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）

2.6.1　緒言

ムンディファーマ株式会社

目次

1　医薬品に関する情報 5

1.1　医薬品情報 5

1.2　製剤の組成及び性状 5

2　薬力学的特性及び科学的背景 5

3　適応 6

4　用量及び使用期間 6

4.1　プララトレキサート注射剤の用量 6

図目次

図 2.6.1- 1　プララトレキサートの構造式.....5

略号一覧

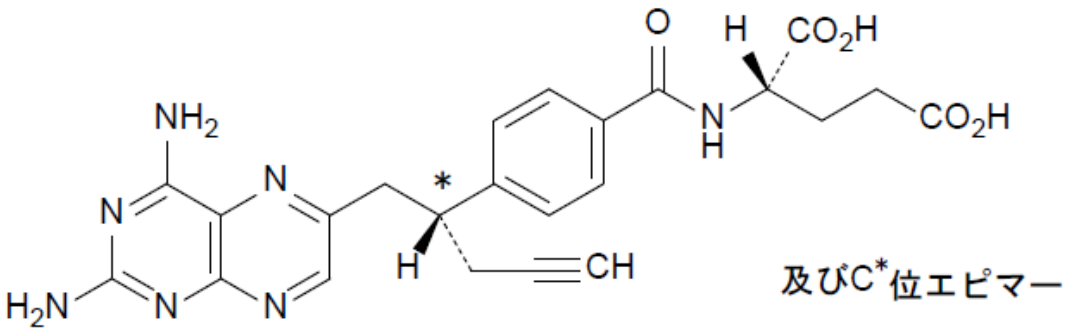
略号	日本語	英語
AUC_{inf}	時間 0 から無限大までの濃度－時間曲線下面積	area under the concentration time curve from time 0 to infinity
DHFR	ジヒドロ葉酸還元酵素	dihydrofolate reductase
FPGS	ホリルポリグルタミン酸合成酵素	folylpolyglutamyl synthetase
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子	human ether-a-go-go related gene
MTD	最大耐量	maximum tolerated dose
MTX	メトトレキサート	methotrexate
PK	薬物動態	pharmacokinetic(s)
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

1　医薬品に関する情報

1.1　医薬品情報

プララトレキサート注射剤の原薬であるプララトレキサートの化学名は *N*-{4-[(2*RS*)-1-(2,4-Diaminopteridin-6-yl)pent-4-yn-2-yl]benzoyl}-L-glutamic acid である。構造式を図 2.6.1- 1 に示す。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。プララトレキサートの分子式は $C_{23}H_{23}N_7O_5$、分子量は 477.47 である。

図 2.6.1- 1　プララトレキサートの構造式



1.2　製剤の組成及び性状

プララトレキサート注射剤は無菌及び非発熱性の等張な黄色澄明の液で、使い切りガラスバイアルに封入されており、防腐剤を含まない。2 mL 透明ガラスバイアルの中に投与 1 回分が充填されており、静脈内投与用として供給される。1 mL あたり、プララトレキサート 20 mg、等張（280～300 mOsm）にするために塩化ナトリウムを 0.6%、pH を 7.5～8.5 に維持するために適量の水酸化ナトリウム又は必要に応じて塩酸を含む。

2　薬力学的特性及び科学的背景

プララトレキサートは抗悪性腫瘍作用を持つ葉酸アナログであり、葉酸代謝経路のジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）阻害活性を有する。プララトレキサート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り、還元型葉酸キャリア-1（RFC-1）タンパクに高い親和性を有し、MTX と比較して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。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様々な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。

プララトレキサートを用いた一連の非臨床薬理試験の結果、*in vitro* 及び *in vivo* 腫瘍モデルのいずれにおいても細胞増殖阻害作用が示された。様々な腫瘍細胞株を用いた *in vitro* 細胞障害試験で、プララトレキサートは MTX よりも優れた細胞障害作用を示した。また、プララトレキサートは他のがん治療薬との併用で単剤投与よりも優れた細胞増殖阻害作用を示した。同様に、プララトレキサートは様々な *in vivo* 腫瘍モデル（ヒト腫瘍異種移植マウス）において、MTX よりも優れた抗腫瘍作用を示した。MTX が腫瘍細胞の増殖遅延のみを示した *in vivo* 腫瘍モデルにおいて、プララトレキサート投与により高い割合で完全退縮が認められた。プララトレキサートはヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウム電流を阻害しないこと、及びイヌ摘出プルキンエ線維の活動電位に影響しないことが示された。

様々な用量及び投与期間で薬物動態（PK）及び毒性試験が実施された。ラット及びイヌの PK パラメータの解析より、プララトレキサート投与後の血漿中濃度推移は初期に速やかに分布した後、緩慢に消失する二相性を示した。

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠したラット及びイヌ反復投与毒性試験が、臨床投与経路及び臨床での投与スケジュールをもとに実施された。イヌの最大耐量（MTD；14 mg/m^2）における時間 0 から無限大までの濃度 - 時間曲線下面積（AUC_{inf}）は、末梢性 T 細胞リンパ腫（PTCL）患者の MTD（30 mg/m^2）での曝露量の約 3 分の 1 であった。イヌでみられた主な毒性は、軟便、下痢及び嘔吐などの消化管に関するものであった。プララトレキサートの遺伝毒性及び光毒性の特性は他の葉酸アナログと同様であった。ラット及びウサギの胚・胎児発生毒性試験の結果、プララトレキサートに催奇形性は認められなかったが、胎児毒性が認められた。

3　適応

プララトレキサート注射剤は、再発又は難治性の PTCL の治療を適応としている。

4　用量及び使用期間

4.1　プララトレキサート注射剤の用量

通常、成人には、プララトレキサートとして、1 日 1 回 30 mg/m^2（体表面積）を 3～5 分間かけて、週 1 回、静脈内投与する。これを 6 週連続で行い、7 週目は休薬する。これを 1 サイクルとして、投与を繰り返す。なお、患者の状態により適宜減量する。

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）

2.6.2　薬理試験の概要文

ムンディファーマ株式会社

目次

1 まとめ 7

2 効力を裏付ける試験 8

2.1 作用機序 8

2.2 *In vitro* 試験 10

2.2.1 各種ヒト腫瘍細胞に対する細胞増殖阻害作用 10

2.2.2 CCRF-CEM 細胞における生化学的及び細胞薬物動態学的評価並びに細胞障害作用 12

2.2.3 各種ヒトリンパ腫細胞に対する細胞増殖阻害作用 14

2.2.4 Gem との併用による SKI-DLBCL-1 細胞に対する細胞障害作用 15

2.2.5 ヒト初代培養肝細胞に対する細胞障害作用 16

2.2.6 ヒト初代培養肝細胞に対する細胞障害作用 17

2.3 *In vivo* 試験 17

2.3.1 各種 NHL 細胞異種移植モデルに対する抗腫瘍作用 17

2.3.2 Gem との併用による SKI-DLBCL-1 細胞異種移植モデルに対する抗腫瘍作用 18

2.3.3 異なる投与スケジュールでの抗腫瘍作用の比較 20

2.4 その他の薬理試験 21

2.4.1 プララトレキサートジアステレオマーの薬理学的プロファイル 21

2.4.2 不純物A* の薬理学的プロファイル 22

3 副次的薬理試験 24

3.1 抗炎症作用に関する MTX との比較 24

4 安全性薬理試験 24

4.1 中枢神経系 25

4.2 心血管系 25

4.2.1 *In vitro* 試験 25

4.2.1.1 hERG カリウム電流の測定 25

4.2.1.2 イヌ摘出プルキンエ線維を用いた活動電位パラメーターの測定 25

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

4.2.2　*In vivo* 試験 26

4.3　呼吸器系 26

5　薬力学的薬物相互作用試験 27

6　考察及び結論 27

7　参考文献 28

表目次

表 2.6.2- 1　NCI の細胞株でのスクリーニング及び比較結果 11

表 2.6.2- 2　CCRF-CEM 細胞での葉酸アナログの生化学的及び細胞薬物動態学的特性 13

表 2.6.2- 3　ヒト腫瘍細胞に対する各種葉酸アナログの細胞障害作用 14

表 2.6.2- 4　ヒトリンパ腫細胞株におけるプララトレキサート及び MTX の細胞増殖阻害作用 14

表 2.6.2- 5　プララトレキサート処理後のヒト初代培養肝細胞相対生存率 17

表 2.6.2- 6　HT 細胞を異種移植した NOD/SCID マウスでの抗腫瘍作用 18

表 2.6.2- 7　RL 細胞を異種移植した NOD/SCID マウスでの抗腫瘍作用 18

表 2.6.2- 8　SKI-DLBCL-1 細胞を異種移植した NOD/SCID マウスでの抗腫瘍作用 18

表 2.6.2- 9　LX-1 及び MX-1 異種移植マウスへのプララトレキサート投与スケジュール 21

表 2.6.2- 10　CWR22-RV1 前立腺がん細胞におけるプララトレキサート、 PDX-10a 及び PDX-10b の細胞障害作用 22

表 2.6.2- 11　ヒト腫瘍細胞株に対するプララトレキサート及び　　不純物A* の細胞増殖阻害作用 23

表 2.6.2- 12　安全性薬理試験項目一覧 24

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

図目次

図 2.6.2- 1　葉酸代謝とジヒドロ葉酸還元酵素阻害 9

図 2.6.2- 2　プララトレキサート及び MTX の化学構造 10

図 2.6.2- 3　SKI-DLBCL-1 細胞におけるプララトレキサート又は MTX と他剤併用による *in vitro* 細胞障害作用 16

図 2.6.2- 4　SKI-DLBCL-1 NHL 細胞を異種移植した SCID-Beige マウスにおけるプララトレキサートと Gem の併用による抗腫瘍作用 20

図 2.6.2- 5　LX-1 及び MX-1 異種移植マウスにおける異なる投与スケジュールでの プララトレキサートの作用 21

略号一覧

略号	日本語	英語
APA	活動電位振幅	action potential amplitude
APD	活動電位持続時間	action potential duration
ara-C	シタラビン	cytarabine
ATP	アデノシン三リン酸	adenosine triphosphate
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	Chinese hamster ovary
C_{max}	最高血漿中濃度	maximum plasma concentration
DHF	ジヒドロ葉酸	dihydrofolate
DHFR	ジヒドロ葉酸還元酵素	dihydrofolate reductase
DMARD	疾患修飾性抗リウマチ薬	disease-modifying anti-rheumatic drug
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
ED_{50}	50%有効用量	half-maximum efficacious dose
FPGS	ホリルポリグルタミン酸合成酵素	folylpolyglutamyl synthetase
FOB	機能的観察総合評価	Functional Observational Battery
Gem	ゲムシタビン	gemcitabine
GI_{50}	50%細胞増殖阻害濃度	half maximum growth inhibitory concentration
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	結合定数又は 50%V_{max} での基質濃度	binding constant or concentration of substrate that gives half V_{max}
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
NOD/SCID	非肥満、糖尿病／重症複合免疫不全	non-obese, diabetic/severe combined immunodeficient
NSCLC	非小細胞肺がん	non-small cell lung cancer
OS	オーバーシュート	overshoot
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
RMP	静止膜電位	resting membrane potential
RNA	リボ核酸	ribonucleic acid
SD	—	Sprague-Dawley
THF	テトラヒドロ葉酸	tetrahydrofolate
V_{max}	最大速度定数又は最大速度	maximum rate constant or maximum velocity

1　まとめ

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）は葉酸代謝過程のジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）活性を阻害する抗腫瘍性葉酸アナログである。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開発された。プララトレキサート注射剤は 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 週休薬し、7 週間を 1 サイクルとして投与される。投薬に関連した有害事象の発現により、20 mg/m^2/週まで減量できる。

プララトレキサートは還元型葉酸キャリア-1（RFC-1）タンパク質に高い親和性を有するメトトレキサート（MTX）の 10-デアザアミノプテリンアナログであり、また、MTX と比較して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。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（本項 2.2.2 章）。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。乳がん、非小細胞肺がん（NSCLC）及びリンパ腫細胞株など種々の腫瘍細胞を用いた *in vitro* 細胞障害試験では、プララトレキサートの作用は MTX よりも 13～40 倍強力であった（本項 2.2.2 章）。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（本項 2.2.1 章）。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、ほとんどの場合、作用は MTX よりも優れていた（本項 2.2.3 章）。

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。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る。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。各種 NHL 細胞異種移植モデルでは、NHL 細胞の 50%以上の退縮及び有意な増殖遅延がプララトレキサート投与で観察された。MTX 投与では NHL 細胞の退縮はみられず、軽度な増殖遅延のみが認められた（本項 2.3.1 章）。葉酸アナログ及びシチジンアナログは、種々のリンパ増殖性悪性腫瘍の治療に使用されてきた。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫細胞（SKI-DLBCL-1）異種移植モデルにおいてプララトレキサートとシチジンアナログであるゲムシタビン（Gem）の併用投与試験を実施し、標準療法であるシタラビン（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た（本項 2.3.2 章）。以上のように、プララトレキサートは広範かつ優れた *in vitro* 及び *in vivo* 活性を示したことから、各種固形がん及び血液腫瘍における単剤及び他のがん治療薬併用での新たな治療法となり得ることが期待される。

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である。各ジアステレオマーである PDX-10a（*S*-ジアステレオマー）及び PDX-10b（*R*-ジアステレオマー）は、ヒト前立腺がん細胞株に対してプララトレキサートと同様な細胞障害作用を示した（本項 2.4.1 章）。

プララトレキサート製剤中での主な不純物はプララトレキサートの分解生成物である　　不純物A*　　である。各種ヒト腫瘍細胞に対する　　不純物A*　　の細胞障害作用はプララトレキサートよりも明らかに弱かった（本項 2.4.2 章）。

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（本項 3 章）。

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みられなかった（本項 4 章）。

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）で観察された最大の最高血漿中濃度（C_{max}）より 10 倍以上高い濃度でヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウム電流を阻害しなかった（本項 4.2.1.1 章）。さらに、プララトレキサートは臨床試験 PDX-008 試験で観察された最大 C_{max} より約 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与えなかった（本項 4.2.1.2 章）。テレメトリーを装着した覚醒ビーグル犬における心血管系及び呼吸器系の安全性薬理試験において、プララトレキサートは 0.7 mg/kg［最大耐量（MTD）］までの静脈内投与で、呼吸器機能、血圧、心拍数、体温及び心電図（ECG）パラメーターに影響を与えなかった（本項 4.2.2 及び 4.3 章）。これらの所見は、プララトレキサートが呼吸器系及び心血管系に重要な影響を与えないことを示唆する。

Sprague-Dawley（SD）ラットでの 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。プララトレキサート投与群の機能的観察総合評価（FOB）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（本項 4.1 章）。

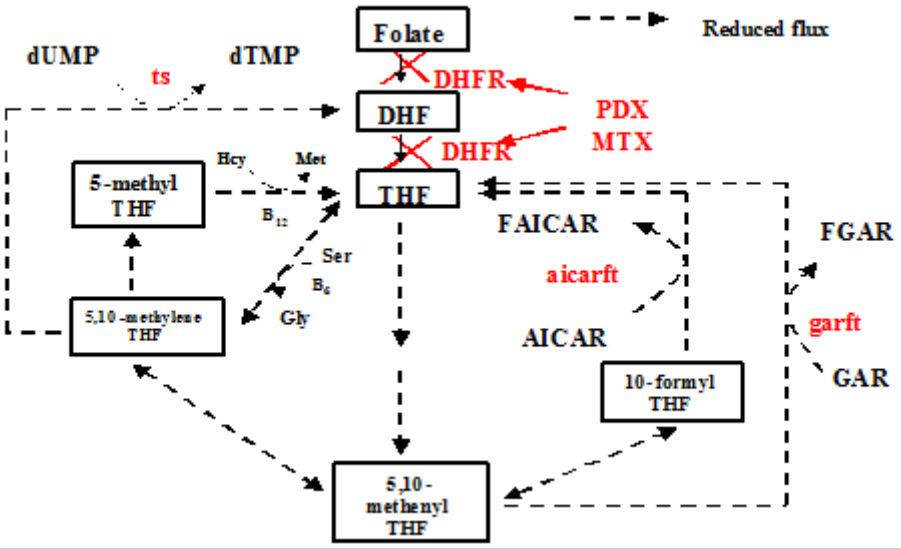
2　効力を裏付ける試験

2.1　作用機序

葉酸はビタミン B の一種（ビタミン B_9）であり、細胞周期に重要である多くの代謝反応において一炭素基の担体として機能する（図 2.6.2- 1）。葉酸はジヒドロ葉酸（DHF）に還元され、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）の合成に必須であり、したがって、デオキシリボ核酸（DNA）の合成に必須である。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

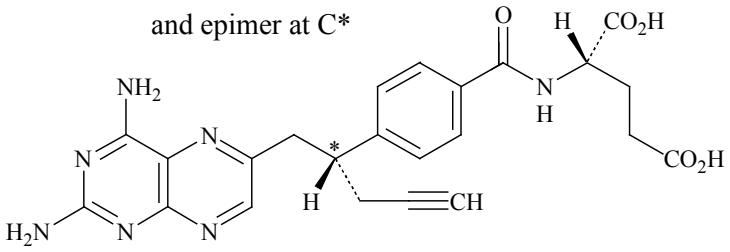
図 2.6.2- 1　葉酸代謝とジヒドロ葉酸還元酵素阻害



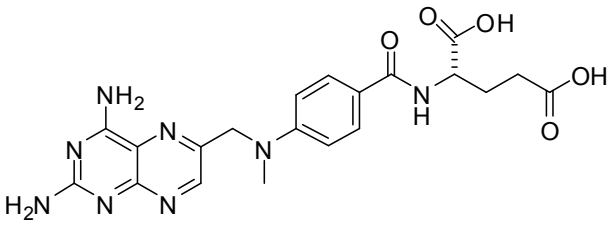
DHF = dihydrofolate, DHFR = dihydrofolate reductase, THF = tetrahydrofolate, PDX = pralatrexate, MTX = methotrexate, ts = thymidylate synthase, dUMP = deoxyuridine monophosphate, dTMP = deoxythymidine monophosphate, B_6 = vitamin B_6, B_{12} = vitamin B_{12}, Hcy = homocysteine, Met = methionine, Ser = 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

プララトレキサートは MTX（図 2.6.2- 2）の構造類似体であり、MTX と同様に、DHFR の阻害により葉酸代謝を抑制する。その作用機序に基づき、プララトレキサートは抗腫瘍葉酸アナログに分類される。DHFR の阻害は、がん治療で最も重要な DNA 合成阻害を含む種々の細胞プロセスの破綻を引き起こす細胞内 THF の枯渇をもたらす。ほとんどのがん細胞では、DNA 合成阻害は、細胞周期の停止及びアポトーシスをもたらす。腫瘍細胞に対するプララトレキサートの選択性には、RFC-1 を介した細胞内取り込み量の増加及び正常細胞と腫瘍細胞での FPGS によるポリグルタミン酸化体生成量の差が一部関与していると考えられる。ポリグルタミン酸化は腫瘍細胞内で起こる時間及び濃度依存的なプロセスで、正常細胞ではあまり生じない。プララトレキサートのポリグルタミン酸化による細胞内滞留の持続は、より強力な DHFR 阻害を生じ、腫瘍細胞で強い細胞障害を引き起こす（本項 2.2 章）。

図 2.6.2- 2　プララトレキサート及び MTX の化学構造



Pralatrexate (PDX)



Methotrexate (MTX)

2.2　*In vitro* 試験

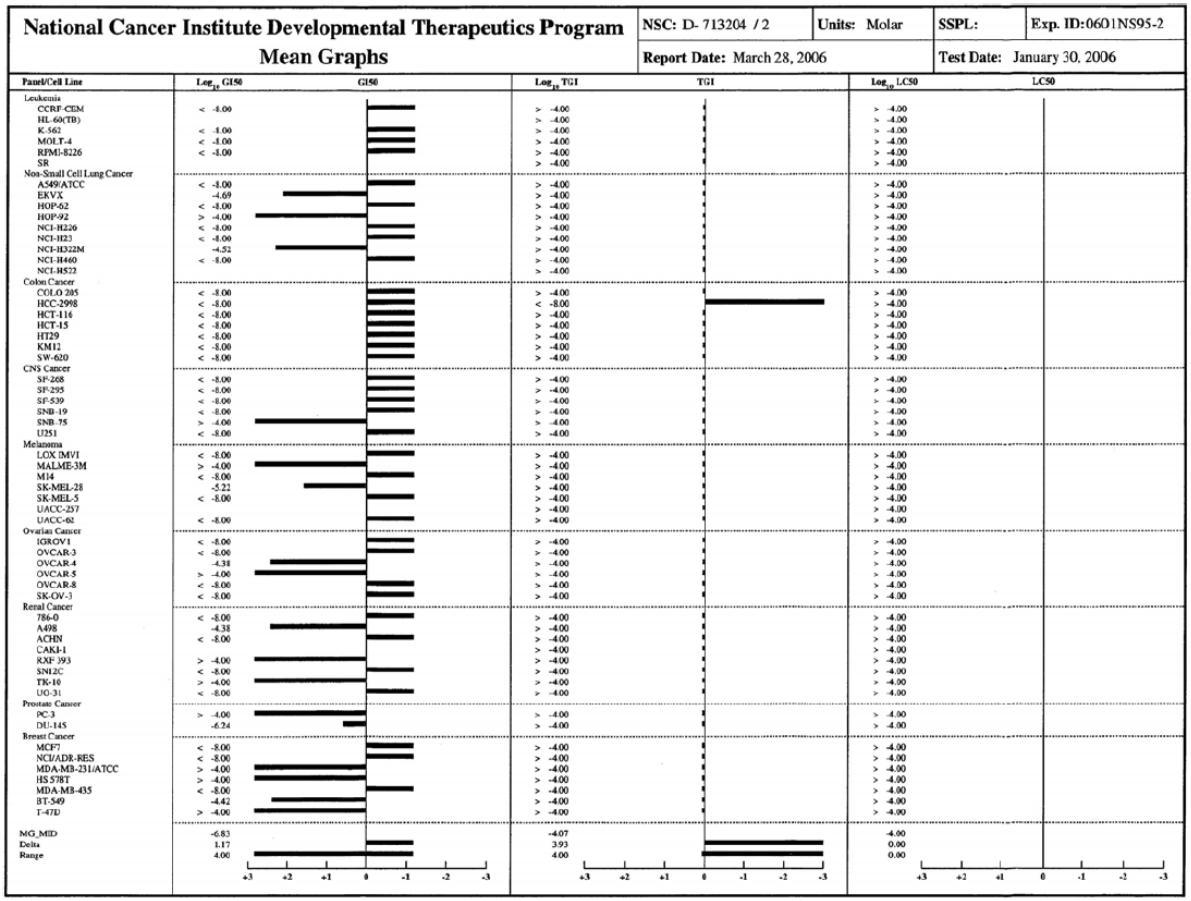
2.2.1　各種ヒト腫瘍細胞に対する細胞増殖阻害作用

（試験番号 PDX-P-06069-U、添付資料 4.2.1.1.1）

NCI-60 細胞パネルからの白血病細胞［急性リンパ芽球性白血病細胞 CCRF-CEM、慢性骨髄性白血病細胞 K-562、急性リンパ芽球性白血病細胞（T 細胞）MOLT-4、多発性骨髄腫細胞 RPMI-8226］を含む 53 種の腫瘍細胞株を細胞培養で増殖させ、37°C、5%CO_2、95%空気、相対湿度 100%の培養条件下にプララトレキサートの各種濃度（5 濃度、1/2 対数連続希釈）で 48 時間処理した。処理期間の終わりに、腫瘍細胞の増殖を測定し、50%細胞増殖阻害濃度（GI_{50} 値）を NCI 開発治療プログラム（NCI Developmental Therapeutics Program）の標準操作手順を用いて算出した。

結果を表 2.6.2- 1 に示す。検討した 53 種の腫瘍細胞株のうち 36 種の細胞株（68%）の GI_{50} 値は 0.1 µmol/L 未満であり、プララトレキサートに高い感受性を示した。プララトレキサートは幅広い種類の腫瘍細胞の増殖を阻害したが、特に白血病（検討した 4 種全種）、大腸がん（検討した 7 種全種）及び中枢神経系がん（検討した 6 種中 5 種）細胞はプララトレキサートに対して最も高い感受性を示した。

表 2.6.2- 1　NCI の細胞株でのスクリーニング及び比較結果



NCI-60 細胞パネルでのプララトレキサート活性。GI_{50}=50%細胞増殖阻害濃度（log10）、TGI=全増殖抑制、LC_{50}＝50%致死濃度（log10）。右向きのバーは平均値以上の活性（感受性）を示し、左向きのバーは相対的な抵抗性を示す。MG_MID＝パネル全体の平均活性、Delta＝log10 単位で示した個々の細胞株の MG_MID からの差、Range=log10 単位で示した細胞株間での最小値から最大値までの範囲。
Source: Study No.PDX-P-06069-U; Table 4.1

2.2.2　CCRF-CEM 細胞における生化学的及び細胞薬物動態学的評価並びに細胞障害作用

（Sirotnak et al 1998、添付資料 4.2.1.1.2）

本試験では CCRF-CEM 細胞におけるプララトレキサートの生化学的及び細胞薬物動態学的評価並びに細胞障害作用の評価を行った。CCRF-CEM 細胞の培養液には RPMI メディウムを用いた。

薬物 influx 測定：10 mmol/L glucose を含む緩衝液（pH7.4）に CCRF-CEM 細胞を懸濁し、[^{3}H]MTX 及び非放射性薬剤とインキュベートした（0 及び 37ºC）。各反応時間で懸濁液を回収して 0ºC に冷却した。冷緩衝等張生理食塩液（0.14 mol /L+ 0.01 mol/L リン酸カリウム、pH7.4）で 10 倍希釈し、遠心分離と再懸濁により 2 回洗浄した。細胞内薬物濃度は、放射能測定又は HPLC 測定により行った。細胞表面成分の薬物濃度を加味して総薬物濃度を補正し、細胞内薬物濃度を算出した。二重逆数プロットより流入最大速度定数（V_{max}）及び結合定数（K_m）を算出した［1］。

DHFR アッセイ：DHFR を過剰産生する遺伝子組み換え肺炎双球菌株から抽出した酵素溶液を用いた滴定法により CCRF-CEM 細胞内の薬物濃度を測定した。既定量の薬物又は希釈試料及び 12.8 mmol/L 2-mercaptoethanol を含む 0.05 mol/L リン酸カリウム緩衝液が入った試験管に、0.1 mmol/L NADPH 溶液 0.5 mL 及び希釈酵素溶液 0.1 mL を加えた（pH6.9）。混合液を 1 mL まで希釈し、4 分間室温で放置した。氷浴上でジヒドロ葉酸（0.1 mmol/L）0.5 mL を加えた後、37 ºC で 12 分間インキュベートした。再度試験管を氷浴に戻し、葉酸拮抗剤 methasquin 100 ng を含む蒸留水 1 mL を加えて反応を停止した。試験管を常温に戻し、340 nm での吸光度を測定した。検量線より各試料の薬物濃度を算出し、DHFR 阻害率を算出した［1］。

FPGS アッセイ：凍結した CCRF-CEM 細胞に 0.1 mol/L 2-mercaptoethanol、1 mmol/L アデノシン三リン酸（ATP）、2 mmol/L $MgCl_2$ 及び 15% (v/v) glycerol を含む冷（0～4ºC）Tris-HCl 緩衝液（pH8.85）を加えてホモジナイズした後、31000 x g で遠心分離して細胞上清を得た。アッセイ溶液は 100 mmol/L Tris-HCl 緩衝液（pH8.85）に 10 mmol/L ATP、20 mmol/L $MgCl_2$、20 mmol/L KCl、100 mmol/L 2-mercaptoethanol、4 mmol/L [^{3}H]glutamate、薬剤（基質）及び細胞上清を加え、最終容量を 250 µL とした。アッセイ溶液は 37 ºC で反応させた。溶液に 25 mmol/L 2-mercaptoethanol を含む冷（0～4ºC）5 mmol/L glutamate（pH7.5）1 mL を加えて反応を停止し、トリチウム化したポリグルタミン酸化体から未反応の[^{3}H] glutamate を DEAE セルロースクロマトグラフィーにより分離した。ポリグルタミン酸化体の生成量は、逆相 HPLC で測定した。二重逆数プロットより最大速度定数（V_{max}）及び 50%V_{max} での基質濃度（K_m）を算出した［2］。

CCRF-CEM 細胞におけるプララトレキサートの重要な生化学的及び細胞薬物動態学的特性を表 2.6.2- 2 に示す。プララトレキサートの DHFR 阻害作用は、同じく葉酸アナログで DHFR 阻害剤であるアミノプテリン、MTX 及び edatrexate の 1/2～1/3 の活性であった。しかし、流入最大速度定数／結合定数（V_{max}／K_m）値で認められるように、プララトレキサートは RFC-1 を介してより効率的に細胞内に取り込まれ、その速度は MTX の約 14 倍である。また、FPGS によるポリグルタミン酸化反応の V_{max}／K_m（最大速度／50%V_{max} での基質濃度）は、プララトレキサートが MTX より 10 倍以上の速度で効率的にポリグルタミン酸化されることを示唆している。同様に、プララ

トレキサートはアミノプテリン及び edatrexate よりも、より効率的に細胞内取り込み及びポリグルタミン酸化される。

表 2.6.2- 2　CCRF-CEM 細胞での葉酸アナログの生化学的及び細胞薬物動態学的特性

Treatment	DHFR Inhibition[a] K_i (pmol/L)	Influx			FPGS Activity		
		K_m (μmol/L)	V_{max} (pmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m	K_m (μmol/L)	V_{max} (pmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m
Pralatrexate	13.4 ± 3	0.3 ± 0.1	3.8 ± 1.3	12.6	5.9 ± 1	137 ± 26	23.2
Aminopterin	4.9 ± 1	1.2 ± 0.2	3.6 ± 1.0	3.0	5.8 ± 1	117 ± 18	20.2
Methotrexate	5.4 ± 2	4.8 ± 1.0	4.1 ± 1.2	0.9	32.2 ± 5	70 ± 10	2.2
Edatrexate	5.8 ± 1	1.1 ± 0.1	3.9 ± 0.9	3.5	6.3 ± 1	65 ± 9	10.3

a: Reaction carried out at pH6.9
The values shown are means ± SE from three to five separate experiments.
FPGS = folylpolyglutamyl synthetase, DHFR = dihydrofolate reductase, K_i = inhibitory constant, K_m = binding constant or concentration of substrate that gives half V_{max}, V_{max} = maximum rate constant or maximum velocity

In vitro 細胞障害試験：ヒト白血病細胞株 CCRF-CEM に対する各種葉酸アナログの細胞障害作用の評価のために、96 ウェルプレートを用いて、RPMI メディウム中で細胞培養した。細胞 10^3 個を含む各ウェルに薬剤の各種濃度を添加し、3 時間培養した。その後、薬物含有培地を新鮮な薬物非含有培地と交換し、さらに 72～96 時間培養した。細胞数は XTT アッセイで測定した。50%阻害濃度（IC_{50} 値）は自動化プレートリーダーで得られたデータから算出した。他の腫瘍細胞株（MDA-468、SK-BRIII、ZR-75-1、SK-LC8、SK-LC16）では、培養液に DMEM-HG 又は α-MEM-F12 メディウムを用いた。

結果を表 2.6.2- 3 に示す。CCRF-CEM 細胞に対する葉酸アナログの細胞障害作用は、生化学的及び細胞薬物動態学的試験の結果と一致していた。プララトレキサートは CCRF-CEM 細胞、乳がん細胞（MDA-468、SK-BRIII、ZR-75-1）及び NSCLC 細胞（SK-LC8、SK-LC16）において、3 時間曝露で MTX より 13～40 倍、edatrexate より 3～4 倍強い細胞障害作用を示した。

表 2.6.2- 3　ヒト腫瘍細胞に対する各種葉酸アナログの細胞障害作用

Cell line	Tissue type	IC_{50} (μmol/L)		
		Pralatrexate	Methotrexate	Edatrexate
CCRF-CEM	Acutelymphocytic leukemia	0.04 ± 0.01	1.2 ± 0.2	0.14 ± 0.03
MDA-468	Breast carcinoma	0.11 ± 0.02	4.5 ± 0.6	0.39 ± 0.05
SK-BR III	Breast carcinoma	0.28 ± 0.04	4.2 ± 0.5	0.99 ± 0.2
ZR-75-1	Breast carcinoma	0.26 ± 0.05	3.5 ± 0.5	0.86 ± 0.1
SK-LC8	NSCLC[a]	0.42 ± 0.1	10.3 ± 2	1.24 ± 0.2
SK-LC16	NSCLC[b]	0.11 ± 0.02	2.1 ± 0.3	0.26 ± 0.05

[a] Squamous cell carcinoma, [b] Adenocarcinoma
The values are means ± SE from three to five experiments. The cells were exposed to different concentrations of each agent in a 3-h pulse.
NSCLC = non-small cell lung cancer

2.2.3　各種ヒトリンパ腫細胞に対する細胞増殖阻害作用

（Wang et al 2003、添付資料 4.2.1.1.3）

プララトレキサート及び MTX の作用を、形質転換した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 種のリンパ腫細胞株で評価した。96 ウェルプレートの各ウェルに 2500～5000 個の細胞を加え、薬剤を添加した。培養液には 10%ウシ胎児血清、2 mmol/L L-グルタミン、4.5 g/L グルコース、1.5 g/L 重炭酸ナトリウム、1 U/mL ペニシリン／ストレプトマイシン、10 mmol/L HEPES 及び 1 nmol/L ピルビン酸ナトリウムを含む RPMI 1640 メディウムを用いた。細胞は 37°C、5%CO_2 下に 5 日間培養した。アラマーブルー又は XTT アッセイにて細胞増殖を測定し、各薬剤の IC_{50} 値を算出した。

結果を表 2.6.2- 4 に示す。*in vitro* での連続 5 日間処理で、プララトレキサートは全てのリンパ腫細胞株において MTX より少なくとも約 10 倍高い活性を示した。

表 2.6.2- 4　ヒトリンパ腫細胞株におけるプララトレキサート及び MTX の細胞増殖阻害作用

Cell line	Lymphoma type	IC_{50} (nmol/L)		*p* value
		Pralatrexate	Methotrexate	
Hs445	Hodgkin's disease	1.6 ± 0.8	32 ± 2.2	0.0455
HT	Diffuse large B-cell	3.0 ± 0.4	35 ± 5.0	0.0236
Raji	Burkitt's	2.0 ± 0.3	16 ± 0.8	0.0034
RL	Transformed follicular	23 ± 2.0	210 ± 40	0.0429
SKI-DLBCL-1	Diffuse large B-cell	5.1 ± 0.1	48 ± 2.5	0.0035

IC_{50} = half maximum inhibitory concentration
Statistical evaluation was performed using student's t-test analysis.

2.2.4　Gem との併用による SKI-DLBCL-1 細胞に対する細胞障害作用

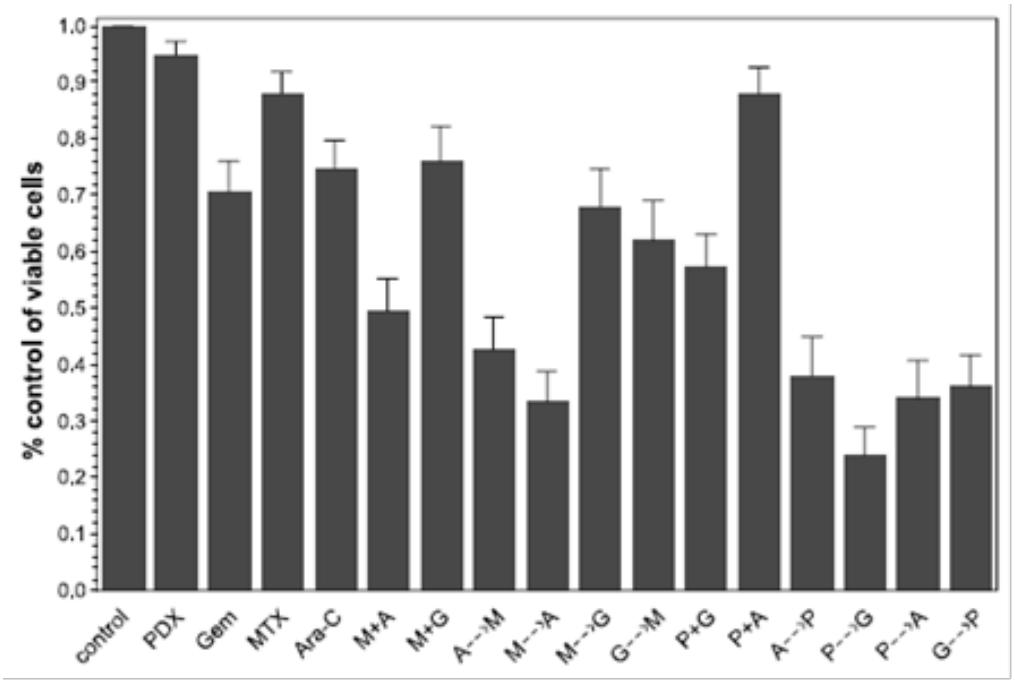
（Toner et al 2006、添付資料 4.2.1.1.4）

単独及びシチジンアナログ併用でのプララトレキサートの細胞増殖阻害作用を検討するために、プララトレキサートとシチジンアナログである Gem との併用で、標準的なトリパンブルー色素排除試験法を用いて、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫細胞（SKI-DLBCL-1）に対する *in vitro* 細胞障害試験を実施した。24 ウェルプレートの各ウェルに 5 x 10^5 個の細胞を加え、各薬剤 10 nmol/L を添加した。単剤（A）又は 2 剤（A+B）を添加して 48 時間培養、あるいは薬剤 A を単独で添加した 24 時間後に薬剤 B を添加し、更に 24 時間培養（A→B）した。各薬剤の濃度はおよそ 10～25%有効濃度とした。培養液には 15%ウシ胎児血清、10 mmol/L HEPES、1 mmol/L ピルビン酸ナトリウム、4.5 g/L グルコース、1.5 g/L 重炭酸ナトリウム及びペニシリン／ストレプトマイシンを含む RPMI メディウムを用いた。細胞は 37°C、5%CO_2 下に培養した。

SKI-DLBCL-1 細胞での MTX、ara-C、プララトレキサート及び Gem 単独並びに併用での作用を比較した *in vitro* 細胞障害試験の結果を図 2.6.2- 3 に示す。

MTX 処理後の ara-C 処理（M→A）で MTX と ara-C との併用処理（M+A）又は ara-C 処理後の MTX 処理（A→M）より強い細胞障害作用を示した。また、プララトレキサート処理後の Gem 処理（P→G）で、プララトレキサートと Gem との併用処理（P+G）又は Gem 処理後のプララトレキサート処理（G→P）より強い細胞障害作用を示し、葉酸アナログ処理後にシチジンアナログを処理するスケジュールが細胞障害作用に重要であることが示された。プララトレキサート処理後の Gem 処理（P→G）で、MTX 処理後の ara-C 処理（M→A）を含むいずれの併用よりも強い細胞障害作用が観察された。この *in vitro* 試験結果は、SKI-DLBCL-1 細胞の *in vivo* 異種移植モデルにおいても確認された（本項 2.3.2 章）。

図 2.6.2- 3　SKI-DLBCL-1 細胞におけるプララトレキサート又は MTX と他剤併用による *in vitro* 細胞障害作用



MTX or M = methotrexate, Ara-C or A = cytarabine, PDX or P = pralatrexate, Gem or G = gemcitabine
Columns: percentage control of viable cells; bars: SE

2.2.5　ヒト初代培養肝細胞に対する細胞障害作用

（試験番号 PDX-K-06020-U、添付資料 4.2.1.1.5）

96 ウェルプレートの各ウェルに低温保存したヒト初代培養肝細胞（12500 個）を加え、プララトレキサート（3.125～200 µmol/L）を添加した。細胞は最長 4 時間、37°C、5%CO_2 下で培養した。培養液には DMEM-F12 メディウムを使用した。対照との相対細胞生存率を ATPLite Kit（PerkinElmer Life and Analytical Sciences）を用いた細胞内 ATP の定量により評価した。

結果を表 2.6.2- 5 に示す。プララトレキサート 200 µmol/L の 4 時間処理で細胞生存率の低下はわずか 11%であり、いずれの濃度及び処理時間でも有意な細胞障害作用は認められなかった。

表 2.6.2- 5　プララトレキサート処理後のヒト初代培養肝細胞相対生存率

Concentration (μmol/L)	Treatment time		
	1-hr	2-hr	4-hr
0	100.00 ± 31.97	100.00 ± 13.65	100.00 ± 10.58
3.125	121.87 ± 27.65	107.49 ± 7.27	110.07 ± 13.99
6.25	123.23 ± 40.06	106.39 ± 20.22	97.80 ± 8.80
12.5	134.82 ± 8.87	101.66 ± 12.67	87.23 ± 8.77
25	115.89 ± 18.74	101.23 ± 8.14	91.93 ± 11.95
50	108.16 ± 31.45	72.35 ± 7.50	94.31 ± 9.13
100	123.58 ± 18.82	76.74 ± 14.33	91.37 ± 6.10
200	102.51 ± 7.05	71.98 ± 17.78	89.37 ± 9.73

The cells were treated at concentrations ranging from 3.125 to 200 μmol/L, for incubation time periods of 1, 2 and 4 hours.
SD = standard deviation, Values were mean ± SD
Source: Study No.PDX-K-06020-U; Table 1

2.2.6　ヒト初代培養肝細胞に対する細胞障害作用

（試験番号 PDX-K-08060-U、添付資料 4.2.2.6.8）

ヒト初代培養肝細胞でのプララトレキサートの肝酵素誘導作用を検討した試験において、同時に細胞障害作用を評価した。48 ウェルプレートに 3 名のドナーから入手したヒト初代培養肝細胞を加え、プララトレキサートを添加して最終濃度 2～50 μmol/L とした。細胞は 37°C の組織培養インキュベーター中で 3 日間培養した。培養液には William's medium E を用いた。細胞生存率をテトラゾリウム塩を用いた細胞増殖測定法（CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay）で評価した。

最高濃度（50 μmol/L）での細胞生存率の低下は最大でわずか 16.5%であり、全てのドナー由来の初代培養肝細胞において、いずれの濃度でもプララトレキサートによる有意な細胞障害作用は認められなかった。

2.3　*In vivo* 試験

2.3.1　各種 NHL 細胞異種移植モデルに対する抗腫瘍作用

（Wang et al 2003、添付資料 4.2.1.1.3）

非肥満糖尿病／重症複合免疫不全(NOD/SCID)マウス(6～8 週齢)に 3 種のヒト NHL 細胞(RL、HT 及び SKI-DLBCL-1 細胞）10^7 個を皮下移植し、プララトレキサートの *in vivo* 作用を MTX と比較した。マウスの腫瘍体積が 100 mm^3 に達した時点で 3 群（3～8 匹／群）に割り付け、生理食塩液（対照）、最大耐量（MTD）の MTX（40 mg/kg）又は MTD のプララトレキサート（60 mg/kg）を週 2 回、2 週間腹腔内投与した。試験は 2 回実施した。腫瘍の最大の長さ及び幅を測定し、腫瘍体積を $4/3\ \pi r^3$［r =（長さ+幅）/4］の計算式で算出した。

プララトレキサート投与では HT リンパ腫のほぼ 90%が完全に退縮したが、MTX 投与ではわずかな腫瘍増殖遅延のみを示した（表 2.6.2- 6）。他の 2 種のモデルでプララトレキサート投与により腫瘍が完全退縮した割合は、RL で 56%（表 2.6.2- 7）、SKI-DLBCL-1 で 30%（表 2.6.2- 8）であった。一方、MTX 投与では腫瘍退縮はみられず、軽度な増殖遅延を示す程度であった。これらの結果は、プララトレキサートが MTX より NHL に対し、高い活性を有することを示している。

表 2.6.2- 6　HT 細胞を異種移植した NOD/SCID マウスでの抗腫瘍作用

Agent	Dose (mg/kg)	Body weight change (%)	Average tumor diameter (mm ± SE)	Average change in tumor volume (mm^3 ± SE)	Average tumor regression (%)	Complete regressions (no./total)
Control	—	+13.3	11.2 ± 1.3	+641 ± 252	—	0/8
Methotrexate	40	- 9.8	8.7 ± 2.0	+300 ± 225	—	0/7
Pralatrexate	60	- 8.9	0.5 ± 0.3	-95 ± 0.8	99	8/9

SE = standard error, no. = number
Shown are the results of two experiments with 3-5 mice per group

表 2.6.2- 7　RL 細胞を異種移植した NOD/SCID マウスでの抗腫瘍作用

Agent	Dose (mg/kg)	Body weight change (%)	Average tumor diameter (mm ± SE)	Average change in tumor volume (mm^3 ± SE)	Average tumor regression (%)	Complete regressions (no./total)
Control	—	+15.9	12.5 ± 1.3	+1228 ± 238	—	0/7
Methotrexate	40	-14.8	10.9 ± 0.5	+618 ± 108	—	0/12
Pralatrexate	60	-11.1	2.7 ± 1.1	- 46 ± 34	57	5/9

SE = standard error, no. = number
Shown are the results of two experiments with 3-8 mice per group

表 2.6.2- 8　SKI-DLBCL-1 細胞を異種移植した NOD/SCID マウスでの抗腫瘍作用

Agent	Dose (mg/kg)	Body weight change (%)	Average tumor diameter (mm ± SE)	Average change in tumor volume (mm^3 ± SE)	Average tumor regression (%)	Complete regressions (no./total)
Control	—	+4.9	12± 0.3	+786 ± 64	—	0/8
Methotrexate	40	+1.9	9.5± 0.4	+299 ± 58	—	0/10
Pralatrexate	60	-1.2	3.5± 0.7	- 81 ± 16	54	3/10

SE = standard error, no. = number
Shown are the results of two experiments with 3-5 mice per group

2.3.2　Gem との併用による SKI-DLBCL-1 細胞異種移植モデルに対する抗腫瘍作用

（Toner et al 2006、添付資料 4.2.1.1.4）

葉酸アナログおよびシチジンアナログは、多種のリンパ増殖性疾患の治療に用いられている。MTX は、投与スケジュールによっては ara-C と相乗的に作用することが知られている。

SKI-DLBCL-1 細胞異種移植モデルにおいて、プララトレキサートとシチジンアナログである Gem の併用投与試験を実施し、標準併用療法である MTX + ara-C と、プララトレキサート+ Gem の併用効果を比較した。

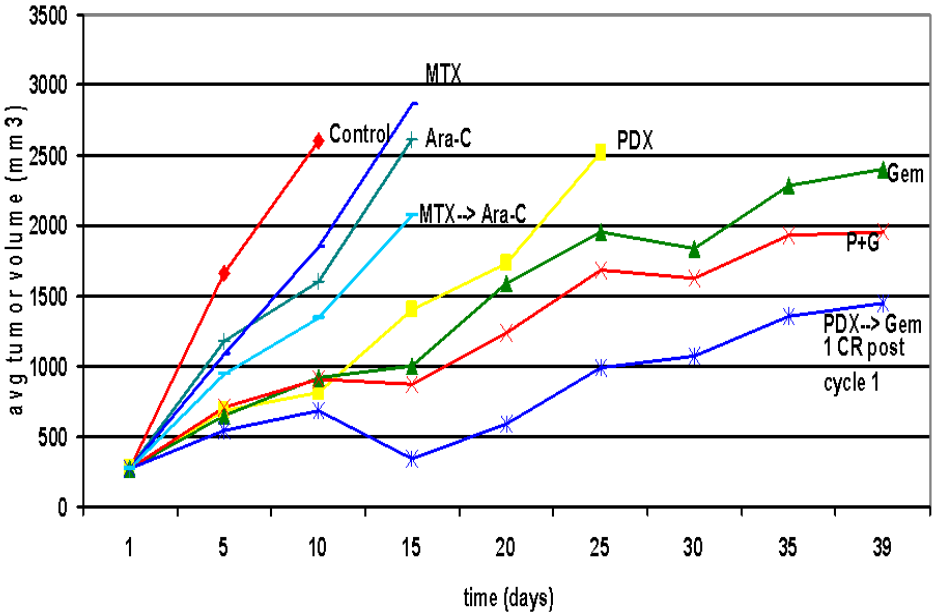
SCID beige マウス（5～7 週齢）に SKI-DLBCL-1 細胞 10^7 個を皮下移植し、腫瘍体積が 300 mm^3 に達した時点で 9 群(5 匹／群)に割り付け、いずれも MTD の MTX（40 mg/kg）、ara-C（300 mg/kg）、プララトレキサート（60 mg/kg）又は Gem（60 mg/kg）、又はこれら薬剤の併用（投与量は MTD の 1/2 又は 1/4 量）で週 2 回、2 週間、計 4 回腹腔内投与した。投与スケジュール依存性の検討では、プララトレキサート及び MTX 投与後 24 時間に、それぞれ Gem 及び ara-C を投与した。対照群にはいずれも生理食塩液を投与した。腫瘍の最大の長さ及び幅を測定し、腫瘍体積を 4/3 πr^3［r =（長さ+幅）/4］の計算式で算出した。

NOD/SCID マウスに SKI-DLBCL-1 細胞を皮下移植したモデルを用いた予備試験では、プララトレキサートと Gem（いずれも 30 mg/kg、MTD の 1/2 量）の併用投与では、著明な腫瘍退縮（初期腫瘍体積の 63.1%退縮）が認められ、5 匹中 3 匹では完全な寛解がみられた（データ省略）。MTX 40 mg/kg、ara-C 300 mg/kg 又はこれら薬剤の 1/2 量での併用投与では、対照群に比較して軽度な腫瘍増殖遅延を示すのみで、これらの動物は腫瘍の過剰増殖のため 3 週目までに安楽死させた。

次に SCID beige マウスに SKI-DLBCL-1 細胞を皮下移植したモデルを用いて、より低い用量のプララトレキサートと Gem（いずれも 15 mg/kg、MTD の 1/4 量）を用いた併用投与試験を行った。試験結果を図 2.6.2- 4 に示す。先の予備試験と同様に対照群並びに MTX（40 mg/kg、MTD）及び ara-C（300 mg/kg、MTD）単独、又は、MTX 投与 24 時間後 ara-C 投与群（MTX→ara-C；投与量はいずれも MTD の 1/2 量）の動物は、過度の腫瘍増殖により早期に安楽死させた。プララトレキサート単独投与は、MTX 及び ara-C 単独、又は MTX→ara-C 群より優れた腫瘍増殖阻害作用を示した。プララトレキサートと Gem の併用投与（P+G；投与量はいずれも MTD の 1/4 量）では、MTX 及び ara-C 単独、又は MTX→ara-C 群より著明に高い効果を示した。完全腫瘍退縮は、プララトレキサート投与 24 時間後に Gem を投与した群（PDX→Gem）でのみ認められた。これらの *in vivo* 試験では、プララトレキサート投与後に Gem へ切り替える投与方法が明らかに優れていることが示された。

以上の結果から、Gem との併用の有無にかかわらず、リンパ増殖性疾患の治療にプララトレキサートが新たな治療法の選択肢をもたらす可能性は高いと考えられる。

図 2.6.2- 4　SKI-DLBCL-1 NHL 細胞を異種移植した SCID-Beige マウスにおけるプララトレキサートと Gem の併用による抗腫瘍作用



avg = average, MTX = methotrexate, Ara-C = cytarabine, PDX = pralatrexate, Gem = gemcitabine, P + G = pralatrexate + gemcitabine, CR = complete remission
MTX was given at 40 mg/kg i.p., ara-C was given at a dose of 300 mg/kg i.p.; PDX and Gem were both given at a dose of 60 mg/kg i.p. All drugs were dosed twice weekly for 2 weeks (i.e., on days1and 4 and 8 and11) followed by a1week rest for a total of two cycles of therapy in all cases. In cases where ordered administration was used, the second drug was given 24 hours after the first drug. In the case where MTX and ara-C were given in combination, the doses of drugs used were 20 and 150 mg/kg, respectively. In the cases where PDX and Gem were used, the doses were15 mg/kg for both agents.

2.3.3　異なる投与スケジュールでの抗腫瘍作用の比較

（試験番号 PDX-P-03002-M、添付資料 4.2.1.1.6）

異なる投与スケジュールでのプララトレキサートの有効性を、3 種の投与スケジュールを用いて、2 つのヒト腫瘍異種移植モデルで検討した（表 2.6.2- 9）。ヒト乳がん細胞（MX-1）及びヒト肺がん細胞（LX-1）を移植した NCR（AT）nu マウス（22～30 g、6 匹／群）に、MTD 又はその近似量のプララトレキサートを各投与スケジュールで腹腔内投与した。プララトレキサート投与は、腫瘍サイズが直径 4～4.5 mm となった腫瘍移植 3～4 日後に開始した。腫瘍体積は 4/3 πr^3 の計算式で算出した。

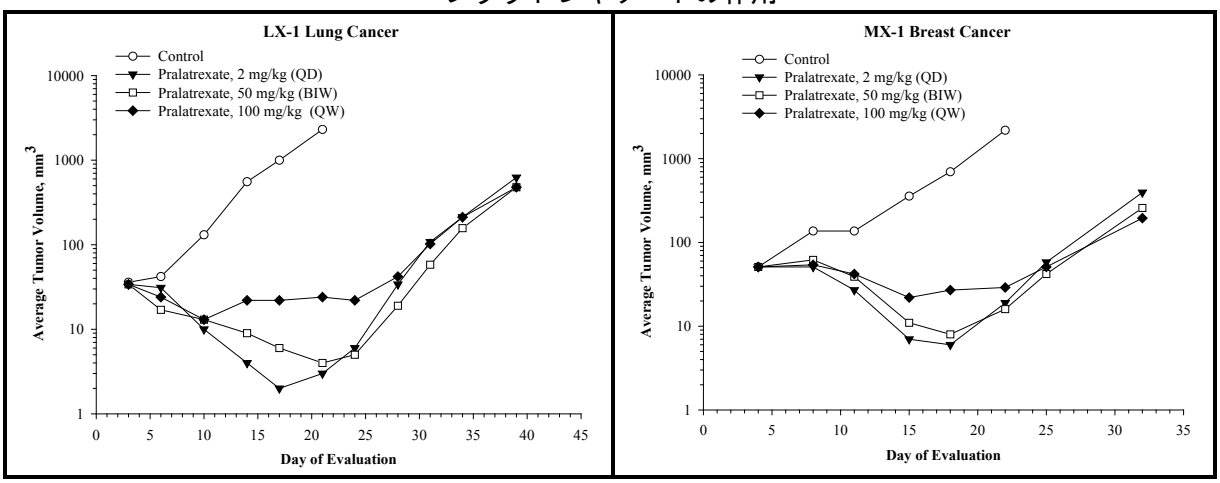
表 2.6.2- 9　LX-1 及び MX-1 異種移植マウスへのプララトレキサート投与スケジュール

投与スケジュール	1 回あたりの投与量（mg/kg）	投与回数	総投与量（mg/kg）
1 日 1 回 5 日間 × 2 週	2	10	20
週 2 回 × 2 週	50	4	200
週 1 回 × 3 週	100	3	300

Source: Study No.PDX-P-03002-M; Table 1

いずれの腫瘍モデルにおいても、検討したすべての投与スケジュールで腫瘍退縮が認められた（図 2.6.2- 5）。いずれの腫瘍モデルにおいても、週 1 回投与に比べ、1 日 1 回 5 日間投与及び週 2 回投与でより顕著な腫瘍退縮が認められ、2 回の試験で再現性が得られた。1 日 1 回 5 日間投与での総投与量 20 mg/kg では、総投与量 200 及び 300 mg/kg の間歇投与と比較して、より効果的であったことから、投与スケジュールは用量よりも大きな効果を有していた。

図 2.6.2- 5　LX-1 及び MX-1 異種移植マウスにおける異なる投与スケジュールでの
プララトレキサートの作用



QD = once daily, BIW = biweekly, QW = once weekly
Source: Study No.PDX-P-03002-M; Figure 2A and 4A

2.4　その他の薬理試験

2.4.1　プララトレキサートジアステレオマーの薬理学的プロファイル

（試験番号 PDX-P-05071-U、添付資料 4.2.1.1.7）

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である。2 つのジアステレオマーは、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。プララトレキサート、PDX-10a 及び PDX-10b の長期曝露（5 日間）でのヒト前立腺がん細胞（CWR22-RV1）に対する *in vitro* 細胞障害作用を検討した。試験は 4 回実施した。培養液には 10%ウシ胎児血清を含む RPMI メディウムを用いた。96 ウェルプレートの各ウェルに細胞を加え、薬剤（1～500 ng/mL）を添加し、37°C、5%CO_2、95%空気、相対湿度 100%の

培養条件下に 5 日間処理した。処理期間の終わりに、細胞の生育及び生存を MTT アッセイにより測定し、対照に対する相対細胞生存率を算出した。細胞生存率から IC_{50} 値を求めた。

試験間で若干の変動があったが、いずれのジアステレオマーも、ジアステレオマー混合物であるプララトレキサートと同程度の細胞障害作用を示した（IC_{50} 値：8.3～13.3 nmol/L）（表 2.6.2- 10）。

表 2.6.2- 10　CWR22-RV1 前立腺がん細胞におけるプララトレキサート、PDX-10a 及び PDX-10b の細胞障害作用

	IC_{50} (nmol/L)	± SD
Pralatrexate	8.32	1.49
PDX-10a	13.31	2.66
PDX-10b	8.51	1.93

IC_{50} = half-maximum inhibitory concentration, SD = standard deviation
Source: Study No.PDX-P-05071-U; Table 4.1

2.4.2　不純物A*　の薬理学的プロファイル

（試験番号 PDX-P-08068-U、添付資料 4.2.1.1.8）

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。細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルに加え、37°C、5%CO_2 下で 24 時間培養した後、プララトレキサート又は　不純物A*　を各種濃度（0.003～10 µmol/L）で添加し、3 時間培養した。薬物含有培地を新鮮な薬物非含有培地と交換し、さらに 72 時間培養後、細胞増殖を MTS 生細胞アッセイで定量した。490 nm での光学密度をプロットし、IC_{50} 値を算出した。

表 2.6.2- 11 に示すように、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（IC_{50} 値：6.7～54.3 nmol/L）。一方、　不純物A*　の作用は全ての細胞株に対して明らかに弱かった（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*　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。さらに、プララトレキサート及び同種の葉酸アナログの用量制限毒性は、それらの細胞障害作用に関連しているため、　不純物A*　が動物モデルや患者で観察された用量制限毒性に寄与している可能性は低いと考えられる。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

表 2.6.2- 11　ヒト腫瘍細胞株に対するプララトレキサート及び不純物A*の細胞増殖阻害作用

Cell Line	IC_{50} (nmol/L)	
	Pralatrexate	不純物A*
A549 (lung)	> 10,000	> 10,000
NCI-H460 (lung)	6.7	> 10,000
MDA-MB231 (breast)	25.0	1,980
MDA-MB435 (breast)	35.1	1,377
SK-BR3 (breast)	54.3	> 10,000

IC_{50} = half maximum growth inhibitory concentration, [redacted]
Source: Study No.PDX-P-08068-U; Table 4.1

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

3　副次的薬理試験

3.1　抗炎症作用に関する MTX との比較

（試験番号 PDX-P-06031-R、添付資料 4.2.1.2.1）

MTX は、関節リウマチの治療に疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）として使用されている［3、4］。ラット II 型コラーゲン誘発関節炎モデルにおけるプララトレキサートの抗炎症作用を MTX と比較した。雌 Lewis ラット（142～169 g）に Day 0 及び Day 6 にウシタイプ II コラーゲンをフロイント不完全アジュバンドとともに投与し、関節炎を惹起させた。ラット（関節炎ラット；10 匹／群、コントロールラット；4 匹／群）には、Day 0～Day 16 に溶媒（生理食塩液）、MTX（0.075、0.05 及び 0.025 mg/kg）又はプララトレキサート（0.075、0.05 及び 0.025 mg/kg）を 1 日 1 回、経口又は静脈内投与した。Day 0 及び Day 9 以降毎日、足関節直径をノギスで測定した。Day 17 に全ての動物を屠殺して試験を終了した。作用の評価は、試験期間を通した足関節直径（時間－足関節直径曲線下面積を算出）、試験終了時の後肢重量並びに足関節及び膝の組織病理学的検査に基づいて行った。

MTX 及びプララトレキサート（いずれも 0.075、0.05 及び 0.025 mg/kg）の静脈内投与での作用は、高用量では MTX が、中間及び低用量ではプララトレキサートがわずかに優れていたが、両薬剤の足関節の病理組織学的検査スコア、試験期間を通した足関節直径及び後肢重量に対する 50%有効用量（ED_{50} 値）は 0.054～0.061 mg/kg、膝の病理組織学的検査スコアの ED_{50} 値は 0.041～0.046 mg/kg であり、同様の結果が得られた。MTX の静脈内投与では同用量の経口投与よりもわずかに優れた作用を示した。プララトレキサートの 0.05 及び 0.025 mg/kg 経口投与では概ね作用はみられなかったが、0.075 mg/kg で足関節直径 AUC、後肢重量及び病理組織学的検査スコアに有意差のない軽度な抑制がみられた（Day 10 及び 11 の足関節直径には有意差を認めた）。

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は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A ガイドラインに従って実施した。プララトレキサートで実施した安全性薬理試験を表 2.6.2- 12 に示す。

表 2.6.2- 12　安全性薬理試験項目一覧

Type of Study and Test System	Study Period	GLP Compliant	Study Number
Neurobehavioral, SD rats	2006-2007	Yes	PDX-T-07037-R
Cardiac safety, hERG	2003-2005	No	PDX-T-05018-H
Cardiac safety, isolated dog Purkinje fibers	2003-2004	Yes	PDX-T-04005-D
Cardiovascular and respiratory safety, Beagle dogs	2006-2007	Yes	PDX-T-07036-D

GLP = Good Laboratory Practice, hERG = human ether-a-go-go related gene, SD = Sprague-Dawley

4.1　中枢神経系

（試験番号 PDX-T-07037-R、添付資料 4.2.1.3.1）

計 128 匹の雌雄 SD ラット（投与開始時　雄：9～14 週齢、雌：9～15 週齢）を 1～4 群に無作為に割り付け（16 匹／性／群）、リン酸緩衝生理食塩液（溶媒）又はプララトレキサートの 5、10 又は 25 mg/kg を単回静脈内投与した。FOB、自発運動量、臨床所見観察及び体重を評価項目とした。ラットは投与前並びに投与 5 分後（C_{max}）及び 24 時間後での FOB（8 匹／性／群）及び自発運動量測定（8 匹／性／群）のために各群割り付けた。

プララトレキサートの投与で死亡例はなかった。プララトレキサート投与に関連した異常所見はなく、体重は対照群と類似していた。FOB 所見及び自発運動量は、全ての時点で対照群と類似していた。

結論として、SD ラットにおける 25 mg/kg までの用量でのプララトレキサート単回静脈内投与で神経毒性の有害所見はなかった。プララトレキサート投与群での FOB 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。

4.2　心血管系

4.2.1　*In vitro* 試験

4.2.1.1　　hERG カリウム電流の測定

（試験番号 PDX-T-05018-H、添付資料 4.2.1.3.2）

プララトレキサート（0.4、0.8、2 及び 4 mg/mL）の hERG カリウム電流に対する作用を、hERG チャネルを発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）-K1 細胞株を用い、ホールセルパッチクランプ法により評価した。陽性対照として E-4031（3 µmol/L）を用いた。プララトレキサートは 11 個の細胞を用いて、陽性対照は 3 個の細胞を用いて評価した。

プララトレキサートは 0.8、2 及び 4 mg/mL で hERG カリウム電流をそれぞれ 37%、54%及び 54%阻害した。0.4 mg/mL では hERG カリウム電流に作用を示さなかった。一方、陽性対照である E-4031 は hERG カリウム電流を 98%阻害した。

本試験において、プララトレキサートの高濃度で hERG カリウム電流阻害が観察されたが、海外第 2 相試験（PDX-008 試験；2.7.2.3.2 項）で観察された最大 C_{max} である約 22 µg/mL よりも 10 倍以上高い濃度（0.4 mg/mL）で hERG カリウム電流阻害はなかった。

4.2.1.2　　イヌ摘出プルキンエ線維を用いた活動電位パラメーターの測定

（試験番号 PDX-T-04005-D、添付資料 4.2.1.3.3）

イヌ摘出プルキンエ線維を用いた微小電極法により 0.5 及び 1.0 Hz での電気刺激時の活動電位パラメーターに対するプララトレキサート（0.4、0.8 又は 2.0 mg/mL）の作用を評価した。測定した活動電位パラメーターは、静止膜電位（RMP）、オーバーシュート（OS）、活動電位振幅（APA）、

最大立ち上がり速度（V_{max}）並びに 30、60 及び 90%再分極での活動電位持続時間（APD_{30}、APD_{60}、APD_{90}）である。

プララトレキサートは 0.4、0.8 及び 2.0 mg/mL（分析結果濃度はそれぞれ約 0.34、0.67 及び 1.66 mg/mL）で、いずれのパラメーターにおいても統計学的有意な、又は生物学的に意義ある（>15%）変化を誘導しなかった。一方、陽性対照の dl-sotalol（50 µmol/L）は、APD_{60} 及び APD_{90} の延長を示した。

本試験での最高実質濃度（1.66 mg/mL）は、海外第 2 相試験 PDX-008 試験（2.7.2.3.2 項）で観察された最大 C_{max} である約 22 µg/mL よりも約 75 倍高いことから、プララトレキサートが臨床用量で QT 延長を誘発する可能性は低いと考えられた。

4.2.2　*In vivo* 試験

（試験番号 PDX-T-07036-D、添付資料 4.2.1.3.4）

テレメトリー装着の覚醒雌雄ビーグル犬を用いて心血管系に対するプララトレキサート静脈内投与での作用を評価した。テレメトリー装着の覚醒ビーグル犬雌雄各 4 匹（初回投与時　雄：10～11 ヵ月齢、雌：9～12 ヵ月齢）に、対照溶媒（PBS）を Day 1 に、プララトレキサートの 0.1、0.5 及び 0.7 mg/kg をそれぞれ Day 8、15 及び 22 に静脈内投与した。各種パラメーターは投与前、投与 30、60 及び 120 分後並びに投与 4、8 及び 24 時間後に測定した。心血管系パラメーター（心拍数並びに収縮期、拡張期及び平均動脈圧）、ECG パラメーター（PR 間隔、QRS 幅、RR 及び QT/QTc 間隔）及び体温は、テレメトリーシステムを介して採集した。また、他の評価項目として、死亡、一般症状、体重及び体重変化量を検討した。

プララトレキサートは 0.7 mg/kg までの投与で心血管系パラメーター、体温及び ECG パラメーターに影響を示さなかった。また死亡例も認められなかった。雌雄の体重及び体重変化量に有害作用はみられなかった。摂餌低下、下痢、嘔吐並びに軟便、粘液便、変色便及び／又は無糞便などを含む投与に関連した用量依存のある毒性所見は雌雄でみられなかった。

4.3　呼吸器系

（試験番号 PDX-T-07036-D、添付資料 4.2.1.3.4）

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の安全性評価試験（本項 4.2.2 章）では、呼吸器系に対する作用も同時に検討した。呼吸器機能は Day 29（PBS）及び 36（プララトレキサート 0.7 mg/kg）の静脈内投与後に評価した。呼吸器機能データ（血中酸素飽和度及び終末呼気 CO_2 濃度）はカプノグラフを介して採集し、呼吸数は手動で測定した。

プララトレキサートは 0.7 mg/kg の静脈内投与でいずれの測定パラメーターに対しても影響を示さなかった。

5　薬力学的薬物相互作用試験

SKI-DLBCL-1 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（本項 2.2.4 及び 2.3.2 章）。

6　考察及び結論

プララトレキサートは MTX に比較して、細胞内への取り込みが向上し、FPGS によるポリグルタミン酸化体を効率的に生成する抗腫瘍性葉酸アナログである。これらのプララトレキサートの改良された特性により、他の葉酸アナログ及びその他の化学療法剤に比較して、ヒト腫瘍細胞株を用いた各種 *in vitro* 及び *in vivo* モデルにおいて優れた有効性を示した。他葉酸アナログと同様に、プララトレキサートは NCI-60 細胞パネルを用いたスクリーニングにおいて、幅広い種類の腫瘍細胞株に対して強力な細胞障害作用を示した。プララトレキサートと既承認がん治療薬との *in vitro* 及び *in vivo* 併用試験では、ほとんどの場合、併用投与が単剤投与より優れていた。また、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。

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影響を検討するため、安全性薬理コアバッテリー試験を実施した。プララトレキサートの中枢神経系に対する影響を、ラットを用いた FOB 及び自発運動により評価した結果、投与に関連した変化はみられなかった。心血管系安全性評価試験では、プララトレキサートは臨床で観察された最大 C_{max} の 10 倍及び 75 倍を超える濃度でそれぞれ hERG カリウム電流及びイヌプルキンエ線維の活動電位に影響しないことが示された。覚醒ビーグルを用いたテレメトリー法において、プララトレキサートは血圧（収縮期、拡張期及び平均動脈圧）、心拍数、体温、ECG パラメーター（PR、QRS、RR 及び QT/QTc 間隔）に影響しなかった。また、同試験においてプララトレキサートによる呼吸器系に対する影響も認められなかった。

7　参考文献

1. Sirotnak, FM. Correlates of folate analog transport, pharmacokinetics and selective antitumor action. Pharmacol Ther 1980; 8: 71-103. (4.3.9)
2. Rumberger BG, Barrueco JR, Sirotnak FM. Differing specificities for 4-aminofolate analogues of folylpolyglutamyl synthetase from tumors and proliferative intestinal epithelium of the mouse with significance for selective antitumor action. Cancer Res 1990; 50: 4639-43. (4.3.8)
3. Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. Pharmacol Rev 2005; 57(2): 163-72. (4.3.1)
4. Swierkot J, Szechinski J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. Pharmacol Rep 2006; 58(4): 473-92. (4.3.10)

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）

2.6.3　薬理試験概要表

ムンディファーマ株式会社

目次

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 6

2.6.3.3　副次的薬理試験 6

2.6.3.4　安全性薬理試験 7

2.6.3.4.1　*In vitro* 試験 7

2.6.3.4.2　*In vivo* 試験 8

2.6.3.5　薬理学的薬物相互作用試験 9

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number / Published article	Location
In Vitro Primary Pharmacodynamics					
Growth inhibitory activity of pralatrexate (PDX) in the National Cancer Institute (NCI)-60 cancer cell panel	Human cancer cells in culture	Not applicable (NA) (*in vitro*)	[redacted] USA	PDX-P-06069-U	4.2.1.1.1
Biochemical and cellular activity of PDX, methotrexate, and edatrexate in human cancer cell lines	Various human cancer cell lines in culture	NA (*in vitro*)	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC), New York, NY, USA	Sirotnak 1998	4.2.1.1.2
Cytotoxicity of PDX and methotrexate in human lymphoma cell lines	Various human lymphoma cell lines in culture	NA (*in vitro*)	MSKCC, New York, NY, USA	Wang 2003	4.2.1.1.3
Cytotoxicity of PDX in combination with gemcitabine in SKI-DLBCL-1 cells	Human diffuse large b cell lymphoma (DLBCL) cells in culture	NA (*in vitro*)	MSKCC, New York, NY, USA	Toner 2006	4.2.1.1.4
Cytotoxicity of PDX in human hepatocytes	Human hepatocytes	NA (*in vitro*)	[redacted] USA	PDX-K-06020-U	4.2.1.1.5
Induction Assessment of CYP1A2, 3A4, and 2C19 by PDX in Fresh Human Hepatocytes	Fresh human hepatocytes	NA (*in vitro*)	[redacted] USA	PDX-K-08060-U	4.2.2.6.8

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表（続き）

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number / Published article	Location
In Vivo Primary Pharmacodynamics					
Evaluation of PDX and methotrexate in human lymphoma xenograft models	Human Lymphoma xenograft models	Intraperitoneal (IP)	MSKCC, New York, NY, USA	Wang 2003	4.2.1.1.3
Evaluation of PDX in combination with gemcitabine in the SKI-DLBCL-1 xenograft model	Human DLBCL xenograft model	IP	MSKCC, New York, NY, USA	Toner 2006	4.2.1.1.4
Activity of PDX administered on different schedules in tumor xenograft models	Human breast and lung cancer xenograft models	IP	[redacted] USA	PDX-P-03002-M	4.2.1.1.6
Other Primary Pharmacodynamics					
Cytotoxicity of PDX and PDX diastereomers in a human prostate cancer cell line	Human prostate cancer cells in culture	NA (*in vitro*)	[redacted] USA	PDX-P-05071-U	4.2.1.1.7
Growth inhibitory activity of PDX and Impurity A* in cancer cell lines	Human cancer cells in culture	NA (*in vitro*)	[redacted] USA	PDX-P-08068-U	4.2.1.1.8
Secondary Pharmacodynamics					
Evaluation of PDX and methotrexate in rat type II collagen arthritis model	Rat arthritis model	Oral, Intravenous (IV)	[redacted] USA	PDX-P-06031-R	4.2.1.2.1

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表（続き）

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number / Published article	Location
Safety Pharmacology					
Neurobehavioral study in Sprague Dawley rats	Sprague-Dawley rats	IV	[redacted] USA	PDX-T-07037-R	4.2.1.3.1
Effect of PDX on human ether-a-go-go related gene (hERG)-K^+ currents	Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells	NA (*in vitro*)	[redacted] Switzerland	PDX-T-05018-H	4.2.1.3.2
Effect of PDX on action potential parameters in dog isolated Purkinje fibers	Dog isolated Purkinje fibers	NA (*in vitro*)	[redacted] USA	PDX-T-04005-D	4.2.1.3.3
Cardiovascular safety pharmacology and respiratory function in Beagle dogs	Beagle dogs	IV	[redacted] USA	PDX-T-07036-D	4.2.1.3.4

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験

2.6.2.2 項を参照

2.6.3.3　　副次的薬理試験

2.6.2.3 項を参照

2.6.3.4　安全性薬理試験

2.6.3.4.1　*In vitro* 試験

Test Articles: Pralatrexate

Organ Systems Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose (mg/mL)	No. per Group	Noteworthy Findings	GLP[a]	Study Number / Location
Cardiovascular (hERG Inhibition)	CHO-K1 cells	*In vitro*	0.4, 0.8, 2, 4	5 cells per concentration	PDX at concentrations of 0.8, 2, and 4 mg/mL inhibited hERG K^+ currents by 37%, 54%, and 54%, respectively. At 0.4 mg/mL, a concentration 18-fold higher than the highest observed clinical C_{max} (about 22 µmol/L), PDX had no effect on hERG K^+-currents.	No	PDX-T-05018-H / 4.2.1.3.2
Cardiovascular (Purkinje fiber action potential Inhibition)	Dog isolated Purkinje fibers	*In vitro*	0.4, 0.8, 2.0	Male, n = 4	PDX at concentrations of 0.4, 0.8, and 2.0 mg/mL does not have any significant or biologically relevant effects on dog Purkinje fiber action potential. The tested concentrations are at least 75-fold higher than the C_{max} (about 22 µmol/L) observed in patients, and therefore PDX is not likely to induce QT prolongation under *in vivo* conditions.	Yes	PDX-T-04005-D / 4.2.1.3.3

a　An entry of "Yes" indicates that the study was performed in compliance with GLP.
PDX = pralatrexate, n = number, GLP = Good Laboratory Practice, C_{max} = maximum concentration, hERG = human ether-a-go-go related gene, CHO = Chinese hamster ovary

2.6.3.4.2　*In vivo* 試験

Test Article: Pralatrexate

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP[a]	Study Number / Location
Central Nervous System	Rat/Sprague Dawley	IV	0, 5, 10, 25	n = 16 (n=8 for FOB, n=8 for locomotor activity) per gender per group (Male and Female)	Single bolus IV administration of PDX in Sprague-Dawley rats at doses up to and including 25 mg/kg did not result in adverse signs of neurological toxicity. Neurobehavioral and functional integrity measured by functional observation battery and locomotor activity data from treatment groups were comparable to the control group at predose, 5-minute post dose, and 24 hour post dose.	Yes	PDX-T-07037-R / 4.2.1.3.1
Cardiovascular and Respiratory System	Dog/Beagle	IV	0, 0.1, 0.5, 0.7	n = 4 per gender (Male and Female)	Treatment with PDX at doses up to 0.7 mg/kg had no adverse effects on blood pressure (systolic, diastolic, and mean arterial pressure), heart rate, body temperature, electrocardiographic parameters (heart rate, PR, QRS, RR, and QT/QTc), respiratory function (respiratory rate, blood oxygen saturation, and end tidal CO_2), or mortality. There were no adverse effects on body weight and body weight changes in both males and females. Treatment-related and dose-proportional signs of toxicity included appetite loss, diarrhea, emesis, and soft, mucoid, discolored, feces and/or no feces in both males and females.	Yes	PDX-T-07036-D / 4.2.1.3.4

a　An entry of "Yes" indicates that the study was performed in compliance with GLP.
PDX = pralatrexate, n = number, GLP = Good Laboratory Practice, C_{max} = maximum concentration

2.6.3.5　　薬理学的薬物相互作用試験

2.6.2.5 項を参照