2.6.1　緒言

カプレルサ®錠　100 mg

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次　　頁

目次 2
略語及び専門用語一覧表 3
1　緒言 4
2　参考文献一覧 5

略語及び専門用語一覧表

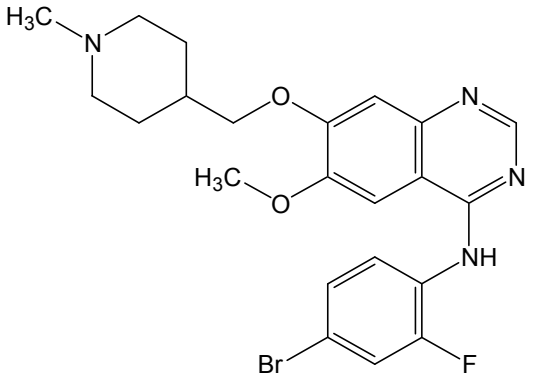
本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
EGFR	上皮増殖因子受容体
MTC	甲状腺髄様癌
RET	Rearranged during Transfection；トランスフェクション中の再構成（癌原遺伝子）。受容体チロシンキナーゼの一種。
VEGFR	血管内皮増殖因子受容体

1　　緒言

バンデタニブは、血管内皮増殖因子受容体-2（VEGFR-2）チロシンキナーゼ、上皮増殖因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ及び RET（Rearranged during Transfection）チロシンキナーゼに対して選択的なマルチキナーゼ阻害薬である。バンデタニブの化学構造式を以下に示す。

バンデタニブ（Vandetanib）（JAN）



N-(4-bromo-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl)methoxy]quinazolin-4-amine

分子量：475.35

開発番号：ZD6474、M382561、AZ11749412

今回、製造販売承認申請を行うバンデタニブ製剤の効能・効果（案）及び用法・用量（案）は以下のとおりである。

申請品目名	カプレルサ®錠 100 mg
効能・効果（案）	根治切除不能な局所進行又は転移を伴う甲状腺髄様癌
用法・用量（案）	通常、成人にはバンデタニブとして 1 回 300 mg を 1 日 1 回、経口投与する。なお、患者の状態により適宜減量する。

予定適応症の甲状腺髄様癌（MTC）の発症には RET チロシンキナーゼが関与し、MTC では VEGFR チロシンキナーゼや EGFR チロシンキナーゼの発現増加も認められる（Capp et al 2010、Rodriguez-Antona et al 2010）。バンデタニブは *in vitro* 及び *in vivo* の非臨床薬理試験において、MTC 腫瘍細胞の増殖を濃度依存的に抑制することが示されている（Vitagliano et al 2011）。

2　　参考文献一覧

Capp et al 2010

Capp C, Wajner SM, Siqueira DR, Brasil BA, Meurer L, Maia AL. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. Thyroid. 2010 Aug;20(8):863-71.

Rodriguez-Antona et al 2010

Rodríguez-Antona C, Pallares J, Montero-Conde C, Inglada-Pérez L, Castelblanco E, Landa I et al. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. Endocr Relat Cancer. 2010 Jan 29;17(1):7-16.

Vitagliano et al 2011

Vitagliano D, De Falco V, Tamburrino A, Coluzzi S, Troncone G, Chiappetta G et al. The tyrosine kinase inhibitor ZD6474 blocks proliferation of RET mutant medullary thyroid carcinoma cells. Endocr Relat Cancer. 2010 Nov 30;18(1):1-11.

2.6.2　薬理試験の概要文

カプレルサ®錠 100 mg

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次　　頁

	目次	2
	略語及び専門用語一覧表	6
	薬理試験の概要文	8
1	まとめ	8
2	効力を裏付ける試験	10
2.1	*In vitro* 試験	10
2.1.1	バンデタニブの酵素阻害作用	10
2.1.1.1	バンデタニブの各種キナーゼに対する阻害作用及び選択性	10
2.1.1.2	活性型変異を有する RET チロシンキナーゼの阻害作用	11
2.1.1.3	変異型チロシンキナーゼに対する阻害作用	13
2.1.2	血管内皮細胞を用いた *in vitro* 試験	14
2.1.2.1	HUVEC の増殖に対する作用	14
2.1.2.2	各種血管内皮細胞の増殖、遊走、浸潤及びアポトーシスに及ぼす作用	15
2.1.2.3	血管内皮細胞の管腔形成に対する作用	17
2.1.2.4	HUVEC における VEGFR-2 チロシンキナーゼ及び EGFR チロシンキナーゼの自己リン酸化に対するバンデタニブの阻害作用	17
2.1.3	ヒト腫瘍細胞株を用いた *in vitro* 試験	18
2.1.3.1	非小細胞肺癌（NSCLC）、大腸癌（CRC）、頭頸部扁平上皮癌（SCCHN）及び食道癌株に対する作用	18
2.1.3.2	ヒト甲状腺腫瘍細胞株の RET チロシンキナーゼに対する阻害作用	20
2.1.3.3	MTC 腫瘍細胞株の増殖に対する作用	21
2.2	*In vivo* 試験	23
2.2.1	ヒト腫瘍異種移植モデルにおけるバンデタニブの薬力学的作用	23
2.2.1.1	ヒト大腸癌株 LoVo 移植マウスの腫瘍組織における VEGFR-2 及び EGFR チロシンキナーゼのリン酸化阻害作用	23
2.2.1.2	ヒト NSCLC 株 PC-9 移植 SCID マウスにおけるアポトーシス誘導	24
2.2.1.3	ヒト肺癌細胞株 A549 異種移植マウスにおける皮膚血管新生の阻害	26
2.2.1.4	Calu-6 腫瘍組織の微小血管新生及び腫瘍細胞死に対するバンデタニブの影響	27
2.2.2	*In vivo* におけるバンデタニブの抗腫瘍効果	28
2.2.2.1	各種ヒト腫瘍及び同系腫瘍移植マウスにおける抗腫瘍効果	28
2.2.2.2	MTC 腫瘍に対する増殖抑制作用	30
2.2.2.3	RET/PTC3 融合遺伝子を導入した NIH3T3 細胞に対する増殖抑制作用	31
2.3	バンデタニブ代謝物の薬理作用	33
3	副次的薬理試験	34
3.1	*In vitro* 試験	34
3.1.1	*In vitro* 放射性リガンド結合及び酵素阻害試験	34

3.2　*In vivo* 試験……35
3.2.1　VEGF 及び bFGF による血圧低下に対する作用……35
3.2.2　ラットにおける骨端軟骨板肥厚の誘発……36
3.2.3　バンデタニブが創傷治癒に及ぼす影響……37
4　安全性薬理試験……38
4.1　中枢神経系に対する作用……38
4.1.1　マウスにおける作用……38
4.1.2　ラットにおける作用……39
4.2　心血管系に対する作用……39
4.2.1　*In vitro* 電気生理学的試験……39
4.2.1.1　hERG チャネルに対する作用……39
4.2.1.2　イヌプルキンエ線維の活動電位に対する作用……39
4.2.2　*In vivo* 電気生理学的試験……39
4.2.2.1　ラットのテレメトリー試験……39
4.2.2.2　イヌのテレメトリー試験……40
4.2.2.3　イヌの静脈内投与試験……40
4.2.3　オンダンセトロンとの併用に関する検討……40
4.2.3.1　*In vitro* 試験……40
4.2.3.2　*In vivo* 試験……41
4.3　呼吸器系に対する作用……41
4.4　消化管系に対する作用……42
4.5　腎／泌尿器系に対する作用……42
4.6　代謝物の安全性薬理試験……43
5　薬力学的薬物相互作用……43
6　考察及び結論……43
6.1　効力を裏付ける薬理試験……43
6.2　副次的薬理試験……45
6.3　安全性薬理試験……45
7　参考文献一覧……48

表目次

表 1　バンデタニブによるキナーゼ阻害：効力及び選択性……11
表 2　野生型及び変異型チロシンキナーゼ（EGFR 及び RET）に対するバンデタニブの阻害作用……13
表 3　増殖因子及び血清刺激による HUVEC の増殖に対するバンデタニブの作用……14
表 4　管腔総面積、全長及び分岐点の数に対するバンデタニブの IC_{50} 値……17

表 5　ヒト又は同系腫瘍を移植したマウスにおける抗腫瘍効果 29
表 6　バンデタニブ及びその代謝物の各種受容体チロシンキナーゼ阻害作用 33
表 7　バンデタニブ及びその代謝物の各種増殖因子誘発 HUVEC 増殖に及ぼす作用 34
表 8　ラットの胃内容物排出速度及び腸管輸送能に対するバンデタニブの作用（中央値） 42

図目次

図 1　バンデタニブ（ZD6474）による変異型 RET チロシンキナーゼのリン酸化阻害（典型的一例） 12
図 2　H441 ヒト肺癌細胞及び血管内皮細胞の遊走又は浸潤に対するバンデタニブ（ZD6474）の作用 16
図 3　HUVEC における VEGF 及び EGF 刺激による受容体チロシンキナーゼ自己リン酸化に対するバンデタニブ及びゲフィチニブの阻害作用（典型的一例） 18
図 4　ヒト腫瘍細胞株のバンデタニブに対する感受性（Hypersensitive：高感受性株、Sensitive：感受性株、Resistant：抵抗性株、Refractory：高抵抗性株） 19
図 5　甲状腺腫瘍細胞株（TPC-1、FB2 及び ARO）に対するバンデタニブ（ZD6474）の増殖抑制作用（A）及び細胞周期への影響（B） 20
図 6　MTC 細胞の増殖に対するバンデタニブ（ZD6474）の作用 (A：TT 細胞、B：MZ-CRC-1 細胞) 22
図 7　TT 細胞及び MZ-CRC-1 細胞の RET、EGFR 及び VEGFR-2 チロシンキナーゼに対するバンデタニブ（ZD6474）の作用 22
図 8　ヒト大腸癌 LoVo 細胞異種移植マウスにおけるバンデタニブによる肺組織及び腫瘍組織内 EGFR、VEGFR-2 チロシンキナーゼのリン酸化阻害作用 24
図 9　ヒト NSCLC 株 PC-9 移植 SCID マウスにおける、バンデタニブ、ゲフィチニブ及び vatalanib の腫瘍増殖（A）及び EGFR 自己リン酸化（B）に対する作用並びにアポトーシス誘導作用（C） 25
図 10　腫瘍により誘導される血管新生に対するバンデタニブ（ZD6474）の作用 26
図 11　バンデタニブ（ZD6474）を長期投与した Calu-6 異種移植モデルの腫瘍組織の解析 27
図 12　TT 細胞異種移植モデルへのバンデタニブ（ZD6474）経口投与（50 mg/kg/日）による腫瘍増殖抑制作用 31
図 13　NIH3T3-RET/PTC3 腫瘍細胞を移植したマウスにおけるバンデタニブ（ZD6474）の細胞増殖抑制作用 32
図 14　麻酔下の Wistar 系雄ラットにおける VEGF 又は bFGF で誘発される急性血圧低下に対するバンデタニブ（ZD6474）の作用 36
図 15　バンデタニブ（ZD6474）で誘発されるラットの骨端軟骨板肥厚 37

図 16　マウスの創傷 7 日後及び 28 日後の創傷結合力（Breaking Strength）に対するバンデタニブの影響 38
図 17　バンデタニブ投与後の曝露量の比較－MCF-7 腫瘍移植マウス（単回経口投与）及び日本人 MTC 患者（300 mg/日反復経口投与、定常状態）の血漿中濃度 45
図 18　心機能に関連する安全性薬理試験データと臨床曝露量の関係 47

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
AGC	プロテインキナーゼ A、G、C が属するキナーゼファミリー。
AKT	セリン・スレオニンキナーゼの一種。プロテインキナーゼ B とも呼ばれる。
ALP	Alkaline Phosphatase；アルカリフォスファターゼ
ALT	Alanine Transaminase；アラニントランスアミナーゼ
APD_{90}	Action Potential Duration at 90% of Repolarization；90%再分極時の活動電位持続時間
APD_{70}	Action Potential Duration at 70% of Repolarization；70%再分極時の活動電位持続時間
APD_{50}	Action Potential Duration at 50% ofRepolarization；50%再分極時の活動電位持続時間
AST	Aspartate Aminotransferase；アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	Adenosine Triphosphate；アデノシン三リン酸
AUC	Area Under the Plasma Concentration-Time Curve；血漿中濃度-時間曲線下面積
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor；塩基性線維芽細胞増殖因子
BrdU	Bromodeoxyuridine；ブロモデオキシウリジン
BRK	Breast Tumour Kinase；乳癌特異的チロシンキナーゼ Protein Tyrosine Kinase 6（プロテインキナーゼ 6）とも呼ばれる。
CAMK	Ca^{2+}/Calmodulin-dependent Protein Kinase；Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ
CD31	130 kDa の膜内在性糖タンパク質 Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1（PECAM-1、血小板内皮細胞接着分子 1）とも呼ばれる。
CHO	Chinese Hamster Ovary；チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	Maximum Plasma Concentration；最高血漿中濃度
CRC	Colorectal Cancer；大腸癌
DAB	3,3'-diaminobenzidine；3,3'-ジアミノベンジジン
DMSO	Dimethyl Sulfoxide；ジメチルスルホキシド
DNA	Deoxyribonucleic Acid；デオキシリボ核酸
EGF	Epidermal Growth Factor；上皮増殖因子
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor；上皮増殖因子受容体
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay；酵素結合免疫測定法
erbB2	受容体チロシンキナーゼの一種。HER2（ヒト上皮増殖因子受容体 2 キナーゼ）とも呼ばれる。
FAK	Focal Adhesion Kinase；接着斑キナーゼ
FCS	Fetal Calf Serum；ウシ胎児血清
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded；ホルマリン固定パラフィン包埋組織
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor；線維芽細胞増殖因子受容体
FMTC	Familial Medullary Thyroid Cancer；家族性甲状腺髄様癌
FOB	Functional Observational Battery；機能観察総合評価
GLP	Good Laboratory Practice；医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
H&E	Hematoxylin and Eosin；ヘマトキシリン・エオジン染色

略語及び専門用語	用語の説明
HEK	Human Embryonic Kidney；ヒト胎児腎
hERG	Human Ether-a-go-go Related Gene；ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HPAEC	Human Pulmonary Artery Endothelial Cell；ヒト肺動脈内皮細胞
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell；ヒト臍帯静脈血管内皮細胞
IC_{50}	50% Inhibition Concentration；50%抑制に必要な薬物濃度
I_{kr}	急速活性化遅延整流カリウムチャネル電流
IGF-1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor；インスリン様増殖因子-1 受容体
K_i	阻害定数
M	mol/L；モル濃度
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase；分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
MEK	MAPK/ERK(Extracellular Signal-regulated Kinase) Kinase；MAPK/ERK キナーゼ
MEN	Multiple Endocrine Neoplasia；多発性内分泌腫瘍症
MLEC	Mouse Lung Endothelial Cells；マウス肺血管内皮細胞
MTC	Medullary Thyroid Cancer；甲状腺髄様癌
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide；3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-臭化ジフェニルテトラゾリウム
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer；非小細胞肺癌
PDGFRβ	Platelet-Derived Growth Factor Receptor β；血小板由来増殖因子受容体 β
PTC	Papillary Thyroid Cancer；甲状腺乳頭癌
QT 間隔	心電図の QRS 群の開始から T 波終了までの時間
QTcV	心拍数で補正した QT 間隔
RET	Rearranged during Transfection；トランスフェクション中の再構成（癌原遺伝子） 受容体チロシンキナーゼの一種。
SCCHN	Squamous Cell Cancer of the Head and Neck；頭頸部扁平上皮癌
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis；ポリアクリルアミドゲル電気泳動
SCID	Severe Combined Immune Deficiency；重症複合型免疫不全症
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling 断片化 DNA を検出する方法の一種。
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor；血管内皮増殖因子
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor；血管内皮増殖因子受容体
ZD6474	Vandetanib；バンデタニブ

薬理試験の概要文

1　　まとめ

バンデタニブは、血管内皮増殖因子（VEGF）刺激による血管新生を阻害することで間接的に腫瘍増殖を抑制するとともに、上皮増殖因子受容体（EGFR）及び RET（Rearranged during Transfection:トランスフェクション中の再構成）チロシンキナーゼを介した腫瘍細胞の増殖を直接的に抑制する。これらのチロシンキナーゼはすべて甲状腺髄様癌（MTC）において重要な役割を果たしている。甲状腺癌に対するバンデタニブの細胞増殖抑制作用は、*in vitro* で甲状腺乳頭癌（PTC）由来の細胞に対して Carlomagno ら（Carlomagno et al 2002）によって初めて示され、後に *in vivo* で MTC に対しても示された（Vitagliano et al 2011）。

効力を裏付ける *in vitro* 薬理試験

バンデタニブは血管内皮増殖因子受容体-2（VEGFR-2）、EGFR、RET 及び乳癌特異的チロシンキナーゼ（BRK）のチロシンキナーゼ活性を 0.1 μM 以下の IC_{50} 値で阻害した。バンデタニブは活性化変異を有する EGFR チロシンキナーゼ（L858R）や MTC でみられる変異型 RET チロシンキナーゼ（M918T 等、Carlomagno et al 2004）の自己リン酸化を阻害したが、T790M 変異型 EGFR チロシンキナーゼや V804L 又は V804M 変異型 RET チロシンキナーゼに対する阻害作用はそれぞれの野生型チロシンキナーゼに対する阻害作用と比較して低下した。

バンデタニブは増殖因子刺激下のヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）の増殖を強く抑制した（Wedge et al 2002）。また、各種血管内皮細胞の遊走、浸潤及び増殖を濃度依存的に抑制した（Wu et al 2007）。バンデタニブは濃度依存的に HUVEC の VEGFR-2 及び EGFR の各チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害し（Brave et al 2007a、Brave et al 2011）、血管内皮細胞の管腔形成を抑制した。

各種ヒト腫瘍細胞株において、バンデタニブとゲフィチニブに対する感受性に強い相関がみられ、その作用機序として EGFR チロシンキナーゼ阻害が示唆された（Brave et al 2007a、Brave et al 2011）。また、バンデタニブは活性化 RET チロシンキナーゼ RET-PTC1 を発現する PTC 細胞株 TPC-1 及び FB2 の細胞増殖を抑制し（Carlomagno et al 2002）、MTC 株 TT（RET C634W）及び MZ-CRC-1（RET M918T）細胞の増殖も 50 nM 以上の濃度で抑制した。MTC 細胞では RET、EGFR 及び VEGFR-2 の各チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害した（Vitagliano et al 2011）。

効力を裏付ける *in vivo* 薬理試験

7 株のヒト腫瘍細胞株（前立腺癌、卵巣癌、乳癌、外陰部癌、肺癌及び大腸癌）をマウスに移植し、バンデタニブ（12.5～100 mg/kg/日）を 21～35 日間反復経口投与したところ、用量依存的な増殖抑制作用が認められ、25 mg/kg/日以上の用量で 7 株全てに統計学的有意な増殖抑制作用が認められた（Wedge et al 2002）。PC-9 腫瘍移植マウスでは、21 日間のバンデタニブ 12.5 mg/kg/日の反復経口投与により腫瘍が退縮し、腫瘍組織におけるリン酸化 EGFR（pEGFR）レベルの低下とアポトーシスマーカーM30 の増加が認められた。さらに、MTC 腫瘍株 TT 移植マウスへのバンデタニブ 50 mg/kg/日の 17 日間反復経口投与により腫瘍が退縮し、腫瘍内 RET チロシンキナーゼのリン酸化阻害が認められた（Vitagliano et al 2011）。また、A549 肺癌細胞移植マウスでは、5 日間のバンデタニブ（50 又は 100 mg/kg/日）反復経口投与により血管新生が有意に阻害された（それぞれ 63%及び 79%）（Wedge et al 2002）。

バンデタニブ代謝物の薬理作用

ヒトで認められたバンデタニブの代謝物である *N*-脱メチル体の VEGFR-2 及び EGFR の各チロシンキナーゼに対する阻害活性はバンデタニブとほぼ同程度であったのに対し、*N*-オキシド体の VEGFR-2 チロシンキナーゼ阻害能はバンデタニブの約 5 分の 1 であった。一方、HUVEC の増殖に対する抑制作用は、バンデタニブと比較して、*N*-脱メチル体は VEGF、上皮増殖因子（EGF）及び塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）刺激下でほぼ同等であったのに対し、*N*-オキシド体は約 50 分の 1 であった。

副次的薬理試験

バンデタニブの *in vitro* の放射性リガンド結合試験及び酵素活性阻害試験において阻害作用が認められた 35 の標的分子のうち、特に 3 種の受容体（ヒスタミン H_1 受容体、アドレナリン α_{2A} 受容体、アドレナリン α_{2B} 受容体）に高い親和性（K_i 値 0.1 μM 以下）を示した。

バンデタニブは、ラットにおいて VEGF による血圧低下に対する抑制作用及び骨端軟骨板の肥大作用を示した。また、マウス創傷治癒モデルにおいて創傷結合力を低下させる（Ko et al 2005）など、バンデタニブは VEGF に関連する各種生理的反応を抑制した。

安全性薬理試験

バンデタニブの安全性薬理コアバッテリー試験、フォローアップ試験及び補足的試験を実施し、中枢神経系、心血管系、呼吸器系、消化器系及び腎／泌尿器系に及ぼす影響を検討した。試験は GLP（Good Laboratory Practice；医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準）準拠を基本としたが、一部 GLP に完全に準拠しないものもあった。安全性薬理試験では主に心血管系への影響が認められ、血圧上昇と hERG（ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子）チャネル阻害による QT 間隔延長がヒトでも発現する可能性が示唆された。

中枢神経系：マウスへのバンデタニブ 50 mg/kg 単回経口投与により、行動への影響は観察されなかったが、平均直腸温がわずかに上昇した（投与 1 時間後に 1.4℃）。また、ラットにバンデタニブ（40、200 及び 1000 mg/kg）を単回経口投与した機能観察総合評価（FOB）において、オープンフィールドでの運動量が全用量で低下し、用量依存性の体重減少が認められた。

心血管系：バンデタニブの hERG チャネルに対する IC_{50} 値は 0.4 μM であり、代謝物 *N*-脱メチル体及び *N*-オキシド体の hERG に対する IC_{50} 値はそれぞれ 1.3 μM 及び 4.0 μM であった。バンデタニブは濃度依存的にイヌプルキンエ線維の 90%再分極時の活動電位持続時間（APD_{90}）を延長し、この作用は低刺激頻度や低カリウム濃度の条件下で増強された。

ラットへのバンデタニブ 12.5 mg/kg の単回経口投与により、収縮期及び拡張期血圧が上昇し、反復経口投与ではさらに上昇した。イヌへのバンデタニブの単回経口投与では、最高用量 40 mg/kg における心拍数低下を除いて心血管系への影響はみられなかった。

イヌへのバンデタニブ（0.2～13.4 mg/kg を漸増投与）静脈内ボーラス投与により、0.67 mg/kg 以上の用量で QTcV（心拍数で補正した QT 間隔）の延長作用が認められ、この作用は 6.7 mg/kg 投与時に最大となり約 16%延長した（血漿中濃度は約 1.5 μM）。バンデタニブの心電図波形に関する無影響量は 0.2 mg/kg（血漿中濃度は約 0.04 μM）であった。この試験で、バンデタニブが心筋虚血につながる冠動脈収縮を誘発する所見は観察されなかった。

QT 延長作用のある制吐薬オンダンセトロンとの併用試験を実施した。hERG チャネル発現 CHO（Chinese Hamster Ovary）細胞にバンデタニブ 0.4 μM とオンダンセトロン 1 μM を同時に作用させたところ、I_{kr} 電流は約 70%阻害された。

イヌへのオンダンセトロン（1～3 mg/kg）又はバンデタニブ（5.19～27.5 mg/kg）の静脈内投与により、用量依存的な QTcV 延長がみられたが、オンダンセトロン（1～3 mg/kg）、バンデタニブ（20.75 mg/kg）、オンダンセトロン（1～3 mg/kg）をこの順に静脈内投与したところ、バンデタニブ投与による明らかな QTcV 延長作用は認められなかった。

呼吸器系：ラットへのバンデタニブ 200 mg/kg 単回経口投与により呼吸器系への影響はみられなかったが、1000 mg/kg の用量では最大吸気流量が増加し、吸気時間が短縮した。

消化管系：ラットへのバンデタニブ（40 mg/kg 以上）の単回経口投与により、用量依存的に胃内容物排出速度及び腸管輸送能が低下した。

腎／泌尿器系：ラットへのバンデタニブ 50 mg/kg の単回経口投与により、尿中への塩素及びカリウムの排泄量低下と尿中総タンパク濃度の増加が認められたが、利尿あるいは抗利尿作用は示されず、血液化学的検査値への影響もみられなかった。

2　効力を裏付ける試験

2.1　*In vitro* 試験

In vitro 試験では、バンデタニブをジメチルスルホキシド（DMSO）に溶かして用いた。

2.1.1　バンデタニブの酵素阻害作用

2.1.1.1　バンデタニブの各種キナーゼに対する阻害作用及び選択性

[1770-2]

VEGFR-2、EGFR 及び RET のチロシンキナーゼを含む酵素パネルを用いて、バンデタニブの阻害作用及び酵素選択性を検討した。

試験方法

各種キナーゼファミリーの代表的キナーゼを含む、96 種のヒトプロテインキナーゼ（受容体型及び非受容体型チロシンキナーゼ、その他のプロテインキナーゼ）からなる酵素パネルを用いて、バンデタニブのスクリーニング試験を実施した。キナーゼ活性の測定には放射性基質リン酸化アッセイ（[redacted]）を用いた。組み換え酵素をバンデタニブ、[γ-^{33}P]ATP 及び基質と共にインキュベートし、基質への ^{33}P 取り込み量をシンチレーションカウンターで計測した。

試験結果

バンデタニブは *in vitro* で VEGFR-2、EGFR、RET 及び BRK のチロシンキナーゼ活性を強力に阻害し（IC_{50} 値 0.1 μM 以下）、さらに VEGFR-1、VEGFR-3 等のチロシンキナーゼや、エフリン受容体（EphA1、EphB2）及び SRC 関連キナーゼ（YES、LCK、LYN 及び SRC）の活性も阻害した（IC_{50} 値 0.5 μM 未満）（表 1）。バンデタニブは、AGC、CAMK、CMGC、STE 等のプロテインキナーゼ群と比較して、VEGFR-2、EGFR、RET 及び BRK 等のチロシンキナーゼに対して高い選択性を示した。

表 1　　バンデタニブによるキナーゼ阻害：効力及び選択性

Receptor tyrosine kinases		Non-receptor tyrosine kinases*		AGC and CAMK kinases		CMGC, STE and other kinases	
Kinase	IC_{50} (μM)	Kinase	IC_{50} (μM)	Kinase	IC_{50} (μM)	Kinase	IC_{50} (μM)
VEGFR-2	0.04	BRK	0.04	S6K	29.00	AurA	22.00
EGFR	0.04	YES	0.24	ROCK2	76.00	MST4	55.00
RET	0.10	LCK	0.37			NLK	57.00
EphB2	0.11	LYN	0.40			Wee1	65.00
VEGFR-1	0.15	SRC	0.42			AurC	92.00
EphA1	0.17	IRAK4	0.50				
VEGFR-3	0.26	FGR	1.10				
EphA2	0.31	ABL1	1.30				
EphB4	0.32	CSK	1.60				
EphA4	0.37	ITK	26.00				
ERBB2	0.39	SYK	80.00				
EphB1	0.43						
TIE2	0.52						
FGFR1	0.58						
ERBB4	0.70						
FGFR3	0.75						
PDGFRα	1.10						
KIT	1.40						
MUSK	4.50						
PDGFRβ	5.30						
FGFR4	5.80						
EphB3	13.00						
FLT3	15.00						

Vandetanib was tested at 12 concentrations in the range from $1x10^{-4}$ M to $3x10^{-10}$ M in singlicate (n = 1) in each kinase assay. $IC_{50} \leq 100.0$ μM are shown in the table.
* Includes IRAK4, a member of the TKL (tyrosine kinase-like) group of kinases

結論

バンデタニブはVEGFR-2、EGFR、RET及びBRKの各チロシンキナーゼに対して強い阻害作用を有し（IC_{50}値0.1 μM以下）、VEGFR-1及びVEGFR-3等のチロシンキナーゼに対しても阻害作用がある（IC_{50}値0.5 μM未満）ことが示された。

2.1.1.2　活性型変異を有する RET チロシンキナーゼの阻害作用

[参考 Carlomagno et al 2004]

生殖細胞系列の RET 遺伝子に生じる活性化変異は、MTC を発症する遺伝性の癌症候群に関連し、散発性 MTC でも同様の RET 遺伝子変異がみられる（Castellone and Santoro 2008）。本試験

では、これらの変異型 RET チロシンキナーゼの自己リン酸化に対するバンデタニブの阻害作用を検討した（Carlomagno et al 2004）。

試験方法

pBABE ベクターによりヒト HEK293 細胞に各種変異型 RET チロシンキナーゼ（E768D、L790F、Y791F、S891A、A883F、C634R、M918T、V804L 及び V804M）を一過性に発現させた。得られたタンパク抽出物にバンデタニブ、Src 及び Src 様キナーゼ阻害薬 PP1 又は PP2（それぞれ 0.5、5 μM）又は溶媒を加えて 2 時間インキュベートし、リン酸化 RET 抗体 pY1062 を用いて RET チロシンキナーゼのチロシンリン酸化部位をウェスタンブロッティングで検出した。

試験結果

バンデタニブは 0.5 μM の濃度で E768D、L790F、Y791F、S891A、A883F、C634R 及び M918T の各種変異型 RET チロシンキナーゼのリン酸化を阻害したが、V804L 及び V804M 変異型 RET チロシンキナーゼの自己リン酸化は 5.0 μM の高濃度でも阻害しなかった（図 1）。

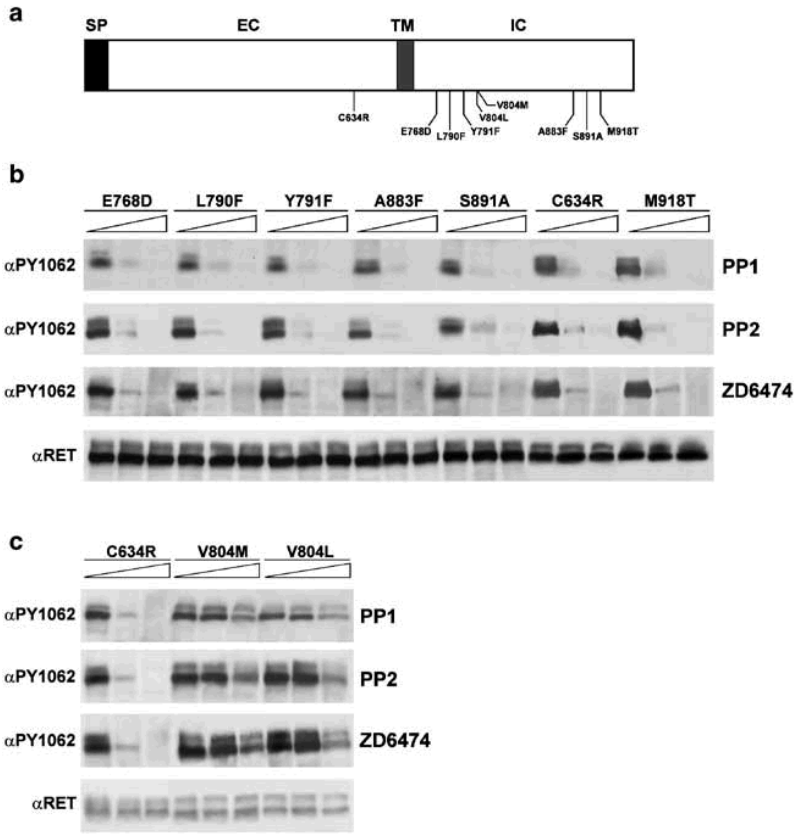


図 1　　バンデタニブ（ZD6474）による変異型 RET チロシンキナーゼのリン酸化阻害（典型的一例）

Increasing concentration of each inhibitor is indicated below the respective mutation (0, 0.5 and 5 μM, left to right). The results are representative of at least three independent assays.

(a) Schematic representation of the RET mutants used in this study. SP: signal peptide; EC: extracellular domain; IC: intracellular domain; TM: transmembrane domain.

(b, c) Western blots of protein extracts representing the RET mutants following tretment with the respective inhibitors as indicated.

2.1.1.3　変異型チロシンキナーゼに対する阻害作用

[ASZ138abc]

本試験では、変異型及び野生型の EGFR 及び RET チロシンキナーゼに対するバンデタニブの阻害作用を検討した。

試験方法

野生型及び変異型のEGFR及びRETチロシンキナーゼに対するバンデタニブの阻害作用を放射性基質リン酸化アッセイ（[redacted]）により測定した。遺伝子組み換え酵素をバンデタニブ、[γ-^{33}P]ATP及びpoly-GT基質と共にインキュベートし、基質への^{33}P取り込み量をシンチレーションカウンターで計測した。

試験結果

バンデタニブは、野生型のEGFRチロシンキナーゼと比較して、L858R変異型をより強く阻害したのに対し、T790M変異型に対する阻害作用は、L858R変異の有無に関わらず、野生型と比較して弱かった（表 2）。

一方、バンデタニブのRETチロシンキナーゼに対する阻害作用は、野生型RETチロシンキナーゼと比較してV804L及びV804M変異型で低下した（表 2）。

表 2　　野生型及び変異型チロシンキナーゼ（EGFR 及び RET）に対するバンデタニブの阻害作用

Kinase	Triplicate Assay IC_{50} (μM)		
	A	B	C
EGFR – wild-type	0.029	0.023	0.021
EGFR L858R	0.007	0.003	0.005
EGFR T790M	0.108	0.195	0.279
EGFR L858R T790M	0.213	0.190	0.241
RET – wild-type	0.050	0.020	0.034
RET V804L	4.060	2.853	4.006
RET V804M	>10	>10	>10

Vandetanib was tested at 9 concetrations in the range from 1 x 10^{-5} M to 1 x 10^{-9} M in duplicate.
A, B, and C represent the respective mean IC_{50}s for the kinases determined in each of three independent assays.

結論及び考察

バンデタニブは、野生型と比較して活性化変異 L858R を有する EGFR チロシンキナーゼに対してより強い阻害作用を示したが、T790M ゲートキーパー変異があると、L858R 変異の有無に関わらず、バンデタニブの阻害作用は野生型と比較して低下した。

一方、RET チロシンキナーゼでも V804L 及び V804M 変異型に対するバンデタニブの阻害作用は野生型と比較して弱く、V804 の変異がバンデタニブ耐性に関わる可能性が示唆された。

2.1.2 血管内皮細胞を用いた *in vitro* 試験

血管新生の過程では血管内皮細胞が増殖・遊走し、管腔を形成した後に血管が形成されるが、これらの過程にはVEGFによるシグナル伝達が必須と考えられている（Otrock et al 2007）。本項の試験では、*in vitro* 試験系が確立している一部の血管新生過程に対するバンデタニブの影響を検討した。

2.1.2.1 HUVECの増殖に対する作用

[CIRA2; Wedge et al 2002]

本試験では、HUVEC の増殖に対するバンデタニブの作用を増殖因子（VEGF、EGF 又はbFGF）の存在下又は非存在下で[^{3}H]チミジン取り込み法により評価した。

試験方法

ヒト臍帯より分離したHUVECにVEGF、EGF又はbFGFを加え、バンデタニブと共に4日間無血清培地でインキュベートした後、[^{3}H]チミジンを加えてさらに 4 時間インキュベートした。2%血清のみを加えて同様の操作を行った群［比較対照（Basal）］も設け、VEGF、EGF 及びbFGF以外の因子による増殖に対するバンデタニブの影響を検討した。得られた細胞の[^{3}H]チミジン取り込み量をβ線カウンターで測定した。

試験結果

バンデタニブは増殖因子刺激下の HUVEC の増殖を強力かつ選択的に抑制した（表 3）。その抑制作用は VEGF > EGF > bFGF 刺激下の順に強く、この細胞培養系を用いた試験でも酵素活性阻害試験と同様の傾向が確認された。

表 3　増殖因子及び血清刺激によるHUVECの増殖に対するバンデタニブの作用

	Growth factor			
	VEGF (3 ng/mL)	EGF (3 ng/mL)	bFGF (0.3 ng/mL)	Basal (2% serum)
Vandetanib IC_{50} * (μM, mean ± SE)	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.80 ± 0.07	> 3

* n = 5-6

結論及び考察

バンデタニブは VEGF 刺激による HUVEC の増殖を強力かつ選択的に抑制した。2%血清存在下では、バンデタニブ濃度が VEGF 刺激下の IC_{50} 値の 50 倍でも HUVEC 増殖に対する有意な抑制作用がみられなかった（IC_{50} 値は VEGF 刺激下の 0.06 μM に対して> 3 μM）。すなわち、HUVEC におけるバンデタニブの細胞増殖抑制作用は VEGF、EGF 又は bFGF の増殖因子刺激がある場合に強く、非特異的な細胞毒性作用ではないことが示唆された。

2.1.2.2　各種血管内皮細胞の増殖、遊走、浸潤及びアポトーシスに及ぼす作用

[参考 Wu et al 2007]

HUVEC、ヒト肺動脈内皮細胞（HPAEC）、マウス肺血管内皮細胞（MLEC）及びヒト肺癌細胞株 H441 は VEGFR-2 及び EGFR を共に発現し、これらの受容体が細胞増殖に寄与すると考えられる。本試験ではこれらの細胞を用いて、血管内皮細胞の遊走、浸潤、増殖及びアポトーシスに対するバンデタニブの作用を検討した。

試験方法

細胞の遊走能及び浸潤能の評価には Transwell cell culture chamber（Costar 社製）を用いた。なお、浸潤能の評価のみ、チャンバー上部のフィルター下部表面にフィブロネクチン、フィルター上部表面にマトリゲルを塗布した。HUVEC、HPAEC、MLEC 及びヒト肺癌細胞株 H441 をチャンバー上部に播種し、バンデタニブ（0～5 μM）と共に 0.1%ウシ血清アルブミンを含む無血清培地でインキュベートした。細胞の遊走（3～4 時間後）及び浸潤（6～8 時間後）はフィルター下部表面（200 倍に拡大した 5 箇所）に遊走及び浸潤した細胞数を計測して評価した。

細胞増殖アッセイは、各細胞を血清添加培地内でバンデタニブ（0～10 μM）を 72 時間処置し、MTT 色素還元法により生細胞数を検出することで実施した。

バンデタニブ（1.25 μM）による各細胞のアポトーシス誘導は、EGF（20 ng/mL）又は VEGF（20 ng/mL）を添加した無血清培地でバンデタニブを 48 時間処置し、TUNEL 陽性又はカスパーゼ-3 陽性細胞を検出して評価した。

試験結果

バンデタニブは、HUVEC、HPAEC、MLEC 及び H441 細胞の遊走及び浸潤を濃度依存的に阻害した（図 2A、B; Wu et al 2007）。また、バンデタニブはこれらの細胞の増殖を抑制し、2.5 μM 以上の濃度で特に顕著な作用が認められた（図 2C）。

さらに、MLEC 及び H441 細胞のアポトーシスがバンデタニブにより誘導されることが示された。MLEC 及び H441 細胞のアポトーシスは EGF 又は VEGF 添加で抑制されたことから、これらの細胞では EGFR 及び VEGFR の各チロシンキナーゼを介して生存シグナルが伝達されることが示唆された（図 2D）。

また、バンデタニブ（1.25 μM）により、増殖因子刺激による VEGFR-2 及び EGFR チロシンキナーゼの自己リン酸化とその下流の細胞内シグナル伝達（AKT 及び MAPK リン酸化）が阻害された。

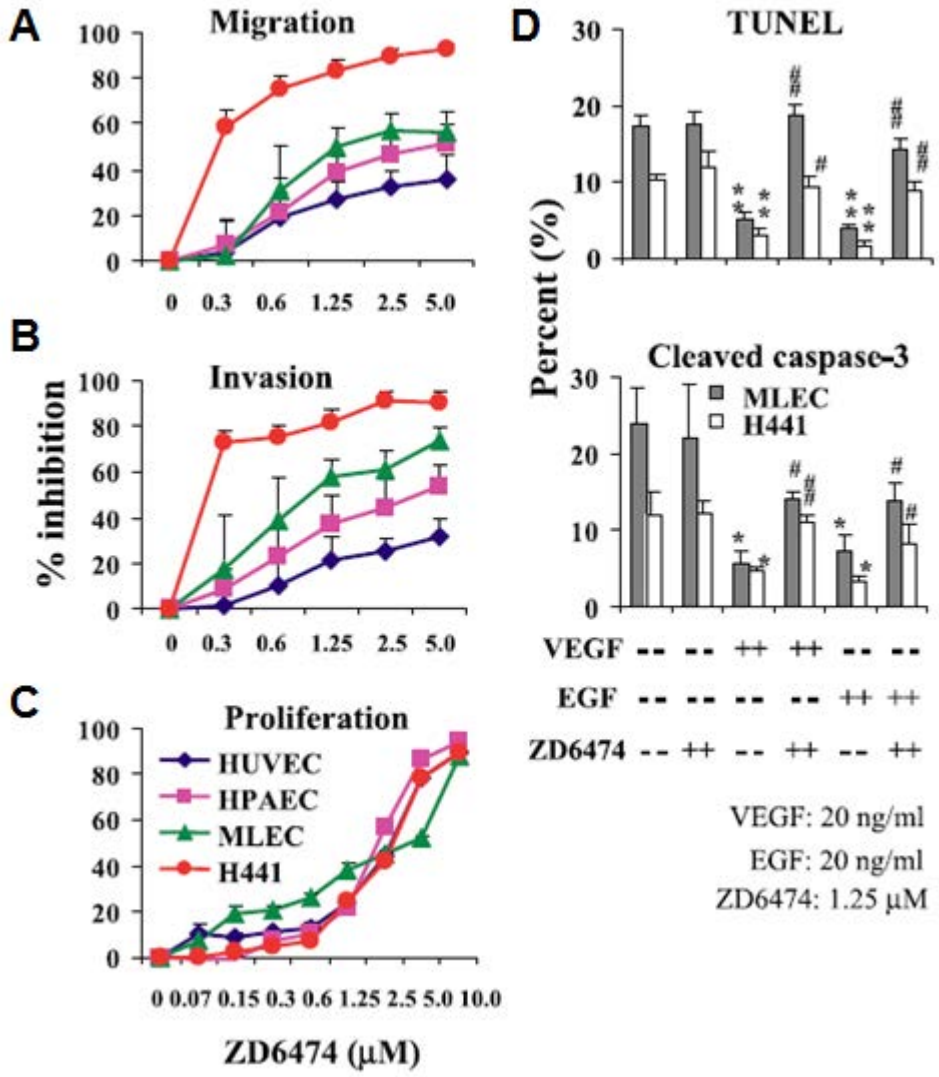


図 2　　H441 ヒト肺癌細胞及び血管内皮細胞の遊走又は浸潤に対するバンデタニブ（ZD6474）の作用

Columns, mean percentage of total MLEC or H441 cells that are TUNEL or caspase-3 positive; bars, SD. One representative experiment of the three completed. * or #, $P < 0.05$; ** or ##, $P < 0.001$, versus control or VEGF/EGF alone, respectively. The data were analyzed by the Student's *t* test (two tailed).

結論

バンデタニブは、血管内皮細胞及び腫瘍細胞の遊走及び浸潤を阻害した。さらに、バンデタニブは EGF 又は VEGF 刺激による血管内皮細胞及び腫瘍細胞の増殖と抗アポトーシスを抑制した。

2.1.2.3　血管内皮細胞の管腔形成に対する作用

[CIRA4; Brave et al 2007a]

血管内皮細胞による *in vitro* 管腔形成は *in vivo* における血管新生に類似しており、ヒト血管内皮細胞とヒト線維芽細胞の共培養により作製できる。血管内皮細胞は増殖及び遊走することで管腔を形成し、管腔がネットワークを構築して毛細管網状組織を形成する。本試験では、バンデタニブが管腔の形成とその形態に及ぼす影響を検討した。

試験方法

HUVEC 管腔形成アッセイ（TCS Cellworks 社製）により、バンデタニブの管腔形成及び形態に対する作用を検討した。HUVEC とヒト線維芽細胞を、2%ウシ胎児血清（FCS）を添加した MCDB131 培地にバンデタニブ（10～750 nM）を加えて 11 日間培養後に固定し、管腔形成を Zeiss KS400 3.0 画像アナライザー（Imaging Associates 社製）で観察した。形成された管腔を定量評価するため CD31 染色を実施した。形態学的指標として、分岐点の数、管腔の全長及び総面積を測定した。

試験結果

バンデタニブはこれらのパラメータの増加を著しく阻害した（表 4）。

表 4　　管腔総面積、全長及び分岐点の数に対するバンデタニブの IC_{50} 値

Vessel Parameter	Vandetanib IC_{50} (nM, mean ± SEM, n = 3)
Tubule area (%)	93 ± 20
Total vessel length (mm)	61 ± 19
Number of branch points	33 ± 14

結論

バンデタニブは共培養した血管内皮細胞と線維芽細胞において、管腔の総面積、全長及び分岐点の数を減少させ、*in vitro* における血管新生阻害作用を有していることが示された。

2.1.2.4　HUVEC における VEGFR-2 チロシンキナーゼ及び EGFR チロシンキナーゼの自己リン酸化に対するバンデタニブの阻害作用

[Brave et al 2007a; Brave et al 2011]

VEGFR-2 及び EGFR の各チロシンキナーゼの自己リン酸化に対するバンデタニブの阻害作用を HUVEC を用いて検討し、ゲフィチニブの作用と比較した。

試験方法

HUVEC を 2%血清培地で一晩培養した後、無血清培地で 2.5 時間インキュベートした。バンデタニブ（0、0.014、0.12、0.4、1、3、10 μM）又はゲフィチニブ（0、1 μM）を加えて 90 分間前処置し、次いで VEGF（50 ng/mL）又は EGF（1 μg/mL）を 5 分間作用させた。細胞溶解物を

SDS-PAGE で分離し、VEGFR-2、リン酸化 VEGFR-2、EGFR 及びリン酸化 EGFR に対する抗体を用いたウエスタンブロッティング法による解析に供した。なお、各バンドの強度は ChemiGenius 画像システムを用いて定量した。

試験結果

バンデタニブは濃度依存的に HUVEC の VEGFR-2 及び EGFR の各チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害し、その IC_{50} 値（平均値 ± 標準誤差、n = 4）はそれぞれ 0.4 ± 0.13 μM 及び 1.1 ± 0.47 μM であった（図 3）。これに対し、ゲフィチニブ（1 μM）は VEGF 刺激による VEGFR-2 チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害しなかったが、EGF 刺激による EGFR チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害した（図 3）。

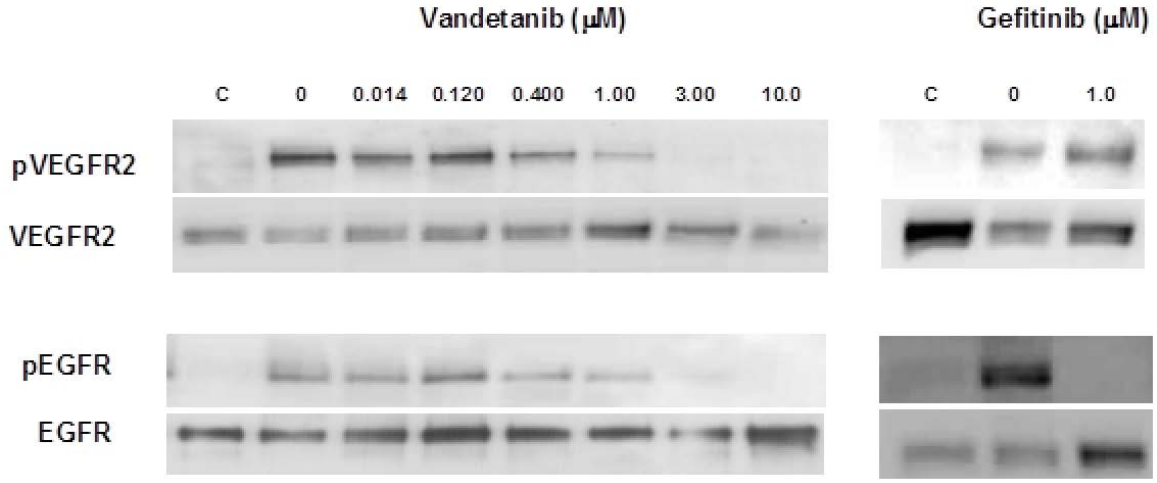


図 3　HUVEC における VEGF 及び EGF 刺激による受容体チロシンキナーゼ自己リン酸化に対するバンデタニブ及びゲフィチニブの阻害作用（典型的一例）

C : VEGF 又は EGF 刺激なし

結論

バンデタニブは HUVEC において VEGFR-2 及び EGFR の各チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害した。これに対して、ゲフィチニブは EGFR チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害したものの、VEGFR-2 チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害しなかった。

2.1.3　ヒト腫瘍細胞株を用いた *in vitro* 試験

2.1.3.1　非小細胞肺癌（NSCLC）、大腸癌（CRC）、頭頸部扁平上皮癌（SCCHN）及び食道癌株に対する作用

[Brave et al 2007a; Brave et al 2011]

試験方法

NSCLC（22 株）、CRC（14 株）、SCCHN（18 株）及び食道癌（KYSE-450 と OE21 の 2 株）由来の細胞株を 10% FCS を添加した培地に播種した。播種 4 時間後にバンデタニブ又はゲフィ

チニブ（被験濃度はいずれも 0.29～30 μM）を添加し、さらに 72～96 時間培養した後、生細胞数を計測して IC_{50} 値を算出した。

試験結果

算出した IC_{50} 値に基づき、腫瘍細胞株をバンデタニブ高感受性株（IC_{50} 値 ≤ 0.100 μM）、感受性株（IC_{50} 値 > 0.100 ～ ≤ 1.0 μM）、抵抗性株（IC_{50} 値 > 1.0 ～ ≤ 10.0 μM）、高抵抗性株（IC_{50} 値 > 10 μM）に分類した（図 4）。

EGFR 遺伝子の活性化変異が認められたのは、高感受性株では 8 種中 3 種（38%：KYSE-450、SW48 及び PC-9）であったのに対し、感受性/抵抗性/高抵抗性株では 48 種中 1 種（2%：H1975）のみであった。この H1975 細胞株は EGFR 遺伝子に活性化変異 L858R に加えて T790M 変異（EGFR チロシンキナーゼ阻害薬耐性に関与）を有する。

また、NSCLC、CRC、SCCHN 及び食道癌株で、バンデタニブとゲフィチニブに対する感受性に強い相関がみられた（R^2 値はそれぞれ 0.93、0.88 及び 0.80）。

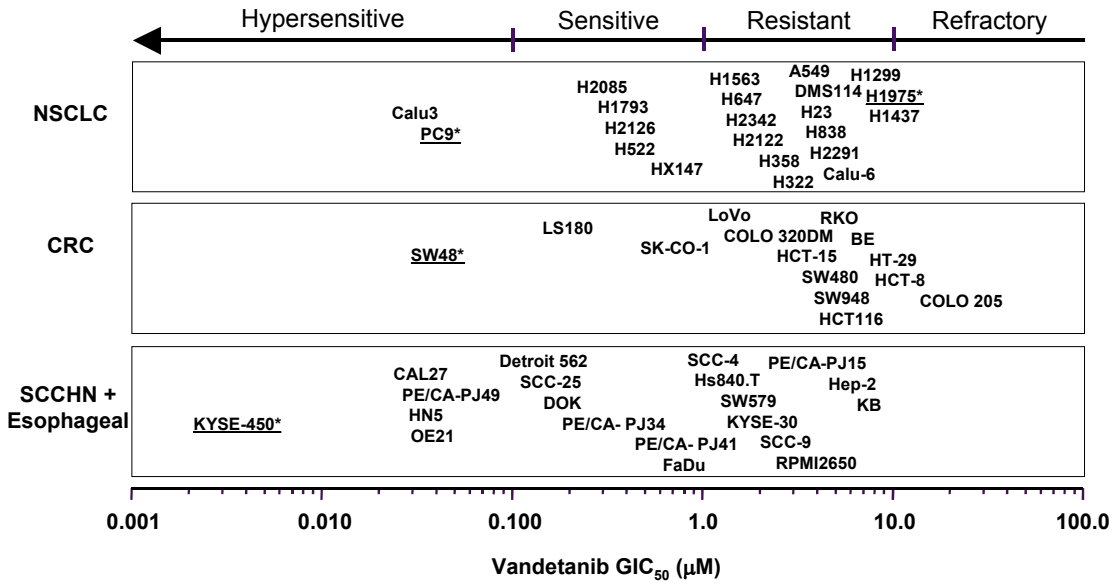


図 4　　ヒト腫瘍細胞株のバンデタニブに対する感受性（Hypersensitive：高感受性株、Sensitive：感受性株、Resistant：抵抗性株、Refractory：高抵抗性株）

Each experiment was performed at least three times with a minimum of two replicates per dose concentration. Data is also expressed as Geometric Mean of IC_{50}.
* Cell lines with EGFR mutations: H1975 (EGFR L858R plus T790M point mutations), PC-9 (deletion E746–A750 exon 19 EGFR mutation), SW48 (EGFR G719S point mutation), KYSE-450 (EGFR S768I point mutation)

結論及び考察

バンデタニブはいくつかの NSCLC、CRC、SCCHN 及び食道癌由来細胞株に対して増殖抑制作用を示し、これらの細胞株ではバンデタニブとゲフィチニブに対する感受性に強い相関がみられたことから、その作用機序として EGFR チロシンキナーゼ阻害が示唆された。

2.1.3.2　ヒト甲状腺腫瘍細胞株の RET チロシンキナーゼに対する阻害作用

[参考 Carlomagno et al 2002]

RET チロシンキナーゼの変異状態が異なる数種の甲状腺腫瘍細胞株を用いて、バンデタニブの増殖に対する作用を検討した。

試験方法

培養 PTC 細胞株 TPC-1 及び FB2（いずれも RET-PTC1 活性化 RET チロシンキナーゼを発現）、並びにヒト甲状腺未分化癌細胞株 ARO（野生型 RET チロシンキナーゼを発現）をバンデタニブ 0.5 又は 5.0 μM で 8 日間処置し、細胞数を 1 日 1 回計測した。

また、細胞周期の解析は次の手順で実施した。24 時間の血清飢餓培養の後、バンデタニブ無添加又は 5.0 μM を加えて 24 時間インキュベートした。バンデタニブ処置の前後に細胞を回収した。その後、ヨウ化プロピジウムを加えてインキュベートし、フローサイトメトリーで、細胞周期 sub-G1 期（アポトーシス）、G0-G1 期、S 期及び G2-M 期にある細胞の比率を計測した。

試験結果

バンデタニブは TPC-1 及び FB2 の細胞増殖を抑制したが、ARO に対しては増殖抑制作用を示さなかった（図 5）。

また、TPC-1 及び FB2 細胞をバンデタニブで 24 時間処置したときの細胞周期の比率は、G0-G1 期が増加したのに対して S 期及び G2-M 期は減少し、細胞周期の停止が認められた。さらに、アポトーシス誘発を示す sub-G1 期の比率が顕著に増加し、これらの細胞株におけるバンデタニブのアポトーシス誘導作用が示唆された。

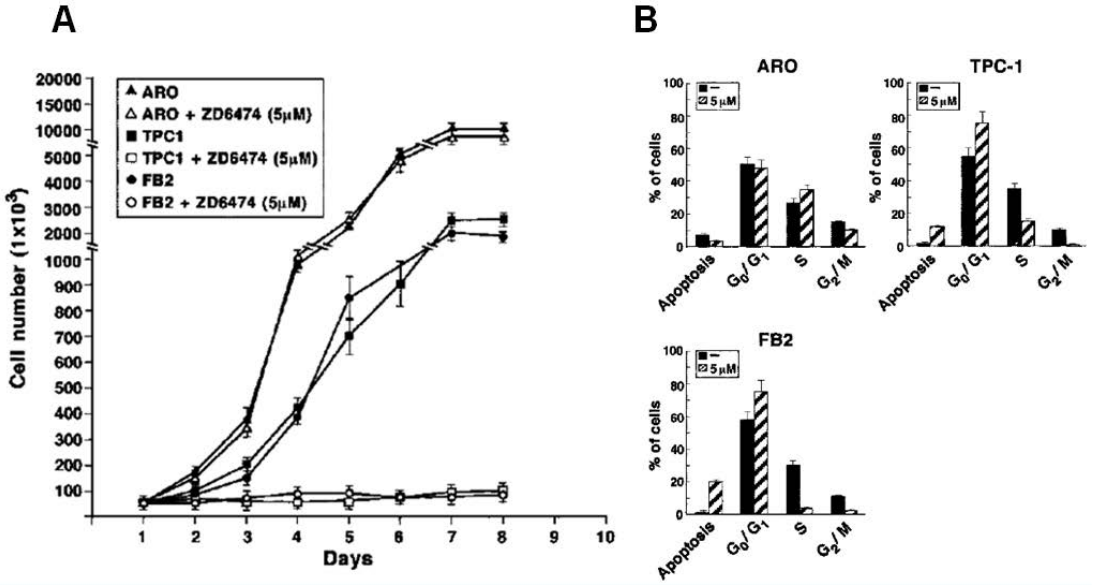


図 5　　甲状腺腫瘍細胞株（TPC-1、FB2 及び ARO）に対するバンデタニブ（ZD6474）の増殖抑制作用（A）及び細胞周期への影響（B）

Bars; mean ± SD of 6 values.

結論及び考察

バンデタニブは活性化 RET チロシンキナーゼを発現する PTC 腫瘍細胞株の増殖を抑制した。また、バンデタニブ処置により sub-G1 期（アポトーシス）の比率が増加したことから、バンデタニブのアポトーシス誘導作用が示唆された。

2.1.3.3　MTC 腫瘍細胞株の増殖に対する作用

[参考 Vitagliano et al 2011]

MTC 腫瘍株 TT 細胞（散発性 MTC 患者由来）及び MZ-CRC-1 細胞（転移 MTC 患者の悪性胸水より分離）は、それぞれ RET 遺伝子に活性化変異 C634W 及び M918T を有する MTC 患者由来の細胞株である。本試験では、これら MTC 腫瘍細胞株の増殖に対するバンデタニブの影響を検討した。

試験方法

TT 及び MZ-CRC-1 細胞にバンデタニブ（0、0.05、0.25 又は 1 μM）を加えて 5 又は 6 日間培養した。このバンデタニブ処置の期間に細胞数を 1 日 1 回計測し、細胞増殖に対するバンデタニブの作用を検討した。

また、DNA 合成に対する影響を BrdU（Bromodeoxyuridine）取り込み法により評価した。TT 及び MZ-CRC-1 細胞にバンデタニブ（0、0.05、0.25、1 μM）を加えて 24 時間、さらに BrdU を加えて 1 時間インキュベートして細胞を固定した。抗 BrdU 蛍光抗体を用いて細胞への BrdU 取り込み量を検出した。

さらに、バンデタニブ（0.01～1 μM）で 2 時間処置した TT 及び MZ-CRC-1 細胞の溶解物について、ウエスタンブロッティングで RET チロシンキナーゼ活性を測定した。すなわち、RET チロシンキナーゼの自己リン酸化を RET リン酸化 Y905 抗体（RET チロシンキナーゼの activation loop に位置する）、RET リン酸化 Y1062 抗体（同じく C 末端ドメインに位置する）を用いて免疫抗体法により検出した。また、TT 及び MZ-CRC-1 細胞株はいずれも EGFR 及び VEGFR-2 チロシンキナーゼを発現するため、これらのチロシンキナーゼ抗体を用いてウエスタンブロッティングによりバンデタニブの作用を検討した。

試験結果

バンデタニブは TT 及び MZ-CRC-1 細胞の増殖を 50 nM 以上の濃度で抑制した（図 6）。バンデタニブ 250 nM 処置群の細胞数は、対照群に比べて、培養開始から 5 日目の TT 細胞では 38.5%減少し（$p < 0.0015$、対応のない Student の t 検定）、培養開始から 6 日目の MZ-CRC-1 細胞では 37.8%減少した（$p < 0.001$、対応のない Student の t 検定）。

さらに、バンデタニブは 50 nM 以上の濃度で、両細胞株において DNA への BrdU 取り込みを阻害し、1 μM ではほぼ完全に DNA 合成を阻害した（データ示さず）。

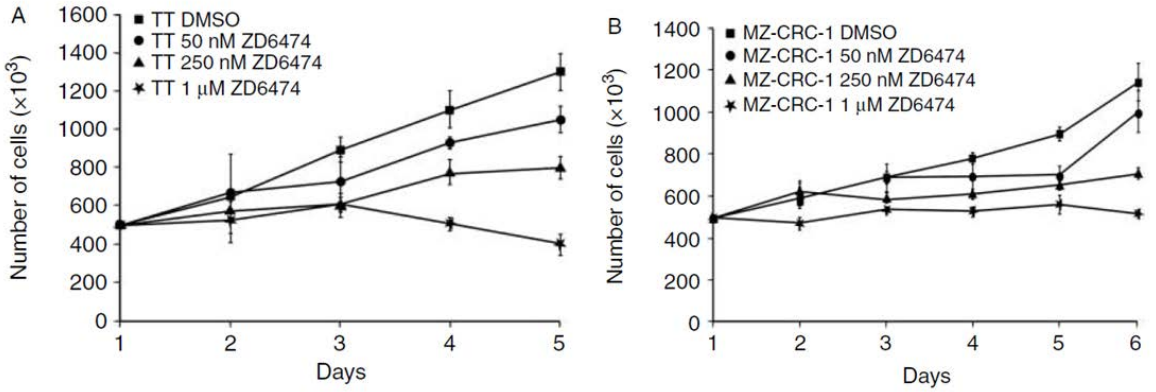


図 6　　MTC 細胞の増殖に対するバンデタニブ（ZD6474）の作用 (A：TT 細胞、B：MZ-CRC-1 細胞)

Each point represents the mean value of three culture dishes and error bars represent 95% confidence intervals.

また、バンデタニブは TT 及び MZ-CRC-1 細胞において、RET、EGFR 及び VEGFR-2 の各チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害したことから、MTC 細胞に対するバンデタニブの増殖抑制作用には RET チロシンキナーゼだけでなく、EGFR 及び VEGFR-2 の各チロシンキナーゼに対する阻害作用も寄与することが示唆された（図 7）。

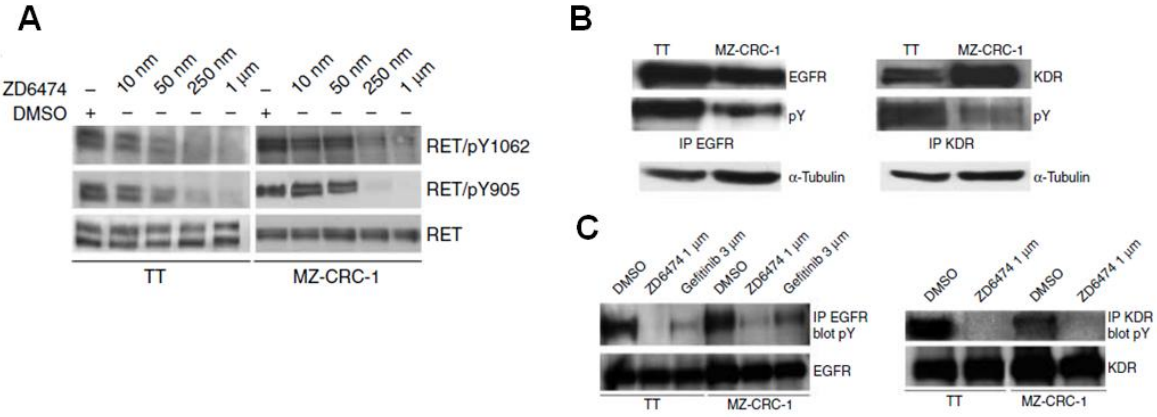


図 7　　TT 細胞及び MZ-CRC-1 細胞の RET、EGFR 及び VEGFR-2 チロシンキナーゼに対するバンデタニブ（ZD6474）の作用

A. TT or MZ-CRC-1 cells were incubated for 2hr with vandetanib 0.01-1 μM and cell lysates were immunoblotted with antibodies to phsophorylated RET (RET pY905 and RET pY1062), anti-RET was used for normalization.
B. TT and MZ-CRC-1 cell lysates were immunoprecipitated with anti-EGFR or anti-KDR (VEGFR-2) and immunoblotted with either anti-EGFR, anti-KDR or anti-phopshotyrosine.
C. TT and MZ-CRC-1 cells were incubated with vehicle (DMSO), vandetanib (ZD6474, 1 μM) or gefitinib (3 μM) for 24hr. Cell lysates were then immunoprecipitated and immunoblotted with anti-EGFR, anti-KDR or anti-phosphotyrosine.

結論及び考察

バンデタニブは MTC で高頻度に検出される RET チロシンキナーゼ活性変異体を発現する MTC 細胞株 TT 及び MZ-CRC-1 細胞の増殖を抑制した。さらに、これらの細胞株は RET チロシ

ンキナーゼに加えて EGFR 及び VEGFR-2 を発現しており、バンデタニブによりこれら 3 種のチロシンキナーゼのリン酸化が阻害されることが示された。上記結果は、MTC 腫瘍細胞において EGFR、VEGFR-2 及び RET チロシンキナーゼを標的とすることの妥当性を示している。

2.2　*In vivo* 試験

本項の *in vivo* 試験では、別途記載がない限り、溶媒として 1% ポリソルベート 20 水溶液を用いた。

2.2.1　ヒト腫瘍異種移植モデルにおけるバンデタニブの薬力学的作用

2.2.1.1　ヒト大腸癌株 LoVo 移植マウスの腫瘍組織における VEGFR-2 及び EGFR チロシンキナーゼのリン酸化阻害作用

[Brave et al 2011]

マウス肺組織の血管内皮細胞はVEGFR-2を高発現しており、そのリン酸化レベルも高いことから、VEGFR-2標的薬の効果を検討するのに適している（Brave et al 2011）。本試験では、ヒト腫瘍移植マウスにバンデタニブを反復経口投与し、肺組織内のVEGFR-2及びEGFRチロシンキナーゼのリン酸化レベルと血漿中薬物濃度の変化を調べた。

試験方法

ヒト大腸癌細胞株LoVoを皮下に移植した雌ヌードマウス（8～12週齢）に、溶媒（1% ポリソルベート80水溶液）又はバンデタニブ（25又は100 mg/kg/日）を1日1回、4日間反復経口投与した（12匹／群）。最終投与の約2時間後にVEGF-A 20 μg（30 μL）を静注し、その5分後に肺組織及び腫瘍組織を摘出し、血漿中薬物濃度の測定用に血液も採取した。肺及び腫瘍組織をホモジナイズし、ウエスタンブロッティングを行い、リン酸化VEGFR-2（pVEGFR-2）、総VEGFR-2、pEGFR及び総EGFRを定量した。バンデタニブの血漿中濃度はLC/MS/MS法で測定した。

試験結果

バンデタニブ25 mg/kg/日以上の反復経口投与により、マウス肺組織内のpVEGFR-2及びpEGFRレベル及び腫瘍組織内のpEGFRレベルが統計学的有意に低下した（$p < 0.01$、分散分析）（図8）。このときのバンデタニブの平均血漿中濃度は1497 ng/mLであった。バンデタニブを100 mg/kg/日に増量すると平均血漿中濃度は3653 ng/mLに達したが、肺又は腫瘍組織内のpVEGFR-2及びpEGFRレベルは25 mg/kg/日投与時と比べて有意な変化は認められなかった。

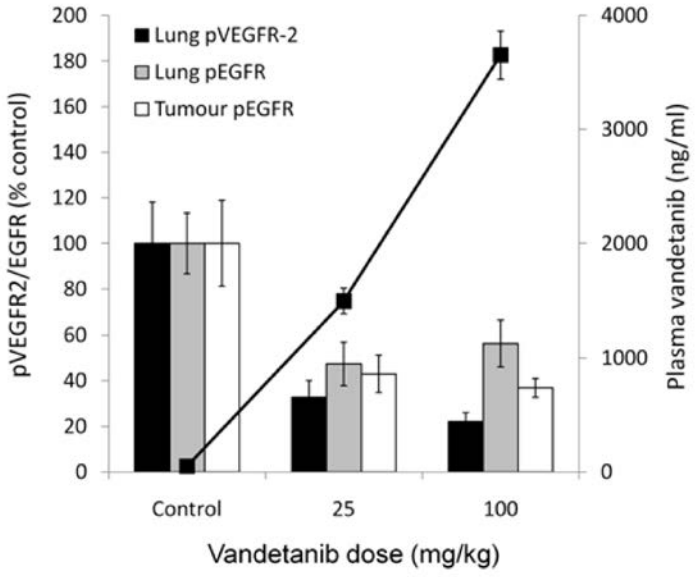


図 8　　ヒト大腸癌 LoVo 細胞異種移植マウスにおけるバンデタニブによる肺組織及び腫瘍組織内 EGFR、VEGFR-2 チロシンキナーゼのリン酸化阻害作用

Lung pVEGFR-2 (black columns), lung pEGFR (grey columns) and LoVo tumour pEGFR (white columns) are shown for control and vandetanib treated groups (left axis, mean ± SEM, n = 12). Mean plasma concentrations ± SEM (right axis) for vandetanib (black squares) is also shown.

結論

LoVo移植マウスへの4日間のバンデタニブ反復経口投与により、肺組織内のpVEGFR-2及びpEGFRレベル、並びに、腫瘍組織内のpEGFRレベルが低下した。バンデタニブ100 mg/kg/日投与により平均血漿中薬物濃度は上昇したが、肺又は腫瘍組織内のpVEGFR-2及びpEGFRレベルは25 mg/kg/日投与時と比べて有意な低下が認められなかったことから、本試験系では、バンデタニブのVEGFR-2及びEGFRチロシンキナーゼに対するリン酸化阻害作用が最大となるのは25 mg/kg/日付近と考えられた。

2.2.1.2　ヒト NSCLC 株 PC-9 移植 SCID マウスにおけるアポトーシス誘導

[Brave et al 2011]

ヒト NSCLC 株 PC-9 は変異型 EGFR（エクソン 19 のフレーム内欠失変異）を有し、バンデタニブ及びゲフィチニブに対して *in vitro* で高い感受性を示した（2.1.3.1 項参照）。

本試験では、PC-9 移植 SCID マウスに対するバンデタニブ、ゲフィチニブ、及び選択的 VEGFR-2 チロシンキナーゼ阻害薬 vatalanib の作用を検討した。

試験方法

雌 SCID マウス（8～12 週齢）の側腹に PC-9 腫瘍株を皮下移植し、腫瘍組織の大きさが 0.3～0.4 cm^3 になった時点で 1 群 10 匹のグループに分け、溶媒（1% ポリソルベート 80 水溶液）、バ

ンデタニブ（12.5 又は 50 mg/kg）、ゲフィチニブ（12.5 mg/kg）、又は vatalanib（100 mg/kg）を 1 日 1 回 21 日間反復経口投与した。投与期間中及び最終投与後 16 日目まで、腫瘍径を測定し腫瘍体積を算出した。

また、各薬物を 4 日間投与後に摘出した腫瘍組織を液体窒素で凍結し、氷冷した溶解液中でホモジナイズした。EGFR 及び pEGFR、M30（サイトケラチン 18 がカスパーゼにより切断された断片）を ELISA（Enzyme-linked Immunosorbent Assay；酵素結合免疫測定法）キットにより定量した（Brave et al 2011）。統計解析では分散分析及び両側 *t* 検定を実施した。

試験結果

ゲフィチニブ 12.5 mg/kg/日の投与により腫瘍は急速に退縮したが、35 日目に投与を中止すると再増殖が確認された。一方、バンデタニブを 12.5 mg/kg/日の用量で投与すると、同用量のゲフィチニブと同程度の抗腫瘍効果が得られ、同 50 mg/kg/日の用量では腫瘍の退縮はより速やかに生じ、35 日目に投与を中止しても、少なくとも 51 日目まで再増殖はみられなかった。vatalanib は 100 mg/kg/日の用量で腫瘍の増殖遅延作用を示したが、退縮には至らなかった（図 9A）。

また、バンデタニブの 4 日間投与により pEGFR レベルは統計学的有意に低下し（$p < 0.001$）、アポトーシスのマーカーである M30 は対照群と比較して 3 倍増加した（$p < 0.001$）。vatalanib の 4 日間投与では特に影響はみられなかった（図 9B 及び 9C）。

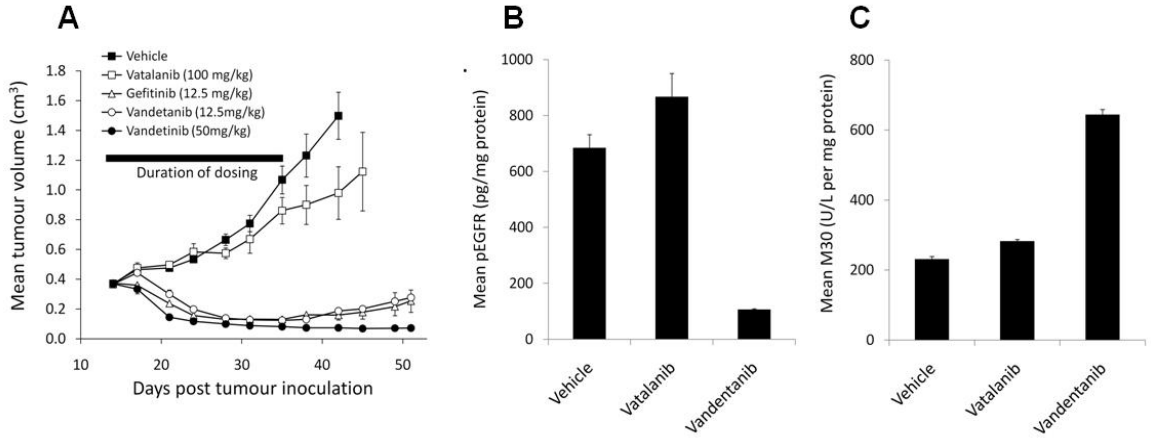


図 9　　ヒト NSCLC 株 PC-9 移植 SCID マウスにおける、バンデタニブ、ゲフィチニブ及び vatalanib の腫瘍増殖（A）及び EGFR 自己リン酸化（B）に対する作用並びにアポトーシス誘導作用（C）

A: PC-9 tumour xenografts were established on SCID mice. Tumour volumes were calculated and the data was plotted as geometric mean ± SEM for each group.
B, C: To assess the effects on EGFR phosphorylation (B) and M30 (C) in response to acute treatment, separate studies were performed where mice were sacrificed following 4 doses with vandetanib (50 mg/kg/day, n = 3), or vatalanib (100 mg/kg, n = 3), or drug vehicle alone (n=4). Values are mean ± SEM.

結論及び考察

PC-9 腫瘍細胞異種移植マウスへのバンデタニブ反復経口投与により腫瘍退縮が認められ、高用量ではさらに早い退縮及び投与期間終了後の増殖抑制効果持続が認められた。バンデタニブを 4 日間投与した後の腫瘍組織の解析から、EGFR チロシンキナーゼ阻害に加えてアポトーシス誘発が腫瘍細胞の退縮に寄与することが示唆された。

2.2.1.3　ヒト肺癌細胞株 A549 異種移植マウスにおける皮膚血管新生の阻害

[Wedge et al 2002]

In vivo 腫瘍細胞皮内移植モデルにおいて、腫瘍の血管新生誘導に対するバンデタニブの阻害作用を検討した。

試験方法

雄ヌードマウスの腹部皮内に A549 ヒト肺癌細胞懸濁液又はリン酸緩衝生理食塩液（PBS、対照）を注入し、溶媒又はバンデタニブ（50 又は 100 mg/kg/日）を 5 日間反復経口投与した（4 匹／群）。薬物投与期間終了後に癌細胞懸濁液又は PBS を注入した箇所を光学顕微鏡（倍率 10 倍）で観察し、1 cm^2 あたりの血管数を調べた。

試験結果

ヌードマウスへの A549 の皮内移植により血管新生がみられ、移植から 5 日後の血管数平均値 ± 標準誤差は、PBS 移植群の 27 ± 1.2 血管/cm^2 に対し、腫瘍細胞移植群では 152 ± 6.5 血管/cm^2 であった。腫瘍細胞移植群にバンデタニブを 50 又は 100 mg/kg/日の用量で 5 日間経口投与すると、腫瘍細胞により誘導される血管新生が有意に阻害された（それぞれ 63%及び 79%、$p < 0.001$、片側 *t* 検定）（図 10）。

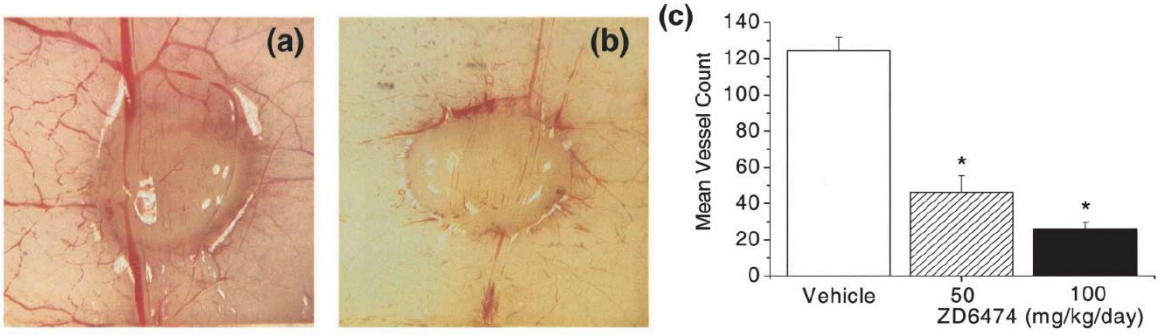


図 10　　腫瘍により誘導される血管新生に対するバンデタニブ（ZD6474）の作用

The effect of administering (*a*) vehicle or (*b*) 100 mg/kg/day vandetanib for the duration of assay is shown in representative images (x 1 objective magnification). (*c*) vessel count data (2/mouse). Bars; Mean±SE, n = 4, *; $p < 0.001$ by one-tailed *t* test.

結論及び考察

バンデタニブにより皮内腫瘍における血管新生が阻害された。A549 移植モデルでは比較的高濃度の VEGF が分泌される（White et al 2001）ことから、本試験で観察された血管新生は主として VEGF によるものと推察された。その一方で、バンデタニブの EGFR チロシンキナーゼ阻害作用が、EGF 刺激で誘発される血管新生を抑制することや、腫瘍細胞からの VEGF 分泌抑制により血管新生を間接的に抑制することが、本モデルでの血管新生阻害に寄与している可能性も考えられる。

2.2.1.4　Calu-6 腫瘍組織の微小血管新生及び腫瘍細胞死に対するバンデタニブの影響

[Wedge et al 2002]

本試験では、ヒト腫瘍を移植したマウスにバンデタニブを 24 日間反復経口投与後の腫瘍について、組織学的分析を行った。

試験方法

2.2.2.1 項で述べる Calu-6 細胞株異種移植モデル（溶媒又はバンデタニブを 25、50 又は 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 24 日間反復経口投与）を用いて、Calu-6 腫瘍細胞の組織学的分析を行った。腫瘍組織をラット CD31 モノクローナル一次抗体と共にインキュベートし、DAB 法で染色した。Zeiss KS400 イメージアナライザーで CD31 陽性細胞を解析した。腫瘍細胞の壊死は FFPE 組織の H&E 染色により検出した。

試験結果

バンデタニブを 50 mg/kg/日以上の用量で 1 日 1 回 24 日間反復経口投与したマウスの腫瘍組織では、CD31 陽性血管内皮細胞の割合が統計学的有意に低下し、腫瘍細胞壊死が増加していた（図 11）。

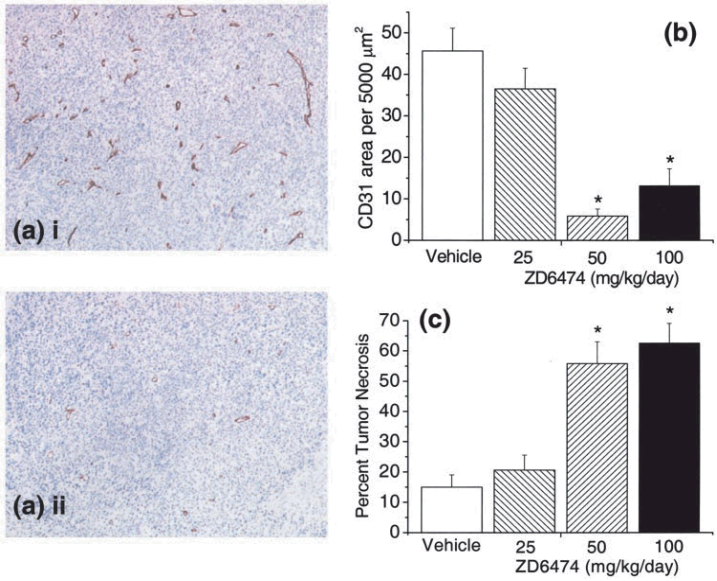


図 11　　バンデタニブ（ZD6474）を長期投与した Calu-6 異種移植モデルの腫瘍組織の解析

(a) Histological sections of (i) control (vehicle-treated) and (ii) vandetanib (ZD6474) (50 mg/kg/day)-treated Calu-6 tumors stained for CD31 (n = 5). Mean CD31-positive area/5000 μm^2 viable tumor (b) and percentage of total tumor necrosis (c), as determined by morphometric image analysis after 24 days of treatment with vehicle or vandetanib (25–100 mg/kg/day, once daily, *p.o.*). *: $P \leq 0.001$ by one-tailed *t* test.

結論及び考察

Calu-6 腫瘍移植モデルへのバンデタニブ投与により、血管内皮細胞の CD31 陽性細胞数が減少し（腫瘍血管の減少を示唆）、腫瘍壊死の増加が認められた。以上のことから、腫瘍血管の減少により腫瘍壊死が誘発されたと考えられた。

2.2.2　*In vivo* におけるバンデタニブの抗腫瘍効果

2.2.2.1　各種ヒト腫瘍及び同系腫瘍移植マウスにおける抗腫瘍効果

[Wedge et al 2002]

本項では、7 種類のヒト組織由来腫瘍細胞、及び、2 種類のマウス由来腫瘍細胞をマウスに移植し、バンデタニブの反復経口投与による抗腫瘍効果を検討した。

試験方法

7 種類のヒト組織由来腫瘍細胞（前立腺癌、卵巣癌、乳癌、外陰部癌、2 株の肺癌、大腸癌）を Swiss 系雌無胸腺マウスの後側腹部に移植し、バンデタニブの抗腫瘍効果を検討した。腫瘍体積が 0.15 ～ 0.47 cm^3 に到達した時点で 1 群 10 匹に分け、バンデタニブ（12.5～100 mg/kg/日）又は溶媒を 1 日 1 回、表 5 に記載した投与期間で、反復経口投与した。

また、2 種類のマウス由来腫瘍細胞（B16F10 黒色メラノーマ由来の B16F10AP3 腫瘍、及び Lewis 肺癌）を免疫正常 C57/BL6 雌マウスの後側腹部に移植し、バンデタニブの抗腫瘍効果を評価した。移植当日からバンデタニブ（25～100 mg/kg/日）又は溶媒を 1 日 1 回、表 5 に記載した投与期間で、反復経口投与した（10 匹／群）。

すべてのモデルの腫瘍組織の体積を週 2 回測定し、溶媒対照群とバンデタニブ投与群の平均腫瘍体積の差を求め、投与開始日からの腫瘍増殖抑制率を算出した。統計解析では、データを対数変換し、片側 *t*-検定を実施した。

試験結果

ヒト腫瘍移植モデルにおいて、バンデタニブは 100 mg/kg/日の用量で検討した 7 株全てで統計学的有意な抗腫瘍効果を示し（$p < 0.001$）、そのうち 3 株では退縮作用がみられた（表 5）。50 mg/kg/日の用量でも、7 株全てで統計学的有意な増殖抑制がみられ（$p < 0.001$）、そのうち 2 株で退縮がみられた。25 mg/kg/日では、7 株全ての腫瘍の増殖が統計学的有意に抑制されたが（SKOV-3 の $p < 0.05$ を除き、$p < 0.001$）、退縮はみられなかった。12.5 mg/kg/日投与群では、7 株中 5 株の腫瘍で統計学的有意な増殖抑制作用がみられた（$p < 0.01$ 又は $p < 0.001$）。

また、同系移植モデル 2 種でも用量依存的な増殖抑制作用が認められ、25 mg/kg/日投与群でも統計学的有意な抗腫瘍効果が得られた（$p < 0.01$ 又は $p < 0.001$）（表 5）。

表 5　　ヒト又は同系腫瘍を移植したマウスにおける抗腫瘍効果

Tumour	Tumour origin	Vandetanib dose (mg/kg/day)	No. of doses (treatment period/days)	Tumour growth inhibition (%)*	*P* value**
Calu-6	Human lung	100	28	92	<0.001
		50		78	<0.001
		25		56	<0.001
		12.5		57	<0.001
PC-3	Human prostate	100	35	>100	<0.001
		50		95	<0.001
		25		68	<0.001
		12.5		29	NS (p=0.06)
MDA-MB-231	Human breast	100	25	99	<0.001
		50		83	<0.001
		25		63	<0.001
		12.5		73	<0.001
SKOV-3	Human ovary	100	28	100	<0.001
		50		98	<0.001
		25		50	<0.05
		12.5		31	NS (*p*=0.3)
SW620	Human colorectal	100	22	91	<0.001
		50		77	<0.001
		25		46	<0.001
		12.5		26	<0.01
A549	Human lung	100	25	>100	<0.001
		50		>100	<0.001
		25		89	<0.001
		12.5		64	<0.001
A431	Human vulva	100	21	>100	<0.001
		50		>100	<0.001
		25		80	<0.001
		12.5		48	<0.01
B16-F10(AP3)	Murine melanoma	100	17	92	<0.001
		50		77	<0.001
		25		56	<0.01
Lewis lung	Murine lung	100	14	79	<0.001
		50		70	<0.001
		25		61	<0.001

Once daily dosing *p.o.* * >100% indicates tumour regressions.　** one-tailed *t*-test.　NS: not significant.

考察

本試験においてバンデタニブは様々な組織由来の腫瘍に対して抗腫瘍効果を示した。これは一般的に VEGFR チロシンキナーゼを介したシグナル伝達を阻害すると血管新生が阻害され、間接的な腫瘍増殖抑制効果によって幅広い抗腫瘍スペクトルが得られることと整合している。バンデタニブの EGFR チロシンキナーゼ阻害作用が本試験の抗腫瘍効果にある程度寄与した可能性があるが、ゲフィチニブ等、より選択的な EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の抗腫瘍活性とは異なっていた。例えば、本試験でバンデタニブが増殖抑制作用を示した腫瘍のうち、ゲフィチニブ（12.5～200 mg/kg/日）は A431 及び LoVo に対して阻害作用を示したが、Calu-6 や MDA-MB-231 に対して無効であった（Wakeling et al 2002、Williams et al 2004）。さらにバンデタニブは、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬及び EGFR 抗体に耐性を獲得したヒト大腸癌株 GEO の増殖を抑制したとの報告もある（Ciardiello et al 2004）。したがって、バンデタニブの EGFR 又は RET のチロシンキナーゼ阻害作用は、腫瘍の増殖及び生存がこれらのチロシンキナーゼに依存性の腫瘍（例えば、RET 遺伝子に活性化変異を有する MTC 等）には、特に相加的な抗腫瘍効果を示す可能性があるが、バンデタニブの抗腫瘍効果発現には VEGFR チロシンキナーゼの阻害が重要であることが示唆された。

結論

ヒト腫瘍及び同系腫瘍移植マウスにおいて、バンデタニブは最大耐量 100 mg/kg/日に達するまで用量依存的な腫瘍増殖抑制作用を示した。この用量依存性は、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬に耐性の Calu-6 や MDA-MB-231 でもみられた。これらの効果発現機序として、VEGFR チロシンキナーゼ阻害の重要性が示唆された。

2.2.2.2　MTC 腫瘍に対する増殖抑制作用

[参考 Vitagliano et al 2011]

本試験では、RET 遺伝子に C634W 変異を有する MTC 腫瘍細胞株 TT を用いて、バンデタニブの増殖抑制作用を検討した。

試験方法

MTC 細胞株 TT（約 1×10^7 細胞）を BALB/c 雄ヌードマウス皮下に移植し、腫瘍組織の体積が 200 mm^3 大に達した時点でマウスを 2 群に分け、溶媒（0.5% ポリソルベート 80 のリン酸緩衝生理食塩液）又はバンデタニブ 50 mg/kg を 1 日 1 回反復経口投与した。投与開始から 17 日後、溶媒対照群の腫瘍が約 500 mm^3 大になった時点でさらにマウスを溶媒対照群とバンデタニブ投与群に分け、さらに 3 週間投与を継続した。腫瘍組織の体積は、3～4 日毎に腫瘍径をノギスで測定し、算出した。また、38 日後の腫瘍から抽出したタンパク質に抗 RET 抗体又は抗リン酸化 RET 抗体を加えて免疫ブロッティングを実施した。

試験結果

腫瘍が約 200 mm^3 大の時点からバンデタニブ投与を開始した群、及び、17 日間の溶媒投与後にバンデタニブ投与を開始した群の何れの場合も、腫瘍増殖が統計学的有意に抑制された（図 12）。38 日間の投与終了後に摘出した腫瘍では、RET チロシンキナーゼリン酸化阻害を伴う腫瘍増殖抑制が認められた（図 12 右下）。

なお、バンデタニブの腫瘍増殖抑制作用は、MTC 患者由来の GOT2 細胞（RET/C634R 変異株）移植マウスでも認められることが報告されている（Johanson et al 2007）。

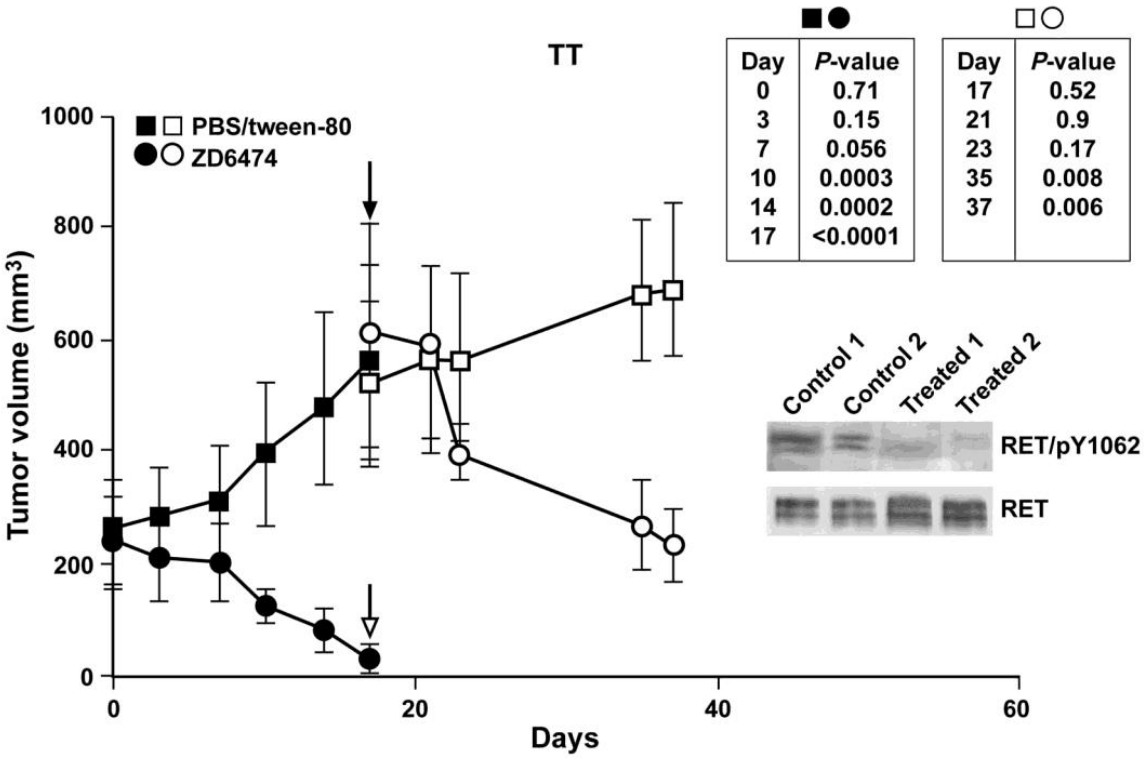


図 12　　TT 細胞異種移植モデルへのバンデタニブ（ZD6474）経口投与（50 mg/kg/日）による腫瘍増殖抑制作用

Tumour bearing animals were randomised to vandetanib (solid circles) or vehicle treated (solid squares) groups (n = 7 per group) at approximately 200 mm^3 and treated for 17 days at which time the vehicle treated control group was further randomised into control (n = 3, open squares) and vandetanib (n = 4, open circles) treated groups (indicated by the arrows), and treatment continued for a further 21 days. Inset shows RET phosphorylation at Y1062 in TT tumours after 38 days treatment. *P* values (Student's *t*-test) for the difference between control and treated tumour volumes are provided in the box. Horizontal bars are 95% CI.

結論

バンデタニブは BALB/c ヌードマウスに移植した TT 腫瘍細胞の増殖を有意に抑制し、その抑制には RET チロシンキナーゼリン酸化阻害が伴っていた。

2.2.2.3　RET/PTC3 融合遺伝子を導入した NIH3T3 細胞に対する増殖抑制作用

[参考 Carlomagno et al 2002]

本試験では、PTC でみられる RET/PTC3 融合遺伝子を導入した細胞をマウスに移植し、バンデタニブの抗腫瘍効果を検討した。

試験方法

PTC 由来の RET/PTC3 融合遺伝子を導入した NIH3T3 細胞を BALB/c 雄ヌードマウスに皮下移植した。移植から 3 日後、溶媒（0.5% ポリソルベート 80 のリン酸緩衝生理食塩液）又はバンデタニブを 0.4 又は 1 mg/マウス（それぞれ約 20 及び約 50 mg/kg に相当）の用量で 1 日 1 回の 13 日間反復腹腔内投与を行った（6 匹／群）。腫瘍組織の体積は、1～3 日毎に腫瘍径をノギスで測定し、算出した。また、薬物投与開始 13 日後の腫瘍から抽出したタンパク質を抗 RET 抗体で免疫沈降した後、抗 RET 抗体又は抗リン酸化チロシン抗体を用いて免疫ブロッティングを実施した。

試験結果

1 mg/マウス（約 50 mg/kg に相当）のバンデタニブ投与により、腫瘍組織の増大が完全に抑制された（図 13）。0.4 mg/マウス（約 20 mg/kg に相当）の用量で 13 日間投与したマウスにおいても、対照群と比較して有意に腫瘍増殖が抑制され（$p < 0.01$、Student の t 検定）、RET-PTC3 の自己リン酸化はほぼ完全に阻害されていた。

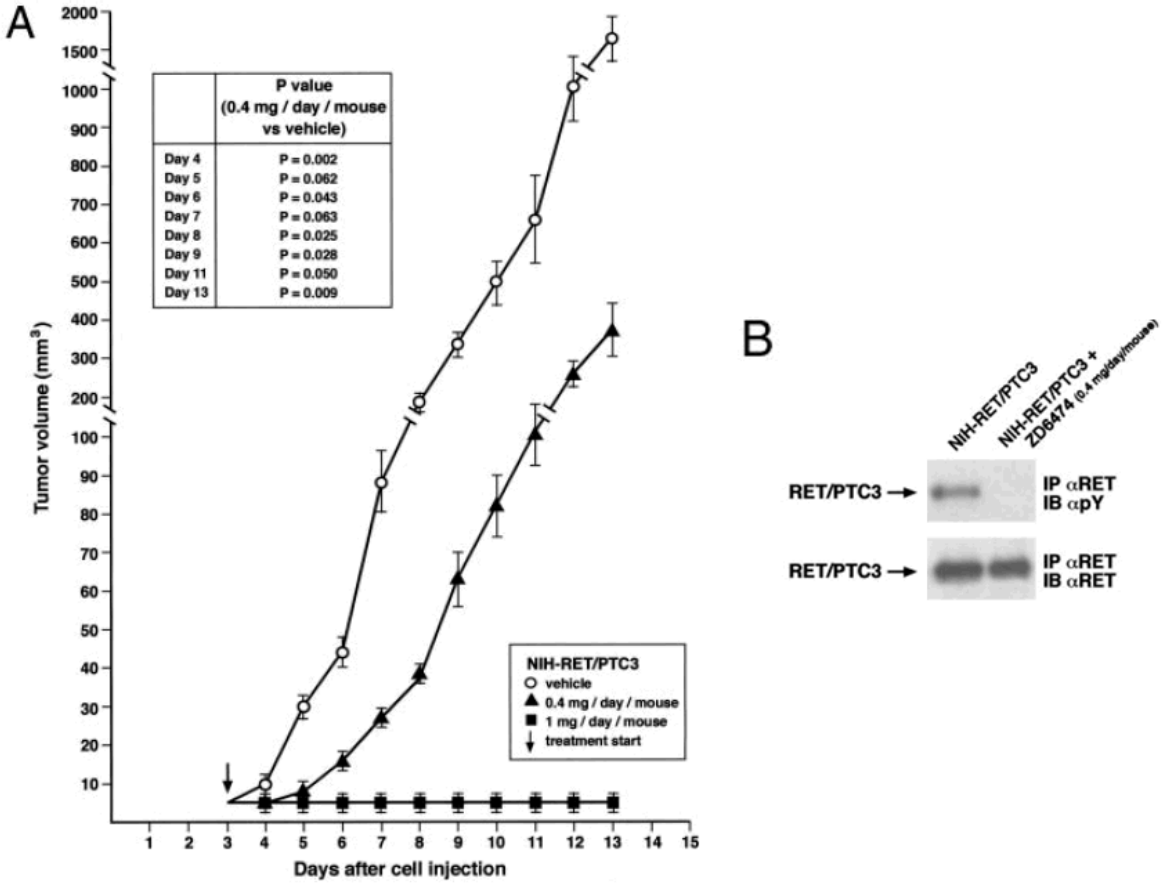


図 13　　NIH3T3-RET/PTC3 腫瘍細胞を移植したマウスにおけるバンデタニブ（ZD6474）の細胞増殖抑制作用

A. Vandetanib 0.4 and 1 mg per mouse was dosed once daily *i.p.* and tumour volumes were measured with calipers every 1-3 days. Tumor volumes (V) were calculated by the rotational ellipsoid formula: $V = A \times B^2/2$ (A = axial diameter; B =

rotational diameter. Mean±S.D. (n = 6 per group). P values (Student's *t*-test) for the difference between control and treated tumour volumes are provided in the box.

B. Protein extracted from a representative tumour (day 13) from control and vandetanib treated animals was immunoprecipitated with an anti-RET antibody and then immunoblotted with either anti-phosphotyrosine or anti-RET antibodies as shown.

結論

RET/PTC3 融合遺伝子導入細胞の皮下移植モデルにおいて、バンデタニブ投与により RET-PTC3 リン酸化阻害を伴う腫瘍増殖抑制作用が確認された。

2.3 バンデタニブ代謝物の薬理作用

[CIRA3; CIRA2]

ヒトで認められた 2 種類のバンデタニブ代謝物について、キナーゼ活性及び細胞増殖に対する作用を評価した。

試験方法

バンデタニブとその代謝物（*N*-脱メチル体：M382558 及び *N*-オキシド体：M447882）の VEGFR-2、VEGFR-1、EGFR 及び FGFR-1 の各チロシンキナーゼに対する阻害作用を ELISA 法で測定した。すなわち、バンデタニブ又は代謝物を上記チロシンキナーゼ及び ATP と共に poly(Glu, Ala, Tyr) 6:3:1 ポリマーをコーティングした 96 ウェルプレートでインキュベートした。次に、マウス IgG 抗リン酸化チロシン 4G10 抗体、HRP 標識ヒツジ抗マウス免疫グロブリン抗体、ABTS 基質を順次加えてインキュベートし、リン酸化チロシンを検出した。

また、2.6.2.2.1.2.1 項の HUVEC アッセイと同じ方法で増殖因子刺激下の細胞増殖抑制作用を検討した。

試験結果

IC_{50} 値で比較した場合、*N*-脱メチル体 M382558 は未変化体バンデタニブとほぼ同じ程度の作用強度を示した。すなわち、*N*-脱メチル体 M382558 は VEGFR-2 チロシンキナーゼに対する阻害作用が最も強く（IC_{50} 値 0.070 μM）、EGFR チロシンキナーゼに対しても阻害作用を示した（IC_{50} 値 0.170 μM）。VEGFR-1 及び FGFR-1 の各チロシンキナーゼに対する阻害作用は、VEGFR-2 及び EGFR の各チロシンキナーゼに対する作用よりも弱かった。また、*N*-オキシド体 M447882 の VEGFR-2 チロシンキナーゼ阻害能は未変化体の約 5 分の 1 であった（表 6）。

表 6 バンデタニブ及びその代謝物の各種受容体チロシンキナーゼ阻害作用

Compound	IC_{50} (mean ± SE) μM			
	VEGFR-2	VEGFR-1	EGFR	FGFR-1
Vandetanib	0.04 ± 0.01	1.6 ± 0.4	0.5 ± 0.1	3.6 ± 0.9
N-desmethyl-vandetanib (M382558)	0.07 ± 0.04	0.90 ± 0.44	0.17 ± 0.1	6.2 ± 0.25
Vandetanib *N*-oxide (M447882)	0.20	1.92	0.46	10.2

N = 2-6

一方、HUVEC の増殖に対しては、*N*-脱メチル体 M382558 は、VEGF、EGF 及び bFGF 刺激下で未変化体バンデタニブとほぼ同等の抑制作用を示した（IC_{50} 値で比較。表 7）。また、本試験における *N*-オキシド体 M447882 の HUVEC 増殖に対する抑制作用は、未変化体バンデタニブのそれと比較して約 50 分の 1 であった（表 7）。

表 7　　バンデタニブ及びその代謝物の各種増殖因子誘発 HUVEC 増殖に及ぼす作用

Compound	IC_{50} (mean ± SE) μM		
	VEGF (3 ng/mL)	EGF (3 ng/mL)	bFGF (0.3 ng/mL)
Vandetanib	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.8 ± 0.07
N-desmethyl-vandetanib (M382558)	0.02 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.95 ± 0.32
Vandetanib-*N*-oxide (M447882)	3.1 ± 1.9	8.8 ± 1.2	>10

N = 5-6

結論

組み換え酵素を用いたチロシンキナーゼアッセイ及び HUVEC アッセイにおいて、*N*-脱メチル体 M382558 は未変化体バンデタニブとほぼ同様の作用を示した。対照的に、*N*-オキシド体 M447882 は未変化体バンデタニブと比較して、VEGFR-2 チロシンキナーゼ阻害能は約 5 分の 1、HUVEC 増殖に対する抑制作用は約 50 分の 1 であった。

3　副次的薬理試験

3.1　*In vitro* 試験

3.1.1　*In vitro* 放射性リガンド結合及び酵素阻害試験

[0393SY; 0585SY]

本試験では、種々の標的分子に対するバンデタニブの薬理学的作用を *in vitro* の放射性リガンド結合試験及び酵素阻害試験で評価した。

試験方法

合計 334 種の酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターからなる標的分子パネルを用いて、*in vitro* の放射性リガンド結合試験及び酵素阻害試験を行った。バンデタニブの被験濃度は 1、10、30、100 又は 1000 μM とし、1 濃度につき 2 回ずつ試験を実施した。

試験結果

334 種のうち 59 種の標的分子に対して、有意な作用（被験濃度範囲において 50%を超える作用を示したものと規定した）が認められ、そのうち阻害作用が示された 35 の標的分子では濃度-阻害曲線を作成し、IC_{50} 値及び K_i 値を求めた。

35 分子のうち以下に示す 10 分子に対するバンデタニブの K_i 値は 1 μM 未満であった；ヒスタミン H_1 受容体 0.068 μM；アドレナリン α_{2A} 受容体 0.090 μM；アドレナリン α_{2B} 受容体 0.100 μM；イミダゾリン I_2 受容体 0.565 μM；ヒスタミン H_2 受容体 0.599 μM；アドレナリン α_{2C} 受容体

0.607 μM；ドパミン D_1 受容体 0.753 μM；セロトニントランスポーター 0.803 μM；セロトニン $_{2A}$ 受容体 0.813 μM；ドパミン D_5 受容体 0.948 μM。

これらのうち、高い親和性を示したヒスタミン H_1 受容体は炎症反応に関与し（Parsons and Ganellin 2006）、アドレナリン α_2 受容体は血管収縮、神経伝達、鎮痛/鎮静作用あるいは血小板凝集反応に重要な役割を担っている（Knaus et al 2007）。これらを含む 3 種の受容体を対象に追加の *in vitro* 機能試験を実施したところ、バンデタニブはそれぞれ 8.8 μM（ヒスタミン H_1 受容体）、13 μM（アドレナリン α_{2C} 受容体）及び 33 μM（ヒスタミン H_2 受容体）の IC_{50} 値でアンタゴニスト作用を示した。

3.2　*In vivo* 試験

3.2.1　VEGF 及び bFGF による血圧低下に対する作用

[Wedge et al 2002]

ラットに VEGF 等の増殖因子を多量に静脈内急速単回投与すると急性の血圧低下が起こる。これはそれぞれの増殖因子に関連する受容体を介した反応と考えられている。本試験では、VEGF を介したシグナル伝達に対する阻害作用を *in vivo* で確認するため、VEGF 又は bFGF で血圧低下を誘発させたラットにおいてバンデタニブの作用を検討した。

試験方法

麻酔下の雄 Wistar 系ラット（4～6 匹／群）に VEGF（32 μg/kg）又は bFGF（40 μg/kg）の生理食塩液を静脈内投与し、5 分後に溶媒（Sorenson の pH5.5 リン酸緩衝液で調製した 25%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン溶液）又はバンデタニブ（2.5 mg/kg）を静脈内投与した。それぞれの投与後に血圧を測定した。

試験結果

麻酔ラットへの VEGF 又は bFGF 静脈内投与により、ほぼ投与後 2 分以内に 26～30 mmHg の血圧低下が起こり、その低下は約 20 分間持続した。VEGF 又は bFGF 投与の約 5 分後にバンデタニブ（2.5 mg/kg）を単回静脈内投与すると、VEGF による血圧低下は 63%抑制されたが、bFGF による血圧低下には同様の作用はみられなかった（図 14）。

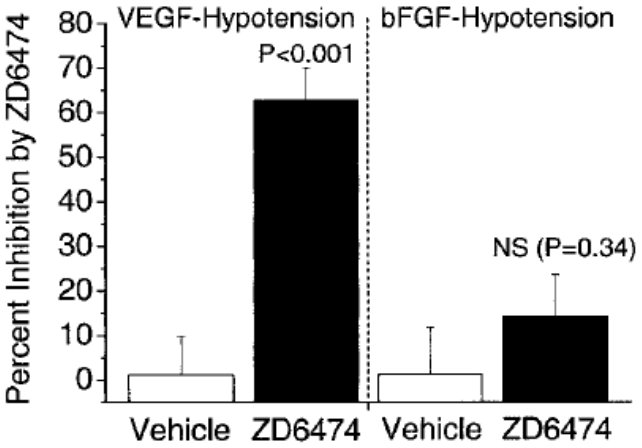


図 14　麻酔下の Wistar 系雄ラットにおける VEGF 又は bFGF で誘発される急性血圧低下に対するバンデタニブ（ZD6474）の作用

Bars: mean + SE

3.2.2　ラットにおける骨端軟骨板肥厚の誘発

[Wedge et al 2002]

血管新生は長骨伸長時の軟骨内骨化に必須であり、血管の軟骨板への浸潤は肥大軟骨細胞の VEGF 産生に依存する。VEGF に特異的結合能を有する薬物の投与により、肥大軟骨細胞帯が拡大し、血管新生が阻害されることから（Gerber et al 1999、Ryan et al 1999）、VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬は、軟骨への血管浸潤を抑制し、成長期の動物の骨端軟骨板肥厚帯を増大させると考えられる（Hall et al 2006）。本試験では、成長期のラットにおいて、骨端軟骨板の形態に対するバンデタニブの影響を検討した。

試験方法

若齢 Wistar 系雌ラットに、溶媒（1%ポリソルベート 20 水溶液）又はバンデタニブ（15、50 又は 100 mg/kg/日）を 1 日 1 回 14 日間反復経口投与し（5～6 匹／群）、大腿骨及び脛骨の骨端軟骨板の画像診断により骨端軟骨板肥厚を定量化した。

試験結果及び考察

成長期のラットへのバンデタニブ投与により、用量依存的な骨端軟骨板肥厚帯の拡大がみられ、50 及び 100 mg/kg/日投与群では骨端軟骨板面積が有意に増加した（それぞれ 57%及び 75%、$p < 0.001$、片側 t 検定）（図 15）。この結果は、VEGF の骨形成における役割から予想されたものであり、バンデタニブは骨形成を抑制する可能性が示唆された。

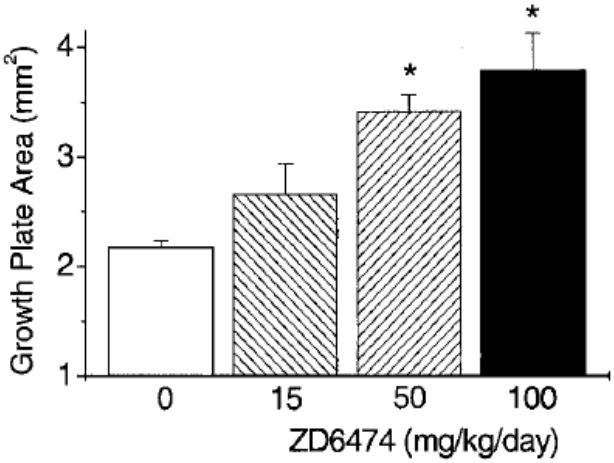


図 15　　バンデタニブ（ZD6474）で誘発されるラットの骨端軟骨板肥厚

* : $p < 0.001$, one-tailed *t*-test, n = 5-6.

3.2.3　　バンデタニブが創傷治癒に及ぼす影響

[参考 Ko et al 2005]

創傷治癒のプロセスには EGF や FGF 等の様々な増殖因子が関与しており、血管新生が必須である。本試験では、創傷治癒モデルを用いて、バンデタニブが創傷治癒に及ぼす影響を検討した。

試験方法

雌 BALB/c マウスに溶媒（1% ポリソルベート 80 水溶液）又はバンデタニブ（50 又は 100 mg/kg/日）を 1 日 1 回 7 日間反復経口投与し（10～12 匹／群）、マウスに真皮に至る切開を 2 ヵ所行って縫合した。創傷 7 日後又は 28 日後に治癒途中にある創傷部の皮膚を破断するのに要する力（以下、「創傷結合力」）を測定した。統計解析には Wilcoxon の順位和検定を用いた。

試験結果

溶媒対照群と比較して、バンデタニブ 100 mg/kg/日投与群で、創傷 7 日後（$p < 0.0001$）及び 28 日後（$p < 0.005$）ともに、創傷結合力が有意に低下した（図 16）。バンデタニブ 50 mg/kg/日投与群の対照群と比較した創傷結合力は、創傷 7 日後に有意に低下し（$p < 0.0001$）、創傷 28 日後も低下傾向がみられたものの、統計学的有意差はなかった。

結論及び考察

本モデルにおいて、バンデタニブは溶媒対照群と比較して、創傷 7 日及び 28 日後の創傷結合力を低下させることが示された。バンデタニブ投与群の創傷結合力の低下は時間経過とともに改善されたことから、バンデタニブは創傷治癒を遅延させるものの、停止させることはないと考えられた。

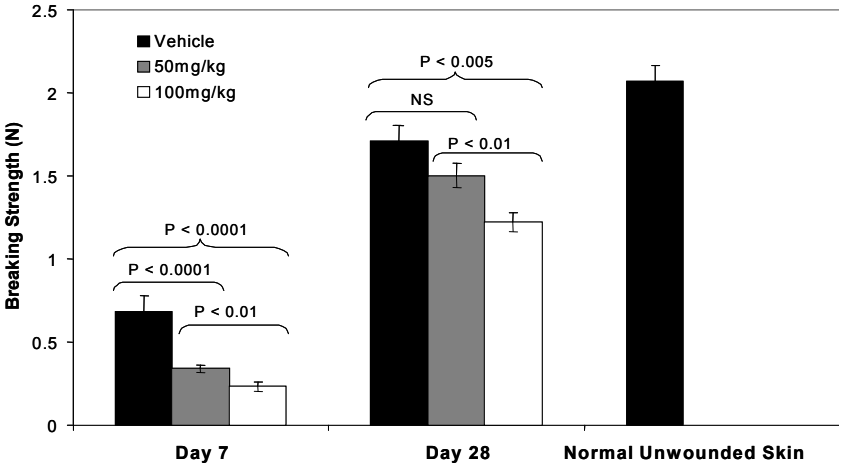


図 16　　マウスの創傷 7 日後及び 28 日後の創傷結合力（Breaking Strength）に対するバンデタニブの影響

Wound strength measured as breaking strength (N). Animals were divided into vehicle (n = 10, 7 day; n = 11, 28 day), 50 mg/kg/day (n = 12, 7 and 28 day), and 100 mg/kg/day (n = 11, 7 day; n = 12, 28 day) vandetanib-treated groups. Mean values shown on post-wounding day 7 and day 28. Normal unwounded skin is also included for comparison. Data were analyzed using the Wilcoxon Rank Sum Test. Significant *P* values are indicated above the respective results. NS = not statistically significant.

4　　安全性薬理試験

バンデタニブの安全性薬理コアバッテリー試験、フォローアップ試験及び補足的試験を実施し、中枢神経系、心血管系、呼吸器系、消化器系及び腎／泌尿器系に及ぼす影響を検討した。試験は GLP 準拠を基本としたが、一部 GLP に完全に準拠しないものもあった。

本項では、別途記載がない限り、*in vitro* 試験の溶媒として 0.1% DMSO 溶液、*in vivo* 試験の溶媒として、経口投与時は 0.5% ヒプロメロース／0.1% ポリソルベート 80 水溶液、静脈内投与時は 15% ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン／1.6% マンニトール水溶液を用いた。

4.1　　中枢神経系に対する作用

4.1.1　　マウスにおける作用

[TSM1124]

Swiss 系雄マウス（5 匹／群）に溶媒又はバンデタニブを 50 mg/kg の用量で単回経口投与し、行動に対する作用を 1 時間観察した。また、投与前後に直腸温を測定した。

バンデタニブは動物の行動（筋緊張、常同行動、挙尾、流涎、眼瞼下垂、振戦、正向反射、散瞳、痙攣、呼吸、自発運動）に影響を及ぼさず、致死作用もみられなかった。バンデタニブ投与により、平均直腸温の軽微な上昇（投与 1 時間後に 1.4℃）がみられたが、正常範囲内の変化であった。

4.1.2 ラットにおける作用

[1228SR]

Wistar 系雄ラット（5～7 匹／群）に溶媒又はバンデタニブを 40、200 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与し、投与の約 4 時間後に FOB を実施し、約 24 時間後に体重を測定した。統計解析には一元配置分散分析と両側 *t* 検定を用いた。

用量依存性は認められないものの、オープンフィールドにおける運動量低下が全ての用量でみられ、1000 mg/kg 投与群で着地開脚幅が減少した（平均値 ± 標準誤差は-2.9 ± 0.4 cm、$p < 0.05$）。さらに投与の約 24 時間後には用量依存性の体重減少が認められた（体重平均値 ± 標準誤差は 200 mg/kg 投与群で-8.4 ± 0.7 g、1000 mg/kg 投与群で-12.0 ± 2.8 g、いずれも $p < 0.001$）。

4.2 心血管系に対する作用

4.2.1 *In vitro* 電気生理学的試験

4.2.1.1 hERG チャネルに対する作用

[TSZ36]

hERG チャネルを発現させた HEK 細胞（n = 5）を用いて、ホールセルパッチクランプ法によりバンデタニブの hERG チャネルに対する作用を検討した。溶媒、陽性対照（dofetilide）又はバンデタニブ 100 nM～10 μM を添加してテール電流を測定し、陽性対照に対する相対値から阻害率を求めた。

バンデタニブは hERG チャネルを阻害し、その IC_{50} 値は 0.4 μM であった。

4.2.1.2 イヌプルキンエ線維の活動電位に対する作用

[TSD1293]

5 匹の雄ビーグル犬より単離したプルキンエ線維（n = 6）を用いて、バンデタニブの活動電位パラメータに対する作用を検討した。6 本の線維標本につき、溶媒（Tyrode 液）、バンデタニブ 0.1、0.3、1 及び 10 μM、溶媒、陽性対照 Cisapride 0.3 μM の順に 30 分間ずつ処置した。その間、1 Hz で 25 分間、0.33 Hz で 5 分間刺激し、5 分毎に活動電位振幅、静止膜電位、最大立ち上がり速度、APD_{50}、APD_{70}、APD_{90} を測定した。残りの 6 本の線維標本について、溶媒として低カリウム Tyrode 液を用いて同様の試験を実施した。統計解析には Newman-Keuls 検定を用いた。

バンデタニブは、1 μM 以上の濃度で APD_{90} を、10 μM の濃度で APD_{70} を延長し、その延長作用は溶媒対照との比較において統計学的有意差が認められた。この延長作用は刺激頻度が低い方が強かったことから（バンデタニブ 1 μM における APD_{90} 平均値は 1 Hz で 12 ms、0.33 Hz で 26 ms）、実際の生体においては心拍数が低いほど強く影響を及ぼす可能性が考えられた。また、低カリウム濃度条件下でも同作用が増強された（バンデタニブ 1 μM における APD_{90} 平均値は 1 Hz で 29 ms、0.33 Hz で 61 ms）。

4.2.2 *In vivo* 電気生理学的試験

4.2.2.1 ラットのテレメトリー試験

[CIRA10]

テレメトリー装置を装着した覚醒下の Wistar 系雄ラット（3 匹／群）に溶媒（1% ポリソルベート水溶液）を 7 日間投与後、バンデタニブを 12.5 又は 50 mg/kg の用量で単回経口投与し、収縮期及び拡張期血圧を測定した。さらに、12.5 mg/kg/日の用量のみ 1 日 1 回 7 日間反復経口投与し、同様に血圧を測定した。

12.5 mg/kg の単回投与により、溶媒投与時のベースライン値と比較して収縮期、拡張期血圧がいずれも 5 mmHg 上昇した。50 mg/kg の単回投与では、ベースライン値から収縮期、拡張期血圧がそれぞれ 13 mmHg 及び 11 mmHg 上昇した。12.5 mg/kg/日の 7 日間反復経口投与により、収縮期及び拡張期血圧はそれぞれベースライン値から 12 mmHg、13 mmHg 上昇した。

4.2.2.2　イヌのテレメトリー試験

[TKD1045]

テレメトリーを装着した覚醒下の雄ビーグル犬（４匹）に、溶媒又はバンデタニブを5、15及び40 mg/kgの用量で単回経口投与し、投与30分前及び投与30分後～360分後の11時点で、血圧、心拍数及び心電図の測定を行った。統計解析には一元配置分散分析とDunnettの多重比較検定を用いた。

40 mg/kg での心拍数低下を除き、心血管系への影響はみられなかった。この心拍数低下作用は、投与の 90 分後（$p < 0.05$）、180 分後及び 360 分後（$p < 0.01$）の時点で統計学的有意差が認められ、溶媒対照群と比較していずれも約 25 回／分低かった。

4.2.2.3　イヌの静脈内投与試験

[0276SD]

麻酔下の雄ビーグル犬（4 匹／群）に、溶媒（5 回投与）又はバンデタニブ（0.2、0.67、2、6.7 及び 13.4 mg/kg を漸増投与）を 45 分毎に静脈内ボーラス投与（その後持続投与）し、投与中、心電図をモニターした。さらに、投与前及び投与の 15、30、45 分後に採血し、バンデタニブの血漿中濃度を測定した。

バンデタニブ0.67～13.4 mg/kgの用量でQTcV延長作用が認められ、この作用は6.7 mg/kg投与時に最大となった。このときのQTcV平均値は288 msで、ベースライン値から約16%、溶媒投与群と比較して約13%高値であった。このときの血漿中濃度は約1.5 μMであったが、血漿中濃度がこの値を上回ってもさらなるQTcV延長作用はみられなかった。また、バンデタニブ6.7 mg/kg以上で用量依存的なT波の振幅増大と再分極がみられ、0.67及び2.0 mg/kgの用量でもわずかではあるが同変化が認められた。本試験におけるバンデタニブの心電図波形に関する無影響量は0.2 mg/kgで、このときの平均血漿中濃度は約0.04 μMであった。なお、バンデタニブが心筋虚血につながる冠動脈収縮を誘発する所見は観察されなかった。

4.2.3　オンダンセトロンとの併用に関する検討

バンデタニブを臨床で使用する際には、QT 延長を起こすことが知られている制吐薬と併用される可能性があるため、オンダンセトロンとの併用による影響を検討した。

4.2.3.1　*In vitro* 試験

[0102SZ]

hERG チャネルを発現させた CHO 細胞（n = 4）を用いて、ホールセルパッチクランプ法により、バンデタニブとオンダンセトロンを併用時の hERG チャネルに対する作用を検討した。

バンデタニブとオンダンセトロンを両薬物の IC_{50} 値に近い濃度（それぞれ 0.4 μM 及び 1 μM）で同時に作用させたところ、I_{kr} 電流は約 70%阻害された。

4.2.3.2　*In vivo* 試験

[0257SD; 0258SD]

予備試験

麻酔下の雄ビーグル犬にオンダンセトロン又はバンデタニブを静脈内投与し（2 匹／群）、併用投与試験における両薬物の被験用量を検討した。本試験では、バンデタニブ又はオンダンセトロンを静脈内ボーラス投与とそれに続く静脈内持続投与（45 分）の組み合わせにより漸増投与（バンデタニブ：5.19、20.75 及び 27.5 mg/kg、オンダンセトロン：1、1.5 及び 3 mg/kg）し、大腿動脈血圧と心電図を測定した。

バンデタニブ投与（5.19～27.5 mg/kg）により、用量依存的な QTcV 延長及び大腿動脈血圧の増加がみられた。27.5 mg/kg 投与後の QTcV 値はベースライン値より約 24%高く、大腿動脈血圧は 20.75 mg/kg 投与後にベースライン値から約 25%上昇し 105 mmHg となり、試験終了までほぼ一定であった。一方、オンダンセトロンでも同様に用量依存的な QTcV 延長がみられ、3 mg/kg 投与後の QTcV 値はベースライン値より約 19%高かったが、大腿動脈血圧に変化はみられなかった。

併用投与試験

先と同じ投与法により、麻酔下の雄ビーグル犬（8 匹）にオンダンセトロン（1、1.5 及び 3 mg/kg）を漸増投与（1 回目）した後、2 グループに分け（n = 4）、グループ 1 には溶媒（生理食塩液）を、グループ 2 にはバンデタニブ（20.75 mg/kg）を投与し、再度オンダンセトロン（1、1.5 及び 3 mg/kg）の漸増投与（2 回目）を両グループで実施した。投与期間中、継続的に心電図を測定した。

1 回目のオンダンセトロン 3 用量の漸増投与により、予備試験と同様の用量依存的な QTcV 延長作用がみられ、グループ 1 及び 2 の QTcV 値はベースライン値と比較してそれぞれ 14%及び 17%高かった。続いて各グループに溶媒又はバンデタニブを投与したところ、いずれも QTcV 値は減少に転じた。2 回目のオンダンセトロン 3 用量の投与により、グループ 1 の QTcV 値は再び上昇したものの、グループ 2 では明らかな QTcV 値の再上昇は認められなかった。

4.3　呼吸器系に対する作用

[1220SR]

覚醒下の Wistar 系雄ラット（8 匹／群）に溶媒、テオフィリン 100 mg/kg（陽性対照）又はバンデタニブ（40、200 又は 1000 mg/kg）を単回経口投与し、バンデタニブの呼吸器系に対する影響を検討した。投与の約 30 分後から約 4 時間後まで、全身プレスチモグラフィーにより、呼吸数、最大吸気及び呼気流量、吸気及び呼気時間、1 回換気量、分時換気量を計測した。統計解析には Newman-Keuls 検定を用いた。

40 及び 200 mg/kg の用量では呼吸器系に対する影響はみられなかった。最高用量の 1000 mg/kg では統計学的有意な最大吸気流量の増加と吸気時間の短縮が認められた。最大吸気流量平均値 ± 標準誤差は、投与の約 30 分後及び約 60 分後にそれぞれ 55 ± 6 mL/s（$p \leq 0.01$）及び 32 ± 7 mL/s（$p \leq 0.05$）であり、吸気時間平均変化率 ± 標準誤差は、投与前と比較して、投与の約

30 分後及び約 60 分後にそれぞれ-27 ± 3%及び-23 ± 4%（いずれも $p \leq 0.01$）であった。したがって、覚醒ラットの呼吸器系に対するバンデタニブ経口投与の無影響量は 200 mg/kg であった。

4.4　消化管系に対する作用

[1290SR]

Han Wistar 系雄ラットを用いて、バンデタニブの胃内容物排出速度及び腸管輸送能に対する作用を検討した。覚醒下のラット（9～10 匹／群）に溶媒、アトロピン 20 mg/kg（陽性対照）又はバンデタニブ（40、200 又は 1000 mg/kg）を単回経口投与し、約 4 時間後に活性炭懸濁液を投与した。さらに約 15～20 分後に腸管を摘出し、胃重量の差（胃内容物排出速度）と炭末の移動率（腸管輸送能）を求めた。統計解析には Wilcoxon Mann Whitney 検定を用いた。

バンデタニブの全ての用量で、溶媒対照群と比較して統計学的有意に胃内容物排出速度及び腸管輸送能が低下し、用量依存性がみられた（表 8）。40 mg/kg 投与群における胃内容物排出速度及び腸管輸送能の中央値はそれぞれ 1.18 g（$p < 0.05$）及び 55.68%（$p < 0.05$）であった。

表 8　ラットの胃内容物排出速度及び腸管輸送能に対するバンデタニブの作用（中央値）

Treatment	Dose (mg/kg)	Gastric emptying (g)	Intestinal transit (%)
Vehicle	0	0.61	65.77
Vandetanib	40	1.18 *	55.68 *
Vandetanib	200	4.43 **	38.24 *
Vandetanib	1000	6.31 **	26.47 **
Atropine 1h post-dose (reference)	20	2.72 ***	32.62 ***
Atropine 4h post-dose (reference)	20	1.78 ***	46.01 ***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by Wilcoxon Mann Whitney test. n = 9-10

4.5　腎／泌尿器系に対する作用

[TSR2922]

バンデタニブの腎／泌尿器系に対する作用を、覚醒下の Wistar 系雌ラット（5 匹／群）を用いて検討した。溶媒又はバンデタニブ 50 mg/kg を単回経口投与し、投与後 0～6 時間及び 6～24 時間の尿を採取し、尿量、比重、尿中電解質量及び濃度（カリウム、ナトリウム、塩素、クレアチニン、グルコース及び総タンパク）を測定した。また、バンデタニブ投与 24 時間後に採血し、血液化学的検査（グルコース、尿素、総タンパク、アルブミン、クレアチニン、総ビリルビン、ALT、AST、ALP、ナトリウム、カリウム、コレステロール、トリグリセリド）を実施した。統計解析には両側 *t* 検定を用いた。

バンデタニブは利尿あるいは抗利尿作用を示さなかったが、投与後 6～24 時間の尿検査で、統計学的有意な（$p < 0.05$）塩素量、カリウム量及びカリウム濃度の低下と総タンパク濃度の増加が認められた。すなわち、バンデタニブ投与群の平均値 ± 標準偏差は、塩素量が 1.6 ± 0.6 mmol/sample、カリウム量が 2.0 ± 0.6 mmol/sample、カリウム濃度が 247.0 ± 112.6 mmol/L、総タンパク濃度が 26.2 ± 4.8 mg/dL であった。一方、血液化学的検査値への影響はみられなかった。

4.6　代謝物の安全性薬理試験

[0048SZ]

バンデタニブ代謝物の hERG チャネルに対する作用を 2.6.2.4.2.1.1 項と同様の方法で検討した。バンデタニブ代謝物の *N*-脱メチル体（M382558）及び *N*-オキシド体（M447882）の被験濃度はいずれも 0.03 μM～10 μM とした。

N-脱メチル体（M382558）及び *N*-オキシド体（M447882）の hERG に対する IC_{50} 値は、それぞれ 1.3 μM（n = 4）及び 4.0 μM（n = 5）であった。

5　薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用の試験は実施しなかった。

6　考察及び結論

6.1　効力を裏付ける薬理試験

In vitro 試験

バンデタニブは VEGFR-2、EGFR、RET 及び BRK のチロシンキナーゼ活性を 0.1 μM 以下の IC_{50} 値で阻害した。BRK は乳癌の増殖や進展への関与が示唆されているが（Xiang et al 2008）、MTC での役割は不明である。バンデタニブは活性化変異を有する EGFR チロシンキナーゼ（L858R）や MTC でみられる変異型 RET チロシンキナーゼ（M918T 等、Carlomagno et al 2004）の自己リン酸化を阻害したが、T790M 変異型 EGFR チロシンキナーゼや V804L 又は V804M 変異型 RET チロシンキナーゼに対する阻害作用はそれぞれの野生型チロシンキナーゼに対する阻害作用と比較して減弱した。バンデタニブ耐性には EGFR チロシンキナーゼの T790M 変異や RET チロシンキナーゼの V804 変異が関与する可能性が示唆された。

バンデタニブは濃度依存的に血管内皮細胞の VEGFR-2 及び EGFR の各チロシンキナーゼ活性を阻害し、細胞の遊走、増殖及び管腔形成を抑制した。腫瘍細胞に対しては、バンデタニブは NSCLC、CRC を含む複数組織由来の細胞株の増殖を抑制し、これらの細胞株ではバンデタニブとゲフィチニブに対する感受性に強い相関が示されたことから、その作用機序として EGFR チロシンキナーゼ阻害が示唆された（Brave et al 2007a、Brave et al 2011）。また、バンデタニブは活性化 RET チロシンキナーゼ RET-PTC1 を発現する PTC 細胞株 TPC-1 及び FB2 の細胞増殖を抑制し（Carlomagno et al 2002）、MTC 細胞株 TT 及び MZ-CRC-1 の増殖を抑制した（Vitagliano et al 2011）。MTC 細胞では RET、EGFR 及び VEGFR-2 の各チロシンキナーゼの自己リン酸化阻害が認められ、バンデタニブの MTC 細胞に対する増殖抑制作用には、RET チロシンキナーゼだけでなく、EGFR 及び VEGFR-2 の各チロシンキナーゼに対する阻害作用も寄与することが示唆された。

In vivo 試験

7 株のヒト腫瘍細胞株（前立腺癌、卵巣癌、乳癌、外陰部癌、肺癌及び大腸癌）をマウスに移植し、バンデタニブ（12.5～100 mg/kg/日）を 21～35 日間反復経口投与したところ、用量依存的な増殖抑制作用が認められ、25 mg/kg/日以上の用量で 7 株全てに統計学的有意な増殖抑制作用が

認められた（Wedge et al 2002）。PC-9 腫瘍移植マウスでは、21 日間のバンデタニブ 12.5 mg/kg/日の反復経口投与により腫瘍退縮が認められ、50 mg/kg/日投与群では投与期間終了後の増殖抑制効果が持続した。本モデルにバンデタニブを 4 日間反復投与後の腫瘍組織において、pEGFR レベルの低下とアポトーシスマーカーM30 の著しい増加が認められ、EGFR チロシンキナーゼ阻害に加えてアポトーシス誘発が腫瘍細胞の退縮に寄与することが示唆された。また、RET 遺伝子に C634W 変異を有する MTC 腫瘍細胞株 TT を移植したマウスにバンデタニブ 50 mg/kg/日を 17 日間反復経口投与したところ、腫瘍退縮が認められ、投与期間終了後に摘出した腫瘍において RET チロシンキナーゼのリン酸化阻害が認められた（Vitagliano et al 2011）。

大腸癌細胞株 LoVo 移植マウスへのバンデタニブ 25 mg/kg の 4 日間反復経口投与により、肺組織内の pVEGFR-2 及び腫瘍組織内の pEGFR レベルが統計学的有意に低下し、このときの平均血漿中濃度は 1497 ng/mL であった（Brave et al 2011）。100 mg/kg の用量では平均血漿中濃度は 3653 ng/mL に達したが、腫瘍組織内の pEGFR レベルは 25 mg/kg 投与時と比べて有意な変化が認められなかったことから、本試験系の EGFR チロシンキナーゼ阻害作用は、バンデタニブ 25 mg/kg 付近の用量でほぼ最大となると考えられた。

血管新生阻害作用は肺癌細胞 A549 移植マウスで認められ、5 日間のバンデタニブ（50 又は 100 mg/kg/日）反復経口投与により血管新生が有意に阻害された（それぞれ 63%及び 79%）（Wedge et al 2002）。

以上より、バンデタニブの薬効発現には、主に VEGFR チロシンキナーゼを介した血管新生に対する阻害作用に加えて、EGFR 及び RET チロシンキナーゼ阻害による細胞増殖抑制作用が付加的に作用すると考えられた。なお、MTC 移植マウスにおいて腫瘍の退縮が認められたのは、MTC の RET チロシンキナーゼ依存度が高く、その付加的効果が強く表れたためと考えられた。

バンデタニブ代謝物の薬理作用

ヒトで認められたバンデタニブの代謝物である *N*-脱メチル体の VEGFR-2 及び EGFR の各チロシンキナーゼに対する阻害活性はバンデタニブとほぼ同程度であったのに対し、*N*-オキシド体の VEGFR-2 チロシンキナーゼ阻害能はバンデタニブの 5 分の 1 であった。一方、HUVEC の増殖に対する抑制作用は、バンデタニブと比較して、*N*-脱メチル体は VEGF、EGF 及び bFGF 刺激下でほぼ同等であったのに対し、*N*-オキシド体は約 50 分の 1 であった。ヒトにバンデタニブ 300 mg を 1 日 1 回反復経口投与したときの *N*-脱メチル体及び *N*-オキシド体の曝露量はバンデタニブの値に対してそれぞれ 14.1%及び 1.8%であり（試験 D4200C00057、非臨床試験の概括評価 2.4.3.6 項参照）、バンデタニブの薬効発現に対するこれらの代謝物の寄与は小さいと考えられた。

曝露量の考察

図 17 に、乳癌細胞 MCF-7 移植マウスにバンデタニブ 10～50 mg/kg を単回経口投与したときの血漿中濃度推移（Gustafson et al 2006）と、日本人 MTC 患者に 1 日 300 mg を反復経口投与したときの定常状態における平均血漿中濃度の最高値（$C_{ss,max}$）及び最低値（$C_{ss,min}$）を示した。マウスとヒトにおけるバンデタニブのタンパク結合率に違いがないため（非臨床試験の概括評価 2.4.3.5 項参照）、ここでは総血漿中濃度での比較とした。日本人 MTC 患者の $C_{ss,max}$ 値及び $C_{ss,min}$ 値はいずれも担癌マウスにバンデタニブ 25 mg/kg を単回経口投与した後の最高血漿中濃度を超え、50 mg/kg を単回経口投与した後の血漿中濃度推移の範囲内にあった。担癌マウスへのバンデタニブ 25～50 mg/kg/日の反復経口投与により、VEGFR-2、EGFR、RET の各チロシンキナーゼを介したシグナル伝達が阻害され、血管新生阻害及び抗腫瘍効果が示されたことから、日本人 MTC 患

者においても 1 日 1 回 300 mg のバンデタニブ経口投与により同様の薬理作用が期待できると考える。

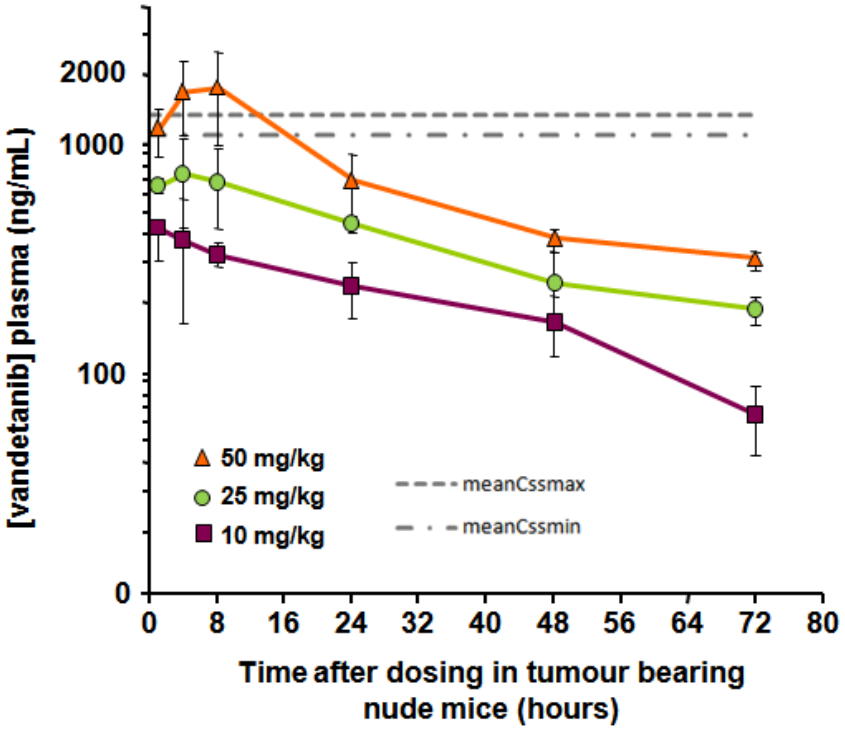


図 17　バンデタニブ投与後の曝露量の比較－MCF-7 腫瘍移植マウス（単回経口投与）及び日本人 MTC 患者（300 mg/日反復経口投与、定常状態）の血漿中濃度

Gray bar indicates the steady state C_{max} or C_{min} plasma concentration for the 300 mg dose in patients (n = 11) from the Japanese MTC study. Preclinical plasma concentrations are represented as mean±SD for three animals per time point per dose.

[Gustafson et al 2006 の Fig. 2 を改変し、日本人 MTC 患者の $C_{ss,max}$ 及び $C_{ss,min}$ を追加]

6.2　副次的薬理試験

In vitro 放射性リガンド結合試験で、バンデタニブは 334 分子のうち 59 分子に対して有意な作用を示し、そのうち 3 種の受容体（ヒスタミン H_1 受容体、アドレナリン α_{2A} 受容体及びアドレナリン α_{2B} 受容体）に高い親和性を示した。

バンデタニブは、ラットにおいて VEGF による血圧低下に対する抑制作用及び骨端軟骨板の肥大作用を示した。また、マウス創傷治癒モデルにおいて創傷結合力を低下させる（Ko et al 2005）など、バンデタニブは VEGF に関連する各種生理的反応を抑制した。

6.3　安全性薬理試験

臨床的に重要な所見が主に心血管系の試験で認められ、血圧上昇と hERG チャネル阻害による QT 間隔延長がヒトでも発現する可能性が示唆された。安全性薬理試験結果を以下に要約する。

心血管系：バンデタニブの hERG チャネルに対する IC_{50} 値は 0.4 μM であり、代謝物 *N*-脱メチル体及び *N*-オキシド体の hERG に対する IC_{50} 値はそれぞれ 1.3 μM 及び 4.0 μM であった。バンデタニブは濃度依存的にイヌプルキンエ線維の APD_{90} を延長し、この作用は低刺激頻度や低カリウム濃度の条件下で増強された。

ラットへのバンデタニブ 12.5 mg/kg の単回経口投与により血圧が上昇し、反復経口投与ではさらに上昇した。イヌへの単回経口投与では、最高用量 40 mg/kg で心拍数が低下した。

イヌへのバンデタニブ静脈内ボーラス投与により、0.67 mg/kg 以上の用量で QTcV 延長作用が認められ、この作用は 6.7 mg/kg 投与時に最大となり約 16%延長した（血漿中濃度は約 1.5 μM）。バンデタニブの心電図波形に関する無影響量は 0.2 mg/kg（血漿中濃度は約 0.04 μM）であった。この試験で、バンデタニブが心筋虚血につながる冠動脈収縮を誘発する所見は観察されなかった。

QT 延長作用のある制吐薬オンダンセトロンとの併用試験を実施した。hERG チャネル発現 CHO 細胞にバンデタニブ 0.4 μM とオンダンセトロン 1 μM を同時に作用させたところ、I_{kr} 電流は約 70%阻害された。イヌへのオンダンセトロン（1～3 mg/kg）又はバンデタニブ（5.19～27.5 mg/kg）の静脈内投与により、用量依存的な QTcV 延長がみられたが、オンダンセトロン（1～3 mg/kg）、バンデタニブ（20.75 mg/kg）、オンダンセトロン（1～3 mg/kg）をこの順に静脈内投与したところ、バンデタニブ投与による明らかな QTcV 延長作用は認められなかった。

中枢神経系：マウスへのバンデタニブ 50 mg/kg 単回経口投与により、行動への影響は観察されなかったが、平均直腸温がわずかに上昇した（投与 1 時間後に 1.4℃）。また、ラットにバンデタニブ 40 mg/kg 以上を単回経口投与した FOB において、オープンフィールドでの運動量が全用量で低下し、用量依存性の体重減少も認められた。

呼吸器系：ラットへのバンデタニブ 200 mg/kg 単回経口投与により呼吸器系への影響はみられなかったが、1000 mg/kg の用量では最大吸気流量が増加し、吸気時間が短縮した。

消化管系：ラットへのバンデタニブ 40 mg/kg 以上の単回経口投与により、用量依存的に胃内容物排出速度及び腸管輸送能が低下した。

腎／泌尿器系：ラットへのバンデタニブ 50 mg/kg の単回経口投与により、尿中への塩素及びカリウムの排泄量低下と尿中総タンパク濃度の増加が認められたが、利尿あるいは抗利尿作用は示されず、血液化学的検査値への影響もみられなかった。

考察

図 18 に、バンデタニブの心再分極に関するデータと、試験 98 において日本人 MTC 患者に 300 mg/日を反復経口投与したときの遊離 C_{max} 平均値を示した。この安全性薬理試験の結果から、hERG チャネル阻害によりヒトでも QT 間隔延長が発現する可能性が示唆された。

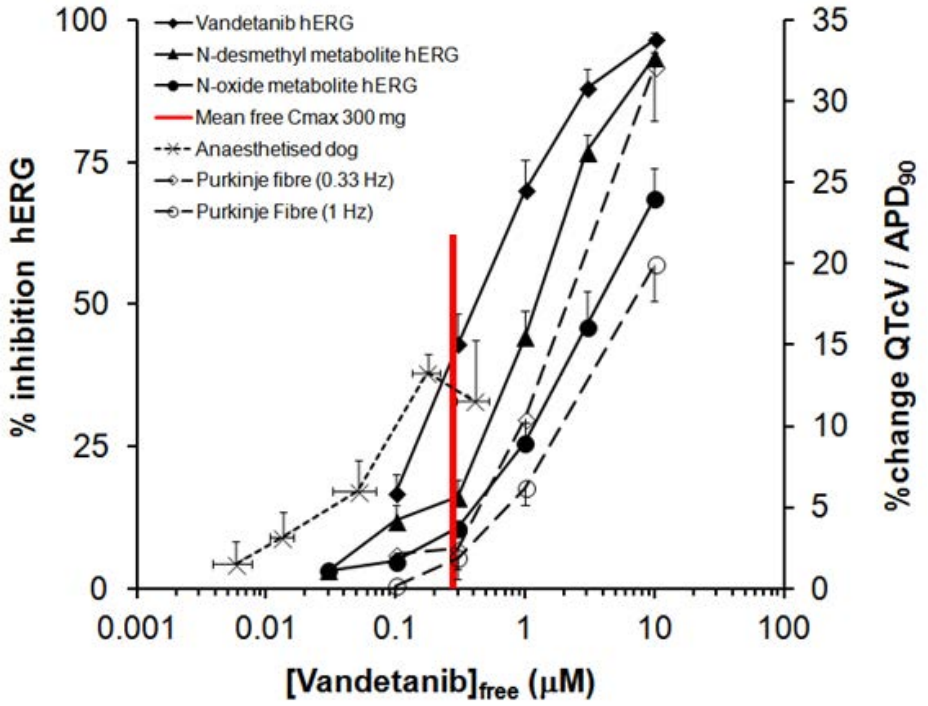


図 18　　心機能に関連する安全性薬理試験データと臨床曝露量の関係

ラット及びイヌの心血管系試験では血圧上昇がみられた。VEGFR チロシンキナーゼの阻害により血圧が上昇することから（Curwen et al 2008）、この作用は本薬の薬理作用に基づくものと考えられた。この結果は、血管内皮細胞が VEGF 刺激で一酸化窒素を放出することで血管緊張を調節しているという報告とも一致する（Kroll and Waltenberger 1999）。

ラットを用いた安全性薬理試験では、中枢神経系[1]、心血管系[2]、呼吸器系[3]、消化管系[4]及び腎／泌尿器系[5]に対する作用が認められたが、ラットの 1 カ月投与毒性試験やその他の毒性試験では、中枢神経系、呼吸器系及び消化管系に対する同様の所見はみられなかった。ラットの 1 カ月間反復投与毒性試験（TAR2937）において、25 又は 75 mg/kg/日を経口投与時の定常状態の曝露量（AUC_{SS}）はそれぞれ約 23000 ng.h/mL 及び約 34000 ng.h/mL であったのに対し、試験 98 で日本人 MTC 患者に 300 mg/日を反復経口投与したときの定常状態における AUC_{SS} は 28448 ng.h/mL であり（臨床薬理試験 2.7.2.2.1.6.1 項参照）、安全性薬理試験における用量範囲の曝露量は、臨床用量での曝露量と同等又はそれ以上と考えられた。

[1] 最小影響量：40 mg/kg（運動量低下）
無影響量：40 mg/kg（体重減少）、200 mg/kg（着地開脚幅減少）
[2] 最小影響量：12.5 mg/kg（血圧上昇）
[3] 無影響量：200 mg/kg（吸気流量増加、吸気時間短縮）
[4] 最小影響量：40 mg/kg（胃内容物排出速度及び腸管輸送能の低下）
[5] 最小影響量：50 mg/kg（尿中の塩素、カリウム及びタンパクの増加）

7　　参考文献一覧

Brave et al 2007a

Brave SR, Marshall G, Wainwright A, James N, Acheson N, Howard Z, et al. *In vitro* effects of vandetanib on VEGFR-2, EGFR and RET phosphorylation, endothelial cell tube formation, and tumor cell growth and survival. AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics 2007; San Francisco, CA. AACR Meeting Abstracts 2007; C189.

Brave et al 2011

Brave SR, Odedra R, James NH, Smith NR, Marshall GB, Acheson KL et al. Vandetanib inhibits both VEGFR-2 and EGFR signalling at clinically relevant drug levels in preclinical models of human cancer. Int J Oncol. 2011 Jul;39(1):271-8.

Carlomagno et al 2002

Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Ciardiello F, Tortora G, Vecchio G et al. ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. Cancer Res. 2002 Dec 15;62(24):7284-90.

Carlomagno et al 2004

Carlomagno F, Guida T, Anaganti S, Vecchio G, Fusco A, Ryan AJ et al. Disease associated mutations at valine 804 in the RET receptor tyrosine kinase confer resistance to selective kinase inhibitors. Oncogene. 2004 Aug 12;23(36):6056-63.

Castellone and Santoro 2008

Castellone MD, Santoro M. Dysregulated RET signaling in thyroid cancer. Endocrinol Metab Clin North Am. 2008 Jun;37(2):363-74, viii.

Ciardiello et al 2004

Ciardiello F, Bianco R, Caputo R, Caputo R, Damiano V, Troiani T, et al. Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to antiepidermal growth factor receptor therapy. Clin Cancer Res 2004;10:784-93.

Curwen et al 2008

Curwen JO, Musgrove HL, Kendrew J, Richmond GH, Ogilvie DJ, Wedge SR.Inhibition of vascular endothelial growth factor-a signaling induces hypertension: examining the effect of cediranib (recentin; AZD2171) treatment on blood pressure in rat and the use of concomitant antihypertensive therapy. Clin Cancer Res. 2008 May 15;14(10):3124-31.

Gerber et al 1999

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nat Med. 1999 Jun;5(6):623-8.

Gustafson et al 2006

Gustafson DL, Bradshaw-Pierce EL, Merz AL, Zirrolli JA. Tissue distribution and metabolism of the tyrosine kinase inhibitor ZD6474 (Zactima) in tumor-bearing nude mice following oral dosing. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Aug;318(2):872-80.

Hall et al 2006

Hall AP, Westwood FR, Wadsworth PF. Review of the effects of anti-angiogenic compounds on the epiphyseal growth plate. Toxicol Pathol. 2006;34(2):131-47.

Johanson et al 2007

Johanson V, Ahlman H, Bernhardt P, Jansson S, Kölby L, Persson F et al. A transplantable human medullary thyroid carcinoma as a model for RET tyrosine kinase-driven tumorigenesis. Endocr Relat Cancer. 2007 Jun;14(2):433-44.

Knaus et al 2007

Knaus AE, Muthig V, Schickinger S, Moura E, Beetz N, Gilsbach R et al. Alpha2-adrenoceptor subtypes--unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. Neurochem Int. 2007 Oct;51(5):277-81.

Ko et al 2005

Ko J, Ross J, Awad H, Hurwitz H, Klitzman B. The effects of ZD6474, an inhibitor of VEGF signaling, on cutaneous wound healing in mice. J Surg Res. 2005 Dec;129(2):251-9.

Kroll and Waltenberger 1999

Kroll J, Waltenberger J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Nov 30;265(3):636-9.

Otrock et al 2007

Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. Blood Cells Mol Dis. 2007 May-Jun;38(3):258-68.

Parsons and Ganellin 2006

Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. Br J Pharmacol. 2006 Jan;147 Suppl 1:S127-35.

Ryan et al 1999

Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL et al. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. Toxicol Pathol. 1999 Jan-Feb;27(1):78-86.

Vitagliano et al 2011

Vitagliano D, De Falco V, Tamburrino A, Coluzzi S, Troncone G, Chiappetta G et al. The tyrosine kinase inhibitor ZD6474 blocks proliferation of RET mutant medullary thyroid carcinoma cells. Endocr Relat Cancer. 2010 Nov 30;18(1):1-11.

Wakeling et al 2002

"Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Barker AJ et al. ZD1839 (Iressa): An Orally Active Inhibitor of Epidermal Growth Factor Signaling with Potential for Cancer Therapy. Cancer Res. 2002 Oct 15;62(20):5749-54."

Wedge et al 2002

Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA et al. ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. Cancer Res. 2002 Aug 15;62(16):4645-55.

White et al 2001

White ES, Strom SR, Wys NL, Arenberg DA. Non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity. J Immunol. 2001 Jun 15;166(12):7549-55.

Williams et al 2004

Williams KJ, Telfer BA, Brave S, Kendrew J, Whittaker L, Stratford IJ et al. ZD6474, a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling, combined with radiotherapy: schedule-dependent enhancement of antitumor activity. Clin Cancer Res. 2004 Dec 15;10(24):8587-93.

Wu et al 2007

Wu W, Onn A, Isobe T, Itasaka S, Langley RR, Shitani T et al. Targeted therapy of orthotopic human lung cancer by combined vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor signaling blockade. Mol Cancer Ther. 2007 Feb;6(2):471-83.

Xiang et al 2008

Xiang B, Chatti K, Qiu H, Lakshmi B, Krasnitz A, Hicks J et al. Brk is coamplified with ErbB2 to promote proliferation in breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Aug 26;105(34):12463-8.

2.6.3 薬理試験概要表

カプレルサ®錠 100 mg

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次　　頁

1.　薬理試験：一覧表 3
2.　効力を裏付ける試験....6
3.　副次的薬理試験....6
4.　安全性薬理試験....6
5.　薬力学的薬物相互作用試験....9

1. 薬理試験：一覧表

被験物質: バンデタニブ

Type of study	Test system	Method of administration	Testing Facility	Study number	Location in CTD
1.1 Primary pharmacology					
Enzyme assays on various kinases	Human recombinant enzyme	N.A. (*in vitro*)	[redacted] Germany	1770-2	4.2.1.1.1
Enzyme assays on mutant RET	Human recombinant enzyme	N.A. (*in vitro*)	University 'Federico II' Italy	Carlomagno et al 2004	4.2.1.1.2
Enzyme assays on wild type and mutant RET and EGFR	Human recombinant enzyme	N.A. (*in vitro*)	[redacted] UK	ASZ138abc	4.2.1.1.3
Effect on growth factors-stimulated cell growth	HUVEC	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	CIRA2	4.2.1.1.4
Effect on growth factors-stimulated cell growth	HUVEC	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Wedge et al 2002	4.2.1.1.11
Effects on cell growth, migration and survival	HPAEC, HUVEC and MLEC	N.A. (*in vitro*)	University of Texas M.D. Anderson Cancer Center USA	Wu et al 2007	4.2.1.1.5
Effect on tubule formation and morphology of HUVEC	HUVEC and human fibroblast	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	CIRA4	4.2.1.1.6
Effect on tubule formation and morphology of HUVEC	HUVEC and human fibroblasts	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Brave et al 2007a	4.2.1.1.7
Effect on pVEGFR-2 and pEGFR	HUVEC	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Brave et al 2007a	4.2.1.1.7
Effect on pVEGFR-2 and pEGFR	HUVEC	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Brave et al 2011	4.2.1.1.8
Effect on the growth of human NSCLC, CRC and SCCHN	Human NSCLC, CRC and SCCHN cell lines	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Brave et al 2007a	4.2.1.1.7
Effect on the growth of human NSCLC, CRC and SCCHN	Human NSCLC, CRC and SCCHN cell lines	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Brave et al 2011	4.2.1.1.8
Effect on RET-driven cell growth	Human thyroid tumour cells	N.A. (*in vitro*)	University 'Federico II' Italy	Carlomagno et al 2002	4.2.1.1.9
Effects on MTC tumor cell growth	MTC tumour cells	N.A. (*in vitro*)	University 'Federico II' Italy	Vitagliano et al 2011	4.2.1.1.10

Type of study	Test system	Method of administration	Testing Facility	Study number	Location in CTD
Effect on pEGFR and pVEGFR-2 in lung and tumor tissues	Human tumor (LOVO) bearing nude mice	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Brave et al 2011	4.2.1.1.8
Induction of apoptosis in lung tumor tissues	Human tumor (PC-9) bearing SCID mice	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Brave et al 2011	4.2.1.1.8
Effect on tumor angiogenesis and tumor necrosis	Human tumor (A549) bearing nude mice	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Wedge et al 2002	4.2.1.1.11
Impact on microvascular density and necrosis	Human tumor (Calu-6) bearing nude mice	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Wedge et al 2002	4.2.1.1.11
Effect on human tumour in xenografts and syngeneic murine tumours	Human or syngeneic tumor bearing mice	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Wedge et al 2002	4.2.1.1.11
Effect on MTC tumor growth	TT tumor bearing nude mice	*p.o.*	University 'Federico II' Italy	Vitagliano et al 2011	4.2.1.1.10
Effect on PTC tumor growth	RET/PTC3 bearing nude mice	*i.p.*	University 'Federico II' Italy	Carlomagno et al 2002	4.2.1.1.9
Enzyme inhibition of metabolites	Human recombinant enzyme	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	CIRA3	4.2.1.1.12
Effect of metabolites on growth factors-stimulated cell growth	HUVEC	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	CIRA2	4.2.1.1.4
1.2　Secondary Pharmacology					
Radioligand binding and enzyme assays	Molecular panel	N.A. (*in vitro*)	[redacted] Taiwan	0393SY	4.2.1.2.1
Radioligand binding and enzyme assays	Molecular panel	N.A. (*in vitro*)	[redacted] France	0585SY	4.2.1.2.2
VEGF-induced acute hypotension	Rat	*i.v.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Wedge et al 2002	4.2.1.1.11
Epiphyseal growth plate hypertrophy	Rat	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	Wedge et al 2002	4.2.1.1.11
Effects on cutaneous wound healing	Mouse	*p.o.*	Duke University Medical Center, USA	Ko et al 2005	4.2.1.2.3
1.3　Safety Pharmacology					
Effects on behavior and rectal temperature	Mouse	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	TSM1124	4.2.1.3.1

Type of study	Test system	Method of administration	Testing Facility	Study number	Location in CTD
Functional observational battery	Rat	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	1228SR	4.2.1.3.2
Effect on hERG potassium channel	hERG-expressing HEK cells	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	TSZ36	4.2.1.3.3
Effect on cardiac action potential	Isolated canine purkinje fibers	N.A. (*in vitro*)	[redacted] France	TSD1293	4.2.1.3.4
Effect on blood pressure (telemetry study)	Telemetered rat	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	CIRA10	4.2.1.3.5
Effect on cardiovascular system	Telemetered dog	*p.o.*	[redacted] UK	TKD1045	4.2.1.3.6
Effects on hemodynamic parameters	Anaesthetised dog	*i.v.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	0276SD	4.2.1.3.7
Combination effect with ondansetron on hERG potassium channel	hERG-expressing CHO cells	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	0102SZ	4.2.1.3.8
Combination effect with ondansetron on QTc (pilot study)	Anaesthetised dog	*i.v.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	0257SD	4.2.1.3.9
Combination effect with ondansetron on QTc	Anaesthetised dog	*i.v.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	0258SD	4.2.1.3.10
Effect on respiration system	Rat	*p.o.*	[redacted] France	1220SR	4.2.1.3.11
Effect on gastric emptying and intestinal motility	Rat	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	1290SR	4.2.1.3.12
Effect on diuretic function	Rat	*p.o.*	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	TSR2922	4.2.1.3.13
Effect of metabolites on hERG potassium channel	hERG-expressing HEK cells	N.A. (*in vitro*)	AstraZeneca Pharmaceuticals UK	0048SZ	4.2.1.3.14
1.4　Pharmacodynamic drug interactions					
N.A.					—

N.A. : Not Applicable

2. 効力を裏付ける試験

2.6.2 薬理試験の概要文に記載。

3. 副次的薬理試験

2.6.2 薬理試験の概要文に記載。

4. 安全性薬理試験

被験物質: バンデタニブ

Organ systems evaluated	Species/strain or test system	Method of administration and vehicle	Doses (mg/kg or M) [a]	Gender, number per group	Noteworthy findings	GLP compli-ance	Study number
Central nervous system (multi-observation)	Mouse / Alpk:AP$_f$CD-1	*p.o.* in 0.5% HPMC/0.1% polysorbate 80	0, 50	N = 5 males	There were no abnormal behavioural signs related to vandetanib, but there was a marginal increase in mean rectal temperature (+1.4ºC after 1 hour).	Yes	TSM1124
Central nervous system (functional observation battery)	Rat / AlpkHsdBrlHan:WIST	*p.o.* in 0.5% HPMC/0.1% polysorbate 80	0, 40, 200, 1000	N = 5-7 males	There was a decrease in open field activities at all dose levels, and a decrease in landing foot splay at 1000 mg/kg. There was also a dose-related decrease in body weight approx. 24 h post-dose (eg, -12.0 ± 2.8 g after the 1000 mg/kg dose).	Yes	1228SR
Cardiovascular	hERG-expressing HEK cells	*In vitro* 0.1% DMSO	10^{-7} M to 10^{-5} M	N = 5	Vandetanib was active with an IC_{50} of 0.4 μM.	No	TSZ36

Organ systems evaluated	Species/strain or test system	Method of administration and vehicle	Doses (mg/kg or M) [a]	Gender, number per group	Noteworthy findings	GLP compli-ance	Study number
Cardiovascular	Dog Purkinje fibre	*In vitro* 0.1% DMSO	10^{-7} M to 10^{-5} M	6 preps from male dogs	Vandetanib caused a concentration-dependent increase in APD_{90}, with the changes achieving statistical significance at concentrations of 1 μM and greater. The effect was greater at low frequency stimulation. Increases in APD_{90} were more pronounced under low potassium conditions.	Yes	TSD1293
Cardiovascular	Rat/Wistar	*p.o.*in 1% polysorbate	single dose: 12.5, 50 7 doses (once daily) :12.5	N = 3 males	A single dose of vandetanib produced a dose-dependent elevation of systolic and diastolic blood pressure. Marginal reductions in heart rate were observed. Chronic dosing resulted in greater increases in systolic and diastolic blood pressure than those following a single dose.	No	CIRA10
Cardiovascular Telemetry (conscious)	Dog / Beagle	*p.o.* in 0.5% HPMC/0.1% polysorbate 80	5, 15 and 40	N = 4 males	Vandetanib had no effect on cardiovascular parameters at all doses except for a decrease in heart rate at the highest dose. This decrease in heart rate was significant at 90, 180 and 360 min post-administration (mean heart rate was approximately 25 beats per min lower than vehicle at these time points).	Yes	TKD1045
Cardiovascular (anaesthetised)	Dog / Alderley Park Beagle	IV bolus and infusions in water containing 15% hydroxypropyl-β-cyclodextrin and 1.6% mannitol, pH adjusted	0.2, 0.67, 2, 6.7, 13.4	N = 4 males	Vandetanib caused an increase in QTcV over the 0.67-13.4 mg/kg dose range. The QTcV increase was up to 16% (total plasma exposure : 1.4 μM). A dose-related increase in T-wave amplitude and polarity were seen at 6.7 mg/kg dose and above, with slight changes occasionally observed at lower doses. A dose of 0.2 mg/kg vandetanib was a no-effect level for ECG waveform morphology. There were no indications from this study that vandetanib causes coronary constriction, leading to local ischemia.	Yes	0276SD

Organ systems evaluated	Species/strain or test system	Method of administration and vehicle	Doses (mg/kg or M) [a]	Gender, number per group	Noteworthy findings	GLP compli-ance	Study number
Cardiovascular	hERG potassium channel expressing CHO cells	*In vitro* 0.1% DMSO	Combination of vandetanib (0.4 μM) and ondansetron (1 μM)	N = 4	Co-application of vandetanib and ondansetron resulted in approximately 70% inhibition.	No	0102SZ
Cardiovascular (anaesthetised)	Dog / Alderley Park Beagle	IV bolus and continuous infusions (over 45 minutes) in water containing hydroxypropyl-β-cyclodextrin and mannitol	Vandetanib: 5.19, 20.75, 27.5 Ondansetron (antiemetic): 1, 1.5, 3	N = 2 males	Dose-related increases in T-wave amplitude, QTcV and femoral mean blood pressure in anaesthetised dog study were seen where vandetanib was administered alone. Ondansetron caused a dose-related increase in QTcV.	No	0257SD
Cardiovascular (Anaesthetised)	Dog / Alderley Park Beagle	IV bolus and continuous infusions (over 45 minutes) in water containing hydroxypropyl-β-cyclodextrin and mannitol	Vandetanib: 20.75 Ondansetron (antiemetic): 1, 1.5, 3	N = 4 males	Prior exposure to ondansetron inhibited the expected increase in QTcV to vandetanib. The combination of vandetanib and ondansetron did not cause a further increase in QTcV than that seen for ondansetron alone.	Yes	0258SD
Respiratory	Rat / Wistar - RJ: WI (IOPS Han)	*p.o.* in 0.5% HPMC/0.1% polysorbate 80	0, 40, 200 or 1000	N = 8 males	At a dose of 1000 mg/kg, vandetanib induced an increase in peak inspiratory flow associated with a decrease in inspiration time.	Yes	1220SR
Gastric Function	Rat / AzHsdBrlHan: WIST	*p.o.* in 0.5% HPMC/0.1% polysorbate 80	0, 40, 200 or 1000	N = 10 males	Vandetanib treatment caused inhibition of gastric emptying and intestinal transit at all doses.	Yes	1290SR

Organ systems evaluated	Species/strain or test system	Method of administration and vehicle	Doses (mg/kg or M) [a]	Gender, number per group	Noteworthy findings	GLP compli-ance	Study number
Renal function	Rat / Alpk:AP$_f$SD	*p.o.* in 0.5% HPMC/0.1% polysorbate 80	0, 50	N = 5 females	In urine samples collected 6 to 24 hours post-dose there was a significant decrease in chloride and potassium content, potassium concentration and significant increase in total protein concentration in animals treated with vandetanib. Vandetanib had no effect on clinical chemistry parameters.	No	TSR2922
Cardiovascular	hERG-expressing HEK cells	*In vitro* 0.1% DMSO	3.16×10^{-8} M to 1×10^{-5} M M382558 or M447882	M382558 (N = 4) M447882 (N = 5).	M382558 (N-desmethyl-vandetanib) and M447882 (Vandetanib N-oxide) (human metabolites of vandetanib) were shown to be active in the hERG assay with IC_{50} values of 1.3 μM and 4.0 μM respectively.	No	0048SZ

a Single dose unless specified otherwise. M : mol/L

5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。