

アフアチニブマレイン酸塩

CTD 第2部 資料概要

2.4 非臨床試験の概括評価

日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社

2.4 非臨床試験の概括評価.....	1
1. 非臨床試験計画概略	4
2. 薬理試験.....	6
3. 薬物動態試験	10
4. 毒性試験.....	14
4.1 単回投与毒性試験.....	14
4.2 反復投与毒性試験.....	15
4.3 遺伝毒性試験	18
4.4 がん原性試験	20
4.5 生殖発生毒性試験.....	20
4.6 局所忍容性試験	24
4.7 その他の毒性試験.....	25
4.7.1 光安全性評価.....	25
4.8 不純物.....	26
5. 総括および結論	29
6. 参考文献.....	38

2.4 非臨床試験の概括評価

略語

ADME	Absorption, distribution, metabolism, excretion (吸収, 分布, 代謝, 排泄)
ALD	Approximate Lethal Dose (概略致死量)
Akt	Protein kinase B (プロテインキナーゼ B)
ATP	Adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
AUC	Area under curve (血漿中濃度-時間曲線下面積)
AUC ₀₋₂₄	Area under the concentration-time curve of the analyte in plasma over the time interval from 0 to 24h (時間ゼロから 24 時間後までの血漿中濃度-時間曲線下面積)
AUC _{0-24,ss}	Area under the concentration-time curve of the analyte in plasma over the time interval from 0 to 24h at steady state conditions (定常状態の時間ゼロから 24 時間後までの血漿中濃度-時間曲線下面積)
AUC _{τ,ss}	Area under the concentration-time curve of the analyte in plasma over one steady state dosing interval (定常状態の一投与期間 τ 内における血漿中濃度-時間曲線下面積)
BCRP	Breast cancer resistance protein (乳癌耐性蛋白)
BI	Boehringer Ingelheim (ベーリンガーインゲルハイム社)
BUN	Blood urea nitrogen (血中尿素窒素)
CaCo-2	Human colonic adenocarcinoma cell line (ヒト結腸癌由来細胞株)
CCK-A	Cholecystokinin A receptor (コレシストキニン受容体)
CL	Clearance
C _{max}	Maximum measured concentration of the analyte in plasma (最高血漿中濃度)
C _{max,ss}	Maximum concentration of the analyte in plasma at steady state (定常状態における最高血漿中濃度)
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products (医薬品委員会)
CYP	Cytochrome P450 (チトクロム P450)
Cys	Cysteine
DEREK	<i>In silico</i> system for structure activity relationship assessment
DNA	Deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
DP	Drug product (製剤)
DS	Drug substance (原薬)
EC ₅₀	Effective concentration 50% (50%有効濃度)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (上皮成長因子受容体)
EMA (EMA)	European Medicines Agency
ErbB	Proto-oncogene B of the avian erythroblastosis virus (AEV-H strain); ErbB1

	encodes EGFR (ニワトリ赤芽球症ウイルス (AEV-H 種) の癌原遺伝子 B ; EGFR をエンコードする ErbB1)
f_b	Fraction bound
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FGFR	Fibroblast growth factor receptor (線維芽細胞増殖因子受容体)
GD	Gestation day (妊娠日)
GLP	Good Laboratory Practice (医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準)
h	Hour(s)
H ₂	Histamine receptor 2 (ヒスタミン H ₂ 受容体)
HED	Human equivalent dose (ヒト等価用量)
HER1	Human epidermal-growth-factor-receptor 1, also known as EGFR or ErbB1 (ヒト上皮細胞成長因子受容体 1, EGFR または ErbB1 としても知られる)
HER2	Human Epidermal-growth-factor-receptor 1 related receptor 2; ErbB2 (ヒト上皮細胞成長因子受容体 2, ErbB2)
HER3	Human Epidermal-growth-factor-receptor 1 related receptor 3; ErbB3 (ヒト上皮細胞成長因子受容体 3, ErbB3)
HER4	Human Epidermal-growth-factor-receptor 1 related receptor 4; ErbB4 (ヒト上皮細胞成長因子受容体 4, ErbB4)
hERG	Human ether-a-go-go related gene (ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子)
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration (50%抑制濃度)
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (日米 EU 医薬品規制調和国際会議)
INN	International Nonproprietary Name (国際一般名称)
<i>In vitro</i>	試験管内
<i>In vivo</i>	生体内
i.v.	Intravenous (静脈内投与)
kg	Kilogram(s) (キログラム)
Jak/Stat	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (ヤヌスキナーゼ/シグナル伝達兼転写活性化因子)
LVEF	Left ventricular ejection fraction (左室駆出率)
LVdP/dt-max	Maximum of the first derivative of the left ventricular pressure against time (index for cardiac contractility) (左室内圧最大立ち上がり速度 (心収縮力の指標))
M ₁	Muscarinic acetylcholine receptor 1 (ムスカリンアセチルコリン受容体 1)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ)

mg	Milligram(s) (ミリグラム)
MTD	Maximal tolerated dose (最大耐量)
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mTOR	Mammalian target of rapamycin (哺乳類ラパマイシン標的蛋白質)
nd	Not detected
nM	Nanomolar (ナノモル)
NOAEL	A no observed adverse effect level (無毒性量)
NSCLC	Non small cell lung cancer (非小細胞肺癌)
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor (血小板由来成長因子受容体)
P-gp	Poly-glycoprotein
PI3K	phosphatidylinositide-3 kinase (ホスファチジルイノシチド-3 キナーゼ)
p.o.	Per os (oral) (経口投与)
QWBA	Quantitative whole body autoradiography
Raf	Rat fibrosarcoma (group of protein kinases) (ラット線維肉腫, プロテインキナーゼの一種)
S.	<i>Salmonella</i>
S9	Aroclor 1254-induced rat liver metabolic activation
SWP	Safety Working Party
T/C	Tumour volume of treated group/tumour volume of control group (薬物処置群の腫瘍体積/溶媒投与群の腫瘍体積)
TKI	Tyrosine kinase inhibitor (チロシンキナーゼ阻害剤)
$t_{1/2}$	Terminal half-life of the analyte in plasma (消失半減期)
t_{max}	Time from dosing to the maximum measured concentration of the analyte in plasma (最高血漿中濃度到達時間)
μg	Microgram(s)
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor (血管内皮増殖因子受容体)
V_{ss}	volume of distribution at steady state after intravenous administration
V_z	apparent volume of distribution during the terminal phase $\lambda(z)$

1. 非臨床試験計画概略

正常細胞から腫瘍細胞への形質転換は分化、転移、増殖およびアポトーシスの制御にかかわる情報伝達経路における活性化を引き起こすような多くの遺伝的な変化によって起こると考えられる。たとえば、成長因子受容体経路における発癌の活性化は、リガンドの過剰発現、受容体の過剰発現あるいは変異、不完全な受容体ダウンレギュレーション、または、他の受容体との活性化を引き起こし、これらすべての分子異常が制御不能なシグナリングならびに形質転換を引き起こすと考えられる。

細胞膜表面分子で構造的に関連のある ErbB ファミリー受容体である EGFR (epidermal growth factor receptor (ErbB1)) もしくは HER1 (human epidermal growth factor receptor 1), HER2 (ErbB2 または c-Neu), HER3 (ErbB3) および HER4 (ErbB4) は、細胞内情報伝達ネットワークについて最も広く研究されている。これらの受容体分子は、クラス I 受容体チロシンキナーゼファミリーに属している [CTD 4.3-33 (R10-0764), CTD 4.3-34 (R00-0982)]。上皮成長因子受容体 EGFR や HER2 をエンコードしている遺伝子増幅により、これらの蛋白の過剰発現やシグナル伝達の過剰な活性化を引き起こし、腫瘍細胞へ形質転換が起こる [CTD 4.3-22 (R01-0006)]。同様に、これらの受容体分子の恒常的な活性化に関連した EGFR キナーゼドメインの変異や HER3 ならびに HER4 の変異が、肺癌患者の腫瘍から同定された [CTD 4.3-1 (R04-4507), CTD 4.3-2 (R04-4508), CTD 4.3-35 (R12-1126)]。他の受容体システムと同様に、このファミリー分子はリガンド結合によって、ホモダイマーまたはヘテロダイマーを形成する。現時点ではこのリガンドは、アイソフォームを除き、13 のリガンドが知られている。この受容体システムの活性化は、2 つの細胞内チロシンキナーゼドメインが互いに近づき、続いてお互いのチロシン残基をリン酸化する。このリン酸化チロシン残基が下流のシグナル分子の配列に結合しうる部位となる。EGFR と HER4 は十分に機能を持った受容体であり、同族受容体と結合でき、本質的にキナーゼ活性を有している。HER2 に結合するリガンドは見つかっておらず、オーファン受容体であると考えられている。HER2 は主に活性化状態で存在しており、他の ErbB ファミリーと結合し、ヘテロダイマーを形成すると考えられている。すなわち、EGFR, HER3 および HER4 がヘテロダイマーのパートナーであると考えられている [CTD 4.3-36 (R10-0561), CTD 4.3-37 (R06-0981)]。HER3 はキナーゼドメインに必要な触媒残基がないため自己活性化することはないが、EGFR, HER3 および HER4 と結合することによって、細胞内シグナル伝達が行える。ErbB 受容体システムによって引き起こされる重要な下流には、Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt/mTOR, ホスホリパーゼ C, Jak/Stat 等の細胞内シグナル伝達経路が含まれる。

癌発症にクラス I 受容体チロシンキナーゼファミリーが機能的に重要であることは 1984 年に v-ErbB (ニワトリ赤芽球症ウイルスの発癌遺伝子産物がヒト EGFR 受容体の変異であった) が発見されたことにより明らかとなった [CTD 4.3-38 (R10-0929)]。この観察により腫瘍細胞は異常なシグナル伝達活性をもった正常細胞であるということが決定づけられた。同様の知見として、正常細胞へのクラス I 受容体チロシンキナーゼファミリーの受容体やリガンドの形質移入により、異所性の発現が起こり、細胞形質変換が引き起こされると考えられる [CTD 4.3-39 (R10-0761), CTD 4.3-40 (R10-0587)]。この発癌過程は *in vivo* においても確認されている。EGFR または HER2 のトランスジェニック動物は腫瘍の発現率は高い [CTD 4.3-41

(R10-0763)]。また、ヒトにおける疫学調査によって、いくつかの上皮細胞癌と ErbB 受容体シグナル伝達経路の相関性が明らかとなっている [CTD 4.3-42 (R00-0983) , CTD 4.3-43 (R02-0254) , CTD 4.3-44 (R00-0984) , CTD 4.3-45 (R00-0985)]。EGFR と同様に、乳癌ならびに卵巣癌においては HER2 または HER3 の過剰発現が浸潤や生存率に関係していることが明らかとなっている [CTD 4.3-43 (R02-0254)]。したがって、多くの腫瘍において、EGFR 経路が活性化されており、治療が可能な標的分子になりえると考えられる。EGFR/HER2 の阻害剤の臨床的な有用性は、ゲフィチニブ (肺癌) , エルロチニブ塩酸塩 (以下エルロチニブ) (肺癌, 膵臓癌) などの EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤あるいは、EGFR のモノクローナル抗体 (セツキシマブ; 結腸・直腸癌, 頭頸部癌) , HER2 モノクローナル抗体 (トラスツズマブ (遺伝子組換え) ; 乳癌, 胃癌) ならびに EGFR と HER2 の両方を阻害するラパチニブトシル酸塩水和物 (以下ラパチニブ) (乳癌) によって明らかとなっている。BIBW 2992 (以下アファチニブ) は新規の経口投与可能な 4-アニリノキナゾリン系チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) であり、ゲフィチニブやエルロチニブのような第一世代の可逆的な EGFR の選択的阻害剤と比べ 2 つの基本的な特徴が異なっている。第 1 に、アファチニブは EGFR のキナーゼ活性を強力に阻害するだけではなく、ErbB 受容体ファミリーに属する他の受容体 HER2 (ErbB2) および HER4 (ErbB4) のキナーゼ活性も阻害するため、受容体阻害の範囲が広く、ErbB ファミリーの阻害剤として、ErbB ファミリーが形成する癌に関連したホモおよびヘテロダイマーすべての活性を妨害することが期待される。第 2 に、アファチニブの分子設計では EGFR, HER2 および HER4 の ATP (アデノシン三リン酸) 結合ポケットのシステイン残基への共有結合により受容体分子を長時間阻害し、血漿中濃度が阻害濃度未満に低下した後も長時間の阻害が維持される。なお、EGFR キナーゼドメイン活性部位の 797 位システイン残基へのアファチニブの共有結合は、X 線構造解析によって明らかにされている [CTD 4.2.1.1-6 (U-1264)]。

詳細な薬理試験で、種々の *in vitro* の分子および細胞アッセイならびにヒト腫瘍細胞株の異種移植 (担癌) マウスモデル, トランスジェニックマウスモデルを含む *in vivo* の系で ErbB 依存プロセスに対するアファチニブの阻害能を検討した。多くの実験でゲフィチニブ, canertinib, エルロチニブ, ラパチニブなどのキナーゼ阻害剤を対照薬として使用した。

2. 薬理試験

詳細な薬理試験で、種々の *in vitro* の分子および細胞アッセイならびにヒト腫瘍細胞株の異種移植（担癌）マウスモデル、トランスジェニックマウスモデルを含む *in vivo* の系で ErbB 依存プロセスに対するアファチニブの阻害能を検討した。多くの実験でゲフィチニブ、canertinib, エルロチニブ, ラパチニブなどのキナーゼ阻害剤を対照薬として使用した。

アファチニブの *in vitro* 阻害作用および選択性はヒト組換えプロテインキナーゼドメインを用いた酵素アッセイで測定した。アファチニブにより、EGFR キナーゼ活性は阻害され、IC₅₀（50%抑制濃度）は 0.5 nM であった。HER2 の IC₅₀ は 14 nM, HER4 の IC₅₀ は 1.1 nM であった [CTD 4.2.1.1-1 (U-1351), CTD 4.2.1.1-2 (U-2645)]。また、アファチニブの阻害活性は 30 種類を超えるチロシンおよびセリン/スレオニンプロテインキナーゼの試験パネルで検討されており [CTD 4.2.1.1-1 (U-1351), CTD 4.2.1.1-3 (U-1265)]、アファチニブ 10 μM によって検討したキナーゼ類の酵素活性に対して明らかな影響はなく、アファチニブの高い選択性が示唆された。

アファチニブの阻害作用は短時間受容体リン酸化アッセイにおいて細胞レベルでも確認しており（EGFR : IC₅₀=13 nM, A431 細胞, HER2 : IC₅₀=35 nM, BT-474 細胞）、アファチニブが細胞内の分子標的に到達し、低ナノモル水準の濃度で阻害作用を発揮することが明らかとなった [CTD 4.2.1.1-4 (U-1391)]。このデータと同様に、アファチニブは 96 時間細胞増殖アッセイにおいても NCI-N87 および BT-474 細胞の増殖を阻害し、それらの IC₅₀ はそれぞれ 4 および 12 nM であった [CTD 4.2.1.1-4 (U-1391)]。さらに、キナーゼへの不可逆的結合により長時間の阻害作用が得られることが、A431 細胞での細胞洗浄試験によって明らかとなった [CTD 4.2.1.1-5 (U-1086)]。可逆的 EGFR 阻害剤による受容体活性化阻害の持続時間は、不可逆的阻害剤とは異なり短く、洗浄処理の 8 時間後に細胞は完全に回復した。アファチニブまたは他の不可逆的阻害剤で処理した細胞では 48 時間以内に完全に回復した。

アファチニブ/EGFR プロテインキナーゼドメイン複合体の構造解析によりアファチニブが実際に Cys⁷⁹⁷ と共有結合していることが明らかとなった [CTD 4.2.1.1-6 (U-1264)]。これにより洗浄実験のデータが裏付けられるとともに、最初の構造的および化学的仮定が確実なものとなった。

2004 年、2 つの研究グループは別々に、第一世代 EGFR-TKI（エルロチニブ、ゲフィチニブ）が有効である非小細胞肺癌（NSCLC）患者の腫瘍に、EGFR キナーゼドメイン内に活性型変異があることを報告した [CTD 4.3-1 (R04-4507), CTD 4.3-2 (R04-4508)]。それ以降、T790M 変異のように、エルロチニブおよびゲフィチニブ非感受性のものを含めて多数の活性型 EGFR および HER2 変異が報告されている [CTD 4.3-3 (P09-09950)]。社内試験ではアファチニブが酵素キナーゼアッセイに加え、第一世代阻害剤に耐性の変異を含む種々の変異型 EGFR アイソフォームを有する培養 NSCLC 細胞株で阻害活性を示すことを明らかにした [CTD 4.2.1.1-7 (U-1338)]。

アファチニブの *in vivo* における作用を、免疫不全ヌードマウスでの種々の腫瘍細胞株の担癌モデルで評価した。典型的な実験ではヒト腫瘍細胞株をヌードマウスに皮下移植した。平均体積約 100 mm³ の腫瘍が生着した担癌マウスを被験物質投与群と対照群に無作為に割り付け、

アファチニブ 20 mg/kg (60 mg/m²) または溶媒を連日経口投与し、有効性の測定指標として T/C 比 (薬物処置群の腫瘍体積/溶媒投与群の腫瘍体積) の中央値を測定した。また、トランスジェニックマウスを用いた試験も実施した。

肺癌 アファチニブ単独投与による抗腫瘍作用が複数のヒト肺癌担癌モデルおよび2つのトランスジェニックマウスモデルで立証された。NCI-H1781 腫瘍細胞株は HER2 キナーゼドメイン内の活性型変異 (HER2^{G776insV G/C}) に起因すると推定されており、このモデルでアファチニブは効果を示した [CTD 4.3-4 (P09-00886)]。NCI-H1975 NSCLC 細胞株は EGFR 内の活性型変異 (L858R) に加え、ゲフィチニブおよびエルロチニブ耐性を起こすと報告されている T790M 変異を有する。アファチニブはヌードマウスに生着した NCI-H1975 腫瘍の増殖を完全に抑制した [CTD 4.3-5 (P08-06904)]。肺に HER2^{YVMA} または EGFR^{L858R/T790M} のいずれかを発現するトランスジェニックマウスでは生後数週間以内に大型の肺の癌腫が発現する。この担癌マウスにアファチニブを投与したところ腫瘍の退縮傾向を示し、エルロチニブ/ゲフィチニブ療法が無効であった患者でアファチニブが治療の選択肢となる可能性が示唆された [CTD 4.3-4 (P09-00886), CTD 4.3-5 (P08-06904)]。

乳癌 アファチニブは HER2 遺伝子増幅およびトラスツズマブ感受性を特徴とする MDA-MB-453 乳癌モデルにおいて、腫瘍の増殖を完全に抑制した (T/C 比=3% [CTD 4.2.1.1-11 (U-1703)])。HER2 過剰発現ではあるもののトラスツズマブ耐性である乳癌モデル SUM-190 で、アファチニブは T/C 比 11%と腫瘍の増殖を強く阻害し、トラスツズマブ耐性における EGFR シグナル伝達の役割が示唆された [CTD 4.2.1.1-16 (U-1455)]。アファチニブは、エストロゲン依存性ヒト乳癌 MCF-7 の担癌マウスで腫瘍の増殖を中等度に阻害した (T/C 比=48%, [CTD 4.2.1.1-14 (U-1301)])。アファチニブはトリプルネガティブ乳癌のモデル (SUM-149) でも非常に有効であった (T/C 比=5%, [CTD 4.2.1.1-15 (U-1454)])。

その他の癌 アファチニブの有効性は EGFR 過剰発現の A431 外陰部扁平上皮癌細胞株の担癌マウスで高く、腫瘍の退縮が誘発され (T/C 比=2%)、被験動物での忍容性は良好であった [CTD 4.2.1.1-8 (U-1702)]。アファチニブ投与は卵巣癌モデルの SKOV-3 (HER2 遺伝子増幅) および HER2 過剰発現の NCI-N87 胃癌モデルにおいて、それぞれの T/C 比は 3%および 0~4%と阻害作用を示した [CTD 4.2.1.1-10 (U-1660), CTD 4.2.1.1-12 (U-1614), CTD 4.2.1.1-13 (U-2532)]。

併用療法 アファチニブとドセタキセル [CTD 4.2.1.1-17 (U-1342)], BI の開発中の血管新生阻害剤 (INN:) [CTD 4.2.1.1-18 (U-1940), CTD 4.2.1.1-20 (U-2392), CTD 4.2.1.1-21 (U-2665), CTD 4.2.1.1-19 (U-1036)], mTORC1 阻害剤ラパマイシン [CTD 4.3-4 (P09-00886), CTD 4.3-6 (P08-06904)] など他の薬剤との併用投与を検討し、また放射線療法 [CTD 4.2.1.1-22 (U-2147), CTD 4.3-6 (P07-14966)] との併用も検討した。Regales ら [CTD 4.3-7 (P09-12297)] は EGFR^{L858R/T790M} トランスジェニックモデルを用い、セツキシマブ (遺伝子組換え) (抗 EGFR モノクローナル抗体) とアファチニブの併用によって EGFR を標的とすることは、単独療法のアプローチよりも優れていることを明らかとした。

薬物動態解析 上述したヒト腫瘍担癌モデルにおいて、抗腫瘍活性が得られる最高の血漿中アフチニブ濃度は 80~285 nM であり、対応する AUC_{0-24} の範囲は 0.6~3.2 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ であった。これらは、臨床試験においてアフチニブ 50 mg/日を投与した時の最高血漿中濃度 $C_{\text{max,ss}}$ 158 nM (77 ng/mL) と $AUC_{\tau,ss}$ 2.33 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ [CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)] はこれらの曝露範囲の中にあつた。

アフチニブの副次的薬理試験および安全性薬理試験

非 GLP (医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準) 下の試験は、薬理学的プロファイルの試験に並行して実施した。その後、最初の臨床試験開始までに必要な GLP 適合試験を終了させた。なお、投与量はすべてフリー体で記載した。

受容体およびイオンチャンネルに及ぼす作用：

50 種類の受容体結合試験においてアフチニブの持つ副次的薬理作用を評価した [CTD 4.2.1.2-1 (U-1083)]。アフチニブ 5 μM で 50%を超える結合阻害が認められたのは H_2 受容体 (シメチジン)、 M_1 受容体 (ピレンゼピン) および CCK-A 受容体 (devazepide) の 3 つであった。この濃度は、臨床試験でのアフチニブ 50 mg 投与後定常状態の最高血漿中濃度 $C_{\text{max, ss}}$ 158 nM [CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)] の 30 倍を超えるものであった。

中枢神経系に及ぼす作用：

In vivo においてアフチニブの経口投与による影響を検討した。Irwin の変法を用いた試験においてマウス [CTD 4.2.1.2-2 (U-1619)] では 300 mg/kg (900 mg/m^2) まで、ラット [CTD 4.2.1.3-1 (U-1858)] では 18 mg/kg (108 mg/m^2) まで一般症状、体温および自発運動量に対する明らかな作用は認められなかった。

心血管、呼吸系および心電図に及ぼす作用：

In vitro および *in vivo* においてアフチニブの影響を検討した。HEK293 細胞を用いた hERG チャンネル試験で IC_{50} は 2.4 μM であった [CTD 4.2.1.3-2 (U-1580)]。0.1~10 μM の濃度で累積的に曝露した摘出モルモット心室乳頭筋標本における活動電位に対して影響は認められなかった [CTD 4.2.1.3-2 (U-1580)]。テレメトリー装着覚醒雄ラットにアフチニブ 0, 10, 30 および 100 mg/kg (0, 60, 180 および 600 mg/m^2) を経口投与したとき、100 mg/kg での動脈血圧および心拍数増加を除き、体温、自発運動量、呼吸数、1 回換気量に対して影響は認められなかった [CTD 4.2.1.2-3 (U-1467)]。

アフチニブ 1 日投与量 0, 1, 2.45 および 6 mg/kg (0, 35, 85.8 および 210 mg/m^2) を用いたミニプタ 4 週間経口反復投与毒性試験では、用量依存的に可逆的な心拍数増加が認められ、2.45 および 6 mg/kg 投与では一時的な心拍数の増加を伴った QT 間隔短縮がみられたが、心電図に変化はみられなかった [CTD 4.2.3.2-11 (U-1774)]。ブタにアフチニブの漸増用量を静脈内投与した試験では、収縮期および拡張期の動脈血圧、心拍数、心電図パラメータ (PR 間隔, QRS 時間, QT 間隔) に対する影響は認められなかったものの、心筋収縮力 (LVdp/dt-max) は 6.65 mg/kg で減少し (233 mg/m^2 , 血漿中濃度は患者の平均 C_{max} の 7.6 倍),

20 mg/kg (700 mg/m², 血漿中濃度は患者の平均 C_{max, ss} の 45 倍) でさらに顕著な減少が認められた [CTD 4.2.1.2-4 (U■■-1311)] 。

アフアチニブの呼吸系に対する影響は *in vivo* で覚醒ラットの経口投与後に検討した [CTD 4.2.1.3-3 (U■■-1859)] 。

18 mg/kg (108 mg/m²) まで呼吸数, 1 回換気量, 分時換気量に問題となる影響はみられなかった。

腎および肝機能に及ぼす作用：

ラットにアフアチニブ 0, 30, 100 および 300 mg/kg (0, 180, 600 および 1800 mg/m²) を経口投与し, *in vivo* でアフアチニブの影響を検討した [CTD 4.2.1.2-5 (U■■-1490)] 。

全用量で尿中排泄量 (ブドウ糖, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, 乳酸脱水素酵素活性) の増加が認められた。血清分析では, 対照群に比較してブドウ糖の増加, ならびに非常に軽度のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (1.4 倍) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ活性 (2.0 倍) の増加が明らかとなった。

胃腸管系に及ぼす影響：

アフアチニブの胃排出能 [CTD 4.2.1.2-6 (U■■-1487)] , 胃液分泌 [CTD 4.2.1.2-7 (U■■-1489)] , 消化管輸送能 [CTD 4.2.1.2-8 (U■■-1488)] への影響を検討した。ラットへ 0, 30, 100 および 300 mg/kg (0, 180, 600 および 1800 mg/m²) を経口投与し *in vivo* で検討した。主に高用量において, 統計学的に有意で明らかな影響が認められた。

薬力学的薬物相互作用に対する試験は実施していない。

3. 薬物動態試験

アフアチニブの薬物動態学的評価の対象は、未変化体の血漿／血中濃度 - 時間プロファイル、標識薬剤に由来する放射能、アルビノラット、有色ラットおよび妊娠ラットを用いた全身オートラジオグラフィー、反復投与後の定量的組織分布、ラットにおける酵素誘導ならびに血漿蛋白結合率とした。吸収、分布、代謝、排泄（ADME）試験はマウス、ラット、ミニブタおよびウサギを用いて実施し、試験には排泄バランスおよび胆汁中排泄の評価に加え、血漿、尿、糞および胆汁中における代謝の検討も含めた。授乳期のラットを用いて乳汁排泄について検討した。*in vitro* 試験では、ヒト肝ミクロソームおよびヒト肝細胞における代謝について、またアフアチニブとヒトチトクロム P450 酵素、P 糖蛋白および他の薬物トランスポーターおよびUDP-グルクロン酸転移酵素 1A1 (UGT1A1) との相互作用について検討した。さらに *in vitro* 試験を行い、ヒト肝細胞における酵素誘導、P 糖蛋白および他の薬物トランスポーターによる薬剤輸送ならびに CaCo-2 細胞における透過性について検討した。

雌雄マウス、雌雄ラット、雌ウサギおよび雌雄ミニブタを用いて、アフアチニブ単回投与後の薬物動態および薬物代謝について検討した。非臨床安全性試験で用いたものと同一の動物種を使用した。アフアチニブの薬物動態に問題となる雌雄差は観察されなかった。毒性試験で反復投与した際に、アフアチニブの血漿中濃度上昇によって示唆される薬物の蓄積はラットのみで観察され、雌よりも雄で顕著に認められた。反復投与後に血漿中のアフアチニブに対する曝露量の減少は観察されなかった。各動物種およびヒトに単回投与した後の薬物動態パラメータの比較を [表 3.1](#) に示す。

表 3: 1 アフアチニブ単回投与後の薬物動態パラメータの種間比較（算術平均値；未変化体の血漿中濃度データに基づく）
（CTD 4.2.2.2-1（U■■-1487），CTD 5.3.2.1-2（U■■-1101），CTD 4.2.2.2-3（U■■-1208），CTD 4.2.2.2-4（U■■-1282），CTD 5.3.2.1-1（U■■-2062），CTD 5.3.3.1-1（U■■-1759））

文献番号			CTD 4.2.2.2-1 (U■■-1487), CTD 5.3.2.1-2 (U■■-1101)	CTD 4.2.2.2-3 (U■■-1208), CTD 5.3.2.1-2 (U■■-1101)	CTD 4.2.2.2-4 (U■■-1282), CTD 5.3.2.1-1 (U■■-2062)	CTD 5.3.3.1-1 (U■■-1759), CTD 5.3.2.1-2 (U■■-1101)
投与 経路	パラメータ	単位	ラット (雄, N=4)	ミニブタ (雌雄, 各 N=2/2)	ウサギ (雌, N=3)	ヒト ^{a,c} (男性, N=8)
	投与量*	[mg/kg]*	8 p.o. 4 i.v.	2	1.94	15 ^d
p.o.	C _{max}	[nmol/L]	397	29.1	34	12.7
	t _{max} ^b	[h]	4	4	1	6.0
	AUC _{0-∞}	[(nmol・h)/L]	2600	214	178	335
	t _{1/2}	[h]	4.5	10.8	2.6	33.9
	CL/F	[mL/(min・kg)]	108	341	467	1530 ^d
	V _Z /F	[L/kg]	42.8	310	110	4500 ^d
	F _a	[%]	67.7 ^e	nd	nd	nd
	F	[%]	44.5	11.2	nd	nd
i.v.	C _{max}	[nmol/L]	1620	1190	nd	nd
	AUC _{0-∞}	[(nmol・h)/L]	2920	2000	nd	nd
	t _{1/2}	[h]	5.22	13.8	nd	nd
	CL	[mL/(min・kg)]	55.3	35.4	nd	nd
	V _{ss}	[L/kg]	16.2	12.4	nd	nd
<i>in vitro</i>	f _b	[%]	92.6	92.9	91.8	95.0

*：ラット，ミニブタおよびウサギでは目標用量をフリー体の [mg/kg] で，ヒトでは [mg/患者] として示す。

a：体重=64~101 キログラム

b：中央値

c：ヒトでは t_{max}（中央値）および血漿蛋白結合率（算術平均値）を除き，幾何平均値が報告された。

d：パラメータ値は体重で補正されていない。

e：静脈内または経口投与後の総放射能に対する時間曲線下面積の比として算出。

nd：測定せず

ラットにおけるアフアチニブの吸収率および絶対経口バイオアベイラビリティはそれぞれ 67.7%および 44.5%であった [CTD 4.2.2.2-1 (U-1487)]。ミニブタにおける絶対経口バイオアベイラビリティは 11.2%であった [CTD 4.2.2.2-3 (U-1208)]。他の動物種では静脈内投与を行わなかったため、両パラメータについて評価しなかった。

アフアチニブの分布容積は大きかった（ラットおよびミニブタへの静脈内投与後にそれぞれ 16.2 および 12.4 L/kg）。経口投与後でも同様に、分布容積は大きかった。したがって、アフアチニブは組織に十分に分布することが示唆された。ラットを用いた定量全身オートラジオグラフィ（QWBA）試験 [CTD 4.2.2.3-3 (U-1562)] およびミニブタを用いた組織分布試験 [CTD 4.2.2.2-2 (U-1093)] から、放射能は血液から中枢神経系以外の大部分の組織へと速やかに広く分布することが示された。ごく少量の放射能しか血液脳関門を通過しなかった。妊娠ラットを用いて経口投与後の組織分布を調べたところ [CTD 4.2.2.3-1 (U-1374)]、全体の分布はラット QWBA 試験の場合と同様であることが示されたが、胚および胎児に問題となる濃度の放射能は検出されなかった。

ラットを用いて¹⁴Cアフアチニブの反復投与後の組織分布を調べたところ [CTD 4.2.2.3-2 (U-1535)]、蓄積効果が示唆されたが、器官および組織への蓄積は比較的 low 濃度であり、器官から回収された総放射エネルギーは少量でしかなかった。

動物種およびヒトにおけるアフアチニブの血漿蛋白結合率は 92%～95%であった [CTD 5.3.2.1-2 (U-1101), CTD 5.3.2.1-1 (U-2062), CTD 4.2.2.3-4 (U-2434)]。血漿蛋白への結合は飽和しなかった。血球および血漿間のアフアチニブの分配を評価する試験から、アフアチニブは主に血球に分布することが示された [CTD 4.2.2.2-1 (U-1487), CTD 4.2.2.2-2 (U-1093), CTD 4.2.2.2-4 (U-1282)]。これは *in vitro* 試験で示されたように [CTD 4.2.2.4-1 (U-1028)]、¹⁴Cアフアチニブが赤血球の蛋白質と共有結合するためである。

アフアチニブの分子内には α,β -不飽和ケトンの構造があり、マイケル付加反応の受容体分子として作用する。この性質のためにアフアチニブは蛋白質と共有結合し、特に *in vivo* 試験で各動物種（ラット [CTD 4.2.2.4-1 (U-1028)]、ミニブタ [CTD 4.2.2.2-2 (U-1093)]、ウサギ [CTD 4.2.2.4-2 (U-1227)] およびヒト [CTD 5.3.2.3-5 (U-1737)]）の血漿蛋白と結合することが示された。アフアチニブは *in vitro* においてアルブミン、ヘモグロビンおよび肝ミクロソーム蛋白質と共有結合することが示されている。こうした蛋白質との共有結合が、ラット QWBA 試験で放射能が長く持続して観察され、ラットで反復投与後に器官への蓄積が認められたことへの最も適切な説明になると考えられた。

マウス、ラット、ミニブタ、ウサギおよびヒト健康被験者に [¹⁴C] アフアチニブを経口投与した後に、血漿、尿、糞および胆汁（動物種の胆汁のみ）中の代謝パターンを検討した [CTD 4.2.2.4-1 (U-1028), CTD 4.2.2.2-2 (U-1093), CTD 4.2.2.4-2 (U-1227), CTD 5.3.2.3-5 (U-1737), CTD 4.2.2.4-3 (U-2019)]。ラットでは、静脈内投与後の胆汁および尿サンプルでも代謝パターンを評価した。さらに、LC-MS を用いて癌患者におけるアフアチニブ代謝を検討した [CTD 5.3.2.3-3 (U-1296), CTD 5.3.2.3-2 (U-1445)]。アフアチニブは少量しか代謝されず、その代謝は蛋白質または求核性低分子とのマイケル付加反応によって制御されていた。概して酸化的代謝がアフアチニブの代謝に果たす役割は小さく、特に CYP3A4 が触媒する酸化的代謝反応は *in vivo* でのアフアチニブ代謝にほとんど関与しないことが示された。

ヒトでは、排泄された薬剤由来物質のうち代謝物が占める割合は 15%未満であった [CTD 5.3.2.3-5 (U-1737)]。アフアチニブの主要な代謝経路は動物種とヒトの間で同様であり、グルタチオン、システインまたは蛋白質とアフアチニブの抱合体（付加体）およびジメチルアミノ基での *N*-酸化物または *N*-脱メチル化物で構成される。他にも微量の代謝物を生成するいくつかの経路が観察された。

アフアチニブは 100 μM までの濃度では、チトクロム P450 酵素（CYP1A1/2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP4A11）に対し強い阻害活性を示さなかった（CYP2C9 に対して $\text{IC}_{50}=79.3 \mu\text{M}$ であった以外は $\text{IC}_{50}>100 \mu\text{M}$ ） [CTD 5.3.2.2-15 (U-1446)]。サンドイッチ培養した初代ヒト肝細胞を用いて、5 μM までの濃度のアフアチニブで 48 時間処理した後でも、CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 および CYP3A4 に関して *in vitro* 酵素活性または mRNA 量の誘導はみられなかった [CTD 5.3.2.2-7 (U-1527)]。治療用量投与後に得られるアフアチニブの血漿中濃度に基づき（癌患者に 40~50 mg を投与して得られる定常状態のアフアチニブ平均 [幾何平均] 総最高血漿中濃度は、0.078~0.158 μM であった [CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)]），アフアチニブによるチトクロム P450 酵素の阻害または誘導もしくは UDP-グルクロン酸転移酵素の阻害のために [CTD 5.3.2.2-9 (U-1744)]，薬物間相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

アフアチニブは CaCo-2 細胞において高い受動透過性を示し [CTD 5.3.2.2-14 (U-1771)]，P 糖蛋白質の基質であった（ミカエリス-メンテン定数は 9~30 μM ） [CTD 5.3.2.2-14 (U-1771)，CTD 5.3.2.2-8 (U-3504)]。ジゴキシンの P 糖蛋白質による輸送はアフアチニブによって阻害され、阻害剤の解離定数は 3.4 μM であった [CTD 5.3.2.2-5 (U-1668)]。

アフアチニブは BCRP（乳癌耐性蛋白）トランスポーターの基質であることが示され、BCRP を阻害した（ $\text{IC}_{50}=0.75 \mu\text{M}$ ） [CTD 5.3.2.2-1 (U-2809)]。アフアチニブが OATP2, OATP8, OATP-B, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2 および OCT3 の基質である可能性は非常に低いと考えられた [CTD 5.3.2.2-4 (U-4022)，CTD 5.3.2.2-3 (U-4023)，CTD 5.3.2.2-2 (U-4024)]。これらのトランスポーターに対するアフアチニブの阻害活性は、まったく（ $\text{IC}_{50}>100 \mu\text{M}$ ）またはほとんど（ $\text{IC}_{50}>6 \mu\text{M}$ ）認められなかった。アフアチニブが *in vivo* で OATP, OAT または OCT 薬物トランスポーターを阻害する可能性は非常に低いと結論した。

検討した全動物種およびヒトにおいて、アフアチニブの主な排泄経路は糞中排泄であった [CTD 4.2.2.2-1 (U-1487)，CTD 4.2.2.2-2 (U-1093)，CTD 4.2.2.2-4 (U-1282)，CTD 4.2.2.3-2 (U-1535)，CTD 5.3.3.1-1 (U-1759)，CTD 4.2.2.2-5 (U-1632)]。腎排泄される薬剤由来放射エネルギーはわずかであった。薬剤由来放射能の物質収支はほぼ完全に合致した。また、アフアチニブは授乳期のラットで乳汁排泄されることが示された [CTD 4.2.2.5-1 (U-2164)]。

動物を用いた *in vivo* における薬物動態学的な薬物間相互作用試験は、それによってヒトにおける薬物間相互作用は予測できないと考えられたため、実施しなかった。

4. 毒性試験

臨床適用経路である経口投与で、最大耐量または致死量までの用量を用いた非臨床安全性試験を実施し、アフチニブの非臨床安全性プロファイルを評価した。ほとんどの試験においてアフチニブのマレイン酸塩を用いた。毒性試験には、げっ歯類の動物種として Wistar Han ラットを選択した。肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験において、ヒトと同等の代謝パターンおよびアルデヒド酸化酵素によるキナゾリン代謝能が示されていることから、非げっ歯類の動物種としてゲッチングミニブタを選択した。親化合物の毒性評価に加え、適切な *in vitro* および *in vivo* 試験を用いて、一連の不純物の毒性についても評価した。主要な試験はすべて GLP に準拠して実施した。別に表示のない限り、本文に記載したすべての用量または濃度は、アフチニブのフリー体として表した。

4.1 単回投与毒性試験

マウスおよびラットを用いて単回投与毒性（GLP 適合）を評価した（表 4.1: 1）。アフチニブの経口投与では中等度の毒性を示し、ALD はマウスで 763 mg/kg (2289 mg/m²)、ラットで 382 mg/kg (2292 mg/m²) であった。いずれの動物種でも主な毒性の標的器官は消化管であった。

表 4.1: 1 アフチニブの単回経口投与毒性試験成績

動物種	用量 [mg/kg]	主な所見	資料番号（ 社内報告書 番号）
マウス	191, 382, 763	763 mg/kg（雌のみ評価）：投与後 1 日目に雌 3 例中 1 例を切迫屠殺；著明な活動低下，腹式呼吸，体温低下，閉眼；剖検：胃粘膜の変色とびらん，盲腸壁の菲薄化，およびガスまたは体液で充満した消化管の膨満	CTD 4.2.3.1-1 (U-1089)
ラット	191, 382, 763	死亡あるいは切迫屠殺：382 mg/kg で投与後 8~9 日目に雄 3 例中 3 例，763 mg/kg で投与後 2~7 日目に雌 3 例中 3 例；立毛，下痢，低体温および消瘦；剖検：消化管粘膜の発赤または壊死，膨満およびガスまたは体液の充満	CTD 4.2.3.1-2 (U-1088)

4.2 反復投与毒性試験

ラットおよびミニブタを用いた反復経口投与毒性試験を GLP 適合下で実施した。ラットで最長 26 週間 [CTD 4.2.3.2-7 (U-1217)]、ミニブタで最長 52 週間 [CTD 4.2.3.2-13 (U-2251)]、1 日 1 回投与で実施した。いずれの動物種においても 4 週間試験で用いた高用量が最高用量であった [CTD 4.2.3.2-5 (U-1775)、CTD 4.2.3.2-11 (U-1774)]。全試験においてトキシコキネティクス用の採血を行い、回復群を設けた試験においては毒性作用の可逆性を評価した。

ラットを用いた反復投与試験中のトキシコキネティクスにより、アフアチニブの全身曝露が確認された。最高血漿中濃度および全身曝露量 (AUC) は、投与期間が 4 週間から 26 週間まで延びるにつれて用量比を上回る増加を示した。また、蓄積性がみられ、その程度は雌より雄で顕著であった。ラットの 26 週間試験では、雌に比べ雄で曝露量が高かった [CTD 4.2.3.2-7 (U-1217)]。

表 4.2:1 に要約したように、ラットにおける主な標的器官は、消化管、皮膚および腎臓であった。消化管では、特に 4 週間試験において、用量依存的な上皮の萎縮に加え胃粘膜のびらん／潰瘍が観察された。一般症状では、高用量で体重減少を伴う軟便／下痢がみられた。上記以外に上皮萎縮が観察された器官は、皮膚、前立腺、子宮および膣であった。また、消化管および気道の粘液腺も萎縮した。腎臓では高用量で腎乳頭壊死がみられた。いずれの試験でも、投与期間中に動物が生存可能である低用量でのみ、アフアチニブの長期投与が可能であった。その結果、26 週間毒性試験 (CTD 4.2.3.2-7 (U-1217)) で設定された NOAEL が最も低い値となり、投与終了時の雄および雌の平均 C_{max} は 37.9 nmol/L および 17.2 nmol/L、平均 AUC_{0-24} は 303 nmol h/L および 97.7 nmol h/L であった。観察された好中球数増加は、二次的なもので、皮膚の炎症に続発したものと判断された。観察された毒性所見のほとんどは回復期間中に回復した。

アフアチニブおよび (INN:)、BI が開発中のトリプルチロシンキナーゼ阻害薬) の経口併用投与では、ラットに交互に投与しても [CTD 4.2.3.7.7-4 (U-1605)] また、併用投与しても [CTD 4.2.3.7.7-2 (U-1606)]、各化合物の単剤投与に比べ、毒性に著明な差は認められなかった。

表 4.2:1 に、ラットにアフアチニブを投与した反復投与毒性試験の主な成績を要約する。

表 4.2: 1 ラットにおけるアフチニブの反復投与毒性試験成績

投与期間； 投与量 [mg/kg/日]	主な所見	資料番号（社内報告書番号）
4 週間； 0, 4, 8.5, 18	<p><u>4 mg/kg</u> : NOAEL。</p> <p><u>8.5 mg/kg</u> : 口唇の発赤／肥厚（3 週目を過ぎてから）。好中球比増加を伴う白血球数増加；腎乳頭壊死（雄 10 例中 1 例）；食道，胃，小腸，および大腸の上皮萎縮；子宮内膜上皮の萎縮；顔面皮膚：膿疱性皮膚炎あるいは化膿性／肉芽腫性毛包炎。</p> <p><u>18 mg/kg</u> : 雄 20 例中 11 例および雌 20 例中 3 例の死亡または切迫屠殺。下痢，削瘦，脱水；皮膚の変化；体重減少（雄）；好中球比増加を伴う白血球数増加；腎乳頭壊死（雄>雌）；胃：切迫屠殺動物における高い発生率のびらん／潰瘍；食道，胃，小腸および大腸の上皮萎縮；脾臓，胸腺，前立腺，精囊および子宮内膜／膈の上皮の萎縮；骨髄の骨髄球系造血亢進；顔面皮膚：膿疱性皮膚炎あるいは化膿性／肉芽腫性毛包炎。回復性：回復傾向を示す。</p>	CTD 4.2.3.2-5 (U-1775)
13 週間 0, 2, 5, 10	<p><u>2 mg/kg</u> : NOAEL。</p> <p><u>5 mg/kg</u> : 雄の波状被毛／粗毛あるいは光沢消失被毛；毛包炎と関連する皮膚の肉眼的病理変化；白血球数および好中球数の増加（雄）。</p> <p><u>10 mg/kg</u> : 雄 2 例，雌 1 例を 39～82 日目に切迫屠殺；波状被毛／粗毛あるいは光沢消失被毛，脱毛，皮膚の変化を伴う腫脹した鼻口部（28 日目以降；雄>雌）；体重減少（雄）；白血球数および好中球数の増加；尿量減少（雄）；尿中の蛋白濃度増加，白血球数増加および赤血球数増加；皮膚の炎症性病変に対する二次的な反応として下顎あるいは腋窩リンパ節の腫脹；軽微～重度の毛包炎；19 例中 6 例（切迫屠殺例を含む）および回復動物 18 例中 4 例の腎乳頭壊死；18 例中 15 例には回復期間終了時に皮膚病変が残存した。</p>	CTD 4.2.3.2-6 (U-1766)
26 週間； 0, 1.5, 3, 6	<p><u>1.5 mg/kg</u> : NOAEL。</p> <p><u>3 mg/kg</u> : 全例に波状被毛／粗毛（雄）および鼻口部の腫脹（雌雄）（100 日目以降），皮膚（毛包炎，炎症性細胞浸潤），所属リンパ節（反応性過形成，組織球数増加，形質細胞数増加）</p> <p><u>6 mg/kg</u> : 全例に波状被毛／粗毛あるいは光沢消失被毛，鼻口部の腫脹および退色，脱毛およびうろこ状皮膚（35 日目以降）；白血球数および好中球数の増加；総蛋白濃度の減少および白血球の混入を伴う尿量減少（雄）；皮膚（毛包炎，炎症性細胞浸潤），所属リンパ節（反応性過形成，組織球増加，形質細胞数増加）および腎（雄 8/20 例および雌 1/20 例における乳頭壊死）における変化。一部の皮膚（雄>雌）および腎（雄）の変化を除き，ほぼすべての変化が回復するか，回復終了時には消失していた。</p>	CTD 4.2.3.2-7 (U-1217)

アファチニブを最長 52 週間経口投与したミニブタ [CTD 4.2.3.2-13 (U-2251)] では、毒性の主な標的器官は消化管であった。一般症状では、高用量での軟便/下痢（すべての試験において）および便潜血（単独例）として観察された。13 週間試験では、消化管毒性のために、用量を 7 mg/kg/日から 5.5 mg/kg/日まで減量する必要があった。病理組織学的検査では、用量依存的な上皮の萎縮と同時に胃の限局性びらん/潰瘍が観察された。上記以外に上皮萎縮が観察された器官は、上気道、前立腺、精囊および角膜であった。また、消化管および気道の粘液腺も萎縮した。観察された好中球数増加は、反応性的のもので、皮膚の炎症に続発したものと判断された。

アファチニブのトキシコキネティクスから、高用量での全身曝露量は用量比を上回る増加を示した。ラットとは異なり、蓄積性は観察されず、雄および雌の曝露量に試験間差は認められなかった。

表 4.2:2 に、ミニブタの反復投与毒性試験成績を要約する。

表 4.2: 2 ミニブタにおけるアファチニブの反復投与毒性試験成績 (1/2)

投与期間 ; 投与量 [mg/kg/日]	主な所見	資料番号 (社内報告書番号)
4 週間 0, 1, 2.45, 6	<u>1 mg/kg</u> : 毒性所見なし <u>2.45 mg/kg</u> : 一過性の軟便 (11~27 日目)。11 日目に雄 1 例に便潜血陽性。好中球数増加。消化管および喉頭の粘膜上皮および粘液腺の萎縮。 <u>6 mg/kg</u> : 一過性の軟便 (11~28 日目)。雄の好中球数増加。病理組織 : 消化管 (食道, 胃, 十二指腸, 回腸) および気道 (喉頭, 気管) の粘膜上皮の萎縮 ; 粘液腺 (顎下および舌下, 喉頭, 食道および十二指腸) の萎縮 ; 角膜上皮の萎縮 ; 精囊の萎縮。すべての変化は 2 週間の回復期間中に回復。	CTD 4.2.3.2-11 (U-1774)
13 週間 ; 0, 0.5, 2, 7/5.5	<u>0.5 mg/kg</u> : NOAEL <u>2 mg/kg</u> : 剖検 : 空腸および回腸における柔らかく/流動性のある内容物, 粘膜の退色あるいは鼓腸。消化管 (食道, 前胃, 回腸) および雄の生殖器 (前立腺上皮, 精囊) の上皮萎縮 ; 粘液腺 (舌下腺および喉頭) の萎縮。ほぼすべての変化が 6 週間の回復期間中に回復。 <u>7 mg/kg/5.5 mg/kg</u> : 投与開始 4 週目までの一過性の軟便により, 減量した。9 日目および 77 日目に雄 2 例で便潜血陽性。好中球数および BUN の増加。消化管 (食道, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸), 呼吸器 (喉頭, 気管) および雄の生殖器 (前立腺上皮, 精囊) の上皮萎縮/炎症 ; 粘液腺 (顎下腺および舌下腺, 食道, 十二指腸, 喉頭, 気管) の萎縮 ; 角膜上皮の萎縮。すべての変化が 6 週間の回復期間中に回復。	CTD 4.2.3.2-12 (U-1795)

表 4.2: 2 ミニブタにおけるアフアチニブの反復投与毒性試験成績 (2/2)

投与期間 ; 投与量 [mg/kg/日]	主な所見	資料番号 (社内報告書番号)
52 週間 0, 0.5, 1.5, 5	<p><u>0.5 mg/kg</u> : NOAEL</p> <p><u>1.5 mg/kg</u> : 消化管の上皮/扁平上皮の軽微~軽度の萎縮/空胞形成および上気道の粘液腺の萎縮; 軽微の角膜上皮の萎縮。</p> <p><u>5 mg/kg</u> : 一過性の軟便または液状便。好中球数および BUN の増加。消化管 (食道, 前胃) の上皮/扁平上皮の萎縮/空胞形成, 喉頭の粘液腺の萎縮; 角膜上皮の萎縮。すべての変化が 6 週間の回復期間中に回復。</p>	CTD 4.2.3.2-13 (U-2251)

4.3 遺伝毒性試験

一連の *in vitro* および *in vivo* 試験において、アフアチニブの遺伝毒性を評価した。単回投与での評価と共に、反復投与による評価も可能なことから、アフアチニブの染色体異常誘発性の有無について検討するために、ラットを用いた 4 週間経口投与毒性試験の中に小核試験を設定した。*In vitro* Ames 試験で弱い陽性反応が認められたことから、さらにアフアチニブの遺伝毒性を評価するため、経口投与による *in vivo* コメットアッセイおよび MutaTM マウスにおける 4 週間経口投与による突然変異試験を実施した。Weight of Evidence に基づき評価すると、染色体異常試験において変異原性が認められず、3 つの *in vivo* 試験において遺伝毒性が示されなかったことは、Ames 試験における単一試験株で観察された弱い陽性結果よりも遺伝毒性評価に重要な情報と考えられることから、アフアチニブは生物学的には遺伝毒性がないと結論された。実施した試験の概要を表 [4.3: 1](#) に示す。

表 4.3: 1 アファチニブの遺伝毒性試験成績

試験の種類	菌株／細胞	濃度または用量	主な結果	資料番号（社内報告書番号）
<i>In vitro</i>				
Ames 試験	代謝活性化系の非存在下および存在下 <i>S. typhimurium</i> TA98, 100, 102, 1535, 1537	アファチニブ 5～1000 µg/プレート	TA 98 にのみ弱い陽性反応（代謝活性化系の非存在下／存在下におけるプレート法で 30 µg /プレートで最大 2.2 倍増加）	CTD 4.2.3.3.1-1 (U■■-1855)
染色体異常試験	ヒトリンパ球	アファチニブ 1～30 µg/mL	細胞毒性を示さない濃度では染色体異常の誘導なし	CTD 4.2.3.3.1-2 (U■■-1863)
<i>In vivo</i>				
雄 Muta™マウスにおける突然変異試験	肝, 十二指腸, 皮膚	0, 24, 47, 70 mg/kg/日 4 週間経口投与	致死量に近かったため 70mg/kg では評価せず。24 および 47 mg/kg で突然変異の誘発なし	CTD 4.2.3.3.2-1 (U■■-2836)
Wistar ラットにおける骨髓小核試験	骨髓	0, 4, 8.5, 18 mg/kg/日 4 週間経口投与	18 mg/kg は致死量に近い用量。わずかな骨髓毒性小核誘発なし	CTD 4.2.3.3.2-2 (U■■-1691)
Wistar ラットにおけるコマットアッセイ	肝, 腎および空腸	0, 2, 16, 200 mg/kg を 24 時間間隔で 2 回経口投与	MTD まででも DNA 損傷の誘導なし。	CTD 4.2.3.3.2-3 (U■■-1903)

4.4 がん原性試験

アファチニブの長期がん原性試験は、これまで実施されていない。これは、本薬が EGFR 突然変異を持つ局所的に進行性または転移性の非小細胞肺癌を治療目的とすることから、ICH ガイドライン S9（抗がん剤に対する非臨床評価）に従ったためである。しかし、将来のがん原性試験の実施に備えて、用量設定試験のみを、強制経口投与により CD-1 マウスおよび野性

型 Tg.rasH2 マウスで行った。その結果、ラットおよびミニブタを用いた毒性試験で観察された所見に匹敵する一連の毒性が同じようにマウスの試験でも観察された。結果は、毒性試験の概要文 [CTD 2.6.6] に示す。

4.5 生殖発生毒性試験

アフアチニブの生殖発生毒性について、ラットおよびウサギを用いた試験を実施し、ICH ガイドラインに従って評価した。

雌雄の HsdHanTM:WIST (Wistar) ラットに 0 (溶媒対照), 4, 6 および 8 mg/kg/日 (0, 24, 36, 48 mg/m²/日) の用量で強制経口投与し [CTD 4.2.3.5.1-1 (U-2843)] , アフアチニブの受胎能および初期胚発生に及ぼす影響を検討した。雄には、交配前 4 週間、交配中および交尾確認後の剖検まで最低 5 週間を通じて、毎日投与した。雌には、交配前 2 週間、交配中および交尾後 7 日目まで毎日投与した。

初回投与日および最終投与日のトキシコキネティクスでは、投与期間中にアフアチニブの全投与動物で全身曝露が確認された。曝露は、ほぼ用量に比例して増大した。投与 1 日目のアフアチニブの血漿中濃度は、投与 36 日目 (雄) または妊娠 7 日目 (雌) の濃度とほぼ同じであった。アフアチニブ血漿中濃度に関連する変化は、反復投与後には観察されなかった。アフアチニブ血漿中濃度は、雌より雄で約 2 倍高かった。

体重減少および全身状態悪化のために、8 mg/kg 群の雄 1 例を投与 19 日目に剖検に供した。軟便ならびに鼻口部周囲および口腔の痂皮、ならびに鼻口部および口腔の発赤などの一般症状が、6 あるいは 8 mg/kg/日を投与した雄では低い発生率で観察され、雌では稀であった。平均体重増加量の用量依存的な一過性の低下が、6 あるいは 8 mg/kg/日の雄で観察された (対照と比較してそれぞれ 0.72 または 0.55 倍)。雌では、8 mg/kg/日における体重増加量は、交配前 (対照の 0.69 倍) および妊娠初期にわずかに低下した (0~4 日目に対照の 0.8 倍)。

発情周期、交尾行動および受胎能 (交尾前の期間、交尾率、受胎率および受胎指数により評価) は、アフアチニブの投与により影響を受なかった。着床数および生存胎児数は、8 mg/kg/日で低かった (それぞれ対照の 0.88 および 0.82 倍) が、これらは母体体重の減少に関連した変化 [CTD 4.3-71 (R11-4562)] と考えられる黄体数の減少 (対照の 0.91 倍) に起因すると考えられた。したがって、これらの所見は特定の生殖発生毒性に関連するのではなく、母動物の一般毒性による影響と考えられる。これらの所見および着床後胚損失の軽度増加 (対照の 2.3 倍) は、アフアチニブの薬力学的活性によると考えられた。

8 mg/kg の用量は、受胎能および初期胚発生に対する NOAEL と判断された。NOAEL における非結合薬物画分を考慮した安全域 (ヒト臨床用量 50 mg の定常状態での曝露量との比較) は、雄では狭いか (AUC で 1.3)、雌では存在しなかった (AUC で 0.51) [CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)]。表 4.5: 1 に、ラットの受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験の成績を示す。

表 4.5: 1 アフアチニブのラットの受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験の成績

動物種；投与期間；用量 [mg/kg/日]	主な所見	資料番号（社内報告書番号）
ラット 雄：交配4週間前から剖検時まで最低5週間 雌：交配2週間前から妊娠（GD）7日目まで 0, 4, 6, 8	<p><u>全群</u>：発情周期，交尾行動および受胎能（交尾前期間，交尾率，受胎率および受胎能指数により評価）に対する影響なし</p> <p><u>4 mg/kg</u>：毒性所見なし</p> <p><u>6 mg/kg</u>：毒性所見なし，一般症状（軟便，痲皮，鼻口部の発赤）は雄では低頻度および雌では稀，雄における体重増加量減少（対照の0.72倍）</p> <p><u>8 mg/kg</u>：毒性所見なし。雄1例を19日目に切迫屠殺。一般症状（軟便，痲皮，鼻口部の発赤）は雄では低頻度および雌では稀。雄（0.55倍）および雌（交配前で0.69倍，妊娠初期で0.8倍）の体重増加量減少。生存胎児数減少（0.82倍）；黄体数減少（0.91倍）；着床数減少（0.88倍）および着床後胚損失増加（2.3倍）</p>	CTD 4.2.3.5.1-1 (U-2843)

妊娠ラット [CTD 4.2.3.5.2-2 (U-1526)] および妊娠ウサギ [CTD 4.2.3.5.2-4 (U-1336)] に強制経口投与してアフアチニブの胚・胎児発生毒性を検討した。ラットへの最大投与量は 16 mg/kg/日 で，これは 96 mg/m²/日に相当する。ウサギを用いた試験での最大投与量は 10 mg/kg/日 で，これは 120 mg/m²/日に相当する。

ラットおよびウサギを用いたアフアチニブの胚・胎児発生試験では，母動物に対する明らかな毒性および生命を脅かす毒性を引き起こす作用が高用量でみられたにもかかわらず，胚・胎児に対する著しい毒性作用や催奇形性作用は認められなかった。明らかな毒性作用がみられなかった理由としては，妊娠雌ラットでは薬剤が胎盤を通過しにくいこと [CTD 4.2.2.3-1 (U-1374)] に起因する可能性がある。ウサギでは，概して胚胎児への影響は少なく，観察された所見は高用量の 10 mg/kg/日に限られ，偶発的あるいは溶媒対照群と比較して若干高い発生率で認められた変異のみであった。NOAEL における非結合薬物画分を考慮した安全域（ヒト臨床用量 50 mg の定常状態での曝露量との比較）は，ラットはわずか（AUC で 2.2）であり，ウサギではほとんど確保できなかった（AUC で 0.3） [CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)]。

[表 4.5: 2](#) に，ラットおよびウサギにおける胚・胎児発生毒性試験の成績を示す。

表 4.5: 2 アフアチニブのラットおよびウサギにおける胚・胎児発生に関する試験の成績

動物種；投与期間；用量 [mg/kg/日]	主な所見	資料番号（社内報告書番号）
ラット 妊娠 6～17 日 0, 4, 8, 16	<p>全群：すべての母動物が妊娠した。胚胎児の生存，成長および外表に対する影響なし。</p> <p><u>4 mg/kg</u>：毒性所見なし</p> <p><u>8 mg/kg</u>：NOAEL（母動物）。胚胎児発生に対する毒性所見なし。</p> <p><u>16 mg/kg</u>：雌 1 例を妊娠 15 日に屠殺（体重減少および軟便，円背）。生存動物：妊娠 12 日目以降に立毛，軟便あるいは液状便ならびに主に鼻口部および鼻周囲に痂皮，体重減少および投与期間中の摂餌量減少。NOAEL（胚胎児）。</p>	CTD 4.2.3.5.2-2 (U-1526)
ウサギ 妊娠 6～18 日 0, 2.5, 5, 10	<p>全群：すべての母動物が妊娠した。対照群と投与群間で奇形の発現分布に用量相関はなく，正常な範囲内であった。</p> <p><u>2.5 mg/kg</u>：NOAEL（母動物）。胚胎児発生に対する毒性所見なし。</p> <p><u>5 mg/kg</u>：雌 2/21 例で糞排泄量減少または排泄なし，雌 1/21 例で下痢または液状便。雌 1 例で完全流産。</p> <p><u>10 mg/kg</u>：雌 2 例が妊娠 17, 19 日に死亡，雌 2 例を妊娠 22 日に屠殺。雌 3 例流産。体重減少，投与期間中の摂餌量低下，糞便排泄量低下または糞便排泄なし。胎児体重減少，胎児の 3.1%が未熟であった（対照群の胎児体重の 65%未満）。変異：四肢の湾曲，前肢の菲薄な皮膚，大動脈弓における過剰血管，右または左頸動脈における過剰血管，菲薄な胃壁，矮小な精巣，腰肋，腰肋の分離，肋骨の湾曲の異常（片側）および上腕骨遠位部の部分的な未骨化（両側）</p>	CTD 4.2.3.5.2-4 (U-1336)

ラットの出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験 [CTD 4.2.3.5.3-1 (U-2844)] では，6 あるいは 8 mg/kg を投与した雌から得られた出生児の出生時体重および離乳前の体重増加量は低かった（8 mg/kg における雄および雌では対照の 0.91 倍）が，機能発達に関する検査値，性成熟または行動の成績に対して毒性意義のある影響はなかった。出生児では恐らく乳汁を介したわずかではあるが測定可能な全身的薬物曝露が認められた。これは薬物動態試験の結果 [CTD 4.2.2.5-1 (U-2164)] と一致し，アフアチニブを経口投与したラットでの乳汁排泄を示している。6 あるいは 8 mg/kg を投与した雌から得られた動物の体重減

少は、F1 世代の検査開始時にも依然としてみられ、これらの高用量群では大部分の F1 世代の体重は対照群の値を下回っていた。しかし、F1 動物の交尾行動または受胎能には影響がみられず、体重への影響は比較的小さかった。6 あるいは 8 mg/kg の投与での全身曝露量がほぼ同レベルであった。非結合薬物画分を考慮すると、安全域（ヒト臨床用量 50 mg の定常状態での曝露量との比較 [CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)]) は確保できなかった (AUC で 0.23)。

表 4.5: 3 アフアチニブのラットにおける出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験の成績

動物種；投与期間；用量 [mg/kg/日]	主な所見	資料番号（社内報告書番号）
ラット 妊娠 6 日目～授乳 20 日目まで 0, 4, 6, 8	<p><u>全群</u>：母動物が生存同腹児を出産するか、その同腹児を離乳まで哺育する能力には影響がなかった。アフアチニブの母体へ投与は、F1 動物の交尾行動または受胎能に影響はなく、学習および記憶の評価を含む機能発達に関する検査値または行動にも影響はなかった。</p> <p><u>4 mg/kg</u>：出生前および出生後発育に対する毒性所見なし。</p> <p><u>6 mg/kg および 8 mg/kg</u>：出生前および出生後発育に対する毒性所見なし。離乳前の出生児体重は低値を示し、体重増加量は低く推移した（8 mg/kg/日の雄/雌で対照群の 0.91 倍）。</p> <p>6 あるいは 8 mg/kg/日を投与した母動物由来の出生児の体重減少は、F1 動物の試験開始時（約 5 週齢）にも認められ、体重は、多くの F1 動物で対照群の値を下回った（6 および 8 mg/kg で、74 日目に F1 雄はそれぞれ対照群の 0.91 および 0.94 倍；F1 雌は同居前の対照群の >0.9 倍、また妊娠期間中には対照に対する統計的有意差なし）。</p> <p>トキシコキネティクス：6 mg/kg 群と 8 mg/kg 群との全身曝露量に差はなかった。</p>	CTD 4.2.3.5.3-1 (U-2844)

4.6 局所忍容性試験

ウサギを用いた局所刺激性試験を実施した。アフアチニブ（マレイン酸塩として投与）を皮膚に塗布しても、刺激性も腐食性も認められなかったが [CTD 4.2.3.6-1 (U-1670)]，ウサギの眼の結膜嚢に点眼すると眼刺激性が認められた [CTD4.2.3.6-2 (U-1510)]。

4.7 その他の毒性試験

原薬中でアファチニブの対イオンであるマレイン酸が、腎に対する副作用との関連性が報告されている [CTD 4.3-51 (R03-2388)]。そのため、ミニブタを用いた4週間経口投与毒性試験を実施し、アファチニブの4週間毒性試験で投与された高用量アファチニブ中に存在するマレイン酸陰イオン量と同等量を経口投与した。ミニブタにマレイン酸を3 mg/kg/日の投与量で4週間投与したが、それに伴う毒性は認められなかった [CTD 4.2.3.7.7-5 (U-1773)]。

ラット4週間経口投与毒性試験の一部として免疫毒性について検討したが [CTD 4.2.3.2-5 (U-1775)]、免疫系に対して影響は認められなかった。

BI社が開発中の化合物で、トリプルキナーゼ阻害剤 (VEGFR, PDGFR および FGFR を阻害) である BI 治験薬 [REDACTED] とアファチニブの併用投与の有用性を検討する臨床試験の開始に先立って、ラットを用いた併用投与毒性試験を実施した。ラットにアファチニブと [REDACTED] を交互に (アファチニブを1週間投与後に [REDACTED] を1週間投与し、この2週間で1サイクルとして4サイクル投与 [CTD 4.2.3.7.7-4 (U-1605)])、または併用して4週間投与したところ [CTD 4.2.3.7.7-2 (U-1606)]、各化合物の単剤投与と比較して、その毒性の発現には違いが認められなかった。

同一試験内でそれぞれ別途実施した3回の *in vitro* 3T3 NRU 光毒性実験を行ったところ [CTD 4.2.3.7.1-1 (U-2433)]、各試験で異なった結果が得られた。OECD ガイドラインに従って、試験1では光毒性の限界値を超えたが、光毒性係数の算出値に基づき、試験2でアファチニブは「光毒性なし」、試験3では再び「光毒性の可能性あり」と判定された。したがって、アファチニブは光毒性の可能性があると結論された。

4.7.1 光安全性評価

物理化学的評価の結果、アファチニブのエタノール溶液が249 nm および344 nm で吸収することが示された [CTD 3.2.S.3.1-1 (U-1767)]。有色ラットを用いた¹⁴C 標識したアファチニブの全身オートラジオグラフィの結果、明確で長期持続する放射能との親和性が、皮膚および網膜で検出された [CTD 4.2.2.3-3 (U-1562)]。皮膚においてアファチニブが長期持続して存在することは、その表皮組織における EGF 受容体の存在およびその臓器におけるアファチニブの EGF 受容体との共有結合に起因する。したがって、皮膚におけるアファチニブの存在は、必然的に哺乳動物における薬剤の薬力学的活性および受容体分布に関係する。

アファチニブで治療される大部分の患者では、薬剤の薬力学的活性に関連し、皮膚における有害事象の発現が予想される。これは他の EGFR 阻害剤 (ゲフィチニブ, エルロチニブ, ラパチニブ) で治療した患者でも観察されることが報告されている [CTD 4.3-66 (R10-2923) および CTD 4.3-67 (R10-2924)]。これらの皮膚に関連した有害事象に対する予防措置として、直接的な日光の曝露を避けることが含まれ、日光から皮膚を保護する衣服の着用および適切な日焼け止めの使用を、薬剤の光毒性の可能性に関わらず、適正使用情報に盛り込む予定である。したがって、*in vitro* 光毒性試験 (CTD 4.2.3.7.1-1 (U-2433)) の結果を考慮すると、アファチニブに対する追加の *in vivo* 光安全性試験は、必要ないと判断された。

4.8 不純物

アフアチニブ原薬 (DS) あるいは製剤 (DP) 中に存在する不純物の安全性を、ICH ガイドライン Q3A (R2) 「新原薬中の不純物」および Q3B (R2) 「新製剤中の不純物」に従って評価した。Q3A (R2) に従い、DS の 0.15% あるいは 1 日総摂取量 1.0 mg を超える場合、安全性の確認が必要となる。Q3B (R2) に従い、DP 中の 0.5% あるいは 1 日総摂取量 200 µg を上回る場合、その不純物の安全性の確認が必要となる。

したがって、不純物である 類縁物質A*、類縁物質C*、類縁物質B* および 類縁物質D* について、不純物を添加したアフアチニブの原薬を用いて適切な遺伝毒性試験およびラット 13 週間経口投与毒性試験を実施し、安全性を確認した。類縁物質A* の他にも検出された加水分解産物であるジメチルアミンについては、文献を調査した。その結果、ヒト体内ではコリンの代謝や様々な食物の消化によってジメチルアミンが産生されることから、アフアチニブ製剤中に 0.3% のジメチルアミンが含まれても許容可能であると結論した。

不純物の安全性を確認する 13 週間試験 [CTD 4.2.3.7.6-1 (U-1345)] では、不純物である 類縁物質A*、類縁物質C*、類縁物質B*、類縁物質E*、類縁物質F*、類縁物質G*、類縁物質H* および 類縁物質D* をアフアチニブに添加し、0 (溶媒対照)、2.0、5.0 および 8.5 mg/kg/日のアフアチニブをラットに 13 週間経口投与した。一般状態、血液学ならびに血液生化学検査値における変化および形態学的所見が、試験中および病理組織学的評価で観察された。しかし、不純物を含まないアフアチニブ単剤による反復投与試験中で観察された所見と異なる変化または標的器官はなかった。したがって、不純物を添加したアフアチニブの投与が、アフアチニブ単剤による毒性に影響しないことが明らかとなった。以上より、不純物に対する NOAEL は、高用量 8.5 mg/kg/日と判断された。

表 4.8: 1 に、DS および DP 中のアフアチニブ不純物の申請規格案、アフアチニブ 50mg/日に基づく最大曝露量、ラット 13 週間毒性試験で用いたスパイクしたアフアチニブロット中の不純物の分析値、ヒト 60 kg 体重で換算したラット 13 週間毒性試験における NOAEL での最大曝露量およびラットとヒトの曝露量 (mg) 比較に基づく安全域を記載した。したがって、規格限界値内の DS または DP における不純物は、それらの安全性が担保されると判断された。

* : 新薬承認情報公開時に置き換えた

表 4.8: 1 アファチニブ原薬 (DS) および製剤 (DP) 中の不純物に対する判定基準 (%) および安全域 (曝露比較)

不純物	DS 申請規格案 (≤) (安全性確認の閾値: 0.15%)	DP 申請規格案 (≤) (貯蔵有効期間) (安全性確認の閾値: 0.50%)	アファチニブ 50mg/日に基づくヒト最大可能曝露量 [mg]	ラット 13 週間毒性試験で用いたロット中の実側値[%]	ヒト 60 kg 体重で換算したラット 13 週間毒性試験における NOAEL での最大曝露 [mg]	ラットとヒトの曝露量 (mg) 比較に基づく安全域
類縁物質A*	1.2	3.0	1.50	6.38	32.54	21.7
類縁物質C*	0.10 ³⁾	0.5	0.25	0.76	3.88	15.5
類縁物質B*	0.30	-	0.15	0.60	3.06	20.4
類縁物質E*	0.10 ³⁾	-	0.05	0.48	2.45	49.0
類縁物質F*	0.10 ³⁾	-	0.05	0.24	1.22	24.4
類縁物質G*	0.10 ³⁾	-	0.05	0.32	1.63	32.6
類縁物質H* ¹⁾	-	0.4	0.20	0.64	3.26	16.3
類縁物質D* ²⁾	0.20	-	0.10	0.50	2.55	25.5
ジメチルアミン	0.05	0.3	0.15	-	-	-

1: アファチニブの N-オキシド代謝産物およびアファチニブ製剤の分解生成物

2: アファチニブの光学異性体

3: 原薬申請規格において個別規格を設定する不純物には含まれない (個別規格を設定しない不純物)。

原薬/製剤の申請規格案では (表 4.8: 1), 不純物類縁物質A*, 類縁物質C* および類縁物質B* の許容限度値は, ICH で規定されている安全性評価の必要な閾値より高いレベルに設定された。これらの不純物について, 個々の不純物の遺伝毒性を, ラット由来の肝ミクロソーム (S9mix) の非存在下および存在下で *in vitro* 試験 (Ames 試験, 染色体異常試験) で評価した。不純物類縁物質B* については, さらに詳細に評価するために, 染色体異常試験の代替として *in vivo* コメットアッセイ/小核試験の組み合わせ試験を実施した。類縁物質D* (アファチニブの光学異性体) は Ames 試験で評価した [CTD 4.2.3.7.6-19 (U-1791)]。その結果, 類縁物質A*, 類縁物質C* および類縁物質D* については, 遺伝毒性は認められなかった。類縁物質B* は試験菌株 TA 98 における復帰突然変異体数が軽度増加 (2.5 倍) したため, 「Ames 陽性」と判定されたが [CTD 4.2.3.7.6-16 (U-1285)], *in vivo* コメットアッセイ/小核試験の組合せでは DNA 損傷の誘発または細胞遺伝学的損傷はみられなかった [CTD 4.2.3.7.6-20 (U-1792)]。Weight of evidence アプローチに基づき評価したところ, これら 2 つの生物学的に関連する *in vivo* 遺伝毒性評価項目における陰性反応は, 高濃度での Ames 試験の TA 98 試験株にみられた類縁物質B* の弱い陽性結果よりもより重要な情報と考えられることから, 類縁物質B* は遺伝毒性がないと判断された。

*: 新薬承認情報公開時に置き換えた

不純物のジメチルアミン (DMA) については、文献調査から評価した。DMA はヒト体内に生理的に存在しており [CTD 4.3-57 (R09-6418), CTD 4.3-59 (R09-6436), CTD 4.3-61 (R09-6439)] , 作業曝露限界値は比較的高く CTD 4.3-69 (R10-2937) , 普通の食料品に自然に含まれている [CTD 4.3-58 (R09-6434), CTD 4.3-62 (R09-6441), CTD 4.3-63 (R09-6442)] 。そのため、アファチニブ投与による患者 1 人当たり DMA 最大 0.15 mg/日以内の曝露であれば、通常の DMA 1 日曝露量に対してごくわずかな追加曝露に過ぎない。したがって毒性学的に許容されると考えられる。

DS あるいは DP 中に混在が予想される不純物について、それらの化学構造から遺伝毒性を評価した。最初に、遺伝毒性およびがん原性に関するデータベース (MDL Toxicity Database, SciFinder, Toxnet および Leadscope など) で文献検索を行い、続いて、DEREK (Version 13) および MC4PC (MCCase, Version 2.3/2.4) による *in silico* 変異原性解析で評価した。化学構造に対して変異原性に関連したアラートを引き起こす不純物について、遺伝毒性不純物に関する EMA ガイドラインに従って、ラット肝ミクロソーム (S9mix) の非存在下および存在下で *in vitro* 細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) により評価 [CTD 4.3-53 (R06-2395)] した。「Ames 陽性」と判定された類縁物質I* を例外として [CTD 4.2.3.7.6-14 (U-1031)] , 試験した不純物はいずれも遺伝毒性および遺伝毒性を示す可能性のある不純物とはみなされなかった。類縁物質I* については、その前駆体、すなわち「Ames 陽性」出発原料である不純物類縁物質J* の制御法を確立したため、類縁物質I* の量は毒性学的な懸念の閾値である 1.5 µg/日を明らかに下回っていることが示された。

* : 新薬承認情報公開時に置き換えた

5. 総括および結論

アファチニブは、経口投与可能で不可逆的な低分子 EGFR/HER2/HER4 チロシンキナーゼ阻害剤 (ErbB ファミリー阻害剤) である。標的分子の EGFR または HER2 のどちらかを単独で阻害するよりも両方を阻害する方が、非臨床的にも、臨床的にも優れた効果を示すことを期待し、デザインされた薬剤である。アファチニブは不可逆的に分子標的と結合することにより、血漿中薬剤濃度が阻害発現濃度を下回った場合においても効果の持続がみられると考えられた。酵素阻害実験において、アファチニブは EGFR, HER2 ならびに HER4 に対してそれぞれ 0.5 nM, 14 nM ならびに 1.1 nM の IC₅₀ で阻害作用を示すことが明らかとなった。分子標的への選択性を検討するため、EGFR, HER2, HER4 以外の種々のキナーゼ類の酵素活性を検討したが、アファチニブによって明らかな影響は認められなかった。また、*in vitro* での副次的薬理試験においても影響は認められなかった。

アファチニブの *in vivo* における阻害作用は、ヌードマウスまたはトランスジェニックマウスを用いて、作用機序関連あるいは病態関連モデルで検討した。薬効を発現するためには、中枢神経系や胎児を除くアファチニブの広範な組織への分布が必要であり、このことは薬物動態試験で確認されている。通常、一日量アファチニブ 20 mg/kg (60 mg/m²) は、腫瘍退縮を引き起こすのに十分な用量であり、2~4 週間の投与においても、マウスにおいて良好な認容性を示した。十分な抗腫瘍活性 (T/C 比<10%) を示すために必要な最高血漿中濃度は 80~285 nM であり、対応する AUC₀₋₂₄ の範囲は 0.6~3.2 μM·h であった。このデータは 50 mg/日のアファチニブを患者に投与した後に得られる曝露量と一致しており、その場合、定常状態におけるアファチニブの平均最高血漿中濃度は 158 nM (77 ng/mL) , 曝露量は 2.3 μM·h であった [CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)]。

マウス、ラットおよびミニブタを用いた吸収、分布、代謝および排泄に関する薬物動態試験から、血漿中の主成分は非結合型薬物であることが示された。ディスプロポーションेट (ヒト特有の、あるいは動物よりヒトのほうが多い) 代謝物に関しては、FDA のガイダンス「薬物代謝物の安全性試験」におけるクライテリアである AUC 限界値 10%を超える代謝物はみられなかった [CTD 4.3-54 (R08-2457)]。

細胞膜および細胞単層に対するアファチニブの受動透過性は高かった。しかし、ラットにおけるアファチニブの吸収率は比較的 low、ラットおよびミニブタにおける絶対経口バイオアベイラビリティは限られていた。マウス、ウサギおよびヒト被験者でも、経口投与されたアファチニブは糞中に未変化体が最大画分として認められたことから、アファチニブは胃腸管で完全に吸収されない可能性が高かった。アファチニブは小腸の排出トランスポーターである P 糖蛋白および BCRP の基質であるため、このことが小腸での排出による吸収の不完全性の説明となるかもしれない。

アファチニブを経口投与した場合、高くて用量依存的な曝露 (トキシコキネティクス評価に基づく) が観察された。脳や妊娠ラットの胎児といった少数の顕著な例外を除き、アファチニブの受動透過性は高いため、薬剤由来物質は体内に広範に分布した。例外については、排出トランスポーターの P 糖蛋白および BCRP による排出輸送によって説明可能であり、P 糖蛋白および BCRP が基質であるアファチニブの血液脳関門および胎盤関門の通過を防ぐと考えられた。

アフアチニブは受動浸透性が高いために肝臓にも十分分布した。しかし、アフアチニブは肝取り込みトランスポーターの基質ではないことが判明した。血漿蛋白結合率は比較的高いが、このためにアフアチニブの臓器および身体深部区画への分布が制限されることはなかった。結果として、ラットおよびミニブタにおけるアフアチニブの分布容積は大きかった（それぞれ 16.2 および 12.4 L/kg）。

代謝の中でも特に酸化代謝はアフアチニブの排泄における重要性が低かった。循環血漿中の主な成分は未変化体であった。CYP3A4 によるアフアチニブの酸化的 *N*-脱メチル化がヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験で観察されたが、その結果、生じる代謝物の m10 については、健康被験者および癌患者における *in vivo* 試験で測定可能な量は検出されなかった。このデータおよびヒト肝細胞を用いた試験の結果から、アフアチニブの体内動態および排泄に CYP3A4 が触媒する代謝はほとんど関与しないことが示唆された。アフアチニブはマイケル付加反応の受容体分子として作用できるため、主要な代謝経路はマイケル付加反応による求核分子（グルタチオンやシステインなど）や蛋白質との抱合体形成であった。この点に関しては、動物種とヒトの間で代謝経路に大きな量的差異はなかった。

in vitro 試験でアフアチニブはチトクロム P450 酵素に対し明らかな干渉を示さなかった。そのため、アフアチニブが P450 酵素を阻害または誘導することによって薬物間相互作用が生じる可能性は低い。*in vitro* 試験の結果から、アフアチニブが *in vivo* で OATP, OAT または OCT の薬物トランスポーターを阻害する可能性は非常に低いことが示された。

代謝酵素が寄与することなくアフアチニブが抱合体を形成できるのは、アフアチニブ分子内に α,β -不飽和ケトンの化学構造があるという顕著な特徴のためであった。その結果として、アフアチニブはマイケル付加反応の受容体分子として作用できる。この特徴は、アフアチニブの薬理的な標的受容体を不可逆的に阻害するために、アフアチニブの構造中に意図的に導入されている。こうした化学構造を持つために、アフアチニブはグルタチオン、システインおよび蛋白質などの求核性反応物と付加体（抱合体）を形成することができる。すなわち、すべての動物種およびヒトにおける *in vivo* 試験で、アフアチニブと血漿蛋白の付加体が観察されている。*in vitro* 試験においても、動物種およびヒトの血漿蛋白とアフアチニブの付加体形成ならびにヒト血清アルブミンおよびヘモグロビンとアフアチニブの付加体形成が検出されている。酵素の活性化または代謝酵素の触媒活性をまったく要することなく、このような付加体が形成される。

アルブミンとの共有結合は過去に他の腫瘍治療薬（クロラムブシル、メルファランなど）でも観察されており [CTD 4.3-75 (P07-01012)]、ペニシリン類でも記述されている [CTD 4.3-77 (P92-68316)]。血中に共有結合により修飾された蛋白質が存在するとアレルギー性反応を生じる一定のリスクが生じる可能性がある [CTD 4.3-76 (P09-13633)]。現在のところアレルギー性反応の発現率および重症度を非臨床データから予測することはできないが、これまでに付加体形成とアレルギー性反応発現の間に密接な関係は報告されていない。ペニシリン類の場合でさえ、アレルギー性反応の発現率は二峰性アルブミン血症が観察される頻度よりはるかに低い [CTD 4.3-56 (R09-5864)]。確かな結論を出すためにはより多くの患者データが必要だが、共有結合付加体形成と特異体質反応発現の間に直接的な関係があることはアフアチニブの場合にも当てはまらないと予想される。

アファチニブは主に未変化体として糞中排泄され、経口投与後に腎排泄される薬剤由来物質の割合は、ヒトを含め検討したすべての種で、投与量の 5%未満であった。これらの所見から、アファチニブの全体的な薬物動態に代謝および腎排泄が果たす役割は小さいことが示された。動物種のデータから、胆汁中排泄がアファチニブの主要な排泄経路であることが示唆される。アファチニブに関連した放射能が授乳期のラットで大量に乳汁排泄された理由は、おそらくアファチニブの脂肪親和性および BCRP 排出トランスポーターの基質という特性の両者にあると考えられた。

ICH ガイドラインに従って一連の毒性試験を実施し、アファチニブの非臨床安全性を評価した。実施した *in vivo* 試験には以下が含まれる：マウスおよびラットの急性（単回投与）試験；ラット（4 週間、13 週間および 26 週間）およびミニブタ（4 週間、13 週間および 52 週間）における反復投与試験；マウスのがん原性試験のための用量設定試験；ラットの受胎能および初期胚発生、出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験、ラットおよびウサギの胚・胎児発生毒性試験；ウサギの局所刺激性試験。主な試験はすべて GLP 適用下で実施し、アファチニブの経口投与後の毒性を評価するために、十分高い用量を用いた。さらに、副次的薬理作用および安全性薬理コアバッテリー試験を実施した。

反復経口投与毒性試験で実施されたトキシコキネティクスの結果、親化合物であるアファチニブの十分な薬物曝露が確認された。ラットでは、最高血漿中濃度および全身曝露（AUC）は、投与期間が 4 週間から 26 週間に進むにつれて、用量比を上回る増加を示した。さらに、26 週間試験において、薬剤の蓄積は、雌より雄で顕著に認められた。マウスおよびミニブタでは、薬剤の蓄積は観察されず、曝露における有意な性差は認められなかった。ミニブタでは、全身曝露の用量比を上回る増加が高用量で観察された。妊娠ウサギでは、薬剤蓄積はなく、AUC₀₋₂₄ は、用量比を若干上回って増加した。

アファチニブの毒性作用は、ラットでは 4~26 週間、ミニブタでは 4~52 週間の投与期間を通じて一貫した毒性発現傾向を示した。全般的に、投与期間が延びるにしたがって、高用量を下げる必要があった。

反復経口投与毒性試験では、ラットおよびミニブタをげっ歯類および非げっ歯類として、それぞれ選択した。アファチニブの主な標的器官は、皮膚および腎（ラット）に加えて消化管（ラットおよびミニブタ）であった。消化管では、ラットおよびミニブタの胃における上皮の用量依存的な萎縮とそれに伴って局所的なびらん／潰瘍が観察された。臨床的には、これは、両種における軟便／下痢ならびに高用量の数例のミニブタで便潜血を特徴とした。萎縮はラットおよびミニブタの腸管上皮で顕著であったが、マウスではむしろ肥大および過形成が認められた。上皮萎縮がみられたその他の器官は、ラットでは皮膚、前立腺、子宮および膈ならびにマウスおよびミニブタでは上気道、前立腺、精囊および眼の角膜であった。さらに、消化管および気道における粘液腺にも萎縮がみられた。これらの変化はすべて軽微～中等度で、ほとんどの所見は十分可逆的であり、EGF 受容体の分布と一致したため、アファチニブによる ErbB シグナ

ル伝達の阻害に関連すると考えられる。観察された好中球増加は、皮膚（ラット）および消化管（ラットおよびミニブタ）における炎症過程に続発する反応性変化と考えられた。

ラットは、マウスと比較して、より感受性の高いげっ歯類の動物モデルと判明した。Wistar Han ラットの4週間経口投与毒性試験 [CTD 4.2.3.2-5 (U-1775)] および CD-1 マウスの4週間経口投与用量設定試験 [CTD 4.2.3.2-1 (U-1451)] において、両種において同一用量であるアファチニブ 18 mg/kg を投与し、同等の血漿中濃度が得られた。CD-1 マウスでは死亡はなく、非常に軽度の影響のみが認められ、この用量が NOAEL と判断された。一方、ラットでは 14/40 例で投与期間中に早期死亡あるいは切迫屠殺され、明らかな毒性が認められた。さらに、ラットと比較して明らかに高い全身曝露が認められたにもかかわらず、マウスでは腎の変化が観察されなかったことは特記すべきである。このように、ラットの4週間経口投与毒性試験 (CTD 4.2.3.2-5 (U-1775)) では、8.5 mg/kg/日 (51 mg/m²/日) (AUC₀₋₂₄=2030 nmol・h/L) で、雄 1 例に腎乳頭壊死が観察されたが、CD-1 マウスの 13 週間経口投与 MTD 試験 [CTD 4.2.3.2-2 (U-1089)] では、3 倍を超える投与期間後に、ラットに比べて 4.7 倍高い全身曝露 (AUC₀₋₂₄=9500 nmol・h/L) を伴う 27 mg/kg/日 (81 mg/m²/日) の用量でも腎の変化は認められなかった。さらに 11.4 倍高い全身曝露 (AUC₀₋₂₄=23200 nmol・h/L) を示し、10 週目にマウスが早期屠殺された 36 mg/kg/日 (108 mg/m²/日) の高用量でも、腎の変化は観察されなかった。

単回投与および反復投与毒性試験で観察された毒性は、市販薬である低分子型 EGF 受容体阻害剤ゲフィチニブ [CTD 4.3-65 (R09-6554)]、エルロチニブ [CTD 4.3-32 (R09-6552)] およびラパチニブ [CTD 4.3-64 (R09-6553)] の非臨床安全性試験に関する公表された承認審査に関する情報とほぼ一致する。これらの薬剤では、毒性の標的器官として、上気道の上皮萎縮、雌雄の生殖器および眼の角膜に加え、消化管、皮膚および腎が挙げられ、これは、EGF 受容体阻害剤の薬力学的効果と一致すると考えられる。ゲフィチニブ、ラパチニブ、あるいはエルロチニブを服用した患者で報告された肝毒性 [CTD 4.3-74 (S10-2025)] は、反復投与毒性試験で投与された毒性用量でも、アファチニブでは認められなかった。

アファチニブは HER2 および HER4 と結合することから、ラットおよびミニブタにおける反復投与毒性試験では、アファチニブの心毒性作用について特に注意深く検討された。HER2 モノクローナル抗体のトラスツズマブが左室駆出率 (LVEF) 低下およびうっ血性心不全という形で心毒性に関連することが報告されている。しかし、ラットにアファチニブを最長 26 週間、ミニブタに 52 週間まで投与した長期経口投与試験では、心毒性の徴候は観察されなかった。マウス、ラットおよびミニブタにおいては、心の形態学的異常はみられなかった。心毒性のバイオマーカーであるトロポニン T の増加もみられなかった。ミニブタで観察された心に対する作用は、4 週間毒性試験における 2.45 および 6 mg/kg/日 (85.5 および 210 mg/m²/日) の投与量でのみ観察された持続的な QT 間隔短縮を伴う心拍数の用量依存的な上昇であり、これらの作用は 13 週間および 52 週間毒性試験で同様の全身曝露量が得られたにもかかわらず再現できなかった。したがって、ミニブタ 4 週間毒性試験で認められた心拍数および QT 間隔に対する作用は、毒性学的には意味のない 4 週間試験のみの特異な影響の可能性が高いと考えられる。

癌患者を対象としてアファチニブ 50 mg を投与した第 II 相試験では、投与第 1 日および第 14 日（最高血漿中濃度=178 nmol/L；AUC₀₋₂₄=2570 nmol·h/L）に評価したところ、QT 間隔または心拍数で補正した QT 間隔の延長、他の心電図エンドポイントの変化および心拍数に対する作用は観察されなかった [CTD 5.3.4.2-1 (U■■-2519)]。

In vitro の安全性薬理試験（hERG カリウムチャネルを発現させた HEK293 細胞を用いた試験ならびに摘出モルモット心室乳頭筋の活動電位試験）において、アファチニブは QT 延長を引き起こすような心室の再分極に影響を与えることはないと考えられた。

副次的薬理試験として実施した麻酔下のブタにおける検討で、アファチニブは静脈内投与で心筋収縮力に対して影響が認められた [CTD 4.2.1.2-4 (U■■-1311)]。心筋収縮力（LVdP/dt-max）はアファチニブ 6.65 mg/kg（233 mg/m²）の投与では、溶媒投与群と比較して収縮性が低下する傾向が認められ、20 mg/kg（700 mg/m²）においては低下作用が認められた。6.65 mg/kg のアファチニブ投与における血漿中薬物濃度は 1200 nM であり、臨床試験においてアファチニブ 50 mg 投与時の最高血漿中濃度 C_{max, ss} 158 nM（77 ng/mL） [CTD 5.3.5.3-1 (U■■-1153)] とブタにおいて認められた心筋収縮力に及ぼす血漿中濃度を比較すると 7.6 倍の安全域があることが明らかとなった。したがって、アファチニブ投与による心筋収縮力低下がヒトで発現するリスクは低いと考えられた。なお、可逆的 EGFR/HER2 阻害剤ラパチニブにおいては、少数の患者で可逆的な、通常は症状を伴わない左室駆出率（LVEF）低下の発現が確認されている [CTD 4.3-31 (R09-5865)]。

マウスやラットを用いた試験において、アファチニブは中枢神経系ならびに呼吸器系に対して、顕著な作用は認められなかった。胃腸管系に対する作用は、ラットの試験においては主に 300 mg/kg（1800 mg/m²）の高用量においてのみ認められた。この結果は、経口 EGFR 阻害剤エルロチニブに関して公表されている規制当局の情報、すなわちエルロチニブでみられたラットへの経口または静脈内投与後にみられる用量依存的な胃排出能の阻害は薬効分類に共通する作用であるとの記載に一致するものであった [CTD 4.3-32 (R09-6552)]。以上のことから、消化管に対する影響の発現は患者に投与する用量をはるかに上回るアファチニブの高用量に限られたため、臨床的な意義はないと考えられる。

副次的薬理試験のラットにおける試験において、腎および肝機能に対してアファチニブ 300 mg/kg（1800 mg/m²）の高用量により影響が認められた [CTD 4.2.1.2-5 (U■■-1490)]。一方、ラットにおける最高 26 週間の反復投与試験では腎臓への形態学的な変化が認められたが、肝毒性は観察されなかった。さらにミニブタにおける最高 52 週間の反復投与試験においても肝毒性は観察されなかった。アファチニブの臨床用量（50 mg/日、体重 60 kg のヒトの 31 mg/m²に相当）に比較すると、ラット試験（CTD 4.2.1.2-5 (U■■-1490)）で影響が認められた 300 mg/kg（1800 mg/m²）は体表面積単位（mg/m²）で比較すると 58 倍の濃度であり、臨床での投与用量状況をはるかに上回るものであった。したがって、副次的薬理試験で観察されたアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼおよびアラニンアミノトランスフェラーゼの軽度の上昇は、患者に連日投与する場合とは関連性がない投与量を用いた場合に観察された単発的な所見と考えられる。マウス、ラットおよびミニブタを用いた反復投与毒性試験では、肝毒性の徴候はみられなかった。

抗がん剤では珍しいことではないが、非臨床試験における NOAEL およびその全身曝露量は、臨床用量およびその曝露量とほとんど差がなかった。したがって、表 5: 1 に示したように、慢性毒性試験から得られた NOAEL から算出したヒト等価用量と、アフアチニブ 50mg/日の反復投与後の臨床薬物動態データ ($C_{max, ss}$, $AUC_{0-24, ss}$) のいずれかを指標として、動物とヒトとを比較した場合に安全域はみられなかった。

表 5: 1 アフアチニブの用量と血漿中濃度に基づくヒトと動物との安全域の概要

種, 投与期間 資料番号 (社内報告書 番号)	動物試験の NOAEL [mg/kg]	NOAEL における HED ²⁾ [mg/m ²]	NOAEL に おける平均 C_{max} [nmol/L]	NOAEL にお ける平均 AUC_{0-24} [nmol·h/L]	ヒトに対する動物の安全域 ¹⁾		
					HED ²⁾ (mg/m ²) に基づく	C_{max} に基づ く ³⁾	AUC_{0-24} に基 づく ³⁾
ラット, 26 週間 CTD 4.2.3.2-7 (U- 1217)	1.5	9	M: 37.9 F: 17.2	M: 303 F: 97.7	0.3	M: 0.36 F: 0.16	M: 0.19 F: 0.06
ミニブタ, 52 週間 CTD 4.2.3.2- 13 (U- 2251)	0.5	17.5	M: 2.35 F: 1.34	M: 26.2 F: 19.5	0.6	M: 0.02 F: 0.01	M: 0.02 F: 0.01

¹⁾ 比較のため、定常状態における臨床試験 [CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)] のメタ解析から得られた以下のデータを使用した：ヒトのアフアチニブ 用量：50 mg/日，体重 60 kg 換算で 0.83 mg/kg (31 mg/m²) に相当。平均 C_{max} =158 nmol/L，平均 $AUC_{\tau, ss}$ =2330 nmol·h/L (注：アフアチニブ 1 nmol/L は アフアチニブ 0.486 ng/mL に相当する)

²⁾ FDA ガイダンス「成人健常志願者における治療法に対する臨床試験における安全開始用量の推定」にしたがったヒト等価用量 (換算係数：ヒトでは 37，ミニブタでは 35，ラットでは 6)

³⁾ 以下のタンパク結合を考慮した：ラットでは 7.4%，ミニブタでは 7.1%，ヒトでは 5%の非結合薬物画分 [CTD 5.3.2.1-2 (U-1101)]

遺伝毒性試験の結果，アフアチニブの Ames 試験では代謝活性化の有無にかかわらず *Salmonella typhimurium* 株 TA 98 において変異原性陽性を示した。無毒性濃度でのヒトリンパ球における染色体異常試験および明らかな毒性/致死および骨髄毒性用量まで実施したラット骨髄小核試験で，染色体異常誘発性は認められなかった。さらに，*in vivo* コメットアッセイにより，アフアチニブを MTD 以下で投与した場合に，ラットの肝，腎および空腸における DNA 損傷は認められなかった。最後に，MutaTM マウスを用いた 4 週間経口投与試験では肝，十二指腸および皮膚において突然変異誘発性はみられなかった。Weight of Evidence に基づき

評価すると、染色体異常試験において変異原性が認められず、3つの *in vivo* 試験において遺伝毒性が示されなかったことは、Ames 試験における単一試験株で観察された弱い陽性結果よりも重要な情報と考えられることから、アフチニブは生物学的に遺伝毒性がないと結論された。

ラットの受胎能および初期胚・胎児発生に対する著しい作用は、認められなかった。生存胚数は、8 mg/kg ではわずかに低値を示した（対照の 0.82 倍）が、この作用は、黄体数（対照の 0.91 倍）のわずかな低値に関連し、黄体数の減少は恐らく母体体重の減少に関連し [CTD 4.3-71 (R11-4562)]、特定の生殖毒性ではなく母動物における一般毒性の作用と考えられた。同じことが、着床後損失率の軽微な増加（対照の 2.3 倍）についても当てはまる。NOAEL である 8 mg/kg での全身曝露量は、雌に比べて雄でより顕著であるが、ヒトの臨床用量 50 mg で測定した血漿中濃度以下であった [CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)]。NOAEL である 8 mg/kg における非結合薬物画分を考慮した [CTD 5.3.2.1-2 (U-1101)] 安全域（ヒト臨床用量 50 mg の定常状態での曝露量との比較（CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)））は、雄では狭いか（AUC で 1.3）、雌では存在しなかった（AUC で 0.51）。

アフチニブの全身曝露量に関して、安全域（この投与量での時間曲線下面積に基づく曝露量を 50 mg 投与後の定常状態における臨床曝露量（CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)）と比較して得られた曝露量の倍数、薬物の非結合分画も考慮した（CTD 5.3.2.1-2 (U-1101)）はラットで小さく（2.2）、ウサギでは極めて小さい（0.3）。

ラットおよびウサギを用いたアフチニブの胚・胎児発生試験では、母動物に対する明らかな毒性および生命を脅かす毒性を引き起こす作用が高用量でみられたにもかかわらず、胚・胎児に対する著しい毒性作用や催奇形性作用は認められなかった。明らかな毒性作用がみられなかった理由としては、妊娠雌ラットでは薬剤が胎盤を通過しにくいこと [CTD 4.2.2.3-1 (U-1374)] に起因する可能性がある。また、ウサギでは、概して胚胎児への影響は少なく、観察された所見は高用量に限られ、偶発的あるいは溶媒対照群と比較して若干高い発生率で認められた変異のみであった。ラットおよびウサギにおける胚・胎児の NOAEL をヒト（非結合薬物画分を考慮した（CTD 5.3.2.1-2 (U-1101)）50 mg 投与後の定常状態における AUC（CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)）と比較すると、ラットはわずかな安全域（AUC で 2.2）を示したが、ウサギでは安全域をほとんど確保できなかった（AUC で 0.3）。

ラットにおける出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験では、新生児の出生時体重および体重増加の減少が認められたが、機能発達に関する検査値、性成熟または行動の成績に対して意義のある影響はなかった。6 mg/kg の用量では NOAEL である 8 mg/kg 投与時の全身曝露量と同じく高い曝露がみられたにもかかわらず、毒性作用は観察されなかった。非結合薬物画分を考慮する（CTD 5.3.2.1-2 (U-1101)）と、安全域（ヒト臨床用量 50 mg の定常状態での曝露量との比較（CTD 5.3.5.3-1 (U-1153)））は確保できなかった（AUC で 0.23）。6 あるいは 8 mg/kg の投与での全身曝露量がほぼ同レベルであったことは特記すべきである。さらに、全身曝露量（AUC）は同一試験施設で実施された受胎能および着床までの初

期胚発生に関する試験での AUC に比べて明らかに低値を示した [CTD 4.2.3.5.1-1 (U-2843)]。両試験での全身曝露量の差異に対する理由を明らかにすることはできなかった。

生殖発生毒性試験の結果を総合すると、受胎能および初期胚発生に対する著しい作用はみられず、催奇形性はなく、骨化遅延／未骨化（ラット）または変異（ウサギ）の比較的高い発生率のみがみられ、ラットの出生前および出生後の発生ならびに母動物の機能に関する試験において出生児の出生時体重および体重増加にごくわずかな影響が認められた。全般的に、これらの結果は、すでに上市されている EGFR 阻害剤で認められた所見と一致する [CTD 4.3-32 (R09-6552), CTD 4.3-64 (R09-6553) および CTD 4.3-65 (R09-6554)]。非臨床生殖発生毒性試験における薬物の全身曝露は、全般的にヒトでの曝露をわずかに上回るに過ぎないか（ラットの胚・胎児発生、雄ラットの受胎能）、低かった（雌ラットの受胎能および出生前／出生後発生；すべてのウサギ曝露）ため、安全域（曝露量に基づく）が確保できなかった。したがって、動物試験データに基づいたヒトに対する生殖発生毒性について評価することはできなかった。

アファチニブの原薬あるいは製剤中に存在する不純物を、*in vitro* および *in vivo* 遺伝毒性試験およびラットの 13 週間反復経口投与毒性試験において、詳細かつ適切に評価した。すべての規格された不純物は、ラットとヒトの曝露量を比較した場合、十分広い安全域（曝露量に基づく）を示した。

アファチニブで治療される大部分の患者では、薬剤の薬力学的活性に関連して、皮膚における有害事象の発現が予想される。これは他の EGFR 阻害剤（ゲフィチニブ、エルロチニブ、ラパチニブ）で治療した患者でも観察されることが報告されている [CTD 4.3-66 (R10-2923) および CTD 4.3-67 (R10-2924)]。これらの皮膚に関連した有害事象に対する予防措置として、直接的な日光の曝露を避けることが含まれ、日光から皮膚を保護する衣服の着用および適切な日焼け止めの使用を、薬剤の光毒性の可能性にかかわらず、適正使用情報に盛り込む予定である。したがって、*in vitro* 光毒性試験 [CTD 4.2.3.7.1-1 (U-2433)] の結果を考慮すると、アファチニブに対する追加の *in vivo* 光安全性試験は、必要ないと判断された。

患者におけるアファチニブの全般的な有害事象プロファイルは、非臨床試験で得られたデータから大きく逸脱しないと考えられる。アファチニブの臨床試験で主に観察された有害事象は、下痢、発疹／ざ瘡、爪の異常および口内炎である。消化管および皮膚もまた、反復投与毒性試験における重要な標的器官であった。患者では腎機能不全が、低い発現率ではあるが、観察された。その大部分は可逆的で、発現する時期が下痢の発現と密接に関連していた。そのため、腎有害事象は腎毒性の徴候であるというよりも、下痢に起因する脱水の続発症である可能性が高いことが示唆される。ラットで観察された腎乳頭壊死は、ヒトではみられないと考えられた。患者の心機能（左心室収縮機能、QT 間隔）に明らかな影響は認められず、これはミニブタを用いた副次的薬理試験および反復投与毒性試験の結果と一致する。

以上、一連の非臨床試験の結果を要約すると、アファチニブは *in vitro* において強力かつ不可逆的であり、経口投与によっても生体で効果を示す (*in vivo* 活性を有する)

EGFR/HER2/HER4 チロシンキナーゼ阻害剤 (erbB ファミリー阻害剤) である。エルロチニブやゲフィチニブなどの可逆的 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に抵抗性の EGFR 変異に対しても、アファチニブは *in vitro* および *in vivo* 活性を示した。薬物動態試験の結果から、アファチニブは薬剤として適切な ADME の性質を有することが示唆され、組織に広く分布し、抗腫瘍活性を示すために十分長い全身曝露が得られた。さらに、ヒトと動物の試験結果を比較しても、全般的な薬物動態学的性質に目立った違いはみられなかった。動物に生命を脅かす高用量まで投与した毒性試験で観察された一般症状、血液学的、血液生化学的および形態学的所見の特徴は、HER2 に対する阻害活性の有無にかかわらず、他の低分子 EGFR 阻害剤で得られているデータと一致する。さらに、アファチニブ投与後に生じる一連の変化は概して軽微から中等度で、ほとんどが可逆的であり、さらに標的受容体の分布と一致していた。したがって、これらの変化はおそらくアファチニブによる ErbB シグナル伝達の阻害と関連すると考えられる。遺伝毒性試験の結果から、アファチニブに遺伝毒性はないと結論付けられた。受胎能、初期胚発生、出生前および出生後の発生に関する試験では、母動物における一般毒性に関連すると考えられる所見、アファチニブの薬理作用に関連すると考えられる所見 (受胎能試験)、または新生児の体重に対するわずかな影響 (出生前/出生後の発生) が観察された。胚・胎児発生試験では、催奇形性の徴候は認められず、一連の毒性所見は許容範囲内であった。慢性毒性試験および臨床試験から得られたヒトの等価用量および全身曝露量に基づく安全域が、たとえ確保できないとしても、アファチニブについて確認された安全性プロファイルは、生命を脅かす適応症に対して承認申請を行う意義は十分にあると考える。

これらの非臨床安全性データに基づき、アファチニブは EGFR に変異を有する局所進行性または転移性の非小細胞肺癌に対する治療薬として、優れた薬理活性、適切な薬物動態学的性質および許容可能な毒性プロファイルを有する薬剤であると考えられる。

6. 参考文献

- P07-01012 Zhou S, Chan E, Duan W, Huang M, Chen YZ. Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metab Rev.* 2005;37(1): 41-213. (CTD 4.3-75)
- P07-14966 Schuetze C, Doerfler A, Eicheler W, Zips D, Hering S, Solca F, et al. Combination of EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibition by BIBW 2992 and BIBW 2669 with irradiation in FaDu human squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol.* 2007;183(5):256-264. (CTD 4.3-6)
- P08-06904 Li D, Ambrogio L, Shimamura T, Kubo S, Takahashi M, Chirieac LR, et al. BIBW 2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene.* 2008;27(34):4702-4711. (CTD 4.3-5)
- P09-00886 Perera SA, Li D, Shimamura T, Raso MG, Ji H, Chen L, et al. HER2^{YVMA} drives rapid development of adenosquamous lung tumors in mice that are sensitive to BIBW 2992 and rapamycin combination therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(2):474-479. (CTD 4.3-4)
- P09-09950 Nguyen KSH, Kobayashi S, Costa DB. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer.* 2009;10(4):281-289. (CTD 4.3-3)
- P09-12297 Regales L, Gong Y, Shen R, Stanchina E de, Vivanco I, Goel A, et al. Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer. *J Clin Invest.* 2009;119(10):3000-3010. (CTD 4.3-7)
- P09-13633 Park BK, Kitteringham NR. Drug-protein conjugation and its immunological consequences. *Drug Metab Rev.* 1990;22(1):87-144. (CTD 4.3-76)
- P92-68316 Wright AJ, Wilkowske CJ. The penicillins. *Mayo Clin Proc.* 1991;66(10):1047-1063. (CTD 4.3-77)
- R00-0982 Shawver LK. Tyrosine kinase inhibitors: from the emergence of targets to their clinical development. 35th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology, Atlanta, 15-18 May 1999 In: American Society of Clinical Oncology. 1999 Educational Book. 1999:29-47. (CTD 4.3-34)
- R00-0983 Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br Med Bull.* 1991;47(1):87-98. (CTD 4.3-42)

- R00-0984 Modjtahedi H, Dean C. The receptor for EGF and its ligands: expression, prognostic value and target for therapy in cancer (review). *Int J Oncol.* 1994;4:277-296. (CTD 4.3-44)
- R00-0985 Sainsbury JRC, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet.* 1987;1:1398-1402. (CTD 4.3-45)
- R01-0006 Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature.* 1984;309:418-425. (CTD 4.3-22)
- R02-0254 Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res.* 2000;77:26-79. (CTD 4.3-43)
- R03-2388 Everett RM, Descotes G, Rollin M, Greener Y, Bradford JC, Benziger DP, et al. Nephrotoxicity of pravadoline maleate (WIN 48098-6) in dogs: evidence of maleic acid-induced acute tubular necrosis. *Fundam Appl Toxicol.* 1993;21(1):59-65. (CTD 4.3-51)
- R04-4507 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350(21):2129-2139. (CTD 4.3-1)
- R04-4508 Paez JG, Jaenne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304:1497-1500. (CTD 4.3-2)
- R06-0981 Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 1997;16(7):1647-1655. (CTD 4.3-37)
- R06-2395 European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP): guideline on the limits of genotoxic impurities (London, 28 June 2006, CPMP/SWP/5199/02, EMA/CHMP/QWP/251344/2006). London: European Medicines Agency, Evaluation of Medicines for Human Use 2006. (CTD 4.3-53)
- R08-2457 Guidance for industry: safety testing of drug metabolites (February 2008). Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2008. (CTD 4.3-54)

- R09-5864 Lapresle C, Wal JM. The binding of penicillin to albumin molecules in bisalbuminemia induced by penicillin therapy. *Biochim Biophys Acta*. 1979;586:106-111. (CTD 4.3-56)
- R09-5865 Perez EA, Koehler M, Byrne J, Preston AJ, Rappold E, Ewer MS. Cardiac safety of lapatinib: pooled analysis of 3689 patients enrolled in clinical trials. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(6):679-686. (CTD 4.3-31)
- R09-6418 Mitchell SC, Zhang AQ, Smith RL. Dimethylamine and diet. *Food Chem Toxicol* 2008;46:1734-1738. (CTD 4.3-57)
- R09-6434 Neurath GB, Duenger M, Pein FG, Ambrosius D, Schreiber O. Primary and secondary amines in the human environment. *Food Cosmet Toxicol* 1977;15:275-282. (CTD 4.3-58)
- R09-6436 Asatoor AM, Simenhoff ML. The origin of urinary dimethylamine. *Biochim Biophys Acta* 1965;111:384-392. (CTD 4.3-59)
- R09-6439 Zhang AQ, Mitchell SC, Smith RL. Dimethylamine in human urine. *Clin Chim Acta* 1995;233:81-88. (CTD 4.3-61)
- R09-6441 Zeisel SH, Wishnok JS, Blusztajn JK. Formation of methylamines from ingested choline and lecithin. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;225(2):320-324. (CTD-4.3-62)
- R09-6442 Singer GM, Lijinsky W. Naturally occurring nitrosatable compounds.I.Secondary amines in foodstuffs. *J Agric Food Chem* 1976;24(3):550-553. (CTD 4.3-63)
- R09-6552 European Medicines Agency (EMA). Tarceva: scientific discussion. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/tarceva/061805en6.pdf>;2005. (CTD 4.3-32)
- R09-6553 Tykerb (lapatinib) (GlaxoSmithKline): pharmacology/toxicology review and evaluation (NDA, application number 22-059, marketing application approval date: March 12, 2007). http://www.accessdata.fda.gov/drugsatssdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022059s000_PharmR_P1.pdf ; http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022059s000_PharmR_P2.pdf ; http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022059s000_PharmR_P3.pdf; 2007. (CTD 4.3-64)
- R09-6554 Iressa (gefitinib) (AstraZeneca Pharmaceuticals): Center for Drug Evaluation and Research approval package for: application number 21-399: pharmacology review(s) (review and evaluation of pharmacology and toxicology data, filename 21399 Iressa for non-small cell lung cancer.doc, review number 1).

- http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/21-399_IRESSA_Pharmr_P1.pdf ; http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/21-399_IRESSA_Pharmr_P2.pdf; 2002.
(CTD 4.3-65)
- R10-0561 Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell*. 2003;11:495-505. (CTD 4.3-36)
- R10-0587 Marco E di, Pierce JH, Knicley CL, Fiore PP di. Transformation of NIH 3T3 cells by overexpression of the normal coding sequence of the rat neu gene. *Mol Cell Biol*. 1990;10(6):3247-3252. (CTD 4.3-40)
- R10-0761 Fiore PP di, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. ErbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*. 1987;237:178-182. (CTD 4.3-39)
- R10-0763 Dankort DL, Muller WJ. Signal transduction in mammary tumorigenesis: a transgenic perspective. *Oncogene*. 2000;19:1038-1044. (CTD 4.3-41)
- R10-0764 Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:453-481. (CTD 4.3-33)
- R10-0929 Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and *v-erb-B* oncogene protein sequences. *Nature*. 1984;307:521-527. (CTD 4.3-38)
- R10-2923 Giovannini M, Gregorc V, Belli C, Roca E, Lazzari C, Vigano MG, Serafico A, Villa E. Clinical significance of skin toxicity due to EGFR-targeted therapies. *J Oncol*. 2009:849051. (CTD 4.3-66)
- R10-2924 Perez-Soler R, Saltz L. Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5235-5246. (CTD 4.3-67)
- R10-2937 GESTIS international limit values: dimethylamine (CAS no. 124-40-3). http://bgia-online.hvbg.de/LIMITVALUE/WebForm_ueliste.aspx; 2010.
(CTD 4.3-69)
- R11-4562 Norman NA, Bruce NW. Fetal and placental weight relationships in the albino rat near term. *Teratology* 1979;19:245-250. (CTD 4.3-71)
- R12-1126 Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008;455:1069-1075. (CTD 4.3-35)

S10-2025 Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab* 2009;10(5):470-481. (CTD 4.3-74)