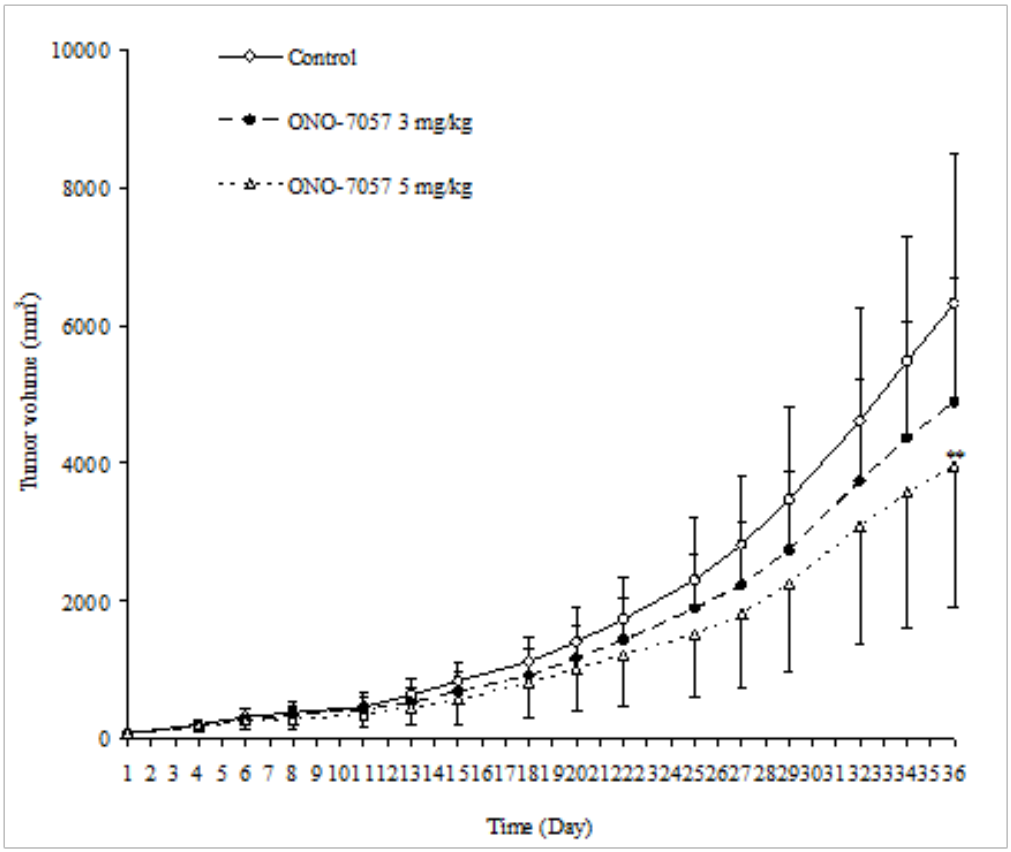


図 2.6.2.2.3.1-1　ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S 皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果
データは各群 15 例の腫瘍体積の平均値±標準偏差を示す.
** p<0.01：Dunnett 検定，最終評価日における対照群との比較
横軸：カルフィルゾミブ投与開始日からの時間（日）
ONO-7057：カルフィルゾミブ

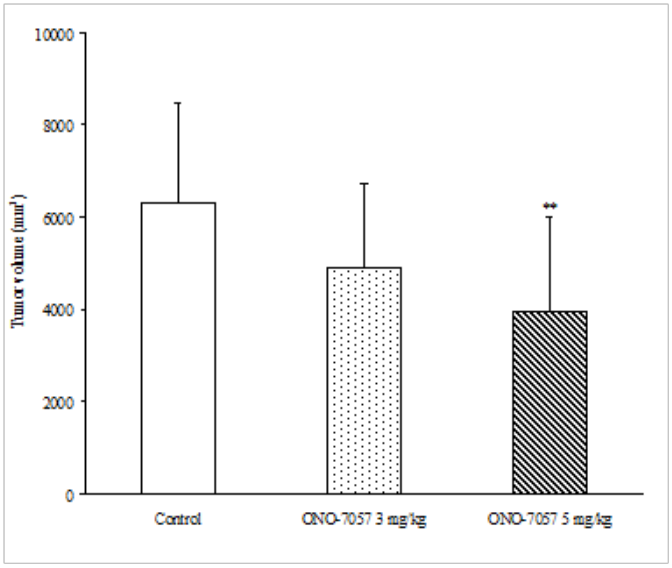


図 2.6.2.2.3.1-2　最終評価日（Day 36）における腫瘍体積
データは各群 15 例の腫瘍体積の平均値＋標準偏差を示す.
** p<0.01：Dunnett 検定，対照群との比較
ONO-7057：カルフィルゾミブ

2） ヒト大腸がん細胞株 HT-29 皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果

［参考資料 4.2.1.1-9］

ヒト大腸がん細胞株 HT-29 を雌 NIH III（BNX）系マウスの皮下に移植し，カルフィルゾミブとボルテゾミブの抗腫瘍効果を比較検討した．HT-29 は 5×10^6 cells/0.1mL/body で移植し，移植後 4 日に腫瘍体積を測定したのち，1 群あたり 6 例を無作為に割付けた．腫瘍体積が約 50 mm^3に達した移植後 7 日から，カルフィルゾミブを 10 mg/kg で週 1 回，5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 2 日目），又は 5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目），ボルテゾミブを 1 mg/kg（最大耐量）で週 2 回（週の 1 及び 4 日目），媒体を週 2 回（週の 1 及び 4 日目），それぞれ 4 週間静脈内急速投与した．腫瘍体積は移植後 4 日に 1 回，移植後 7 日から 42 日まで週 3 回測定した．試験期間中，一般状態観察及び体重測定を実施した．

結果を図 2.6.2.2.3.1-3 に示した．カルフィルゾミブ及びボルテゾミブは，一般状態及び体重推移に重篤な影響を及ぼすことなく，忍容性は良好であった．カルフィルゾミブは 5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目），又は 10 mg/kg で週 1 回静脈内急速投与したとき，腫瘍の増大を抑制しなかったが，5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 2 日目）静脈内急速投与したときは，有意な抗腫瘍効果を示した．また，ボルテゾミブは 1 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目）静脈内急速投与したとき，腫瘍の増大を抑制しなかった．

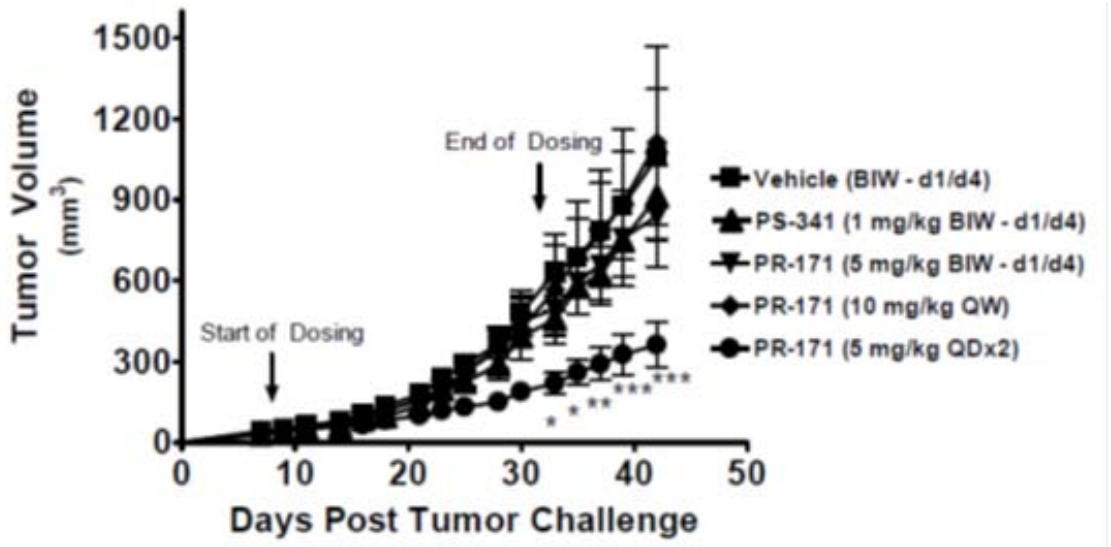


図 2.6.2.2.3.1-3 ヒト大腸がん細胞株 HT-29 皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果

データは各群 6 例の腫瘍体積の平均値±標準誤差を示す．矢印は投与開始及び終了日を示す．
*p < 0.05，**p < 0.01，***p < 0.001：二元配置分散分析と Bonferroni 型の事後解析
PR-171：カルフィルゾミブ，PS-341：ボルテゾミブ
BIW - d1/d4：週 2 回投与（週の 1 及び 4 日目），QW：週 1 回投与，QD×2：週 2 回投与（週の 1 及び 2 日目）

3） 各種腫瘍細胞株の皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果

［参考資料 4.2.1.1-3[1)] ］

ヒト大腸がん細胞株 HT-29，ヒト非ホジキンリンパ腫細胞株 RL 又はヒトバーキットリンパ腫細胞株 HS-Sultan を雌 NIH III（BNX）系マウスの皮下に移植し，カルフィルゾミブの抗腫瘍効果を検討した．

HT-29 は 5×10^6 cells/0.1mL/body で移植し，腫瘍体積が約 50 mm^3に達した移植後 7 日から，カルフィルゾミブを 10 mg/kg で週 1 回，5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 2 日目），又は 5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目），ボルテゾミブを 1 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目），媒体を週 2 回（週の 1 及び 4 日目），それぞれ 3 週間静脈内急速投与した（各群 7 例）．腫瘍体積は週 3 回測定した．

RL は 1×10^7 cells/0.1mL/body で移植し，腫瘍体積が約 90 mm^3に達した移植後 12 日から，カルフィルゾミブを 3 及び 5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 2 日目），ボルテゾミブを 1 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目），媒体を週 2 回（週の 1 及び 2 日目），それぞれ 2 週間静脈内急速投与した（各群 7 例）．腫瘍体積は週 3 回測定した．

HS-Sultan はマトリゲルと 1：1 の割合で混合して 1×10^7 cells/0.2mL/body で移植し，腫瘍体積が約 300 mm^3に達した移植後 11 日から，カルフィルゾミブを 3 又は 5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 2 日目），ボルテゾミブを 1 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目），媒体を週 2 回（週の 1 及び 2 日目，又は週の 1 及び 4 日目），それぞれ 2 週間静脈内急速投与した（各群 7 例）．腫瘍体積は週 3 回測定した．

結果を図 2.6.2.2.3.1-4 に示した．カルフィルゾミブは 5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 2 日目）静脈内急速投与したとき，いずれの担がんモデルにおいても腫瘍の増大を抑制した．一方，ボルテゾミブは 1 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目）静脈内急速投与したとき，いずれの担がんモデルにおいても腫瘍の増大を抑制しなかった．なお，HT-29 を移植した担がんモデルにおいて，カルフィルゾミブは，5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目），又は 10 mg/kg で週 1 回静脈内急速投与したとき腫瘍の増大を抑制しなかった．

2.6.2 薬理試験の概要文
カルフィルゾミブ

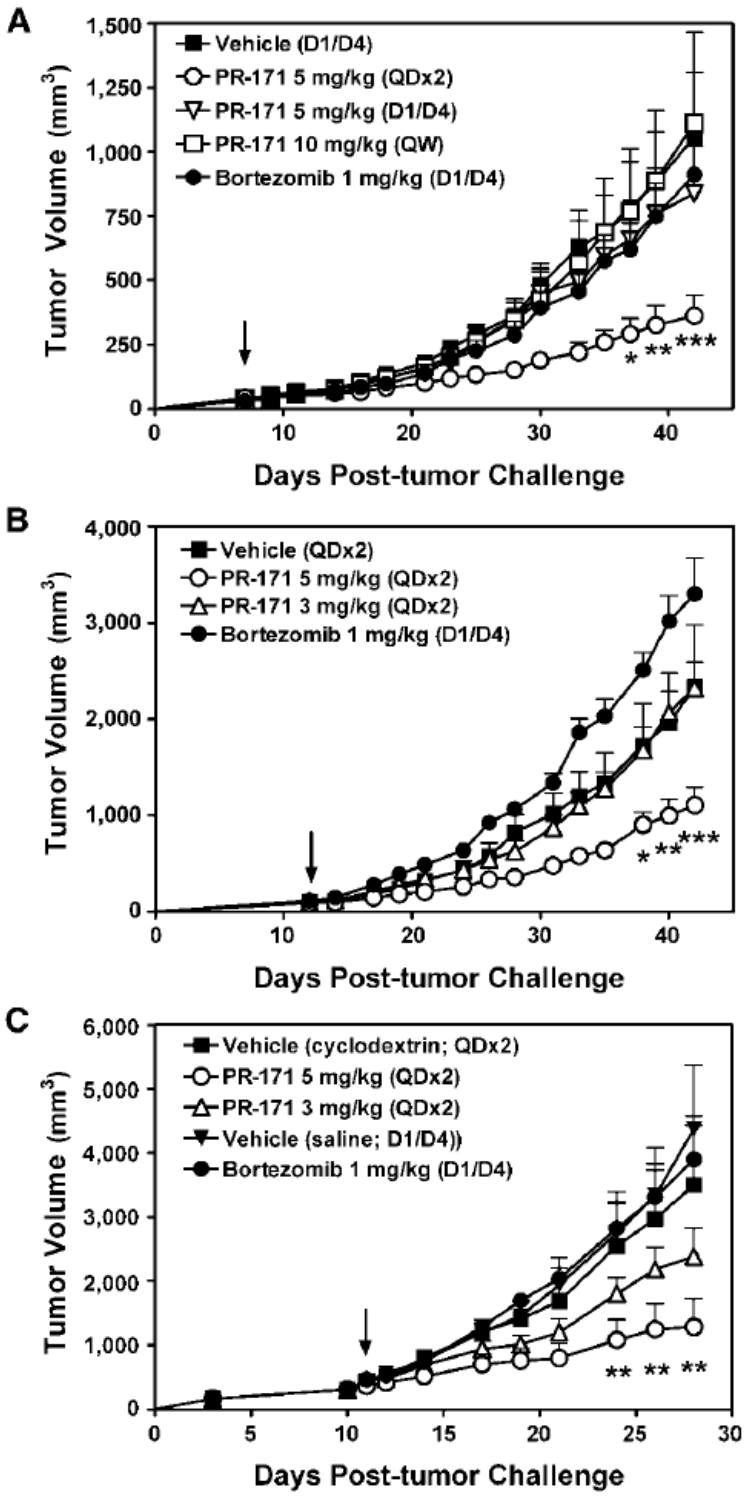


図 2.6.2.2.3.1-4　各種担がんモデルにおける抗腫瘍効果
A：HT-29 担がんモデル，B：RL 担がんモデル，C：HS-Sultan 担がんモデル
データは各群 7 例の腫瘍体積の平均値＋標準偏差を示す．矢印は投与開始日を示す．
*p < 0.05，**p < 0.01，***p < 0.001：二元配置分散分析と Bonferroni 型の事後解析
PR-171：カルフィルゾミブ，cyclodextrin：sulfobutylether-β-cyclodextrin，Saline：生理食塩液
D1/D4：週 2 回投与（週の 1 及び 4 日目），QW：週 1 回投与，QD×2：週 2 回投与（週の 1 及び 2 日目）

2.6.2.2.3.2 薬力学試験

1） マウスの血中及び組織中のプロテアソーム活性に対する阻害作用

［参考資料 4.2.1.1-3[1)] ］

BALB/c 系マウス（雌 3 例／群）に，媒体，カルフィルゾミブの 5 mg/kg 又はボルテゾミブの 1 mg/kg を単回静脈内投与し，投与後 1 から 168 時間の血中又は組織中のプロテアソーム活性を測定した．

カルフィルゾミブは血中のプロテアソームのキモトリプシン様活性，カスパーゼ様活性及びトリプシン様活性のうち，キモトリプシン様活性を選択的に阻害した．一方，ボルテゾミブはキモトリプシン様活性に加えてカスパーゼ様活性も阻害した．また，カルフィルゾミブ及びボルテゾミブは，各組織中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を投与後 1 時間において阻害した．更に，カルフィルゾミブは全血のプロテアソーム活性を投与後 72 時間まで持続的に阻害したが，ボルテゾミブは投与後 72 時間までに阻害作用が消失した．

2） ラットの血中及び組織中のプロテアソーム活性に対する阻害作用

（1） 単回静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-3[1)] ，4.2.1.1-10，4.2.1.1-11，4.2.1.1-12］

SD 系ラット（雄 2～6 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 0.1～25 mg/kg で単回静脈内急速投与し，投与後 1 時間から 7 日までの血中及び組織中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を経時的に測定した．

（2） 単回又は 2 日間連日静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-13］

SD 系ラット（雄 3 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 2 mg/kg で単回又は 2 日間連日静脈内急速投与した．単回投与後 1，24，48 及び 72 時間に，2 日間連日投与では 2 回目の投与後 1，24 及び 48 時間に，血液又は組織（副腎，肝臓及び骨髄）を採取し，血中及び組織中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した．

（3） 単回又は 5 日間連日静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-14］

SD 系ラット（雄 2～3 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 0.1，0.25，0.5，1，2 及び 4 mg/kg で単回静脈内急速投与，あるいは媒体又はカルフィルゾミブを 0.1，0.25，0.5，1 及び 2 mg/kg で 5 日間連日静脈内急速投与した．投与後に血液又は組織（脳，脾臓，赤血球

除去骨髄，副腎，心臓，肝臓又は肺）を採取し，血中又は組織中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した.

（4） 5 日間連日静脈内急速投与又は週 2 回（週の 1 及び 4 日目）静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-15］

SD 系ラット（雄 4 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 1，2 及び 4.5 mg/kg で静脈内急速投与し，これを 5 日間繰り返した後に 7 日間休薬した（QD×5）．また，媒体又はカルフィルゾミブを 2，4.5 及び 9 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目）静脈内急速投与し，これを 2 週繰り返した（BIW×2）．投与 5 日目（QD×5 では最終投与後 1 時間，BIW×2 では 2 回目投与翌日）及び 12 日目（QD×5 では 7 日間休薬後，BIW×2 では最終投与翌日）に採血し，血中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した.

（5） 1 カ月間反復静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-16］

SD 系ラット（雌雄各 4 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 0.5，1，2，4 及び 6 mg/kg で静脈内急速投与した．投与スケジュールは，5 日間連日投与後，9 日間休薬し，更に 5 日間連日投与した．初回投与前，初回及び最終投与後 1 又は 24 時間に血液を，最終投与後 1 又は 24 時間に組織（骨髄，副腎，肝臓及び脳）を採取し，血中又は組織中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した.

（6） 6 カ月間反復静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-17］

SD 系ラット（雌雄各 2～8 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 1，2 及び 4 mg/kg で 6 カ月間静脈内急速投与［週 2 回（週の 1 及び 2 日目）の静脈内投与を 3 週間繰り返し，1 週間休薬するサイクルを 6 回繰り返し］した．投与 1 日目（初回投与日），投与 57 日目（3 サイクル目の投与初日），投与 142 日目（6 サイクル目の投与初日）の投与前及び投与後 1 時間に採血し，血中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した.

（7） 単回急速又は静脈内持続投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-18］

SD 系ラット（雄 3 例／群）に，カルフィルゾミブを 1 mg/kg で単回静脈内急速投与，又は 1，5 及び 30 分かけて単回静脈内持続投与した．投与後 1 時間に全血，脾臓，骨髄，副腎，心臓，肝臓，肺及び腎臓を採取し，各試料中のプロテアソームのキモトリプシン様活性，カスパーゼ様活性及びトリプシン様活性を測定した.

（8） 単回静脈内急速又は持続投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-19］

SD 系ラット（雄 3～10 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 8 mg/kg で静脈内急速投与，又はカルフィルゾミブを 30 分かけて静脈内持続投与した．また，ボルテゾミブを 0.5 mg/kg で静脈内急速投与した．投与後 2 及び 24 時間に血液，副腎，心臓，肝臓，肺及び腎臓を採取し，各試料中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した．

上記（1）から（8）のラットの血中及び組織中プロテアソーム活性に対する阻害作用の結果を表 2.6.2.2.3.2-1 に記載した．

表 2.6.2.2.3.2-1　ラットの血中及び組織中のプロテアソーム活性に対する阻害作用

（1）	単回静脈内急速投与	カルフィルゾミブは投与後 1 時間において，血中及び組織中のプロテアソーム活性を用量依存的に阻害したが，脳のプロテアソーム活性を阻害しなかった．全血（主成分は脱核した赤血球）では，プロテアソーム活性の回復は他組織に比べ緩やかであった．
（2）	2 日間連日静脈内急速投与	カルフィルゾミブを単回又は 2 日間連日投与したとき，投与後のプロテアソーム活性の回復性は類似していた．
（3）	5 日間連日静脈内急速投与	カルフィルゾミブの連日投与により，全血，肺及び心臓では阻害曲線が低用量側に移行した．全血では投与後 9 日においてプロテアソーム活性がほとんど回復しなかったが，全血以外の組織では活性が回復した．
（4）	5 日間連日静脈内急速投与又は週 2 回（週の 1 及び 4 日目）静脈内急速投与	カルフィルゾミブは 5 日間連日静脈内急速投与又は週 2 回静脈内急速投与のいずれの投与方法においても，投与後 5 日の全血のプロテアソーム活性を完全に阻害した．
（5）	1 カ月間反復静脈内急速投与	カルフィルゾミブは最終投与後 1 時間において，血中及び組織中のプロテアソーム活性を阻害したが，脳のプロテアソーム活性を阻害しなかった．
（6）	6 カ月間反復静脈内急速投与	カルフィルゾミブは初回投与後 1 時間において，全血のプロテアソーム活性を 85%以上阻害した．全血のプロテアソーム活性は，3 及び 6 サイクル目の投与初日の投与前においてわずかに回復したが，カルフィルゾミブの投与により 90%以上阻害された．
（7），（8）	単回静脈内急速又は持続投与	カルフィルゾミブは静脈内急速投与又は静脈内持続投与したとき，プロテアソームのキモトリプシン様活性を同程度阻害した．カルフィルゾミブは心臓を除く組織においてプロテアソームのカスパーゼ様及びトリプシン様活性を阻害しなかった．カルフィルゾミブは心臓のプロテアソームのカスパーゼ様及びトリプシン様活性を約 40%阻害した．

3） サルの血中及び組織中のプロテアソーム活性に対する阻害作用

（1） 単回静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-20，4.2.1.1-21］

カニクイザル（雌雄各 2 例／群又は雄 6 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 1，2 及び 3 mg/kg で単回静脈内急速投与した．投与前並びに投与後 24 から 25 時間に採血し，血中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した．ただし，カルフィルゾミブを 3 mg/kg で投与した雄カニクイザルについては，投与後 6 から 22 時間に採血した．

（2） サルに単回静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-22］

カニクイザル（雌 3 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 2 mg/kg で単回静脈内急速投与した．投与後約 2 時間に血液，赤血球除去骨髄，副腎，脳，肝臓，心臓，肺及び鼠径リンパ節を採取し，各試料中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した．また，投与前並びに投与後 15，60 及び 120 分に採血し，全血（主として赤血球）のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した．

（3） 単回又は 5 日間連日静脈内急速投与したときの血中及び組織中プロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-23］

カニクイザル（雄 2～3 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 1，1.16，2 及び 4 mg/kg で単回静脈内急速投与した（1.16 mg/kg 群は 2 例，その他の群は各 3 例）．また，カニクイザル（雄 3 例）に，カルフィルゾミブを 1 mg/kg で 5 日間連日静脈内急速投与した．投与後に予め定めた時点で血液又は骨髄を採取し，血中又は組織中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した．

（4） 1 カ月間反復静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-24］

カニクイザル（雌雄各 5 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 0.5，1 及び 2 mg/kg で静脈内急速投与した．投与スケジュールは，5 日間連日投与後，9 日間休薬するサイクルを 2 回繰り返し，投与 20 及び 29 日目に計画剖検した（投与 20 日目雌雄各 3 例，投与 29 日目雌雄各 2 例）．投与後に血液又は組織（副腎，脳，心臓及び肝臓）を採取し，血中又は組織中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した．

（5） 9 カ月間反復静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性

［参考資料 4.2.1.1-25］

カニクイザル（雌雄各 4 又は 6 例／群）に，媒体又はカルフィルゾミブを 0.5，1 及び 2 mg/kg で 9 カ月間静脈内急速投与［週 2 回（週の 1 及び 2 日目）の静脈内急速投与を 3 週間繰り返し，1 週間休薬するサイクルを 9 回繰り返し］した．投与 1 日目（初回投与日），投

与 57 日目（3 サイクル目の投与初日），投与 141 日目（6 サイクル目の投与初日），投与 225 日目（9 サイクル目の投与初日）の投与前及び投与後 1 時間に採血し，血中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した.

上記の（1）から（5）のサルの血中及び組織中プロテアソーム活性（キモトリプシン様活性）に対する阻害作用の結果を表 2.6.2.2.3.2-2 に記載した.

表 2.6.2.2.3.2-2　サルの血中及び組織中プロテアソーム活性に対する阻害作用

(1)，(2)	単回急速投与	カルフィルゾミブは投与後 15 分において全血のプロテアソーム活性を 90%以上阻害し，投与後 25 時間においても 75%以上阻害した. カルフィルゾミブは，投与後 2 時間において，骨髄，副腎，心臓及び肺のプロテアソーム活性を阻害した．また，肝臓及び鼠径リンパ節のプロテアソーム活性を一部阻害したが有意差はなかった. 一方，脳のプロテアソーム活性は阻害しなかった.
(3)	5 日間連日静脈内急速投与	カルフィルゾミブは 3 及び 4 回目の投与後 1 時間において全血のプロテアソーム活性をほぼ完全に阻害し，5 回目の投与後 9 日において活性は一部回復した．また，PBMC のプロテアソーム活性は全血と比較してより速く回復した.
(4)	1 カ月間反復静脈内急速投与	カルフィルゾミブは最終投与後 24 時間において，全血のプロテアソーム活性をほぼ完全に阻害した．また，カルフィルゾミブは最終投与後 24 時間において，心臓のプロテアソーム活性を阻害したが，副腎，肝臓及び脳のプロテアソーム活性を阻害しなかった.
(5)	9 カ月間反復静脈内急速投与	カルフィルゾミブは初回投与後 1 時間において，全血のプロテアソーム活性を 80%以上阻害した. 全血のプロテアソーム活性は 3，6 及び 9 サイクル目の投与初日の投与前においてわずかに回復したが，カルフィルゾミブの投与により 90%以上阻害された.

2.6.2.3　副次的薬理試験

カルフィルゾミブのプロテアソーム以外の各種プロテアーゼに対する作用，各種受容体及び酵素に対する作用並びに神経細胞及びセリンプロテアーゼに対する作用を検討した.

2.6.2.3.1　プロテアソーム以外の各種プロテアーゼに対する作用

［参考資料 4.2.1.2-1］

プロテアソーム以外の 21 種のプロテアーゼに対するカルフィルゾミブ及びボルテゾミブの阻害作用を 10μmol/L の濃度で検討した.

カルフィルゾミブは 10μmol/L の濃度において，検討したいずれのプロテアーゼに対しても阻害率 50%を超える明らかな阻害作用を示さなかった．一方，ボルテゾミブはカテプシン G，キマーゼ及びヒト膵臓キモトリプシンを 90%以上阻害した.

2.6.2.3.2 各種受容体及び酵素に対する作用

［参考資料 4.2.1.2-2］

67 種類の受容体／リガンド結合及び 16 種類の酵素に対する阻害作用を検討した.

カルフィルゾミブは 10μmol/L の濃度で，NK_1及び NK_2受容体並びにナトリウムチャネル（Site 2）のリガンドとの結合を 50%以上阻害し，その阻害率はそれぞれ 61，120 及び 51%であった．NK_1及び NK_2受容体に対するカルフィルゾミブの IC_{50}値は，それぞれ 22 及び 0.7 μmol/L であった．また，ウサギ肺動脈を用いた試験でカルフィルゾミブの NK_2受容体拮抗作用が確認された.

2.6.2.3.3 神経細胞及びセリンプロテアーゼに対する作用

［参考資料 4.2.1.2-3[4)] ］

神経細胞に分化させたヒト神経芽細胞腫細胞株 SH-SY5Y を用いた *in vitro* 試験において，ボルテゾミブとカルフィルゾミブの神経傷害作用を比較した．また，*in vitro* 及び *in vivo* 試験にて，ボルテゾミブ及びカルフィルゾミブのセリンプロテアーゼに対する作用を評価した.

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y をレチノイン酸と脳由来神経栄養因子で神経細胞に分化させた後，10 nmol/L のカルフィルゾミブ又はボルテゾミブを含む培地で 1 及び 24 時間培養した．培養後 24 時間に細胞骨格のβⅢチューブリンを免疫染色することで細胞体及び神経突起を検出した．また，Hoechst で核染色することで生存細胞を検出した．更に，培養後 1 時間での細胞中のキモトリプシン様活性を測定した．なお，細胞突起の長さと細胞数は，各 well 20 視野を撮影し，画像解析した.

結果を図 2.6.2.3.3-1 に示した．カルフィルゾミブは細胞の生存数及び神経突起の長さに影響を与えなかった．一方，ボルテゾミブは細胞の生存数に影響を与えなかったが，神経突起の合計長及び平均長を 40%減少させた．なお，カルフィルゾミブ及びボルテゾミブは，処置後 1 時間においてプロテアソームのキモトリプシン様活性を同程度阻害した.

精製酵素及びそれぞれの基質を用いて，カテプシン A，カテプシン G，キマーゼ及び DPP Ⅱのプロテアーゼ活性を測定した．また，HtrA2/Omi の活性をβ-casein を基質とした際の生成物を SDS-PAGE にて検出した．更に，ヒト PBMC から調製した細胞溶解液を用いて，カルフィルゾミブ又はボルテゾミブ添加後のセリンプロテアーゼ活性を ABP 法 [5] により測定した．

結果を表 2.6.2.3.3-1 に示した．カルフィルゾミブはカテプシン A，カテプシン G，キマーゼ，DPP Ⅱ及び HtrA2/Omi を阻害したボルテゾミブと異なり，これらのセリンプロテアーゼを阻害しなかった．

SD 系ラット（雄 3 例／群）に，媒体，カルフィルゾミブを 7 mg/kg 又はボルテゾミブを 0.3 mg/kg で単回静脈内急速投与した．投与後 15 分に脾臓を採取し，赤血球除去脾細胞におけるプロテアソームのキモトリプシン様活性及びカテプシン G 活性を測定した．また，ボルテゾミブを 1.0，1.3 又は 1.6 mg/m^{2}で投与した骨髄腫患者の末梢血から PBMC を単離し，PBMC 中のプロテアソームのキモトリプシン様活性及びカテプシン G 活性を測定した．

結果を図 2.6.2.3.3-2 及び図 2.6.2.3.3-3 に示した．カルフィルゾミブあるいはボルテゾミブを投与したラットの赤血球除去脾細胞におけるプロテアソームのキモトリプシン様活性は，それぞれ，媒体群に対し 15%以下及び 30%であった．一方，カルフィルゾミブ投与後のカテプシン G 活性は媒体群と同様であったが，ボルテゾミブ投与後のカテプシン G 活性は媒体群の 50%であった．更に，ボルテゾミブを 1.3 及び 1.6 mg/m^{2}で投与した骨髄腫患者由来の PBMC において，カテプシン G 活性の低下が認められた．なお，ボルテゾミブを 1.6 mg/m^{2}で投与したとき，投与後 1 時間の PBMC におけるカテプシン G 及びプロテアソーム活性の低下率は，それぞれ 50 及び 70%程度と近接していた．

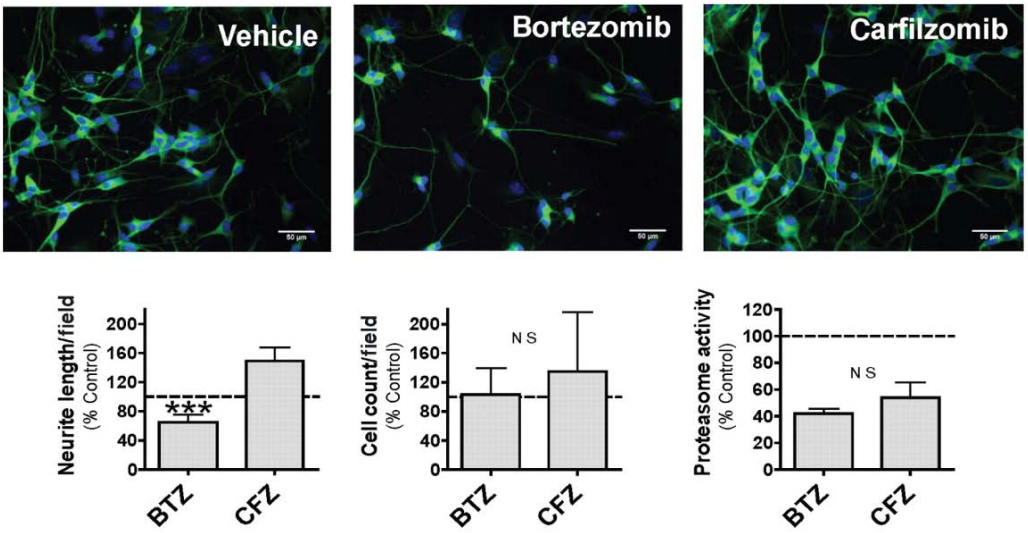


図 2.6.2.3.3-1　神経細胞に対する作用

2.6.2 薬理試験の概要文
カルフィルゾミブ

上図は化合物処置後 24 時間の神経細胞株の蛍光画像（倍率 20 倍）の代表例を示す．青：Hoechst（核），緑：βⅢチューブリン（細胞骨格）
下図は化合物処置後の神経細胞の神経突起の長さ，細胞数及びプロテアソームのキモトリプシン様活性を示す．神経突起の長さ及び細胞数は 20 視野/well の平均値を示す．
***p<0.05 vs. Control：一元配置分散分析と Bonferroni 型の事後解析
CFZ：カルフィルゾミブ，BTZ：ボルテゾミブ，NS：not significant

表 2.6.2.3.3-1　セリンプロテアーゼに対する作用

		IC_{50} (μmol/L)			
		Carfilzomib		Bortezomib	
Target	P1 selectivity	Purified enzyme	PBMC lysate[a]	Purified enzyme	PBMC lysate[a]
CatA	F, Y, V, E	>10	>10	2.5 (1.6–4.1)	0.0047 (0.0022–0.0098)
CatG	L, F, H, Y, N, I, V	>10	>10	0.95 (0.77–1.2)	0.3 (0.12–0.76)
Chymase	F, Y	>10	>10	0.28 (0.26–0.31)	0.0016 (0.00071–0.0036)
DPPII	P, A, R	>10	>10	8.7 (5.6–14)	0.26 (0.17–0.4)
HtrA2/Omi	L, V	>10	N/A	0.003 (0.001–0.009)	N/A
Proteasome (LMP7)	L, F	0.025 (0.015–0.041)	0.022 (0.016–0.030)	0.031 (0.021–0.047)	0.00099 (0.00063–0.0016)

カッコ内の数字は 95%信頼区間の値を示す．NA：not available（データなし）
Proteasome（LMP7）：免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性
a：PBMC lysate の IC_{50}値は，Proteasome（LMP7）を除き ABP 法により得られた値を用いて算出した．

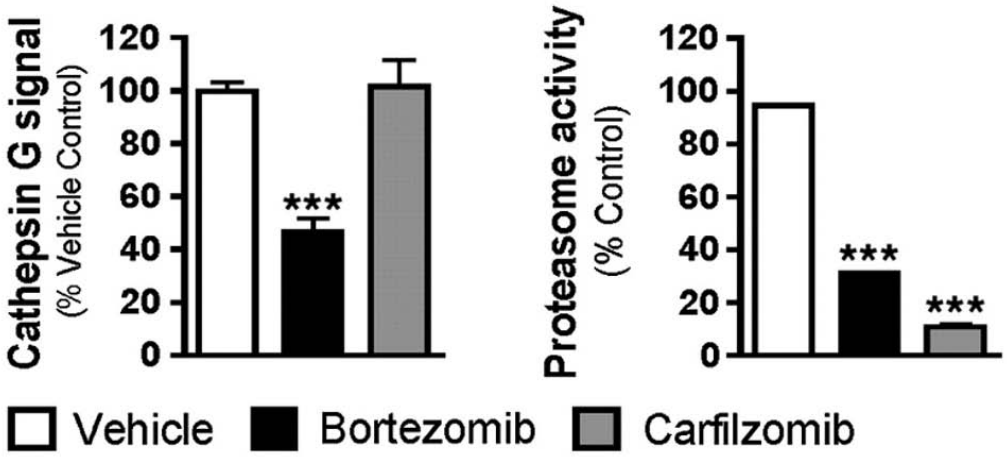


図 2.6.2.3.3-2　ラットに単回静脈内急速投与したときの赤血球除去脾細胞でのカテプシン G に対する作用
データは 3 例の平均値＋標準誤差で示す.
***p<0.05 vs. Control：一元配置分散分析と Bonferroni 型の事後解析

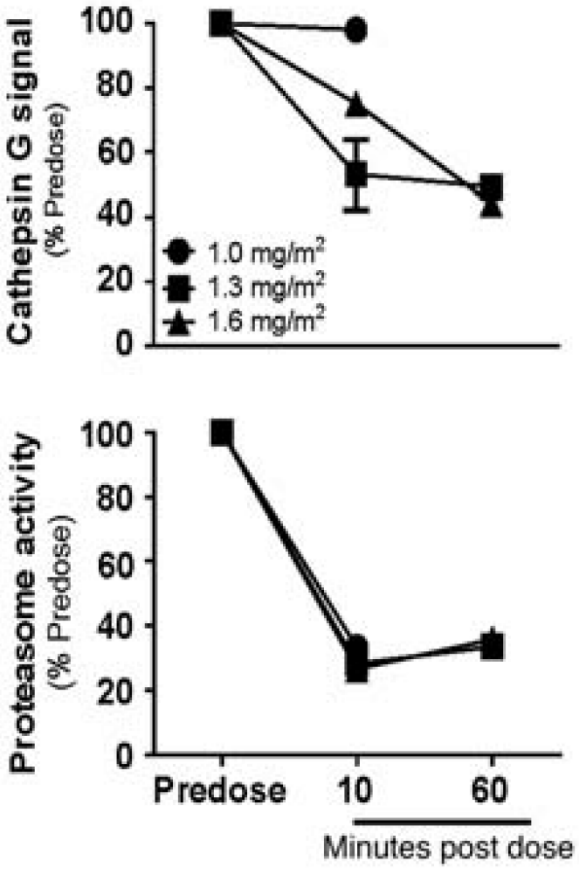


図 2.6.2.3.3-3　骨髄腫患者にボルテゾミブを投与したときの PBMC でのカテプシン G に対する作用
1.3 mg/m^{2}群の投与後 10 分の値は 2 例の平均値を，その他の値は各群 1 例の値を示す.

2.6.2.4 安全性薬理試験

カルフィルゾミブの安全性薬理試験として，サルへの単回静脈内投与により中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対する作用を評価した．中枢神経系に対する作用については，カルフィルゾミブのラット及びサルを用いた反復投与毒性試験の中で FOB 又は神経行動学的検査を実施し，反復投与後の中枢神経系に対する作用も評価した．心血管系に対する作用については，*in vitro* で hERG チャネル電流に対する作用も評価した．いずれの試験も GLP を遵守して実施した．

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1，4.2.3.2-4，4.2.3.2-5，4.2.3.2-7，4.2.3.2-8］

カニクイザル（雌雄各 2 例／群）に，対照群として媒体である 10 w/v% SBECD 含有 10 mmol/L クエン酸溶液（pH3.5）を単回静脈内急速投与し，その 48～72 時間後にカルフィルゾミブを 1，2 及び 3 mg/kg で単回静脈内急速投与した．投与前及び投与後 24 時間に神経行動学的検査（精神状態，筋緊張，筋運動，眼瞼位置，瞳孔の大きさ，眼球運動，流涙，流涎，姿勢，自発運動及び運動機能の評価）を実施した．なお，心室性期外収縮の発現頻度の上昇又は状態悪化により切迫剖検した 3 mg/kg の雄 2 例については，それぞれ剖検前の投与後 6 及び 21 時間に神経行動学的検査を実施した．また，血中のプロテアソーム活性（2.6.2.2.3.2）を測定した．

その結果，状態悪化した雄 1 例を除き，カルフィルゾミブは最高投与量である 3 mg/kg までいずれの検査項目にも影響しなかった．なお，状態悪化例では，自発運動減少及び覚醒度の低下，蒼白，ケージ壁への寄り掛り並びに円背が認められたが，これらは心筋の虚血及び傷害による循環不全に起因した変化（2.6.2.4.2.2）と考えられた．

サルの 1 カ月間及び 9 カ月間反復投与毒性試験［2.6.6.3.7，2.6.6.3.8］では，神経行動学的検査（精神状態，筋緊張，筋運動，眼瞼位置，瞳孔の大きさ，眼球運動，流涙，流涎，姿勢，自発運動及び運動機能の評価，1 カ月間反復投与毒性試験では歩行状態及びよじ登り行動も評価）を実施したが，いずれも最高投与量である 2 mg/kg まで中枢神経系に対する影響は認められなかった．また，ラットの 1 カ月間及び 6 カ月間反復投与毒性試験［2.6.6.3.4，2.6.6.3.5］では，FOB 法（ホームケージでの観察，ハンドリングでの観察，オープンフィールドでの観察，刺激反応性，握力，着地時開脚度及び体温）による観察を実施したが，それぞれ最高投与量である 6 及び 4 mg/kg まで中枢神経系に対する影響は認められなかった．

以上，カルフィルゾミブのサル及びラットの中枢神経系に対する無影響量は，それぞれ 3mg/kg（36 mg/m^2）及び 6 mg/kg（36 mg/m^2）と考えられた．

2.6.2.4.2 心血管系に対する作用

2.6.2.4.2.1 hERG チャネル電流に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-2］

hERG 遺伝子を導入した HEK293 細胞（3～4 標本／濃度）を用いて，カルフィルゾミブの hERG チャネル電流に対する作用を検討した．カルフィルゾミブは DMSO に溶解させた後 HEPES 緩衝液に添加し，0.7，1.5 及び 2.2 μmol/L の濃度で試験を実施した．

その結果，カルフィルゾミブは 0.7，1.5 及び 2.2 μmol/L の濃度で hERG チャネル電流をそれぞれ 6.9，12.7 及び 54.2%阻害し，IC_{50}値は 2.1 μmol/L（1500 ng/mL）であった．

2.6.2.4.2.2 サルの心血管系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1］

カニクイザル（雌雄各 2 例／群）に，対照群として媒体である 10 w/v% SBECD 含有 10 mmol/L クエン酸溶液（pH3.5）を単回静脈内急速投与し，その 48～72 時間後にカルフィルゾミブを 1，2 及び 3 mg/kg で単回静脈内急速投与した．テレメトリーシステムにより，投与前から投与後 24 時間までの血圧（収縮期，拡張期及び平均血圧），心拍数及び心電図（波形，PR，QRS，RR，QT 及び QTc 間隔）を測定した．また，投与後 24～25 時間に血清トロポニン T を測定した．なお，切迫剖検した 3 mg/kg の雄 2 例については，それぞれ剖検前の投与後 6 及び 22 時間に血清トロポニン T を測定した．

その結果，3 mg/kg の雄 1 例において，投与後 2～4 時間付近より顕著な血圧低下，心拍数増加並びに PR，QRS 及び QT 間隔の短縮が認められ，投与後 18 時間以降には ST 上昇及び T 波増高の心電図異常が認められた．本例では，自発運動減少，蒼白及び覚醒度の低下などの一般状態の悪化が認められたため，投与後 22 時間に切迫剖検した．剖検前のトロポニン T は高値を示し，剖検では気管支周囲の浮腫，胸水，心嚢液貯留，心外膜表面の粗面化及び不規則化並びに左室及び心室中隔の赤色化が認められたため，心筋の虚血及び傷害による循環不全が一般状態の悪化の原因と考えられた．また，同群の別の雄 1 例では，投与前から認められていた心室性期外収縮の発現頻度が投与後 2 時間より上昇し，血圧低下も認められたため，投与後 6 時間に人道的理由により切迫剖検した．剖検では気管支周囲の浮腫が認められた．3 mg/kg の雌の剖検では，心室の軟化，左心室心内膜への軟ゼラチン状／淡赤色塊の付着が認められた．一方，3 mg/kg の雌 2 例及び 2 mg/kg 以下の雌雄では，血圧，心拍数及び心電図に対する影響は認められなかった．

以上，カルフィルゾミブは 3 mg/kg で血圧を低下させ，ST 上昇及び T 波増高の虚血性の心電図変化や心室性期外収縮の発現頻度の上昇を示したことから，サルの心血管系に対する無影響量は 2 mg/kg（24 mg/m^2）と考えられた.

2.6.2.4.3 呼吸系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1］

カニクイザル（雌雄各 2 例／群）に，対照群として媒体である 10 w/v% SBECD 含有 10 mmol/L クエン酸溶液（pH3.5）を単回静脈内急速投与し，その 48～72 時間後にカルフィルゾミブを 1，2 及び 3 mg/kg で単回静脈内急速投与した．投与前及び投与後 6 時間に，呼吸数，1 回換気量及び分時換気量を測定した.

その結果，3 mg/kg で投与後 6 時間以降に心室性期外収縮の発現頻度の上昇又は状態悪化による切迫剖検例が雄 2 例に認められが，いずれの投与量においても呼吸パラメータに影響は認められず，カルフィルゾミブの呼吸系に対する無影響量は 3 mg/kg（36 mg/m^2）と考えられた.

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的相互作用試験は実施しなかった.

2.6.2.6 考察及び結論

カルフィルゾミブはヒト 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性を不可逆的に阻害し [1) 6)]，精製ヒト構成プロテアソーム及び免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する IC_{50}値は 10 nmol/L 未満であった．また，プロテアソームの他のサブユニットの活性（カスパーゼ様活性及びトリプシン様活性）に対して 300 倍以上の選択性を示した．一方，公知のプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブは，プロテアソームのキモトリプシン様活性をカルフィルゾミブと同程度に阻害したが，プロテアソームのカスパーゼ様活性も阻害した．カルフィルゾミブは公知のプロテアソーム阻害剤である epoxomicin と同じα，βエポキシケトン骨格を有し，不可逆的な阻害様式を示すことから，α，βエポキシケトンがプロテアソームの N-末端スレオニン残基のα-アミノ基及び側鎖γ位の酸素の両方と共有結合したモルホリノ付加体を形成すると考えられた [1) 6)]．一方，ボルテゾミブはボロン酸がプロテアソームの N-末端スレオニン残基のα-アミノ基の 水酸基と共有結合した可逆的なボロン酸誘導体を形成すると考えられた [7)]．したがって，カルフィルゾミブの阻害様式はボルテゾミブの阻害様式と異なった.

カルフィルゾミブは腫瘍細胞においてプロテアソームのキモトリプシン様活性を強力に阻害し，腫瘍細胞の細胞溶解液中での IC_{50}値は 10 nmol/L 未満であった[3)]．また，腫瘍細胞株をカルフィルゾミブを含む培地で 1 時間培養したとき，カルフィルゾミブはプロテアソームのキモトリプシン様活性を速やかに阻害し，続いてポリユビキチン化タンパクを蓄積させ，アポトーシスを誘導した[3) 8)]．

カルフィルゾミブは多発性骨髄腫細胞を含む各種の腫瘍細胞に対して細胞傷害作用を示した[1) 3) 8)]．各種の腫瘍細胞をカルフィルゾミブを含む培地で 72 時間培養したとき，カルフィルゾミブの細胞生存に対する IC_{50}値は 2.4～20 nmol/L となり，その細胞傷害作用はボルテゾミブと同程度であった．しかし，血液腫瘍細胞株及び固形腫瘍細胞株をカルフィルゾミブ又はボルテゾミブを含む培地で 1 時間培養し，その後化合物を含まない培地で 72 時間培養したとき，カルフィルゾミブの細胞傷害作用はボルテゾミブと比較してより強力であった．また，本条件においてカルフィルゾミブの細胞生存に対する IC_{50}値は，固形腫瘍細胞株及び正常細胞に比べて血液腫瘍細胞株で低濃度であり，血液腫瘍細胞株はカルフィルゾミブに対する感受性が高かった．更に，アポトーシス誘導に要する時間は，固形腫瘍細胞株に比べて血液腫瘍細胞株で短時間であった．カルフィルゾミブ及びボルテゾミブは，いずれも時間依存的な阻害作用を示し，また血漿中から速やかに消失することから薬物の短時間曝露試験などが有用と考え，血液及び固形腫瘍細胞株の感受性の差異に係る作用機序やプロテアソーム活性の阻害後に発生する事象について詳細検討した．その結果，腫瘍細胞に対するカルフィルゾミブ又はボルテゾミブの細胞傷害作用は，プロテアソーム活性の阻害の程度及び持続時間に依存することが明らかになり，臨床での効果発現にはプロテアソームの強力かつ持続的な阻害が必要と考えられた．

カルフィルゾミブは各種薬剤に耐性を有する細胞に対して細胞傷害作用を示した[3) 9)]．ヒト大腸がん細胞株 HT-29 に比較し，ボルテゾミブに対する耐性を獲得させた HT-29 PS 300 では，ボルテゾミブに対する感受性が 100 分の 1 未満に低下したが，カルフィルゾミブに対する感受性は 4 分の 1 に低下するに留まった．また，カルフィルゾミブはボルテゾミブ非奏効の多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞，ボルテゾミブの治療中に進行した多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞に対しても細胞傷害作用を示した．したがって，カルフィルゾミブはボルテゾミブに耐性となった患者及び他の抗がん剤に耐性になった患者において有効性を示す可能性があると考えられた．

上記の *in vitro* 試験の結果より，カルフィルゾミブはプロテアソーム活性を持続的に阻害することで最大の細胞傷害作用を示すことが想定されたため，最適の投与スケジュールについて検討した．ヒト大腸がん細胞株 HT-29 を移植した免疫不全マウス（HT-29 担がんモデル）において，カルフィルゾミブは，10 mg/kg を週 1 回投与したとき腫瘍の増大を抑制しなかっ

たが，標的細胞内のプロテアソーム活性をより持続的に阻害できるように 5 mg/kg を週 2 回連日投与（週の 1 及び 2 日目）したとき有意な抗腫瘍効果を示した[1)]．一方，ボルテゾミブは同じ投与スケジュールに忍容性がなく[10)]，臨床レジメンと同じ投与間隔の週 2 回間歇投与（週の 1 及び 4 日目）投与したとき腫瘍の増大を抑制しなかった．これらの *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果より，カルフィルゾミブはプロテアソーム活性を持続的に阻害する投与スケジュールにすることで，臨床でも強力な抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された．更に，カルフィルゾミブはヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S，ヒト非ホジキンリンパ腫細胞株 RL，ヒトバーキットリンパ腫 HS-Sultan など幅広い腫瘍細胞株の担がんモデルで，有意な抗腫瘍効果を示した[1) 11)]．すなわち，カルフィルゾミブは非臨床試験において多発性骨髄腫を含む血液腫瘍及び固形腫瘍に対して抗腫瘍効果を示したことから，幅広いがん腫に対する治療薬となる可能性があると考えられた．

マウス，ラット及びサルにおいて，カルフィルゾミブは脳を除く組織でプロテアソーム活性を阻害した．また，反復投与後の組織におけるプロテアソーム活性の回復は単回投与後と同様であった．なお，全血（主成分は脱核した赤血球）でのプロテアソーム活性の回復は他組織に比べ緩やかであった．これはカルフィルゾミブがプロテアソームを不可逆的に阻害し，プロテアソーム合成能がない赤血球においては，その回復性が赤血球の代謝回転に依存することに起因すると考えられた[12)]．カルフィルゾミブは同じ投与量を静脈内急速投与若しくは 30 分間静脈内持続投与したとき，プロテアソーム活性を同程度に阻害したことから，その薬力学は Cmax ではなく総投与量と相関することが示唆された[13)]．以上のことから，カルフィルゾミブはマウス，ラット及びサルの *in vivo* においてプロテアソームのキモトリプシン様活性を種差なく阻害した．また，カルフィルゾミブはヒトにおいてもプロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害した［2.7.3.4.5］．

プロテアソーム以外のプロテアーゼに対する阻害作用を検討した結果，カルフィルゾミブは，10 μmol/L で異なるプロテアーゼ（セリンプロテアーゼ，メタロプロテアーゼ，システインプロテアーゼ及びアスパラギン酸プロテアーゼ）類に対して明らかな阻害作用を示さなかった．一方，ボルテゾミブは 10 μmol/L でセリンプロテアーゼのカテプシン G，キマーゼ及びヒト膵臓キモトリプシンに対して 90%を超える阻害率を示した．また，67 種類の受容体／リガンド結合及び 16 種類の酵素に対する活性阻害を検討した結果，カルフィルゾミブは 10 μmol/L で NK_1及び NK_2受容体並びにナトリウムチャネル（Site 2）に対し阻害率 50%を超えるリガンド結合阻害を示し，少なくとも NK_2受容体に対する拮抗作用が示された（1 μmol/L で 41%阻害）．しかし，カルフィルゾミブは血中から速やかに消失することから，生体内で NK_2受容体に拮抗し，薬理作用を示すとは考え難い．したがって，カルフィルゾミブはプロテアソーム以外の標的に明らかな作用を示さないと考えられた．

カルフィルゾミブはセリン・システインプロテアーゼに対して有意な阻害を示さなかった．一方，ボルテゾミブは *in vitro* 試験において，カテプシン A，カテプシン G，DPPⅡ，キマーゼ及び HtrA2/Omi などを阻害した．特に神経細胞の生存促進性プロテアーゼである HtrA2/Omi[14) 15)] に対するボルテゾミブの阻害活性は強力であり，その IC_{50}値は 3 nmol/L であった．また，カルフィルゾミブを投与したラットの脾細胞のカテプシン G 活性は低下しなかったが，ボルテゾミブを投与したラットの脾細胞のカテプシン G 活性は低下した．神経細胞へ分化させたヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y において，カルフィルゾミブ及びボルテゾミブは，同程度のプロテアソーム活性の阻害作用を示したが，ボルテゾミブにのみ神経突起の退縮作用が認められた [15)]．以上，カルフィルゾミブはプロテアソームに高い選択性を有し，ボルテゾミブと異なり神経細胞突起への影響が認められなかった．この結果は，カルフィルゾミブが臨床において末梢神経障害の発現が低いことと関連すると考えられた．

安全性薬理試験では，カルフィルゾミブはサルにおいて最高投与量の 3 mg/kg を単回投与しても中枢神経系に対して影響しなかった．また，ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験の中で FOB 又は神経行動学的検査を実施したが，それぞれ最高投与量である 6 及び 2 mg/kg まで反復投与による中枢神経系への影響は認められなかった［2.6.6.3.4，2.6.6.3.5，2.6.6.3.7，2.6.6.3.8］．中枢神経系に対するカルフィルゾミブの無影響量はラット及びサルの概略の致死量である 8 及び 4 mg/kg［2.6.6.2.2，2.6.6.2.3］に近い投与量であったが，無影響量での曝露量はラットでは臨床の用法・用量における曝露量と同程度，サルでは臨床の用法・用量における曝露量未満であった（表 2.6.2.6-1）．カルフィルゾミブは全血のプロテアソーム活性を 80％以上阻害する用量において脳のプロテアソーム活性を阻害せず（2.6.2.2.3.2，表 2.6.2.2.3.2-1，表 2.6.2.2.3.2-2），中枢移行性は低いと考えられた［2.6.4.9］．

カルフィルゾミブはサルにおいて最高投与量の 3 mg/kg を単回投与しても呼吸系に対して影響しなかった．本投与量はサルの概略の致死量である 4 mg/kg［2.6.6.2.3］に近い投与量であったが，カルフィルゾミブの曝露量は臨床の用法・用量における曝露量未満であった（表 2.6.2.6-1）．カルフィルゾミブは本投与量で全血のプロテアソーム活性を 80％以上阻害することから（2.6.2.2.3.2，表 2.6.2.2.3.2-2），カルフィルゾミブによるプロテアソーム活性の阻害は，呼吸系に影響しないと考えられた．

心血管系に対してカルフィルゾミブは hERG チャネル電流を阻害し，その IC_{50}値は 2.1 μmol/L（1500 ng/mL）であった（2.6.2.4.2.1）．本薬の臨床試験の用法・用量（最大 27 mg/m^2 を 10 分間かけて静脈内持続投与）における血漿中濃度（Cmax：2300 ng/mL，表 2.6.2.6-1）は，タンパク非結合型濃度（*in vitro* ヒト血漿タンパク結合率：約 97％）に換算すると，hERG 阻害の IC_{50}値に対して 22 倍の乖離があり，臨床では hERG 阻害を介した心血管系への影響は生じないと考えられた．一方，サルにおいて，カルフィルゾミブは 3 mg/kg の単回

投与により血圧低下並びに ST 上昇及び T 波増高の虚血性の心電図変化や心室性期外収縮の発現頻度の上昇を示した．心臓は本薬の毒性標的器官の一つであり，サルを用いた反復投与毒性試験では 2 日間投与により 2 mg/kg で心筋の変性［2.6.6.3.6］，1 カ月間投与により 2 mg/kg で心筋の炎症，出血，壊死及び浮腫［2.6.6.3.7］，9 カ月間投与により 0.5 mg/kg 以上で心臓の炎症細胞浸潤や心筋の変性［2.6.6.3.8］などの病理組織学的変化が認められており，剖検では心臓の赤色化なども認められた．安全性薬理試験においても，血圧低下及び虚血性の心電図変化を示したサルで心臓の赤色化が認められた．したがって，カルフィルゾミブの心血管系への影響は心筋毒性に起因して発現した可能性が考えられた．ユビキチンープロテアソーム系は心臓でタンパク質の恒常性に重要な役割を果たしており [16]，公知のプロテアソーム阻害剤（ボルテゾミブ，MG132，epoxomycin 及び carbobenzoxyl-lle-Glu-(O-t-butyl)-Ala-Leucinal）は，腫瘍細胞に細胞毒性を示す濃度範囲で培養ラット心筋芽細胞株に対しても細胞毒性を示すことが報告されている [17]．また，ボルテゾミブでもサルにおいて心筋の変性，出血及び炎症や血圧低下が報告されていることから [10]，カルフィルゾミブの心筋毒性及び心血管系への影響はプロテアソーム活性の阻害に基づいて発現すると考えられた．一方，投与後 2 時間に心室性期外収縮の発現頻度の上昇を示したサルでは心臓に肉眼的所見は認められなかったが，心筋の炎症が心室性期外収縮の発現頻度を上昇させることもあり，カルフィルゾミブの影響が疑われた．以上，カルフィルゾミブは心筋への影響に基づくと考えられる血圧低下や虚血性の心電図変化などの心機能障害を示した．サルの心血管系への無影響量でのカルフィルゾミブの曝露量は臨床の用法・用量における曝露量に比べて小さく，安全域は認められなかった（表 2.6.2.6-1）．

表 2.6.2.6-1　ラット及びサルの無影響量及び臨床の用法・用量でのカルフィルゾミブの曝露量の比較

動物種	投与量	性	Cmax 又は C0 （ng/mL）	AUClast （ng･min/mL）
ヒト	20/27 mg/m^2	-	2300[d]	26160[d]
サル	2 mg/kg[a] （24 mg/m^2）	雄 雌	202[e] 151[e]	1934[e] 1692[e]
	3 mg/kg[bc] （36 mg/m^2）	雄 雌	303[f] 227[f]	2901[f] 2538[f]
ラット	6 mg/kg[b] （36 mg/m^2）	雄 雌	4536[g] 4373[g]	22092[g] 20399[g]

a：心血管系に対する無影響量
b：中枢神経系に対する無影響量
c：呼吸系に対する無影響量
d：日本人の再発又は難治性の多発性骨髄腫患者にカルフィルゾミブを 20/27 mg/m^{2}で 10 分間かけて静脈内持続投与したときの第 1 サイクル 16 日目（27 mg/m^2）のカルフィルゾミブの Cmax 及び AUClast［2.7.2.2.2.1］
e：サルの 9 カ月間反復投与毒性試験における 2 mg/kg の初回投与時の C0 及び AUClast［2.6.7.7E］
f：サルの 2 mg/kg から推定した値（2 mg/kg の値を 1.5 倍）
g：ラットの 6 カ月間反復投与毒性試験における 4 mg/kg の初回投与時の C0 及び AUClast［2.6.7.7B］から推定した値（4 mg/kg の値を 1.5 倍）

カルフィルゾミブは構成及び免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害することにより *in vitro* 及び *in vivo* で抗腫瘍作用を誘導する強力なプロテアソーム阻害剤である．カルフィルゾミブはプロテアソーム以外の標的に対してほとんど作用を示さず，ボルテゾミブよりも細胞傷害（神経細胞を含む）の選択性に優れている．安全性薬理試験において，カルフィルゾミブは中枢神経系及び呼吸系に対して影響しなかったが，本薬の心筋への影響に基づくと考えられる血圧低下や虚血性の心電図変化などの心機能障害を示したことから，カルフィルゾミブの臨床使用に際しては，心機能に対する注意が必要であると考えられる．

以上，これまでに得られている非臨床試験成績から，カルフィルゾミブはがん細胞内のプロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害することで，がん細胞にアポトーシスを誘導し，多発性骨髄腫を含む各種がんに対して有効な治療薬となる可能性が考えられた．

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した.

2.6.2.8 参考文献

1） Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, Buchholz TJ, Dajee M, Ho MN. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. Cancer Res. 2007;67:6383-91.

2） Chauhan D, Catley L, Li G, Podar K, Hideshima T, Velankar M, et al. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. Cancer Cell. 2005;8:407-19.

3） Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. Blood. 2007;10:3281-90.

4） Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, Parlati F, Shenk KD, Lee SJ, et al. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. Clin Cancer Res. 2011;17:2734-43.

5） Liu Y, Patricelli MP, Cravatt BF. Activity-based protein profiling: the serine hydrolases. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:14694-9.

6） Bennett MK, Kirk CJ. Development of proteasome inhibitors in oncology and autoimmune diseases. Curr Opin Drug Discov Devel. 2008;11:616-25.

7） Groll M, Berkers CR, Ploegh HL, Ovaa H. Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. Structure. 2006;14(3):451-6.

8） Parlati F, Lee SJ, Aujay M, Suzuki E, Levitsky K, Lorens JB, et al. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. Blood. 2009;114(16):3439-47.

9） Suzuki E, Demo S, Deu E, Keats J, Arastu-Kapur S, Bergsagel PL, et al. Molecular mechanisms of bortezomib resistant adenocarcinoma cells. PLoS One. 2011 Dec 22;6(12):e27996.

10） Bross PF, Kane R, Farrell AT, Abraham S, Benson K, Brower ME, et al. Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2004;10:3954-64.

11） Chauhan D, Singh AV, Aujay M, Kirk CJ, Bandi M, Ciccarelli B, et al. A novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma. Blood. 2010;116(23):4906-15.

12） Meiners S, Heyken D, Weller A, Ludwig A, Stangl K, Kloetzel PM, et al. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. J Biol Chem. 2003;278(24):21517-25.

13） Yang J, Wang Z, Fang Y, Jiang J, Zhao F, Wong H, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, metabolism, distribution, and excretion of carfilzomib in rats. Drug Metab Dispos. 2011;39:1873-82.

14） Chao JR, Parganas E, Boyd K, Hong CY, Opferman JT, Ihle JN. Hax1-mediated processing of HtrA2 by Parl allows survival of lymphocytes and neurons. Nature. 2008;452:98-102.

15） Martins LM, Morrison A, Klupsch K, Fedele V, Moisoi N, Teismann P, et al. Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. Mol Cell Biol. 2004;24:9848-62.

16） Pagan J, Seto T, Pagano M, Cittadini A. Role of the ubiquitin proteasome system in the heart. Circ Res. 2013;112:1046-58.

17） Nowis D, Maczewski M, Mackiewicz U, Kujawa M, Ratajska A, Wieckowski MR, et al. Cardiotoxicity of the anticancer therapeutic agent bortezomib. Am J Pathol. 2010;176:2658-68.

2.6.3 薬理試験の概要表

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.3 薬理試験の概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 11
2.6.3.3 副次的薬理試験 27
2.6.3.4 安全性薬理試験 29
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 31

2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：カルフィルゾミブ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
精製ヒト構成プロテアソーム及び免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する阻害作用	精製ヒトプロテアソーム	*In vitro*	[redacted]	[redacted]18127	［4.2.1.1-1］
プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用	精製ヒトプロテアソーム	*In vitro*	Proteolix, Inc.	TR-0004-171	［4.2.1.1-2］（参考資料）
プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する各種プロテアソーム阻害剤の作用	精製ヒトプロテアソーム， ヒト大腸がん細胞株 HT-29 細胞溶解液	*In vitro*	Proteolix, Inc.	Demo et al. 2007	［4.2.1.1-3］（参考資料）
細胞溶解液中のプロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用	ヒト多発性骨髄腫細胞株 ANBL-6 細胞溶解液	*In vitro*	University of North Carolina 他 [1)]	Kuhn et al. 2007	［4.2.1.1-4］（参考資料）
腫瘍細胞中のプロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用	ヒト大腸がん細胞株 HT-29， ヒト多発性骨髄腫細胞株 ANBL-6	*In vitro*	Proteolix, Inc. University of North Carolina 他 [1)]	Demo et al. 2007 Kuhn et al. 2007	［4.2.1.1-3］（参考資料） ［4.2.1.1-4］（参考資料）

1）University of North Carolina，Proteolix, Inc.，The Netherlands Cancer Institute，Roswell Park Cancer Institute

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
腫瘍細胞中のプロテアソームのキモトリプシン様活性の回復性	ヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226, ヒト大腸がん細胞株 HT-29	*In vitro*	Proteolix, Inc.	Demo et al. 2007	［4.2.1.1-3］ （参考資料）
腫瘍細胞株における細胞死誘導機序	ヒト大腸がん細胞株 HT-29, ヒト急性リンパ性白血病細胞株 Molt4, ヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226,	*In vitro*	University of North Carolina 他 [1)] Onyx Pharmaceuticals, Inc.	Kuhn et al. 2007 TR-0031-171	［4.2.1.1-4］ （参考資料） ［4.2.1.1-5］ （参考資料）
多発性骨髄腫細胞株に対する細胞傷害作用	ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S	*In vitro*	[redacted]	[redacted]0521	［4.2.1.1-6］
各種細胞に対する細胞傷害作用	ヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226, ヒトバーキットリンパ腫細胞株 HS-Sultan, ヒト急性リンパ性白血病細胞株 Molt4, ヒト非ホジキンリンパ腫細胞株 RL, ヒト大腸がん細胞株 HT-29, ヒト膵臓がん細胞株 MiaPaCa-2, ヒト非小細胞肺がん細胞株 A549, ヒト正常皮膚線維芽細胞 NHDF, ヒト正常臍帯静脈内皮細胞 HUVEC	*In vitro*	Proteolix, Inc.	Demo et al. 2007	［4.2.1.1-3］ （参考資料）

1）University of North Carolina，Proteolix, Inc.，The Netherlands Cancer Institute，Roswell Park Cancer Institute

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
ボルテゾミブ耐性細胞株に対する細胞傷害作用	ヒト大腸がん細胞株 HT-29, ボルテゾミブ耐性ヒト大腸がん細胞株 HT-29 PS 100, ボルテゾミブ耐性ヒト大腸がん細胞株 HT-29 PS 200, ボルテゾミブ耐性ヒト大腸がん細胞株 HT-29 PS 300	*In vitro*	Onyx Pharmaceuticals, Inc.	TR-0032-171	［4.2.1.1-7］ （参考資料）
薬剤耐性細胞に対する細胞傷害作用	ボルテゾミブ非奏効あるいはボルテゾミブによる治療中に進行した多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞, ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM1.S, デキサメタゾン耐性ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM1.R, ヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226.wt, メルファラン耐性ヒト骨髄腫細胞株 8226.LR5, ドキソルビシン耐性ヒト骨髄腫細胞株 8226.Dox40	*In vitro*	University of North Carolina 他 [1)]	Kuhn et al. 2007	［4.2.1.1-4］ （参考資料）
ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S 皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果	細胞株；ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S モデル；マウス皮下移植	静脈内急速	[redacted]	[redacted]0524	［4.2.1.1-8］
ヒト大腸がん細胞株 HT-29 皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果	細胞株；ヒト大腸がん細胞株 HT-29 モデル；マウス皮下移植	静脈内急速	[redacted]	TR-0037-171	［4.2.1.1-9］ （参考資料）

1）University of North Carolina，Proteolix, Inc.，The Netherlands Cancer Institute，Roswell Park Cancer Institute

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
各種腫瘍細胞株の皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果	細胞株；ヒト大腸がん細胞株 HT-29 細胞株；ヒト非ホジキンリンパ腫細胞株 RL 細胞株；ヒトバーキットリンパ腫細胞株 HS-Sultan モデル；マウス皮下移植	静脈内急速	Proteolix, Inc.	Demo et al. 2007	［4.2.1.1-3］ （参考資料）
マウスの血中及び組織中のプロテアソーム活性に対する阻害作用	マウス	静脈内急速	Proteolix, Inc.	Demo et al. 2007	［4.2.1.1-3］ （参考資料）
ラットに単回静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット	静脈内急速	Proteolix, Inc. [redacted]	Demo et al. 2007 TR-0006-171 TR-0009-171 TR-0010-171	［4.2.1.1-3］ （参考資料） ［4.2.1.1-10］ （参考資料） ［4.2.1.1-11］ （参考資料） ［4.2.1.1-12］ （参考資料）
ラットに単回又は 2 日間連日静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット	静脈内急速	[redacted]	TR-0027-171	［4.2.1.1-13］ （参考資料）

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
ラットに単回又は 5 日間連日静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット	静脈内急速	[redacted]	TR-0021-171	［4.2.1.1-14］（参考資料）
ラットに 5 日間連日静脈内急速投与又は週 2 回（週の 1 及び 4 日目）静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性	ラット	静脈内急速	[redacted]	TR-0020-171	［4.2.1.1-15］（参考資料）
ラットに 1 カ月間反復静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット	静脈内急速	[redacted]	TR-0015-171	［4.2.1.1-16］（参考資料）
ラットに 6 カ月間反復静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性	ラット	静脈内急速	[redacted]	TR-0072-171	［4.2.1.1-17］（参考資料）
ラットに単回静脈内急速又は持続投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット	静脈内急速，静脈内持続	Proteolix, Inc.	TR-0089-171	［4.2.1.1-18］（参考資料）
ラットに単回静脈内急速又は持続投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット	静脈内急速，静脈内持続	Onyx Pharmaceuticals, Inc.	TR-0356-171	［4.2.1.1-19］（参考資料）

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
サルに単回静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性	カニクイザル	静脈内急速	[redacted]	TR-0024-171 TR-0157-171	［4.2.1.1-20］（参考資料） ［4.2.1.1-21］（参考資料）
サルに単回静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	カニクイザル	静脈内急速	[redacted]	TR-0046-171-PD	［4.2.1.1-22］（参考資料）
サルに単回又は 5 日間連日静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	カニクイザル	静脈内急速	[redacted]	TR-0011-171	［4.2.1.1-23］（参考資料）
サルに 1 カ月間反復静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	カニクイザル	静脈内急速	[redacted]	TR-0018-171	［4.2.1.1-24］（参考資料）
サルに 9 カ月間反復静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性	カニクイザル	静脈内急速	[redacted]	TR-0073-171	［4.2.1.1-25］（参考資料）

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
副次的薬理試験					
プロテアソーム以外の各種プロテアーゼに対する作用	21 種類のプロテアーゼ	*In vitro*	[redacted]	TR-0002-171	［4.2.1.2-1］（参考資料）
各種受容体及び酵素に対する作用	16 種類の酵素及び 67 種類の受容体／リガンド	*In vitro*		TR-0003-171	［4.2.1.2-2］（参考資料）
神経細胞及びセリンプロテアーゼに対する作用	ヒト神経芽細胞腫細胞株 SH-SY5Y, ヒト末梢血単核球, ラット	*In vitro* 静脈内急速	Onyx 他 [2)]	Arastu-Kapur et al. 2011	［4.2.1.2-3］（参考資料）

2）Onyx Pharmaceuticals, Inc.， Millipore Corporation， Kantonsspital, St. Gallen

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

安全性薬理試験					
中枢神経系に及ぼす影響	ラット [3)]	静脈内急速	[redacted]	TR-0014-171	［4.2.3.2-4］
	ラット [4)]	静脈内急速	[redacted]	TR-0072-171	［4.2.3.2-5］
	カニクイザル [5)]	静脈内急速	[redacted]	TR-0023-171	［4.2.1.3-1］
	カニクイザル [3)]	静脈内急速	[redacted]	TR-0017-171	［4.2.3.2-7］
	カニクイザル [4)]	静脈内急速	[redacted]	TR-0073-171	［4.2.3.2-8］
心血管系に及ぼす影響	HEK293 細胞 [6)]	*In vitro*	[redacted]	TR-0088-171	［4.2.1.3-2］
	カニクイザル [5)]	静脈内急速	[redacted]	TR-0023-171	［4.2.1.3-1］
呼吸系に及ぼす影響	カニクイザル [5)]	静脈内急速	[redacted]	TR-0023-171	［4.2.1.3-1］

3）GLP 適用試験（TK，PD，CYP 含量及び CYP 活性測定は GLP 不適）
4）GLP 適用試験（獣医神経病理学者による末梢神経の病理組織学的レビュー，PD，CYP 活性及び CYPmRNA 発現量測定，PK パラメータ算出並びに代謝物検索は GLP 不適）
5）GLP 適用試験（PD 測定は GLP 不適）
6）GLP 適用試験（投与液の濃度測定及び均一性は GLP 不適，被験物質及び投与液の安定性確認は未実施）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
精製ヒト構成プロテアソーム及び免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する阻害作用	精製ヒトプロテアソーム	*In vitro*	0.1～ 100 nmol/L	カルフィルゾミブは，精製ヒト構成プロテアソーム及び精製ヒト免疫プロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害し，その IC_{50} 値はそれぞれ 2.08 及び 5.89 nmol/L であった.	[redacted]18127	［4.2.1.1-1］

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用	精製ヒトプロテアソーム	*In vitro*	1.5 nmol/L～20 μmol/L	カルフィルゾミブは，精製ヒト20S プロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害し，その IC_{50}値は 4.4 nmol/L であった．また，プロテアソームの他の活性（カスパーゼ様及びトリプシン様活性）に対する IC_{50}値は 1 μmol/L 以上であり，キモトリプシン様活性に対する IC_{50}値に比べ 300 倍以上乖離していた．一方，ボルテゾミブでは，プロテアソームのキモトリプシン様活性に対する IC_{50}値は 3.9 nmol/L，カスパーゼ様活性に対する IC_{50}値は 75 nmol/L，トリプシン様活性に対する IC_{50}値は 1 μmol/L 以上であった．なお，カルフィルゾミブ及びボルテゾミブのプロテアソームのキモトリプシン様活性に対する阻害作用は共に時間依存的であり，kinact/Ki 値は 30000 $(mol/L)^{-1}s^{-1}$を超えた．	TR-0004-171	［4.2.1.1-2］（参考資料）

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
プロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する各種プロテアソーム阻害剤の作用	精製ヒトプロテアソーム， ヒト大腸がん細胞株 HT-29 細胞溶解液	*In vitro*	1 nmol/L～ 10 μmol/L	カルフィルゾミブは，精製ヒト 20S プロテアソーム及び精製ヒト 20S 免疫プロテアソーム並びにヒト大腸がん細胞株 HT-29 の細胞溶解液のキモトリプシン様活性を選択的に阻害し，その IC_{50} 値はそれぞれ 6，33 及び 4 nmol/L であった．一方，ボルテゾミブは，キモトリプシン様活性に加え，カスパーゼ様活性も阻害した．また，*Clasto*-lactacystin β-lactone は，キモトリプシン様活性に選択的であったが，IC_{50} 値はカルフィルゾミブに比べ 10 倍程度高かった．Salinosporamide A は，プロテアソームのすべての活性を阻害した．	Demo et al. 2007	［4.2.1.1-3］ （参考資料）
細胞溶解液中のプロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用	ヒト多発性骨髄腫細胞株 ANBL-6 細胞溶解液	*In vitro*	0.1 nmol/L～ 250 nmol/L	カルフィルゾミブは，10 nmol/L 以上の濃度でプロテアソームのキモトリプシン様活性を 80%以上阻害した．一方，カルフィルゾミブは 100 nmol/L で，プロテアソームのカスパーゼ様及びトリプシン様活性を 30%以上阻害しなかった．	Kuhn et al. 2007	［4.2.1.1-4］ （参考資料）

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
腫瘍細胞中のプロテアソームのキモトリプシン様，カスパーゼ様及びトリプシン様活性に対する阻害作用	ヒト大腸がん細胞株 HT-29， ヒト多発性骨髄腫細胞株 ANBL-6	*In vitro*	0.01 nmol/L ～ 10 μ mol/L	カルフィルゾミブは HT-29 細胞中のプロテアソーム活性を用量依存的に阻害し，キモトリプシン様活性に対する阻害活性が最も高かった．一方，ボルテゾミブはカルフィルゾミブと同様に HT-29 細胞中のプロテアソーム活性を用量依存的に阻害したが，キモトリプシン様活性及びカスパーゼ様活性を同程度に阻害した．また，カルフィルゾミブは ANBL-6 細胞中の構成プロテアソーム及び免疫プロテアソームの各サブユニットの活性部位に用量依存的に結合し，キモトリプシン様活性部位（β5 及びβ5i）に対する選択性が高かった．	Demo et al. 2007 Kuhn et al. 2007	［4.2.1.1-3］ （参考資料） ［4.2.1.1-4］ （参考資料）
腫瘍細胞中のプロテアソームのキモトリプシン様活性の回復性	ヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226， ヒト大腸がん細胞株 HT-29	*In vitro*	32 nmol/L	カルフィルゾミブ及びボルテゾミブを除去することで，腫瘍細胞中のプロテアソームのキモトリプシン様活性は，経時的に回復した．	Demo et al. 2007	［4.2.1.1-3］ （参考資料）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
腫瘍細胞株における細胞死誘導機序	ヒト大腸がん細胞株 HT-29, ヒト急性リンパ性白血病細胞株 Molt4, ヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226,	*In vitro*	100，500 nmol/L	カルフィルゾミブは，各種腫瘍細胞において，ポリユビキチン化タンパクを蓄積させ，アポトーシスを誘導した.	Kuhn et al. 2007 TR-0031-171	［4.2.1.1-4］（参考資料） ［4.2.1.1-5］（参考資料）
多発性骨髄腫細胞株に対する細胞傷害作用	ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S	*In vitro*	1～100 nmol/L	カルフィルゾミブを 1 又は 24 時間処置した際の細胞生存に対する IC_{50} 値はそれぞれ 35.7 及び 5.9 nmol/L であった.	[redacted]0521	［4.2.1.1-6］

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
各種細胞に対する細胞傷害作用	ヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226, ヒトバーキットリンパ腫細胞株 HS-Sultan, ヒト急性リンパ性白血病細胞株 Molt4, ヒト非ホジキンリンパ腫細胞株 RL, ヒト大腸がん細胞株 HT-29, ヒト膵臓がん細胞株 MiaPaCa-2, ヒト非小細胞肺がん細胞株 A549, ヒト正常皮膚線維芽細胞 NHDF, ヒト正常臍帯静脈内皮細胞 HUVEC	*In vitro*	1 nmol/L～10 μmol/L	カルフィルゾミブを 72 時間持続処置したとき，各種がん細胞の細胞生存に対する IC_{50} 値は 2.4～20 nmol/L であり，その細胞傷害作用はボルテゾミブと同程度であった．一方，1 時間処置では，カルフィルゾミブがボルテゾミブに比べより強力な細胞傷害作用を示した．また同条件での，カルフィルゾミブの細胞生存に対する IC_{50} 値は，固形腫瘍細胞株及び正常細胞に比べ血液腫瘍細胞株で低値であり，血液腫瘍細胞株はカルフィルゾミブに対する感受性が高かった．	Demo et al. 2007	［4.2.1.1-3］ （参考資料）

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
ボルテゾミブ耐性細胞株に対する細胞傷害作用	ヒト大腸がん細胞株 HT-29，ボルテゾミブ耐性ヒト大腸がん細胞株 HT-29 PS 100，HT-29 PS 200 及び PS 300	*In vitro*	2 nmol/L～2 μmol/L	ボルテゾミブ耐性細胞株に対して，カルフィルゾミブは細胞傷害作用を示した.	TR-0032-171	［4.2.1.1-7］（参考資料）

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
薬剤耐性細胞に対する細胞傷害作用	ボルテゾミブ非奏効あるいはボルテゾミブによる治療中に進行した多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞， ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM1.S， デキサメタゾン耐性ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM1.R， ヒト骨髄腫細胞株 RPMI-8226.wt， メルファラン耐性ヒト骨髄腫細胞株 8226.LR5， ドキソルビシン耐性ヒト骨髄腫細胞株 8226.Dox40	*In vitro*	1 nmol/L～10 μ mol/L	カルフィルゾミブは，ボルテゾミブ非奏効の多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞，ボルテゾミブの治療中に進行した多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞に対して細胞傷害作用を示した．また，カルフィルゾミブは，ボルテゾミブの治療中に進行した多発性骨髄腫患者由来の CD138 陽性細胞に対してボルテゾミブよりも強い細胞傷害作用を示した．更に，カルフィルゾミブは，MM1.S，MM1.R，RPMI-8226.wt，8226.LR5 に対しても細胞傷害作用を示した．一方，カルフィルゾミブは 8226.Dox40 に対して細胞傷害作用を示さなかった．なお，P-gp 阻害剤であるベラパミルを 8226.Dox40 に前処置することで，カルフィルゾミブは 8226.Dox40 に対して細胞傷害作用を示した．	Kuhn et al. 2007	［4.2.1.1-4］ （参考資料）

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
ヒト多発性骨髄腫細胞株 MM.1S 皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果	マウス／Crl:NIH-*Lyst*^{bg} *Foxn1*^{nu} *Btk*^{xid}（雌 15 例／群）	静脈内急速	3，5 mg/kg［週 2 回（週の 1 及び 2 日目），5 週間］	カルフィルゾミブは，MM.1S 担がんマウスの一般状態及び体重推移に重篤な影響を及ぼすことなく，有意な抗腫瘍効果を示した.	[redacted]0524	［4.2.1.1-8］
ヒト大腸がん細胞株 HT-29 皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果	マウス／NIH III（BNX）（雌 6 例／群）	静脈内急速	5 mg/kg［週 2 回（週の 1 及び 2 日目），4 週間］ 5 mg/kg［週 2 回（週の 1 及び 4 日目），4 週間］ 10 mg/kg（週 1 回，4 週間） 【ボルテゾミブ 1 mg/kg［週 2 回（週の 1 及び 4 日目），4 週間］】	カルフィルゾミブ及びボルテゾミブは，一般状態及び体重推移に重篤な影響を及ぼすことなく，忍容性は良好であった．カルフィルゾミブは，5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目），又は 10 mg/kg で週 1 回静脈内急速投与したとき，腫瘍の増大を抑制しなかったが，5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 2 日目）静脈内急速投与したときは，有意な抗腫瘍効果を示した．また，ボルテゾミブは，1 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目）静脈内急速投与したとき，腫瘍の増大を抑制しなかった.	TR-0037-171	［4.2.1.1-9］（参考資料）

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
各種腫瘍細胞株の皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果	マウス／NIH III（BNX）（雌 7 例／群）	静脈内急速	3，5 mg/kg［週 2 回（週の 1 及び 2 日目），2 又は 3 週間） 3，5 mg/kg［週 2 回（週の 1 及び 4 日目），2 又は 3 週間］ 10 mg/kg（週 1 回，2 又は 3 週間） 【ボルテゾミブ 1 mg/kg［週 2 回（週の 1 及び 4 日目），2 又は 3 週間］】	カルフィルゾミブは，5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 2 日目）静脈内急速投与したとき，いずれの担がんモデルにおいても腫瘍の増大を抑制した．一方，ボルテゾミブは，1 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目）静脈内急速投与したとき，いずれの担がんモデルにおいても腫瘍の増大を抑制しなかった．なお，HT-29 を移植した担がんモデルにおいて，カルフィルゾミブは，5 mg/kg で週 2 回（週の 1 及び 4 日目），又は 10 mg/kg で腫瘍の増大を抑制しなかった．	Demo et al. 2007	［4.2.1.1-3］（参考資料）

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
マウスの血中及び組織中のプロテアソーム活性に対する阻害作用	マウス／BALB/c（雌 3 例／群）	静脈内急速	5 mg/kg（単回投与） ［ボルテゾミブ 1 mg/kg（単回投与）］	カルフィルゾミブは，血中のプロテアソームのキモトリプシン様活性，カスパーゼ様活性及びトリプシン様活性のうち，キモトリプシン様活性を選択的に阻害した．一方，ボルテゾミブは，キモトリプシン様活性に加えてカスパーゼ様活性も阻害した．また，カルフィルゾミブ及びボルテゾミブは，各組織中のプロテアソームのキモトリプシン様活性を投与後 1 時間において阻害した．更に，カルフィルゾミブは，全血のプロテアソーム活性を投与後 72 時間まで持続的に阻害したが，ボルテゾミブは投与後 72 時間までに阻害作用が回復した．	Demo et al. 2007	［4.2.1.1-3］（参考資料）

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
ラットに単回静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット／SD（雄 2～6 例／群）	静脈内急速	0.1，0.25，0.5，1，1.5，2，3，4，4.5，5，7，9，10，15，25 mg/kg（単回投与）	カルフィルゾミブは，投与後 1 時間において，血中及び組織中のプロテアソーム活性を用量依存的に阻害したが，脳のプロテアソーム活性を阻害しなかった．全血（主成分は脱核した赤血球）では，プロテアソーム活性の回復は他組織に比べ緩やかであった．	Demo et al. 2007 TR-0006-171 TR-0009-171 TR-0010-171	［4.2.1.1-3］（参考資料） ［4.2.1.1-10］（参考資料） ［4.2.1.1-11］（参考資料） ［4.2.1.1-12］（参考資料）
ラットに単回又は 2 日間連日静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット／SD（雄 3 例／群）	静脈内急速	2 mg/kg（単回投与）（2 日間連日投与）	カルフィルゾミブを単回又は 2 日間連日投与したとき，投与後のプロテアソーム活性の回復性は類似していた．	TR-0027-171	［4.2.1.1-13］（参考資料）
ラットに単回又は 5 日間連日静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット／SD（雄 2～3 例／群）	静脈内急速	0.1，0.25，0.5，1，2，4 mg/kg（単回投与） 0.1，0.25，0.5，1，2 mg/kg（5 日間連日投与）	カルフィルゾミブの連日投与により，全血，肺及び心臓では阻害曲線が低用量側に移行した．全血では投与後 9 日においてプロテアソーム活性がほとんど回復しなかったが，全血以外の組織では活性が回復した．	TR-0021-171	［4.2.1.1-14］（参考資料）

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
ラットに5日間連日静脈内急速投与又は週2回（週の1及び4日目）静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性	ラット／SD（雄4例／群）	静脈内急速	1，2，4.5 mg/kg（5日間連日投与，7日間休薬） 2，4.5，9 mg/kg［週2回（週の1及び4日目），2週間］	カルフィルゾミブは，5日間連日静脈内投与又は週2回静脈内投与のいずれの投与方法においても，投与5日の全血のプロテアソーム活性を完全に阻害した.	TR-0020-171	［4.2.1.1-15］（参考資料）
ラットに1カ月間反復静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット／SD（雌雄各4例／群）	静脈内急速	0.5，1，2，4，6 mg/kg（5日間連日投与後，9日間休薬し，更に5日間連日投与）	カルフィルゾミブは，最終投与後1時間において，血中及び組織中のプロテアソーム活性を阻害したが，脳のプロテアソーム活性を阻害しなかった.	TR-0015-171	［4.2.1.1-16］（参考資料）
ラットに6カ月間反復静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性	ラット／SD（雌雄各 2～8例／群）	静脈内急速	1，2，4 mg/kg［週2回（週の1及び2日目）投与を3週間繰り返し，1週間休薬するサイクルを6回繰り返し］	カルフィルゾミブは初回投与後1時間において，全血のプロテアソーム活性を85%以上阻害した. 全血のプロテアソーム活性は，3及び6サイクル目の初日投与前においてわずかに回復したが，カルフィルゾミブの投与により90%以上阻害された.	TR-0072-171	［4.2.1.1-17］（参考資料）

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
ラットに単回静脈内急速又は持続投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット／SD（雄 3 例／群）	静脈内急速, 静脈内持続	1 mg/kg （単回投与）	カルフィルゾミブを静脈内急速投与又は静脈内持続投与したとき，プロテアソームのキモトリプシン様活性の阻害に有意な差は認められなかった. カルフィルゾミブは心臓を除く組織においてプロテアソームのカスパーゼ様及びトリプシン様活性を阻害しなかった．カルフィルゾミブは心臓のプロテアソームのカスパーゼ様及びトリプシン様活性を約 40%阻害した.	TR-0089-171	［4.2.1.1-18］ （参考資料）
ラットに単回静脈内急速又は持続投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	ラット／SD（雄 3～10 例／群）	静脈内急速, 静脈内持続	8 mg/kg （単回投与） 【ボルテゾミブ 0.5 mg/kg（静脈内急速）［週 2 回（週の 1 及び 4 日目），2 又は 3 週間］】	カルフィルゾミブは，静脈内急速投与又は静脈内持続投与したとき，プロテアソーム活性を同程度阻害した．更に，カルフィルゾミブ及びボルテゾミブは，プロテアソーム活性を同程度阻害した.	TR-0356-171	［4.2.1.1-19］ （参考資料）
サルに単回静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性	カニクイザル（雌雄各 2 例／群又は雄 6 例／群）	静脈内急速	1，2，3 mg/kg （単回投与）	カルフィルゾミブは投与後 24～25 時間において，血中のプロテアソーム活性を 75%以上阻害した.	TR-0024-171 TR-0157-171	［4.2.1.1-20］ ［4.2.1.1-21］ （参考資料）

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
サルに単回静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	カニクイザル（雌 3 例／群）	静脈内急速	2 mg/kg（単回投与）	カルフィルゾミブは，投与後 15 分において全血のプロテアソーム活性を 90%以上阻害し，阻害は投与後 120 分まで持続した． カルフィルゾミブは，投与後 2 時間において，骨髄，副腎，心臓及び肺のプロテアソーム活性を阻害した．また，肝臓及び鼠径リンパ節のプロテアソーム活性を一部阻害したが有意差はなかった．一方，脳のプロテアソーム活性は阻害しなかった．	TR-0046-171-PD	［4.2.1.1-22］（参考資料）
サルに単回又は 5 日間連日静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	カニクイザル（雄 2～3 例／群）	静脈内急速	1，1.16，2，4 mg/kg（単回投与）（5 日間連日投与）	カルフィルゾミブは，3 及び 4 回目の投与後 1 時間において全血のプロテアソーム活性をほぼ完全に阻害し，5 回目の投与後 9 日において活性は一部回復した．また，PBMC のプロテアソーム活性は全血と比較してより速く回復した．	TR-0011-171	［4.2.1.1-23］（参考資料）
サルに 1 カ月間反復静脈内急速投与したときの血中及び組織中のプロテアソーム活性	カニクイザル（雌雄各 5 例／群）	静脈内急速	0.5，1，2 mg/kg（5 日間連日投与後，9 日間休薬するサイクルを 2 回繰り返し）	カルフィルゾミブは，最終投与後 24 時間において，全血のプロテアソーム活性をほぼ完全に阻害した．また，カルフィルゾミブは，最終投与後 24 時間において，心臓のプロテアソーム活性を阻害したが，副腎，肝臓及び脳のプロテアソーム活性を阻害しなかった．	TR-0018-171	［4.2.1.1-24］（参考資料）

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
サルに 9 カ月間反復静脈内急速投与したときの血中のプロテアソーム活性	カニクイザル（雌雄各 4 又は 6 例／群）	静脈内急速	0.5，1，2 mg/kg［週 2 回（週の 1 及び 2 日目）投与を 3 週繰り返し，1 週間休薬するサイクルを 9 回繰り返し］	カルフィルゾミブは初回投与後 1 時間において，全血のプロテアソーム活性を 80%以上阻害した．全血のプロテアソーム活性は，3，6 及び 9 サイクル目の投与前においてわずかに回復したが，カルフィルゾミブの投与により 90%以上阻害された．	TR-0073-171	［4.2.1.1-25］（参考資料）

2.6.3.3 副次的薬理試験

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
プロテアソーム以外の各種プロテアーゼに対する作用	21 種類のプロテアーゼ	*In vitro*	10 μ mol/L	カルフィルゾミブは 10 μ mol/L の濃度において，検討したいずれのプロテアーゼに対しても阻害率 50%を超える明らかな阻害作用を示さなかった．一方，ボルテゾミブは，10 μ mol/L の濃度において，カテプシン G，キマーゼ及びヒト膵臓キモトリプシンを 90%以上阻害した．	TR-0002-171	［4.2.1.2-1］（参考資料）
各種受容体及び酵素に対する作用	16 種類の酵素及び 67 種類の受容体／リガンド	*In vitro*	0.3 nmol/L～100 μ mol/L	カルフィルゾミブは 10 μ mol/L の濃度において，NK_1及び NK_2受容体並びにナトリウムチャネル（Site 2）に対して阻害率 50%以上の阻害作用を示し，その阻害率はそれぞれ 61，120 及び 51%であった．NK_1及び NK_2受容体に対するカルフィルゾミブの IC_{50} 値は，それぞれ 22 及び 0.7 μ mol/L であった．また，ウサギ肺動脈を用いた試験で，カルフィルゾミブの NK_2受容体拮抗作用が確認された．	TR-0003-171	［4.2.1.2-2］（参考資料）

2.6.3.3　副次的薬理試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
神経細胞及びセリンプロテアーゼに対する作用	ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y, ヒト末梢血単核球（PBMC）	*In vitro*	（*in vitro*） 10 nmol/L ～ 10 μmol/L	ボルテゾミブは神経細胞の生存数に影響を与えなかったが，神経突起の合計長及び平均長を 40%減少させた．一方，カルフィルゾミブは，神経細胞の生存数及び神経突起の長さに影響を与えなかった．	Arastu-Kapur et al. 2011	［4.2.1.2-3］ （参考資料）
	ラット／SD （雄 3 例／群）	静脈内急速	(*in vivo*) カルフィルゾミブ 7 mg/kg （単回投与） ［ボルテゾミブ 0.3 mg/kg （単回投与）］	ラットにカルフィルゾミブ又はボルテゾミブを静脈内投与したとき，脾細胞のカテプシン G 活性をカルフィルゾミブは阻害しなかったが，ボルテゾミブは 50%阻害した．		
	ボルテゾミブを 1.0, 1.3 又は 1.6 mg/m^{2}で投与した骨髄腫患者から調製した PBMC			また，ボルテゾミブを 1.0，1.3 及び 1.6 mg/m^{2}で投与した骨髄腫患者由来の PBMC において，カテプシン G 阻害が認められた．		

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：カルフィルゾミブ

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量[a]（mg/kg）	性別及び動物数／群	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
中枢神経系	ラット／SD	静脈内急速	0.5，1，2，4，6（1カ月間[b]）	雌雄各10～13	反復投与毒性試験にて，FOB法により投与前及び反復投与後に評価	無影響	適	TR-0014-171	［4.2.3.2-4］
	ラット／SD	静脈内急速	1，2，4（6カ月間[c]）	雌雄各25	反復投与毒性試験にて，FOB法により投与前及び反復投与後に評価	無影響	適	TR-0072-171	［4.2.3.2-5］
	カニクイザル	静脈内急速	1，2，3	雌雄各2	神経行動学的検査（精神状態，筋緊張，筋運動，眼瞼位置，瞳孔の大きさ，眼球運動，流涙，流涎，姿勢，自発運動及び運動機能の評価）を投与前及び投与後24時間に評価[f]	無影響	適	TR-0023-171	［4.2.1.3-1］
	カニクイザル	静脈内急速	0.5，1，2[e]（1カ月間[b]）	雌雄各5	反復投与毒性試験にて，神経行動学的検査（精神状態，筋緊張，筋運動，眼瞼位置，瞳孔の大きさ，眼球運動，流涙，流涎，姿勢，自発運動，運動機能，歩行状態及びよじ登り行動）を投与前及び反復投与後に評価	無影響	適	TR-0017-171	［4.2.3.2-7］
	カニクイザル	静脈内急速	0.5，1，2（9カ月間[d]）	雌雄各4~6	反復投与毒性試験にて，神経行動学的検査（精神状態，筋緊張，筋運動，眼瞼位置，瞳孔の大きさ，眼球運動，流涙，流涎，姿勢，自発運動及び運動機能）を投与前及び反復投与後に評価	無影響	適	TR-0073-171	［4.2.3.2-8］

a：特にことわりがない限り単回投与　　b：5日間の連日投与後，9日間休薬するサイクルを2回繰り返し
c：週2回（週の1及び2日目）の3週間投与後，1週間休薬するサイクルを6回繰り返し
d：週2回（週の1及び2日目）の3週間投与後，1週間休薬するサイクルを9回繰り返し
e：1サイクル目の3から5回目投与後に雌雄各3例が死亡又は切迫剖検となったため，2サイクル目は休薬（計5回投与）とした.
f：3 mg/kgの雄2例は，それぞれ切迫剖検前（投与後6及び21時間）に評価した.

2.6.3.4　　安全性薬理試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量[a]	性別及び動物数／群	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
心血管系	HEK293細胞	*In vitro*	0.7, 1.5，2.2 μmol/L	各濃度3～4標本	hERG チャネル電流に対する作用を検討した.	hERG チャネル電流阻害 IC_{50} 値：2.1 μmol/L（0.7，1.5，2.2 μmol/L：6.9，12.7，54.2%阻害）	適	TR-0088-171	［4.2.1.3-2］
	カニクイザル	静脈内急速	1，2，3 mg/kg	雌雄各2	・血圧（収縮期，拡張期及び平均血圧），心拍数及び心電図（波形及びパラメータ[b]）をテレメトリーシステムにより投与前から投与後24時間まで測定（投与後6時間までは5分ごと，投与後6時間以降は15分ごとのデータで評価） ・血清トロポニンT（投与後24～25時間，切迫剖検例は剖検前の投与後6及び22時間に評価） ・一般状態観察 ・剖検	2 mg/kg：無影響 3 mg/kg 雄1例（切迫剖検例） ・投与後 2～4 時間付近より顕著な血圧低下，心拍数増加，PR，QRS，QT間隔短縮，投与後18時間以降よりST上昇，T波増高 ・トロポニンT高値 （投与前；<0.010 ng/mL，投与後22時間；0.434 ng/mL） ・一般状態の悪化（自発運動減少，蒼白，覚醒度の低下，ケージ壁への寄り掛り，円背），剖検で気管支周囲の浮腫，胸水，心嚢液貯留，心外膜表面の粗面化及び不規則化，左室及び心室中隔の赤色化 3 mg/kg 雄1例（切迫剖検例） ・投与後2時間より，投与前から認められていた心室性期外収縮の発現頻度上昇，心拍数増加を伴わない血圧低下，剖検で気管支周囲の浮腫 3 mg/kg 雌（生存例） ・剖検で心室の軟化，左心室心内膜に軟ゼラチン状／淡赤色塊付着）	適	TR-0023-171	［4.2.1.3-1］

a：特にことわりがない限り単回投与　　b：PR，QRS，RR，QT及びQTc間隔

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

被験物質：カルフィルゾミブ

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量[a]	性別及び動物数／群	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
呼吸器系	カニクイザル	静脈内急速	1，2，3 mg/kg	雌雄各 2	呼吸数，1 回換気量及び分時換気量を投与前及び投与後約 6 時間に測定	無影響	適	TR-0023-171	［4.2.1.3-1］

a：特にことわりがない限り単回投与

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施しなかった.