

**アレセンサカプセル20 mg
アレセンサカプセル40 mg
(アレクチニブ塩酸塩)**

第2部 (モジュール2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
c-MET	Mesenchymal-epithelial transition factor	肝細胞増殖因子受容体
EML4	Echinoderm microtubule associated protein like 4	微小管会合蛋白4
NPM	Nucleophosmin	ヌクレオフォスミン
KIF5B	Kinesin family member 5B	キネシンファミリーメンバー5B
EGFR	Epidermal growth factor receptor	上皮増殖因子受容体
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ
RON	Recepteur d'origine nantais	—

目次

	頁
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表.....	4
2.6.1 緒言	4
2.6.1.1 癌における ALK の機能.....	4
2.6.1.2 選択的 ALK 阻害剤の創製.....	4
2.6.1.3 薬理学的特性.....	5
2.6.1.4 承認申請の概要.....	5
2.6.1.5 参考文献.....	5

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 癌における ALK の機能

未分化リンパ腫キナーゼ（以下、ALK）はインスリン受容体スーパーファミリーに属する受容体型チロシンキナーゼである。ALK は未分化大細胞型リンパ腫において染色体転座の結果生じるヌクレオフォスミン (NPM)-ALK を構成する遺伝子として発見された¹⁾。その後も、ALK の遺伝子異常は複数の癌種において同定されており、炎症性筋線維芽細胞腫瘍においては ALK の融合遺伝子²⁾、神経芽腫においては ALK の遺伝子増幅や点変異³⁾が報告された。一方、ヒト正常組織において、ALK は中枢神経系などごく限られた一部の組織以外ではほとんど発現していないこと、中枢神経系での発現も未分化大細胞型リンパ腫と比較して低いこと⁴⁾が明らかとなっている。

2007年に Soda らのグループにより、微小管会合蛋白4 (EML4)-ALK 融合遺伝子が非小細胞肺癌における新規癌融合遺伝子として同定され⁵⁾、肺癌治療薬を研究開発する上での新たな標的分子として注目を集めるようになった。EML4-ALK 融合遺伝子は2番染色体の逆位に伴って生じ、その遺伝子産物である蛋白質が恒常的なキナーゼの活性化を引き起こしている。EML4-ALK 融合遺伝子の腫瘍形成能は、EML4-ALK 融合遺伝子を導入したマウス線維芽細胞を用いた形質転換活性⁵⁾や EML4-ALK 融合遺伝子を肺胞上皮特異的に発現するトランスジェニックマウスによる肺腺癌の発症⁶⁾により確認された。また、EML4-ALK 融合遺伝子には融合点の異なる複数のバリエーション⁷⁾や、キネシンファミリーメンバー5B (KIF5B)-ALK のように融合相手の異なる融合遺伝子⁸⁾も同定された。これら ALK 融合遺伝子に起因する異常な ALK のキナーゼ活性が、ALK 融合遺伝子陽性非小細胞肺癌の癌化及びその後の腫瘍増殖に関与していると考えられる。

また、非小細胞肺癌において EML4-ALK 融合遺伝子と上皮増殖因子受容体 (EGFR) あるいはカーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ (KRAS) の遺伝子変異が一部の例外を除き、相互に排他的な関係にあることが確認されている⁹⁾。EML4-ALK 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌患者は、標準治療薬の一つである EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の治療効果が乏しいことから¹⁰⁾、新たな治療法の確立が必要とされている。ALK は肺癌治療における新たな標的として有望であり、ALK 阻害剤は ALK 陽性非小細胞肺癌に対して効果的かつ有用な抗癌剤となることが期待される。

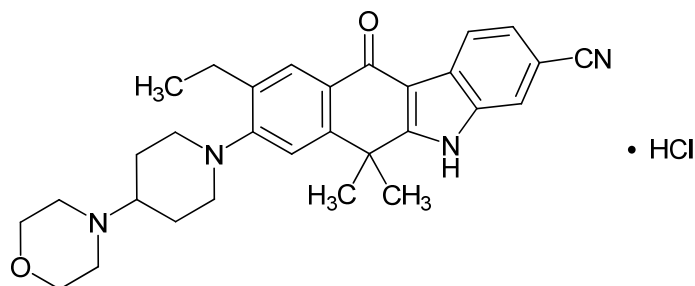
2.6.1.2 選択的 ALK 阻害剤の創製

現在、ALK を標的とした複数の低分子阻害剤は非臨床及び臨床のステージで研究開発がなされているが、クリゾチニブは ALK を標的として最初に臨床開発を開始した薬剤である。クリゾチニブは ALK 融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌患者を対象にした臨床試験において高い奏効率が示され¹¹⁾、新医薬品として本邦でも承認された。クリゾチニブは、ALK の他、肝細胞増殖因子受容体 (c-MET)、及び Recepteur d'origine nantais (RON) に対してもチロシンキナーゼ阻害活性を有している。一方で、クリゾチニブ処置により部分奏効した後、再発の認められた患者の癌検体を用いた遺伝子解析から、複数の ALK の点変異体が同定されており¹²⁾⁻¹⁴⁾、これらクリゾチニブ耐性に関与する点変異体にも効果を示す ALK 阻害剤の開発が求められている。

アレクチニブ塩酸塩（以下、本薬）の化学構造の基本骨格は、百万以上の化合物ライブラリーを用いたキナーゼ阻害剤のハイスループットスクリーニングの中から見出された。スクリーニングヒット化合物の中から化学構造的な新規性や安全性など複数の視点で、独自性の高い四環性構造のリード化合物を選抜した。更に、ALK 阻害活性の増強、キナーゼ選択性の向上及び薬物動態を改善するために、種々の構造的な改変を検討した。新規 ALK 阻害剤のデザイン

にあたっては、ALK の有する特異的なアミノ酸配列の情報、ALK の X 線結晶構造情報及びモデリングによる阻害剤のデザインなど構造に基づく医薬品設計の手法を複合的に利用し、化学構造上の最適化を行った。最終的に約600の化合物誘導体を合成し、その中から ALK に対する強い阻害活性と高いキナーゼ選択性とを兼ね備えた広い有効治療域を有する本薬の創製に成功した (図 2.6.1.2-1)。

図 2.6.1.2-1 アレクチニブ塩酸塩の化学構造



2.6.1.3 藥理学的特性

本薬は ALK のチロシンキナーゼ活性を阻害することで、ALK 遺伝子異常を有する癌に対し抗腫瘍効果を発揮する経口投与可能な分子標的治療薬である。

本薬又は本薬遊離塩基を用いた非臨床試験において、強力かつ選択性の高い *ALK* の酵素阻害活性が確認された。また、クリゾチニブ耐性に関与する点変異型 *ALK* 及び神経芽腫の発症に関与する活性化点変異型 *ALK* に対しても高い阻害能を有していた。本薬は *ALK* 融合遺伝子を有するヒト非小細胞肺癌細胞株及びリンパ腫細胞株に対し、*in vitro* 細胞増殖阻害試験及び *in vivo* 腫瘍増殖阻害試験において高い抗腫瘍効果を示した。特に、*in vivo* 試験においては顕著な腫瘍退縮も認められた。一方、*ALK* 融合遺伝子陰性のヒト癌細胞株に対しては、ほとんど効果を示さず、本薬の抗腫瘍効果は *ALK* 融合遺伝子陽性腫瘍に対し選択的であった。また、クリゾチニブ耐性に関与する *EML4-ALK* の点変異体を発現させた腫瘍に対しても、本薬は優れた抗腫瘍効果を発揮した。

2.6.1.4 承認申請の概要

本申請で予定している効能・効果及び用法・用量については2.2に記載した。

2.6.1.5 参考文献

- 1) Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, *ALK*, to a nucleolar protein gene, *NPM*, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994;263:1281-4.
- 2) Griffin CA, Hawkins AL, Dvorak C, Henkle C, Ellingham T, Perlman EJ. Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Res* 1999;59:2776-80.
- 3) Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of *ALK* as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455:930-5.
- 4) Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stroud D, et al. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 1997;89:1394-404.
- 5) Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561-6.
- 6) Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, et al. A mouse model for *EML4-ALK*-

- positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19893-7.
- 7) Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for *EML4-ALK* fusion transcripts. *Clin Cancer Res* 2008;14:6618-24.
 - 8) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3143-9.
 - 9) Webb TR, Slavish J, George RE, Look AT, Xue L, Jiang Q, et al. Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9:331-56.
 - 10) Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor *EML4-ALK*. *J Clin Oncol* 2009;27:4247-53.
 - 11) Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Eng J Med* 2010;363:1693-703.
 - 12) Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Eng J Med* 2010;363:1734-9.
 - 13) Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with *ALK* gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:1472-82.
 - 14) Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers. *Sci Transl Med* 2012;4:120ra17.

**アレセンサカプセル20 mg
アレセンサカプセル40 mg
(アレクチニブ塩酸塩)**

第2部 (モジュール2) : CTD の概要 (サマリー)

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

略語一覧

略語	英名	和名
ABL	Abelson tyrosine kinase	アベルソンチロシンキナーゼ
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	v-akt マウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ1
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
Aurora A	Aurora kinase A	オーロラキナーゼ A
CaMK2 α	Calcium /calmodulin-dependent protein kinase II alpha	カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II アルファ
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	サイクリン依存性キナーゼ1
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	サイクリン依存性キナーゼ2
C _{max}	Maximum (peak) plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
c-MET	Mesenchymal-epithelial transition factor	肝細胞増殖因子受容体
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
EGFR	Epidermal growth factor receptor	上皮増殖因子受容体
EML4	Echinoderm microtubule associated protein like 4	微小管会合蛋白4
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2	線維芽細胞増殖因子受容体2
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓由来
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2	ヒト上皮増殖因子受容体2
hERG	Human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
HPCD	Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	ヒドロキシプロピル- β -サイクロデキストリン
IC ₂₀	20% inhibitory concentration	20%阻害濃度
IC ₅₀	Half maximal (50%) inhibitory concentration	50%阻害濃度
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	I 型インスリン様増殖因子受容体
IL-3	Interleukin-3	インターロイキン-3
INSR	Insulin receptor	インスリン受容体
JAK1	Janus kinase 1	ヤヌスキナーゼ1
KDR	Kinase insert domain receptor	キナーゼ挿入ドメイン受容体
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	v-kit ハーディー-ズッカーマン4ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ
MEK1	Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ又は細胞外シグナル調節キナーゼキナーゼ1
NPM	Nucleophosmin	ヌクレオフォスミン
PDGFR β	Platelet-derived growth factor receptor β	血小板由来増殖因子受容体 β

略語	英名	和名
PEG 400	Polyethylene glycol 400	ポリエチレングリコール400
PKA	Protein kinase A	プロテインキナーゼ A
PKC α	Protein kinase C α	プロテインキナーゼ C α
PKC β 1	Protein kinase C β 1	プロテインキナーゼ C β 1
PKC β 2	Protein kinase C β 2	プロテインキナーゼ C β 2
p-Tyr	Phosphotyrosine	リン酸化チロシン
Raf-1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	v-raf-1マウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ1
SCID	Severe combined immunodeficiency	重症複合型免疫不全
SBECD	Sulfolbutyl ether- β -cyclodextrin	スルフォブチルエーテル- β -シクロデキストリン
SRC	Rous sarcoma oncogene	ラウス肉腫癌遺伝子
TGI	Tumor growth inhibition	腫瘍増殖阻害率

目次

	頁
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.....	6
2.6.2.2.1 ALK に対する阻害作用	6
2.6.2.2.2 ヒト癌細胞株における増殖阻害効果.....	8
2.6.2.2.3 ヒト主要代謝物の ALK に対する阻害活性	10
2.6.2.2.4 ヒト癌細胞株移植マウスにおける抗腫瘍効果.....	10
2.6.2.2.5 クリゾチニブ耐性変異型 ALK 発現細胞株移植マウスにおける抗腫瘍効果 ...	13
2.6.2.3 副次的薬理試験.....	15
2.6.2.3.1 受容体, イオンチャネル, トランスポーター及び酵素に対する <i>in vitro</i> 試験	15
2.6.2.4 安全性薬理試験.....	15
2.6.2.4.1 心血管系に対する影響.....	15
2.6.2.4.2 中枢神経系に対する影響.....	16
2.6.2.4.3 呼吸系に対する影響.....	17
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	17
2.6.2.6 考察及び結論.....	17
2.6.2.7 図表.....	18
2.6.2.8 参考文献.....	18

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

アレクチニブ塩酸塩（以下、本薬）は、ヒト未分化リンパ腫キナーゼ（以下、ALK）を標的として開発された低分子阻害剤である。ALK は染色体再構成（転座・逆位）、点変異及び遺伝子増幅に伴って恒常的に活性化され、癌の発生や増殖に関与することが知られている。その中でも *ALK* 遺伝子再構成に起因する微小管会合蛋白4 (*EML4*)-*ALK* などの *ALK* 融合遺伝子は非小細胞肺癌患者の一部において認められている。*ALK* 遺伝子異常を有する癌の増殖は *ALK* のキナーゼ活性に強く依存していることから、*ALK* のチロシンキナーゼ阻害剤が *ALK* 遺伝子異常を有する癌患者に対して有効な治療戦略の一つとなりうる。

(1) 効力を裏付ける試験

薬効薬理試験として、本薬又は本薬遊離塩基の効果及び作用機序を各種 *in vitro* 及び *in vivo* の試験により検討した。*ALK* 及びその点変異体の酵素に対する阻害作用は、非細胞系の基質ペプチドを用いた酵素阻害試験により評価した。また、本薬と組換えヒト *ALK* との複合体を X 線結晶構造解析することで、両者の結合様式を検討した。*In vitro* の細胞増殖阻害効果は、*ALK* 融合遺伝子陽性及び陰性の非小細胞肺癌、並びに *ALK* 融合遺伝子陽性の未分化大細胞型リンパ腫の細胞株を用いて検討した。ヒトにおける本薬の主要代謝物（CH5468924-000、以下 M-4）については、*ALK* に対する酵素阻害活性及び *ALK* 融合遺伝子陽性細胞株の増殖阻害効果を評価した。*In vivo* の薬効評価は、*ALK* 融合遺伝子陽性及び陰性、並びに *ALK* 遺伝子増幅を有する細胞株を皮下に移植したマウスモデルを用いて検討した。クリゾチニブ耐性に関与する点変異体を有する腫瘍に対しての薬効評価は、*EML4-ALK* L1196M を発現させた細胞株を作製し、それを皮下に移植したマウスモデルを用いて評価した。

酵素阻害試験の結果、本薬は強力かつ選択性の高い *ALK* 阻害剤であることが示された。また、クリゾチニブ耐性に関与する2種の点変異型 *ALK* 及び神経芽腫の発症に関与する2種の活性化点変異型 *ALK* に対しても高い阻害能を有していた。X 線結晶構造解析の結果から、本薬は *ALK* の ATP 結合部位で相互作用することが示された。ヒト非小細胞肺癌細胞株及びリンパ腫細胞株を用いた *in vitro* 細胞増殖阻害試験において、本薬は *ALK* 融合遺伝子陽性の細胞株選択的に高い細胞増殖阻害効果を示し、細胞内の *ALK* のリン酸化は阻害された。また、ヒトにおける本薬の主要代謝物 M-4は、酵素及び細胞レベルにおいて *ALK* に対し本薬と同程度の阻害活性が認められた。

ALK 融合遺伝子陽性及び *ALK* 遺伝子増幅を有する癌細胞株を皮下移植したマウスを用いた *in vivo* 試験において、本薬を経口投与することによる腫瘍増殖抑制効果及び腫瘍の退縮が認められた。一方、*ALK* 融合遺伝子陰性の細胞株を用いた *in vivo* 試験においては腫瘍増殖阻害効果が認められなかったことから、*ALK* 遺伝子異常を有する腫瘍に対して選択的な抗腫瘍効果が示された。更に、本薬はクリゾチニブ耐性変異体 *EML4-ALK* L1196M を発現させた細胞株を用いた *in vivo* 試験においても高い抗腫瘍効果を示した。

(2) 副次的薬理試験

受容体、イオンチャネル又はトランスポーターに対するリガンド結合性並びに酵素の活性を指標とした *in vitro* スクリーニング試験において、複数の分子に本薬の影響が認められた。機能に及ぼす影響を更に *in vitro* で検討した結果、セロトニン受容体5-HT_{2B} における活性阻害並びにシナプトソームにおけるセロトニン、ノルエピネフリン及びドパミンの取込み阻害が認められた。このように副次的薬理試験ではシナプトソームへのモノアミンの取込み阻害作用等が *in vitro* で認められたが、中枢神経系への影響を検討した *in vivo* 安全性薬理試験及

び最長13週間投与した反復投与毒性試験においては、中枢神経系に対する影響を示唆する所見はみられなかった。

(3) 安全性薬理試験

安全性薬理試験として、*in vitro* 心血管系試験（hERG 試験）、カニクイザルを用いた *in vivo* 心血管系試験（テレメトリー試験）、ラットを用いた中枢神経系試験（Irwin 変法）及びラットを用いた呼吸系試験（全身プレチスモグラフ）をコアバッテリー試験として実施し、本薬が生命機能に及ぼす影響を調べた。更に、カニクイザルを用いた探索的テレメトリー試験で血圧低下が確認されたことから、その機序解明の試験としてラット摘出血管の収縮及びヒト電位依存性 Cav1.2チャネル（L型 Ca^{2+} チャネル）電流に本薬が及ぼす影響を調べた。

In vitro 試験において本薬は hERG 電流を IC_{20} 58 ng/mL、 IC_{50} 217 ng/mL で阻害し、hERG チャネル阻害作用が示された。カニクイザルのテレメトリー試験において、15 mg/kg までの用量で心電図を含む心血管系パラメータ及び体温に対する影響はなかったが、カニクイザルの探索的テレメトリー試験においては、20及び60 mg/kg で軽度の血圧低下作用がみられた。血圧低下作用の機序解明のために行った試験において、本薬は高濃度カリウム溶液による血管収縮を抑制し（ IC_{20} : 0.0153 $\mu\text{mol/L}$ (7.38 ng/mL)、 IC_{50} : 0.168 $\mu\text{mol/L}$ (81.1 ng/mL)）、ヒト電位依存性 Cav1.2チャネル電流を阻害した（ IC_{20} : 0.203 $\mu\text{mol/L}$ (98 ng/mL)、 IC_{50} : 0.461 $\mu\text{mol/L}$ (222 ng/mL)）。これらの機序解明試験の結果から、本薬は電位依存性 Cav1.2チャネルの阻害を介して血管を拡張し、その結果としてカニクイザルで軽度な血圧低下が認められたものと推察された。

ラットにおいて、300 mg/kg までの用量で中枢神経系及び呼吸系に対する影響はみられなかった。

(4) 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

本薬の効力を裏付ける試験は、2.6.2.2.4(2)及び2.6.2.2.4(3)の試験以外は、本薬を用いて実施した。2.6.2.2.4(2)及び2.6.2.2.4(3)の試験は、本薬遊離塩基を使用した。投与用量の表記は、本薬を使用した場合も、遊離塩基換算量で記載した。

2.6.2.2.1 ALK に対する阻害作用

(1) ALK を含めた各種キナーゼに対する酵素阻害活性の検討

(資料番号4.2.1.1-1及び資料番号4.2.1.1-2)

細胞内シグナル伝達経路のチロシンキナーゼ及びセリン/スレオニンキナーゼには、癌化や細胞増殖に関与するものが多数知られている。そこで、本薬の ALK を含む各種キナーゼに対する阻害活性について評価した。

酵素標品として ALK 細胞内ドメインをはじめとする各種組換えヒトキナーゼを用いて、時間分解蛍光共鳴エネルギー転移法又は蛍光偏光法によってそれぞれのキナーゼに対する本薬の酵素阻害活性を検討した。

本薬は、ALK に対し低濃度で阻害活性を示し、その IC_{50} は 1.9 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1-1）。また、インスリン受容体（INSR）及びキナーゼ挿入ドメイン受容体（KDR）に対して、それぞれ550及び1400 nmol/L の IC_{50} を示した。その他20種のキナーゼに対する IC_{50} は 5000 nmol/L 以上であり、本薬は強力かつ選択性の高い ALK 阻害剤であることが示された。

次に、点変異型 ALK に対する本薬の酵素阻害活性を評価した。クリゾチニブの獲得耐性に関与する点変異型 C1156Y 及び L1196M¹⁾の ALK に対する本薬の阻害活性は両変異体に対して

点変異を持たない ALK と同等に高い阻害活性を示した。また、神経芽腫の発症に関与する活性化変異型 F1174L 及び R1275Q²⁾の ALK に対しても同様の結果であった。特に、キナーゼ阻害剤に対する共通耐性機構の一つとして知られているゲートキーパー残基の変異 *ALK* L1196M は、臨床でのクリゾチニブ耐性癌において複数の報告がなされており^{1),3),4)}、この変異体に対して阻害能を有することは大きな意義を持つと考えられる。

表 2.6.2.2.1-1 各種キナーゼに対するアレクチニブの阻害活性

Class	Enzyme	IC ₅₀ (nmol/L)
Tyrosine kinase	ALK	1.9
	ALK (C1156Y)	0.93
	ALK (F1174L)	1.0
	ALK (L1196M)	2.1
	ALK (R1275Q)	3.5
	INSR	550
	KDR	1400
	ABL	> 5000
	EGFR	> 5000
	FGFR2	> 5000
	HER2	> 5000
	IGF1R	> 5000
	JAK1	> 5000
	KIT	> 5000
	c-MET	> 5000
	PDGFRβ	> 5000
	SRC	> 5000
Serine/threonine kinase	AKT1	> 5000
	Aurora A	> 5000
	CDK1	> 5000
	CDK2	> 5000
	MEK1	> 5000
	PKA	> 5000
	PKCα	> 5000
	PKCβ1	> 5000
	PKCβ2	> 5000
	Raf-1	> 5000

[4.2.1.1-1 Table 2～Table 4及び4.2.1.1-2 Table 2を改変]

(2) ALK 蛋白質との相互作用に関する検討

(資料番号4.2.1.1-3)

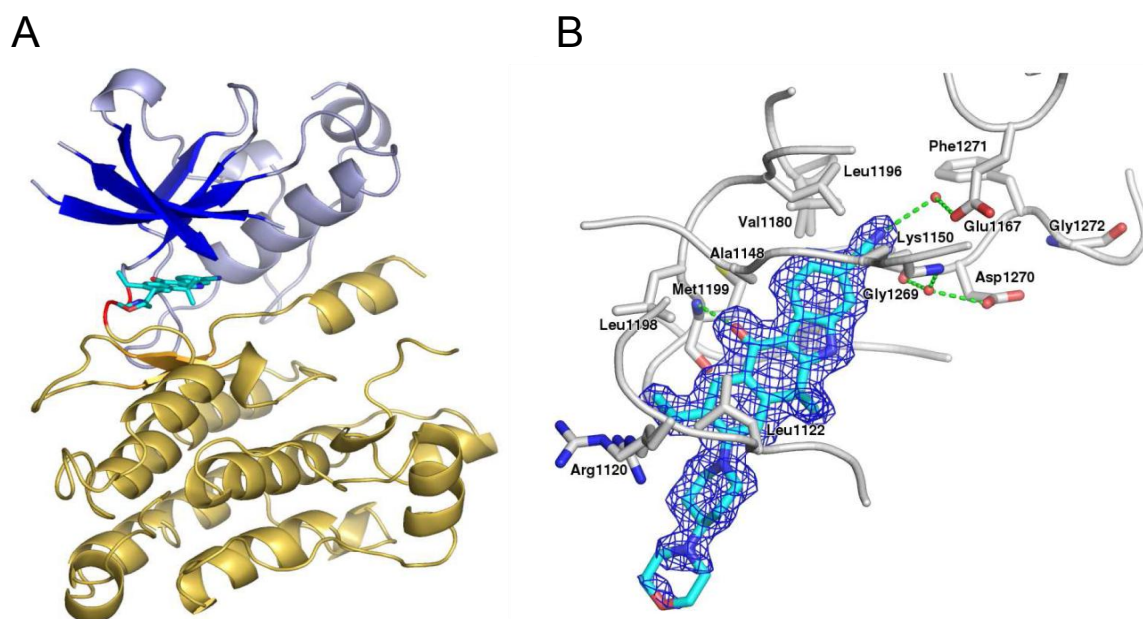
本薬と組換えヒト ALK との複合体を X 線結晶構造解析することにより、両者の詳細な結合様式を検討した。

本薬及び培養昆虫細胞に発現させ精製したヒト ALK キナーゼドメインを用い、シッティングドロップ法にて結晶化を行った⁵⁾。液体窒素により瞬間凍結した結晶から1.75 Å 分解能の X 線回折データを取得し、結晶構造を解析した。本薬と水素結合する主要な ALK のアミノ酸は1199番目のメチオニンであり、その他1150番目のリジンや1167番目のグルタミン酸など複数の

アミノ酸残基との間に親水性相互作用が認められた⁵⁾ (図 2.6.2.2.1-1)。これらのアミノ酸は、ALK の ATP 結合部位及び近傍の活性部位を構成することから、本薬が ATP 結合部位に結合することが示された。したがって、本薬は ATP 競合性のキナーゼ阻害剤と考えられる。

とりわけ ALK のゲートキーパー残基である1196番目のロイシンにおいて、本薬からの距離は3.57 Å の近傍に存在し、本薬との効果的な CH/ π 相互作用が観察された。得られた複合体の結晶構造を基に1196番目のロイシンをメチオニンに置換したクリゾチニブ耐性変異体 L1196M の三次元構造モデルを *in silico* で作成し解析したところ、同様な CH/ π 相互作用が保持されていた⁵⁾。この結果は、本薬が ALK L1196M 変異体に対しても点変異を持たない ALK と同程度の阻害活性を有することを構造面から裏付ける知見と考えられる。

図 2.6.2.2.1-1 アレクチニブ-ALK 複合体の X 線結晶構造



- A. ALK (N ロープ：青，ヒンジ領域：赤，C ロープ：オレンジ) をリボン表示で，アレクチニブ (水色) をスティックモデルで示した。
- B. アレクチニブ (水色) をスティックモデル及び電子密度図で，近傍のアミノ酸をスティックモデルで，水素結合は点線 (緑) で示した。

[4.2.1.1-3 Figure 1及び Figure 2を改変]

2.6.2.2.2 ヒト癌細胞株における増殖阻害効果

(1) ALK 融合遺伝子陽性及び陰性のヒト癌細胞株における増殖阻害効果

(資料番号4.2.1.1-4及び資料番号4.2.1.1-5)

ALK 融合遺伝子陽性及び陰性のヒト癌細胞株に対する細胞増殖阻害効果を *in vitro* 試験により評価した。

各ヒト癌細胞株 (2.0×10^3 細胞/ウェル) を96ウェルプレートに播種し，翌日から0又は1～1000 nmol/L の本薬存在下で4又は5日間培養した後，ATP 量を定量することにより生細胞数を測定した。ALK 融合遺伝子陽性ヒト非小細胞肺癌細胞株として，*EML4-ALK* 融合遺伝子を有する NCI-H2228を使用した。ALK 融合遺伝子陰性のヒト非小細胞肺癌細胞株として，上皮増殖因子受容体 (*EGFR*) 遺伝子の活性化欠失変異を有する PC-9，肝細胞増殖因子受容体 (*c-MET*) 遺伝子の増幅を有する NCI-H1993及びカーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ

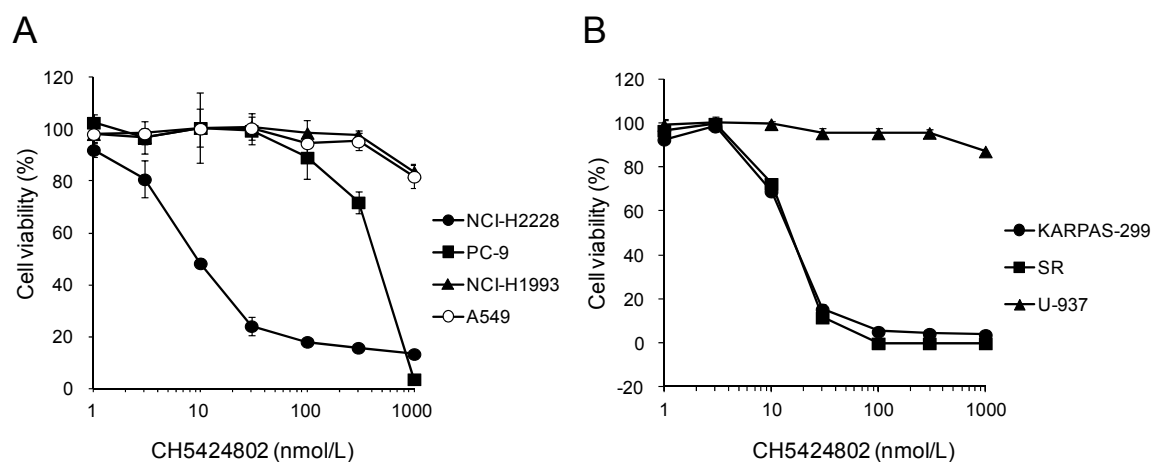
(*KRAS*) 遺伝子の活性化点変異を有する A549を使用した。

その結果、本薬は *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性の NCI-H2228の増殖を濃度依存的に阻害し、 IC_{50} は12 nmol/L であった (図 2.6.2.2.2-1A)。一方、*ALK* 融合遺伝子陰性の3株に対する IC_{50} は、PC-9では400 nmol/L、NCI-H1993及び A549では1000 nmol/L 以上と細胞増殖阻害効果は弱かった。

同様に、ヒトリンパ腫細胞株に対する本薬の細胞増殖阻害効果を検討したところ、ヌクレオフォスミン (*NPM*) -*ALK* 融合遺伝子を有するヒト未分化大細胞型リンパ腫細胞株 KARPAS-299及び SR に対して IC_{50} は14 nmol/L と濃度依存的に強く増殖を阻害したのに比べ、*ALK* 融合遺伝子陰性のヒト組織球性リンパ腫細胞株 U-937に対する IC_{50} は1000 nmol/L 以上で細胞増殖阻害を示さなかった (図 2.6.2.2.2-1B)。

以上の結果から、本薬が癌種を問わず *ALK* 融合遺伝子を有する細胞株に対し選択的に細胞増殖阻害効果をもたらすことが示された。

図 2.6.2.2.2-1 *ALK*融合遺伝子陽性癌細胞株に対する選択的な細胞増殖阻害効果



プロットは平均値 ± 標準偏差で示される。A：ヒト非小細胞肺癌細胞株，B：ヒトリンパ腫細胞株。
CH5424802：アレクチニブ

[4.2.1.1-4 Figure 1及び4.2.1.1-5 Figure 1を改変]

(2) 細胞内における *ALK* 阻害作用

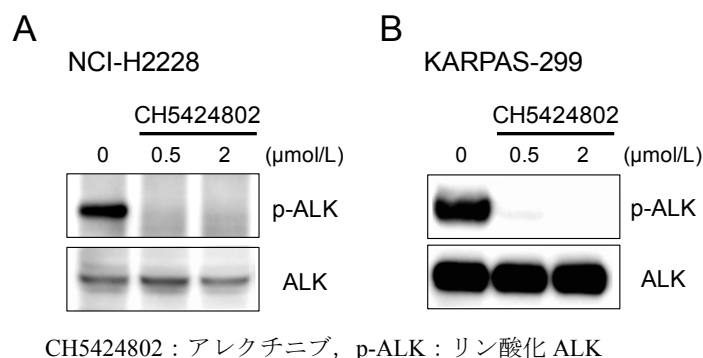
(資料番号4.2.1.1-6)

本薬による細胞内での *ALK* 活性阻害を評価するために、*ALK* 活性化の指標となる *ALK* のリン酸化をイムノブロット法により解析した。

NCI-H2228及び KARPAS-299 (1.0×10^6 細胞) を培養皿に播種し、翌日0, 0.5又は2 μ mol/L の本薬で2時間処理後、細胞を可溶化した。NCI-H2228ではリン酸化チロシンタンパク質を免疫沈降後に *ALK* 抗体でイムノブロットすることにより、KARPAS-299ではリン酸化 *ALK* 抗体でイムノブロットすることにより検出した。

本薬の処理を行った両細胞株でリン酸化 *ALK* のバンドの消失が認められたことから (図 2.6.2.2.2-2)，本薬による細胞内での *ALK* 活性阻害が確認された。この *ALK* 活性阻害が *ALK* 融合遺伝子陽性の癌細胞株に対する細胞増殖阻害効果を引き起こすと考えられる。

図 2.6.2.2.2-2 アレクチニブによる細胞内での ALK のリン酸化阻害作用



[4.2.1.1-6 Figure 1を改変]

2.6.2.2.3 ヒト主要代謝物の ALK に対する阻害活性

(資料番号4.2.1.1-7及び資料番号4.2.1.1-8)

ヒトにおける本薬の主要代謝物として、M-4が同定されている。この主要代謝物の ALK に対する阻害活性を評価した。

M-4のヒト組換え ALK に対する酵素阻害活性は、 IC_{50} が1.2 nmol/L で本薬と同程度であった。また、細胞内 ALK を阻害することに基づく M-4の増殖阻害活性を *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株 NCI-H2228を用いて評価した。M-4は、NCI-H2228細胞株に対する増殖阻害活性を示し、その IC_{50} は37 nmol/L であった。

2.6.2.2.4 ヒト癌細胞株移植マウスにおける抗腫瘍効果

In vivo の薬効評価には、*ALK* 融合遺伝子陽性及び陰性又は *ALK* 遺伝子の増幅を有するヒト癌細胞株をマウスに皮下移植した *in vivo* モデルを用いた。投与溶媒は、図 2.6.2.2.4-2A の試験以外では、 $\blacksquare$ mol/L 塩酸、 $\blacksquare$ % Dimethyl sulfoxide (DMSO) / $\blacksquare$ % Cremophor EL / $\blacksquare$ % Polyethylene Glycol 400 (PEG 400) / $\blacksquare$ w/v% Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) を用いて実施した。図 2.6.2.2.4-2A の試験では、 $\blacksquare$ % DMSO / $\blacksquare$ % Cremophor EL / $\blacksquare$ % PEG 400 / $\blacksquare$ w/v% HPCD を使用した。

(1) ヒト非小細胞肺癌移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果

(資料番号4.2.1.1-9及び資料番号4.2.1.1-10)

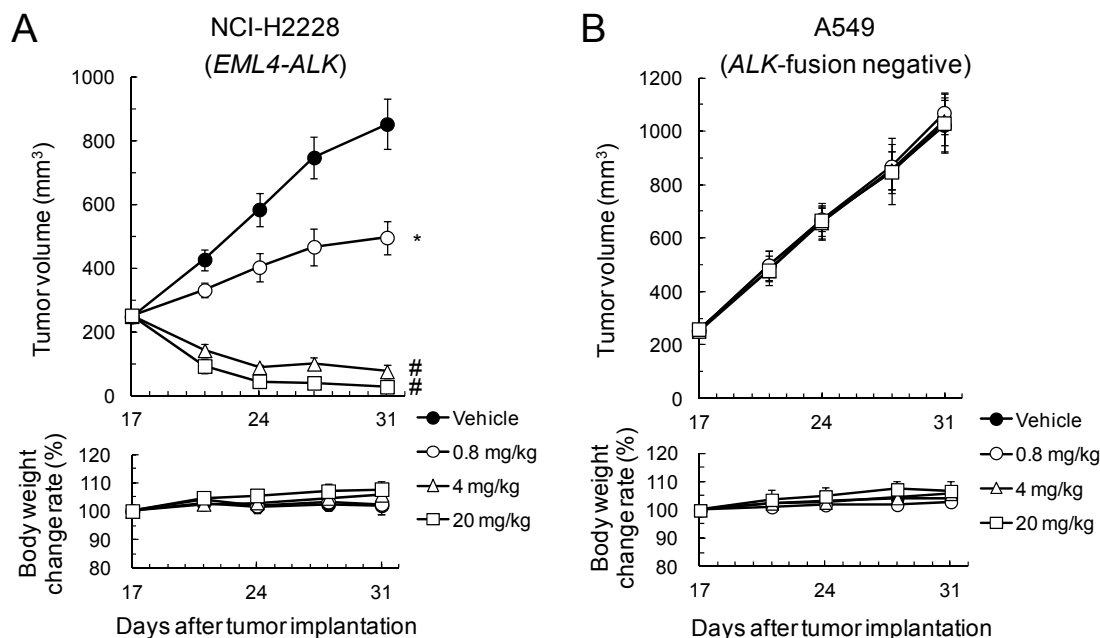
ヒト非小細胞肺癌細胞株をマウスに皮下移植した *in vivo* モデルを用いて、本薬の抗腫瘍効果を評価した。

EML4-ALK 融合遺伝子陽性の NCI-H2228 (1×10^7 細胞/マウス) 又は *ALK* 融合遺伝子陰性の A549 (5×10^6 細胞/マウス) を重症複合型免疫不全 (SCID) マウスの皮下に移植した後、17日目に1群7匹となるよう無作為化割付けし、同日から溶媒 (対照) 又は0.8, 4及び20 mg/kg の本薬を1日1回、14日間連続で経口投与した。腫瘍径及び体重を投与開始日及び投与開始後3又は4日間隔で測定し、腫瘍体積を算出した。

その結果、*EML4-ALK* 融合遺伝子陽性の NCI-H2228のモデルにおいて、31日目 (最終計測日) 時点での0.8, 4及び20 mg/kg の本薬投与群における腫瘍増殖阻害率 (TGI) はそれぞれ59, 129及び137%で、いずれの用量においても対照群に対して統計学的に有意な腫瘍増殖阻害効果が認められた (図 2.6.2.2.4-1A, 表 2.6.2.2.4-1)。特に、4 mg/kg 以上において顕著な腫瘍の退縮が観察された。なお、本薬投与によるマウスの体重減少は認められなかった。一方、*ALK* 融合遺伝子陰性の A549のモデルにおいては、31日目時点での本薬20 mg/kg 投与群における TGI は0%で、有意な腫瘍増殖阻害効果は認められなかった (図 2.6.2.2.4-1B, 表 2.6.2.2.4-1)。以

上のように、本薬の *ALK* 融合遺伝子陽性非小細胞肺癌モデルに対する強力かつ選択的な抗腫瘍効果が示された。

図 2.6.2.2.4-1 NCI-H2228及び A549に対するアレクチニブの抗腫瘍効果



各プロットは平均値 ± 標準偏差 (N=7) で示される。上段：腫瘍体積，下段：マウスの体重百分率

*：対照群に対して P=0.0006，#：対照群に対して P<0.0001（いずれもパラメトリック Dunnett 型多重比較検定）

[4.2.1.1-9 Figure 1及び Figure 2並びに4.2.1.1-10 Figure 1及び Figure 2を改変]

表 2.6.2.2.4-1 NCI-H2228及び A549に対するアレクチニブの抗腫瘍効果

Cell line	Dose (mg/kg)	TGI (%)	P value
NCI-H2228	0.8	59	0.0006
	4	129	< 0.0001
	20	137	< 0.0001
A549	0.8	-6	0.6427
	4	-2	0.9765
	20	0	0.9981

腫瘍移植後31日目（最終計測日）における TGI (%) を以下の式により算出した。

$$\text{TGI (\%)} = \{1 - (\text{各投与群の腫瘍体積変化量平均値}) / (\text{対照群の腫瘍体積変化量平均値})\} \times 100$$

ただし、腫瘍体積変化量 (mm³) = (最終計測日の腫瘍体積) - (投与開始日の腫瘍体積)

それぞれの腫瘍体積の対照群に対する有意差検定のため、パラメトリック Dunnett 型多重比較を実施し、P 値を示した。

[4.2.1.1-9 Table 1及び4.2.1.1-10 Table 1を改変]

(2) ヒトリンパ腫及び神経芽腫移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果

(資料番号4.2.1.1-11及び資料番号4.2.1.1-12)

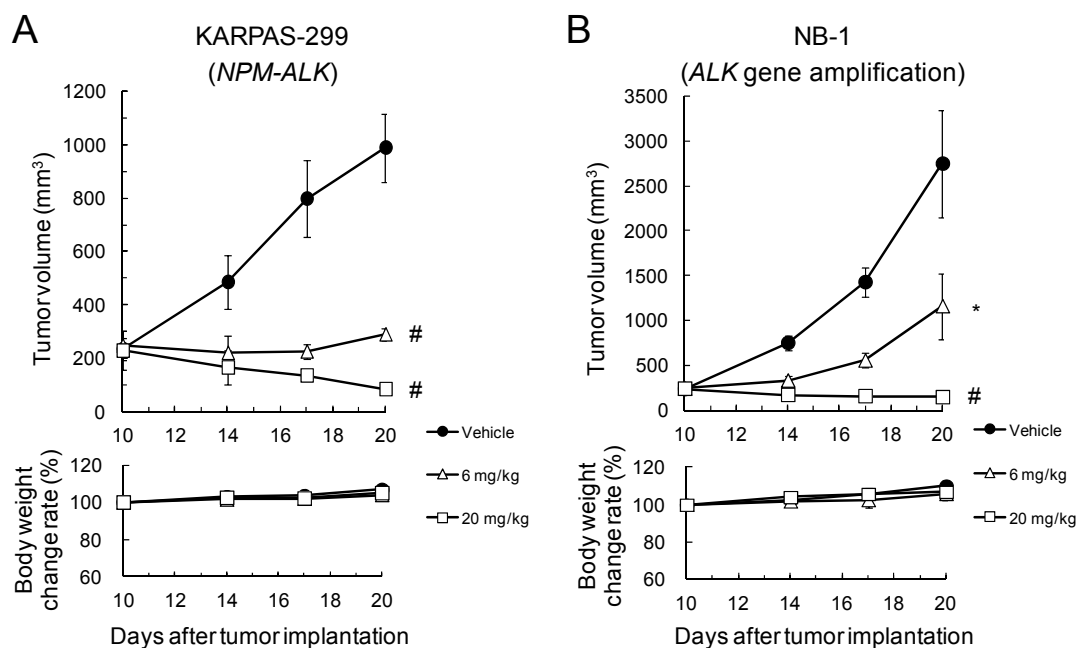
NPM-ALK 融合遺伝子を有するヒト未分化大細胞型リンパ腫細胞株 KARPAS-299及び *ALK* 遺伝子の増幅を有するヒト神経芽腫細胞株 NB-1をマウスに皮下移植した *in vivo* モデルを用いて、本薬の抗腫瘍効果を評価した。

KARPAS-299 (4.9×10^6 細胞/マウス) 又は NB-1 (8.9×10^6 細胞/マウス) を SCID マウスの皮下に移植した後、10日目にそれぞれ1群4又は5匹になるよう無作為化割付けし、同日から溶媒(対照)又は6若しくは20 mg/kg の本薬を1日1回、11日間連続で経口投与した。腫瘍径及び体重を投与開始日及び投与開始後3又は4日間隔で測定し、腫瘍体積を算出した。

その結果、両移植モデルにおいて本薬投与群は対照群に対して統計学的に有意な腫瘍増殖阻害効果が確認され、20日目(最終計測日)時点での20 mg/kg の本薬投与群における TGI は KARPAS-299では119%, NB-1では104%と腫瘍退縮が観察された(図 2.6.2.2.4-2, 表 2.6.2.2.4-2)。

以上のことから、本薬は非小細胞肺癌以外の *ALK* の遺伝子異常を有する腫瘍モデルに対しても抗腫瘍効果を有することが示された。

図 2.6.2.2.4-2 KARPAS-299及びNB-1に対するアレクチニブの抗腫瘍効果



各プロットは平均値 ± 標準偏差 (N=4又は5) で示される。上段：腫瘍体積，下段：マウスの体重百分率

*：対照群に対して $P=0.0003$ ，#：対照群に対して $P<0.0001$ (いずれもパラメトリック Dunnett 型多重比較検定)

[4.2.1.1-11 Figure 1及び Figure 2並びに4.2.1.1-12 Figure 1及び Figure 2を改変]

表 2.6.2.2.4-2 KARPAS-299及びNB-1に対するアレクチニブの抗腫瘍効果

Cell line	Dose (mg/kg)	TGI (%)	P value
KARPAS-299	6	94	< 0.0001
	20	119	< 0.0001
NB-1	6	63	0.0003
	20	104	< 0.0001

腫瘍移植後20日目（最終計測日）における TGI (%) は以下の式により算出した。

$$\text{TGI (\%)} = \{1 - (\text{各投与群の腫瘍体積変化量平均値}) / (\text{対照群の腫瘍体積変化量平均値})\} \times 100$$

ただし、腫瘍体積変化量 (mm³) = (最終計測日の腫瘍体積) - (投与開始日の腫瘍体積)

それぞれの腫瘍体積の対照群に対する有意差検定のため、パラメトリック Dunnett 型多重比較を実施し、P 値を示した。

[4.2.1.1-11 Table 1及び4.2.1.1-12 Table 1を改変]

(3) ヒト非小細胞肺癌移植マウスモデルにおける腫瘍内の ALK 阻害作用

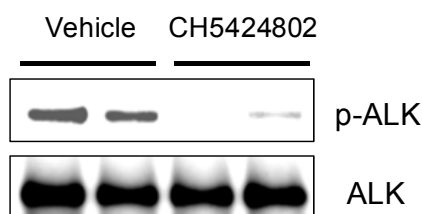
(資料番号4.2.1.1-13)

NCI-H2228移植モデルにおいて、本薬による腫瘍中の ALK のリン酸化阻害作用を解析した。

NCI-H2228 (1.0 × 10⁷細胞/マウス) を SCID マウスに皮下移植し、1群2匹となるよう無作為割付け後、溶媒又は20 mg/kg の本薬を単回経口投与し、投与4時間後に腫瘍を摘出した。リン酸化 ALK 又は総 ALK の検出は、腫瘍のタンパク質を可溶化した後にリン酸化チロシン抗体又は ALK 抗体でタンパク質を免疫沈降し、ALK 抗体でイムノブロットすることにより検出した。

その結果、本薬投与により ALK のリン酸化が抑制され、腫瘍内での ALK 活性阻害が確認された (図 2.6.2.2.4-3)。

図 2.6.2.2.4-3 アレクチニブによる腫瘍内における ALK のリン酸化阻害作用



CH5424802 : アレクチニブ, p-ALK : リン酸化 ALK

[4.2.1.1-13 Figure 1を改変]

2.6.2.2.5 クリゾチニブ耐性変異型 ALK 発現細胞株移植マウスにおける抗腫瘍効果

(資料番号4.2.1.1-14)

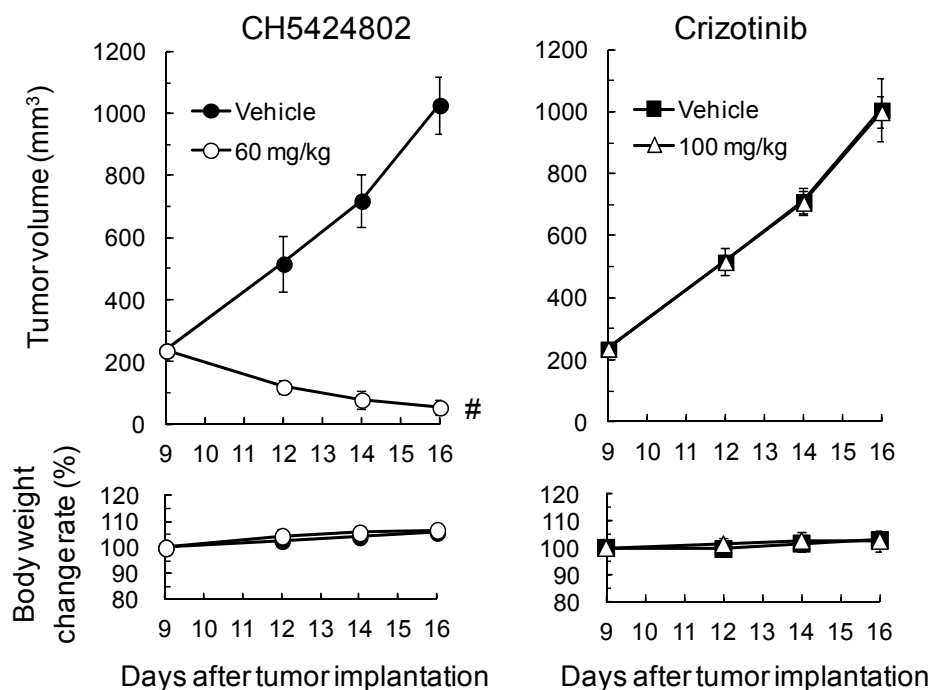
EML4-ALK のクリゾチニブ耐性変異型 L1196M をマウス前駆 B リンパ球細胞株 Ba/F3に強制発現させた細胞株を樹立し、その細胞株をマウスに移植した *in vivo* モデルを用いて、本薬の抗腫瘍効果を評価した。

EML4-ALK L1196M に依存して増殖する細胞を取得するため、インターロイキン-3 (IL-3) 存在下でのみ増殖する親株 Ba/F3に *EML4-ALK* L1196M を遺伝子導入し、IL-3非存在下で増殖する細胞クローンを単離した⁵⁾。この *EML4-ALK* L1196M を発現した Ba/F3細胞株 (5.0 × 10⁶細胞/マウス) を SCID マウスの皮下に移植した後、9日目に1群7匹になるよう無作為化割付けし、同日からそれぞれの溶媒 (対照), 60 mg/kg の本薬又は100 mg/kg のクリゾチニブを1日1回,

7日間連続で経口投与した。腫瘍径及び体重を投与開始日及び投与開始後2又は3日間隔で測定し、腫瘍体積を算出した。

その結果、本薬投与群の16日目（最終計測日）時点での TGI は123%で、対照群に対して統計学的に有意な腫瘍増殖阻害効果と腫瘍の退縮が認められた（図 2.6.2.2.5-1，表 2.6.2.2.5-1）。一方、クリゾチニブ投与群においては有意な腫瘍増殖阻害効果は認められなかった。以上のことから、本薬はクリゾチニブ耐性に関与するゲートキーパー変異体 *EML4-ALK* L1196M を有する腫瘍に対しても有効であることが示唆された。

図 2.6.2.2.5-1 *EML4-ALK* L1196M 発現 Ba/F3に対するアレクチニブの抗腫瘍効果



各プロットは平均値 ± 標準偏差 (N=7) で示される。上段：腫瘍体積，下段：マウスの体重百分率

#：対照群に対して $P < 0.0001$ （パラメトリック Dunnett 型多重比較検定）

CH5424802：アレクチニブ

[4.2.1.1-14 Figure 1～Figure 4を改変]

表 2.6.2.2.5-1 *EML4-ALK* L1196M 発現 Ba/F3に対するアレクチニブの抗腫瘍効果

Drug	Dose (mg/kg)	TGI (%)	P value
CH5424802	60	123	< 0.0001
Crizotinib	100	1	0.8811

腫瘍移植後16日目（最終計測日）における TGI (%) は以下の式により算出した。

$$\text{TGI (\%)} = \{1 - (\text{各投与群の腫瘍体積変化量平均値}) / (\text{対照群の腫瘍体積変化量平均値})\} \times 100$$

ただし、腫瘍体積変化量 (mm³) = (最終計測日の腫瘍体積) - (投与開始日の腫瘍体積)

それぞれの腫瘍体積の対照群に対する有意差検定のため、パラメトリック Dunnett 型多重比較を実施し、P 値を示した。CH5424802：アレクチニブ

[4.2.1.1-14 Table 1を改変]

2.6.2.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験として、受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び酵素に関する影響を *in vitro* 試験で調べた。被験物質として本薬遊離塩基を用いた。

2.6.2.3.1 受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び酵素に対する *in vitro* 試験

(資料番号4.2.1.2-1, 資料番号4.2.1.2-2, 資料番号4.2.1.2-3)

スクリーニング試験として、109種の受容体、イオンチャネル又はトランスポーターに対するリガンド結合性と、42種の酵素の活性に対する影響を、1濃度 (10 $\mu\text{mol/L}$, 4826 ng/mL) で検討した。その結果、リガンド結合性 (ベンゾジアゼピン受容体 (末梢型), ドパミン受容体, ムスカリン受容体, ニューロキニン受容体, セロトニン受容体, σ 受容体, グルココルチコイド受容体, ウロテンシン受容体, L 型 Ca^{2+} チャネル, Cl^- チャネル, セロトニントランスポーター, ノルエピネフリントランスポーター, ドパミントランスポーター) 及び酵素活性 (CaMK2 α) に対し、本薬は阻害作用 (> 50%) を示した。

結合性試験の結果を基に、機能に及ぼす影響を検討した。細胞に発現させた20種の受容体の機能及び2種のモノアミン (ノルエピネフリン及びドパミン) のラットシナプトソームへの取り込みについて、2濃度 (1及び10 $\mu\text{mol/L}$, 482.6及び4826 ng/mL) で評価した。受容体の評価には、リガンド結合性で本薬の阻害作用が認められた受容体のうち、機能評価系が利用できるドパミン受容体, ムスカリン受容体, ニューロキニン受容体, セロトニン受容体及びウロテンシン受容体を含めた。その結果、ノルエピネフリン及びドパミンのシナプトソームへの取込みに対しては1 $\mu\text{mol/L}$ のみで、セロトニン受容体5-HT_{2B}の活性に対しては10 $\mu\text{mol/L}$ で、50%を超える阻害作用が認められた。その他の受容体機能に対する影響は認められなかった。

これらの機能評価で認められた阻害作用を更に精査する目的で、セロトニン、ノルエピネフリン及びドパミンのシナプトソームへの取り込み阻害について、 10^{-3} ~1 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で検討し、IC₅₀を求めた。セロトニン、ノルエピネフリン及びドパミンの取り込み阻害の IC₅₀は各々、0.10, 0.33及び0.26 $\mu\text{mol/L}$ (48.3, 159.3及び125.5 ng/mL) であった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験として、*in vitro* 心血管系試験 (hERG 試験), カニクイザルを用いた *in vivo* 心血管系試験 (テレメトリー試験), ラットを用いた中枢神経系試験 (Irwin 変法) 及びラットを用いた呼吸系試験 (全身プレチスモグラフ) をコアバッテリー試験として実施し、本薬が生命機能に及ぼす影響を調べた。更に、カニクイザルの探索的テレメトリー試験でみられた血圧低下の機序解明の試験として、ラット摘出血管及びヒト電位依存性 Cav1.2チャネル電流に本薬が及ぼす影響を調べた。

摘出血管の試験では被験物質として本薬遊離塩基を用いたが、その他の試験では本薬塩酸塩を用いた。用量及び濃度は本薬遊離塩基換算量で示した。

2.6.2.4.1 心血管系に対する影響

(1) *In vitro* 心血管系試験 (hERG 試験)

(資料番号4.2.1.3-1)

本薬が心血管系に及ぼす作用を検討する目的で、hERG を強制発現させた HEK293細胞を用いて hERG 電流を測定した。

本薬は hERG 電流を阻害し、IC₂₀は0.12 $\mu\text{mol/L}$ (58 ng/mL), IC₅₀は0.45 $\mu\text{mol/L}$ (217 ng/mL) であった。

(2) カニクイザルを用いた *in vivo* 心血管系探索試験（探索的テレメトリー試験）

(資料番号4.2.1.3-2)

本薬が心血管系に及ぼす作用を探索的に検討した。雌雄各2例のカニクイザルに本薬を0 (■w/v% SBEDC/■mol/L 塩酸水溶液), 20, 60 mg/kg の用量で漸増経口投与し、テレメトリー法により血圧、心拍数及び心電図を無麻酔・無拘束下で測定した。曝露量は投与量及び溶媒が同じカニクイザル2週間予備毒性試験の成績を基に評価した。

20及び60 mg/kg（初回投与日の雌雄平均 C_{max} : 719及び695 ng/mL）で軽度の血圧低下作用（約10 mmHg）がみられたが、心電図及び心拍数に影響はみられなかった。20 mg/kg の血圧低下は投与後およそ22時間後には回復した。

(3) カニクイザルを用いた *in vivo* 心血管系試験（テレメトリー試験）

(資料番号4.2.1.3-3)

本薬の心血管系に対する影響について本試験を実施して評価した。4例の雄カニクイザルに本薬を0 (■w/v% HPCD/■mol/L メタンスルホン酸/■mol/L 塩酸水溶液), 1.7, 5, 15 mg/kg の用量で漸増投与し、テレメトリー法により血圧、心拍数、心電図及び体温を無麻酔・無拘束下で測定した。また、トキシコキネティクス試験を実施して曝露量を確認した。

15 mg/kg（投与後4時間の平均血漿中薬物濃度：279 ng/mL）までのいずれの用量においても心血管系及び体温に対する影響はみられなかった。これより、探索的テレメトリー試験で認められた血圧低下作用の無影響量は15 mg/kg と判断された。

(4) *In vitro* 心血管系試験（電位依存性 Cav1.2チャンネル試験）

(資料番号4.2.1.3-4)

探索的に行われたカニクイザルのテレメトリー試験でみられた本薬による血圧低下の発現機序を明らかにする目的で、血管平滑筋の収縮に主要な役割を果たす電位依存性 Cav1.2チャンネルを強制発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株を用いて、本薬が電位依存性 Cav1.2チャンネル電流に及ぼす影響を評価した。

本薬はヒト電位依存性 Cav1.2チャンネル電流を阻害し、 IC_{20} は0.203 μ mol/L（98 ng/mL）、 IC_{50} は0.461 μ mol/L（222 ng/mL）であった。

(5) *In vitro* 心血管系試験（血管のマグヌス試験）

(資料番号4.2.1.3-5)

探索的に行われたカニクイザルのテレメトリー試験でみられた本薬による血圧低下の発現機序を明らかにする目的で、高濃度カリウム刺激により前収縮させたラット摘出大動脈に対して本薬が及ぼす影響をマグヌス法で評価した。

本薬は濃度依存的に高濃度カリウム溶液による血管収縮を阻害し、 IC_{20} は0.0153 μ mol/L（7.38 ng/mL）、 IC_{50} は0.168 μ mol/L（81.1 ng/mL）であった。

2.6.2.4.2 中枢神経系に対する影響

(1) ラットを用いた中枢神経系試験（Irwin 変法）

(資料番号4.2.1.3-6)

本薬が中枢神経系に及ぼす作用を検討する目的で、1群6例の雄ラットに本薬を0 (■w/v% HPCD/■mol/L メタンスルホン酸/■mol/L 塩酸水溶液), 3, 30, 300 mg/kg の用量で単回経口投与し、Irwin 変法により行動及び一般状態を観察した。また、別途、1群3例の雄ラットからなる薬物動態検討群を設置して曝露量を確認した。

300 mg/kg（平均 C_{max} : 1770 ng/mL）までのいずれの用量においても、中枢神経系に対する影響はみられなかった。

2.6.2.4.3 呼吸系に対する影響

(1) ラットを用いた呼吸系試験

(資料番号4.2.1.3-7)

本薬が呼吸系に及ぼす作用を検討する目的で、1群8例の雄ラット（覚醒）に本薬を0（ $\blacksquare$ w/v% HPCD/ $\blacksquare$ mol/L メタンスルホン酸/ $\blacksquare$ mol/L 塩酸水溶液）、3, 30, 300 mg/kg の用量で単回経口投与し、呼吸数及び換気量（1回換気量、分時換気量）を測定した（全身プレチスモグラフ）。

300 mg/kg（平均 $C_{\max}$: 1770 ng/mL）までのいずれの用量においても、呼吸系に対する影響はみられなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし

2.6.2.6 考察及び結論

非臨床薬理試験の結果から、本薬は ALK の ATP 結合部位に結合し、ALK を強力かつ選択的に阻害するチロシンキナーゼ阻害剤であることが示された。本薬は、ALK 融合遺伝子を有する癌の ALK リン酸化を *in vitro* 及び *in vivo* で強く阻害し、顕著な腫瘍退縮効果を示した。ALK 融合遺伝子を有する癌の増殖は ALK のキナーゼ活性に強く依存していることから、本薬の強い ALK 阻害作用が高い抗腫瘍効果を生み出したものと考えられる。

キナーゼ阻害剤に対する獲得耐性の機序として、キナーゼドメインの点変異がよく知られている。特に、ヒンジ部位に隣接するゲートキーパーと呼ばれるアミノ酸の変異が最も高頻度でみられる。ALK のゲートキーパー残基は1196番目のロイシンに相当するが、クリゾチニブに対し獲得耐性を示した肺癌患者から L1196M 変異型 *EML4-ALK* を持つ腫瘍細胞が単離され、そのクリゾチニブ耐性が実験的に証明されている¹⁾。更に、その後の遺伝子解析からこの変異が複数のクリゾチニブ耐性癌においても発現していることが確認されており^{3,4)}、このゲートキーパー変異体を阻害できることは臨床上大きな意義を持つと考えられる。本薬は、ゲートキーパー変異型 ALK の酵素活性を阻害するとともに、この変異型 *EML4-ALK* を発現する細胞株をマウスに移植したモデルにおいて高い抗腫瘍活性を示した。したがって、本薬はクリゾチニブ耐性となった癌に対しても有効性を示す可能性があると考えられる。

副次的薬理試験の受容体、イオンチャネル又はトランスポーターに対するリガンド結合性並びに酵素の活性を指標とした *in vitro* スクリーニング試験において、複数の分子に対して影響が認められた。更に、機能評価を *in vitro* で行った結果、ラットシナプトソームにおけるセロトニン、ノルエピネフリン及びドパミンの取込み阻害等が認められ、モノアミン取込み阻害の IC_{50} は 48.3~159.3 ng/mL であった。しかしながら、ラットを用いた中枢神経系試験では 300 mg/kg（平均 $C_{\max}$: 1770 ng/mL）まで行動及び一般症状に中枢神経系に対する影響を示唆する所見は認められなかった。また、ラット及びカニクイザルに最長13週間まで投与した反復投与毒性試験（最高60 mg/kg/日の雌雄平均 $C_{\max}$: 2000 ng/mL 以上）においても、中枢神経系に対する影響を示唆する一般症状の変化及び病理組織学的所見はみられなかった。

安全性薬理試験はラット、カニクイザル及び *in vitro* で実施した。*In vitro* 心血管系試験において、本薬は hERG 電流を阻害し（ IC_{20} : 58 ng/mL, IC_{50} : 217 ng/mL）、hERG チャネル阻害作用が示唆された。本薬の血漿蛋白結合率は99%以上であることから、同様の阻害作用を *in vivo* で誘発する場合の本薬の血漿中濃度は、*in vitro* の100倍以上と考えられる。カニクイザルのテレメトリー試験では15 mg/kg（投与後4時間の平均血漿中薬物濃度 : 279 ng/mL）まで、探索的テレメトリー試験では60 mg/kg（平均 $C_{\max}$: 695 ng/mL）まで心電図に異常は認められなかった。

カニクイザルの探索的テレメトリー試験において、20及び60 mg/kg（平均 $C_{\max}$: 719及び

695 ng/mL) で軽度の血圧低下作用 (約10 mmHg) がみられたことから、本薬の血圧低下作用の機序を明らかにする目的で、ラット摘出大動脈に対する影響及びヒト電位依存性 Cav1.2チャンネルに対する影響について検討した。本薬はラット摘出血管において、高カリウム溶液による血管収縮を IC₂₀ 7.38 ng/mL, IC₅₀ 81.1 ng/mL で阻害した。また、電位依存性 Cav1.2チャンネルを IC₂₀ 98 ng/mL 及び IC₅₀ 222 ng/mL で阻害した。本薬は電位依存性 Cav1.2チャンネル阻害を介して血管を拡張し、その結果としてカニクイザルで軽度の血圧低下を誘発したものと考えられた。臨床推奨用量 (600 mg/日 (300 mg, 1日2回)) 投与時の本薬の血漿中濃度 (平均 C_{max}) は575 ng/mL であり、臨床において軽度の血圧低下が誘発される可能性は否定できない。しかしながら、本薬の国内臨床試験においても、血圧低下に関連する有害事象は認められず、バイタルサインとしても臨床上問題となる異常変動は認められていない。したがって、本薬の電位依存性 Cav1.2チャンネルに対する阻害作用を介した血圧への影響は臨床上問題となるものではないと考えられた。

ラットにおいて300 mg/kg (平均 C_{max} : 1770 ng/mL) までの用量で中枢神経系及び呼吸系に対する影響はみられなかった。また、ラット反復投与試験の最高用量60 mg/kg/日においても、中枢神経系に対する影響を示唆する所見は認められなかった。この時の血漿中濃度 (平均 C_{max}) は2000 ng/mL 以上 (60 mg/kg/日) あり、臨床推奨用量投与時 (平均 C_{max} : 575 ng/mL) の3倍以上であった (表2.6.6.8-1)。

このように、副次的薬理試験及び安全性薬理試験の結果からは、本薬の臨床推奨用量での使用において、臨床で問題となる重篤な副作用が発現する可能性は低いと考えられた。

2. 6. 2. 7 図表

図表は本文中に挿入した。

2. 6. 2. 8 参考文献

- 1) Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. N Engl J Med 2010;363:1734-9.
- 2) Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of *ALK* as a major familial neuroblastoma predisposition gene. Nature 2008;455:930-5.
- 3) Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with *ALK* gene rearranged non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2012;18:1472-82.
- 4) Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers. Sci Transl Med 2012;4:120ra17.
- 5) Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. Cancer Cell 2011;19:679-90.

**アレセンサカプセル20 mg
アレセンサカプセル40 mg
(アレクチニブ塩酸塩)**

第2部 (モジュール2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6. 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

略語一覧

略語	英名	和名
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC _{0-24h}	Area under the plasma concentration–time curve from zero to 24h	0から24時間までの血漿中濃度–時間曲線下面積
BLQ	Below the lower limit of quantification	定量限界未満
BZD	Benzodiazepine	ベンゾジアゼピン
CaMK2 α	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II アルファ
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズ・ハムスター卵巣由来
C _{max}	Maximum (peak) plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
DA	Dopamine	ドパミン
ECG	Electrocardiogram	心電図
EML4	Echinoderm microtubule associated protein like 4	微小管会合蛋白4
GR	Glucocorticoid receptor	グルココルチコイド受容体
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
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓由来
hERG	Human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
HPCD	Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン
5-HT	Serotonin	セロトニン
IC ₂₀	20% inhibitory concentration	20%阻害濃度
IC ₅₀	Half maximal (50%) inhibitory concentration	50%阻害濃度
INSR	Insulin receptor	インスリン受容体
IRI	Immunoreactive insulin	免疫反応性インスリン
KDR	Kinase insert domain receptor	キナーゼ挿入ドメイン受容体
NA	Not applicable	未適応
NE	Norepinephrine	ノルエピネフリン
NK	Neurokinin	ニューロキニン
SBECD	Sulfobutyl ether- β -cyclodextrin	スルフォブチルエーテル- β -シクロデキストリン
SCID	Severe combined immunodeficiency	重症複合型免疫不全
TGI	Tumor growth inhibition	腫瘍増殖阻害率
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
UT	Urotensin	ウロテンシン

目次

	<u>頁</u>
2.6.3 薬理試験概要表	4
2.6.3.1 薬理試験一覧表	4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験	8
2.6.3.3 副次的薬理試験	11
2.6.3.4 安全性薬理試験	12
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験	14

2.6.3.1 薬理試験一覧表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1-1 藥効藥理試験一覽

Test Article: Alectinib Hydrochloride or Alectinib					
Study Type	Species and Test System	Test Method and Compound	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacology					
Enzyme inhibition assay	Recombinant human ALK, mutated ALK, and various kinases	<i>In vitro</i> Alectinib Hydrochloride	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0213	4.2.1.1-1
Enzyme inhibition assay	Recombinant human mutated ALK	<i>In vitro</i> Alectinib Hydrochloride	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0054	4.2.1.1-2
X-ray structure analysis	Recombinant human ALK	<i>In vitro</i> Alectinib Hydrochloride	██████████ ██████████	██████████ BB00288	4.2.1.1-3
Cell growth inhibition assay	Human non-small cell lung cancer cell lines NCI-H2228, PC-9, NCI-H1993, and A549	<i>In vitro</i> Alectinib Hydrochloride	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0105	4.2.1.1-4
Cell growth inhibition assay	Human lymphoma cell lines KARPAS-299, SR, and U-937	<i>In vitro</i> Alectinib Hydrochloride	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0067	4.2.1.1-5
Cellular ALK inhibition assay	Human non-small cell lung cancer cell line NCI-H2228 and human lymphoma cell line KARPAS-299	<i>In vitro</i> Alectinib Hydrochloride	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0237S	4.2.1.1-6

表 2.6.3.1-1 薬効薬理試験一覧 (続)

Test Article: Alectinib Hydrochloride or Alectinib					
Study Type	Species and Test System	Test Method and Compound	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Enzyme inhibition assay	Recombinant human ALK	<i>In vitro</i> CH5468924-000 (M-4, major metabolite)	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0143	4.2.1.1-7
Cell growth inhibition assay	Human non-small cell lung cancer cell line NCI-H2228	<i>In vitro</i> CH5468924-000 (M-4, major metabolite)	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0144	4.2.1.1-8
Xenograft model antitumor assay	Human non-small cell lung cancer cell line NCI-H2228 xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> Alectinib Hydrochloride	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0057	4.2.1.1-9
Xenograft model antitumor assay	Human non-small cell lung cancer cell line A549 xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> Alectinib Hydrochloride	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0058	4.2.1.1-10
Xenograft model antitumor assay	Human lymphoma cell line KARPAS-299 xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> Alectinib	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0242S	4.2.1.1-11
Xenograft model antitumor assay	Human neuroblastoma cell line NB-1 xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> Alectinib	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0243S	4.2.1.1-12
Intratumoral ALK inhibition assay	Human non-small cell lung cancer cell line NCI-H2228 xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> Alectinib	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0020S	4.2.1.1-13
Xenograft model antitumor assay	Mouse lymphocyte cell line Ba/F3 expressing <i>EML4-ALK</i> L1196M xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> Alectinib Hydrochloride	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	PHM-0140	4.2.1.1-14

表 2.6.3.1-2 副次的薬理試験一覧

Test Article: Alectinib								
Study Type	Species and Test System	Method of Administration	Duration	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Secondary Pharmacology								
Binding assay	Binding of radiolabeled ligands to receptors/transporters/channels (111 assays with 109 molecules)	<i>In vitro</i>	NA	10 µmol/L	No	■■■■	TOX■■-0007S	4.2.1.2-1
Enzyme activity assay	Enzyme activity (42 assays with 42 enzymes)	<i>In vitro</i>	NA	10 µmol/L	No	■■■■		
Receptor activity assay	Receptor-transfected cell lines (40 assays with 20 receptors)	<i>In vitro</i>	NA	1, 10 µmol/L	No	■■■■	TOX■■-0027S	4.2.1.2-2
Monoamine uptake assay	Rat brain synaptosomes (NE, DA)	<i>In vitro</i>	NA	1, 10 µmol/L	No	■■■■		
Monoamine uptake assay	Rat brain synaptosomes (5-HT, NE, DA)	<i>In vitro</i>	NA	10 ⁻³ -1 µmol/L	No	■■■■	TOX■■-0047S	4.2.1.2-3

NE: norepinephrine, DA: dopamine, 5-HT: serotonin.

表 2.6.3.1-3 安全性薬理試験一覧

Test Article: Alectinib Hydrochloride or Alectinib								
Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Cardiovascular system	HEK293 cells expressing hERG	<i>In vitro</i>	NA	0, 0.141, 0.246, 0.470 $\mu\text{mol/L}$	Yes		TOX-0150	4.2.1.3-1
	Cynomolgus monkeys (telemetry)	Gavage	Escalating dose (Preliminary study)	0, 20, 60	No	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0048S	4.2.1.3-2
	Cynomolgus monkeys (telemetry)	Gavage	Escalating dose	0, 1.7, 5, 15	Yes		TOX-0151	4.2.1.3-3
	CHO cells expressing voltage-gated Cav1.2 channel (L type Ca^{2+} channel)	<i>In vitro</i>	NA	0, 0.189, 0.339, 0.764 $\mu\text{mol/L}$	No	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0060	4.2.1.3-4
	Isolated rat aorta (Vasomotion)	<i>In vitro</i>	NA	0, 0.0160, 0.0723, 0.247, 0.860, 3.38 $\mu\text{mol/L}$	No	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.	TOX-0055S	4.2.1.3-5
Central nervous system	RccHan TM : WIST rats (Modified Irwin)	Gavage	Single dose	0, 3, 30, 300	Yes		TOX-0165	4.2.1.3-6
Respiratory system	RccHan TM : WIST rats	Gavage	Single dose	0, 3, 30, 300	Yes		TOX-0167	4.2.1.3-7

Alectinib Hydrochloride was used in all studies except *in vitro* vasomotion study with rat isolated aorta in which Alectinib was used.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験

Study Type	Test System	Test Method	Key Results	Location in CTD
Enzyme inhibition assay	Recombinant human ALK, mutated ALK, and various kinases	<i>In vitro</i>	ALK: IC ₅₀ = 1.9 nmol/L ALK F1174L: IC ₅₀ = 1.0 nmol/L ALK R1275Q: IC ₅₀ = 3.5 nmol/L INSR: IC ₅₀ = 550 nmol/L KDR: IC ₅₀ = 1400 nmol/L Other 20 kinases: IC ₅₀ > 5000 nmol/L	4.2.1.1-1
Enzyme inhibition assay	Recombinant human mutated ALK	<i>In vitro</i>	ALK C1156Y: IC ₅₀ = 0.93 nmol/L ALK L1196M: IC ₅₀ = 2.1 nmol/L	4.2.1.1-2
X-ray structure analysis	Recombinant human ALK	<i>In vitro</i>	Interaction of alectinib in the ATP-binding site of ALK	4.2.1.1-3
Cell growth inhibition assay	Human non-small cell lung cancer cell lines NCI-H2228, PC-9, NCI-H1993, and A549	<i>In vitro</i> 0, 1–1000 nmol/L 120 hours post-treatment	NCI-H2228: IC ₅₀ = 12 nmol/L PC-9: IC ₅₀ = 400 nmol/L NCI-H1993: IC ₅₀ > 1000 nmol/L A549: IC ₅₀ > 1000 nmol/L	4.2.1.1-4
Cell growth inhibition assay	Human lymphoma cell lines KARPAS-299, SR, and U-937	<i>In vitro</i> 0, 1–1000 nmol/L 96 hours post-treatment	KARPAS-299: IC ₅₀ = 14 nmol/L SR: IC ₅₀ = 14 nmol/L U-937: IC ₅₀ > 1000 nmol/L	4.2.1.1-5
Cellular ALK inhibition assay	Human non-small cell lung cancer cell line NCI-H2228 and human lymphoma cell line KARPAS-299	<i>In vitro</i> 0, 500, 2000 nmol/L 2 hours post-treatment	Inhibition of cellular ALK phosphorylation by alectinib	4.2.1.1-6

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験 (続)

Study Type	Test System	Test Method	Key Results	Location in CTD
Enzyme inhibition assay	Recombinant human ALK	<i>In vitro</i> CH5468924-000 (M-4, major metabolite)	CH5468924-000 ALK: IC ₅₀ = 1.2 nmol/L	4.2.1.1-7
Cell growth inhibition assay	Human non-small cell lung cancer cell line NCI-H2228	<i>In vitro</i> 0, 1–1000 nmol/L of CH5468924-000 (M-4, major metabolite) 120 hours post-treatment	CH5468924-000 NCI-H2228: IC ₅₀ = 37 nmol/L	4.2.1.1-8
Xenograft model antitumor assay	Human non-small cell lung cancer cell line NCI-H2228 xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> 0, 0.8, 4, 20 mg/kg/day, n = 7 14-day repeated oral administration	0.8 mg/kg: TGI = 59% 4 mg/kg: TGI = 129% 20 mg/kg: TGI = 137%	4.2.1.1-9
Xenograft model antitumor assay	Human non-small cell lung cancer cell line A549 xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> 0, 0.8, 4, 20 mg/kg/day, n = 7 14-day repeated oral administration	0.8 mg/kg: TGI = – 6% 4 mg/kg: TGI = – 2% 20 mg/kg: TGI = 0%	4.2.1.1-10
Xenograft model antitumor assay	Human anaplastic large-cell lymphoma cell line KARPAS-299 xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> 0, 6, 20 mg/kg/day, n = 4 11-day repeated oral administration	6 mg/kg: TGI = 94% 20 mg/kg: TGI = 119%	4.2.1.1-11
Xenograft model antitumor assay	Human neuroblastoma cell line NB-1 xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> 0, 6, 20 mg/kg/day, n = 5 11-day repeated oral administration	6 mg/kg: TGI = 63% 20 mg/kg: TGI = 104%	4.2.1.1-12

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験（続）

Study Type	Test System	Test Method	Key Results	Location in CTD
Intratumoral ALK inhibition assay	Human non-small cell lung cancer cell line NCI-H2228 xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> 0, 20 mg/kg/day, n = 2 4 hours post-dose	Inhibition of intratumoral ALK phosphorylation after treatment of alectinib	4.2.1.1-13
Xenograft model antitumor assay	Mouse lymphocyte cell line Ba/F3 expressing <i>EML4-ALK</i> L1196M xenograft model in SCID mice	<i>In vivo</i> 0, 60 mg/kg/day, n = 7 7-day repeated oral administration	60 mg/kg: TGI = 123%	4.2.1.1-14

2. 6. 3. 3 副次的薬理試験

表 2. 6. 3. 3-1 副次的薬理試験

Test Article: Alectinib

Study Type	Conc. ($\mu\text{mol/L}$)	Endpoint	Result	Location in CTD
Binding assay	10 $\mu\text{mol/L}$	Inhibition rate against binding of radiolabeled ligands to receptors/transporters/channels (111 assays with 109 molecules)	[> 50% inhibition] BZD (peripheral), D ₁ , D _{2S} , D ₃ , M ₅ , NK ₁ , NK ₂ , 5-HT _{2B} , 5-HT _{2C} , σ (non-selective), GR, UT, Ca ²⁺ channel (L, dihydropyridine site), Ca ²⁺ channel (L, diltiazem site), Ca ²⁺ channel (L, verapamil site), Cl ⁻ channel (GABA-gated), transporter (NE, DA, 5-HT)	4.2.1.2-1
Enzyme activity assay		Enzyme activity inhibition rate (42 assays with 42 enzymes)	[> 50% inhibition] CaMK2 α	
Receptor activity assay	1, 10 $\mu\text{mol/L}$	Receptor activity change rate with receptor-expressed cell lines (40 assays with 20 receptors)	[> 50% changes] 5-HT _{2B} (at 10 $\mu\text{mol/L}$ only)	4.2.1.2-2
Monoamine uptake assay		Monoamine uptake inhibition rate with rat brain synaptosomes (NE, DA)	[> 50% inhibition] NE, DA (at 1 $\mu\text{mol/L}$ only)	
Monoamine uptake assay	10 ⁻³ -1 $\mu\text{mol/L}$	Monoamine uptake IC ₅₀ values with rat brain synaptosomes (5-HT, NE, DA)	[IC ₅₀ values] 5-HT: 0.10 $\mu\text{mol/L}$ (48.3 ng/mL), NE: 0.33 $\mu\text{mol/L}$ (159.3 ng/mL), DA: 0.26 $\mu\text{mol/L}$ (125.5 ng/mL)	4.2.1.2-3

All assays were performed in duplicate.

10 $\mu\text{mol/L}$ = approx. 4826 ng/mL

NE: norepinephrine, DA: dopamine, 5-HT: serotonin.

2. 6. 3. 4 安全性薬理試験

表 2. 6. 3. 4-1 安全性薬理試験

Test Article: Alectinib Hydrochloride or Alectinib

Study Type	Treatment Duration	Species/ Test System	Animals/ Group	Dose (mg/kg)	Mean C _{max} (ng/mL) M/F	Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL) M/F	Major Effects	Location In CTD
Cardiovascular system								
hERG	<i>In vitro</i>	HEK293 cells expressing hERG	n=5/conc.	0, 0.141, 0.246, 0.470 μmol/L	NA	NA	IC ₂₀ : 0.12 μmol/L (58 ng/mL) IC ₅₀ : 0.45 μmol/L (217 ng/mL)	4.2.1.3-1
Preliminary cardiovascular system (telemetry) ^{a,b}	Escalating- dose	Cynomolgus monkeys	2/sex	0 20 60	– 605/832 574/816	Not determined 9870/11100 11500/12600	Decrease in blood pressure at 20 and 60 mg/kg (approx. 10 mmHg)	4.2.1.3-2
Cardiovascular system (telemetry) ^{c,d}	Escalating- dose	Cynomolgus monkeys	4 M	0 1.7 5 15	BLQ 126/– 238/– 279/– (4h after administration)	Not determined	No effects on blood pressure, ECG, body temperature and heart rate	4.2.1.3-3
Ca ²⁺ Channel	<i>In vitro</i>	CHO cells expressing voltage-gated Cav1.2 channel	n=4/conc.	0, 0.189, 0.339, 0.764 μmol/L	NA	NA	IC ₂₀ : 0.203 μmol/L (98 ng/mL) IC ₅₀ : 0.461 μmol/L (222 ng/mL)	4.2.1.3-4
Vasomotion ^f	<i>In vitro</i>	Isolated rat aorta	n=4/conc. (control, n=8)	0, 0.0160, 0.0723, 0.247, 0.860, 3.38 μmol/L	NA	NA	IC ₂₀ : 0.0153 nmol/L (7.38 ng/mL) IC ₅₀ : 0.168 nmol/L (81.1 ng/mL)	4.2.1.3-5
Central nervous system								
Modified Irwin test ^c	Single dose	RccHan TM : WIST rats	Main: 6 M TK: 3 M	0 3 30 300	BLQ 171/– 1250/– 1770/–	Not determined 2690/– 22000/– 31500/–	No effects on general condition and behavior	4.2.1.3-6

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験（続）

Test Article: Alectinib hydrochloride								
Study Type	Treatment Duration	Species/ Test System	Animals/ Group	Dose (mg/kg)	Mean C _{max} (ng/mL) M/F	Mean AUC _{0-24h} (ng·h/mL) M/F	Major Effects	Location In CTD
Respiratory system								
Respiratory system in conscious rat ^{c,e}	Single dose	RccHan TM : WIST rats	8 M	0	BLQ	Not determined	No effects on respiratory rate, tidal volume and minutes volume	4.2.1.3-7
				3	171/-	2690/-		
				30	1250/-	22000/-		
				300	1770/-	31500/-		

Alectinib Hydrochloride was used in all studies except *in vitro* vasomotion study with rat isolated aorta in which Alectinib was used.

- a) The vehicle was an aqueous solution of █% w/v SBECD and █mol/L hydrochloric acid.
- b) TK data are cited from the 2-week monkey study (data of Day 1).
- c) The vehicle was an aqueous solution of █w/v%HPCD, █mol/L methanesulfonic acid and █mol/L hydrochloric acid.
- d) TK measurements were performed only at 4 and 24 hours post-dose.
- e) TK data are cited from the study of central nervous system (modified Irwin's test).
- f) Test article used was Alectinib.

–: Not done; NA:Not applicable; BLQ: Below the lower limit of quantification

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし