TABLE OF CONTENTS

LIST OF FIGURES 1
本項で使用する用語・略語 2
1. 非臨床試験計画概略 3
2. 薬理試験 4
2.1. 効力を裏付ける試験 4
2.2. 副次的薬理試験 4
2.3. 安全性薬理試験 4
2.4. 薬力学的薬物相互作用 5
3. 薬物動態試験 5
3.1. 吸収 5
3.2. 分布 6
3.3. 代謝 6
3.4. 排泄 7
3.5. 薬物動態学的薬物相互作用 7
4. 毒性試験 8
4.1. 単回投与毒性試験 8
4.2. 反復投与毒性試験 8
4.3. 遺伝毒性試験 8
4.4. がん原性試験 8
4.5. 生殖発生毒性試験 9
4.6. 骨髄抑制メカニズム検討試験 9
4.7. 光毒性試験 9
4.8. 局所刺激性試験および血液適合性試験 9
4.9. 糖代謝異常の検討試験 9
4.10. 不純物および分解物の毒性評価 9
5. 総括及び結論 10
6. 参考文献 13

LIST OF FIGURES

Figure 1. [^{14}C]パルボシクリブ（PD-0332991）の構造 5
Figure 2. パルボシクリブの主な代謝経路 7

本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
AUC	area under the plasma concentration-time curve：血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistant protein：乳癌耐性蛋白質
BSEP	bile salt export pump：胆汁酸塩排出ポンプ
CDK	cyclin-dependent kinase：サイクリン依存性キナーゼ
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
CYP	cytochrome P450：シトクロム P450
f_u	fraction unbound：非結合型分率
HPLC	High performance liquid chromatography：高速液体クロマトグラフィ
IC_{50}	50% inhibitory concentration：50%阻害濃度
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MDR1	multidrug resistance protein 1：多剤耐性蛋白質 1
MS/MS	tandem mass spectrometry：タンデム質量分析法
OAT	organic anion transporter：有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide：有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter：有機カチオントランスポーター
P-gp	P-glycoprotein：P-糖蛋白質
SULT	sulfotransferase：硫酸転移酵素
UGT	uridine diphosphate glucuronosyl transferase：ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素

1. 非臨床試験計画概略

パルボシクリブの効力を裏付ける試験として，（1）種々の CDK に対する効力および 274 種類のキナーゼに対する選択性，（2）細胞内シグナル伝達系に対する作用，（3）細胞周期進行，DNA 合成および腫瘍増殖などの調節に関する評価を実施した。副次的薬理試験では, 64 種類の受容体, 酵素，トランスポーターおよびイオンチャネルに対する結合能（酵素以外）または阻害作用（酵素）を評価した。安全性薬理試験では, hERG チャネルを介するカリウム電流および摘出プルキンエ線維の心筋活動電位に及ぼす影響を in vitro で, 心血管系に及ぼす影響をイヌ単回投与試験で, 中枢神経系に及ぼす影響をラット単回経口投与試験で，呼吸系に及ぼす影響をイヌ単回静脈内投与試験で評価した。

非臨床薬物動態では，主として薬理試験および毒性試験で使用した動物種であるマウス，ラットおよびイヌにおけるパルボシクリブの吸収，分布，代謝および排泄に関する広範な検討を実施した。吸収，代謝および薬物トランスポーターに関する検討には，ヒト試料またはヒト遺伝子発現系細胞など目的に応じた in vitro 試験系を用いた。分布，代謝および排泄の検討には[^{14}C]パルボシクリブを使用した。生体試料中のパルボシクリブおよびラクタム代謝物の定量には高速液体クロマトグラフィ/タンデム質量分析法（HPLC/MS/MS）を用いた。

パルボシクリブの毒性プロファイルを評価するために，単回投与毒性試験，最長 39 週間の反復投与毒性試験，in vitro 遺伝毒性試験，in vivo 遺伝毒性試験，雌の受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験ならびに胚・胎児発生に関する試験を実施した。また，パルボシクリブの光毒性を評価するために，in vitro 光毒性試験（3T3 線維芽細胞を用いたニュートラルレッド取り込み試験）を，一般毒性試験でみられた骨髄毒性を検討するために探索毒性試験を実施した。薬物動態プロファイルおよびヒトの主要代謝経路との類似性に基づき，一般毒性試験に用いるげっ歯類および非げっ歯類の動物種にはそれぞれラットおよびイヌを選択した。

特に記載のない限り，投与経路は臨床適用経路である経口投与とし，投与頻度はパルボシクリブの薬物動態に基づき 1 日 1 回投与とした。臨床での投与方法に合わせて，ラットおよびイヌを用いた重要な反復投与毒性試験では, 1 日 1 回 3 週間投与して 1 週間休薬する間欠投与を実施した。毒性試験プログラムの多くはパルボシクリブイセチオン酸塩（PD-0332991-0054）を用いて実施したが, ラットおよびイヌを用いた重要な毒性試験（15 週間以上）ならびに生殖発生毒性試験は, 市販用製剤であるパルボシクリブ遊離塩基（PD-0332991）を用いて実施した。毒性試験での曝露量に塩と遊離塩基との差は認められなかったことから，特に記載のない限り用量および濃度については遊離塩基に換算して表記した。なお，パルボシクリブのイセチオン酸塩または二塩酸塩を用いる場合には，脱イオン水に溶解した溶液として調製し，遊離塩基を用いる場合には，0.5%メチルセルロース懸濁液として調製した。

経口投与毒性試験のほか，臨床薬物動態試験での単回静脈内投与に先立ち，局所刺激性試験および in vitro 血液適合性試験を実施した。

イヌを用いた用量漸増単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験（in vivo 小核試験）および重要な生殖発生毒性試験において採血を行い，血漿中パルボシクリブ濃度測定を実施した。ラットに 2 週間投与したところ，血漿中パルボシクリブ濃度は雌ラットで雄ラットよりも低く，曝露量に性差がみられたことから，重要な毒性試験では，曝露量が雌雄でほぼ同等になるよう，雌の用量を雄より高く設定した。ヒトの主要代謝物ではないパルボシクリブのラクタム代謝物

（PF-05089326，M17）についても，ラットおよびイヌを用いた 15 週間投与毒性試験において PF-05089326 の血漿中濃度測定を実施した。

2. 薬理試験

2.1. 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の結果から，パルボシクリブは CDK4 および CDK6 に対する強力な選択的阻害薬であることが示された。パルボシクリブは CDK4/サイクリン D1 複合体および CDK6/サイクリン D2 複合体の活性を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ，11 nmol/L（4.9 ng/mL）および 15 nmol/L（6.7 ng/mL）であった。パルボシクリブは，乳癌細胞において CDK4 および CDK6 の標的である Rb のリン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 9 nmol/L～66 nmol/L であった。細胞調節機能を評価する試験において，パルボシクリブは G_1 期の細胞の細胞周期進行を 80 nmol/L で停止させ，DNA 合成を IC_{50} 値 40 nmol/L～170 nmol/L で阻害し，細胞増殖を IC_{50} 値 200 nmol/L 未満で阻害した。また一連の *in vivo* 試験結果から，腫瘍モデルにおいてパルボシクリブが有効性を示す上で，Rb 活性が重要であることが示唆された。すなわち，パルボシクリブは最大耐量（MTD）である 150 mg/kg において，大腸癌細胞（Colo205）および神経膠芽腫細胞（SF295）を異種移植したマウスの腫瘍を退縮させ，MTD に準ずる用量である 130 mg/kg において，乳癌細胞（MDA-MB435）を異種移植したマウスの腫瘍増殖を停止させた。

分子的特性の異なる種々の乳癌細胞株を用いた試験結果から，パルボシクリブはルミナル型の乳癌に対して最も有効であり，特にエストロゲン受容体（ER）陽性の乳癌に対して効果を示すことが明らかにされている[1]。さらに，パルボシクリブとタモキシフェンの併用により，ER 陽性乳癌細胞に対する相乗的な抗腫瘍効果も示されている[1]。現在，タモキシフェン以外にも様々な抗エストロゲン薬が ER 陽性乳癌の標準治療薬として用いられていることから，ER 陽性乳癌モデルを用いたパルボシクリブと他の抗エストロゲン薬の併用薬理試験を実施した結果，抗エストロゲン薬であるタモキシフェン，フルベストラントまたはレトロゾールとパルボシクリブとの併用により抗腫瘍作用の増強が認められた。作用機序の観点からは，単独投与と比べてこれらの併用投与時には，Rb リン酸化阻害ならびに FoxM1 蛋白および c-Myc 蛋白の発現抑制が増強された。細胞調節機能の観点からは，単独投与と比べてこれらの併用投与時には細胞増殖阻害作用，DNA 合成阻害作用および細胞老化マーカーであるβ-ガラクトシダーゼ（SA-β-gal）活性の蓄積が増強された。

2.2. 副次的薬理試験

副次的薬理試験において，パルボシクリブは複数の受容体および酵素ならびに 1 つのイオンチャネルに対して結合親和性を示した。しかしながら，臨床曝露量における結合活性は比較的弱いことから，臨床的上問題となる可能性は低いと考えられた。

2.3. 安全性薬理試験

パルボシクリブの心血管系，呼吸系および中枢神経系へ及ぼす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。心血管系の評価では，パルボシクリブはヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウムチャネルを阻害した。パルボシクリブはイヌプルキンエ線維を用いた試験で 90%再分極時活動電位持続時間（APD_{90}）を延長し，イヌの QT 間隔および QTc 間隔を延長した。また，イヌを用いた試験において，パルボシクリブは心拍数を減少させ，それと対応し

て RR 間隔を延長し，さらに収縮期血圧も中等度に上昇させた。ラットを用いた神経機能試験においてパルボシクリブは自発運動量を低下させたが，機能観察総合評価（FOB）の他のパラメータに影響はみられなかった。麻酔イヌを用いた呼吸系評価において，パルボシクリブによる呼吸抑制がみられたが，麻酔薬とパルボシクリブの相互作用に起因する可能性が考えられた。

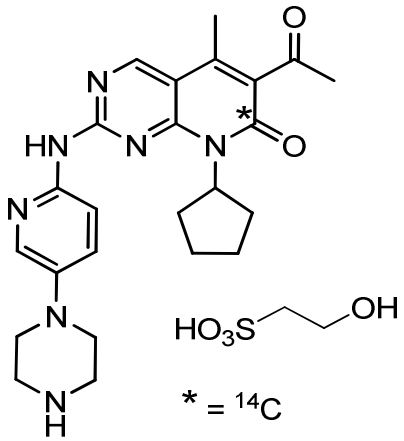
2.4. 薬力学的薬物相互作用

パルボシクリブと抗エストロゲン薬（フルベストラント，レトロゾールまたはタモキシフェン）の併用時の薬理学的相互作用について，2.6.2.2.6 項に記載した。その他の薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

3. 薬物動態試験

パルボシクリブの薬物動態は，主として薬理試験および毒性試験で使用した動物種であるマウス，ラットおよびイヌを用いて検討した。吸収，代謝および薬物トランスポーターに関する検討には目的に応じた in vitro 試験系を用いた。分布，代謝および排泄の検討には[^{14}C]パルボシクリブを使用した。[^{14}C]パルボシクリブの構造および標識位置を Figure 1 に示す。生体試料中のパルボシクリブおよびラクタム代謝物の定量には HPLC/MS/MS を用いた。

Figure 1.　[^{14}C]パルボシクリブ（PD-0332991）の構造



3.1. 吸収

ラット，イヌおよびサルでは，パルボシクリブの全身クリアランスは低度から中等度（7.22 mL/min/kg～38.0 mL/min/kg）であり，大きな分布容積（5.05 L/kg～7.07 L/kg）を示したことから組織へ広範に分布することが示唆された。経口バイオアベイラビリティは 23.1%～56.1%であった。ラットおよびイヌを用いたトキシコキネティクス試験では，曝露量は用量増加に伴い増加した。ラットでは雄の方が雌より高い曝露量を示したが，イヌでは曝露量に性差は認められなかった。ラットでは反復投与によるパルボシクリブの顕著な蓄積は認められなかった。イヌでは最終投与日における曝露量は投与初日の 1.1～4.2 倍であった。

P-糖蛋白質（P-gp，MDR1）または乳癌耐性蛋白質（BCRP）を発現させた MDCK 細胞におけるパルボシクリブの膜透過性は中等度であり，P-gp および BCRP の低度から中等度の基質であったが，パルボシクリブのラットおよびヒトにおける消化管吸収は良好であり，排出トランスポーターの寄与はほとんどないものと考えられた。また，in vitro においてパルボシクリブは主に受動

的拡散によりヒト肝細胞に取り込まれ，肝取り込みトランスポーターの寄与は小さいことが示唆された。

3.2. 分布

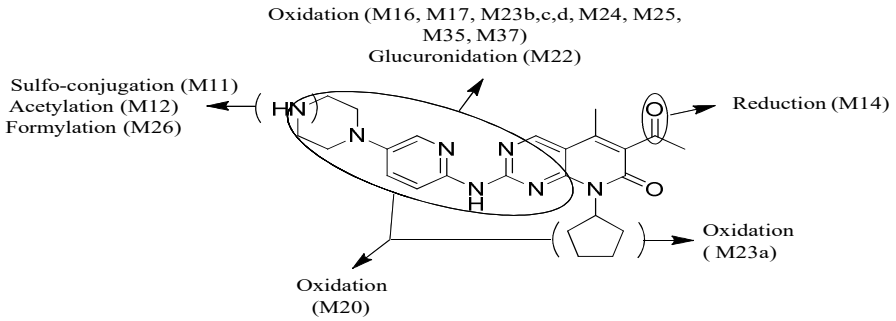
[^{14}C]パルボシクリブを有色ラット（Long-Evans）に単回経口投与したところ，放射能はほとんどの組織および体液に広く分布し，組織中濃度は血中濃度よりも概して高かった。血液脳関門外にある髄膜，下垂体，脈絡叢および脳脊髄液を除く中枢神経系組織の放射能濃度は，血中濃度よりも低かった。メラニン含有組織であるブドウ膜において，高い放射能濃度が持続的に認められたが，投与後 168 時間では最高値の 32%まで低下していた。

パルボシクリブの血漿蛋白結合率に濃度依存性は認められず，マウス，ラット，ウサギ，イヌおよびヒトにおける非結合型分率（f_u）は 0.159，0.125，0.0733，0.413 および 0.147 であった。パルボシクリブはヒトでは血漿よりも赤血球にやや多く分布したが（Kp = 2.44），マウス，ラット，イヌおよびサルでは赤血球および血漿への分布は同程度であった（Kp = 0.94～1.36）。

3.3. 代謝

マウス，ラット，イヌおよびヒトにおける in vivo 代謝試験では，いずれの血漿中でも未変化体が最も高濃度で検出された。ラットにおける主な代謝経路は酸化，硫酸抱合，グルクロン酸抱合およびアシル化であり，ヒトにおいても認められた。イヌにおけるパルボシクリブの主代謝経路は酸化であった。In vivo において推定されるパルボシクリブの代謝経路を Figure 2 に示す。ヒト血漿中の主代謝物は未変化体のグルクロン酸抱合体である M22 であったが，尿中では投与量の 1.5%程とわずかであり，アシルグルクロニドではないことから毒性学的な懸念がない代謝物であると考えられた。ヒトで排泄された主代謝物は未変化体の硫酸抱合体である M11 およびカルボン酸体である M16 であった。ヒト血漿中でみられた代謝物は，ラットまたはイヌの血漿中，胆汁または尿中でも認められたことから，ヒト特異的な代謝物はないと考えられ，代謝物の特性を調べるための非臨床試験は必要ないと判断した。パルボシクリブは，マウス，ラットおよびヒトの肝細胞により複数の代謝物へと代謝され，マウス，ラットおよびヒトにおける代謝は質的に類似していた。In vitro 代謝試験から，パルボシクリブは主として SULT2A1 および CYP3A により代謝されることが示された。

Figure 2.　パルボシクリブの主な代謝経路



3.4. 排泄

ラット，イヌおよびヒトにおいて，[^{14}C]パルボシクリブ由来の放射能は主として糞中に排泄され，尿中への排泄はわずかであった。胆管カニューレ挿入ラットへの投与後 48 時間までの胆汁中回収率は投与量の 50.1%～81.3%であった。ラットおよびヒトの糞中代謝物を検索したところ，未変化体として排泄された量は投与量の 2.3%～3.6%とわずかであり，経口投与されたパルボシクリブの消化管吸収は良好であることが示唆された。

3.5. 薬物動態学的薬物相互作用

In vitro において，パルボシクリブは CYP1A2，CYP2A6，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 を阻害せず，臨床用量（125 mg，1 日 1 回投与）での定常状態における C_{max}（非結合型）の 50 倍の濃度においても CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8 および CYP3A の誘導能を示さなかったことから，臨床においてこれらの基質となる薬剤との併用により薬物動態学的薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。パルボシクリブおよびそのラクタム体は in vitro において CYP3A に対する時間依存的阻害を示し，阻害または誘導による影響を受けやすい CYP3A の基質薬であるミダゾラムとパルボシクリブを併用した臨床試験においても弱い CYP3A 阻害作用を示した。臨床用量においては，パルボシクリブが UGT 分子種（UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9 および UGT2B7）ならびに薬物トランスポーター（消化管以外における P-gp および BCRP ならびに OATP1B1，OATP1B3，BSEP，OAT1，OAT3 および OCT2）を阻害する可能性は低いと考えられた。パルボシクリブの水への溶解度は pH 依存性を示し，消化管と同じ pH 域（中性）における溶解度は$[I]_2$（投与量/250 mL により算出した 0.5 mg/mL = 1117 µmol/L）より低かったが，この pH 域においても胆汁酸塩混合ミセルの存在下では$[I]_2$を上回った（2.3.P.2.2.1 項）。このことから，パルボシクリブの消化管中濃度として$[I]_2$を用いたところ，消化管においては P-gp および BCRP を阻害する可能性が示唆された。

4. 毒性試験

4.1. 単回投与毒性試験

ラットに高用量（1000 mg/kg 以上）のパルボシクリブを単回投与したところ，糞便異常，忍容性不良の一般状態変化および体重減少の急性毒性を示し，瀕死状態となった。イヌに 30 mg/kg 以上のパルボシクリブを単回投与したところ，消化管への影響が認められ，嘔吐および糞便異常ならびに体重減少が認められた。さらにイヌでは骨髄への影響が認められ，骨髄細胞の減少および末梢血の汎血球減少がみられた。

4.2. 反復投与毒性試験

ラットおよびイヌにパルボシクリブを反復投与したところ，骨髄，リンパ組織（細胞減少），雄性生殖器（精細管上皮の変性ならびにそれに伴う精巣上体，前立腺および精嚢の二次的変化）にパルボシクリブと関連する主要な標的臓器毒性が認められた。これらの変化は可逆的であり，パルボシクリブの薬理作用である細胞周期阻害によるものと考えられる。ラットを用いた 15 週間以上の試験では，糖代謝異常（高血糖または尿糖）がみられ，膵島細胞の空胞化との関連が認められた。膵臓の空胞化は，インスリンおよび C ペプチドの低下と関連するβ細胞の減少に起因するものと考えられた。ラットにパルボシクリブを 27 週間投与したところ，糖代謝異常がみられ，眼（白内障または水晶体変性），腎臓（尿細管の空胞化）および脂肪組織（萎縮）に関連する変化が認められた。このほか，ラットの反復投与試験では，骨への影響（骨梁減少）および切歯への影響（エナメル芽細胞変性，色素性マクロファージの浸潤）も認められた。これらの糖代謝異常，骨および切歯への影響についても，パルボシクリブの薬理作用に基づくものと考えられた。若齢ラットで実施した検討試験により，糖代謝異常発生および関連する膵臓の変化の時間経過が明らかとなった。さらに，加齢ラットを用いた検討試験により，内分泌/代謝への影響は膵臓の高い増殖状態によるものであり，糖代謝異常発生に対して若齢ラットの感受性が高いために生じたことが明らかとなった。12 週間の休薬後は糖代謝異常，膵臓，眼，腎臓および骨の変化に回復性は認められなかったが，歯および脂肪組織への影響は回復傾向を示した。

このほかに，パルボシクリブの耐量投与時には，多数組織の細胞の空胞化（リン脂質症と形態学的に一致），消化管への影響（胃粘膜または腸の異常上皮，萎縮，びらんまたは腺胃の腺粘液減少，肝臓（肝酵素の上昇，肝細胞肥大または肝細胞の空胞化），腎臓（慢性進行性腎症の増加），副腎（皮質細胞肥大）および呼吸系（一般状態変化，気管上皮細胞の萎縮）への影響ならびに凝固時間延長が認められたが，重症度が低いまたは変性性の変化を認めないことから毒性学的に意義の乏しいものと考えられた。これらの変化については，回復または回復傾向が認められた。

4.3. 遺伝毒性試験

In vitro 遺伝毒性試験では，パルボシクリブは細菌に対する変異原性およびヒトリンパ球に対する染色体異常誘発性を示さなかった。ラットの小核試験では小核多染性赤血球の増加が認められたが，in vitro 小核試験における動原体染色の結果から，小核多染性赤血球の増加は染色体異数性誘発性に起因するものと考えられた。異数性誘発性に関する無作用量は，in vivo ラット小核試験成績から算出した。

4.4. がん原性試験

パルボシクリブのがん原性試験を実施中である。

4.5. 生殖発生毒性試験

ラットを用いた受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験では，雌雄の交尾行動または受胎能に対するパルボシクリブの影響はみられなかった。ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では，最高用量で胎児の低体重が認められ，さらに胎児の 13 肋骨の発現率の上昇（毒性学的意義の乏しい変化と考えられた）がみられた。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では，最高用量で胎児の骨格変異（低頻度の前肢指骨の短縮）が認められた。

パルボシクリブの出生前および出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験では，300 mg/kg/日で妊娠期間中に母動物の体重抑制，体重増加量および摂餌量の減少が認められたが，出生児では 300 mg/kg/日でもパルボシクリブによる影響はみられなかった。

4.6. 骨髄抑制メカニズム検討試験

パルボシクリブ単剤または抗エストロゲン剤であるフルベストラントとの併用により，ヒト骨髄単核球細胞（hBMNC）においてアポトーシス，細胞老化または DNA 損傷を伴わない G1 細胞周期停止に伴う細胞増殖阻害がみられたが，4 日または 5 日の休薬により完全な回復性が認められた。

4.7. 光毒性試験

パルボシクリブは紫外線を吸収し，吸光度のピークが紫外線 A 領域にあること，および有色組織（眼および皮膚など）に親和性を有することから，光毒性を評価した。In vitro 3T3 ニュートラルレッド取り込み試験の結果から，パルボシクリブに光毒性はないと判断した。

4.8. 局所刺激性試験および血液適合性試験

In vitro 血液適合性試験およびウサギ in vivo 局所刺激性試験（静脈内および血管周囲）の結果から，評価した用量または濃度においてパルボシクリブによる溶血作用および血管刺激性は認められなかった。

4.9. 糖代謝異常の検討試験

ヒトのβ細胞増殖率との類似性が報告されている 12 ヵ月齢の加齢ラットを用いた 27 週間投与探索毒性試験では，（若齢）ラットの 27 週間毒性試験で糖代謝異常および膵β細胞の減少が認められた曝露量においても糖代謝異常は認められず，膵臓の病理組織学的所見も認められなかった。若齢ラットにおける内分泌および代謝に対する感受性の高さは，イヌではヒト臨床曝露量の 2.3 倍まで類似の所見がみられなかったことからも裏付けられる。ラットでの糖代謝異常の発生に対する感受性にβ細胞増殖能の差異が関与すると考えられるが，その他にβ細胞の生物学的な差異が関与する可能性もある。加齢ラットを用いた試験の結果から，パルボシクリブによりヒトで膵β細胞の減少およびそれに伴う糖代謝異常が引き起こされる可能性は低いと考えられた。

4.10. 不純物および分解物の毒性評価

原薬の不純物 2 種類（PF-00710042 および PF-00447880）および製剤分解物（PF-06694807）の変異原性を評価したところ，いずれも変異原性を示さなかった。さらに，PF-00447880 については in vitro 小核試験および蛍光 in situ ハイブリダイゼーション試験を実施したところ，異数性誘発作用を介して小核を誘発することが示唆された。また，PF-00710042，PF-00447880 および

PF-06694807 が含まれるロットでのラット反復投与試験またはヒト臨床試験での曝露量はパルボシクリブの 1 日最大投与量 125 mg を患者に投与した時の最大曝露量よりも高かったことから，これらの不純物または製剤分解物の安全性が確認されたものと考えた。

5. 総括及び結論

パルボシクリブは CDK4 および CDK6 に対する強力な阻害薬であり，数十 nmol/L の IC_{50} 値を示した。複数のキナーゼを用いてスクリーニングを実施したところ，パルボシクリブは CDK4 および CDK6 を選択的に阻害し，臨床推奨用量における血漿中濃度範囲（非結合型 C_{max}：27 ng/mL，60 nmol/L）[a]において，標的分子以外に対する結合親和性が有効性または安全性に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。パルボシクリブのラクタム代謝物（PF-05089326）は CDK4 および CDK6 に対してパルボシクリブと同程度の阻害活性を示し，標的以外のキナーゼへの活性もわずかにみられたものの，この代謝物のヒト血漿中における存在比はパルボシクリブの約 10%であることから，臨床において意味のある活性を示す可能性は低いと考えられた。パルボシクリブは CDK4/CDK6 の基質である Rb に対して，S780，S795，S807，S811 など，複数部位のリン酸化を阻害した（IC_{50} 値：9.3～66 nmol/L）。パルボシクリブの細胞増殖阻害作用および DNA 合成阻害作用について種々の腫瘍細胞株で検討したところ，同程度の IC_{50} 値（200 nmol/L 未満）が得られた。さらに Rb 陰性細胞株に対してパルボシクリブは抗腫瘍効果を示さなかった。これらの結果から，パルボシクリブの抗腫瘍活性は，標的である CDK4/CDK6 阻害に基づくことが示唆された。パルボシクリブによる Rb S780 部位のリン酸化阻害作用に伴い，パルボシクリブは Rb 陽性腫瘍異種移植モデルにおいて用量依存的な抗腫瘍効果（腫瘍増殖停止や腫瘍退縮）を示した。

パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用投与により，ER 陽性乳癌に対する抗腫瘍効果はそれぞれの単独投与と比較して増強した。パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬の作用機序から，併用投与により Rb リン酸化が 2 つの経路で協調的に阻害されることで抗腫瘍効果が増強されたと考えられる。1 つの経路は，パルボシクリブによる CDK4/CDK6 活性の直接的な阻害であり，もう 1 つの経路は抗エストロゲン薬がサイクリン D1 の発現を抑制することによる CDK4/CDK6 の間接的な阻害である。また，各薬物の効果として，パルボシクリブによる FoxM1 発現抑制および抗エストロゲン薬による c-Myc 発現抑制が寄与している可能性が高いことが示唆された。ER 陽性乳癌細胞株を用いた *in vitro* 試験において，パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用により，各薬物の単独と比べて DNA 合成阻害作用，細胞増殖阻害作用および細胞老化誘導作用が増強された。また患者由来 ER 陽性乳癌異種移植モデル（HBCx-34）を用いた *in vivo* 試験においても，増殖阻害効果および細胞老化誘導の増強など，*in vitro* 試験と同様の併用効果が認められた。*in vivo* 試験では，パルボシクリブ（75 mg/kg または 125 mg/kg）とレトロゾール（2 mg/kg）を併用投与しても顕著な体重減少はみられず，忍容性が認められた。さらに，血漿中薬物濃度を測定したところ，薬物間相互作用による各薬物の濃度変化はみられず，併用投与による効果増強は曝露量増加ではなく作用機序に起因するものであると考えられた。これらの非臨床試験結果は，臨床試験においてパルボシクリブとレトロゾールを併用投与した患者で無増悪生存の顕著な改善が認められたこととも一致し，上述の作用機序を支持するものであった。

[a]日本人に 125 mg を 1 日 1 回投与したときの第 1 サイクルの第 8 日の幾何平均値（A5481010 試験，2.7.2.2.2.5.2.1 項）

副次的薬理試験として，64 種類の標準的な受容体，酵素，トランスポーターまたはイオンチャネルに対するパルボシクリブの作用を一連の放射性リガンド結合試験により検討した。パルボシクリブは数 μmol/L レベルの濃度において，数種の受容体およびイオンチャネルへの結合親和性または酵素活性阻害作用を示した。しかしながら，これらの K_i または IC_{50} 値は臨床推奨用量（125 mg 1 日 1 回）を投与したときのヒトでの曝露量と比較して高く（定常状態での非結合型 C_{max} の 5 倍以上），臨床使用上安全性に大きな問題を生じる可能性は低いと考えられた。

安全性薬理試験では，心血管系，中枢神経系および呼吸系に及ぼすパルボシクリブの影響について，ラットおよびイヌを用いて検討した。その結果，パルボシクリブが心血管系および呼吸器系に影響を及ぼす可能性が示唆されたが，神経機能への影響は認められなかった。心血管系への作用を検討したところ，パルボシクリブは hERG カリウムイオンチャネルを阻害することが示され［IC_{50} 値 ＝3.2 μmol/L（1432 ng/mL）］，10 μmol/L の濃度において APD_{90} を有意に延長した。またテレメトリーを装着した覚醒イヌを用いた *in vivo* 試験では，3 mg/kg（総血漿中濃度 162 ng/mL，非結合型濃度 67 ng/mL）以上で QT 間隔延長および QTc 間隔延長を引き起こす可能性が示唆された。また同試験では，非結合型 C_{max} が 140 ng/mL 以上において，収縮期血圧のわずかな上昇，ならびに心拍数減少およびそれに付随する RR 間隔延長が生じた。これらの心血管系への影響が示された非結合型血漿中濃度は，ヒトの臨床推奨用量（125 mg 1 日 1 回）における定常状態での最高血漿中濃度（非結合型 C_{max}：27 ng/mL）[a]の 2.5 倍以上であった。麻酔イヌを用いて呼吸系への影響を検討したところ，ヒトの臨床推奨用量における非結合型 C_{max}（27 ng/mL）の 30 倍の曝露量（非結合型 C_{max}：843 ng/mL）において，パルボシクリブが呼吸抑制を引き起こす可能性が示唆された。認められた呼吸系への影響は一過性で，中枢呼吸抑制薬である麻酔薬プロポフォール[2]とパルボシクリブの相互作用に起因する可能性が考えられる。プロポフォール誘発性の呼吸抑制に対する相加的または相乗的な作用は，オピオイド鎮痛薬など他の薬物でも認められている[2]。ラットにおける神経機能に及ぼす影響の検討では，ヒトの臨床推奨用量（125 mg 1 日 1 回）での非結合型 C_{max}（27 ng/mL）の 29 倍の曝露量（非結合型 C_{max}：793 ng/mL）においても神経機能への影響は認められなかったが，活動度の低下が認められた。

ラット，イヌおよびサルを用いたパルボシクリブの薬物動態試験では，中等度の経口バイオアベイラビリティ，低度から中等度のクリアランス，大きな V_{ss} を示した。ラットおよびイヌを用いたトキシコキネティクス試験では，曝露量は用量増加に伴い増加した。ラットでは曝露量に性差がみられ，3 週間，15 週間および 27 週間反復投与毒性試験における雌雄同一用量では，雌と比べて雄の AUC は 7～24 倍高値を示した。イヌではパルボシクリブの曝露量に性差は認められなかった。ラットでは反復投与によるパルボシクリブの顕著な蓄積は認められなかった。イヌでは最終投与日における曝露量は投与初日の 1.1～4.2 倍であった。パルボシクリブは in vitro の検討から排出トランスポーターである P-gp および BCRP の低度から中等度の基質であることが示されたが，ラットおよびヒトにおいてパルボシクリブ経口投与時の吸収は良好であり，in vivo ではこれらの排出トランスポーターによる影響はほとんどないと考えられた。また，in vitro においてパルボシクリブは主に受動的拡散によりヒト肝細胞に取り込まれ，肝取り込みトランスポーター

[a]日本人に 125 mg を 1 日 1 回投与したときの第 1 サイクルの第 8 日の幾何平均値（A5481010 試験，2.7.2.2.2.5.2.1 項）

の寄与は小さいことが示唆された。有色ラットを用いた組織分布試験では，[^{14}C]パルボシクリブ由来の放射能は脳を除くほとんどの組織に広く分布し，パルボシクリブが大きい分布容積を示したことと符合していた。メラニン含有組織であるブドウ膜において，高い放射能濃度が持続的に認められたが，投与後 168 時間では最高値の 32%まで低下していた。パルボシクリブの血漿蛋白結合率は，マウス，ラット，ウサギおよびヒトで中等度，イヌで低度であった。ヒト血清アルブミンおよびα_1酸性糖蛋白質に対する蛋白結合率は低度であった。In vitro において，パルボシクリブはヒトにおいて血漿よりも赤血球にやや多く分布し，マウス，ラット，イヌおよびサルでは，赤血球と血漿にほぼ均等に分布することが示された。マウス，ラット，イヌおよびヒトにおける in vivo 代謝試験では，いずれの血漿中でも未変化体が最も高濃度で検出された。ラットにおける主な代謝経路は酸化，硫酸抱合，グルクロン酸抱合およびアシル化であり，ヒトにおいても認められた。イヌにおけるパルボシクリブの主代謝経路は酸化であった。ヒト血漿中の主代謝物は未変化体のグルクロン酸抱合体である M22 であったが, 尿中では投与量の 1.5%程とわずかであり，アシルグルクロニドではないことから毒性学的な懸念がない代謝物であると考えられた。ヒトで排泄された主代謝物は未変化体の硫酸抱合体である M11 およびカルボン酸体である M16 であった。ヒト血漿中でみられた代謝物は，ラットまたはイヌの血漿中，胆汁または尿中でも認められたことから，ヒト特異的な代謝物はないと考えられ，代謝物の特性を調べるための非臨床試験は必要ないと判断した。In vitro 試験からパルボシクリブは主に SULT2A1 および CYP3A により代謝されることが示された。ラット，イヌおよびヒトに[^{14}C]パルボシクリブを経口投与したとき，いずれにおいても放射能の大部分は糞中に排泄された。ラットおよびヒトの糞中代謝物を検索したところ，未変化体として排泄された量は投与量の 2.3%～3.6%とわずかであり，経口投与されたパルボシクリブの消化管吸収は良好であることが示唆された。In vitro において，パルボシクリブは CYP1A2，CYP2A6，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 を阻害せず，また CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP3A の誘導能を示さなかったことから，臨床においてこれらの基質となる薬剤との併用により薬物動態学的薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。パルボシクリブおよびそのラクタム体は in vitro において CYP3A に対する時間依存的阻害を示し，阻害または誘導による影響を受けやすい CYP3A の基質薬であるミダゾラムとパルボシクリブを併用した臨床試験においても弱い CYP3A 阻害作用を示した。臨床用量（125 mg, 1 日 1 回投与）においては, パルボシクリブが UGT 分子種（UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9 および UGT2B7）ならびに薬物トランスポーター（消化管以外における P-gp および BCRP，ならびに OATP1B1，OATP1B3，BSEP，OAT1，OAT3 および OCT2）を阻害する可能性は低いと考えられた。

単回投与毒性試験，最長 39 週間の反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験および光毒性試験により，パルボシクリブの非臨床毒性プロファイルを明らかにした。パルボシクリブの薬理作用（細胞周期の阻害，CDK4/6 の阻害）に関連する標的臓器における主な所見として，ラットおよびイヌでリンパ造血系および雄の生殖器への影響，ラットで骨および活発に成長する歯への影響，ラットで膵臓への影響ならびに膵β細胞の減少に伴う糖代謝異常に関連した眼，腎臓および脂肪組織への影響が反復投与試験で認められた。臨床的に忍容性があるリンパ造血系への影響を除いては，直接的な毒性（および二次的影響）は毒性と考えた。ラットにおける眼，腎臓および脂肪組織での内分泌/代謝への影響およびそれに関連する変化は, 加齢ラットでの検討試験成績から若齢ラットにおける膵臓の高い増殖状態とそれによる高い感受性を反映したものと考えられた。このように，内分泌/代謝への影響は活発に成長する歯への影響とともに成人には外挿されないと考えた。糖代謝，膵臓，眼，腎臓および骨への影響については，12 週間の休薬後にも回復性はみられなかったが，リンパ造血系および雄性生殖器，歯および脂肪組織への影響につ

いては回復傾向が認められた。パルボシクリブは細胞周期を阻害することから消化管への影響が予測され，ラットおよびイヌの単回投与試験および最長 3 週間の反復投与試験で消化管への影響（嘔吐，糞便異常および消化管の病理組織学的変化）が認められたが，臨床用量に相当する曝露量では軽度であった。より長期の試験では顕著な消化管への影響はみられなかったが，ラットの 27 週間投与試験では腺胃の変化およびげっ歯類特異的な前胃の変化が認められ，12 週間の休薬後も回復性は認められなかった。その他，パルボシクリブ投与に関連する変化として，多数の組織における細胞空胞化（形態学的にリン脂質症と一致），肝酵素上昇および肝細胞の肥大・空胞化，慢性進行性腎症，副腎皮質細胞の肥大および呼吸系の変化（一般状態の変化および気管上皮細胞の萎縮）ならびに血液凝固時間の延長が認められたが，軽度または関連する変性性変化を伴わないことから毒性学的意義の乏しい変化であると判断した。また，これらの変化の多くで回復傾向がみられた。用量依存性の体重および摂餌量の減少，薬物不耐性による一般状態悪化がヒトに 125 mg 1 日 1 回を投与したときの曝露量を超える曝露量を示した単回投与試験および反復投与試験でみられた。ラットを用いた生殖発生毒性試験では雌雄の交尾行動および受胎能への影響はみられなかった。ヒトの骨髄単核球細胞を用いた in vitro の探索試験成績では，典型的な細胞障害性化学療法薬がアポトーシスを示すのに対し，パルボシクリブは細胞周期停止の回復性を示したことから，パルボシクリブは典型的な細胞障害性抗がん剤よりも優れた血液学的安全性プロファイルが期待される。3T3NRU の成績から，光毒性はないことが示された。なお，パルボシクリブは異数性誘発性を示したが，異数性に対する無作用量が明らかにされている。以上の成績より，パルボシクリブ投与に関連する影響は，臨床的に管理可能であるか，本薬の適応対象である患者への投与に際しては容認できるリスクであると考えられる。

以上のように，進行性がん患者に本薬が使用されることに対して，非臨床での薬理，薬物動態および毒性は充分に評価されていると考える。

6. 参考文献

[1] Finn RS, Dering J, Conklin D, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. Breast Cancer Res. 2009;11(5):R77.

[2] Marshall BE and Longnecker DE. General Anesthetics. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P editors. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed. Pergamon Press, 1990; p.307-8.