第 2 部　CTD の概要

一般名：オシメルチニブメシル酸塩

版番号：[redacted]

2.6.1 緒言

タグリッソ®錠

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
2.6.1.1　緒言 4
2.6.1.2　参考文献 7

表目次

表 1　AZD9291 並びに特定された 2 つの薬理活性代謝物 AZ7550 及び AZ5104 の構造式 6

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
AKT	別名 PKB（プロテインキナーゼ B）
EGF	Epidermal growth factor：上皮成長因子
EGFR	Epidermal growth factor receptor：上皮成長因子受容体
EGFR(L858R)	Epidermal growth factor receptor with L858R activating mutation ：L858R 活性化変異を有する上皮成長因子受容体
EGFR(Ex19Del)	Epidermal growth factor receptor with exon19deletion activating mutation：エクソン 19 欠失活性化変異を有する上皮成長因子受容体
EGFRm	Epidermal growth factor receptor (containing activating/sensitising mutation)：活性化変異／感受性変異を有する上皮成長因子受容体
EGFRm/T790M	Epidermal growth factor receptor (containing activating mutation with T790M resistance mutation)：活性化変異及び T790M 耐性変異を有する上皮成長因子受容体
ErbB	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog：赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2：増殖因子受容体結合蛋白質 2
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2 (also known as ErbB2)：ヒト上皮成長因子受容体 2（別名 ErbB2）
MAPK	Mitogen-activated protein kinase：分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ
NSCLC	Non small cell lung cancer：非小細胞肺癌
PCR	Polymerase chain reaction：ポリメラーゼ連鎖反応
PI3K	Phosphatidylisositol 3-kinase：ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ
SHC	Src homologous and collagen：蛋白質チロシンキナーゼ
STAT	Signal transduction and activator of transcription：シグナル伝達兼転写活性化因子
TGF-α	Transforming growth factor-α：トランスフォーミング増殖因子α
TKI	Tyrosine kinase inhibitor：チロシンキナーゼ阻害剤

2.6.1.1　緒言

上皮成長因子受容体（EGFR）は、受容体チロシンキナーゼ ErbB ファミリーに属し、そのファミリーには EGFR（ErbB1）、HER2（ErbB2）、HER3（ErbB3）及び HER4（ErbB4）が含まれている。ErbB ファミリーは、4 つの相同的な機能ドメイン（細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内チロシンキナーゼドメイン及び C 末端調節ドメイン）を有している。ErbB ファミリーに結合することが知られているリガンドは 11 種類あり、それぞれ異なる受容体結合特異性を有する。例えば、EGF 及びトランスフォーミング増殖因子α（TGF-α）は EGFR のみ、エピレグリンは EGFR 及び HER4、ヘレグリンは HER3 及び HER4、ニューレグリン 4 は HER4 のみに結合する。生理的条件下において、リガンド結合により異なる受容体間でヘテロ及びホモ二量体が形成され、続いてそれらが活性化される。HER2 は同族リガンドのないオーファン受容体であると考えられているが、他の ErbB ファミリーとヘテロ二量体を形成することにより、リガンド介在性シグナル伝達に大きく関与している。受容体が二量体を形成し、活性化されると、それらの C 末端のチロシン残基がリン酸化され、ホスホリパーゼ Cγ、CBL、GRB2、SHC 及び p85 といった種々のアダプター蛋白質の特異的な結合部位として働くようになる。そして、これらのアダプター蛋白質が、PI3K/AKT、RAS-MAPK 及び STAT3 等のシグナル伝達経路を活性化することにより、細胞増殖、アポトーシス及び転移が促進される（Mitsudomi and Yatabe 2010）。

EGFR の活性化変異（EGFRm）が生じると、EGFR がリガンド非依存的かつ恒常的にリン酸化され、発癌シグナル伝達が活性化される。進行非小細胞肺癌（NSCLC）患者のうち、EGFRm を有する患者は欧米で約 15%及びアジアで約 30%である（Pao et al 2010）。EGFRm による腫瘍の約 90%で、エクソン 19 における数個のヌクレオチドのインフレーム欠失（Ex19del）又はエクソン 21 の点突然変異による 858 位のロイシンからアルギニンへの置換（L858R）が認められる。これらの活性化 Ex19del 及び L858R 変異により、一つには EGFR のアデノシン三リン酸 ATP への親和性が高くなり、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）の腫瘍に対する感受性が高くなる。しかし、この患者群に、EGFRm を標的とする既存の TKI のゲフィチニブ（イレッサ）、エルロチニブ（タルセバ）及びアファチニブ（ジオトリフ）を投与したとき、当初の奏効率は非常に良好で（約 70%）あるにもかかわらず、9～14 カ月後に薬剤耐性を生じる（Arcila et al 2011, Jackman et al 2009, Mok et al 2009, Oxnard et al 2011, Maemondo et al 2010, Mitsudomi et al 2010, Rosell et al 2012）。

病勢が進行した患者から腫瘍組織を採取して分析することにより、EGFR-TKI 耐性に関与する多くのメカニズムが特定されている。耐性を引き起こす遺伝的及びその他のシグナル伝達異常には、HER2（ErbB2）遺伝子増幅（Takezawa et al 2012）、MET 遺伝子増幅（Engelman et al 2007）、PIK3CA 遺伝子変異（Sequist et al 2011）、BRAF 遺伝子変異（Ohashi et al 2012）、NF1 欠失（de Bruin et al 2014）等がある。また、小細胞肺癌（SCLC）への形質転換や上皮間葉転換といった組織学的変化を示す耐性腫瘍も報告されている（Sequist et al 2011）。しかし、現在知られている最も一般的な耐性メカニズムは、EGFR の「ゲートキーパー」アミノ酸である 790 位のスレオニンがメチオニンに置換される二次的変異（T790M）の獲得であり、病勢が進行した患者のうち最大 60%の患者の腫瘍細胞で検出されている（Kobayashi et al 2005, Pao et al 2005, Yu et al 2013）。EGFR に T790M 変異が起こると、立体障害（Sos et al 2010）及び ATP 親和性の増強（Yun et al 2008）の双方から、既存の EGFR-TKI の阻害作用に対する耐性が獲得される（Pao et al 2005, Kobayashi et al 2005, Arcila et al 2011）。

現在のところ、耐性を獲得した患者に対する治療法は限られている。アファチニブ（Li et al 2008）や dacomitinib（Engelman et al 2007b）といった第二世代の不可逆的 EGFR-TKI は、治療経験のない EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に有効性を示す（Ramalingam et al 2012, Sequist et al 2013）。しかし、これらの不可逆的 TKI を単剤で使用する際、野生型 EGFR チロシンキナーゼに対する非選択的阻害に起因する用量制限毒性により、非臨床モデルで T790M 変異に効果を示す濃度までヒトでは増量できないことから（Eskens et al 2008）、T790M 変異による耐性患者では有効性が認められていない（Miller et al 2012, Katakami et al 2013）。更に、これらの阻害剤は、*in vitro*（Chmielecki et al 2011）及び患者（Kim et al 2012）において、T790M 変異を誘導する。有効性を示す可能性のあるレジメンの 1 つに、アファチニブと抗 EGFR 抗体のセツキシマブとの併用療法があり、EGFRm 肺癌を有し、エルロチニブに耐性を示す患者を対象とした第 IB 相臨床試験において、未確定ながら 32%の奏効率が得られている（Janjigian et al 2014）。しかし、この併用療法では重度の皮膚毒性が認められており、20%の患者で有害事象共通用語基準グレード 3 以上の発疹が報告されている（Janjigian et al 2014）。

変異のない（野生型）EGFR は複数の組織の上皮細胞に広く発現しており、増殖、再生、分化及び発生といった多くの生理学的過程で重要な役割を果たしている（Yano et al 2003）。既存の EGFR-TKI は、野生型 EGFR チロシンキナーゼを強く阻害し、この薬理作用に関連する毒性を引き起こすことが多い。EGFR はケラチノサイトの増殖、分化、遊走及び生存の重要な制御因子であり、EGFR が欠損すると、毛包の発生及び皮膚の構造に異常が生じる（Murillas et al 1995）。皮膚における野生型 EGFR の生理学的役割と一致して、既存の EGFR-TKI でよくみられる副作用には、様々な種類及び重症度の皮疹がある（Melosky and Hirsh 2014）。また、EGFR は消化管の上皮細胞にも発現しており、EGF の強い増殖促進作用が消化管の全ての部分で認められている（Vinter-Jensen 1999, Breider et al 1996, Reindel et al 1996）。消化管の生理機能に野生型 EGFR が関与しているため、EGFR-TKI で最も高頻度にみられる有害事象の 1 つに下痢がある（Melosky and Hirsh 2014）。EGFR-TKI に伴うこれらの一般的な毒性により、患者の服薬遵守、生活の質及び治療成績が低下する可能性がある（Hirsh 2011）。したがって、野生型 EGFR チロシンキナーゼへの活性が低く、T790M 腫瘍をより効果的に標的とする EGFR-TKI に対する大きなアンメットニーズが依然として存在している。このことから、T790M 及び EGFR-TKI 感受性変異を標的とし、野生型 EGFR チロシンキナーゼへの作用が弱くなるようにデザインされた新規 EGFR-TKI が開発されている。

また、注目すべきこととして、T790M 変異腫瘍は、その発生率は未だ不明であるが、治療経験のない一次治療対象の NSCLC においても発生する。腫瘍生検のダイレクトシークエンスや変異検査キットを用いた PCR といった従来の診断技術による測定では、治療経験のない EGFRm 患者の約 2～5%に T790M 変異が認められた（生殖細胞系の EGFR に T790M 変異がみられる患者を含む）（Sequist et al 2008, Oxnard et al 2012）。最近、より感度の高い技術を使用したグループが、T790M 変異の検出率は更に高い 65%であると報告した（Costa et al 2014）（ただし、これらの結果には分析時のアーチファクトが含まれている可能性もある（Ye et al 2013））。したがって、T790M 変異を標的とする薬剤は、T790M 変異陽性 EGFRm 腫瘍を有する進行 NSCLC 患者の一次治療対象サブセットにもベネフィットをもたらすと考えられる。

薬理学的特性

AZD9291（表 1）は、T790M 耐性・活性化変異標的型かつ野生型非標的型 EGFR チロシンキナーゼ不可逆的阻害作用を有する経口投与可能な新規 TKI である。本申請は、EGFR-TKI の使用中又は使用後に病勢進行した、EGFR T790M 変異陽性の切除不能な進行・再発の NSCLC 患者に

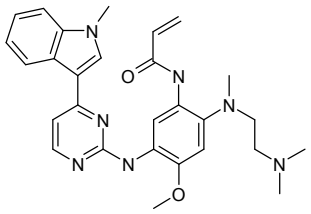
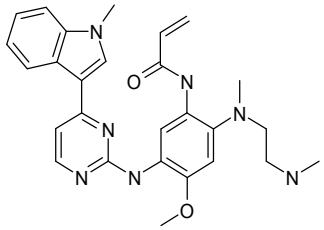
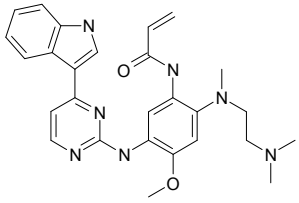
対する経口治療薬として AZD9291 を使用することを目的としたものである。本薬は、ゲフィチニブ、エルロチニブ又はアファチニブ治療後に再発した進行 NSCLC 患者サブセットにおいて、残存している EGFRm 腫瘍細胞を引き続き抑制するだけでなく、T790M 耐性変異により再発した患者サブセットに更なるベネフィットをもたらすことを目的としている。

非臨床開発において、マウス、ラット及びイヌを含む非臨床動物種で AZD9291 が代謝されると循環血液中に 2 つの活性代謝物 AZ5104 及び AZ7550 が生成されることが明らかになった（表 1）。その後、ヒトに AZD9291 を投与したときにも循環血液中に両代謝物が存在することが確認された。

非臨床試験の概要文では、非臨床薬理、毒性、薬物動態及び薬物代謝試験の主な結果について記載した。

AZD9291 は、一部の試験報告書で AZ13552748 とも称されている。代謝物 AZ5104 及び AZ7550 は試験報告書でそれぞれ AZ13575104 及び AZ13597550 とも称されている。

表 1　　AZD9291 並びに特定された 2 つの薬理活性代謝物 AZ7550 及び AZ5104 の構造式

化学構造	化合物名／コード	分子量
	AZD9291 （AZ13552748）	499.60
	AZ7550 （M3 代謝物、AZ13597550）	485.60
	AZ5104 （M6 代謝物、AZ13575104）	485.60

本薬の効能・効果（案）及び用法・用量（案）を以下に示す。

効能・効果（案）

EGFR チロシンキナーゼ阻害薬に抵抗性の EGFR T790M 変異陽性の手術不能又は再発非小細胞肺癌

用法・用量（案）

通常、成人にはオシメルチニブとして 80mg 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。

2.6.1.2　参考文献

Arcila et al 2011

Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. Clin. Cancer Res. 2011;17:1169-80.

Breider et al 1996

Breider MA, Bleavins MR, Reindel, JF, Gough AW and de la Iglesia FA. Cellular hyperplasia in rats following continuous intravenous infusion of recombinant human epidermal growth factor. Vet Pathol 1996;33:184-94.

de Bruin et al 2014

de Bruin EC, Cowell CF, Warne PH, Jiang M, Saunders RE, Melnick MA, et al. Reduced NF1 expression confers resistance to EGFR inhibition in lung cancer. Cancer Discovery. 2014;4:606-19.

Chmielecki et al 2011

Chmielecki J, Foo J, Oxnard GR, Hutchinson K, Ohashi K, Somwar R, et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. Science Translational Medicine. 2011;3:90ra59.

Costa et al 2014

Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A, Gimenez-Capitán A, Bertran-Alamillo J, Karachaliou N, et al. The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. Clinical Cancer Research. 2014;20:2001-10.

Engelman et al 2007

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. Science. 2007;316:1039-43.

Engelman et al 2007b

Engelman JA, Zejnullahu K, Gale CM, Lifshits E, Gonzales AJ, Shimamura T, et al. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. Cancer Research. 2007;67:11924-32.

Eskens et al 2008

Eskens FA, Mom CH, Planting AS, Gietema JA, Amelsberg A, Huisman H, et al. A phase I dose escalation study of BIBW 2992, an irreversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and 2 (HER2) tyrosine kinase in a 2-week on, 2-week off schedule in patients with advanced solid tumours. British Journal of Cancer. 2008;98:80-5.

Hirsh 2011

Hirsh V. Managing treatment-related adverse events associated with EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer. Curr Oncol. 2011;18:126-38.

Jackman et al 2009

Jackman DM, Miller VA, Cioffredi LA, Yeap BY, Jänne PA, Riely GJ, et al. Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials. Clinical Cancer Res. 2009; 15: 5267-73.

Janjigian et al 2014

Janjigian YY, Smit EF, Groen HJ, Horn L, Gettinger S, Camidge DR, et al. Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. Cancer Discov. 2014;4:1036-45.

Katakami et al 2013

Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, Inoue A, et al. LUX-Lung 4: A phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. J Clin Oncol. 2013;31:3335-41.

Kim et al 2012

Kim Y, Ko J, Cui Z, Abolhoda A, Ahn JS, Ou SH, et al. The EGFR T790M mutation in acquired resistance to an irreversible second-generation EGFR inhibitor. Molecular Cancer Therapeutics. 2012;11:784-91.

Kobayashi et al 2005

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non small-cell lung cancer to gefitinib.　N. Engl. J. Med. 2005; 352: 786-92.

Li et al 2008

Li D, Ambrogio L, Shimamura T, Kubo S, Takahashi M, Chirieac LR, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. Oncogene. 2008;27:4702-11.

Maemondo et al 2010

Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. The New England Journal of Medicine. 2010;362:2380-8.

Melosky and Hirsh 2014

Melosky B and Hirsh V. Management of common toxicities in metastatic NSCLC related to anti-lung cancer therapies with EGFR-TKIs. Frontiers in Oncology 2014;4:238:1-6.

Miller et al 2012

Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, Chen YM, Park K, Kim SW, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. The Lancet Oncology. 2012;13:528-38.

Mitsudomi et al 2010

Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. The Lancet Oncology. 2010;11:121-8.

Mitsudomi and Yatabe 2010

Mitsudomi T and Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. FEBS J. 2010; 277:301-8.

Mok et al 2009

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N. Engl. J. Med. 2009; 361: 947-57.

Murillas et al 1995

Murillas R, Larcher F, Conti CJ, Santos M, Ullrich A and Jorcano JL. Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. EMBO Journal 1995;14:5216-23.

Ohashi et al 2012

Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, Moran T, Chmielecki J, Lin YL, et al. Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109:E2127-33.

Oxnard et al 2011

Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, Riely GJ, Chmielecki J, Kris MG, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumours harboring the T790M mutation. Clin. Cancer Res. 2011;17:1616-22.

Oxnard et al 2012

Oxnard GR, Miller VA, Robson ME, Azzoli CG, Pao W, Ladanyi M, et al. Screening for germline EGFR T790M mutations through lung cancer genotyping. J Thorac Oncol. 2012;7:1049-52.

Pao et al 2005

Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PloS Med 2005;2:e73.

Pao et al 2010

Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. Nature Reviews Cancer. 2010;10:760-74.

Ramalingam et al 2012

Ramalingam SS, Blackhall F, Krzakowski M, Barrios CH, Park K, Bover I, et al. Randomized phase II study of dacomitinib (PF-00299804), an irreversible pan-human epidermal growth factor receptor inhibitor, versus erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2012;30:3337-44.

Reindel et al 1996

Reindel JF, Pilcher GD, Gough AW, Haskins JR and de la Iglesia FA. Recombinant human epidermal growth factor induced structural changes in the digestive tract of cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). Toxicologic Pathology 1996;24:669-80.

Rosell et al 2009

Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. N. Engl. J. Med. 2009;361:958-67.

Rosell et al 2012

Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. The Lancet Oncology. 2012;13:239-46.

Sequist et al 2008

Sequist LV, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, Jänne PA, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. J Clin Oncol. 2008;26:2442-9.

Sequist et al 2011

Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. Science Translational Medicine. 2011;3:75ra26.

Sequist et al 2013

Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. J Clin Oncol. 2013;31:3327-34.

Sos et al 2010

Sos ML, Rode HB, Heynck S, Peifer M, Fischer F, Klüter S, et al. Chemogenomic profiling provides insights into the limited activity of irreversible EGFR Inhibitors in tumor cells expressing the T790M EGFR resistance mutation. Cancer Research. 2010;70:868-74.

Takezawa et al 2012

Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, Nebhan CA, Song X, de Stanchina E, et al. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site $EGFR^{T790M}$ mutation. Cancer Discovery. 2012;2:922-33.

Vinter-Jensen 1999

Vinter-Jensen L. Pharmacological effects of epidermal growth factor (EGF) with focus on the urinary and gastrointestinal tracts. APMIS 1999;107(Suppl 93):5-42.

Ye et al 2013

Ye X, Zhu ZZ, Zhong L, Lu Y, Sun Y, Yin X, et al. High T790M detection rate in TKI-naive NSCLC with EGFR sensitive mutation: truth or artifact? J Thoracic Oncol. 2013;8:1118-20.

Yano et al 2003

Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, Wakeling A et al. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. Anticancer Research 2003;23:3639-50.

Yu et al 2013

Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. Clin Cancer Res. 2013;19:2240-7.

Yun et al 2008

Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105:2070-5.

第 2 部　CTD の概要

一般名：オシメルチニブメシル酸塩

版番号：[redacted]

2.6.2 薬理試験の概要文

タグリッソ®錠

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
2.6.2.1 まとめ 9
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 11
2.6.2.2.1 *In vitro* 試験 11
2.6.2.2.1.1 酵素阻害作用（試験 Pharmacology Report [redacted]） 11
2.6.2.2.1.2 AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の細胞における EGFR リン酸化阻害作用（試験 Pharmacology Report [redacted]及び [redacted]） 14
2.6.2.2.1.3 インスリン様成長因子 1 受容体及びインスリン受容体に対する阻害作用（試験 Pharmacology Report [redacted] 並びに試験 3129SV、3285SV 及び 3284SV） 15
2.6.2.2.1.4 細胞における HER2（ErbB2）リン酸化阻害作用（試験 Pharmacology Report [redacted] 及び [redacted]） 16
2.6.2.2.1.5 AZD9291 の EGFR チロシンキナーゼに対する不可逆的阻害作用（試験 Pharmacology Report [redacted]） 17
2.6.2.2.1.6 *In vitro* における細胞増殖抑制作用（試験 Pharmacology Report [redacted]） 21
2.6.2.2.1.7 既存の EGFR-TKI とは異なる AZD9291 の薬理学的耐性獲得プロファイル（試験 Pharmacology Report [redacted] 及び [redacted]） 22
2.6.2.2.2 *In vivo* 試験 24
2.6.2.2.2.1 EGFR 依存性異種移植腫瘍モデルにおける AZD9291 の抗腫瘍作用（試験 Pharmacology Report [redacted]） 24
2.6.2.2.2.2 EGFR 依存性腫瘍異種移植モデルにおける AZD9291 の長期投与による抗腫瘍作用（試験 Pharmacology Report [redacted]、[redacted] 及び [redacted]） 28
2.6.2.2.2.3 腫瘍異種移植モデルにおける AZD9291 の活性代謝物 AZ5104 の抗腫瘍作用（試験 Pharmacology Report [redacted]） 32
2.6.2.2.2.4 腫瘍異種移植モデルにおける AZD9291 の EGFR シグナル伝達系に及ぼす影響（試験 Pharmacology Report [redacted]） 33
2.6.2.2.2.5 EGFRm/T790M 変異を有するトランスジェニックマウスモデルにおける AZD9291 の抗腫瘍作用（試験 Pharmacology Report [redacted]） 40
2.6.2.2.2.6 EGFRm 腫瘍脳転移モデルにおける AZD9291 の抗腫瘍作用（試験 Pharmacology Report [redacted]） 41
2.6.2.3 副次的薬理試験 42
2.6.2.4 安全性薬理試験 44
2.6.2.4.1 中枢神経系（試験 3464SR） 45
2.6.2.4.2 視覚系（試験 3464SR） 45
2.6.2.4.3 心血管系 46

2.6.2.4.3.1　チャイニーズハムスター卵巣細胞に発現させたヒト hERG カリウムチャネルに対する *in vitro* での影響（試験 VKS0795（0403SZ））.....46
2.6.2.4.3.2　その他の心筋イオンチャネルに対する影響（試験 1112SY［参考資料］、3535SV、1120SY［参考資料］、3473SV、1121SY［参考資料］及び 3472SV）.....46
2.6.2.4.3.3　イヌの心血管系への影響（試験 1352ZD）.....46
2.6.2.4.3.4　ラットの心血管系への影響（試験 PH/E/14191）.....47
2.6.2.4.3.5　麻酔モルモットの心血管系への影響（試験 0264SG）.....47
2.6.2.4.4　呼吸系（試験 3464SR）.....47
2.6.2.4.5　消化管系（試験 3464SR）.....48
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験.....48
2.6.2.6　考察及び結論.....48
2.6.2.6.1　効力を裏付ける試験.....48
2.6.2.6.2　副次的薬理試験.....49
2.6.2.6.3　安全性薬理試験.....49
2.6.2.7　参考文献.....51

表目次

表 1　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の単離 EGFR チロシンキナーゼに対する阻害作用.....12
表 2　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の [redacted] Kinase Profiler のキナーゼに対する 1 μM での阻害率及び IC_{50} 値.....13
表 3　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の各種細胞株における EGFR リン酸化阻害作用.....15
表 4　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の IGF1R 及び InsR 酵素に対する阻害作用.....16
表 5　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の IGF1R リン酸化に対する阻害作用.....16
表 6　AZD9291、AZ5104 及び対照化合物の HER2 リン酸化阻害作用.....17
表 7　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の変異型及び野生型 EGFR 発現細胞株に対する増殖抑制作用.....22
表 8　各種異種移植モデルにおける AZD9291 の 14 日間反復経口投与後の腫瘍増殖抑制作用.....25
表 9　各種異種移植モデルにおける AZ5104 及び AZD9291 の 13～14 日間反復経口投与後の腫瘍増殖抑制作用.....32
表 10　H1975 異種移植モデルにおける AZD9291 単回経口投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用.....34
表 11　PC9 異種移植モデルにおける AZD9291 単回経口投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用.....37

表 12　A431 異種移植モデルにおける AZD9291 単回経口投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用 39
表 13　放射性リガンド結合、酵素活性及び機能試験における AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の作用：IC_{50} 値又は K_i 値（μM）が主標的に対する IC_{50} 値の 100 倍以内の標的分子について記載 43
表 14　投与 4 時間後の総血漿中濃度の群平均 46

図目次

図 1　H1975（L858R/T790M）細胞株と様々な時間インキュベーションしたときの阻害作用の経時変化 18
図 2　PC9（Ex19del）細胞株と様々な時間インキュベーションしたときの阻害作用の経時変化 19
図 3　LOVO（野生型 EGFR）細胞株と様々な時間インキュベーションしたときの阻害作用の経時変化 20
図 4　H1975 を各化合物 1 μM とともに 2 時間インキュベーションし、洗浄したときの pEGFR の洗浄後の経時変化 21
図 5　*In vitro* における PC9 細胞の AZD9291 に対する耐性獲得における T790M 変異の関与 23
図 6　PC9 細胞の AZD9291、アファチニブ及びゲフィチニブに対する耐性を獲得するまでの時間 24
図 7　雌無胸腺マウスの H1975（L858R/T790M）異種移植モデルにおける AZD9291（AZ13552748）の腫瘍増殖抑制作用（代表例） 26
図 8　雌 SCID マウスの PC9（Ex19del）異種移植モデルにおける AZD9291（AZ13552748）の腫瘍増殖抑制作用（代表例） 27
図 9　雌無胸腺マウスの A431（野生型）異種移植モデルにおける AZD9291 の腫瘍増殖抑制作用（代表例） 28
図 10　雌 SCID マウスの PC9（Ex19del）異種移植モデルにおける AZD9291 及びゲフィチニブの長期投与による腫瘍増殖抑制作用 29
図 11　雌 SCID マウスの H3255（L858R）異種移植モデルにおける AZD9291 及びゲフィチニブの長期投与による腫瘍増殖抑制作用 30
図 12　雌無胸腺マウスの H1975（L858R/T790M）異種移植モデルにおける AZD9291 の長期投与による腫瘍増殖抑制作用 31
図 13　H1975 異種移植モデルにおける AZD9291（AZ13552748）投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用の経時変化（代表例） 35
図 14　H1975 異種移植モデルにおける AZD9291（5 mg/kg）単回経口投与後の pERK 及び pEGFR の IHC 評価 36
図 15　PC9 異種移植モデルにおける AZD9291（AZ13552748）投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用の経時変化（代表例） 38
図 16　A431 異種移植モデルにおける AZD9291（AZ13552748）投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用の経時変化（代表例） 39
図 17　L858R/T790M 変異型 EGFR 発現トランスジェニックマウスにおける AZD9291（AZ13552748）の腫瘍増殖抑制作用 41

図 18　　雌無胸腺マウスの PC9－ルシフェラーゼ脳転移モデルにおける
AZD9291 の腫瘍増殖抑制作用 42

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
ACK1	Activated CDC42 kinase 1：活性化 CDC42 キナーゼ 1
AKT	Also known as PKB (Protein Kinase B：別名プロテインキナーゼ B)
ATP	Adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
AUC	Area under the plasma concentration-time curve from zero to infinity：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AURA 試験	Study D5160C00001 Phase I component in EGFR T790M+ advanced NSCLC patients who have progressed following prior therapy with an EGFR-TKI agent ± chemotherapy：上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤による治療後に進行が認められた進行非小細胞肺癌患者を対象とした、AZD9291 の安全性、忍容性、薬物動態、及び抗腫瘍効果を評価する非盲検用量漸増多施設共同第 I/II 相試験
AURA2 試験	Study D5160C00002 Phase II in EGFR T790M+ advanced NSCLC patients who have progressed following either one prior therapy wit an EGFR TKI agent or following treatment with both EGFR TKI and at least one prior platinum-based doublet chemotherapy：上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤による治療後に進行が認められた、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼに活性型変異及び T790M 変異を有する局所進行又は転移性非小細胞肺癌患者を対象とした AZD9291 の安全性及び有効性を評価する第 II 相非盲検単群試験
BLK	B lymphoid tyrosine kinase：B リンパ球チロシンキナーゼ
BRK	Breast tumor kinase：乳癌特異的チロシンキナーゼ
CD	Cyclodextrin：シクロデキストリン
C_{max}	Maximum plasma drug concentration：最高血漿中薬物濃度
Cys	Cysteine：システイン
DMA	Dimethylacetamide：ジメチルアセトアミド
DMSO	Dimethyl sulphoxide：ジメチルスルホキシド
Dox	Doxycycline：ドキシサイクリン
dP/dt_{max}	Maximum rate of left ventricular pressure change. An index of cardiac contractility：最大左室圧立ち上がり速度。心臓収縮機能の指標
ECG	Electrocardiogram：心電図
EGF	Epidermal growth factor：上皮成長因子
EGFR	Epidermal growth factor receptor：上皮成長因子受容体
EGFR(L858R)	Epidermal growth factor receptor with L858R activating mutation ：L858R 活性化変異を有する上皮成長因子受容体
EGFR(Ex19Del)	Epidermal growth factor receptor with exon19deletion activating mutation：エクソン 19 欠失活性化変異を有する上皮成長因子受容体

略語及び専門用語	用語の説明
EGFRm	Epidermal growth factor receptor (containing activating/sensitising mutation)：活性化変異／感受性変異を有する上皮成長因子受容体
EGFRm/T790M	Epidermal growth factor receptor (containing activating mutation with T790M resistance mutation)：活性化変異及び T790M 耐性変異を有する上皮成長因子受容体
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定法
ERK	Also known as MAP Kinase：別名 MAP キナーゼ
FEPE	Formalin fixed paraffin embedded：ホルマリン固定パラフィン包埋
ErbB	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog：赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ
GLP	Good laboratory practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
h 又は hr	Hour：時間
H&E	Hematoxylin and eosin stain：ヘマトキシリン・エオジン染色
hERG	Human ether-a-go-go-related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2：ヒト上皮成長因子受容体 2（別名 ErbB2）
HPMC	Hydroxypropyl methylcellulose：ヒドロキシプロピルメチルセルロース
IC_{50}	Concentration giving 50% of the drug-induced inhibitory effect ：50%阻害濃度
ICH	International conference on harmonisation：日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IGF1R	Insulin-like growth factor receptor-1：インスリン様成長因子 1 受容体
IHC	Immunohistochemistry：免疫組織化学
InsR	Insulin receptor：インスリン受容体
kg	Kilogram：キログラム
K_i	Inhibition constant：阻害定数
K_m	Michaelis constant (substrate concentration at which the reaction rate is half of Vmax)：ミカエリス定数（反応速度が V_{max} の半分となる基質濃度）
LVEF	Left ventricular ejection fraction：左室駆出率
µg	Microgram：マイクログラム
µL	Microlitre：マイクロリットル
µM	Micromolar：マイクロモル
mg	Milligram：ミリグラム
mL	Millilitre：ミリリットル
MLK1	Mixed lineage kinase 1：混合系統キナーゼ 1
MNK2	Mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase：分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ相互作用キナーゼ 2
Nav1.5	Cardiac sodium channel：心筋ナトリウムチャネル
ND	Not detectable/not determined：検出不能／測定せず
nM	Nanomolar：ナノモル
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer：非小細胞肺癌

略語及び専門用語	用語の説明
PCR	Polymerase Chain Reaction：ポリメラーゼ連鎖反応
PR	ECG interval measured from the beginning of the P wave to the beginning of the QRS complex：心電図上の P 波の始まりから QRS 波の始まりまでの間隔
QD	Once daily dosing：1 日 1 回投与
QRS	ECG interval measured from the beginning of the Q wave to the end of the S wave：心電図上の Q 波の始まりから S 波の終わりまでの間隔
QT	ECG interval measured from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave：心電図上の QRS 波の始まりから T 波の終わりまでの間隔
QTcB	Heart rate corrected QT interval using Bazett's formula ：Bazett 式により心拍数について補正した QT 間隔
QTcR	Heart rate corrected QT interval on an individual animal using the Ollerstam correction：Ollerstam 式により心拍数について補正した個々の動物の QT 間隔
SCID mice	Severe combined immuno deficient mice：重症複合免疫不全マウス
SEM	Standard error of mean：平均値の標準誤差
TEG	Triethylene glycol：トリエチレングリコール
TKI	Tyrosine kinase inhibitor：チロシンキナーゼ阻害剤

2.6.2.1 まとめ

AZD9291 の薬効薬理作用、副次的薬理作用及び安全性薬理作用の特性を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。AZD9291 の 2 つの活性代謝物 AZ5104 及び AZ7550 の特性評価についても、本 *in vitro* 及び *in vivo* 試験パッケージの一部として実施した。ラット及びイヌでの医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用 *in vivo* 安全性薬理試験において AZD9291 の経口投与により AZ5104 及び AZ7550 が生成することが確認されている。AZ7550 の曝露量は全ての GLP 適用安全性薬理試験で定量できたが、AZ5104 の曝露量は、分析上の問題により、イヌ心血管系試験以外では定量できなかった（薬物動態試験の概要文 2.6.4.3.5 項参照）。ヒトにおける AZ5104 及び AZ7550 の血漿中濃度は、循環血中総薬物曝露量の約 10%であったことから（AURA 試験の第 I 相パート及び第 II 相延長コホート、並びに AURA2 試験の成績、臨床薬理試験 2.7.2.3.2.3 項参照）、ICHM3(R2) ガイドラインに基づくと、これらの代謝物の個別の非臨床特性評価は不要である（ICH M3(R2), 2009）。

本申請は、上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬（TKI）の使用歴を有する、EGFR-T790M 変異陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌（NSCLC）患者に対する経口治療薬として AZD9291 を使用することを目的としたものである。本概要でヒトにおける曝露量を参照する際、その代表的な値として、日本人進行 NSCLC 患者 32 例に AZDZ9291 の錠剤を 80 mg の用量で投与したときの定常状態における C_{max} 及び $AUC_{(0-24)}$（それぞれ $C_{ss,max}$ 及び AUC_{ss}）の算術平均を引用した（AURA 試験の第 II 相延長コホート）。当該試験で 32 例の日本人 NSCLC 患者から得られた AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の $C_{ss,max}$ はそれぞれ 0.78、0.08 及び 0.061 μM であり、AUC_{ss} はそれぞれ 15、1.6 及び 1.3 μM·h であった。なお、これらの値は血漿蛋白結合率が評価不能であったため（薬物動態試験 2.6.4.4.2 項参照）、いずれも総薬物濃度に基づき算出した値である。

全ての試験で AZD9291 のフリー体を使用したが、例外として、GLP 適用の ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）アッセイでは AZD9291 メシル酸塩（臨床製剤での塩）を使用した。AZD9291 は、一部の試験報告書で AZ13552748 とも称されている。代謝物 AZ5104 及び AZ7550 は試験報告書でそれぞれ AZ13575104 及び AZ13597550 とも称されている。

一連の *in vitro* 及び *in vivo* 安全性薬理試験を含む非臨床薬理試験における主要所見を以下に要約した。

効力を裏付ける試験

- AZD9291 は、単離した野生型 EGFR チロシンキナーゼと比較して、変異型 EGFR チロシンキナーゼに対して強力かつ選択的に作用する不可逆的阻害剤であることが生化学試験で示された（見かけの IC_{50} 値は、変異型 EGFR チロシンキナーゼに対して 20 nM 以下、野生型 EGFR チロシンキナーゼに対して 80 nM）。277 種類の他のプロテインキナーゼに対するスクリーニングにおいて、AZD9291 が明らかな作用（1 μM で 60%を超える阻害）を示したキナーゼは 18 種類（ACK1、BLK、ErbB2、ErbB4、BRK、MLK1 及び MNK2 を含む）であったことから、EGFR ファミリーへの選択性が示された。AZD9291 は、細胞アッセイにおいて HER2（ErbB2）にも作用し、その見かけの平均 IC_{50} 値は 90～119 nM であった。

- *In vitro* における細胞の EGFR リン酸化アッセイにおいて、AZD9291 は EGFR に活性化変異（EGFRm）単独又は T790M 変異を伴う二重変異（EGFRm/T790M）を有する種々の細胞株の全ての EGFR チロシンキナーゼに対して強力な阻害作用を示し、その見かけの平均 IC_{50} 値は 6～54 nM の範囲であった。一方、野生型 EGFR チロシンキナーゼに対する阻害作用は弱かったことから（種々の細胞株に対する見かけの平均 IC_{50} 値は 480 nM～1.9 μM）、AZD9291 は、*in vitro* の細胞において、野生型 EGFR チロシンキナーゼと比較して変異型 EGFR チロシンキナーゼに対する阻害作用が強いことが示された。更に、*in vitro* の細胞における洗浄及び時間依存性動態試験により、AZD9291 の不可逆的な作用機序が裏付けられた。
- EGFR に EGFRm 又は EGFRm/T790M 変異を有する細胞を用いた *in vitro* アッセイにおいて、AZD9291 は、EGFR チロシンキナーゼに対する強力かつ不可逆的な作用に起因する強い増殖抑制作用を示した（見かけの平均 IC_{50} 値は、EGFRm に対して 8 nM、EGFRm/T790M 変異に対して 11 及び 40 nM）。更に、種々の野生型 EGFR 発現細胞株を用いたアッセイにおける AZD9291 の増殖抑制作用は弱かった（見かけの IC_{50} 値は 461～650 nM）。
- PC9（Ex19del）細胞集団に対して *in vitro* で AZD9291 を長期曝露したとき、他の既存の EGFR-TKI（ゲフィチニブ、アファチニブ）と比較して、耐性獲得までの時間が遅延した。更に、AZD9291 に対して耐性を獲得した PC9 細胞株において T790M 変異は認められなかった。
- EGFRm 又は EGFRm/T790M 変異を有する腫瘍を異種移植したマウスに AZD9291（5 mg/kg）を反復経口投与したところ、顕著な腫瘍退縮が認められた。一方、野生型 EGFR 異種移植モデルでは、*in vitro* における選択性プロファイルと一致して、腫瘍増殖の顕著な抑制には高用量（25 mg/kg）の AZD9291 が必要であり、しかも腫瘍退縮には至らなかった。
- 異種移植腫瘍モデルにおいて AZD9291 は、EGFR の用量及び時間依存的なリン酸化阻害とともに主要な下流バイオマーカーの AKT 及び ERK のリン酸化阻害を伴っていた。
- PC9 脳転移モデルにおいて AZD9291 は 25 mg/kg の反復経口投与により、顕著かつ持続的な腫瘍増殖抑制作用を示した。
- 代謝物の AZ5104 及び AZ7550 は、AZD9291 と質的に類似した薬理プロファイルを示した。*In vitro* アッセイにおける AZ7550 のプロファイルは、AZD9291 と同様であった。一方、AZ5104 は、変異型及び野生型 EGFR チロシンキナーゼを用いたアッセイにおいて、AZD9291 より明らかに強い作用を示したことから、*in vitro* において、野生型 EGFR チロシンキナーゼと比較したときの EGFRm 及び EGFRm/T790M 変異型 EGFR チロシンキナーゼへの選択性は AZD9291 より低いことが示された。265 種類のキノームからなるパネルにおいて、両代謝物は AZD9291 に質的に類似したキナーゼ選択性プロファイルを示した。AZ5104 は 23 種類のキナーゼに対して明らかな作用（1 μM で 60%を超える阻害）を示し、そのうち 16 種類は AZD9291 でも阻害作用が認められた。一方、AZ7550 が明らかな作用を示したキナーゼは 6 種類のみであり、これらは全て AZD9291 又は AZ5104 でも阻害作用が認められた。

副次的薬理試験

- 副次的薬理標的パネルを用いた *in vitro* 試験において、AZD9291 は、181 種類の標的分子のうち 21 種類（野生型 EGFR を含む）において、主標的（変異型 EGFR）に対する IC_{50}

値の 100 倍以内の K_i 値又は IC_{50} 値を示した。AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の副次的薬理プロファイルは質的に類似していた。

安全性薬理試験

- AZD9291 は hERG カリウムチャネルの機能を阻害し、その IC_{50} 値は 0.69 μM であった（GLP 適用試験）。AZ5104 及び AZ7550 は hERG チャネルを阻害し、その IC_{50} 値はそれぞれ 17.48 μM 及び>33 μM であった（GLP 非適用試験）。
- GLP 適用の単回経口投与安全性薬理試験では、ラット（最大 100 mg/kg）における中枢神経系、呼吸系又は視覚系への明らかな影響はみられず、イヌ（最大 60 mg/kg）における心血管系への明らかな影響もみられなかった。
- ラットにおいて AZD9291 は 10 mg/kg 以上の単回経口投与で、胃排出能低下及び小腸輸送能の低下を示した。これらの作用は、臨床的に意義のある AZD9291 の血漿中濃度でみられた。無影響量の決定には至らなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

AZD9291 は、T790M 耐性・活性化変異選択性かつ野生型非選択性 EGFR チロシンキナーゼ不可逆的阻害作用を有する経口投与可能な新規 EGFR-TKI である（Cross et al 2014）。本項には、EGFR 並びに主要な副次的標的であるインスリン／IGF1 受容体及び HER2（ErbB2）に対する AZD9291 の *in vitro* における薬理プロファイルを示す。*In vitro* 試験には DMSO を媒体として用いた。

2.6.2.2.1.1 酵素阻害作用（試験 Pharmacology Report [redacted]）

単離した変異型 EGFR チロシンキナーゼに対する AZD9291 並びにその活性代謝物 AZ5104 及び AZ7550 の効力を表 1に示す（[redacted]社のフィルター結合放射性 ATP トランスフェラーゼアッセイにより測定）。不可逆的薬物では、標的への曝露時間が増加すると、阻害剤の共有結合によって活性を有する酵素レベルが低下するため、見かけの IC_{50} 値が低下する。したがって、IC_{50} 値により効力を解釈及び比較する場合には曝露時間を考慮する必要があり、そのような効力の値を用いて *in vivo* 作用を解釈することは困難である。不可逆的阻害剤の効力は、受容体への可逆的な親和性（K_i）及びそれに続く共有結合による不活性化速度（K_{inact}）の両方により決定されるため（Schwartz et al 2014）、効力を阻害剤の K_i/K_{inact} の関係で表す方がより正確である。しかし、EGFR チロシンキナーゼに関しては、生化学アッセイでこれらの係数を測定することが極めて困難であり（Schwartz et al 2014）、社内の検討では、その測定を行うことは不可能であったことから、全体の効力のサロゲートとして見かけの IC_{50} 値を使用する必要があった。全ての化合物が、単離された各変異型 EGFR チロシンキナーゼを阻害し、その見かけの IC_{50} 値は 83 nM 以下であった（表 1）。注目すべきこととして、AZD9291 及び AZ7550 は野生型 EGFR チロシンキナーゼに対する作用が明らかに弱かったが、AZ5104 は野生型 EGFR チロシンキナーゼに対する作用が強かった。このことから、野生型 EGFR チロシンキナーゼと比較したときの変異型 EGFR チロシン

キナーゼへの選択性は、AZ5104 の方が AZD9291 及び AZ7550 よりも低いことが示された（表 1）。

表 1　　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の単離 EGFR チロシンキナーゼに対する阻害作用

化合物	EGFR (T790M/ L858R)	EGFR (L858R)	EGFR (L861Q)	EGFR (wt)
AZD9291	2 (0.1, 49)	20 (6, 62)	10 (1, 84)	80 (10, 629)
AZ5104	<1, <1, 4[1)]	9 (4, 24)	2 (0.2, 28)	15 (5, 49)
AZ7550	10 (0.6, 179)	83 (33, 212)	66 (7.4, 581)	330 (61, 1792)

酵素活性は [redacted]社のフィルター結合放射性 ATP トランスフェラーゼアッセイにより測定した（r-^{33}P-ATP を加えて反応を開始し、40 分間インキュベーションした）。
n=3 の場合は見かけの IC_{50} 値の幾何平均及び 95%信頼区間（nM）を示す。
1）2 試験結果が<1（分析限界未満）であったので、幾何平均を算出せず、個々の結果を示した。
EGFRm 感受性変異体：L858R, L861Q
wt：野生型
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted]の Table 1 から引用）

277 種類の単離プロテインキナーゼ及び 21 種類の脂質キナーゼからなる市販のパネルを用いて、広範なキノームに対する AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の選択性を評価した。初めに各化合物を 1 μM の濃度でパネルスクリーニングを行った後、AZD9291 及び代謝物で 60%を超える阻害がみられたキナーゼについて改めて IC_{50} 値を測定した。AZD9291 は標的外キナーゼに対する作用が弱く、1 μM で 60%を超える阻害がみられた標的外キナーゼは 18 種類（ErbB2/4、ACK1、ALK、BLK、BRK、MLK1 及び MNK2 等）のみであった。

更に、その後の IC_{50} 値の測定では、標的外キナーゼに対する作用は、主標的の変異型 EGFR チロシンキナーゼに対する作用（表 1）を超えるものではなかった。2.6.2.2.1.5項に述べるように、AZD9291 は EGFR の Cys797 と共有結合を形成することから、特に、類似したキナーゼドメインの位置にシステイン残基を有するキナーゼに対する作用を検討した。EGFR の Cys797 に類似した構造を有する 9 種類のヒトキナーゼのうち、生化学アッセイにおいて AZD9291 が明らかな作用を示したのは ErbB2、ErbB4、TEC 及び BLK のみであった（表 2）。明らかな作用のみられた副次的キナーゼ標的分子のいずれについても、変異型 EGFR に影響を及ぼす可能性は示されていないことから、AZD9291 の有効性は全て変異型 EGFR チロシンキナーゼに対する作用を介したものであるという前提が裏付けられた。

AZD9291 の代謝物は、265 種類のキノームパネルに対して、AZD9291 に質的に類似した副次的標的プロファイルを示した。AZ5104 は、23 種類のキナーゼに対して明らかな作用（1 μM で 60%を超える阻害）を示し、そのうち 16 種類は AZD9291 でも阻害作用が認められた（表 2）。一方、AZ7550 が明らかな作用を示したキナーゼは 6 種類のみであり、それらは全て AZD9291 又は AZ5104 でも阻害作用が認められた（表 2）。AZD9291 と同様に、代謝物で作用のみられた副次的キナーゼ標的分子のいずれについても、変異型 EGFR チロシンキナーゼを有する腫瘍に有効性を示すと考えられる既知の根拠はなかった。酵素の生化学的データを総合すると、AZD9291 並びにその代謝物 AZ5104 及び AZ7550 は変異型 EGFR チロシンキナーゼに対して強力かつ選択的に作用することが示された。

表 2　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の [redacted] Kinase Profiler のキナーゼに対する 1 μM での阻害率及び IC_{50} 値

キナーゼ	AZD9291 による阻害率（%）	AZD9291 の IC_{50} 値（nM）	AZ5104 による阻害率（%）	AZ5104 の IC_{50} 値（nM）	AZ7550 による阻害率（%）	AZ7550 の IC_{50} 値（nM）
ACK1	100	71, 128	100	27, 66	76	156, 344
ALK	66	231, 1622	89	97, 175	58	420, 1804
BLK	**100**	**168, 442**	**100**	**27, 56**	**50**	**977, 1469**
BMX	**19**	**2425, 2381**	**68**	**505, 359**	**14**	**>10000, >10000**
BRK	87	255, 258	99	45, 57	56	843, 420
BTK	**64**	**699, 989**	**91**	**132, 451**	**12**	**5104, 4433**
ErbB2	**97**	**116**	**98**	**61**	**89**	**700**
ErbB4	**94**	**67, 46**	**97**	**7, 11**	**81**	**195, 222**
FAK	67	598, 774	95	136, 320	37	995, 1866
FES	39	389, 1985	83	127, 468	59	449, 1028
FGFR1	77	>10000	31	6018	12	>10000
FLT3	55	562, 2392	75	129, 911	39	302, 2128
FLT4	78	678, 983	82	142, 404	50	1784, 3190
IGF1-R	64	941, 1775	87	78, 395	38	1005, 4119
Ins R	66	432, 880	90	127, 226	39	1256, 1803
IRR	21	281, 2210	95	423, 342	19	840, 3510
ITK	**17**	**6956, 10000**	**81**	**925, 1529**	**23**	**>10000, >10000**
JAK3	**44**	**2640, 3436**	**49**	**1358, 2556**	**19**	**>10000, >10000**
LRRK2	75	375	65	993	35	3933
MLK1	88	85, 409	63	141, 1289	69	88, 448
MNK2	91	95, 155	91	62, 171	75	228, 585
PYK2	59	682, 1476	81	284, 536	28	2288, 4653
TEC	**79**	**420, 497**	**91**	**118, 219**	**43**	**1317, 2191**
TrkB	0	>10000	100	>10000	100	>10000
Txk	**66**	**1590, 2519**	**83**	**426, 621**	**29**	**2443, 5541**
YES	86	8193	22	4803	4	>10000

1 μM の濃度でパネルスクリーニング（[redacted] 社）を行った後、60%を超える阻害がみられたキナーゼについては IC_{50} 値を測定した。独立した実験を 2 回行った場合は、各実験で算出した IC_{50} 値を示した。独立した実験を 3 回行った場合は、代表的な 1 実験のデータを示す。
太字で記したキナーゼは、類似の反応性 Cys797 残基を触媒部位に有する。
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Table 2 から引用）

2.6.2.2.1.2 AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の細胞における EGFR リン酸化阻害作用（試験 Pharmacology Report [redacted]及び [redacted]）

セルベースアッセイは、変異型及び野生型 EGFR チロシンキナーゼに対する作用が、生理的 ATP レベル及び細胞環境で、親和性及び効力に良好に反映されるかを目的として検討した。細胞の EGFR リン酸化アッセイには、H1975（L858R/T790M）、PC9VanR（Ex19del/T790M）、H1650（Ex19del）、PC9（Ex19del）、H3255（L858R）、LOVO（野生型 EGFR）、A431（野生型 EGFR）及び H2073（野生型 EGFR）細胞を使用した。12 点の用量反応曲線となるように化合物を超音波ディスペンサーで添加し、2 時間処理した後、野生型 EGFR の LOVO、A431 及び H2073 細胞については 20 nM の EGF で 10 分間刺激し、EGFR の活性化及びリン酸化を誘導した。細胞を溶解させ、リン酸化 EGFR（pEGFR）に特異的な抗体を用いる改変 ELISA キット（R&D Systems 社）を使用して、細胞 EGFR のリン酸化に対する阻害作用を測定した。各細胞のキナーゼに対する化合物の IC_{50} 値を算出し、2.6.2.2.1.1項に考察したように不可逆的阻害剤の効力は時間依存的であることから、この IC_{50} 値を見かけの IC_{50} 値と称した。

表 3に示すように、AZD9291 は試験に用いた EGFRm 単独又は T790M 変異を伴う二重変異（EGFRm/T790M）を有する全ての EGFR 細胞株で強い阻害作用を示し、その見かけの平均 IC_{50} 値は 6～54 nM の範囲であった。重要なこととして、AZD9291 は EGFR の変異の種類によらず各細胞株で同様に作用を示したことから、臨床的に意義のあるこれら全ての EGFR 変異に対して一様に強い効力を発揮することが示された。また、表 3に示すように、野生型 EGFR 発現細胞株では、EGFR リン酸化に対する AZD9291 の作用が明らかに弱く、その IC_{50} 値は 0.48～1.9 μM の範囲であった。したがって、*in vitro* での細胞において、被験化合物添加 2 時間後の時点で、AZD9291 は野生型 EGFR と比較して変異型 EGFR に明らかな選択性を有することが示された（例えば、LOVO の平均 IC_{50} 値は H1975 の約 30 倍）。AZ7550 は、単離酵素アッセイと同様、親化合物 AZD9291 に類似した効力及びプロファイルを示した。表 3に示すように、AZ5104 のプロファイルは AZD9291 に質的に類似していたが、L858R/T790M 変異型 EGFR 及び Ex19del 変異型 EGFR に対するその効力は、それぞれ AZD9291 よりも約 6～7 倍及び 8 倍強かった。着目すべき重要なこととして、AZ5104 は野生型 EGFR チロシンキナーゼを有する LOVO 及び H2073 細胞株に対しても AZD9291 又は AZ7550 より明らかに強い作用を示した。これらの *in vitro* データを総合すると、野生型 EGFR チロシンキナーゼと比較したときの T790M 変異型 EGFR チロシンキナーゼへの全体的な選択性は、代謝物 AZ5104 で約 15 倍であり、AZD9291 の約 30 倍と比較して低かった（表 3）。AZ5104 は変異型及び野生型 EGFR チロシンキナーゼに対して AZD9291 より強い阻害作用を示したことから、非臨床及び臨床において、AZD9291 でみられる有効性及び毒性に寄与する可能性が示されたが、どの程度寄与するかについては明らかになっていない。

表 3　　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の各種細胞株における EGFR リン酸化阻害作用

化合物	H1975 (L858R/ T790M)	PC9 VanR (Ex19del/ T790M)	PC9 (Ex19 del)	H3255 (L858R)	H1650 (Ex19 del)	LOVO (wt)	A431 (wt)	H2073 (wt)
AZD9291	15 (10, 20) n=16	6 (3, 13) n=5	17 (13, 22) n=16	60, 49 n=2	14, 12 n=2	480 (320, 720) n=16	2376, 1193 n=2	1865 (872, 3988) n=4
AZ5104	2 (2, 4) n=9	1 (0.04, 8) n=3	2 (2, 3) n=8	ND	ND	33 (24, 45) n=8	ND	53, 66 n=2
AZ7550	45 (34, 59) n=9	29 (8, 108) n=3	26 (10, 65) n=6	ND	ND	786 (480, 1292) n=7	ND	2356, 2367 n=2

培養細胞に被験化合物を 2 時間作用させた後、細胞を溶解して ELISA キット（R&D Systems 社）でリン酸化 EGFR（pEGFR）を測定した。野生型 EGFR の LOVO、A431 及び H2073 細胞は被験化合物を作用させた後、20 nM の EGF で 10 分間刺激し、EGFR を活性化させた。
n>2 の場合は見かけの IC_{50} 値の幾何平均及び 95%信頼区間（nM）を示す。
ND = 測定せず
EGFRm 感受性変異体：L858R、Ex19del
wt：野生型
（出典：試験 Pharmacology Report ■ の Table 1 及び試験 Pharmacology Report ■ の Table 1 より作成）

2.6.2.2.1.3　インスリン様成長因子 1 受容体及びインスリン受容体に対する阻害作用（試験 Pharmacology Report ■ 並びに試験 3129SV、3285SV 及び 3284SV）

AZD9291 はインスリン様成長因子 1 受容体（IGF1R）及びインスリン受容体（InsR）に対する阻害作用が弱くなるようにデザインされているが（Finlay et al 2014）、単離キナーゼを用いたプロファイリングでは、臨床での忍容性に関連する可能性のある IGF1R に対する作用が認められた。したがって、IGF1R 及び InsR に対する作用を別の酵素及び細胞アッセイで更に検討した。

IGF1R 酵素については、市販の遺伝子組換え活性化 IGF1R（活性化状態）に対する作用を、ペプチド基質を用いて、Caliper LabChip LC3000 マイクロ流体移動度シフトプラットフォームにより測定した。表 4に示すように、AZD9291 及び AZ7550 はいずれも IGF1R に対する作用が弱く、IC_{50} 値は 1 μM を超えていた。一方、AZ5104 はより強い作用を示し、平均 IC_{50} 値は 238 nM であった。

同様に、遺伝子組換え InsR 酵素に対する作用を、ペプチド基質を用いて、LANCE®蛍光検出プラットフォームにより測定した。IGF1R と同様に、AZD9291 及び AZ7550 は InsR 酵素に対する作用が弱かったが、AZ5104 は一貫してより強い作用を示し、その平均 IC_{50} 値は 110 nM であった（表 4及び表 13）。

表 4　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の IGF1R 及び InsR 酵素に対する阻害作用

化合物	IGF1R	InsR
AZD9291	2360, 3460	1200 (620, 2290) (n=3)
AZ5104	238 (181, 313) (n=5)	90, 130
AZ7550	1710 (990, 2940) (n=4)	1020, 530

IGF1R 酵素及び InsR 酵素は、遺伝子組換え酵素を用い、ペプチド基質で測定した。
n>2 の場合は IC_{50} 値の幾何平均及び 95%信頼区間（nM）を示す。
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Table 3 から引用）

酵素に対する作用強度が細胞においてどの程度反映されるかを検討するため、リン酸化 IGF1R（pIGF1R）をサロゲート・マーカーとして、セルベースアッセイを実施した。[redacted] 社で市販の IGF1R アッセイを duplicate で実施し、8 点の用量反応曲線から細胞における IC_{50} 値を算出した。[redacted] 社では、遺伝子導入された完全長ヒト IGF1R を高レベルで発現するマウス胎児線維芽細胞株が構築されている。これらの細胞を IGF1 で刺激し、IGF1R 自己リン酸化レベルを、特異的な捕捉抗体及びリン酸化チロシン検出抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により測定した。表 5に示すように、AZD9291 及び 2 つの代謝物は細胞 IGF1R リン酸化に対してほとんど作用を示さず、それらの IC_{50} 値は>1 μM であった。このことから、*in vitro* での細胞において、これらの化合物の IGF1R 阻害作用は弱く、AZ5104 でみられた酵素に対する作用は細胞には反映されないことが示された。

表 5　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の IGF1R リン酸化に対する阻害作用

化合物	IGF1R 阻害作用における平均 IC_{50} 値
AZD9291	4614 (1997, 10664) (n=4)
AZ5104	1915 (1350, 2714) (n=4)
AZ7550	>10000, >10000 (n=2)

遺伝子導入された完全長ヒト IGF1R を高レベルで発現しているマウス胎児線維芽細胞株を用い、IGF1 刺激による IGF1R 自己リン酸化レベルを ELISA 法により測定した。
n>2 の場合は IC_{50} 値の幾何平均及び 95%信頼区間（nM）を示す。
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Table 4 から引用）

2.6.2.2.1.4　細胞における HER2（ErbB2）リン酸化阻害作用（試験 Pharmacology Report [redacted] 及び [redacted]）

EGFR は受容体の ErbB ファミリーに属しており、そのファミリーには EGFR と密接に関連する HER2（ErbB2）、ErbB3（HER3）及び ErbB4（HER4）も含まれている。酵素キナーゼプロファイリングにより、AZD9291 及び代謝物は、HER2（ErbB2）に対して強い作用を有する可能性が示された。この結果について更に検討するため、一連の HER2 リン酸化セルベースアッセイでこれらの化合物を評価した。内因性及び外因性 HER2 を発現する種々の細胞において、リン酸化 HER2（pHER2）を、特異的な捕捉抗体及びリン酸化チロシン検出抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により測定した。AZD9291 は HER2 に対して一貫して作用を示した（表 6；見かけの平均 IC_{50} 値の範囲は 90～119 nM）。しかし、AZD9291 の作用強度は他の HER2 阻害剤アファチニブ及びラパチニブの約 1/6～1/10 と弱かったことから、HER2 に作用を及ぼすほど臨床曝露量が

高くなるかは不明である。AZ7550 の薬理作用は AZD9291 に類似しており、生化学プロファイリングによりその作用は弱いことが示されたため、AZ7550 の細胞 HER2 に対する作用の検討は行わなかった。着目すべきこととして、AZ5104 は野生型 EGFR チロシンキナーゼに対する作用が強いことと一致して（表 3）、HER2 リン酸化に対しても強い作用を示し（見かけの平均 IC_{50} 値の範囲は 13～18 nM）、その作用はアファチニブ及びラパチニブと同程度であったことから、代謝物 AZ5104 が臨床で十分なレベルに達した場合には HER2 に対して作用する可能性が示された（表 6）。

表 6　　AZD9291、AZ5104 及び対照化合物の HER2 リン酸化阻害作用

化合物	NIH3T3/HER2[a]	BT474c[b]	MCF7[c]
AZD9291	93 (39, 221) (n=3)	119 (55, 257) (n=3)	118, 63
AZ5104	18 (9, 35) (n=3)	17 (12, 23) (n=3)	16, 11
アファチニブ	15 (8, 29) (n= 3)	18 (4, 80) (n=3)	16, 13
ラパチニブ	7 (5, 11) (n=4)	ND	ND

HER2 を発現する種々の細胞において、リン酸化 HER2（pHER2）を、特異的な捕捉抗体及びリン酸化チロシン検出抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により測定した。
n>2 の場合は IC_{50} 値の幾何平均及び 95%信頼区間（nM）を示す。
当試験では AZ7550 の評価を実施しなかった。
ND；測定せず
[a] [redacted]社の市販アッセイ。遺伝子導入された完全長ヒト HER2/ErbB2 を高レベルで発現するマウス線維芽細胞株 NIH3T3
[b] 遺伝子増幅され、恒常的に活性化された HER2/ErbB2 を有する BT474c 細胞株
[c] リガンド（ヘレグリン）により活性化された HER2/ErbB2 を有する MCF7 細胞株
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Table 4、試験 Pharmacology Report [redacted] の Table 1 及び Table 3 より作成）

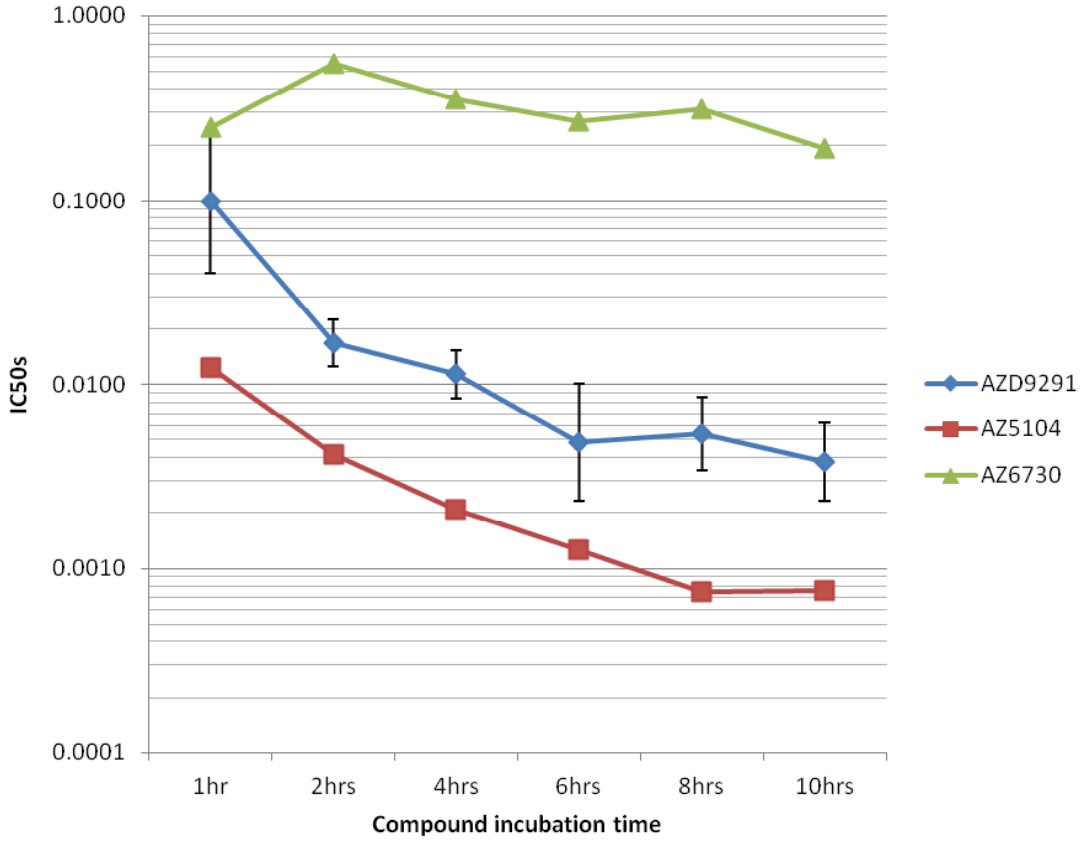
2.6.2.2.1.5　AZD9291 の EGFR チロシンキナーゼに対する不可逆的阻害作用（試験 Pharmacology Report 14）

T790M 変異型 EGFR チロシンキナーゼは、ATP に対する K_m 値が小さいため可逆的に結合する薬物では標的としにくいことが知られている。したがって、AZD9291 は、共有結合で不可逆的に結合する作用機序によって、細胞の T790M 変異型 EGFR チロシンキナーゼに対して強い効力を発揮するように開発された。実際、質量分析試験において、単離した遺伝子組換え EGFR チロシンキナーゼの触媒部位に位置する Cys797 に AZD9291 が選択的に共有結合することが確認されており（試験 Pharmacology Report [redacted]）、また生理学的意義は不明ながら別の部位 Cys939 への結合も認められている。したがって、この不可逆的結合機序によって生じる AZD9291 及びその活性代謝物の薬力学的動態は可逆的結合薬物とは異なることが想定される。

2.6.2.2.1.1項で考察したように、不可逆的阻害剤の重要な薬力学的動態の 1 つとして、標的への曝露時間が長くなるにつれて活性を有する酵素量が経時的に減少し、時間依存的な阻害作用の増強がみられると考えられる。このことを AZD9291 及び AZ5104 について更に検討するため（AZ7550 は薬理作用が AZD9291 に類似しているため検討を行わなかった）、被験化合物を細胞とともに様々な時間インキュベーションした後、EGFR リン酸化阻害作用の IC_{50} 値を測定した。図 1に示すように、AZD9291 の見かけの IC_{50} 値は、インキュベーション時間が長くなるにつれて低下し、10 時間インキュベーション後の値は、表 3に示した標準的な 2 時間インキュベーション後の値の約 1/10 であった。AZ5104 でも同様の時間依存的な変化が H1975 細胞株に対する IC_{50}

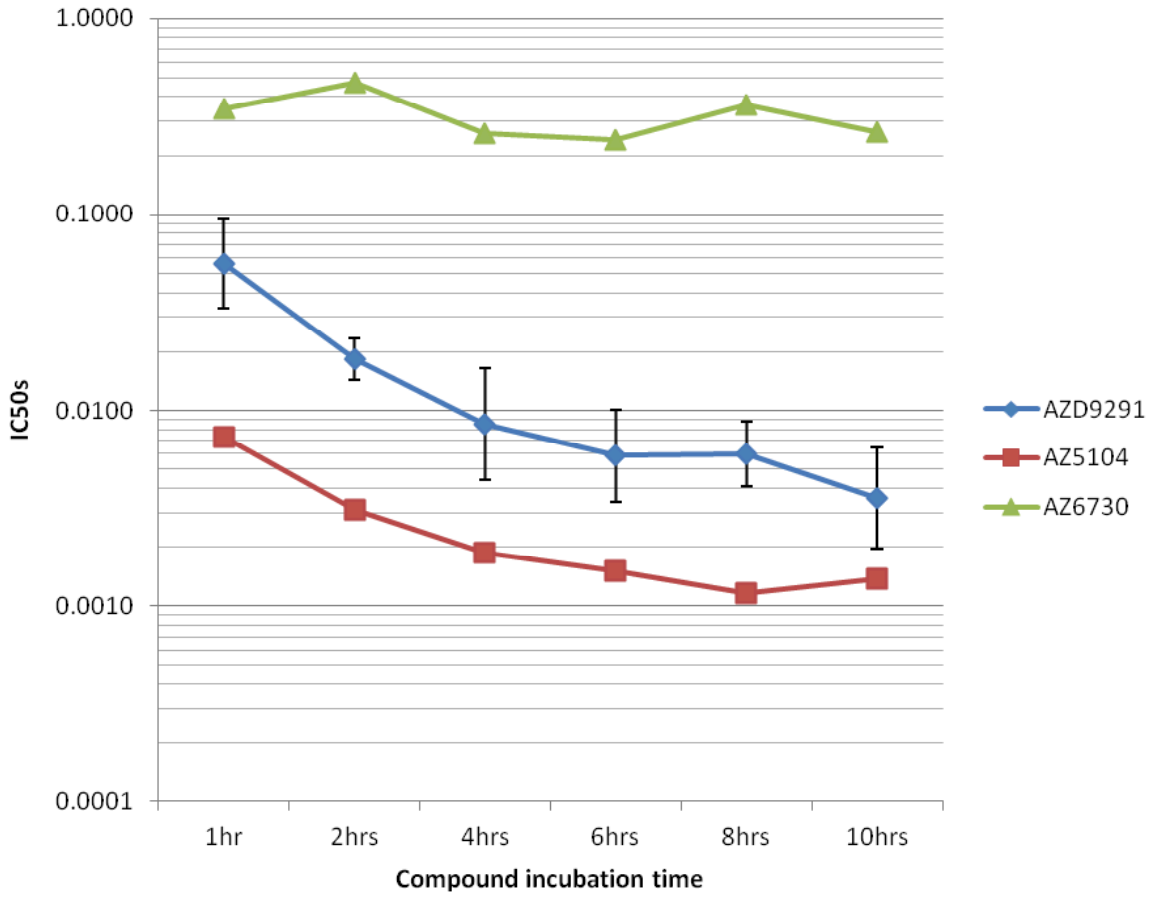
値に認められている（図 1）。これとは対照的に、対照の可逆的 EGFR プローブ阻害剤 AZ6730 は、可逆的薬物で予想されるように、全インキュベーション時間でほぼ一定の IC_{50} 値を示した（図 1）。AZD9291 及び AZ5104 では、H1975 細胞株と同様に PC9 細胞株（図 2）及び野生型 EGFR モデルの LOVO 細胞株（図 3）においても、同様の時間依存的な阻害作用の増強が認められた。これらの *in vitro* での細胞アッセイにおいて、AZD9291 及び AZ5104 は不可逆的な阻害剤であることが強く裏付けられた。このことより、*in vitro* アッセイで不可逆的阻害剤の IC_{50} 値を決定し、その値を解釈することが困難であることが明らかになった。

図 1　　H1975（L858R/T790M）細胞株と様々な時間インキュベーションしたときの阻害作用の経時変化



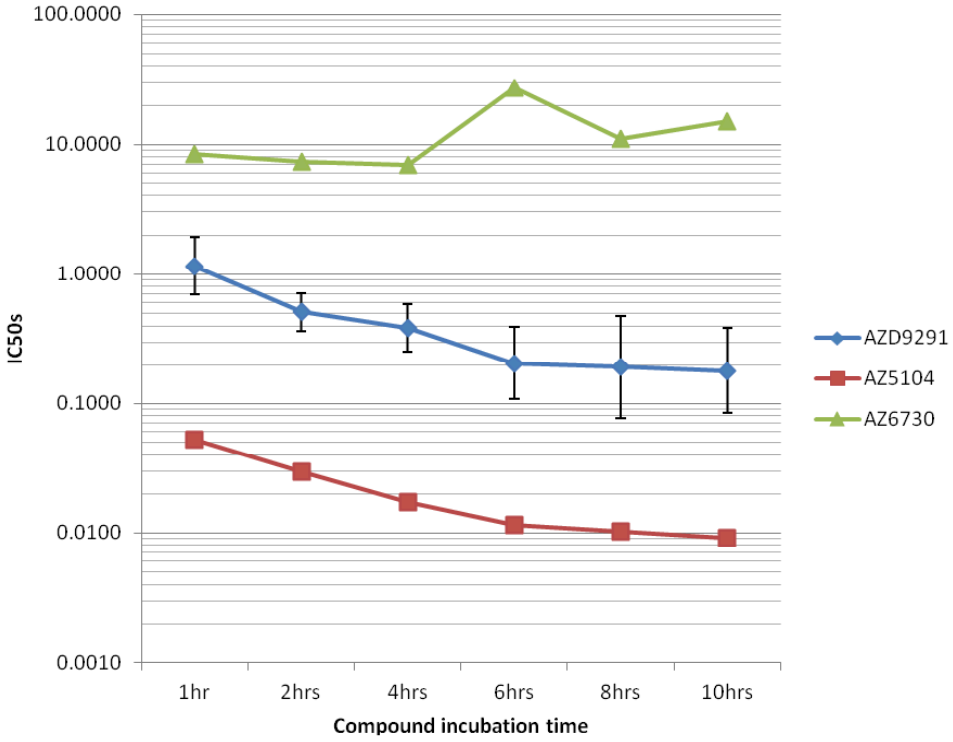
H1975 細胞を被験化合物と様々な時間インキュベーションした後、リン酸化 EGFR を ELISA キットで測定した。
n>2 の場合は IC_{50} 値の幾何平均及び 95%信頼区間を示す。
Compound incubation time：化合物とのインキュベーション時間
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 1 から引用）

図 2　　PC9（Ex19del）細胞株と様々な時間インキュベーションしたときの阻害作用の経時変化



PC9 細胞を被験化合物と様々な時間インキュベーションした後、リン酸化 EGFR を ELISA キットで測定した。
n>2 の場合は IC_{50} 値の幾何平均及び 95%信頼区間を示す。
Compound incubation time：化合物とのインキュベーション時間
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 2 から引用）

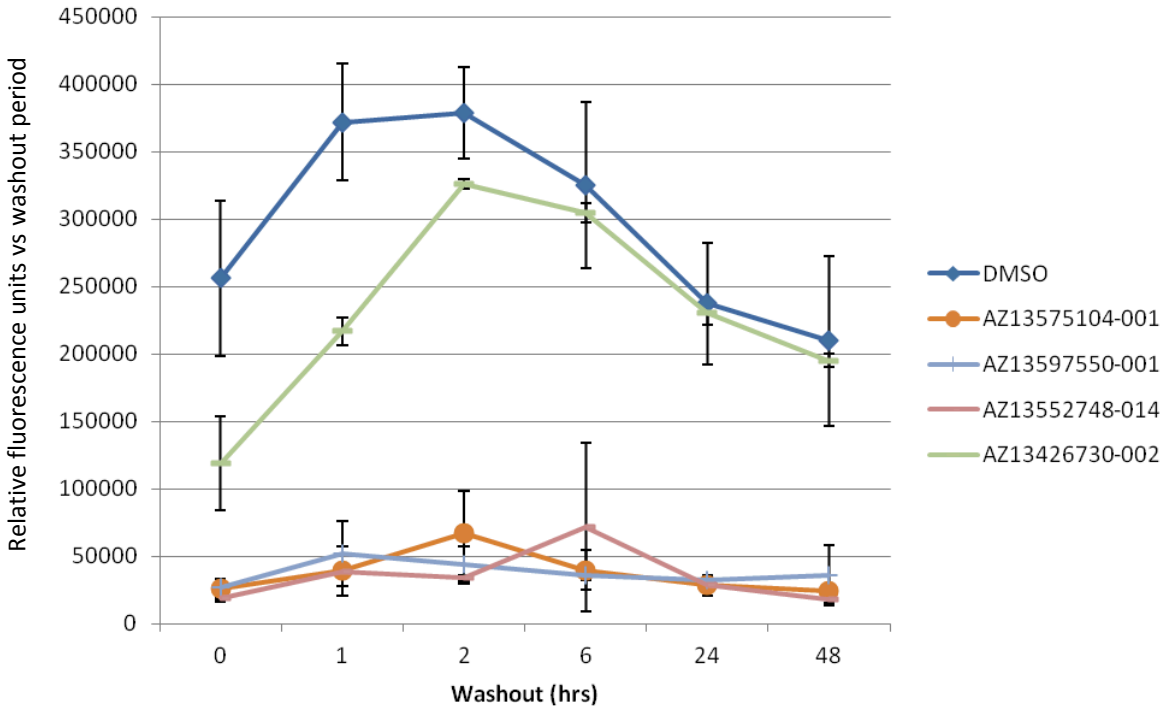
図 3　　LOVO（野生型 EGFR）細胞株と様々な時間インキュベーションしたときの阻害作用の経時変化



LOVO 細胞を被験化合物と様々な時間インキュベーションした後、リン酸化 EGFR を ELISA キットで測定した。n>2 の場合は IC_{50} 値の幾何平均及び 95%信頼区間を示す。
Compound incubation time：化合物とのインキュベーション時間
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 3 から引用）

不可逆的阻害剤の薬力学的動態を更に検討するため、H1975 細胞株を化合物とインキュベーションし、2 時間後に十分に洗浄した。洗浄後の様々な時点で pEGFR レベルを測定し、EGFR リン酸化がどの程度速やかに回復するかを検討した。図 4に示すように、AZD9291（AZ13552748）、AZ5104（AZ13575104）及び AZ7550（AZ13597550）では、阻害剤の洗浄 48 時間後まで持続して pEGFR が低かった。これとは対照的に、可逆的 EGFR プローブ阻害剤 AZ6730（AZ13426730）では pEGFR は洗浄 2 時間後にベースラインレベルまで回復した。

図 4　　H1975 を各化合物 1 μM とともに 2 時間インキュベーションし、洗浄したときの pEGFR の洗浄後の経時変化



H1975 細胞株を被験化合物（1 μM）と 2 時間インキュベーションして洗浄した後、様々な時点でのリン酸化 EGFR を ELISA キットで測定した。
エラーバーは±標準偏差。Washout：洗浄後の時間
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 5 から引用）

2.6.2.2.1.6　*In vitro* における細胞増殖抑制作用（試験 Pharmacology Report [redacted]）

生細胞の細胞膜を透過しない核酸蛍光染色剤 Sytox Green を用いて、変異型又は野生型 EGFR チロシンキナーゼを有する一連の腫瘍細胞株に対する増殖抑制作用を検討した。Sytox Green は死細胞やアポトーシス細胞等、細胞膜が透過性を示す細胞のみに取り込まれるため、被験物質の細胞死及び細胞増殖に対する影響の評価に使用できる。細胞株に被験化合物を添加して 72 時間インキュベーションした後、Sytox Green により死細胞数を求めた。細胞をサポニン処理により全細胞を Sytox Green 染色可能にすることでウェルあたりの総細胞数を求め、総細胞数から死細胞数を差し引くことでウェルあたりの生細胞数を算出した。同様の方法で 0 日目のプレートを Sytox Green 及びサポニン処理することにより実験開始時の各細胞株の生細胞数を求め、被験化合物の細胞死に対する影響を検討した。

AZD9291 は EGFRm（PC9）又は EGFRm/T790M 変異（H1975 及び PC9VanR）を有する細胞の増殖を 8～40 nM で抑制した（表 7）。AZD9291 の野生型 EGFR 発現細胞株（CALU3、CALU6 及び H2073）に対する増殖抑制作用は弱かった（表 7）。AZ5104 は変異型 EGFR 発現細胞に対して強い作用を示し（表 7）、野生型 EGFR モデルである CALU3 及び H2073 に対する作用も

AZD9291 の 10～15 倍であった。他のデータと一致して、AZ7550 は親化合物 AZD9291 と類似したプロファイルを示した。CALU6 には野生型 EGFR 刺激による増殖誘導がないため、本モデルで作用がみられなかったことは、他の細胞でみられた作用が非特異的な細胞毒性によるものではないことを示唆している。

表 7　AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の変異型及び野生型 EGFR 発現細胞株に対する増殖抑制作用

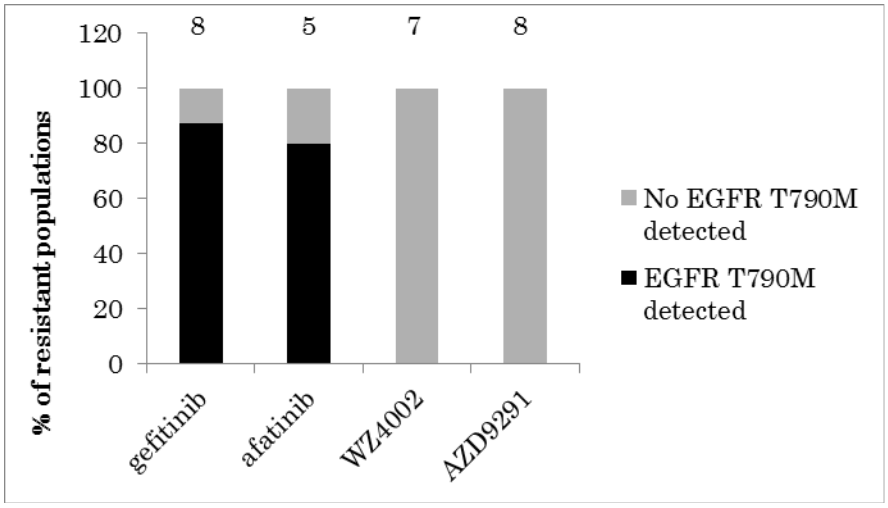
化合物	H1975 (L858R/ T790M)	PC9VanR (Ex19del/ T790M)	PC9 (Ex19 del)	CALU3 (wt)	CALU6 (wt)	H2073 (wt)
AZD9291	11 (6, 19) n=17	40 (30, 54) n=8	8 (7, 9) n=17	650 (457, 924) n=17	4089 (3551, 4708) n=15	461 (230, 924) n=12
AZ5104	3 (2, 5) n=11	7 (3, 17) n=3	3 (2, 3) n=11	80 (28, 231) n=11	2041 (1650, 2525) n=9	28 (7, 107) n=8
AZ7550	26, 33 n=2	ND	10, 26 n=2	2460, 370 n=2	3850, 4060 n=2	1361 n=1

培養細胞株に被験化合物を添加して 72 時間インキュベーションした後、核酸蛍光染色剤 Sytox Green を用いて、細胞増殖に対する作用を検討した。
n>2 の場合は IC_{50} 値の幾何平均及び 95%信頼区間（nM）を示す。n=1 及び 2 の場合、個別値を示す。
ND = 測定せず
wt：野生型
（出典：試験 Pharmacology Report ■）

2.6.2.2.1.7　既存の EGFR-TKI とは異なる AZD9291 の薬理学的耐性獲得プロファイル（試験 Pharmacology Report ■及び ■）

既に強調したように、既存の EGFR-TKI に対する耐性の獲得は、臨床及び非臨床モデルのいずれにおいても、EGFR T790M 変異の発現に伴って起こることが多く、このことが AZD9291 を開発する根拠となった。重要なこととして、AZD9291 は T790M 変異型 EGFR チロシンキナーゼに対する作用が強いことと一致して、*in vitro* で AZD9291 を長期曝露した複数の独立した PC9 細胞集団において、耐性獲得メカニズムである T790M 変異は検出されていない（図 5）。これとは明らかに対照的に、既存の TKI を長期曝露すると、ゲフィチニブ耐性集団の 7/8、アファチニブ耐性集団の 4/5 で T790M 変異が検出された（図 5）。これらのデータから、AZD9291 は T790M 変異に対し強い作用を有することが裏付けられ、更に、TKI に曝露されていない条件下で、AZD9291 を曝露したとき、T790M による耐性獲得は起こりにくいと考えられる。

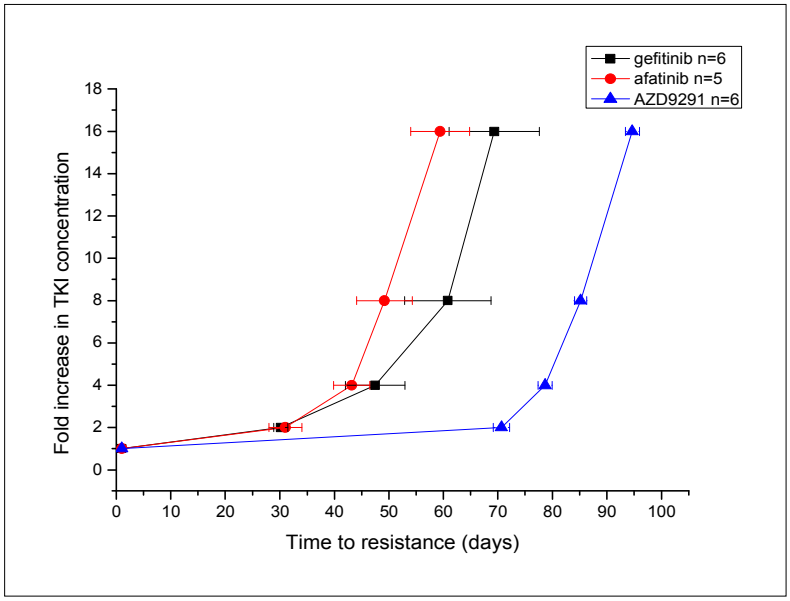
図 5　　*In vitro* における PC9 細胞の AZD9291 に対する耐性獲得における T790M 変異の関与



PC9 細胞を被験化合物に長期間曝露し、耐性を獲得した細胞の DNA 解析を行った。
% of resistant population：集団の総数に対する比率、gefitinib：ゲフィチニブ、afatinib：アファチニブ、no T790M detected：T790M 非検出、T790M detected：T790M 検出
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted]）

T790M 変異が発現しないことに加えて、AZD9291 が従来の EGFR-TKI と更に異なる点は耐性獲得までの時間である。図 6に示すように、PC9 細胞集団が AZD9291 に対して耐性を獲得するまでの時間は、アファチニブ及びゲフィチニブと比較して明らかに長かった。このデータから、EGFR-TKI に曝露されていない条件下で、AZD9291 は他剤と異なる状況を引き起こし得るとの前提が更に裏付けられた。

図 6　　PC9 細胞の AZD9291、アファチニブ及びゲフィチニブに対する耐性を獲得するまでの時間



5 つ以上の独立した PC9 細胞集団に AZD9291 は 10 nM、ゲフィチニブは 20 nM 及びアファチニブは 0.5 nM を開始濃度（PC9 細胞増殖に対する IC_{50} 値）として添加した後、生存し増殖する細胞（耐性獲得細胞）を採取した。その後、阻害剤の濃度を 2 倍ずつ上げながら 16 倍の濃度まで、それぞれの濃度において細胞が耐性を獲得するまでの日数を測定した。
エラーバーは SEM を表す。
fold increase in TKI concentration：TKI 濃度の増加倍率、time to resistance (days)：耐性獲得までの時間（日）、gefitinib：ゲフィチニブ、afatinib：アファチニブ
（出典：試験 Pharmacology Report[redacted]）

2.6.2.2.2　*In vivo* 試験

2.6.2.2.2.1　EGFR 依存性異種移植腫瘍モデルにおける AZD9291 の抗腫瘍作用（試験 Pharmacology Report [redacted]）

種々の EGFRm（PC9 及び H3255）、EGFRm/T790M 変異（H1975 及び PC9VanR）及び野生型 EGFR（A431 及び LOVO）発現細胞株の異種移植モデルに AZD9291 を 1 日 1 回 14 日間反復経口投与したときの作用を検討した。6 週齢以上の雌免疫不全マウスの左背側皮下に細胞懸濁液 100 µL を移植し、異種移植腫瘍を生着させた。A431、LOVO 及び H1975 異種移植モデルには雌無胸腺マウス（Swiss nu/nu 遺伝子型、ヌードマウス）を、PC9、H3255 及び PC9VanR 異種移植モデルには雌重症複合免疫不全（SCID）マウスを使用した。

両側測定用バーニアノギスを用いて少なくとも週 2 回腫瘍を測定（全長×全幅）し、mousetrap ソフトウェアを用いて腫瘍体積を（3.142×（全長×全幅 ^{2}））/6000 の計算式から算出した。平均腫瘍体積がヌードマウスで約 0.2 cm^3、SCID マウスで約 0.4 cm^3 に達した時点で、マウスを各投与群に無作為に割り付け（1 群あたり 6～8 例）、翌日から媒体（1%ポリソルベート 80）又は AZD9291 を 1 日 1 回経口投与した。Mousetrap ソフトウェアを用いて媒体群及び AZD9291 投与

群の投与開始時からの腫瘍体積の平均変化を比較し、腫瘍増殖抑制作用を評価した。表 8に種々の EGFRm、EGFRm/T790M 変異及び野生型 EGFR 発現細胞株の異種移植モデルにおける AZD9291 の抗腫瘍作用を腫瘍増殖抑制率（%）として示す（>100%は腫瘍退縮を意味する）。

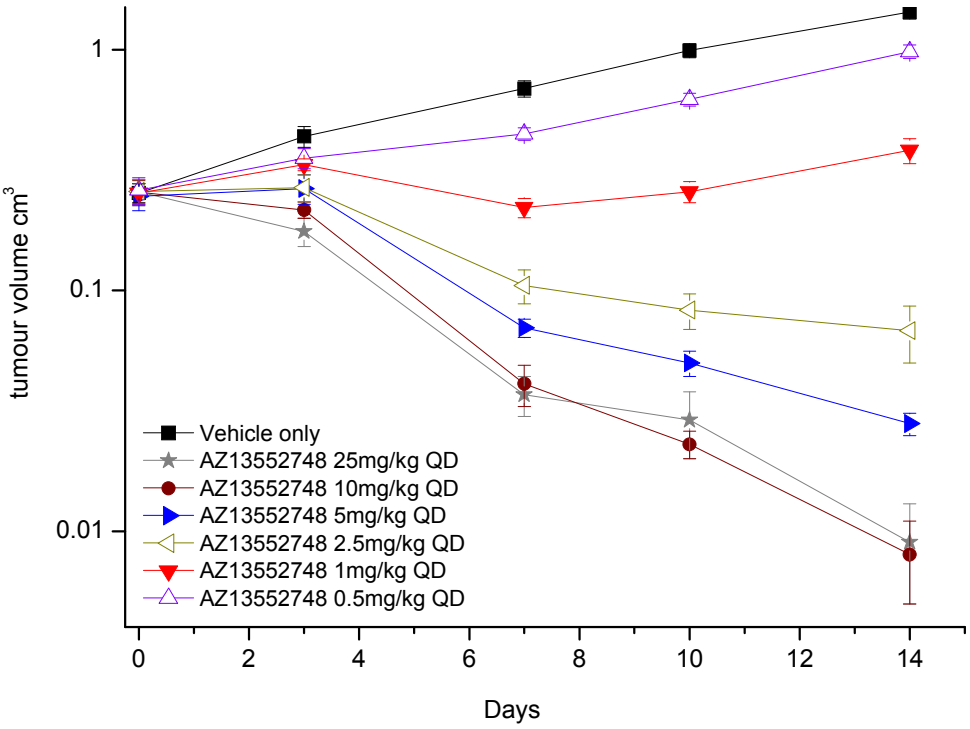
表 8　　各種異種移植モデルにおける AZD9291 の 14 日間反復経口投与後の腫瘍増殖抑制作用

異種移植モデル	変異の状態	用量 (mg/kg) 1 日 1 回	腫瘍増殖抑制率 (%)
H1975	L858R/T790M	25	120
		10	120
		5	119 ± 2 (n=9)
		2.5	116, 107
		1	81 ± 6 (n=3)
		0.5	39, 43
H3255	L858R	5	211
PC9VanR	Ex19del/T790M	5	171
PC9	Ex19del	25	212
		10	162
		5	178 ± 4 (n=8)
		2.5	165
		1	150, 154
		0.5	103
		0.25	39
		0.1	13
A431	wt	25	102
		10	94
		5	77 ± 3 (n=9)
		2.5	59
		1	43, 33
		0.5	36
		0.1	11
LOVO	wt	25	56
		5	7

雌免疫不全マウスの左背側皮下に腫瘍細胞懸濁液 100 µL を移植し、異種移植腫瘍を生着させ、腫瘍体積が一定の大きさになった後、媒体及び AZD9291 を 1 日 1 回 14 日間経口投与した。
腫瘍増加抑制率(%)は n>2 (実験数)の場合、平均 ± SEM を示す。
wt：野生型
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted]の Table 1 から引用）

H1975（EGFR L858R/T790M）異種移植モデルにおいて、AZD9291 投与による用量依存的な腫瘍増殖抑制がみられ、2.5 mg/kg 以上の 1 日 1 回 14 日間反復経口投与により腫瘍が顕著に退縮した（表 8、図 7）。EGFRm/T790M 変異異種移植モデルにおける強い作用と一致して、PC9VanR（Ex19del/T790M）異種移植モデルにおいても 5 mg/kg の用量で同様の腫瘍の退縮が認められた。これらの試験成績は、AZD9291 が EGFRm/T790M 変異を有する腫瘍に対して著しい抗腫瘍作用を発揮することを示している。

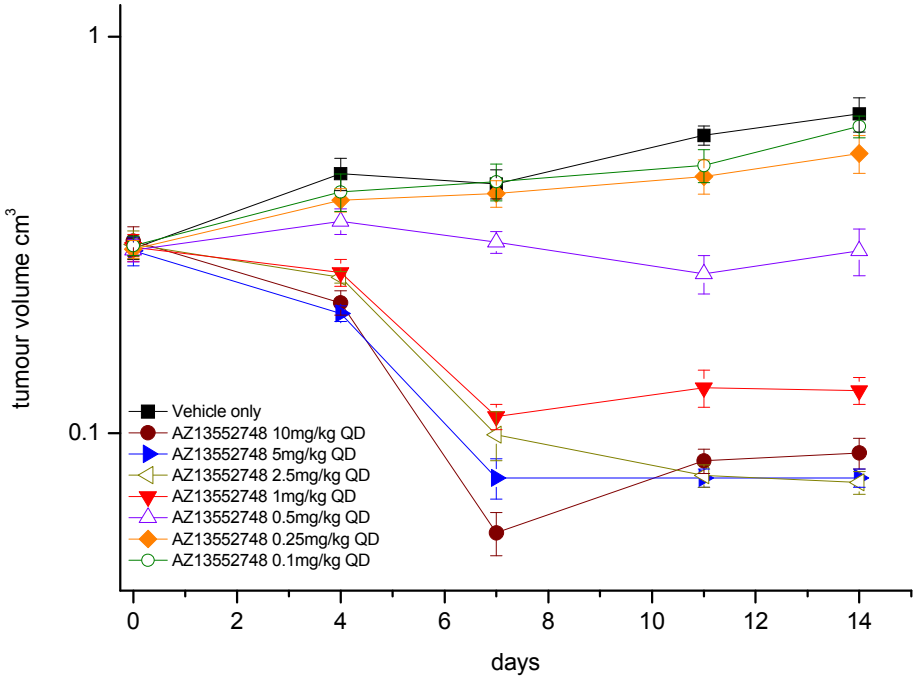
図 7　　雌無胸腺マウスの H1975（L858R/T790M）異種移植モデルにおける AZD9291（AZ13552748）の腫瘍増殖抑制作用（代表例）



雌無胸腺マウスの左背側皮下に H1975 細胞懸濁液 100 µL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。AZD9291 は 1 日 1 回 14 日間経口投与し、腫瘍体積を週 2 回以上測定した。
各点は群平均 ± SEM を示す。
tumor volume：腫瘍体積、days：日数、vehicle only：媒体（1%ポリソルベート 80）のみ、QD：1 日 1 回
X 軸：腫瘍評価開始日を 0 日目とし、1 日目に投与を開始した。
Y 軸：対数目盛で表示した腫瘍体積
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 2 から引用）

同様に、PC9（Ex19del）異種移植モデルにおいても AZD9291 による用量依存的な腫瘍退縮がみられ、退縮がみられた最低用量の 2.5 mg/kg では、14 日後に退縮が最大となった（表 8及び図 8参照）。また、H3255（L858R）モデルでも同様の退縮がみられた（表 8）。これらの試験成績を総合すると、AZD9291 は EGFRm モデルにおいて強い抗腫瘍作用を発揮することが示された。

図 8　　雌 SCID マウスの PC9（Ex19del）異種移植モデルにおける AZD9291（AZ13552748）の腫瘍増殖抑制作用（代表例）

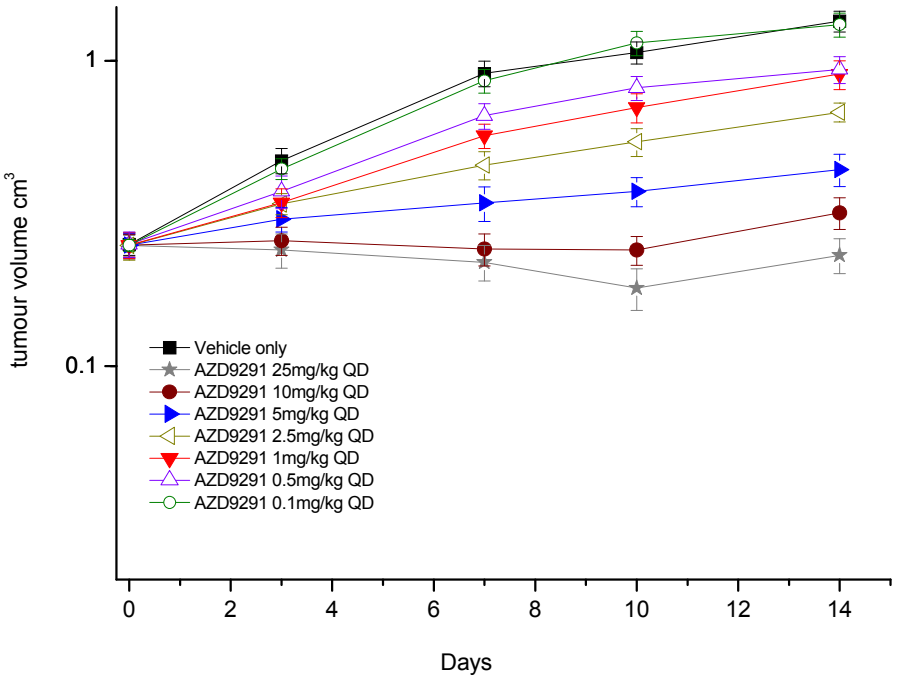


雌 SCID マウスの左背側皮下に PC9 細胞懸濁液 100 µL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。
AZD9291 は 1 日 1 回 14 日間経口投与し、腫瘍体積を週 2 回以上測定した。
各点は群平均 ± SEM を示す。
tumor volume：腫瘍体積、days：日数、vehicle only：媒体（1%ポリソルベート 80）のみ、QD：1 日 1 回
X 軸：腫瘍評価開始日を 0 日目とし、1 日目に投与を開始した。
Y 軸：対数目盛で表示した腫瘍体積
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 1 から引用）

In vitro での野生型 EGFR に対する作用が *in vivo* でどのように反映されるかを更に検討した。野生型 EGFR を高レベルに発現し強い増殖誘導を示す A431 異種移植モデルにおいて AZD9291 の腫瘍増殖抑制作用を検討した。表 8及び図 9に示すように、退縮には至らなかったものの、AZD9291 により腫瘍増殖が明らかに抑制された。

EGFRm 及び EGFRm/T790M 変異モデルで退縮が得られる AZD9291 の最低用量 2.5 mg/kg は、野生型モデルで中程度（59%）の増殖抑制作用を示した。また、野生型 EGFR に対する作用が弱いことと一致して、LOVO 異種移植モデルにおいて 5 mg/kg の AZD9291 では抑制がみられず、25 mg/kg で中程度の腫瘍増殖抑制がみられたのみであった（表 8）。これらの結果より、*in vivo* において AZD9291 は野生型 EGFR 発現腫瘍に対しても弱いながら薬理作用を有することが示されたが、これらの EGFR を高発現している異種移植モデルの特性を考慮すると、詳細について解釈することは難しい。

図 9　　雌無胸腺マウスの A431（野生型）異種移植モデルにおける AZD9291 の腫瘍増殖抑制作用（代表例）



雌無胸腺マウスの左背側皮下に A431 細胞懸濁液 100 µL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。
AZD9291 は 1 日 1 回 14 日間経口投与し、腫瘍体積を週 2 回以上測定した。
各点は群平均 ± SEM を示す。
tumor volume：腫瘍体積、days：日数、vehicle only：媒体（1%ポリソルベート 80）のみ、QD：1 日 1 回
X 軸：腫瘍評価開始日を 0 日目とし、1 日目に投与を開始した。
Y 軸：対数目盛で表示した腫瘍体積
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 3 から引用）

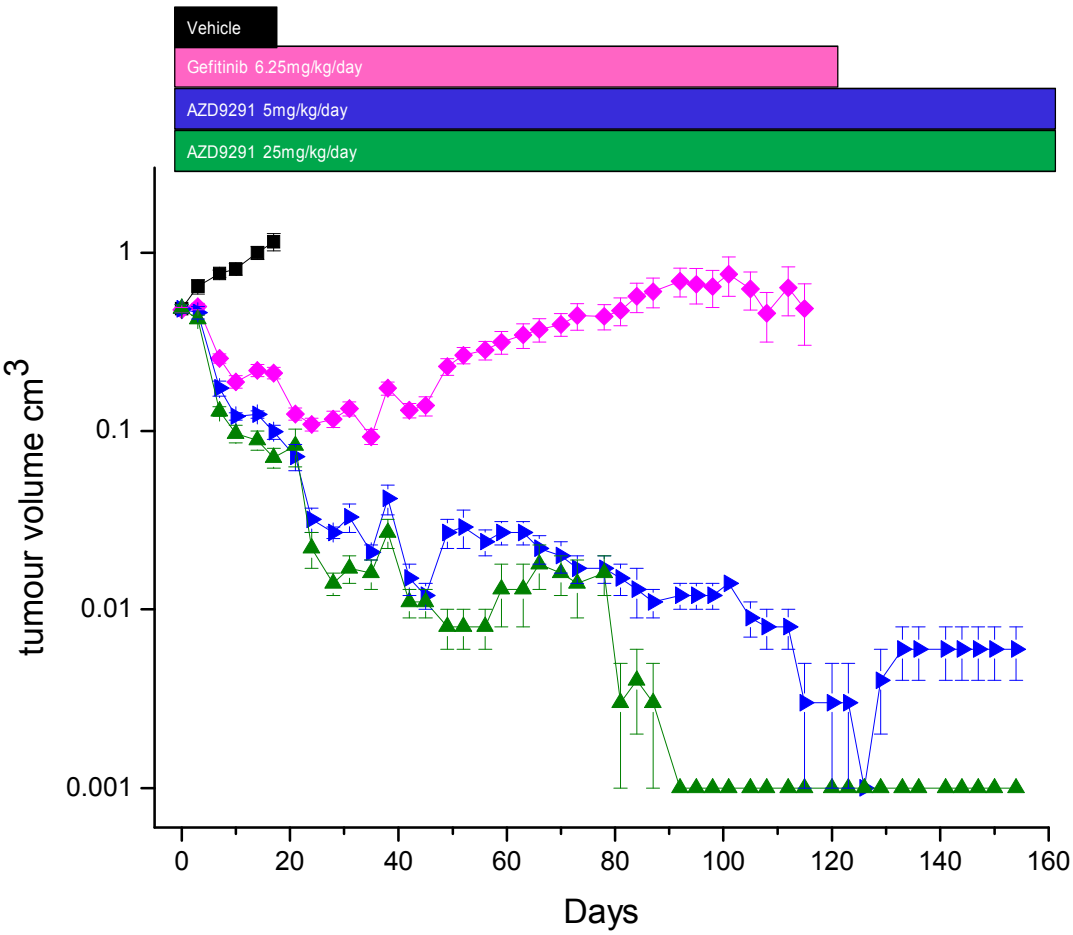
2.6.2.2.2.2　EGFR 依存性腫瘍異種移植モデルにおける AZD9291 の長期投与による抗腫瘍作用（試験 Pharmacology Report [redacted]、[redacted] 及び [redacted]）

異種移植モデルにおける AZD9291 の有効性を更に検討するため、EGFRm（PC9；Ex19del 及び H3255；L858R）及び H1975（L858R/T790M）の異種移植モデルにおいて AZD9291 の長期投与での効果を検討した。動物は 6 週齢以上の雌免疫不全マウス（SCID あるいは無胸腺）を用いた。

PC9 腫瘍異種移植マウス（雌 SCID）に AZD9291（媒体：0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース；HPMC）を 25 mg/kg/日の用量で長期にわたり反復経口投与したところ、8 例全てにおいて腫瘍が完全に消失した。すなわち、約 90 日後には目視で確認できる腫瘍が消失し（図 10）、この状態が約 200 日目まで持続し、病勢の進行は確認されなかった（データは示さず）。同様に、低用量の 5 mg/kg/日を投与したときには、8 例中 5 例で可視的な腫瘍が持続的かつ完全に消失し、残りのマウスでは可視的な腫瘍が認められたものの、小さく、測定不能であった（図 10）。これとは対照的に、ゲフィチニブ（媒体：0.5% HPMC /0.1%ポリソルベート 80）の臨床的に意義の

ある用量（6.25 mg/kg/日は臨床用量の 250 mg に近い用量）では、部分的で一時的な退縮が認められたのみであった（図 10）。

図 10　　雌 SCID マウスの PC9（Ex19del）異種移植モデルにおける AZD9291 及びゲフィチニブの長期投与による腫瘍増殖抑制作用



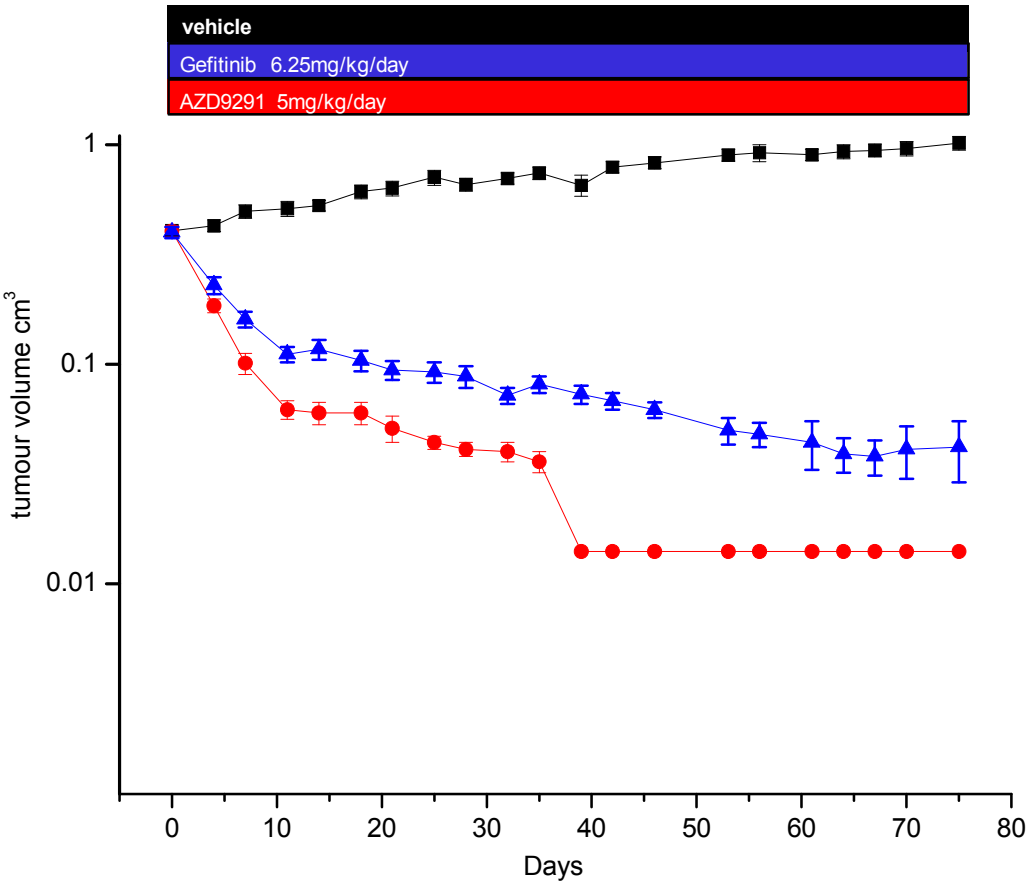
雌 SCID マウスの左背側皮下に PC9 細胞懸濁液 100 µL（5 x 10^6 細胞）を移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。
AZD9291 及びゲフィチニブは 1 日 1 回経口投与し、原則 1 週間に 2 回腫瘍体積を測定した。
各点は群平均 ± SEM を示す（vehicle：n=6～7、gefitinib 6.25 mg/kg/day：n=6～16、AZD9291 5 mg/kg/day：n=8、AZD9291 25 mg/kg/day：n=8）。
tumor volume：腫瘍体積、days：日数、vehicle：媒体（0.5%HPMC/0.1%ポリソルベート 80）、gefitinib：ゲフィチニブ
X 軸：腫瘍評価開始日を 0 日目とし、1 日目に投与を開始した。
Y 軸：対数目盛で表示した腫瘍体積
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 1 から引用）

同様に、H3255（L858R）異種移植マウス（雌 SCID）モデルにおいても、AZD9291（媒体：0.5% HPMC）を 5 mg/kg/日の用量で長期経口投与したとき、8 例全てにおいて 39 日目から腫瘍が測定不能となり、この状態が 75 日目の試験期間終了日まで持続した（図 11）。一方、

6.25 mg/kg のゲフィチニブ（媒体：1%ポリソルベート 80）を投与したとき、腫瘍が測定不能な状態となったのは 1 例のみであった（図 11）。

これらのデータを総合すると、EGFR に Ex19del 又は L858R 変異を有するいずれの腫瘍モデルにおいても、AZD9291 は低用量で強く持続的な抗腫瘍作用を示すことが確認された。

図 11　雌 SCID マウスの H3255（L858R）異種移植モデルにおける AZD9291 及びゲフィチニブの長期投与による腫瘍増殖抑制作用

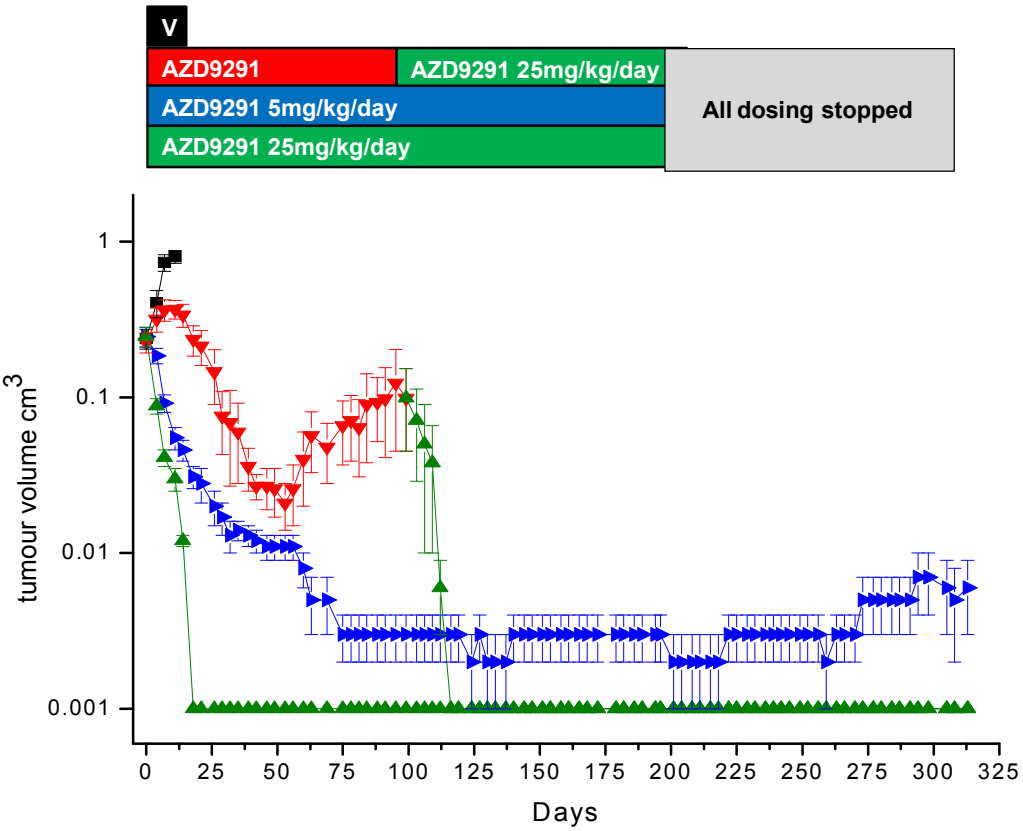


雌 SCID マウスの左背側皮下に H3255 細胞懸濁液 200 µL（5 x 10^6 細胞）を移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。AZD9291 及びゲフィチニブは 1 日 1 回経口投与し、原則 1 週間に 2 回腫瘍体積を測定した。
各点は群平均 ± SEM を示す（vehicle：n=6～12、gefitinib 6.25 mg/kg/day：n=5～8、AZD9291 5 mg/kg/day：n=8）。
tumor volume：腫瘍体積、days：日数、vehicle：媒体（0.5% HPMC）、gefitinib：ゲフィチニブ
X 軸：腫瘍評価開始日を 0 日目とし、1 日目に投与を開始した。
Y 軸：対数目盛で表示した腫瘍体積
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 1 から引用）

更に、AZD9291（媒体：1%ポリソルベート 80）を H1975（L858R/T790M）異種移植モデル（雌無胸腺マウス）に長期経口投与したところ、可視的な腫瘍が持続的に消失した。H1975 腫瘍異種移植マウスに AZD9291 を 25 mg/kg/日の用量で投与したとき、9 例全てにおいて、約 20 日後

には可視的な腫瘍が消失し、この状態が 200 日目の投与終了日まで持続した（図 12）。同様に、AZD9291 を 5 mg/kg/日で投与したときには、12 例中 11 例で腫瘍が完全に消失したが（残りのマウスでは測定不能な腫瘍がみられた）、消失までの時間は 25 mg/kg/日を投与したときよりも若干長かった。興味深いことに、AZD9291 を 1 mg/kg/日で投与したときには、部分的で一時的な退縮が認められたのみであったが、その後、これらの動物に 25 mg/kg/日で投与すると、腫瘍が顕著かつ完全に退縮した（図 12）。着目すべきこととして、投与終了後 100 日間にわたり、全ての投与群で明らかな腫瘍の再増殖は確認されなかったことから、AZD9291 の強力な抗腫瘍作用が示された。

図 12　　雌無胸腺マウスの H1975（L858R/T790M）異種移植モデルにおける AZD9291 の長期投与による腫瘍増殖抑制作用



雌 SCID マウスの左背側皮下に H3255 細胞懸濁液 100 µL を移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。AZD9291 は 1 日 1 回経口投与した。
各点は群平均 ± SEM を示す（vehicle：n=9～10、AZD9291 1 mg/kg/day：n=5～12、AZD9291 5 mg/kg/day：n=11～12、AZD9291 25 mg/kg/day：n=9～12）。
tumor volume：腫瘍体積、days：日数、V：媒体（1%ポリソルベート 80）、all dosing stopped：投与休止
X 軸：腫瘍評価開始日を 0 日目とし、1 日目に投与を開始した。
Y 軸：対数目盛で表示した腫瘍体積
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 1 から引用）

これらの試験成績より、変異型 EGFR を有する腫瘍モデルにおいて、AZD9291 は低用量で極めて強力な抗腫瘍作用を発揮することが示された。

2.6.2.2.2.3　腫瘍異種移植モデルにおける AZD9291 の活性代謝物 AZ5104 の抗腫瘍作用（試験 Pharmacology Report [redacted]）

AZD9291 の代謝物である AZ5104 は *in vitro* で AZD9291 より強い EGFR チロシンキナーゼ阻害作用を示した。本代謝物が *in vivo* で作用を示すかどうかを、AZD9291 に使用した様々な異種移植モデルで検討した。動物は 6 週齢以上の雌免疫不全マウス（SCID あるいは無胸腺）を用いた。表 9に示すように、AZ5104 は、EGFRm モデル及び EGFRm/T790M 変異モデルにおいて AZD9291 と同程度の腫瘍増殖抑制作用を示した。更に、AZ5104 は、野生型 EGFR モデルに対して AZD9291 より高い有効性を示し、*in vitro* において AZD9291 より野生型 EGFR に対する作用が強かったことと一致した。

表 9　各種異種移植モデルにおける AZ5104 及び AZD9291 の 13～14 日間反復経口投与後の腫瘍増殖抑制作用

異種移植モデル	変異の状態	用量（mg/kg）	腫瘍増殖抑制率 (%)	
		1 日 1 回	AZ5104	AZD9291
H1975	L858R/T790M	50	118	-
		25	-	120
		10	115	120
		5	108	119 ± 2 (n=9)
		2.5	82	116, 107
		1	-	81 ± 6 (n=3)
PC9	Ex19del	50	184	-
		25	-	212
		10	182	162
		5	174	178 ± 4 (n=8)
		2.5	163	165
		1	-	150, 154
A431	wt	50	118	-
		25	-	102
		10	107	94
		5	82	77 ± 3 (n=9)
		2.5	72	59
		1	-	43, 33

雌無胸腺マウスに H1975 細胞及び A431 細胞、雌 SCID マウスに PC9 細胞懸濁液 100 µL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。AZ5104 1 日 1 回 13～14 日間経口投与し、週 2 回以上腫瘍体積を測定した。
AZD9291 は表 8 の値を示した。
n>2 の場合、平均 ± SEM（実験数）を示す。
wt：野生型
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted]の Table 1 から引用）

2.6.2.2.2.4　腫瘍異種移植モデルにおける AZD9291 の EGFR シグナル伝達系に及ぼす影響（試験 Pharmacology Report [redacted]）

マウス（6 週齢以上の雌無胸腺又は雌 SCID）の皮下に移植した異種移植腫瘍が所定のサイズ（H1975 で約 0.5 cm^3、PC9 で約 0.8 cm^3）に達した後、マウスを各投与群に無作為に割り付け、媒体（1%ポリソルベート 80）又は AZD9291 を単回経口投与した。投与後の既定の時点で腫瘍を摘出し半分に切り、一方は FastPrep チューブに入れ、速やかに液体窒素にて凍結し、ELISA 分析用として-80°C にて保存した。他方は 10%緩衝ホルマリンにて固定し、切除から 24～48 時間以内に免疫組織化学（IHC）用のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）ブロックにした。

凍結した腫瘍はホスファターゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤を含む細胞溶解緩衝液中で FastPrep 法によりホモジナイズした。総 EGFR 及びリン酸化 EGFR（pEGFR）レベルをそれぞれ異なる ELISA キット（R&D Systems 社の DYC1854 及び DYC1095）で測定した。総 AKT 量は ELISA で測定し、リン酸化 AKT（pAKT）量は、電気化学発光標識抗体で pAKT（Ser473）を捕捉し、それらの量を MSD SECTOR® Imager で測定した。総蛋白に対するリン酸化蛋白の割合を求め、その値を媒体投与群の腫瘍と比較したときの差を百分率（%）で表した。

H1975（L858R/T790M）異種移植モデルにおける AZD9291 単回経口投与後の EGFR 及び下流経路の主要なマーカーである AKT のリン酸化阻害率を表 10、代表的な経時変化を図 13に示す。H1975 異種移植腫瘍において、用量及び時間依存的に EGFR のリン酸化が阻害され、AZD9291 5 mg/kg の単回投与では投与 6 時間後に阻害率が最大となり、1 mg/kg における阻害率はそれより若干低かった。1 及び 5 mg/kg では投与 36 時間後まで約 60%の阻害が持続した。低用量の 0.5 mg/kg では投与 16～24 時間後に阻害率が最大となり、その阻害率は他の用量における最大阻害率より低かった。同様に、H1975 異種移植腫瘍で AKT リン酸化の阻害率が最大となったのは AZD9291 投与 6 時間後で、同じく用量依存的であった（表 10及び図 13）。しかし AKT リン酸化の阻害は EGFR リン酸化阻害より一過性で、5 mg/kg で投与 30～36 時間後、1 及び 0.5 mg/kg で投与 16 時間後にはベースライン値にまで回復した。IHC により評価した ERK リン酸化阻害は投与 6 時間後に最大となり、EGFR リン酸化より早くベースラインレベルに回復した（図 14）。

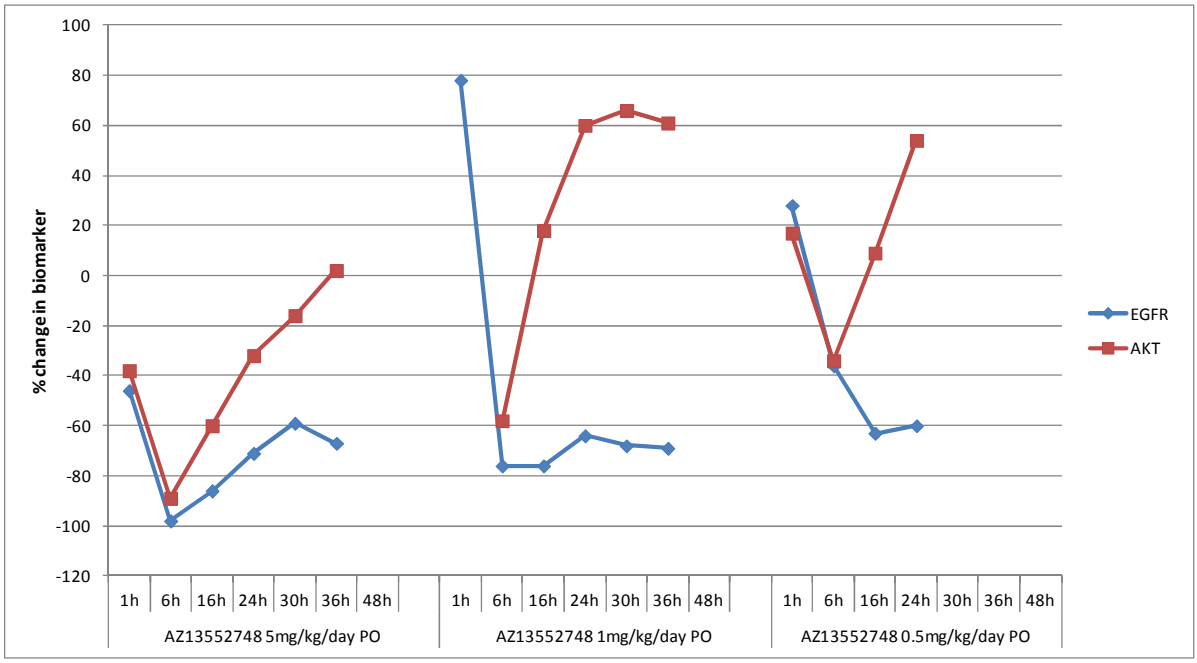
AZD9291 の 5 mg/kg 単回投与後、EGFR リン酸化レベルがベースラインレベルに回復するまで 72 時間かかったが、血漿中濃度が測定可能であったのは約 12 時間後までであり、これは AZD9291 が不可逆的に結合し、pEGFR の再合成速度が緩やかであることを反映している。阻害動態が不可逆的であるため薬物動態/薬力学（PK/PD）関係を示すのは困難であり，単純な相関関係として表すことができなかった。

表 10　H1975 異種移植モデルにおける AZD9291 単回経口投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用

用量 (mg/kg)	マーカー	投与後の経過時間 0.5 h	1 h	2 h	6 h	16 h	24 h	36 h	48 h	72 h
5	pEGFR	-30, 13	46, 54	51, 70	91± 3 (n=5)	84, 86	78± 5 (n=4)	45± 20 n=3	31± 9 n=3	18± 2 (n=3)
	pAKT	-9, 12	38, 32	76, 86	81± 6 (n=4)	60, 61	47± 8 (n=3)	-2, 23	0, 29	-14± 12 (n=3)
1	pEGFR	ND	-8 (n=1)	ND	76, 86	76 (n=1)	64, 74	69 (n=1)	ND	ND
	pAKT	ND	ND	ND	58, 91	-18 (n=1)	-60, 17	-62 (n=1)	ND	ND
0.5	pEGFR	ND	28 (n=1)	ND	36, 78	63 (n=1)	60, 56	ND	ND	ND
	pAKT	ND	-17 (n=1)	ND	34, 54	-9 (n=1)	-54, 24	ND	ND	ND

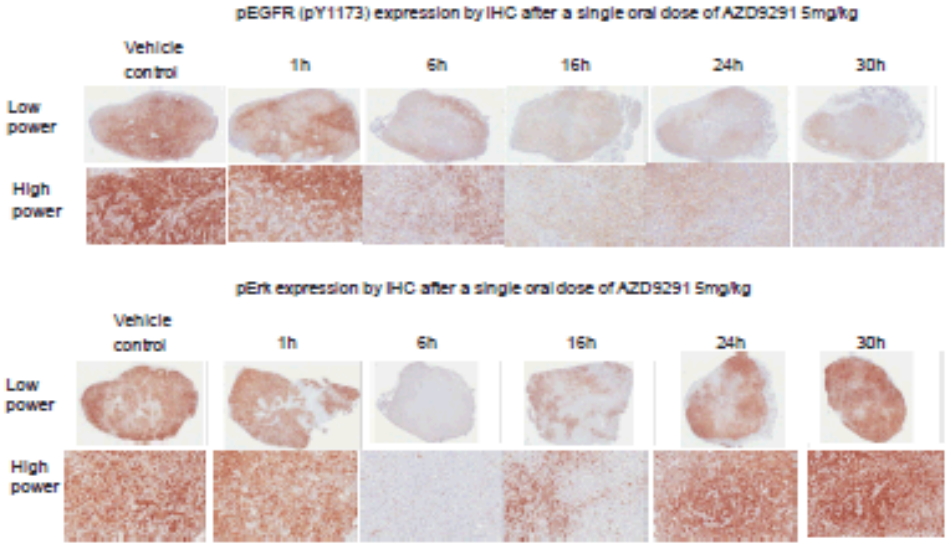
雌無胸腺マウスに H1975 細胞懸濁液 100 µL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。
AZD9291 を単回経口投与した後、既定の時点で腫瘍を摘出しリン酸化 EGFR 及びリン酸化 AKT を測定した。
n>2 の場合、阻害率 ± SEM を示す。
h：時間
ND = 測定せず
阻害率（%）は、リン酸化蛋白／総蛋白を 6 時間後の媒体投与群と比較して算出した。
マイナスの阻害率は、対照値を超える増加を示す。
n は独立した実験数を表す。
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Table 1 から引用）

図 13　　H1975 異種移植モデルにおける AZD9291（AZ13552748）投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用の経時変化（代表例）



雌無胸腺マウスに H1975 細胞懸濁液 100 μL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。
AZD9291 を単回経口投与した後、既定の時点で腫瘍を摘出しリン酸化 EGFR 及び AKT を ELISA で測定した。
% change in biomarker：バイオマーカーの変化率、h：時間、mg/kg/day：mg/kg/日、PO：経口投与
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 1 から引用）

図 14　　H1975 異種移植モデルにおける AZD9291（5 mg/kg）単回経口投与後の pERK 及び pEGFR の IHC 評価



無胸腺マウスに H1975 細胞懸濁液 100 µL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。AZD9291 を単回経口投与した後、既定の時点で腫瘍を摘出してホルマリン固定し、リン酸化 EGFR 及びリン酸化 ERK を免疫組織化学で評価した。
pErk expression by IHC after a single oral dose of AZD9291 5 mg/kg：5 mg/kg の AZD9291 単回経口投与後の pERK 発現の IHC 結果、pEGFR (pY1173) expression by IHC after a single oral dose of AZD9291 5 mg/kg：5 mg/kg の AZD9291 単回経口投与後の pEGFR（pY1173）発現の IHC 結果、low power：低倍率、high power：高倍率、vehicle control：媒体対照（1%ポリソルベート 80）、h：時間
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 4 から引用）

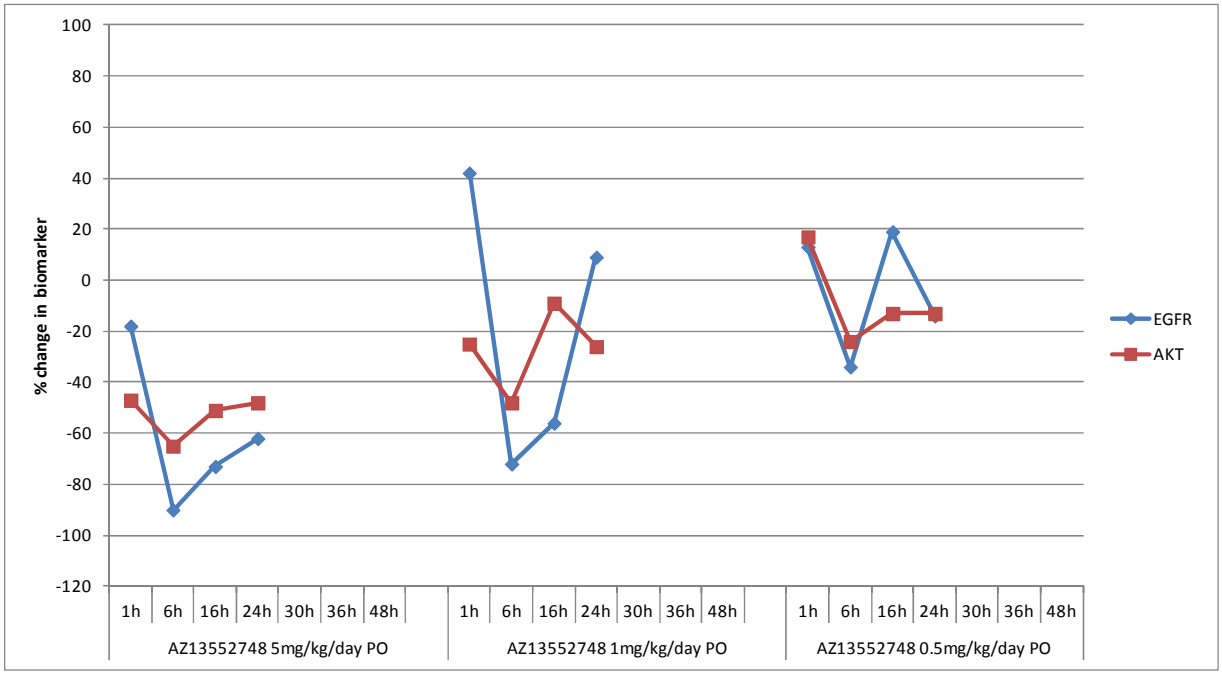
H1975 モデルと同様に、PC9 異種移植モデルにおいても、AZD9291 単回投与 6 時間後に EGFR 及び AKT のリン酸化阻害率がともに最大となった（表 11及び図 15）。これらの作用は用量依存的で、5 mg/kg における阻害率が最も高かった。5 mg/kg では 36 時間後においても 60%を超える EGFR リン酸化阻害が認められたが、低用量における阻害作用は一過性で、16～24 時間後までにはベースラインレベルに回復した。pAKT は AZD9291 が 5 mg/kg の場合は 30 時間以上経ってベースラインレベルに回復したが、低用量では 16 時間後にベースラインレベルに回復した（表 11）。

表 11　PC9 異種移植モデルにおける AZD9291 単回経口投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用

用量	マーカー	投与後の経過時間						
（mg/kg）		0.5 h	1 h	6 h	16 h	24 h	30 h	36 h
5	pEGFR	-16 (n=1)	18, 47	90, 94	73, 89	62 (n=1)	72 (n=1)	72 (n=1)
	pAKT	19 (n=1)	34, 47	65, 60	47, 51	48 (n=1)	21 (n=1)	24 (n=1)
1	pEGFR	ND	-42 (n=1)	72 (n=1)	56 (n=1)	-9 (n=1)	ND	ND
	pAKT	ND	25 (n=1)	48 (n=1)	9 (n=1)	26 (n=1)	ND	ND
0.5	pEGFR	ND	-13 (n=1)	34 (n=1)	-19 (n=1)	14 (n=1)	ND	ND
	pAKT	ND	-17 (n=1)	24 (n=1)	13 (n=1)	13 (n=1)	ND	ND

雌 SCID マウスに PC9 細胞懸濁液 100 µL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。
AZD9291 を単回経口投与した後、既定の時点で腫瘍を摘出しリン酸化 EGFR 及びリン酸化 AKT を ELISA で測定した。
h：時間
ND = 測定せず。
阻害率（%）は、リン酸化蛋白／総蛋白を 6 時間後の媒体投与群と比較して算出した。
マイナスの阻害率は、対照値を超える増加を示す。
n は独立した実験数を表す。
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted]の Table 2 より抜粋）

図 15　　PC9 異種移植モデルにおける AZD9291（AZ13552748）投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用の経時変化（代表例）



雌 SCID マウスに PC9 細胞懸濁液 100 µL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。
AZD9291 を単回経口投与した後、既定の時点で腫瘍を摘出しリン酸化 EGFR 及びリン酸化 AKT を ELISA で測定した。
% change in biomarker：バイオマーカーの変化率、h：時間、mg/kg/day：mg/kg/日、PO：経口投与
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 2 から引用）

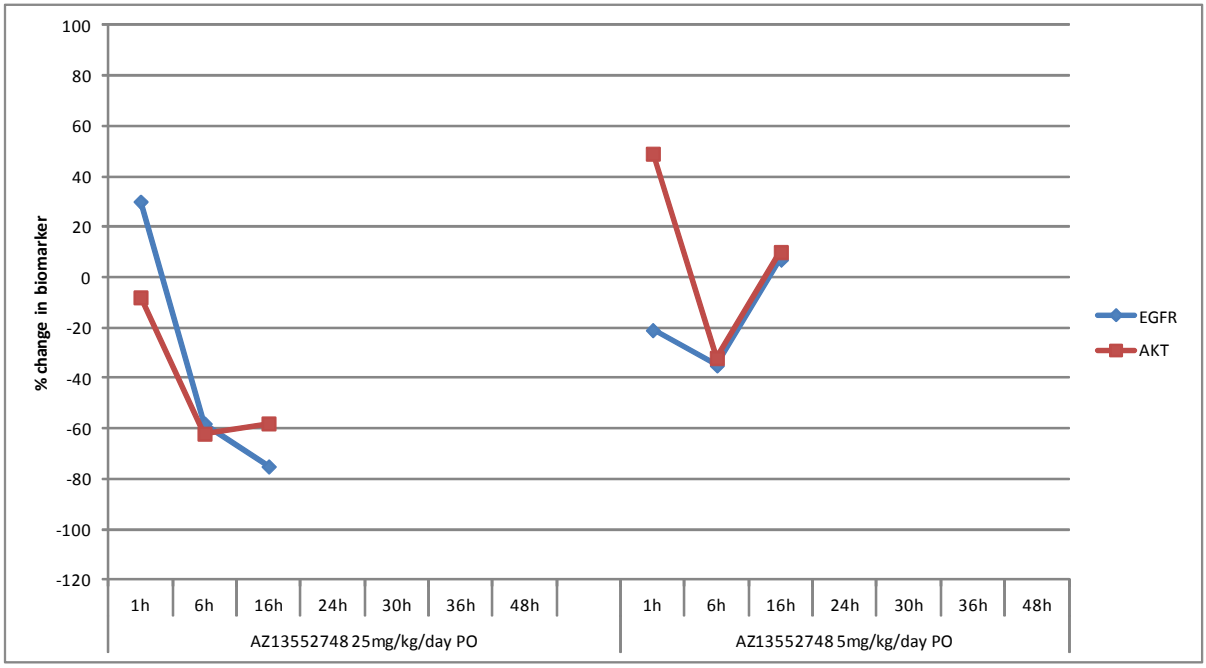
例数の少ないデータではあるが、野生型 EGFR を発現する A431 異種移植モデルでは、変異型 EGFR モデルで強い作用が認められた AZD9291 の 5 mg/kg の用量において、EGFR 又は AKT のリン酸化に対する阻害作用は認められなかった（表 12及び図 16）。EGFR 及び AKT のリン酸化に対していずれも 60%を超える阻害率を得るには、25 mg/kg の AZD9291 を投与する必要があった（表 12）。これらのデータから、AZD9291 は野生型 EGFR よりも EGFRm 又は EGFRm/T790M 変異を有する EGFR に対する作用の方が強いということが更に裏付けられた。

表 12　A431 異種移植モデルにおける AZD9291 単回経口投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用

用量（mg/kg）	マーカー	投与後の経過時間		
		1 h	6 h	16 h
25	pEGFR	-30	58	75
	pAKT	8	62	58
5	pEGFR	21	35	-7
	pAKT	-49	32	-10

雌無胸腺マウスに A431 細胞懸濁液 100 µL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。
AZD9291 を単回経口投与した後、既定の時点で腫瘍を摘出しリン酸化 EGFR 及び AKT を ELISA で測定した。
h：時間
阻害率（%）は、リン酸化蛋白／総蛋白を 6 時間後の媒体投与群と比較して算出した。
マイナスの阻害率は、対照値を超える増加を示す。
n=1（独立した実験数を表す）
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Table 3 から引用）

図 16　A431 異種移植モデルにおける AZD9291（AZ13552748）投与後の EGFR 及び AKT のリン酸化阻害作用の経時変化（代表例）



雌無胸腺マウスに A431 細胞懸濁液 100 µL を左背側皮下に移植し、異種移植腫瘍モデルを作製した。
AZD9291 を単回経口投与した後、既定の時点で腫瘍を摘出しリン酸化 EGFR 及び AKT を ELISA で測定した。
% change in biomarker：バイオマーカーの変化率、h：時間、mg/kg/day：mg/kg/日、PO：経口投与
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 3 から引用）

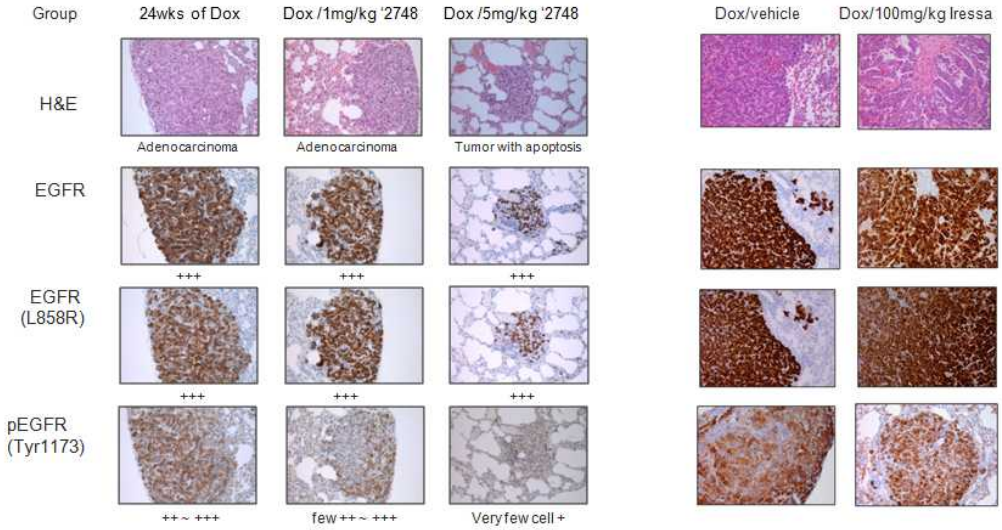
2.6.2.2.2.5　EGFRm/T790M 変異を有するトランスジェニックマウスモデルにおける AZD9291 の抗腫瘍作用（試験 Pharmacology Report [redacted]）

EGFRm/T790M 変異を有する腫瘍における AZD9291 の有効性を更に調べるため、ドキシサイクリン投与により肺に L858R/T790M 変異型 EGFR 発現腫瘍を自然発生させた同所誘導性トランスジェニックマウス腫瘍モデルでの試験を行った。トランスジェニックモデルを作製するにあたり、Tet-op-EGFR（L858R/T790M）発現ベクターを FVB/N マウスの胚盤胞に注入し、PCR による尾の DNA の遺伝子型解析により遺伝子導入された子孫を特定した。次に CCSP-rtTA マウスを L858R/T790M 変異型 EGFR のファウンダー系統と交配し、尾の DNA で遺伝子型を確認して誘導性腫瘍モデルを作製した。

トランスジェニックマウスを 16 週間以上混餌投与でドキシサイクリンに連続曝露させた後、各投与群に無作為に割り付けた。AZD9291（媒体：1%ポリソルベート 80）の 1 mg/kg 又は 5 mg/kg を 4 週間にわたって反復経口投与し、超高用量（100 mg/kg/日）のゲフィチニブ（イレッサ、媒体：1%ポリソルベート 80）と比較することにより本試験モデルの反応特異性を検討した。全マウスを安楽死させ、肺及び皮膚を 10%ホルマリンで固定してパラフィン包埋し、組織切片を HE 染色及び免疫組織化学染色した。全投与群とも対照には同腹仔を使用した。

図 17に示すように、トランスジェニックマウスに AZD9291 の 5 mg/kg を投与したところ、腫瘍の pEGFR レベルが低下し、それに伴って腫瘍増殖が明らかに抑制された。AZD9291 の 1 mg/kg では腫瘍増殖及び EGFR のリン酸化に対し弱い阻害作用を示した。これとは対照的に、ゲフィチニブは、先に実施した別試験において高用量でも腫瘍増殖を抑制しなかった。これらのデータから、AZD9291 が遺伝子組換えで発生した腫瘍増殖を抑制することが示された。これは既に示した異種移植モデルにおける有効性とも一致しており、また、外部のグループが実施したトランスジェニック動物を用いた別の試験によっても更に裏付けられている（Cross et al 2014）。

図 17　　L858R/T790M 変異型 EGFR 発現トランスジェニックマウスにおける AZD9291（AZ13552748）の腫瘍増殖抑制作用

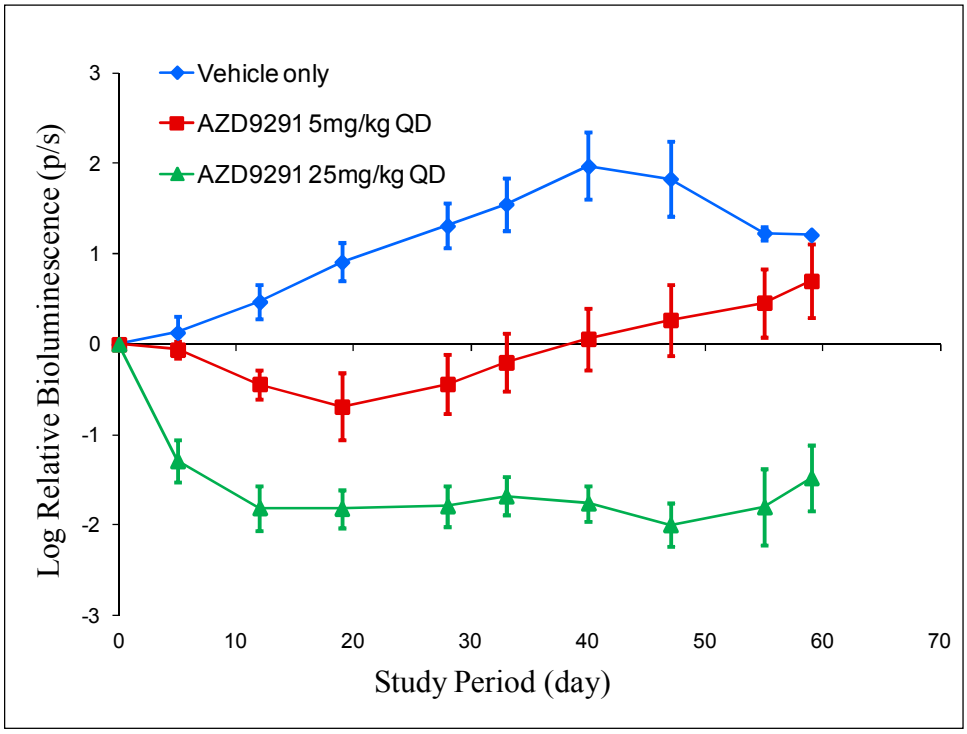


L858R/T790M 変異トランスジェニックに 16 週間以上ドキシサイクリンを混餌投与した後、AZD9291 の 1 mg/kg/日又は 5 mg/kg/日を 4 週間反復経口投与した。ゲフィチニブは 100 mg/kg/日を経口投与した。投与後、肺及び皮膚を 10%ホルマリンで固定後パラフィン包埋し、組織切片を HE 染色及び免疫組織化学染色した。
group：群、24wks of Dox：ドキシサイクリンを 24 週間投与、Dox：ドキシサイクリン、'2748：AZD9291、vehicle：媒体、Iressa：イレッサ、H&E：ヘマトキシリン・エオジン染色、adenocarcinoma：腺癌、tumor with apoptosis：アポトーシスが認められる腫瘍、few：少数、very few cell：ごく少数の細胞
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 1 から引用）

2.6.2.2.2.6　EGFRm 腫瘍脳転移モデルにおける AZD9291 の抗腫瘍作用（試験 Pharmacology Report [redacted]）

脳に転移した EGFRm 腫瘍に対して AZD9291 が有効性を示すかどうかを、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した PC9 細胞株を内頸動脈から注入して作製した脳腫瘍モデルで検討した。動物は 6～8 週齢の無胸腺マウスを用いた。図 18に示すように、AZD9291（媒体：1%ポリソルベート 80）の 25 mg/kg/日により、脳内の PC9（Ex19del）腫瘍が顕著かつ持続的に退縮し、明らかな体重減少を伴うことなく、60 日目の試験終了日まで退縮が持続した。低用量の 5 mg/kg/日でも明らかな退縮が認められたが、一過性であったことから、脳内腫瘍に対して持続的な退縮を得るためには、頭蓋外腫瘍退縮時の曝露量よりも高い曝露量が必要であることが示唆された。これらの試験成績から、AZD9291 は脳に転移した EGFRm 腫瘍に対して抗腫瘍作用を示すと考えられる。

図 18　　雌無胸腺マウスの PC9－ルシフェラーゼ脳転移モデルにおける AZD9291 の腫瘍増殖抑制作用



ルシフェラーゼを導入した PC9 細胞株を内頸動脈から注入し、生物発光強度が 10^7 になった時点から媒体及び AZD9291 を 1 日 1 回経口投与した。
各点は群平均 ± SEM を示す（n=8～9）。
log relative bioluminescence：相対生物発光強度の対数、study period (day)：試験開始後の経過日数（日）、
vehicle only：媒体（1%ポリソルベート 80）のみ、QD：1 日 1 回
（出典：試験 Pharmacology Report [redacted] の Figure 4 から引用）

2.6.2.3　副次的薬理試験

AZD9291 とその 2 つの代謝物 AZ5104 及び AZ7550 の薬理学的プロファイルを検討するため、様々な受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び酵素を網羅する標的分子パネルを用いて、*in vitro* 放射性リガンド結合試験、酵素活性及び機能試験を実施した。創薬段階において、これらの 3 種類の化合物は、最初に 97 種類の標的分子からなる副次的薬理標的分子パネルで評価した（試験 1112SY、1120SY 及び 1121SY［いずれも参考資料］）。続いて、これらの化合物を拡大パネルで評価した（AZD9291 は 181 種類、代謝物は 189 種類の標的分子に対してスクリーニングした；試験 3129SV、3285SV 及び 3284SV）。後者の試験で得られたデータセットは、現在の基準に従って得られた総合的なものであることから、最も重要と考え、以下に試験成績を示した。また、*in vitro* 電気生理学試験で 8 種類の心筋イオンチャネルに対する AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の作用も評価した（2.6.2.4.3.1項及び2.6.2.4.3.2項参照）。

AZD9291 は 88 種類、AZ5104 は 82 種類、AZ7550 は 90 種類の標的分子に対して IC_{50} 又は K_i 値を算出するのに十分な活性を示した（野生型 EGFR を含む）。表 13に主標的に対する IC_{50} 値と

比較した選択性が 100 倍以内の標的分子を示す（単離した変異型 EGFR に対する AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の IC_{50} 値は、表 1で示したデータを算出する際に使用した 1 試験のデータである）。AZ5104 及び AZ7550 の副次的薬理プロファイルは質的に AZD9291 に類似していた。

表 13　放射性リガンド結合、酵素活性及び機能試験における AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の作用：IC_{50} 値又は K_i 値（μM）が主標的に対する IC_{50} 値の 100 倍以内の標的分子について記載

標的分子 [a]	AZD9291	AZ5104	AZ7550	薬理作用機序
EGFR チロシンキナーゼ	0.014	<0.01	0.057	インヒビター
5-HT_{2C} 受容体	0.018	0.014	0.098	アンタゴニスト
ウロテンシン UT_2 受容体	0.22	[b]	1.4	アンタゴニスト
5-HT_{1D} 受容体（ラット）	0.23	0.14	1.7	AZD9291=パーシャルアゴニスト, AZ5104=アゴニスト, AZ7550=アンタゴニスト
ドーパミン D_2 受容体	0.26	[b]	0.091	AZD9291=アゴニスト, AZ7550=ND[c]
アドレナリン α_{1B} 受容体	0.36	0.085	0.21	アンタゴニスト
アドレナリン α_{1D} 受容体	0.27	0.072	0.30	ND
アドレナリン α_{2C} 受容体	0.38	[b]	0.83	アゴニスト
5-HT_{2B} 受容体	0.39	0.24	0.92	アンタゴニスト
15-リポキシゲナーゼ	0.40	[b]	0.47	インヒビター
5-HT_7 受容体	0.52	[b]	0.26	アンタゴニスト
PDGFβ受容体キナーゼ	0.54	[b]	0.51	インヒビター
ドーパミン D_1 受容体	0.54	0.21	1.6	アンタゴニスト
5-HT_{2A} 受容体	0.68	0.13	2.9	アンタゴニスト
α_{1A} アドレナリン受容体	0.78	[b]	2.8	アンタゴニスト
KDR キナーゼ	0.81	0.30	0.81	インヒビター
5-HT_{1A} 受容体	0.83	[b]	0.38	AZD9291=ND、AZ7550=アゴニスト
ソマトスタチン sst_4 受容体	0.83	[b]	1.3	AZD9291=パーシャルアゴニスト, AZ7550=ND
5-HT_{1B} 受容体（ラット：結合/ハムスター：機能）	0.98	[b]	1.6	アンタゴニスト
インスリン受容体キナーゼ	1.2	0.11	0.73	インヒビター
タキキニン NK_2 受容体	1.2	[b]	2.8	アンタゴニスト
アデノシントランスポーター（モルモット）	[b]	0.041	5.5	ND
c-kit キナーゼ	[b]	0.55	0.54	インヒビター
メラノコルチン MC_5 受容体	[b]	ND	0.4	アンタゴニスト
ドーパミン D_3 受容体	[b]	[b]	0.83	アゴニスト
オピオイド μ 受容体	[b]	[b]	1.2	アゴニスト
プロスタノイド EP_2 受容体	[b]	[b]	1.7	アンタゴニスト
SRC キナーゼ	[b]	[b]	2.4	インヒビター
ホスホジエステラーゼ $PDE10_{A1}$	[b]	[b]	2.4	インヒビター
5-リポキシゲナーゼ	[b]	[b]	2.6	インヒビター

表 13　放射性リガンド結合、酵素活性及び機能試験における AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の作用：IC_{50} 値又は K_i 値（μM）が主標的に対する IC_{50} 値の 100 倍以内の標的分子について記載

標的分子 [a]	AZD9291	AZ5104	AZ7550	薬理作用機序
タキキニン NK_1 受容体	[b]	[b]	2.8	アンタゴニスト
ムスカリン M_1 受容体	[b]	[b]	2.9	アンタゴニスト
ニューロトロフィン受容体キナーゼ 1	ND	[b]	3.1	インヒビター
オピオイドκ受容体（ラット）	[b]	[b]	3.3	アンタゴニスト
ムスカリン M_3 受容体	[b]	[b]	3.7	アンタゴニスト
ムスカリン M_5 受容体	[b]	[b]	4.4	ND
グレリン受容体	[b]	[b]	4.6	アンタゴニスト
5-HT_{5A} 受容体	[b]	[b]	4.6	ND
輸送体蛋白質（18kDa）（ラット）	[b]	[b]	4.7	ND
オピオイドδ受容体	[b]	[b]	4.8	ND

a　別途示す場合を除き、ヒト由来
b　主標的（変異型 EGFR、表 1）との選択性が 100 倍を超える
c　ND：測定せず

2.6.2.4　安全性薬理試験

AZD9291 の心血管系、消化管系、呼吸系及び中枢神経系に対する影響を、安全性薬理に関する ICH ガイドライン（ICH S7A及びICH S7B）に従い、一連の安全性薬理試験で評価した。*In vitro* hERG アッセイ、呼吸系、消化管系及び中枢神経系への影響を評価したラット *in vivo* 試験（これらの 3 臓器系は 1 つのラット試験で評価した）、並びに心血管系への影響を評価したイヌ *in vivo* 試験では、GLP を遵守した。反復投与毒性試験（毒性試験の概要文 2.6.6.3.1 項及び 2.6.6.3.2 項参照）で角膜に病理組織学的所見がみられたことから、視覚系に対する影響もラットで評価した（この評価は GLP 非適用下で実施した）。創薬段階でラット及びモルモットを用いて心血管系への影響を評価した別の *in vivo* 試験、並びに他の心筋イオンチャネルに対する影響を評価した *in vitro* 試験は GLP 非適用下で実施した。全試験で AZD9291 のフリー体を使用したが、例外として、GLP 適用の hERG アッセイでは AZD9291 メシル酸塩（臨床製剤での塩）を使用した。全ての安全性薬理試験を薬理試験一覧表に示し、その結果を安全性薬理試験概要表に要約した（薬理試験概要表 2.6.3.1 項及び 2.6.3.4 項参照）。

呼吸系、消化管系、視覚系及び中枢神経系に対する影響は、ラットの 14 日間用量設定試験（試験 3310DR；毒性試験の概要文 2.6.6.3.1.3 項参照）においても若干評価を行い、顕著な所見について考察している（2.6.2.6.3項参照）。

AZD9291 の *in vitro* 代謝を検討したところ、ヒト肝細胞中に確認された代謝物はいずれもラット及び／又はイヌの肝細胞中にも存在したことから、GLP 適用安全性薬理試験に用いる動物種としてラット及びイヌを選択することの妥当性が裏付けられた（薬物動態試験の概要文 2.6.4.5.1 項参照）。ラット及びイヌにおける GLP 適用 *in vivo* 安全性薬理試験で、AZD9291 の経口投与によ

り代謝物 AZ5104 及び AZ7550 の存在を確認した。イヌ心血管系試験では、両代謝物の血漿中濃度を定量した。呼吸系、消化管系、視覚系及び中枢神経系に対する影響を評価したラットの試験では、AZ7550 の血漿中濃度は定量できたが、AZ5104 の血漿中濃度は、分析上の問題により定量できなかった（薬物動態試験の概要文 2.6.4.2.1 項参照）。AZ5104 及び AZ7550 の心筋イオンチャネルに対する影響を *in vitro* で評価した。

GLP 適用 *in vivo* 安全性薬理試験における AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 の血漿中濃度の測定結果を以下の試験概要に示した（2.6.2.4.3.3項参照、表 14）。しかし、これらの血漿試料は分析まで様々な期間にわたり凍結保存されており、その後の試験で、これら 3 化合物の血漿中における凍結保存安定性を評価したところ、凍結保存後に測定された血漿中濃度は試料採取時よりも低い傾向が認められた（AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 でそれぞれ最大約-23%、-52%及び-21%；薬物動態試験の概要文 2.6.4.2.1 項参照）。したがって、これらの動物における AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 の曝露量は過小評価されている可能性があるものの、本データを使用したヒトでのリスク評価に影響することはないと考えられる。

2.6.2.4.1 中枢神経系（試験 3464SR）

覚醒雄性ラット（8～9 週齢 Wistar 系、n=6/群）に媒体（0.5% HPMC）又は AZD9291 の 10、40 及び 100 mg/kg を単回経口投与したときの自律神経、神経筋、感覚運動、行動パラメータ、瞳孔径、体温及び体重に対する影響を、Irwin 変法により、投与 24 時間後までの様々な時点で評価した。

AZD9291 の 10、40 及び 100 mg/kg 投与 4 時間 20 分後における総血漿中濃度の群平均は、AZD9291 がそれぞれ 0.266、0.557 及び 0.876 µM、AZ7550 がそれぞれ 0.033、0.079 及び 0.111 µM であった。AZD9291 を投与した全ての動物が AZ5104 に曝露されていたが、本代謝物を定量することはできなかった。

AZD9291 の 40 及び 100 mg/kg では、投与 24 時間後に体重のわずかな減少が認められたが（100 mg/kg 群の平均減少率は 2%）、これらの変化は、他の試験において本薬でみられた消化管系への影響に関連するものと考えられる（2.6.2.6.3項参照）。Irwin 試験において、その他の影響はみられなかったことから、中枢神経系に対する無影響量は 100 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.2 視覚系（試験 3464SR）

反復投与毒性試験において AZD9291 投与に伴う眼の病理組織学的所見（角膜上皮萎縮）が認められ、野生型 EGFR 阻害によるものと考えられたため（毒性試験の概要文 2.6.6.10 項参照）、本試験において視覚系に対する影響を更に検討した。

雄性ラット（8～9 週齢 Wistar 系、n=6/群）に媒体（0.5% HPMC）又は AZD9291 の 10、40 及び 100 mg/kg を単回経口投与したときの視力及び行動に対する影響を、OptoMotry 法により評価した（Redfern et al 2011に記載の方法で実施）。これらの評価は、Irwin 変法を用いた試験の一部として、投与約 4 時間 20 分後のトキシコキネティクス用血液採取終了後に実施した（2.6.2.4.1項参照）。

AZD9291 の投与に関連した視力及び行動の変化はみられなかったことから、無影響量は 100 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.3 心血管系

2.6.2.4.3.1 チャイニーズハムスター卵巣細胞に発現させたヒト hERG カリウムチャネルに対する *in vitro* での影響（試験 VKS0795（0403SZ））

チャイニーズハムスター卵巣細胞に発現させた hERG カリウムチャネルに対する AZD9291 の影響を、パッチクランプ法により、0.135～1.98 μM の濃度範囲で検討した。媒体は 0.1% DMSO を用いた。

AZD9291 は hERG カリウムチャネルを阻害し、その IC_{50} 値は 0.69 μM であった（n=4）。

2.6.2.4.3.2 その他の心筋イオンチャネルに対する影響（試験 1112SY［参考資料］、3535SV、1120SY［参考資料］、3473SV、1121SY［参考資料］及び 3472SV）

AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の 8 種類の遺伝子組換えヒト電位依存性心筋イオンチャネル（括弧内は各チャネルが誘導する電流）$hK_v11.1$（hERG；IKr）、$hNa_v1.5$（INa）、$hK_v4.3$/hKChIP2.2（I_{to}）、hK_vLQT1/hmink（hIKs）、$hCa_v1.2/\beta2/\alpha2\delta$（$ICa_L$）、$hK_v1.5$（$IK_{UR}$）、$hCa_v3.2$（$ICa_T$）及び $hHCN_4$（I_F）に対する影響を、電気生理学的試験により検討した。各化合物は最大 33～100 μM の濃度まで検討した。

AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 は一部の心筋イオンチャネルに阻害作用を示したが、IC_{50} 値を算出できるほどの阻害作用は AZD9291 及び AZ5104 の hERG（IC_{50} 値はそれぞれ 16.22 μM 及び 17.48 μM）並びに AZ5104 及び AZ7550 の $hCa_v3.2$（IC_{50} 値はそれぞれ 37.5 μM 及び 31.9 μM）に対してのみにみられた。当試験は GLP 非適用であるため、AZD9291 の hERG に対するデータは、後に実施した GLP 適用の hERG アッセイのデータ（2.6.2.4.3.1項参照）を使用した。

2.6.2.4.3.3 イヌの心血管系への影響（試験 1352ZD）

テレメトリー装着覚醒雄性イヌ（ビーグル犬、n=4）において、媒体（0.5% HPMC）又は AZD9291 の 6、20 及び 60 mg/kg の単回経口投与前から投与 20 時間後まで、動脈圧、心拍数、左室圧、第 II 誘導心電図（PR、QT、QTcR 間隔、QRS 時間及び心電図（ECG）波形）及び体温に対する影響を評価した。

AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の投与 4 時間後の総血漿中濃度の群平均を表 14に示す。

表 14　投与 4 時間後の総血漿中濃度の群平均

用量 (mg/kg)	AZD9291 (μM)	AZ5104 (μM)	AZ7550 (μM)
6	0.516	0.0150	0.0713
20	1.71	0.0429	0.216
60	2.51	0.0442	0.266

AZD9291（6、20 及び 60 mg/kg）の投与後に、同時間の媒体対照データと比較して、QTcR 間隔のわずかな延長（最大 7%）及び心拍数の軽度低下（最大 20%）がみられたが、一過性で用量

との相関性がなく生物学的意義は限定的と考えられた。その他の ECG パラメータ、血圧、左室パラメータ及び体温に対して生物学的意義のある影響はみられなかった。

2.6.2.4.3.4 ラットの心血管系への影響（試験 PH/E/14191）

テレメトリー装着覚醒雄性ラット（Wistar 系、n=4/群）において、AZD9291 の 20、50 及び 100 mg/kg を単回経口投与したときの血圧、心拍数及び行動に対する影響を検討した。本試験では、AZD9291 及びその代謝物の曝露量は測定しなかった。

50 及び 100 mg/kg の投与によって収縮期血圧及び拡張期血圧が上昇した。100 mg/kg では媒体（HPMC/ポリソルベート 80）より最大 15 mmHg 上昇し、その程度及び持続時間は用量依存的であった。50 mg/kg の場合、これらの変化は投与 24 時間後までに回復した。無影響量は 20 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.3.5 麻酔モルモットの心血管系への影響（試験 0264SG）

麻酔雄性モルモット（体重約 500 g の Hartley 系、n=6/群）において、媒体（40% DMA/20% TEG in 75% HP-β-CD）又は AZD9291 の 5 及び 40 mg/kg を静脈内に注入し、動脈圧、心拍数、心電図（PR、QT、QTcB 間隔及び QRS 時間）及び左室圧に対する影響を検討した。静脈内注入は 15 分間行い、注入後 30 分間モニタリングを行った。

AZD9291 の 5 及び 40 mg/kg 注入後の最高総血漿中濃度の群平均は、それぞれ 4.76 及び 22.87 μM であった。本試験では、代謝物の曝露量は測定しなかった。

AZD9291 の 40 mg/kg 注入によって心拍数及び+ve dP/dt_{max}（心収縮性の指標）の軽度低下（それぞれ最大 7%及び 18%）、並びに左室収縮期圧の上昇、PR 間隔、QTcB 間隔及び QRS 時間の延長（それぞれ最大 10%、7%、7%、26%）が認められた。変化率は媒体で補正し、ベースライン値と比較した変化率の群平均を表す。低用量の 5 mg/kg では化合物に関連した心血管系パラメータの変化はみられなかったことから、無影響量は 5 mg/kg と判断した。

40 mg/kg でみられた変化は、注入後 30 分間に部分的（心拍数、QTcB 間隔及び左室収縮期圧）又は完全な（+ve dP/dt_{max}、PR 間隔及び QRS 時間）回復が認められた。

2.6.2.4.4 呼吸系（試験 3464SR）

雄性ラット（8～9 週齢 Wistar 系、n=8/群）に媒体（0.5% HPMC）又は AZD9291 の 10、40 及び 100 mg/kg を単回経口投与し、全身プレチスモグラフィを使用して、投与 6 時間後までの呼吸数、一回換気量、分時換気量、吸気時間、呼気時間、並びに最大吸気及び呼気流量を評価した。

AZD9291 の 10、40 及び 100 mg/kg 投与 6 時間 20 分後における総血漿中濃度の群平均は、AZD9291 がそれぞれ 0.203、0.579 及び 0.995 μM、AZ7550 がそれぞれ 0.024、0.082 及び 0.127 μM であった。AZD9291 を投与した全ての動物が AZ5104 に曝露されていたが、本代謝物を定量することはできなかった。

6 時間のモニタリング期間中、AZD9291 の呼吸系パラメータに対する顕著な影響は認められず、無影響量は 100 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.5 消化管系（試験 3464SR）

雄性ラット（8～9 週齢 Wistar 系、n=8/群）に媒体（0.5% HPMC）又は AZD9291 の 10、40 及び 100 mg/kg を単回経口投与し、胃排出能及び小腸輸送能に対する影響を炭末輸送試験により評価した。媒体群と AZD9291 群の比較は Wilcoxon Mann Whitney 検定を用いた。

AZD9291 の 10、40 及び 100 mg/kg 投与 4 時間 20 分後における総血漿中濃度の群平均は、AZD9291 がそれぞれ 0.226、0.912 及び 1.47 μM、AZ7550 が 0.028、0.117 及び 0.161 μM であった。AZD9291 を投与した全ての動物が AZ5104 に曝露されていたが、本代謝物を定量することはできなかった。

AZD9291 の全用量で媒体群に比べ、統計学的有意で用量依存的な胃排出能低下がみられた（最大 421%の胃内容重量増加）。また小腸輸送能の低下もみられ（最大 25%）、40 及び 100 mg/kg の用量で有意差が認められた。無影響量の決定には至らなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用の試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

AZD9291 は、T790M 耐性・活性化変異標的型かつ野生型非標的型 EGFR チロシンキナーゼ不可逆的阻害作用を有する経口投与可能な新規 TKI である。AZD9291 は、*in vitro* での変異型 EGFR 発現細胞増殖アッセイ及び細胞の EGFR リン酸化アッセイにおいて強力な作用を示した。更に *in vivo* では、異種移植モデル及びトランスジェニック疾患モデルに AZD9291 を臨床用量に相当する用量で経口投与すると、腫瘍が著しく退縮し、その作用は用量及び時間依存的であった。*In vitro*、*in vivo* 双方の試験から、AZD9291 は野生型より変異型 EGFR チロシンキナーゼに対して強い阻害作用を有することが示された。

AZD9291 には AZ5104 及び AZ7550 の 2 つの活性代謝物が存在することが知られており、ヒトに 80 mg の治療用量を投与したときのそれら代謝物の血漿中曝露量は、循環血中総薬物曝露量の約 10%である（AURA 試験の第 I 相パート及び第 II 相延長コホート、並びに AURA2 試験の成績、臨床薬理試験 2.7.2.3.2.3 項参照）。AZ7550 は AZD9291 と質的に類似した薬効薬理作用を示し、AZ7550 の効力は概して AZD9291 と同程度かそれより弱かった。したがって、臨床において、AZ7550 が AZD9291 の有効性に大きく寄与することはないと考えられる。一方、AZ5104 も AZD9291 と質的に類似した薬効薬理作用を示すが、*in vitro* での変異型 EGFR チロシンキナーゼに対する効力は AZD9291 よりも強かった。更に、AZ5104 は野生型 EGFR チロシンキナーゼに対しても AZD9291 より高い効力を示し、本代謝物の変異型 EGFR チロシンキナーゼへの選択性が AZD9291 より低いことが示唆された。したがって、臨床において、AZ5104 は AZD9291 の有効性及び忍容性のプロファイルに寄与する可能性があるが、その程度は不明である。

2.6.2.6.2 副次的薬理試験

広範なキノームパネルを用いた試験で、AZD9291 の標的外キナーゼに対する作用は弱いことが示された。181 種類の標的分子の副次的薬理スクリーニングにおいて、AZD9291 は 21 種類の標的分子に対して、主標的（変異型 EGFR チロシンキナーゼ）に対する IC_{50} 値の 100 倍以内の活性を示した。2 つの代謝物 AZ5104 及び AZ7550 の標的外プロファイルは、AZD9291 と質的に類似していた。

血漿蛋白結合率のデータがないため、臨床において AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の血漿中フリー体がこれらの副次的薬理標的分子にどの程度影響を及ぼすかを推測することは難しい。

AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 は単離した IGF1R 及び InsR 酵素に対して阻害作用を示したが、細胞での IGF1R のリン酸化に対する阻害作用は極めて弱く、酵素に対する作用は細胞には反映されないことが示された（2.6.2.2.1.3 項参照）。*In vitro* における細胞のデータと一致して、AZD9291（200 mg/kg）をラットに単回経口投与し、投与 24 時間後までの様々な時点で血漿中インスリン及び血糖値を測定したところ、これらのパラメータに明らかな変化は認められなかった（試験 3273KR）。更に、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験においても、血漿中インスリン及び血糖値に対する明らかな作用は認められなかった（毒性試験の概要文 2.6.6.3 項参照）。これらの *in vivo* 試験は、AZD9291 及びその代謝物が IGF1R 及び InsR のいずれに対しても明らかな作用を及ぼさないことを裏付けている。

AZD9291 及びその 2 つの代謝物の副次的薬理プロファイルについては、毒性及び安全性薬理試験における所見、並びに NSCLC 患者を対象とした進行中の臨床試験での忍容性及び曝露量データから十分に精査されている。反復投与毒性試験でみられた主な用量制限毒性は、野生型 EGFR チロシンキナーゼへの作用に一致するものである（毒性試験の概要文 2.6.6.10 項参照）。更に、AZD9291 の臨床での忍容性はこれまでのところ良好であり、主な有害事象も野生型 EGFR チロシンキナーゼへの作用に一致するものである[AURA 試験で 20～240 mg の用量を投与した 253 名の患者の評価に基づく。データカットオフ日は 2014 年 12 月 2 日；臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照]。

2.6.2.6.3 安全性薬理試験

包括的な一連の安全性薬理試験で AZD9291 を評価した。ラット及びイヌでは AZD9291 の活性代謝物 AZ5104 及び AZ7550 が生成するため、*in vivo* 試験ではこれらの代謝物の評価も含まれている。ラット及びイヌの試験最高用量で得られた総血漿中 AZD9291 濃度の群平均（ラット：消化管系、呼吸系、視覚系及び中枢神経系に対する影響を評価した試験における 0.876～1.47 μM、イヌ：心血管系試験における 2.51 μM）は、80 mg の治療用量を投与した患者における C_{max} の平均（0.78 μM）より高かった。代謝物 AZ7550 に関しては、ラット及びイヌの試験最高用量で測定された総血漿中濃度（ラット：0.111～0.161 μM、イヌ：0.266 μM）が、80 mg の用量を投与した患者における C_{max}（0.061 μM）より高かった。代謝物 AZ5104 の曝露量は、分析上の問題により、イヌ心血管系試験以外では定量できず、このイヌ心血管系試験の最高用量における血漿中濃度の群平均（0.0442 μM）は、80 mg の用量を投与した患者における C_{max} の平均（0.080 μM）よりわずかに低かった。

AZD9291 は hERG チャネルを阻害し、その IC_{50} 値は 0.69 μM であった。AZ5104 及び AZ7550 も hERG チャネルを阻害し、その IC_{50} 値はそれぞれ 17.48 μM 及び>33 μM であった（代謝物の評価は GLP 非適用）。イヌテレメトリー試験において、QTcR 間隔のわずかな延長がみられたが、

程度が小さく、一過性であったことから、これらの変化の生物学的意義は限定的と考えられる。試験最高用量（60 mg/kg）における AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 の C_{max} は、ヒトでの 80 mg の用量における C_{max} のそれぞれ約 3 倍、0.6 倍及び 4 倍であった。イヌ 1 カ月間試験（AZD9291 の総 C_{max} が患者に 80 mg の用量を投与したときと同程度になる 20 mg/kg/日までの用量の反復投与）又はイヌ 3 カ月間試験（10 mg/kg/日までの用量の反復投与）において、QTcV 間隔に明らかな影響はみられなかった（毒性試験の概要文 2.6.6.3.2.2 項及び 2.6.6.3.2.3 項参照）。麻酔モルモット試験では、高用量（40 mg/kg 静注）において QTcB 間隔の延長が認められた。Yao らは、同様のモルモットモデルを用い、臨床での QT リスクの可能性を有する化合物を検出するのに適した閾値として QTc 間隔の 5%延長を提案している（Yao et al 2008）。AZD9291 の極めて高い曝露量（総血漿中濃度は 22.87 μM；ヒト C_{max} の 29 倍）でみられた QTcB 間隔の延長の程度（7%）は小さく、低用量の 5 mg/kg（総血漿中濃度は 4.76 μM；ヒト C_{max} の 6 倍）では影響がみられなかったことから、本所見の臨床的意義は小さいと考えられる。

AZ5104 及び AZ7550 は $hCa_v3.2$ チャネルを阻害し、その IC_{50} 値はそれぞれ 37.5 μM 及び 31.9 μM であったが、患者におけるこれら代謝物の血漿中濃度から臨床的意義はないと考えられる。

In vitro 薬理試験において、AZD9291 及び AZ5104 は HER2 阻害作用を有することが示された（表 6参照）。アントラサイクリン系抗がん剤をベースとした治療後にトラスツズマブを投与した一部の乳がん患者において、HER2 阻害に伴って左室駆出率（LVEF）低下リスクが認められている（Ewer and O'Shaughnessy 2007）。しかし、不可逆的阻害剤を含む最近の HER2 に対する低分子阻害剤の解析では、HER2 阻害と LVEF への影響の間に明らかな関連性は認められていない（Ades et al 2014, Ewer et al 2014, Perez et al 2008）。AZD9291 のイヌテレメトリー試験では、化合物に関連した心収縮性に対する影響はみられなかった。麻酔モルモットにおいて高用量（40 mg/kg）を静脈内注入したときにみられた+ve dP/dt_{max}（心収縮性の指標）の軽度低下については、このような軽度の変化が極めて高い曝露量のみでみられ、注入後 30 分間に速やかに回復したことから、臨床的意義は小さいと考えられる。低用量の 5 mg/kg では、化合物に関連した+ve dP/dt_{max} に対する影響はみられなかった。

ラットテレメトリー試験において、AZD9291 を 50 mg/kg 以上の用量で経口投与したとき、用量依存的な血圧の上昇が認められた（無影響量は 20 mg/kg）。当試験では曝露量を測定しなかったが、ラットの用量設定試験からの外挿に基づくと、AZD9291 をラットに 50 mg/kg の用量で投与したときの C_{max}（7 日間ラット試験で 50 mg/kg を単回経口投与したときの C_{max} は約 0.7 μM、3278DR 試験）はヒトでの 80 mg の用量における C_{max}（0.78 μM）と同程度になると推測される。GLP 適用のイヌテレメトリー試験（AZD9291 の C_{max} の群平均は最大 2.51 μM）及びイヌ 1 カ月間試験では、血圧への影響はみられなかった。イヌの 14 日間用量設定試験中に一部の動物で血圧上昇が認められたが、不耐量（≥40 mg/kg）又は忍容性不良（20 mg/kg）の用量に限られており、動物の全身状態が血圧の散発的な変化及びばらつきの一因と考えられた。

GLP 適用のイヌテレメトリー試験、イヌの 1 カ月間及び 3 カ月間試験、及び麻酔モルモット試験において、臨床的に意義があると考えられる他の心血管系パラメータへの明らかな影響はみられなかった。更に、ラット及びイヌを用いた最長 3 カ月間の反復投与毒性試験において、心臓の病理組織学的所見は認められなかった（毒性試験の概要文 2.6.6.3.1 項及び 2.6.6.3.2 項参照）。

AZD9291 は、ラットにおいて、患者に 80 mg の用量を投与したときの C_{max}（0.78 μM）より低い血漿中濃度（≥0.226 μM）で消化管輸送を抑制し、ラットの 14 日間反復投与毒性試験で糞塊排泄量の減少がみられたことと一致していた（3310DR 試験の 60 mg/kg/日における所見；毒性試験の概要文 2.6.6.3.1.3 項参照）。本所見の機序は不明であるが、既承認の他の EGFR-TKI（エルロ

チニブ及びアファチニブ）でもラットでの胃排出能抑制が報告されている（Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004, Afatinib (Tradename Gilotrif) 2013）。ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において、消化管は AZD9291 の標的臓器であることが確認されており、それらの試験でみられた病理組織学的変化（摂餌量減少及び体重減少を伴う萎縮、変性及び／又は炎症性変化）は野生型 EGFR チロシンキナーゼの阻害に起因するものと考えられる（毒性試験の概要文 2.6.6.10 項参照）。

GLP 適用の安全性薬理試験において、ラットに AZD9291 を 100 mg/kg までの用量で単回投与したとき、呼吸系、視覚系及び中枢神経系に対する明らかな影響は認められなかった。ラット 14 日間反復投与毒性試験において（毒性試験の概要文 2.6.6.3.1.3 項参照）、3 日目には視力への影響がみられなかったが、AZD9291 の 9 日間投与後には少数例に軽度の視力低下が認められた（60 mg/kg/日の雄 2/4 例、40 mg/kg/日の雌 1/4 例）。これらの所見は、40 及び 60 mg/kg/日の用量を投与した全例でみられた病理組織学的所見の角膜上皮萎縮と関連していると考えられる。当試験では、AZD9291 の反復投与後に、化合物に関連した中枢神経系及び呼吸系に対する影響は特に認められなかった（60 mg/kg/日までの用量を 9 日間投与）。

以上、AZD9291 は予定適応症に対して許容可能な副次的薬理及び安全性薬理プロファイルを有することが示された。

2.6.2.7 参考文献

ICH S7A

ICH Topic S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals; November 2000.

ICH S7B

ICH Topic S7B: The Nonclinical Evaluation of the Potential for delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals; May 2005.

ICH M3(R2), 2009

ICH M3(R2) Guidance on Nonclincal Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (June 2009).

Ades et al 2014

Ades F, Zardavas D, Pinto AC, Criscitiello C, Aftimos P, Azambuja E. Cardiotoxicity of systemic agents used in breast cancer. The Breast 2014; 23(4): 317-28.

Afatinib (Tradename Gilotrif) 2013

Pharmacology Review section of the FDA Approval Package for afatinib (Gilotrif) NDA 201292. July 2013.

Cross et al 2014

Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S, Eberlein C, Nebhan CA, Spitzler PJ, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. Cancer Discov 2014 Sep;4(9):1046-61. Epub 2014 Jun 3.

Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004

Pharmacology Review section of the FDA Approval Package for erlotinib (Tarceva) NDA 21-743. November 2004.

Ewer et al 2014

Ewer MS, Patel K, O'Brien D, Lorence RM. Cardiac safety of afatinib: review of clinical trial data. J Clin Oncol 2014; 32 (suppl abstr e19037)

Ewer and O'Shaughnessy 2007

Ewer MS and O'Shaughnessy JA. Cardiac toxicity of trastuzumab-related regimens in HER2-overexpressing breast cancer. Clin Breast Cancer 2007;7(8):600-7.

Finlay et al 2014

Finlay MR, Anderton M, Ashton S, Ballard P, Bethel PA, Box MR, et al. Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild-type form of the receptor. J Med Chem 2014 Oct 1. [Epub ahead of print]

Perez et al 2008

Perez EA, Koehler M, Byrne J, Preston AJ, Rappold E, Ewer MS. Cardiac safety of lapatinib: pooled analysis of 3689 patients enrolled in clinical trials. Mayo Clin Proc 2008;83(6):679-86.

Redfern et al 2011

Redfern WS, Storey S, Tse K, Hussain Q, Maung, KP, Valentin JP, et al. Evaluation of a convenient method of assessing rodent visual function in safety pharmacology studies: effects of sodium iodate on visual acuity and retinal morphology in albino and pigmented rats and mice. J Pharmacol Toxicol Methods 2011;63(1):102-14.

Schwartz et al 2014

Schwartz PA, Kuzmic P, Solowiej J, Bergqvist S, Bolanos B, Almaden C, et al. Covalent EGFR inhibitor analysis reveals importance of reversible interactions to potency and mechanisms of drug resistance. PNAS 2014: 111(1):173-8.

Yao et al 2008

Yao X, Anderson DL, Ross SA, Lang DG, Desai BZ, Cooper DC, et al.　Predicting QT prolongation in humans during early drug development using hERG inhibition and an anaesthetized guinea-pig model. Br J Pharmacol 2008; 154(7): 1446-56.

第 2 部　CTD の概要

一般名：オシメルチニブメシル酸塩

版番号：[redacted]

2.6.3 薬理試験概要表

タグリッソ®錠

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
2.6.3.1　薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 9
2.6.3.3　副次的薬理試験 10
2.6.3.4　安全性薬理試験 12
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 16

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
CHO	Chinese hamster ovary
EGFR	Epidermal growth factor receptor：上皮成長因子受容体
EGFRm	Epidermal Growth Factor Receptor (containing sensitising mutation)：活性型 EGFR 変異陽性、EGFRm 陽性
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2：ヒト上皮成長因子受容体 2（別名 ErbB2）
HER3	Human epidermal growth factor receptor 3：ヒト上皮成長因子受容体 3（別名 ErbB3）
hERG	human ether-a-go-go related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	Concentration required for 50% inhibition：50%阻害濃度
IGF1R	Insulin-like Growth Factor Receptor-1：インスリン様成長因子 1 受容体
i.v.	Intravenous：静脈内
K_i	Inhibition constant：阻害定数
M	male：雄性
NOEL	No-Observed Effect Level：無影響量
QRS	ECG interval measured from the beginning of the Q wave to the end of the S wave：心電図上の Q の始まりから S の終りまでに要する時間
QTcB	Heart rate corrected QT interval using Bazett's formula：Bazett 式により心拍数について補正した QT 間隔
QTcR	Heart rate corrected QT interval on an individual animal using the Ollerstam correction：Ollerstam 式により心拍数について補正した個々の動物の QT 間隔
UK	United Kingdom：英国
US	United States：米国

2.6.3.1　薬理試験：一覧表

Test article: AZD9291 and metabolites, AZ5104 and AZ7550

Type of Study	Test system	Method of administration	Testing facility	Report No. (Sponsor reference No.)	Location in CTD
Primary pharmacodynamics					
***In vitro* studies**					
Enzyme inhibition	Various biochemical and cell assays	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], UK [redacted], Germany [redacted] [redacted], US	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.1
Inhibition of EGFR phosphorylation in cells	Various EGFR cell and recombinant enzyme assays	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.2
	Various EGFR cell phosphorylation assays	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.3
Inhibition of IGF1R and Insulin Receptor	Various biochemical and cell assays	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], UK [redacted], Germany [redacted] [redacted], US	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.1
Inhibition of HER2 (ErbB2) phosphorylation in cells	Various biochemical and cell assays	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], UK [redacted], Germany [redacted] [redacted], US	Pharmacology Reports [redacted]	4.2.1.1.1

Test article: AZD9291 and metabolites, AZ5104 and AZ7550

Type of Study	Test system	Method of administration	Testing facility	Report No. (Sponsor reference No.)	Location in CTD
	HER2 and HER3 cell phosphorylation	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Reports [redacted]	4.2.1.1.4
AZD9291 is an irreversible inhibitor of EGFR	Various EGFR cell phosphorylation assays	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.3
	Recombinant EGFR and Mass Spectrometry	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.5
Inhibition of *in vitro* cellular proliferation	Various EGFR cell proliferation assays	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.6
AZD9291 pharmacological profile provides a differentiated acquired resistance profile compared to currently approved EGFR Tyrosine kinase inhibitors	EGFRm PC9 cell line	*In vitro*	AstraZeneca, UK AstraZeneca, US [redacted], US	Pharmacology Reports [redacted]	4.2.1.1.7
	EGFRm PC9 cell line	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Reports [redacted]	4.2.1.1.8
***In vivo* studies**					
Efficacy of AZD9291 against EGFR-dependent xenografts	Various EGFR xenograft mouse models	Oral, 14-day repeated doses	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.9
AZD9291 treatment causes durable complete macroscopic responses against EGFR-dependent xenografts	PC9 xenograft mouse model	Oral, 160-day repeated doses	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.10
	H3255 xenograft mouse model	Oral, 75-day repeated doses	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.11
	H1975 xenograft mouse model	Oral, 200-day repeated doses	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.12

Test article: AZD9291 and metabolites, AZ5104 and AZ7550

Type of Study	Test system	Method of administration	Testing facility	Report No. (Sponsor reference No.)	Location in CTD
AZ5104, active metabolite of AZD9291, efficacy in xenograft models	Various EGFR xenografts mouse models	Oral, 14-day repeated doses	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.13
Pharmacodynamic data for AZD9291 in xenograft tumor models	Mutant and wild-type EGFR xenografts mouse models	Oral, single dose	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.14
AZD9291 efficacy in a bi-transgenic model of EGFRm/T790M in mice	Transgenic EGFR mouse model	Oral, 4 week-repeated doses after exposure to doxycycline diets for more than 16 weeks	AstraZeneca, China	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.15
AZD9291 efficacy in an EGFRm brain metastasis model *in vivo*	PC9 brain metastasis xenograft mouse model	Oral, 60-day repeated doses	AstraZeneca, China	Pharmacology Report [redacted]	4.2.1.1.16
Secondary pharmacodynamics					
AZD9291: Receptors, ion channels, transporters and enzyme activity (including hERG and other cardiac ion channels)[b]	Various recombinant cell lines	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], Taiwan	1112SY [Reference study]	4.2.1.2.1
AZ5104: Receptors, ion channels, transporters and enzyme activity (including hERG and other cardiac ion channels)[b]	Various recombinant cell lines	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], Taiwan[redacted], France	1120SY [Reference study]	4.2.1.2.2

Test article: AZD9291 and metabolites, AZ5104 and AZ7550

Type of Study	Test system	Method of administration	Testing facility	Report No. (Sponsor reference No.)	Location in CTD
AZ7550: Receptors, ion channels, transporters and enzyme activity (including hERG and other cardiac ion channels)[b]	Various recombinant cell lines	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], Taiwan	1121SY [Reference study]	4.2.1.2.3
AZD9291: Receptors, ion channels, transporters and enzyme activity[b]	Various recombinant cell lines	*In vitro*	[redacted], France	3129SV	4.2.1.2.4
AZ5104: Receptors, ion channels, transporters and enzyme activity[b]	Various recombinant cell lines	*In vitro*	[redacted], France	3285SV	4.2.1.2.5
AZ7550: Receptors, ion channels, transporters and enzyme activity[b]	Various recombinant cell lines	*In vitro*	[redacted], France	3284SV	4.2.1.2.6
Safety pharmacology					
Central nervous system[a,c]	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	AstraZeneca, UK	3464SR	4.2.1.3.1
Visual system[c]	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	AstraZeneca, UK	3464SR	4.2.1.3.1
Cardiovascular system					
Effects on the hERG encoded potassium channel in CHO cells *in vitro*[a]	hERG expressing CHO cells	*In vitro*	[redacted], UK	VKS0795 (0403SZ)	4.2.1.3.2
Effects on other cardiac ion channels	Various recombinant cell lines	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], Taiwan	1112SY [Reference study]	4.2.1.2.1
Selectivity Screening in Cardiac Ion Channel	Various recombinant cell lines	*In vitro*	AstraZeneca, UK	3535SV	4.2.1.3.3

Test article: AZD9291 and metabolites, AZ5104 and AZ7550

Type of Study	Test system	Method of administration	Testing facility	Report No. (Sponsor reference No.)	Location in CTD
Effects on other cardiac ion channels	Various recombinant cell lines	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], Taiwan [redacted], France	1120SY [Reference study]	4.2.1.2.2
Electrophysiological Assays in vitro	Various recombinant cell lines	*In vitro*	AstraZeneca, UK	3473SV	4.2.1.3.4
Effects on other cardiac ion channels	Various recombinant cell lines	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], Taiwan	1121SY [Reference study]	4.2.1.2.3
Selectivity Screening in Cardiac Ion Channel Electrophysiological Assays in vitro	Various recombinant cell lines	*In vitro*	AstraZeneca, UK	3472SV	4.2.1.3.5
Cardiovascular effects in dogs [a]	Dog / Beagle	Oral (gavage)	AstraZeneca, UK	1352ZD	4.2.1.3.6
Cardiovascular effects in rats	Rat / Alderley Park Wistar	Oral (gavage)	AstraZeneca, UK	PH/E/14191	4.2.1.3.7
Cardiovascular effects in anaesthetised guinea pigs	Guinea pig / Dunkin Hartley	i.v.	AstraZeneca, UK	0264SG	4.2.1.3.8
Respiratory system[a,c]	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	AstraZeneca, UK	3464SR	4.2.1.3.1
Gastrointestinal system[a,c]	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	AstraZeneca, UK	3464SR	4.2.1.3.1
Pharmacodynamic drug interactions					
No studies conducted	-	-	-	-	-

AZD9291 is referred to red to as AZ13552748 in some of the study reports. The metabolites AZ5104 and AZ7550 are referred to as AZ13575104 and AZ13597550, respectively in the study reports.

a Study claims GLP compliance. All other studies are non-GLP.

b The comprehensive secondary pharmacology studies conducted at [redacted] (Study numbers 3129SV, 3285SV and 3284SV) are considered to be the most relevant data set. The more limited secondary pharmacology studies that were conducted during the discovery phase (Study numbers 1112SY, 1120SY and 1121SY) are included in this submission since these study reports contain the cardiac ion channel data.

c The visual acuity assessments conducted as part of this study do not claim GLP compliance.

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験

AZD9291 に関する効力を裏付ける試験成績は「薬理試験の概要文 2.6.2 項」に要約した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test article: AZD9291 and metabolites, AZ5104 and AZ7550

Assay	Species/ strain	Method of admin-istration	Compound/ Doses	Gender and number per group	Noteworthy findings	Report No.
Radioligand binding, enzyme and electrophysiological assays	97 targets [a]	*In vitro*	AZD9291: 10 µM or concentration-response curves generated	Not applicable	AZD9291 had significant activity (defined as >50 % inhibition) in 15 of the 97 targets. IC_{50} or K_i values were defined for 14 targets.	1112SY [Reference study]
	97 targets [a]	*In vitro*	AZ5104: 10 µM or concentration-response curves generated	Not applicable	AZ5104 had significant activity (defined as >50 % inhibition) at 17 of the 97 targets. IC_{50} or K_i values were defined for 7 targets.	1120SY [Reference study]
	97 targets [a]	*In vitro*	AZ7550: 10 µM or concentration-response curves generated	Not applicable	AZ7550 had significant (defined as > 50% inhibition) activity in 22 of the 97 targets. IC_{50} or K_i values were defined for 6 targets.	1121SY [Reference study]
Selectivity Screening in Radioligand Binding, Enzyme Activity and Functional Assays	181 targets[a]	*In vitro*	AZD9291: 10 µM or concentration-response curves generated	Not applicable	AZD9291 showed activity sufficient to define IC_{50} or K_i values for 88 targets.	3129SV
	189 targets[a]	*In vitro*	AZ5104: 10 µM or concentration-response curves generated	Not applicable	AZ5104 showed activity sufficient to define IC_{50} or K_i values for 82 targets.	3285SV

Test article: AZD9291 and metabolites, AZ5104 and AZ7550

Assay	Species/ strain	Method of admin-istration	Compound/ Doses	Gender and number per group	Noteworthy findings	Report No.
	189 targets[a]	*In vitro*	AZ7550: 10 µM or concentration-response curves generated	Not applicable	AZ7550 showed activity sufficient to define IC_{50} or K_i values for 90 targets.	3284SV

AZD9291 is also referred to as AZ13552748 in the study reports. The metabolites AZ5104 and AZ7550 are referred to as AZ13575104 and AZ13597550 respectively in the study reports.
AZD9291, AZ5104 and AZ7550 were initially screened in a smaller secondary pharmacology panel during the discovery phase (report numbers 1112SY, 1120SY and 1121SY). Study numbers 3129SV, 3285SV and 3284SV table represent a more comprehensive data set that was produced to current standards therefore these studies are considered to provide the most relevant secondary pharmacology data set.
a Panel of targets comprising receptors, ion channels, transporters and enzymes.

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test article: AZD9291 and metabolites, AZ5104 and AZ7550

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin-istration	Doses [a]	Gender and number per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Report No. (Sponsor reference No.)
Central nervous and visual systems	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	0, 10, 40, 100 mg/kg	6 M	A small decrease in body weight was seen at 24 hours post-dose at 40 and 100 mg/kg AZD9291, but these effects are considered to be related to the gastrointestinal effects seen in other studies with this compound. No other effects were noted in the Irwin or visual assessments therefore the NOEL was 100 mg/kg.	Yes	3464SR
Cardiovascular system							
Effects on the hERG encoded potassium channel in CHO cells *in vitro*	hERG-expressing CHO cells	*In vitro*	0.135, 0.531, 1.98 μM[b]	Not applicable	AZD9291 inhibited the hERG-encoded potassium channel with an IC_{50} of 0.69 μM.	Yes	VKS0795 (0403SZ)
Effects on other cardiac ion channels	Various recombinant cell lines[c]	*In vitro*	Up to 33 μM	Not applicable	AZD9291 inhibited the hKv11.1 (IC_{50} 16.22 μM)[e], hNav1.5 (29% inhibition at 33 μM) and KvLQT1/hmink (34% inhibition at 33 μM) channels.	No	1112SY [Reference study]
Effects on other cardiac ion channels	Various recombinant cell lines[d]	*In vitro*	Up to 100 μM	Not applicable	AZD9291 had no significant activity (a defined IC_{50} value).	No	3535SV

Test article: AZD9291 and metabolites, AZ5104 and AZ7550

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin-istration	Doses [a]	Gender and number per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Report No. (Sponsor reference No.)
Effects on other cardiac ion channels	Various recombinant cell lines[c]	*In vitro*	Up to 33 μM	Not applicable	AZ5104 inhibited the hKv11.1 (IC_{50} 17.48 μM) and hNav1.5 (40% inhibition at 33 μM) channels.	No	1120SY [Reference study]
Effects on other cardiac ion channels	Various recombinant cell lines[d]	*In vitro*	Up to 100 μM	Not applicable	AZ5104 had significant activity (a defined IC_{50} value) at hCav3.2 (IC_{50} of 37.54 μM).	No	3473SV
Effects on other cardiac ion channels	Various recombinant cell lines[c]	*In vitro*	Up to 33 μM	Not applicable	AZ7550 inhibited the hKv11.1 (28% at 33 μM), hNav1.5 (31% inhibition at 33 μM), hKvLQT1/hmink (38% inhibition at 33 μM) and hKv4.3/hKChIP2.2 (21% inhibition at 33 μM) channels.	No	1121SY [Reference study]
Effects on other cardiac ion channels	Various recombinant cell lines[d]	*In vitro*	Up to 100 μM	Not applicable	AZ7550 had significant activity (a defined IC_{50} value) at hCav3.2 (IC_{50} of 31.91 μM).	No	3472SV
Cardiovascular effects in dogs [a]	Dog /Beagle	Oral (gavage)	0, 6, 20, 60 mg/kg	4 M	Administration of AZD9291 at 6, 20 and 60 mg/kg was associated with marginal increases in QTcR and small decreases in heart rate compared to time-matched vehicle control data. These differences from control were transient, not dose-related and are considered to be of limited biological significance.	Yes	1352ZD

Test article: AZD9291 and metabolites, AZ5104 and AZ7550

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin-istration	Doses [a]	Gender and number per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Report No. (Sponsor reference No.)
Cardiovascular effects in rats	Rat / Alderley Park Wistar	Oral (gavage)	0, 20, 50, 100 mg/kg	4 M	Administration of AZD9291 at 50 and 100 mg/kg was associated with increases in systolic and diastolic blood pressure, which were dose-related in magnitude and duration. These effects have recovered by 24 hours post-dose at 50 mg/kg. 20 mg/kg was the NOEL.	No	PH/E/14191
Cardiovascular effects in anaesthetised guinea pigs	Guinea pig / Dunkin Hartley	Intravenous infusion for 15 minutes	0, 5, 40 mg/kg	6 M	Administration of 40 mg/kg AZD9291 was associated with small reductions in heart rate and +ve dP/dt_{max} (an index of cardiac contractility), and increases in left ventricular systolic pressure, PR interval, QTcB interval and QRS duration. 5 mg/kg was the NOEL.	No	0264SG
Respiratory system	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	0, 10, 40, 100 mg/kg	8 M	Administration of AZD9291 had no notable effects on respiratory parameters therefore the NOEL was 100 mg/kg.	Yes	3464SR
Gastrointestinal system	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	0, 10, 40, 100 mg/kg	8 M	Administration of AZD9291 inhibited gastric emptying at all doses and there was a decrease in small intestinal transit at 40 and 100 mg/kg.	Yes	3464SR

a Single doses.
b Measured test concentrations

c　Each compound was tested in electrophysiological assays for 5 types of human recombinant voltage-gated cardiac ion channels (the current each channels conducts is shown in brackets): hKv11.1 (hERG), hNav1.5 (INa), hKv4.3/hKChIP2.2 (Ito), KvLQT1/hmink (hIKs) and hCav1.2/β2/α2δ (ICaL)

d　Each compound was tested in electrophysiological assays for 3 types of human recombinant voltage-gated cardiac ion channels (the current each channels conducts is shown in brackets): $hK_v1.5$ (IK_{UR}), $hCa_v3.2$ (ICa_T) and hHCN4 (I_F).

e　hERG data generated for AZD9291 in this non-GLP study is superseded by data from the GLP-compliant hERG assay (study VKS0795).

M, male; NOEL, no-observed effect level

AZD9291 is also referred to as AZ13552748 in some of the study reports.　The metabolites AZ5104 and AZ7550 are referred to as AZ13575104 and AZ13597550 respectively in the study reports.

AZD9291 free base was used for all of the AZD9291 studies, except for the GLP hERG assay (Study number VKS0795) where the AZD9291 mesylate salt was used.　The vehicles used for the in vivo studies were as follows: 40% DMA/20% TEG in 75% HP-β-CD for 0264SG; water containing 0.5% hydroxypropyl methyl cellulose for 3464SR and 1352ZD; HPMC/Tween 80 for PH/E/14191.

2.6.3.5　　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。