

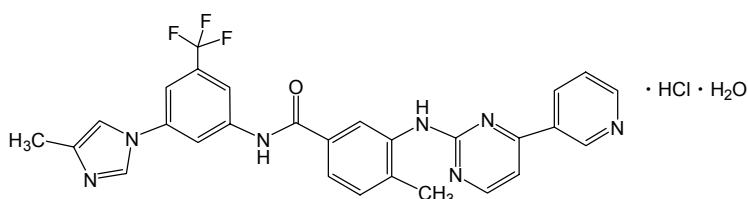
2.6.1 緒言

1 緒言

Bcr-Abl チロシンキナーゼ阻害薬のフィラデルフィア染色体陽性慢性骨髄性白血病 (Ph+CML) の治療に対する有用性は、イマチニブ (イマチニブメシル酸塩 ; Glivec®) の開発によって確立された。大多数の慢性期 CML 患者において、イマチニブによる治療は、血液学的及び細胞遺伝学的効果を持続し、無増悪生存期間が延長する。しかしながら、イマチニブに対し抵抗性又は不耐容を示す患者が存在し、初発未治療の慢性期 CML 患者を対象とする臨床試験では 5 年間で 6% の患者が移行期又は急性期へと進行している。また、移行期・急性期に進行した CML 患者では、当初イマチニブ療法が奏効することは少なくないが、再発率が高く、慢性期に治療した患者と比較して予後は著しく不良である。このことから、イマチニブよりも優れた Bcr-Abl 阻害薬の開発が期待されていた。

ニロチニブは、イマチニブの Bcr-Abl 阻害作用を改善することを目的として、イマチニブ-Abl 複合体の結晶構造解析に基づき、理論的に分子設計された第二世代の Bcr-Abl チロシンキナーゼ阻害薬である。ニロチニブは、Bcr-Abl チロシンキナーゼを強力に阻害し、野生型 Bcr-Abl を発現させた細胞株においてイマチニブよりも 20 倍以上の細胞増殖抑制作用を示した。ニロチニブは、イマチニブと同様に PDGFR (血小板由来増殖因子受容体) 及び c-Kit 受容体キナーゼを阻害したが、イマチニブと同程度の阻害作用であったことから、イマチニブと比較してニロチニブは Bcr-Abl に対し選択的に作用することが示された。また、ニロチニブは臨床で確認されているイマチニブ抵抗性 Bcr-Abl 変異体を発現させた細胞株 33 種のうち、32 種に対し自己リン酸化阻害作用及び細胞増殖阻害作用を示した。さらに、Bcr-Abl の野生型及び変異体を発現させた細胞株を用いて惹起した骨髄増殖性疾患動物モデルにおいても、ニロチニブは抗腫瘍作用を示した。以上の結果は、ニロチニブがイマチニブ抵抗性又は不耐容の Ph+CML 患者に有用である可能性を示唆している。

ニロチニブ塩酸塩水和物の化学構造



4-Methyl-N-[3-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]benzamide monohydrochloride monohydrate

ニロチニブ・カプセル製剤は、添加物として一般的な乳糖水和物、クロスポピドン、ポロオキシエチレン (160) ポリオキシプロピレン (30) グリコール、軽質無水ケイ酸及びステアリン酸

CTD 2.6.1 緒言

マグネシウムを含有する。カプセル剤皮の成分は、ゼラチン、酸化チタン、及び黄色酸化鉄（E172）である。

申請する効能又は効果並びに用法及び用量、関連する使用上の注意は以下のとおりである。

【効能又は効果】

イマチニブ抵抗性の慢性期又は移行期の慢性骨髄性白血病

＜効能又は効果に関連する使用上の注意＞

- (1) 本剤の投与は、イマチニブで効果不十分又はイマチニブに忍容性のない患者を対象とすること。
- (2) イマチニブに忍容性のない患者に本剤を投与する際には、慎重に経過観察を行い、副作用発現に注意すること（「1.慎重投与」の項参照）。

【用法及び用量】

通常、成人にはニロチニブとして 1 回 400 mg を食事の 1 時間以上前又は食後 2 時間以降に 1 日 2 回、12 時間毎を目安に経口投与する。なお、患者の状態により適宜減量する。

＜用法及び用量に関連する使用上の注意＞

- (1) 他の抗悪性腫瘍剤との併用について、有効性及び安全性は確立していない。
- (2) 食後に本剤を投与した場合、本剤の血中濃度が増加するとの報告がある。食事の影響を避けるため食事の 1 時間前から食後 2 時間までの間の服用は避けること（【薬物動態】の項参照）。
- (3) 副作用により、本剤を休薬、減量又は中止する場合には、副作用の症状、重症度等に応じて以下の基準を考慮すること。

1) 血液系の副作用と投与量調節の基準

本剤の投与中に白血病に関連しない好中球減少、血小板減少が認められた場合は、下表を参考に投与量を調節すること。

CTD 2.6.1 緒言

	休薬・減量基準	投与量調節
400 mg 1 日 2 回投与中の慢性期慢性骨髄性白血病 (CML)	好中球数 $< 1,000/\text{mm}^3$ 又は 血小板数 $< 50,000/\text{mm}^3$	1. 好中球数 $1,000/\text{mm}^3$ 以上又は血小板数 $50,000/\text{mm}^3$ 以上に回復するまで休薬する。 2. 2 週間以内に回復した場合は、400 mg 1 日 2 回の用量で再開する。 3. 2 週間以内に回復しなかった場合は、患者の状態により、400 mg 1 日 1 回に減量する。
400 mg 1 日 2 回投与中の移行期 CML	好中球数 $< 500/\text{mm}^3$ 又は 血小板数 $< 10,000/\text{mm}^3$	1. 好中球数 $1,000/\text{mm}^3$ 以上又は血小板数 $20,000/\text{mm}^3$ 以上に回復するまで休薬する。 2. 2 週間以内に回復した場合は、400 mg 1 日 2 回の用量で再開する。 3. 2 週間以内に回復しなかった場合は、患者の状態により、400 mg 1 日 1 回に減量する。

2) 非血液系の副作用と投与量調節の基準

本剤の投与中に肝機能検査値（ビリルビン，AST（GOT），ALT（GPT））又は膵機能検査値（リパーゼ）の上昇，QT 間隔延長及びその他の非血液系の副作用が認められた場合は，下表を参考に投与量を調節すること。

	休薬・減量基準	投与量調節
肝機能検査値（ビリルビン，AST（GOT），ALT（GPT））	ビリルビン値 $>$ 施設正常値上限の 3 倍 又は AST 値，ALT 値 $>$ 施設正常値上限の 5 倍	1. ビリルビン値が施設正常値上限の 1.5 倍未満に，AST，ALT 値が 2.5 倍未満に低下するまで本剤を休薬する。 2. 400 mg 1 日 1 回に減量して再開する。
膵機能検査値（リパーゼ）	リパーゼ値 $>$ 施設正常値上限の 2 倍	1. リパーゼ値が施設正常値上限の 1.5 倍未満に低下するまで本剤を休薬する。 2. 400 mg 1 日 1 回に減量して再開する。
QT 間隔延長	480msec 以上の延長	1. 本剤を休薬する。 2. 2 週間以内に，450msec 未満かつベースライン値からの延長が 20msec 以内に回復した場合は，同一用量にて再開する。 2 週間の休薬以降も，450msec 以上 480msec 未満の場合は，400 mg 1 日 1 回に減量して再開する。 3. 400 mg 1 日 1 回に減量して再開した後に，再度，480msec 以上の延長が認められた場合は，本剤の投与を中止する。
グレード 3 以上のその他の非血液毒性が発現した場合は，グレード 1 以下に回復するまで，本剤を休薬すること。投与を再開する場合には，400 mg 1 日 1 回に減量するなど注意すること。（グレードは NCI-CTC に準じる。）		

2.6.2 薬理試験の概要文

目 次

目 次	2
表一覧	3
図一覧	3
略号一覧	4
1 薬理試験の概要文	5
1.1 はじめに	5
2 効力を裏付ける試験	7
2.1 Bcr-Abl 自己リン酸化に対するニロチニブの作用 (<i>in vitro</i>)	7
2.2 Bcr-Abl 依存性細胞増殖に対するニロチニブの作用 (<i>in vitro</i>)	9
2.3 Bcr-Abl 依存性の骨髄増殖性疾患モデルに対するニロチニブの作用	9
2.4 薬理試験実施のためのニロチニブに対する忍容性の検討	11
2.5 作用機序に基づいた評価モデル	11
2.6 評価に用いた病態動物モデル	11
2.7 その他の薬理試験	11
2.7.1 薬物動態と薬力学的作用の関係	11
2.7.2 他の薬物との併用効果	12
2.7.3 サロゲートマーカー	12
2.8 作用機序	12
3 副次的薬理試験	12
3.1 各種チロシンキナーゼ及びセリン／スレオニンキナーゼに対するリン 酸基転移阻害作用（非細胞系試験）	12
3.2 各種キナーゼに対する自己リン酸化又は細胞増殖阻害作用（細胞を用 いた試験）	13
3.2.1 PDGFR チロシンキナーゼの自己リン酸化及び PDGFR 依存 性細胞増殖に対するニロチニブの作用 (<i>In vitro</i>)	14
3.2.2 c-Kit チロシンキナーゼの自己リン酸化及び c-Kit 依存性細 胞増殖に対するニロチニブの作用 (<i>In vitro</i>)	14
3.3 PDGFR 依存性の骨髄増殖性疾患モデルに対するニロチニブの作用	15
4 安全性薬理試験	16
4.1 ニロチニブと代謝物 p36.5 の受容体等に対する相互作用	16
4.2 哺乳動物細胞に発現させた hERG チャネルに対するニロチニブ の作 用	16

CTD 2.6.2 薬理試験の概要文

4.3	ウサギ摘出心臓に及ぼすニロチニブの電気生理学的影響	16
4.4	ウサギ摘出心臓に及ぼすニロチニブの電気生理学的影響（2 回目の試験）	17
4.5	哺乳動物細胞に発現させた hERG チャネルに対する p36.5 の作用	17
4.6	ウサギ摘出心臓に及ぼす p36.5 の電気生理学的影響	18
4.7	無麻酔雄性ビーグル犬の心血管系に及ぼすニロチニブ経口投与の影響 ...	18
4.8	経口投与ラットを用いたニロチニブの呼吸器系及び中枢神経系安全性薬理試験	19
4.9	ヒトの皮下抵抗血管及び冠動脈に対するニロチニブの作用	19
4.10	ヒト血液の血小板及び凝固バイオマーカーに対するニロチニブの作用 ...	19
5	薬力学的薬物相互作用試験	20
6	考察及び結論	20
7	参考文献	21

表一覧

Table 2-1	Bcr-Abl（野生型及び変異体）発現細胞の Bcr-Abl 自己リン酸化及び増殖に対するニロチニブの作用	8
Table 3-1	各種プロテインキナーゼ発現細胞におけるキナーゼ自己リン酸化と細胞増殖に対するニロチニブ（遊離塩基）の作用	13

図一覧

Figure 2-1	32D/Bcr-Abl/luc の同所性腫瘍に対するニロチニブの作用	10
------------	--	----

略号一覧

略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ABL (Abl)	Abelson proto-oncogene	Abelson プロトオンコジーン (Abl は遺伝子産物)
ALL	Acute lymphoblastic leukaemia	急性リンパ球性白血病
APD	Action potential duration	活動電位持続時間
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC	Area under the concentration-time curve	濃度 - 時間曲線下面積
BCR (Bcr)	Breakpoint Cluster Region gene	Breakpoint Cluster Region 遺伝子 (Bcr は遺伝子産物)
C _{max}	maximum concentration	最高濃度
CML	Chronic myelogenous leukaemia	慢性骨髄性白血病
CML-AP	Chronic myelogenous leukaemia in accelerated phase	慢性骨髄性白血病 - 移行期
CML-BC	Chronic myelogenous leukaemia in blast crisis	慢性骨髄性白血病 - 急性期
CML-CP	Chronic myelogenous leukaemia in chronic phase	慢性骨髄性白血病 - 慢性期
CMML	Chronic myelomonocytic leukaemia	慢性骨髄単球性白血病
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
GIST	Gastrointestinal stromal tumour	消化管間質腫瘍
hERG	human ether-a-go-go-related gene	human ether-a-go-go-related 遺伝子
HES	Hypereosinophilic syndrome	好酸球増多症候群
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
HSC	Haematopoietic stem cell	造血幹細胞
IC ₅₀	Concentration that inhibits function by 50%	50%阻害濃度
NMP	N-methylpyrrolidone	N-メチルピロリドン
p185, p190, p210, p230	185-, 190-, 210 or 230- kiloDalton protein	185, 190, 210 又は 230 キロダルトンのタンパク質
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor	血小板由来増殖因子受容体
PEG200	Polyethylene glycol, average molecular weight 200	ポリエチレングリコール, 平均分子量 200
p.o.	<i>per os</i> (oral administration)	経口投与
SM	Systemic mastocytosis	全身性肥満細胞症
TRiAD	Triangulation, Reverse use dependence, Instability and Dispersion	三角形分割, 逆頻度依存性, 不安定性及びばらつき

1 薬理試験の概要文

1.1 はじめに

慢性骨髄性白血病(Chronic myelogenous leukaemia, CML)は、成人白血病の15%に認められ、国内における総患者数は約8000人と考えられている。CMLの症状は慢性期(Chronic Phase, CP; 以下 CML-CP)、移行期(Accelerated Phase, AP; 以下 CML-AP)、急性期(Blast Crisis, BC; 以下 CML-BC)を経て進行し、初期のCML-CPの特徴は、脾臓、骨髄及び末梢血における未熟骨髄細胞及び成熟顆粒球の過剰産生であり、平均罹患期間は4~6年である。治療を行わなければ、骨髄及び末梢血中に未分化芽球の出現を特徴とするCML-APに進行し、さらに骨髄及び末梢血に占める未分化芽球の占める割合が30%を超えるCML-BCへと進行する。末期にあたる急性期患者では、生存期間の中央値は18週間である(Kantarjian, et al 1988)。

CMLは、多能性骨髄造血幹細胞(haematopoietic stem cell, HSC)における染色体相互転座t(9;22)の結果として発症する。染色体相互転座によってBreakpoint cluster region 遺伝子(BCR)とAbelson 遺伝子(ABL)が分断して組み換えられ、すなわちBCRとABLのそれぞれのDNAの末端領域が置換して、フィラデルフィア染色体上にBCR-ABL 癌遺伝子が形成される(Rowley 1973) (Ren 2005)。この融合遺伝子のコードするキメラBcr-Abl タンパク質は、BCRの解裂部位によって190, 210 又は230 kDaの3種が存在し(それぞれp190, p210 又は p230)、自己制御領域を欠損することから、Abl チロシンキナーゼが恒常的に活性化される。

Bcr-Abl がHSC内のタンパク質を無秩序にリン酸化することによって、増殖因子に非依存的なHSCの増殖、分化抑制、生存促進といったCMLに特徴的な作用が誘導されると考えられている。p210 Bcr-Abl は、CML患者の95%、急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患者には、およそ33%に発現している。CMLでは、p210 Bcr-Abl が優勢であるが、多くのCML-CP及びCML-AP患者はp190 Bcr-Abl mRNAを発現している。一方、急速に進行するALLにおいては、逆にp190 Bcr-Abl が優勢であり、小児では80%及び成人の50%に検出されている。分子量のより大きい230 kDaの融合タンパク質は、急性期へ緩やかに進行する希少疾患の慢性好中球性白血病と関連している。

イマチニブ(イマチニブメシル酸塩; STI571; Glivec®)は、Bcr-Abl, c-Kit 及びPDGFRのチロシンキナーゼを標的とする経口用薬剤である(Zimmerman, et al 1977)。Bcr-Abl チロシンキナーゼ阻害剤は、国内外における発売後5年間にわたるイマチニブの臨床使用成績から、CML治療薬としての位置付けが確立された。大多数のCML-CP患者では、イマチニブの投薬により血液学的及び細胞遺伝学的効果が持続し、無増悪生存期間が延長する。しかしながら、イマチニブに対する不耐容又は抵抗性を示す患者が少数ながら存在することに加え、およそ6%の患者はCML-AP又はCML-BCへと進行する。CML-AP及びCML-BCに進行した患者では、投薬当初はイマチニブ療法が奏効することは少なくないが、再発率が高いため、慢性期に治療した患者と比較する

CTD 2.6.2 薬理試験の概要文

と予後は著しく不良である。CML-AP 患者を対象とした試験の 4 年生存率は 53% (Kantarjian, et al 2005) であり, CML-BC 患者を対象とした試験の 3 年生存率は 14% であった (Silver, et al 2004)。

イマチニブは、ほとんどの患者において血液学的又は細胞遺伝学的効果を達成しているが、現在の CML の治療目標は、Bcr-Abl 転写産物の減少又は消失を基準とする分子遺伝学的効果を得ることである。これは、イマチニブで治療した多くの慢性期 CML 患者においても認められているように (Baccarani, et al 2006), CML 患者において分子遺伝学的効果が長期寛解期間 (Cortes, et al 2005), 無増悪生存期間 (Hughes, et al 2003), 及び生存率のサロゲートマーカーになるためである。BCR-ABL の転写レベルは、基準ベースラインからの対数減少, 又は対照遺伝子に対する BCR-ABL の比として高感度かつ定量的に測定することが可能である。BCR-ABL/BCR 転写産物が基準となるベースラインから対数として 3 倍 (3-log) 以上減少した場合を分子遺伝学的メジャー寛解 (Major molecular response) と定めた場合の病態進行は、BCR-ABL 転写産物レベルを 3 ヶ月間で 1-log, 6 ヶ月間で 2-log 減少させることができなかった場合と関連していることから (Brannford, et al 2003), 分子遺伝学的効果が得られるまでの期間によって長期予後予測することが可能と考えられる。

BCR-ABL 遺伝子増幅との関連性が示唆される場合もあるが、イマチニブ投与でみられる CML の再発の多くは、Bcr-Abl キナーゼ・ドメイン内の突然変異によってイマチニブとの結合親和性が減少することにより、イマチニブ抵抗性を発現するためと考えられている (Gorre, et al 2001) (Cowan-Jacob, et al 2004) (Hochhaus and Rosée 2004)。イマチニブ抵抗性の変異は、Abl キナーゼ・ドメイン内に全体的に存在しているが、イマチニブとの結合に直接関与する残基とその近傍、又は変異によってイマチニブとの結合を妨げるような立体構造に変化する位置において高頻度に検出されている。抵抗性の程度は、数倍からイマチニブが結合不能となる T315I 変異による完全抵抗性まで様々である (Weisberg, et al 2006)。

以上のとおり、新たな治療選択肢として、イマチニブよりも効果の発現が早く、強い分子遺伝学的効果を示し、またイマチニブ抵抗性 Bcr-Abl 変異体を阻害し、イマチニブ抵抗性を克服した新規の Bcr-Abl キナーゼ阻害薬の開発が臨床的に期待されている。このような薬剤を開発することを目的として研究を行った結果、ニロチニブを発見した。

ニロチニブ, 4-Methyl-N-[3-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]benzamide monohydrochloride monohydrate [非臨床試験の概括評価 (2.4)], は鏡像体が存在しないアキラルなフェニルアミノピリミジン誘導体であり、この塩酸塩水和物を CML 患者に対する経口投与製剤として開発した。ニロチニブは、イマチニブ-Abl 複合体の結晶構造解析 (Cowan-Jacob, et al 2004) に基き、創薬のメディシナルケミストリーの手法を用いて理論的に分子設計されたことから、イマチニブと関連した構造を有する。

ニロチニブは、Bcr-Abl のチロシンキナーゼ活性に対する ATP 競合的阻害薬であり、Bcr-Abl 依存的な細胞増殖及び抗アポトーシス経路 (PI-3 キナーゼ及び STAT5 等) を抑制し、Bcr-Abl

表現型細胞に細胞死を誘導する (Weisberg, et al 2005)。また、ニロチニブは PDGFR チロシンキナーゼ (2.6.2-3.2.1) (2.6.2-3.3) 及び c-Kit 受容体チロシンキナーゼ (2.6.2-3.2.2) を阻害する。非臨床試験において、ニロチニブは遊離塩基又は塩酸塩を用いて評価された。経口投与による動物試験において、ニロチニブの経口投与における吸収性が認められ、マウスの骨髄増殖性疾患モデルにおいて耐容量で有効性を示した。

2 効力を裏付ける試験

細胞を用いた試験において、ニロチニブは Bcr-Abl チロシンキナーゼ (full length) を強力に阻害し、Bcr-Abl 依存性の細胞増殖に対して低 nM レベルの IC_{50} 値を示した (Table 2-1)。イマチニブも Bcr-Abl チロシンキナーゼ阻害薬であるが、ニロチニブと比較すると Bcr-Abl に対する阻害作用及び選択性は低かった (Manley, Cowan-Jacob, and Mestan 2005)。ニロチニブの選択性及び標的分子以外に対する阻害作用については第 3 項 (2.6.2-3) に記載した。選択性の改善に加えてニロチニブの重要な特徴は、多くのイマチニブ抵抗性 Bcr-Abl 変異体に対しても阻害作用を示すことである (Weisberg, et al 2006)。

2.1 Bcr-Abl 自己リン酸化に対するニロチニブの作用 (*in vitro*)

Bcr-Abl を介するすべてのシグナル伝達は、Bcr-Abl 分子間の交差リン酸化が起点となっている。リン酸化された活性型 Bcr-Abl が生成し、ATP が結合することによって基質となるタンパク質がリン酸化される。細胞内の Bcr-Abl 自己リン酸化は、c-Abl 特異的捕捉抗体と共に、酵素標識抗リン酸チロシン抗体及び蛍光基質を用いた capture ELISA によって定量することができる [Table 2.6.3-RD-20000907]。c-Abl は、ほとんどの細胞に発現しているにもかかわらず、そのチロシンキナーゼ活性は厳格に抑制されており、検討した細胞においても c-Abl のチロシンキナーゼ活性は低く、測定感度以下であったことから、チロシンキナーゼ活性の測定は行わず、Bcr-Abl の自己リン酸化活性のみを測定した。ニロチニブの Bcr-Abl 自己リン酸化に対する作用は、Bcr-Abl 発現細胞株のヒト白血病細胞株 K562 及び KU-812F だけでなく、p190 又は p210-Bcr-Abl をトランスフェクトし、発現させた Ba/F3 細胞及び p210-Bcr-Abl をトランスフェクトし、発現させた 32D 細胞のマウス造血細胞株を用いて評価した。さらにイマチニブ抵抗性 Bcr-Abl 変異体を発現させた多種の Ba/F3 細胞株を用い、イマチニブ抵抗性 Bcr-Abl 変異体の自己リン酸化に対するニロチニブの作用を検討した。結果は、Table 2-1 にまとめて示した。

ヒト CML 由来細胞株及び野生型 Bcr-Abl を発現させたマウス造血細胞株において、ニロチニブ (遊離塩基) は Bcr-Abl の自己リン酸化を強く阻害し、 IC_{50} 値は 20~60 nM の範囲であった [Table 2.6.3-RD-20000907]。これに対し、イマチニブの p210 Bcr-Abl を発現させた Ba/F3 細胞株に対する IC_{50} 値は 221 ± 31 nM であることが報告されている (Manley, Cowan-Jacob, and Mestan 2005)。また、ニロチニブ (遊離塩基) は、試験したイマチニブ抵抗性変異体 33 種のうち 32 種に対して阻害作用を示し、 IC_{50} 値は、20~400 nM であった。T315I 変異体では、8000 nM の濃度

CTD 2.6.2 薬理試験の概要文

までニロチニブの阻害作用は認められなかった[Table 2.6.3-RD-200702] (Weisberg, et al 2006)。

Table 2-1 Bcr-Abl (野生型及び変異体) 発現細胞の Bcr-Abl 自己リン酸化及び増殖に対するニロチニブの作用

平均 IC ₅₀ 値 (nM) ± SEM (実験回数)		
キナーゼ (細胞株)	自己リン酸化	細胞増殖
(wt-32D + IL-3)	not applicable	6134 ± 228 (3)
(wt-Ba/F3 + IL-3)	not applicable	>10,000 (71), 2600, 2100
p210 Bcr-Abl (32D)	20 ± 0.8 (96)	12 ± 3.0 (4)
p210 Bcr-Abl (K562)	43 ± 15 (3)	12 ± 2 (3)
p210 Bcr-Abl (KU-812F)	60 ± 19 (5)	8 ± 2 (6)
p210 Bcr-Abl (Ba/F3)	20 ± 1.6 (7)	24 ± 0.7 (75)
p190 Bcr-Abl (Ba/F3)	31 ± 3 (3)	n.a.
p210 E255K	170 ± 12 (6)	548 ± 72 (6)
p210 E255V	252 ± 21 (15)	791 ± 67 (19)
p210 E292K	31 ± 6 (3)	81 ± 8 (4)
p210 T315I	>8000 (57)	>10,000 (47)
p210 F317L	38 ± 4 (13)	91 ± 6.5 (17)
p210 M351T	29 ± 2.8 (13)	38 ± 3.7 (18)
p210 F486S	41 ± 3.8 (8)	75 ± 6.8 (11)
p185 (hybrid) M237I	34 (2)	35 (2)
p185 (hybrid) M244V	101 ± 16 (3)	67 ± 6.7 (4)
p185 (hybrid) L248V	83 ± 6.8 (3)	102 ± 13 (4)
p185 (hybrid) G250A	46 (2)	65 (2)
p185 (hybrid) G250E	92 ± 9.8 (5)	145 ± 32 (3)
p185 (hybrid) G250V	54 (2)	19 (2)
p185 (hybrid) Q252H	117 ± 25 (3)	67 ± 22 (4)
p185 (hybrid) Y253H	260 ± 34 (6)	700 ± 116 (5)
p185 (hybrid) E255D	51 (2)	24 (2)
p185 (hybrid) E255K	392 ± 82 (6)	308 ± 42 (5)
p185 (hybrid) E255R	235 (2)	56 (2)
p185 (hybrid) E275K	125 (2)	29 (2)
p185 (hybrid) D276G	107 (2)	77 (2)
p185 (hybrid) E281K	39 (2)	49 (2)
p185 (hybrid) K285N	188 (2)	63 (2)
p185 (hybrid) F311V	84 ± 1.6 (3)	155 ± 31 (4)
p185 (hybrid) F317C	57 (2)	19 (2)
p185 (hybrid) F317V	95 ± 28 (3)	28 ± 3.5 (4)
p185 (hybrid) D325N	69 (2)	25 (2)
p185 (hybrid) S348L	54 (2)	26 (2)
p185 (hybrid) E355A	91 (2)	38 (2)
p185 (hybrid) E355G	67 ± 15 (3)	47 ± 8.1 (4)
p185 (hybrid) F359C	201 (2)	291 (2)
p185 (hybrid) F359V	313 ± 79 (3)	161 ± 61 (4)
p185 (hybrid) A380S	125 (2)	179 (2)

平均 IC ₅₀ 値 (nM) ± SEM (実験回数)		
キナーゼ (細胞株)	自己リン酸化	細胞増殖
p185 (hybrid) L387F	172 (2)	39 (2)
p185 (hybrid) M388L	68 (2)	20 (2)

2.2 Bcr-Abl 依存性細胞増殖に対するニロチニブの作用 (*in vitro*)

Bcr-Abl 発現細胞のヒト白血病細胞株 K-562 及び KU-812F と同様に Bcr-Abl をトランスフェクトし、発現させたマウス Ba/F3 細胞株は増殖因子に非依存的に生存し、増殖する。細胞にネクローシスやアポトーシスが起これば、細胞内 ATP 濃度が急速に減少することから、ATP は細胞生存のマーカーとなる[Table 2.6.3-RD-2000907]。そこで、発光 ATP 測定キットを用いた ATP 測定等により、上述した細胞の生存及び増殖に対するニロチニブの作用を検討した。結果を Table 2-1 に示した。

ニロチニブ (遊離塩基) は、K-562, KU-812F のヒト白血病細胞株、p210 Bcr-Abl キナーゼを発現させたマウス造血細胞株の生存及び増殖を強力に阻害し、IC₅₀ 値は 8~24 nM の範囲であった。これに対し、p210 Bcr-Abl を発現させたマウス Ba/F3 細胞株に対するイマチニブの IC₅₀ 値は 678±39 nM であることが報告されている (Manley, Cowan-Jacob, and Mestan 2005)。これらの細胞株において、細胞生存及び増殖抑制作用は、Bcr-Abl チロシンキナーゼ阻害作用と良く相関していた。

また、ニロチニブ (遊離塩基) は、イマチニブ抵抗性 Bcr-Abl 変異体を発現させた多種類のマウス Ba/F3 細胞株に対して、同程度の細胞増殖阻害作用を示した。M237I, M244V, L248V, G250A, G250E, G250V, Q252H, E255D, E255R, E275K, D276G, E281K, K285N, E292K, F311V, F317L, F317C, F317V, F359V, D325N, S348L, M351T, E355A, E355G, A380S, L387F, M388L, F486S の Bcr-Abl 変異体に対する IC₅₀ 値は 1~200 nM の範囲であり、Y253H, E255K, E255V 及び F359C の Bcr-Abl 変異体に対する IC₅₀ 値は 200~800 nM の範囲であった。T315I 変異体においては、10000 nM の濃度までニロチニブの阻害作用は認められなかった[Table 2.6.3-RD-2000702] (Weisberg, et al 2006)。

この *in vitro* 薬理試験の結果から、CML 患者において有効性が認められる血液もしくは骨髄中の組織内ニロチニブ濃度は、毒性発現濃度 (32D 造血細胞株では 5000 nM 以上) に比較してかなり低いことが示唆された。

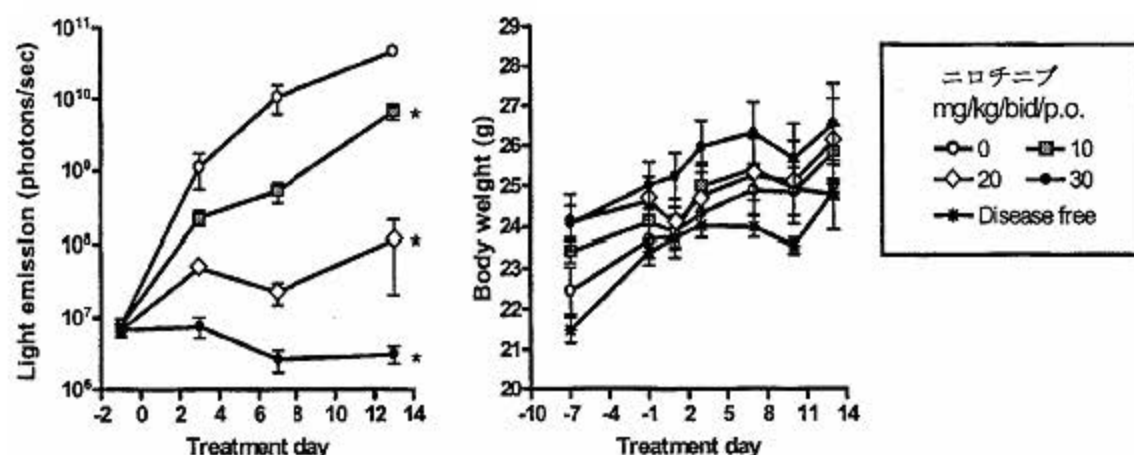
2.3 Bcr-Abl 依存性の骨髄増殖性疾患モデルに対するニロチニブの作用

ニロチニブの細胞増殖抑制作用及びマウスにおけるバイオアベイラビリティから、ニロチニブが骨髄増殖性疾患モデルに対し有効性を示す可能性が示唆された。そこで、ヒト CML の病態生理学的特徴を有するマウスの疾患モデルを用い、ニロチニブの抗腫瘍作用を評価した。

ホタルのルシフェラーゼ遺伝子を導入し、さらに p210 Bcr-Abl をトランスフェクトした Bcr-Abl 依存的に生存するマウス 32D 細胞株をマウスの静脈内に移植し、急性モデルとした。病態の

進行は、ルシフェリンの注入後、「白血病」化した細胞から放出された光量を測定することによって評価した。試験終了時に殺処分し、腫瘍量の補足データとするため脾臓重量を測定した。このモデルにおいてニロチニブを1日1回(18, 45又は68 mg/kg p.o.)又は1日2回(10, 20又は30 mg/kg p.o.)投与した結果、用量依存的に病態の進行が抑制され、45 mg/kg/qd又は30 mg/kg/bidでは完全な腫瘍増殖抑制作用が認められた[Table 2.6.3-RD-201550] (Weisberg, et al 2005)。この実験結果の一例を Figure 2-1 に示した。雌性胸腺欠損ヌードマウスに 10^5 個の 32D/Bcr-Abl/luc 細胞を静脈内に移植することによって血液腫瘍モデルを作製した。注入から6日後に個体全体からの生体発光を測定し、動物を無作為に4群に群分けした($n = 8$)。翌日(day 0)から0.05% Tween 80を含む0.5%HPMC溶液で調製したニロチニブ(塩酸塩)を1日2回投与し(Figure 2-1に記載の用量は、遊離塩基換算量)、生体発光と体重を投与開始から13日後まで規定した間隔で記録した。2週間の投与期間の間には、有効性を示した用量において、体重への有意な影響は認められなかったことから、忍容性は良好であったと考えられた。

Figure 2-1 32D/Bcr-Abl/luc の同所性腫瘍に対するニロチニブの作用



p210 Bcr-Abl の野生型又は E255V 変異体をトランスフェクトし、発現させた 32D 細胞株を移植し、骨髓増殖性疾患を発症させたマウスを用いた別の試験では、75 mg/kg のニロチニブを1日1回、経口投与することにより、マウスの生存期間が延長し、腫瘍量の指標とした脾臓重量の減少が認められた (Weisberg, et al 2005)。さらに Bcr-Abl をトランスフェクトし、発現させた骨髓細胞を移植することによって作製した慢性病態モデルマウスを用いてニロチニブの作用を評価した。ニロチニブを投与したマウスでは、病態発生率が減少し、脾臓重量は正常範囲内にあった。E255V 又は M351T 変異 BCR-ABL をトランスフェクトした骨髓細胞を移植したマウスにおいても同様な作用が認められたが、有効性はわずかに低下した (Weisberg, et al 2005)。

以上の *in vivo* 試験の結果より、マウスの CML モデルにおいて、ニロチニブの経口投与による有効性が示されたことから、CML 患者の治療におけるニロチニブの有用性が期待された。なお、マウス以外の動物種では適切な病態モデルが存在しないため、検討していない。

2.4 薬理試験実施のためのニロチニブに対する忍容性の検討

薬効薬理試験の実施前にニロチニブのマウスに対する忍容性を検討した。雄性 OF1 マウスに対し、ニロチニブ（遊離塩基）の 50, 150 又は 450 mg/kg の用量を 1 日 1 回, 2 週間, 胃ゾンデを用いて経口投与した[Table 2.6.7-R143]。450 mg/kg の用量では忍容性が認められなかったが, 50 及び 150 mg/kg の用量では比較的良好な忍容性が確認された。

2.5 作用機序に基づいた評価モデル

2.3 項 (2.6.2-2.3) に記載した。

2.6 評価に用いた病態動物モデル

2.3 項 (2.6.2-2.3) に記載した。

2.7 その他の薬理試験

2.7.1 薬物動態と薬力学的作用の関係

ニロチニブの遊離塩基又は塩酸塩をマウスに単回投与し, 血漿中ニロチニブの薬物動態を検討した[Table 2.6.3-RD-20000707]。

10% NMP/90%PEG200 (v/v) を用いて調製したニロチニブ（遊離塩基）の 20 mg/kg を単回経口投与した時, 血漿中ニロチニブ濃度は投与後 0.5 時間で C_{max} 10 $\mu\text{mol/L}$ に到達した。一方, 10% NMP/90%PEG200 又は乳酸/5%グルコース水溶液を用いて調製したニロチニブ塩酸塩を遊離塩基として 20 mg/kg の用量で単回経口投与した時, C_{max} はそれぞれ 17.9 又は 18.5 $\mu\text{mol/L}$ であり, 遊離塩基として投与したときよりも高い C_{max} を示した。また, 用量補正した AUC_{0-inf} はそれぞれ 4.2 及び 6.3 ($\text{h}\cdot\mu\text{mol/L}$)/(mg/kg) であり, 乳酸/5%グルコースを媒体として調製したときの方が 10%NMP/90%PEG200 で調製した場合よりも高い暴露量 (AUC) を示す傾向が認められた。いずれの溶液を用いて調製した場合にも, 投与 8 時間後の血漿中ニロチニブ濃度は, p210 Bcr-Abl をトランスフェクトした Ba/F3 細胞を用いて検討した細胞増殖抑制作用における IC_{50} 値 (24 nM) [Table 2.6.3-RD-20000907]の約 200~400 倍を示した。

これらの結果より, ニロチニブは, 適当な用量及び投与スケジュールを用いてマウスに経口投与することにより, 適切な血液腫瘍モデル動物において抗腫瘍作用を示すことが推察された。そこで, 使用する薬物の塩の違いに合わせた適切な溶媒を用い, ニロチニブを経口投与し, 血液腫瘍モデルに対する作用を 100 mg/kg(qd)の用量まで検討した結果, 期待された効果が確認された。

また, ニロチニブ（遊離塩基）をラットに単回投与し, 血漿中ニロチニブの薬物動態を検討した[Table 2.6.3-RD-20000709]。結果の詳細は, 薬物動態試験の概要文[2.6.4]に記載した。10%NMP/90%PEG200 (v/v) を用いて調製したニロチニブ（遊離塩基）の 50 mg/kg を単回経口投与した結果, 血漿中ニロチニブ濃度は投与 1 時間後に C_{max} 9.8 $\mu\text{mol/L}$ に到達し, 投与 24 時間後の最終採血時点には 4.8 $\mu\text{mol/L}$ まで低下した。この濃度は, p-210 kDa の Bcr-Abl をトランスフ

エクトした Ba/F3 細胞に対する細胞増殖阻害作用における IC₅₀ 値 (24 nM) よりも 200 倍以上高かった。

2.7.2 他の薬物との併用効果

検討を行っていない。

2.7.3 サロゲートマーカー

ニロチニブを用いた *in vitro* 及び *in vivo* 非臨床試験において、Bcr-Abl キナーゼ阻害作用のバイオマーカーに関する検討は行わなかった。

2.8 作用機序

ニロチニブを用いた *in vitro* 及び *in vivo* 試験の成績は、Bcr-Abl チロシンキナーゼ阻害薬として期待される作用を示すものであった。X 線結晶構造解析の結果、ニロチニブはキナーゼドメインの触媒部位内に結合することにより ATP と競合的に拮抗し、Bcr-Abl チロシンキナーゼを阻害することが示唆された[Table 2.6.3-RD-20000784]。

3 副次的薬理試験

細胞を用いた試験及び非細胞系試験において、種々のキナーゼに対するニロチニブの阻害作用を検討した。ニロチニブは、Bcr-Abl チロシンキナーゼだけでなく PDGFR キナーゼ及び c-Kit 受容体キナーゼの 3 種を阻害し、その他のプロテインキナーゼに対しては明確な阻害作用を示さなかったことから、これら 3 種のキナーゼに対し選択的に阻害することが示された。

また、ニロチニブは、HT1080 細胞株における Jak2 依存的な STAT1 の核への移行、及び Jak2 を安定的にトランスフェクトした Ba/F3 細胞株の増殖因子非依存的な細胞増殖に対して作用を示さなかった[Table 2.6.3-RD-20000095]。ニロチニブは、TEL-activated Ephrin receptor B1, Ephrin receptor B2 又は Ephrin receptor B4 のキナーゼドメインをトランスフェクトした Ba/F3 細胞に対し、低 nM の範囲の IC₅₀ 値を示し、増殖を強く抑制することが最近報告されている (Melnick, et al 2006)。しかしながら、この活性は、ephrin 受容体キナーゼドメインを用いて生化学的に測定したリン酸基転移阻害作用と必ずしも一致していないことから、この結果の生理学的意義は不明である。

3.1 各種チロシンキナーゼ及びセリン/スレオニンキナーゼに対するリン酸基転移阻害作用 (非細胞系試験)

組み換えタンパク質として得られた 38 種のチロシンキナーゼ及び 10 種のセリン/スレオニンキナーゼを用いて、[γ³³P]ATP からの ³³P の基質ペプチドへの取り込みを測定することによって、各種プロテインキナーゼのリン酸基転移に対するニロチニブの阻害作用を 10 μM の濃度まで検討した。その結果、ニロチニブ (遊離塩基) は、1 μM 以下の濃度において c-Abl を阻害した。Her-2, Hck, Lck, p38, c-Raf-1, B-Raf-V599E, c-Src, Tek/Tie-2, VEGFR-2 に対する IC₅₀ 値は

1~10 μM の範囲であり、弱い活性を示した。試験した他のキナーゼに対しては 10 μM 以下の濃度において有意な阻害作用は認められなかった[Table 2.6.3-RD-20000117]。

3.2 各種キナーゼに対する自己リン酸化又は細胞増殖阻害作用（細胞を用いた試験）

恒常的に活性化した（腫瘍原性）キナーゼに依存して生存するように遺伝子導入した Ba/F3 細胞株、又はキナーゼを発現している癌細胞株を用いて、プロテインキナーゼの自己リン酸化又は細胞生存に対するニロチニブの作用を 10 μM の濃度まで検討した。キナーゼの自己リン酸化は、特異的 capture ELISA を用いて定量した。細胞の生存及び増殖に対する阻害作用は、ニロチニブの存在下で培養後、細胞溶解液の ATP レベルを測定することによって定量した。結果を Table 3-1 に示した。ALK, Akt, FGF-R1, FGF-R3, FGF-R4, Flt3, Her-1 (EGFR), Her-2 (c-erbB-2), IGF-1R, Ins-R, JAK-2, Met, pim2, oncogenic Ha-Ras, Ret 及び VEGF-R2 に対し明らかな作用が認められなかったことから、ニロチニブの Abl/Bcr-Abl, PDGFR 及び c-Kit プロテインキナーゼ阻害薬としての選択性が確認された[Table 2.6.3-RD-20000907]。

Table 3-1 各種プロテインキナーゼ発現細胞におけるキナーゼ自己リン酸化と細胞増殖に対するニロチニブ（遊離塩基）の作用

キナーゼ（細胞種）	平均 IC ₅₀ 値 (nM) $\pm$ SEM（実験回数）	
	自己リン酸化	細胞増殖
(wt-Ba/F3 + IL-3)	not determined	>10,000 (71), 2600, 2100
c-Kit (GIST882)	210 $\pm$ 11 (42)	158 $\pm$ 7.9 (26)
c-Kit D816V (Ba/F3)	2492 (2)	> 2900 (10)
c-Kit D816Y (Ba/F3)	480 $\pm$ 100 (3)	774 $\pm$ 135 (8)
c-Kit delVV (Ba/F3)	27 $\pm$ 2.9 (3)	26 $\pm$ 1.0 (4)
c-Kit R634W (Ba/F3)	365 $\pm$ 112 (3)	293 $\pm$ 44 (7)
PDGFR α 及び β (A31)	69 $\pm$ 4.3 (47)	not determined
FIP-PDGF-R α (Ba/F3)	not determined	2.5 – 11 (3)
Tel-PDGF-R β (Ba/F3)	not determined	53 $\pm$ 4.8 (26)
Alk (Ba/F3-ALK clone1)	not determined	> 3000 (3)
Akt (Ba/F3-MyrAkt clone21)	not determined	> 3000(1)
Arg (Ba/F3 Tel-Arg)	not determined	< 20 and 6
FGF-R1 (Ba/F3-Bcr-FGFR1)	not determined	> 3000 (2)
FGF-R3 (Ba/F3-TelFGFR3)	not determined	> 3000 (3)
FGF-R4 (Ba/F3-FGFR4-TD)	not determined	> 3000 (1)
Flt3-ITD (Ba/F3-NPOS-ITD)	not determined	> 3000 (3)
Flt3 N841I (Ba/F3)	not determined	> 3000 (1)
Her-1 (A431)	> 3900 (6)	not determined
Her-2 (BT474)	> 10000 (8)	not determined
Her-2 (Ba/F3-erbB-2)	not determined	> 3000 (3)
IGF-1R (Ba/F3-Tel-HLH-IGF-1R)	not determined	2090 $\pm$ 388 (3)
IGF-1R (Ba/F3-Tel-FL-IGF-1R)	not determined	> 3000 (2)
IGF-1R (NWT-21)	> 10000 (5)	not determined

CTD 2.6.2 薬理試験の概要文

キナーゼ (細胞種)	平均 IC ₅₀ 値 (nM) ± SEM (実験回数)	
	自己リン酸化	細胞増殖
Ins-R (A14)	> 10000 (6)	not determined
JAK2 (Ba/F3-JAK2)	not determined	> 3000 (3)
Met (Ba/F3-Tpr-Met)	not determined	> 3000 (3)
Pim2 (Ba/F3-EF6-mpim2S)	not determined	> 3000 (3)
Ras (Ba/F3-H-Ras-G12V)	not determined	> 3000 (3)
Ret (Ba/F3-PTC-3)	not determined	1754, 2463, > 3000
VEGF-R2 (CHO-KDR)	3280 ± 1038 (4), >10000 (5)	not determined

3.2.1 PDGFR チロシンキナーゼの自己リン酸化及び PDGFR 依存性細胞増殖に対するニロチニブの作用 (*In vitro*)

PDGFR- α 及び PDGFR- β に特異的な抗 PDGFR 抗体と A31 細胞株を用いた cell-capture ELISA により、PDGFR チロシンキナーゼの自己リン酸化に対するニロチニブの作用を検討した。ニロチニブは、PDGFR チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害し、IC₅₀ 値は 69 ± 4.3 nM であった (Table 3-1) [Table 2.6.3-RD-200907]。

また、ニロチニブは PDGFR- α 及び PDGFR- β 依存的な細胞増殖を阻害した (FIP-PDGFR- α 発現 Ba/F3 細胞株における IC₅₀ 値の範囲は 2.5~11 nM ; Tel-PDGFR- β 発現 Ba/F3 細胞株における IC₅₀ 値は 53 ± 4.8 nM) [Table 2.6.3-RD-200907]。この結果から、ニロチニブは PDGFR キナーゼの自己リン酸化を阻害することによって、PDGFR- α 及び PDGFR- β 依存的な細胞増殖を阻害することが示唆された。

ニロチニブの PDGFR チロシンキナーゼ阻害作用は、イマチニブと同程度であった (Weisberg, et al 2005)。

3.2.2 c-Kit チロシンキナーゼの自己リン酸化及び c-Kit 依存性細胞増殖に対するニロチニブの作用 (*In vitro*)

ニロチニブの第 3 の標的は、幹細胞因子受容体として知られている c-Kit チロシンキナーゼである。カハール介在細胞の前駆細胞において、c-Kit の主に細胞外ドメイン (エクソン 9) と傍細胞膜領域 (エクソン 11) に機能獲得性の突然変異が起こり、消化管間質腫瘍[gastrointestinal stromal tumours (GIST)]が発生する (Corless, Fletcher and Heinrich 2004)。c-Kit の変異は、他の種類の細胞においても腫瘍と関連することが知られている。肥満細胞の前駆細胞において c-Kit に D816VKit 変異が誘発されると全身性肥満細胞症が発症することが報告されている (Akim and Metcalfe 2004)。

活性化 c-Kit (CD117) を恒常的に発現している消化管間質腫瘍の患者に由来する GIST882 細胞株 (Tuveson, et al 2001), 並びに D816V, D816Y, R634W 又は delVV c-Kit 変異体を発現させた組み換え Ba/F3 細胞株を用いてニロチニブ (遊離塩基) の c-Kit 自己リン酸化及び細胞増殖に対する作用を検討した [Table 2.6.3-RD-200907]。ニロチニブと細胞をインキュベーションした

後、c-Kit 特異的抗体、並びに酵素標識した抗体及び発光基質を用いた capture ELISA を行い c-Kit のリン酸化を定量することにより、c-Kit キナーゼ活性を測定した。ニロチニブの自己リン酸化阻害作用は、対照に対する c-Kit リン酸化の減少率 (%) に対する用量作用曲線から IC_{50} 値を算出することによって検討した。結果を Table 3-1 に示した[Table 2.6.3-RD-200907]。

ニロチニブは、GIST 細胞株の c-Kit 自己リン酸化を強力に阻害し、 IC_{50} 値は 210 ± 11 nM であった。イマチニブの阻害作用は同程度であり、 IC_{50} 値は 96 ± 12 nM であることが報告されている (Weisberg, et al 2005)。また、ニロチニブは D816Y, R634W 及び delVV 変異体に対しても阻害作用を示した。これらと比較して、肥満細胞の病態と関連性が示唆されている D816V 変異体の自己リン酸化に対するニロチニブの阻害作用は弱かった (IC_{50} 値は 2492 nM)。

また、ニロチニブは、GIST 細胞株の c-Kit 依存的な細胞増殖を強く抑制し、 IC_{50} 値は 158 ± 7.9 nM であった。この阻害作用は、c-Kit キナーゼの自己リン酸化阻害と関連していると考えられた。これと比較して、報告されているイマチニブの阻害作用は同程度であり、 IC_{50} 値は 120 ± 6 nM であった (Weisberg, et al 2005)。Table 3-1 に示したように、ニロチニブは c-Kit の D816Y 変異体を発現した組み換え Ba/F3 細胞株に対しても阻害作用を示した (IC_{50} 値は 774 ± 135 nM) が、肥満細胞の病態との関連性が示唆されている D816V 変異体を発現した組み換え Ba/F3 細胞株に対する阻害作用は弱かった (IC_{50} 値は 2900 nM を超える濃度であった)。

GIST の治療にイマチニブを使用することによって患者の症状は顕著に改善することが報告されている (van der Zwan and DeMatteo, 2005)。ニロチニブは、イマチニブと同程度の阻害作用を示したことから、GIST の治療における有用性が示唆された。

3.3 PDGFR 依存性の骨髄増殖性疾患モデルに対するニロチニブの作用

FIP1-like-1-PDGFR- α (FIP1-L1-PDGFR- α) チロシンキナーゼは、好酸球増多症候群、慢性好酸球白血病及び全身性肥満細胞症、また TEL-PDGFR- β チロシンキナーゼは、慢性骨髄単球性白血病 (chronic myelomonocytic leukaemia, CMML) と関連することが示唆されている (Cools, et al 2004) (Apperley, et al 2002)。これらの疾患におけるイマチニブの有効性が示されており、ニロチニブはイマチニブと同程度の PDGFR- α 及び β 阻害作用を示すことから、これらの疾患動物モデルに対するニロチニブの作用を検討した。

非致死量の放射線照射後、TEL-PDGFR- β 又は FIP1L1-PDGFR- α の遺伝子を導入した骨髄細胞を移植した Balb/C マウスを用いてニロチニブ (遊離塩基) の作用を検討した (Stover, et al 2005)。

TEL-PDGFR- β に依存的な CMML のモデルに対して、移植後 11 日目から 75 mg/kg/日のニロチニブを 1 日 1 回、経口投与した。溶媒を投与した対照群では、すべてのマウスが病態の進行のため 18 日目までに死亡した。一方、ニロチニブ投与群では、すべてのマウスが 25 日間生存した。殺処分後の骨髄、脾臓及び肝臓の病理組織学的検査において、対照群と比較して、ニロチニブ投与群の骨髄増殖疾患の進行の有意な遅延が認められた。

また、FIP1L1-PDGFR- α に依存的な HES のモデルでは、75 mg/kg/日のニロチニブ の 1 日 1 回投与により、マウスの生存期間の有意な延長が認められた。また、病理組織学的検査では、対照群と比較して、ニロチニブ投与群の骨髄の顕著な改善がみられ、脾臓構造は保持され、肝臓における随外造血はほとんど認められなかった。

4 安全性薬理試験

心血管系、中枢神経系、呼吸器系安全性薬理試験を実施し、ニロチニブの生命機能に及ぼす影響を検討した。代謝物 p36.5 (BJA783) については *in vitro* 心血管系安全性薬理試験を実施した。

4.1 ニロチニブと代謝物 p36.5 の受容体等に対する相互作用

G タンパク質共役型受容体、細胞トランスポーター、イオンチャネル及び酵素を含めた 79 種類のタンパク質に対するニロチニブ及び代謝物 p36.5 (BJA783) の相互作用を結合試験により検討した。ニロチニブは、4.0 μ M 未満の濃度において、ヒトアデノシン 3 受容体 (IC_{50} 値: 2.44 及び 4.2 μ M) 及びヒトアデノシントランスポーター (hENT1; IC_{50} 値: 3.5, 0.88 及び 5.8 μ M) に結合し、これら以外のタンパク質に対し、有意な結合を示さなかった[Table 2.6.3-RD-2050404]。また、ニロチニブの代謝物 p36.5 についても同様に検討し、10 μ M 未満の濃度において、ヒトアデノシン 3 受容体 (IC_{50} 6.8 μ M) 及びヒトアデノシントランスポーター (IC_{50} 値 0.83 及び 1.49 μ M) との結合が確認された[Table 2.6.3-RD-2050406]。

4.2 哺乳動物細胞に発現させた hERG チャネルに対するニロチニブ の作用

hERG cDNA を安定的にトランスフェクトした HEK293 細胞を用い、*in vitro* における hERG チャネル電流 (I_{Kr} , 急速活性化遅延整流 K 電流) に対するニロチニブの作用 (濃度依存性及び温度依存性) を検討した (非 GLP 試験) [Table 2.6.3-80166]。

ニロチニブ (Batch number 0351002) の hERG 電流阻害作用は、0.03, 0.1, 0.3 及び 1 μ M の濃度において、それぞれ $14.9 \pm 2.0\%$ ($n = 3$) , $43.9 \pm 0.7\%$ ($n = 3$) , $70.4 \pm 2.5\%$ ($n = 3$) 及び $89.7 \pm 1.6\%$ ($n = 3$) を示した。ニロチニブの hERG 電流に対する IC_{25} , IC_{50} 及び IC_{75} は、それぞれ 0.04, 0.13 及び 0.40 μ M であった。陽性対照の terfenadine は、予測された通りの hERG 電流阻害作用を示した。

インキュベーション温度を室温から $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に上昇させたが、ニロチニブ 0.1 μ M における阻害作用に有意に変化は認められなかった (室温: 44% に対し、 35°C : 47%阻害した)。

4.3 ウサギ摘出心臓に及ぼすニロチニブの電気生理学的影響

ウサギ摘出心臓を用い、ニロチニブの心臓に対する電気生理学的影響を検討した (非 GLP 試験)。1 試験につき 1 つの摘出心臓を用い、3 試験を実施した[Table 2.6.3-50152]。

実施した 3 試験のうちの 2 試験では 0.16, 0.48, 1.6, 4.8, 9.6 $\mu\text{g/mL}$ (それぞれ 0.3, 0.9, 3, 9 及び 18 μM), 別の 1 試験では, 0.16, 0.48, 1.6, 4.8 及び 16 $\mu\text{g/mL}$ (それぞれ 0.3, 0.9, 3, 9 及び 30 μM) の濃度のニロチニブを使用した。

ニロチニブは, 1 試験において 0.9 μM , その他の 1 試験において 18 μM から冠動脈灌流量を低下させた。また, ニロチニブは 1 試験において 3 μM , その他の 2 試験において 9 μM から APD を有意に延長した。さらに, 1 試験において 3 μM と 9 μM , その他の 1 試験では 3, 9 及び 18 μM の濃度において, 三角形分割が認められた。不安定性は, 1 試験において 18 μM から, その他の 1 試験では 30 μM の濃度において認められた。しかしながら, 18 μM から調製溶液の質が低下し始め, 実験系に薬物の析出が認められた。

以上の試験結果において, 0.3 μM (0.16 $\mu\text{g/mL}$) の濃度まで, ニロチニブの有意な電気生理学的影響は認められなかった。3 μM 以上の濃度において認められた主な影響は, 三角形分割を伴う APD 延長作用であった。不安定性は 18 μM 及び 30 μM (それぞれ 9.6 及び 16 $\mu\text{g/mL}$) で観察されたが, この影響は実験系における薬物の析出と関連している可能性が考えられた。

4.4 ウサギ摘出心臓に及ぼすニロチニブの電気生理学的影響 (2 回目の試験)

ウサギ摘出心臓を用い, ニロチニブの心臓に対する電気生理学的影響を検討した (非 GLP 試験)。1 試験につき 1 つの摘出心臓を用い, 6 試験を実施した [Table 2.6.3 ■ 18514]。

試験実施前に行ったニロチニブの溶解性の検討において, 最大溶解濃度は 0.5 μM であったことから, 0.005, 0.015, 0.05, 0.15 及び 0.5 μM の濃度を用いて検討した。しかしながら, 2 つの試験において, 0.15 及び 0.5 μM の濃度でニロチニブの析出が観察されたことから, 0.15 及び 0.5 μM で得られた結果は, 慎重に評価する必要性が考えられた。

ニロチニブは, 0.5 μM の濃度において冠動脈灌流量を有意に減少させた。測定した他のパラメーターには, 有意な電気生理学的影響は観察されなかった。試験した最高濃度 (0.5 μM) まで, ニロチニブは三角形分割, 逆頻度依存性, 不安定性, すなわち心室の再分極過程に対し, 有意な影響を及ぼさなかった。

0.5 μM のニロチニブで灌流している間に心室細動が 1 回発生した。しかしながら, 心電図波長の短縮及び三角形分割の兆候が認められなかったことから, この試験で観察された心室細動は, 同濃度の溶液で生じた薬物の析出に起因した微小栓塞によって誘導された可能性が考えられた。

以上の試験結果において, 供試した最高濃度 (0.5 μM) まで, ニロチニブは TRIaD 現象を誘発せず, 再分極過程に有意な影響を及ぼさなかった。

4.5 哺乳動物細胞に発現させた hERG チャネルに対する p36.5 の作用

hERG cDNA を安定的にトランスフェクトした HEK293 細胞を用い, *in vitro* における p36.5 (BJA783) の hERG チャネル電流に対する作用を検討した (非 GLP 試験) [Table 2.6.3 ■ 16144]。

hERG 電流に対する p36.5 の作用は、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ においてホールセルパッチクランプ法によって検討した。p36.5 (30 μM) の作用を 4 細胞を用いて検討した。溶媒として用いた 0.1% DMSO の影響を 5 細胞を用いて検討した。試験系の感度を検証するため、既知の hERG 電流阻害である E-4031 (陽性対照薬) の 100 nM における作用を 2 つの細胞を用いて検討した。薬物の作用時間は、約 10 分間とした。p36.5 の作用は、p36.5 群のテール電流 (I_{tail}) を溶媒対照群の値と比較し、残留電流 (対照に対する%) を計算することにより検討した。さらに適切な対照群の rundown で測定された平均値を用いて補正した ($n=5$)。

以上の試験結果において、30 μM の p36.5 による hERG テール電流阻害作用は認められなかった。

4.6 ウサギ摘出心臓に及ぼす p36.5 の電気生理学的影響

ウサギ摘出心臓を用い、p36.5 (BJA783) の心臓に対する電気生理学的影響を検討した (非 GLP 試験) [Table 2.6.3-18547]。

6 つの試験 (20974, 20985, 20986, 20987, 20988 及び 21009) を実施し、0.02, 0.06, 0.2, 0.6 及び 2 μM における p36.5 の作用を検討した。異なる試験として記録されたパラメータは、まとめて統計解析し、1 つの報告書に記載した。

試験した最高濃度 (2 μM , 1.12 $\mu\text{g/mL}$) においても、p36.5 の QT 間隔延長及び不整脈を示唆する兆候は認められなかった。

以上の試験結果では、2 μM の濃度まで、p36.5 のウサギ摘出心臓に対する電気生理学的影響は、いずれのパラメータにおいても認められなかった。

4.7 無麻酔雄性ビーグル犬の心血管系に及ぼすニロチニブ経口投与の影響

無麻酔雄性ビーグル犬にニロチニブを強制経口投与し、テレメトリーシステムを用いて心血管系に及ぼす影響を検討した (GLP 試験) [Table 2.6.3-80165]。

4 匹のビーグル犬を用い、0.5% (w/v) HPMC に溶解したニロチニブ (Batch number 51002) 30, 100 又は 300 mg/kg の用量を、それぞれ 8, 18, 23 日目 (1 日目は溶媒を投与) に単回強制経口投与した。

死亡の有無、一般状態、体重、心血管系への影響 (収縮期、拡張期及び平均血圧、心拍数及び心電図を、投与 24, 23, 20 及び 18 時間前、投与 30 分、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 及び 24 時間後に 5 分間測定) を検討し、さらに血液学的検査及び血液生化学的検査を行った。

ニロチニブの投与に関連した死亡及び症状の変化はみられず、心毒性の発現を示唆する心電図の変化も認められなかった。

以上の結果から、ニロチニブの 30, 100 又は 300 mg/kg の経口投与は、無麻酔雄性ビーグル犬の一般状態、血行動態及び心電図パラメーターに影響を及ぼさないことが確認された。

4.8 ニロチニブを用いたニロチニブの呼吸器系及び中枢神経系安全性薬理試験

ニロチニブの単回投与により、生命維持機能のうち呼吸器系及び中枢神経系に及ぼす急性の影響を検討した（GLP 試験）[Table 2.6.3-10047]。

0.5%HPMC に懸濁したニロチニブ（Batch number 23025）を、プレチスモグラフィーによる検討では 10 匹の雄性ラットに 0, 30 及び 300 mg/kg の用量をクロスオーバー法により経口投与し、機能観察総合評価法（FOB, functional observation battery）による観察では 0 及び 300 mg/kg の用量を一群 10 匹の雄性ラットに経口投与した。対照動物には同様に媒体のみを投与した。投与後、死亡の有無及び一般状態の観察、体重測定、安全性薬理作用の評価（FOB 及びプレチスモグラフィー）を行い比較検討した。

中枢神経系の評価として、ホームケージ内、ハンドリング及びオープンフィールドによる観察、感覚・運動機能、直腸温及び前後肢のグリップ力、及び着地時後肢開脚について測定した。ニロチニブ 300 mg/kg を投与した 1 匹の動物において死亡が認められた。死亡の原因は、誤投与に起因したものと考えられた。この動物を除き、ニロチニブ投与による一般状態の変化は観察されなかった。

呼吸器系の評価として、プレチスモグラフィーにより呼吸数、1 回換気量及び分時換気量を測定した。ニロチニブの 30 又は 300 mg/kg の単回投与による呼吸器系パラメーターに対する影響は認められなかった。

ニロチニブ投与による体重への影響は認められなかった。

以上の試験結果では、ニロチニブ 300 mg/kg の単回投与による神経系機能への影響は認められなかった。また、プレチスモグラフィーのデータにおいてニロチニブの呼吸器系への影響は認められなかった。

4.9 ヒトの皮下抵抗血管及び冠動脈に対するニロチニブの作用

心血管系安全性薬理試験として、ヒト皮下抵抗血管又は冠動脈に対するニロチニブの直接的な収縮作用を検討した（非 GLP 試験）[Table 2.6.3-80132]。

ヒト皮下抵抗血管又は冠動脈を筋運動記録槽に懸垂してニロチニブの収縮作用を検討した。ニロチニブの、1, 3 及び 10 μ M 濃度において、溶媒対照と比較して有意なヒト皮下血管に対する作用は認められなかった。冠動脈を用いた検討では、ニロチニブの 3 μ M の濃度において収縮反応（28.9%）が観察されたが、1 及び 10 μ M 濃度では有意な反応は認められなかった。

以上の結果より、ニロチニブはヒト皮下抵抗血管及び冠動脈に対し、強い収縮作用を示さないことが示唆された。

4.10 ヒト血液の血小板及び凝固バイオマーカーに対するニロチニブの作用

心血管系安全性薬理試験として、ヒトの血小板機能及び凝固線溶系バイオマーカーに及ぼすニロチニブの影響を検討した（非 GLP 試験）[Table 2.6.3-80135]。

健常者から採取した血液に、最終濃度が 1, 3 及び 10 µg/mL となるようにニロチニブを添加し、室温で 1 時間インキュベートした後、バイオマーカーを解析した。ニロチニブの治療濃度範囲（1~10 µg/mL）において、血小板凝集測定計、血小板機能分析器及び flow cytometry によって測定した血小板活性化バイオマーカーが、軽度であるが有意に増加した。

凝固線溶系バイオマーカーに対するニロチニブの影響は認められなかった。

以上の結果より、ニロチニブは血小板バイオマーカーに軽度な影響を及ぼすことが示唆された。しかしながら、作用が軽度であり、臨床との関連性は不明であることから、注意を要する作用ではないと考えられた。

5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用の検討は実施していない。

6 考察及び結論

CML の治療において Bcr-Abl 阻害薬が有効性を示すことは、イマチニブメシル酸塩が開発されたことによって立証された。ニロチニブの Bcr-Abl 発現細胞に対する *in vitro* での有効性、マウス CML モデルに対する *in vivo* での有効性、さらにニロチニブの薬物動態など一連の非臨床データは、ニロチニブが CML の治療に対して有用であることを示唆している。

ニロチニブの最も重要な作用は、イマチニブ抵抗性 Bcr-Abl 変異体に対する阻害作用である。十分な血漿中濃度に到達させることによって、ニロチニブはイマチニブ抵抗性 CML 患者に対し有効性を示すことが期待される。

細胞を用いた検討において、ニロチニブは、イマチニブよりも Bcr-Abl チロシンキナーゼに対し高い選択的阻害作用を示した。また、ニロチニブは CML 動物モデルに対し、耐容量において有効性を示した。これらの結果から、ニロチニブはイマチニブ抵抗性及びイマチニブ不耐容の患者に対し有用性を示すことが期待される。

安全性薬理試験において、中枢神経系及び呼吸器系に対するニロチニブの影響は認められなかった。心血管系試験では、イヌを用いたテレメトリー試験において、ニロチニブの心電図への影響は認められなかった。イヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験及びカニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験においても、心電図に影響は認められていない。一方、*in vitro* 試験では hERG チャネル試験において、ニロチニブは低濃度の IC₅₀ 値 (0.13 µM) を示した。また、ウサギ摘出心臓を用いた試験において、薬物の析出の影響を考慮する必要があるが、冠動脈灌流速度の低下、APD の延長作用が認められた。これらの試験結果から、ニロチニブの QT 延長作用は否定されず、臨床試験においては、心機能モニタリングが必要であることが示唆された。

7 参考文献

- [Apperley JF, Gardembas M, Melo JV, et al (2002)] Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *New Engl J Med*; 347:481-7.
- [Akin C and Metcalfe DD (2004)] Systemic mastocytosis. *Ann Rev Med*; 55:419-32.
- [Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al (2006)] Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia. Recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemianet. *Blood*, prepublished online May 18, 2006; DOI 10.1182/blood-2006-02-005686.
- [Branford S, Rudzki Z, Harper A, et al (2003)] Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia*; 17:2401-9.
- [Cools J, Stover EH, Wlodarska I, et al (2004)] The FIP1L1-PDGFR α kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia. *Curr Opin Hematology*; 11:51-7.
- [Corless CL, Fletcher JA, and Heinrich MC (2004)] Biology of Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Clin Oncol*; 22:3813-25.
- [Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, et al (2005)] Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*; 11:3425-32.
- [Cowan-Jacob SW, Guez V, Fendrich G, et al (2004)] Imatinib (STI571) Resistance in Chronic Myelogenous Leukemia: Molecular Basis of the Underlying Mechanisms and Potential Strategies for Treatment. *Mini Rev Med Chem*; 4:285-99.
- [Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al (2001)] Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*; 293:876-80.
- [Hochhaus A and La Rosée P (2004)] Imatinib therapy in chronic myelogenous leukaemia: strategies to overcome and avoid resistance. *Leukemia*; 18:1321-31.
- [Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al (2003)] Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*; 349:1423-32.
- [Kantarjian HM and Taplaz M (1988)] Definition of the accelerated phase of chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol*; 6:180-2.
- [Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, et al (2005)] Survival benefit with imatinib mesylate therapy in patients with accelerated-phase chronic myelogenous leukemia-comparison with historic experience. *Cancer*; 103:2099-108.
- [Manley PW, Cowan-Jacob SW, Mestan J (2005)] Advances in the Structural Biology, Design and Clinical Development of Bcr-Abl Kinase Inhibitors for the Treatment of Chronic Myeloid Leukaemia. *Biochim Biophys Acta*; 1754:3-13.

- [Melnick JS, Janes J, Kim S, et al (2006)] An efficient rapid system for profiling the cellular activities of molecular libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*; 103: 3153-8.
- [Ren R (2005)] Mechanisms of Bcr-Abl in the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Nat Rev Cancer*; 5:172-83.
- [Rowley JD (1973)] A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*; 243:290-3.
- [Silver RT, Talpaz M, Sawyers CL, et al (2004)] Four Years of Follow-Up of 1027 Patients with Late Chronic Phase (L-CP), Accelerated Phase (AP), or Blast Crisis (BC) Chronic Myeloid Leukemia (CML) Treated with Imatinib in Three Large Phase II Trials. *Blood*; 104:11a.
- [Stover EH, Chen J, Lee BH, et al (2005)] The small molecule tyrosine kinase inhibitor AMN107 inhibits TEL-PDGFR β and FIP1L1-PDGFR α *in vitro* and *in vivo*. *Blood*; 106:3206-13.
- [Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, et al (2001)] STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-Kit oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene*; 20:5054-8.
- [van der Zwan SM and DeMatteo RP (2005)] Gastrointestinal stromal tumor: 5 years later. *Cancer*; 104:1781-8.
- [Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W et al (2005)] AMN107: Characterization of a novel inhibitor of both wild-type and imatinib-resistant mutant Bcr-Abl *in vitro* and in murine models of leukemia. *Cancer Cell*; 7:129-41.
- [Weisberg E, Manley P, Mestan J, et al (2006)] AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of Bcr-Abl. *Br J Cancer*; advance on-line publication, 23 May 2006; doi: 10.1038/sj.bjc.6603170.
- [Zimmermann J, Buchdunger E, Mett H, et al. (1997)] Potent and selective inhibitors of the Abl kinase - Phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*; 7:187-92.

2.6.3 薬理試験の概要表

目 次

目 次	2
略号一覧	3
2.6.3.1 薬理試験一覧表	4
2.6.3.2 薬効を裏付ける試験－該当なし	10
2.6.3.3 副次的薬理試験－該当なし	10
2.6.3.4 安全性薬理試験	11

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

略号一覧

略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
APD	Action potential duration	活動電位持続時間
Abl	Abelson proto-oncogene	Abelson プロトオンコジーン遺伝子産物
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
b	Bovine	ウシ
Bcr-Abl	Breakpoint cluster region - Abelson proto-oncogene	Bcr と Abl の融合遺伝子産物
GPCR	G protein-coupled receptor	G タンパク共役型受容体
h	Human	ヒト
hr	Human recombinant	ヒト遺伝子組み換え
HEK cells	Human embryonic kidney cells	ヒト胎児腎臓細胞
hERG	Human ether-a-go-go-related gene	Human ether-a-go-go-related 遺伝子
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
HPLC/MS-MS	High performance liquid chromatography/ mass spectrometry - mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析
IC ₅₀	Concentration that inhibits function by 50%	50%阻害濃度
JAK	Janus kinase	Janus キナーゼ
ov	Ovine	ヒツジ
r	Rat	ラット
rr	Rat recombinant	ラット遺伝子組み換え

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

被験物質：ニロチニブ（AMN107）

試験の種類	試験系・プロトコール	投与方法	報告書番号	資料番号
効力を裏付ける試験				
> <i>In vitro</i> 薬理試験				
Bcr-Abl キナーゼに対するニロチニブ（遊離塩基）の阻害活性及び選択性	種々のキナーゼ発現細胞株又はキナーゼをトランスフェクトした細胞株等（40 種）を用い、キナーゼ自己リン酸化は cell capture ELISA、キナーゼ依存性細胞増殖/生存は ATPLite assay, YO-PRO-1-assay, Alamar-Blue-assay によって IC ₅₀ 値を算出した。	<i>In vitro</i>	[RD-200907]	[4.2.1.1-1]
Bcr-Abl キナーゼドメイン変異体に対するニロチニブの阻害活性	種々の Bcr-Abl 変異体（34 変異体）をトランスフェクトした細胞株用い、キナーゼ自己リン酸化は cell capture ELISA、キナーゼ依存性細胞増殖/生存は ATPLite assay によって IC ₅₀ 値を算出した。	<i>In vitro</i>	[RD-200702]	[4.2.1.1-2]
ニロチニブと Abl キナーゼ複合体の結晶構造	非リン酸化ヒト Abl キナーゼとニロチニブ複合体の結晶構造を解析した（作用機序検討のため）。	—	[RD-200784]	[4.2.1.1-3]

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

試験の種類	試験系・プロトコール	投与方法	報告書番号	資料番号
> <i>In vivo</i> 薬理試験				
正常マウスを用いた単回経口投与におけるニロチニブ（遊離塩基及び塩酸塩）の薬物動態プロファイル	正常雌性 OF1 マウスにニロチニブを単回経口投与した。投与後、血漿、肝臓、筋肉又は骨髄を採取し、HPLC/MS-MSによりニロチニブの濃度を測定した。	単回経口投与 ・ 遊離塩基 20, 75 mg/kg ・ 塩酸塩 20 mg/kg（遊離塩基として）	[RD-200707]	[4.2.1.1-5]
正常ラットを用いた単回静脈内又は経口投与におけるニロチニブ（遊離塩基）の薬物動態プロファイル	正常雌性 OFA ラットにニロチニブを単回経口又は単回静脈内投与した。その後、HPLC/MS-MSにより血漿ニロチニブ濃度を測定した。	単回経口投与 ・ 50 mg/kg 単回静脈内投与 ・ 10 mg/kg	[RD-200709]	[4.2.1.1-6]
骨髄増殖性疾患マウスモデルにおけるニロチニブの作用	p210 Bcr-Abl とホタルルシフェラーゼの発現ベクターを安定的にトランスフェクトした 32D 細胞を雌性ヌードマウスに静脈内注入し、Bcr-Abl 依存性骨髄増殖性疾患モデルを作製した。このモデル動物にニロチニブを経口投与した時の全身の発光量を測定し、ニロチニブの抗腫瘍効果を評価した。	経口投与 ・ 1 日 1 回, 14 日間 18, 45, 68 mg/kg ・ 1 日 2 回, 14 日間 10, 20, 30 mg/kg	[RD-201550]	[4.2.1.1-4]
副次的薬理試験				
> <i>In vitro</i> 薬理試験				
Bcr-Abl キナーゼに対するニロチニブ（遊離塩基）の阻害活性及び選択性	種々のキナーゼ発現細胞株又はキナーゼをトランスフェクトした細胞株等（40 種）を用い、キナーゼ自己リン酸化は cell capture ELISA, キナーゼ依存性細胞増殖/生存は ATPLite assay, YO-PRO-1-assay, Alamar-Blue-assay によって IC ₅₀ 値を算出した。	<i>In vitro</i>	[RD-200907]	[4.2.1.1-1]

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

試験の種類	試験系・プロトコール	投与方法	報告書番号	資料番号
<i>In vitro</i> における種々のヒトプロテインキナーゼ及びイマチニブ抵抗性 Bcr-Abl 変異体に対するニロチニブの選択的作用	遺伝子組み換えプロテインキナーゼドメイン（38種のチロシンキナーゼ及び10種のセリン・スレオニンキナーゼ）を、それぞれに相当する基質ペプチド、ATP 及び $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$ とインキュベートし、キナーゼによって触媒される基質ペプチドへのリン酸基転移を Filter binding method 又は Flash plate method によって測定し、ニロチニブの IC_{50} 値を算出した。	<i>In vitro</i> ・ 0.01, 0.1, 1, 10 μM の4濃度、又は 10 μM から3倍の段階希釈で8濃度	[RD-2000117]	[4.2.1.2-1]
ニロチニブによる JAK 阻害作用	HT1080 細胞を用いた STAT1 (Signal transducer and activator of transcription-1) -GFP (Green Fluorescent Protein) translocation assay において、インターフェロン γ で誘導される JAK2 依存的な STAT1 の核への移行に対するニロチニブの作用を検討した。また、種々の JAK を安定的にトランスフェクトした Ba/F3 細胞において IL-3 非依存的細胞増殖に対するニロチニブの作用を resazurin assay によって測定した。	<i>In vitro</i> ・ 0.03 ~ 10 μM	[RD-2000095]	[4.2.1.2-2]
> <i>In vivo</i> 薬理作用	実施していない			

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

試験のタイプ	試験系・プロトコール	投与方法	報告書番号	資料番号
安全性薬理試験				
種々の受容体，イオンチャネル，結合タンパク及び酵素に対するニコチンの相互作用 (非 GLP 試験)	ヒト及び動物由来の組織，又は遺伝子工学的に適切なタンパク質を発現させた細胞株から得られた GPCR (57 種)，イオンチャネル (8 種)，核受容体 (5 種) トランスポーター (4 種) 及び酵素 (5 種) に対するニコチンの相互作用について放射性標識したリガンドを用いた受容体結合試験により測定した。	<i>In vitro</i> ・ 30µM 以下	[RD-20- 50404]	[4.2.1.3-1]
種々の受容体，イオンチャネル，結合タンパク及び酵素に対するニコチンの代謝物 p36.5 (BJA783) の相互作用 (非 GLP 試験)	ヒト又は動物由来の組織，又は遺伝子工学的に適切なタンパク質を発現させた細胞株から得られた GPCR (57 種)，イオンチャネル (8 種)，トランスポーター (4 種)，核受容体 (5 種) 及び酵素 (4 種) とニコチンの代謝物 p36.5 との相互作用について放射性標識したリガンドを用いた受容体結合試験によって測定した。	<i>In vitro</i> ・ 30 µM 以下	[RD-20- 50406]	[4.2.1.3-2]
hERG に対する影響 (非 GLP 試験)	安定的に hERG チャネル遺伝子をトランスフェクトした HEK293 細胞を用い hERG 電流を測定し，ニコチンの電気生理学的安全性について評価した。	<i>In vitro</i> ・ 0.03, 0.1, 0.3, 1 µM	-50166]	[4.2.1.3-3]
ウサギ摘出心臓に対する影響 (非 GLP 試験)	ウサギ摘出心臓を用い，ニコチンの電気生理学的安全性を評価した。 ・ 測定パラメーター；単層性活動電位の再分極持続時間，逆頻度依存性，不安定性，三角形分割，僅不整脈作用指標，冠動脈灌流速度，心室内伝導，ペースメーカー活性の可変性及び閾刺激電流の振幅	<i>In vitro</i> ・ 0.3, 0.9, 3, 9, 18 µM (n=2) ・ 0.3, 0.9, 3, 9, 30 µM (n=1)	-50152]	[4.2.1.3-4]

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

試験のタイプ	試験系・プロトコール	投与方法	報告書番号	資料番号
ウサギ摘出心臓 (非 GLP 試験)	ウサギ摘出心臓を用い、ニロチニブの電気生理学的安全性を評価した。 ・測定パラメーター；単層性活動電位の再分極持続時間、逆頻度依存性、不安定性、三角形分割、僅不整脈作用指標、冠動脈灌流速度、心室内伝導、ペースメーカー活性の可変性及び閾刺激電流の振幅	<i>In vitro</i> ・ 0.005, 0.015, 0.05, 0.15, 0.5 μ M	■18514]	[4.2.1.3-5]
p36.5(BJA783)の hERG に対する影響 (非 GLP 試験)	安定的に hERG 遺伝子をトランスフェクトした HEK293 細胞を用い hERG 電流を測定し、p36.5 の電気生理学的安全性を評価した。	<i>In vitro</i> ・ 30 μ M	■16144]	[4.2.1.3-6]
p36.5(BJA783)のウサギ摘出心臓に対する作用 (非 GLP 試験)	ウサギ摘出心臓を用い、p36.5 の電気生理学安全性を評価した。 ・測定パラメーター；単層性活動電位の再分極持続時間、逆頻度依存性、不安定性、三角形分割、僅不整脈作用指標、冠動脈灌流速度、心室内伝導、ペースメーカー活性の可変性及び閾刺激電流の振幅	<i>In vitro</i> ・ 0.02, 0.06, 0.2, 0.6, 2 μ M	■18547]	[4.2.1.3-7]
イヌを用いたテレメトリーによる心血管系への影響 (GLP 試験)	テレメトリーを装着したビーグル犬にニロチニブを投与し、心血管系への影響を評価した。 ・測定及び評価項目；生死、一般状態、体重、投与後 30 分、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 及び 24 時間における心電図、心拍数及び血圧（拡張期、収縮期及び平均血圧）	単回経口投与 ・ 30, 100, 300 mg/kg	■30165]	[4.2.1.3-8]

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

試験のタイプ	試験系・プロトコール	投与方法	報告書番号	資料番号
ラットを用いた中枢神経系及び呼吸器系安全性薬理試験 (GLP 試験)	呼吸器系；プレチスモグラフィによる呼吸機能を測定した。 ・測定項目；呼吸数, 一回換気量, 分時換気量 神経系；機能観察総合評価法 (FOB) により評価した。 ・測定項目；一般状態観察, ハンドリングによる観察, オープンフィールド試験, 感覚運動機能, 直腸温, 前後肢のグリップ力, 着地時後肢開脚	呼吸器系 経口投与 ・ 30, 300 mg/kg 神経系 経口投与 ・ 300 mg/kg	■10047]	[4.2.1.3-9]
ヒト皮下抵抗血管及び冠動脈に対するニロチニブの作用 (非 GLP 試験)	ヒト組織から得られた血管標本の収縮反応について筋運動記録槽を用いて測定した。	<i>In vitro</i> ・ 1, 3, 10 μ M	■80132]	[4.2.1.3-10]
ヒトの血液を用いた血小板活及び凝固バイオマーカーに対するニロチニブの作用 (非 GLP 試験)	健常者から採取した血液にニロチニブを添加し, 室温で1時間インキュベートした後, 血小板凝集測定計, 血小板機能分析器 (PFA100) 及びフローサイトメトリー によって各バイオマーカーを測定した。	<i>In vitro</i> ・ 1, 3, 10 μ g/mL	■80135]	[4.2.1.3-11]
薬力学的薬物相互作用試験	該当なし			

2.6.3.2 薬効を裏付ける試験－該当なし

2.6.3.3 副次的薬理試験－該当なし

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：ニロチニブ（AMN107）

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
種々の受容体及びイオンチャネルに対する相互作用	ヒト及び動物由来組織、又は遺伝子工学的にタンパク質を発現させた細胞株	<i>In vitro</i>	30 µM 以下	—	ニロチニブは、アデノシン 3 受容体 (Ki 値 3.2 µM) 及びアデノシントランスポーター (Ki 値 1.1 µM) に対し弱い結合親和性を示した。オピエート kappa 及びタキキニン-1 に対しては、ニロチニブのバッチによって親和性が異なっていた。又、ニロチニブは以下に示した受容体等に対し、10 µM の濃度まで有意な相互作用を示さなかった。 GPCR : hr Ad₁, hr Ad_{2A}, r alpha₁, hr Alpha_{2A}, hr Alpha_{2B}, hr Alpha_{2C}, hr AT₁, hr Beta₁, hr Beta₂, hr Beta₃, hr BK1, hr BK2, hr CB1, hr CCKa, hr CCKb, hr CRF-1, hr D₁, hr D_{2L}, hr D₃, hr D_{4.4}, hr D₅, hr ET_A, hr ET_B, h GABA_B, hr Ghrelin, hr Glucagon, hr GIP, hr H₁, hr H₂, hr H₃, hr 5-HT_{1A}, hr 5-HT_{2A}, hr 5-HT_{2B}, hr 5-HT_{2C}, hr 5-HT_{5A}, hr 5-HT₆, hr 5-HT₇, hr M₁, hr M₂, hr M₃, hr M₄, hr M₅, hr MC₃, hr MC₄, hr Motilin, hr NPY₁, hr NPY₂, hr NT1, hr NK₂(antagonist), hr Opiate-delta, hr Opiate-mu, hr TP, hr V1a, hr V2, トランスポーター : hr DAT, hr NET, hr 5-HTT イオンチャネル : r Ca²⁺(L)DHP, r Ca²⁺(N), r K⁺(ATP dep), r BZD, r GABA_A, h Nic(CNS), r PCP, hr 5-HT₃ 核受容体 : rr AR, hr Eα, hr ERβ, hr GR, hr PR 酵素 : ov COX-1, hr COX-2, h PDE3, h PDE4d, b PDE6	[RD-20-50404]	[4.2.1.3-1]

(非 GLP 試験)

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
種々の受容体、イオンチャネル、結合タンパク及び酵素に対する代謝物 p36.5 (BJA783) の相互作用	ヒト及び動物由来組織、又は遺伝子工学的にタンパク質を発現させた細胞株	<i>In vitro</i>	30μM 以下	—	p36.5 は、アデノシン 3 受容体 (Ki 値 6.5 μM) 及びヒトアデノシントランスポーター (Ki 値 0.46 μM) に対し弱い結合親和性を示した。又、p36.5 は、以下に示した受容体等に対し、10 μM の濃度まで有意な相互作用を示さなかった。 GPCR : hr Ad₁, hr Ad_{2a}, r alpha₁, hr Alpha_{2A}, hr Alpha_{2B}, hr Alpha_{2C}, hr AT₁, hr Beta₁, hr Beta₂, hr Beta₃, hr BK1, hr BK2, hr CB1, hr CCKa, hr CCKb, hr CRF-1, hr D₁, hr D_{2L}, hr D₃, hr D_{4.4}, hr D₅, hr ET_A, hr ET_B, hr GABA_B, hr Ghrelin, hr Glucagon, hr GIP, hr H₁, hr H₂, hr H₃, hr 5-HT_{1A}, hr 5-HT_{2A}, hr 5-HT_{2B}, hr 5-HT_{2C}, hr-5-HT_{5A}, hr 5-HT₆, hr 5-HT₇, hr M₁, hr M₂, hr M₃, hr M₄, hr M₅, hr MC₃, hr MC₄, hr Motilin, hr NPY₁, hr NPY₂, hr NT1, h NK₁, hr NK₂ (antagonist), hr Opiate-delta, hr Opiate-kappa, hr Opiate-mu, hr TP, hr V1a, hr V2, トランスポーター : hr DAT, hr NET, hr 5-HTT イオンチャネル : r Ca²⁺(L)DHP, r Ca²⁺(N), r K⁺(ATP dep), r BZD, r GABA_A, h Nic(CNS), r PCP, hr 5-HT₃ 核受容体 : rr AR, hr ERα, hr ERβ, hr GR, hr PR, 酵素 : ov COX-1, hr COX-2, h PDE3, h PDE4d.	[RD-20- XXXX -50406] (非 GLP 試験)	[4.2.1.3-2]
hERG チャネル	HEK293 細胞	<i>In vitro</i>	0.03, 0.1, 0.3, 1 μM	n= 3 (細胞)	IC ₅₀ : 0.13 μM (室温)	XXXX 80166] (非 GLP 試験)	[4.2.1.3-3]
摘出心臓	ウサギ	<i>In vitro</i>	0.3, 0.9, 3, 9, 18 μM (n=2) 0.3, 0.9, 3, 9, 30 μM (n=1)	n= 3 (心臓)	3 μM (n= 1) 及び 9 μM (n= 2) : APD 延長 ≥ 3 μM : 三角形分割 ≥ 0.9 μM : 冠動脈灌流速度低下 (n=2) 18 及び 30 μM で薬物の沈殿が観察された。	XXXX 50152 (非 GLP 試験)	[4.2.1.3-4]

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
摘出心臓	ウサギ	<i>In vitro</i>	0.005, 0.015, 0.05, 0.15, 0.5 μ M	n = 6 (心臓)	0.5 μ M : 冠動脈灌流速度低下 (n = 4) 0.5 μ M : 心室細動 (n = 1) 0.5 μ M において薬物の沈殿が生じたことから、これらの作用は沈殿と関連している可能性が考えられる。	[18514] (非 GLP 試験)	[4.2.1.3-5]
hERG チャネルに対する p36.5 (BJA783) の作用	HEK293 細胞	<i>In vitro</i>	30 μ M	n = 4 (細胞)	p36.5 は、hERG テール電流に対し、有意な阻害を示さなかった。	[16144] (非 GLP 試験)	[4.2.1.3-6]
摘出心臓に対する p36.5 (BJA783) の作用	ウサギ	<i>In vitro</i>	0.02, 0.06, 0.2, 0.6, 2 μ M	n = 6 (心臓)	p36.5 は、2 μ M の濃度まで電気生理学的パラメータに対し影響を及ぼさず、QT 間隔延長や不整脈に関連するリスクを示さなかった。	[8547] (非 GLP 試験)	[4.2.1.3-7]
心血管系テレメトリー	ビーグル犬	経口 (強制)	0, 30, 100, 300 mg/kg [溶媒 : 0.5% (w/v) HPMC]	雄, n = 4	影響なし	[80165] (GLP 試験)	[4.2.1.3-8]

CTD2.6.3 薬理試験の概要表

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	用量	性別及び動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
神経系及び呼吸器系	ラット Crl:WI (Han)	経口 (強制)	呼吸器系 ・ 0, 30, 300 mg/kg [溶媒 : 0.5% (w/v) HPMC]	雄, n = 10	影響なし	[] 10047] (GLP 試験)	[4.2.1.3-9]
			神経系 ・ 0, 300 mg/kg [溶媒 : 0.5% (w/v) HPMC]	雄, n = 10	影響なし		
心血管系 (血管収縮作用)	ヒト血管	<i>In vitro</i>	1, 3, 10 µM	n = 3~5	・ 皮下血管 ; 作用なし ・ 冠動脈 ; 3µM : 収縮反応あり (28.9%) 1, 10 µM : 作用なし	[] 80132] (非 GLP 試験)	[4.2.1.3-10]
心血管系 (血小板及び凝固バイオマーカー)	ヒト血液	<i>In vitro</i>	1, 3, 10 µg/mL	男性 n=14, 女性 n=6	・ 血小板活性化バイオマーカー ; ≥ 1 µg/mL で増加 : 血小板凝集 (5 µM ADP, collagen 5 µg/mL) , CD31 (PECAM-1) , CD41 (GPIIb/IIIa) , CD62p (P-selectin) , CD107a, CD151+14 (platelet-leukocyte interaction) , WEDE-15 (protease-activated thrombin receptors, PAR-1) ≥ 1 µg/mL で減少 : closure time ・ 凝固線溶バイオマーカー ; 作用なし	[] 80135] (非 GLP 試験)	[4.2.1.3-11]