

クリゾチニブ

ザーコリ[®]カプセル 200mg

ザーコリ[®]カプセル 250mg

第2部（モジュール2）CTDの概要

2.6 非臨床試験の概要文

2.6.1 緒言

ファイザー株式会社

2.6.1 緒言

クリゾチニブ（開発番号：PF-02341066，化学名：*(R)*-3-[1-(2,6-Dichloro-3-fluoro-phenyl)-ethoxy]-5-(1-piperidin-4-yl-1*H*-pyrazol-4-yl)-pyridin-2-ylamine，分子量：450.34）は、Pfizer社により未分化リンパ腫キナーゼ（anaplastic lymphoma kinase：ALK）融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌（Non-small cell lung cancer：NSCLC）治療薬として開発されたチロシンキナーゼ阻害剤である（図1）。

クリゾチニブは、ALKの受容体チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase：RTK）とその発癌性変異体（ALK融合蛋白質および特定のALK変異体）に対する選択的低分子阻害剤であると同時に、肝細胞増殖因子受容体（hepatocyte growth factor receptor：HGFR，c-Met）チロシンキナーゼを選択的に阻害する。NSCLCの細胞株および保存された臨床検体において、ヒト2番染色体短腕（染色体2p）上で逆位が起こることにより、微小管会合蛋白（echinoderm microtubule associated protein-like 4：EML4）遺伝子とALK遺伝子の融合遺伝子が形成されることが、2007年に確認された^{注1)}。この発見に続いて発表された一連の研究では、EML4-ALK融合には9種類以上の変異体があること、それぞれはALKのC末端キナーゼドメインの同一部分により構成されていること、および触媒活性を有する融合蛋白変異体であることが示されている^{注2)}、^{注3)}、^{注4)}、^{注5)}、^{注6)}。トランスジェニックマウスの肺胞上皮細胞において特異的なEML4-ALKの発現は、出生後わずか数週間で全てのマウスの両肺に多数の腺癌を発生させるが、これは融合キナーゼの強力な発癌活性を示すものである^{注7)}。ALKの主な融合パートナーはEML4であるが、TRK-融合遺伝子（TFG）およびキネシンファミリーメンバー5B（Kinesin family member 5B）も融合パートナーとして同定されており、その他の未知の遺伝子も融合パートナーとして示唆されている^{注8)}、^{注9)}、^{注10)}。

クリゾチニブは、ヒト悪性腫瘍に関連する特定のRTKの活性に対して阻害作用を示す低分子の創薬プログラムより見出された。種々のキナーゼに対する阻害活性を評価した結果、クリゾチニブは、ALKおよびc-Met/HGFRに対して阻害作用を示した^{注11)}。これら試験の結果は、分子レベルで選択された患者集団におけるクリゾチニブの臨床試験の科学的根拠となっている。

注1) Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007; 448: 561-6.

注2) Choi YL, Takeuchi K, Soda M, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2008; 68: 4971-6.

注3) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2008; 3: 13-7.

注4) Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 4275-83.

注5) Shinmura K, Kageyama S, Tao H, et al. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer*. 2008; 61: 163-9.

注6) Takeuchi K, Choi YL, Soda M, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 6618-24.

注7) Soda M et al, A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:19893-97.

注8) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 3143-9.

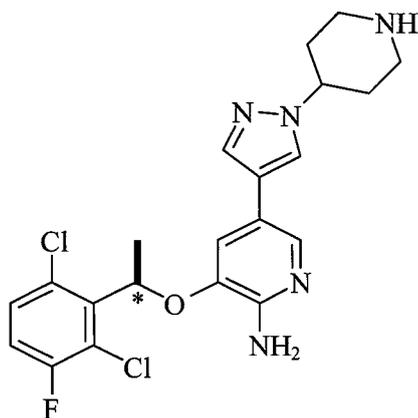
注9) Perner S, Wagner PL, Demichelis F, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: A rare acquired event. *Neoplasia*. 2008; 10:298-302.

注10) Rikova K et al, Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 2007; 131:1190-1203.

注11) 2.6.2.2 項

今回の申請にあたり、クリゾチニブの有効性および安全性に関する特徴を明らかにする目的で、薬理、薬物動態および毒性の各非臨床試験を実施した。また、一部の試験ではラクタム代謝物についても評価した。クリゾチニブについて予定している効能・効果および用量・用法を次頁に示す。

図1 クリゾチニブの化学構造式



* : 不斉炭素

分子式 : C₂₁H₂₂Cl₂FN₅O

クリゾチニブの効能・効果（案）および用法・用量（案）

【効能・効果】

ALK 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌

【効能・効果に関連する使用上の注意】

- (1) 十分な経験を有する病理医又は検査施設における検査により、ALK 融合遺伝子陽性が確認された患者に投与すること。
- (2) 本剤の術後補助療法における有効性及び安全性は確立していない。

【用法・用量】

通常、成人にはクリゾチニブとして 250 mg を 1 日 2 回、連日経口投与する。なお、患者の症状により適宜減量する。

【用法・用量に関連する使用上の注意】

副作用により、本剤を休薬、減量、中止する場合には、以下の基準を考慮すること。減量して投与を継続する場合には、副作用の症状、重症度等に応じて、1 レベル減量して投与すること（減量のレベル：開始用量 250 mg を 1 日 2 回→200 mg を 1 日 2 回→250 mg を 1 日 1 回）。[「重要な基本的注意」、「重大な副作用」の項参照]

クリゾチニブ

ザーコリ[®]カプセル 200mg

ザーコリ[®]カプセル 250mg

第2部（モジュール2）CTDの概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

ファイザー株式会社

目次

2.6.2	薬理試験の概要文.....	5
2.6.2.1	まとめ.....	5
2.6.2.2	効力を裏付ける試験.....	8
2.6.2.3	副次的薬理試験.....	28
2.6.2.4	安全性薬理試験.....	29
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用.....	36
2.6.2.6	考察および結論.....	37
2.6.2.7	図表.....	41

略号および用語一覧

略号, 用語	省略していない表現または定義
ALCL	anaplastic large cell lymphoma : 未分化大細胞リンパ腫
ALK	anaplastic lymphoma kinase : 未分化リンパ腫キナーゼ
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
ATP	adenosine triphosphate : アデノシン三リン酸
AUC	area under the plasma concentration-time curve : 血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC ₀₋₂₄	area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours : 投与後 0 から 24 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
BDNF	brain-derived neurotrophic factor : 脳由来神経栄養因子
BID	twice daily : 1 日 2 回
C _{eff}	effective plasma concentration : 目標有効血漿中濃度
C _{max}	maximum plasma concentration : 最高血漿中濃度
EC ₅₀	concentration producing 50% of maximal effect : 50%有効濃度
EC ₉₀	concentration producing 90% of maximal effect : 90%有効濃度
EGF	epidermal growth factor : 上皮増殖因子
EGFR	epidermal growth factor receptor : 上皮増殖因子受容体
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay : 酵素免疫測定法
EML4	echinoderm microtubule-associated protein-like4 : 微小管会合蛋白
Erk	extracellular signal-regulated kinase : 細胞外シグナル調節キナーゼ
Gab-1	growth factor receptor bound 2 (Grb2)-associated binder-1 : 増殖因子受容体結合蛋白質 2 (Grb2) 結合蛋白質 1
Gas6	growth arrest specific 6
GLP	Good Laboratory Practice : 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
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
HGF	hepatocyte growth factor : 肝細胞増殖因子
HGFR	hepatocyte growth factor receptor : 肝細胞増殖因子受容体
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell : ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC ₁₀	10% inhibitory concentration : 10%阻害濃度
IC ₂₀	20% inhibitory concentration : 20%阻害濃度
IC ₅₀	50% inhibitory concentration : 50%阻害濃度
IRK	insulin receptor kinase : インスリン受容体キナーゼ
K _b	binding constant : 結合定数
K _i	inhibition constant : 阻害定数
MAPD ₉₀	monophasic action potential duration to 90% repolarization : 90%再分極までの単相性活動電位持続時間
MAPD ₁₀₀	monophasic action potential duration to 100% repolarization : 100%再分極までの単相性活動電位持続時間
MDCK	Madin-Darby canine kidney : イヌ腎臓
MSP	macrophage stimulating protein : マクロファージ刺激蛋白質
NGF	nerve growth factor : 神経成長因子
NPM-ALK	nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase
NSCLC	non-small cell lung cancer : 非小細胞肺癌
PAI	pharmacological activity index : 薬理活性指数
PD	pharmacodynamic : 薬力学
PDGF	platelet-derived growth factor : 血小板由来増殖因子
PK	pharmacokinetic : 薬物動態
PLC γ	phospholipase C γ : ホスホリパーゼ C γ
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
QD	once daily : 1 日 1 回
QRS	electrocardiographic marker of ventricular depolarization : 心室脱分極の心電図マーカー

QT	time from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave in the electrocardiogram : 心電図における QRS 複合波の開始から 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
RON	Recepteur d'Origine Nantais
RP	resting potential : 静止膜電位
RTK	receptor tyrosine kinase : 受容体チロシンキナーゼ
STAT3	signal transducers and activators of transcription3 : シグナル伝達兼転写活性化因子 3
tmax	time of occurrence of Cmax (time of maximum plasma concentration) : 最高血漿中濃度到達時間
VEGF	vascular endothelial growth factor : 血管内皮増殖因子

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

クリゾチニブ (PF-02341066) は、未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) および c-Met/肝細胞増殖因子受容体 (HGFR) を強力かつ選択的に阻害する ATP 競合性のキナーゼ阻害剤である。肺癌およびその他の癌において ALK を標的とすることは、発症原因遺伝子である ALK 融合変異を有する腫瘍細胞を選択的に標的とする、新たな治療の機会を提供するものである^{注1)}。また、遺伝的あるいはエピジェネティックなメカニズムによる c-Met/HGFR の異常な活性化は、多くの癌における腫瘍細胞増殖、血管新生、浸潤的増殖および転移促進などに関係する^{注2) 注3)}。

非臨床薬理試験においては、まず、標的キナーゼ (ALK, ALK 融合蛋白質, c-Met/HGFR) に対する作用およびその他のキナーゼに対する選択性について酵素レベルおよび細胞レベルで検討した。また、ヒトの主要な代謝経路で生成される代謝物の標的キナーゼに対する作用についても評価を行った。さらに、生体内における腫瘍増殖、転移および病的血管新生などの過程を反映した *in vitro* 試験系として、腫瘍細胞および内皮細胞を用い、増殖、生存、浸潤などの ALK および c-Met/HGFR が関与する種々の細胞機能に対する作用を検討した。これらの検討に引き続き、*in vivo* で 1) 腫瘍中の標的キナーゼ (ALK および c-Met/HGFR) の阻害作用、2) げっ歯類の腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果、3) 目標血漿中濃度の推定を目的とした PK/PD 解析、4) 抗腫瘍効果の作用機序について検討した。

(1) 効力を裏付ける試験

クリゾチニブは ALK および c-Met/HGFR を強力かつ選択的に阻害し、*in vitro* および *in vivo* で腫瘍細胞におけるこれらのキナーゼが関与する細胞機能を阻害することが示された。活性化した ALK (EML4-ALK および NPM-ALK) および c-Met/HGFR を発現した腫瘍を用いた *in vivo* 試験では、顕著な腫瘍退縮効果を含む抗腫瘍効果を示した。クリゾチニブの抗腫瘍効果は用量依存的であり、腫瘍中の EML4-ALK, NPM-ALK および c-Met/HGFR リン酸化に対する阻害作用との相関が認められた。ALK 陽性腫瘍異種移植モデルにおける検討結果および PK/PD 解析から、非結合型薬物の目標血漿中濃度は 19~23 nmol/L (9~10 ng/mL) と算出された。また、c-Met/HGFR 陽性腫瘍異種移植モデルにおける検討からは、十分な抗腫瘍効果を得るためには全投与期間にわたって c-Met/HGFR の活性をほぼ完全に (90%以上) 阻害することが必要であることが示唆され、目標とする非結合型有効血漿中濃度は 8.1~12.8 nmol/L (3.6~5.8 ng/mL) と算出された。なお、非結合型血漿中濃度は、特記した場合を除いて、マウスの血漿蛋白結合率 (96.4%) を用いて算出した^{注4)}。EML4-ALK 陽性腫瘍モデルにおいて、EML4-ALK リン酸化阻害および抗腫瘍効果が得られた際の非結合型血漿中濃度は、EML4-ALK 陽性被験者における臨床試験の目標血漿中濃度の設定に

注1) Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol.* 2004;199:330-58.

注2) Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett.* 2005;225:1-26

注3) Sattler M, Salgia R. c-Met and hepatocyte growth factor: potential as novel targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep.* 2007;9:102-8.

注4) 2.6.4.4. (2) 1) 項

用いた。

(2) 副次的薬理試験

広範な受容体、酵素またはイオンチャネルに対するクリゾチニブの作用を検討した。クリゾチニブは、セロトニン 5-HT_{2B} 受容体アゴニスト結合部位への結合親和性、セロトニン 5-HT_{4E}, 5-HT₇ およびアドレナリン α_{1a} 受容体アンタゴニスト活性ならびにドパミントランスポーターおよびセロトニントランスポーター阻害活性を有した。これらの K_b 値または IC₅₀ 値は 40.7 nmol/L (18.3 ng/mL) 以上であった。

(3) 安全性薬理試験

心血管系、中枢神経系および呼吸系に及ぼすクリゾチニブの影響について、ラットおよびイヌを用いて評価した。さらに、*in vivo* コアッテリー試験に加え、QT 間隔延長の可能性ならびに心血管系および中枢神経系の作用に関するカルシウムチャネルおよびナトリウムチャネルに及ぼす影響について *in vitro* で追加評価した。クリゾチニブは、hERG カリウムチャネル、カルシウムチャネルおよびナトリウムチャネルに対する阻害作用を有した。また、クリゾチニブは、Nav1.5 ナトリウムチャネルに対する阻害作用も示し、心筋活動電位に影響を及ぼす可能性が示唆された。さらに、血行動態および心電図パラメータに及ぼす影響を、麻酔イヌを用いて評価したところ、主な影響として、心拍数および拡張期血圧の低下がみられた。また、QT 間隔の延長および拡張終期の左心室圧の上昇がみられたが、これらは心拍数減少に起因すると考えられた。洞調律でのみ認められた MAPD₁₀₀ の延長、PR および QRS 間隔の延長についても心拍数減少の影響と考えられたが、Nav1.5 ナトリウムチャネル阻害が関連している可能性も考えられた。さらに、評価した最高用量においては心筋収縮力の低下も認められた。クリゾチニブは Nav1.1 ナトリウムチャネルに対しても阻害作用を有し、神経細胞で活動電位を発生させる脱分極に影響を及ぼす可能性が考えられた。しかしながら、神経機能試験で自発運動量の低下がみられたものの、その他の機能観察試験の評価項目に対する作用は認められなかった。また、呼吸系に対する有害作用もみられなかった。

(4) 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施していない。

以上、クリゾチニブは ALK および c-Met/HGFR チロシンキナーゼ受容体に対して強力な阻害作用を示し、また、活性化した ALK および c-Met/HGFR を有する腫瘍を用いた異種移植モデルにおいて、ALK および c-Met/HGFR 阻害作用ならびに抗腫瘍活性を示した。安全性薬理試験の結果から、クリゾチニブはヒトで心血管系に影響を及ぼす可能性が示唆されたが、これは臨床においてモニター可能と考えられた。また、副次的薬理試験および *in vitro* 安全性薬理試験の結果から、神経機能に影響を及ぼす可能性が考えられたが、関連した作用は *in vivo* の検討では認められず、ヒトで重篤な有害作用が発現する可能性は低いことが示唆された。

これらの非臨床薬理試験成績は、ALK 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌の治療におけるクリゾチニブの有効性および安全性を裏付けるものと考えられた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

(1) *in vitro* 標的受容体チロシンキナーゼ阻害作用

1) 酵素レベルでの検討 (報告書番号 PF-02341066_06Oct [REDACTED] 192308)

クリゾチニブの標的受容体チロシンキナーゼ (RTK) に対する作用を、酵素レベルで評価した。クリゾチニブは組換えヒト ALK および組換えヒト c-Met/HGFR に対して ATP 競合的な阻害作用を示し、その K_i 値はそれぞれ 0.50 nmol/L および 0.62 nmol/L であった。また、RON RTK に対しても阻害作用を示し、その K_i 値は 9.1 nmol/L であった。これは、ALK 阻害の約 1/20 の作用であった (表 1)。

2) 細胞レベルでの検討 (報告書番号 PF-02341066_06Oct [REDACTED] 192308, 報告書番号 PF-02341066-Pharm-001)

酵素レベルで認められた標的 RTK に対するクリゾチニブの阻害作用を細胞レベルで確認するため、ALK, c-Met/HGFR および RON 発現細胞を用いてクリゾチニブのキナーゼリン酸化阻害作用を検討した。

NCI-H3122 および NCI-H2228 はヒト肺癌の株化細胞で、それぞれ染色体逆位により EML4-ALK 融合蛋白質変異体 variant 1 (V1) および variant 3 (V3) を発現している^{注1)}。クリゾチニブは、NCI-H3122 細胞 (EML4-ALK V1) および NCI-H2228 細胞 (V3a/b) の 1604 位チロシン残基における ALK リン酸化を阻害し、その IC_{50} はそれぞれ 63 nmol/L および 74 nmol/L であった (表 1)。EML4-ALK V1, V2, V3a および V3b を発現させた NIH3T3 細胞においても、クリゾチニブは ALK リン酸化 (1604 位チロシン残基) を阻害し、その IC_{50} 値は 60 nmol/L (V1), 69 nmol/L (V2), 27 nmol/L (V3a) および 41 nmol/L (V3b) であった (表 1)。また、t(2;5) 染色体転座により NPM-ALK 融合蛋白質を発現しているヒト未分化大細胞リンパ腫 (ALCL) Karpas 299 細胞においてもクリゾチニブは ALK のリン酸化を阻害し、その IC_{50} 値は 35 nmol/L であった^{注2)} (表 1)。

さらに、c-Met/HGFR に対する作用を検討した試験では、クリゾチニブは一連のヒト腫瘍株化細胞において、HGF によって活性化された野生型 c-Met/HGFR および恒常的に活性化している野生型 c-Met/HGFR のチロシンリン酸化を阻害し (平均 IC_{50} 値 = 11 nmol/L)、マウスまたはイヌの上皮細胞においても同様の阻害作用を示した (表 1)。また、c-Met/HGFR の活性化変異は、ヒトの幾つかの癌腫において癌病変形成に関与している変異として以前から注目されており、こうした変異を有する癌患者における c-Met/HGFR 阻害剤の臨床効果も期待される^{注3) 注4)}。クリゾチニブは、ATP 結合部位変異体 (V1092I で 19 nmol/L, H1094R で 2.2 nmol/L) および P ループ変異体 (M1250T で 15 nmol/L) に対して、野生型受容体と同等以上の活性を示した^{注5)}。これに対し、活性化ルー

注1) Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K et al, EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. Clin Cancer Res. 2008;14:4275-83.

注2) 報告書番号 PF-02341066_06Oct [REDACTED] 192308

注3) Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. Cancer Lett. 2005;225:1-26.

注4) Sattler M, Salgia R. c-Met and hepatocyte growth factor: potential as novel targets in cancer therapy. Curr Oncol Rep. 2007;9:102-8.

注5) 報告書番号 PF-02341066-Pharm-001

プ変異体 (Y1230C で 127 nmol/L) では野生型受容体と比較して顕著な活性の低下 (1/10 倍) が認められた^{注1)}。

クリゾチニブは、c-Met の類縁キナーゼである RON RTK のチロシンリン酸化に対しても阻害作用を示し、NIH3T3 細胞に発現させた RON に対する IC₅₀ 値は 80 nmol/L であった^{注2)}。

以上の結果から、クリゾチニブの薬理活性発現には、ALK, c-Met/HGFR および RON が関与していると考えられた。なお、RON に関する詳細な薬理評価は実施していないが、特定の癌で過剰発現していること、RON 欠損マウスでは有害な表現型がみられておらず安全性上の懸念は低いと推測されることから、抗癌剤の標的分子として有用である可能性が示唆される^{注3)}。

表 1 標的受容体チロシンキナーゼおよび融合蛋白質に対するクリゾチニブの *in vitro* 阻害作用

試験系	Ki 値または IC ₅₀ 値 ^a	
	nmol/L	ng/mL
酵素レベル		
ALK ^b	0.5	0.2
c-Met/HGFR ^b	0.6	0.3
RON ^b	9.1	4.1
細胞レベル		
EML4-ALK V1 リン酸化 (NCI-H3122 ヒト肺癌細胞) ^b	63	28
EML4-ALK V3 リン酸化 (NCI-H2228 ヒト肺癌細胞) ^b	74	33
EML4-ALK V1 リン酸化 (EML4-ALK V1 発現 NIH3T3 細胞) ^b	60	27
EML4-ALK V2 リン酸化 (EML4-ALK V2 発現 NIH3T3 細胞) ^b	69	31
EML4-ALK V3a リン酸化 (EML4-ALK V3a 発現 NIH3T3 細胞) ^b	27	12
EML4-ALK V3b リン酸化 (EML4-ALK V3b 発現 NIH3T3 細胞) ^b	41	18
NPM-ALK リン酸化 (ヒト Karpas 299 ALCL 細胞) ^b	35	16
c-Met/HGFR リン酸化 (ヒト腫瘍株化細胞の平均)	11	5
c-Met/HGFR リン酸化 (ヒト A549 肺癌細胞) ^{b,c}	8.6, 5.0	3.9, 2
c-Met/HGFR リン酸化 (ヒト GTL-16 胃癌細胞) ^c	13	5.9
c-Met/HGFR リン酸化 (ヒト HT29 大腸癌細胞) ^c	11	5
c-Met/HGFR リン酸化 (ヒト Colo205 大腸癌細胞) ^c	10	4.5
c-Met/HGFR リン酸化 (ヒト A498 腎臓癌細胞) ^c	13	5.9
c-Met/HGFR リン酸化 (ヒト 786-O 腎臓癌細胞) ^c	19	8.6
c-Met/HGFR リン酸化 (ヒト MBA-MD-231 乳癌細胞) ^c	5.1	2.3
c-Met/HGFR リン酸化 (マウス IMCD3 腎臓上皮細胞) ^c	5	2
c-Met/HGFR リン酸化 (イヌ MDCK 上皮細胞) ^c	24	11
MSP 刺激 RON リン酸化 (RON 発現 NIH3T3 細胞) ^b	80	36
c-Met/HGFR リン酸化 (ATP 結合部位変異体[V1092I]発現 NIH3T3 細胞) ^c	19	8.6
c-Met/HGFR リン酸化 (ATP 結合部位変異体[H1094R]発現 NIH3T3 細胞) ^c	2.2	1
c-Met/HGFR リン酸化 (活性化ループ変異体[Y1230C]発現 NIH3T3 細胞) ^c	127	57
c-Met/HGFR リン酸化 (Pループ変異体[M1250T]発現 NIH3T3 細胞) ^c	15	6.8
c-Met/HGFR リン酸化 (野生型 c-Met/HGFR 発現 NIH3T3 細胞) ^c	12.6	5.7

a) 酵素レベルの評価については Ki 値, 細胞レベルの評価については IC₅₀ 値を示す。

b) PF-02341066_06Oct-192308

c) PF-02341066-Pharm-001

(出典: 報告書番号 PF-02341066_06Oct-192308, Table 2 および報告書番号 PF-02341066-Pharm-001, Table 1)

注1) 報告書番号 PF-02341066-Pharm-001

注2) 報告書番号 PF-02341066_06Oct-192308

注3) Wagh PK, Peace BE, Waltz SE. Met-related receptor tyrosine kinase Ron in tumor growth and metastasis. Adv Cancer Res. 2008;100:1-33.

3) クリゾチニブの代謝物の酵素レベルおよび細胞レベルでの検討（報告書番号 PF-02341066_06Oct 192308）

ヒトにおけるクリゾチニブの主要代謝物として、ラクタム体（M10, PF-06260182）が同定されている。また、微量代謝物として、*O*-脱アルキル体のグルクロン酸抱合体（M1）、同じく硫酸抱合体（M3）、*O*-脱アルキル体のラクタム体（M2, PF-06268935）およびM2の硫酸抱合体（M8）が検出されている^{注1)}。これらの代謝物のキナーゼ阻害活性を検討するため、ラクタム体のジアステレオマーであるPF-06270079およびPF-06270080、*O*-脱アルキル体（M4, PF-03255243）および*O*-脱アルキルラクタム体（M2, PF-06268935）の、ALK, c-Met/HGFR およびRONに対する阻害作用を評価した。

ラクタム体であるPF-06270079およびPF-06270080は、組換えヒトALK, c-Met/HGFRならびにRONのいずれに対しても阻害作用を示し、そのKi値は、ALKに対してそれぞれ2.4 nmol/L および1.6 nmol/L、c-Met/HGFRに対してそれぞれ0.45 nmol/L および0.56 nmol/L ならびにRONに対してそれぞれ7.7 nmol/L および2.8 nmol/Lであった（表2）。

これらの酵素レベルでみられた作用と一致して、PF-06270079およびPF-06270080は、細胞レベルにおいても、EML4-ALK, c-Met/HGFR およびRONのリン酸化を阻害することが示された。すなわち、PF-06270079およびPF-06270080は、NCI-H3122細胞（EML4-ALK V1を発現）におけるALKリン酸化（1604位チロシン残基）を阻害し（IC₅₀値はそれぞれ284 および194 nmol/L）、また、NCI-H2228細胞（EML4-ALK V3を発現）のALKリン酸化（1604位チロシン残基）を阻害した（IC₅₀値はそれぞれ554 および355 nmol/L）。これらのラクタム体のALK阻害活性は、IC₅₀値による比較でクリゾチニブと比べて1/8~1/3倍であった。また、PF-06270079およびPF-06270080は、A549細胞におけるHGF刺激c-Met/HGFRリン酸化に対しても阻害作用を示したが（IC₅₀値はそれぞれ19 および12 nmol/L）、その作用はクリゾチニブの1/4~1/3倍であった。一方、RONに対してはPF-06270079およびPF-06270080はクリゾチニブと同等もしくはそれ以上の阻害作用を示し、NIH3T3細胞におけるMSP刺激RONリン酸化に対するIC₅₀値はそれぞれ85 および40 nmol/Lであった（表2）。

一方、*O*-脱アルキルラクタム体PF-06268935および*O*-脱アルキル体PF-03255243は、細胞レベルの評価において、EML4-ALK, c-Met/HGFR およびRONのいずれに対しても10 μmol/Lまでの濃度で阻害作用を示さなかった。

注1) 2.6.4.5 (1) 3) 項

表 2 標的受容体チロシンキナーゼおよび融合蛋白質に対する代謝物の *in vitro* 阻害作用

試験系	化合物	Ki 値または IC ₅₀ 値 ^a (nmol/L)	活性比 代謝物/ クリゾチニブ
酵素レベル			
ALK	クリゾチニブ	0.50	
	PF-06270079	2.4	5
	PF-06270080	1.6	3
c-Met/HGFR	クリゾチニブ	0.62	
	PF-06270079	0.45	0.7
	PF-06270080	0.56	0.9
RON	クリゾチニブ	9.1	
	PF-06270079	7.7	0.9
	PF-06270080	2.8	0.3
細胞レベル			
EML4-ALK V1 リン酸化 (NCI-H3122 細胞)	クリゾチニブ	63	
	PF-06270079	284	3.7
	PF-06270080	194	2.5
EML4-ALK V3 リン酸化 (NCI-H2228 細胞)	クリゾチニブ	74	
	PF-06270079	554	7.5
	PF-06270080	355	5.0
c-Met/HGFR リン酸化 (A549 細胞)	クリゾチニブ	5.0	
	PF-06270079	19	4.0
	PF-06270080	12	2.5
RON リン酸化 (RON 発現 NIH3T3 細胞)	クリゾチニブ	80	
	PF-06270079	85	1.0
	PF-06270080	40	0.5

a) 酵素レベルの評価については Ki 値, 細胞レベルの評価については IC₅₀ 値を示す。

(出典: 報告書番号 PF-02341066_06Oct 192308, Table 1 および Table 3)

4) クリゾチニブのキナーゼ阻害作用の選択性 (4.2.1.1.2 報告書番号 PF-02341066-Pharm-001)

クリゾチニブのキナーゼ阻害作用の ALK および c-Met/HGFR に対する選択性を検討するため、約 120 種の組換えキナーゼについて酵素レベルでの作用を評価した。その結果、ALK または c-Met/HGFR との比較において、14 種のキナーゼに対する選択性が 100 倍未満であった。さらに、これらのキナーゼおよび c-Met/HGFR と類縁の一連のキナーゼに対するクリゾチニブの作用を細胞レベルで評価した。クリゾチニブは、c-Met/HGFR (IC₅₀ 値=11 nmol/L) に対して、VEGFR2, PDGFRβ, および Sky RTKs については 1000 倍以上, IRK および Lck については 200 倍以上, Axl, Tie-2, TrkA および TrkB については約 30~50 倍の選択性を示した (表 3)。細胞レベルでの 50 倍の選択性の差が、*in vivo* での c-Met/HGFR に対する選択性を裏付けるのに十分であるかを検討するため、ラット C6 神経膠腫細胞を移植したヌードマウスを用いて Tie-2 リン酸化阻害作用を評価した。クリゾチニブは、50 mg/kg (24 時間にわたって c-Met/HGFR 活性を 99%阻害する用量^{注1)}) および 100 mg/kg の単回経口投与では、Tie-2 リン酸化に対して意味のある阻害作用を示さなかった。このことから、*in vivo* では c-Met/HGFR を 24 時間にわたって完全に阻害する用量の 2 倍の用

注1) 2.6.2.2 (3) 5) 項

量においても, Axl, Tie-2, TrkA および TrkB に対して阻害作用を示す可能性は低いと考えられた。さらに, ヒトでの 250 mg (BID) 反復投与における血漿中濃度の Cmax は 577 ng/mL (非結合型濃度として 54 ng/mL) であり^{注1)}, 臨床においてノンターゲットのキナーゼを阻害する濃度に到達する可能性は低いと考えられた。

表 3 細胞レベルでのクリゾチニブのキナーゼ選択性

試験系	IC ₅₀ 値	
	nmol/L	ng/mL
Gas6 刺激 Axl リン酸化 (Axl 発現 NIH3T3 細胞)	322	145
EGF 刺激 Tie-2 リン酸化 (Tie-2/EGFR 発現 NIH3T3 細胞)	448	202
NGF 刺激 TrkA リン酸化 (Trk A 発現 PAE 細胞)	580	261
BDNF 刺激 TrkB リン酸化 (Trk B 発現 PAE 細胞)	399	180
BCR-Abl リン酸化 (BCR-Abl 発現 BaF3 細胞)	1045	471
インスリン刺激 IRK リン酸化 (IRK 発現 HEK293 細胞)	2887	1300
抗 CD3 抗体刺激 Lck 依存性 Zap70 リン酸化 (Jurkat 細胞)	2741	1234
Gas6 刺激 Sky リン酸化 (Sky 発現 NIH3T3 細胞)	>10000	>4500
PDGF-bb 刺激 PDGFRβ リン酸化 (PDGFRβ 発現 PAE 細胞)	>10000	>4500
VEGF ₁₆₅ 刺激 VEGFR2 リン酸化 (VEGFR2 発現 PAE 細胞)	>10000	>4500

(出典: 報告書番号 PF-02341066-Pharm-001, Table 2)

(2) 標的 RTK が関与する細胞機能に対する阻害作用 (*in vitro*)

1) ALK が関与する細胞機能に対する作用 (報告書番号 PF-02341066_06Oct-192308, 報告書番号 PF-02341066-Pharm-001)

ALK 融合蛋白質は, 肺癌および ALCL 等の ALK 遺伝子座に転座/逆位を有する腫瘍の細胞増殖および細胞生存の調節異常に関与していることから^{注2)}, これらの細胞機能に対するクリゾチニブの作用について検討した。クリゾチニブは, EML4-ALK V1 を発現している NCI-H3122 肺癌細胞の細胞増殖を阻害し, またアポトーシスを誘導した^{注3)} (表 4)。また, t(2;5) 染色体転座により NPM-ALK 融合蛋白質を発現している Karpas 299 ALCL 細胞および SU-DHL-1ALCL 細胞においても, 細胞増殖を阻害した。これらの NPM-ALK 陽性のリンパ腫細胞のクリゾチニブによる増殖阻害は, G0/G1 期における細胞周期の停止とアポトーシス誘導に関連していた^{注4)}。

2) c-Met/HGFR が関与する細胞機能に対する作用 (報告書番号 PF-02341066-Pharm-001)

c-Met/HGFR は, 種々の腫瘍細胞および腫瘍血管内皮細胞の細胞増殖, 遊走および浸潤の調節異常に関与している^{注5)}。一連の細胞レベルでの評価において, クリゾチニブはヒト GTL-16 胃癌細

注1) 外国 A8081001 試験における日本人の Cmax (577 ng/mL ; 2.7.2.2 項, 表 21) とヒト血漿蛋白結合率 (90.7 % ; 2.6.4.4 (2) 1) 項) より算出

注2) Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. J Cell Physiol. 2004;199:330-58.

注3) 報告書番号 PF-02341066_06Oct-192308

注4) 報告書番号 PF-02341066-Pharm-001

注5) Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. Cancer Lett. 2005;225:1-26.

胞の増殖, HGF 刺激によるヒト NCI-H441 肺癌細胞の遊走およびマトリゲル™マトリックスへの浸潤ならびに HGF 刺激による MDCK 細胞の運動性/分散性を阻害した (表 4)。これらの c-Met/HGFR が関与する細胞機能に対する阻害濃度は, 腫瘍株化細胞における c-Met/HGFR リン酸化阻害濃度 (IC₅₀ 値= 5~24 nmol/L) と同等であった。

また, c-Met/HGFR は, 腫瘍増殖時の内皮細胞の形態形成および病的血管新生に関与している^{注1)}。クリゾチニブは, HGF 刺激によるヒト臍帯静脈内皮細胞の生存およびマトリゲル浸潤を阻害した (表 4)。これらの結果から, クリゾチニブの抗腫瘍効果は, 腫瘍細胞の増殖または生存に対する直接作用と血管新生抑制作用の双方の機序を介している可能性が示唆された。

表 4 ALK 融合蛋白質および c-Met/HGFR が関与する細胞機能に対する作用

試験系	IC ₅₀ 値	
	nmol/L	ng/mL
腫瘍細胞		
細胞増殖 (EML4-ALK V1 陽性 NCI-H3122 肺癌細胞) ^a	54	24
アポトーシス (EML4-ALK V1 陽性 NCI-H3122 肺癌細胞) ^a	110 ^c	50 ^c
細胞増殖 (NPM-ALK 陽性 Karpas 299 ALCL 細胞) ^b	60	27
細胞増殖 (GTL-16 胃癌細胞) ^b	9.7	4.4
HGF 刺激細胞遊走 (NCI-H441 肺癌細胞) ^b	11	5.0
HGF 刺激マトリゲル浸潤 (NCI-H441 肺癌細胞) ^b	6.1	2.7
HGF 刺激コロニー分散 (MDCK 細胞) ^b	16	7.2
内皮細胞		
HGF 刺激細胞生存 (HUVEC) ^b	11	5.0
HGF 刺激マトリゲル浸潤 (HUVEC) ^b	35	16

a) PF-02341066_06Oct-192308

b) PF-02341066-Pharm-001

c) EC₅₀ 値

(出典: 報告書番号 PF-02341066_06Oct-192308, Table 4 および報告書番号 PF-02341066-Pharm-001, Table 3 および 3.6.1 項)

(3) *in vivo* 標的キナーゼ阻害作用および抗腫瘍効果の作用機序

クリゾチニブについて一連の *in vivo* 試験を行い, 1) 腫瘍中の標的キナーゼ (ALK および c-Met/HGFR) の阻害作用, 2) げっ歯類の腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果, 3) 目標血漿中濃度の推定を目的とした PK/PD 解析, 4) 抗腫瘍効果の作用機序について検討した。これらの試験では, クリゾチニブの標的分子である活性化キナーゼを発現しているヒト腫瘍を免疫不全マウスに皮下移植した異種移植モデルを用いた。評価に用いたヒト腫瘍は, 1) inv(2) 染色体逆位により恒常的に活性化した EML4-ALK 融合蛋白質を発現している NCI-H3122 肺癌, 2) t(2;5) 染色体転座により NPM-ALK を発現している Karpas 299 ALCL, 3) c-Met/HGFR の遺伝子発現が増幅して恒常的に活性化している GTL-16 ヒト胃癌, 4) HGF と c-Met/HGFR の双方を発現してオートクラインループを構成している U87MG ヒト神経膠芽腫および PC-3 ヒト前立腺癌, 5) 腫瘍間質から生物学的に活性なヒト HGF を供給するためにヒト MRC5 線維芽細胞を同時移植したヒト NCI-H441 肺癌である。これらの試験結果は, 目標有効血漿中濃度 (C_{eff}) ならびにヒトにおける用量および

注1) Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett.* 2005;225:1-26.

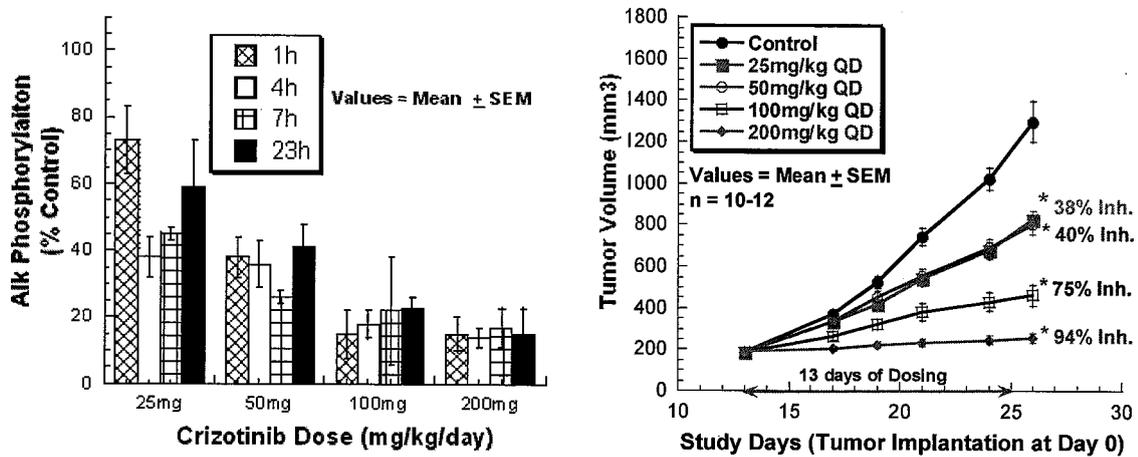
投与スケジュールの設定根拠の参考とした。なお、特記ない限り、概要文中のクリゾチニブの血漿中濃度はマウスの血漿蛋白結合率 (96.4 %) ^{注1)}を用いて補正した非結合型濃度として示した。

1) EML4-ALK 陽性 NCI-H3122 肺癌異種移植モデルにおけるクリゾチニブ経口投与時の EML4-ALK 阻害作用と抗腫瘍効果 (報告書番号 PF-02341066_06Oct_192438)

クリゾチニブの腫瘍中 EML4-ALK 阻害作用および抗腫瘍効果を検討するため、NCI-H3122 肺癌異種移植モデルにおけるクリゾチニブの 13 日間経口投与試験を実施した。経口投与後、経時的に腫瘍を採取し、腫瘍中の EML4-ALK リン酸化状態を ELISA 法で測定するとともに、腫瘍容積を腫瘍径から算出して、EML4-ALK リン酸化および腫瘍増殖に対するクリゾチニブの作用を評価した。クリゾチニブは、200 mg/kg/日で 24 時間の投与間隔全体にわたって EML4-ALK リン酸化を阻害し(投与後 1, 4, 7 および 23 時間における阻害率 83~86%), 腫瘍増殖を 94%阻害した。100 mg/kg/日では、同様に 24 時間にわたって EML4-ALK リン酸化を 77~85%阻害し、腫瘍増殖を 74%阻害した。50 mg/kg/日では、投与後 1~7 時間では 62~74%, 23 時間では 59%の EML4-ALK リン酸化阻害作用を示し、腫瘍増殖を 40%阻害した。25 mg/kg/日では、EML4-ALK リン酸化阻害作用は投与後 1 時間で 27%, 4~7 時間で 55~62%, 23 時間で 41%であり、腫瘍増殖阻害率は 38%であった (図 1, 表 5)。これらの結果から、NCI-H3122 モデルにおける抗腫瘍効果と EML4-ALK リン酸化阻害作用の関係は、100 および 200 mg/kg/日投与時にみられたように、投与間隔である 24 時間のすべてにわたる強い EML4-ALK リン酸化阻害作用 (77~86%阻害) と一致して腫瘍増殖を強く阻害 (74~94%阻害) すること、また、25 および 50 mg/kg/日投与時にみられたように、EML4-ALK 阻害作用が投与後の一部の時間帯に限られる場合は、抗腫瘍効果は有意ではあるが作用は若干弱くなる (38~40%阻害) ことが明らかとなった。この作用は、17 日間経口投与試験においてもよく再現され、クリゾチニブは 25 mg/kg/日、50 mg/kg/日および 100 mg/kg/日の経口投与でそれぞれ投与 17 日に 17%, 29%および 86%の腫瘍増殖阻害作用を示し、200 mg/kg/日では 11%の腫瘍退縮作用を示した (図 2, 表 5)。また、全ての群で投与期間中に体重が減少したが、体重減少の程度は対照群より 100 および 200 mg/kg/日の方が軽度であった。これらの結果から、EML4-ALK リン酸化を持続的にほぼ完全に阻害することが治療効果を最大にするために必要であり、また、その忍容性は良好であることが示唆された。

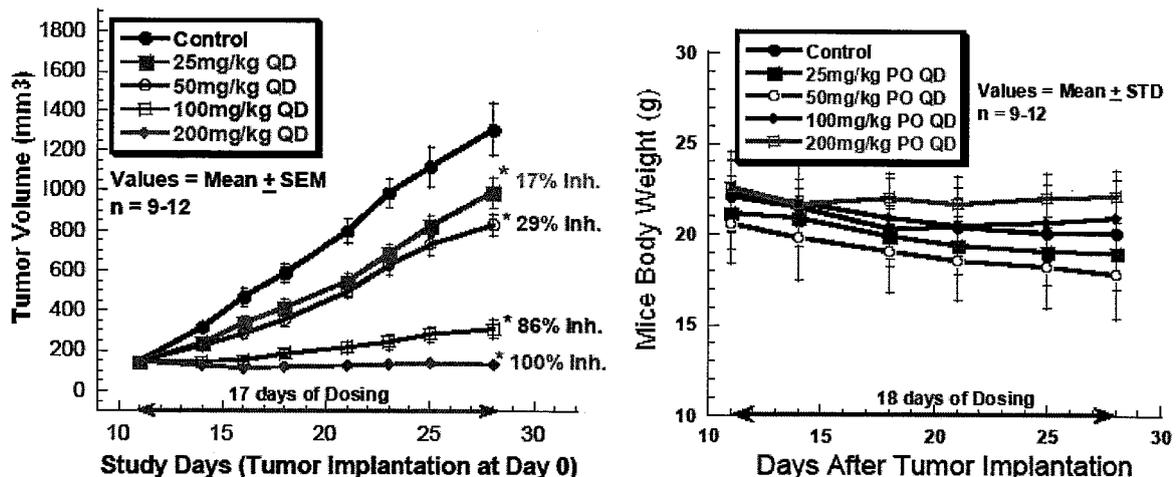
注1) 2.6.4.4 (2) 1) 項

図1 NCI-H3122 肺癌異種移植モデルにおける EML4-ALK リン酸化および腫瘍増殖に対する阻害作用



胸腺欠損マウスにヒト NCI-H3122 肺癌を異種移植し、腫瘍が定着した (180 mm³) マウスにクリゾチニブ (25, 50, 100 および 200 mg/kg/日) もしくは溶媒を 13 日間経口投与した。左図はクリゾチニブの EML4-ALK リン酸化阻害作用、右図は腫瘍増殖阻害作用を示す。腫瘍増殖阻害率は、試験 26 日の腫瘍容積に基づき、次式で算出した。100× (1-[(クリゾチニブ群の試験 26 日の腫瘍容積) - (クリゾチニブ群の試験 13 日の腫瘍容積)] / [(対照群の試験 26 日の腫瘍容積) - (対照群の試験 13 日の腫瘍容積)])。* p < 0.0001: 対照群との比較 (一元配置分散分析)。(出典: 報告書番号 PF-02341066_06Oct_192438, Figure 1)

図2 NCI-H3122 肺癌異種移植モデルにおける腫瘍増殖に対する阻害作用および体重変化



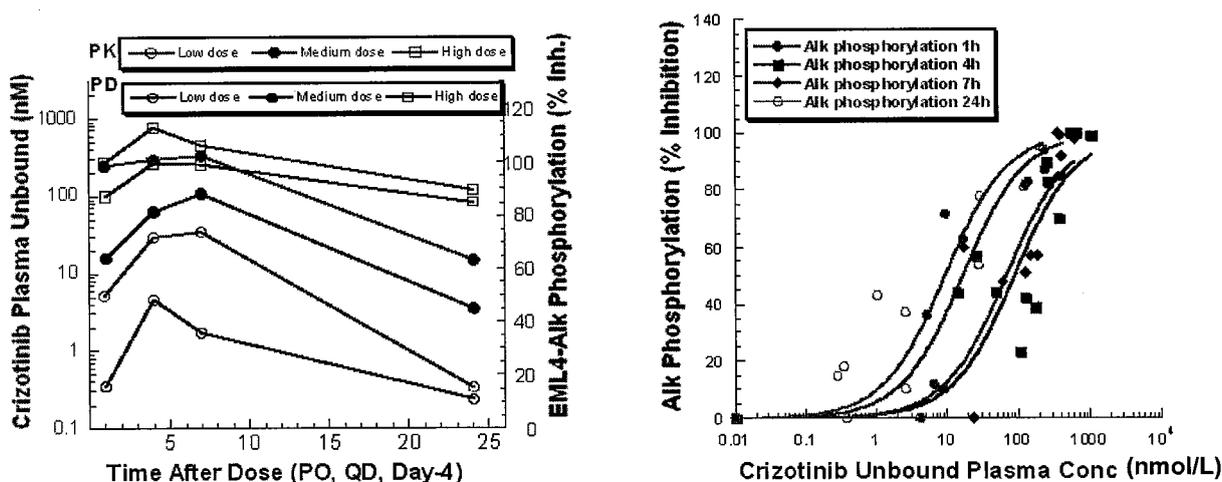
胸腺欠損マウスにヒト NCI-H3122 肺癌を異種移植し、腫瘍が定着した (140 mm³) マウスにクリゾチニブ (25, 50, 100 および 200 mg/kg/日) もしくは溶媒を 17 日間経口投与した。左図はクリゾチニブの腫瘍増殖阻害作用、右図は体重に対する影響を示す。腫瘍増殖阻害率は、試験 28 日の腫瘍容積に基づき、次式で算出した。100× (1-[(クリゾチニブ群の試験 28 日の腫瘍容積) - (クリゾチニブ群の試験 12 日の腫瘍容積)] / [(対照群の試験 28 日の腫瘍容積) - (対照群の試験 12 日の腫瘍容積)])。* p < 0.05: 対照群との比較 (一元配置分散分析)。(出典: 報告書番号 PF-02341066_06Oct_192438, Figure 2)

2) NCI-H3122 肺癌異種移植モデルにおける EML4-ALK 阻害および腫瘍増殖阻害の PK/PD 相関 (報告書番号 PF-02341066_06Oct_192438, 報告書番号 PF-02341066_01Oct_124928, 報告書番号 PF-02341066_13Oct_213230)

NCI-H3122 肺癌異種移植モデルにおけるクリゾチニブの EML4-ALK リン酸化阻害作用と血漿中濃度の関係を検討するため、クリゾチニブの 4 日間投与試験および 14 日間投与試験を実施した。

各測定時点で、非結合型血漿中濃度と ALK リン酸化阻害率について Hill 関数プロットを作成し、非結合型血漿中 EC₅₀ 濃度を算出した。反復経口投与後のクリゾチニブの血漿中濃度と EML4-ALK リン酸化阻害作用の関係から、EML4-ALK に対する薬力学的効果の経時変化は血漿中薬物濃度の経時変化に遅れることが示された (図 3)。この時間差は、血漿から標的組織への薬物の分布に起因するものと考えられた。したがって、NCI-H3122 異種移植モデルにおける EML4-ALK リン酸化阻害と血漿中濃度の関係は Link モデル^{注1)} を用いて解析した。EML4-ALK リン酸化阻害の実測値は Link モデルとよく一致した。Link モデルによると、4 日間および 14 日間投与試験における EML4-ALK リン酸化阻害作用の EC₅₀ 値は、それぞれ、51 nmol/L (23 ng/ml) および 19 nmol/L (8.6 ng/mL) と推定された。

図 3 NCI-H3122 肺癌異種移植モデルにおけるクリゾチニブ経口投与時の EML4-ALK リン酸化阻害作用の PK/PD 相関



胸腺欠損マウスにヒト NCI-H3122 肺癌を異種移植し、腫瘍が定着した (320 mm³) マウスにクリゾチニブ (25, 50, 100 および 200 mg/kg/日) もしくは溶媒を 4 日間経口投与した。左図は、クリゾチニブの血漿中濃度の経時変化 (赤色線) と EML4-ALK リン酸化阻害作用の経時変化 (青色線)。血漿中濃度は LCMS で測定し、EML4-ALK リン酸化は ELISA 法で測定した。“Low dose”, “Medium dose” および “High dose” は、それぞれ 25, 100 および 200 mg/kg/日を示す。右図は、投与後 1, 4, 7 および 24 時間におけるクリゾチニブの非結合型血漿中濃度と EML4-ALK リン酸化阻害率の Hill 関数プロット。(出典: 報告書番号 PF-02341066_06Oct 192438, Figure 3)

さらに、クリゾチニブの腫瘍増殖阻害作用の PK/PD 相関を明らかにするため、クリゾチニブの 17 日間投与試験を実施し、NCI-H3122 肺癌モデルにおける増殖阻害効果を間接反応モデル^{注2)} を用いて解析した。このロジスティック腫瘍増殖モデルは、腫瘍増殖阻害作用の経時変化と良く一致し、EC₅₀ 値は 23 nmol/L (10 ng/mL) と算出された (表 6)。

以上のように、EML4-ALK リン酸化阻害作用と腫瘍増殖阻害作用の 50%阻害濃度は同等であり、EML4-ALK リン酸化阻害作用の程度および持続時間は、抗腫瘍作用に直接的に関係していると考

注1) Sheiner LB, Stanski DR, Vozeh S et al, Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: Application to d-tubocurarine. Clin Pharmacol Ther. 1979;25:358-71.

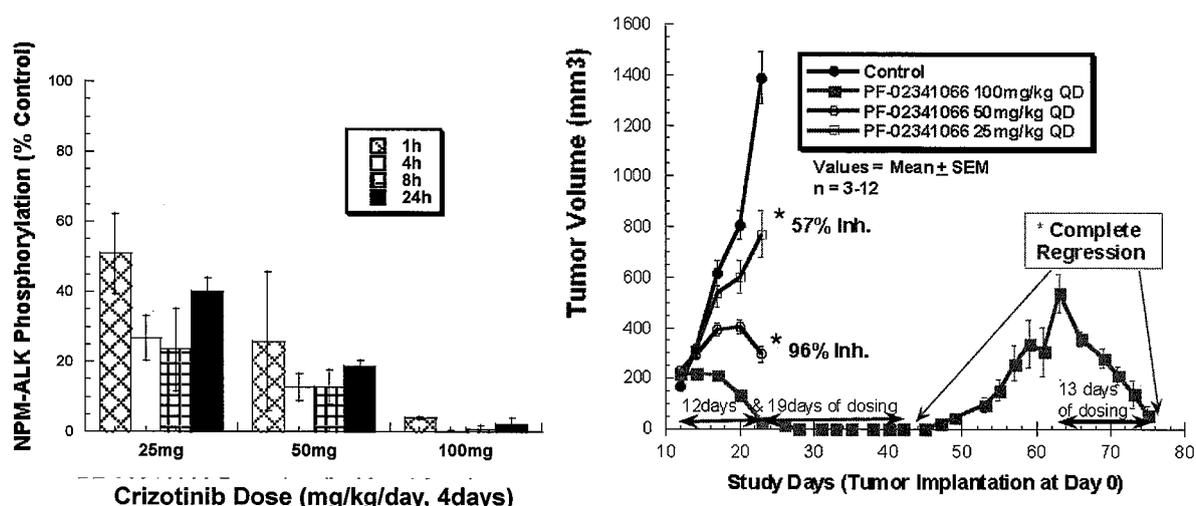
注2) Sharma A and Jusko WJ. Characteristics of indirect pharmacodynamic models and applications to clinical drug responses. Br J Clin Pharmacol. 1998; 45: 229-39.

えられた。

3) NPM-ALK 陽性 Karpas 299 ALCL モデルにおけるクリゾチニブ経口投与時の NPM-ALK 阻害作用と抗腫瘍効果（報告書番号 PF-02341066-Pharm-002）

t(2;5)染色体転座により NPM-ALK 融合蛋白質を発現する NPM-ALK 陽性 Karpas 299 ALCL モデルを用いて、クリゾチニブの NPM-ALK リン酸化阻害作用と抗腫瘍効果を検討した。クリゾチニブの 100 mg/kg/日により、投与したすべてのマウスの腫瘍は投与開始後 15 日以内に完全に退縮した（図 4）。投与開始後 31 日にクリゾチニブの投与を中止したところ、腫瘍は再び増殖した。腫瘍が 600 mm³ を超える大きさに増殖したときクリゾチニブの投与を再開し、さらに 13 日間投与したところ、再度腫瘍が完全に退縮した（図 4）。クリゾチニブの抗腫瘍効果は用量依存的であった（図 4）。腫瘍中の NPM-ALK リン酸化阻害作用と抗腫瘍効果の関係を用量と時間を振って検討したところ、100 mg/kg/日投与時の最大抗腫瘍効果（完全退縮）が得られた際は、NPM-ALK リン酸化は投与間隔（24 時間）全体にわたってほぼ完全に阻害（90%以上）されていた（図 4）。NPM-ALK リン酸化阻害の程度が低い場合（25 または 50 mg/kg/日投与時の 90%未満の阻害）は最大の抗腫瘍効果は得られなかった。

図 4 Karpas 299 ALCL 異種移植モデルにおける NPM-ALK リン酸化および腫瘍増殖に対する阻害作用



SCID マウスにヒト Karpas 299 ALCL を異種移植し、腫瘍が定着した (220 mm³) マウスにクリゾチニブ 25 および 50 mg/kg/日もしくは溶媒は 12 日間、クリゾチニブ 100 mg/kg/日は 31 日間経口投与した。クリゾチニブ 100 mg/kg/日群は 19 日間の休業の後、投与開始後 51 日から再度 13 日間投与した。左図はクリゾチニブの NPM-ALK リン酸化阻害作用、右図は腫瘍増殖阻害作用を示す。腫瘍増殖阻害率 (%) は、試験 23 日の腫瘍容積に基づき、次式で算出した。100× (1-[(クリゾチニブ群の試験 23 日の腫瘍容積) - (クリゾチニブ群の試験 12 日の腫瘍容積)] / [(対照群の試験 23 日の腫瘍容積) - (対照群の試験 12 日の腫瘍容積)])。* p < 0.001: 対照群との比較 (一元配置分散分析)。(出典: 報告書番号 PF-02341066-Pharm-002, Figure 11)

表 5 ALK 融合蛋白質陽性腫瘍モデルにおけるクリゾチニブの抗腫瘍効果 (in vivo)

腫瘍の種類	開始時腫瘍容積 (mm ³)	投与量, (mg/kg) 1日1回投与	抗腫瘍効果				p 値 ^g
			増殖阻害 % ^c (投与日数)	退縮 % ^d (投与日数)	部分奏功 ^e	完全奏功 ^f	
NCI-H3122 肺癌 (実験 1 ^a)	180	200	94% (13 日)	NA	1/10	NA	<0.0001
	180	100	74% (13 日)	NA	NA	NA	<0.0001
	180	50	40% (13 日)	NA	NA	NA	<0.0001
	180	25	38% (13 日)	NA	NA	NA	<0.0001
NCI-H3122 肺癌 (実験 2 ^a)	140	200	退縮	11% (17 日)	3/11	NA	<0.0001
	140	100	86% (17 日)	NA	NA	NA	<0.0001
	140	50	29% (17 日)	NA	NA	NA	<0.0001
	140	25	17% (17 日)	NA	NA	NA	0.018
Karpas 299 ALCL ^b	220	100	退縮	100% (16 日)	完全奏功	12/12	<0.0001
	220	50	96% (12 日)	NA	NA	NA	<0.0001
	220	25	57% (12 日)	NA	NA	NA	<0.0001
	540 ^h	100	退縮	90% (13 日)	NA	3/3	<0.0001

a) PF-02341066_06Oct-192438

b) PF-02341066-Pharm-002

c) 腫瘍増殖阻害率 (%) は $100 \times (\text{クリゾチニブ群の最終腫瘍容積} - \text{投与開始時腫瘍容積}) / (\text{対照群の最終腫瘍容積} - \text{投与開始時腫瘍容積})$ として算出した。d) 腫瘍退縮率 (%) は $100 \times [1 - (\text{最終腫瘍容積} / \text{投与開始時腫瘍容積})]$ として算出した。

e) 部分奏功は投与開始時の腫瘍容積の 30%以上の減少として定義した。

f) 完全奏功は投与開始時の腫瘍容積の 100%の減少として定義した。

g) p 値は対照群との比較で一元配置分散分析により求めた。

h) 再投与時

NA=not available

(出典：報告書番号 PF-02341066_06Oct-192438, Table 1 および報告書番号 PF-02341066-Pharm-002, Appendix Table 1)

4) ALK 融合蛋白質陽性腫瘍異種移植モデルにおける抗腫瘍効果の作用機序 (報告書番号 PF-02341066_06Oct-192438, 報告書番号 PF-02341066-Pharm-002)

ALK 融合蛋白質を発現する腫瘍モデルにおけるクリゾチニブの抗腫瘍効果の作用機序について、EML4-ALK が関与する機能に関わるシグナル伝達系 (リン酸化 STAT3, Erk, Akt および PLC γ など)^{注1)} に対する作用ならびに細胞増殖阻害作用およびアポトーシス誘導作用を検討した。

シグナル伝達系におけるクリゾチニブの作用は、NCI-H3122 肺癌モデルを用い、イムノブロット法で評価した。クリゾチニブは、50~200 mg/kg/日の用量で ALK, Erk, Akt, STAT3 および PLC γ リン酸化に対して用量依存的な抑制作用を示した (図 5)^{注2)}。また、Karpas 299 ALCL モデルにおいても、Erk, Akt, STAT3 および PLC γ の調節といった NPM-ALK が関与するシグナル伝達系に対しても用量依存的な抑制作用を示した (図 6)^{注3)}。これらの結果から、主要なシグナル伝達系に対する抑制作用と抗腫瘍効果がほぼ同じ用量範囲で発現することが明らかとなった。

また、細胞増殖阻害作用およびアポトーシス誘導作用は、それぞれのマーカーである Ki67 およびカスパーゼ-3 について免疫組織化学的手法およびイムノブロット法を用いて検討を行った。NCI-H3122 肺癌モデルで抗腫瘍効果の評価した試験で 74~94 %の腫瘍増殖阻害作用を示した 100

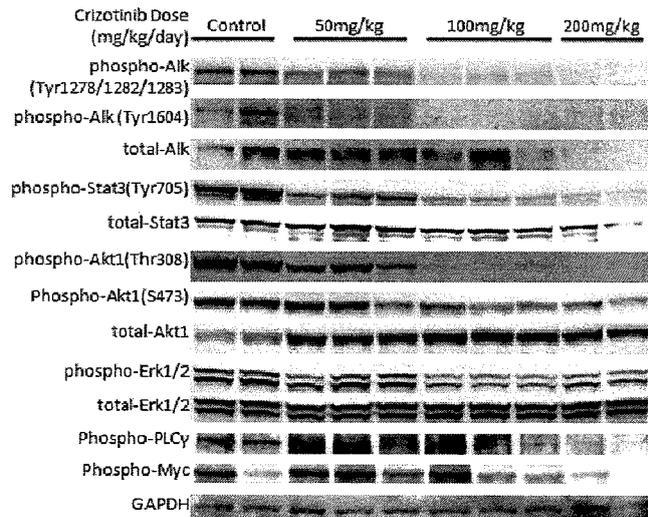
注1) Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. J Cell Physiol. 2004;199:330-58.

注2) 試験報告書 PF 02341066_06Oct-192438

注3) 試験報告書 PF-02341066-Pharm-002

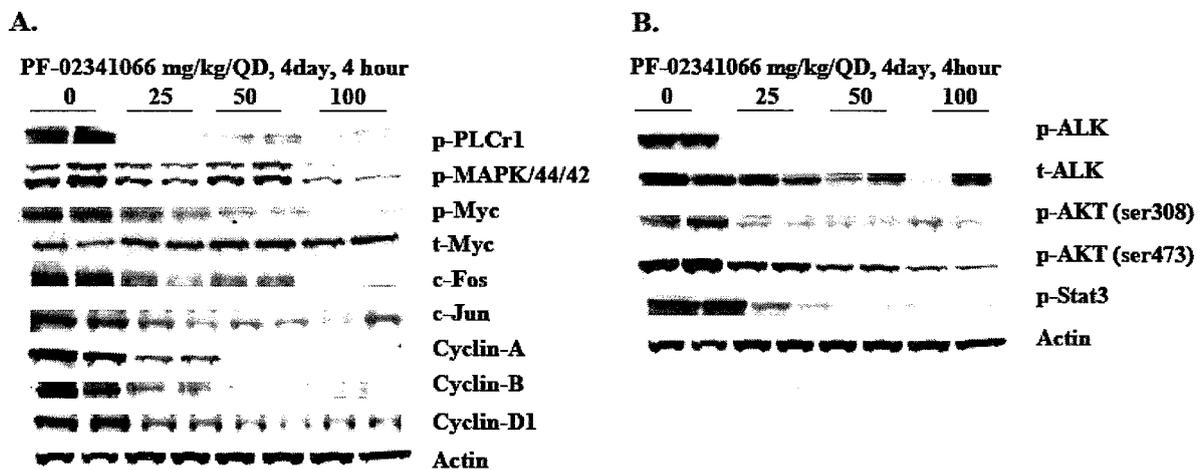
および 200 mg/kg/日において、用量依存的な Ki67 の抑制作用が認められ (図 7)、細胞増殖阻害作用が抗腫瘍効果に関連していることが示唆された²⁾。また、カスパーゼ-3 に関しては、50 および 100 mg/kg/日で用量依存的な活性化作用がみられ、200 mg/kg/日でプラトーとなったことから (図 8)、アポトーシスの増加も抗腫瘍効果の有効用量と相関することが示された。

図 5 NCI-H3122 肺癌異種移植における EML4-ALK が関与するシグナル伝達系分子に対する作用



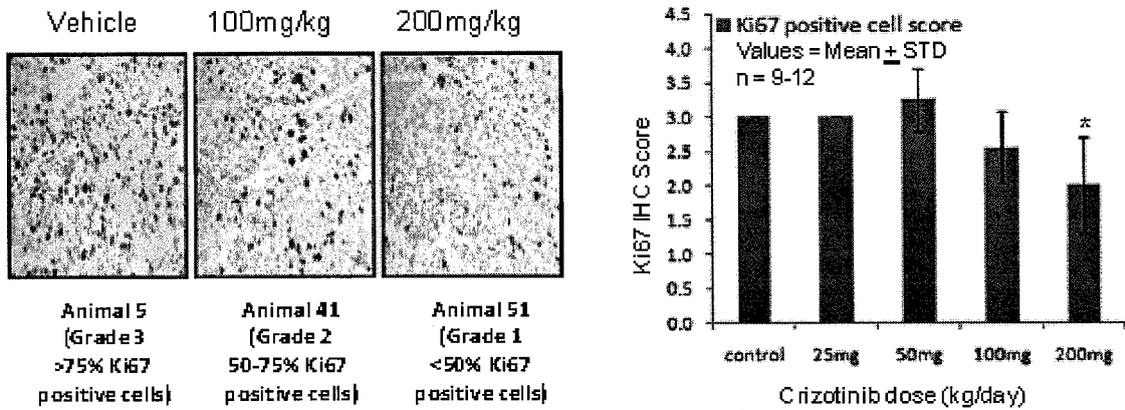
NCI-H3122 肺癌を異種移植した胸腺欠損マウスにクリゾチニブ (50, 100 および 200 mg/kg/日) もしくは溶媒を 4 日間経口投与し、最終投与 7 時間後に腫瘍組織を採取して、イムノブロット法にてシグナル伝達系分子に対するクリゾチニブの作用を評価した。(出典：報告書番号 PF-02341066_06Oct 192438, Figure 4)

図 6 Karpas 299 ALCL 異種移植モデルにおける NPM-ALK が関与するシグナル伝達系分子に対する作用



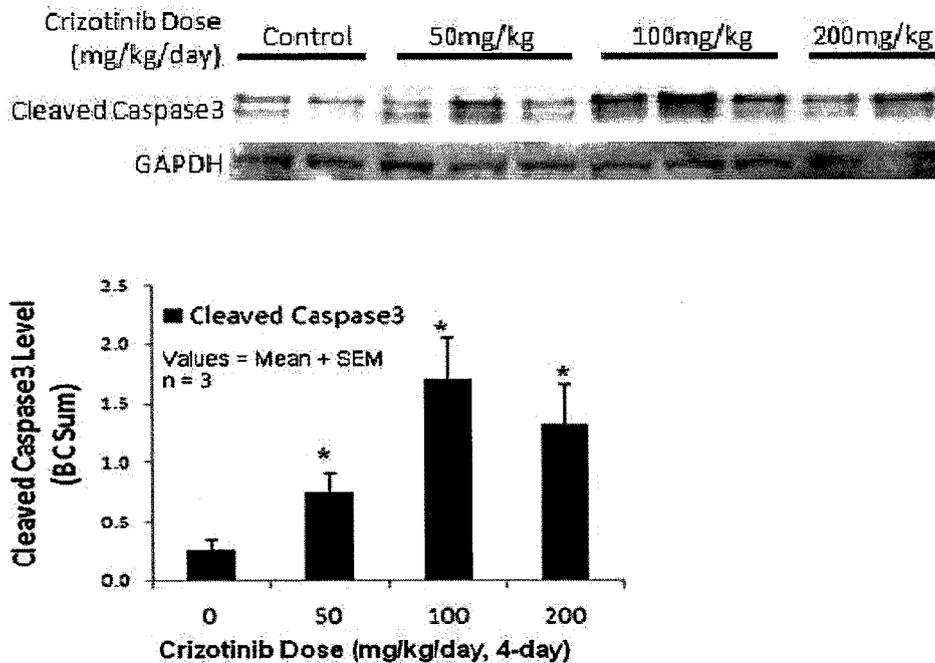
Karpas 299 ALCL を異種移植した胸腺欠損マウスにクリゾチニブ (25, 50 および 100 mg/kg/日) もしくは溶媒を 4 日間経口投与し、最終投与 4 時間後に腫瘍組織を採取して、イムノブロット法にてシグナル伝達系分子に対するクリゾチニブの作用を評価した。左図は細胞分裂に関係するシグナル伝達系分子に対する抑制作用、右図はアポトーシス抑制に関係するシグナル伝達系分子に対する抑制作用を示す。(出典 報告書番号：PF-02341066-Pharm-002, Figure 12)

図7 NCI-H3122 肺癌異種移植モデルにおける細胞増殖マーカー (Ki67) に対する作用



NCI-H3122 肺癌を異種移植した胸腺欠損マウスにクリゾチニブ (25, 50, 100 および 200 mg/kg/日) もしくは溶媒を 14 日間経口投与し、最終投与 7 時間後に腫瘍組織を採取した。Ki67 レベルは免疫組織化学的手法で測定し、Ki67 陽性細胞数の割合を対照群と比較した。* p < 0.025 : 対照群との比較 (一元配置分散分析)。(出典：報告書番号 PF-02341066_06Oct 192438, Figure 7)

図8 NCI-H3122 肺癌異種移植モデルにおけるアポトーシスマーカー (カスパーゼ-3) に対する作用



NCI-H3122 肺癌を異種移植した胸腺欠損マウスにクリゾチニブ (50, 100 および 200 mg/kg/日) もしくは溶媒を 4 日間経口投与し、最終投与 7 時間後に腫瘍組織を採取して、イムノプロット法にてカスパーゼ-3 活性化に対するクリゾチニブの作用を評価した。* p < 0.025 : 対照群との比較 (一元配置分散分析) (出典：報告書番号 PF-02341066_06Oct 192438, Figure 8)

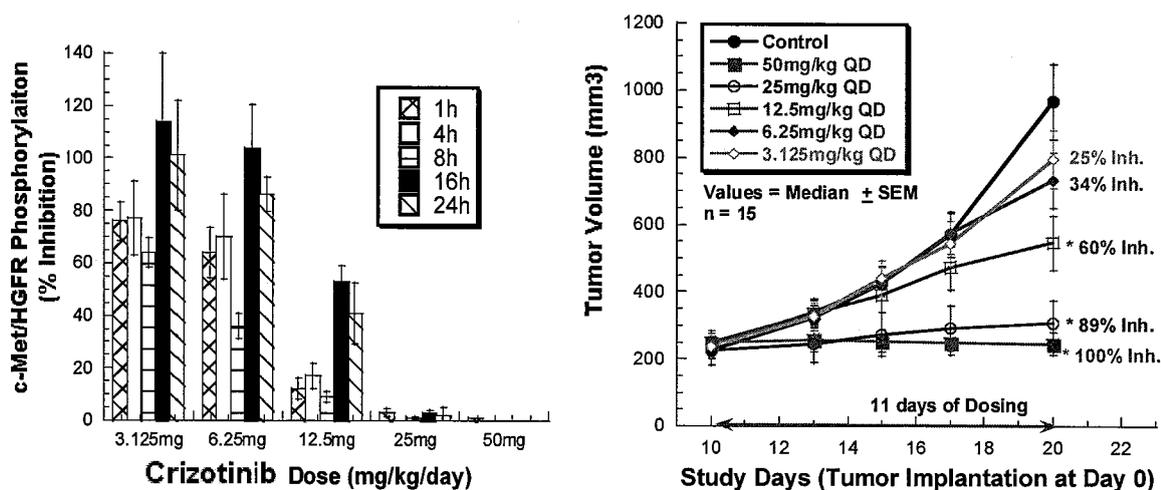
5) クリゾチニブ経口投与時の c-Met/HGFR 阻害作用と抗腫瘍効果の関係 (報告書番号 PF-02341066-Pharm-002)

クリゾチニブの c-Met/HGFR 阻害作用および抗腫瘍効果を検討するため、GTL-16 胃癌異種移植モデルを用いたクリゾチニブの単回および反復経口投与試験において経時的に腫瘍を採取し、c-Met/HGFR リン酸化および腫瘍増殖に対する作用を評価した。腫瘍中の c-Met/HGFR リン酸化状

態は ELISA 法で計測した。その結果 11 日間投与試験においては、50 mg/kg/日でクリゾチニブは投与後 24 時間にわたって GTL-16 腫瘍中の c-Met/HGFR リン酸化を完全に阻害し、腫瘍増殖も 100%阻害した。また、25 mg/kg/日においてもリン酸化および腫瘍増殖をほぼ完全に阻害した。12.5 mg/kg/日では投与後 1~8 時間では 80~90%の c-Met/HGFR リン酸化阻害作用を示したものの、16~24 時間では阻害率が 50~60%に低下し、腫瘍増殖阻害率は 60%であった。6.25 mg/kg/日では c-Met/HGFR リン酸化阻害作用は投与後 1~8 時間で 30~50%であったが、この作用は 16 時間までに消失し、統計的に有意な腫瘍増殖阻害作用は認められなかった (図 9)。

これらの結果から、GTL-16 モデルにおける抗腫瘍作用と c-Met/HGFR リン酸化阻害作用の関係は、c-Met/HGFR 活性を 24 時間にわたって完全に阻害することによって腫瘍増殖も完全に阻害されること (50 mg/kg/日で 100%の腫瘍増殖阻害)、投与間隔の一部のみの間の c-Met/HGFR 活性阻害は、最大効果に準じる効力となること (12.5 mg/kg/日で 60%の腫瘍増殖阻害)、c-Met/HGFR 活性の阻害が 50%に満たない場合 (3.125 mg/kg/日および 6.25 mg/kg/日)、有意な腫瘍増殖阻害効果はみられないことが明らかとなった (図 9)。これらの結果から、クリゾチニブの抗腫瘍効果を最大化するためには、c-Met/HGFR 阻害の持続時間が重要であり投与期間中にわたって c-Met/HGFR リン酸化をほぼ完全に阻害 (90%以上) することが必要であることが示唆された。

図 9 GTL-16 胃癌異種移植モデルにおける c-Met/HGFR リン酸化および腫瘍増殖に対する阻害作用



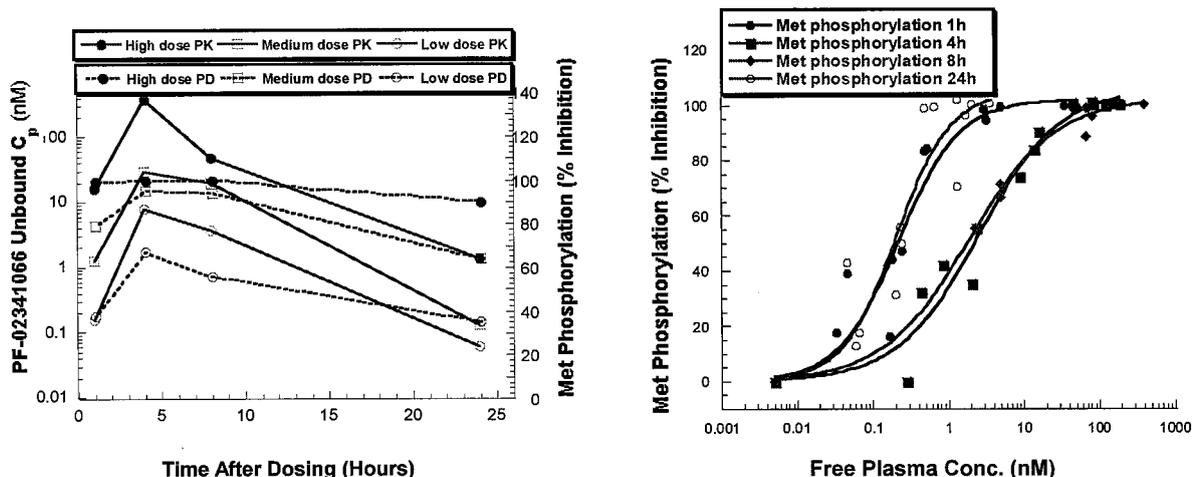
胸腺欠損マウスにヒト GTL-16 胃癌を異種移植し、腫瘍が定着した (250 mm³) マウスにクリゾチニブ (3.125, 6.25, 12.5, 25 および 50 mg/kg/日) もしくは溶媒を 11 日間経口投与した。左図はクリゾチニブの c-Met/HGFR リン酸化阻害作用、右図は腫瘍増殖阻害作用を示す。腫瘍増殖阻害率は、試験 20 日の腫瘍容積に基づき、次式で算出した。100× [(クリゾチニブ群の試験 20 日の腫瘍容積) - (クリゾチニブ群の試験 10 日の腫瘍容積)] / [(対照群の試験 20 日の腫瘍容積) - (対照群の試験 10 日の腫瘍容積)] * p < 0.001: 対照群との比較 (一元配置分散分析)。(出典: 4.2.1.1.3 報告書番号 PF-02341066-Pharm-002, Figure 1)

6) クリゾチニブ経口および皮下投与時の c-Met/HGFR リン酸化阻害の PK/PD 相関 (報告書番号 PF-02341066-Pharm-002)

クリゾチニブの血漿中濃度と c-Met/HGFR リン酸化阻害作用の関係について、血漿中 EC₉₀ 値に

着目して検討した。GTL-16 胃癌異種移植モデルにおける各測定時点について、非結合型血漿中濃度と c-Met/HGFR リン酸化阻害率の Hill 関数プロットを作成し、非結合型血漿中 EC₅₀ 濃度および EC₉₀ 濃度を算出した。これらの試験において、クリゾチニブの血漿中濃度と c-Met/HGFR リン酸化阻害の関係から、血漿中から薬物が消失しても c-Met/HGFR リン酸化阻害効果はある程度持続することが示された (図 10)。この時間差は、血漿から標的組織への薬物の分布に起因しており、PK/PD 試験においてヒステリシスループとして一般的に知られている。Hill 関数プロットにおける時間の影響を排除し、ヒトに用量/曝露量を外挿するための C_{eff} (目標有効血漿中濃度: EC₉₀) を求めるために、PK/PD モデルとして Link モデル (Sheiner 法^{注1)}) または間接反応モデル^{注2)} を用いた。これらの 2 つのモデルで算出された EC₉₀ 値 (C_{eff}) はほぼ一致しており、非結合型血漿中濃度として 12.9 nmol/L (間接反応モデル) および 12.7 nmol/L (Sheiner 法) であった (平均 12.8 nmol/L, 5.8 ng/mL) (表 6)。

図 10 GTL-16 胃癌異種移植モデルにおけるクリゾチニブ経口投与時の c-Met/HGFR リン酸化阻害作用の PK/PD 相関



胸腺欠損マウスにヒト GTL-16 胃癌を異種移植し、腫瘍が定着した (250 mm³) マウスにクリゾチニブ (8.6, 17.2 および 34 mg/kg/日) もしくは溶媒を 10 日間経口投与した。左図は、クリゾチニブの血漿中濃度の経時変化 (赤色線) と c-Met/HGFR リン酸化阻害作用の経時変化 (青色線)。血漿中濃度は LCMS で測定し、c-Met/HGFR リン酸化は ELISA 法で測定した。右図は、投与後 1, 4, 8 および 24 時間におけるクリゾチニブの非結合型血漿中濃度と c-Met/HGFR リン酸化阻害率の Hill 関数プロット。(出典 4.2.1.3.2 報告書番号 PF-02341066-Pharm-002, Figure 3)

さらに、定常状態におけるクリゾチニブ血漿中濃度 (もしくは C_{min}) と c-Met/HGFR リン酸化および抗腫瘍活性との関係を検討するため、持続注入ポンプを用いた試験を行った。GTL-16 胃癌を移植したマウスの皮下に浸透圧ミニポンプを埋め込み、1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 および 50 mg/kg/日の用量を反映するように薬液濃度を設定し、2 日間投与試験および 12 日間投与試験を実施した。これらの 2 つの試験で得られた血漿中非結合型クリゾチニブ濃度と腫瘍中 c-Met/HGFR リン酸化阻害の関係は、2 日間投与 (EC₉₀=6.8 nmol/L) と 12 日間投与 (EC₉₀=9.4 nmol/L) でほぼ同等で

注1) Sheiner LB, Stanski DR, Vozeh S et al, Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: Application to d-tubocurarine. Clin Pharmacol Ther. 1979;25:358-71.

注2) Sharma A and Jusko WJ. Characteristics of indirect pharmacodynamic models to clinical drug responses. Br J Clin Pharmacol. 1998; 45: 229-239.

あった (表 6)。また、これらの注入ポンプを用いた 2 つの試験におけるクリゾチニブの平均 EC₉₀ 値 (8.1 nmol/L, 3.6 ng/mL) は、経口投与試験の PK/PD 解析で得られた平均 EC₉₀ 値 (12.8 nmol/L) とほぼ同等であった。12 日間注入投与試験で c-Met/HGFR リン酸化を 90% 阻害することより、顕著な腫瘍増殖阻害効果が得られた。

クリゾチニブ血漿中曝露量, c-Met/HGFR 活性阻害および抗腫瘍効果の関係を総合評価した結果, c-Met/HGFR 活性阻害の程度および持続時間は、抗腫瘍効果と直接関連していること、確実な抗腫瘍効果を得るには、全投与期間にわたってほぼ完全に c-Met/HGFR を阻害する必要があることが明らかとなった。これらの結果に基づき、c-Met/HGFR 活性を 90% 阻害する最小血漿中非結合型クリゾチニブ濃度を目標有効血漿中濃度 (C_{eff}) とした。経口および持続皮下投与試験および PK/PD 解析の結果、c-Met/HGFR 阻害作用の非結合型目標 C_{eff} の範囲は 8.1 nmol/L から 12.8 nmol/L と算出された。

表 6 ALK および c-Met/HGFR に対する有効血漿中濃度のまとめ

試験系	EC ₅₀ 値もしくは EC ₉₀ 値	
	nmol/L	ng/mL
NCI-H3122 肺癌モデルにおける経口投与時の ALK リン酸化阻害 (EC ₅₀ 値) ^{a, c}	19	8.6
NCI-H3122 肺癌モデルにおける経口投与時の腫瘍増殖阻害 (EC ₅₀ 値) ^{a, d}	23	10.4
GTL-16 胃癌モデルにおける c-Met/HGFR リン酸化阻害		
経口投与 (平均 EC ₅₀ 値) ^{b, c, d}	1.0	0.5
持続皮下投与 (平均 EC ₅₀ 値) ^b	2.1	0.9
経口投与 (平均 EC ₉₀ 値) ^{b, c, d}	12.8	5.8
持続皮下投与 (平均 EC ₉₀ 値) ^b	8.1	3.6

a) PF-02341066_06Oct-192438

b) PF-02341066-Pharm-002

c) Link モデルによる PK/PD 解析

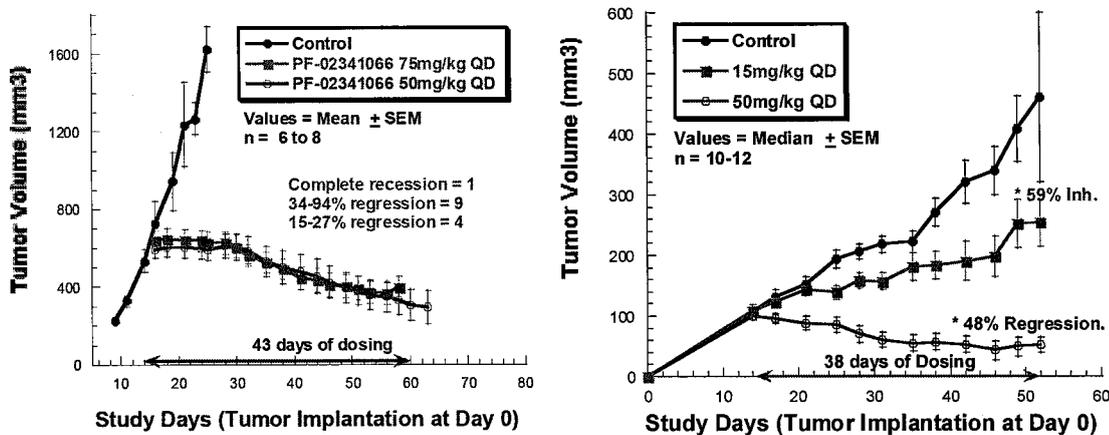
d) 間接反応モデルによる PK/PD 解析

(出典：報告書番号 PF-02341066_06Oct-192438, Table 2 および報告書番号 PF-02341066-Pharm-002, Table 1)

7) c-Met/HGFR 陽性各種ヒト腫瘍異種移植モデルにおけるクリゾチニブの腫瘍退縮効果 (報告書番号 PF-02341066-Pharm-002)

c-Met/HGFR の調節異常が関係している各種ヒト腫瘍異種移植モデルで、クリゾチニブの抗腫瘍効果の評価した。クリゾチニブは、GTL-16 胃癌モデル (平均 60% の退縮) および NCI-H441 肺癌モデル (平均 48% の退縮) において強力な腫瘍退縮効果を有することが示された (図 11, 表 7)。GTL-16 胃癌モデルにおいては、クリゾチニブの 43 日間投与 (50 および 75 mg/kg/日) により、14 例中 9 例で 30% 以上の退縮 (部分奏功) がみられ、さらに 1 例では完全奏功を示し、この動物では投薬終了 10 日後においても腫瘍の再発は認められなかった。また、NCI-H441 肺癌モデルでの検討においては、クリゾチニブの 33 日間投与 (50 mg/kg/日) により、11 例中 3 例で 30% 以上の退縮 (部分奏功) がみられ、さらに 3 例では完全奏功を示した。さらに、クリゾチニブは、50 mg/kg/日の用量で U87MG 神経膠芽腫モデル (97% の増殖阻害) および PC-3 前立腺癌モデル (84% の増殖阻害) において腫瘍増殖をほぼ完全に阻害することも示された。なお、いずれの試験においてもクリゾチニブの忍容性は良好であり、明らかな毒性は認められなかった。

図 11 GTL-16 胃癌および NCI-H441 肺癌異種移植モデルにおける腫瘍退縮効果



胸腺欠損マウスにヒト GTL-16 胃癌 (左図) および NCI-H441 肺癌 (右図) を異種移植し、腫瘍が定着したマウスにクリゾチニブもしくは溶媒を図中に示す用量および期間で経口投与した。各モデルにおけるクリゾチニブの腫瘍退縮作用を示す。腫瘍退縮率は、次式で算出した。100×[1 - (最終腫瘍容積 / 投与開始時腫瘍容積)]。* p < 0.001 : 対照群との比較 (一元配置分散分析)。(出典：報告書番号 PF-02341066-Pharm-002, Figure 6 および Figure 7)

各種ヒト腫瘍異種移植モデル (GTL-16, U87MG および NCI-H441) において、用量依存的な c-Met/HGFR のリン酸化阻害と相関した用量依存的な腫瘍増殖阻害作用が認められた (表 7)。いずれのモデルにおいても、50 mg/kg/日で完全な腫瘍増殖阻害効果または腫瘍退縮効果が得られた。GTL-16 モデルでは、50 および 75 mg/kg/日で 43 日間の投与期間中ほぼ同等の腫瘍退縮効果を示し、50 mg/kg/日の用量で最大効果が得られることが示唆された。GTL-16 および U87MG モデルでは、3.125~50 mg/kg/日の用量域で用量依存的な作用が得られた。c-Met/HGFR リン酸化阻害と抗腫瘍効果の間に用量依存的な相関関係がみられたことから、最大の抗腫瘍効果を得るためには、c-Met/HGFR 阻害の程度と持続時間を最大化する必要があることが示唆された。c-Met/HGFR 阻害作用の持続時間が重要であることは、GTL-16 モデルでの 1 日 1 回投与と 1 日 2 回投与の結果の比較からも明らかである。すなわち、GTL-16 腫瘍に対する抗増殖効果において、12.5 mg/kg の 1 日 2 回投与の効果は、25 および 50 mg/kg 1 日 1 回投与の効果と同等であり、6.25 mg/kg の 1 日 2 回投与の効果は、12.5 mg/kg 1 日 1 回投与の効果と同等であった。これらの結果から、クリゾチニブの薬効発現のためには、高い Cmax を達成することではなく、目標血漿中濃度を維持することが重要であると考えられた。

表7 ヒト腫瘍異種移植モデルにおけるクリゾチニブの用量依存的抗腫瘍効果

腫瘍の種類	開始時腫瘍容積 (mm ³)	投与量, スケジュール (mg/kg)	抗腫瘍効果				p 値 ^e
			増殖阻害 % ^a (投与日数)	退縮 % ^b (投与日数)	部分奏功 ^c	完全奏功 ^d	
GTL-16 胃癌	230	50, QD	100% (11 日)	NA	2/15	NA	<0.0001
	230	25, QD	89% (11 日)	NA	NA	NA	<0.0001
	230	12.5, QD	60% (11 日)	NA	NA	NA	0.0013
	230	6.25, QD	34% (11 日)	NA	NA	NA	0.074
	230	3.125, QD	29% (11 日)	NA	NA	NA	0.144
	230	25, BID	95% (11 日)	NA	NA	NA	<0.0001
	230	12.5, BID	84% (11 日)	NA	NA	NA	<0.0001
GTL-16 胃癌	620	75, QD	退縮	60% (43 日)	6/8	NA	<0.0001
	620	50, QD	退縮	60% (43 日)	3/6	1/6	<0.0001
U87 MG 神経膠芽腫	170	50, QD	97% (9 日)	NA	1/12	NA	<0.0001
	170	25, QD	83% (9 日)	NA	1/12	NA	<0.0001
	170	12.5, QD	71% (9 日)	NA	NA	NA	<0.0001
	170	6.25, QD	50% (9 日)	NA	NA	NA	0.0003
	170	3.125, QD	34% (9 日)	NA	NA	NA	0.0454
H441 肺癌	100	50, QD	退縮	48% (38 日)	3/11	3/11	<0.0001
	100	15, QD	59% (9 日)	NA	NA	2/12	0.0013
PC-3 前立腺癌	290	50, QD	84% (20 日)	NA	NA	NA	0.001

a) 腫瘍増殖阻害率 (%) は $100 \times (\text{クリゾチニブ群の最終腫瘍容積} - \text{投与開始時腫瘍容積}) / (\text{対照群の最終腫瘍容積} - \text{投与開始時腫瘍容積})$ として算出した。

b) 腫瘍退縮率 (%) は $1 - (\text{最終腫瘍容積} / \text{投与開始時腫瘍容積})$ として算出した。

c) 部分奏効は投与開始時の腫瘍容積の 30%以上の減少として定義した。

d) 完全奏効は投与開始時の腫瘍容積の 100%の減少として定義した。

e) p 値は対照群との比較で一元配置分散分析により求めた。

NA=not available

(出典：報告書番号 PF-02341066-Pharm-002 Appendix Table 1)

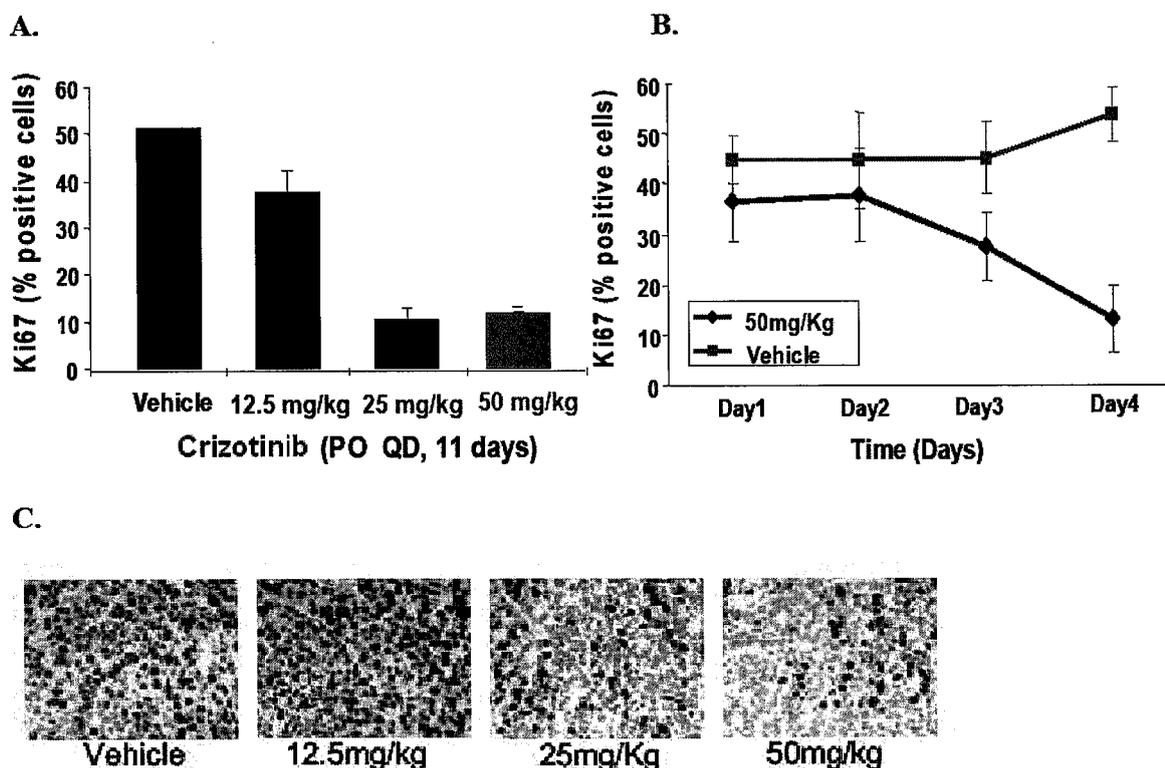
8) c-Met/HGFR 陽性腫瘍異種移植モデルにおける抗腫瘍効果の作用機序 (報告書番号 PF-02341066-Pharm-002)

c-Met/HGFR を発現する腫瘍異種移植モデルにおけるクリゾチニブの抗腫瘍効果の作用機序として、細胞増殖阻害作用、アポトーシス誘導作用および血管新生阻害作用の検討を行った。細胞増殖、アポトーシス誘導および血管新生のマーカーとして、それぞれ Ki67, カスパーゼ-3 および CD-31 について、それぞれ腫瘍組織切片を免疫組織化学的手法で評価した。クリゾチニブは、GTL-16 胃癌モデルにおいて 25 mg/kg/日および 50 mg/kg/日で Ki67 阻害作用を示し、細胞分裂阻害が抗腫瘍効果に寄与していることが示唆された (図 12)。また U87MG 神経膠芽腫モデルにおいても 50 mg/kg/日で顕著な Ki67 阻害が認められた。また、GTL-16 モデル (25 および 50 mg/kg/日) および U87MG モデル (50 mg/kg/日) でカスパーゼ-3 の活性化がみられ、アポトーシスの増加も有効用量と関連することが示された。血管新生阻害作用の検討では、GTL-16 腫瘍において 12.5, 25 および 50 mg/kg/日の用量で CD-31 陽性血管内皮細胞が用量依存的に著しく減少し、腫瘍の微小血管密度の減少と抗腫瘍効果との用量依存的な相関が示された (図 13)。一方、短期間の試験では微小血管密度への作用は弱く、この効果を得るには長期投与が必要であることが示された。なお、GTL-16 モデルとは対照的に、U87MG モデルでは微小血管密度への作用はほとんどなく、

血管新生抑制作用は腫瘍の種類に依存することが示唆された。これらの結果から、クリゾチニブの抗腫瘍効果は、腫瘍細胞の増殖または生存に対する直接的な抑制作用と血管新生抑制作用の双方の機序を介していると考えられた。

さらに、c-Met/HGFR が関与するシグナル伝達系におけるクリゾチニブの作用をイムノプロット法および免疫組織化学的手法で評価した。本検討では、c-Met/HGFR が関与するシグナル伝達系分子であるリン酸化 Erk, Akt および Gab-1^{注1)} について評価を行った。クリゾチニブは、GTL-16 モデルにおいて、12.5, 25 および 50 mg/kg/日で c-Met/HGFR (活性化ループおよび結合部位), Erk, Akt および Gab-1 のリン酸化を用量依存的に強く阻害した (図 14)。これらの結果から、クリゾチニブの抗腫瘍効果には、シグナル伝達経路への作用が関連していることが示唆された。

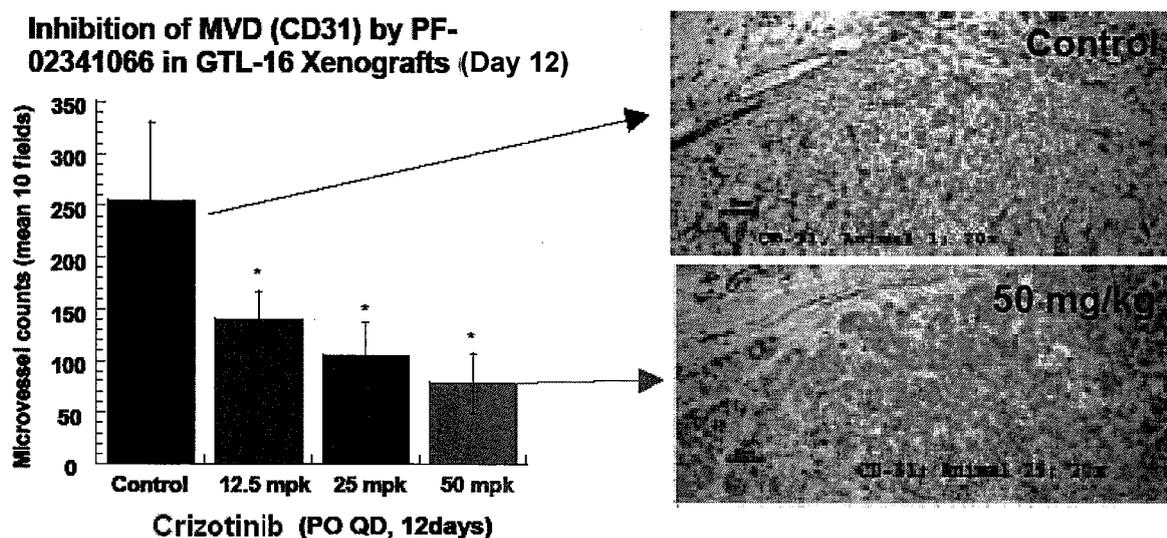
図 12 GTL-16 胃癌細胞における細胞増殖に対する阻害作用



胸腺欠損マウスに GTL-16 胃癌を異種移植し、腫瘍が定着したマウスにクリゾチニブ (12.5, 25 および 50 mg/kg/日) もしくは溶媒を経口投与した。図中に示した各投与日の投与 4 時間後に腫瘍を採取し、抗 Ki67 抗体を用いて免疫染色した。左上図 (A) および下図 (C) は、GTL-16 腫瘍の細胞増殖に対するクリゾチニブの阻害作用の用量反応性を示す。右上図 (B) は、GTL-16 腫瘍の細胞増殖に対するクリゾチニブの阻害作用の経時変化を示す。(出典: 報告書番号 PF-02341066-Pharm-002, Figure 9)

注1) Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. Cancer Lett. 2005;225:1-26

図 13 GTL-16 胃癌細胞における微小血管密度に対する阻害作用



胸腺欠損マウスに GTL-16 胃癌を異種移植し、腫瘍が定着したマウスにクリゾチニブ (12.5, 25 および 50 mg/kg/日) もしくは溶媒を経口投与した。試験 12 日の投与 4 時間後に腫瘍を採取し抗 CD-31 抗体を用いて免疫染色した。(出典：報告書番号 PF-02341066-Pharm-002, Figure10)

図 14 GTL-16 胃癌細胞における c-Met/HGFR が関与するシグナル伝達系分子に対する阻害作用



胸腺欠損マウスに GTL-16 胃癌を異種移植し、腫瘍が定着したマウスにクリゾチニブ (12.5, 25 および 50 mg/kg/日) もしくは溶媒を 12 日間経口投与した。12 日目の投与 4 時間後に腫瘍を採取し、シグナル伝達分子の各抗体にてイムノブロッティングを行った。(出典：報告書番号 PF-02341066-Pharm-002, Figure 8)

2.6.2.3 副次的薬理試験

(1) 各種受容体、酵素またはイオンチャネルに対する作用（報告書番号 901036, 報告書番号 8850568, 報告書番号 8850900_3, 報告書番号 SP7610, 概要表 2.6.3.3）

73 種の標準的な受容体、酵素またはイオンチャネルに対するクリゾチニブの作用を評価するため、最大 10 μ mol/L までの濃度で放射性リガンド結合試験および機能活性測定試験を実施した。

リガンド結合試験において、クリゾチニブが数 nmol/L～数 μ mol/L の濃度域で結合能を示した受容体、イオンチャネルおよびトランスポーター (Ki 値) は以下のとおりであった。アドレナリン α_1 (170 nmol/L), ヒスタミン H₁ (1.6 nmol/L), ムスカリン M₁ (2.4 μ mol/L), M₂ (1.3 μ mol/L), M₃ (2.1 μ mol/L), ニコチン (2.0 μ mol/L), セロトニン (5-HT_{1B}[2.4 μ mol/L], 5-HT_{2A}[2.5 μ mol/L], 5-HT_{2B}[90 nmol/L], 5-HT_{4E}[110 nmol/L], 5-HT₇[630 nmol/L]), カルシウムチャネル (27～130 nmol/L) ナトリウムチャネル (230 nmol/L), ドパミントランスポーター (590 nmol/L) およびセロトニントランスポーター (2.2 μ mol/L)。また、10 μ mol/L で 50%以上の阻害作用が認められた酵素 (IC₅₀ 値) は、ホスホジエステラーゼ 4 (7.8 μ mol/L) および p55^{fm} キナーゼ (290 nmol/L) であった^{注1)}。

上記の受容体およびトランスポーターのうち、推奨臨床用量である 250 mg 1 日 2 回投与時における非結合型 C_{max} (84 nmol/L, 38 ng/mL^{注2)}) の約 30 倍に相当する濃度以下で結合親和性を示したのものについて、さらに詳細な検討を行った。クリゾチニブは、セロトニン 5-HT_{2B} 受容体のアゴニスト結合部位に対して結合親和性を示した (Ki 値が 160 nmol/L, 72.1 ng/mL)。また、セロトニン 5-HT_{4E} 受容体 (K_b 値が 140 nmol/L, 63.0 ng/mL), 5-HT₇ 受容体 (K_b 値が 2.2 μ mol/L, 991 ng/mL) およびアドレナリン α_{1A} 受容体 (K_b 値が 40.7 nmol/L, 18.3 ng/mL) に対してアンタゴニスト活性を示した。さらに、ドパミントランスポーター (IC₅₀ 値が 630 nmol/L, 284 ng/mL) およびセロトニントランスポーター (IC₅₀ 値が 830 nmol/L, 374 ng/mL) に対する阻害作用を示した。一方、ヒスタミン, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} およびムスカリン (M₁, M₂, M₃) 受容体に対する機能活性は示さなかった。

注1) 報告書番号 901036

注2) 外国 A8081001 試験における C_{max} (411 ng/mL ; 2.7.2.3.8 項) とヒト血漿蛋白結合率 (90.7% ; 2.6.4.4 (2) 1 項) より算出

2.6.2.4 安全性薬理試験

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ついての試験を実施した。腎/泌尿器系の安全性薬理評価は、ラットおよびイヌでの毒性試験^{注1)}において腎臓系パラメータの評価および腎臓への影響の評価として実施した。特記ない限り、クリゾチニブを用い、*in vivo* 試験では0.5%メチルセルロース溶液に懸濁して経口投与した。実施した安全性薬理試験の一覧を表8に示す。特記ない限り、安全性薬理試験はGLP基準を遵守して実施した。

表8 安全性薬理試験の一覧

試験	報告書番号	試験濃度または用量
hERG 発現 HEK293 細胞を用いた hERG 電流に対する作用の評価	PF02341066HERG	0.1, 0.3, 1, 3, 10 $\mu\text{mol/L}$
摘出ラット大動脈を用いたカルシウムチャンネル拮抗作用の評価	PF02341066AORTA	0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$
単離モルモット心室筋細胞を用いたカルシウム電流に対する作用の評価	■-2796-01	1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{mol/L}$
Nav1.5 発現 CHO 細胞を用いたナトリウム電流に対する作用の評価	PF02341066NA15	0.3, 1, 3, 10 $\mu\text{mol/L}$
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	PF02341066/IC/001/■	0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$
麻酔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 (静脈内投与)	PF02341066/CG/003/■	0, 0.134, 0.295, 1.192, 1.907 mg/kg
Nav1.1 発現 HEK293 細胞を用いたナトリウム電流に対する作用の評価	PF02341066NA11	0.3, 1, 3 $\mu\text{mol/L}$
ラット神経機能に及ぼす作用の評価	3660	0, 10, 75, 500 mg/kg
ラット呼吸系機能に及ぼす作用の評価	3622	0, 10, 75, 500 mg/kg

(1) 心血管系

1) hERG 電流に対する作用 (参考資料 PF02341066HERG, 概要表 2.6.3.4)

クリゾチニブが hERG チャンネルを介するカリウム電流に及ぼす影響を、hERG チャンネルを発現させた HEK293 細胞を用いてパッチクランプ法で評価した。本試験では、クリゾチニブを用い 0.1, 0.3, 1, 3 および 10 $\mu\text{mol/L}$ での作用を評価した。なお、本試験は GLP 非適用で実施した。

クリゾチニブは、hERG 電流に対して濃度依存的に統計的に有意な抑制作用を示し (抑制率 9.8 ~ 95.5%), その IC_{20} および IC_{50} 値はそれぞれ、0.3 $\mu\text{mol/L}$ (135 ng/mL) および 1.1 $\mu\text{mol/L}$ (495 ng/mL) であった (表 9)。

注1) 2.6.6.9 (12) 3) 項

表 9 クリゾチニブの hERG 電流に対する作用

濃度 (μmol/L)	0.1	0.3	1	3	10
抑制率 (%)	9.8 ± 2.7 *	18.8 ± 4.6 *	48.2 ± 5.1 *	73.4 ± 5.9 *	95.5 ± 1.0 *

抑制率は平均値±標準誤差で示す (n=5)。* p<0.05 溶媒対照群との比較 (t-test)

2) ラット摘出大動脈におけるカルシウムチャンネルに対する作用(参考資料 PF02341066AORTA, 概要表 2.6.3.4)

クリゾチニブが血管のカルシウムチャンネルに及ぼす影響を、雄ラットから摘出した胸部下行大動脈を用い、等尺性張力測定法にて塩化カリウム誘発血管収縮に対する弛緩作用を測定することにより評価した。本試験では、クリゾチニブを用い 0.1, 1 および 10 μmol/L での作用を評価した。なお、本試験は GLP 非適用で実施した。

クリゾチニブは、添加 90 分後に定常状態となる血管弛緩作用を示し、この作用は濃度依存的で 1 および 10 μmol/L で統計的に有意であり、その IC₅₀ 値は、0.83 μmol/L (374 ng/mL) であった。(表 10)。

表 10 クリゾチニブの KCl 誘発血管収縮に対する作用

濃度 (μmol/L)	0	0.1	1	10
弛緩率 (%)	3.0 ± 1.5	7.7 ± 2.9	56.0 ± 4.2 *	94.2 ± 2.2 *

抑制率は平均値±標準誤差で示す (n=6)。* p<0.05 溶媒対照群との比較 (t-test)

3) L-タイプカルシウムチャンネルに対する作用 (参考資料 ■-2796-01, 概要表 2.6.3.4)

クリゾチニブが L-タイプカルシウム電流に及ぼす影響を、モルモットの心臓から単離した心室筋細胞を用い、パッチクランプ法で評価した。本試験では、クリゾチニブを用い 1, 3, 10, 30 および 100 μmol/L での作用を評価した。なお、本試験は GLP 非適用で実施した。

クリゾチニブは、L-タイプカルシウムチャンネル電流に対して統計的に有意な濃度依存的抑制作用を示し (抑制率 9.3~95.6%)、その IC₅₀ 値は 14.6 μmol/L (6575 ng/mL) であった (表 11)。

表 11 クリゾチニブの L-タイプカルシウムチャンネル電流に対する作用

濃度 (μmol/L)	1	3	10	30	100
抑制率 (%)	9.3 ± 0.5	17.3 ± 2.7	36.0 ± 1.9	67.7 ± 7.8	95.6 ± 3.6

抑制率は平均値±標準偏差で示す (n=3~6)。

4) Nav1.5 ナトリウムチャンネルに対する作用 (参考資料 PF02341066NA15, 概要表 2.6.3.4)

クリゾチニブが Nav1.5 チャンネルを介するナトリウム電流に及ぼす影響を、Nav1.5 チャンネルを発現させた CHO 細胞を用いてパッチクランプ法で評価した。本試験では、クリゾチニブを用い 0.3, 1, 3 および 10 μmol/L での作用を評価した。なお、本試験は GLP 非適用で実施した。

クリゾチニブは、Nav1.5 ナトリウムチャンネル電流に対して濃度依存的に統計的に有意な抑制作用を示し (抑制率 16.4~95.7%)、その IC₅₀ 値は 1.56 μmol/L (703 ng/mL) であり、およその IC₁₀

値は 0.25 $\mu\text{mol/L}$ (113 ng/mL) であった (表 12)。

表 12 クリゾチニブの Nav1.5 ナトリウムチャネル電流に対する作用

濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	0.3	1	3	10
抑制率 (%)	16.4 \pm 5.7	35.0 \pm 4.3 *	68.7 \pm 2.2 *	95.7 ^a

a) 2 例の平均値のため、有意差検定は実施せず。

抑制率は平均値 \pm 標準誤差で示す (n=2~6)。* p<0.05 溶媒対照群との比較 (t-test)

5) 摘出イヌ心臓プルキンエ線維の活動電位に対する作用 (報告書番号 PF02341066/IC/001/■■■■, 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クリゾチニブの作用を評価した。本試験では、クリゾチニブを用い、0.01, 0.1, 1 および 10 $\mu\text{mol/L}$ の濃度を 5 標本/群で漸増的に濃度を上げて適用した。0.3, 1 および 3 Hz 刺激の条件下で、静止膜電位 (RP), 活動電位振幅 (APA), 最大立ち上がり速度 (Vmax) および活動電位持続時間 (APD₅₀, APD₉₀) を評価した。

クリゾチニブは、APA および Vmax に対しては、いずれの刺激頻度においても最高濃度の 10 $\mu\text{mol/L}$ まで統計的に有意な作用を示さなかった。一方、APD₅₀ については、いずれの刺激頻度においても 10 $\mu\text{mol/L}$ で短縮が認められ、短縮の程度は高刺激頻度においてより大きかった (3 Hz で最大 18.4% の短縮)。また、APD₉₀ は、10 $\mu\text{mol/L}$ の 1 および 3 Hz 刺激下では短縮作用が認められたが (3 Hz で最大 8.1% の短縮)、0.3 Hz 刺激時には作用はみられなかった。1 $\mu\text{mol/L}$ 以下では心筋活動電位に対する影響は認められなかった (表 13)。10 $\mu\text{mol/L}$ (4503 ng/mL) でみられた心筋活動電位に対する影響は、カルシウムチャネルに対する阻害作用と一致すると考えられた。

表 13 プルキンエ線維心筋活動電位に対するクリゾチニブの作用

濃度 (μmol/L)	変化率 ^a		
	0.3 Hz	1 Hz	3 Hz
RP			
0.01	1.4 ± 0.7	1.7 ± 1.0	1.5 ± 0.9
0.1	2.0 ± 1.8	2.6 ± 1.6	3.2 ± 1.9
1	0.9 ± 2.4	1.8 ± 2.5	1.2 ± 2.2
10	0.9 ± 3.0	0.6 ± 2.6	-2.2 ± 1.6 *
APA			
0.01	-1.2 ± 0.5	-0.5 ± 0.6	-0.7 ± 0.5
0.1	-1.7 ± 0.4	-1.1 ± 0.7	-1.1 ± 0.6
1	-1.9 ± 0.4	-1.8 ± 0.8	-2.2 ± 0.9
10	-1.1 ± 0.8	-2.0 ± 0.9	-6.4 ± 4.2
Vmax			
0.01	0.4 ± 3.6	-1.3 ± 1.6	-2.8 ± 1.0
0.1	1.1 ± 4.7	0.5 ± 3.2	0.3 ± 3.7
1	-0.8 ± 3.3	-1.9 ± 2.5	-5.1 ± 3.7
10	-4.8 ± 2.7	-7.5 ± 3.2	-12.4 ± 5.5
APD ₅₀			
0.01	0.3 ± 0.6	1.5 ± 1.0	0.5 ± 0.5
0.1	6.9 ± 5.8	1.2 ± 1.7	0.2 ± 1.0
1	6.8 ± 7.0	0.7 ± 1.1	-1.6 ± 1.1
10	-6.3 ± 1.9 *	-13.4 ± 1.9 ***	-18.4 ± 2.9 ***
APD ₉₀			
0.01	1.1 ± 0.5	2.0 ± 1.1	1.0 ± 0.6
0.1	7.2 ± 6.0	1.6 ± 1.7	1.0 ± 1.0
1	8.0 ± 6.5	1.5 ± 1.2	-0.3 ± 1.1
10	4.0 ± 5.7	-6.3 ± 2.2 *	-8.1 ± 1.7 **

a 変化率は各薬液処置前の溶媒インキュベーション終了時の値に対する変化率の平均値±標準誤差を示す (n=5)。薬液処置時間は 0.3, 1 および 3Hz 時で各濃度それぞれ 34, 31 および 28 分間。
* p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 インキュベーション時間を一致させた溶媒対照群との比較 (対応のない student t-test)

6) 麻酔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 (報告書番号 PF02341066/CG/003/■, 概要表 2.6.3.4)

麻酔ビーグル犬にクリゾチニブを単回静脈内投与し、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。イソフルラン麻酔した雄ビーグル犬 (8 匹) に溶媒およびクリゾチニブを投与し、動脈血圧、左心室圧、単相性活動電位 (MAP) および心電図を記録した。計測は試験実施中連続して行い、収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、収縮期および拡張終期の左心室圧、左心室圧の上昇速度 (心筋収縮力)、心拍数、MAPD₉₀ および MAPD₁₀₀ (90 および 100 %再分極時の MAP 持続時間)、PR, QT, QRS 間隔および T 波の振幅を評価した。クリゾチニブの作用は、洞調律ならびに心拍数 150, 160, 170, 180, 190 および 200 拍/分 (bpm) のペーシング下で評価した。本試験では、クリゾチニブを用い、0.9 %生理食塩液に溶解したクリゾチニブを、0.134, 0.295, 1.192 および 1.907 mg/kg の用量で 10 分間かけて持続静脈内投与した後、さらにそれぞれ

0.00939, 0.0207, 0.0834 および 0.134 mg/kg/分の持続静脈内投与を約 25 分間行った（用量は遊離塩基として表記）。これらの用量は、予備的薬物動態試験結果^{注1)}に基づきヒトで予測される非結合同型 Ceff^{注2)} の約 100 倍の血漿中濃度が得られるように設定した。薬物投与前、10 分間のローディング投与後、25 分間の維持投与開始 10 分後および終了 5 分前に動脈血を採取し、クリゾチニブの血漿中濃度を測定した。各用量投与時の非結合同型血漿中濃度をイヌの蛋白結合率 (95.7%^{注3)}) に基づいて求めたところ、維持投与終了 5 分前では低用量から順にそれぞれ、8, 24, 84 および 164 ng/mL であった。

クリゾチニブが血行動態に及ぼす影響として、溶媒対照群との比較で、非結合同型血漿中濃度が 84 ng/mL 以上での心拍数減少（最大 33 bpm）、拡張終期の左心室圧の上昇（最大 3.47 mmHg）が認められた。164 ng/mL においては、統計的に有意な心筋収縮力の低下がみられたが、薬物投与動物における実際の心筋収縮力は投与前値と同程度であった。また、統計的に有意な拡張期血圧の低下（最大 7.5 mmHg）および統計的に有意なもののおよび平均血圧の低下が認められた。心電図パラメータに対しては、84 ng/mL 以上の非結合同型血漿中濃度で、統計的に有意な PR（最大 16.3 ミリ秒）、QRS（最大 5 ミリ秒）および QT 間隔（最大 35.5 ミリ秒）の延長が認められた。また、洞調律においてのみ 84 ng/mL 以上で統計的に有意な MAPD₁₀₀ の延長がみられたが、150 および 200 bpm ではクリゾチニブの影響は認められなかった。24 ng/mL 以下では心血管系パラメータに対するクリゾチニブの影響はみられなかった。

(2) 中枢神経系

1) Nav1.1 ナトリウムチャネルに対する作用（参考資料 PF02341066NA11, 概要表 2.6.3.4）

クリゾチニブが Nav1.1 チャネルを介するナトリウム電流に及ぼす影響を、Nav1.1 チャネルを発現させた HEK293 細胞を用いてパッチクランプ法で評価した。本試験では、クリゾチニブを用い 0.3, 1 および 3 μmol/L での作用を評価した。なお、本試験は GLP 非適用で実施した。

クリゾチニブは、Nav1.1 ナトリウムチャネル電流に対して濃度依存的に統計的に有意な抑制作用を示し、チャネル閉鎖状態および不活性化状態の IC₅₀ 値は、それぞれ 0.85 μmol/L (383 ng/mL) および 0.87 μmol/L (392 ng/mL) であった（表 14）。

表 14 クリゾチニブの Nav1.1 ナトリウムチャネル電流に対する作用

濃度 (μmol/L)	0.3	1	3
抑制率 (%), 閉鎖状態	26.2 ± 3.5 *	53.2 ± 3.0 *	80.6 ± 3.9 *
抑制率 (%), 不活性化状態	22.6 ± 4.7 *	53.2 ± 4.2 *	82.3 ± 3.9 *

抑制率は平均値±標準誤差で示す (n=4~7)。* p<0.05 溶媒対照群との比較 (t-test)

2) ラット神経機能に及ぼす作用（報告書番号 3660, 概要表 2.6.3.4）

神経系に及ぼす影響を評価するため、Sprague-Dawley ラット (8 匹/群) にクリゾチニブ (0, 10,

注1) 報告書番号 PF02341066/CG/002/

注2) 2.6.2.2. (3) 6) 項

注3) 2.6.4.4. (2) 1) 項

75 および 500 mg/kg) を単回経口投与し、症状観察（一般状態およびオープンフィールド試験）、神経筋機能試験および反射反応と活動性の評価を実施した。一般状態は投与直後および投与 3 時間後から 15 分おきに 1 時間行い、その他の試験は投与の約 4 時間後に実施した。加えて、採血を行い、血漿中薬物動態の評価に供した（4 匹/用量/測定時点）。

クリゾチニブは、10 mg/kg では神経機能に対して影響を及ぼさなかった。75 mg/kg 以上で自発運動量の低下が認められ、75 および 500 mg/kg において、それぞれ対照群との比較で 33 % および 48 % の総移動距離の減少、30 % および 65 % の立ち上がり行動回数の減少がみられた。500 mg/kg では、一般状態への影響が認められ、8 例中 2 例で流涎および呼吸困難が主に投与後 3~4 時間にみられた。また、鼻口部の汚れ（赤色）および活動性の低下が 1 例ずつ認められた。なお、神経筋機能試験、反射反応および体温に対しては、生物学的に意義のある作用はみられなかった。

以上、クリゾチニブの単回経口投与は 10 mg/kg では神経機能に影響を及ぼさなかったが、75 mg/kg 以上で自発運動量の低下を示し、500 mg/kg では軽度な一般状態の変化を示した。10 mg/kg における曝露量（非結合型 Cmax および AUC₀₋₂₄）^{注1)} は、109 ng/mL および 984 ng•h/mL（6.2 ng/mL および 56.1 ng•h/mL）、75 mg/kg では、1160 ng/mL および 17900 ng•h/mL（66.1 ng/mL および 1020 ng•h/mL）であり、500 mg/kg では 2260 ng/mL および 45000 ng•h/mL（129 ng/mL および 2565 ng•h/mL）であった。

(3) 呼吸系

1) ラット呼吸系機能に及ぼす作用（報告書番号 3622, 概要表 2.6.3.4）

呼吸系に及ぼす影響を評価するため、Sprague-Dawley ラット（8 匹/群）にクリゾチニブ（0, 10, 75 および 500 mg/kg）を単回経口投与し、全身プレチスモグラフィ検査によって、呼吸数、一回換気量および分時換気量を測定し呼吸機能に対する影響を評価した。プレチスモグラフィ検査は、投与の約 3 時間後から 120 分間行った。また、投与前および投与の約 5 時間後に一般状態観察を行った。

一般状態観察では、500 mg/kg で呼吸困難、鼻口部の汚れ（赤色）および流涎が認められた。呼吸機能に関しては、500 mg/kg で測定開始後 1~24 分に呼吸数および分時換気量の統計的に有意な低下がみられ、溶媒対照群との比較でそれぞれ 47% および 28 % の低下であった。一方、同用量および同測定時点において、一回換気量は 64 % の統計的に有意な増加を示した。500 mg/kg ではプレチスモグラフィ検査を行った 120 分間の平均として、統計的に有意な呼吸数の減少および一回換気量の増加が認められた。500 mg/kg でみられた呼吸数の減少は、神経系に及ぼす作用の検討^{注2)}で認められた活動性の低下に起因すると考えられた。また、一回換気量の増加は呼吸数の減少に伴う代償的な変化と考えられた。分時換気量は、測定開始直後の 24 分間を除き呼吸数および一回換気量の変化の影響を受けず、これは血漿中濃度の経時変化（tmax ≥ 4 時間）^{注2)}と一致しなかった。75 mg/kg の検査開始後 25~48 分においては統計的に有意な呼吸数の増加（対照群との比較で 31 %）がみられたが、この変化は持続せず、用量依存性も認められなかった。また、分時換気量

注1) ラットの血漿蛋白結合率（94.3 %、2.6.4.4 (2) 1) 項）に基づき算出。

注2) 報告書番号 3660

への影響も認められなかった。

これらの結果から、クリゾチニブは 500 mg/kg までの単回投与では呼吸系に有害作用を及ぼさないと考えられた。神経機能に及ぼす作用の検討における曝露量^{注1)}に基づくと、500 mg/kg 投与時の Cmax および AUC₀₋₂₄ は 2260 ng/mL および 45000 ng•h/mL (非結合型として 129 ng/mL および 2565 ng•h/mL)^{注1)}であった。

注1) ラットの血漿蛋白結合率 (94.3 %, 2.6.4.4 (2) 1) 項) に基づき算出

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6 考察および結論

クリゾチニブは、ALK および c-Met/HGFR を強力かつ選択的に阻害する ATP 競合性のキナーゼ阻害剤である。in vitro および in vivo で腫瘍細胞中の ALK および c-Met/HGFR ならびにこれらが関与する機能を、臨床において達成可能な血中濃度で強力かつ選択的に阻害した。さらに、c-Met/HGFR と類縁の RON キナーゼに対しても同様の阻害作用を示した。

また、クリゾチニブのヒトの主要代謝経路で生成される代謝物であるラクタム体は、in vitro 細胞レベルの試験で ALK および c-Met/HGFR に対しクリゾチニブの約 1/8~1/3 倍の阻害作用を示した。薬理活性指数 (PAI) ^{注1)} が 25% を超える場合、薬理作用に対する代謝物の寄与を検討する必要があるとされているが^{注2)}、ラクタム体のジアステレオマーである PF-06270079 および PF-06270080 の PAI は 1~2% と推定されたことから、ラクタム体のクリゾチニブ投与時の薬理作用への寄与は低いと予測された。

活性化した c-Met/HGFR または ALK 融合蛋白質を発現させた腫瘍を免疫不全マウスに移植した種々の腫瘍モデルにおいて、クリゾチニブは顕著な腫瘍退縮効果を含む抗腫瘍効果を示した。作用機序に関する試験から、クリゾチニブの抗腫瘍効果には、腫瘍細胞の増殖または生存に対する直接的な抑制作用とともに血管新生抑制作用も寄与していると考えられた。クリゾチニブの抗腫瘍効果は用量依存的であり、腫瘍中の EML4-ALK, NPM-ALK および c-Met/HGFR リン酸化に対する阻害作用との相関が認められた。また、ALK 陽性腫瘍異種移植モデルの結果および PK/PD 解析から、非結合型薬物の目標血漿中濃度は 19~23 nmol/L (9~10 ng/mL) と算出された。また、c-Met/HGFR 陽性腫瘍異種移植モデルからは、十分な抗腫瘍効果を得るためには全投与期間にわたって c-Met/HGFR の活性をほぼ完全に (90%以上) 阻害することが必要であることが示唆され、目標とする非結合型有効血漿中濃度の範囲は 8.1~12.8 nmol/L (3.6~5.8 ng/mL) と算出された。

副次的薬理試験として、73 種の標準的な受容体、酵素またはイオンチャネルに対するクリゾチニブの作用をリガンド結合試験および機能活性測定試験を実施して検討した。その結果、セロトニン 5-HT_{2B} 受容体アゴニスト結合部位への結合親和性、セロトニン 5-HT_{4E}, 5-HT₇ およびアドレナリン α_{1A} 受容体アンタゴニスト活性ならびにドパミントランスポーターおよびセロトニントランスポーター阻害活性が認められた。なお、これらの K_b 値または IC₅₀ 値は 40.7 nmol/L (18.3 ng/mL) 以上であった。また、Src キナーゼファミリーに属する p55^{fyn} キナーゼに対して阻害作用がみられ、その IC₅₀ 値は臨床推奨用量 (250 mg, BID) における非結合型 C_{max} (54 ng/mL ^{注3)}) の 2.4 倍であった。p55^{fyn} キナーゼは、全身に広く分布した T 細胞特異的なアイソフォームも報告されている^{注4)}。Fyn 欠損マウスは神経障害を発現することが報告されており^{注5)}、また、Src ファミリーにお

注1) PAI=[(代謝物の非結合型 AUC) / (未変化体の非結合型 AUC)] × [(未変化体の薬理活性) / (代謝物の薬理活性)]

注2) Leclercq L, Cuyckens F, Mannens GSJ, et al. Which human metabolites have we MIST? Retrospective analysis, practical aspects, and perspectives for metabolite identification and quantification in pharmaceutical development. Chem Res Toxicol. 2009;22:280-93.

注3) 外国 A8081001 試験における日本人の C_{max} (577 ng/mL ; 2.7.2.2 項, 表 21) とヒト血漿蛋白結合率 (90.7% ; 2.6.4.4 (2) 1) 項) より算出

注4) Thomas SM and JS Brugge. Cellular functions regulated by Src family kinases. Annu Rev Cell Dev Biol. 1997;13:513-609.

注5) Grant SGN, O'Dell TJ, Karl KA, et al. Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. Science. 1992;258:1903-10.

ける機能重複性で補償される可能性はあるものの Fyn 阻害により T 細胞の反応が変化する可能性も考えられるが^{注1)}、クリゾチニブの薬理試験においては Fyn の阻害を示唆する作用はみられなかった。

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クリゾチニブの影響について、ラットおよびイヌを用いて評価した。さらに、*in vivo* コアバッテリー試験に加え、QT 間隔延長の可能性ならびに心血管系および中枢神経系の作用に関係するカルシウムチャンネルおよびナトリウムチャンネルに及ぼす影響について *in vitro* で追加評価した。

クリゾチニブはラット摘出大動脈、モルモット心室筋細胞、イヌのプルキンエ線維を用いた系においてカルシウムチャンネル阻害作用を示し、hERG アッセイ系ではカリウムチャンネル阻害作用 (IC₂₀ 値 : 0.3 μmol/L, 135 ng/mL) を示した。また、麻酔イヌでの心血管系の検討試験では、150 および 200 bpm の心拍ペーシング下では心臓の再分極時間の指標である MAPD₁₀₀ に変化は認められず、このことは、上記のような複数のチャンネル阻害の結果であると考えられた。84 および 164 ng/mL (非結合型濃度) における洞調律下での MAPD₁₀₀ および QT 間隔の統計学的に有意な延長は、クリゾチニブ投与による心拍数の減少を反映する変化であると考えられた。イヌの 1 ヶ月間投与毒性試験では 20 mg/kg/日群の 2/6 例で投与 22 日の投与前および投与後に背景データを超える QTc 間隔の延長が認められたが、これは偶発的かつ軽度な変化と考えられた^{注2)}。イヌの 3 ヶ月間投与毒性試験では、5 mg/kg/日以上で投与 6 週および 13 週における投与前の QTc 間隔が投与開始前値より延長したが、投与前後の QTc 間隔を比較すると、血漿中薬物濃度が高い投与後の QTc 間隔は投与前値よりも延長していなかった^{注2)}。このように、イヌの反復投与毒性試験においては QTc 間隔に対して認められた影響は明確ではなかったものの、クリゾチニブは QTc 延長作用をもつ可能性が否定できないものと考えられた。麻酔イヌを用いた心血管系の検討においては血行動態への影響も認められた。すなわち、84 ng/mL [血漿中非結合型 : 250 mg を 1 日 2 回投与時のヒト曝露量 (非結合型 C_{max}) の 1.6 倍]以上の濃度で心拍数の減少が認められ、副次的薬理試験で示されたセロトニン 5-HT_{4E} 受容体に対する阻害作用との関連性が示唆された。5-HT_{4E} 受容体に対する阻害作用が及ぼす影響は実証されていないが、ヒト心房に発現している 5-HT₄ 受容体に対するアゴニスト作用が頻脈に関与しているといわれている^{注3) 注4)}。心拍数に対する影響については、クリゾチニブのドパミン取り込みトランスポーターに対する阻害作用との関連性も考えられる。また、拡張期血圧の低下が 164 ng/mL (血漿中非結合型) の濃度で認められ、クリゾチニブのカルシウムチャンネル阻害作用を反映した可能性が示唆されたが、アドレナリン α_{1A} 受容体やセロトニン 5-HT_{2B} 受容体に対する作用^{注5)}あるいはドパミンやセロトニントランスポーターへの阻害作用の可能性も考えられる。イヌの心血管系への影響の検討で認められたその他の作用は、84 ng/mL (血漿中非結合型) 以上の濃度での拡張終期の左心室圧の上昇ならびに QRS および PR 間隔の延

注1) Grant SGN, O'Dell TJ, Karl KA, et al. Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science*. 1992;258:1903-10.

注2) 2.6.6.9 (3) 項

注3) Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, et al. A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* 1990;100:879-885.

注4) Medhurst AD and Kaumann AJ. Characterization of the 5-HT₄ receptor mediating tachycardia in piglet isolated right atrium. *Br J Pharmacol* 1993;110:1023-1030.

注5) 2.6.2.3 (1) 項

長であった。これらの変化については、心拍数減少の影響が考えられるが、クリゾチニブは心筋活動電位の脱分極に影響する Nav1.5 ナトリウムチャンネルに対しても阻害作用 (IC₁₀ 値: 0.25 μmol/L, 113 ng/mL) を有していることから^{注1)}, Nav1.5 ナトリウムチャンネルに対する阻害が、164 ng/mL (血漿中非結合型) の濃度で認められた心筋収縮力の低下のみならず、QRS および PR 間隔の延長にも影響している可能性がある。なお、この心筋収縮力の低下は統計学的には有意であったものの、薬物投与動物における実際の心筋収縮力は投与前値と同程度であった。麻酔イヌでの試験結果から、心血管系に対する無作用量は 24 ng/mL (非結合型) と考えられ、250 mg を 1 日 2 回投与時の臨床曝露量 (非結合型 C_{max}) の約 0.4 倍であった。

ラットにおける神経機能に及ぼす影響の検討では、臨床推奨用量での非結合型 C_{max} の 7 倍程度の濃度で、Nav1.1 ナトリウムチャンネルの阻害作用が認められた。Nav1.1 ナトリウムチャンネルは神経細胞で活動電位を発生させる脱分極に重要な役割を果たしており、その阻害はけいれん発作の誘発に関係している可能性が報告されている^{注2)}。しかしながら、単回経口投与による試験では、75 mg/kg 以上で認められた自発運動量の低下を除き、Nav1.1 ナトリウムチャンネル阻害作用に関連した作用は、最高用量の 500 mg/kg までみられなかった。また、これまでのところ、その他の非臨床試験においてもけいれん発作は認められていない。このように Nav1.1 阻害作用に関連した作用が *in vivo* でみられていないことは、ラットの定量的全身オートラジオグラフィで示されたように^{注3)}, クリゾチニブは血液-脳関門の透過性が低いためである可能性が考えられる。したがって、血液脳関門が十分に発達した成人においては Nav1.1 阻害作用に関係する安全性上のリスクは極めて低いと考えられるが、血液-脳関門が十分に発達していない小児および血液-脳関門に障害を有する場合の使用においては、慎重を期する必要がある。なお、自発運動量の低下が認められた際、非結合型血漿中濃度は、臨床推奨用量の非結合型 C_{max} の 1.2 倍であった。

呼吸系に及ぼす影響をラットで評価した結果、非結合型血漿中濃度が臨床推奨用量の非結合型 C_{max} の 2.4 倍となる 500 mg/kg においても、クリゾチニブ投与による有害作用は認められなかった。呼吸機能測定開始直後の 24 分間にみられた呼吸数の減少は、神経系に及ぼす作用の検討で認められた活動性の低下に起因すると考えられ、また、一回換気量の増加は呼吸数の減少に伴う代償的な変化と考えられた。また測定開始後 24 分間でみられた分時換気量の減少についても血漿中の薬物濃度推移と一致せず、この作用はその後の時間帯で消失した。

以上、効力を裏付ける試験から、クリゾチニブは ALK および c-Met/HGFR を選択的に阻害して腫瘍の進行および血管新生を阻害することにより、ヒトにおいてこれらのチロシンキナーゼ受容体を発現する腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが示唆された。副次的薬理試験および安全性薬理試験の結果から、クリゾチニブはヒトで心血管系に影響を及ぼす可能性が示唆されたが、これは臨床においてモニター可能と考えられた。また、副次的薬理試験および *in vitro* 安全性薬理試験の結果から、神経機能に影響を及ぼす可能性が考えられたが、関連した作用は *in vivo* の検討では認められず、ヒトで重篤な有害作用が発現する可能性は低いことが示唆された。

注1) 2.6.2.4 (1) 項

注2) Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, et al. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nature Neuroscience* 2006;9:1142-9.

注3) 2.6.4.4 (1) 1) 項

これらの非臨床薬理試験成績は、ALK 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌の治療におけるクリゾチニブの有効性および安全性を裏付けるものと考えられた。

2.6.2.7 図表

表および図は、本文中または概要表（2.6.3）に適宜記載した。

クリゾチニブ

ザーコリ[®]カプセル 200mg

ザーコリ[®]カプセル 250mg

第2部（モジュール2）CTDの概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

ファイザー株式会社

目 次

2.6.3 薬理試験の概要表.....	3
2.6.3.1 Pharmacology: Overview.....	3
2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics	16
2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics.....	17
2.6.3.4 Safety Pharmacology	19

Test Article: Crizotinib

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics				
Potency Against Target RTKs in Biochemical and Cell-Based Assays				
Biochemical potency for inhibition of ALK	Biochemical ALK Ki and % inhibition assay using recombinant human ALK protein	In vitro	PFIZER	PF-02341066 _06Oc [REDACTED] 192308
Biochemical potency for inhibition of c-Met/HGFR	Biochemical c-Met/HGFR Ki and % inhibition assay using recombinant human c-Met/HGFR protein	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001 PF-02341066 _06Oc [REDACTED] 192308
Biochemical potency for inhibition of RON	Biochemical RON Ki and % inhibition assay using recombinant human RON protein	In vitro	PFIZER	PF-02341066 _06Oc [REDACTED] 192308
IC ₅₀ value for inhibition of EML4-ALK phosphorylation	ELISA analysis of EML4-ALK V1 phosphorylation in NCI-H3122 human NSCLC cells	In vitro	PFIZER	PF-02341066 _06Oc [REDACTED] 192308
IC ₅₀ value for inhibition of EML4-ALK phosphorylation	ELISA analysis of EML4-ALK V1 phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human EML4-ALK V1	In vitro	PFIZER	PF-02341066 _06Oc [REDACTED] 192308
IC ₅₀ value for inhibition of EML4-ALK phosphorylation	ELISA analysis of EML4-ALK V2 phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human EML4-ALK V2	In vitro	PFIZER	PF-02341066 _06Oc [REDACTED] 192308
IC ₅₀ value for inhibition of EML4-ALK phosphorylation	ELISA analysis of EML4-ALK V3a/b phosphorylation in NCI-H2228 human NSCLC cells	In vitro	PFIZER	PF-02341066 _06Oc [REDACTED] 192308
IC ₅₀ value for inhibition of EML4-ALK phosphorylation	ELISA analysis of EML4-ALK V3a phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human EML4-ALK V3a	In vitro	PFIZER	PF-02341066 _06Oc [REDACTED] 192308

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Test Article: Crizotinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
IC ₅₀ value for inhibition of EML4-ALK phosphorylation	ELISA analysis of EML4-ALK V3b phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human EML4-ALK V3b	In vitro	PFIZER	PF-02341066 _06Oc[REDACTED]192308
IC ₅₀ value for inhibition of NPM-ALK phosphorylation	ELISA analysis of NPM-ALK phosphorylation in the Karpas 299 human ALCL cells	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001 PF-02341066 _06Oc[REDACTED]192308
IC ₅₀ value for inhibition of NPM-ALK phosphorylation	Immunoblot analysis of NPM-ALK phosphorylation in Karpas 299 human ALCL cells	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of c-Met/HGFR in tumor cells	ELISA analysis of human wild type c-Met/HGFR phosphorylation in a panel of human cancer cell lines	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of c-Met/HGFR in endothelial cells	ELISA analysis of human wild type c-Met/HGFR phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of murine c-Met/HGFR	ELISA analysis of murine wild type c-Met/HGFR phosphorylation in the murine mIMCD3 kidney epithelial cells	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of canine c-Met/HGFR	ELISA analysis of canine wild type c-Met/HGFR phosphorylation in the canine MDCK kidney epithelial cells	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of human wild type c-Met/HGFR	ELISA analysis of c-Met/HGFR phosphorylation in GTL-16 human gastric carcinoma cells	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001

Test Article: Crizotinib

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
IC ₅₀ value for inhibition of canine c-Met/HGFR in MDR1 engineered cells	ELISA analysis of canine wild type c-Met/HGFR phosphorylation in the canine MDCK kidney epithelial cells engineered to express human MDR1	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of wild type c-Met/HGFR in NIH3T3 cells	ELISA analysis of human wild type c-Met/HGFR phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human wild type c-Met/HGFR	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of c-Met/HGFR-V1092I mutant	ELISA analysis of mutant c-Met/HGFR (V1092I) phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human c-Met/HGFR-V1092I	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of c-Met/HGFR-H1094R mutant	ELISA analysis of mutant c-Met/HGFR (H1094R) phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human c-Met/HGFR-H1094R	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of c-Met/HGFR-Y1230C mutant	ELISA analysis of mutant c-Met/HGFR (Y1230C) phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human c-Met/HGFR-Y1230C	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of full-length RON	ELISA analysis of RON phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human full-length RON	In vitro	PFIZER	PF-02341066 _06Oc_192308

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Test Article: Crizotinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Kinase Selectivity in Biochemical Enzyme Assays and Cell-Based Assays				
Biochemical potency on a broad panel of tyrosine and serine-threonine kinases	Biochemical IC ₅₀ and % inhibition assays using recombinant human proteins of a broad panel of tyrosine and serine-threonine kinases	In vitro	██████	PF-02341066-Pharm-001
Biochemical potency on the selected kinases	Biochemical IC ₅₀ and % inhibition assays using recombinant human proteins of the selected kinases	In vitro	██████	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of human Axl	ELISA analysis of H ₂ O ₂ -stimulated human Axl RTK phosphorylation in HUVEC cells	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of murine Axl	ELISA analysis of Gas6-stimulated murine Axl RTK phosphorylation in NIH3T3 cells	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of Tie2	ELISA analysis of EGF-stimulated human Tie2 phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human EGFR/Tie2 chimera RTK	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of Trk A	ELISA analysis of NGF-stimulated Trk A phosphorylation in PAE cells engineered to express human Trk A RTK	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of Trk B	ELISA analysis of BDNF-stimulated Trk B phosphorylation in PAE cells engineered to express human Trk B RTK	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of BCR-Abl	ELISA analysis of constitutive BCR-Abl phosphorylation in BaF3 cells engineered to express human BCR-Abl	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001

Test Article: Crizotinib

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
IC ₅₀ value for inhibition of IRK	ELISA analysis of insulin-stimulated IRK phosphorylation in HEK293 cells engineered to express human IRK	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of Lck	ELISA analysis of anti-CD3-stimulated Zap70 phosphorylation (Lck activity) in Jurkat human lymphoma cells	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of Sky	ELISA analysis of Gas6-stimulated Sky phosphorylation in NIH3T3 cells engineered to express human Sky RTK	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of VEGFR2	ELISA analysis of VEGF ₁₆₅ -stimulated VEGFR2 phosphorylation in PAE cells engineered to express human VEGFR2 RTK	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of PDGFRβ	ELISA analysis of PDGF bb-stimulated PDGFRβ phosphorylation in PAE cells engineered to express human PDGFRβ RTK	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
Effect of Crizotinib on Target RTK Dependent Oncogenic Phenotypes in Cell Assays				
IC ₅₀ value for inhibition of cell proliferation	Proliferation of EML4-ALK V1 positive NCI-H3122 and NCI-H2228 human NSCLC cells by the Cell Titer-Glo assay	In vitro	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192308
EC ₅₀ value for induction of cell apoptosis	Apoptosis of EML4-ALK V1 positive NCI-H3122 and NCI-H2228 human NSCLC cells by the cleaved Caspase3/7 assay	In vitro	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192308
IC ₅₀ value for inhibition of cell proliferation	Proliferation of NPM-ALK positive Karpas 299 human ALCL cells by MTT assays	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Test Article: Crizotinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Analysis of cell cycle distribution	Cell cycle distribution of NPM-ALK positive Karpas 299 and SU-DHL-1 human ALCL cells by FACS analysis	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
EC ₅₀ value for cell apoptosis	Apoptosis of NPM-ALK positive Karpas 299 and SU-DHL-1 human ALCL cells by A ₀ phase FACS analysis	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of cell proliferation	Proliferation of GTL-16 human gastric carcinoma cells by MTT assay	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of tumor cell migration	HGF-stimulated NCI-H441 human NSCLC cell migration in Boyden Chamber system	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of tumor cell Matrigel invasion	HGF-stimulated NCI-H441 human NSCLC cell Matrigel invasion in Boyden Chamber system	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of HGF-stimulated cell scattering	HGF-stimulated canine MDCK cell colony scatter	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of endothelial cell survival	HGF-stimulated human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) survival	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of endothelial cell Matrigel invasion	HGF-stimulated human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) Matrigel invasion	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001
IC ₅₀ value for inhibition of endothelial cell sprouting	Vascular sprouting of human microvascular endothelial cells (HMVEC)	In vitro	PFIZER	PF-02341066-Pharm-001

Test Article: Crizotinib

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Inhibition of Crizotinib Target RTKs In Vivo				
Inhibition of EML4-ALK phosphorylation in tumor xenografts in vivo	ELISA analysis of EML4-ALK V1 phosphorylation in NCI-H3122 human NSCLC tumors in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192438
Inhibition of EML4-ALK phosphorylation in tumor xenografts in vivo	Immunoblot analysis of EML4-ALK V1 phosphorylation in NCI-H3122 human NSCLC tumors implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192438
Inhibition of EML4-ALK phosphorylation in tumor xenografts in vivo	Immunoblot analysis of EML4-ALK V1 protein levels in NCI-H3122 human NSCLC tumors implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192438
Inhibition of EML4-ALK phosphorylation in tumor xenografts in vivo	IHC analysis of EML4-ALK V1 phosphorylation in NCI-H3122 human NSCLC tumors in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192438
Inhibition of NPM-ALK phosphorylation in tumor xenografts in vivo	ELISA analysis of NPM-ALK phosphorylation in Karpas 299 human ALCL tumors in SCID mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Inhibition of NPM-ALK phosphorylation in tumor xenografts in vivo	Immunoblot analysis of NPM-ALK phosphorylation in Karpas 299 human ALCL tumors in SCID mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Inhibition of NPM-ALK phosphorylation in tumor xenografts in vivo	Immunoblot analysis of NPM-ALK protein levels in Karpas 299 human ALCL tumors in SCID mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Test Article: Crizotinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Inhibition of c-Met/HGFR phosphorylation in tumor xenografts in vivo	ELISA analysis of c-Met/HGFR phosphorylation in c-Met/HGFR amplified GTL-16 human gastric carcinoma tumors implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Inhibition of c-Met/HGFR phosphorylation in tumor xenografts in vivo	Immunoblot analysis of c-Met/HGFR phosphorylation in GTL-16 human gastric carcinoma tumors implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Inhibition of c-Met/HGFR phosphorylation in tumor xenografts in vivo	Immunoblot analysis of c-Met/HGFR protein levels in GTL-16 human gastric carcinoma tumors implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Inhibition of c-Met/HGFR phosphorylation in tumor xenografts in vivo	ELISA analysis of c-Met/HGFR phosphorylation in GTL-16 human gastric carcinoma tumors implanted in athymic mice	Mini Pump Infusion	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Antitumor Efficacy of Crizotinib in Human Xenograft Models of Cancer In Vivo				
Analysis of tumor growth in athymic mice in vivo	Measured volume of EML4-ALK positive NCI-H3122 human NSCLC tumor xenografts implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192438
Analysis of tumor growth in SCID mice in vivo	Measured volume of NPM-ALK positive Karpas 299 human ALCL tumor xenograft implanted in SCID mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Analysis of tumor growth in athymic mice in vivo	Measured volume of GTL-16 human gastric carcinoma tumor xenograft implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002

Test Article: Crizotinib

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Analysis of tumor growth in athymic mice in vivo	Measured volume of GTL-16 human gastric carcinoma tumor xenografts implanted in athymic mice	Mini Pump Infusion	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Analysis of tumor growth in athymic mice in vivo	Measured volume of U87MG human glioblastoma xenografts implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Analysis of tumor growth in athymic mice in vivo	Measured volume of NCI-H441 human NSCLC tumor xenografts implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Analysis of tumor growth in athymic mice in vivo	Measured volume of PC-3 human prostate carcinoma tumor xenografts implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Analysis of tumor cell proliferation in tumor xenografts	IHC analysis of Ki67 in EML4-ALK V1 positive NCI-H3122 human NSCLC tumors implanted in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192438
Analysis of tumor cell apoptosis in tumor xenografts	Immunoblot analysis of activated Caspase3 levels in EML4-ALK V1 positive NCI-H3122 human NSCLC tumors in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192438
Analysis of tumor cell proliferation in tumor xenografts	IHC analysis of Ki67 in c-Met/HGFR amplified GTL-16 human gastric carcinoma tumors in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Analysis of tumor cell apoptosis in tumor xenografts	IHC analysis of activated Caspase3 levels in c-Met/HGFR amplified GTL-16 human gastric carcinoma tumors in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Test Article: Crizotinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Analysis of tumor microvessel density in tumor xenografts	Microvessel density as determined by IHC analysis for CD31-positive endothelial cells in GTL-16 human gastric carcinoma xenografts in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
PK/PD Understanding				
Plasma EC ₅₀ value for inhibition of EML4-ALK phosphorylation in tumor xenografts	PK/PD analysis of EML4-ALK V1 phosphorylation inhibition in tumors vs. plasma PK values in NCI-H3122 human NSCLC xenografts in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192438
Plasma EC ₅₀ value for inhibition of growth of tumor xenografts	PK/PD analysis of tumor growth inhibition vs. plasma PK values in NCI-H3122 human NSCLC xenografts in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_06Oc[REDACTED]192438
PK/PD modeling of EML4-ALK inhibition in NCI-H3122 tumor xenografts	PK/PD analysis of EML4-ALK phosphorylation inhibition in tumors vs. plasma PK values in NCI-H3122 human NSCLC xenografts in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_13Oc[REDACTED]213230
PK/PD modeling of EML4-ALK V1 inhibition in NCI-H3122 tumor xenografts	PK/PD analysis of EML4-ALK V1 phosphorylation inhibition in tumors vs. plasma PK values in NCI-H3122 human NSCLC xenografts in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066_01Oc[REDACTED]124928
Plasma EC ₅₀ and EC ₉₀ value for inhibition of c-Met/HGFR phosphorylation in tumor xenografts	PK/PD analysis of c-Met/HGFR phosphorylation inhibition in tumors vs. plasma PK values in GTL-16 human gastric carcinoma xenografts in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002

Test Article: Crizotinib

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Plasma EC ₅₀ and EC ₉₀ value for tumor growth inhibition in tumor xenografts	PK/PD analysis of tumor growth inhibition vs. plasma PK values in GTL-16 human gastric carcinoma xenografts in athymic mice	Oral Gavage	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Plasma EC ₅₀ and EC ₉₀ value for inhibition of c-Met/HGFR phosphorylation in tumor xenografts	PK/PD analysis of c-Met/HGFR phosphorylation inhibition in tumors vs. plasma PK values in GTL-16 human gastric carcinoma xenografts in athymic mice	Mini pump infusion	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Plasma EC ₅₀ and EC ₉₀ value for tumor growth inhibition in tumor xenografts	PK/PD analysis of tumor growth inhibition vs. plasma PK values in GTL-16 human gastric carcinoma xenografts in athymic mice	Mini pump infusion	PFIZER	PF-02341066-Pharm-002
Secondary Pharmacodynamics				
CEREP radioligand binding and enzyme inhibition profile	cDNA transfected cells and cell extracts from brain and peripheral tissues from human, rat, mouse, guinea pig, hamster, bovine, and dog	In vitro	████████	901036
CEREP in vitro binding and cell-based assays	5-HT _{2β} (<i>h</i>) (agonist effect) from human recombinant (CHO cells), H ₁ receptor-mediated Ca ²⁺ mobilization (<i>h</i>) (antagonist effect) from human recombinant (HEK293 cells).	In vitro	████████	8850568
CEREP in vitro cellular functional and uptake assays	Non-peptide receptors of 5-HT _{4e} , 5-HT ₇ (antagonist effect) and 5-HT ₇ (agonist effect) from Human recombinant CHO cells. Dopamine uptake from rat striatum synaptosomes and 5-HT uptake from rat brain synaptosomes	In vitro	████████	8850900_3

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Test Article: Crizotinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
In vitro receptor assays	HEK-hu5-HT _{2A} cells, HeLa-hu5-HT _{1B} cell membranes, U2OS-β-arrestin-EA cells (M1 & M3), PathHunter™ CHO-K1 CHRM2 β-arrestin cell line, CHO-rat adrenergic alpha 1 _A cells	In vitro	PFIZER	SP7610
Safety Pharmacology				
Cardiovascular assessment (hERG)	Mammalian cell (HEK293)	In vitro	PFIZER	PF02341066HERG
Cardiovascular assessment (Ca ²⁺ channel antagonism)	Rat isolated aorta	In vitro	PFIZER	PF02341066AORTA
Cardiovascular assessment (Ca ²⁺ current)	Guinea pig ventricular myocytes	In vitro	PFIZER	2796-01
Functional follow up on Nav1.5 sodium channel current	CHO cells stably transfected with human Nav1.5 gene	In vitro	PFIZER	PF02341066NA15
Cardiovascular assessment (cardiac action potential)	Isolated Purkinje fibres	In vitro	PFIZER	PF02341066/IC/001
Cardiovascular assessment	Dog/Beagle	Intravenous	PFIZER	PF02341066/CG/003
Functional follow up on Nav1.1 sodium channel current	HEK293 cells stably transfected with human Nav1.1 gene	In vitro	PFIZER	PF02341066NA11
Neurofunctional assessment	Rat/Sprague Dawley	Oral Gavage	PFIZER	3660
Pulmonary assessment	Rat/Sprague Dawley	Oral Gavage	PFIZER	3622

Test Article: Crizotinib

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
---------------	-------------	--------------------------	------------------	--------------

Pharmacodynamic Drug Interactions
Not Applicable

ALK = Anaplastic Lymphoma Kinase; HGFR = Hepatocyte Growth Factor Receptor; EML4 = Echinoderm Microtubule-associated protein like 4; NSCLC = Non-Small Cell Lung Cancer; NPM = Nucleophosmin; ALCL = Anaplastic Large Cell Lymphoma; RTK = Receptor Tyrosine Kinase; PAE = Porcine Aorta Endothelium; IHC = Immunohistochemistry; PK/PD = Pharmacokinetic/Pharmacodynamic; CHO = Chinese hamster Ovary; HEK293 = Human embryonic kidney cell line; hERG = Human ether-à-go-go related gene.

2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics

Test Article: Crizotinib

Described in 2.6.2 Pharmacology Written Summary

2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics

Test Article: Crizotinib

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Receptor, Ion Channels and Enzymes	In vitro	NA	≤ 10 μM	NA	Binding affinity in the low nM to low μM range was observed for a number of receptors and ion channels, including the adrenergic α ₁ (Ki of 170 nM), histamine H ₁ (Ki of 1.6 nM), muscarinic M ₁ (Ki of 2.4 μM), M ₂ (Ki of 1.3 μM), and M ₃ (Ki of 2.1 μM), nicotinic (Ki of 2.0 μM), serotonin (5-HT _{1B} [Ki of 2.4 μM], 5-HT _{2A} [Ki of 2.5 μM], 5-HT _{2B} [Ki of 90 nM], 5-HT _{4e} [Ki of 110 nM], 5-HT ₇ [Ki of 630 nM]), calcium (Ki of 27 to 130 nM) and sodium channels (Ki of 230 nM), dopamine transporter (Ki of 590 nM), and 5-HT transporter (Ki of 2.2 μM). Phosphodiesterase 4 and p55 ^{βγ} kinase activity was also determined with IC ₅₀ values of 7.8 μM and 290 nM, respectively.	No	901036
Receptor	In vitro	NA	≤ 10 μM	NA	Agonist site 5-HT _{2b} (IC ₅₀ of 170 nM). No activity for the H ₁ receptor-mediated Ca ²⁺ mobilization antagonist effect.	No	8850568
Receptor	In vitro	NA	≤ 30 μM	NA	Functional antagonist of the 5-HT _{4e} (IC ₅₀ of 970 nM) and antagonist but not agonist of the 5-HT ₇ (IC ₅₀ of 28 μM) serotonin receptors. PF-02341066 was also identified as an inhibitor of dopamine and 5-HT uptake (IC ₅₀ of 630 and 830 nM, respectively).	No	8850900_3

2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics

Test Article: Crizotinib

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Transmembrane receptor	In vitro	NA	≤ 10 μM	NA	No agonist activity at any of the receptors at the concentrations tested in this study. No antagonist activity at the 5-HT _{2A} (tested up to 10 μM), 5-HT _{1B} (tested up to 1 μM), muscarinic M1 (tested up to 1 μM), muscarinic M2 (tested up to 1 μM) or muscarinic M3 (tested up to 1 μM) receptor subtypes. Demonstration of antagonist activity at the rat adrenergic α _{1A} receptor with a calculated K _B value of 40.73±9.25 nM.	No	SP7610

GLP = Good Laboratory Practice; NA = Not applicable.

2.6.3.4 Safety Pharmacology

**Cardiovascular Assessment
In Vitro**

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Concentrations	Results	GLP Compliance	Study Number
hERG Patch Clamp	HEK293 cells expressing hERG channels	0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M	hERG IC ₅₀ = 1.1 μ M; hERG IC ₂₀ = 0.30 μ M	No	PF02341066HERG
Isometric Tension Assay	Rat thoracic aorta segments	0.1, 1, 10 μ M	Apparent steady-state decreases in tension achieved within 90 minutes. Concentration-dependent relaxation of a 45 mM potassium chloride induced contraction was observed with an IC ₅₀ of 0.83 μ M.	No	PF02341066AORTA
Calcium Channel Current	Freshly isolated guinea pig ventricular myocytes	1, 3, 10, 30, 100 μ M	At 1, 3, 10, 30 and 100 μ M, the cardiac L-type calcium channel was inhibited by 9.3 \pm 0.5, 17.3 \pm 2.7, 36.0 \pm 1.9, 67.7 \pm 7.8, and 95.6 \pm 3.6%, respectively, with an IC ₅₀ of 14.6 μ M, Hill coefficient 1.1.	No	2796-01
Patch-clamp	CHO stably expressing Nav1.5 channels	0.3, 1, 3, 10 μ M	16.4%, 35.0%, 68.7%, and 95.7% inhibition of Nav1.5 current at 0.3, 1, 3, 10 μ M, respectively; IC ₅₀ = 1.56 μ M. Approximate IC ₁₀ =0.25 μ M	No	PF02341066NA15
Purkinje Fibres	Dog	0.01, 0.1, 1, 10 μ M	Up to 1 μ M Crizotinib had no biologically meaningful effect on cardiac action potential. At 10 μ M, effects on cardiac action potential were observed consistent with inhibition of calcium channels.	Yes	PF02341066/IC/001

Cardiovascular Assessment**In Vivo**

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses ^a (mg/kg)	Number/Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular	Dog/Beagle	IV (under Isoflurane Anesthesia)	0 (0.9% saline) 0.134, 0.295, 1.192, 1.907 mg/kg ^b	4M	Animals given 1.192 and 1.907 mg/kg followed by 0.0834 and 0.134 mg/kg/min infusion rate, respectively had increased QRS, decreased heart rate and increased LVEDP. Increased PR-interval, and QT-interval and increased MAPD ₁₀₀ at sinus rhythm were likely secondary to the decreased heart rate at these doses. Animals given 1.907 mg/kg followed by 0.134 mg/kg/min had decreased myocardial contractility, decreased arterial blood pressure, and decreased diastolic blood pressure.	Yes	PF02341066/CG/003

Study PF02341066/CG/003 plasma concentrations:

Dose (mg/kg)	0.134	0.295	1.192	1.907
Mean Plasma concentration (ng/mL)	8 or	24 or	84 or	164 or
Steady state	19 nM	53 nM	187 nM	364 nM
Mean Plasma concentration (ng/mL) 10 minute loading	218	521	2210	3363
Dose (mg/kg/min)	0.00939	0.0207	0.0834	0.134
Mean Plasma concentration (ng/mL) post maintenance	196	557	1963	3817

2.6.3.4 Safety Pharmacology

Neurofunctional Assessment

In Vitro

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Concentrations	Results	GLP Compliance	Study Number
Patch-clamp	HEK293 stably expressing Nav1.1 channels	0.3, 1, 3 μ M	26.2%, 53.2%, and 80.6% inhibition of Nav1.1 current at 0.3, 1, 3 μ M, respectively, with an IC_{50} = 0.85 μ M for the closed state channel block. 22.6%, 53.2%, and 82.3% inhibition of Nav1.1 current at 0.3, 1, 3 μ M, respectively, with an IC_{50} of 0.87 μ M for the inactivated state channel block.	No	PF02341066NA11

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses ^a (mg/kg)	Number/Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Central Nervous System	Rat/Sprague-Dawley	Oral Gavage	0, 10, 75, 500	8M observational assessment; 8M neuromuscular testing; 8M reflexes/activity monitoring	Activity monitoring revealed at 500 mg/kg, a 48% decrease in total distance traveled and a 65% decrease in vertical movements were observed compared to controls. Clinical signs were limited to the 500 mg/kg dose group and included dyspnea and salivation in 2/8 rats, red muzzle staining 1/8 rats, and hypoactivity in 1/8 rats. C _{max} : 10, 75, and 500 mg/kg were 109, 1160, and 2260 ng/mL, respectively. AUC(0-24): 984, 17900, and 45000 ng•h/mL for 10, 75 and 500 mg/kg doses, respectively.	Yes	3660

2.6.3.4 Safety Pharmacology

Test Article: Crizotinib

**Pulmonary Assessment
In Vivo**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses ^a (mg/kg)	Number/Sex/ Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Pulmonary	Rat/ Sprague- Dawley	Oral Gavage	0, 10, 75, 500	8M	There was a 28% decrease in mean minute volume, 47% decrease in mean respiratory rate, and 64% increase in mean tidal volume, respective to vehicle controls at the first 24 minute time interval in animals given 500 mg/kg. The diminished respiratory rates at 500 mg/kg were attributed to decreased activity, as observed in the neurofunctional study. Changes in tidal volume are reflective of compensatory changes to the respiratory rate. Animals given 75 mg/kg had a 31% increase in mean respiratory rate at the 25–48 minute intervals compared with control. No adverse effects on pulmonary parameters occurred at doses up to 500 mg/kg.	Yes	3622

GLP = Good laboratory practice; min = Minutes; M = Male; IV = intravenous; MAPD = Monophasic action potential duration; LVEDP = Left ventricular end diastolic pressure; HEK293 = Human embryonic kidney cell line; hERG = Human ether-á-go-go related gene; IC₅₀ = 50% Inhibitive concentration.

^a Single dose unless specified otherwise.

^b The mono-HCl salt form of Crizotinib (PF-02341066-01; batch PF-02341066-01-0005) was delivered over 10 minutes followed by maintenance infusions of 0.00939, 0.0207, 0.0834, and 0.134 mg/kg/min for approximately 25 minutes, respectively, and compared with time-matched IV vehicle infusions over 35 minutes.