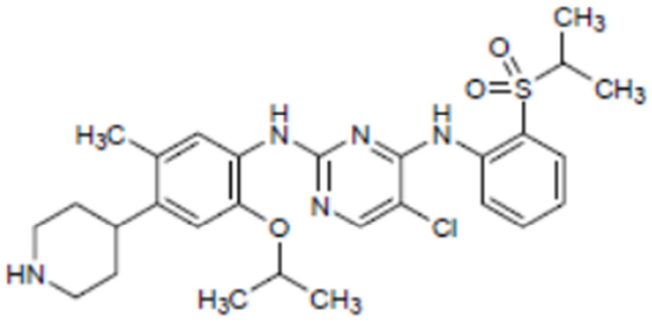
2.6.1　緒言

1 緒言

セリチニブ（LDK378，5-Chloro-N^2-{5-methyl-4-(piperidin-4-yl)-2-[(propan-2-yl)oxy]phenyl}-N^4-[2-(propan-2-ylsulfonyl)phenyl]pyrimidine-2,4-diamine）は，未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）におけるアデノシン三リン酸結合部位を強力かつ選択的に阻害する抗悪性腫瘍薬である。本薬の構造式を以下に示す（Figure 1-1）。

Figure 1-1 セリチニブの化学構造式



ALK は染色体再構成（転座・逆位），点変異及び遺伝子増幅により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が，セリチニブは，ALK の自己リン酸化を阻害することで下流のシグナル伝達蛋白質のリン酸化を阻害し，非臨床試験では *in vitro* 及び *in vivo* で ALK 依存的な癌細胞の増殖を抑制することが示されている。

また，臨床試験により，セリチニブを経口投与したときの安全性，忍容性，薬物動態，及び有効性が検討されており，*ALK* 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌患者に対して治療効果を示す臨床成績が得られている。

セリチニブの予定する効能又は効果並びに用法及び用量を以下に示す。

【効能又は効果】

他の ALK 阻害剤に抵抗性又は不耐容の *ALK* 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌

【用法及び用量】

通常，成人にはセリチニブとして 1 回 750 mg を 1 日 1 回，空腹時に経口投与すること。なお，患者の状態により適宜減量する。

2.6.2　薬理試験の概要文

目　次

目　次 2
表 一 覧 3
図 一 覧 3
略号一覧 5
1 薬理試験の概要文 7
1.1 まとめ 7
2 効力を裏付ける試験 8
2.1 標的分子に対するキナーゼ阻害活性と選択性（*in vitro*） 9
2.1.1 組換え蛋白質キナーゼに対するセリチニブ及びクリゾチニブの活性及び選択性 9
2.1.2 細胞に導入した蛋白質キナーゼに対するセリチニブの活性及び選択性 9
2.1.3 クリゾチニブ耐性変異を有する EML4-ALK 融合キナーゼに対するセリチニブの活性 11
2.1.4 ALK シグナル伝達経路に対する作用 11
2.2 *In vitro* 細胞増殖阻害作用 13
2.2.1 *ALK* 遺伝子異常を有するヒト癌細胞株に対する作用 13
2.2.2 ヒト NSCLC 細胞株パネルにおける作用 14
2.2.3 クリゾチニブとの比較 16
2.2.4 クリゾチニブ耐性 *ALK* 変異を有する細胞に対するセリチニブの細胞増殖阻害作用 16
2.2.5 アレクチニブ耐性 *ALK* 変異を有する細胞に対するセリチニブの細胞増殖阻害作用 17
2.3 *In vivo* における薬理作用 17
2.3.1 異種移植腫瘍モデルマウスにおける抗腫瘍効果 17
2.3.2 異種移植腫瘍モデルラットにおける抗腫瘍効果 19
2.3.3 クリゾチニブとの *in vivo* 抗腫瘍効果の比較 21
2.3.4 クリゾチニブ耐性腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果 22
2.3.5 クリゾチニブ耐性患者由来細胞を用いた腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果 27
2.3.6 その他の *in vivo* 薬理試験 28
3 副次的薬理試験 31
3.1 *In vitro* 薬理試験 31
3.1.1 その他の標的に対する *in vitro* での選択性 31
3.2 *In vivo* 薬理試験 32
3.2.1 IGF-1R 経路への影響 32

3.2.2 糖代謝への影響 32
4 安全性薬理試験 33
4.1 心血管系に及ぼす影響 33
4.1.1 hERG チャネルアッセイ 33
4.1.2 サルを用いたテレメトリー試験 33
4.2 中枢神経系に及ぼす影響 34
4.3 呼吸に及ぼす影響 34
5 薬力学的薬物相互作用試験 34
6 考察及び結論 34
7 参考文献 37

表一覧

Table 2-1 組換え蛋白質キナーゼ 36 種類のパネルにおけるセリチニブ及びクリゾチニブの活性 9
Table 2-2 Ba/F3 細胞に導入した EML4-ALK あるいは NPM-ALK に対するセリチニブの活性 10
Table 2-3 Ba/F3 細胞に導入した TEL 融合キナーゼに対するセリチニブの活性 10
Table 2-4 変異型 ALK に対するセリチニブ及びクリゾチニブの活性 11
Table 2-5 *ALK* 遺伝子異常を有するヒト癌細胞株に対するセリチニブの細胞増殖阻害作用 13
Table 2-6 *EML4-ALK* 陽性ヒト癌細胞株 NCI-H2228 及び H3122 に対するセリチニブとクリゾチニブの IC50 値 16
Table 2-7 クリゾチニブ耐性 *ALK* 変異を有する細胞に対するセリチニブ及びクリゾチニブの細胞増殖阻害作用 16
Table 2-8 クリゾチニブ耐性を示し *ALK* 変異を有さない臨床分離細胞に対するセリチニブ及びクリゾチニブの細胞増殖阻害作用 17
Table 2-9 アレクチニブ耐性 *ALK* 変異を有する臨床分離細胞に対するセリチニブ，アレクチニブ及びクリゾチニブの細胞増殖阻害作用 17
Table 2-10 Karpas299 腫瘍モデルマウスにおけるセリチニブの抗腫瘍効果 19
Table 2-11 Karpas299 腫瘍モデルラットにおけるセリチニブの抗腫瘍効果 21
Table 2-12 *ALK* I1171T 変異を有するクリゾチニブ耐性 NCI-H2228 腫瘍モデルにおける血漿中薬物動態パラメータ（14 日目） 24
Table 2-13 *ALK* C1156Y 変異を有するクリゾチニブ耐性 NCI-H2228 腫瘍モデルにおける血漿中薬物動態パラメータ（11 日目） 26

図一覧

Figure 2-1 セリチニブによる ALK 及び STAT3 のリン酸化阻害 12

Figure 2-2 セリチニブによる ALK，AKT，ERK 及び S6 のリン酸化阻害 13
Figure 2-3 NSCLC 細胞株 95 種類の *ALK* 発現量及びセリチニブ感受性 15
Figure 2-4 NCI-H2228 腫瘍モデルマウスにおけるセリチニブの抗腫瘍効果 18
Figure 2-5 NCI-H2228 腫瘍モデルラットにおけるセリチニブの抗腫瘍効果 20
Figure 2-6 NCI-H2228 腫瘍モデルマウスにおけるセリチニブとクリゾチニブの抗腫瘍効果の比較 22
Figure 2-7 *ALK* I1171T 変異を有するクリゾチニブ耐性 NCI-H2228 腫瘍モデルにおけるセリチニブ及びクリゾチニブの効果 24
Figure 2-8 *ALK* C1156Y 変異を有するクリゾチニブ耐性 NCI-H2228 腫瘍モデルにおけるセリチニブ及びクリゾチニブの効果 25
Figure 2-9 *ALK* 非変異型クリゾチニブ耐性 NCI-H2228 腫瘍モデルにおけるセリチニブ及びクリゾチニブの効果 27
Figure 2-10 *ALK* L1196M 変異を有するクリゾチニブ耐性 MGH045 腫瘍モデルにおけるセリチニブ及びクリゾチニブの効果 28
Figure 2-11 セリチニブ単回経口投与後の Karpas299 腫瘍モデルマウスの pSTAT3 阻害と薬物濃度との相関性 29

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
ALCL	Anaplastic large-cell lymphoma	未分化大細胞リンパ腫
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
ANOVA	Analysis of variance	分散分析
AUC0-24h	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to time 24 hour	0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
Cmax	Maximum concentration	最高濃度
EC50	Effective concentration by 50%	50%有効濃度
EML4	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	微小管会合蛋白質 4
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	細胞外シグナル制御キナーゼ
FPKM	Fragments per kilobase of mRNA per million mapped reads	-
GLP	Good Laboratory Practices	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GPCR	G protein-coupled receptor	G 蛋白質共役受容体
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IC50	Concentration required to inhibit effects by 50%	50%阻害濃度
IGF	Inslin-like growth factor	インスリン様成長因子
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	インスリン様成長因子 1 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
JAK	Janus kinase	ヤヌスキナーゼ
LCK	Lymphocyte kinase	-
MEK	Mitogen-activated ERK kinase	マイトジェン活性化 ERK キナーゼ
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐容量
NPM	Nucleophosmin	ヌクレオフォスミン。核小体リン酸化蛋白質のひとつ
NSCLC	Non-small l cell lung cancer	非小細胞肺癌
OGTT	Oral glucose tolerance test	経口ブドウ糖負荷試験
pAKT	Phospholyrated AKT	リン酸化 AKT
pALK	Phospholyrated ALK	リン酸化 ALK
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase	ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ
PK/PD	Pharmacokinetics/Pharmacodynamic	薬物動態学／薬力学
pSTAT3	Phospholyrated STAT3	リン酸化 STAT3
PXR	Pregnane X receptor	プレグナン X 受容体
SST	Somatostatin receptor	ソマトスタチン受容体

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
STAT	Signal transducer and activator of transcription	シグナル伝達兼転写因子
T/C	Tumor value (change) divided by control value (change)	溶媒対照群（C）の腫瘍体積（変化）で除した薬物投与群（T）の腫瘍体積（変化） 100 × [(被験薬投与群の day x の腫瘍体積) − (被験薬投与群の day 1 の腫瘍体積)]/[(溶媒対照群の day x の腫瘍体積) − (溶媒対照群の day 1 の腫瘍体積)] ただし，腫瘍退縮の場合は, 100 × ([(被験薬投与群の day x の腫瘍体積) − (被験薬投与群の day 1 の腫瘍体積)])/[(被験薬投与群の day 1 の腫瘍体積)])
TEL	Translocation Ets Leukemia	転写因子の 1 つ

1 薬理試験の概要文

1.1 まとめ

セリチニブ（LDK378）は，未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）を強力かつ選択的に阻害するアデノシン三リン酸（ATP）競合性の経口阻害剤である。ALK は染色体再構成（転座・逆位），点変異及び遺伝子増幅により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。セリチニブの薬理作用を明らかにするために生化学アッセイ，細胞を用いた試験及び *in vivo* 試験を実施した。

36 種類の蛋白質キナーゼを対象とした *in vitro* 生化学アッセイでは，セリチニブは ALK を IC50 値 0.15 nM で阻害し，その他のキナーゼと比べ，約 50 倍以上高い選択性を示した。セリチニブは細胞内に導入した融合型蛋白質キナーゼのうち，微小管会合蛋白質 4（EML4）と ALK の融合蛋白質（EML4-ALK）及びヌクレオフォスミン（NPM）と ALK の融合蛋白質（NPM-ALK）に対して阻害作用を示し，IC50 値はそれぞれ 27 及び 35 nM であった。*ALK* キナーゼドメイン内にクリゾチニブ耐性変異を有する *EML4-ALK* を細胞内に導入し，セリチニブの阻害活性を検討した結果，非変異型 *EML4-ALK*（IC50 = 31 nM）と比べ *ALK* の変異（C1156Y，L1196M，G1202R 及び I1171T）によりセリチニブの阻害活性は低下したが（IC50 値はそれぞれ 160，69，940 及び 38 nM），非変異型及びいずれの変異型 ALK に対してもクリゾチニブと比べ高い活性を示した。また，セリチニブは *NPM-ALK* 陽性の Karpas299 細胞（ヒト未分化大細胞リンパ腫（ALCL））や *EML4-ALK* 陽性の NCI-H2228 細胞（ヒト非小細胞肺癌（NSCLC））における ALK 及び ALK シグナル伝達経路の下流に存在するシグナル伝達兼転写因子（STAT）3，AKT，細胞外シグナル制御キナーゼ（ERK）及び S6 のリン酸化を濃度依存的に阻害した。

セリチニブは *in vitro* における Karpas299，NCI-H2228 及び NB-1 細胞（*ALK* 遺伝子増幅型ヒト神経芽細胞腫）の増殖を阻害し，IC50 値はそれぞれ 45，11 及び 24 nM であった。また，ヒト NSCLC 細胞株 95 種類のうち，*EML4-ALK* 陽性細胞株である NCI-H2228 細胞に対しセリチニブは最も高い感受性を示した（相対的 IC50 = 0.8 μM）。セリチニブは，NCI-H2228 及び H3122 細胞（*EML4-ALK* 陽性ヒト NSCLC），H3122 CR1，MGH045 及び MGH021-4 細胞（クリゾチニブ耐性 *ALK* 変異型 NSCLC），MGH051 細胞（クリゾチニブ耐性 *ALK* 非変異型 NSCLC）の増殖を，クリゾチニブと比べ強力に阻害した。さらに，セリチニブは，アレクチニブ耐性 *ALK* 変異型 NSCLC である MGH056-1 細胞の増殖についても，アレクチニブ及びクリゾチニブと比べ強力に阻害した。

In vivo では，NCI-H2228 及び Karpas299 細胞の異種移植腫瘍モデルマウス及びラットを用いてセリチニブの反復経口投与による抗腫瘍効果を検討したところ，25 mg/kg 以上の用量ですべてのモデルにおいて腫瘍の退縮が認められた。また，NCI-H2228 腫瘍モデルマウスに対し，セリチニブはクリゾチニブより低用量で腫瘍を完全に退縮させた。投与中止後，クリゾチニブ投与群では

1～2 週間以内に腫瘍が再増殖したが，セリチニブ投与群ではほとんどのマウスにおいて，試験終了（投与中止後 184 日目）まで完全退縮が継続した。人為的クリゾチニブ耐性腫瘍モデルマウスを用いた検討では，*ALK* キナーゼドメイン内の I1171T 変異あるいは C1156Y 変異によるクリゾチニブ耐性腫瘍に対し，セリチニブをそれぞれ 50 及び 100 mg/kg の用量で投与することにより腫瘍の完全退縮が認められ，*ALK* 非変異型クリゾチニブ耐性腫瘍に対しては，セリチニブを 50 mg/kg 以上の用量で投与することにより腫瘍の退縮が認められた。さらに，NSCLC 患者由来の L1196M *ALK* 変異型 MGH045 腫瘍モデルに対し，セリチニブを 25 mg/kg の用量で投与することにより腫瘍増殖抑制がみられた。同所性の Karpas299 腫瘍モデルマウスを用いて腫瘍内 STAT3 のリン酸化阻害作用を検討した結果，セリチニブを 12.5 mg/kg の用量で投与した場合，投与 16 時間後まで約 60%の阻害がみられ，25 mg/kg 以上の用量では，60%以上の阻害が投与 24 時間後まで維持されていた。

副次的薬理試験では，G 蛋白質共役受容体（GPCR），トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体及び酵素からなるパネルを用いてセリチニブの選択性について評価した。細胞機能試験（カルシウム流入）で活性を示したのはドパミン D2 受容体に対してのみであった（EC50 = 6.0 μM）。また，プレグナン X 受容体（PXR）依存的 CYP3A4 誘導について，セリチニブは弱い活性（最大で 9.8%）を示した。*In vivo* では，IGF-1R を介したシグナル伝達に生存／増殖が依存する腫瘍モデルを用いて，IGF-1R 経路へのセリチニブの影響を検討したが，セリチニブは IGF-1R 及び AKT のリン酸化を抑制しなかった。また，マウス経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）では，セリチニブの経口投与により検討したいずれの用量においても血糖値に有意な影響を与えず，また空腹時血漿中インスリン濃度にも影響を及ぼさなかった。

セリチニブの安全性薬理試験として，*in vitro*（hERG［human ether-a-go-go related gene］チャネルアッセイ）及び *in vivo*（テレメトリー試験）での心血管系への影響に関する試験，並びにラットを用いた中枢神経系及び呼吸系への影響に関する試験を実施した。hERG チャネルアッセイにおいてセリチニブは hERG 電流を阻害し，50%阻害濃度（IC50）は 0.4 μM であった。GLP 非適用のカニクイザルを用いたテレメトリー試験では，250 mg/kg の単回経口投与において心血管系への影響はみられなかったが，GLP 適用のカニクイザルを用いたテレメトリー試験では，100 mg/kg の単回経口投与において 4 例中 1 例で QTc 間隔の延長が認められた。ラットを用いた中枢神経系及び呼吸系への影響に関する試験では，100 mg/kg の単回経口投与において，セリチニブ投与に関連した変化は認められなかった。

以上の *in vitro* 及び *in vivo* で得られた薬理データから，セリチニブは *ALK* 融合遺伝子陽性 NSCLC の増殖を阻害すると考えられた。

2 効力を裏付ける試験

経口 ALK 阻害剤であるセリチニブの薬理作用を明らかにするために *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験を実施した。

2.1 標的分子に対するキナーゼ阻害活性と選択性（*in vitro*）

2.1.1 組換え蛋白質キナーゼに対するセリチニブ及びクリゾチニブの活性及び選択性

組換え ALK 及びその他 35 種類の蛋白質キナーゼに対するセリチニブ及びクリゾチニブの阻害活性について，キャピラリー電気泳動によるモビリティーシフト法により検討した。本キナーゼパネルの中でセリチニブが最も強力に阻害したキナーゼは ALK であり，その IC50 値は 0.15 nM であった。インスリン受容体（INSR）及びインスリン様成長因子 1 受容体（IGF-1R）に対するセリチニブの IC50 値はそれぞれ 7 及び 8 nM であり，セリチニブは ALK に対し約 50 倍の選択性を示した。検討したその他すべてのキナーゼに対するセリチニブの IC50 値は 100 nM を上回っていた。一方，クリゾチニブも ALK を最も強力に阻害したが（IC50 = 3 nM），グリベック耐性変異（T315I）Abelson kinase（cABL-T315I），MET，AXL，Aurora kinase A（AURORA-A），ヤヌスキナーゼ 2（JAK2）及び Lymphocyte kinase（LCK）の 6 種類のキナーゼに対して IC50 値 100 nM 未満の阻害作用を示した。その他のキナーゼに対する IC50 値は，いずれも 100 nM を上回った。ALK に対する阻害活性は，クリゾチニブと比べセリチニブは 20 倍強力であった（Table 2-1）[Table 2.6.3.1-RD-2010-00649，Table 2.6.3.1-RD-2010-00651]。

Table 2-1 組換え蛋白質キナーゼ 36 種類のパネルにおけるセリチニブ及びクリゾチニブの活性

キナーゼ	セリチニブ IC50 値（nM）[a]	クリゾチニブ IC50 値（nM）[b]
ALK	0.15[c]	3 ± 1.7
INSR	7 ± 1.3	290 ± 71
IGF-1R	8 ± 3.5	400 ± 240
MET	3200 ± 640	8 ± 3.6
cABL-T315I	130 ± 12	6 ± 2.1
AXL	180 ± 26	13 ± 7.8
AURORA-A	110 ± 15	60 ± 52
JAK2	600 ± 170	60 ± 31
LCK	600 ± 180	80 ± 40

a：Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-00649]

b：Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-00651]

数値は平均値 ± 標準偏差を示す（n = 3）。

c：3 例中 1 例で IC50 値が試験最低濃度を下回ったため，標準偏差は算出していない。

本表にはセリチニブ又はクリゾチニブのいずれかの IC50 値が 100 nM 未満であったキナーゼのみを示す。

2.1.2 細胞に導入した蛋白質キナーゼに対するセリチニブの活性及び選択性

Ba/F3 細胞はインターロイキン-3（IL-3）依存的に増殖及び生存するマウス pro-B リンパ腫細胞株であるが，活性型蛋白質キナーゼを導入し，安定発現させることで IL-3 非依存的に増殖及び生存する。*EML4-ALK* 又は *NPM-ALK* を発現する Ba/F3 細胞を作製し，導入したルシフェラーゼ活

性を細胞の成長及び増殖の指標として，細胞内の EML4-ALK 及び NPM-ALK に対するセリチニブの阻害活性を評価した。セリチニブは Ba/F3-EML4-ALK 細胞及び Ba/F3-NPM-ALK 細胞の増殖を阻害し，IC50 値はそれぞれ 27 及び 35 nM であった。一方，IL-3 依存性野生型 Ba/F3 細胞の増殖に対してセリチニブはほとんど活性を示さず，IC50 値は 4970 nM であった（Table 2-2）[Table 2.6.3.1-RD-2009-50672]。

Table 2-2 Ba/F3 細胞に導入した EML4-ALK あるいは NPM-ALK に対するセリチニブの活性

アッセイ	IC50 値（nM）
Ba/F3-EML4-ALK[a]	27 ± 9
Ba/F3-NPM-ALK	35 ± 15
Ba/F3-WT	4970 ± 2920

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2009-50672]
WT：野生型
数値は平均値 ± 標準偏差を示す（n = 4）。
a：*EML4-ALK* はバリアント 3 を用いた。

また，キナーゼを Translocation Ets Leukemia（TEL）と融合し，二量体を形成させ安定発現させることで，増殖及び生存が IL-3 非依存的となった 39 種類の Ba/F3 細胞を作製し，ルシフェラーゼ活性を指標にセリチニブの阻害活性を評価した。これら Ba/F3 細胞のうち，セリチニブは ALK の類縁分子である IGF-1R（IC50 = 220 nM），INSR（IC50 = 400 nM）及び ROS1（IC50 = 180 nM）を発現させた Ba/F3 細胞の増殖を阻害したが，その他の融合キナーゼを導入した Ba/F3 細胞に対する IC50 値はいずれも 1000 nM を上回った（Table 2-3）[Table 2.6.3.1-RD-2009-50670, Table 2.6.3.1-RD-2009-50673]。

セリチニブの IGF-1R 及び INSR に関連する作用については，*in vivo* での IGF-1R 薬力学的試験及び OGTT によりさらに評価した（3.2 項）。

Table 2-3 Ba/F3 細胞に導入した TEL 融合キナーゼに対するセリチニブの活性

アッセイ	IC50 値（nM）
Ba/F3-WT	1890 ± 320
Ba/F3-TEL-ALK	60 ± 0
Ba/F3-TEL-IGF-1R	220 ± 20
Ba/F3-TEL-INSR	400 ± 50
Ba/F3-TEL-ROS1	180 ± 20

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2009-50670]
本表には，Ba/F3-WT 細胞を除き IC50 値が 1000 nM 未満であった Ba/F3 細胞のみを示す。
数値は平均値 ± 標準偏差を示す（n = 2）。

2.1.3 クリゾチニブ耐性変異を有する EML4-ALK 融合キナーゼに対するセリチニブの活性

クリゾチニブは *EML4-ALK* 陽性 NSCLC 患者において効果を示すが，患者は 1～2 年以内にクリゾチニブ耐性となり，病態が進行する（Shaw and Engelman 2013）。クリゾチニブの投与中に進行が認められた一部の NSCLC 患者で *ALK* キナーゼドメイン内に二次変異が検出され，この二次変異がクリゾチニブへの耐性獲得の原因であると考えられている。これらの二次変異には，C1156Y，ゲートキーパー変異 L1196M，G1202R 及びその他数種類の変異が含まれる（Voena and Chiarle 2012, Shaw and Engelman 2013）。これらの変異によりクリゾチニブ耐性に至る正確な機序については十分に解明されていないが，これらの変異が ALK 阻害剤の効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。

2.1.2 項と同様の方法で *ALK* キナーゼドメイン内にクリゾチニブ耐性変異を有する EML4-ALK に対するセリチニブの阻害活性を評価するとともに，クリゾチニブと比較した。*ALK* 変異によりクリゾチニブ及びセリチニブの活性低下が認められたが，非変異型及びいずれの変異型 ALK に対してもクリゾチニブと比べセリチニブのほうが活性が高いことが示された（Table 2-4）[Table 2.6.3.1-RD-2013-50375]。たとえば，ゲートキーパー変異 L1196M（Choi et al. 2010, Katayama et al. 2012, Doebele et al. 2012, Huang et al. 2013, Gainor et al. 2013）に対するセリチニブの IC50 値（69 nM）は，クリゾチニブの L1196M 変異に対する IC50 値（1460 nM）や非変異型 EML4-ALK に対する IC50 値（160 nM）よりも低値であった。

Table 2-4 変異型 ALK に対するセリチニブ及びクリゾチニブの活性

変異体	セリチニブ IC50 値（nM）	クリゾチニブ IC50 値（nM）
EML4-ALK	31 ± 2	160 ± 20
EML4-ALK C1156Y	160 ± 10	440 ± 80
EML4-ALK L1196M	69 ± 7	1460 ± 230
EML4-ALK G1202R	940 ± 270	1370 ± 100
EML4-ALK I1171T	38 ± 1	340 ± 80

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2013-50375]
数値は平均値 ± 標準偏差を示す（n = 4）。
本試験での EML4-ALK はバリアント 3a を用いた。

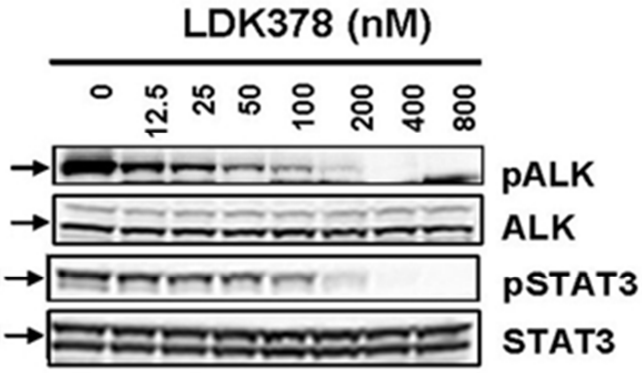
2.1.4 ALK シグナル伝達経路に対する作用

恒常活性型 ALK は，下流のシグナル伝達蛋白質のリン酸化及び経路の活性化を媒介する。このような経路として，PI3K/AKT，RAS/MEK/ERK，ホスホリパーゼ C-γ 及び JAK/STAT がある。特に，JAK/STAT 経路は，ALCL 細胞の増殖及び生存には NPM-ALK による STAT3 の過剰リン酸化が重要な役割を果たしていると考えられている（Chiarle et al. 2008）。

2.1.4.1 Karpas299 細胞における ALK 及び STAT3 のリン酸化阻害

NPM-ALK を発現するヒト ALCL 細胞株である Karpas299 細胞を種々の濃度のセリチニブとともに培養し，細胞内 ALK 及び STAT3 のチロシンリン酸化状態をリン酸化 ALK（pALK）抗体及びリン酸化 STAT3（pSTAT3）抗体を用いたウエスタンブロット法により観察した。セリチニブは ALK 及び STAT3 のリン酸化を濃度依存的に阻害した（Figure 2-1）[Table 2.6.3.1-RD-2008-50914]。

Figure 2-1 セリチニブによる ALK 及び STAT3 のリン酸化阻害



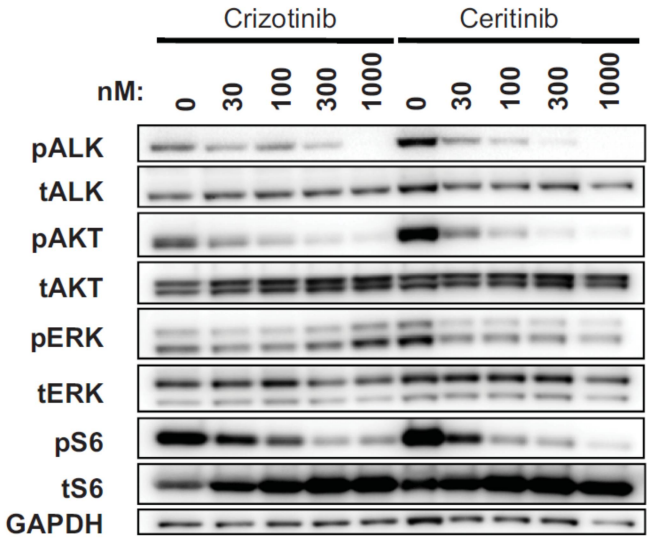
Source：Table 2.6.3.1-RD-2008-50914

Karpas299 細胞をプレートに播種後，記載の終濃度となるようセリチニブを添加した。37°C で 2 時間インキュベート後の細胞を回収し，得られたライセートを ALK 抗体，pALK 抗体，STAT3 抗体及び pSTAT3 抗体を用いたウエスタンブロット法に供し，ALK 及び STAT3 のリン酸化状態を観察した。

2.1.4.2 NCI-H2228 細胞における下流シグナル伝達蛋白質のリン酸化阻害

EML4-ALK を発現するヒト NSCLC 細胞株である NCI-H2228 細胞を種々の濃度のセリチニブとともに培養し，細胞内 ALK，AKT，ERK 及び S6 のチロシンリン酸化状態を pALK，リン酸化 AKT（pAKT），リン酸化 ERK（pERK）及びリン酸化 S6（pS6）抗体を用いたウエスタンブロット法により観察した。セリチニブは ALK，AKT，ERK 及び S6 のリン酸化を濃度依存的に阻害した（Figure 2-2）[Table 2.6.3.1-Friboulet et al. 2014]。

Figure 2-2　　セリチニブによる ALK，AKT，ERK 及び S6 のリン酸化阻害



Source：Table 2.6.3.1-Friboulet et al. 2014

NCI-H2228 細胞をプレートに播種後，記載の終濃度となるようセリチニブ又はクリゾチニブを添加した。37°C で 6 時間インキュベート後の細胞を回収し，得られたライセートを ALK，pALK，AKT，pAKT，ERK，pERK，S6 及び pS6 抗体を用いたウエスタンブロット法に供し，ALK，AKT，ERK 及び S6 のリン酸化状態を観察した。

2.2　*In vitro* 細胞増殖阻害作用

2.2.1　*ALK* 遺伝子異常を有するヒト癌細胞株に対する作用

ALK 遺伝子の転座又は増幅といった遺伝子異常を有するヒト癌細胞株の増殖及び生存に対するセリチニブの阻害作用を検討した。レトロウイルスによりルシフェラーゼ遺伝子を導入した Karpas299 細胞，NCI-H2228 細胞及び全長の野生型 *ALK* 遺伝子増幅を示すヒト神経芽細胞腫である NB-1 細胞を，種々の濃度のセリチニブとともに 3 日間培養後，ルシフェラーゼ活性を測定することにより増殖阻害作用を評価した。セリチニブは Karpas299（IC50 = 45 nM），NCI-H2228（IC50 = 11 nM）及び NB-1（IC50 = 24 nM）細胞の増殖を濃度依存的に抑制した（Table 2-5）[Table 2.6.3.1-RD-2008-50914, Table 2.6.3.1-RD-2010-50442]。

Table 2-5　　*ALK* 遺伝子異常を有するヒト癌細胞株に対するセリチニブの細胞増殖阻害作用

細胞	IC50 値（nM）
Karpas299（*NPM-ALK*+, ALCL）	45 ± 25[a]
NCI-H2228（*EML4-ALK*+, NSCLC）	11 ± 1[a]
NB-1（*ALK* 増幅，神経芽細胞腫）	24 ± 4[b]

a：Source：[Table 2.6.3.1-RD-2008-50914]

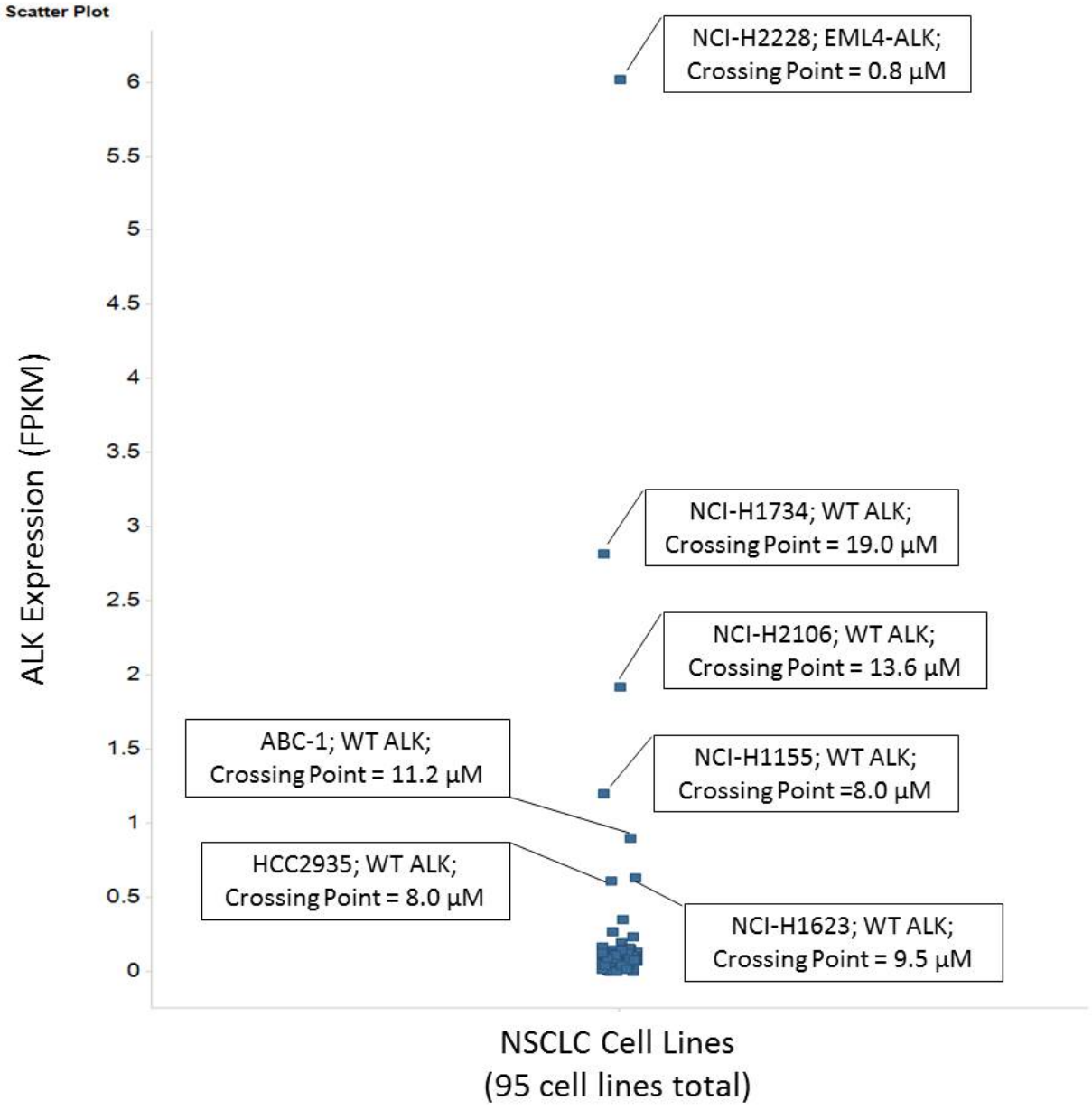
b：Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-50442]

数値は平均値 ± 標準偏差を示す。a については，独立した 4 回の試験で得られた平均値（各試験において n = 2～3）から算出した平均値 ± 標準偏差で示した。b については n = 3。

2.2.2 ヒト NSCLC 細胞株パネルにおける作用

セリチニブの細胞増殖阻害作用について，95 種類のヒト NSCLC 細胞株からなるパネルを用いて検討した。各細胞に種々の濃度のセリチニブを添加して 72 時間培養後，ATP 量を測定し生細胞数を決定した。細胞傷害性化合物 MG132（プロテアソーム阻害剤，1 μM）を最大増殖阻害の陽性対照として使用し，陰性対照（溶媒）との間の 50%増殖阻害が得られるために必要な濃度を相対的 IC50 値とした。また，95 種類の細胞株における *ALK* 発現量は RNA-seq 技術により RNA の配列データから算出した FPKM 値として表した。野生型 *ALK* を有する NSCLC 細胞株は，セリチニブへの感受性は低く（相対的 IC50 値 > 5.0 μM），また，細胞内の *ALK* 発現量と IC50 値の間に相関性は認められなかった。一方，セリチニブの NCI-H2228 に対する相対的 IC50 値は 0.8 μM であり，最も高い感受性を示した（Figure 2-3）[Table 2.6.3.1-RD-2013-50316]。

Figure 2-3 NSCLC 細胞株 95 種類の *ALK* 発現量及びセリチニブ感受性



Source：Table 2.6.3.1-RD-2013-50316

Crossing Point：相対的 IC50 値

ほとんどの細胞株においてクラスター形成がみられ，*ALK* 発現量は低く（FPKM の低値），セリチニブへの感受性はみられなかった（相対的 IC50 値 > 5.0 µM）。

2.2.3 クリゾチニブとの比較

EML4-ALK を発現するヒト癌細胞株である NCI-H2228 及び H3122 の増殖及び生存に対するセリチニブの阻害作用をクリゾチニブと比較した。種々の濃度のセリチニブを添加し細胞を 72 時間培養した後，ルシフェラーゼ活性を測定することにより増殖阻害作用を評価した。クリゾチニブの NCI-H2228 及び H3122 細胞に対する IC50 値はそれぞれ 107 及び 245 nM であるのに対し，セリチニブはそれぞれ 3.8 及び 6.3 nM とクリゾチニブと比べ非常に強力な細胞増殖阻害作用を示した（Table 2-6）[Table 2.6.3.1-Friboulet et al. 2014]。

Table 2-6 *EML4-ALK* 陽性ヒト癌細胞株 NCI-H2228 及び H3122 に対するセリチニブとクリゾチニブの IC50 値

細胞	セリチニブ IC50 値（nM）	クリゾチニブ IC50 値（nM）	倍
NCI-H2228	3.8	107	28
H3122	6.3	245	39

Source：[Table 2.6.3.1-Friboulet et al. 2014]

2.2.4 クリゾチニブ耐性 *ALK* 変異を有する細胞に対するセリチニブの細胞増殖阻害作用

H3122 CR1 細胞は，H3122 細胞の *ALK* キナーゼドメイン内に人為的に L1196M 変異を誘導した細胞株である（Katayama et al. 2011）。また，MGH045 及び MGH021-4 細胞は，それぞれ *ALK* のキナーゼドメイン内に L1196M 及び G1269A 変異を有し，クリゾチニブに対し二次耐性を呈した患者より採取した臨床分離細胞である。これらのクリゾチニブ耐性 *ALK* 変異を有する細胞に対するセリチニブの細胞増殖阻害作用をクリゾチニブと比較した。セリチニブの H3122 CR1，MGH045 及び MGH021-4 細胞の増殖に対する IC50 値はそれぞれ 230，25 及び 80 nM であり，いずれの細胞に対してもクリゾチニブと比べ高い活性を示した（クリゾチニブの IC50 値はそれぞれ 2884，891 及び 500 nM）（Table 2-7）[Table 2.6.3.1-Friboulet et al. 2014]。

Table 2-7 クリゾチニブ耐性 *ALK* 変異を有する細胞に対するセリチニブ及びクリゾチニブの細胞増殖阻害作用

細胞株	*ALK* 変異	セリチニブ IC50 値（nM）	クリゾチニブ IC50 値（nM）	倍
H3122 CR1	L1196M	230	2884	13
MGH045	L1196M	25	891	36
MGH021-4	G1269A	80	500	6

Source：[Table 2.6.3.1-Friboulet et al. 2014]

H3122 CR1 細胞は H3122 細胞をクリゾチニブで処理することで *ALK* 変異を誘導した。

MGH045 及び MGH021-4 細胞はクリゾチニブに対し二次耐性を呈した患者より採取した臨床分離細胞株である。

種々の濃度のセリチニブ及びクリゾチニブで 72 時間処理後の細胞数から IC50 値を算出した。

また，クリゾチニブに対し二次耐性を呈した患者より採取した臨床分離細胞であり，クリゾチニブ耐性 *ALK* 変異を有さない MGH051 細胞（肝転移 NSCLC）に対するセリチニブの細胞増殖阻害作用をクリゾチニブと比較したところ，セリチニブ及びクリゾチニブの IC50 値はそれぞれ 2.6 及び 62 nM とセリチニブのほうが高い活性を示した（Table 2-8）[Table 2.6.3.1-Friboulet et al. 2014]。

Table 2-8　クリゾチニブ耐性を示し *ALK* 変異を有さない臨床分離細胞に対するセリチニブ及びクリゾチニブの細胞増殖阻害作用

細胞株	*ALK* 変異	セリチニブ IC50 値（nM）	クリゾチニブ IC50 値（nM）	倍
MGH051	野生型	2.6	62	24

Source：[Table 2.6.3.1-Friboulet et al. 2014]
MGH051 細胞はクリゾチニブに対し二次耐性を呈した患者より採取した肺転移性の臨床分離細胞である。
種々の濃度のセリチニブ及びクリゾチニブで 7 日間処理後の細胞数から IC50 値を算出した。

2.2.5　アレクチニブ耐性 *ALK* 変異を有する細胞に対するセリチニブの細胞増殖阻害作用

MGH056-1 細胞は，*ALK* のキナーゼドメイン内に I1171T 変異を有し，アレクチニブに対し二次耐性を呈した患者より採取した臨床分離細胞である。MGH056-1 細胞に対するセリチニブの細胞増殖阻害作用をアレクチニブ及びクリゾチニブと比較した。セリチニブ，アレクチニブ及びクリゾチニブの IC50 値はそれぞれ 4.3，80 及び 236 nM であり，セリチニブはアレクチニブ及びクリゾチニブと比べ高い活性を示した（Table 2-9）[Table 2.6.3.1-Katayama et al. 2014]。

Table 2-9　アレクチニブ耐性 *ALK* 変異を有する臨床分離細胞に対するセリチニブ，アレクチニブ及びクリゾチニブの細胞増殖阻害作用

細胞株	*ALK* 変異	セリチニブ IC50 値（nM）	アレクチニブ IC50 値（nM）	倍	クリゾチニブ IC50 値（nM）	倍
MGH056-1	I1171T	4.3	80	19	236	55

Source：[Table 2.6.3.1-Katayama et al. 2014]
MGH056-1 細胞はアレクチニブに対し二次耐性を呈した患者より採取した肺転移性の臨床分離細胞である。
種々の濃度のセリチニブ，アレクチニブ及びクリゾチニブで 72 時間処理後の細胞数から IC50 値を算出した。

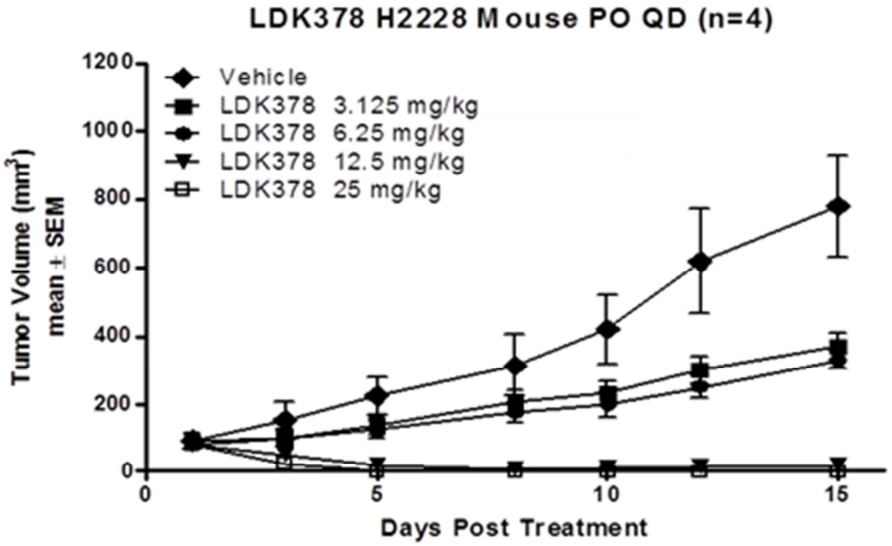
2.3　*In vivo* における薬理作用

2.3.1　異種移植腫瘍モデルマウスにおける抗腫瘍効果

マウス担癌モデルを用いて，*in vivo* におけるセリチニブの抗腫瘍効果を確認した。NCI-H2228 細胞を雌性 SCID beige マウスの右側腹部に皮下移植し，異種移植腫瘍モデルマウスを作製した。セリチニブを 3.125～25 mg/kg の用量で 1 日 1 回，14 日間経口投与し，投与群（T）及び溶媒対照

群（C）の腫瘍体積の変化量から求めた T/C 比により腫瘍増殖抑制又は腫瘍退縮を評価した。その結果，セリチニブの用量依存的な抗腫瘍効果が認められた。3.125 及び 6.25 mg/kg 投与群では腫瘍増殖抑制が認められた（15 日目の T/C：それぞれ 41 及び 36%）。また，12.5 mg/kg 投与群では腫瘍退縮が認められ，25 mg/kg 投与群では完全に腫瘍が退縮した（15 日目の T/C：それぞれ -75 及び-100%，$p = 0.001$ 及び $p < 0.001$）（Figure 2-4）[Table 2.6.3.1-RD-2008-50926]。投与開始時からの平均体重の変化率は，全用量・全時点において-3%を下回ることはなく，セリチニブの忍容性は良好であった。

Figure 2-4　　NCI-H2228 腫瘍モデルマウスにおけるセリチニブの抗腫瘍効果



Source：Table 2.6.3.1-RD-2008-50926

NCI-H2228 細胞を雌性 SCID beige マウスに皮下移植後，溶媒又はセリチニブ（3.125，6.25，12.5 及び 25 mg/kg）を 1 日 1 回 14 日間，経口投与し，腫瘍体積を測定した。

1 日目（腫瘍移植後 18 日目）より投与を開始した。

各群の腫瘍体積を平均値 ± 標準誤差として表す。

セリチニブ 12.5 及び 25 mg/kg 投与群の 15 日目における T/C：それぞれ-75 及び-100%，$p = 0.001$ 及び $p<0.001$（ANOVA 順位検定後の Tukey の検定による溶媒対照群との比較）

$n = 4$

また，Karpas299 細胞を雌性 SCID beige マウスの右側腹部に皮下移植し，セリチニブを 6.25～25 mg/kg の用量で 1 日 1 回，13 日間経口投与すると，用量依存的な抗腫瘍効果が認められた。6.25 mg/kg 投与群では統計学的有意差は認められなかったが，腫瘍増殖抑制傾向がみられた（13 日目の T/C：62%）。12.5 mg/kg 投与群では有意な腫瘍増殖抑制が認められ，25 mg/kg 投与群では腫瘍退縮が認められた（13 日目の T/C：それぞれ 18 及び-93%，$p < 0.05$ 及び $p < 0.001$，ANOVA 順位検定後の Tukey の検定による溶媒対照群との比較）（Table 2-10）[Table 2.6.3.1-RD-

2008-50927]。投与開始時からの平均体重の変化率は，全用量・全時点において-1%を下回ることはなく，セリチニブの忍容性は良好であった。

Table 2-10 Karpas299 腫瘍モデルマウスにおけるセリチニブの抗腫瘍効果

用量（mg/kg）	溶媒	6.25	12.5	25
T/C（%）	100	62	18	-93

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2008-50927]

Karpas299 細胞を雌性 SCID beige マウスに皮下移植後，溶媒又はセリチニブ（6.25，12.5 及び 25 mg/kg）を 1 日 1 回 13 日間，経口投与し，腫瘍体積を測定した。

1 日目（腫瘍移植後 9 日目）より投与を開始した。

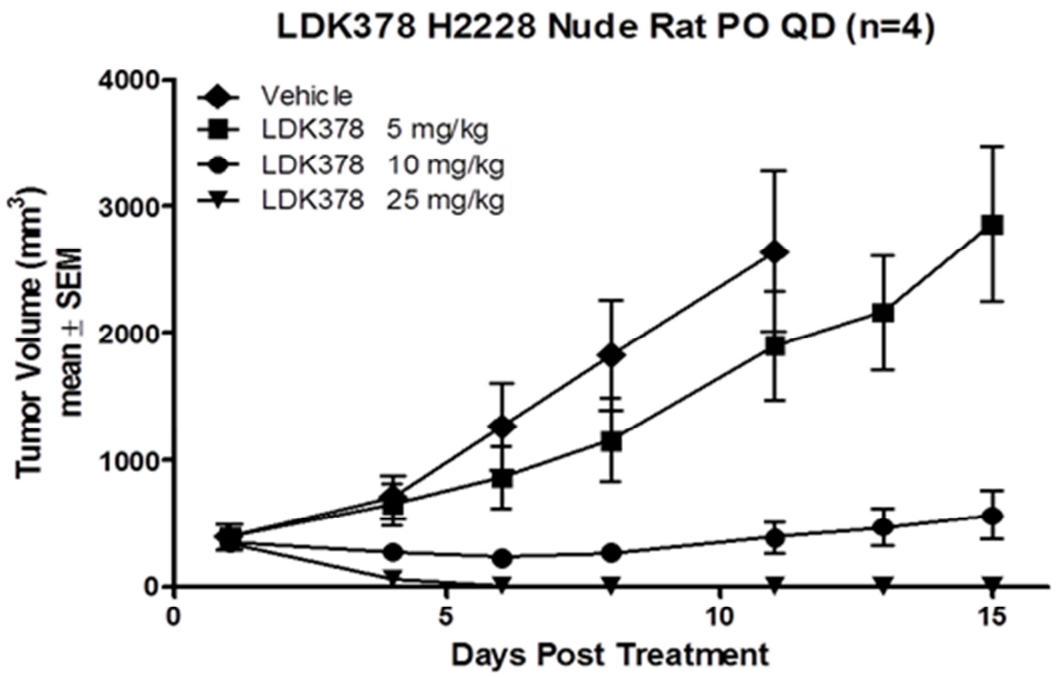
投与 13 日後の T/C（%）を示す。

n = 4

2.3.2 異種移植腫瘍モデルラットにおける抗腫瘍効果

ラット担癌モデルを用いて，*in vivo* におけるセリチニブの抗腫瘍効果を確認した。NCI-H2228 細胞を雌性 RNU ヌードラットの右側腹部に皮下移植し，異種移植腫瘍モデルラットを作製した。セリチニブを 5～25 mg/kg の用量で 1 日 1 回，14 日間経口投与すると，用量依存的な抗腫瘍効果が認められた。5 mg/kg 投与群では，統計学的有意差は認められなかったが，腫瘍増殖抑制傾向が観察された（11 日目の T/C：67%）。10 mg/kg 投与群では腫瘍増殖が完全に抑制され，25 mg/kg 投与群では完全な腫瘍退縮が認められた（11 日目の T/C：それぞれ 2 及び-100%，$p < 0.05$，ANOVA 順位検定後の Tukey の検定による溶媒対照群との比較）（Figure 2-5）[Table 2.6.3.1-RD-2008-50933]。投与開始時からの平均体重については，セリチニブの投与開始翌日に約 1～3.5%の低下が観察されたが，その後は回復し，良好な忍容性が示された。

Figure 2-5　　NCI-H2228 腫瘍モデルラットにおけるセリチニブの抗腫瘍効果



Source：Table 2.6.3.1-RD-2008-50933

NCI-H2228 細胞を雌性 RNU ヌードラットの右側腹部に皮下移植後，溶媒又はセリチニブ（5.0，10 及び 25 mg/kg）を 1 日 1 回 14 日間，経口投与し，腫瘍体積を測定した。

1 日目（腫瘍移植後 9 日目）より投与を開始した。

各群の腫瘍体積を平均値 ± 標準誤差として表す。

セリチニブ 10 及び 25 mg/kg 投与群の 11 日目における T/C：それぞれ 2 及び-100%，$p < 0.05$（ANOVA 順位検定後の Tukey の検定による溶媒対照群との比較）

溶媒対照群は，一部の個体で腫瘍体積が大きくなったために屠殺を要したことから，11 日目までの値を示す。

n = 4

また，Karpas299 細胞を雌性 RNU ヌードラットの右側腹部に皮下移植し，セリチニブを 6.25～50 mg/kg の用量で 1 日 1 回，14 日間経口投与すると，用量依存的な抗腫瘍効果が認められた。投与開始 8 日目において，6.25 mg/kg 投与群では，統計学的有意差は認められなかったが腫瘍増殖抑制傾向が観察され（8 日目の T/C：74%），12.5 mg/kg 投与群で有意な腫瘍増殖抑制が認められた（T/C：30%，$p < 0.005$，ANOVA 順位検定後の Tukey の検定による溶媒対照群との比較）。また，25 及び 50 mg/kg 投与群では有意な腫瘍退縮が認められた（T/C：それぞれ-33 及び-66%，$p < 0.001$）（Table 2-11）。15 日目における 25 及び 50 mg/kg 投与群の退縮率はそれぞれ 76 及び 97%に達した[Table 2.6.3.1-RD-2008-50942]。投与開始時からの平均体重については，セリチニブの投与開始翌日に一部の用量群において約 1%程度の低下が観察されたが，その後は回復し，良好な忍容性が示された。

Table 2-11 Karpas299 腫瘍モデルラットにおけるセリチニブの抗腫瘍効果

用量（mg/kg）	溶媒	6.25	12.5	25	50
T/C（%）	100	74	30	-33	-66

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2008-50942]

Karpas299 細胞を雌性 RNU ヌードラットに皮下移植後，溶媒又はセリチニブ（6.25，12.5，25 及び 50 mg/kg）を 1 日 1 回 14 日間，経口投与し，腫瘍体積を測定した。

1 日目（腫瘍移植後 9 日目）より投与を開始した。

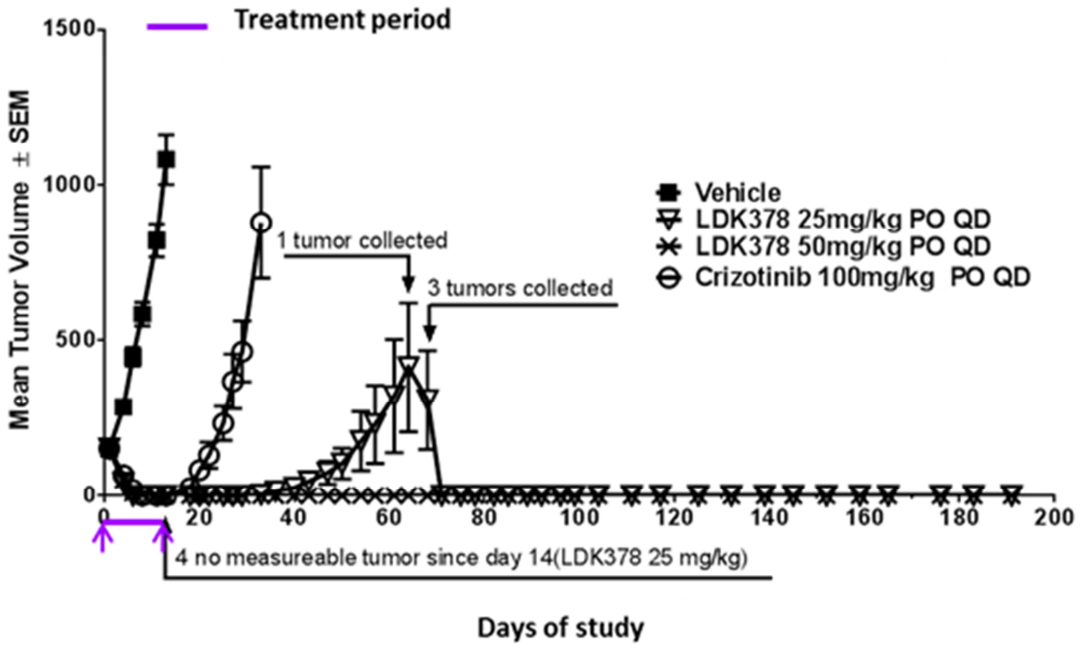
投与 8 日目の T/C（%）を示す。

n = 6

2.3.3 クリゾチニブとの *in vivo* 抗腫瘍効果の比較

マウス担癌モデルを用いて，セリチニブの抗腫瘍効果をクリゾチニブと比較した。NCI-H2228 細胞を雌性 SCID beige マウスの右側腹部に皮下移植し，異種移植腫瘍モデルマウスを作製した。マウスに溶媒，クリゾチニブ 100 mg/kg，又はセリチニブを 25 及び 50 mg/kg の用量で 1 日 1 回，14 日間経口投与すると，溶媒対照群を除く各投与群の全 8 例で完全な腫瘍退縮が認められた。さらに，15 日目以降は被験薬を投与せずに腫瘍の再増殖についてモニタリングした。その結果，クリゾチニブ投与群のすべてのマウスにおいて，投与中止後 1～2 週間以内に腫瘍が急速に再増殖した。一方，セリチニブ 25 mg/kg 投与群では，8 例中 4 例で 4～5 週間以内に腫瘍の再増殖が認められたが，残りの 4 例においては試験終了まで完全退縮が継続した。また，セリチニブ 50 mg/kg を投与した 8 例すべてのマウスでは 150 日間以上，完全退縮が継続した。これらのうち 1 例については 151 日目に転移性胸腔内腫瘍が認められたが，残りの 7 例においては試験終了（198 日目）まで完全退縮が継続した（Figure 2-6）[Table 2.6.3.1-RD-2013-50301]。

Figure 2-6　NCI-H2228 腫瘍モデルマウスにおけるセリチニブとクリゾチニブの抗腫瘍効果の比較



Source：Table 2.6.3.1-RD-2013-50301

NCI-H2228 細胞を雌性 SCID beige マウスの右側腹部に皮下移植後，溶媒，クリゾチニブ（100 mg/kg），又はセリチニブ（25 及び 50 mg/kg）を 1 日 1 回 14 日間，経口投与し，腫瘍体積を測定した。

1 日目（腫瘍移植後 9 日目）より投与を開始した。

15 日目以降は被験薬を投与せず，腫瘍体積を測定した。

各群の腫瘍体積を平均値 ± 標準誤差を表す。

n = 8

セリチニブ 25 mg/kg 群のマウス 4 例で腫瘍の再増殖が認められたため，これら 4 例についてはモニタリングを終了し，腫瘍を回収した。それ以降は残り 4 例のマウスについてモニタリングを継続した。

2.3.4　クリゾチニブ耐性腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

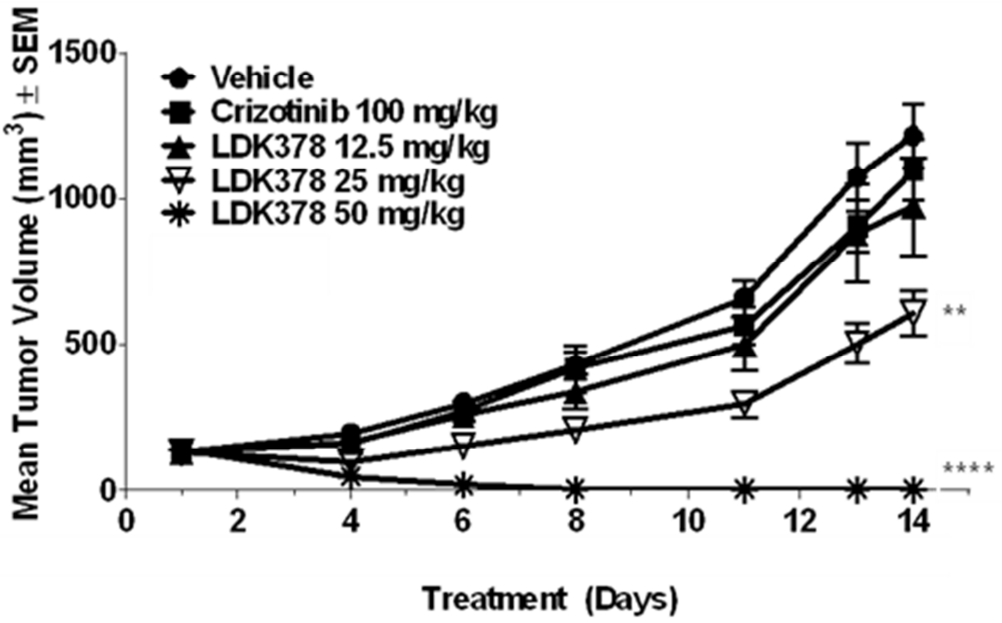
人為的にクリゾチニブ耐性腫瘍モデルを作製するために，NCI-H2228 を雌性 SCID beige マウスに皮下移植後，クリゾチニブを腫瘍が完全には退縮しない用量である 50 mg/kg で投与開始後，100 mg/kg まで漸増投与し，100 mg/kg のクリゾチニブを投与中に増殖した腫瘍内における *ALK* キナーゼドメインの配列を決定した[Table 2.6.3.1-RD-2013-50300, Table 2.6.3.1-RD-2013-50302, Table 2.6.3.1-RD-2013-50303]。試験に必要な担癌マウスの例数が得られるまでこれらのクリゾチニブ耐性腫瘍をマウスでさらに継代し，クリゾチニブ（100 mg/kg）の経口投与を継続した。腫瘍の *ALK* キナーゼドメインの変異状態は，継代時に確認した。これらの操作により，*ALK* キナーゼドメインの I1171T 変異及び C1156Y 変異，あるいは *ALK* 内に変異を有さないクリゾチニブ耐性腫瘍が作製された。I1171T 変異は，クリゾチニブ（Toyokawa et al. 2014）又はアレクチニブ

（Katayama et al. 2014）の投与によりに腫瘍が縮小したものの，その後は再増殖が認められた患者において同定されている。C1156Y 変異はクリゾチニブの投与により腫瘍が縮小したものの，その後は再増殖が認められた患者においても報告されている（Choi et al. 2010, Huang et al. 2013）。また，*ALK* 変異は認められないがクリゾチニブの投与中に進行する患者も報告されている（Katayama et al. 2012, Doebele et al. 2012, Huang et al. 2013, Gainor et al. 2013）。

2.3.4.1 I1171T 変異によるクリゾチニブ耐性腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

I1171T 変異型クリゾチニブ耐性腫瘍モデルマウスに対し，溶媒，クリゾチニブ 100 mg/kg，又はセリチニブを 12.5，25 及び 50 mg/kg の用量で 1 日 1 回，14 日間経口投与した。クリゾチニブは 100 mg/kg の用量で腫瘍増殖抑制作用を示さなかった（14 日目の T/C：89%）。一方，セリチニブは，12.5 mg/kg の用量では統計学的に有意な腫瘍増殖抑制作用を示さなかったが（14 日目の T/C：78%），25 mg/kg の用量で投与すると有意な腫瘍増殖抑制が認められた（14 日目の T/C：44%，$p < 0.05$）。また，50 mg/kg の用量では完全な腫瘍退縮が認められた（14 日目の T/C：-100%，$p < 0.0001$）（Figure 2-7）[Table 2.6.3.1-RD-2013-50300]。

Figure 2-7　*ALK* I1171T 変異を有するクリゾチニブ耐性 NCI-H2228 腫瘍モデルにおけるセリチニブ及びクリゾチニブの効果



Source：Table 2.6.3.1-RD-2013-50300

I1171T 変異を有する NCI-H2228 細胞を雌性 SCID beige マウスの右側腹部に皮下移植後，溶媒，クリゾチニブ（100 mg/kg），又はセリチニブ（12.5，25 及び 50 mg/kg）を 1 日 1 回 14 日間，経口投与し，腫瘍体積を測定した。

1 日目（腫瘍移植後 9 日目）より投与を開始した。

各群の腫瘍体積を平均値 ± 標準誤差を表す。

$p < 0.05$，** $p < 0.0001$（ANOVA 順位検定後の Tukey の検定による溶媒対照群との比較）。

n = 6

腫瘍退縮が認められた 50 mg/kg 投与群における最終投与（14 日目）後のセリチニブ血漿中曝露量（AUC0-24h）は 24620 ng · h/mL で，クリゾチニブの血漿中曝露量（AUC0-24h）は 46975 ng · h/mL であった（Table 2-12）[Table 2.6.3.1-RD-2013-50300]。

Table 2-12　*ALK* I1171T 変異を有するクリゾチニブ耐性 NCI-H2228 腫瘍モデルにおける血漿中薬物動態パラメータ（14 日目）

化合物	用量（mg/kg）	Cmax（ng/mL）	AUC0-24h（ng · h/mL）
セリチニブ	12.5	324	5671
	25	562	8854
	50	1358	24620
クリゾチニブ	100	3121	46975

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2013-50300]

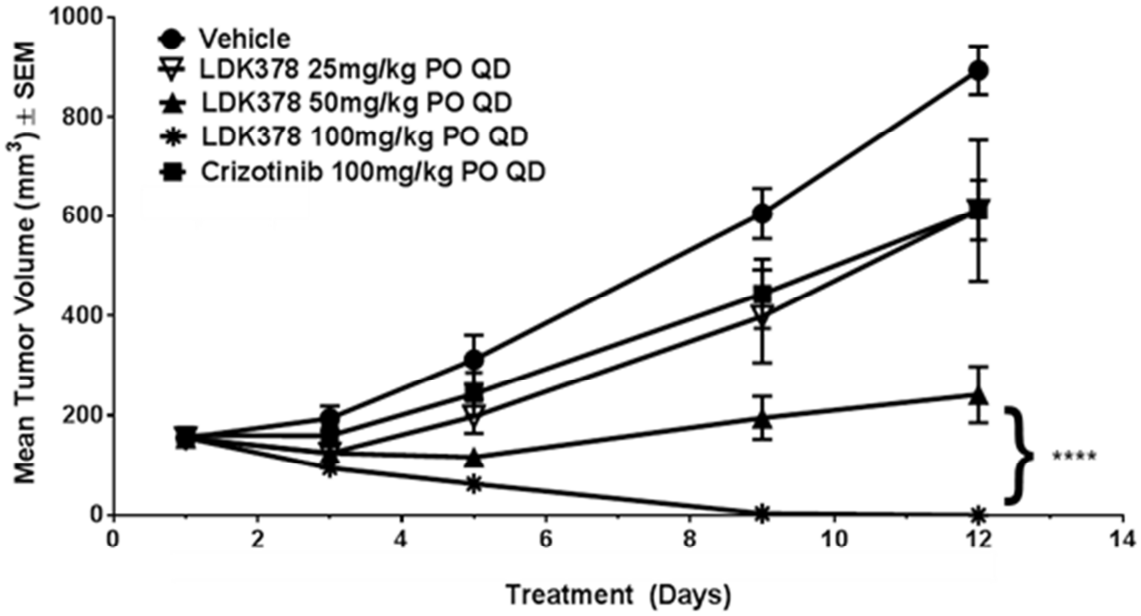
最終投与（14 日目）後のクリゾチニブ及びセリチニブの Cmax 及び AUC0-24h を示す。

n = 2

2.3.4.2　C1156Y 変異によるクリゾチニブ耐性腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

C1156Y 変異型クリゾチニブ耐性モデルマウスに対し，溶媒，クリゾチニブ 100 mg/kg，又はセリチニブを 25，50 及び 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回，11 日間経口投与したところ，クリゾチニブの投与により統計学的に有意な腫瘍増殖抑制作用はみられなかったが（12 日目の T/C：61.2%），セリチニブは用量依存的な抗腫瘍効果を示した。セリチニブは 25 mg/kg の用量では統計学的に有意な腫瘍増殖抑制作用を示さなかったが（T/C：61.8%），50 mg/kg では有意な腫瘍増殖抑制が認められ，100 mg/kg では完全な腫瘍退縮が認められた（12 日目の T/C：それぞれ 11.7%及び-100%，いずれも $p < 0.05$）（Figure 2-8）[Table 2.6.3.1-RD-2013-50302]。

Figure 2-8　*ALK* C1156Y 変異を有するクリゾチニブ耐性 NCI-H2228 腫瘍モデルにおけるセリチニブ及びクリゾチニブの効果



Source：Table 2.6.3.1-RD-2013-50302

C1156Y 変異を有する NCI-H2228 細胞を雌性 SCID beige マウスに皮下移植後，溶媒，クリゾチニブ（100 mg/kg），又はセリチニブ（25，50 及び 100 mg/kg）を 1 日 1 回 11 日間，経口投与し，腫瘍体積を測定した。

1 日目（腫瘍移植後 11 日目）より投与を開始した。

各群の腫瘍体積を平均値 ± 標準誤差を表す。

**** $p<0.0001$（ANOVA 順位検定後の Tukey の検定による溶媒対照群との比較）。

$n = 8$

投与 11 日目のクリゾチニブ及びセリチニブの血漿中薬物動態パラメータを Table 2-13 に示す。腫瘍退縮が認められたセリチニブ 100 mg/kg 投与群における AUC0-24h は 57811 ng · h/mL で，クリゾチニブの AUC0-24h は 49059 ng · h/mL であった（Table 2-13）[Table 2.6.3.1-RD-2013-50302]。

Table 2-13　*ALK* C1156Y 変異を有するクリゾチニブ耐性 NCI-H2228 腫瘍モデルにおける血漿中薬物動態パラメータ（11 日目）

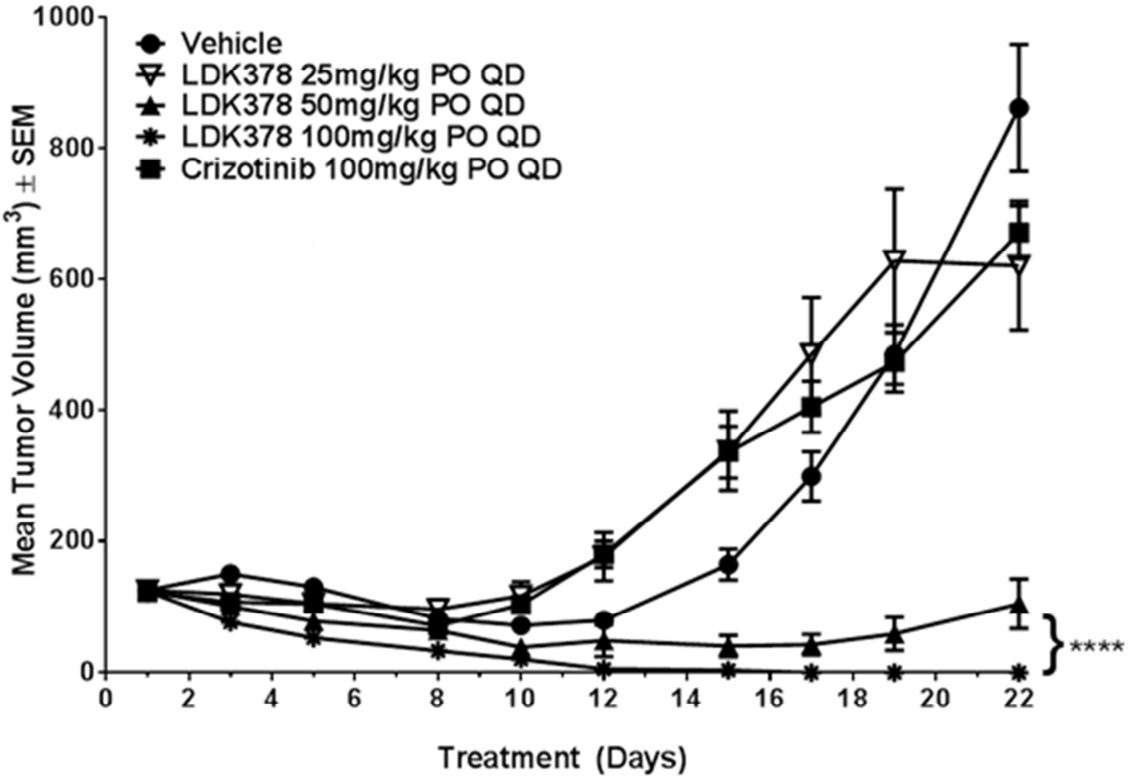
化合物	用量（mg/kg）	Cmax（ng/mL）	AUC0-24h（ng · h/mL）
セリチニブ	25	657	12507
	50	1687	29752
	100	4732	57811
クリゾチニブ	100	3863	49059

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2013-50302]
投与 11 日目のクリゾチニブ及びセリチニブの Cmax 及び AUC0-24h を示す。
n = 3

2.3.4.3　*ALK* 非変異型クリゾチニブ耐性腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

ALK 内に変異は認められないがクリゾチニブに耐性を示す非変異型 *EML4-ALK* クリゾチニブ耐性腫瘍モデルを用いてセリチニブの抗腫瘍効果を検討した。本クリゾチニブ耐性腫瘍モデルマウスに対し，溶媒，クリゾチニブ 100 mg/kg，又はセリチニブを 25，50 及び 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回，22 日間経口投与した。その結果，クリゾチニブは 100 mg/kg の用量で腫瘍増殖抑制作用を示さなかった（22 日目の T/C：74.6%）。一方，セリチニブを 50 mg/kg の用量で投与するとわずかな腫瘍退縮がみられ，100 mg/kg の投与により腫瘍退縮が認められた（22 日目の T/C：それぞれ-16.0 及び-100%，いずれも $p < 0.0001$）（Figure 2-9）[Table 2.6.3.1-RD-2013-50303]。

Figure 2-9 *ALK* 非変異型クリゾチニブ耐性 NCI-H2228 腫瘍モデルにおけるセリチニブ及びクリゾチニブの効果



Source：Table 2.6.3.1-RD-2013-50303

ALK 変異を有さずにクリゾチニブに対し耐性を示した NCI-H2228 細胞を雌性 SCID beige マウスに皮下移植後，溶媒，クリゾチニブ（100 mg/kg），又はセリチニブ（25，50 及び 100 mg/kg）を 1 日 1 回 22 日間，経口投与し，腫瘍体積を測定した。

1 日目（腫瘍移植後 11 日目）より投与を開始した。

各群の腫瘍体積を平均値 ± 標準誤差を表す。

****$p < 0.0001$（ANOVA 順位検定後の Tukey の検定による溶媒対照群との比較）。

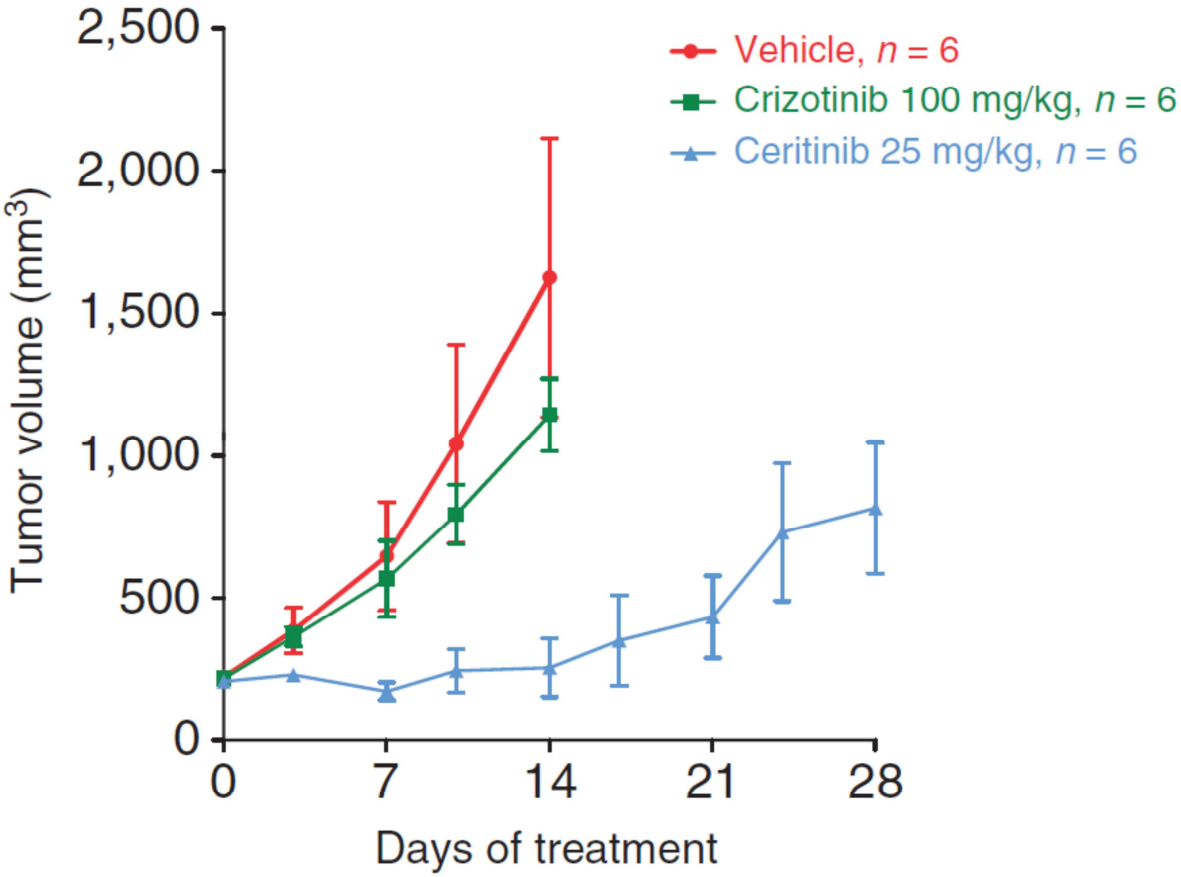
N = 8

2.3.5 クリゾチニブ耐性患者由来細胞を用いた腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

ALK 再構成を有し，クリゾチニブ治療に対し抵抗性を示した NSCLC 患者より分離した細胞（MGH045）を用いてクリゾチニブ耐性腫瘍モデルを作製し，セリチニブの抗腫瘍効果を検討した。MGH045 細胞は L1196M 変異を有する。L1196M 変異は 2.1.3 項に記載したとおり，ゲートキーパー変異であり，これまでに同定された二次変異の中で最も高頻度でみられている（Voena and Chiarle 2012, Shaw and Engelman 2013）。MGH045 細胞をヌードマウスに移植し，溶媒，クリゾチニブ 100 mg/kg，又はセリチニブを 25 mg/kg の用量で 1 日 1 回，14 若しくは 28 日間経口投与した。クリゾチニブは 100 mg/kg の 14 日間投与により腫瘍増殖をわずかに抑制したが，セリチ

ニブは 25 mg/kg の投与により腫瘍増殖抑制作用を示した（Figure 2-10）[Table 2.6.3.1-Friboulet et al. 2014]。

Figure 2-10　*ALK* L1196M 変異を有するクリゾチニブ耐性 MGH045 腫瘍モデルにおけるセリチニブ及びクリゾチニブの効果



Source：Table 2.6.3.1-Friboulet et al. 2014

MGH045 はクリゾチニブに対し二次耐性を呈した NSCLC 患者より採取した臨床分離細胞である。

ヌードマウスに MGH045 細胞を移植し，溶媒，クリゾチニブ（100 mg/kg），又はセリチニブ（25 mg/kg）を 1 日 1 回，14 若しくは 28 日間，経口投与し，腫瘍体積を測定した。

各群の腫瘍体積を平均値 ± 標準誤差を表す。

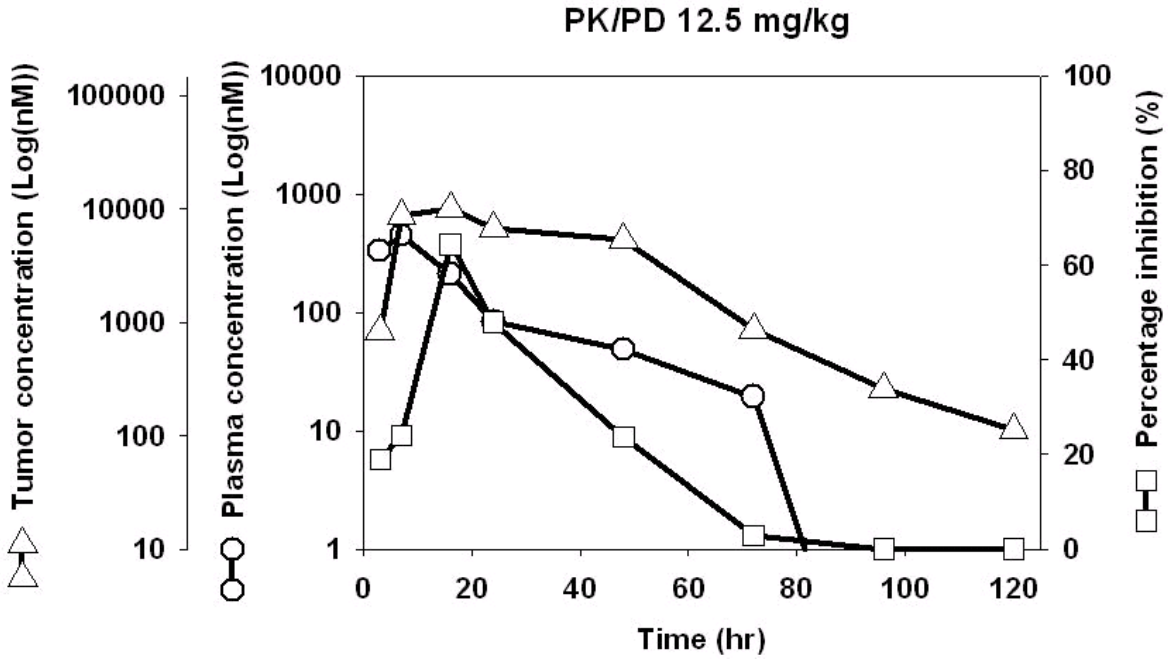
n = 6

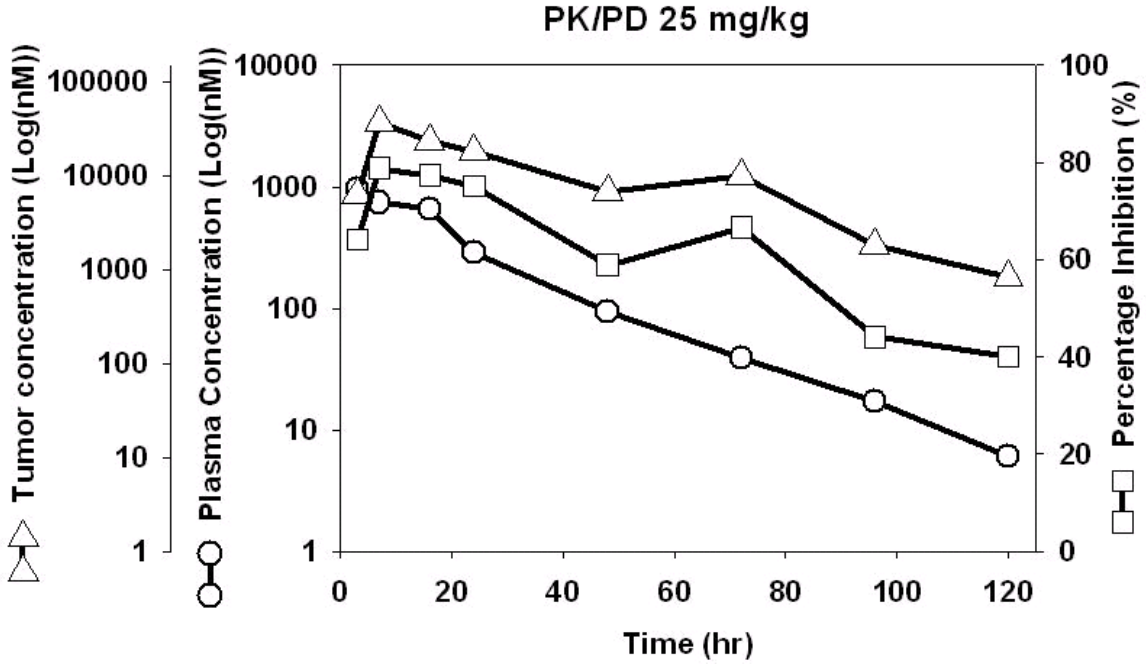
2.3.6　その他の *in vivo* 薬理試験

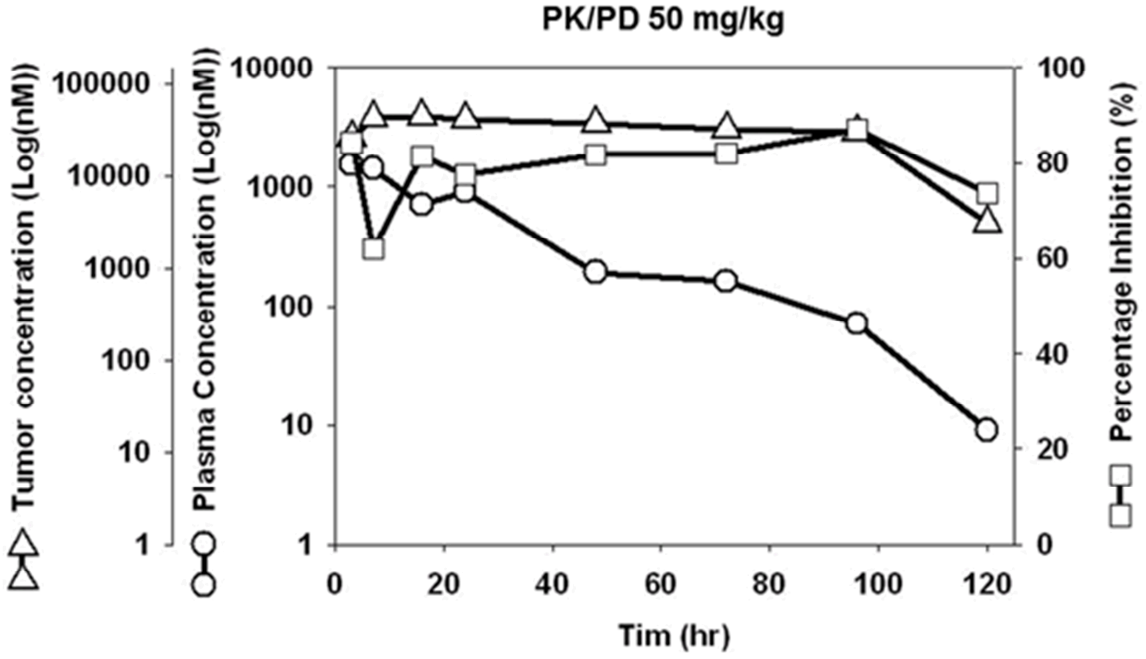
In vivo における ALK シグナル伝達経路に対するセリチニブの作用について，pSTAT3 を指標として検討した。Karpas299 細胞を雌性 SCID beige マウスに尾静脈接種し，同所性の Karpas299 腫瘍モデルマウスを作製した。セリチニブを 5，12.5，25，50 及び 100 mg/kg の用量で単回経口投与後，頚部リンパ節周囲に形成された腫瘍組織及び血液を経時的に採取し，セリチニブの腫瘍内及び血漿中濃度を測定した。腫瘍内の STAT3 チロシンリン酸化状態は，ウエスタンブロット法

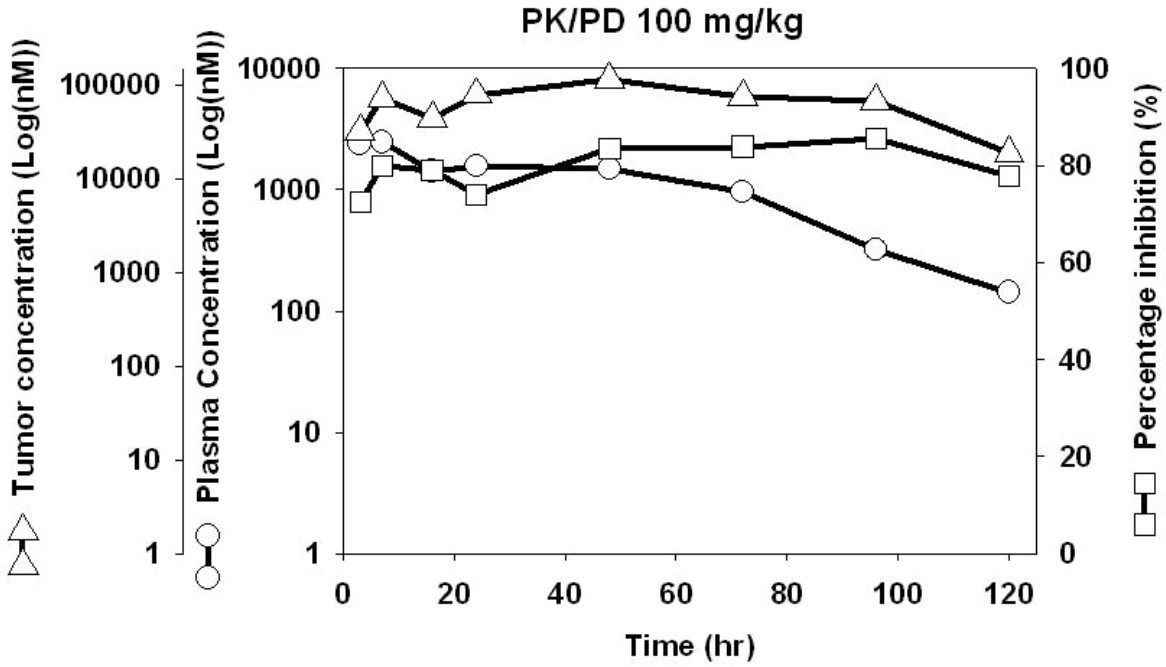
により観察した。セリチニブ 12.5 mg/kg 投与により，16 時間後では約 60%の pSTAT3 阻害を示したが，24 時間後では約 50%以下に低下した。25 mg/kg 投与では，3～24 時間後で pSTAT3 を約 60～80%阻害し，50 及び 100 mg/kg 投与では，50 mg/kg 投与群の 7 時間後を除く 120 時間後までの全測定時点で pSTAT3 を約 70～90%阻害した（Figure 2-11）[Table 2.6.3.1-RD-2008-50976]。セリチニブによる pSTAT3 阻害と腫瘍内セリチニブ濃度との間には相関性が認められたが，血漿中濃度との相関は低かった。

Figure 2-11　セリチニブ単回経口投与後の Karpas299 腫瘍モデルマウスの pSTAT3 阻害と薬物濃度との相関性




PK/PD 25 mg/kg
Tumor concentration (Log(nM))
Plasma Concentration (Log(nM))
Percentage Inhibition (%)
Time (hr)
100000
10000
1000
100
10
1
10000
1000
100
10
1
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120


PK/PD 50 mg/kg
Tumor concentration (Log(nM))
Plasma Concentration (Log(nM))
Percentage Inhibition (%)
Tim (hr)
100000
10000
1000
100
10
1
10000
1000
100
10
1
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120



Source：Table 2.6.3.1-RD-2008-50976

Karpas299 細胞を雌性 SCID beige マウスに尾静脈接種し，同所性の Karpas299 腫瘍モデルとした。

Karpas299 を尾静脈接種 17～19 日後，被験薬を単回投与した。

溶媒，又はセリチニブ（12.5，25，50 及び 100 mg/kg）を経口投与後，頚部リンパ節周囲に形成された腫瘍組織及び血液を経時的に採取し，セリチニブの腫瘍内及び血漿中濃度を測定した。

腫瘍内 pSTAT3 阻害はウエスタンブロット法により観察した。

腫瘍内及び血漿中セリチニブ濃度及び pSTAT3 阻害率の平均値を表す。

各用量群とも各投与時点につき n = 3

3 副次的薬理試験

3.1 *In vitro* 薬理試験

3.1.1 その他の標的に対する *in vitro* での選択性

セリチニブの選択性について，GPCR，トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体及び酵素からなるパネルを用いて評価した。標的 84 種類からなるパネルにおける単一濃度（10 µM）での活性[Table 2.6.3.1-RD-2008-50904]又は標的 73 種類からなるパネルにおける用量反応性[Table 2.6.3.1-RD-2010-50499]を検討し，いくつかの標的については細胞機能試験を実施した。

標的 84 種類のパネルでは，最初に，各標的及び放射性同位体を含有するリガンドに対しセリチニブを終濃度 10 µM として結合アッセイを実施した。このスクリーニングによりセリチニブが 50%を上回る活性を示した標的 15 種類中 9 種類については，さらに用量反応性を検討し，IC50 値を得た。これらの標的にはモノアミントランスポーター（IC50 = 0.33 µM），カリウムチャネ

ル（IC50 = 0.68 μM），セロトニン 5A 受容体（IC50 = 5.0 μM），ソマトスタチン受容体（SST）1，2，3 及び 4（IC50 はそれぞれ 2.4，2.3，5.1 及び 1.9 μM）並びに L 型カルシウムチャネルのベンゾジアゼピン結合部位（IC50 = 1.8 μM）及びフェニルアルキルアミン結合部位（IC50 = 2.4 μM）が含まれる[Table 2.6.3.1-RD-2008-50904]。SST2 及び 4 については，カルシウム流入に関する細胞機能試験でさらに検討したところ，セリチニブは 10 μM まで活性を示さなかった[Table 2.6.3.1-RD-2008-50906]。

標的 73 種類のパネルでは，各標的及び放射性同位体を含有するリガンドに対し種々の濃度のセリチニブを用いた結合アッセイ，又は酵素アッセイを行った[Table 2.6.3.1-RD-2010-50499]。このスクリーニングでは 19 種類の標的に対して 5 μM 未満の IC50 値が認められた。アデノシン 3 受容体，アドレナリン α1A 受容体，メラノコルチン 4 受容体，ヒスタミン H2 及び H3 受容体，ニューロキニン 1 受容体及びオピオイド κ 受容体について，カルシウム流入に関する細胞機能試験でさらに検討したところ，セリチニブはいずれの機能試験においても 10 μM まで活性を示さなかった。ドパミン D2 受容体についてはセリチニブが 50%の有効性を示す EC50 値は 6.0 μM であった[Table 2.6.3.1-RD-2008-50906]。また，セリチニブは PXR に対して 4.4 μM の IC50 値であったため[Table 2.6.3.1-RD-2010-50499]，肝癌細胞試験において PXR 依存的 CYP3A4 誘導について測定したところ，セリチニブは弱い活性（最大で 9.8%）を示した[Table 2.6.3.1-RD-2010-50501]。

3.2 *In vivo* 薬理試験

3.2.1 IGF-1R 経路への影響

生化学アッセイにおけるセリチニブの IGF-1R に対する阻害活性は，ALK に対する阻害活性の約 1/50 である（IC50 値は IGF-1R：8 nM，ALK：0.15 nM）（Table 2-1）。IGF-1R と比較した ALK へのセリチニブの選択性を NIH3T3：IGF-1R：IGF-2 腫瘍モデルを用い *in vivo* で検討した。NIH3T3 マウス線維芽細胞にヒト IGF-1R 及びインスリン様成長因子（IGF）-2 を発現させることで，オートクライン様式に IGF-1R 経路が恒常的に活性化されているため，主に IGF-1R が生存／増殖を担っている。雌性無胸腺 HsdNpa マウス（ヌードマウス）に上記の NIH3T3 細胞を皮下移植し，NIH3T3：IGF-1R：IGF-2 腫瘍モデルマウスを作製した。セリチニブを 25，50 又は 100 mg/kg の用量で単回経口投与後，1，4，8 及び 24 時間の時点で腫瘍試料を回収し，リン酸化 IGF-1R 抗体及び pAKT 抗体を用いたウエスタンブロット法により IGF-1R シグナル伝達経路について観察した。セリチニブは，検討したいずれの用量でも IGF-1R 及び AKT のリン酸化を抑制しなかった[Table 2.6.3.1-RD-2013-00413]。

3.2.2 糖代謝への影響

生化学アッセイにおけるセリチニブの INSR に対する阻害活性は，ALK に対する阻害活性の約 1/50 である（IC50 値は INSR：7 nM，ALK：0.15 nM）（Table 2-1）。マウス OGTT により INSR と比較した ALK へのセリチニブの選択性を *in vivo* で検討した。雄性 C57BL/6J マウスにセリチニ

ブを 25，50 又は 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回，7 日間経口投与した。絶食下，最終投与の 3 時間後，ブドウ糖を経口負荷（3 g/kg）し，その 20，40，60 及び 120 分後に尾静脈より採血し，簡易型血糖測定器によりマウスの血糖値を測定した。溶媒対照群と比較して，セリチニブは検討したいずれの用量でも血糖値に有意な影響を与えず，また空腹時血漿中インスリン濃度にも影響を及ぼさなかった[Table 2.6.3.1-RD-2010-50507]。

4 安全性薬理試験

セリチニブの安全性薬理試験として，*in vitro*（hERG チャネルアッセイ）及び *in vivo*（テレメトリー試験）での心血管系への影響に関する試験，並びにラットを用いた中枢神経系及び呼吸系への影響に関する試験を実施した。これらの試験は日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A 及び S7B ガイドライン（安全性薬理試験ガイドライン及びヒト用医薬品の心室再分極遅延［QT 間隔延長］の潜在的可能性に関する非臨床的評価）に従い，主要な試験は「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）」に準拠して実施した。本項におけるセリチニブの処理濃度及び用量は遊離塩基として表記した。

4.1 心血管系に及ぼす影響

4.1.1 hERG チャネルアッセイ

hERG チャネルを発現させた HEK293 細胞を用いて，hERG 電流に対するセリチニブの作用をホールセルパッチクランプ法で検討した[Table 2.6.3.4-0970418]。セリチニブの処理濃度は 0.3，0.4，1 及び 2.4 μM とし，GLP 適用で実施した。その結果，セリチニブは hERG 電流を阻害し，IC50 は 0.4 μM であった。

4.1.2 サルを用いたテレメトリー試験

セリチニブの心血管系に及ぼす影響について，覚醒カニクイザルを用いてテレメトリー法により検討した（GLP 非適用試験：[Table 2.6.3.4-0770889]，GLP 適用試験：[Table 2.6.3.4-0970420]）。

GLP 非適用試験では，2 例の覚醒雄性カニクイザルに 0 及び 250 mg/kg の用量のセリチニブを 1 及び 2 日目に経口投与し，血圧（収縮期，拡張期及び平均），心拍数，体温及び心電図を測定した。また，一般状態を観察し，体重及び摂餌量を測定した。その結果，250 mg/kg 投与で飼料混入嘔吐，軟便及び摂餌量減少が認められた。体重，血圧，心拍数，体温及び心電図に対するセリチニブ投与の影響はみられなかった。

GLP 適用試験では，4 例の覚醒雄性カニクイザルに，0，10，30 及び 100 mg/kg の用量のセリチニブを 1，8，15 及び 22 日に経口投与し，血圧（収縮期，拡張期及び平均血圧），心拍数，体温及び心電図を測定した。また，一般状態を観察し，体重及び摂餌量を測定した。その結果，一般状態の変化として 10 mg/kg 以上の投与で軟便，30 mg/kg 以上の投与で嘔吐，100 mg/kg 投与で下痢が認められた。体重，摂餌量，血圧，心拍数及び体温に対するセリチニブ投与の影響はみられ

なかった。心電図検査では PR，RR 及び QRS 間隔並びに波形にセリチニブ投与の影響は認められなかったが，100 mg/kg 投与 10～19 時間後に QTc 間隔の延長（投与前値から 14.25～43.52 ms の延長）が 1 例でみられた。

4.2 中枢神経系に及ぼす影響

セリチニブの中枢神経系に及ぼす影響について，ラットを用いて検討した（GLP 適用，[Table 2.6.3.4-0970415]）。1 群 10 例の Wistar Hannover 系雄性ラットに 0 及び 100 mg/kg の用量のセリチニブを単回経口投与し，投与 3 及び 24 時間後に機能観察総合評価を実施した。また，一般状態を観察し，体重を測定した。その結果，セリチニブ投与に関連した変化はみられなかった。

4.3 呼吸に及ぼす影響

セリチニブの呼吸系に及ぼす影響について，ラットを用いて検討した（GLP 適用，[Table 2.6.3.4-0970415]）。10 例の Wistar Hannover 系雄性ラットに 0 及び 100 mg/kg の用量のセリチニブを経口投与し，全身プレチスモグラフを用いて，投与直後から 1 時間，並びに投与 3，7 及び 24 時間から 30 分間，呼吸パラメータ（1 回換気量，呼吸数及び分時呼吸量）を測定した。また，一般状態を観察し，体重を測定した。その結果，セリチニブ投与に関連した変化はみられなかった。

5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。

6 考察及び結論

In vitro 生化学アッセイにおいて，セリチニブ及びクリゾチニブの ALK に対する IC50 値はそれぞれ 0.15 及び 3 nM であり，セリチニブはクリゾチニブより強力な阻害活性を有することが示された（2.1.1 項）。また，セリチニブは細胞内の融合型蛋白質キナーゼのうち EML4-ALK 及び NPM-ALK に対しそれぞれ 27 及び 35 nM の IC50 値を示し（2.1.2 項），*NPM-ALK* 又は *EML4-ALK* 陽性の Karpas299（ヒト ALCL）及び NCI-H2228（ヒト NSCLC）細胞における ALK 及びその下流シグナル伝達蛋白質（STAT3，AKT，ERK 及び S6）のリン酸化（2.1.4 項），及び細胞増殖（2.2.1 項）を濃度依存的に阻害した。*In vitro* において，セリチニブは NCI-H2228 及び H3122（*EML4-ALK* 陽性ヒト NSCLC）細胞の増殖を強力に阻害したが（2.2.3 項），野生型 *ALK* を有する NSCLC 細胞株に対する感受性は低かった（2.2.2 項）。*In vivo* では，マウス及びラットの NCI-H2228 及び Karpas299 細胞異種移植腫瘍モデルに対しセリチニブは用量依存的な抗腫瘍効果を示し，25 mg/kg 以上の用量ですべてのモデルにおいて腫瘍の退縮が認められた（2.3.1 項及び 2.3.2 項）。以上のことから，セリチニブは EML4-ALK や NPM-ALK といった恒常活性型 ALK のリン酸化を阻害し，下流へのシグナル伝達を阻害することで腫瘍細胞の増殖を阻害し，*in vivo* における抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。また，NCI-H2228 及び H3122 細胞と同様にクリゾチニブ未治療の *ALK* 融合遺伝子陽性 NSCLC 患者由来の MGH006 細胞を用いた *in vivo* 異種移植腫瘍モ

デルに対しても，セリチニブの投与による腫瘍退縮が報告されていることから（Friboulet et al. 2014），セリチニブはクリゾチニブ未治療の *ALK* 融合遺伝子陽性 NSCLC 患者の治療選択肢となること及び同患者層に対しクリゾチニブよりも高い効果を示す可能性が示唆された。

いくつかの *in vitro* 及び *in vivo* 試験ではセリチニブとクリゾチニブの効力を比較した。*In vitro* では，NCI-H2228 及び H3122 細胞に対し，セリチニブはクリゾチニブと比べ強力な細胞増殖阻害作用を示した（2.2.3 項）。また，*in vivo* 異種移植腫瘍モデルマウスにクリゾチニブを 100 mg/kg，又はセリチニブを 25 及び 50 mg/kg の用量で投与すると，すべてのマウスの腫瘍が完全に退縮した（2.3.3 項）。クリゾチニブ及びセリチニブの曝露量を検討した他の 2 つの試験では，クリゾチニブ 100 mg/kg 及びセリチニブ 25 mg/kg を投与後の AUC0-24h は，それぞれ 46975 及び 8854 ng · h/mL（2.3.4.1 項），又はそれぞれ 49059 及び 12507 ng · h/mL であり（2.3.4.2 項），腫瘍の完全退縮にはクリゾチニブはセリチニブの 3.9～5.3 倍高い曝露量が必要であった。この結果は *in vitro* においてセリチニブの ALK 阻害活性や細胞増殖阻害作用がクリゾチニブと比較して高いことと一致している（Table 2-1 及び Table 2-6）。また，クリゾチニブ 100 mg/kg 投与後の曝露量は，ヒトにおける最大耐容量（MTD，250 mg，1 日 2 回）での曝露量（クリゾチニブ臨床薬理及び生物薬剤学の FDA レビューで得られたサイクル 1 の 15 日目のデータ）（Orbach and Zineh 2011）と比べ約 6 倍高いが，セリチニブ 25 及び 50 mg/kg 投与後の曝露量は，ヒトにおける MTD（750 mg/日）での曝露量（試験 CLDK378X2101 におけるサイクル 2 の 1 日目の平均 AUC0-24h による評価）[CTD 2.7.2-2.3.1 項]の約 0.6 及び 1.3 倍であり，セリチニブは臨床用法用量下で得られる曝露量において腫瘍の完全退縮が認められたと考えられる。さらに，本試験では被験薬の投与中止後の腫瘍再増殖を観察したところ，クリゾチニブ投与群のすべてのマウスにおいて，投与中止後 1～2 週間以内に腫瘍が再増殖する一方，セリチニブ 25 mg/kg 投与群では，半数のマウスで 4～5 週間以内に腫瘍が再増殖したが，残りの半数においては試験終了（198 日目）まで完全退縮が継続し，50 mg/kg 投与群では 151 日目に転移性胸腔内腫瘍が認められた 1 例を除くすべてのマウスにおいて，試験終了まで完全退縮が継続したことからもセリチニブはクリゾチニブと比べ強力な抗腫瘍効果を有すると考えられる（2.3.3 項）。

同所性の Karpas299 細胞腫瘍モデルマウスを用いた PK/PD に関する検討（2.3.6 項）では，セリチニブを 12.5 mg/kg の用量で投与した場合，腫瘍内の pSTAT3 阻害率は投与 16 時間後にピークとなり（約 60%），その後は経時的に低下した。25 mg/kg の用量で投与すると，腫瘍内の pSTAT3 阻害率は投与 3～24 時間後で約 60～80%の範囲で維持され，50 及び 100 mg/kg 投与では，50 mg/kg 投与群の 7 時間後を除く全測定時点で約 70～90%阻害した。2.3.1 項に示すように，セリチニブを 12.5 mg/kg の用量で投与すると腫瘍増殖阻害がみられるが（T/C：18%），25 mg/kg の用量で投与すると腫瘍の退縮が認められる（T/C：-93%）。以上のことから，腫瘍退縮が認められるためには，投与間隔中に pSTAT3 が 60～80%阻害されている必要があると考えられる。

また，ALK 阻害剤への耐性発現に寄与すると考えられている *ALK* キナーゼドメイン内の変異に対するセリチニブの作用についても検討した。*In vitro* では，セリチニブは非変異型 EML4-

ALK（IC50 = 31 nM）と比べ，ALK 内の変異（C1156Y，L1196M，G1202R 及び I1171T）により活性の低下が認められたが（IC50 値はそれぞれ 160，69，940 及び 38 nM），非変異型及びいずれの変異型 ALK に対してもクリゾチニブと比べ高い活性を示した（2.1.3 項）。また，クリゾチニブと比較して，セリチニブは H3122 CR1 及び MGH045 細胞（L1196M 陽性），及び MGH021-4 細胞（G1269A 陽性）の増殖を強力に阻害した（2.2.4 項）。*In vivo* における人為的クリゾチニブ耐性腫瘍モデルマウスを用いた検討では，*ALK* の I1171T 及び C1156Y 変異型クリゾチニブ耐性腫瘍モデルにおいて，セリチニブは用量依存的な抗腫瘍効果を示し，それぞれ 50 及び 100 mg/kg の用量で完全に腫瘍を退縮した（2.3.4.1 項及び 2.3.4.2 項）。また，L1196M 変異型クリゾチニブ耐性腫瘍モデル（MGH045）において，セリチニブは 25 mg/kg の用量で腫瘍増殖抑制作用を示しており（2.3.5 項），*in vivo* で観察された *ALK* 変異型クリゾチニブ耐性腫瘍モデルにおけるセリチニブの抗腫瘍効果は，*in vitro* で観察された変異型 ALK 阻害活性（2.1.3 項）及び細胞増殖阻害作用（2.2.4 項）を反映していると考えられる。セリチニブは MGH051 細胞（*ALK* 非変異型，肝転移 NSCLC）の増殖阻害（2.2.4 項）及び *ALK* 非変異型クリゾチニブ耐性腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果も示している（2.3.4.3 項）。これらの結果から，セリチニブは臨床で同定されている *ALK* の I1171T，C1156Y 又は L1196M 変異によるクリゾチニブ耐性 NSCLC 患者，及び *ALK* 非変異型クリゾチニブ耐性 NSCLC 患者に対しても有効であることが示唆された。*ALK* の I1171T 変異に対しては，前述のとおり，セリチニブは *in vitro* で高い阻害活性を示しており（2.1.3 項），*in vivo* 異種移植腫瘍モデルにおいても 50 mg/kg の用量で完全に腫瘍を退縮している（2.3.4.1 項）。また，アレクチニブ耐性 NSCLC 患者由来の MGH056-1 細胞（I1171T 陽性）の増殖を強力に阻害したが（2.2.5 項），当該患者では，この結果と一致してセリチニブの投与により腫瘍が著しく縮小し，7 ヵ月にわたり部分奏功が持続していることから，セリチニブは *ALK* の I1171T 変異によるアレクチニブ耐性 NSCLC 患者に対しても有効であることが示唆された。なお，臨床での報告はないが人為的アレクチニブ耐性細胞株であり，*ALK* の V1180L 変異を有する H3122 CHR-A1 細胞に対し，アレクチニブ及びクリゾチニブは増殖阻害作用の低下がみられたが，セリチニブは感受性を維持していることも報告されている（Katayama et al. 2014）。一方，セリチニブの G1202R 変異に対する *in vitro* 阻害活性は低く（2.1.3 項），また，G1202R 変異型クリゾチニブ耐性腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果は弱く，セリチニブ抵抗性 NSCLC 患者からも少数ながら同変異が同定されており（Friboulet et al. 2014），G1202R 変異型 NSCLC 患者に対するセリチニブの効果については，今後も注視する必要があると考えられる。

In vitro 生化学アッセイにおいて，クリゾチニブは ALK の他にも MET（IC50 = 8 nM）など 6 種類のキナーゼに対して IC50 値が 100 nM 未満であったのに対し，セリチニブは検討したその他すべてのキナーゼと比較すると ALK に対して 50 倍以上の選択性を示した（2.1.1 項）。セリチニブはクリゾチニブよりも ALK に対する活性及び選択性が高いことから，ALK を著明に阻害する曝露量又は薬物濃度では標的外キナーゼに対する阻害作用を示さないと考えられる。このことは，副次的薬理試験でも確認されており，NIH3T3：IGF-1R：IGF-2 腫瘍モデルマウスに対し，セリチ

ニブは 100 mg/kg の用量まで IGF-1R 及び AKT のリン酸化を抑制せず（3.2.1 項），マウス OGTT でも，セリチニブは 100 mg/kg の用量まで血糖値及び空腹時血漿中インスリン濃度に有意な影響を及ぼさなかった（3.2.2 項）。したがって，セリチニブが臨床用量で IGF-1R シグナル伝達経路及びブドウ糖代謝に影響する可能性は低いと考えられる。また，セリチニブの選択性に関する *in vitro* 副次的薬理試験では，セリチニブが細胞機能試験（カルシウム流入）で活性を示したのはドパミン D2 受容体に対してのみであり，その EC50 値も高値（6.0 µM）であった（3.1.1 項）。また，PXR 依存的 CYP3A4 誘導について，セリチニブは弱い活性（9.8%）を示したに過ぎなかった（3.1.1 項）。以上のことから，セリチニブの臨床用量における標的外への影響は極めて小さいと考えられる。

セリチニブの安全性薬理試験として，*in vitro*（hERG チャネルアッセイ）及び *in vivo*（テレメトリー試験）での心血管系への影響に関する試験，並びにラットを用いた中枢神経系及び呼吸系への影響に関する試験を実施した。hERG チャネルアッセイにおいて，セリチニブは hERG 電流を阻害し，IC50 は 0.4 µM であった。*ALK* 融合遺伝子変異の腫瘍を有する癌患者に臨床推奨用量（750 mg）を経口投与したときの Cmax（1100 ng/mL，CLDK378X2101 試験）及びヒトにおけるセリチニブの血漿タンパク結合率（97.2%，[CTD 2.6.4-4.2 項]）から最高血漿中非結合型セリチニブ濃度を算出すると 30.8 ng/mL となる。hERG チャネルアッセイにおける IC50 は臨床推奨用量における最高血漿中非結合型セリチニブ濃度の約 7 倍であった。GLP 非適用のサルを用いたテレメトリー試験では，250 mg/kg の単回経口投与で心血管系への影響はみられなかったが，GLP 適用のサルを用いたテレメトリー試験では，4 例中 1 例で 100 mg/kg の単回経口投与において QTc 間隔の延長（投与 10～19 時間後）が認められた。これらの試験では血漿中セリチニブ濃度測定を実施していないが，サルを用いた 2 週間反復投与毒性試験（試験番号 0870126）における 100 mg/kg/日群の投与 14 日目の Cmax は 1710～2140 ng/mL（投与 7 時間後）であり，臨床推奨用量における Cmax の 1.6～1.9 倍であった。臨床試験では，セリチニブを投与した患者で QTc 間隔の延長がみられ，セリチニブの曝露量と QTc 間隔の延長の間に相関性が示されていることから，添付文書（案）に本事象について記載し，注意喚起を行っている。ラットを用いた中枢神経系及び呼吸系への影響に関する試験では，100 mg/kg の単回経口投与において，セリチニブ投与に関連した変化は認められなかった。

以上のことから，セリチニブは *ALK* 融合遺伝子陽性 NSCLC の増殖を阻害し，臨床においても有用性を示すと考えられた。

7 参考文献

[Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, et al. (2008)] The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. Nat Rev Cancer; 8:11-23.

[Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. (2010)] EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. N Engl J Med; 363(18):1734-9.

[Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. (2012)] Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res; 18(5):1472-82.

[Friboulet L, Li N, Katayama R, et al. (2014)] The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. Cancer Discov; 4(6):662-73.

[Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, et al. (2013)] ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: An Analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res; 19(15):4273-81.

[Huang D, Kim DW, Kotsakis A, et al. (2013)] Multiplexed deep sequencing analysis of ALK kinase domain identifies resistance mutations in relapsed patients following crizotinib treatment. Genomics; 102:157-62.

[Katayama R, Khan TM, Benes C, et al. (2011)] Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. Proc Natl Acad Sci USA; 108(18):7535-40.

[Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. (2012)] Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers. Sci Transl Med; 4(120):120ra17.

[Katayama R, Friboulet L, Koike S, et al. (2014)] Two Novel ALK Mutations Mediate Acquired Resistance to the Next-Generation ALK Inhibitor Alectinib. Clin Cancer Res; 20(22):1-11.

[Orbach RC and Zineh I (2011)] FDA : CDER Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review of Crizotinib. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000ClinPharmR.pdf

[Shaw AT and Engelman JA (2013)] ALK in lung cancer: past, present, and future. J Clin Oncol; 31(8):1105-11.

[Toyokawa G, Hirai F, Inamasu E, et al. (2014)] Secondary mutations at I1171 in the ALK gene confer resistance to both crizotinib and alectinib. J Thorac Oncol; 9(12):e86-7.

[Voena C and Chiarle R (2012)] The battle against ALK resistance: successes and setbacks. Expert Opin Investig Drugs; 21(12):1751-4.

2.6.3　薬理試験概要表

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.3.1　薬理試験一覧表 5
2.6.3.2　薬効を裏付ける試験 16
2.6.3.3　副次的薬理試験 16
2.6.3.4　安全性薬理試験 17

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
ALCL	Anaplastic large-cell lymphoma	未分化大細胞リンパ腫
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
AUC0-24h	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to time 24 hour	0 時間から 24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積
AURORA-A	Aurora kinase A	-
BCR	Breakpoint cluster region	-
BTK	Bruton's tyrosine kinase	ブルトン型チロシンキナーゼ
cABL	Abelson kinase	-
cABL-T315I	-	Abelson kinase（cABL）内にグリベック耐性変異である T315I を有する変異体
CDK	Cyclin-dependent kinase	サイクリン依存性キナーゼ
CYP	Cytochrome P450	シトクロム P450
ECG	Electrocardiogram	心電図
EC50	Concentration causing 50% effect	50%の効果を誘導する濃度
EGFR	Epidermal growth factor receptor	上皮増殖因子受容体
EML4	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	微小管会合蛋白質 4
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	細胞外シグナル制御キナーゼ
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化セルソーティング
FGFR	Fibroblast growth factor	線維芽細胞増殖因子
FLT	FMS-like tyrosine kinase	FMS 様チロシンキナーゼ
GLP	Good Laboratory Practices	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
GPCR	G protein-coupled receptor	G 蛋白質共役受容体
GSK	Glycogen synthase kinase	グリコーゲン合成酵素キナーゼ
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓
hERG	Human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
IC50	Concentration required to inhibit effects by 50%	50%阻害濃度
IGF	Insulin-like growth factor	インスリン様成長因子
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	インスリン様成長因子 1 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
JAK	Janus kinase	ヤヌスキナーゼ
KDR	Kinase insert domain receptor	-
LCK	Lymphocyte kinase	-
LC-MS	Liquid chromatograph mass spectrometer	液体クロマトグラム質量分析
NPM	Nucleophosmin	ヌクレオフォスミン。核小体リン酸化蛋白質のひとつ
NSCLC	Non-small l cell lung cancer	非小細胞肺癌
pAKT	Phospholyrated AKT	リン酸化 AKT
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor	血小板由来成長因子受容体

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
PDK	3-phosphoinositide-dependent protein kinase	3-ホスフォイノシチド依存性蛋白質キナーゼ
pIGF-1R	Phospholyrated IGF-1R	リン酸化 IGF-1R
PKA	Protein kinase A	蛋白質キナーゼ A
PKC	Protein kinase C	蛋白質キナーゼ C
PKN	Protein kinase N	-
pSTAT3	Phospholyrated STAT3	リン酸化 STAT3
PXR	Pregnane X receptor	プレグナン X 受容体
RNA	Ribonucleic acid	リボ核酸
SST	Somatostatin receptor	ソマトスタチン受容体
STAT	Signal transducer and activator of transcription	シグナル伝達兼転写因子
SYK	Spleen tyrosine kinase	脾臓チロシンキナーゼ
T/C	Tumor value (change) divided by control value (change)	溶媒対照群（C）の腫瘍体積（変化）で除した薬物投与群（T）の腫瘍体積（変化） 100×[(被験薬投与群の day x の腫瘍体積)−(被験薬投与群の day 1 の腫瘍体積)]/ [(溶媒対照群の day x の腫瘍体積)−(溶媒対照群の day 1 の腫瘍体積)] ただし，腫瘍退縮の場合は, 100×([(被験薬投与群の day x の腫瘍体積)−(被験薬投与群の day 1 の腫瘍体積)])/ [(被験薬投与群の day 1 の腫瘍体積)])
TEL	Translocation Ets Leukemia	転写因子の 1 つ
TIE	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains	-
WT	Wild type	野生型
ZAP70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa	-
5-HT5A	5-hydroxytryptamine 5A receptor	セロトニン 5A 受容体

2.6.3.1 薬理試験一覧表

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
標的分子に対するキナーゼ阻害活性と選択性（*in vitro*）					
LDK378's inhibitory activity against a panel of recombinant protein kinases	A panel of 36 recombinant human protein kinases LDK378 was most potent against ALK (IC50 = 0.15 nM). Two additional kinases had IC50 values < 100 nM: INSR (IC50 = 7 nM) and IGF-1R (IC50 = 8 nM). All other kinases had IC50 values > 100 nM: AURORA-A, AXL, BTK, cABL-T315I, CDK2A, CDK4D1, COT1, EGFR, EPHA4, EPHB4, ERK2, FGFR3, GSK3β, JAK1, JAK2, JAK3, KDR, KIT, LCK, MET, p38a, PDGFRα, PDK1, PKA, PKCα, PKCθ, PKN1, PKN2, RET, ROCK2, SYK, TYK2, ZAP70.	*In vitro*	Novartis	[RD-2010-00649]	4.2.1.1-1
Crizotinib's inhibitory activity against a panel of recombinant protein kinases	A panel of 36 recombinant human protein kinases Crizotinib (NVP-BQK827) was most potent against ALK (IC50 = 3 nM) and MET (IC50 = 8 nM). Five additional kinases (cABL-T315I, AXL, AURORA-A, JAK2, LCK) had IC50 values < 100 nM. All other kinases had IC50 values > 100 nM: BTK, CDK2A, CDK4D1, COT1, EGFR, EPHA4, EPHB4, ERK2, FGFR3, GSK3β, IGF-1R, INSR, JAK1, JAK3, KDR, KIT, p38a, PDGFRα, PDK1, PKA, PKCα, PKCθ, PKN1, PKN2, RET, ROCK2, SYK, TYK2, ZAP70.	*In vitro*	Novartis	[RD-2010-00651]	4.2.1.1-2
LDK378's effect on proliferation and viability of Ba/F3 cells engineered to express *ALK* fusion gene	Ba/F3 cells expressing NPM-ALK or EML4-ALK fusion kinase LDK378 inhibited proliferation and viability of Ba/F3 cells expressing *NPM-ALK* (IC50 = 35 nM) or *EML4-ALK* (variant 3) (IC50 = 27 nM). In IL-3 dependent Ba/F3 cells that did not express any active kinases, LDK378's IC50 was 4970 nM.	*In vitro*	Novartis	[RD-2009-50672]	4.2.1.1-3

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
LDK378's effect on proliferation and viability of Ba/F3 cells engineered to express various activated protein kinases	A panel of Ba/F3 cells expressing ALK and 37 other protein kinases activated by fusion with TEL (with the exceptions of ABL and BRAF, which were activated by fusion with BCR and coexpression with PIM1, respectively) In addition to Ba/F3 line expressing active ALK, three Ba/F3 lines had IC50 values < 1,000 nM: TEL-IGF-1R (IC50 = 220 nM), TEL-INSR (IC50 = 400 nM), and TEL-ROS1 (IC50 = 180 nM). All other lines had IC50 values > 1,000 nM: BCR-ABL, BRAF-PIM1, TEL-BMX, TEL-EphA3, TEL-EphB2, TEL-FGFR2, TEL-FGFR3, TEL-FGFR4, TEL-FGR, TEL-FLT1, TEL-FLT3, TEL-FLT4, TEL-FMS, TEL-JAK1, TEL-JAK2, TEL-JAK3, TEL-KDR, TEL-KIT, TEL-LCK, TEL-LYN, TEL-MER, TEL-MET, TEL-PDGFRβ, TEL-RET, TEL-RON, TEL-SRC, TEL-SYK, TEL-TIE1, TEL-TIE2, TEL-TRKA, TEL-TRKB, TEL-TRKC, TEL-TYK2, TEL-ZAP70.	*In vitro*	Novartis	[RD-2009-50670]	4.2.1.1-4
LDK378's effect on proliferation and viability of Ba/F3 cells engineered to express active FES (TEL-FES) or FER (TEL-FER) kinase	Ba/F3 cells expressing active tyrosine kinase FES (TEL-FES) or FER (TEL-FER) LDK378 did not have strong inhibitory activity in Ba/F3 cells expressing active TEL-FES (IC50 = 3648 nM) or TEL-FER (IC50 = 1649 nM).	*In vitro*	Novartis	[RD-2009-50673]	4.2.1.1-5
Effects of LDK378 on proliferation and viability of Ba/F3 cells engineered to express crizotinib resistant *EML4-ALK* mutants	Ba/F3 cells expressing *EML4-ALK* wild type (WT) or *EML4-ALK* mutants that harbor crizotinib resistant *ALK* mutation C1156Y, L1196M, G1202R, I1171T, S1206A, or G1269S LDK378 was more potent than crizotinib against all EML4-ALK fusion kinases tested, with the following IC50 values: WT: 31 nM, C1156Y: 160 nM, L1196M: 69 nM, G1202R: 940 nM, I1171T: 37.6 nM, S1206A: 160 nM, G1269S: 250 nM. Crizotinib (NVP-LDQ718) had the following IC50 values: WT: 160 nM, C1156Y: 440 nM, L1196M: 1460 nM, G1202R: 1370 nM, I1171T: 340 nM, S1206A: 270 nM, G1269S: 2140 nM.	*In vitro*	Novartis	[RD-2013-50375]	4.2.1.1-6

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
Effects of LDK378 on ALK signaling pathway in human ALCL with *ALK* translocations	Human ALCL cell Karpas299 (*NPM-ALK*+) LDK378 inhibited ALK signaling pathway in Karpas299 cells, measured by inhibition of phosphorylation of NPM-ALK (IC50 = 46 nM) or of STAT3 (IC50 = 150 nM).	*In vitro*	Novartis	[RD-2008-50914]	4.2.1.1-7
Effects of LDK378 on ALK signaling pathway in human NSCLC with *ALK* translocations	Human NSCLC cell NCI-H2228 (*EML4-ALK*+) LDK378 inhibited ALK signaling pathway in NCI-H2228 cells, measured by inhibition of phosphorylation of EML4-ALK, AKT, ERK and S6.	*In vitro*	Massachusetts General Hospital Cancer Center (US)	[Friboulet et al. 2014]	4.2.1.1-8 参考資料
In vitro 細胞増殖阻害作用					
Effects of LDK378 on cell proliferation in human cancer cells with *ALK* translocations	Human ALCL cell Karpas299 (*NPM-ALK*+) and human NSCLC cell NCI-H2228 (*EML4-ALK*+) LDK378 inhibited cell proliferation and growth of Karpas299 (IC50 = 45 nM) and NCI-H2228 (IC50 = 11 nM).	*In vitro*	Novartis	RD-2008-50914	4.2.1.1-7
LDK378's effect on cell proliferation and viability of a neuroblastoma cell line with *ALK* gene amplification	Human neuroblastoma cell NB-1 with *ALK* gene amplification LDK378 inhibited cell proliferation and growth of NB-1 cell (IC50 = 24 nM).	*In vitro*	Novartis	[RD-2010-50442]	4.2.1.1-9
LDK378's effect on cell proliferation and growth in a panel of human NSCLC cell lines	95 different human NSCLC cell lines *ALK* expression level and sensitivity towards LDK378 were determined. *ALK* expression level was determined by RNA-seq or microarray technology. NSCLC lines that do not harbor *ALK* rearrangements or fusion genes were not sensitive to LDK378 (the crossing point: relative IC50 > 5.0 µM) regardless of their *ALK* expression level. NCI-H2228, the only line with the *EML4-ALK* (and the highest expression level of *ALK*), was the most sensitive line to LDK378 (the crossing point: relative IC50 = 0.8 µM).	*In vitro*	Novartis	[RD-2013-50316]	4.2.1.1-10
LDK378's and crizotinib's effects on cell proliferation in human NSCLC with *ALK* translocations	Human NSCLC cells NCI-H2228 and H3122 (*EML4-ALK*+) LDK378 and crizotinib inhibited cell proliferation of NCI-H2228 (IC50 = 3.8 and 107 nM, respectively) and H3122 (IC50 = 6.3 and 245 nM, respectively).	*In vitro*	Massachusetts General Hospital Cancer Center (US)	Friboulet et al. 2014	4.2.1.1-8 参考資料

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
LDK378's and crizotinib's effects on cell proliferation in NSCLC that harbored crizotinib resistant *ALK* mutations	H3122CR1 (experimentally induced L1196M mutation in *ALK* kinase domain), and MGH045 and MGH021-4 derived from NSCLC patients with *ALK* L1196M or G1269A mutation in *ALK*, respectively LDK378 and crizotinib inhibited cell proliferation of H3122CR1 (IC50 = 230 and 2884 nM, respectively), MGH045 (IC50 = 25 and 891 nM, respectively) and MGH021-4 (IC50 = 80 and 500 nM, respectively).	*In vitro*	Massachusetts General Hospital Cancer Center (US)	Friboulet et al. 2014	4.2.1.1-8 参考資料
LDK378's and crizotinib's effects on cell proliferation in NSCLC that did not harbor crizotinib resistant *ALK* mutations	MGH051 derived from crizotinib-resistant NSCLC patients without secondary mutations in ALK LDK378 and crizotinib inhibited cell proliferation of MGH051(IC50 = 2.6 and 62 nM, respectively).	*In vitro*	Massachusetts General Hospital Cancer Center (US)	Friboulet et al. 2014	4.2.1.1-8 参考資料
LDK378's, alectinib's and crizotinib's effects on cell proliferation in NSCLC that harbored alectinib resistant *ALK* mutation	MGH056-1 derived from NSCLC patients with *ALK* I1171T mutation in *ALK* LDK378, alectinib and crizotinib inhibited cell proliferation of MGH056-1 (IC50 = 4.3, 80 and 236 nM, respectively).	*In vitro*	Massachusetts General Hospital Cancer Center (US)	[Katayama et al. 2014]	4.2.1.1-11 参考資料
In vivo における薬理作用					
Evaluation of LDK378's anti-tumor activity and exposure in xenograft tumor model of NSCLC NCI-H2228	Xenograft tumor model of *EML4-ALK*+ NSCLC NCI-H2228 in SCID beige mice LDK378 was dosed once daily at 3.125, 6.25, 12.5, and 25 mg/kg for 14 days. Changes in tumor volume for each treated (T) and control (C) groups were measured and used to calculate growth inhibition as expressed by the T/C ratio. LDK378 was well tolerated. Dose-dependent efficacy and exposure were observed, with complete tumor regression ($p < 0.001$) at 25 mg/kg associated with plasma AUC0-24h of 40253 h*nM (or 22467 ng · h/mL). A dose of 3.125 and 6.25 mg/kg of LDK378 led to tumor growth inhibition (T/C: 41 and 36%; $p > 0.05$ and $p < 0.05$, respectively). A dose of 12.5 mg/kg induced a very significant tumor regression (T/C: -75%; $p = 0.001$).	Oral	Novartis	[RD-2008-50926]	4.2.1.1-12

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
Evaluation of LDK378's anti-tumor activity and exposure in xenograft tumor model of ACLC Karpas299	Xenograft tumor model of *NPM-ALK*+ ALCL Karpas299 in SCID beige mice LDK378 was dosed once daily at 6.25, 12.5, and 25 mg/kg for 14 days. LDK378 was well tolerated. Dose-dependent efficacy and exposure were observed, with nearly complete tumor regression (TC: -93%; $p < 0.001$) at 25 mg/kg associated with plasma AUC0-24h of 24787 h*nM (or 13835 ng · h/mL). A dose of 6.25 mg/kg did not produce significant tumor growth inhibition (T/C: 62%, $p > 0.05$). A dose of 12.5 mg/kg inhibited the tumor growth significantly (T/C: 18%, $p < 0.05$).	Oral	Novartis	[RD-2008-50927]	4.2.1.1-13
Evaluation of LDK378's anti-tumor activity and exposure in xenograft tumor model of NSCLC NCI-H2228 in rats	Xenograft tumor model of *EML4-ALK*+ NSCLC NCI-H2228 in RNU nude rats LDK378 was dosed once daily at 5, 10, and 25 mg/kg for 14 days. LDK378 was well tolerated. Dose-dependent efficacy and exposure were observed, with complete tumor regression at 25 mg/kg ($p < 0.05$), associated with plasma AUC0-24h of 13917 h*nM (or 7768 ng · h/mL). T/C values were calculated at day 11 of treatment as the control group had to be sacrificed due to the large tumor size. Dosing of the treatment groups continued through day 14. A dose of 5 mg/kg of LDK378 led to slight and statistically non-significant tumor growth inhibition (T/C: 67%, $p > 0.05$). A dose of 10 mg/kg caused tumor stasis (T/C: 2%, $p < 0.05$).	Oral	Novartis	[RD-2008-50933]	4.2.1.1-14

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
Evaluation of LDK378's anti-tumor activity and exposure in xenograft tumor model of ACLC Karpas299 in rats	Xenograft tumor model of *NPM-ALK*+ ALCL Karpas299 in RNU nude rats LDK378 was dosed once daily at 6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg. LDK378 was well tolerated. Dose-dependent efficacy and exposure were observed. After 8 days of treatment, a dose of 12.5 mg/kg inhibited the tumor growth (T/C: 30%, $p < 0.005$), and doses of 25 and 50 mg/kg resulted in significant tumor regression (T/C: -33 and -66%, respectively; $p < 0.001$). After 14 days of treatment, 25 and 50 mg/kg resulted in substantial tumor regression, T/C: -76% and -97%, respectively, which was associated with plasma AUC0-24h of 13127 and 14006 h*nM, respectively (or 7327 and 7817 ng · h/mL, respectively).	Oral	Novartis	[RD-2008-50942]	4.2.1.1-15
Comparison of anti-tumor activity of LDK378 with crizotinib in xenograft tumor model of NSCLC NCI-H2228	Xenograft tumor model of *EML4-ALK*+ NSCLC NCI-H2228 in SCID beige mice LDK378 was dosed once daily at 25 and 50 mg/kg for 14 days; crizotinib (BQK827) was dosed once daily at 100 mg/kg for 14 days. Complete tumor regression was observed after 14 days of treatment with LDK378 or crizotinib. While tumors recurred quickly in all 8 mice within 1-2 weeks after termination of 14-day treatment with crizotinib (100 mg/kg), remission maintained for > 4 months after termination of 14-day treatment with LDK378 (50 mg/kg). One out of the 8 mice treated with LDK378 50 mg/kg was found to have a metastatic tumor in thoracic cavity on day 151. All the other 7 animals maintained remission until the end of the study (day 198). In 4 out of 8 mice having received 14-day treatment of LDK378 25 mg/kg, tumors recurred within 4-5 weeks. The other 4 mice had remission until the end of the study (day 198).	Oral	Novartis	[RD-2013-50301]	4.2.1.1-16

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
Evaluation of LDK378's anti-tumor activity and exposure in a crizotinib resistant xenograft tumor model of NCI-H2228 that harbored *ALK* I1171T mutation	Crizotinib resistant xenograft tumor model of *EML4-ALK*+ NSCLC NCI-H2228 with *ALK* I1171T mutation in SCID beige mice LDK378 was dosed once daily at 12.5, 25, and 50 mg/kg; crizotinib (BQK827) was dosed once daily at 100 mg/kg for 14 days. Dose dependent efficacy and exposure of LDK378 was observed, with complete tumor regression at 50 mg/kg ($p < 0.0001$) after 14 days of treatment, associated with plasma AUC0-24h of 24620 ng · h/mL. A dose of 25 mg/kg of LDK378 led to statistically significant tumor growth inhibition (T/C: 44%, $p < 0.05$). Crizotinib at 100 mg/kg, with the exposure of AUC0-24h 46975 ng · h/mL, had little effect on tumor growth in this resistant model.	Oral	Novartis	[RD-2013-50300]	4.2.1.1-17
Evaluation of LDK378's anti-tumor activity and exposure in a crizotinib resistant xenograft tumor model of NCI-H2228 that harbored *ALK* C1156Y mutation	Crizotinib resistant xenograft tumor model of *EML4-ALK*+ NSCLC NCI-H2228 with *ALK* C1156Y mutation in SCID beige mice LDK378 was dosed once daily at 25, 50, and 100 mg/kg; crizotinib (BQK827) was dosed once daily at 100 mg/kg for 11 days. Dose dependent efficacy and exposure of LDK378 was observed after 11 days of treatment, with complete tumor regression at 100 mg/kg, associated with plasma AUC0-24h of 57811 ng · h/mL. LDK378 at 25 mg/kg did not have significant effect on growth whereas at 50 mg/kg showed significant tumor growth inhibition (T/C: 11.7% on day 12, $p < 0.05$). Crizotinib at 100 mg/kg (with the exposure of AUC0-24h 49059 ng · h/mL) had little effect on tumor growth in this resistant model.	Oral	Novartis	[RD-2013-50302]	4.2.1.1-18

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
Evaluation of LDK378's anti-tumor activity in a crizotinib resistant xenograft tumor model of NCI-H2228 that did not harbor mutations in *ALK* kinase domain	Crizotinib resistant xenograft tumor model of *EML4-ALK*+ NSCLC NCI-H2228 without detectable mutations in *ALK* kinase domain in SCID beige mice LDK378 was dosed once daily at 25, 50, and 100 mg/kg; crizotinib (BQK827) was dosed once daily at 100 mg/kg for 22 days. Dose dependent efficacy of LDK378 was observed. After 22 days of treatment, LDK378 caused complete tumor regression at 100 mg/kg and tumor regression at 50 mg/kg (T/C: -16.0%). Crizotinib at 100 mg/kg had little effect on tumor growth in this resistant model.	Oral	Novartis	[RD-2013-50303]	4.2.1.1-19
Evaluation of LDK378's anti-tumor activity in a crizotinib resistant xenograft tumor model of MGH045 that harbored *ALK* L1196M mutation	Crizotinib resistant xenograft tumor model of MGH045 cells derived from NSCLC patients with *ALK* L1196M mutation in *ALK* kinase domain in nude mice LDK378 was dosed once daily at 25 mg/kg for 28 days; crizotinib was dosed once daily at 100 mg/kg for 14 days. Tumor growth suppression was observed after 14 days of treatment with LDK378 while crizotinib slightly inhibited.	Oral	Massachusetts General Hospital Cancer Center (US)	Friboulet et al. 2014	4.2.1.1-8 参考資料
In vivo pharmacodynamic and pharmacokinetic studies of LDK378 in ALCL Karpas299 tumor model to evaluate correlation of LDK378 concentration with its effect on ALK-STAT3 signaling pathway	Orthotopic ALCL model generated through inoculating *NPM-ALK*+ Karpas299 cells in SCID beige mice LDK378 was dosed at 5, 12.5, 25, 50, and 100 mg/kg. Tumor and plasma samples were collected at 3, 7, 16, 24, 48, 72, 96 and 120 hour time points following single dose of LDK378. pSTAT3 levels in the tumor samples were determined by the Western blot or FACS analysis. LDK378 concentrations in both plasma and tumor samples were quantified using LC-MS assay. LDK378 inhibited ALK-STAT3 signaling pathway in a concentration dependent manner. Dosing at 12.5 mg/kg inhibited pSTAT3 by ~60% at 16 hour time point, but dropped to <50% at 24 hour time point. The 25 mg/kg dose reduced pSTAT3 by 60-80% between 3 to 24 hour time points. The 50 and 100 mg/kg doses reduced pSTAT3 by 70-90% at all time points except at 50 mg/kg at 7 hour time point.	Oral	Novartis	[RD-2008-50976]	4.2.1.1-20

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
副次的薬理試験					
In vitro 薬理試験					
In vitro safety pharmacology receptor profiling of LDK378 at [redacted]	A panel of 84 targets (GPCRs, ion channels, transporters, nuclear receptors) The 84 member target panel was first assayed at a single concentration of 10 µM. Fifteen of the 84 targets showed greater than 50% activity and included: Adrenergic α2B receptor (62%), Calcium channel L-type (benzodiazepine and phenylalkylamine: 90 and 65%, respectively), Galanin receptor 2 (59%), Transporter monoamine (97%), Motilin receptor(88%), Platelet activating factor receptor (59%), Potassium channel (99%), Progesterone receptor B (78%), 5-HT5A receptor (71%), SST1, 2, 3 and 4 (88, 93, 76 and 90%, respectively), and Urotensin II receptor (79%). To determine the binding affinities, a dose response IC50 was performed on 9 out of the 15 targets indicated above. The results of the IC50 were: Transporter monoamine (0.33 µM), Potassium channel (0.68 µM), 5-HT5A receptor (5.0 µM), SST1, 2, 3 and 4 (2.4, 2.3, 5.1 and 1.9 µM, respectively), Calcium channel L-type benzodiazepine and phenylalkylamine (1.8 and 2.4 µM, respectively). All of the remaining 69 targets of this 84 target panel had binding activity less than 50% at 10 µM of LDK378.	*In vitro*	[redacted] (Taiwan)	[RD-2008-50904]	4.2.1.2-1

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
NVP-LDK378: *in vitro* safety pharmacology profile	A panel of 73 targets (GPCRs, ion channels, transporters, enzymes, nuclear receptors) The 73 member target panel was initially screened in dose response format from binding or enzymatic assays. Where two IC50 values are listed, the targets were tested in two independent assays. Nineteen targets had IC50's for LDK378 of less than 5 μM from the initial screening. These included following targets and the IC50 were: Adenosine 3 receptor (0.73 and 3.1 μM), Adrenergic α1 receptor (4.4 μM), Adrenergic α1A receptor (3.9 μM), Adrenergic α2C receptor (4.3 and 13 μM), Calcium channel L-type (4.3 and 9.3 μM), Melanocortin 3 receptor (0.67 and 3.4 μM), Melanocortin 4 receptor (0.60 and 5.6 μM), Motilin receptor (3.5 and 8.5 μM), Opiate κ receptor (0.57 and 4.5 μM), Opiate μ receptor (4.8 μM), PXR (4.4 μM), Histamine H2 receptor (0.17 μM), Neurokinin 1 receptor (0.99 μM), Dopamine D2 receptor (1.2 and 6.7 μM), Norepinephrine transporter (1.7 and 7.3 μM), 5-HT2A receptor (4.7 and 6.4 μM), Ghrelin receptor(2.9 and 28 μM), Vasopressin 1a receptor (4.0 and 20 μM), and Phosphodiesterase 4D receptor (1.8 and 4.1 μM). All of the remaining 54 targets of this 73 target panel had IC50 activity > 5 μM for LDK378.	*In vitro*	Novartis	[RD-2010-50499]	4.2.1.2-2
Safety receptor panel profiling of LDK378: individual test EC50 and IC50 values	LDK378 was tested in functional calcium flux cellular assay of Adenosine 3, Adrenergic α1A, Dopamine D2, Histamine H2 and H3, Melanocortin 4, Opioid κ1 receptor, Neurokinin1 receptor, SST2 and 4. LDK378 showed weak agonist activity in Dopamine D2 assay (EC50 of 6.0 μM at 50% efficacy), and it was inactive in all other assays up to 10 μM.	*In vitro*	[redacted] (US)	[RD-2008-50906]	4.2.1.2-3
CYP3A4 induction potential of LDK378 by measuring activation of human PXR in a reporter gene assay	LDK378 was found to be weakly active at the top dose of 10 μM (9.8% of the observed response to rifampicin, a known PXR agonist used as a positive control) when tested in a hepatoma cell assay that measured PXR-dependent CYP3A4 induction.	*In vitro*	Novartis	[RD-2010-50501]	4.2.1.2-4

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
In vivo 薬理試験					
In vivo pharmacodynamic study to evaluate LDK378's effect on IGF-1R signaling pathway	Xenograft tumor model derived from NIH3T3 cells co-expressing IGF-1R and the ligand IGF-2 in HsdNpa nude mice LDK378 was dosed at 25, 50, and 100 mg/kg. Tumor samples were collected at 1, 4, 8, and 24 hour time points following single dose of LDK378. pIGF-1R and pAKT levels were determined by the Western blot analysis. LDK378 did not inhibit IGF-1R signaling pathway at all dose levels tested, as measured by its effect on pIGF-1R level and pAKT level.	Oral	Novartis	[RD-2013-00413]	4.2.1.2-5
Evaluation of LDK378's effects on glucose tolerance and insulin resistance in mice	Mouse/C57BL/6J Animals were dosed once daily with LDK378 at 25, 50, and 100 mg/kg for 7 days before the oral glucose tolerance test under fasting condition. LDK378 did not have significant effect on glucose tolerance or fasting plasma insulin level at all dose levels tested compared with the vehicle group.	Oral	Novartis	[RD-2010-50507]	4.2.1.2-6
安全性薬理試験	2.6.3.4 項参照				
薬力学的薬物相互作用試験	該当資料なし				

2.6.3.2 薬効を裏付ける試験

2.6.3.1 に記載

2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.1 に記載

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses or concentrations	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number	Location in CTD
Cardio-vascular	hERG transfected HEK293 cells	*In vitro*	0.3, 0.4, 1, 2.4 µM	Not applicable	The IC50 for the inhibitory effect on hERG potassium current was 0.4 µM.	Yes	[0970418]	4.2.1.3-1
Cardio-vascular	Monkeys/ Cynomolgus	Oral (gavage)	0, 250 mg/kg (test article was dosed as LDK378 phosphate)	2 males	There was no LDK378-related effect on body weight. Decreased food consumption, emesis with feed and soft feces were observed at 250 mg/kg dose. There were no LDK378-related effects on blood pressure, heart rate, core body temperature or electrocardiography.	No	[0770889]	4.2.1.3-2
Cardio-vascular	Monkeys/ Cynomolgus	Oral (gavage)	0, 10, 30, 100 mg/kg	4 males	Soft feces was observed at doses ≥ 10 mg/kg dose. Emesis was observed at doses ≥ 30 mg/kg dose. Diarrhea was observed at 100 mg/kg dose. No LDK378-related changes in food consumption or body weight were observed. LDK378 had no effects on blood pressure, heart rate, body temperature and ECG intervals (PR, RR or QRS) and did not produce any arrhythmias. Apparent QTc prolongation was noted only in one animal between approximately 10 and 19 hours (ranged from 14.25 to 43.52 ms above predose baseline value) at 100 mg/kg dose.	Yes	[0970420]	4.2.1.3-3
Central nervous	Rat/Wistar Hannover	Oral (gavage)	0, 100 mg/kg	10 males	No LDK378-related effects were noted on functional observations and measurements conducted as part of the functional observational battery.	Yes	[0970415]	4.2.1.3-4
Respiratory	Rat/Wistar Hannover	Oral (gavage)	0, 100 mg/kg	10 males	No LDK378-related effects were noted on respiratory function (tidal volume, respiratory rate, minute volume).	Yes	0970415	4.2.1.3-4