TABLE OF CONTENTS

LIST OF FIGURES 1
1. 緒言 2
2. 参考文献 3

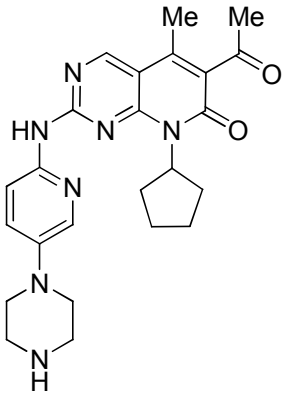
LIST OF FIGURES

Figure 1. パルボシクリブの化学構造式 2

1. 緒言

パルボシクリブ（開発番号：PD-0332991，PF-00080665，化学名：6-Acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-{[5-(piperazin-1-yl)pyridin-2-yl]amino}pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one，分子量：447.53）は，Pfizer 社により手術不能または再発乳癌の治療薬として開発された，サイクリン依存性キナーゼ（CDK）4 および 6 に対して高い選択性を有する経口投与可能な可逆的阻害薬である（Figure 1）。

Figure 1.　パルボシクリブの化学構造式



分子式：$C_{24}H_{29}N_7O_2$（遊離塩基）

CDK4/CDK6 はサイクリン D と相互作用することで活性化され，網膜芽細胞腫蛋白質（Rb）をリン酸化する。Rb は細胞周期が G_1 期から S 期へ移行するための重要なチェックポイントであり，細胞増殖を制御している[1]。しかしながら，80%以上のヒト腫瘍では，様々な遺伝的・生物学的な適応（たとえば，CDK4 の発現上昇，サイクリン D の増幅，CDK4/CDK6 の内因性阻害遺伝子である $p16^{INK4A}$ の発現抑制など）により，この制御機構が破綻している。こうした異常の結果，CDK4/CDK6 の活性，Rb リン酸化および細胞増殖が制御不能となるか顕著に活性化されることがある[2,3]。このことから，CDK4/CDK6 活性に依存して増殖/生存する腫瘍は，この経路の阻害に対して特に高い感受性を示す可能性がある。

細胞を用いた薬理試験において，パルボシクリブは CDK4/CDK6 による Rb リン酸化を強力に阻害した。また，パルボシクリブは Rb 陽性の乳癌細胞株に対して， G1 期から S 期への細胞周期の移行および細胞増殖を阻害し，細胞の老化を誘導した。エストロゲン受容体（ER）陽性ルミナル乳癌細胞の異種移植モデルなどの様々な非臨床動物モデルにおいてパルボシクリブは抗腫瘍効果を示した。現在，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抗エストロゲン薬の併用薬理試験を実施した結果，それぞれの単独投与と比較して，DNA 合成および細胞増殖の阻害，ならびに細胞老化の誘導が増強した。その作用機序として，パルボシクリブによる CDK4/CDK6 の直接的阻害および抗エストロゲン剤によりサイクリン D1 レベルを低下させる CDK4/CDK6 の間接的阻害の 2 つの経路を介して Rb リン酸化が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。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。

パルボシクリブの効能・効果および用法・用量は添付文書（案）（CTD 1.8 項）に記載した。

2. 参考文献

[1] Choi YJ, Anders L. Signaling through cyclin D-dependent kinases. Oncogene. 2014;33(15):1890-903.

[2] Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. Biochim Biophys Acta. 2002;1602(1):73-87.

[3] Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell. 2002;2(2):103-12.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 4
本項で使用する用語・略語 5
1. まとめ 6
1.1. 効力を裏付ける試験 6
1.2. 副次的薬理試験 6
1.3. 安全性薬理試験 7
2. 効力を裏付ける試験 8
2.1. CDK4/CDK6 の抑制およびキナーゼ選択性 8
2.1.1. パルボシクリブ 8
2.1.2. 代謝物 PF-05089326 10
2.2. Rb リン酸化阻害 10
2.3. DNA 合成阻害および細胞増殖阻害 11
2.4. Rb 陽性腫瘍に対するパルボシクリブの選択性 13
2.5. パルボシクリブ単独での *in vivo* 試験 13
2.5.1. *In vivo* 抗腫瘍効果 13
2.5.2. *In vivo* における Rb リン酸化阻害と有効性の相関 16
2.5.3. 目標血漿中濃度 18
2.6. パルボシクリブと抗エストロゲン薬を併用したときのエストロゲン受容体陽性乳癌に対する抗腫瘍活性 19
2.6.1. *In vitro* 併用試験 19
2.6.1.1. パルボシクリブと抗エストロゲン薬を併用したときの *in vitro* 増殖阻害作用 19
2.6.1.2. パルボシクリブと抗エストロゲン薬を併用したときの作用機序 25
2.6.1.3. パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用による DNA 合成阻害 31
2.6.1.4. パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用による細胞老化誘導 32
2.6.2. *In vivo* 併用試験 38
2.6.2.1. 異種移植モデルにおけるパルボシクリブおよびレトロゾールの抗腫瘍効果 38
2.6.2.2. 異種移植モデルにおけるパルボシクリブおよびレトロゾールの細胞増殖阻害作用ならびにアポトーシス誘導作用 41

2.6.2.3. 異種移植モデルにおけるパルボシクリブとレトロゾールの細胞老化誘導作用 42
2.6.2.4. 異種移植マウスにおけるパルボシクリブとレトロゾールを併用投与したときの血漿中薬物濃度 43
3. 副次的薬理試験 45
3.1. パルボシクリブの各種受容体，酵素，トランスポーターまたはイオンチャネルに対する作用 45
3.2. 代謝物 PF-05089326 の各種受容体，酵素，トランスポーターまたはイオンチャネルに対する作用 45
4. 安全性薬理試験 47
4.1. 心血管系 48
4.1.1. hERG チャネルへの作用 48
4.1.2. イヌプルキンエ線維における作用 48
4.1.3. イヌを用いた試験 49
4.1.3.1. 予備試験 49
4.1.3.2. 本試験 50
4.2. 神経機能 51
4.2.1. ラットを用いた試験 51
4.3. 呼吸系 51
4.3.1. イヌを用いた試験 51
5. 薬力学的薬物相互作用試験 53
6. 考察及び結論 54
7. 図表 56
8. 参考文献 57

LIST OF TABLES

Table 1. サイクリン依存性キナーゼに対するパルボシクリブの *in vitro* 阻害能 8
Table 2. ゲルシフトアッセイを用いたパルボシクリブのキナーゼ選択性スクリーニング 9
Table 3. FRET 法を用いたパルボシクリブのキナーゼ選択性スクリーニング 10
Table 4. 細胞レベルにおける Rb リン酸化 11
Table 5. MDA-MB453 乳癌細胞の細胞周期割合に対するパルボシクリブの作用 12
Table 6. パルボシクリブによるヒトがん細胞における DNA へのチミジン取り込み阻害 12

Table 7. パルボシクリブによるヒトがん細胞における増殖阻害 12
Table 8. パルボシクリブによる Rb 陽性または陰性がん細胞における DNA へのチミジン取り込み阻害 13
Table 9. SCID マウスのヒト腫瘍異種移植モデルに対するパルボシクリブの抗腫瘍効果 15
Table 10. パルボシクリブを投与した MDA-MB435/Colo205 異種移植マウスにおける Rb リン酸化および細胞増殖マーカーKi-67 の抑制状況 18
Table 11. ヒト腫瘍異種移植マウスにおける有効用量と推定パルボシクリブ曝露量との関係 19
Table 12. T47D 細胞の生存率に対するパルボシクリブおよびフルベストラントの相加的作用 21
Table 13. MCF7 細胞の生存率に対するパルボシクリブおよびフルベストラントの相加的作用 22
Table 14. ER 陽性乳癌細胞をパルボシクリブおよびフルベストラントで併用処理したときの細胞増殖抑制率 24
Table 15. ER 陽性乳癌細胞をパルボシクリブおよびタモキシフェンで併用処理したときの細胞増殖抑制率 24
Table 16. ER 陽性乳癌細胞をパルボシクリブおよびレトロゾールで併用処理したときの細胞増殖抑制効果 25
Table 17. T47D 細胞における CDK4/6 および ER シグナル伝達の標的分子発現量（パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による阻害） 27
Table 18. MCF7-CYP19 細胞における CDK4/6 および ER シグナル伝達の標的分子発現量（パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による阻害） 29
Table 19. パルボシクリブとフルベストラントを 4 日間併用したときの DNA 合成への影響 31
Table 20. パルボシクリブとレトロゾールを 4 日間併用したときの DNA 合成への影響 32
Table 21. ER 陽性乳癌細胞におけるパルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による細胞老化誘導 33
Table 22. HBCx-34 異種移植モデルにおけるパルボシクリブおよびレトロゾールの抗腫瘍活性（投与 42 日） 39
Table 23. HBCx-34 細胞における細胞周期および ER シグナル伝達の標的分子発現量 41
Table 24. *In vivo* におけるパルボシクリブとレトロゾールの細胞増殖阻害作用およびアポトーシス誘導作用 42
Table 25. パルボシクリブを単独投与またはレトロゾールと併用投与したエストロゲン依存性乳癌（HBCx-34）移植マウスにおける血漿中パルボシクリブ濃度 44
Table 26. レトロゾールを単独投与またはパルボシクリブと併用投与したエストロゲン依存性乳癌（HBCx-34）移植マウスにおける血漿中レトロゾール濃度 44

Table 27. 安全性薬理試験の概要 47
Table 28. パルボシクリブ（0.3，1，3 および 10 µmol/L）の hERG チャネル阻害作用 48
Table 29. プルキンエ線維の心筋活動電位に対するパルボシクリブの作用 49

LIST OF FIGURES

Figure 1. MDA-MB435 乳癌移植マウスにおけるパルボシクリブの投与量と Rb リン酸化の関係 [a] 17
Figure 2. Colo205 大腸癌移植マウスにおけるパルボシクリブの投与量と Rb リン酸化の関係 [a] 17
Figure 3. ER 陽性乳癌細胞をパルボシクリブおよびフルベストラントで併用処理したときの用量反応曲線 23
Figure 4. T47D 細胞における細胞周期および ER シグナル伝達の標的分子発現量（パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による阻害） 28
Figure 5. MCF7-CYP19 細胞における CDK4/6 および ER シグナル伝達の標的分子発現量（パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による阻害） 30
Figure 6. ER 陽性乳癌細胞におけるパルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による細胞老化誘導 34
Figure 7. パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬で処理した T47D 細胞における細胞老化関連 SA-β-Gal 染色 35
Figure 8. 併用処理後に薬物除去したときの細胞老化誘導の維持（T47D 細胞） 36
Figure 9. 併用処理後に薬物除去したときの DNA 合成阻害の維持（T47D 細胞） 37
Figure 10. 併用処理後に薬物除去したときの細胞周期および ER シグナル伝達の標的分子発現量（T47D 細胞） 37
Figure 11. HBCx-34 腫瘍異種移植モデルにおけるパルボシクリブとレトロゾールの *in vivo* 細胞老化誘導作用（投与 20 日） 43

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
AP-1	activator protein-1
APA	action potential amplitude：活動電位振幅
APD_{50}	action potential duration at 50% repolarization：50%再分極時活動電位持続時間
APD_{90}	action potential duration at 90% repolarization：90%再分極時活動電位持続時間
AUC	area under the plasma concentration-time curve：血漿中濃度‐時間曲線下面積
AUC_t	area under the plasma concentration-time curve from zero to time t：0 時間から t 時間までの血漿中濃度‐時間曲線下面積
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
C_{ss}	steady-state average plasma concentration：定常状態における平均血漿中濃度
DMSO	dimethyl sulfoxid：ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribonucleic acid：デオキシリボ核酸
EdU	5-ethynyl-2′-deoxyuridine：5-エチニル-2’-デオキシウリジン
ER	estrogen receptor：エストロゲン受容体
GABA	gamma amino butyric acid：γ-アミノ酪酸
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HBCx-34	human breast cancer from 34 patient derived xenograft：34 名の患者由来エストロゲン依存性乳癌異種移植モデル
HEK	human embryonic kidney：ヒト胎児由来腎臓
hERG	human ether-a-go-go-related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	50% inhibitory concentration：50%阻害濃度
Ki	inhibition constant：阻害定数
K_m	Michaelis constant：ミカエリス定数
LD_{10}	dose that is lethal to 10% of the animals receiving it：10%致死量
mRNA	messenger ribonucleic acid：メッセンジャーRNA
MTD	maximum tolerated dose：最大耐量
PD	pharmacodynamic：薬力学
PK	pharmacokinetic：薬物動態
PR	time from the beginning of the P wave to the beginning of the QRS complex in the electrocardiogram：心電図における P 波の開始から QRS 複合波の開始までの時間
QT	time from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave in the electrocardiogram：心電図上の QRS 群の開始から T 波の終了までの時間
QTc	QT interval, corrected for heart rate：心拍数で補正した QT 間隔
QRS	electrocardiographic marker of ventricular depolarization：心室脱分極の心電図マーカー
Rb	retinoblastoma protein：網膜芽細胞腫蛋白質
RP	resting membrane potential：静止膜電位
SA-β-gal	senescence-associated-β-galactosidase：細胞老化関連 β-ガラクトシダーゼ
SCID	severe combined immunodeficiency：重症複合型免疫不全
shRNA	short hairpin RNA：ショートヘアピン RNA
T_{max}	time of occurrence of C_{max}：最高血漿中濃度到達時間
V_{max}	maximum upstroke velocity：最大反応速度

1. まとめ

パルボシクリブ（PD-0332991，PF-00080665）はサイクリン依存性キナーゼ（CDK）4 および 6 に対して高い選択性を有する阻害薬である。CDK4/CDK6 はサイクリン D と相互作用することで活性化され，網膜芽細胞腫蛋白質（Rb）をリン酸化する。Rb は細胞周期が G_1 期から S 期へ移行するための重要なチェックポイントであり，細胞増殖を制御している[1]。しかしながら，80%以上のヒト腫瘍では，様々な遺伝的・生物学的な適応（たとえば，CDK4 の発現上昇，サイクリン D の増幅，CDK4/CDK6 の内因性阻害遺伝子である $p16^{INK4A}$ の発現抑制など）により，この制御機構が破綻している。こうした異常の結果，CDK4/CDK6 の活性，Rb リン酸化および細胞増殖が制御不能となるか顕著に活性化されることがある[2,3]。このことから，CDK4/CDK6 活性に依存して増殖/生存する腫瘍は，この経路の阻害に対して特に高い感受性を示す可能性がある。

1.1. 効力を裏付ける試験

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。

これらの試験結果から，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[4]。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[4]。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。

1.2. 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。

1.3. 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. 効力を裏付ける試験

2.1. CDK4/CDK6 の抑制およびキナーゼ選択性

2.1.1. パルボシクリブ

報告書番号 RR-REG 700-00180，PD 0332991_[redacted]_133827

パルボシクリブはキナーゼ CDK4 および CDK6 に対して高い選択性を示し，他の CDK に対してはほとんど活性を示さなかった（Table 1）。CDK4 と CDK6 はいずれもサイクリン D サブユニットと複合体を形成し，哺乳類の細胞および腫瘍に共通して発現している。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（Table 1）。

Table 1.　サイクリン依存性キナーゼに対するパルボシクリブの *in vitro* 阻害能

CDK	IC_{50} 値（μmol/L）
CDK4/cyclinD1	0.012±0.010[a,c]
CDK4/cyclinD3	0.008[a,d] および 0.001[b,e]
CDK6/cyclinD2	0.010[a,d]
CDK6/cyclinD3	0.004[b,e]
CDK2/cyclinA	>5[a,c] および 1.59[b,e]
CDK2/cyclinE1	>3[b,e]
CDK3/cyclinE1	>3[b,e]
CDK1/cyclinB	>5[a,d] および>3[b,e]
CDK5/p25	>5[a,f] および 1.77[b,e]
CDK7/cyclinH/MAT1	>3[b,e]
CDK9/cyclinT1	0.423[b,e]
Cdc7/ASK	>3[b,e]

CDK：サイクリン依存性キナーゼ，IC_{50}：50%阻害濃度
a. [^{32}P]ATP 存在下で反応させ，放射活性を測定した（RR-REG 700-00180）
b. K_m濃度の ATP 存在下でゲルシフトアッセイにより測定した（PD-0332991_[redacted]_133827）
c. 平均±標準偏差（N=3）
d. N=2
e. N=1
f. N=4

生化学的スクリーニングにより，274 種類の組み換えキナーゼに対するパルボシクリブの作用を検討し，CDK4 および CDK6 に対する選択性と比較した。ゲルシフトアッセイにおいて，パルボシクリブ（1 μmol/L）は 21 種類のキナーゼを 50%以上の阻害率で阻害した（Table 2）。阻害率が 70%を超えた 10 種類のキナーゼについては用量反応関係を求めるための測定を行い，IC_{50} 値を算出した。そのうち，CDC 様キナーゼ 1 蛋白質（CLK1）に対する IC_{50} 値は 32 nmol/L であった。CLK1 は，セリン・アルギニンを豊富に含む蛋白質（SR 蛋白質）をリン酸化することで mRNA 前駆体の選択的スプライシングを調節するキナーゼファミリーに属している[5]。残り 9 種類のキナーゼに対する IC_{50} 値は，CDK4 および CDK6 に対する IC_{50} 値の 9 倍以上であった（Table 2）。

キナーゼに対する選択性は，蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）法でも評価した。このスクリーニング試験では，パルボシクリブ（1 μmol/L）は K_m 濃度の ATP 存在下で CLK1，CLK2，PRKD2，CAMK-II-delta，CDK9/サイクリン T1，DAPK3 および FLT3 の 7 種類のキナーゼに対し，56%～77%の阻害を示した。75%以上の阻害率が示された 2 種のキナーゼ（CLK1 および CLK2）および STK16 について FRET 法を用いて IC_{50} 値を算出したところ，IC_{50} 値は CLK1：373 nmol/L，CLK2：193 nmol/L ，STK16：273 nmol/L であった（Table 3）。

以上の結果から，1 µmol/L のパルボシクリブが 70%以上の阻害率を示した 11 種類のキナーゼのうち，ヒトの定常状態における非結合型 C_{max}（27 ng/mL，60 nmol/L）[a]以下の IC_{50} 値で阻害されたのは CLK1 のみであった。それ以外のキナーゼの IC_{50} 値は臨床用量における C_{max} を上回っており，それらのキナーゼは臨床における本薬の有効性および安全性に寄与する可能性は低いと考えられる。

Table 2.　ゲルシフトアッセイを用いたパルボシクリブのキナーゼ選択性スクリーニング

キナーゼ	1 µmol/L での阻害率（%）[a]	IC_{50} (nmol/L)[b]
CLK1	100	32
HIPK2	89	139
MAP2K5 Cascade	85	180
FLT3	85	106
Erk5	78	259
TRKA	73	ND
CLK2	72	352
PKD3	72	408
PKD2	72	555
PKR	71	482
DYRK1B	71	323
PKD1	69	ND
PEK	69	ND
HIPK3	63	ND
HIPK4	63	ND
NuaK2	62	ND
HIPK1	57	ND
CaMK2δ	54	ND
TSSK1	53	ND
DYRK3	52	ND
MER	52	ND

IC_{50}：50%阻害濃度，ND：測定せず
N=1
a. K_m 濃度の ATP 存在下で検討した 274 種類のヒトキナーゼのうち，ゲルシフトアッセイで 1 µmol/L のパルボシクリブ存在下で 50%以上の阻害率がみられたキナーゼについて記載した。
b. 70%以上の阻害率がみられた TRKA を除くキナーゼについて，用量反応関係を求めた。
(PD-0332991_[redacted]_133827)

[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）

Table 3. FRET 法を用いたパルボシクリブのキナーゼ選択性スクリーニング

キナーゼ	1 µmol/L での阻害率（%）[a]	IC_{50} (nmol/L)[b]
CLK1	77	373
CLK2	76	193
PRKD2	74	ND
CAMK-II-delta	65	ND
CDK9/サイクリン T1	65	ND
DAPK3	57	ND
FLT3	56	ND

IC_{50}：50%阻害濃度，ND：測定せず
N=1
a. K_m 濃度の ATP 存在下で検討した 174 種類のヒトキナーゼのうち，FRET 法で 1 µmol/L のパルボシクリブ存在下で 50%以上の阻害率がみられたキナーゼについて記載した。
b. 75%以上の阻害率がみられたキナーゼについて，用量反応関係を求めた。
(PD-0332991_[redacted]_133827)

2.1.2. 代謝物 PF-05089326

報告書番号 PD-0332991_[redacted]_133827

ヒト血漿中にわずかに存在するパルボシクリブのラクタム代謝物（PF-05089326）[a]について，ゲルシフトアッセイにより検討したところ，CDK4 と CDK6 に対する阻害活性はパルボシクリブと同等であった［CDK4 および CDK6 に対する IC_{50} 値 ：それぞれ 5.4 nmol/L（2.4 ng/mL）および 16.2 nmol/L（7.3 ng/mL）］。また，274 種類の組み換えキナーゼに対する PF-05089326 の選択性を，CDK4 および CDK6 に対する選択性と比較した。ゲルシフトアッセイにおいて，PF-05089326（1 µmol/L）は 50%以上の阻害率で TRKA（64%），CLK1（63%）および FLT3（56%）を阻害した。FRET 法では，PF-05089326（1 µmol/L）は 50%以上の阻害率で GSK3β，JAK3 および TRKA のキナーゼ活性を阻害した。しかしながら，ヒト血漿中における PF-05089326 の存在比はパルボシクリブの約 10%であり[b]，PF-05089326 の臨床での薬理活性に対する寄与は小さいものと考えられる。

2.2. Rb リン酸化阻害

報告書番号 RR-REG 700-00180，PD-332991_[redacted]_110019

酵素レベルの試験結果から細胞レベルでの薬効を予測するため，ER 陽性（MCF7，T47D）および ER 陰性（MDA-MB435[c]）の乳癌細胞株を用いて，パルボシクリブの薬効のバイオマーカーとなる Rb リン酸化を ELISA 法またはウェスタンブロット法を用いて評価した。CDK4/CDK6 によりリン酸化される 4 つの異なる Rb リン酸化部位（S780，S795 および S807/S811）[6,7]について評価した。Table 4 に示したように，ER 陽性 MCF7 細胞をパルボシクリブで 24 時間処理したところ，S780 および S807/S811 における Rb リン酸化が阻害され，IC_{50} 値はそれぞれ，9.3 nmol/L お

[a] CTD 2.6.4.5.1.3 項

[b] CTD 2.6.4.3.2 項

[c] MDA-MB-435 は試験実施当時は乳癌由来と考えられていたが，現在ではメラノーマ由来とされている。

よび 18.8 nmol/L であった。ER 陽性 T47D 細胞をパルボシクリブで同様に処理したところ，S780 および S807/S811 における Rb リン酸化が阻害され，IC_{50} 値はそれぞれ 29.7 nmol/L および 19.9 nmol/L であった。また, ER 陰性 MDA-MB435 細胞をパルボシクリブで処理したところ, S780 および S795 における Rb リン酸化が阻害され，IC_{50} 値はそれぞれ 66 nmol/L および 63 nmol/L であった。これらの結果から，パルボシクリブの Rb リン酸化阻害作用は評価した 3 種の細胞で同程度であり，各 Rb リン酸化部位はパルボシクリブの活性を予測する適切なバイオマーカーとなることが示唆された。

Table 4.　細胞レベルにおける Rb リン酸化

	パルボシクリブによる Rb リン酸化阻害（IC_{50} 値；nmol/L）		
細胞株	**Rb S780**	**Rb S795**	**Rb S807/S811**
MCF7	9.3± 0.3[a]	ND	18.8 ± 8.2[a]
T47D	29.7 ± 5.3[a]	ND	19.9 ± 5[a]
MDA-MB435	66[b]	63[b]	ND

平均 ± 標準偏差
IC_{50} 値：50%阻害濃度，ND：測定せず
a. 細胞（N=3）は様々な濃度のパルボシクリブに 24 時間曝露し，Rb のリン酸化を ELISA 法により測定した（PD-332991_[redacted]_110019）
b. 細胞（N=1）は様々な濃度のパルボシクリブに 24 時間曝露し，Rb のリン酸化をウェスタンブロット法により測定した（RR-REG 700-00180）

2.3. DNA 合成阻害および細胞増殖阻害

試験報告書 RR-REG 700-00180，PD-332991_[redacted]_110019

MDA-MB453 ヒト乳癌細胞をパルボシクリブで 24 時間処理したところ，80 nmol/L 以上の濃度で G_1 期の細胞の割合が増加し，S 期および G_2/M 期の細胞の割合が減少した（Table 5）。また，パルボシクリブは Rb 陽性のヒト乳癌, 大腸癌および肺癌細胞における DNA へのチミジン取り込みを阻害し，IC_{50} 値は 40 nmol/L～170 nmol/L であった（Table 6）。

同様に，パルボシクリブは Colo205，MDA-MB435，MCF7 および T47D 細胞における細胞増殖をチミジン取り込み阻害と同程度の濃度で阻害した（Table 7）。これらの試験結果から，パルボシクリブは細胞周期を G_1 期で停止させることにより，DNA 合成および細胞増殖を阻害することが示唆された。

Table 5.　MDA-MB453 乳癌細胞の細胞周期割合に対するパルボシクリブの作用

パルボシクリブ（nmol/L）[a]	細胞周期の各期にある細胞の割合（%）		
	G_1	S	G_2/M
0	59	30	11
20	54	33	12
40	74	22	4
80	89	7	3
110	81	16	5
330	86	12	3
620	86	11	3
1000	87	11	2
1250	84	14	2
2500	87	8	5
3000	89	9	2
5000	81	17	2
10000	81	16	4

G_1：第 1 間期，S：DNA 合成期，G_2/M：第 2 間期/分裂期
フローサイトメトリーで測定した DNA 量から，各期の相対分布を求めた。
a. 表中に示した濃度のパルボシクリブで 24 時間処理した。
(RR-REG 700-00180)

Table 6.　パルボシクリブによるヒトがん細胞における DNA へのチミジン取り込み阻害

細胞株 [a]	種類	IC_{50} (nmol/L)
MDA-MB435	乳癌	160
ZR-75-1	乳癌	170
T47D	乳癌	40
MCF7	乳癌	100
H1299	肺癌	120
Colo205	大腸癌	130

IC_{50}：50%阻害濃度
a. 細胞（N=1）は種々の濃度のパルボシクリブおよび[^{14}C]チミジン存在下で 72 時間処理して，放射活性を測定した。
(RR-REG 700-00180)

Table 7.　パルボシクリブによるヒトがん細胞における増殖阻害

細胞株	種類	IC_{50} (nmol/L)
MDA-MB435	乳癌	32[a]
MCF7	乳癌	219[b]
T47D	乳癌	103[b]
Colo205	大腸癌	89[a]

IC_{50}：50%阻害濃度
a. 細胞（N=1）は様々な濃度のパルボシクリブに 3 日間曝露し，コールターカウンターにて細胞数を測定した。（RR-REG 700-00180）
b. 細胞（N=1）は様々な濃度のパルボシクリブに 7 日間曝露し，生存率を蛍光分析法により測定した。（PD-332991_[redacted]_110019）

2.4. Rb 陽性腫瘍に対するパルボシクリブの選択性

報告書番号 RR-REG 700-00180

Rb 陽性および陰性のヒト乳癌および非小細胞肺癌（NSCLC）細胞を用いて，Rb 陽性腫瘍に対するパルボシクリブの選択性を検討した。Rb 陽性の MDA-MB435 乳癌細胞および NCIH1299 NSCLC 細胞をパルボシクリブで処理したところ，いずれの細胞に対しても DNA へのチミジン取り込みを阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 160 nmol/L および 120 nmol/L であった。一方，Rb 陰性の MDA-MB468 細胞および NCIH2009 細胞に対しては，これらの IC_{50} 値より約 20 倍高濃度である 3000 nmol/L でもチミジン取り込み阻害は認められなかった（Table 8）。

また，ほとんどの細胞株で Rb の発現上昇がみられるルミナル型ヒト乳癌細胞に対しては，パルボシクリブは強い増殖阻害作用を示した[4]。パルボシクリブは 16 種類の Rb 陽性神経膠芽腫細胞株に対して G_1 期での細胞周期停止を誘発したが，5 種類の Rb 陰性神経膠芽腫細胞株に対しては細胞周期停止を誘発しなかった[8]。さらに，ショートヘアピン RNA（shRNA）を用いて Rb 陽性 U87MG 神経膠芽腫細胞の Rb をノックダウンしたところ，この細胞はパルボシクリブに抵抗性を示した[8]。これらの結果から，パルボシクリブの抗腫瘍効果を得るには Rb の発現が必要であることが示唆される。

Table 8. パルボシクリブによる Rb 陽性または陰性がん細胞における DNA へのチミジン取り込み阻害

腫瘍	腫瘍の種類	Rb	IC_{50} 値(nmol/L)
MDA-MB435	乳癌	陽性	160
MDA-MB468	乳癌	陰性	>3000
NCIH1299	肺癌	陽性	120
NCIH2009	肺癌	陰性	>3000

IC_{50}：50%阻害濃度，Rb：網膜芽細胞腫蛋白質
N=1
(RR-REG 700-00180)

2.5. パルボシクリブ単独での *in vivo* 試験

2.5.1. *In vivo* 抗腫瘍効果

報告書番号 RR-REG 700-00180

パルボシクリブのマウスにおける最大耐量（MTD）の同定および皮下異種移植モデルにおける抗腫瘍効果について検討するため，一連の *in vivo* 試験を実施した。MTD は死亡のみられない最高用量として定義した。SCID マウスにパルボシクリブを 1 日 1 回 14 日間経口投与したときの MTD は 150 mg/kg であった（Table 9）。この用量において，パルボシクリブは種々のヒト腫瘍異種移植 SCID マウスモデルで顕著な抗腫瘍活性［不活化効力（log_{10} kill）[a]で表される腫瘍退縮または増殖停止ならびに T-C で表される増殖遅延に基づき総合的に評価した］を示した（Table 9）。Colo205 大腸癌細胞を移植したマウスにおいては，本薬 150 mg/kg の 1 日 1 回 14 日間の経口投与

[a]不活化効力（log_{10} kill）は被験物質投与中の腫瘍重量の変化を示す。負の値は腫瘍重量の増加を，正の値は腫瘍重量の減少を，また 0 に近い値は腫瘍増殖の停止状態を示す。

により腫瘍が退縮し，約 50 日間の増殖遅延および 1 を超える不活化効力を示した。腫瘍退縮は SF-295 神経膠芽腫細胞を移植したマウスでも 150 mg/kg の用量でみられ，2 例の無腫瘍生存例が認められた。MDA-MB435 乳癌モデルにおいても MTD に準ずる用量である 130 mg/kg で強力な抗腫瘍効果が認められ，腫瘍増殖が完全に停止した。また，ZR-75-1 乳癌モデルおよび PC-3 前立腺癌モデルでも，それぞれ用量 150 mg/kg および 130 mg/kg で腫瘍増殖がほぼ停止した。

2 つの Rb 陰性腫瘍モデルとして MDA-MB468 乳癌（150 mg/kg）および DU145 前立腺癌（130 mg/kg）を用いて，MTD もしくはそれに準ずる用量におけるパルボシクリブの有効性を評価した。パルボシクリブはいずれの Rb 陰性モデルでも効果を示さなかった（Table 9）。この Rb 陰性腫瘍でみられたパルボシクリブ抵抗性は，*in vitro* における細胞増殖阻害活性に対する抵抗性と同様であった。これらの結果から，酵素/細胞レベルで示されたパルボシクリブの選択性および作用機序（CDK4/CDK6 を介した Rb リン酸化の阻害および細胞周期進行の調節作用）が *in vivo* においても発現していることが示唆された。

Table 9. SCID マウスのヒト腫瘍異種移植モデルに対するパルボシクリブの抗腫瘍効果

腫瘍[a]	腫瘍の種類	投与量[b] MTD または HDT	体重変化率（%）[c]	CR[d]	PR[e]	T-C[f]	不活化効力 log_{10} kill[g]
Colo-205	大腸癌	0	-9	0/12	0/12	NA	-0.44
		12.5	-4	0/8	0/8	12.9	0.00
		37.5	-1	3/8	0/8	18.5	+0.19
		75	+	5/8	0/8	20.0	+0.24
		150	-6	6/8	0/8	48.4	+1.20
SF-295	膠芽腫	0	+	0/12	0/12	NA	-1.70
		58	0	0/6	0/6	0.1	-1.69
		93	-15	0/6	0/6	3.1	-1.30
		150	-11	2/6[h]	0/6	30.1	+2.24
MDA-MB435	乳癌	0	+	0/12	0/12	NA	-0.89
		48	+	0/8	0/8	5.5	-0.51
		77	+	0/8	0/8	11.4	-0.11
		130	+	0/8	0/8	22.3	+0.64
		200	-20	0/8	0/8	Toxic[j]	Toxic
ZR-75-1	乳癌	0	+	0/12	0/12	NA	-1.35
		58	+	0/6	0/6	-0.6	–[k]
		93	-4	0/6	0/6	-1.0	–
		150	-4	0/6	0/6	12.4	-0.06
		240	-29	0/6	0/6	Toxic	Toxic
PC-3	前立腺癌	0	-13	0/11	0/11	NA	-1.00
		50	-13	0/6	0/6	8.9	-0.32
		80	-13	0/6	0/6	10.7	-0.18
		130	-13	0/6	0/6	12.8	0.02
		190	-18	0/6	0/6	Toxic	Toxic
MDA-MB468 (Rb-)	乳癌	0	+	0/20	0/20	NA	-0.35
		37.5	+	0/10	0/10	-4.1	–
		75	+	0/10	0/10	0.7	-0.33
		150	-2	1/10[i]	0/10	-4.3	–
		240	-24	1/10[i]	0/10	Toxic	Toxic
DU145 (Rb-)	前立腺癌	0	+	0/12	0/12	NA	NA
		50	+	0/6	0/6	-0.9	–
		80	+	0/6	0/6	1.5	-0.50
		130	-9	0/6	0/6	6.6	-0.28
		190	-16	0/6	0/6	Toxic	Toxic

C：対照，CR：完全奏効，HDT：試験に用いた最高用量，MTD：最大耐量，PR：部分奏効，T：投与，NA：該当なし
a. MDA-MB468 および DU145 以外はすべて Rb 陽性である。
b. 投与量は mg/kg で示す。溶媒は 50 mmol/L 乳酸緩衝液（pH 4.0）であった。パルボシクリブは 1 日 1 回 14 日間経口投与した。腫瘍重量が 100 mg～150 mg の時点で投与を開始した。
c. 負の値は投与中にみられた体重の減少率を，+は投与終了時に体重増加がみられたことを示す。
d. CR は試験中に重量が 62 mg 未満に減少した腫瘍と定義した。
e. PR は投与開始時から重量が 50%以上減少した腫瘍と定義した。
f. T - C は，被験物質を投与した腫瘍と対照群の腫瘍が一定の評価サイズに達するのに要した日数の差（中央値）を示す。
g. 不活化効力（$\log_{10}$ kill）は被験物質投与中の腫瘍重量の変化を示す。負の値は腫瘍重量の増加を，正の値は腫瘍重量の減少を，また 0 に近い値は腫瘍増殖の停止状態を示す。不活化効力は以下の式により求めた。
$\log_{10}$ kill＝[(T-C) - 投与期間] / (T_d×3.32)
ここで T_d は対数線形プロットにより求めた腫瘍の倍加時間の平均値（日），3.32 は腫瘍が 10 倍に増殖するのに必要な倍加数（すなわち，$2^{3.32}$＝10）を意味する。
h. 無腫瘍生存例 2 例
i. 1 つの腫瘍は評価可能なサイズに達する前に潰瘍化した。
j. 当該群の 10%以上の動物が死亡したことを示す。
k. T-C が負の値の場合，不活化効力は算出しなかったため「－」と表記した。
(RR-REG 700-00180)

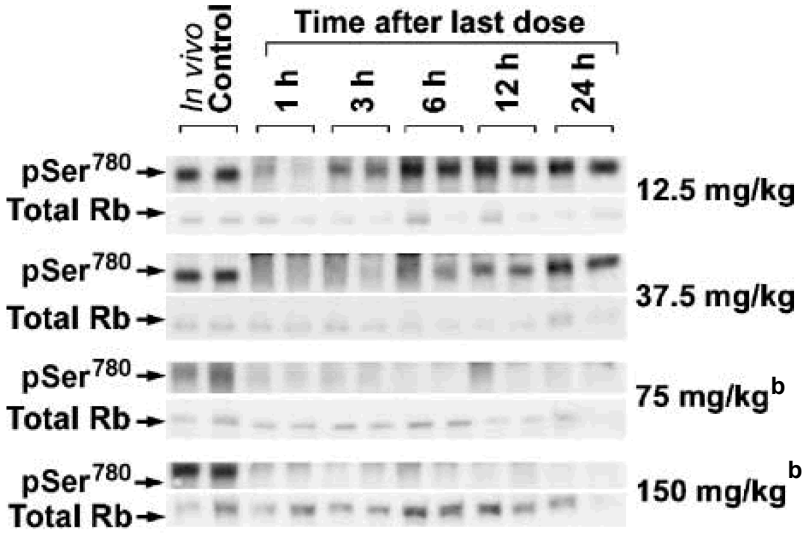
2.5.2. *In vivo* における Rb リン酸化阻害と有効性の相関

報告書番号 RR-REG 700-00180

MDA-MB435 乳癌細胞および Colo205 大腸癌細胞の異種移植マウスを用いて, Rb S780 部位のリン酸化阻害と抗腫瘍活性との間の相関について検討した。MDA-MB435 乳癌細胞を異種移植したマウスに無効量から有効量にわたる用量のパルボシクリブ（12.5 mg/kg～150 mg/kg）を投与し，腫瘍組織における Rb S780 のリン酸化状態を経時的にモニタリングした（Figure 1）。有効用量（75 mg/kg および 150 mg/kg）では投与後 6 時間までに Rb S780 のリン酸化が完全に阻害され，24 時間まで持続した。一方，無効用量（12.5 mg/kg および 37.5 mg/kg）では，Rb S780 リン酸化阻害の程度は低く，投与から 24 時間以内にほぼ溶媒対照と同程度にまで戻った（Figure 1）。Colo205 大腸癌細胞を異種移植したマウスで同様の試験を実施したところ，すべての用量で投与から 6 時間までに，Rb S780 リン酸化を完全またはほぼ完全に阻害したが，投与後 24 時間まで完全な阻害が維持されていたのは 150 mg/kg（MTD）のみであった（Figure 2）。いずれの試験においても，投与から 6 時間の時点で Rb S780 のリン酸化をほぼ完全に阻害する用量のパルボシクリブを投与した場合に腫瘍増殖停止または腫瘍退縮が認められ，Rb S780 のリン酸化阻害と抗腫瘍活性の間に相関がみられた。

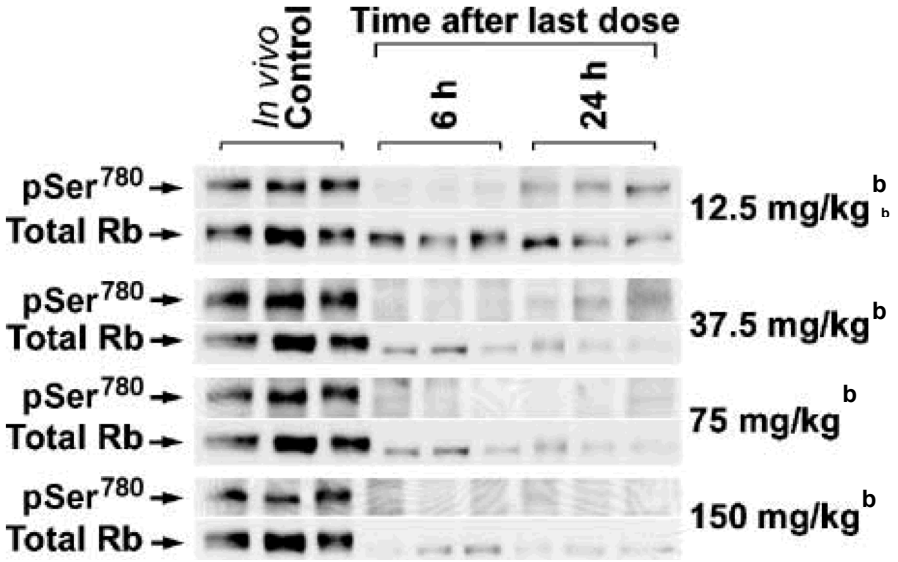
次に, Rb リン酸化阻害と細胞増殖のマーカーである Ki-67 を指標とした腫瘍増殖阻害作用との相関について検討した。MDA-MB435 および Colo205 の異種移植マウスに 130 mg/kg/日のパルボシクリブをそれぞれ 7 日間および 4 日間投与した。最終投与から 1，6，12，24，48 および 72 時間後に腫瘍サンプルを採取し，Rb S780 リン酸化および Ki-67 発現の状況を解析した。いずれの腫瘍モデルにおいても，パルボシクリブ投与群では溶媒対照群と比較して，投与後 1～24 時間の Rb リン酸化および Ki-67 発現が強く抑制された（Table 10）。Rb リン酸化と Ki-67 発現は，MDA-MB435 モデルでは最終投与から 48 時間および 72 時間の時点で対照群と同程度まで戻ったが，Colo205 モデルでは 72 時間まで部分的に抑制された。これらのことから，Rb S780 のリン酸化はパルボシクリブの有効性を示す適切な薬力学的指標であると考えられ，パルボシクリブによる Rb リン酸化抑制の程度は腫瘍細胞増殖の抑制（Ki-67 染色）と直接相関することが示唆される。

Figure 1.　MDA-MB435 乳癌移植マウスにおけるパルボシクリブの投与量と Rb リン酸化の関係 [a]



Rb：網膜芽細胞腫蛋白質
N=2
a. 腫瘍における Rb S780 リン酸化（pSer[780]）をウェスタンブロット法で測定した。
b. 有効用量（腫瘍増殖停止または腫瘍退縮のみられる用量）
(RR-REG 700-00180)

Figure 2.　Colo205 大腸癌移植マウスにおけるパルボシクリブの投与量と Rb リン酸化の関係 [a]



Rb：網膜芽細胞腫蛋白質
N=3
a. 腫瘍における Rb S780 リン酸化（pSer[780]）をウェスタンブロット法で測定した。
b. 有効用量（腫瘍増殖停止または腫瘍退縮のみられる用量）
(RR-REG 700-00180)

Table 10.　パルボシクリブを投与した MDA-MB435/Colo205 異種移植マウスにおける Rb リン酸化および細胞増殖マーカーKi-67 の抑制状況

	MDA-MB435[a]		Colo-205[a]	
経過時間（時間）	pRb S780 (ng/mL)[b]	Ki-67（免疫組織化学スコア）[c]	pRb S780 (ng/mL)[b]	Ki-67（免疫組織化学スコア）[c]
溶媒（24 時間）	130 ± 1.73	230 ± 10.0	788 ± 175	220 ± 10.0
1	34.3 ± 14.5	21.7 ± 2.89	74.3 ± 24.6	6.3 ± 0.58
6	22.0 ± 4.58	14.3 ± 8.08	71.3 ± 24.1	11.0 ± 5.57
12	30.7 ± 7.37	7.0 ± 1.73	87.7 ± 38.5	9.3 ± 2.89
24	30.0 ± 10.4	8.7 ± 2.52	107 ± 67.2	7.0 ± 1.73
48	108 ± 115	183 ± 15.3	114 ± 74.7	43.3 ± 38.5
72	189 ± 39.2	215 ± 58.9	209 ± 177	39.7 ± 44.4

K_i：解離定数，NR：報告されず，Rb：網膜芽細胞腫蛋白質
a. MDA-MB435 または Colo205 を異種移植した SCID マウスに 130 mg/kg のパルボシクリブを 1 日 1 回投与した。溶媒は 50 mmol/L 乳酸緩衝液（pH 4.0）であった。MDA-MB435 モデルでは，パルボシクリブを 7 日間投与後に腫瘍サンプルを採取し解析した。Colo205 モデルでは，4 日間投与後に腫瘍サンプルを採取し解析した。腫瘍サンプルの採取は，各群 3 例を対象に，最終投与後から規定の時間に実施した。
N=3（平均値±標準偏差）
b. ELISA 法により Rb S780 のリン酸化を測定した。
c. 病理学的検査により Ki-67 免疫組織化学染色（MIB-1）を 0～300 の値にスコア化した。
(RR-REG 700-00180)

2.5.3. 目標血漿中濃度

報告書番号 RR764-04338

3 種類の腫瘍細胞（Colo205，SF295 および MDA-MB435）の異種移植マウスを用いて，Rb リン酸化阻害率と腫瘍増殖阻害および定常状態血漿中薬物濃度の関係を評価した。パルボシクリブを 14 日間反復投与した後，各モデルにおける実測値に基づく Css および AUC_{24} の推定値を Table 11 に示す。いずれのモデルにおいてもパルボシクリブの抗腫瘍活性が認められ，腫瘍増殖は 20 日以上遅延したが，抗腫瘍効果の程度は各モデルで異なり，Colo205 モデルの完全退縮から MDA-MB435 モデルの腫瘍増殖停止まで幅があった（Table 9）。

これらのデータに基づいてモデリングした PK/PD 相関から，各ヒト腫瘍異種移植モデルにおいて Rb リン酸化阻害率 80%～90%および腫瘍増殖抑制率 50%を達成するための定常状態のパルボシクリブ濃度（Css）は約 1000 ng/mL（非結合型濃度 147 ng/mL）と推定された。

Table 11.　ヒト腫瘍異種移植マウスにおける有効用量と推定パルボシクリブ曝露量との関係

ヒト腫瘍	投与量（mg/kg/日）	Css,p (ng/mL)	推定曝露量 (AUC_{24}, ng･hr/mL)
MDA-MB435	48	556	13344
	77[a]	918	22032
	130[a]	1830	43920
	200[b]	3384	81216
Colo205	48[a]	543	13032
	77[a]	960	23040
	130[a]	2054	49296
	200[b]	3659	87816
SF295	48	638	15312
	77	840	20160
	130[a]	1677	40248
	200[b]	3101	74424

Css,p：定常状態における平均血漿中濃度，AUC_{24}：24 時間における曲線下面積（Css,p×24）
N=3/群
a. 有効用量（腫瘍増殖停止以上の反応が得られた用量）
b. MTD を超える用量
(RR764-04338)

2.6. パルボシクリブと抗エストロゲン薬を併用したときのエストロゲン受容体陽性乳癌に対する抗腫瘍活性

分子的特性が異なる種類の乳癌細胞を用いたパルボシクリブの薬理試験結果から，パルボシクリブはルミナル型のエストロゲン受容体（ER）陽性の乳癌に対して最も有効であることが明らかにされている[4]。この傾向は特に，Rb が発現し，かつ p16 が欠損している場合に顕著であった。さらに，タモキシフェンとパルボシクリブを臨床用量に相当する濃度で併用すると，ER 陽性乳癌細胞の細胞増殖阻害が増強された[4]。これらの知見に基づき，パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用効果の作用機序を検討するために，ER 陽性乳癌細胞株を用いたパルボシクリブとフルベストラント（ER ダウンレギュレーター），タモキシフェン（ER 遮断薬）またはレトロゾール（アロマターゼ阻害薬）との併用薬理試験を実施した。一連の *in vitro* 試験および *in vivo* 腫瘍モデル試験を実施し，パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用によるシグナル伝達，DNA 合成，細胞増殖および細胞老化への影響を評価した。

2.6.1. *In vitro* 併用試験

2.6.1.1. パルボシクリブと抗エストロゲン薬を併用したときの *in vitro* 増殖阻害作用

試験報告書 PD-332991_[redacted]_110019

パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用効果を評価するために，腫瘍細胞株を用いて *in vitro* 試験を実施し，BLISS スコアリングにより解析した。BLISS スコアは 2 つの薬物の併用が相加的であった場合の理論的有効性を算出したものである[9]。細胞増殖の実測値が BLISS スコアの±5%の範囲内の場合に，その併用投与は相加的であると判断される。また，両方の薬物が併用投与による有効性の向上に寄与していることを確認するため，併用による腫瘍細胞生存率が両薬物のいずれの単独処理と比べても 15%以上低かった場合に相加的であると判断した。

ER 陽性乳癌細胞である T47D および MCF7 細胞をパルボシクリブ（610 pmol/L～10 µmol/L）およびフルベストラント（1.6 nmol/L～1 µmol/L）で 6 日間処理した。各濃度の組み合わせは総当たりの相関マトリックスとした。T47D および MCF7 のいずれにおいても，156 nmol/L のパルボシクリブとフルベストラント 8 nmol/L～1000 nmol/L を併用した場合に，効果が概ね相加的となることが示された（Table 12 および Table 13）。相加的効果のみられたフルベストラント濃度は，臨床有効用量と同程度であった。T47D および MCF7 のいずれにおいても，156 nmol/L のパルボシクリブとフルベストラント 8 nmol/L を併用した場合に，両薬物を単独処理した場合と比較して最も大きな相加的効果が得られた（Table 12 および Table 13）。

さらに，次の 3 通りのパルボシクリブ濃度-生存率曲線をプロットした：（1）パルボシクリブを単独処理したときの実測値，（2）パルボシクリブ（可変濃度）とフルベストラント（8 nmol/L）の併用に関する BLISS スコア，（3）パルボシクリブ（可変濃度）とフルベストラント（8 nmol/L）を併用したときの実測値（Figure 3）。MCF7 および T47D のいずれにおいても，併用時の実測値に基づく曲線は BLISS スコアによる予測曲線と重なり，パルボシクリブおよびフルベストラントの併用による増殖阻害効果は相加的であることが示された。

Table 12. T47D細胞の生存率に対するパルボシクリブおよびフルベストラントの相加的作用

Palbo 単独		Fulv 単独		Fulv と併用	Fulv [1000 nmol/L]		Fulv [200 nmol/L]		Fulv [40 nmol/L]		Fulv [8 nmol/L]		Fulv [1.6 nmol/L]	
[nmol/L]	生存率[a]	[nmol/L]	生存率[a]	Palbo [nmol/L]	BLISS[b]	実測[c]	BLISS[b]	実測[c]	BLISS[b]	実測[c]	BLISS[b]	実測[c]	BLISS[b]	実測[c]
10000	0.17	1000	0.25	10000	0.04	0.17	0.05	0.21	0.04	0.18	0.06	0.15	0.13	0.14
2500	0.13	200	0.28	2500	0.03	0.06	0.04	0.17	0.03	0.14	0.05	0.07	0.10	0.10
625	0.13	40	0.26	625	0.03	0.10	0.04	0.07	0.03	0.09	0.05	0.03	0.09	0.06
156	0.45	8	0.37	156	0.11	0.10 [d]	0.13	0.13 [d]	0.11	0.14	0.16	0.12 [d]	0.33	0.27
39.1	0.73	1.6	0.74	39.1	0.18	0.16	0.20	0.30	0.19	0.27	0.27	0.31	0.54	0.50
9.8	0.93	0	1.00	9.8	0.23	0.22	0.26	0.25	0.24	0.23	0.34	0.38	0.69	0.56
2.5	1.01			2.5	0.25	0.15	0.28	0.33	0.26	0.29	0.37	0.35	0.75	0.67
0.6	0.85			0.6	0.21	0.21	0.24	0.30	0.22	0.29	0.31	0.35	0.63	0.66
0	1.00			0	0.25	0.25	0.28	0.28	0.26	0.26	0.37	0.37	0.74	0.74

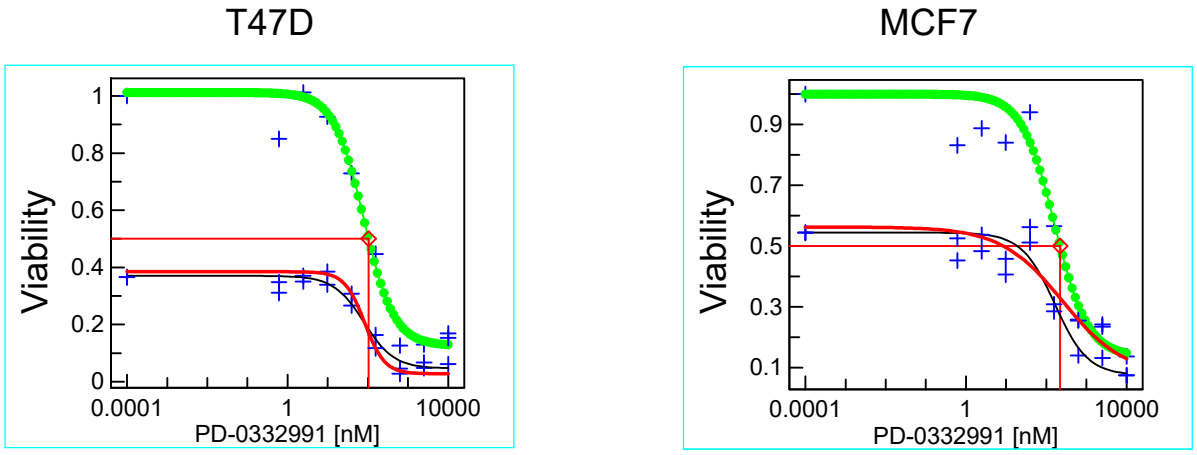
Palbo: パルボシクリブ，Fulv: フルベストラント
数値は 2 つ以上の実験による代表データを示す。
a. 溶媒対照と比較したときの単独投与時の相対生存率
b. BLISS スコア：相加性が成立するとしたときの理論生存率。計算式 C = ((A + B) - (A×B))により算出。ここで，A = ある用量での薬物 1 の阻害率，B = ある用量での薬物 2 の阻害率，C = 相加性が成り立つ場合の理論阻害率。阻害率 = 1-生存率
c. 溶媒対照と比較したときの相対生存率の実測値
d. 併用で実際に測定された生存率が BLISS スコアの±0.05 であり，かつ併用時の生存率がいずれの単独処理時よりも 0.15 以上低い場合に，その併用効果は相加的であると判断した。
（PD-332991_[redacted]_110019）

Table 13.　MCF7細胞の生存率に対するパルボシクリブおよびフルベストラントの相加的作用

Palbo 単独		Fulv 単独		Fulv と併用	Fulv [1000 nmol/L]		Fulv [200 nmol/L]		Fulv [40 nmol/L]		Fulv [8 nmol/L]		Fulv [1.6 nmol/L]	
[nmol/L]	生存率 [a]	[nmol/L]	生存率 [a]	Palbo [nmol/L]	BLISS[b]	実測 [c]	BLISS[b]	実測 [c]	BLISS[b]	実測 [c]	BLISS[b]	実測 [c]	BLISS[b]	実測 [c]
10000	0.14	1000	0.36	10000	0.05	0.03	0.05	0.07	0.04	0.04	0.07	0.07	0.13	0.07
2500	0.24	200	0.39	2500	0.09	0.20	0.10	0.23	0.08	0.22	0.13	0.23	0.23	0.24
625	0.26	40	0.32	625	0.09	0.20	0.10	0.23	0.08	0.20	0.14	0.26	0.24	0.21
156	0.57	8	0.54	156	0.20	0.19 [d]	0.22	0.23 [d]	0.18	0.21	0.31	0.28 [d]	0.53	0.45
39.1	0.94	1.6	0.94	39.1	0.34	0.30	0.37	0.32	0.30	0.39	0.51	0.56	0.89	0.72
9.8	0.84	0	1.00	9.8	0.30	0.32	0.33	0.34	0.27	0.28	0.46	0.41	0.79	0.80
2.5	0.89			2.5	0.32	0.36	0.35	0.34	0.28	0.33	0.48	0.54	0.84	0.84
0.6	0.83			0.6	0.30	0.38	0.33	0.33	0.27	0.42	0.45	0.53	0.78	0.94
0	1.00			0	0.36	0.36	0.39	0.39	0.32	0.32	0.54	0.54	0.94	0.94

Palbo: パルボシクリブ，Fulv: フルベストラント
数値は 2 つ以上の実験による代表データを示す。
a. 溶媒対照と比較したときの単独投与時の相対生存率
b. BLISS スコア：相加性が成立するとしたときの理論生存率。計算式 C = ((A + B) - (A×B))により算出。ここで，A = ある用量での薬物 1 の阻害率，B = ある用量での薬物 2 の阻害率，C = 相加性が成り立つ場合の理論阻害率。阻害率 = 1-生存率
c. 溶媒対照と比較したときの相対生存率の実測値
d. 併用で実際に測定された生存率が BLISS スコアの±0.05 であり，かつ併用時の生存率がいずれの単独処理時よりも 0.15 以上低い場合に，その併用効果は相加的であると判断した。
（PD-332991_[redacted]_110019）

Figure 3.　ER陽性乳癌細胞をパルボシクリブおよびフルベストラントで併用処理したときの用量反応曲線



パルボシクリブとフルベストラントの併用に関する代表的な用量反応曲線（パルボシクリブは可変濃度，フルベストラントは固定濃度）。腫瘍細胞T47DおよびMCF7について，パルボシクリブの濃度を610 pmol/L～10 µmol/L，フルベストラントの濃度を8 nmol/Lとして細胞生存率を評価した。パルボシクリブを単独処理したときの生存率曲線（緑の曲線および丸印），パルボシクリブとフルベストラントの併用が相加的であると仮定したBLISSスコアに基づく生存率曲線（黒の実線），およびパルボシクリブとフルベストラントの併用による実測値に基づく生存率曲線（太い赤の実線）をグラフに示した。BLISSスコアと実測値の生存率曲線が重なることから，併用による細胞増殖阻害効果は相加的であることが示された。細い赤の実線はパルボシクリブを単独処理したときのIC_{50}を示す（T47D：103 nmol/L，MCF7：219 nmol/L）（PD-332991_[redacted]_110019）。

さらに，細胞レベルにおけるパルボシクリブおよびフルベストラント単独それぞれの IC_{50} 値に相当する濃度で両薬物を併用したときの増殖阻害効果の相加性を評価した。細胞増殖阻害試験を再度実施したところ，T47D 細胞の増殖はパルボシクリブ 150 nmol/L により 50.2%，フルベストラント 6 nmol/L により 51.3%抑制された。両薬物を併用したところ，パルボシクリブ単独と比較して阻害率は 23.3%上昇し，有意な相加効果が得られた（Table 14）。同様に，MCF7 細胞の増殖はパルボシクリブ 150 nmol/L により 38.7%，フルベストラント 6 nmol/L により 53.8%阻害され，併用時にはパルボシクリブ単独と比較して抑制率は 37.8%上昇し，有意な相加効果が得られた（Table 14）。

パルボシクリブ（100 nmol/L）およびタモキシフェン（1 µmol/L）の併用による相加効果について，T47D 細胞および MCF7 細胞を用いて同様に評価した。パルボシクリブ単独と比べ，パルボシクリブおよびタモキシフェンの併用時の T47D および MCF7 の細胞増殖阻害率は，それぞれ 19.4%および 22.9%上昇した（Table 15）。

また，パルボシクリブ（25 nmol/L）およびレトロゾール（40 nmol/L）の併用による相加効果についても，アロマターゼを安定的に過剰発現する MCF7-CYP19 細胞を用いて同様に評価した。レトロゾールがアロマターゼに及ぼす作用を直接観察するため，活性炭処理により内因性エストロゲンを除去した後にアロマターゼによりエストラジオールに変換されるアンドロステンジオン（10 nmol/L）を補充した血清で処理して評価した。パルボシクリブ単独と比べ，パルボシク

リブおよびレトロゾールを併用時の細胞増殖阻害率は 39%上昇し，BLISS スコアを上回った（Table 16）。

以上の結果から，パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用により，相加的以上の効果が得られるものと考えられた。

Table 14. ER陽性乳癌細胞をパルボシクリブおよびフルベストラントで併用処理したときの細胞増殖抑制率

細胞株	Palbo（150 nmol/L）[a]	Fulv（6 nmol/L）[a]	併用 [a]	p 値（併用 vs Palbo 単独）[c]	p 値（併用 vs Fulv 単独）[c]
T47D	50.2	51.3	73.5[b]	<0.01	<0.05
MCF7	38.7	53.8	76.5[b]	<0.0001	<0.01

Palbo: パルボシクリブ，Fulv: フルベストラント
T47D 細胞または MCF7 細胞を 7 日間，パルボシクリブ（150 nmol/L）またはフルベストラント（6 nmol/L）の単独で処理したとき，もしくは両薬物で併用処理したときの細胞増殖抑制率。Cell Titer-Blue®を用いて細胞生存率を蛍光測定により求めた。
a. 溶媒対照の細胞生存率を 100 としたときの抑制率（%）
b. BLISS アルゴリズムより，併用効果は相加的であると判断された。
c. 対応のない t 検定（両側）
(PD-332991_[redacted]_110019)

Table 15. ER陽性乳癌細胞をパルボシクリブおよびタモキシフェンで併用処理したときの細胞増殖抑制率

細胞株	Palbo（100 nmol/L）[a]	Tamo（1 µmol/L）[a]	併用 [a]	p 値（併用 vs Palbo 単独）[c]	p 値（併用 vs Tamo 単独）[c]
T47D	70.4	73.3	89.8[b]	<0.001	<0.001
MCF7	52	50.3	74.9[b]	<0.01	<0.01

Palbo: パルボシクリブ，Tamo: タモキシフェン
T47D 細胞または MCF7 細胞を 6 日間，パルボシクリブ（100 nmol/L）またはタモキシフェン（1 µmol/L）の単独で処理したとき，もしくは両薬物で併用処理したときの細胞増殖抑制率。Cell Titer-Blue®を用いて細胞生存率を蛍光測定により求めた。
a. 溶媒対照の細胞生存率を 100 としたときの抑制率（%）
b. BLISS アルゴリズムより，併用効果は相加的であると判断された。
c. 対応のない t 検定（両側）
(PD-332991_[redacted]_110019)

Table 16. ER陽性乳癌細胞をパルボシクリブおよびレトロゾールで併用処理したときの細胞増殖抑制効果

細胞株	Palbo（25 nmol/L）[a]	Letro（40 nmol/L）[a]	併用[a]	p 値（併用 vs Palbo 単独）[c]	p 値（併用 vs Letro 単独）[c]
MCF7-CYP19	41.2	48.7	80.2[b]	<0.001	<0.001

Palbo: パルボシクリブ，Letro: レトロゾール
MCF7-CYP19 細胞に 7 日間，パルボシクリブ（25 nmol/L）またはレトロゾール（40 nmol/L）を単独処理したとき，もしくは両剤で併用処理したときの細胞増殖抑制率。MCF7-CYP19 細胞は CYP19 cDNA によりコードされるアロマターゼを過剰発現している。アロマターゼ阻害薬であるレトロゾールの作用を直接観察するため，MCF7-CYP19 細胞を活性炭処理した血清で 3 日間培養し，内因性エストロゲンを除去した。その後，MCF7-CYP19 細胞をアンドロステンジオン（アロマターゼによりエストラジオールに変換される）10 nmol/L 存在下で試験した。Cellometer® Vision カウンターを用いて細胞数を測定した。
a. 溶媒対照の細胞生存率を 100 としたときの抑制率（%）
b. BLISS アルゴリズムより，併用効果は相加的を上回ると判断された。
c. 対応のない t 検定（両側）
(PD-332991_[redacted]_110019)

2.6.1.2. パルボシクリブと抗エストロゲン薬を併用したときの作用機序

報告書番号 PD-332991_[redacted]_110019

抗エストロゲン薬によるパルボシクリブの活性増強メカニズムを検討するため，CDK4/CDK6 シグナル伝達および ER シグナル伝達に関与する主要な標的分子を評価した。PD の指標として CDK4/6 の基質である Rb および FoxM1 ならびに ER シグナル伝達の標的分子であるサイクリン D1 および c-Myc などを評価した。T47D 細胞および MCF7-CYP19 細胞をパルボシクリブおよび抗エストロゲン薬で併用処理し，6，24，48 時間後および 4 日後の時点における標的分子の発現量を評価した。各薬物の濃度は，細胞増殖阻害試験で得られた IC_{50} 値を用いた。

T47D 細胞における Rb リン酸化（S807/S811 部位）の抑制は処理後 24 時間で最大となった。この時点における Rb リン酸化（S807/S811 部位）の抑制率は，タモキシフェン（1 µmol/L）単独で 45%，フルベストラント（10 nmol/L）単独で 80%，パルボシクリブ（100 nmol/L）単独で 81%であったが，これらの抗エストロゲン薬およびパルボシクリブで併用処理した場合には，Rb リン酸化（S807/S811 部位）はほぼ完全に抑制され（いずれも 95%以上），抑制傾向は処理後 4 日まで持続した（Table 17 および Figure 4）。Rb S780 部位のリン酸化についても同様の結果が得られた（Table 17 および Figure 4）。E2F 転写因子（E2F1，2 および 3）も，その上流にある Rb リン酸化が抑制された結果不活性化され，T47D 細胞をパルボシクリブ（100 nmol/L），フルベストラント（10 nmol/L）またはタモキシフェン（1 µmol/L）で単独処理したとき，処理後 24 時間における E2F1 発現量はそれぞれ 48%，42%および 31%減少した。一方，パルボシクリブをいずれかの抗エストロゲン薬と併用した場合，パルボシクリブ単独と比べ，E2F1 の発現量はそれぞれ 23%および 30%減少した（Table 17 および Figure 4）。FoxM1 は CDK4 または CDK6 により直接リン酸化され，安定化される[10]。T47D 細胞をパルボシクリブ（100 nmol/L）単独で処理したとき，処理後 24 時間における FoxM1 の発現量は 77%減少し，フルベストラント（10 nmol/L）およびタモキシフェン（1 µmol/L）単独ではそれぞれ 51%および 47%減少した。パルボシクリブをいずれかの抗エストロゲン薬と併用しても，パルボシクリブ単独と比べたときの処理後 24 時間における FoxM1 発現抑制率の増強はわずかであった。しかし，処理後 24 時間以降，パルボシクリブ単独では FoxM1 発現量の上昇がみられたが，フルベストラントまたはタモキシフェンとの併用では，

処理後 4 日まで 82%以上の抑制率が継続した（Table 17 および Figure 4）。c-Myc 遺伝子上流のエンハンサーは ER/AP-1 複合体により活性化されることから，エストロゲンは間接的に c-Myc 遺伝子の発現を促進することが知られている[11]。このことから，c-Myc 発現量ついても同様に評価した。パルボシクリブ（100 nmol/L）単独と比較して，フルベストラント（10 nmol/L）またはタモキシフェン（1 µmol/L）単独では，処理後 6 時間において c-Myc 発現量が抑制された。パルボシクリブを抗エストロゲン薬と併用したとき，6，24 および 48 時間の時点で，抗エストロゲン薬単独と比較して c-Myc 発現量の抑制率は増強された（Table 17 および Figure 4）また，長期間（4 日間）の併用処理により，c-Myc の抑制率はさらに増強された（最大 26%）。

MCF7-CYP19 細胞においても，シグナル伝達分子の発現抑制は処理後 24 時間で最大となった。この時点における Rb リン酸化（S807/S811 部位）の抑制率は，レトロゾール（100 nmol/L）単独で 14%，フルベストラント（10 nmol/L）単独で 32%，パルボシクリブ（200 nmol/L）単独で 80%であった。パルボシクリブを抗エストロゲン薬と併用した場合，処理後 24 時間における抑制率はパルボシクリブ単独と比べ 13%以上増強した。Rb リン酸化の下流にある E2F1 も同様に抑制された（Table 18 および Figure 5）。FoxM1 発現抑制率は，パルボシクリブ単独では処理後 24 時間で 92%となり，T47D 細胞を用いた試験結果と同様に FoxM1 はもっとも感度の高い標的分子であった。いずれの抗エストロゲン薬を併用した場合も処理後 24 時間における FoxM1 抑制率の増強はわずかであったが，併用処理ではそれ以降も抑制が持続した（Table 18 および Figure 5）。c-Myc 発現量は，レトロゾールおよびフルベストラントの単独処理により速やかに低下し，処理後 6 時間で最大の抑制がみられた。パルボシクリブ単独でも c-Myc 発現量は低下したが，抗エストロゲン薬と比べて反応が遅く，処理後 24 時間で最大の抑制がみられた。パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬のいずれの単独処理によっても c-Myc の発現抑制は持続せず，最大の抑制がみられてから 24 時間以内にアンドロステンジオン（AD）添加対照と同程度にまで戻った。さらに抗エストロゲン薬単独では c-Myc 発現量が AD 添加対照より 49%以上増加したが，パルボシクリブ単独ではこのような現象はみられなかった。パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬で併用処理したところ，各薬物を単独処理した場合と比べ，c-Myc 発現量は同程度かそれを下回り，処理後 4 日まで発現抑制は持続し，AD 添加対照を上回ることはなかった（Table 18 および Figure 5）。

以上の結果から，パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬の併用による抗腫瘍効果の相加効果は，パルボシクリブによる CDK4/CDK6 の直接的阻害および抗エストロゲン薬によるサイクリン D1 阻害を介した CDK4/CDK6 の間接的阻害の 2 つの経路から，Rb リン酸化が協調的に阻害されることによるものと考えられる。T47D 細胞および MCF7-CYP19 細胞のいずれにおいても，FoxM1（CDK4/CDK6 により直接リン酸化され，細胞老化に関与する）発現量は，主にパルボシクリブにより抑制され処理後 24 時間において最大の抑制を示したが，抗エストロゲン薬の併用により抑制は持続した。一方，c-Myc（エストロゲンにより間接的に発現が促進される）発現量は，主に抗エストロゲン薬により抑制され処理後 6 時間および 24 時間において最大の抑制を示したが，パルボシクリブの併用により抑制は持続した。したがって，パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬の併用による抗腫瘍効果の増強メカニズムには，少なくとも Rb リン酸化抑制作用の増強ならびに FoxM1 および c-Myc の発現抑制の持続時間延長が関与していると考えられる。

Table 17. T47D細胞におけるCDK4/6およびERシグナル伝達の標的分子発現量（パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による阻害）

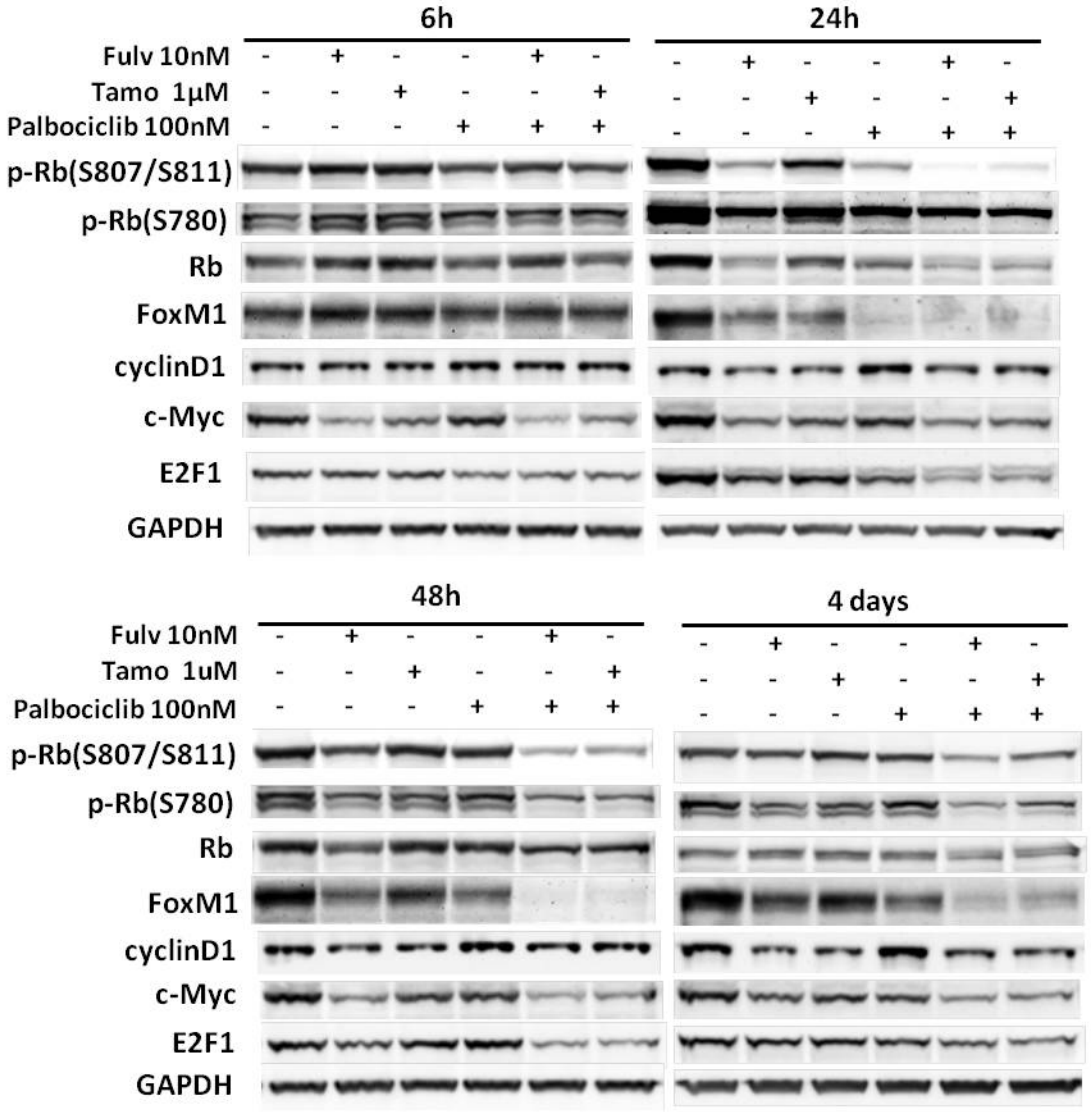
標的分子	適用物質	発現量［溶媒対照を 100 として比較（%）］[a] 6 時間	24 時間	48 時間	4 日間
Rb リン酸化（S807/S811）	DMSO	100	100	100	100
	Fulv 10 nmol/L	115	20	57	72
	Tamo 1 µmol/L	122	55	86	88
	Palbo 100 nmol/L	83	19	76	75
	Fulv + Palbo	87	4	28	32
	Tamo + Palbo	78	5	32	42
Rb リン酸化（S780）	DMSO	100	100	100	100
	Fulv 10 nmol/L	136	54	57	51
	Tamo 1 µmol/L	129	61	69	62
	Palbo 100 nmol/L	106	72	86	71
	Fulv + Palbo	92	42	39	22
	Tamo + Palbo	105	30	40	30
E2F1	DMSO	100	100	100	100
	Fulv 10 nmol/L	94	58	62	77
	Tamo 1 µmol/L	97	69	92	79
	Palbo 100 nmol/L	75	52	102	66
	Fulv + Palbo	73	29	49	47
	Tamo + Palbo	79	22	45	40
FoxM1	DMSO	100	100	100	100
	Fulv 10 nmol/L	108	49	49	58
	Tamo 1 µmol/L	101	53	80	67
	Palbo 100 nmol/L	85	23	55	42
	Fulv + Palbo	87	22	12	16
	Tamo + Palbo	85	16	13	18
c-Myc	DMSO	100	100	100	100
	Fulv 10 nmol/L	43	35	37	55
	Tamo 1 µmol/L	66	44	67	62
	Palbo 100 nmol/L	92	62	69	52
	Fulv + Palbo	36	30	31	26
	Tamo + Palbo	52	29	43	28

T47D 細胞をパルボシクリブ（Palbo : 100 nmol/L），フルベストラント（Fulv : 10 nmol/L），タモキシフェン（Tamo : 1 µmol/L）で単独または併用処理したときの CDK4/CDK6 および ER シグナル伝達の標的分子発現量の経時的変化。表に示した時間処理した後，蛋白質溶解物を採取し，SDS-PAGE により分離した。分離した蛋白質をニトロセルロース膜に転写し，標的蛋白質に対する抗体を用いてウェスタンブロットを実施した。AlphaImager を用いて化学発光を画像化し，バンドを検出した。

a. 各標的分子の発現量は，試料に含まれる細胞数の違いを GAPDH で補正後，溶媒 DMSO で処理したバンドと比較した。

(PD-332991_[redacted]_110019)

Figure 4.　T47D 細胞における細胞周期および ER シグナル伝達の標的分子発現量（パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による阻害）



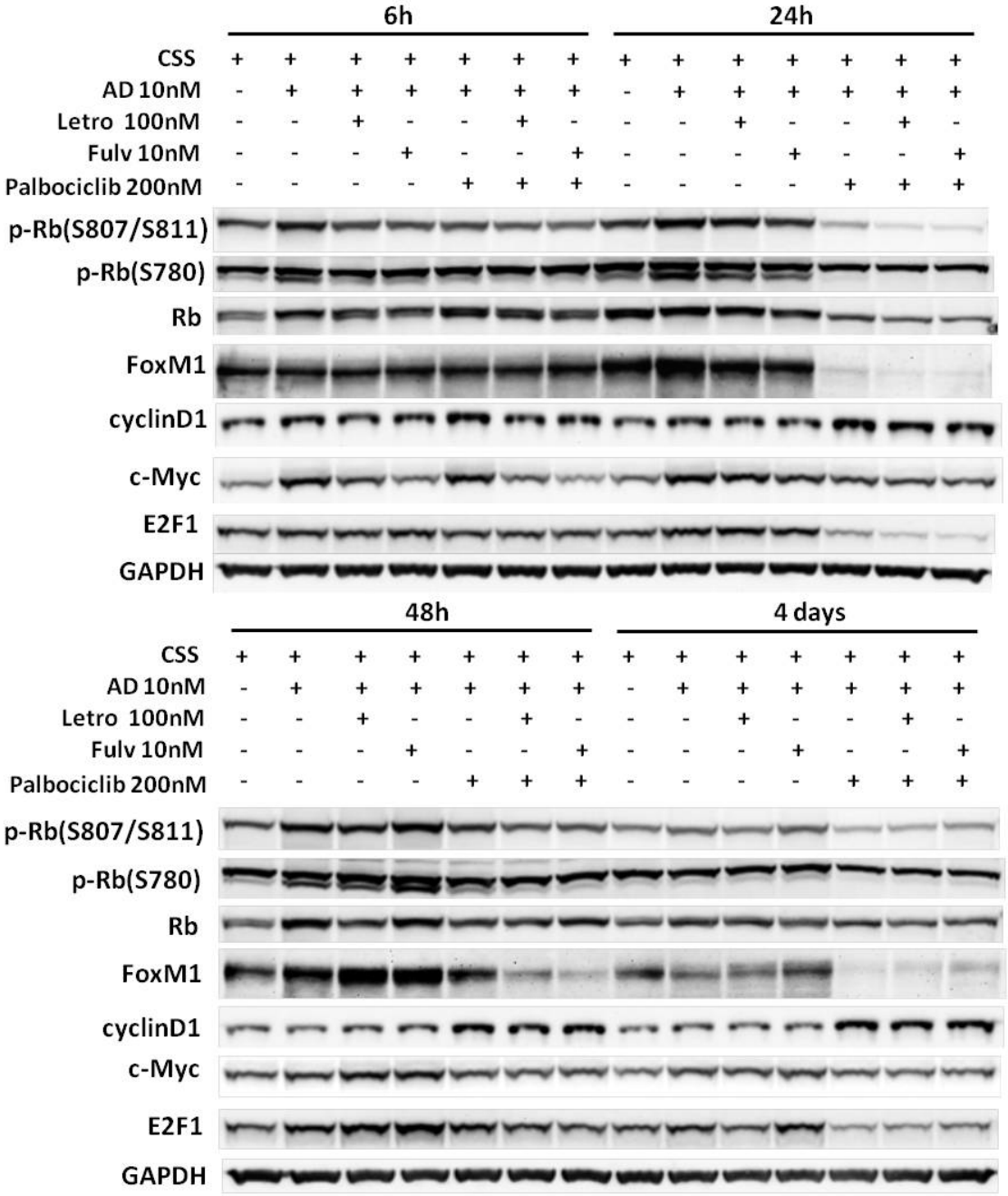
T47D 細胞をパルボシクリブ（Palbociclib：100 nmol/L），フルベストラント（Fulv：10 nmol/L）またはタモキシフェン（Tamo：1 µmol/L）で単独または併用処理したときの CDK4/CDK6 および ER シグナル伝達の標的分子発現量の経時的変化。図に示した時間処理した後，蛋白質溶解物を採取し，SDS-PAGE により分離した。分離した蛋白質をニトロセルロース膜に転写し，標的蛋白質に対する抗体を用いてウェスタンブロットを実施した。AlphaImager を用いて化学発光を画像化し，バンドを検出した（PD-332991_[redacted]_110019）。

Table 18. MCF7-CYP19細胞におけるCDK4/6およびERシグナル伝達の標的分子発現量（パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による阻害）

標的分子	投与物質	発現量［AD を 100 として比較（%）］[a] 6 時間	24 時間	48 時間	4 日間
Rb リン酸化（S807/S811）	AD 10 nmol/L	100	100	100	100
	Letro 100 nmol/L	70	86	99	91
	Fulv 10 nmol/L	63	68	143	123
	Palbo 200 nmol/L	60	20	83	51
	Letro + Palbo	51	7	58	46
	Fulv + Palbo	50	6	54	46
Rb リン酸化（S780）	AD 10 nmol/L	100	100	100	100
	Letro 100 nmol/L	74	86	142	124
	Fulv 10 nmol/L	83	72	164	121
	Palbo 200 nmol/L	82	48	85	80
	Letro + Palbo	76	44	86	78
	Fulv + Palbo	82	38	74	59
E2F1	AD 10 nmol/L	100	100	100	100
	Letro 100 nmol/L	93	109	149	77
	Fulv 10 nmol/L	109	90	196	134
	Palbo 200 nmol/L	80	31	107	42
	Letro + Palbo	83	15	84	40
	Fulv + Palbo	82	11	63	40
FoxM1	AD 10 nmol/L	100	100	100	100
	Letro 100 nmol/L	99	76	153	111
	Fulv 10 nmol/L	101	70	162	167
	Palbo 200 nmol/L	92	8	82	44
	Letro + Palbo	89	4	40	46
	Fulv + Palbo	102	3	24	45
c-Myc	AD 10 nmol/L	100	100	100	100
	Letro 100 nmol/L	64	89	149	107
	Fulv 10 nmol/L	45	73	162	123
	Palbo 200 nmol/L	90	58	102	93
	Letro + Palbo	48	51	92	74
	Fulv + Palbo	32	45	88	64

MCF7-CYP19 細胞をパルボシクリブ（Palbo：200 nmol/L），レトロゾール（Letro：100 nmol/L），フルベストラント（Fulv：10 nmol/L）の単独または併用で処理したときの CDK4/CDK6 および ER シグナル伝達の標的分子の経時的変化。MCF7-CYP19 細胞は CYP19 cDNA によってコードされるアロマターゼを過剰発現している。
MCF7-CYP19 細胞は活性炭処理した血清（CSS）を加えた培地で 3 日間培養し，内因性エストロゲンを除去した後，エストラジオールの前駆体であるアンドロステンジオン（AD）（10 nmol/L）を添加した。表に示した時間処理した後，蛋白質溶解物を採取し，SDS-PAGE により分離した。分離した蛋白質をニトロセルロース膜に転写し，標的蛋白質に対する抗体を用いてウェスタンブロットを実施した。AlphaImager を用いて化学発光を画像化し，バンドを検出した。
a. 各標的分子の発現量は，試料に含まれる細胞数の違いを GAPDH で補正後，溶媒 DMSO で処理したバンドと比較した。
(PD-332991_[redacted]_110019)

Figure 5.　MCF7-CYP19 細胞における CDK4/6 および ER シグナル伝達の標的分子発現量（パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による阻害）



MCF7-CYP19 細胞をパルボシクリブ（Palbociclib：200 nmol/L），レトロゾール（Letro：100 nmol/L），フルベストラント（Fulv：10 nmol/L）の単独または併用で処理したときの CDK4/CDK6 および ER シグナル伝達の標的分子の経時的変化。MCF7-CYP19 細胞は CYP19 cDNA によってコードされるアロマターゼを過剰発現している。MCF7-CYP19 細胞は活性炭処理した血清（CSS）を加えた培地で 3 日間培養し，内因性エストロゲンを除去した後，エストラジオールの前駆体であるアンドロステンジオン（AD）（10 nmol/L）を添加した。図に示した時間処理した後，蛋白質溶解物を採取し，SDS-PAGE により分離した。分離した蛋白質をニトロセルロース膜に転写し，標的蛋白質に対する抗体を用いてウェスタンブロットを実施した。AlphaImager を用いて化学発光を画像化し，バンドを検出した（PD-332991_[redacted]_110019）。

2.6.1.3. パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用による DNA 合成阻害

報告書番号 PD-332991_[redacted]_110019

2.3 項で示したように，パルボシクリブは細胞増殖を阻害するだけでなく，DNA 合成も阻害することが示されている。抗エストロゲン薬の併用がパルボシクリブの DNA 合成阻害作用に与える影響について評価するため，T47D，MCF7 および MCF7-CYP19 細胞における EdU（5-エチニル-2’-デオキシウリジン）取り込み試験を実施した。パルボシクリブと抗エストロゲン薬（フルベストラントおよびレトロゾール）の濃度は，細胞増殖阻害試験で得られた IC_{50} 値を用いた。

T47D 細胞では，4 日間のパルボシクリブ（100 nmol/L）処理により DNA 合成は 66.9%阻害されたが，フルベストラント（10 nmol/L）を併用した場合にはパルボシクリブ単独と比べて DNA 合成阻害率は 23%上昇した（Table 19）。

MCF7 細胞では，4 日間のパルボシクリブ（100 nmol/L）処理により DNA 合成は 46%阻害され，フルベストラント（10 nmol/L）を併用した場合にはパルボシクリブ単独と比べて DNA 合成阻害率は 33.4%上昇した（Table 19）。

MCF7-CYP19 細胞では，4 日間のパルボシクリブ（100 nmol/L）処理により DNA 合成は 47.5%阻害され，レトロゾール（25 nmol/L）を併用した場合にはパルボシクリブ単独と比べて DNA 合成阻害率は 10.5%上昇した（Table 20）。

以上のように，評価した 3 種類の細胞いずれにおいても，各薬物の単独処理と比較してパルボシクリブおよび抗エストロゲン薬の併用により DNA 合成阻害は増強されることが示された。

Table 19.　パルボシクリブとフルベストラントを4日間併用したときのDNA合成への影響

	EdU 取り込み率（%）					
細胞株	**溶媒対照**	**Palbo (100 nmol/L)**	**Fulv (10 nmol/L)**	**併用**	**p 値 [a] 併用 vs Palbo 単独**	**p 値 [a] 併用 vs Fulv 単独**
T47D	100 ± 11.5	33.1± 6.6	23.4 ± 4.8	10.1 ± 1.5	<0.001	<0.001
MCF7	100 ± 11	54 ± 10.8	38.5 ± 9.4	20.6 ± 5.4	<0.001	<0.01

Palbo: パルボシクリブ，Fulv: フルベストラント
T47D 細胞または MCF7 細胞をパルボシクリブ（100 nmol/L）とフルベストラント（10 nmol/L）の単独または併用で 4 日間処理した後，EdU で 2 時間処理して EdU の細胞内取り込みを測定することにより算出した DNA 合成率。TECAN マルチリーダーを用いて EdU 取り込みを蛍光検出し，溶媒対照［DMSO（最終濃度 0.1%）］と比較したときの EdU の取り込み率（%）を算出した。
平均値±標準偏差（N=3）
a. 対応のある t 検定（両側）
(PD-332991_[redacted]_110019)

Table 20.　パルボシクリブとレトロゾールを4日間併用したときのDNA合成への影響

	EdU 取り込み率（%）					
細胞株	溶媒対照	Palbo (100 nmol/L)	Letro (25 nmol/L)	併用	p 値 [a] 併用 vs Palbo 単独	p 値 [a] 併用 vs Letro 単独
MCF7-CYP19	100 ± 13	52.5 ± 10.1	76.1 ± 11.6	42.0 ± 6.4	<0.01	<0.001

Palbo: パルボシクリブ，Fulv: フルベストラント
アンドロステンジオン（AD）10 nmol/L の存在下で MCF7-CYP19 細胞をパルボシクリブ（100 nmol/L）およびレトロゾール（25 nmol/L）の単独または併用で 4 日間処理した後の DNA 合成率。MCF7-CYP19 細胞は CYP19 cDNA によってコードされるアロマターゼを過剰発現している。アロマターゼ阻害薬であるレトロゾールの作用を直接観察するため，MCF7-CYP19 細胞を活性炭処理した血清で 3 日間培養し，内因性エストロゲンを除去した。その後，アロマターゼによりエストラジオールに変換されるアンドロステンジオン 10 nmol/L 存在下で評価した。細胞を薬物で 4 日間処理した後，EdU で 2 時間処理して EdU の細胞内取り込みを測定した。EdU 取り込みは TECAN マルチリーダーを用いて蛍光検出し，溶媒対照［DMSO（最終濃度 0.1%）］と比較したときの EdU の取り込み率（%）を算出した。
平均値±標準偏差（N=3）
a. 対応のある t 検定（両側）
(PD-332991_[redacted]_110019)

2.6.1.4. パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用による細胞老化誘導

報告書番号 PD-332991_[redacted]_110019

2.6.1.2 項で示したように，パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬はそれぞれ FoxM1 発現および c-Myc 発現を抑制した（Table 17，Table 18，Figure 4 および Figure 5）。CDK4/CDK6 は FoxM1 をリン酸化することで FoxM1 を安定化させ [10]，エストロゲンシグナルは c-Myc の発現を亢進することが報告されており [11]，また FoxM1 および c-Myc はがん細胞の老化を抑制することが報告されている [10,12]ことから，パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬の併用による細胞老化への影響を評価した。老化した細胞ではリソソームに細胞老化関連β-ガラクトシダーゼ（SA-β-gal）の蓄積がみられるため, ER 陽性乳癌細胞株（CAMA1, MCF7, T47D）をパルボシクリブ（100 nmol/L），フルベストラント（5 nmol/L または 10 nmol/L）およびタモキシフェン（100 nmol/L または 1000 nmol/L）の単独または併用で 6 日間処理し，蛍光分析により SA-β-gal 活性を測定した。

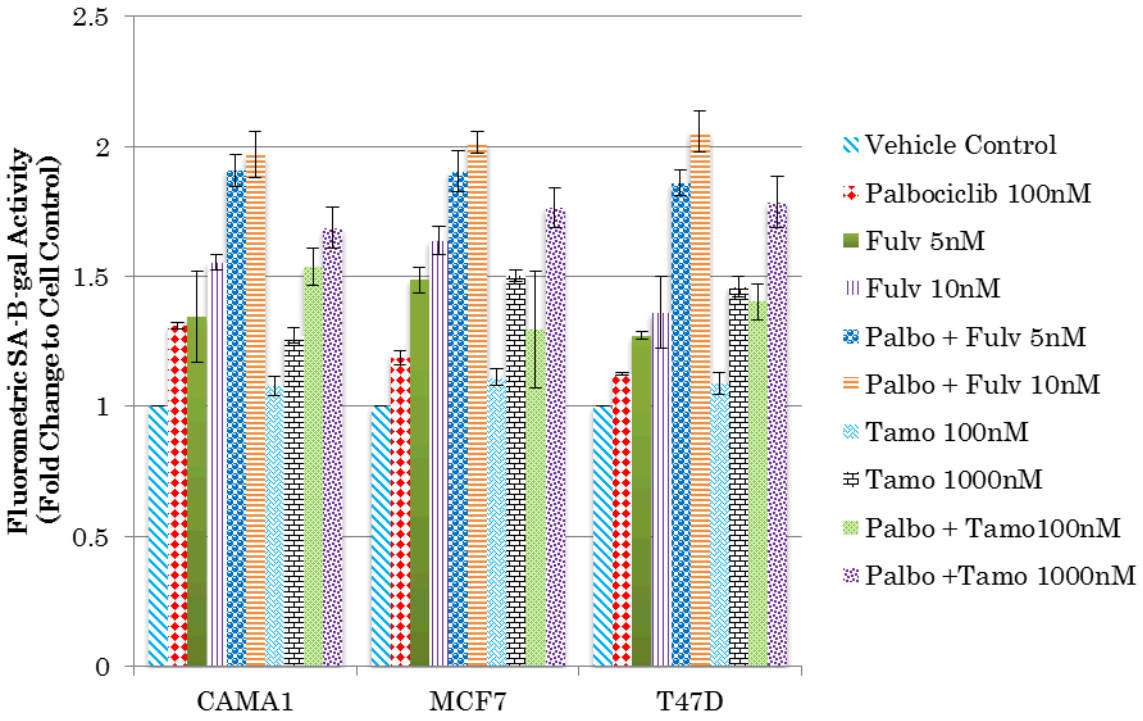
CAMA1, MCF7 および T47D 細胞をパルボシクリブ（100 nmol/L）単独で処理したところ, SA-β-gal 活性は溶媒対照と比較して 12%～31%増強された。同様にフルベストラント（10 nmol/L）およびタモキシフェン（1 µmol/L）単独では SA-β-gal 活性は溶媒対照と比較してそれぞれ 36%～64%および 27%～50%増強された。一方，パルボシクリブをフルベストラントまたはタモキシフェンと併用した場合，SA-β-gal 活性は溶媒対照と比較しそれぞれ 97%～106%および 69%～79%増強された（Table 21 および Figure 6）。

Table 21.　ER陽性乳癌細胞におけるパルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による細胞老化誘導

細胞株	溶媒対照	SA-β-gal 活性 [a,b] Palbo 100 nmol/L	Fulv 5 nmol/L	Fulv 10 nmol/L	Palbo + Fulv 5 nmol/L	Palbo + Fulv 10 nmol/L	Tamo 100 nmol/L	Tamo 1 µmol/L	Palbo + Tamo 100 nmol/L	Palbo + Tamo 1 µmol/L
CAMA1	1.00	1.31 ± 0.01	1.35 ± 0.17	1.55 ± 0.03	1.91 ± 0.06	1.97 ± 0.09	1.08 ± 0.04	1.27 ± 0.03	1.54 ± 0.07	1.69 ± 0.08
MCF7	1.00	1.19 ± 0.03	1.49 ± 0.05	1.64 ± 0.06	1.90 ± 0.08	2.02 ± 0.04	1.11 ± 0.03	1.50 ± 0.02	1.30 ± 0.23[ns]	1.76 ± 0.08
T47D	1.00	1.12 ± 0.01	1.27 ± 0.02	1.36 ± 0.14	1.86 ± 0.05	2.06 ± 0.08	1.09 ± 0.04	1.46 ± 0.04	1.40 ± 0.07	1.79 ± 0.10

ER 陽性乳癌細胞（CAMA1，MCF7，T47D）をパルボシクリブ（Palbo：100 nmol/L），フルベストラント（Fulv：5 nmol/L および 10 nmol/L），タモキシフェン（Tamo：100 nmol/L および 1 µmol/L）の単独または併用で 6 日間処理したときの細胞老化の誘導。細胞老化は細胞老化関連 β-ガラクトシダーゼ（SA-β-gal）活性を蛍光検出により測定した。SA-β-gal 活性は蛋白質濃度により補正し，溶媒対照［DMSO（最終濃度 0.1%）］との比として算出した。
ns=有意差なし
a.平均値±標準偏差（N=3）
b. Student の t 検定（両側），パルボシクリブ+タモキシフェン 100 nmol/L 群（p>0.05，ns）を除き，すべての群で p <0.05。
(PD-332991_[redacted]_110019)

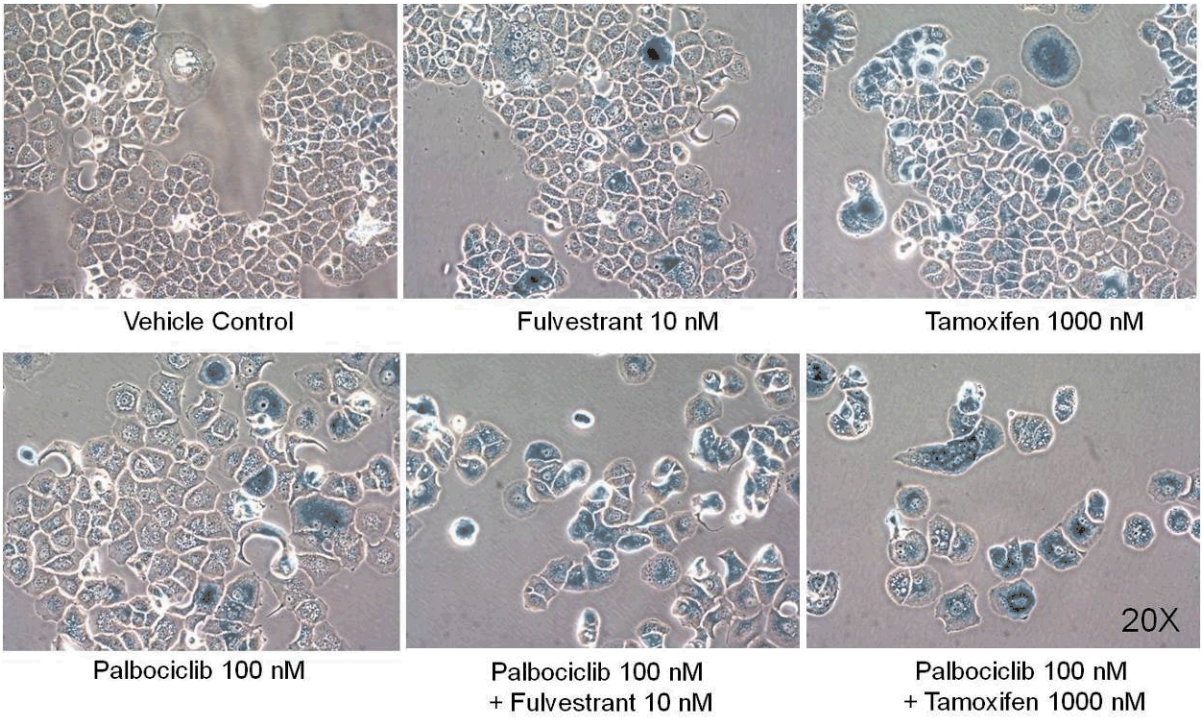
Figure 6.　ER 陽性乳癌細胞におけるパルボシクリブおよび抗エストロゲン薬による細胞老化誘導



ER 陽性乳癌細胞（CAMA1，MCF7，T47D）をパルボシクリブ（Palbociclib : 100 nmol/L），フルベストラント（Fulv : 5 nmol/L および 10 nmol/L），タモキシフェン（Tamo：100 nmol/L および 1 µmol/L）の単独または併用で 6 日間処理したときの細胞老化の誘導。細胞老化は SA-β-gal 活性を蛍光検出により測定した。SA-β-gal 活性は蛋白質濃度により補正し，溶媒対照との比として算出した（PD-332991_[redacted]_110019）。

また，SA-β-gal による細胞染色においても，併用による細胞老化促進が示唆された。T47D 細胞をパルボシクリブ（100 nmol/L）およびフルベストラント（10 nmol/L）またはパルボシクリブ（100 nmol/L）およびタモキシフェン（1000 nmol/L）で 7 日間併用処理したところ，いずれの単独処理と比較しても細胞の肥大，細胞数減少および細胞老化促進がみられた（Figure 7）。

Figure 7.　パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬で処理した T47D 細胞における細胞老化関連 SA-β-Gal 染色



T47D 細胞をパルボシクリブ（100 nmol/L），フルベストラント（10 nmol/L），タモキシフェン（1000 nmol/L）の単独または併用で 7 日間処理したときの細胞老化の誘導。細胞老化は SA-β-gal 染色（青色）により検出した（PD-332991_[redacted]_110019）。

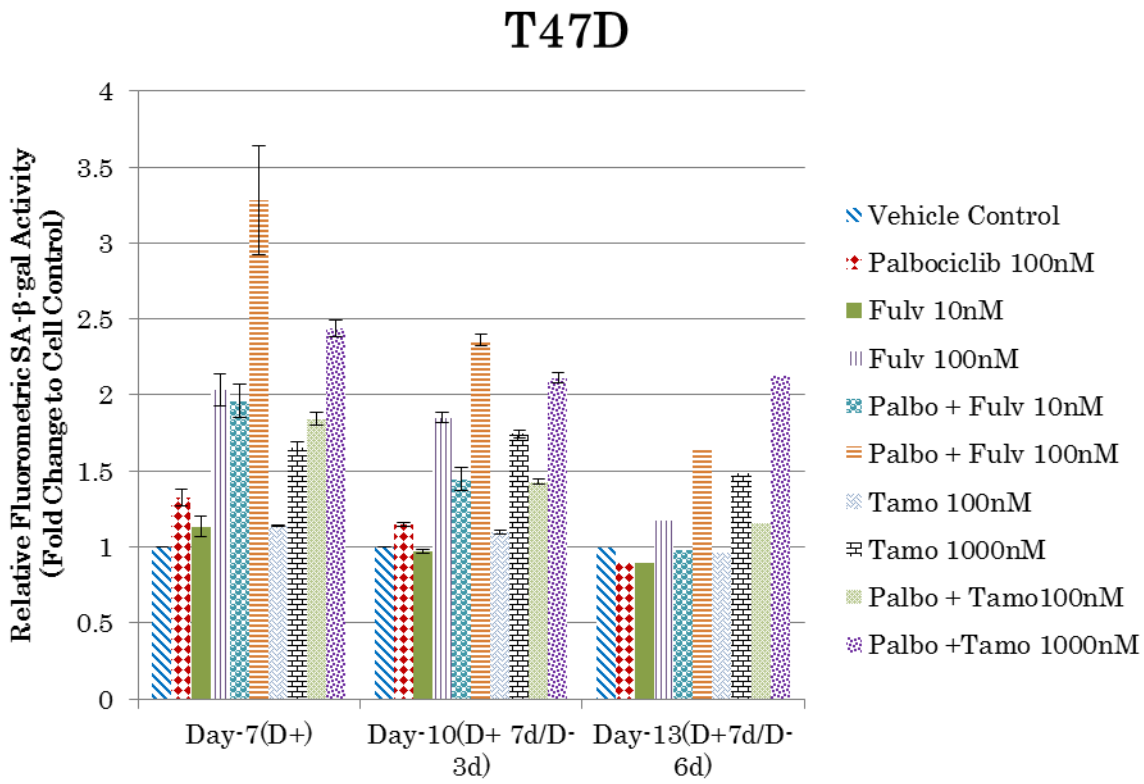
パルボシクリブと抗エストロゲン薬の併用が細胞老化誘導作用の持続期間に与える影響を評価した。T47D 細胞をパルボシクリブと抗エストロゲン薬（フルベストラントまたはタモキシフェン）の単独または併用で最大 7 日間処理した後，薬物を除去して 3 日間培養した。いずれの単独処理と比較しても，併用によって T47D 細胞における細胞老化誘導の持続期間は延長され，薬物除去から 6 日後まで持続した（Figure 8）。

DNA 合成の指標として EdU 取り込みを用い，細胞周期停止の持続期間についても評価した。T47D 細胞をパルボシクリブおよびフルベストラントの単独または併用で 7 日間処理した後，薬物を除去し，4 日間培養した。DNA 合成の割合を 7 日間の薬物処理後および薬物除去から 4 日間の培養後に測定した。7 日間の薬物処理による EdU 取り込み阻害率は，パルボシクリブ（100 nmol/L）で 68.6%，フルベストラント（10 nmol/L）で 82%，両薬物併用で 89.6%であった。薬物除去から 4 日間培養後の DNA 合成率はパルボシクリブまたはフルベストラント単独では溶媒対照と同程度以上であったが，併用処理した細胞では，薬物除去から 4 日間培養後も溶媒対照と比較して EdU 取り込み阻害率が有意に持続（65%以上の阻害）した（Figure 9）。

これらの一連の検討において，パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬の併用により細胞老化誘導（SA-β-gal 活性の増強）がみられ，また細胞周期停止（DNA 合成阻害）が持続したことから，ER 陽性がん細胞において，パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬の併用処理により細胞老化がもたらされると考えられる。

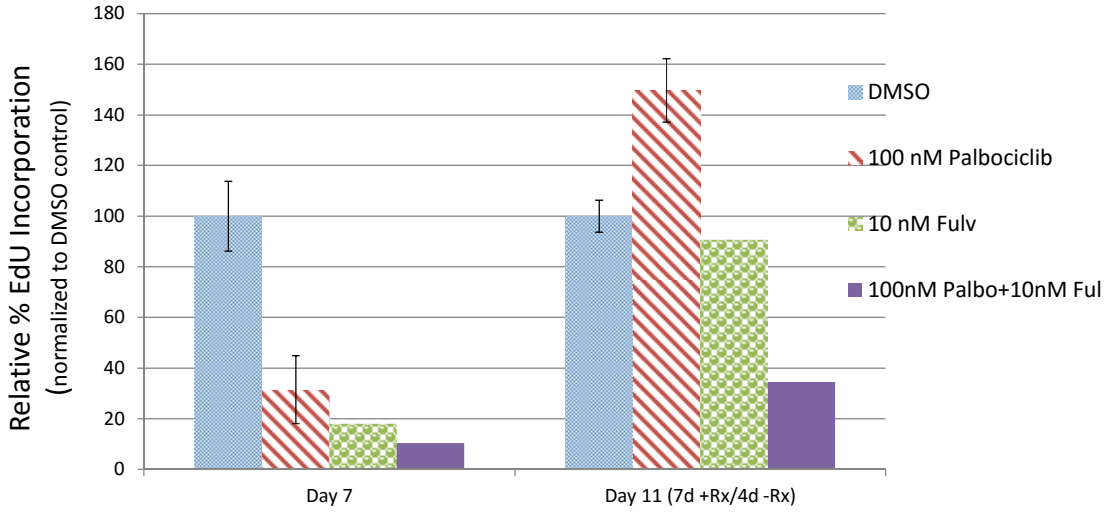
また T47D 細胞におけるシグナル調節について評価したところ，薬物除去から 3 日間培養後にほとんどのシグナル伝達関連分子は回復した。しかしながら，パルボシクリブおよび抗エストロゲン薬の併用処理では，Rb リン酸化（S780 部位）およびサイクリン D1 の発現量は，薬物除去から 3 日間培養後にも抑制されていた（Figure 10）。薬物除去後にみられたシグナル伝達阻害の持続は，細胞老化が不可逆的な現象であることによる可能性が考えられる。

Figure 8.　併用処理後に薬物除去したときの細胞老化誘導の維持（T47D 細胞）



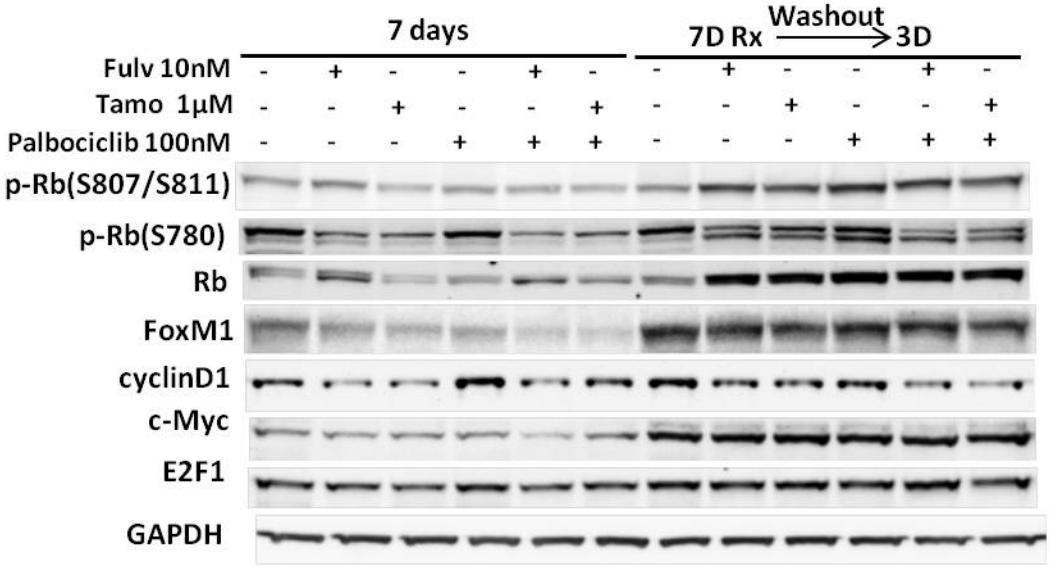
T47D 細胞をパルボシクリブ（Palbo：100 nmol/L），フルベストラント（Fulv：10 nmol/L，100 nmol/L），タモキシフェン（Tamo：100 nmol/L，1000 nmol/L）の単独または併用で 7 日間処理し，処理後，薬物除去から 3 日後および 6 日後の細胞老化誘導を SA-β-gal 活性測定により評価した（PD-332991_[redacted]_110019）。

Figure 9.　併用処理後に薬物除去したときの DNA 合成阻害の維持（T47D 細胞）



T47D 細胞をパルボシクリブ（Palbo）とフルベストラント（Fulv）の単独または併用で 7 日間処理したときの処理直後（第 7 日）および薬物除去から 4 日後（第 11 日）における DNA 合成阻害。第 7 日または第 11 日に，EdU Click-IT®試薬を用いて T47D 細胞にパルスを 2 時間与え，EdU を取り込ませた（PD-332991_[redacted]_110019）。

Figure 10.　併用処理後に薬物除去したときの細胞周期および ER シグナル伝達の標的分子発現量（T47D 細胞）



T47D 細胞をパルボシクリブ（Palbociclib：100 nmol/L），フルベストラント（Fulv：10 nmol/L），タモキシフェン（Tamo：1 μmol/L）の単独または併用で 7 日間処理し，薬物除去後 3 日間培養したときの CDK4/CDK6 および ER シグナル伝達関連分子の発現量。図に示した時間処理した後，蛋白質溶解物を採取し，SDS-PAGE により分離した。分離した蛋白質をニトロセルロース膜に転写し，標的蛋白質に対する抗体を用いてウェスタンブロットを実施した。AlphaImager を用いて化学発光を画像化し，バンドを検出した（PD-332991_[redacted]_110019）。

2.6.2. *In vivo* 併用試験

2.6.2.1. 異種移植モデルにおけるパルボシクリブおよびレトロゾールの抗腫瘍効果

報告書番号 PD-332991_[redacted]_110019

患者由来エストロゲン依存性乳癌（HBCx-34）を異種移植したマウスを用い，（1）パルボシクリブとレトロゾールを単独および併用投与したときの抗腫瘍効果の評価，（2）これらの薬物が細胞周期および ER シグナル伝達に及ぼす PD 調節作用の *in vivo* 評価，（3）これらの薬物を併用したときの PK の解析ならびに(4)細胞老化誘導作用および細胞増殖阻害作用の評価を実施した。

HBCx-34 を異種移植したマウスにパルボシクリブを MTD より低い用量（75 mg/kg）または MTD 相当用量（125 mg/kg）を単独投与，レトロゾール（2 mg/kg）を単独投与，あるいは両薬物を併用投与し，抗腫瘍効果を評価した。いずれの投与群においても有意な体重減少は認められず，良好な忍容性がみられた。パルボシクリブは腫瘍の増殖を用量依存的に抑制し，投与 42 日における腫瘍増殖抑制率はパルボシクリブの 75 mg/kg および 125 mg/kg でそれぞれ 80%および 95%，レトロゾール（2 mg/kg）では 59%であった。パルボシクリブ（75 mg/kg）とレトロゾール（2 mg/kg）の併用投与では，パルボシクリブ単独と比べて腫瘍増殖抑制率は 17%増加し，ほぼ腫瘍増殖が停止した。パルボシクリブ（125 mg/kg）とレトロゾール（2 mg/kg）の併用投与では，パルボシクリブ単独と比べて腫瘍増殖抑制率は 11%増加し，腫瘍退縮がみられた（Table 22）。

Table 22.　HBCx-34 異種移植モデルにおけるパルボシクリブおよびレトロゾールの抗腫瘍活性（投与 42 日）

投与法	投与 0 日の腫瘍体積（mm^3）	投与 42 日の腫瘍体積（mm^3）	腫瘍増殖抑制率（%）	p 値				総動物数
				vs 対照群	vs Letro 2 mg/kg	vs Palbo 75 mg/kg	vs Palbo 125 mg/kg	
対照群（未投与）	177 ± 15	539 ± 74	N/A	N/A	P <0.001	P <0.001	P <0.001	12
Letro 2 mg/kg	186 ± 20	335 ± 31	59	P <0.001	N/A	P <0.05	P <0.001	12
Palbo 75 mg/kg	187 ± 15	259 ± 25	80	P <0.001	P <0.05	N/A	p >0.05	12
Palbo 75 mg/kg + Letro 2 mg/kg	183 ± 14	193 ± 13	97	P <0.001	P <0.001	P <0.05	p >0.05	12
Palbo 125 mg/kg	187 ± 19	206 ± 16	95	P <0.001	P <0.001	p >0.05	N/A	12
Palbo 125 mg/kg + Letro 2 mg/kg	178 ± 15	155 ± 19	106	P <0.001	P <0.001	N/A	P <0.05	12

腫瘍増殖抑制率（%）：100－（投与 42 日における投与群の平均腫瘍体積－投与 0 日における投与群の平均腫瘍体積）/（投与 42 日における対照群の平均腫瘍体積－投与 0 日における対照群の平均腫瘍体積）×100，Palbo：パルボシクリブ，Letro：レトロゾール，N/A：該当せず，腫瘍増殖抑制率 100%：腫瘍増殖停止，腫瘍増殖抑制率 100%超：腫瘍退縮
統計解析は共分散分析により実施した。
平均値±標準誤差
(PD-332991_[redacted]_110019)

HBCx-34 腫瘍を異種移植したマウスを用いて，CDK4/CDK6 シグナル伝達および ER シグナル伝達に関与する主要な標的分子を評価した。パルボシクリブ（125 mg/kg）およびレトロゾール（2 mg/kg）を単独または併用で最長 20 日間反復投与し，投与 0，6，13 または 20 日の投与後 6 時間に腫瘍および血漿サンプルを採取した。

13 日間の反復投与後，Rb S807/S811 部位のリン酸化は，レトロゾール（2 mg/kg）単独投与群で 19%，パルボシクリブ（125 mg/kg）単独投与群で 66%，併用投与群で 81%阻害された。S780 部位のリン酸化も同様に阻害された。下流の PD 指標を解析したところ，単独投与と比べ，併用投与では E2F1 発現阻害率が有意に上昇した（パルボシクリブ単独投与群：59%，レトロゾール単独投与群：15%，併用投与群：81%）（Table 23）。CDK4/CDK6 の基質である FoxM1 の投与 13 日における発現阻害率はレトロゾール単独投与群で 38%，パルボシクリブ単独投与群で 56%，併用投与群で 65%であった。投与 20 日においても FoxM1 の発現量は同様に阻害された（Table 23）。ER シグナルの転写標的である c-Myc の投与 13 日における発現量の阻害阻害率はわずかであり，レトロゾール単独投与群で 10% ，パルボシクリブ単独投与群で 10%，併用投与群で 18%であった。しかしながら，投与 20 日では併用投与群で顕著な c-Myc 発現阻害率の上昇（56%）が認められた（Table 23）。

これらの PD 指標の発現量の変化は，*in vitro* でパルボシクリブとレトロゾールを併用した ER 陽性 MCF7-CYP19 細胞における結果と同様であった（Figure 5）。総じて，パルボシクリブとレトロゾールの併用投与では，それぞれの単独投与と比べて Rb リン酸化を強力に阻害し，FoxM1 および c-Myc の発現を抑制した。これらの一連の結果は，併用投与による抗腫瘍活性の増強と一致していた。

Table 23. HBCx-34細胞における細胞周期およびERシグナル伝達の標的分子発現量

標的分子	投与物質	イムノブロットバンドの定量［対照群との比較（%）］[a] 投与 6 日	投与 13 日	投与 20 日
Rb リン酸化（S807/S811 部位）	対照群（非投与）	100 ± 6	100 ± 2	100 ± 9
	Letro 2 mg/kg	82 ± 20	81 ± 7	66 ± 10
	Palbo 125 mg/kg	23 ± 5	34 ± 2	26 ± 5
	Palbo 125 + Letro 2	17 ± 3	19 ± 2	21 ± 3
Rb リン酸化（S780 部位）	対照群（非投与）	100 ± 22	100 ± 1	100 ± 39
	Letro 2 mg/kg	52 ± 15	25 ± 9	30 ± 22
	Palbo 125 mg/kg	1 ± 0.2	0.9 ± 0.8	2.9 ± 1.2
	Palbo 125 + Letro 2	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.5 ± 0.5
E2F1	対照群（非投与）	100 ± 12	100 ± 2	100 ± 8
	Letro 2 mg/kg	76 ± 20	85 ± 20	46 ± 21
	Palbo 125 mg/kg	34 ± 5	41 ± 4	29 ± 8
	Palbo 125 + Letro 2	29 ± 10	19 ± 2	26 ± 6
FoxM1	対照群（非投与）	100 ± 15	100 ± 8	100 ± 18
	Letro 2 mg/kg	75 ± 8	62 ± 19	81 ± 28
	Palbo 125 mg/kg	50 ± 2	44 ± 4	41 ± 4
	Palbo 125 + Letro 2	48 ± 7	35 ± 7	30 ± 2
c-Myc	対照群（非投与）	100 ± 32	100 ± 16	100 ± 28
	Letro 2 mg/kg	81 ± 7	90 ± 10	90 ± 49
	Palbo 125 mg/kg	91 ± 21	90 ± 4	82 ± 18
	Palbo 125 + Letro 2	79 ± 5	82 ± 34	44 ± 13

HBCx-34 腫瘍を異種移植したマウスにパルボシクリブ（Palbo : 125 mg/kg）およびレトロゾール（Letro : 2 mg/kg）を単独または併用で 6, 13 および 20 日間反復投与したときの細胞周期および ER シグナル伝達の標的分子発現量。最終投与から 6 時間後に各群（3～4 例）のマウスから腫瘍サンプルを採取した。腫瘍から採取した蛋白質溶解物を SDS-PAGE により分離し，ニトロセルロース膜に転写し，各標的分子に対する抗体を用いてウェスタンブロットを実施した。AlphaImager を用いて化学発光を画像化し，バンドを検出した。
a. 各標的分子の発現量は，試料に含まれる細胞数の違いを GAPDH で補正後，溶媒 DMSO で処理したバンドと比較した。
(PD-332991_[redacted]_110019)

2.6.2.2. 異種移植モデルにおけるパルボシクリブおよびレトロゾールの細胞増殖阻害作用ならびにアポトーシス誘導作用

報告書番号 PD-332991_[redacted]_110019

HBCx-34 異種移植マウス試験で腫瘍を採取し，Ki67（細胞増殖マーカー）の免疫染色によりパルボシクリブとレトロゾールの細胞増殖阻害作用を検討した。投与後 6 時間（第 0 日）ならびに投与 6 日および投与 13 日における腫瘍の Ki67 レベルは，Table 24 の脚注に定義した分類に従いスコア化した。レトロゾール 2 mg/kg 単独投与群において，有意な細胞増殖阻害はみられなかった。

一方，パルボシクリブ 75 mg/kg および 125 mg/kg 単独投与群では，投与 6 日および 13 日に用量依存的な細胞増殖阻害が認められた。さらに，パルボシクリブ 75 mg/kg +レトロゾール併用投与群では，いずれの単独投与群と比較しても細胞増殖阻害作用は顕著に増強した。一方，パルボシクリブ 125 mg/kg +レトロゾール併用投与群では，パルボシクリブ単独投与群と比較すると細胞増殖阻害作用の増強はわずかであった（Table 24）。

当該試験では切断型カスパーゼ 3（アポトーシスマーカー）の免疫染色により，アポトーシスの誘導についても評価した。切断型カスパーゼ 3 レベルは，Table 24 の脚注に定義した分類に従いスコア化した。併用投与群では，切断型カスパーゼ 3 の染色強度は各単独投与群と比べてわずかな増強しかみられなかったことから，パルボシクリブとレトロゾールの併用でみられた抗腫瘍効果は，いずれかの薬物のアポトーシス誘導に起因するのではなく，これらの併用により細胞増殖阻害作用が増強されることによるものと考えられた。

Table 24.　*In vivo*におけるパルボシクリブとレトロゾールの細胞増殖阻害作用およびアポトーシス誘導作用

	Ki-67 スコア [a]			切断型カスパーゼ 3 スコア [b]		
投与物質	第 0 日	第 6 日	第 13 日	第 0 日	第 6 日	第 13 日
対照群（非投与）	4.00	4.00	4.00	1.00	1.00	1.50
Letro 2 mg/kg	3.67	3.33	3.33	1.00	1.00	1.00
Palbo 75 mg/kg	4.00	3.00	3.00	1.00	1.33	2.00
Palbo 125 mg/kg	3.67	1.33	1.33	1.33	1.67	2.00
Palbo 75 + Letro 2	3.67	1.33	1.00	1.00	1.67	1.67
Palbo 125 + Letro 2	3.67	1.00	1.00	1.33	2.33	2.00

HBCx-34 腫瘍を異種移植したマウスにパルボシクリブ（Palbo：75 mg/kg または 125 mg/kg）およびレトロゾール（Letro：2 mg/kg）を単独または併用で反復経口投与したときの細胞増殖阻害作用およびアポトーシス誘導作用の *in vivo* 評価。最終投与（投与 0，6 および 13 日）から 6 時間後に 3 匹/群から腫瘍サンプルを採取した。腫瘍切片を Ki-67（細胞増殖マーカー）および切断型カスパーゼ 3（アポトーシスマーカー）について免疫染色し，病理学者がスコア化した。
a. Ki-67 スコア：0 = 陽性細胞率 1%未満，1 = 同 1%～3%，2 = 同 4%～15%，3 = 16%～30%，4 = 同 30%超
b. 切断型カスパーゼ 3 スコア：0 = 陽性細胞が存在しないかほとんど存在しない，1 = まれに散在性に存在する，2 = 軽度から中等度に散在性に存在する，3 = 中等度から高度に散在性に存在する，4 = 陽性細胞率 5%超
(PD-332991_[redacted]_110019)

2.6.2.3. 異種移植モデルにおけるパルボシクリブとレトロゾールの細胞老化誘導作用

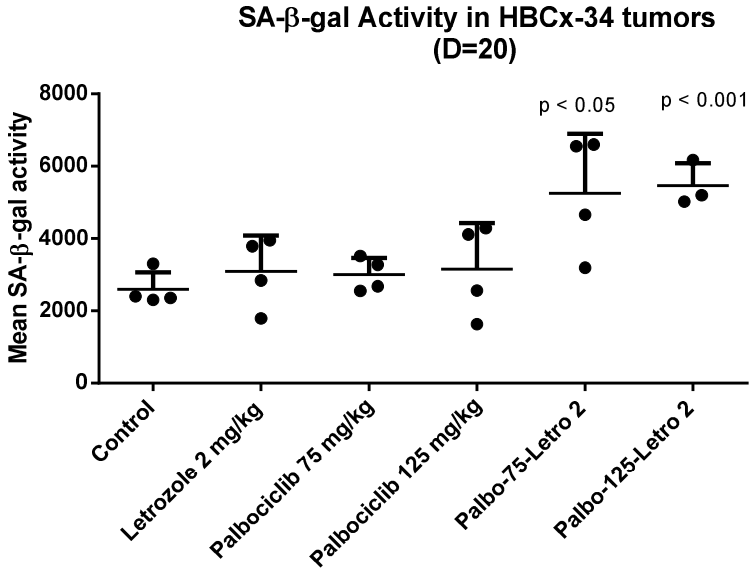
報告書番号 PD-332991_[redacted]_110019

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細胞老化誘導作用が増強されたことから，HBCx-34 異種移植マウスから採取した腫瘍サンプルの SA-β-gal 活性を蛍光分析により測定し，*in vivo* における細胞老化について評価した。

20 日間の反復投与後，レトロゾール（2 mg/kg）単独投与で SA-β-gal 活性を示す蛍光強度は 3089，パルボシクリブ（75 mg/kg および 125 mg/kg）単独投与ではそれぞれ 3002 および 3147 で，いずれの単独投与群の蛍光強度も溶媒対照群の腫瘍（2588）と比較して有意差はみられなかった。一方，レトロゾールとパルボシクリブ（75 mg/kg）併用投与およびレトロゾールとパルボシクリブ（125 mg/kg）併用投与における蛍光強度はそれぞれ 5249 および 5462 で，いずれの単独投与群および溶媒対照群と比較しても有意に上昇していた（Figure 11）。

このように，ER 陽性患者由来乳癌（HBCx-34）異種移植モデルにおいて，パルボシクリブとレトロゾールの併用は細胞老化を有意に促進し，これは前述の抗腫瘍効果および細胞増殖阻害の結果と一致していた。

Figure 11. HBCx-34腫瘍異種移植モデルにおけるパルボシクリブとレトロゾールの*in vivo*細胞老化誘導作用（投与20日）



HBCx-34腫瘍異種移植マウスにパルボシクリブ（75 mg/kgまたは125 mg/kg）およびレトロゾール（2 mg/kg）を単独または併用で20日反復日投与し，腫瘍のSA-β-galの活性を測定し*in vivo*における細胞老化誘導作用を評価した。併用投与群の腫瘍では，単独投与群および溶媒対照群と比較してSA-β-gal活性は有意に上昇した（両側t検定）。最終投与から6時間後に各群3～4匹より腫瘍サンプルを採取した。細胞老化の指標としてSA-β-gal活性を蛍光検出し，蛍光強度を記録した（PD-332991_[redacted]_110019）。

2.6.2.4. 異種移植マウスにおけるパルボシクリブとレトロゾールを併用投与したときの血漿中薬物濃度

報告書番号 PD-332991_[redacted]_110019

HBCx-34 異種移植マウスを用いた PD 試験において，最終投与（投与 0，6，13 および 20 日）から 6 時間後におけるパルボシクリブおよびレトロゾールの血漿中濃度を評価した。

血漿中薬物濃度を Table 25 および Table 26 に示す。パルボシクリブ濃度は投与 6 日以降に定常状態に到達すると考えられ，パルボシクリブ 75 mg/kg および 125 mg/kg のいずれの用量で投与したときも，定常状態における血漿中濃度はいずれの測定時点でも同程度であった（Table 25）。パルボシクリブとレトロゾールの併用投与時における薬物濃度は，それぞれを単独投与したときの濃度と同程度であった。これらの結果から，併用による薬物動態学的薬物相互作用はないことが示唆され，また併用投与による効果増強は曝露量増加に起因するものではないと考えられた（Table 25 および Table 26）。

Table 25. パルボシクリブを単独投与またはレトロゾールと併用投与したエストロゲン依存性乳癌（HBCx-34）移植マウスにおける血漿中パルボシクリブ濃度

	血漿中パルボシクリブ濃度（ng/mL）			
初回投与からの日数 [a]	Palbo 75 mg/kg	Palbo 75 mg/kg + Letro 2 mg/kg	Palbo 125 mg/kg	Palbo 125 mg/kg + Letro 2 mg/kg
0	2910 ± 420	2660 ± 807	4450 ± 883	4000 ± 686
6	3830 ± 724	4230 ± 300	4530 ± 796	4930 ± 300
13	4430 ± 289	4180 ± 510	4470 ± 485	5370 ± 971
20	3560 ± 709	3640 ± 723	4790 ± 684	5420 ± 1030

HBCx-34 腫瘍異種移植マウスにパルボシクリブ（Palbo：75 mg/kg または 125 mg/kg）を単独またはレトロゾール（Letro：2 mg/kg）と併用で反復投与したときの最終投与（投与 0，6，13 および 20 日）から 6 時間後の血漿中パルボシクリブ濃度
平均値±標準偏差
a. 薬物を反復経口投与した。最終投与から 6 時間後に各群 3～4 匹から採血し，血漿中パルボシクリブ濃度を測定した。
(PD-332991_[redacted]_110019)

Table 26. レトロゾールを単独投与またはパルボシクリブと併用投与したエストロゲン依存性乳癌（HBCx-34）移植マウスにおける血漿中レトロゾール濃度

	血漿中レトロゾール濃度（ng/mL）			
初回投与からの日数 [a]	Letro 2 mg/kg	Palbo 75 mg/kg + Letro 2 mg/kg	Letro 2 mg/kg	Palbo 125 mg/kg + Letro 2 mg/kg
0	659 ± 170	430 ± 110	659 ± 170	984 ± 527
6	694 ± 159	670 ± 280	694 ± 159	707 ± 79.5
13	559 ± 116	762 ± 307	559 ± 116	708 ± 151
20	457 ± 76.2	428 ± 79.8	457 ± 76.2	461 ± 107

HBCx-34 腫瘍異種移植マウスにレトロゾール（Letro：2 mg/kg）を単独またはパルボシクリブ（Palbo：75 mg/kg または 125 mg/kg）と併用で反復投与したときの最終投与（投与 0，6，13 および 20 日）から 6 時間後の血漿中レトロゾール濃度
平均値±標準偏差
a. 薬物を反復経口投与した。最終投与から 6 時間後に各群 3～4 匹から採血し，血漿中レトロゾール濃度を測定した。
(PD-332991_[redacted]_110019)

3. 副次的薬理試験

3.1. パルボシクリブの各種受容体，酵素，トランスポーターまたはイオンチャネルに対する作用

報告書番号 7570744，概要表 2.6.3.3

パルボシクリブのイセチオン酸塩を用いて，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。パルボシクリブ濃度 10 μmol/L で特異的結合または酵素活性が 50%以上阻害された場合には種々の濃度で測定を行い，阻害定数（K_i）または IC_{50} 値を算出した。

検討した受容体，トランスポーターおよびイオンチャネルに対するパルボシクリブの結合親和性は 290 nmol/L 以上であり，数 μmol/L 程度までの K_i を示したのはラット神経ニコチン受容体（290 nmol/L），ヒトβ_1アドレナリン受容体（730 nmol/L），ムスカリン M_1 受容体（930 nmol/L），ムスカリン M_3 受容体（1.7 μmol/L），ムスカリン M_2 受容体（2.1 μmol/L），ナトリウムチャネル（2.1 μmol/L），ヒスタミン H_3 受容体（3.2 μmol/L），μ オピオイド受容体（3.5 μmol/L），$GABA_{\beta(1b)}$ 受容体（4.8 μmol/L），アドレナリンα_{2a} 受容体（4.9 μmol/L）および δ オピオイド受容体（delta2）（8.3 μmol/L）であった。また，酵素活性阻害の検討では，ホスホジエステラーゼ 4 およびアセチルコリンエステラーゼがそれぞれ 1.0 μmol/L および 8.2 μmol/L の IC_{50} 値を示した。

最も高い結合親和性を示したラット神経ニコチン受容体における K_i（290 nmol/L）は，ヒトに臨床推奨用量（125 mg 1 日 1 回）を投与したときの定常状態における非結合型 C_{max}（27 ng/mL または 60 nmol/L）[a]の約 5 倍であった。したがって，パルボシクリブの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，上記の受容体およびイオンチャネルに対する機能的評価は実施していない。

3.2. 代謝物 PF-05089326 の各種受容体，酵素，トランスポーターまたはイオンチャネルに対する作用

報告書番号 75760087，概要表 2.6.3.3

パルボシクリブのラクタム代謝物である PF-05089326 を用いて，3.1 項と同様に 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。

検討した受容体，トランスポーターおよびイオンチャネルの中で数 μmol/L 程度の K_i を示したのは，ロリプラム結合部位（1.3 μmol/L），メラトニン MT_3（3.2 μmol/L）およびアデノシン A_3（8.5 μmol/L）であった。酵素活性阻害の検討では，ホスホジエステラーゼ（PDE4D2，PDE5，PDE6 および PDE11）に対してそれぞれ 2.2 μmol/L，2.5 μmol/L，5.4 μmol/L および 76 nmol/L の IC_{50} 値を示した。しかしながら，ヒト血漿中における PF-05089326 の存在比はパルボシクリブの

[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）

約 10%であり[a]，さらに蛋白結合率が高いことから（非結合型分率：0.0490）[b]，この代謝物が標的分子以外に活性を示す可能性は低いと考えられた。

[a] CTD 2.6.4.3.2 項

[b] CTD 2.6.4.4.3.2 項

4. 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の影響を *in vitro* または *in vivo* で評価した。実施した安全性薬理試験の概要を Table 27 に示す。これらの試験はいずれも GLP に準拠して実施した。

Table 27.　安全性薬理試験の概要

試験	報告書番号	濃度または用量	概要表
In vitro			
hERG 発現 HEK293 細胞を用いた hERG 電流に対する作用の評価	[redacted]GR243	0.3, 1, 3, 10 μmol/L[a]	2.6.3.4
摘出イヌ心臓プルキンエ線維の活動電位に対する作用の評価	PD-033299 1/ IC/001/02	0.1, 1, 10 μmol/L[b]	2.6.3.4
In vivo			
神経機能（ラット）			
ラットを用いた神経機能に対する作用の評価	745-03890	0, 30, 300 mg/kg[a]	2.6.3.4
心血管系（イヌ）			
覚醒イヌを用いた血行動態および心電図パラメータに対する作用の評価（予備試験）	745-03696	0, 10, 30 mg/kg[c]	2.6.3.4
覚醒イヌにおける血行動態および心電図パラメータに対する作用の評価（本試験）	[redacted]GR248	0, 3, 10, 30 mg/kg[b]	2.6.3.4
呼吸系（イヌ）			
イヌを用いた呼吸系機能に対する作用の評価	745-03892	0, 1, 5 mg/kg[a]	2.6.3.4

HEK293 細胞：ヒト胎児由来腎臓 293 細胞
a：PD-0332991-0054：パルボシクリブイセチオン酸塩
b：PD-0332991：パルボシクリブ遊離塩基
c：PD-0332991-0002：パルボシクリブ二塩酸塩

4.1. 心血管系

4.1.1. hERG チャネルへの作用

報告書番号 [redacted]GR243，概要表 2.6.3.4

パルボシクリブが hERG チャネルを介するカリウム電流に及ぼす影響を，hERG チャネルを発現させた HEK293 細胞（ヒト胎児由来腎臓細胞）を用いてパッチクランプ法で評価した。本試験では，パルボシクリブのイセチオン酸塩を用い，0.3，1，3 および 10 µmol/L での作用を評価した。

パルボシクリブは hERG 電流に対して濃度依存的に統計学的に有意な抑制作用を示し（抑制率：8.3%～76.7%，$p < 0.05$），IC_{50} 値は 3.2 µmol/L（1432 ng/mL）であった（Table 28）。

Table 28.　パルボシクリブ（0.3，1，3 および 10 µmol/L）の hERG チャネル阻害作用

被験物質		hERG チャネル電流抑制率（%）[a]
溶媒対照 [b]		0.4 ± 0.4
パルボシクリブ	0.3 µmol/L	8.3 ± 1.2*
	1 µmol/L	23.4 ± 1.5*
	3 µmol/L	48.1 ± 2.8*
	10 µmol/L	76.7 ± 2.7*
陽性対照（テルフェナジン）	60 nmol/L	76.5

a：平均値 ± 標準偏差（パルボシクリブおよび溶媒対照：N = 3～4，テルフェナジン：N = 2）
b：0.3%DMSO 含有 HEPES 緩衝生理的食塩液
*：$p < 0.05$：溶媒対照との比較（Dunnett の多重比較検定）
([redacted]GR243)

4.1.2. イヌプルキンエ線維における作用

報告書番号 PD-0332991/IC/001/02，概要表 2.6.3.4

ビーグル犬の心室から摘出したプルキンエ線維を用い，心筋活動電位に対するパルボシクリブの作用を評価した。本試験では，パルボシクリブを用い，0（溶媒：0.1% DMSO），0.1，1 および 10 µmol/L の濃度を 5 標本/群で漸増的に濃度を上げて検討した。1 Hz 刺激の条件下で，静止膜電位（RP），活動電位振幅（APA），最大反応速度（V_{max}）ならびに 50%および 90%再分極時活動電位持続時間（APD_{50} および APD_{90}）を評価した。なお，溶媒である DMSO はイヌプルキンエ線維の活動電位パラメータをわずかに変化させることから，すべてのデータはこの変化率で補正した。データは各標本の溶媒処理時点からの変化率（%）として表した。

パルボシクリブは RP，APA，V_{max} および APD_{50} に影響を及ぼさなかった。APD_{90} は 10 µmol/L（4475 ng/mL）でわずかながら有意に延長（8.2 %）したが，1 µmol/L（447.5 ng/mL）以下では影響は認められなかった（Table 29）。

Table 29.　プルキンエ線維の心筋活動電位に対するパルボシクリブの作用

濃度（μmol/L）	例数	RP（mV）	APA（mV）	Vmax（V/sec）	APD_{50}（msec）	APD_{90}（msec）
0[a]	10	-85.53 ± 1.17	125.27 ± 0.59	776.02 ± 37.98	209.39 ± 10.30	275.99 ± 10.29
0.1	5	1.3 ± 1.1 %[b]	0.4 ± 0.5 %	0.6 ± 1.5 %	0.2 ± 2.2 %	0.9 ± 1.2 %
1	5	1.2 ± 0.9 %	0.2 ± 0.3 %	0.6 ± 0.8 %	1.7 ± 1.5 %	2.8 ± 1.1 %
10	5	2.0 ± 1.3 %	0.0 ± 0.4 %	-0.9 ± 0.8 %	4.3 ± 2.6 %	8.2 ± 2.0 %*

平均値 ± 標準誤差
a：0.1% DMSO
b：パルボシクリブ処理群または陽性対照の値は溶媒処理時点からの変化率（%）を示す
*：p <0.05：溶媒対照との有意差（対応のない Student's t-test）
(PD-0332991/IC/001/02)

4.1.3. イヌを用いた試験

4.1.3.1. 予備試験

報告書番号 745-03696，概要表 2.6.3.4

覚醒ビーグル犬（雄 4 匹）にパルボシクリブ二塩酸塩を単回経口投与（ゼラチンカプセル使用）し，血行動態パラメータおよび心電図パラメータに対する作用を検討した[a]。テレメトリーを装着したイヌにパルボシクリブ二塩酸塩を 0（対照：ゼラチンカプセル），10 または 30 mg/kg の用量で単回投与した。3 期クロスオーバーデザインにより，7 日間の投与間隔を設け，各動物に 3 通りすべての用量を投与した。投与から約 2 時間後および 24 時間後ならびに非投与日は 1 日 1 回，一般状態観察を行った。心拍数，収縮期血圧，拡張期血圧および平均動脈圧を投与後 24 時間連続的に測定した。投与から約 3 時間から 9 時間および測定終了前の 1 時間について，15 分の心電図記録につき 1 分間の区間を画面上で評価し，速度や律動の異常の有無を確認した。QT 間隔対 RR 間隔のグラフをプロットし，グラフの比較および線形回帰分析により，QT 間隔への影響を検討した。ゼラチンカプセル対照のデータから 95%予測限界を定義し，パルボシクリブ投与時のデータのプロットと比較した。QT 間隔の変化が，（1）個別値の 10%以上が予測上限値外，（2）QT 間隔対 RR 間隔のグラフが用量依存的に推移，かつ（3）予測上限値を 10%以上外れる個別値が複数みられる，のすべてに該当した場合に，パルボシクリブに関連する変化とみなした。これとは別にテレメトリー未装着の雄 3 匹を加え，パルボシクリブ 10 mg/kg および 30 mg/kg 投与時の血漿中濃度を測定した。

パルボシクリブ 10 mg/kg および 30 mg/kg の投与から 2 時間後に嘔吐が認められ，30 mg/kg 投与の 1 例では投与から 24 時間後まで嘔吐がみられた。30 mg/kg で糞便異常（主に無便）が認められた。心拍数，血圧および心律動にパルボシクリブと関連する変化はみられなかった。QT 間隔は，10 mg/kg 投与の 4 例中 2 例および 30 mg/kg 投与の 4 例中 3 例では 95%予測区間を 10%以上

[a] 当該予備試験は，QT 間隔データを処理するコンピュータープログラムのバリデーションを実施しなかったことおよび動物生存期間中に信頼性保証部門による監査が実施されていないことを除き，GLP 規制に準拠して実施した。

外れていた。このうち 10 mg/kg 投与の 4 例中 1 例および 30 mg/kg 投与の 4 例中 2 例でみられた変化が，上述の判断基準に該当するパルボシクリブと関連する QT 間隔延長と判断された。

以上，イヌに 10 mg/kg 以上のパルボシクリブを単回投与したとき，QT 間隔延長が認められた。10 mg/kg 投与時の C_{max} は 511 ng/mL（非結合型 C_{max}：211 ng/mL）[a]であった。

4.1.3.2. 本試験

報告書番号 [redacted]GR248，概要表 2.6.3.4

覚醒ビーグル犬（雄 4 匹）にパルボシクリブを単回経口投与（ゼラチンカプセル使用）し，血行動態パラメータおよび心電図パラメータに対する作用についてさらに検討した。テレメトリーを装着したイヌにパルボシクリブを 0（溶媒対照：0.5%メチルセルロース），3，10 または 30 mg/kg の用量で，クロスオーバーデザインにより投与した。一般状態観察は毎日実施した。テレメーターからのデータを投与の約 1 時間前から投与後 24 時間まで収集し，収縮期血圧，拡張期血圧，平均血圧，心拍数，RR 間隔，PR 間隔，QRS 間隔，QT 間隔，QTc 間隔および活動度を算出した。QTc 間隔は，QT 間隔より Individual Animal Correction Factor (IACF) を用いて補正して求めた。QTc 間隔が 5 msec 以上延長した場合，臨床的に意味のある変化と判断した[13,14]。評価期間中，投与前および投与約 4 時間後に採血し，血漿中パルボシクリブ濃度を測定した。さらに評価終了後，すべての動物にパルボシクリブ 3 mg/kg および 30 mg/kg を単回経口投与し，トキシコキネティクスを評価した。

10 mg/kg および 30 mg/kg の投与後 4 時間以内に嘔吐が認められ，30 mg/kg を投与した 1 例では投与約 24 時間後まで嘔吐がみられた。10 mg/kg および 30 mg/kg の投与後 4.5～9.25 時間に，心拍数の減少（それぞれ 8 bpm および 6 bpm）およびそれに伴う RR 間隔の延長（それぞれ 73 msec および 55 msec）が認められた。10 mg/kg および 30 mg/kg の投与後 4.5～20 時間に収縮期血圧の上昇（それぞれ 4～6 mmHg および 3 mmHg）が認められた。投与後 24 時間以内に QT 間隔延長（10 mg/kg : 6～13 msec，30 mg/kg : 8～14 msec）および QTc 間隔延長（3 mg/kg : 5 msec，10 mg/kg : 5～7 msec，30 mg/kg : 6～9 msec）が認められた。QTc 間隔延長がみられた時間帯は用量 3 mg/kg では投与後 4.5～9.25 時間，10 mg/kg では投与後 4.5～24 時間，30 mg/kg では投与後 0.5～24 時間であった。投与後 4 時間における血漿中濃度と QTc 間隔延長（投与後 4.5～9.25 時間）との間に比例関係が認められ，QTc 間隔延長（5 msec の変化）がみられる閾値濃度は 162 ng/mL であった。

以上，イヌに 3 mg/kg 以上のパルボシクリブを単回投与したとき，QTc 間隔延長（5 msec 以上の変化）が認められた。3 mg/kg における血漿中濃度は 162 ng/mL（非結合型濃度：67 ng/mL）[a]であった。また，10 mg/kg［C_{max}：340 ng/mL（非結合型 C_{max}：140 ng/mL）］以上においては，QT 間隔延長，心拍数減少（RR 間隔延長を伴う）ならびに収縮期血圧のわずかな上昇も認められた。

[a] イヌの非結合型分率 0.413（2.6.4.4.3.1 項）

4.2. 神経機能

4.2.1. ラットを用いた試験

報告書番号 745-03890，概要表 2.6.3.4

Sprague Dawley ラット（雄 24 匹/群）にパルボシクリブを単回投与し，パルボシクリブが神経機能に及ぼす影響を評価した。ラットにパルボシクリブイセチオン酸塩を 0（溶媒対照：脱イオン水），30 または 300 mg/kg の用量で単回経口投与した。各群を 8 例ずつに分け，機能観察評価（一般状態観察およびオープンフィールド試験），神経機能検査および反射検査・活動性の観察を実施した。神経機能検査で用いた対照群の 8 匹にパルボシクリブを投与し，トキシコキネティクス評価のために採血した（雄 4 匹/群/時点）。機能観察評価では，投与後約 23 時間から 60 分間，約 15 分ごとに一般状態観察を行った。また，オープンフィールド試験では，投与約 24 時間後から約 5 分間，外観，探索行動，歩行および一般的な活動性について評価した。神経機能検査は推定 T_{max} に相当する投与後約 24 時間に，空中立ち直り反応，視覚性踏み直り反応，聴覚驚愕反応，握力，カタレプシー，後肢開脚，痛覚消失（尾および足指をつまんだときの反応）および協調機能（反転スクリーン試験）を評価した。反射検査・活動性の観察は投与後約 24 時間に約 10 分間暗順応させた後に実施し，角膜反射，瞳孔反射，体温ならびに 30 分間の総移動距離および総上下運動数を測定した。試験終了後，動物は剖検を行わずに安楽殺した。

オープンフィールド試験において，30 mg/kg の 2 例で探索行動の減少が認められ，また 300 mg/kg の 1 例では探索行動の減少とともに糞便減少と自発運動量の減少が認められた。探索行動および自発運動量の減少に伴い，300 mg/kg では活動性の低下傾向が認められ，総移動距離と総上下運動数は，それぞれ 19%および 18%低く（以下，対照群との比較），また総移動距離に関する馴化速度の低下傾向（約-26%）および上下運動の初期活動性の低下傾向（約-18%）も認められたが，これらはいずれも統計学的に有意な変化ではなかった。血漿中パルボシクリブ濃度の測定結果から，T_{max} は 30 mg/kg で約 4 時間，300 mg/kg で約 30 時間であった。

以上，ラットに 30 mg/kg または 300 mg/kg のパルボシクリブを投与しても神経機能への影響は認められなかったが，300 mg/kg で自発運動量の低下が認められた。300 mg/kg における C_{max} は 6340 ng/mL（非結合型 C_{max}：793 ng/mL）[a]であった。

4.3. 呼吸系

4.3.1. イヌを用いた試験

報告書番号 745-03892，概要表 2.6.3.4

麻酔ビーグル犬（雄 4 匹）にパルボシクリブを単回静脈内投与し，パルボシクリブが肺機能に及ぼす影響を評価した。投与間隔を 7 日間とする 3 期クロスオーバーデザインにより，各イヌにパルボシクリブイセチオン酸塩を 0（溶媒対照：5%デキストロース），1 mg/kg または 5 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。各投与日にプロポフォールの静脈内投与により麻酔し，肺機能測定のための装置を装着した。ベースラインデータを 20 分間測定した後，溶媒またはパルボシクリ

[a] ラットの非結合型分率 0.125（2.6.4.4.3.1 項）

ブ（1 mg/kg または 5 mg/kg）を投与容量 1 mL/kg，注入速度 10 mL/分で投与した。麻酔深度をモニタリングするため，一部の動物の心拍数または血液酸素飽和度を間欠的に記録した。投与後 60 分間，肺機能測定を行い，分時換気量，呼吸抵抗，肺コンプライアンス，最大呼気流量，最大吸気流量，呼吸数および 1 回換気量を算出した。血漿中パルボシクリブ濃度測定のため，全例から採血を行った。

5 mg/kg 投与の 1 例で嘔吐（投与後約 3 時間）が，別の 1 例で摂餌量減少および無便（投与 5～6 日後）が認められた。5 mg/kg の投与開始から 2 分以内に 4 例中 2 例で呼吸停止がみられ，血液酸素飽和度が 58%および 33%（以下，投与前との比較）低下したが，その後補助療法により回復した。5 mg/kg 投与の他の 2 例では，投与開始から 2 分以内に血液酸素飽和度は 27%～31%，心拍数は 30%～42%減少したが，血液酸素飽和度は投与開始から 5 分以内に上昇し始め，投与から 36～43 分までには投与前値と同程度まで回復した。5 mg/kg 投与では，分時換気量および呼吸数の顕著な増加（0.6～4.6 倍：以下，溶媒対照との比較）が投与後 4～8 分および 18～26 分に認められたほか，肺コンプライアンス，最大呼気流量および 1 回換気量の顕著な減少（-17%～-72%）が投与後 4～12 分に認められた。1 mg/kg 投与では，投与後 4～10 分に分時換気量および呼吸数がわずかに増加したが（それぞれ 21%～28%および 22%～78%），統計学的有意差はみられず，またこれらの変化が認められたのはいずれも同一の 1 例のみ［この動物では，1 mg/kg 投与から約 5 分後に血液酸素飽和度の低下（-20%）も認められた］であったことから，1 mg/kg で認められた肺機能変化は毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

以上，麻酔イヌに 5 mg/kg のパルボシクリブを単回静脈内投与したとき，分時換気量および呼吸数の増加ならびに肺コンプライアンス，最大呼気流量および 1 回換気量の減少など，肺機能パラメータに顕著な変化が認められた。これらの変化は呼吸抑制を示唆するものであったが，一過性で，パルボシクリブの血漿中濃度が最高値（2040 ng/mL～8020 ng/mL，非結合型：843 ng/mL～3312 ng/mL [a]）に達したときにみられた。

[a] イヌの非結合型分率 0.413（2.6.4.4.3.1 項）

5. 薬力学的薬物相互作用試験

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 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。

6. 考察及び結論

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。

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

[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）

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[15]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[15]。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。

これらの非臨床薬理試験成績は，乳癌の治療におけるパルボシクリブの有効性および安全性を裏付けるものと考えられた。

[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）

7. 図表

図表は，本文の適切な箇所および薬理試験の概要表（CTD 2.6.3 項）に記載した。

8. 参考文献

[1] Choi YJ, Anders L. Signaling through cyclin D-dependent kinases. Oncogene. 2014;33(15):1890-903.

[2] Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. Biochim Biophys Acta. 2002;1602(1):73-87.

[3] Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell. 2002;2(2):103-12.

[4] 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.

[5] Colwill K, Feng LL, Yeakley JM, et al. SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. J Biol Chem. 1996;271(40):24569-75.

[6] Zarkowska T, Mittnacht S. Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. J Biol Chem. 1997;272(19):12738-46.

[7] Rubin SM. Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code. Trends Biochem Sci. 2013;38(1):12-9.

[8] Michaud K, Solomon DA, Oermann E, et al. Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. Cancer Res. 2010;70(8):3228-38.

[9] Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, et al. Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors. Mol Cancer Ther. 2006;5(11):2676-84.

[10] Anders L, Ke N, Hydbring P, et al. A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. Cancer Cell. 2011;20(5):620-34.

[11] Wang C, Mayer JA, Mazumdar A, et al. Estrogen induces c-myc gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. Mol Endocrinol. 2011;25(9):1527-38.

[12] Wu CH, van Riggelen J, Yetil A, et al. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(32):13028-33.

[13] Wallis RM. Integrated risk assessment and predictive value to humans of non-clinical repolarization assays. Br J Pharmacol. 2010;159(1):115-21.

[14] Parkinson J, Visser SA, Jarvis P, et al. Translational pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of QTc effects in dog and human. J Pharmacol Toxicol Methods. 2013;68(3):357-66.

[15] 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.

TABLE OF CONTENTS

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS 8
2.6.3.3 SECONDARY PHARMACODYNAMICS 13
2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY 14

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PD-0332991

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics				
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Inhibition of CDK4/cyclinD1 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Inhibition of CDK4/cyclinD3 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Inhibition of CDK6/cyclinD2 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Inhibition of CDK2/cyclinA by palbociclib, IC_{50}	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Inhibition of CDK1/cyclinB by palbociclib, IC_{50}	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Inhibition of CDK5/p25 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK4/cyclinD3 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK6/cyclinD1 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	PWRD	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK6/cyclinD3 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK1/cyclinB1 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK2/cyclinA2 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK2/cyclinE1 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK3/cyclinE1 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PD-0332991

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK5/p25 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK7/cyclinH/MAT1 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK9/cyclinT1 by palbociclib, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of Cdc7/ASK by palbociclib, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Metabolites Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK4/cyclinD3 by palbociclib metabolites, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Metabolites Kinase Potency	Mobility Shift Kinase Assay to determine inhibition of CDK6/cyclinD3 by palbociclib metabolites, IC_{50}	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Selectivity	Mobility Shift Kinase selectivity screen against 274 kinases using 1 µM of palbociclib	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Lactam Metabolite Kinase Selectivity	Mobility Shift Kinase selectivity screen against 274 kinases using 1 µM of lactam metabolite: PF-05089326	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Kinase Selectivity	FRET-based Kinase Assay against 174 kinases using 1 µM of palbociclib	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Metabolites Kinase Selectivity	FRET-based Kinase Assay against 46 kinases using 1 µM of Palbociclib Metabolites	In vitro	[redacted]	PD-0332991_[redacted]_133827
Evaluation of Palbociclib Cellular Potency	Phospho-Rb S780 ELISA assay with T47D and MCF7 Cells	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib Cellular Potency	Phospho-Rb S807/S811 ELISA assay with T47D and MCF7 Cells	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PD-0332991

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Evaluation of Palbociclib Cellular Potency	Phospho-Rb S780 Western Immunoblot MDA-MB435 Cells	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Cellular Potency	Phospho-Rb S795 Western Immunoblot MDA-MB435 Cells	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Cellular Potency	Flow cytometry analysis of DNA content to assess cell cycle distribution in MDA-MB453 treated with palbociclib	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Tumor Cell Replication	Inhibition of tritiated thymidine to assess inhibition of DNA synthesis in a panel of cells: MDA-MB435, MDA-MB468 ZR751, T47D, MCF7, NCIH1299, NCIH2009, Colo205	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib on Tumor Cell Proliferation	Inhibition of cell proliferation in MDA-MB435 and Colo205	In vitro	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen combination towards Cellular Functional Potency	Cell Viability Assay: palbociclib and fulvestrant combination with T47D and MCF7 Cells	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen combination towards Cellular Functional Potency	Cell proliferation assay: palbociclib and letrozole combination with MCF7-CYP19 Cells	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen combination towards Cellular Functional Potency	Cell proliferation assay: palbociclib and tamoxifen combination with T47D and MCF7 Cells	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen combination towards Cellular Functional Potency	Inhibition of DNA synthesis: palbociclib and fulvestrant with T47D and MCF7 cells: Edu ClickIt incorporation	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen combination towards Cellular Functional Potency	Inhibition of DNA synthesis: palbociclib and letrozole with MCF7-CYP19 cells: Edu Click-It incorporation	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen Effects on Intracellular Signaling	Western immunoblot analysis of inhibiton of cell cycle and ER signaling by palbociclib, fulvestrant and tamoxifen with T47D	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PD-0332991

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen Effects on Intracellular Signaling	Western immunoblot analysis of inhibiton of cell cycle and ER signaling by palbociclib, letrozole and fulvestrant with MCF7-CYP19 Cells	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen combination towards Cellular Functional Potency	Colorimetric SA-β-gal analysis of Induction of senescence by palbociclib, fulvestrant and tamoxifen in combination with CAMA1, MCF7 and T47D cells	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen combination towards Cellular Functional Potency	SA-β-gal cell staining assessment of Induction of senescence by palbociclib and fulvestrant in combination with T47D Cells	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen Effects on Intracellular Signaling	Western immunoblot analysis on duration of signaling modulation following drug removal: palbociclib, fulvestrant and tamoxifen with T47D Cells	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib and Anti-estrogen combination towards Cellular Functional Potency	Colorimetric SA-β-gal analysis of duration of senescence induction following drug removal: palbociclib, fulvestrant and tamoxifen with T47D Cells	In vitro	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib Anti-Tumor Efficacy	Colo205 Colorectal Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Anti-Tumor Efficacy	SF295 Glioblastoma Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Anti-Tumor Efficacy	MDA-MB435 Breast Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Anti-Tumor Efficacy	ZR751 Breast Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Anti-Tumor Efficacy	PC3 Prostate Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Anti-Tumor Efficacy	MBA-MB468 Breast Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Anti-Tumor Efficacy	DU145 Prostate Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PD-0332991

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Evaluation of Palbociclib modulation of phospho-Rb to efficacy correlation	Colo205 Colorectal Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib In Vivo Inhibition of proliferation	Colo205 Colorectal Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib modulation of phospho-Rb to efficacy correlation	MDA-MB435 Breast Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib In Vivo Inhibition of proliferation	MDA-MB435 Breast Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR-REG 700-00180
Evaluation of PK/PD relationship to estimate plasma level required in humans	MDA-MB435 Breast Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR 764-04338
Evaluation of PK/PD relationship to estimate plasma level required in humans	Colo205 Colorectal Cancer in SCID mice	In vivo	PWRD	RR 764-04338
Evaluation of PK/PD relationship to estimate plasma level required in humans	SF295 Glioblastoma in SCID mice	In vivo	PWRD	RR 764-04338
Evaluation of Palbociclib + Letrozole Combination Tumor Growth Inhibiton	Human Derived ER+ breast cancer (HBCx-34) in Athymic Nude Foxn1 mouse	In vivo	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib + Letrozole Pharmacokinetic and Pharmacodynamic	Human Derived ER+ breast cancer (HBCx-34) in Athymic Nude Foxn1 mouse	In vivo	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib + Letrozole In Vivo Pharmacodynamic Signal Modulation	Human Derived ER+ breast cancer (HBCx-34) in Athymic Nude Foxn1 mouse	In vivo	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib + Letrozole Combination In Vivo Senescence Induction	Human Derived ER+ breast cancer (HBCx-34) in Athymic Nude Foxn1 mouse	In vivo	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib + Letrozole Combination In Vivo Inhibition of Cell Proliferation with Ki67 staining	Human Derived ER+ breast cancer (HBCx-34) in Athymic Nude Foxn1 mouse	In vivo	PWRD	PD-332991_[redacted]_110019

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PD-0332991

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Secondary Pharmacodynamics				
[redacted] broad ligand binding	Broad panel radioligand binding for a number of receptors, ion channels, and enzyme targets	In Vitro up to 10 µM	[redacted][a]	7570744
[redacted] broad ligand binding	Broad panel radioligand binding for a number of receptors, ion channels, and enzyme targets	In Vitro up to 10 µM	[redacted][a]	75760087[b]
Safety Pharmacology				
Cardiovascular Assessment (hERG)	Mammalian cell (HEK-293)	In Vitro	[redacted]	[redacted]GR243
Cardiovascular Assessment (Purkinje Fibres)	Isolated purkinje fibres	In Vitro	PWRD	PD0332991/IC/001/02
Neurofunctional Assessment	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage	PWRD	745-03890
Pulmonary Assessment	Dog/Beagle	Intravenous	PWRD	745-03892
Cardiovascular Assessment[c]	Dog/Beagle	Oral capsule	PWRD	745-03696
Cardiovascular Assessment[c]	Dog/Beagle	Oral gavage	PWRD	[redacted]GR248

CDK = Cyclin-dependent kinase; ER+ = Estrogen receptor positive; FRET = Fluorescence resonance energy transfer; HEK = Human embryonic kidney; hERG = Human *ether- à -go-go* related gene; IC_{50} = 50% Inhibitory concentration; µM = Micromolar; PWRD = Pfizer Worldwide Research & Deve opment; SCID = Severe combined immunodeficiency.

a. [redacted], France.

b. PF-05089326, a lactam metabolite of PD-0332991.

c. Animals were dosed in a cross-over study design during cardiovascular portion of study.

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PD-0332991

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report Number
Evaluation of Palbociclib Single Agent Anti-tumor Efficacy in Colo205 Colorectal Cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 150 for 14 days	female 8 per group	Complete response in 6 of 8 animals, tumor growth delay of 48 days	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Single Agent Anti-tumor Efficacy in SF295 Glioblastoma Cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 150 for 14 days	female 6 per group	complete response in 2 of 6 animals, tumor growth delay of 30 days	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Single Agent Anti-tumor Efficacy in MDA-MB435 Breast Cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 130 for 14 days	female 8 per group	tumor stasis response, tumor growth delay of 22 days	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Single Agent Anti-tumor Efficacy in ZR-75-1 Breast Cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 150 for 14 days	female 6 per group	near tumor stasis response, tumor growth delay of 12 days	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Single Agent Anti-tumor Efficacy in PC3 Prostate Cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 130 for 14 days	male 6 per group	near tumor stasis response, tumor growth delay of 12 days	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Single Agent Anti-tumor Efficacy in MBA-MB468 Breast Cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 150 for 14 days	female 10 per group	No response	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib Single Agent Anti-tumor Efficacy in DU145 Prostate Cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 130 for 14 days	male 6 per group	No response	RR-REG 700-00180

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PD-0332991

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report Number
Evaluation of Palbociclib modulation of phospho-Rb to efficacy correlation: Colo205 colorectal cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 12.5, 37.5, 75, 150 for 2 days, and samples collected 6, 24 hrs after last dose	female 3 per group	More complete inhibition of pRb S780 for the full 24 hrs correlated to better tumor efficacy, but sustained complete inhibition of pRb S780 was not necessary in this model to yield efficacy to palbociclib	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib In Vivo Inhibition of proliferation and correlation to Rb phosphorylation: Colo205 colorectal cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 130 for 4 days and samples collected 1, 6, 12, 24, 48, 72 hrs after last dose	female 3 per group	Inhibition of pRb S780 correlated to inhibition of proliferation assessed by Ki67 staining	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib modulation of phospho-Rb to efficacy correlation: MDA-MB435 breast cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 12.5, 37.5, 75, 150 for 14 days, and samples collected 1, 3, 6, 12, 24 hrs after last dose	female 3 per group	More complete inhibition of pRb S780 for the full 24 hrs correlated to better tumor efficacy - occurred with the 150 mg/kg dose; lower doses rebounded much more quickly and may correlate to less efficacy	RR-REG 700-00180
Evaluation of Palbociclib In Vivo Inhibition of proliferation and correlation to Rb phosphorylation: MDA-MB435 breast cancer	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 130 for 7 days and samples collected 1, 6, 12, 24, 48, 72 hrs after last dose	female 3 per group	Inhibition of pRb S780 correlated to inhibition of proliferation assessed by Ki67 staining	RR-REG 700-00180

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PD-0332991

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report Number
Evaluation of PK/PD relationship to estimate plasma level required in humans :MDA-MB435 breast	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 48, 77, 130, 200 mg/kg for 7 days and samples collected 1, 6, 12, 24, 48, 72 hrs after last dose	female 3 per group	plasma concentration of 1 µg/mL resulted in 80-90% inhibition of pRB S780 and tumor growth reduction of 50%	RR 764-04338
Evaluation of PK/PD relationship to estimate plasma level required in humans: Colo205 colorectal	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 48, 77, 130, 200 mg/kg for 4 days and samples collected 1, 6, 12, 24, 48, 72 hrs after last dose	female 3 per group	plasma concentration of 1 µg/mL resulted in 80-90% inhibition of pRB S780 and tumor growth reduction of 50%	RR 764-04338
Evaluation of PK/PD relationship to estimate plasma level required in humans: SF295 glioblastoma	SCID mouse	Oral gavage	palbociclib 48, 77, 130, 200 mg/kg for 4 days and samples collected 1, 6, 12, 24, 48, 72 hrs after last dose	female 3 per group	plasma concentration of 1 µg/mL resulted in 80-90% inhibition of pRB S780 and tumor growth reduction of 50%	RR 764-04338

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PD-0332991

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report Number
Evaluation of Palbociclib + Letrozole Combination Tumor Growth Inhibition in Patient Derived Estrogen Receptor Positive Breast Cancer	Athymic Nude Foxn1 mouse	Oral gavage	palbociclib (75 and 125) letrozole (2) in single and combination treatment for 42 days	female 12 per group	palbociclib 75 mg/kg yielded 52% TGI vs 64% TGI when combined with letrozole; palbociclib 125 mg/kg yielded 62% TGI vs 71% TGI when combined with letrozole. Combination treatment TGI was statistically different from single treatment TGI.	PD-332991_[redacted]_110019
Patient Derived Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Pharmacokinetic and Pharmacodynamic	Athymic Nude Foxn1 mouse	Oral gavage	palbociclib (75 and 125) letrozole (2) in single and combination treatment for 6 hrs, 6, 13 and 20 days	female 3-4 per group	From day 6 onwards, palbociclib concentrations appeared to have achieved steady-state and the 75 mg/kg and 125 mg/kg doses of palbociclib resulted in similar plasma concentrations.	PD-332991_[redacted]_110019
Patient Derived Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Pharmacodynamic Signal Modulation	Athymic Nude Foxn1 mouse	Oral gavage	palbociclib (125) letrozole (2) in single and combination treatment for 6 hrs, 6, 13 and 20 days	female 3-4 per group	Inhibition of cell cycle and estrogen receptor signaling observed similar to in vitro results. Particularly inhibition of phospho-RB, FoxM1, c-Myc.	PD-332991_[redacted]_110019
Evaluation of Palbociclib + Letrozole Combination In Vivo Senescence Induction in Patient Derived Estrogen Receptor Positive Breast Cancer	Athymic Nude Foxn1 mouse	Oral gavage	palbociclib (75 and 125) letrozole (2) in single and combination treatment for 20 days	female 3-4 per group	Combination treatment increased induction of senescence.	PD-332991_[redacted]_110019

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PD-0332991

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report Number
Evaluation of Palbociclib + Letrozole Combination In Vivo Inhibition of Cell Proliferation with Ki67 staining in Patient Derived Estrogen Receptor Positive Breast Cancer	Athymic Nude Foxn1 mouse	Oral gavage	palbociclib (75 and 125) letrozole (2) in single and combination treatment for 6 hrs, 6 and 13 days	female 3-4 per group	Combination treatment increased inhibition of proliferation over single agent palbociclib or letrozole but only at the 75 mg/kg palbociclib. 125 mg/kg palbociclib treatment resulted in extensive inhibition of cell proliferation as a single agent and hence combination with letrozole did not achieve further inhibition.	PD-332991_[redacted]_110019

GLP = Good Laboratory Practice; hrs = Hours; µg/mL = Microgram per milliliter; mg/kg = Milligrams per kilograms; SCID = Severe combined immunodeficiency.

2.6.3.3 SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PD-0332991

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Concentration (μM)	Results	GLP Compliance	Study Number
[redacted] broad ligand binding	Broad panel radioligand binding for a number of receptors, transporters, ion channels, and enzyme targets	10	Binding affinity was observed for a number of receptors, ion channels, and enzymes at a concentration of 10 μM. These included the rat neuronal nicotinic (K_i of 290 nM), human β_1 adrenoceptor (K_i of 730 nM), α_{2a} adrenergic (K_i of 4900 nM), $GABAB_{1b}$ (K_i of 4800 nM), histamine H_3 (K_i of 3200 nM), muscarinic M_1 (K_i of 930 nM), muscarinic M_2 (K_i of 2100 nM), muscarinic M_3 (K_i of 1700 nM), Δ_2 opioid (K_i of 8300 nM), and mu opioid (K_i of 3500 nM) receptors, sodium channel (K_i of 2100 nM), phosphodiesterase 4 (IC_{50} of 1000 nM), and acetylcholinesterase (IC_{50} of 8200 nM).	No	7570744[a]
[redacted] broad ligand binding	Broad panel radioligand binding for a number of receptors, transporters, ion channels, and enzyme targets	10	PF-05089326[b] demonstrated binding affinity for a number of receptors, ion channels, and enzymes at a concentration of 10 μM. These included adenosine 3(K_i of 8500 nM), melatonin 3 (K_i of 3200 nM), rolipram binding site (K_i of 1300 nM), phosphodiesterase 4D2 (IC_{50} of 2200 nM), phosphodiesterase 5 (IC_{50} of 2500 nM), phosphodiesterase 6 (IC_{50} of 5400 nM) and phosphodiesterase 11 (IC_{50} of 76 nM).	No	75760087[b]

GLP = Good Laboratory Practice; IC_{50} = 50% Inhibitory concentration; K_i = Inhibitory constant; μM = Micromolar; nM = Nanomolar; NA = Not applicable.
a. Also known as PF-00080665.
b. PF-05089326, a lactam metabolite of PD-0332991.

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PD-0332991

In Vitro

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Concentration (μM)	Results	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
Cardiovascular hERG Patch-clamp	HEK-293 stably expressing hERG	0.3, 1, 3, and 10	8.3%, 23.4%, 48.1%, and 76.7% inhibition of hERG current at 0.3, 1, 3, and 10 μM, respectively, with an IC_{50} of 3.2 μM.	Yes	[redacted]0729.QHJ ([redacted]GR243)
Cardiovascular Action Potential	Dog purkinje fibres	0.1, 1, 10	No significant effect, at any concentration tested, on resting membrane potential, action potential amplitude, Vmax or APD_{50}; no effect on APD_{90} at 0.1 or 1 μM; statistically significant increase on APD_{90} 8.2% ± 2.0% (p = 0.032) at 10 μM.	Yes	PD0332991/IC/001/02

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PD-0332991

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Central Nervous System FOB, BT, LA	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage, 10 mL/kg, (deionized water) Lot LCD-4245	0, 30, 300	8M	**30 mg/kg:** ↓ exploratory behavior 2/8 at 24 hours postdose **300 mg/kg:** ↓ exploratory behavior 1/8; ↓ feces 1/8; ↓ activity at 24 hours postdose; 19% less mean total distance; 18% less number of vertical movements.	Yes	745-03890

Central Nervous System Study (745-03890) Toxicokinetic Parameters (Male)

Dose (mg/kg)	0	30	300
C_{max} (ng/mL) 4 hours postdose	NA[b]	1150	NA
AUC_{30}(ng•h/mL)	NA[b]	16300	NA
AUC_{24}(ng•h/mL)	NA[b]	16000	NA
C_{max} (ng/mL) 30 hours postdose	NA[b]	NA	6340
AUC_{30}(ng•h/mL)	NA[b]	NA	80500
AUC_{24}(ng•h/mL)	NA[b]	NA	50700

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY — Test Article: PD-0332991

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Pulmonary RR, TV, MV	Dog/Beagle	Intravenous, 1 mL/kg, rate of infusion 10 mL/minute (5% dextrose), Lot LCD-4245	0, 1, 5	4M	**5 mg/kg:** Stopped breathing at start of infusion followed by↓ blood oxygen 58% and 33% compared to predose 2/4; dosing discontinued and animals recovered; ↑ MV and ↑ RR (0.6 to 4.6x control); ↓ compliance, peak expiratory flow, and tidal volume, 17% to 72%. No changes in pulmonary function were noted at plasma drug concentrations ≤0.412 µg/mL.	Yes	745-03892

Cardiovascular Study (745-03892) Toxicokinetic Parameters

Dose (mg/kg)	0	1	5
Plasma Concentration (ng/mL) 0.25 hour postdose	1[c]	157	1450
Plasma Concentration (ng/mL) 1 hour postdose	1[c]	75	440

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PD-0332991

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular[d] BP, HR, Cardiac Rhythm Effects	Dog/Beagle	Oral capsule, (empty gelatin capsule) Lot R	0, 10, 30	4M 3M (TK)	**10 mg/kg:** 3/7 emesis (including TK) 2 hours postdose; ↓ feces 1/7; QT interval prolongation 2/4 **30 mg/kg:** 7/7 emesis; ↓ feces 5/7; QT interval prolongation 3/4	Yes	745-03696

Cardiovascular Study (745-03696) Toxicokinetic Parameters (Male)

Dose (mg/kg)	0	10	30
C_{max} (ng/mL)	NA[e]	511	715
AUC_{24} (ng•h/mL)	NA[e]	8800	12400
T_{max} (h)	NA[e]	5	6

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PD-0332991

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain /model	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular[d] ECG: RR-I, PR-I, QRS-I, QT-I, QTc, HR Systemic Arterial BP: SBP, DBP, MBP Activity	Dog/Beagle ambulatory telemetry	Oral gavage, 2 mL/kg (0.5% (w/v) methylcellulose) E010014102	0[f], 3, 10, and 30	4M	3 mg/kg: ↑ QTc-interval of 5 msec (4.5 to 9.25 HPD) 10 mg/kg: ↓ HR (8 bpm; 4.50 – 9.25 HPD) ↑ RR-interval (73 msec; 4.50 – 9.25 HPD) ↑ SBP (4-6 mm Hg; 4.50 – 20 HPD) ↑ QT-interval (6-13 msec; 0.50 – 24 HPD) ↑ QTc-interval (5-7 msec; 4.50 – 24 HPD) 30 mg/kg: ↓ HR (6 bpm ; 4.50 – 9.25 HPD) ↑ RR-interval (55 msec; 4.50 – 9.25 HPD) ↑ SBP (3 mm Hg; 9.50 – 20 HPD) ↑ QT-interval (8-14 msec; 0.50 – 24 HPD) ↑ QTc-interval (6-9 msec; 0.50 – 24 HPD) NOTE: Plasma concentration of 162 ng/mL was associated with a 5 msec increase in QTc-I.	Yes	[redacted]GR248

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY — Test Article: PD-0332991

Organ Systems Evaluated	Species/Strain /model	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings		GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular Study Toxicokinetic Parameters:								
Dose (mg/kg)		0[f]	3	10	30	3[g]	30[g]	
C_{max} (ng/mL)		NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	83	516	
AUC_{24} (ng•h/mL)		NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	1310	6670	
T_{max} (hours)		NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	10	11	
Plasma Concentration (ng/mL) (4 HPD)		NA[h]	122	340	365	66	267	

APD_{50} = Action potential duration at 50% of the amplitude; APD_{90} = Action potential duration at 90% of the amplitude; AUC_{24} = Area under concentration-time curve from 0 to 24 hours postdose; AUC_{30} = Area under concentration-time curve from 0 to 30 hours postdose; BP = Blood pressure; BT = Body temperature; C_{max} = Maximum observed concentration; DBP = Diastolic blood pressure; ECG = Electrocardiogram; FOB = Functional Observational Battery; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = Human embryonic kidney; hERG = Human ether-à-go-go related gene; HR = Heart rate; HPD = Hours postdose; LA = Locomotor activity; LLOQ = Lower limit of quantitation; M = Male; MBP = Mean blood pressure; Mm Hg = Millimeters of mercury; Msec = Millisecond; MV = Minute volume; NA = Not applicable; QTc = Corrected Qt interval; RR = Respiratory rate; RR-I = R-wave to R-wave interval; SBP = Systolic blood pressure; Sec = Seconds; TK = Toxicokinetic; T_{max} = Time to first occurrence of C_{max}; TV = Tidal volume; Vmax = Maximum rate of depolarization.

a. Single dose unless specified otherwise.

b. Not analyzed.

c. Detectable levels of PD-332991 were found in 2 of 4 vehicle control animals (5753 and 5754) near the analytical methods limit of quantitation (BLQ = 0.001 μg/mL). Both of these animals were dosed with PD-332991 at 5 mg/kg 7 days prior to receiving vehicle. Given the long half-life of PD-332991, it is possible that these represent residual drug levels from the prior treatment. However, all concentrations were negligible relative to those observed at the similar time point in the drug-treated groups and had no impact on the results of the study.

d. Animals were dosed in a cross-over study design during cardiovascular portion of the study.

e. Parameter not measured during the cardiovascular leg of the study.

f. Control animals were administered vehicle containing 0.5% (w/v) methylcellulose.

g. Plasma samples obtained for toxicokinetic analyses during the toxicokinetic leg of the study.

h. All samples below assay limit of quantitation (1.00 ng/mL) except for one animal. These concentrations were only slightly greater than the lower limit of quantitation and occurred primarily in animals that received the mid or high dose the week prior. These negligible exposures (ie near the LLOQ) did not impact the interpretation or integrity of the data.