目次

略号一覧表 2
2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.1.1 薬理試験計画 4
2.4.1.1.1 薬効薬理試験 4
2.4.1.1.2 安全性薬理試験 5
2.4.1.1.3 薬力学的薬物相互作用試験 5
2.4.1.2 薬物動態試験計画 5
2.4.1.3 毒性試験計画 6
2.4.1.4 米国及び欧州の規制当局との協議 9
2.4.2 薬理試験 10
2.4.2.1 in vitro 及び in vivo 薬理試験 10
2.4.2.2 安全性薬理試験 11
2.4.2.3 薬力学的薬物相互作用試験 11
2.4.3 薬物動態試験 12
2.4.4 毒性試験 13
2.4.4.1 単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験 13
2.4.4.2 遺伝毒性試験 15
2.4.4.3 がん原性試験 15
2.4.4.4 生殖発生毒性試験 15
2.4.4.5 局所忍容性試験 15
2.4.4.6 光毒性試験 16
2.4.5 総括及び結論 16
2.4.5.1 薬理試験 16
2.4.5.2 薬物動態試験 17
2.4.5.3 毒性試験 17
2.4.5.4 全般的結論 18
2.4.6 参考文献一覧 19

表

表 2.4.1-1　イキサゾミブに関する非臨床毒性試験プログラム 8
表 2.4.4-1　単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験における最大耐量 14
表 2.4.5-1　ラット（7 サイクル）、イヌ（10 サイクル）、及びヒトへの経口投与後のイキサゾミブに対する全身曝露量の比較 19

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
%CV	percent coefficient of variation	%変動係数
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion	吸収、分布、代謝、排泄
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度時間曲線下面積
AUC_{168}	area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 168 hours	0時間から168時間までの血漿中濃度時間曲線下面積
AUC_{24}	area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 24 hours	0時間から24時間までの血漿中濃度時間曲線下面積
AUC_{72}	area under the plasma concentration-time curve from the time 0 to 72 hours	0時間から72時間までの血漿中濃度時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白質
BDC	bile duct-cannulated	胆管ろう形成
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	相補デオキシリボ核酸
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	欧州ヒト用医薬品委員会
C_{max}	maximum observed plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
DDI	drug-drug interaction	薬物間相互作用
DLT	dose-limiting toxicity	用量制限毒性
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
DRG	dorsal root ganglion	後根神経節
ECG	electrocardiography	心電図
ER	endoplasmic reticulum	小胞体
EU	European Union	欧州連合
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GD	gestation day	妊娠日齢
GEM	genetically engineered mouse	遺伝子改変マウス
GI	gastrointestinal	胃腸の
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
HLM	human liver microsome	ヒト肝ミクロソーム
HPBL	human peripheral blood lymphocyte	ヒト末梢血リンパ球
HUVEC	human umbilical vascular endothelial cell	ヒト臍帯血管内皮細胞
IC_{50}	concentration producing 50% inhibition	50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonisation	日米EU医薬品規制調和国際会議
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IV	intravenous(ly)	静脈内
K_i	inhibition dissociation constant	阻害定数
LC/MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LD_{50}	concentration causing lethality for 50% of cells	50%致死量
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
LSC	liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
MATE	multidrug and toxin extrusion	multidrug and toxin extrusion
MHLW	Ministry of Health, Labour, and Welfare	厚生労働省
MM	multiple myeloma	多発性骨髄腫
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OAT	organic anion transporter	organic anion transporter
OATP	organic anion-transporting polypeptide	organic anion-transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter	organic cation transporter
PCM	plasma cell malignancy	形質細胞悪性腫瘍

略号一覧表（続き）

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白質
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PO	oral(ly)	経口
QW	once weekly	週 1 回
QWBA	quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RBC	red blood cell	赤血球
RRMM	relapsed and/or refractory multiple myeloma	再発及び／又は難治性の多発性骨髄腫
SCID	severe combined immunodeficient	重症複合免疫不全
$t_{1/2}$	half-life	消失半減期
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
t_{max}	time to reach C_{max}	C_{max} 到達時間
ULOQ	upper limit of quantitation	定量上限
UPR	unfolded protein response	小胞体ストレス応答
US	United States	米国
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

プロテアソームは、増殖、細胞周期、及びアポトーシス等の様々な細胞の活動に影響を及ぼす細胞内の蛋白質の代謝回転を制御する酵素複合体である。プロテアソーム阻害は、ある特定のタイプの造血器腫瘍の治療において効果的な手段であることが示されている。経口投与が可能で、原薬（イキサゾミブクエン酸エステル）の活性体のボロン酸化合物であるイキサゾミブは、20S プロテアソームの β5 サブユニットを可逆的に阻害する[1]。プロテアソーム阻害は、細胞周期破壊、小胞体（ER）ストレス、小胞体ストレス応答（UPR）活性化、及び、最終的にはアポトーシス経路の活性化と細胞死をもたらす[2]。

ICH S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」[3]に準拠してイキサゾミブの薬理、薬物動態（PK）及び毒性の包括的な評価を実施した。また、非臨床評価は次の ICH ガイドラインも考慮して実施した。

- M3（R2）、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」[4]
- S2（R1）、「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」[5]
- M7、「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理」[6]
- S7A、「安全性薬理試験ガイドライン」[7]
- S7B、「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価」[8]
- S10、「医薬品の光安全性評価ガイドライン」[9]

全体として、本評価の結果から、再発又は難治性の多発性骨髄腫（MM）患者に対する治療薬としてイキサゾミブを使用することが支持されると考える。重要な毒性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基準（GLP）に準拠して実施されており、また、各国規制当局から受けた助言を検討し、適宜盛り込まれている（Section 2.4.1.4）。

2.4.1.1 薬理試験計画

2.4.1.1.1 薬効薬理試験

生化学及び細胞を用いた試験によるイキサゾミブの 20S プロテアソーム活性に対する阻害作用の評価、イキサゾミブの分子標的治療薬としての選択性の特徴付け、並びに MM 細胞株及び MM 患者由来の腫瘍細胞の生存率に対するイキサゾミブの影響評価を目的とした数多くの in vitro 試験を実施し、イキサゾミブの薬理プロファイルを検討した（概要表 2.6.3.1）。また、MM 細胞株において、ER ストレスやアポトーシス経路など、イキサゾミブ活性を仲介する機序について評価した。さらに、MM 骨髄微小環境における血管新生並びに骨再形成に寄与するその他の細胞種（血管内皮細胞、破骨細胞、及び骨芽細胞など）に対してイキサゾミブが及ぼす影響についても in vitro 試験で検討した。イキサゾミブとレナリドミドの併用効果については、MM 細胞株を用いた in vitro での細胞生存率アッセイを使用して評価した。

イキサゾミブの in vivo での薬力学及び抗腫瘍活性を、MM.1S 腫瘍を移植した CB-17 重症複合免疫不全（SCID）マウスを用いて評価し、抗腫瘍効果についてはさらに形質細胞悪性腫瘍（PCM）のトランスジェニックマウスモデルでも証明した。薬効薬理試験は承認申請者又

は大学等の社外共同研究者によって実施された。社外で実施されたこれらの試験では、Millennium 提供のイキサゾミブを使用した。

2.4.1.1.2 安全性薬理試験

hERG チャンネルにイキサゾミブが及ぼす影響を検討するために、in vitro での安全性薬理試験を実施した。イキサゾミブクエン酸エステルは血漿において速やかに加水分解されイキサゾミブに変換されるためイキサゾミブクエン酸エステルを用いた in vivo での安全性薬理試験を実施し、イキサゾミブの評価を行った。ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験の一環として、心電図（ECG）、神経系及び呼吸器系を評価した。また、イキサゾミブが心血管（CV）系に及ぼす影響を評価するためにビーグル犬を用いたテレメトリー試験を実施した。

2.4.1.1.3 薬力学的薬物相互作用試験

2.4.1.2 に薬物動態学的薬物間相互作用（DDI）試験の概要を示す。薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。

2.4.1.2 薬物動態試験計画

ラット、イヌを用いた in vitro 及び in vivo 並びにヒトを用いた in vitro での一連の包括的な実験において、放射能で標識したイキサゾミブクエン酸エステル（[^{14}C]イキサゾミブクエン酸エステル）又は[^{14}C]イキサゾミブ並びに非標識のイキサゾミブクエン酸エステル又はイキサゾミブを用いて薬物動態（PK）プロファイルを検討した。イキサゾミブは薬理活性を有するボロン酸体であり、イキサゾミブクエン酸エステルはイキサゾミブのクエン酸エステル型プロドラッグである。イキサゾミブクエン酸エステルをラット、イヌ及びヒト血漿に添加（最終濃度 29 μmol/L 以下）したとき、検出限界を 1.94 nmol/mL に設定した LC/MS/MS 法にてイキサゾミブクエン酸エステルが検出されなかったことから、イキサゾミブクエン酸エステルは in vitro 血漿中で速やかにイキサゾミブに加水分解されることが示された。さらに水溶液中でもイキサゾミブクエン酸エステルからイキサゾミブへ加水分解されることが示された（Section 3.2.S.3.1）。このため、特に断らない限り、投与量、濃度及び薬物動態パラメータは、イキサゾミブ換算値で表記した。イキサゾミブの製造販売承認申請に際し、実施した薬物動態試験の一覧を概要表 2.6.5.1 に要約する。

これらの試験で PK 試験データの特性を評価するために使用した分析方法の定量下限（LLOQ）及び安定性データに関しては、Section 2.6.4.2 でさらに詳しく述べる。

イキサゾミブの吸収及びバイオアベイラビリティは、ラット及びイヌへの単回経口投与後に評価した。イキサゾミブの膜透過性、P-糖蛋白質（P-gp）及び breast cancer resistance protein（BCRP）に対する基質性は、Caco-2 細胞を用いて in vitro で評価した。

イキサゾミブの組織分布、血漿蛋白結合率及び血球への分配率を評価した。白色ラット又は有色ラットに[^{14}C]イキサゾミブ又は[^{14}C]イキサゾミブクエン酸エステルを単回経口投与又は静脈内投与し、定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）分析によって様々な組織で放射能濃度を測定した。

イキサゾミブの代謝を in vitro 及び in vivo で評価した。ミクロソーム（マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト）並びにラット及びヒトの凍結肝細胞を用いて、イキサゾミブの代謝物

を同定し評価した。ラット（血漿、尿、胆汁及び糞）及びイヌ（血漿、尿及び糞）を用いて、それぞれに[^{14}C]イキサゾミブクエン酸エステルを単回経口投与し、イキサゾミブの代謝物プロファイルを評価した。加えて、臨床試験においてイキサゾミブクエン酸エステルを単回及び反復経口投与しとときに得られたヒト血漿中のイキサゾミブの代謝物プロファイルも評価した。肝ミクロソーム（マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト）を用いて、イキサゾミブの in vitro 代謝試験から得られた肝固有クリアランスを評価した。ヒトチトクローム P450（CYP）発現ミクロソーム及びヒト肝ミクロソーム（HLM）を用いて、in vitro での CYP 分子種の代謝の程度及び寄与を評価した。CYP 分子種に対する誘導作用及び阻害作用をそれぞれヒト肝細胞及び HLM で評価した。

ラット及びイヌを用いて、[^{14}C]イキサゾミブクエン酸エステルを単回経口投与し、放射能の尿及び糞中への排泄を評価した。ラットについては胆汁中への排泄も評価した。

薬物間相互作用の可能性は、CYP 分子種及びトランスポーター〔P-gp、BCRP、organic cation transporter（OCT）、organic anion transporter（OAT）、organic anion transporting polypeptide（OATP）及び multidrug and toxin extrusion（MATE）トランスポーター〕の相互作用試験に基づいて評価し、さらに、イキサゾミブクエン酸エステルと他のプロテアソーム阻害薬であるカルフィルゾミブとの間で血球への分配率の変化によって引き起こされる薬物間相互作用のリスクを評価した。

2.4.1.3 毒性試験計画

再発又は難治性の MM 患者に対する治療薬としてイキサゾミブの使用を支持するため、ICH S9 [3]に準拠して、包括的な非臨床試験によりイキサゾミブの毒性を評価した。また、ICH M3（R2）[4]（初発 MM に関する臨床試験を支持するため）、並びに S2（R1）[5]、M7 [6]、S7A [7]、S7B[8]及び S10 [9]に準拠して、追加試験を実施した（表 2.4.1-1 及び概要表 2.6.7.1）。

開発段階では注射剤の上市が計画されていたため、GLP 準拠で実施した in vivo 試験では、イキサゾミブクエン酸エステル又はイキサゾミブを経口投与又は静脈内投与したが、現時点では注射剤を上市する計画はないため、本概要では経口投与の毒性試験の試験結果を中心に記載した。単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験で用いた動物種は、CD-1 マウス、Sprague-Dawley ラット及びビーグル犬であった。これらの動物種は、イキサゾミブの作用に対して薬理学的な反応性が良好でヒトプロファイルと類似したトキシコキネティクス及び代謝プロファイルを有していた。また、当該動物種は医薬品開発候補の毒性評価に一般的に用いられている。さらに、Sprague-Dawley ラット及び New Zealand white ウサギを用いた生殖発生毒性試験、in vitro 及び CD-1 マウスを用いた in vivo での遺伝毒性試験、並びに in vitro 光毒性試験を実施した。

特に記載のない限り、すべての用量はイキサゾミブ量として算出した。全身曝露量もイキサゾミブの血漿中濃度に基づいて評価した。イキサゾミブクエン酸エステル又はイキサゾミブのどちらの原薬を投与したかに応じて、それぞれの局所忍容性を評価した。

GLP 準拠で実施した試験で使用したイキサゾミブクエン酸エステル及びイキサゾミブの純度は、それぞれ[redacted]%及び[redacted]%であった（概要表 2.6.7.4）。またその不純物プロファイルは、一般的に重要な臨床試験で使用されたバッチのものと一致し、市販用製剤のプロファイルの妥当性を支持する（Section 2.3.S.4.5）。GLP 準拠で実施した反復投与毒性試験では、

イキサゾミブクエン酸エステルの原薬又はイキサゾミブの原薬又は製剤における総不純物は、それぞれ[redacted]%又は[redacted]%であった。特に、2 つの潜在的な不純物 ([redacted])とエナンチオマー[redacted]の混合物及び[redacted] Section 2.6.7.4）はそれぞれラットにおける代謝物 M1 及び M12 であると同定され（Section 2.6.4.5）、原薬の規格として管理されている。加えて、もう 1 つの潜在的な原薬不純物である代謝物 M3 ([redacted] Section 2.6.7.4）がラット、イヌ及びヒト in vitro で代謝物として検出されたが、in vivo では観察されなかった。これは、代謝物 M3 が代謝物 M12 にさらに代謝されたことによるものと考えられた。

[redacted]はイキサゾミブクエン酸エステルを安定化させることから、毒性試験では複数の[redacted]ベースの投与製剤を使用した。動物に投与した製剤の性質（例えば、[redacted]注射用製剤、[redacted]製剤又は経口投与用[redacted]製剤）により[redacted]の微調整が必要であった。

表 2.4.1-1 及び概要表 2.6.7.1 に、イキサゾミブ（イキサゾミブクエン酸エステル又はイキサゾミブとして投与）の毒性を評価するために実施した非臨床試験の内容を記載する。これらの試験により、毒性標的器官を同定し、臨床的に関連性のある毒性をモニタリングするための非侵襲的な方法を検討し、被験物質に起因する変化の可逆性を評価し、最大耐量（MTD）、無毒性量（NOAEL）及び血漿中イキサゾミブ濃度を得た。これらの試験でみられた主な毒性は、薬理学的標的（20S プロテアソーム）が同じであるベルケイド®（ボルテゾミブ）を投与された動物において以前に観察された毒性と質的に類似していた。非臨床毒性試験の大半が、現行の臨床投与スケジュールと比較して投与頻度が多い方法を採用したことに留意しなければならない。投与期間が 3 ヵ月間以下の毒性試験における投与スケジュールは 21 日間を 1 サイクルとし、各サイクルは、最初の 2 週間における週 2 回投与（1、4、8 及び 11 日目に投与）とそれに続く 10 日間の休薬期間で構成されている。したがって、試験期間が 3 ヵ月間（5 サイクル）の場合、動物には合計 20 回投与されていることとなる。一方、臨床試験で主に用いた投与スケジュールは 28 日間を 1 サイクルとし、各サイクルは週 1 回（QW）での 3 回投与（1、8 及び 15 日目に投与）とそれに続く 13 日間の休薬期間で構成されている。そのため、6 サイクル投薬した患者の場合、投与回数は全部で 18 回となる。ラットを用いた 6 ヵ月間（7 サイクル）反復投与毒性試験及びイヌを用いた 9 ヵ月間（10 サイクル）反復投与毒性毒性試験では、28 日間を 1 サイクルとした臨床と同じ投与スケジュールを採用し、ラットには 6 ヵ月間で 21 回、イヌには 9 ヵ月間で 30 回投与した。

表 2.4.1-1　イキサゾミブに関する非臨床毒性試験プログラム

試験の種類	添付資料番号	動物種	投与期間	被験物質	投与経路	GLP
単回投与毒性試験						
	4.2.3.1-1	CD-1 マウス	単回投与	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	非準拠
	4.2.3.1-2	Sprague-Dawley ラット	単回投与	イキサゾミブ	経口	非準拠
	4.2.3.1-3	Sprague-Dawley ラット	単回投与	イキサゾミブ	静注	非準拠
	4.2.3.1-4	Sprague-Dawley ラット	単回投与	イキサゾミブ	静注	非準拠
	4.2.1.3-3	ビーグル犬	単回投与	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	非準拠
	4.2.3.1-5	ビーグル犬	単回投与	イキサゾミブ	静注	非準拠
反復投与毒性試験						
	4.2.3.2-1	Sprague-Dawley ラット	2 週間	イキサゾミブ	経口	非準拠
	4.2.3.2-2	Sprague-Dawley ラット	1 ヵ月 (2 サイクル[a])	イキサゾミブ	経口	準拠[b]
	4.2.3.2-4	Sprague-Dawley ラット	3 ヵ月 (5 サイクル[a])	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	準拠[b]
	4.2.3.2-5	Sprague-Dawley ラット	6 ヵ月 (7 サイクル[c])	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	準拠
	4.2.3.2-6	Sprague-Dawley ラット	2 週間	イキサゾミブ	静注	非準拠
	4.2.3.2-7	Sprague-Dawley ラット	1 ヵ月 (2 サイクル[a])	イキサゾミブ	静注	準拠[b]
	4.2.3.2-9	Sprague-Dawley ラット	3 ヵ月 (5 サイクル[a])	イキサゾミブクエン酸エステル	静注	準拠[b]
	4.2.3.2-10	ビーグル犬	1 週間	イキサゾミブ	経口	非準拠
	4.2.3.2-11	ビーグル犬	2 週間	イキサゾミブ	経口	準拠[b]
	4.2.3.2-13	ビーグル犬	3 ヵ月 (5 サイクル[a])	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	準拠[b]
	4.2.3.2-15	ビーグル犬	9 ヵ月 (10 サイクル[c])	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	準拠
	4.2.3.2-16	ビーグル犬	2 週間	イキサゾミブ	静注	非準拠
	4.2.3.2-17	ビーグル犬	1 ヵ月 (2 サイクル[a])	イキサゾミブ	静注	準拠[b]
	4.2.3.2-21	ビーグル犬	3 ヵ月 (5 サイクル[a])	イキサゾミブクエン酸エステル	静注	準拠[b]

表 2.4.1-1　イキサゾミブに関する非臨床毒性試験プログラム（続き）

試験の種類	添付資料番号	動物種	投与期間	被験物質	投与経路	GLP
遺伝毒性試験						
細菌を用いる復帰突然変異試験	4.2.3.3.1-1	*Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537), *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*)	N/A	イキサゾミブ	in vitro	準拠
染色体異常試験	4.2.3.3.1-2	HPBL	N/A	イキサゾミブクエン酸エステル	in vitro	準拠
小核試験	4.2.3.3.2-1	CD-1 マウス	単回投与	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	準拠
コメット試験	4.2.3.3.2-2	CD-1 マウス	試料採取の 24 時間前及び 3 時間前	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	準拠
生殖発生毒性試験						
胚・胎児発生に関する用量設定試験	4.2.3.5.2-1	Sprague-Dawley ラット	GD 6～17 まで毎日；GD 6、9、12 及び 15 の間欠的	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	非準拠
胚・胎児発生に関する試験	4.2.3.5.2-2	Sprague-Dawley ラット	GD 6、9、12 及び 15	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	準拠
胚・胎児発生に関する用量設定試験	4.2.3.5.2-3	New Zealand white ウサギ	GD 7、10、13、16 及び 19	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	準拠 [b]
胚・胎児発生に関する試験	4.2.3.5.2-4	New Zealand white ウサギ	GD 7、10、13、16 及び 19	イキサゾミブクエン酸エステル	経口	準拠
局所忍容性試験 [d]						
in vitro 溶血性試験	4.2.3.6-1	ヒト全血	N/A	イキサゾミブ	in vitro	非準拠
	4.2.3.6-2	ヒト全血	N/A	イキサゾミブクエン酸エステル	in vitro	非準拠
その他の毒性試験						
光毒性試験	4.2.3.7.7-1	BALB/3T3 クローン A31 マウス細胞	N/A	イキサゾミブクエン酸エステル	in vitro	非準拠

GD = 妊娠日齢；GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準；HPBL = ヒト末梢血リンパ球；IV = 静脈内；N/A = 該当しない。

a　各サイクルは、最初の 2 週間に対しての週 2 回（BIW）投与とそれに続く 10 日の休薬期間で構成した。最終サイクル終了後、14 日の回復期間を設けた。

b　薬力学的な解析は、当該毒性試験の試料を使用して、GLP 非準拠でも実施した。

c　各サイクルは、最初の 3 週間に対しての週 1 回（QW）の投与とそれに続く 13 日の休薬期間で構成した。最終サイクル終了後、14 日の回復期間を設けた。

d　局所認容性に関しては、GLP 準拠で実施した反復投与毒性試験において特性を詳しく評価した。

2.4.1.4 米国及び欧州の規制当局との協議

イキサゾミブに関する非臨床試験開発プログラムについて、米国（US）食品医薬品局（FDA）及び欧州連合（EU）規制当局と検討した。EU 保健当局からの科学的助言には、欧州ヒト用医薬品委員会（CHMP）及び複数の加盟国の所轄官庁からの集約されたアドバイスが含まれていた。加盟国の所轄官庁からの規制上のフィードバックに基づいて、イキサゾミブの開発

計画全体（維持療法における使用や新規にMMと診断された患者に対する使用を含む）を支持するために、ラットの6ヵ月間（7サイクル）反復投与毒性試験及びイヌの9ヵ月間（10サイクル）反復投与毒性試験を実施した[4]。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 in vitro 及び in vivo 薬理試験

in vitro 薬理試験により、3.4 nMの50%阻害濃度（IC_{50}）でイキサゾミブが20Sプロテアソームのβ5サブユニットを選択的に阻害することが示されており、これは、β1サブユニット（IC_{50} = 31 nmol/L）及びβ2（IC_{50} = 3500 nmol/L）サブユニットと比べ、それぞれ約10倍及び1000倍低い（概要表2.6.3.2；添付資料番号4.2.1.1-1）。後続の試験で、イキサゾミブは、HCT-116細胞のβ5サブユニットに対して強力な阻害作用を示した（最大阻害率：＞98%）。さらに、β5サブユニットに対しての選択性は、β2サブユニットに対する選択性と比べて高いことが明らかとなった（β5サブユニットのIC_{50} = 0.0075 μmol/L、β2サブユニットのIC_{50} = 9.1 μmol/L）（概要表2.6.3.2；添付資料番号4.2.1.1-2）。イキサゾミブは、7種類のセリンプロテアーゼと2種類のシステインプロテアーゼ（それらのIC_{50}は19から＞100 μmol/Lに分布）、103種類のキナーゼ（IC_{50} > 10 μmol/L）及び18種類の受容体（IC_{50} > 10 μmol/L）から構成されたパネルでの阻害成績からプロテアソームに対して選択的な阻害作用が示された（概要表2.6.3.2；添付資料番号4.2.1.1-1及び4.2.1.1-3）。精製プロテアソームの生化学アッセイにおいて、イキサゾミブは、ボルテゾミブと同様のin vitroにおける活性及びプロテアソームの活性サブユニットに対する選択性を示したが、20Sプロテアソームのβ5サブユニットの解離半減時間（$T_{1/2}$）はボルテゾミブと比べて短時間であった（ボルテゾミブの110分に対してイキサゾミブは18分）。この結果は、継続的に作用させた後に薬剤を含まない培地に交換するという条件で培養された細胞を用いたプロテアソーム阻害試験により、イキサゾミブの除去後のプロテアソーム活性の回復はボルテゾミブの場合よりも大きいことからも支持された（概要表2.6.3.2；添付資料番号4.2.1.1-1）。

20Sプロテアソームのβ5サブユニットに対する活性の阻害結果と一致して、イキサゾミブにより、4 x Ub-Lucレポーターの安定化、NF-κB-ルシフェラーゼレポーターの阻害及びユビキチン化された蛋白質の蓄積からも明らかなように、培養細胞内でプロテアソームが阻害されることが示された（概要表2.6.3.2；添付資料番号4.2.1.1-1）。MM細胞株に対するイキサゾミブ処理は、UPRを誘導し、複数のアポトーシス促進性蛋白質及び細胞周期阻害蛋白質の発現量を増大させ、アポトーシスカスケード反応を促進させた（概要表2.6.3.2；添付資料番号4.2.1.1-5）。

ヒト骨髄腫細胞株（MM.1S、ANBL-6、RPMI-8226及びNCI-H929）を用いてin vitroで生存率に及ぼす影響を調べた成績から、イキサゾミブは、5.9～25.8 nmol/Lの範囲のLD_{50}（細胞の半数致死濃度）を持つ強力な殺細胞薬であることが示された（概要表2.6.3.2；添付資料番号4.2.1.1-6）。3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide（MTT）テトラゾリウム還元試験で観察された生存率に及ぼす影響は、追加の培養ヒトMM細胞でも観察され、ボルテゾミブ、レナリドミド及びデキサメタゾン等の複数の前治療後に再発したMM細胞を含む患者由来の精製MM細胞（$CD138^+$）においても明らかであった（概要表2.6.3.2；添付資料番号4.2.1.1-5）。また、イキサゾミブは、骨髄間質細胞存在下で培養したMM.1S細胞の

増殖を阻害した。MM 細胞への作用に加え、イキサゾミブは、骨髄微小環境において血管新生及び骨再形成に寄与する他の細胞種の機能にも影響を及ぼした。血管新生の in vitro モデルであるヒト臍帯血管内皮細胞（HUVEC）による毛細管様構造の形成を in vitro で阻害した（概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-5）。イキサゾミブは、骨吸収性破骨細胞の形成及び機能を in vitro で阻害し、骨形成性骨芽細胞の分化及び機能を in vitro で促進した（概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-7）。

イキサゾミブとレナリドミドの併用は、ANBL-6 及び NCI-H929 細胞株において細胞生存抑制に相乗効果をもたらし、また、RPMI-8226 及び MM.1S 細胞株においては相加効果をもたらした（概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-8）。

In vivo では、MM.1S ヒト多発性骨髄腫細胞株移植マウス（担癌）モデルでイキサゾミブを経口及び静脈内投与すると、腫瘍細胞におけるプロテアソーム阻害、小胞体ストレス応答マーカーの発現量の増大、アポトーシス誘導、及び抗腫瘍活性が示された（概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-9、-10 及び-11）。またイキサゾミブは、ヒト MM の重要な特徴を示す、PCM のマウスモデル、すなわち、デノボ PCM である iMyc$^{C\alpha}$/Bcl-X_L 遺伝子改変マウス（GEM）モデル、並びに DP54-Luc iMyc$^{C\alpha}$/Bcl-X_L マウス細胞株の静脈内及び脛骨内接種によって作製された、PCM 播種マウスモデル及び脛骨内接種 PCM マウスモデルにおいても抗腫瘍活性を示した（概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-12、-13、及び-14）[11][12]。デノボ PCM マウスモデルにイキサゾミブを投与すると、脾腫の縮小及び免疫グロブリン（Ig）G2a レベルの低下ばかりでなく、全生存期間の延長がもたらされた（概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-12）。一方、PCM 播種マウスモデルにイキサゾミブを投与すると、腫瘍量が減少し、溶骨性病変も改善した（頭蓋縫合の離開が縮小することによって証明された）（概要表 2.6.3.2；添付資料番号 4.2.1.1-13）。

2.4.2.2 安全性薬理試験

in vitro（hERG チャネル）及び in vivo の両方での非臨床安全性薬理試験及び評価により、心血管系や呼吸系機能への影響はなかった（概要表 2.6.3.4；添付資料番号 4.2.1.3-1 及び 4.2.1.3-2）。神経系に対する影響は主にイヌで病理組織学的検査によって検出され、臨床徴候をまれに伴う神経細胞傷害に限定されるものであった。病理組織学的検査によって検出されたイキサゾミブによる動物での神経細胞傷害は、プロテアソーム阻害薬のボルテゾミブでも報告されており、ボルテゾミブ投与患者の末梢神経障害との関連が認められている[13]。なお、イキサゾミブは、プロテアソーム阻害薬のカルフィルゾミブで報告されていた血圧低下や心拍数上昇などを引き起こさなかった[14]。末梢神経系に対する影響が発生する可能性があるものの、イキサゾミブに関する安全性薬理試験データにより、患者に心血管系、呼吸系、又は中枢神経系関連の影響が発生する可能性は低いことが示された。

2.4.2.3 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用に関する追加試験は実施しなかった。

2.4.3 薬物動態試験

イキサゾミブの製造販売承認申請に際し、実施した薬物動態試験の一覧を概要表 2.6.5.1 に要約する。

ラット及びイヌにイキサゾミブを経口投与又は静脈内投与し、イキサゾミブの薬物動態を評価した。経口投与後の吸収はラット及びイヌともに速やかであり、最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）はそれぞれ 0.57 及び 0.42 時間であった。イキサゾミブを静脈内及び経口投与した後のイキサゾミブのラット及びイヌにおける経口バイオアベイラビリティ（F）は、それぞれ 41.1%及び 72.2%であった（概要表 2.6.5.3.1；添付資料番号 4.2.2.2-1、-2）。Caco-2 細胞を用いた検討から、イキサゾミブは P-糖蛋白質（P-gp）の基質であることが示唆された。また、イキサゾミブは中程度の膜透過性を有した（概要表 2.6.5.3.2；添付資料番号 4.2.2.2-4）。イキサゾミブの血中動態に及ぼす反復投与の影響については、ラット及びイヌを用いたイキサゾミブクエン酸エステル又はイキサゾミブの反復経口投与毒性試験において得られたトキシコキネティクス（TK）のデータを用いて評価した。これらの TK 試験では、最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）は、概ね用量比に応じて増加するか又は用量比よりも低い増加を示した。また、反復投与後に血漿中 C_{max} 及び AUC がやや増加する傾向が認められ、曝露量に明らかな性差は認められなかった（Section 2.6.6.1.1）。

有色ラットに[^{14}C]イキサゾミブクエン酸エステルを単回経口投与したところ、放射能は全身に広く分布し、投与後 672 時間までにほぼ消失すると考えられた（概要表 2.6.5.5.1；添付資料番号 4.2.2.3-1）。白色ラットに[^{14}C]イキサゾミブを単回静脈内投与した場合にも同様に、放射能は全身に広く分布した（概要表 2.6.5.5.2、2.6.5.5.3；添付資料番号 4.2.2.3-2、-3）。有色ラットと白色ラットにおける血液中及び眼球内の放射能濃度を比較した結果、イキサゾミブ及びその由来成分のメラニン親和性は低いと考えられた。In vitro 試験におけるイキサゾミブのマウス、ラット、イヌ及びヒト血漿蛋白結合率は 81.9～94.4%であり、中程度から高値を示した。またイキサゾミブはヒト血漿中で主にヒト血清アルブミン（HSA）に結合すると考えられた（概要表 2.6.5.6；添付資料番号 4.2.2.3-4）。In vitro 試験におけるイキサゾミブのマウス、ラット、イヌ及びヒト血液中での血球移行率は 0.01 から 0.1 μg/mL の濃度範囲では高かったが、0.1 から 1 μg/mL の濃度範囲では血球移行率に濃度依存的な減少が認められた（概要表 2.6.5.8.1；添付資料番号 4.2.2.3-5）。

[^{14}C]イキサゾミブクエン酸エステルを経口投与したラット及びイヌ血漿中の主成分はイキサゾミブであった。また、投与されたイキサゾミブクエン酸エステルの一部はイキサゾミブとして排泄されるものの、大部分はイキサゾミブからさらに代謝された後に排泄されるものと考えられた（概要表 2.6.5.9；添付資料番号 4.2.2.3-6、4.2.2.4-4、-5）。

ヒト肝ミクロソーム（HLM）を用いた試験で認められたすべての代謝物は、ラット及びイヌの肝ミクロソームでの試験でも見られ、毒性試験にラット及びイヌを用いた妥当性が支持された（概要表 2.6.5.10 及び 2.6.5.11；添付資料番号 4.2.2.4-1 及び 4.2.2.4-2）。肝ミクロソームを用いて測定したイキサゾミブの代謝クリアランスは、マウスでは高値を示したが、それ以外の試験動物種ではいずれも低から中程度であった（概要表 2.6.5.10；添付資料番号 4.2.2.4-6）。イキサゾミブの主な代謝経路は、脱ホウ素化、酸化、*N*-脱アルキル化、及び脱水素反応であった（概要表 2.6.5.11；添付資料番号 4.2.2.4-2）。イキサゾミブは、複数のチトクローム P450（CYP）分子種及び CYP 以外の蛋白によって代謝された（概要表 2.6.5.10 及び

2.6.5.11；添付資料番号 4.2.2.4-2、4.2.2.4-7 及び 4.2.2.4-8）。すなわち、10 μmol/L イキサゾミブの代謝に対する 7 種類の主要なヒト CYP 分子種の寄与率は、3A4（42.3%）、1A2（26.1%）、2B6（16.0%）、2C8（6.0%）、2D6（4.8%）、2C19（4.8%）、2C9（< 1%）であった（概要表 2.6.5.10；添付資料番号 4.2.2.4-8）。一方、0.1 μmol/L 及び 0.5 μmol/L のイキサゾミブを CYP 発現ミクロソーム及び CYP が発現していないコントロールミクロソームを用いて同一蛋白量で反応させると、イキサゾミブの消失速度と代謝物の生成速度は両ミクロソームで同程度であったことから、イキサゾミブの消失には主に CYP 以外の蛋白が関与すると考えられた（概要表 2.6.5.10；添付資料番号 4.2.2.4-8）。以上の結果から、臨床用量における血漿中濃度付近ではイキサゾミブの消失には主に CYP 以外の蛋白が関与しており、各種 CYP 選択的阻害剤による CYP を介した薬物間相互作用の影響は最小限であると考えられる。

ヒト肝細胞を用いた CYP 誘導試験においてイキサゾミブクエン酸エステルを最大 5000 ng/mL（9.67 μmol/L）まで曝露させたが、活性又はウェスタンブロット法で測定した蛋白量評価において CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4/5 誘導作用は認められなかった（概要表 2.6.5.12；添付資料番号 4.2.2.4-10）。イキサゾミブは、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 又は 3A4/5 活性を時間依存的及び可逆的に阻害しなかった[50%阻害濃度（IC_{50}）> 30 μmol/L、推定阻害定数（K_i）> 15 μmol/L]（概要表 2.6.5.12；添付資料番号 4.2.2.4-6、4.2.2.4-11 及び 4.2.2.4-12）。以上の結果からイキサゾミブが CYP 誘導作用又は阻害作用を介して薬物間相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。

[^{14}C]イキサゾミブクエン酸エステルをラットに経口投与したときの放射能の主排泄経路は糞であり、投与後 240 時間までに投与量の 26.42%が尿中に、60.22%が糞中に排泄された（概要表 2.6.5.13；添付資料番号 4.2.2.3-6）。[^{14}C]イキサゾミブクエン酸エステルを胆管ろう形成ラットに経口投与したとき、吸収されたイキサゾミブ及び由来成分は尿中及び胆汁中に同程度排泄されると考えられた（概要表 2.6.5.14；添付資料番号 4.2.2.3-6）。[^{14}C]イキサゾミブクエン酸エステルをイヌに経口投与したところ、放射能は尿中及び糞中に同程度排泄されることが示された（概要表 2.6.5.13；添付資料番号 4.2.2.3-7）。

ヒト肝細胞を用いた検討から、イキサゾミブは organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 及び OATP1B3 の基質でないことが示唆された（概要表 2.6.5.15.1；添付資料番号 4.2.2.6-1）。Caco-2 細胞及びトランスポーター発現細胞を用いて検討したところ、イキサゾミブは、100 μmol/L まで P-gp 及び breast cancer resistance protein（BCRP）の輸送活性を、10 μmol/L まで OATP1B1、OATP1B3、organic anion transporter (OAT) 1、OAT3、organic cation transporter (OCT) 2、multidrug and toxin extrusion (MATE) 1 及び MATE2-K の輸送活性をほとんど阻害しなかった（概要表 2.6.5.15.2 及び 2.6.5.15.3；添付資料番号 4.2.2.6-2、-3）。以上の結果からイキサゾミブが検討したトランスポーターの基質及び阻害を介して薬物間相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験

ラットにおいて最長 6 ヵ月間（7 サイクル）及びイヌにおいて最長 9 ヵ月間（10 サイクル）経口投与した結果、両方の動物種で類似した標的器官毒性が示された（概要表 2.6.7.5、2.6.7.6、2.6.7.7A、2.6.7.7B、2.6.7.7C、2.6.7.7F、2.6.7.7G 及び 2.6.7.7H；添付資料番号 4.2.3.1-2、4.2.1.3-3、

4.2.3.2-1、4.2.3.2-10、4.2.3.2-2、4.2.3.2-3、4.2.3.2-4、4.2.3.2-5、4.2.3.2-11、4.2.3.2-13 及び 4.2.3.2-15)。ラット及びイヌの両方における C_{max} 値及び血漿中 AUC 値は、概ね用量依存性を示すか又は用量比を下回って増加した。また、曝露量に明らかな性差は認められず、反復投与後にはわずかに蓄積がみられた(概要表 2.6.7.7B 及び 2.6.7.7G;添付資料番号 4.2.3.2-4 及び 4.2.3.2-13)。ラット及びイヌにおける用量制限毒性（DLT）は、主に胃腸系（GI）及びリンパ系における影響に起因していた。さらに、DLT の認められる投与量未満では、炎症反応と一致して白血球パラメータの変化がラット及びイヌの両方においてみられたが、交感神経節、後根神経節及び末端器官の神経節における神経細胞変性は経口投与後のイヌに限定されていた。

単回投与後の忍容性を示した投与量と、21 日間サイクル及び 28 日間サイクルの間欠的な反復投与で忍容性を示した投与量は、概ね各動物種間で類似していた（表 2.4.4-1）。

表 2.4.4-1　単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験における最大耐量

動物種	投与期間	MTD		C_{max} (ng/mL)[a]	AUC_{24} (ng·hr/mL)
		(mg/kg)	(mg/m^2)		
ラット	単回投与	1.0	6.0	ND	ND
	3 ヵ月	0.6	3.6	26.1	296
	6 ヵ月	0.8（雄）	4.8	62.1	252
		0.6（雌）	3.6	44.7	288
イヌ	単回投与	0.21	4.2	403	2140
	3 ヵ月	0.15	3.0	137	1260
	9 ヵ月	0.20	4.0	353	1870

AUC_{24} = 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度； MTD = 最大耐量；ND = 実施せず

a　ラット及びイヌの雌雄平均値

一般的に、ラット及びイヌを用いた GLP 準拠及び GLP 非準拠の経口投与毒性試験でみられた所見は、回復又は回復傾向が認められ、臨床においては定期的な観察によりモニタリングが可能であると考えられた。イキサゾミブによって引き起こされた顕著な毒性は、ボルテゾミブ投与後に従来観察されたものと一致しており[13]、さらに、イキサゾミブによって引き起こされた動物での神経障害はボルテゾミブで動物にみられるものと類似していた。この障害はボルテゾミブで治療を受けた患者で観察される末梢神経障害の原因であると思われる。なお、カルフィルゾミブ（別のプロテアソーム阻害薬）とは異なり[14]、イキサゾミブでは心肺毒性がないと考えられた。

ラット及びイヌを用いた静脈内投与毒性試験(期間は最長 5 サイクル)でみられた影響は、経口投与後にみられた毒性と概ね一致していたが(概要表 2.6.7.2、2.6.7.5、2.6.7.7D、2.6.7.7E、2.6.7.7I 及び 2.6.7.7J;添付資料番号 4.2.3.1-5、4.2.3.2-6、4.2.3.2-7、4.2.3.2-9、4.2.3.2-16、4.2.3.2-17、4.2.3.2-21）、静脈内投与の場合には程度の悪化、頻度の増加又は追加的な標的器官毒性がみられ、これは曝露量（C_{max} 及び AUC）が経口投与と比べて高いことに起因するものと推定された。静脈内投与での DLT は、主にラット及びイヌ共に消化管への影響及びリンパ球減少作用によるものであり、経口投与毒性試験と同様に、忍容性を示す投与量での他の標的器官の毒性は回復又は回復傾向が認められ、臨床ではモニタリング可能なものであると考えられた。

2.4.4.2 遺伝毒性試験

イキサゾミブは、細菌を用いた復帰突然変異試験では変異原性を示さなかった（概要表 2.6.7.8A；添付資料番号 4.2.3.3.1-1）。ボルテゾミブ及びカルフィルゾミブと同様に、イキサゾミブ（イキサゾミブクエン酸エステルとして添加もしくは投与）は、ヒト末梢血リンパ球（HPBL）を用いた in vitro 染色体異常試験では陽性であったが（概要表 2.6.7.8B；添付資料番号 4.2.3.3.1-2）、マウスを用いた骨髄小核試験では染色体異常を誘発せず（概要表 2.6.7.9A；添付資料番号 4.2.3.3.2-1）、マウスを用いて腺胃及び肝臓で tail DNA(%)を評価した in vivo コメット試験でも陰性であった（概要表 2.6.7.9B；添付資料番号 4.2.3.3.2-2）。以上の結果から、イキサゾミブは遺伝毒性リスクをもたないことが示された。

2.4.4.3 がん原性試験

ICH S9 に従い、がん原性試験は実施しなかった[3]。

2.4.4.4 生殖発生毒性試験

胚・胎児発生に関する毒性を評価するため、妊娠ラット及びウサギを用いて試験を実施した（概要表 2.6.7.11、2.6.7.13A、2.6.7.13B 及び 2.6.7.13C；添付資料番号 4.2.3.5.2-1、4.2.3.5.2-2、4.2.3.5.2-3 及び 4.2.3.5.2-4）。妊娠ラットを用いた用量設定試験において、胎児体重の減少、及び胎児生存率の低下傾向、及び着床後胚死亡率の増加がみられたが、これらの所見は最終確定試験では再現されなかった（ラットの胚・胎児に対する NOAEL ≥ 0.6 mg/kg、妊娠 15 日目の AUC_{72}[0 時間から 72 時間の AUC] = 1103 ng·hr/mL）（概要表 2.6.7.13A；添付資料番号 4.2.3.5.2-2）。

妊娠ウサギを用いて実施した用量設定試験において、イキサゾミブは、1 mg/kg の投与量で胚・胎児死亡及び着床後胚死亡をもたらしたが（妊娠 19 日目の AUC_{72} = 1340 ng·hr/mL）、これらの所見は、同じ投与量で実施した主要試験では明確には再現されなかった。主要試験では、≥ 0.3 mg/kg の投与量で胎児骨格の変異／異常（尾椎、腰椎数及び完全過剰肋骨）の増加が観察された（概要表 2.6.7.13B 及び 2.6.7.13C；添付資料番号 4.2.3.5.2-3 及び 4.2.3.5.2-4）。ウサギの胚・胎児発生に対する NOAEL は、0.1 mg/kg（妊娠 19 日目の AUC_{72} = 497 ng·hr/mL）であった（概要表 2.6.7.13C；添付資料番号 4.2.3.5.2-4）。

他のプロテアソーム阻害薬（ボルテゾミブ[13]及びカルフィルゾミブ[14]等）では、ラット及びウサギにおいて、母動物に軽微な毒性がみられる投与量で胚・胎児死亡が観察されている。イキサゾミブ及びこのクラスの他の薬剤のデータに基づくと、イキサゾミブはヒトにおいて胚・胎児に影響をもたらす可能性が考えられる。

2.4.4.5 局所忍容性試験

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験の一環として、経口投与後、イキサゾミブ及びイキサゾミブクエン酸エステルの局所忍容性を評価した。患者に投与した製剤はカプセル剤として製剤されたイキサゾミブクエン酸エステルであり、イキサゾミブクエン酸エステルは、pH 値が胃液と同じ値を示す場合であっても速やかに加水分解されてイキサゾミブとなることから（Section 2.3.S.3.1.2）、局所忍容性は、イキサゾミブクエン酸エステル及びイキサゾミブの両方の曝露に関連する。ラット及びイヌを用いた反復経口投与毒性試験の結果から、

イキサゾミブクエン酸エステル及びイキサゾミブには局所刺激性はないと予測される。なお、胃では局所刺激と思われる被験物質関連の有害影響は観察されなかった。

2.4.4.6 光毒性試験

マウス胎児由来の BALB/3T3 clone A31 細胞を用いた光毒性試験では、イキサゾミブは光毒性反応を引き起こさなかった（概要表 2.6.7.17；添付資料番号 4.2.3.7.7-1）。したがって、イキサゾミブは光毒性リスクをもたないと考えられる。

2.4.5 総括及び結論

毒性試験は、主に ICH S9 ガイダンス[3]に従って実施し、さらに、ICH M3（R2）[4]、S2（R1）[5]、M7 [6]、S7A [7]、S7B [8]及び S10[9] ガイダンスも考慮した。非臨床試験では、イキサゾミブの基本的な薬理、薬物動態及び毒性に関する特徴付けが十分に行われた。

2.4.5.1 薬理試験

イキサゾミブは、20S プロテアソームの β5 サブユニットに対する強力、可逆的かつ選択的な阻害薬である。培養細胞にイキサゾミブを添加すると、4 x Ub-Luc レポーターが安定化し、NF-κB-ルシフェラーゼレポーターが阻害され、ユビキチン化蛋白が蓄積し、UPR が増加し、さらにアポトーシスが促進されることからも明らかなように、プロテアソーム活性を阻害し、その結果としてその蛋白質の恒常性に影響を及ぼす。イキサゾミブの添加により、様々なヒト骨髄腫培養細胞株又は初代ヒト骨髄腫細胞の生存率が抑制され、また in vitro では、骨髄微小環境を反映する細胞に作用を示すことが示された。イキサゾミブは、内皮細胞を用いた in vitro の毛細血管形成試験で抗血管新生作用を示し、また、in vitro で骨芽細胞形成及び骨芽細胞活性を促進し、破骨細胞形成及び破骨細胞による骨吸収を阻害した。in vitro では、生存率試験で評価した 4 種の MM 細胞株の内の 2 種で、イキサゾミブとレナリドミドとの間の相乗効果が検出され、残りの 2 種では併用の相加効果がみられた。

in vivo で、ヒト MM.1S 多発性骨髄腫移植マウスモデルにおいて、イキサゾミブを経口投与及び静脈内投与したところ、その両方でイキサゾミブは薬力学的活性及び抗腫瘍活性を示した。イキサゾミブを投与すると、3 種類の PCM 関連マウスモデル、すなわち、デノボ PCM マウスモデルである iMyc$^{C\alpha}$/Bcl-X_L GEM モデル、DP54-Luc iMyc$^{C\alpha}$/Bcl-X_L マウス細胞株の静脈接種によって作成された PCM 播種マウスモデル、及び DP54-Luc iMyc$^{C\alpha}$/Bcl-X_L の脛骨内接種によって作成された脛骨内接種 PCM マウスモデルにおいて顕著な抗腫瘍活性が観察された。デノボ PCM マウスモデルでは、イキサゾミブ及びボルテゾミブ投与により、全生存期間の延長、脾腫の縮小、IgG2a レベルの低下がみられた。PCM 播種マウスモデル及び脛骨内接種 PCM マウスモデルでは、イキサゾミブ及びボルテゾミブの両方において腫瘍量が減少したが、イキサゾミブだけが PCM 播種マウスモデルにおいて溶骨性病変（頭蓋縫合の離開）を顕著に減少させた。

in vitro と in vivo の両方における非臨床安全性薬理試験及び評価では、心血管系、呼吸器系及び神経系に対する影響は、顕微鏡検査で検出された神経細胞傷害に限定されるものであり、主としてイヌでは、まれに神経学的臨床徴候を伴うことが示された。イキサゾミブに関連する顕微鏡検査で検出された神経細胞傷害は、プロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブでも

報告されており、この傷害はボルテゾミブ投与患者の末梢神経障害との関連が認められている。一方、イキサゾミブは、プロテアソーム阻害薬であるカルフィルゾミブ[14]で報告されていた血圧低下や心拍数上昇などの影響を引き起こさなかった。イキサゾミブに関する全般的な安全性薬理試験データから、患者に循環器系、呼吸器系又は中枢神経系に関連する安全上の影響が発生する可能性は低いものの、末梢神経系に対する影響が発生する可能性があることが示された。

2.4.5.2 薬物動態試験

イキサゾミブクエン酸エステルを血漿に添加すると、速やかにイキサゾミブに加水分解されることが in vitro 試験で示された。

イキサゾミブのラット及びイヌにおける経口 F はそれぞれ 41.1%及び 72.2%であった。Caco-2 細胞を用いた検討から、イキサゾミブは P-gp の基質であることが示唆された。また、イキサゾミブは中程度の膜透過性を有した。イキサゾミブ又はイキサゾミブクエン酸エステルを反復投与したときの薬物動態は概ね線形であり、反復投与によりやや増加する傾向が認められた。イキサゾミブ及びその由来成分はラット組織中に広範に分布した。マウス、ラット、イヌ及びヒト血漿中での蛋白結合率は 81.9～94.4%と中程度から高値を示し、ヒト血漿中ではおもに HSA に結合することが明らかとなった。またマウス、ラット、イヌ及びヒト血液中での血球移行率は高く、高濃度では移行率の減少が認められた。

イキサゾミブクエン酸エステルをラット及びイヌに経口投与したときの血漿中の主成分はイキサゾミブであった。また投与されたイキサゾミブクエン酸エステルの一部はイキサゾミブとして排泄されるものの、大部分はイキサゾミブからさらに代謝された後に排泄されると考えられた。

イキサゾミブのヒト生体試料を用いた in vitro 試験では、臨床血漿中濃度付近（0.1 μmol/L）において、CYP 以外の蛋白が関与する消失が認められ、主にこれらがイキサゾミブの代謝に関与していると考えられた。7 種の CYP 発現ミクロソームを用いた in vitro 代謝試験で、イキサゾミブ（10 μmol/L）の代謝には主に CYP3A4 や CYP1A2 が関与していると考えられた。

イキサゾミブは CYP1A2、2B6、3A4/5 活性をいずれも誘導せず、また CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、3A4/5 のいずれに対しても、時間依存的にも可逆的にも活性を阻害しなかった。

[^{14}C]イキサゾミブクエン酸エステルを経口投与したときの主排泄経路はラットにおいては糞であり、イヌでは尿中及び糞中に同程度排泄された。

ヒト肝細胞を用いた検討から、イキサゾミブは OATP1B1 及び OATP1B3 の基質でないことが示唆された。Caco-2 細胞及びトランスポーター発現細胞を用いて検討したところ、イキサゾミブは、100 μmol/L まで P-gp 及び BCRP の輸送活性を、10 μmol/L まで OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の輸送活性をほとんど阻害しなかった。

2.4.5.3 毒性試験

複数の動物種（マウス、ラット、ウサギ及びイヌ）を用いて GLP 準拠及び非準拠での一連の毒性試験を実施した。これらの試験には、単回経口・静脈内投与毒性試験及び反復経口・静脈内投与毒性試験（経口投与毒性試験の最長継続期間はラットでは 6 ヵ月間、イヌでは 9

ヵ月間）、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験、並びに in vitro 光毒性試験が含まれている。これらの試験ではヒトにおける臨床スケジュールよりも高頻度（21 日サイクル）又はそれと同一（長期試験の場合 28 日サイクル）の周期的な間欠投与スケジュールを採用した反復投与毒性試験を実施した。

死亡を含む DLT は、胃腸毒性（体重減少、下痢及び／又は嘔吐などの臨床徴候、並びに、炎症、粘膜／上皮過形成、好中球浸潤、単細胞壊死、潰瘍及び／又は腸障害の病理組織学的検査所見）及びリンパ球毒性（細胞減少、単細胞壊死）によるものであった。MTD は、単回投与と反復投与との間、及びラットとイヌとの間で概ね類似していたが（体表面積ベース）、AUC ベースではイヌの方が高い耐性を示す傾向があった。

ラット及びイヌにおける主な標的器官は胃腸及びリンパ組織であり、イヌでは神経組織も重要な標的であった。一般状態観察及び病理組織学的検査で検出される胃腸への影響は、ラットとイヌとの間で類似していた。両方の動物種における胃腸に関連する他の所見は、腸の炎症、並びに、白血球、好中球、リンパ球、単球、好塩基球、好酸球及び／又はフィブリノゲンのいずれか一つ以上の増加であった。ラット及びイヌの両方の動物種における、耐用量でのリンパ系への影響は、耐用量以上で観察された影響と類似しており、発現率及び重症度において概ね用量依存性が認められた。

神経細胞変性は、主にイヌにみられ、経口投与量 ≥0.10 mg/kg（1、4、8 及び 11 日目に投与する 21 日/サイクル）では、交感神経節、後根神経節、末梢の自律神経（唾液腺）、及び末端器官神経節の軽微から軽度の神経細胞変性、並びに、脊髄後索の上行路及び末梢神経における軽微で二次的な軸索／神経線維の変性がみられた。まれに、病理組織学的所見は、運動失調、開脚歩行、及び反射反応の減少という臨床徴候と相関していた。臨床と同じ投与スケジュール（28 日/サイクルの 1、8 及び 15 日目投与）とした 9 ヵ月間試験（10 サイクル）では、神経について同様の病理組織学的所見が、主に 0.2 mg/kg（AUC_{24} = 1870 ng·hr/mL）で観察された。神経行動学的機能評価では、神経機能の変化は検出されなかった。

胃腸、リンパ球及び神経細胞についての大部分の所見は、後根神経節及び脊髄における所見を除き、休薬期間後に回復又は回復傾向が認められた。休薬後には末梢神経節に持続的な神経細胞変性が存在せず、神経線維及び軸索に二次的な退行性変化しか存在しなかったことは、休薬後は持続的な毒性がないことを示している。

さらに、イキサゾミブは遺伝毒性リスクを持つとは考えられず、胚・胎児発生に及ぼす影響は母体に毒性をもたらす投与量の場合にのみ観察された。

2.4.5.4 全般的結論

イキサゾミブの薬理プロファイルの特性を in vitro 及び in vivo 試験で徹底的に評価した。これらの試験により、イキサゾミブが、20S プロテアソームの β5 サブユニットに対して強力、可逆的かつ選択的な阻害薬であることが実証された。

非臨床薬物動態試験の結果、イキサゾミブは、容認可能な薬物動態プロファイルを有することが明らかとなった。ラット及びイヌにおけるイキサゾミブの経口バイオアベイラビリティ（F）はそれぞれ 41.1%及び 72.2%であった。またラット及びイヌに投与されたイキサゾミブクエン酸エステルの大部分はイキサゾミブからさらに代謝された後に排泄されると考えら

れた。CYP 基質、個々の選択的 CYP 阻害薬、トランスポーター基質又はトランスポーター阻害薬とイキサゾミブとの薬物間相互作用のリスクは低いと考えられた。

一連の非臨床試験において、イキサゾミブの毒性を評価した。イヌ及びラットにおける標的は、経口若しくは静脈内投与後では胃腸系、リンパ系、骨髄系及び神経系であり、末梢神経系を除き、静脈内投与後に重篤度又は頻度がやや高い傾向が認められた。これらの影響は、投与量、全身曝露量、及び投与頻度（1 サイクル内での投与回数及びサイクル数）と関連しており、概して回復又は回復傾向が認められた。またこれら毒性はプロテアソーム阻害作用により予想されるものであった。

表 2.4.5-1 に記載の曝露量における安全マージン（AUC 値に基づくと、ラットで 0.45 倍、イヌで 1.8 倍）、毒性の可逆性、患者の毒性を定性的に予測しモニタリングできること、及びイキサゾミブ治療の有益な効果が見込まれることを考慮すると、再発又は難治性の MM 患者におけるイキサゾミブの使用を妨げる所見は、イキサゾミブの非臨床毒性評価では存在せず、また、追加の非臨床毒性試験は必要ないと考えられた。

表 2.4.5-1　ラット（7 サイクル）、イヌ（10 サイクル）、及びヒトへの経口投与後のイキサゾミブに対する全身曝露量の比較

動物種	用量 (mg/kg)	用量との関連	イキサゾミブに対する全身（血漿）曝露量 [a]	
			C_{max} の平均値 (ng/mL)	AUC の平均値 [b] (ng·hr/mL)
ラット [c]	0.2	NOAEL	5.99	483
イヌ [d]	0.10	NOAEL	136	1940
ヒト [e]	0.057 [f]	N/A	37.0	1080

AUC = 血漿中濃度時間曲線下面積；C_{max} = 最高血漿中濃度；N/A = 該当しない；NOAEL = 無毒性量

a　データは雌雄又は男女を合計して得た値。

b　値は、ラット、イヌ及びヒトの 0 時間から 168 時間までの AUC（AUC_{168}）を示す。

c　添付資料番号 4.2.3.2-5。

d　添付資料番号 4.2.3.2-15。

e　28 日サイクルの 3 週間にわたる週 1 回のイキサゾミブの経口投与後のヒト曝露量;値は 15 日目のパラメータを示す。データは臨床試験 C16004、C16005 及び C16007 から収集。n = 56（C_{max}）；n = 42（AUC_{168}）

f　用量 4 mg、体重 70 kg の患者に基づく。

非臨床試験では、イキサゾミブの基本的な薬理、薬物動態及び毒性に関する特徴付けが十分に行われ、再発又は難治性の MM 患者におけるイキサゾミブの使用を支持していると考えられる。

2.4.6 参考文献一覧

[1] Kupperman E, Lee EC, Cao Y, Bannerman B, Fitzgerald M, Berger A, Yu J, et al. Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. Cancer Res 2010 Mar 1; 70(5): 1970-80.

[2] Reddy N, Czuczman MS. Enhancing activity and overcoming chemoresistance in hematologic malignancies with bortezomib: preclinical mechanistic studies. Ann Oncol. 2010;21(9):1756-64.

[3] Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals S9. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2009.

[4] Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2009.

[5] Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2008.

[6] Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2014.

[7] Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals S7A. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2000.

[8] The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals S7B. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

[9] Photosafety evaluation of pharmaceuticals S10. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2012.

[10] Article 43. The Pharmaceutical Affairs Law, Enforcement Ordinance and Enforcement Regulations 2005/07. 2007; 167.

[11] Cheung WC, Kim JS, Linden M, Peng L, Van Ness B, Polakiewicz RD, et al. Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. J Clin Invest. 2004;113(12):1763-73.

[12] Boylan KL, Gosse MA, Staggs SE, Janz S, Grindle S, Kansas GS, et al. A transgenic mouse model of plasma cell malignancy shows phenotypic, cytogenetic, and gene expression heterogeneity similar to human multiple myeloma. Cancer Res. 2007;67(9):4069-78.

[13] Bross BF, 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(12 Pt 1):3954-64.

[14] Herndon TM, Deisseroth A, Kaminskas E, Kane RC, Koti KM, Rothmann MD, et al. US Food and Drug Administration approval: carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2013;19(17):4559-63.