プララトレキサート

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.4　非臨床試験の概括評価

ムンディファーマ株式会社

目次

1 非臨床試験計画概要 8
2 薬理試験 9
2.1 作用機序 9
2.2 効力を裏付ける試験 11
2.2.1 *In vitro* 試験 11
2.2.2 *In vivo* 試験 12
2.2.3 ジアスレテオマー及び不純物の薬理学的プロファイル 12
2.3 副次的薬理試験 12
2.4 安全性薬理試験 13
2.4.1 中枢神経系 13
2.4.2 心血管系 13
2.4.3 呼吸器系 13
2.5 薬力学的薬物相互作用 14
3 薬物動態 14
3.1 分析法 14
3.1.1 生体試料分析法 14
3.2 吸収 14
3.3 分布 15
3.4 代謝 16
3.5 排泄 16
3.6 薬物動態学的薬物相互作用 16
4 毒性試験 17
4.1 単回投与毒性試験 17
4.2 反復投与毒性試験 18
4.2.1 ラット 6 ヵ月間反復投与毒性試験 18
4.2.2 イヌ 9 ヵ月間反復投与毒性試験 18

4.3　遺伝毒性試験 20
4.4　がん原性試験 20
4.5　生殖発生毒性試験 20
4.5.1　受胎能及び初期胚発生試験 20
4.5.2　胚・胎児発生に関する試験 20
4.5.2.1　ラット胚・胎児発生に関する試験 20
4.5.2.2　ウサギ胚・胎児発生に関する試験 21
4.5.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 21
4.5.4　幼若動物における試験 21
4.6　局所刺激性試験 21
4.7　その他の毒性試験 22
4.7.1　免疫毒性試験 22
4.7.2　代謝物の毒性試験 22
4.7.3　不純物及び分解生成物の評価 22
4.7.4　光安全性に関する試験 23
4.8　全身曝露 23
5　考察及び結論 24
6　参考文献 25

表目次

表 2.4- 1　プララトレキサートのラット及びイヌ反復投与試験並びに臨床試験における
NOAEL 又は MTD での PK パラメーターの比較 24

図目次

図 2.4- 1　プララトレキサートの構造式.....8

図 2.4- 2　葉酸代謝とジヒドロ葉酸還元酵素阻害.....10

略語一覧

略号	日本語	英語
λ	血漿中濃度-時間プロファイルの消失相における傾き（消失速度定数）	negative slope of the log-linear apparent terminal phase of the plasma concentration-time profile
ara-C	シタラビン	cytarabine
AUC	濃度－時間曲線下面積	area under the concentration time curve
AUC_{inf}	時間 0 から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積	area under the concentration time curve from time 0 to infinity
BCRP	乳がん耐性タンパク質	breast cancer resistance protein
c_i	採取 i 回目の血漿中濃度	concentration in the i-th sample
CL_{nonren}	腎外クリアランス	non-renal clearance
CL_{ren}	腎クリアランス	renal clearance
CL_{tot}	全身クリアランス	total clearance
C_{max}	最高血漿中濃度	maximum plasma concentration
c_t	定量可能最終時点の濃度	last quantifiable concentration
CYP	シトクロム P450	cytochrome P450
DHF	ジヒドロ葉酸	dihydrofolate
DHFR	ジヒドロ葉酸還元酵素	dihydrofolate reductase
DLT	用量制限毒性	dose limiting toxicity
DNA	デオキシリボ核酸	deoxyribonucleic acid
dTMP	デオキシチミジン一リン酸	deoxythymidine monophosphate
ECG	心電図	electrocardiogram
fe	尿中未変化体排泄率	fraction of drug excreted unchanged in urine
FPGS	ホリルポリグルタミン酸合成酵素	folylpolyglutamyl synthetase
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
Gem	ゲムシタビン	gemcitabine
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子	human ether-a-go-go-related gene
IC_{50}	50%阻害濃度	half maximum inhibitory concentration
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議	International Conference on Harmonisation
K_m	ミカエリスメンテン定数	Michaelis-Menten constant
Ki	阻害定数	inhibition constant
LC/MS/MS	高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー	high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

略語一覧（続き）

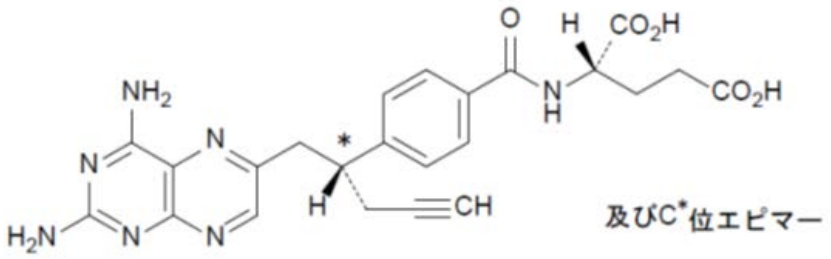
略号	日本語	英語
MCASE	-	Multi-Computer Automated Structure Evaluation
MEC	モル吸光度係数	molar extinction coefficient
MPCE	多染性赤血球	micronucleated polychromatic erythrocyte
MRP	多剤耐性関連タンパク質	multidrug resistance associated protein
MRT_{sys}	平均体内滞留時間	systemic mean residence time
[redacted]	-	[redacted]
MTD	最大耐量	maximum tolerated dose
MTX	メトトレキサート	methotrexate
NCI	アメリカ国立癌研究所	National Cancer Institute
NHL	非ホジキンリンパ腫	non-Hodgkin’s lymphoma
NOAEL	無毒性量	no observed adverse effect level
OAT	有機アニオントランスポーター	organic anion transporter
OATP	有機アニオントランスポータータンパク	organic anion transporting polypeptide
OCT	有機カチオントランスポーター	organic cation transporter
PBS	リン酸緩衝生理食塩水	phosphate-buffered saline
PK	薬物動態	pharmacokinetic(s)
P-gp	P-糖タンパク質	P-glycoprotein
PTCL	末梢性 T 細胞リンパ腫	peripheral T-cell lymphoma
RFC-1	還元型葉酸キャリア-1	reduced folate carrier-1
RNA	リボ核酸	ribonucleic acid
SD	-	Sprague-Dawley
SPE	固相抽出	solid-phase extraction
$t_{1/2}$	消失半減期	estimate of the terminal elimination half-life of the drug calculated by dividing the natural log of 2 by the terminal elimination rate constant (λz)
THF	テトラヒドロ葉酸	tetrahydrofolate
ti	採取 i 回目の投薬後の時間	time of the i-th sample from dosing
T_{inf}	点滴持続時間	injection/infusion time
TK	トキシコキネティクス	toxicokinetics
Vd_{ss}	定常状態の分布容積	volume of distribution at steady state

1　非臨床試験計画概要

プララトレキサート（*N*-{4-[(2*RS*)-1-(2,4-Diaminopteridin-6-yl)pent-4-yn-2-yl]benzoyl}-L-glutamic acid）は、メトトレキサート（MTX）の 10-デアザアミノプテリン誘導体である。プララトレキサートは MTX と同様、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）阻害作用を介して葉酸代謝を阻害し、細胞障害活性を示す抗腫瘍性葉酸アナログである。そのため、様々な種類のがん治療に有効であると考えられる。

プララトレキサートは、炭素 10 位及び炭素 19 位に不斉中心を有し、炭素 10 位の立体化学（*RS* 配位）が異なる約 1：1 のジアステレオマー混合物であり、[redacted]が炭素 19 位の不斉中心での *S*-アイソマーである（図 2.4- 1）。炭素 10 位での各ジアステレオマーを PDX-10a（*S*-ジアステレオマー）及び PDX-10b（*R*-ジアステレオマー）とした。

図 2.4- 1　プララトレキサートの構造式



分子量: 477.47
分子式: $C_{23}H_{23}N_7O_5$

プララトレキサート注射剤（20 mg/mL）は、再発又は難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫（PTCL）の治療を目的としている。プララトレキサート注射剤は PTCL に対して、30 mg/m^2 を週 1 回、3～5 分かけて 6 週連続静脈内投与した後 1 週休薬とする 7 週間を 1 サイクルとして投与される。副作用が現れた場合は、20 mg/m^2/週まで減量できる。

プララトレキサートの非臨床試験が、薬理学的、薬物動態（PK）学的及び毒性学的データを得るために *in vitro* 及び *in vivo* モデルを用いて行われた。

効力を裏付ける試験は、様々なヒト腫瘍細胞株を用いた *in vitro* 細胞障害試験及び *in vivo* 腫瘍モデル（ヒト腫瘍異種移植マウス）を用いて検討された（本項 2.2 章）。また、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従い、ラットでの中枢神経系、*in vitro* イヌ摘出プルキンエ線維の活動電位、並びにイヌでの心血管系及び呼吸器系に対する安全性薬理試験が実施された（本項 2.4 章）。さらに、非 GLP 試験ではあるが、ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）のカリウム電流に対する作用の検討が実施された。

プララトレキサートの PK が、臨床投与スケジュール及び投与経路を用い、ラット及びイヌで単回投与 PK 試験、並びに GLP に従った反復投与トキシコキネティクス（TK）試験で検討された（本項 3.2 章）。プララトレキサートの組織分布及び排泄は、ラットにおけるマスバランス試験において検討された（本項 3.3 章）。

包括的な毒性試験プログラムが GLP に従って実施された。これらの試験は、PTCL に対する臨床におけるプララトレキサートの投与経路及び投与スケジュールを考慮して行われた。実施された試験は以下の通り；ラット及びイヌにおける単回及び反復投与毒性試験（本項 4.1 及び 4.2 章）、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験（本項 4.3 章）、ラット及びウサギにおける生殖発生毒性試験（胚・胎児発生に関する試験）（本項 4.5.2 章）、並びにラットにおける局所刺激性試験（本項 4.6 章）。

プララトレキサートの主な分解生成物である　　不純物A*　　の試験が、腫瘍細胞株を用いた *in vitro* 試験及びイヌにおける *in vivo* 試験で実施された（本項 2.2.3 及び 4.7.3 章）。

2　薬理試験

種々の腫瘍細胞を用いた *in vitro* 細胞障害試験及び *in vivo* 腫瘍モデル（ヒト腫瘍異種移植マウス）によるプララトレキサートの効力を裏付ける試験、並びに日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A ガイドラインに基づいたプララトレキサートの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する安全性薬理試験が行われた。

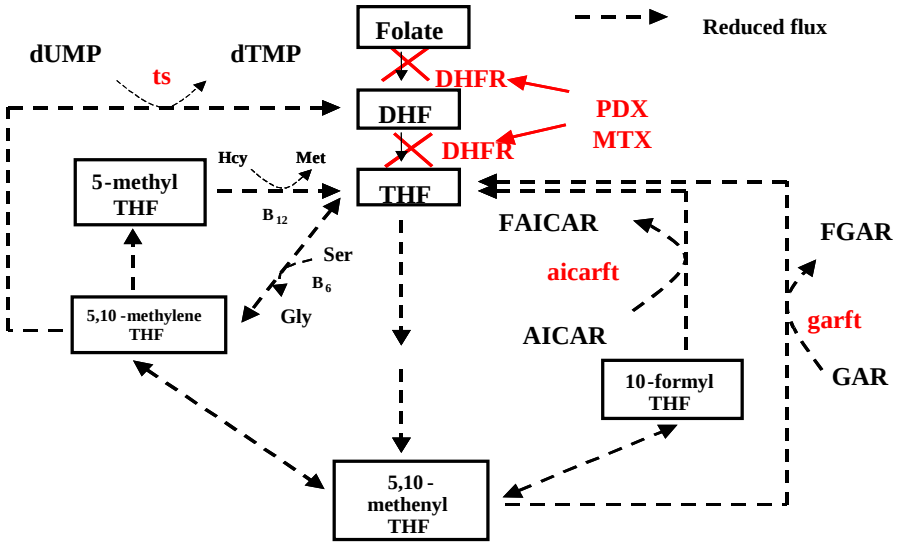
2.1　作用機序

葉酸は、細胞周期に重要である多くの代謝反応における一炭素基の担体として機能する（図 2.4-2）。葉酸は、ジヒドロ葉酸（DHF）へ還元され、さらにテトラヒドロ葉酸（THF）へと還元される。

葉酸及び DHF の還元は、いずれも DHFR により触媒される。THF は多くのアミノ酸の合成及び異化、クレアチン及びコリンの形成、プリンの合成、リボ核酸（RNA）のメチル化及びデオキシチミジン一リン酸（dTMP）の合成に必要であり、したがって、デオキシリボ核酸（DNA）の合成に必要である。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

図 2.4- 2　葉酸代謝とジヒドロ葉酸還元酵素阻害



DHF = dihydrofolate, DHFR = dihydrofolate reductase, THF = tetrahydrofolate, PDX = pralatrexate, MTX = methotrexate, ts = thymidylate synthase, dUMP = deoxyuridine monophosphate, dTMP = deoxythymidine monophosphate, B_6 = vitamin B_6, B_{12} = vitamin B_{12}, Hcy = homocysteine, Met = methionine, Ser = serine, Gly = glycine, AICAR = 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-ß-D ribofuranoside, FAICAR = 5-formamidoimidazole-4-carboxamide 1-ß-D-ribofuranoside, aicarft = AICAR formyl transferase, GAR = glycinamide ribonucleotide, FGAR = formyl GAR, garft = glycinamide ribonucleotide formyl transferase

葉酸の代謝経路は DNA 前駆体（プリン類及び dTMP）の合成に重要であり、同代謝経路が完全に解明される以前から抗がん剤研究のターゲットであった［1］。60 年もの長い間、食事療法による葉酸欠乏が、がん治療として研究されてきた。葉酸の構造解明により、食事療法よりも容易に葉酸の欠乏をもたらすことができる葉酸アナログが合成・開発された。初の葉酸誘導体であるアミノプテリンは、このクラスの薬剤で初めて、小児白血病における臨床試験で有意な作用を示した。アミノプテリンは毒性のためすぐにその 10-メチル誘導体である MTX に代替された。MTX は 50 年以上前に抗がん剤として開発され、白血病、乳がん、頭部及び頸部がん並びに膀胱がんを含む様々ながんの治療に用いられてきた。

天然葉酸と同様に、葉酸アナログは還元型葉酸キャリア-1（RFC-1）により細胞内に取り込まれ、ホリルポリグルタミン酸合成酵素（FPGS）によるポリグルタミン酸化の基質となる。MTX 及びそのポリグルタミン酸代謝物、並びにその他の葉酸アナログは DHFR を主な標的とする。これらの葉酸誘導体は DHFR に可逆的に結合・阻害し、細胞内にプールされたプリン類及び dTMP を枯渇させる。プリン類及び dTMP の枯渇は、最終的に細胞分裂時の DNA 複製を阻害し、腫瘍細胞の増殖を抑制する。

抗腫瘍活性、安全性及び活性スペクトルが改善された新規の葉酸誘導体の発見が注目され、MTX の 10-デアザアミノプテリン誘導体であるプララトレキサートが開発された。MTX と比較して、プララトレキサートは RFC-1 に対してより高い親和性を有し、また FPGS によるポリグルタミン酸化のより良好な基質である。プララトレキサートは、急性リンパ芽球性白血病細胞（CCRF-CEM）において、MTX より 14 倍以上の速度で効率的に細胞内に取り込まれ、また、10

倍以上の速度でポリグルタミン酸化される（Sirotnak et al 1998；2.6.2.2.2.2 項）。これら 2 つの改良により、プララトレキサートの細胞内取り込み量は増加し、ポリグルタミン酸化を受けた代謝物が効率的に生成されて細胞内に薬剤をより滞留させる。その結果、プララトレキサートは種々の腫瘍細胞株において MTX よりも強力な *in vitro* 細胞増殖阻害作用を示すと考えられる（Sirotnak et al 1998；2.6.2.2.2.2 項及び Wang et al 2003；2.6.2.2.2.3 項）。

今回得られた一連の薬効薬理試験結果から、MTX と比較してより効率的なプララトレキサートの細胞内取り込み及びポリグルタミン酸化により、プララトレキサートは各種 *in vitro* 及び *in vivo* 腫瘍モデルにおいて MTX より強力な腫瘍細胞増殖阻害作用を発現するという仮説が裏付けられた。

2.2　効力を裏付ける試験

種々の腫瘍細胞を用いた *in vitro* 細胞障害試験及び *in vivo* 腫瘍モデル（ヒト腫瘍異種移植マウス）によるプララトレキサートの効力を裏付ける試験が実施された。

2.2.1　*In vitro* 試験

検討したアメリカ国立癌研究所（NCI）腫瘍株 53 種のうち固形腫瘍株 36 種（68%）を含む広範なスペクトルのヒト腫瘍細胞株に対し、プララトレキサートは著明な細胞増殖阻害作用を示した。各種リンパ腫細胞株においてもプララトレキサートは作用を示した（試験番号 PDX-P-06069-U；2.6.2.2.2.1 項）。

プララトレキサートは、CCRF-CEM 細胞において、MTX より 14 倍以上の速度で効率的に RFC-1 を介して細胞内に取り込まれ、また 10 倍以上の速度で FPGS によりポリグルタミン酸化されることが示された（Sirotnak et al 1998；2.6.2.2.2.2 項）。プララトレキサートの細胞内取り込み量が増加し、ポリグルタミン酸化を受けた代謝物が効率的に生成されて細胞内に薬剤をより滞留させる結果、プララトレキサートは種々の腫瘍細胞株において MTX よりも強力な *in vitro* 細胞増殖阻害作用を示すと考えられる。

形質転換濾胞性リンパ腫細胞（RL）、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫細胞（HT 及び SKI-DLBCL-1）、バーキットリンパ腫細胞（Raji）及びホジキンリンパ腫細胞（Hs445）の 5 種のヒトリンパ腫細胞株の全てにおいて、プララトレキサートは MTX より約 10 倍強い作用を示した（Wang et al 2003；2.6.2.2.2.3 項）。

SKI-DLBCL-1 細胞に対する *in vitro* 細胞障害試験において、プララトレキサートは単剤と比較してゲムシタビン（Gem）との併用でより強い作用を示した。また、プララトレキサート処理後の Gem 処理は、MTX 処理後のシタラビン（ara-C）処理を含むいずれの併用よりも強い作用を示すことが示された。（Toneret al 2006；2.6.2.2.2.4 項）。

一方、プララトレキサートは正常ヒト初代培養肝細胞に対して細胞障害作用を示さなかった（試験番号 PDX-K-06020-U；2.6.2.2.2.5 項及び試験番号 PDX-K-08060-U；2.6.2.2.2.6 項）。

2.2.2　*In vivo* 試験

各種 *in vivo* 腫瘍モデル（ヒト腫瘍異種移植マウス）において、プララトレキサートは MTX より優れた作用を示した（2.6.2.2.3 項）。

プララトレキサートの腫瘍増殖阻害作用は 1 日 1 回 5 日間投与から、週 2 回投与及び週 1 回投与の投与スケジュールで認められ、投薬の柔軟性を必要とする他のがん治療薬との併用療法にプララトレキサートは適していることが示唆された（試験番号 PDX-P-03002-M；2.6.2.2.3.3 項）。

MTX はアグレッシブ非ホジキンリンパ腫（NHL）の治療で積極的に使用される。プララトレキサートは 3 種のヒト NHL 細胞（RL、HT 及び SKI-DLBCL-1）異種移植モデルにおいて MTX より顕著に優れた作用を示した（Wang et al 2003；2.6.2.2.3.1 項）。

SKI-DLBCL-1 NHL モデルにおいてプララトレキサートと Gem の併用投与試験を実施し、標準療法である ara-C+MTX の併用効果と比較した。プララトレキサート単剤投与は、MTX 及び ara-C の単剤又はこれらの併用投与よりも優れた腫瘍増殖阻害作用を示した。さらに、プララトレキサートと Gem の併用投与では、単剤又は MTX を含むいずれの組み合わせの併用投与の中で最も強い腫瘍増殖阻害作用を示し、*in vitro* 細胞障害試験と同様の結果が得られた（Toner et al 2006；2.6.2.2.3.2 項）。

2.2.3　ジアステレオマー及び不純物の薬理学的プロファイル

ヒト前立腺がん細胞（CWR22-RV1）を用いた *in vitro* 細胞障害試験において、プララトレキサートのジアステレオマーである PDX-10a 及び PDX-10b は、プララトレキサートと同程度の作用を示した［50%阻害濃度（IC_{50}）値：8～13 nmol/L］（試験番号 PDX-P-05071-U；2.6.2.6.1 項）。

プララトレキサートの主な分解生成物である　不純物A*　及びプララトレキサートの細胞増殖阻害作用を 5 種のヒト腫瘍細胞株で評価した（試験番号 PDX-P-08068-U；2.6.2.6.2 項）。プララトレキサートは 5 細胞株中 4 株で強力な増殖阻害作用を示したのに対して（IC_{50} 値：7～54 nmol/L）、　不純物A*　は全ての細胞株で明らかに弱い作用であった（IC_{50} 値：>1300 nmol/L）。したがって、プララトレキサート製剤中で少量含まれる　不純物A*　（規格値：[redacted]）は、プララトレキサートの *in vivo* 活性に寄与しないと考えられる。

2.3　副次的薬理試験

MTX は関節リウマチの治療にも使用されている。ラット II 型コラーゲン誘発関節炎モデルを用いて、プララトレキサートの抗炎症作用を MTX と比較したところ、プララトレキサートは MTX と類似の作用を示した（試験番号 PDX-P-06031-R；2.6.2.3 項）。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

2.4　安全性薬理試験

プララトレキサートの安全性薬理試験が、ICHS7A ガイドラインに基づき実施された（2.6.2.4 項）。中枢神経系、心血管系又は呼吸器系に対するプララトレキサートの直接作用はみられなかった。

2.4.1　中枢神経系

Sprague-Dawley（SD）ラットを用いた中枢神経系に対する安全性評価試験では、25 mg/kg までのプララトレキサートの単回静脈内投与で神経学的な毒性所見はみられなかった（試験番号 PDX-T-07037-R；2.6.2.4.1 項）。プララトレキサート投与群の機能的観察総合評価及び自発運動量測定による神経行動学的及び機能的評価は、投与前並びに投与後 5 分及び 24 時間で対照群と類似していた。

2.4.2　心血管系

プララトレキサートは、主要な海外第 2 相試験（PDX-008 試験；2.7.2.3.2 項）で観察された最高血漿中濃度（C_{max}）より 10 倍以上高い濃度で hERG カリウム電流を抑制しなかった（試験番号 PDX-T-05018-H；2.6.2.4.2.1.1 項）。さらに、プララトレキサートは臨床における C_{max} の約 75 倍高い濃度でイヌ摘出プルキンエ線維の活動電位パラメーターに影響を及ぼさなかった（試験番号 PDX-T-04005-D；2.6.2.4.2.1.2 項）。

テレメトリー装着の覚醒雌雄ビーグル犬における心血管系に対する安全性評価試験において、プララトレキサートは 0.7 mg/kg［14 mg/m^2、最大耐量（MTD）］までの静脈内投与で心血管パラメーター（心拍数並びに収縮期、拡張期及び平均動脈圧）、心電図（ECG）パラメーター（PR 間隔、QRS 幅、RR 及び QT/QTc 間隔）及び体温に影響を及ぼさなかった（試験番号 PDX-T-07036-D；2.6.2.4.2.2 項）。これらの所見は、プララトレキサートが心血管系に重要な影響を与えないことを示唆する。

2.4.3　呼吸器系

テレメトリー装着の覚醒雌雄ビーグル犬を用いた心血管系に対する安全性評価試験（2.6.2.4.2.2 項）では、呼吸器系に対する作用も同時に検討した。プララトレキサートは 0.7 mg/kg（14 mg/m^2、MTD）までの静脈内投与で、呼吸器機能（血中酸素飽和度及び終末呼気 CO_2 濃度）及び呼吸数に影響を及ぼさなかった（試験番号 PDX-T-07036-D；2.6.2.4.3 項）。

2.5　薬力学的薬物相互作用

SKI-DLBCL-1 NHL 細胞を用いた *in vitro* 細胞障害試験及び異種移植マウスモデルにおいて、プララトレキサートと Gem との併用効果を検討した結果、プララトレキサートは Gem との併用で単剤投与より優れた効果を認めた（Toner et al 2006；2.6.2.2.2.4 項及び 2.6.2.2.3.2 項）。

3　薬物動態

プララトレキサートの PK は、ラット及びイヌで臨床と同様の製剤、投与スケジュール及び投与経路で、単回投与試験及び反復毒性試験での TK 試験として検討した。組織内分布及び排泄については、ラットで定量的全身オートラジオグラフィー及びマスバランス試験で検討した。血漿及び血清タンパク結合、並びに代謝についてはヒト生体試料を用いて実施した。また、プララトレキサートのシトクロム P450（CYP）阻害／誘導作用、各トランスポーターの基質／阻害剤となるかについて *in vitro* で検討した。

3.1　分析法

3.1.1　生体試料分析法

プララトレキサートは炭素 10 位の立体化学（*RS* 配置）が異なる約 1：1 のジアステレオマー混合物［PDX-10a（*S*-ジアステレオマー）及び PDX-10b（*R*-ジアステレオマー）］であるため、各ジアステレオマーのマウス（血漿）、ラット（血漿及び尿）、ウサギ（血漿）及びイヌ（血漿及び尿）生体試料中定量法を開発し、バリデーション試験を実施した（試験番号 PDX-K-08057-M、PDX-K-05012-R、PDX-K-08056-B、PDX-K-05011-D；2.6.4.2.1.1、2.6.4.2.4.2、2.6.4.2.1.3 及び 2.6.4.2.1.4 項）。血漿及び尿試料から C18 固相抽出（SPE）カラムを用いて PDX-10a 及び PDX-10b を抽出し、塩化アセチルでメチル誘導体化を行った。誘導体化した試料を、キラルカラムを用いて高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー（LC/MS/MS）にて分析した。定量範囲はラット血漿で 1～1000 ng/mL、それ以外では 0.5～1000 ng/mL であった。また、毒性試験での不純物／分解物測定のために、イヌ血漿中　不純物A*　濃度定量法を確立し、バリデーション試験を実施した（試験番号 PDX-K-08070-D；2.6.4.2.1.4 項）。血漿試料から C18 SPE カラムを用いて　不純物A*　を抽出し、LC/MS/MS にて分析した。バリデーション試験では、特異性、マトリックス効果、日内日間精度［相対標準偏差（%）］及び真度［相対誤差（%）］、直線性並びに各マトリックスからの回収率について評価し、いずれも許容範囲内であった。

3.2　吸収

プララトレキサート投与後の PDX-10a 及び PDX-10b の *in vivo* での PK の評価は、臨床での投与経路、投与スケジュール及び製剤を用いて、ラット及びイヌでの単回投与試験（試験番号

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

PDX-K-05010-R 及び PDX-K-05009-D；2.6.4.3.1 項）並びに TK 試験（試験番号 PDX-T-07034-R 及び PDX-T-07054-D；2.6.4.3.2 項）で実施した。

ラットにプララトレキサートを静脈内投与後の各ジアステレオマーの血漿中濃度推移は二相性を示し、速やかな分布後、長い $t_{1/2}$ を伴って緩慢に消失した。未変化体の尿中排泄はわずかであった。Vd_{ss} は広範な組織分布を示した。Vd_{ss} は 10 mg/kg 超で上昇したが、これは血漿タンパク結合の飽和によるものと考えられた。全投与量で性差が認められ、雌は雄の 2 倍の CL_{tot} を示したが、反復投与毒性試験での TK 試験では性差はみられなかった。また、反復投与による蓄積性もみられなかった。ラットでは、各ジアステレオマーの PK パラメーターに意義のある差はみられなかった。ラットに単回及び反復投与の結果から、5～25 mg/kg の範囲での線形性が認められた。イヌにプララトレキサートを静脈内投与後の血漿中濃度推移も長い $t_{1/2}$ を伴う二相性の消失を示した。各ジアステレオマーの CL_{tot} は、雌雄ともに投与量によって変わらないことから、検討した投与量範囲での線形性が示唆された。イヌでの各ジアステレオマーの尿中排泄率は、低用量では顕著であった（約 20%）が高用量では少なかった（約 3%）ことから、尿細管分泌の飽和が示唆された。CL_{nonren} が大きいことから、組織での代謝及び胆汁排泄の関与が示唆された。Vd_{ss} は広範な組織分布を示し、1.0 mg/kg 超で上昇したが、これは血漿タンパク結合の飽和によるものと考えられた。血漿タンパク結合の飽和により、腎尿細管分泌、代謝、胆汁排泄の飽和が相殺されて、CL_{tot} が投与量によらず、みかけ上一定になったと考えられる。イヌで顕著な性差はみられなかったが、各ジアステレオマーの CL_{tot} には約 2 倍の差があった。すなわち、PDX-10b は PDX-10a より速やかに消失した（約 2 倍）。一方、ヒトでは、PDX-10a が PDX-10b より速やかに消失した（2.7.2.3.2 項）が、この原因は不明である。しかし、2 つのジアステレオマーの *in vitro* 細胞障害作用は同様であるため（2.6.2.6.1 項）、この所見は重要ではないと考えられる。

3.3　分布

有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサート（10 mg/kg）を単回静脈内投与後の組織内分布を定量的全身オートラジオグラフィーを用いて検討した。骨、脳、脊髄及び白色脂肪を除くほとんどの組織で放射能は投与 1 時間後に最高濃度を示し、小腸内容物、小腸粘膜、肝臓、膀胱壁及び腎皮質での放射能が高かった。放射能はその後速やかに消失し、投与 504 時間後では肝臓及び腎皮質でのみ検出可能であった。メラニンへの結合はないと考えられた（試験番号 PDX-K-10077-R；2.6.4.4.1 項）。また、白色ラットに[^{14}C]-プララトレキサート（10 mg/kg）を単回静脈内投与後のマスバランス試験での投与 168 時間後の放射能は肝臓及び腎臓で高く（0.3%未満）、これは消失経路に関連する器官と一致した（試験番号 PDX-K-07052-R；2.6.4.4.1 項）。プララトレキサートは中程度の血漿タンパク結合を有し（63%～88%）（試験番号 PDX-K-06029-U 及び PDX-K-08066-U；2.6.4.4.2 項）、ヒト赤血球に移行しないと考えられた（試験番号 PDX-K-08067-U；2.6.4.4.3 項）。*In situ* ラット脳潅流モデルにおいて、プララトレキサートの脳への取り込みは低いことが明らかになった（試験番号 PDX-P-03001-R；2.6.4.4.4 項）。

3.4　代謝

プララトレキサートの代謝安定性をヒト肝 S9 分画、ヒト肝ミクロソーム及びヒト肝細胞で評価した（試験番号 PDX-K-08061-U 及び PDX-K-07030-U；2.6.4.5.1.1 項）。いずれのヒト生体試料中でもプララトレキサートの安定性が確認された。また、ヒト肝ミクロソーム中でプララトレキサートをインキュベートし、試料中の代謝物の探索を行ったが、プララトレキサートのフラグメントイオンとして検出された *m/z* に関連する代謝物は検出されなかった（試験番号 PDX-K-06028-U；2.6.4.5.1.2 項）。プララトレキサートの代謝に関与する酵素について、ヒト発現系（CYP 及びモノアミンオキシゲナーゼ）及び阻害剤を用いて検討したが、プララトレキサートはいずれの発現系及び阻害剤存在下でも安定であり、検討した酵素の関与は少ないと考えられた（試験番号 PDX-K-08062-U；2.6.4.5.1.3 項）。これらの結果から、プララトレキサートはヒト生体試料において代謝的に安定であり、PK パラメーターに種差がみられなかったことから *in vivo* での代謝試験は実施しなかった。

3.5　排泄

ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを静脈内投与後の排泄試験において、主要排泄経路は糞中であり（44%～66%）、続いて尿中（21%～31%）及び呼気中（6%～10%）に排泄されることが示された（試験番号 PDX-K-07052-R 及び PDX-K-07053-R；2.6.4.6.1 項）。放射能の 70%～92%が投与後 24 時間までに排泄された。呼気中排泄が認められた理由として、グルタミン酸側鎖のカルボン酸部位にある炭素が放射標識されていることによる可能性が考えられる。グルタミン酸側鎖は、代謝又は FPGS によるポリグルタミン酸化を受けやすい（2.6.2.2.1 項）。また、edatrexate 及び MTX と同様に、小腸粘膜において細菌性酵素により[^{14}C]-プララトレキサートが脱グルタミン酸化され、カルボン酸標識した炭素が乖離及び再吸収されるためと考えられる［2］。そこで、プテリジン部位の炭素を標識した[^{14}C]-プララトレキサートを有色ラットに静脈内投与後の排泄試験を実施した。その結果、投与 168 時間までの糞中に約 77%、尿中に約 26%が排泄され、主要排泄経路は糞中であることが示された（試験番号 PDX-K-10077-R；2.6.4.6.1 項）。

3.6　薬物動態学的薬物相互作用

プララトレキサートはタンパク結合を介した薬物相互作用を示さなかった（試験番号 PDX-K-07043-U 及び PDX-K-07049-U；2.6.4.7.1 項）。また、プララトレキサートは CYP（CYP1A2、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4）を阻害しなかった。プララトレキサートは CYP2B6（IC_{50} 値：5000 µmol/L 超）及び CYP2C19（阻害定数［Ki］：1 mmol/L 超）に対して弱い阻害作用を示した。また、CYP2C19 に対する時間依存的な阻害を示さなかった（PDX-K-07032-U、PDX-K-07033-U、PDX-K-07044-U、PDX-K-11089-U 及び PDX-K-11090-U；2.6.4.7.2 項）。プララトレキサートはヒト肝細胞で CYP1A2、CYP2C19 及び CYP3A4 を誘導しなかった（試験番号 PDX-K-08060-U；2.6.4.7.3 項）。

プララトレキサートはP-糖タンパク質（P-gp）の基質ではなく、500 µmol/L まではP-gp を阻害しなかった（試験番号 PDX-K-08059-U；2.6.4.7.4.1 項）。プララトレキサートは乳がん耐性タンパク質（BCRP）、有機アニオントランスポータータンパク（OATP）1B1、多剤耐性関連タンパク質（MRP）2 及び MRP3 に対して中程度から弱い親和性を示し、ミカエリスメンテン定数（K_m 値）はそれぞれ 552.7、123、500 超及び 195.7 µmol/L であった。プララトレキサートは OATP1B3 について濃度依存的な取り込みを示し、K_m 値は 62.2 µmol/L であった。プララトレキサートは有機カチオントランスポーター（OCT）2、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3 の基質ではなかった。プララトレキサートの BCRP、OCT2、OAT1、OAT3 及び OATP1B3 に対する IC_{50} 値は 100 µmol/L 超であった。プララトレキサートは OATP1B1 の弱い阻害剤であり、100 µmol/L で約 35%の阻害がみられた。また、MRP2 に対する IC_{50} 値は 43.5 µmol/L であった。プララトレキサートの MRP3 に対する IC_{50} 値は 0.3 µmol/L 未満であり強力な阻害作用を示した（試験番号 PDX-K-10078-U、PDX-K-10081-U、PDX-K-10080-U、PDX-K-11088-U 及び PDX-K-11084-U；2.6.4.7.4.2 及び 2.6.4.7.4.3 項）。

4　毒性試験

臨床使用予定の製剤を使用し、PTCL に対する臨床開発での投与経路及び投与スケジュールを考慮した包括的なプララトレキサートの毒性試験プログラムを GLP に準拠して実施した。

4.1　単回投与毒性試験

プララトレキサートの単回投与毒性は、ラットでは、反復投与毒性試験（試験番号 PDX-T-05013；2.6.6.3.1.1 項）における初回投与後 7 日間の観察結果で評価した。その結果、75 mg/kg までの静脈内投与で死亡又は切迫屠殺した個体は見られなかった。イヌでは、反復投与毒性試験の用量設定試験として探索的な単回静脈内投与試験を実施した（試験番号 PDX-T-05008-D；2.6.6.2.2 項）。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）又はプララトレキサート 3、6 及び 9 mg/kg（60、120 及び 180 mg/m^2）を各群雌雄各 1 匹に静脈内投与した。試験には分解生成物である　不純物A*　含量が増加したときの影響を検討するために強制劣化させたプララトレキサート注射剤（20 mg/mL）を使用した。試験製剤の総不純物含量は 5.25%（　不純物A*　は 4.0%）であった。

試験第 3 日までに、投与量にかかわらず投薬群の全例に血性下痢が観察された。血性嘔吐も全投薬群でみられた。試験第 4～6 日に投薬群の全例が切迫屠殺又は死亡した。本試験に使用した試験製剤は不純物及び　不純物A*　含量が高かったが、消化管毒性は葉酸アナログの主要な用量制限毒性（DLT）の 1 つであることから、観察された所見はプララトレキサートによると考えられた。本試験の概略の致死量は 3 mg/kg（60 mg/m^2）以下であった。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

4.2　反復投与毒性試験

プララトレキサートの反復投与毒性は、ラット 6 ヵ月間投与試験（試験番号 PDX-T-07034-R；2.6.6.3.1.3 項）及びイヌ 9 ヵ月間投与試験（試験番号 PDX-T-07054-D；2.6.6.3.2.3 項）で評価した。各試験に先立ち、ラット 8 及び 14 週間用量設定試験（それぞれ試験番号 PDX-T-05013-R；2.6.6.3.1.1 項及び試験番号 PDX-T-07039-R；2.6.6.3.1.2 項）並びにイヌ 8 及び 14 週間用量設定試験（それぞれ試験番号 PDX-T-05015-D；2.6.6.3.2.1 項及び試験番号 PDX-T-07035-D；2.6.6.3.2.2 項）を実施した。

4.2.1　ラット 6 ヵ月間反復投与毒性試験

雌雄 SD ラットに、プララトレキサート 0（PBS）、5、10 及び 25 mg/kg（それぞれ 0、30、60 及び 150 mg/m^2）を、7 週間を 1 サイクル（週 1 回、6 週連続投与した後、1 週休薬）とし、2 又は 4 サイクル静脈内投与した（試験番号 PDX-T-07034-R；2.6.6.3.1.3 項）。さらに 2 週間の休薬期間後の回復性を検討した。一般状態観察に異常所見はなかった。6 匹に切迫屠殺又は死亡を認めた。これらの死亡は対照群でも認められ、実験手技による損傷に関連した所見又は孤発性の所見であり、投薬に関連しないと判断した。25 mg/kg 群の雄で体重の低値が観察された。全投薬群の雌雄の中間評価及び最終評価時に赤血球パラメーターへの影響が認められた。25 mg/kg 群で最も顕著であり、雌より雄で明らかであった。パラメーターの用量依存的な低下が、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値で認められ、これらは平均赤血球容積、網状赤血球数、赤血球粒度分布幅及び平均赤血球ヘモグロビン量の用量依存的な高値並びに雄での赤血球形態学的変化を伴った。全ての血液学的パラメーターの変動は休薬期間後に回復した。10 mg/kg 群以上の雄及び 25 mg/kg 群雌で脾臓重量の高値が、25 mg/kg 群雄で精巣重量の低値が認められ、投薬との関連が示唆された。回復群動物に脾臓重量の変動はみられなかったが、精巣重量は依然低値であった。病理組織学的検査では 25 mg/kg 群の雌雄に肝臓及び脾臓の造血亢進及び骨髄細胞減少が観察されたが、回復群動物ではこれらの所見の頻度及び重症度が低下したことから、これらの所見は可逆的であることが示された。TK 評価では、各ジアステレオマーの血漿中濃度推移は分布相の迅速な低下に続く終末相の緩徐な低下の二相性の消失パターンを示した。両ジアステレオマーともに 5～25 mg/kg の投与量範囲では線形性が認められた。AUC_{inf} に性差はみられなかった。

無毒性量（NOAEL）は 5 mg/kg（30 mg/m^2）であった。5 mg/kg 投与時の AUC_{inf} は雌雄それぞれ 336901 ng/mL·min 及び 374826 ng/mL·min（試験第 183 日）であった。

4.2.2　イヌ 9 ヵ月間反復投与毒性試験

ビーグル犬（対照群及び高用量群：雌雄各 12 匹／群、低及び中用量群：雌雄各 10 匹／群）に、プララトレキサート 0（PBS）、0.1、0.3 及び 0.7 mg/kg（0、2、6、及び 14 mg/m^2）を、7 週間を 1 サイクル（週 1 回、6 週連続投与した後、1 週休薬）とし、2 又は 6 サイクル静脈内投与した（試験番号 PDX-T-07054-D；2.6.6.3.2.3 項）。

0.7 mg/kg 群に、死亡及び切迫屠殺、体重減少並びに食欲低下が認められたために、試験第 4 週から 0.7 mg/kg 群の全動物にビタミン B_{12}（0.5 mg/匹/週）及び葉酸（5 mg/匹/日）を補充した。

プララトレキサート及び他の葉酸アナログの臨床試験では、口内炎の発生頻度及び重症度の低減のためにビタミン B_{12} 及び葉酸がそれぞれ筋肉内及び経口投与されている。第 2 サイクル終了後、試験第 87 日に各群雌雄 5 匹（0.7 mg/kg 群雌は早期死亡例により 3 匹）を中間屠殺し、第 6 サイクル終了後、試験第 283 日に各群雌雄各 5 匹（0.7 mg/kg 群雌は早期死亡により 4 匹）を計画屠殺した。第 6 サイクル最終投与 4 週間後、試験第 309 日に対照群の雌雄各 2 匹、0.7 mg/kg 群の雄 2 匹及び雌 1 匹を計画屠殺した。

生死及び一般状態観察、体重測定、摂餌量測定（定性的）、血液学的検査、血液生化学的検査、凝固系検査、ECG 検査、眼科学的検査、臓器重量測定、剖検並びに病理組織学的検査を実施した。

0.7 mg/kg 群雌 1 匹が試験第 19 日に死亡し、同群の雄 1 匹を試験第 11 日、雌 1 匹を試験第 19 日に切迫屠殺した。これらの動物はビタミン B_{12} 及び葉酸を補充されていなかった。さらに、0.7 mg/kg 群雄 1 匹が試験第 88 日に切迫屠殺された。0.3 mg/kg 群以上で体重の低値及び体重増加抑制が認められ、摂餌量が低下した。また、消化管障害に関連した一般症状が認められた。赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、リンパ球数及び好塩基球数の低値が全投薬群において認められ、0.7 mg/kg 群の雌雄では血小板数の軽度高値が認められた。眼科学的検査、ECG、血液生化学的検査及び臓器重量に投薬の影響はみられなかった。中間評価動物の剖検（試験第 87 日）では、投薬に関連する所見として限局的な消化管（小腸、大腸及び直腸）の変色及び腸間膜リンパ節の赤色化が雌雄で観察され、雌で投与部位の赤色化が観察された。これらの所見は全投薬群で観察された。最終評価動物の剖検（試験第 283 日）では、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び直腸の暗色化又は赤色化が、投薬群とともに対照群にも観察された。回復群動物の剖検（試験第 309 日）では、投薬に関連した所見は認められなかった。

ビタミン B_{12} 及び葉酸補充開始前の死亡及び切迫屠殺動物の病理組織学的検査では、大腿骨及び胸骨骨髄での骨髄細胞減少、胸腺萎縮、顎下唾液腺の腺房萎縮及び消化管壊死が観察された。試験第 88 日に切迫屠殺された 0.7 mg/kg 群の雄 1 匹で観察された所見は消化管粘膜固有層のうっ血に限られた。中間評価動物では、0.3 mg/kg 群以上で剖検所見に一致した小腸の上皮及び陰窩部壊死が観察された。最終評価動物では、0.3 mg/kg 群以上で、剖検所見に一致して、まれに陰窩上皮の拡張及び壊死を伴う小腸の絨毛融合が観察され、0.7 mg/kg 群雌 5 匹中 3 匹で胸腺萎縮が観察された。回復群動物の病理組織学的検査に投薬に関連する所見は認められなかった。

以上のとおり、プララトレキサート投与初期に認められた重度の有害作用はビタミン B_{12} 及び葉酸の補充により低減した。第 6 サイクル投与後に観察された投薬に関連した所見は、4 週間の休薬期間後回復した。本試験条件下での NOAEL は 0.1 mg/kg（2 mg/m^2）、MTD は 0.7 mg/kg（14 mg/m^2）と判断した。0.1 mg/kg 投与時の AUC_{inf} は雌雄それぞれ 14755 ng/mL·min 及び 20963 ng/mL·min（試験第 281 日）であった。

4.3　遺伝毒性試験

プララトレキサートを用いた標準的な *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験を実施した。先に実施した細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 PDX-T-06021-I；2.6.6.4.1.1 項）及びチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験（試験番号 PDX-T-06022-H；2.6.6.4.1.3 項）（いずれも非 GLP）において、それぞれ 5000 μg/プレート及び 1 μg/mL 濃度までのプララトレキサートは、代謝活性化の有無にかかわらず遺伝毒性を示さなかった。また、GLP 下に再試験として実施した細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 8360855；2.6.6.4.1.2 項）においても同様な結果が得られた。*In vivo* 小核試験では、先に実施したマウス小核試験（試験番号 PDX-T-06023-M；2.6.6.4.2.1 項）（非 GLP）では、プララトレキサートは、3 mg/kg/日（9 mg/m^2/日）までの 3 日間連日腹腔内投与で小核を有する多染性赤血球（MPCE）の発現頻度上昇を認めなかった。しかし、再試験として GLP 下で実施したラット小核試験の用量設定試験（試験番号 8362119；2.6.6.4.2.2 項）では、200 mg/kg/日までの 2 日間連日静脈内投与により、試験実施施設の背景値と比較して MPCE の発現頻度上昇が認められた。本所見は、他の葉酸アナログである MTX 及びペメトレキセドの *in vivo* 小核試験の結果に類似した［3、4］。

4.4　がん原性試験

プララトレキサートは重篤かつ生命を脅かすがんの患者の治療を目的としているため、がん原性試験は実施しなかった。

4.5　生殖発生毒性試験

4.5.1　受胎能及び初期胚発生試験

プララトレキサートは重篤かつ生命を脅かすがんの患者の治療を目的としているため、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。

4.5.2　胚・胎児発生に関する試験

プララトレキサートの胚・胎児発生に関する試験を SD ラット及び New Zealand White ウサギを用いて実施した。各試験に先立ち、妊娠動物を用いた用量設定試験（ラット：試験番号 PDX-T-07048-R；2.6.6.6.2.1 項、ウサギ：試験番号 PDX-T-07047-B；2.6.6.6.2.3 項）を実施した。

4.5.2.1　ラット胚・胎児発生に関する試験

SD 妊娠ラット（25 匹／群）にプララトレキサートを 0（PBS）、0.01、0.03 及び 0.06 mg/kg/日（0.06、0.18 及び 0.36 mg/m^2/日）の用量で妊娠 7～20 日まで連日静脈内投与し、胚・胎児発生に関する試験を実施した（試験番号 PDX-T-07050-R；2.6.6.6.2.2 項）。

プララトレキサート投与による母動物死亡は認められなかった。0.06 mg/kg/日群の母動物に有意な体重の低値、体重増加抑制及び摂餌量低下が観察された。また、同群で有意な胚・胎児死亡及び着床後胚損失率の高値並びに妊娠子宮重量の低値が観察され、有意な胎児体重（同腹児あたり、胎児あたり及び雌雄別同腹児あたり）の低値が認められた。しかし、胎児の形態学的変化（外観、内臓及び骨格）は観察されなかった。0.01 及び 0.03 mg/kg/日群では影響は認められなかった。0.06 mg/kg/日群で母動物体重並びに胎児の生存及び体重に有害作用が認められたことから、母動物毒性並びに胚・胎児の死亡及び成長に対する NOAEL はいずれも 0.03 mg/kg/日（0.18 mg/m^2/日）と判断した。本試験で催奇形性は認められなかった。

4.5.2.2　　ウサギ胚・胎児発生に関する試験

New Zealand White 妊娠ウサギ（20 匹／群）に 0（PBS）、0.03、0.1 及び 1 mg/kg/日（0.36、1.2 及び 12 mg/m^2/日）のプララトレキサートを妊娠 8～21 日に連日静脈内投与し、胚・胎児に関する試験を実施した（試験番号 PDX-T-07051-B；2.6.6.6.2.4 項）。1 mg/kg/日群では妊娠後期（妊娠 18～25 日）に腟からの赤色排出物が観察された。また、同群の 3 匹は流産を認めたため、切迫屠殺した。母動物の剖検に異常所見は観察されず、体重に有意な差は認められなかった。1 mg/kg/日群では対照群と比較して、胎児死亡数及び着床後胚損失率の増加が認められ、妊娠子宮重量が低下し、妊娠子宮重量を除いた補正体重変化量が増加した。1 mg/kg/日群では同腹児あたりの生存胎児数及び生存胎児体重の有意な低下が認められた。0.03 及び 0.1 mg/kg/日群に投薬の影響は認められなかった。胎児の形態学的検査（外観、内臓及び骨格）に投薬の影響は認められなかった。母動物の一般毒性並びに胚・胎児の死亡及び成長に関する NOAEL は 0.1 mg/kg/日（1.2 mg/m^2/日）であった。

4.5.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

プララトレキサートは重篤かつ生命を脅かすがんの患者の治療を目的としているため、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。

4.5.4　幼若動物における試験

プララトレキサートを用いた幼若動物における試験は実施しなかった。

4.6　局所刺激性試験

SD ラットにおけるプララトレキサート 40 mg/kg の静脈周囲投与は、投与部位の局所刺激性を認めなかった。また、SD ラットにおけるプララトレキサート 20 mg/kg の皮内投与は、軽微～軽度の刺激性を引き起こした（試験番号 PDX-T-04003-R；2.6.6.7 項）。

静脈内投与による独立した刺激性試験は実施していないが、ラット及びイヌにおけるそれぞれ6ヵ月間及び9ヵ月間までの反復投与毒性試験において、投与部位に異常所見は認められていない（本項4.2.1及び4.2.2章）。

4.7　その他の毒性試験

4.7.1　免疫毒性試験

プララトレキサートは、葉酸アナログでありMTXと類似した抗炎症作用を有する（本項2.3章）ため、免疫抑制作用を有する可能性がある。イヌ9ヵ月間反復投与毒性試験では、免疫系に関連する所見、すなわち胸腺委縮及びリンパ球数の低値を含む血液毒性が認められた。プララトレキサートの免疫毒性を検討する独立した試験は、実施しなかった。

4.7.2　代謝物の毒性試験

ヒト肝細胞、ヒト肝ミクロソーム及びS9分画並びにCYP発現系を用いたプララトレキサートの代謝試験において、重要な代謝は認められず、代謝物は同定されなかった（本項3.4章）。したがって、代謝物に関する毒性試験は実施していない。

4.7.3　不純物及び分解生成物の評価

プララトレキサートの主な分解生成物である　不純物A*　の毒性を検討するために、精製した　不純物A*　を用いたイヌでの反復投与毒性試験を実施した。

イヌ6週間投与試験では、　不純物A*　を0（注射用生理食塩液）、3、10及び30 mg/kg（0、60、200及び600 mg/m^2）の用量で、週1回6週間、静脈内投与した（試験番号PDX-T-08064-D；2.6.6.8.1.2項）。　不純物A*　は10 mg/kg（200 mg/m^2）の投与まで軽度で一過性の嘔吐及び流涎を認めたのみで、良好な忍容性を示した。30 mg/kg群では運動失調、嗜眠及び反応性の欠失並びに腎臓への影響が観察されたことから、NOAELは10 mg/kg（200 mg/m^2）と判断した。NOAELである10 mg/kg（200 mg/m^2）は、臨床での最大投与量（プララトレキサート30 mg/m^{2}投与時、　不純物A*　含量が最大[redacted]であったとき、[redacted] mg/m^2）からみて十分に高用量である。したがって、　不純物A*　の規格値はプララトレキサートの臨床投与量からみて十分な安全性が保証されている。また、　不純物A*　は、Multi-Computer Automated Structure Evaluation（MCASE）コンピュータ評価において遺伝毒性ポテンシャルに対し警告構造は示されなかったことから、遺伝毒性なしと判断される（3.2.S.3.2.1.5項）。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

4.7.4　光安全性に関する試験

プララトレキサートの波長 290～700 nm での光吸収性を検討した結果、372 nm（酢酸アンモニウム溶液条件下）及び 338 nm（塩酸溶液条件下）で明らかなピークを認め、モル吸光度係数（MEC）はそれぞれ 8118 及び 11939 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ であった。医薬品の光安全性評価ガイドライン［薬食審査発 0521 第 1 号］に従うと MEC が 1000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ を超える化合物は非臨床光安全性試験の実施が推奨されている。また、類似薬である MTX の添付文書には、その他の副作用として光線過敏症の発現が記載されている。このことから、MTX 系の薬剤は軽度ながら、光毒性を示すことは想定されるが、プララトレキサートの特性、1）光に対して安定で代謝物が認められない、2）皮膚及び眼への移行が少なく速やかに消失する、3）ラット及びイヌ反復投与毒性試験で光毒性を示唆する所見は認められない、4）臨床試験においても重篤な有害事象が認められないことからから判断し、プララトレキサートは既存の MTX と同様、光毒性リスクを示す物質と推測し、新たな本剤の非臨床光毒性試験は実施していない。

4.8　全身曝露

ラット 6 ヵ月間（本項 4.2.1 章）及びイヌ 9 ヵ月間（本項 4.2.2 章）反復投与試験並びに海外第 2 相試験（PDX-008 試験；2.7.2.2.4 項）での重要な PK パラメーターを表 2.4- 1 に要約する。選択した用量は、7 週間を 1 サイクル（週 1 回 6 週連続投与した後、1 週休薬）とする投与スケジュールでの各動物種及びヒトにおける MTD 又は NOAEL である。イヌ及びヒトでの試験では、葉酸及びビタミン B_{12} 補充療法を含む投与レジメであった。2 つのジアステレオマー（PDX-10a 及び PDX-10b）は同程度の抗腫瘍活性を有し（本項 2.2.3 章）、全ての種において使用した用量範囲で一定の血漿中曝露量比を示す（2.6.4.3 項及び 2.7.2.2.4 項）ことから、C_{max} 及び AUC_{inf} は、プララトレキサートのジアステレオマー混合物としての値、すなわち PDX-10a 及び PDX-10b の値の和で示した。明らかな性差は認められなかったため、C_{max} 及び AUC_{inf} の値は雌雄データの平均とした。ラット（30 mg/m^2；NOAEL）及びヒト（30 mg/m^2；MTD）の曝露量（AUC_{inf}）は同程度であったが、イヌ（14 mg/m^2；MTD）の AUC_{inf} はヒトの 1/3 であった。C_{max} の値は種差が大きかったが、プララトレキサートは分布相で速やかに血漿中から消失するため、注入時間及び注入直後の採血時間の違いが、これらの見かけ上の差に関与した可能性がある。

以上の結果から、プララトレキサートに対する感受性はラット、イヌ及びヒトではイヌが最も高いと考えられた。

表 2.4- 1　プララトレキサートのラット及びイヌ反復投与試験並びに臨床試験における NOAEL 又は MTD での PK パラメーターの比較

PK Parameters	Rat (PDX-T-07034-R)		Dog (PDX-T-07054-D)		Human (PDX-008)[a]	
	Day1	Day85	Day1	Day281	C1D1	C1D1 or C2D6
dose [mg/kg] [b]	5	5	0.7	0.7	0.81	0.81
dose [mg/m^2] [b]	30	30	14	14	30	30
C_{max} [ng/mL][c]	19245	14257	1793	649	5815	4963
AUC_{inf} [ng/mL·min][c]	292162	270127	93812	80369	267854	211555

a　PK data from intense sampled patients (N = 10 [C1D1] and N = 6 [C1D6/C2D6])
b　The selected doses represent the NOAEL for rats and MTDs for dogs and human.
c　Racemic mixture (PDX-10a + PDX-10), males and females (mean)
C = cycle, D = Day, mg = milligram, kg = kilogram, C_{max} = maximum plasma concentration, ng = nanogram, mL = milliliter, AUC_{inf} = area under the concentration time curve to infinity, min = minute

5　考察及び結論

プララトレキサートの非臨床薬理、PK 及び毒性プログラムにおける所見は、MTX 及び edatrexate のような関連した葉酸アナログで得られた所見、並びにプララトレキサートで見られた臨床的所見と一致している。プララトレキサートの非臨床安全性薬理試験では中枢神経系、心血管系及び呼吸器系にいかなる影響も示さなかった。

プララトレキサートは、種々の腫瘍細胞を用いた *in vitro* 細胞障害試験及び *in vivo* 腫瘍モデル（ヒト腫瘍異種移植マウス）において MTX より優れた作用を示した。またプララトレキサートは、現在使われている抗がん剤との併用においても強力な腫瘍増殖阻害作用を示した。特にプララトレキサートと Gem の併用投与は、*in vitro* 細胞障害試験及び *in vivo* 腫瘍モデルにおいて、単剤又は MTX を含むいずれの組み合わせの併用投与の中で最も強い腫瘍増殖阻害作用を示した。副次的薬理試験では、プララトレキサートはラット II 型コラーゲン誘発関節炎モデルにおいて MTX と同様の抗炎症作用を示した。安全性薬理試験では、中枢神経系、心血管系又は呼吸器系に対するプララトレキサートの直接作用は認められなかった。プララトレキサートのジアステレオマーである PDX-10a 及び PDX-10b は、CWR22-RV1 細胞においてプララトレキサートと同程度の細胞障害作用を示した。また、プララトレキサートの主な分解生成物である　　不純物A*　　の種々の腫瘍細胞に対する細胞障害作用は、プララトレキサートより明らかに弱かった。

ラット及びイヌでのプララトレキサートの PK プロファイルは、各ジオステレオマーの CL_{tot} でわずかな差がみられたこと以外は類似していた。なお、2 つのジアステレオマーが同等の *in vitro* 細胞障害作用を有していることから、この差異は臨床的に意義はないと考えられた。ラットでのプララトレキサートの主要排泄経路は、糞中（44%～66%）であり、次に尿中（21%～31%）であった。Edatrexate と同様、患者でのプララトレキサートの尿中排泄率はラットより明らかに高かった［25%～38%（臨床試験 PDX-007 及び PDX-008 試験から得られた PDX-10a 及び PDX-10b の平均値の範囲）］。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

プララトレキサートの毒性プログラムにおいて、DLT は、このクラスの他の葉酸アナログで報告されたものと類似しており、主に可逆性の消化管毒性及び血液毒性に関連するものであった。同じ DLT は、プララトレキサートの臨床プログラムにおいても認められた。また、遺伝毒性及び光毒性についても、他の葉酸アナログと同様の特性を示した。プララトレキサートの主な分解生成物である　　不純物A*　　の毒性は、イヌにおいてプララトレキサートより明らかに弱かった。プララトレキサートは、ラット及びウサギにおいて胎児毒性（胚・胎児死亡及び着床後胚損失率の高値）が観察された。プララトレキサートに催奇形性は認められなかった。母動物における NOAEL 並びに胚･胎児の死亡及び成長に対する NOAEL はラットでは 0.03 mg/kg/日（0.18 mg/m^2/日）、ウサギでは 0.1 mg/kg/日（1.2 mg/m^2/日）と考えられた。プララトレキサートの妊婦における試験は実施されてない。プララトレキサートは妊婦に投与したとき、胎児に有害作用を引き起こす可能性がある。もし、プララトレキサートが妊娠期間中に使用されたり、患者がプララトレキサートを服用中にも関わらず妊娠した場合には、患者は胎児への危険の可能性を知らされるべきである。非臨床又は臨床試験で、乳汁移行性を検討する試験は実施されていない。多くの薬剤はヒトの乳汁中に排泄され、受乳中の乳児での薬剤による重篤な副作用の可能性があるため、プララトレキサートを投与中の母親は授乳を中止することが推奨される。

一連の非臨床試験によりプララトレキサートの特性は十分に解析され、得られた結果は PTCL を対象とした臨床開発及び申請をサポートするものであった。

6　参考文献

1. McGuire J.J. Anticancer antifolates: current status and future directions. Curr Pharm Des 2003;9(31):2593-613. (4.3.7)
2. Fanucchi MP, Kinahan JJ, Samuels LL, Hancock C, Chou T-C, Niedzwiecki D et al. Toxicity, elimination, and metabolism of 10-ethyl-10-deazaaminopterin in rats and dogs. Cancer Res 1987;47(9):2334-9. (4.3.3)
3. Pfizer. Methotrexate Solution for injection. Material Safety Data Sheet. PZ00135. 2012 (4.3.11)
4. Lilly. ALIMTA. Safety Data Sheet: 2010 (4.3.12)

*：新薬承認情報提供時に置き換えた