アイクルシグ錠 15 mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

大塚製薬株式会社

目次

目次 2

略号一覧 4

2.4 非臨床試験の概括評価 7

2.4.1 非臨床試験計画概略 7

2.4.2 薬理試験 9

2.4.2.1 ポナチニブの構造設計及びキナーゼ阻害プロファイル 9

2.4.2.2 効力を裏付ける薬理試験 10

2.4.2.3 副次的薬理試験 13

2.4.2.4 安全性薬理試験 14

2.4.2.4.1 中枢神経系に対する影響 14

2.4.2.4.2 心血管系に対する影響 15

2.4.2.4.3 呼吸系に対する影響 15

2.4.2.4.4 腎/泌尿器系に対する影響 16

2.4.2.4.5 消化器系に対する影響 16

2.4.2.4.6 血小板凝集に対する影響 16

2.4.2.5 考察及び結論 17

2.4.3 薬物動態試験 18

2.4.3.1 分析法 18

2.4.3.2 吸収 18

2.4.3.3 分布 19

2.4.3.3.1 血漿タンパク結合率及び血液／血漿分配率 19

2.4.3.3.2 各種トランスポーターに対する基質性及び阻害作用評価 20

2.4.3.3.3 組織内分布 20

2.4.3.4 代謝 20

2.4.3.4.1 肝臓及び小腸ミクロソーム，S9 画分及び肝細胞，並びに組換えヒト CYP による *in vitro* 代謝 26

2.4.3.4.2 ポナチニブのヒトチトクローム P450 阻害作用及び誘導作用 26

2.4.3.5 排泄 27

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 28

2.4.4 毒性試験 28

2.4.4.1 単回投与毒性試験 30

2.4.4.1.1 マウス 30

2.4.4.1.2 ラット 30
2.4.4.1.3 サル 31
2.4.4.2 反復投与毒性試験 32
2.4.4.2.1 ラットにおける 28 日間経口投与毒性試験 32
2.4.4.2.2 ラットにおける 6 ヵ月間経口投与毒性試験 33
2.4.4.2.3 カニクイザルにおける 28 日間経口投与毒性試験 35
2.4.4.2.4 カニクイザルにおける 6 ヵ月間経口投与毒性試験 37
2.4.4.3 遺伝毒性試験 38
2.4.4.4 がん原性試験 38
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 38
2.4.4.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 38
2.4.4.5.2 胚・胎児発生に関する試験 39
2.4.4.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験 39
2.4.4.5.4 新生児を用いた試験 40
2.4.4.5.5 乳汁排泄 40
2.4.4.6 局所刺激性試験 40
2.4.4.7 その他の毒性試験 40
2.4.4.7.1 光毒性試験 40
2.4.4.7.2 免疫毒性試験 41
2.4.4.7.3 代謝物の毒性試験 41
2.4.4.7.4 不純物の毒性試験 41
2.4.5 総括及び結論 41
2.4.6 参考文献 43

略号一覧

略号	省略していない表現
ABL	Abelson murine leukemia virus の発がん遺伝子
ADME	吸収，分布，代謝及び排泄（Absorption, distribution, metabolism, and excretion）
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ（Alanine aminotransferase）
AML	急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia）
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（Aspartate aminotransferase）
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration-time curve）
AUC_{24h}	0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to time 24 hour）
AUC_{∞}	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（Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to infinity）
BCR	22 番染色体の q11 位置にある遺伝子（Breakpoint Cluster Region gene）で ABL と融合遺伝子をつくる
BCR-ABL	BCR と ABL 融合遺伝子及びそのタンパク質産物
BCRP	Breast cancer resistance protein
BDC	胆管カニュレーション（Bile-duct cannulated）
BNPP	リン酸ビス(p-ニトロフェニル)（bis(p-nitrophenyl) phosphate）
BSEP	Bile salt export pump
BUN	血中尿素窒素（Blood urea nitrogen）
C_0	0 時間の血漿中濃度（Plasma concentration at time 0）
CHMP	欧州医薬品委員会（Committee for Medicinal Products for Human Use）
CL	クリアランス（Clearance）
CML	慢性骨髄性白血病（Chronic myeloid leukemia）
CP CML	慢性期 CML（Chronic phase CML）
CYP	チトクローム P450（Cytochrome P450）
C_{max}	最高血漿中濃度（Maximum observed plasma concentration）
DDI	薬物相互作用（Drug-drug interaction）
EC_{50}	50%有効濃度
EMA	欧州医薬品庁（European Medicines Agency）

ENU	N-エチル-N-ニトロソウレア（n-ethyl-n-nitrosourea）
EPH	エフリン受容体（Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma）
eq.	当量（Equivalent）
FDA	米国食品医薬品局（Food and Drug Administration）
FGFR	線維芽細胞増殖因子受容体（Fibroblast growth factor receptor）
FGFR1～4	FGFR ファミリー1～4（Fibroblast growth factor receptor family 1～4）
FIP1L1	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1（Factor interacting with PAPOLA and CPSF1）
FLT3	Fms 様チロシンキナーゼ 3（FMS-like tyrosine kinase 3）
GGT	γ グルタミルトランスフェラーゼ（γ-glutamyltransferase）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
hERG	ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子（Human ether-a-go-go related gene）
IC_{50}	50%阻害濃度（Concentration producing 50% inhibition）
ICH	医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonisation）
IR	速放性（Immediate release）
ITD	遺伝子内縦列重複（Internal tandem duplication）
KIT	幹細胞因子受容体 SCFR（v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog）
Ki	阻害定数（Inhibition constant）
LC/MS/MS	液体クロマトグラフィータンデム質量分析（Liquid chromatography / tandem mass specrometry）
MDR	Multiple drug resistance protein
NOAEL	無毒性量（No-observed-adverse-effect level）
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
P-gp	P-glycoprotein
PDGFR	血小板由来増殖因子受容体（Platelet-Derived Growth Factor Receptor）
PDGFRα	PDGFR のサブタイプ α
PMR	市販後の承認要件（Post-Marketing Requirement）
Ph	フィラデルフィア染色体（Philadelphia chromosome）
Ph+ ALL	フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病

	（Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia）
RET	グリア細胞株由来神経栄養因子 GDNF の受容体（rearranged during transfection）
SAWP	科学的助言ワーキンググループ（Scientific Advice Working Party）
SD	Sprague-Dawley
SRC	がん原遺伝子 Src 由来チロシンキナーゼ（Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src）
T3	トリヨードチロニン（Triiodothyronine）
T315I	ABL 蛋白質配列 315 番目の T（トレオニン）が I（イソロイシン）に変異を表す
T4	チロキシン（Thyroxin）
TK	トキシコキネティクス（Toxicokinetics）
TKI	チロシンキナーゼ阻害薬（Tyrosine kinase inhibitor）
TSH	甲状腺刺激ホルモン（Thyroid stimulating hormone）
$t_{1/2}$	消失半減期（Elimination half-life）
t_{max}	最高血漿中濃度到達時間（Time to maximum observed plasma concentration）
VEGFR	血管内皮細胞増殖因子受容体（Vascular Endothelial Growth Factor Receptor）
V_{ss}	定常状態における分布容積（Steady state volume of distribution）

2.4　非臨床試験の概括評価

フィラデルフィア染色体（Ph）の融合タンパク質産物である BCR-ABL は，恒常的に活性化しているチロシンキナーゼであり，慢性骨髄性白血病（CML）及び急性リンパ性白血病の一部（Ph+ ALL）の発症原因となる（Daley et al, 1990; Faderl et al, 2002）。BCR-ABL のチロシンキナーゼ活性を阻害する第一世代の阻害薬であるイマチニブ，並びに更に強力な作用をもつ第二世代の阻害薬のダサチニブ及びニロチニブの 3 剤が，慢性期 CML（CP CML）として新たに診断された患者の治療薬として承認されている（Gleevec®[imatinib] US Prescribing Information, 2012; Sprycel® [dasatinib] US Prescribing Information, 2011; Tasigna® [nilotinib] US Prescribing Information, 2011）。

BCR-ABL 阻害薬に対する抵抗性は，治療が奏功しない主な原因であり，このような抵抗性は，主に ABL キナーゼドメイン内の突然変異により阻害薬が結合できなくなることで生じている。例えば，50 以上の突然変異が，イマチニブに対する抵抗性を付与することが明らかになっている（Apperley, 2007）。第二世代の BCR-ABL 阻害薬であるダサチニブ及びニロチニブは，当初，イマチニブに対する抵抗性又は不耐容を示す患者の治療に承認された（Sprycel® [dasatinib] US Prescribing Information, 2011; Tasigna® [nilotinib] US Prescribing Information, 2011）。しかし，ダサチニブ及びニロチニブは，一部のイマチニブ抵抗性変異に対して効果を示すものの，ダサチニブに対する抵抗性を示す V299L, T315A, F317L/V/I/C 変異, ニロチニブに対する抵抗性を示す Y253H, E255K/V，F359V/C/I 変異に対しては無効である（O'Hare et al, 2007; National Comprehensive Cancer Network, 2012）。さらに，T315I「ゲートキーパー」変異体に対しては，3 種類の既承認の BCR-ABL 阻害薬の全てが無効である（O'Hare et al, 2007; National Comprehensive Cancer Network, 2012）。現時点で，T315I 変異体を有する患者を含めて，ダサチニブ又はニロチニブに抵抗性又は不耐容を示す CML 患者に対する標準的な薬物療法は存在しない。

したがって，A）ダサチニブ及びニロチニブと少なくとも同程度の活性で野生型 BCR-ABL を阻害し，B）T315I のように，イマチニブ，ダサチニブ又はニロチニブに対する抵抗性を示すことが知られている BCR-ABL 変異体に対して強力な活性を保持し，C）全体的に，BCR-ABL 変異に基づく抵抗性の影響を受けにくく，D）ヒトでの使用に適した薬理学的特性を持つ新規薬剤が求められている。このような新薬の必要性に対応するため，タンパク質の構造情報に基づく計算化学的医薬品分子設計法により開発された低分子型チロシンキナーゼ阻害薬（TKI）がポナチニブである。特に，ポナチニブは野生型 BCR-ABL のキナーゼ活性を強力に阻害するだけでなく，既承認の BCR-ABL 阻害薬に対して抵抗性を引き起こす T315I などの全ての変異型 BCR-ABL のキナーゼ活性を強力に阻害するように設計された。

2.4.1　非臨床試験計画概略

ポナチニブの効力及び副次的薬理活性を評価するため，3 種類の試験を実施した。最初に，本薬のキナーゼ選択性プロファイルを理解するため，広範な *in vitro* スクリーニングを実施した。次に，一連の細胞を用いる試験及び *in vivo*（動物）試験を通して，ポナチニブの抗 BCR-ABL 活性を評価した。第三に，そのほかの複数のキナーゼに対するポナチニブの活性を評価した。

これらの薬力学試験では，ポナチニブの作用機序，効力及び標的キナーゼ阻害の特異性について評価した。これらのうちいくつかの試験では，比較対照薬として BCR-ABL 阻害薬であるイマ

チニブ，ダサチニブ及びニロチニブを使用した。イマチニブ，ダサチニブ若しくはニロチニブに対する抵抗性を示すことが明らかになっている変異を含め，あらゆる単一変異型 BCR-ABL を阻害，及びその出現を抑制する汎 BCR-ABL 阻害薬としてのポナチニブの効力について重点的に評価した。また，ヒト血漿中の主要代謝物 AP24600 及び微量代謝物 AP24567 の活性についても評価した。これらの試験の結果について，以下の 2.4.2 で概説するとともに，薬理試験の概要文で詳細に解説した。

非臨床安全性試験で使用した動物種であるラット及びサルを用いて，ポナチニブの吸収，分布，代謝及び排泄（ADME）を評価した。マウス，ラット，サル及びヒトの血漿を用いてポナチニブの *in vitro* における血漿タンパク結合率を評価するとともに，他の高血漿タンパク結合薬物存在下でのポナチニブのヒト血漿タンパク結合率も測定した。ポナチニブの *in vitro* 代謝について，動物及びヒトの種差比較を行うとともに，代謝酵素を特定するための試験を実施した。ヒトのチトクローム P450（CYP）に対するポナチニブの阻害及び誘導作用の *in vitro* 評価に加えて，P-glycoprotein（P-gp），breast cancer resistance protein（BCRP），bile salt export pump（BSEP），organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 及び 1B3，organic anion transporter（OAT）1 及び 3，並びに organic cation transporter（OCT）1 及び 2 の各トランスポーターに対するポナチニブの基質性又は阻害作用の評価も実施した。これらの試験の結果について，以下の 2.4.3 で簡単に概説するとともに，薬物動態試験の概要文で詳細に説明した。また，これらの試験で得られたデータの詳細な一覧表を薬物動態試験概要表に示した。

ポナチニブの安全性及び毒性プロファイルを明らかにするため，一連の非臨床安全性試験を実施した。これらの試験には安全性薬理試験も含み，中枢神経系，心血管系，呼吸系，腎/泌尿器系及び消化器系機能，並びに血小板凝集に対するポナチニブの影響を評価した。さらに，マウス，ラット及びカニクイザルを用いた単回経口投与毒性試験及びトキシコキネティクス（TK）試験，並びにラット及びカニクイザルを用いた 28 日間及び 6 ヵ月間反復経口投与毒性試験及び TK 試験を実施した。また，一連の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験，ラットを用いたがん原性試験，ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験，並びにラットを用いた胚・胎児発生に関する試験，新生児を用いた毒性試験及び光安全性試験を実施した。主要な試験は全て，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）及び日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに従って実施した。全ての主要な試験で TK 測定を実施し，曝露データを収集した。これらの試験結果について，以下の 2.4.4 で概説するとともに，毒性試験の概要文で詳細に解説し，データを表形式で毒性試験概要表に示した。さらに，安全性薬理試験に関する詳細な情報は薬理試験の概要文及び薬理試験概要表に示した。

ポナチニブの不純物プロファイルを 3.2.S.3.2「不純物」に示す。最終製造規格は 3.2.S.4.1「規格」に示すとおりである。個別規格設定不純物のそれぞれは，ラット及びサルを用いた短期又は長期反復投与毒性試験で検討したバッチ中に存在していたか（2.6.7.4 参照），又は原薬中の不純物に関する ICH ガイドライン（ICH Q3A Guidance）の閾値で許容可能な濃度で存在していたことから，その安全性は確認されている。

[redacted]年[redacted]月に，前治療に対して抵抗性若しくは不耐容を示すCML若しくはPh+ ALL患者，又はT315I変異を有するCML若しくはPh+ ALL患者を対象とした主要な第II相試験（CSR AP24534-10-201, Appendix 16.1.1）デザインを含む開発計画案について，米国食品医薬品局（FDA）及び欧州医薬品庁（EMA）科学的助言ワーキンググループ（SAWP）と議論した。その議論の過程で，ポナチニブ原薬の不純物（及び生成する可能性がある不純物）の遺伝毒性を評価するとともに，ポナチニブの光安全性を評価するよう助言を受けた上で，非臨床計画案は両規制当局により承認された。これらの評価は行われており，原薬不純物に関する評価の詳細については3.2.S.3.2.5「不純物」に示し，光毒性試験（試験番号 20011779）の結果は以下の2.4.4及び2.6.7.17.1に示した。

上述の非臨床プログラムは，不応性CML及びPh+ ALL患者の治療薬としてのポナチニブの初回申請を支持するのに十分なものであった。最初の新薬承認申請（2012年12月14日承認）でFDAによる合意が得られているように，市販後の承認要件（PMR）として，以下の試験を実施した。

- ヒト血小板凝集に対するポナチニブの影響に関する *in vitro* 評価（Study 600075）
- 高タンパク結合型併用薬によるポナチニブのヒト血漿タンパク結合置換（Study ARP350）

また，初回市販承認申請（2013年7月1日承認）の枠組み内でEMA欧州医薬品委員会（CHMP）が審査した医薬品安全性監視活動案に従い，以下の試験を実施している。

- 投与後24時間以降の血漿試料の分析により代謝物プロファイルを明らかにするための追加試験（Study ARP395）
- 培養ヒト肝細胞を用いたポナチニブのチトクローム P450 発現誘導作用の *in vitro* 評価（Report [redacted]133050）

これらに加えて，EMA CHMPと討議したIclusig 小児治験計画（Iclusig Pediatric Investigation Plan）の一部として，ARIAD 社は，成熟動物と比較して感受性の高い幼若動物で毒性を検出するため，Sprague-Dawley（SD）幼若ラットに離乳前から離乳後までポナチニブを1日1回強制経口投与した後，4週間の休薬期間を設けて毒性を検討した。更に，幼若ラットにポナチニブを投与した場合のTKプロファイルについて評価した（Study 902650）。市販予定の経口製剤は速放性（IR）フィルムコーティング錠であり，力価は15 mgで，固形経口製剤に通常使用される添加剤を含有する。市販予定製剤の成分組成を3.2.P.3.2「バッチ処方」に示す。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 ポナチニブの構造設計及びキナーゼ阻害プロファイル

ポナチニブはタンパク質の構造情報に基づく計算化学的医薬品分子設計法により発見された化合物であり，野生型BCR-ABLキナーゼとともに，薬剤抵抗性を引き起こす変異型BCR-ABL（例えば，既承認のBCR-ABL阻害薬であるイマチニブ，ニロチニブ及びダサチニブの全てに対して抵抗性を示すT315I「ゲートキーパー」変異体など）キナーゼに対して阻害活性を示すように特別に設計されている。本薬の構造設計での重要な特徴は，長い結合部位上で全体的に結合親和性

を均衡に分散させ，多数の接触点で不活性型 ABL キナーゼドメインと結合する点である。このような接触点の配列により，野生型 ABL に対して高い結合親和性を示すだけでなく，結合があらゆる単一アミノ酸変異による影響を受けにくくなっている。本薬の第 2 の重要な特徴は，I315 の側鎖と有効な疎水性の接触を可能にする炭素間三重結合であり，これにより，T315I 変異型 BCR-ABL キナーゼを阻害できるようになっていることである。

In vitro キナーゼ試験を実施し，235 種類の遺伝子組換えヒトプロテインキナーゼに対するポナチニブの活性を測定した（Report ARP280）。ポナチニブは濃度 1 μM で 56 種類のキナーゼに対して少なくとも 90%の阻害活性を示すことが明らかになった。さらに，詳細な高感度キナーゼ解析により，ポナチニブは野生型 ABL 及び検討した 5 種類の変異型 ABL（T315I を含む）を阻害し，その 50%阻害濃度（IC_{50}）は 0.3～2.0 nM であることが示された。このほかに阻害作用が認められたキナーゼは，グリア細胞株由来神経栄養因子 GDNF の受容体（RET），Fms 様チロシンキナーゼ 3（FLT3），幹細胞因子受容体 SCFR（KIT），及びキナーゼファミリー線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR），血小板由来増殖因子受容体（PDGFR），血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR），エフリン受容体（EPH）及びがん原遺伝子 Src 由来チロシンキナーゼ（SRC）等であり，その IC_{50} は 20 nM 以下であった。ヒト血漿中のポナチニブの主要代謝物である AP24600 は，野生型及び T315I 変異型 ABL の *in vitro* キナーゼ活性を阻害しなかった（IC_{50} 値：> 3000 nM）。ヒト血漿中のポナチニブの微量代謝物である AP24567 は，ポナチニブと同程度の効力で野生型及び T315I 変異型 ABL の活性を阻害した。ポナチニブが野生型及び変異型 ABL に対して強力な活性を示したことから，BCR-ABL 陽性疾患を適用とする本薬の開発が支持された。

2.4.2.2　効力を裏付ける薬理試験

一連の細胞を用いる試験及び *in vivo* 試験を実施し，BCR-ABL 誘発性 CML モデルにおけるポナチニブの活性を測定した。これらのうち多数の試験で，増殖に関して野生型又は変異型 BCR-ABL 依存性となるように遺伝子改変した Ba/F3 細胞株を使用し，本薬の効力及び作用機序を検討した。また，いくつかの試験では，比較対照として，イマチニブ，ニロチニブ若しくはダサチニブを使用した。

細胞を用いる試験では，ポナチニブは野生型 BCR-ABL 及び検討した 14 種類全ての臨床的に意味のある変異型 BCR-ABL（T315I を含む）を発現する Ba/F3 細胞の増殖を阻害し，その IC_{50} 値は 0.5～36 nM であった。2 種類の試験により，ポナチニブの野生型 BCR-ABL に対する阻害作用（IC_{50} 値：0.5～0.8 nM）は，イマチニブ（IC_{50} 値：260～482 nM）及びニロチニブ（IC_{50} 値：13～21 nM）と比較して非常に強力であり，ダサチニブ（IC_{50} 値：0.8～0.9 nM）と同程度以上であることが明らかになった。また，T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞の増殖に対しては，ポナチニブのみに阻害活性が認められ（IC_{50} 値：8～11 nM），イマチニブ，ニロチニブ及びダサチニブでは，検討した最高濃度（10000 nM）でも阻害活性はみられなかった。これらの試験では，ポナチニブによる阻害作用が最も弱かった変異体は E255V（IC_{50} 値：36 nM）であった。この変異体はダサチニブ並びに，特にニロチニブ及びイマチニブに対しても高い抵抗性を示すことが明らかになった（IC_{50} 値はそれぞれ 11 nM，430 nM 及び 6400 nM 超）。

血清タンパク結合はポナチニブの活性に対して悪影響を及ぼさなかった。T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞の増殖に対するポナチニブの阻害活性は，通常の細胞培養条件下及び生

理学的に意味のある濃度のヒト血清アルブミン存在下では同程度であり，IC_{50} 値はそれぞれ 8 及び 14 nM であった。

ヒト血漿中でのポナチニブの主要代謝物である AP24600 は，野生型 BCR-ABL 及び T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞の増殖に対して影響を及ぼさなかった（IC_{50} 値：> 10000 nM）。また，ヒト血漿中のポナチニブの微量代謝物である AP24567 は，野生型 BCR-ABL 及び T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞の増殖を阻害し，その阻害活性はポナチニブの約 1/4 であった。

野生型 BCR-ABL 又は T315I 変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞では，ポナチニブは EC_{50}（50%有効濃度）値 2～57 nM でアポトーシスを誘導し，IC_{50} 値 25～78 nM で BCR-ABL のリン酸化を阻害した。一方，ニロチニブ及びダサチニブは，野生型 BCR-ABL を発現する細胞では，アポトーシスを誘導し，BCR-ABL のリン酸化を阻害したが，T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞では，このような作用を示さなかった。

追加の試験において，ポナチニブは白血病患者由来の 3 種類の BCR-ABL 陽性細胞株の増殖を強力に阻害したが，3 種類の BCR-ABL 陰性細胞株では阻害しなかった。BCR-ABL 陽性細胞株の 1 つである K562 細胞では，ポナチニブによる強力なアポトーシス誘導作用及び BCR-ABL リン酸化阻害作用も認められた。

BCR-ABL のキナーゼドメインに単一の突然変異が生じることにより，ポナチニブに対する抵抗性を示すか否かを検討するため，加速突然変異誘発試験を実施した。野生型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を変異原物質に曝露させた後，様々な濃度のポナチニブを含むウェルに播種した。細胞増殖が観察された場合，増殖細胞から BCR-ABL 遺伝子の配列を解析し，突然変異を特定した。このアッセイ法は，過去にイマチニブ，ニロチニブ及びダサチニブの抵抗性プロファイルを評価するために用いられた方法であり，これらのチロシンキナーゼ阻害薬の臨床成績を予測するのに有用であることが証明されている（Bradeen et al, 2006）。例えば，このアッセイでイマチニブに対する抵抗性を示すことが明らかになった 20 種類の突然変異体のうち 19 種類がイマチニブ抵抗性患者で特定されている（Bradeen et al, 2006; Apperley, 2007）。また，臨床での使用経験と一致して，各阻害薬について検討した最高濃度（イマチニブ 16000 nM，ニロチニブ 5000 nM 及びダサチニブ 500 nM）で，T315I 変異体が回収された。ニロチニブ（Y253H 及び E255V）及びダサチニブ（F317V）に対して最強に次ぐ抵抗性を示す変異体についても，患者で抵抗性が認められている（National Comprehensive Cancer Network, 2012）。

ポナチニブを用いて 3 回実施した加速突然変異誘発試験の結果をまとめて図 2.4-1 に示す。10 nM のポナチニブに曝露させた細胞では，増殖が限定的に認められ，様々な突然変異が低頻度で検出された。20 nM のポナチニブに曝露させた細胞では，増殖が顕著に抑制され，E255V 及び T315I の 2 種類の突然変異体のみが生存していた。40 nM のポナチニブ存在下では，3 回全ての試験で *in vitro* 抵抗性変異体の出現が完全に抑制された。

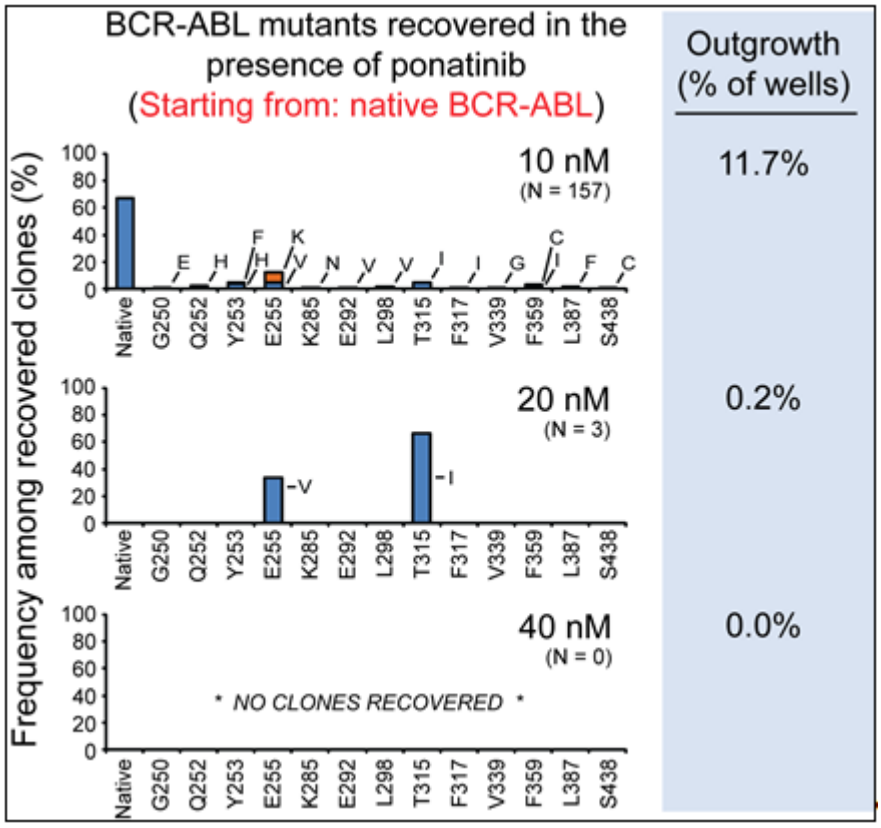


図 2.4-1　　細胞を用いる突然変異誘発スクリーニング試験における抵抗性 BCR-ABL 変異体の出現に対するポナチニブ単独の抑制作用

野生型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を N-エチル-N-ニトロソウレア（ENU）で処理し，濃度 10，20，40 nM のポナチニブ存在下で培養した後に回収した抵抗性クローン。各バーは，回収されたサブクローン中の BCR-ABL キナーゼドメイン変異体の相対的割合を示す。増殖が認められたウェルの割合を各グラフの右側に示す。

したがって，これらの試験成績より，ポナチニブは汎 BCR-ABL 阻害薬であると推察され，40 nM のポナチニブは，野生型 BCR-ABL 及び検討した 14 種類全ての変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞の増殖を阻害すること，また，3 回の独立した試験で単一変異型 BCR-ABL クローンの出現を抑制することも明らかになった。これらの結果から，BCR-ABL 陽性疾患患者では，ポナチニブのトラフ濃度を 40 nM（21 ng/mL）以上に維持することで臨床効果が得られるという仮説が立てられた。

Ba/F3 細胞を用いる増殖試験及び加速突然変異誘発スクリーニング試験の結果は，イマチニブ，ダサチニブ及びニロチニブの臨床成績を予測するものであったが，これらのアッセイでは（使用した変異原物質等により）認められなかった変異体が患者で発現し，40 nM のポナチニブに対して抵抗性を示す可能性を否定することはできない。

また，単一変異型 BCR-ABL の出現を低下させる作用に基づき，ポナチニブを汎 BCR-ABL 阻害薬と定義していることに注意する必要がある。治療効果が認められなかった患者の一部で，同一の BCR-ABL 対立遺伝子に複数の変異が認められる複合変異体が検出されている（Khorashad et al, 2008; Shah et al, 2007）。既に T315I 又は E255V 変異型 BCR-ABL を発現している細胞を用いて実施した加速突然変異誘発試験では（O'Hare et al, 2009），40 nM 以上のポナチニブのみで阻害され

る複合変異体が特定された（640 nM の高濃度を必要とする変異体もあった）。患者では，複合変異体が連続的に発現することから，複合変異体の発現を許容する他の阻害薬による逐次治療よりも，早い段階からポナチニブのような汎 BCR-ABL 阻害薬を用いて治療する方が望ましいことがこれらの結果から示唆された。

2 種類のマウスモデルを用いて，野生型 BCR-ABL 及び T315I 変異型 BCR-ABL に対するポナチニブの *in vivo* 活性を評価した。

野生型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を静脈内播種したマウス生存性モデルに，ポナチニブを投与したところ，対照群（生存期間中央値 19 日）と比較して，用量依存的な生存期間の延長効果が認められた。ポナチニブを投与量 1，2.5，5 及び 10 mg/kg/日で 19 日間経口投与した結果，生存期間中央値はそれぞれ 32%，45%，63%及び 100%延長した（4 用量全てで $p < 0.01$）。

野生型 BCR-ABL を発現する K562 細胞を皮下移植したマウス異種移植モデルに，ポナチニブを投与したところ，腫瘍増殖が用量依存的に抑制された。ポナチニブを投与量 1 mg/kg/日で 18 日間反復経口投与した結果，対照群と比較して腫瘍増殖が有意に抑制された（$p < 0.01$）。投与量 2.5，5 又は 10 mg/kg/日で反復経口投与した場合には，全てのマウスで腫瘍退縮が認められた（1 群あたり 10 例）。最終投与後 8 週間の観察期間中，全てのマウスで腫瘍退縮が維持された。ポナチニブを投与したマウスの腫瘍では，BCR-ABL のリン酸化阻害が認められた。

T315I 変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を静脈内播種したマウス生存性モデルに，ポナチニブを投与したところ，対照群（生存期間中央値 16 日）に比べて，用量依存的な生存期間延長が認められた。ポナチニブを投与量 5，15 及び 25 mg/kg/日で 19 日間経口投与した結果，生存期間中央値は 22%，63%及び 88%延長した（3 投与量全てで $p < 0.01$）。

T315I 変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を皮下移植したマウス異種移植モデルに，ポナチニブを投与したところ，腫瘍増殖が用量依存的に抑制された。ポナチニブを投与量 2.5 及び 5 mg/kg/日で 19 日間反復経口投与した結果，対照群と比較して腫瘍増殖が抑制されたが，統計学的な有意差は認められなかった。投与量 10 及び 30 mg/kg/日で反復経口投与した場合には，それぞれ統計学的に有意な腫瘍増殖の阻害又は静止状態が認められた（$p < 0.01$）。また，投与量 50 mg/kg/日で経口投与した場合には，統計学的に有意な腫瘍退縮が観察された（$p < 0.01$）。ポナチニブ投与群のマウスの腫瘍では，T315I 変異型 BCR-ABL のリン酸化阻害が認められた。

これらの *in vivo* 試験では，野生型及び T315I 変異型 BCR-ABL に対するポナチニブの阻害活性の評価に焦点が当てられた。ポナチニブによる阻害活性が T315I 変異体に比べて弱い E255V 変異体又は複合変異体に対するポナチニブの *in vivo* 活性を評価する試験は実施していない。

これらの試験成績より，TKI による前治療に抵抗性又は不耐容を示す CML 又は Ph+ ALL 患者の治療に，強力な汎 BCR-ABL 阻害薬であるポナチニブが有用である可能性が示された。

2.4.2.3 副次的薬理試験

ポナチニブの包括的な *in vitro* キナーゼ阻害活性プロファイルの評価から，ポナチニブは，BCR-ABL 以外の複数の野生型及び変異型キナーゼに対して，強力な阻害活性（IC_{50} 値：≤ 20 nM）を示す多標的キナーゼ阻害薬であることが明確にされた。これらのキナーゼには，RET，FLT3，KIT，並びにキナーゼファミリーFGFR，PDGFR，VEGFR，EPH 及び SRC 等が含まれる。これらのキナーゼに対するポナチニブの活性について，細胞を用いる試験及び *in vivo* 試験で更に評価し

た。

FLT3‐遺伝子内縦列重複（ITD）変異は，急性骨髄性白血病（AML）患者の 30%近くに認められている（Meshinchi and Appelbaum, 2009）。細胞を用いる試験では，ポナチニブは，FLT3-ITD 陽性白血病細胞株である MV-4-11 の増殖を強力に阻害し，その IC_{50} 値は 2 nM であった。マウスに MV-4-11 細胞を皮下移植した異種移植モデルに，ポナチニブを投与することにより，腫瘍の増殖が用量依存的に抑制された。投与量 2.5 mg/kg/日で反復経口投与した結果，腫瘍の増殖が抑制され，投与量 5 及び 10 mg/kg/日では，有意な腫瘍退縮が認められた（$p < 0.01$）。ポナチニブを投与したマウスの腫瘍では，FLT3-ITD のリン酸化阻害が認められた。

線維芽細胞増殖因子受容体ファミリーキナーゼ（FGFR1～4）は，複数のがんで，様々なメカニズムによる調節異常が認められている（Turner and Grose, 2010）。活性型 FGFR1～4 を発現するよう遺伝子改変した Ba/F3 細胞で，ポナチニブは FGFR を介するシグナル伝達及び生存を強力に阻害し，IC_{50} 値は 40 nM 未満であった。様々なメカニズムにより FGFR の調節異常が起きた 14 種類のがん細胞株を用いた一連の試験で，ポナチニブは FGFR を介するシグナル伝達を 40 nM 未満の IC_{50} 値で阻害し，細胞増殖に対して 7～181 nM の GI_{50}（処理細胞の増殖を無処理細胞の半分に抑制するのに必要な薬物濃度）で効果を示した。また，検討した 3 種類の FGFR 誘発モデル全てで，ポナチニブ 10～30 mg/kg/日の反復経口投与により，腫瘍増殖が抑制され，シグナル伝達が阻害された。

多発性がんで，KIT，PDGFRα 及び RET の活性化突然変異がそれぞれ特定されている（Gramza et al, 2009; Kohno et al, 2012）。KIT の活性化突然変異（N822K）を有する細胞株では，ポナチニブは KIT のリン酸化及び細胞の増殖をそれぞれ 20 及び 8 nM の IC_{50} 値で阻害した。また，活性型 PDGFRα（FIP1L1-PDGFRα 融合）を有する細胞株では，ポナチニブは PDGFRα のリン酸化及び細胞の増殖をそれぞれ 0.6 及び 0.5 nM の IC_{50} 値で阻害した。さらに，活性型 RET を発現するように遺伝子改変した Ba/F3 細胞では，ポナチニブは RET のリン酸化及び細胞の増殖をそれぞれ 5 及び 8 nM の IC_{50} 値で強力に阻害した。

細胞を用いる試験及び患者では, FLT3, KIT 及び PDGFRα のゲートキーパー残基の突然変異は，類似の阻害薬に対する抵抗性に関与することが明らかになっている（Smith et al, 2012; Zhang et al, 2009）。細胞を用いる試験において，ポナチニブはこれらのキナーゼのゲートキーパー変異体に対しても十分な活性を維持していた。

これらの試験より，ポナチニブは，細胞モデルにおいて活性型 KIT，PDGFRα 及び RET に対して，また細胞及び *in vivo* モデルにおいて，FLT3 及び FGFR に対して，強力な阻害薬であることが示された。

2.4.2.4　安全性薬理試験

中枢神経系，心血管系，呼吸系，腎/泌尿器系及び消化器系機能に対するポナチニブの影響を評価するため，安全性薬理試験を GLP に準拠して実施した。これらの *in vivo* 試験では，クエン酸緩衝液（pH 2.75）に溶解したポナチニブを動物に経口投与した。

2.4.2.4.1　中枢神経系に対する影響

試験番号 0200MA53.004，1001MA53.006，0225MA53.006，データの概要を 2.6.3.4 に示す。

雌マウスを用いて，ポナチニブの神経薬理学的作用の有無，自発運動量及び運動協調性に及ぼす影響について検討した。これらの試験では，ポナチニブを投与量 0（溶媒），10，30 及び 100 mg/kg で単回経口投与し，投与後 72 時間にわたり動物を観察及び測定した。その結果，いずれの投与量でも，ポナチニブに神経薬理学的作用はなく，運動協調性に影響しないことが明らかになった。100 mg/kg 投与群で，投与後 24 時間に自発運動抑制がみられたが，それ以降の自発運動量は対照群と同程度であった。

2.4.2.4.2　　心血管系に対する影響

hERG をトランスフェクトした HEK-293 細胞にポナチニブを濃度 0（溶媒），0.1，0.3，1.0，3.0 及び 9.0 μM で適用して hERG アッセイを実施した。ポナチニブは 1.0 μM 以上で用量依存的に hERG 電流を阻害し，IC_{50} 値は 2.33 μM であった（試験番号 S07092，データは 2.6.3.4 に示す）。臨床推奨用量である 45 mg/日のポナチニブを経口投与した場合（試験番号 AP24534-07-101 CSR）の定常状態における血漿中 C_{max} は 0.145 μM（77.4 ng/mL）[非結合型 C_{max}：0.000116 μM]であった。したがって，hERG アッセイにおいて比較的高い IC_{50} 値で認められたこの阻害作用が臨床で問題になるとは考えられなかった。

ポナチニブを経口投与した際の心血管系に対する急性的影響について，テレメトリー装置を装着した覚醒下のビーグル犬（雌雄各 2 例）を用いて検討した。ポナチニブを投与量 0（溶媒），2，5 及び 10 mg/kg で単回経口投与した。心血管系機能に対する影響は心拍数，血圧（拡張期，収縮期，平均）及び第 II 誘導心電図の変化を測定することにより評価した。覚醒下のビーグル犬にポナチニブを投与量 2，5 及び 10 mg/kg で投与しても，心拍数，収縮期血圧，平均血圧及び拡張期血圧に顕著な影響を及ぼさなかった。10 mg/kg 投与群で投与 60 及び 75 分後に QTc 間隔平均値のごくわずかな延長（それぞれ 11%及び 14%）が認められたが，これらの変化の程度は生物学的に問題となるほどではなかった。ただし，これらの変化は，投与 60 及び 75 分後に QTc 間隔がそれぞれ 28%及び 55%延長した動物 1 例の変動に起因したものであり，この例も投与 90 分後には投与前値までに回復した（試験番号 1259DA53.004，データを 2.6.3.4 に示す）。これらの QTc 間隔の延長は投与 60 分及び 75 分後という近接した 2 時点でのみ認められ，そこから 15 分後（投与 90 分後）及びその後 24 時間までの測定時間には，QTc 間隔の延長は認められなかった。

当該試験では，血中ポナチニブ濃度を測定しなかったが，イヌを用いた経口投与による薬物動態試験では，投与後 4～8 時間に C_{max} 値に達したことが示されている。推定曝露量が最大になった時点で QTc 間隔延長が認められなかったことから，この QTc 間隔延長とポナチニブ投与との関連性は低いものと考えられた。ポナチニブを投与量 2，5 及び 10 mg/kg で投与しても，心電図波形に変化は認められなかった。したがって，覚醒下のイヌにポナチニブを投与量 2, 5 及び 10 mg/kg で経口投与しても，心拍数，血圧及び心電図に影響は認められなかったが，例外として，10 mg/kg 投与群の 1 例で QTc 間隔が一過性に延長した。なお，第 I 相用量漸増試験においてポナチニブの薬物動態－QTcF 間隔の関係を検討した結果，被験者の心室再分極に対してポナチニブは顕著な影響を及ぼさないことが明らかになっている。

2.4.2.4.3　　呼吸系に対する影響

ヘッドアウト式プレチスモグラフチャンバーを用いて，覚醒下の雄ラットにポナチニブを投与

した際の呼吸機能に及ぼす影響を検討した。ポナチニブを投与量 0（溶媒），3，10 及び 30 mg/kg で単回経口投与し，呼吸数，1 回換気量及び分時換気量に対する影響を検討した。測定した各パラメータに関して，薬物投与群と溶媒対照群の間で統計学的有意差は認められなかった（試験番号 1275RA53.001，データを 2.6.3.4 に示す）。したがって，覚醒下のラットにポナチニブを投与量 3，10 及び 30 mg/kg で経口投与しても，呼吸数，1 回換気量及び分時換気量に影響はみられなかった。

2.4.2.4.4　　腎/泌尿器系に対する影響

雄ラットにポナチニブを投与量 0（溶媒），3，10，30 mg/kg で単回経口投与し，尿量，尿 pH 及び電解質濃度に対する影響を検討した。ポナチニブの 3，10 及び 30 mg/kg を経口投与した際，それぞれ 42%，51%及び 46%の尿量増加が認められた。また，全ての投与群で電解質排泄量（Na^+，K^+及び Cl^-）も増加した。一方，電解質濃度及び尿 pH に対する影響はほぼ認められなかった（試験番号 0209RA53.006，データを 2.6.3.4 に示す）。したがって，ラットにポナチニブを投与量 3，10 及び 30 mg/kg で単回経口投与すると，尿量及び電解質排泄量は増加するが，尿 pH 及び電解質濃度には影響しないことが明らかになった。

2.4.2.4.5　　消化器系に対する影響

ポナチニブの腸の蠕動運動及び胃内容排出能に及ぼす影響を評価するため，ラットに活性炭を投与する試験を実施した。4 群の雄ラット（各群 10 例）に，10 mL/kg の容量で 0（溶媒），3，10 及び 30 mg/kg のポナチニブを単回経口投与した。いずれのポナチニブ投与群においても，溶媒投与群と比較して，腸管運動に顕著な変化はみられなかった。しかし，ポナチニブの投与量 3，10 及び 30 mg/kg を経口投与した際，対照群と比較して，胃排出能がそれぞれ，30%，65%及び 21%低下した。最大の影響が 10 mg/kg 群で認められたことから，用量依存性はみられなかった（試験番号 0239RA53.001，データを 2.6.3.4 に示す）。したがって，ラットにポナチニブを投与量 3，10 及び 30 mg/kg で経口投与しても，腸管運動に対する影響は認められなかったが，用量依存性のない胃内容排出能の低下は認められた。

2.4.2.4.6　　血小板凝集に対する影響

ポナチニブを投与した患者で出血性事象が認められていること，また，TKI であるダサチニブに *in vitro* で血小板機能を阻害する作用があるという知見（Quintas-Cardama et al, 2009）を考慮し，ポナチニブの血小板凝集に及ぼす影響について検討した。健康な被験者から採取した全血及び多血小板血漿を用いて，臨床推奨治療量である 45 mg を投与した際に求めた血漿中 C_{max} 値 0.077 µg/mL（試験番号 AP24534-07-101 CSR）と比較して 1～100 倍高い濃度の 0.07，0.7 及び 7 µg/mL の適用により，血小板凝集に対するポナチニブの阻害作用を評価した。血小板凝集阻害薬アブシキシマブを陽性対照として使用した。ポナチニブ濃度 0.07 及び 0.7 µg/mL では血小板凝集阻害は認められなかったが，ヒトに治療量 45 mg を 1 日 1 回投与した場合の定常状態における C_{max}（77.4 ng/mL）よりも約 100 倍高い最高濃度 7 µg/mL でのみ，有意な阻害作用が認められた（試験番号 600075，データを 2.6.3.4 に示す）。したがって，これらの試験結果が臨床的に問題になるとは考えられなかった。

2.4.2.5　考察及び結論

上記の非臨床薬理試験の結果を以下に総括し，臨床開発との関連について考察した。

(1)　ポナチニブは野生型BCR-ABL及び変異型BCR-ABL（T315Iゲートキーパー変異体を含む）の両方に対して阻害活性を持つよう特別に構造設計されている。ポナチニブの構造設計の特性として，ゲートキーパー残基の立体障害を回避する炭素間三重結合を持ち，ABLキナーゼドメインとの広範な接触を可能にし，変異による影響を受けにくくする最適な結合配列を含んでいる。

(2)　ポナチニブは野生型BCR-ABLに対して非常に強力な阻害作用を示す。細胞を用いる試験では，ポナチニブは野生型BCR-ABLを発現する細胞の増殖を阻害し，その阻害活性（IC_{50}値：0.5～0.8 nM）は，イマチニブと比較して約500倍，ニロチニブと比較して約25倍強力であり，ダサチニブと同程度又はわずかに上回ることが明らかになった。野生型BCR-ABLを発現する腫瘍を移植したマウスの *in vivo* モデルに，ポナチニブを経口投与することにより，BCR-ABLシグナル伝達が阻害され，腫瘍の縮小及び生存期間の延長効果が認められた。

(3)　ポナチニブはT315I変異型BCR-ABLの強力な阻害薬である。細胞を用いる試験では，ポナチニブはT315I変異型BCR-ABLを発現する細胞の増殖を強力に阻害したが（IC_{50}値：8～11 nM），イマチニブ，ニロチニブ及びダサチニブは，検討した最高濃度（10000 nM）でも細胞の増殖を阻害しなかった。血清タンパク結合はポナチニブの細胞活性に対して悪影響を及ぼさなかった。T315I変異型BCR-ABLを発現する腫瘍を移植したマウスの *in vivo* モデルに，ポナチニブを経口投与することにより，BCR-ABLシグナル伝達が阻害され，腫瘍の縮小及び生存期間の延長効果が認められた。

(4)　細胞を用いる試験で，ヒト血漿中のポナチニブの主要代謝物であるAP24600は，検出可能なBCR-ABL阻害作用を示さなかった。また，ヒト血漿中のポナチニブの微量代謝物であるAP24567は，野生型BCR-ABL又はT315I変異型BCR-ABLを発現する細胞の増殖を阻害し，その阻害活性はポナチニブの約1/4であった。

(5)　ポナチニブは汎BCR-ABL阻害薬のプロファイルを有する。細胞を用いる試験では，ポナチニブは既承認のBCR-ABL阻害薬に対して抵抗性を付与することが知られている14種類の変異型BCR-ABLを発現する細胞株の増殖を強力に阻害した（IC_{50}値：< 40 nM）。これには，T315Iに加えて，ダサチニブに対して抵抗性を付与することが知られているT315A, F317L及びF317V，並びにニロチニブに対して抵抗性を付与することが知られているY253H，E255K，E255V及びF359Vが含まれる（National Comprehensive Cancer Network, 2012）。さらに，既承認のBCR-ABL阻害薬3薬物全てに対して臨床的に抵抗性を付与する変異体を特定するために使用される，細胞を用いる加速突然変異誘発試験では，40 nM（21 ng/mL）のポナチニブに抵抗性を示すBCR-ABL突然変異は検出されなかった。したがって，患者をこの濃度のポナチニブに曝露した場合，単一突然変異型BCR-ABLを有する細胞の増殖又は出現を抑制できることが予想された。

(6)　ポナチニブは多標的キナーゼ阻害薬であり，BCR-ABL以外の複数のキナーゼに対しても強力な阻害活性を示す。*In vitro* キナーゼ試験で，ポナチニブはRET，FLT3及びKIT，並びにキナーゼファミリーFGFR, PDGFR, VEGFR, EPH及びSRC等の活性を阻害した（IC_{50}値：≤ 20 nM）。これらのキナーゼのうち，細胞モデルでは，RET，KIT及びPDGFRαに対して強力な阻害活性を示し，細胞及び *in vivo* モデルでは，FLT3及びFGFRに対して強力な阻害活性を示すことが確認

された。さらに，それらのモデルにおいて，これらのキナーゼのゲートキーパー変異体の一部に対して有望な活性が認められている。以上の結果から，AML（FLT3-ITD 変異体），子宮内膜がん，膀胱がん及び胃がん（FGFR 変異体），消化管間質腫瘍（KIT 及び PDGFRα 変異体），並びに非小細胞肺がん（RET 及び FGFR 変異体）のような，これらのキナーゼにより誘発される腫瘍で，ポナチニブは臨床的効果を示す可能性が示唆された。

(7)　中枢神経系，心血管系，呼吸系，腎/泌尿器系，消化器系機能及び血小板凝集に対するポナチニブの影響を評価する試験で，ポナチニブは良好な安全性薬理プロファイルを示した。

これらの試験成績より，TKI による前治療に抵抗性又は不耐容を示す CML 又は Ph+ ALL 患者の治療に，強力な汎 BCR-ABL 阻害薬であるポナチニブが有用である可能性が示された。

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　分析法

薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験をサポートするための血漿中ポナチニブ濃度の測定には，液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS）法を用いた。GLP 非適用試験では，バリデーション未実施の分析法を使用したが，GLP 適用試験では全て，バリデーションを実施した分析法を使用した。なお，バリデーション未実施の分析法の精度管理は，適切な品質管理及び評価基準により実施した。ラット及びカニクイザルの血漿試料を- 70°C で保存したとき，ポナチニブは約 600 日間安定であった。血漿タンパク結合率は平衡透析法により測定した。組織内分布試験では，^{14}C-ポナチニブを使用し，バリデーション済みの蛍光イメージング法を用いてオートラジオグラムの解析を行った。*In vitro* 代謝試験及び *in vivo* マスバランス／代謝試験では，^{14}C-ポナチニブを使用し，シンチレーション分光法を用いて定量的に分析した。*In vivo* 及び *in vitro* 代謝物の構造解析は LC/MS/MS 法を使用し，代謝物の MS/MS スペクトルとポナチニブ及びその他の合成標品の MS/MS スペクトルを比較することにより実施した。分析法の詳細は薬物動態試験概要表 2.6.5.2.1 に示す。

2.4.3.2　吸収

CD-1 雌マウスにポナチニブを 2.5，5，10，30 及び 100 mg/kg の用量で単回経口投与したとき，全ての用量群で投与後 2 時間に C_{max} に達した。消失は一相性であり，消失半減期（$t_{1/2}$）は 2.5～30 mg/kg の用量範囲でほぼ一定（2.9～3.6 時間）であった。C_{max} 及び AUC_{24h} は，2.5～30 mg/kg の用量範囲で用量に比例して増加し, 100 mg/kg 投与群では, 10 又は 30 mg/kg 投与群と比較して，用量比を上回っていた。また，100 mg/kg 投与群における代謝物 N-脱メチル体（AP24567）の AUC は未変化体の 22%であった（Report ARP073，2.6.5.3.1）。

SD 雄ラットにポナチニブを 3 mg/kg の用量で急速静脈内投与したときの血中クリアランスは中程度に高く（23.5 mL/min/kg），肝血流量の約 42.5%であった。定常状態における分布容積（V_{ss}）は大きく（17.7 L/kg），広く組織に分布することが示された。血漿からの消失は二相性を示し，初期の速い消失相に続いて，$t_{1/2}$ 9.72 時間の遅い終末消失相が認められた（Report 12ARIAP3，2.6.5.3.2）。

雄カニクイザルにポナチニブを 1 mg/kg の用量で急速静脈内投与したときの血中クリアランスは低く（7.84 mL/min/kg），肝血流量の約 18.0%であった。分布容積は 2.6 L/kg であり，サルにおいても広く組織に分布することが示された。血漿からの消失は二相性を示し，初期の速い消失相に続いて，$t_{1/2}$ が 5.3 時間の終末消失相が認められた（Report ARP050，2.6.5.3.3）。

SD 雄ラットにポナチニブを 15 mg/kg の用量で経口投与したときの吸収は緩やかであり，最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）の平均値は 6.0 時間であった。経口投与後の $t_{1/2}$ は 9.95 時間であり，静脈内投与後と同程度であった。ラットに経口投与したときのバイオアベイラビリティは 54%であった。雄カニクイザルに 2～3 mg/kg の用量（カプセル剤）で経口投与したとき容易に吸収され，平均 t_{max} は 4.0 時間であった。カプセル剤経口投与後の $t_{1/2}$ は 7.1 時間であった。サルにカプセル剤を経口投与したときのバイオアベイラビリティは 20.6%であった。

ラット及びサルの薬物動態パラメータを表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1　　ラット及びサルにポナチニブを単回静脈内又は経口投与したときの薬物動態パラメータ（平均値 ± 標準偏差）

投与経路及び用量	薬物動態パラメータ	ラット	サル
静脈内 ラット：3 mg/kg サル：1 mg/kg	C_0 (ng/mL)	427 ± 298	1219 ± 525
	$t_{1/2}$ (h)	9.72 ± 1.73	5.3 ± 2.6
	CL (mL/min/kg)	26.5 ± 24.2	8.7 ± 2.3
	V_{ss} (L/kg)	17.7 ± 12.4	2.6 ± 0.9
	AUC_∞ (ng·h/mL)	3088 ± 2090	2096 ± 772
経口 ラット：15 mg/kg サル：2～3 mg/kg（カプセル）	C_{max} (ng/mL)	453 ± 68.7	96 ± 57
	t_{max} (h)	6.0	4.0
	$t_{1/2}$ (h)	9.95 ± 2.17	7.1 ± 2.3
	AUC_∞ (ng·h/mL)	8320 ± 1786	942 ± 438
	経口バイオアベイラビリティ(%)	54± 12	20.6 ± 13.9

ラット（毒性試験で使用した動物種の一種）の定常状態における代謝物 AP24600 の曝露量を評価するため，14 日間反復投与試験を実施した。ポナチニブを 1.5 及び 3.0 mg/kg/日の用量で投与したときのポナチニブ及び AP24600 の曝露量は，用量に比例して増加した。AP24600 の曝露量は 1 日目に比べて 14 日目で最大 2.04 倍高く，雄に比べて雌でやや高い傾向が認められた。未変化体に対する代謝物の曝露量比は 1.47～4.50 の範囲であり，大まかに用量増加に伴って上昇した（Report 805799，2.6.5.4.1）。

2.4.3.3　分布

2.4.3.3.1　血漿タンパク結合率及び血液／血漿分配率

ポナチニブの *in vitro* 血漿タンパク結合率は高く，マウス，ラット，サル及びヒト血漿でそれぞれ 99.99%，99.99%，99.78%及び 99.92%であった。さらに，*in vitro* 試験の結果，ポナチニブは高血漿タンパク結合薬物共存下においても，その結合サイトから置換されなかった（Report ARP350，2.6.5.6.4）。

ヒト及びラット血漿中の主要代謝物である AP24600 の血漿タンパク結合率も高く，ラット及び

ヒト血漿中での結合率はそれぞれ 94.7%及び 93.5%であった（Report ARP312，2.6.5.6.2）。

ポナチニブの血液／血漿分配比は，マウス，ラット，サル及びヒト血液中でそれぞれ 1.20, 1.13, 1.11 及び 0.96 であった。マウス，ラット，サル及びヒトにおいて，ポナチニブは赤血球及び血漿中に均等に分布し，赤血球への選択的な分布は認められなかった（Report ARP053，2.6.5.6.1，2.6.5.6.3）。

2.4.3.3.2　各種トランスポーターに対する基質性及び阻害作用評価

ポナチニブは P-gp，BCRP，OATP1B1，OATP1B3 及び OCT1 の基質ではなかった。ポナチニブは OATP1B1，OATP1B3，OCT1，OAT1，OAT3 及び OCT2 を阻害しないが，P-gp，BCRP 及び BSEP を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 0.491, 0.013 及び 32.0 μM であった（Report 11ARIAP5R1, 2.6.5.8.1～2.6.5.8.5）。

2.4.3.3.3　組織内分布

Long-Evans 有色雄ラット及び SD 白色雄ラットに ^{14}C-ポナチニブを経口投与したとき，放射能は全身に広く分布した。有色ラットにおけるポナチニブ由来放射能の分布は白色ラットと同様であった。白色ラットの一部の組織中放射能は，有色ラットに比べて高濃度で推移したが，投与後 168 時間の組織中放射能濃度は同程度であった。有色ラットでは，投与後 672 時間にも多くの組織（43 組織中 27 組織）に放射能が残存していたが（投与量の 0.03%以下），眼（ブドウ膜, 46.655 μg eq./g），脳（髄膜，6.700 μg eq./g）及び副腎（2.572 μg eq./g）を除いて，濃度は 1.0 μg eq./g 未満であった。有色ラットで高い放射能分布が認められた組織（投与量に対する%）は，肝臓（21.33%，4 時間），腎臓（2.03%，2 時間），肺（3.51%，4 時間），脾臓（1.11%，4 時間），心臓（0.43%，4 時間），副腎（0.08%，8 時間）及び脳（0.04%，8 時間）であった。有色ラットの色素含有組織である眼のブドウ膜中濃度（C_{max}：86.632 μg eq./g, 96 時間）は，白色ラットでの濃度（C_{max}：2.099 μg eq./g，24 時間）に比べて著しく高く，ポナチニブ又はその由来成分がメラニンに結合する可能性が示唆された（Report 280N-1101，2.6.5.5.1，2.6.5.5.2）。

2.4.3.4　代謝

非標識体を用いてラット，サル及びヒト肝ミクロソーム及び肝細胞中での代謝試験を実施した。主代謝物として N-脱メチル体（AP24567［M42］）及び N-オキシド（AP24734［M36］），微量代謝物として水酸化体（M31，M32 及び M39）が認められた。非標識ポナチニブを用いた *in vivo* 代謝試験において，AP24567（細胞アッセイで薬理活性が未変化体の 4 分の 1）はラット及びサル血漿中の主要代謝物であると考えられたことから，毒性試験，第 I 相臨床試験及び臨床薬理試験において，ポナチニブ及び AP24567 の血漿中濃度を測定した（2.6.2.2.1 参照）。

動物及び健康被験者に放射性標識体を投与した代謝試験の結果，ポナチニブはアミド結合の酵素的加水分解を受け，カルボン酸代謝物（AP24600［M14］）及びアニリン代謝物（AP24592［M19］）を生成することが明らかになった。また，AP24600 はラット及びヒト血漿中の主要代謝物であるが，サル血漿中では主要代謝物ではなかった。AP24592 及びその代謝物はいずれの動物種においても血漿中に検出されないか，又はごく微量であった。AP24600 には薬理学的活性はなかった（2.6.2.2.1 参照）。これらの知見から，毒性試験及び臨床試験において曝露量をモニターした

AP24567 は，血漿中の主要代謝物ではなく，実際の主要代謝物 AP24600 の曝露量がラット及びヒトでモニターされなかった。ラットにおける AP24600 の曝露量を測定するため，2 週間のトキシコキネティクス試験を実施し，血漿中のポナチニブ及び AP24600 濃度を測定した（Report 805799, 2.6.5.4.1）。

ラット及びサルに ^{14}C-ポナチニブを経口投与したときの血漿，尿及び糞中代謝物の分析を実施した。ポナチニブは酵素的アミド加水分解により AP24600（カルボン酸代謝物）及び AP24592（アニリン代謝物）を生成する。動物及びヒトでの *in vivo* 代謝は，主にこれらがさらに第 I 相及び第 II 相反応を受ける経路であることが明らかとなった。ポナチニブ未変化体も様々な CYP を介した第 I 相反応を受け，その代謝物の大部分は糞中に排泄され，血漿及び尿中における存在量はわずかであった。代謝試験により検出された全ての代謝物を図 2.4-2 に示す。識別番号（M No.）及び推定代謝経路を表 2.4-2 に示す。

表 2.4-2　　ポナチニブの *in vitro* 及び *in vivo* 推定代謝経路

代謝反応		識別番号
第 I 相反応	水酸化	M31, M32, M39
	N-オキシド化（AP24734）	M36
	酸化及びラクタム生成	M25
	ラクタム生成又は不飽和化を伴う N-オキシド化	M33, M38, M41
	不飽和化を伴うラクタム生成	M37, M40, M44
	ラクタム生成を伴う二重酸化	M35
	N-脱メチル化（AP24567）	M42
	N-脱メチル化及び水酸化	M27
	脱ピペラジニル化及びカルボン酸化	M23
	ジヒドロジオール化	M50
	アミド加水分解（AP24600，AP24592）	M14
		M19[a]
第 II 相反応	グルクロン酸抱合	M29
	硫酸抱合	M26
	水酸化及びグルクロン酸抱合	M24
	メチルピペラジンのカルボン酸化及びグルクロン酸抱合	M30
	メチル化	M43, M46, M47, M49
M14（AP24600）の代謝	AP24600 のグルタチオン抱合	M8
	AP24600 のグルクロン酸抱合	M11, M15a, M15,M16
	AP24600 のグリシン抱合	M17
	AP24600 のタウリン抱合	M18
	AP24600 の水酸化及びメチルエステル化	M21, M28
	AP24600 のメチルエステル化（AP25047）	M34
	AP24600 のグルタチオン抱合体（M8）の代謝経路	
	AP24600 のグルタミルシステイン抱合	M3
	AP24600 のメルカプツール酸（N-アセチルシステイン）	M12
	AP24600 の N-アセチル-システイン-スルホキシド抱合	M2
	AP24600 のスルホキシド化	M1
	AP24600 のシステイニルグリシン化	M10
	AP24600 のシステイン抱合	M9
	AP24600 のメチルスルフィド化	M20
M19[a]（AP24592）の代謝	AP24592 のグルクロン酸抱合	M4, M6
	AP24592 の水酸化及びグルクロン酸抱合	M5, M7
	AP24592 の N-脱メチル化	M13
	AP24592 のアセチル化	M22

a：非放射性代謝物であるアニリン AP24592 及びその代謝物は質量分析法によってのみ追跡した。

マウス

マウスにポナチニブを 375 mg/kg の用量で経口投与したときの血漿中代謝物を評価した。血漿中における主要代謝物は AP24600 であり，加えて AP24592 の N-グルクロニド，水酸化 AP24592 の N-グルクロニド，AP24600 のアシルグルクロニド，AP24600 のメチルエステル（AP25047），ポナチニブの N-オキシド（AP24734）及びポナチニブの N-脱メチル体（AP24567）が認められた（Report ARP265，2.6.5.9.1）。

ラット

正常ラット及び胆管カニュレーション（BDC）ラットに ^{14}C-ポナチニブを経口投与したときの0～24 時間血漿中の主要放射能成分は，AP24600（50.2%），AP24600 のメチルエステル（12.1%）及びポナチニブ（19.1%）であった。尿及び血漿中代謝物の大部分は，AP24600 及びその代謝物であった。ラットにおける主要代謝経路は，糞中に排泄される N-脱メチル体 AP24567（投与量の26.1%）の生成並びに尿中に排泄される AP24600 及びその代謝物（投与量の 10%）の生成であった。糞中には，投与量の 39.9%が未変化体として排泄された。胆汁中に認められた主要な代謝物は AP24600 及びそのメチルエステルであった（Report ARP260，2.6.5.9.2）。

ポナチニブから AP24600 への加水分解反応にエステラーゼが関与するかどうかを明らかにするための試験を実施した。非特異的エステラーゼ阻害薬であるリン酸ビス（p-ニトロフェニル）（BNPP）併用下及びポナチニブ単独投与時のポナチニブ及び AP24600 の薬物動態を評価した。静脈内及び経口投与後のポナチニブの C_{max} 及び AUC は, BNPP の経口投与による影響を受けなかった。BNPP の併用により AP24600 の C_{max} 及び AUC は，ポナチニブの静脈内投与ではそれぞれ69%及び 62%低下し，経口投与ではそれぞれ 80%及び 77%低下した。BNPP 併用によるポナチニブ経口投与後の AP24600 の生成は 77%の減少にとどまったことから，ポナチニブから AP24600 への加水分解には，おそらくエステラーゼ以外の酵素も関与していると考えられた。ポナチニブを単独で経口及び静脈内投与したときのポナチニブに対する AP24600 の曝露量比は，それぞれ0.74 及び 0.15 であったことから，AP24600 の生成量はポナチニブの静脈内投与後に比べて経口投与後で非常に多いことが明らかになった（Report ARP261，2.6.5.9.3）。この試験の結果から，ポナチニブは全身循環移行前に AP24600 へと加水分解される可能性が高いと考えられた。

サル

カニクイザルに ^{14}C-ポナチニブを経口投与したときの血漿中の主要成分はポナチニブであり，血漿中総放射能の 56.3%であった。血漿中において代謝物が占める割合は血漿中総放射能の 5%未満であった。AP24600 はサル血漿中ではごく微量（1%未満）の代謝物であった。尿中には, AP24600 並びにそのアシルグルクロニドの 3 種類の異性体及びポナチニブの N-オキシド（AP24734）が認められた。糞中の主要放射能成分は，ポナチニブ及び N-脱メチル体（AP24567）であり，糞中放射能のそれぞれ 34.8%及び 10.9%であった。この他の糞中代謝物が糞中総放射能に占める割合はそれぞれ約 2～4%であった（Report ARP259，2.6.5.9.4）。

ヒト

健康被験者 6 例に ^{14}C-ポナチニブのカプセル剤を 45 mg の用量で経口投与したとき，0～24 時間のプール血漿中に，ポナチニブ（総放射能の 25.5%）並びに代謝物として AP24600（14.9%），AP24600 のグルクロン酸抱合体（3.4%），ポナチニブの N-脱ピペラジニルカルボン酸（7.0%）及びポナチニブのグルクロン酸抱合体（6.0%）が認められた。投与後 24 時間以降の血漿試料の分析において，ポナチニブ及びその N-脱ピペラジニルカルボン酸は投与後 96 時間までの血漿中に認められたのに対して，AP24600 は投与後 36 時間の試料にのみ認められ，投与後 120 及び 144 時間の血漿試料中には認められなかった。また，投与後 24 時間以降の血漿試料中に新たな代謝物は認められなかった。ポナチニブ及び N-脱ピペラジニルカルボン酸は，ヒト血漿中で同様の消失動態を示した。尿中の主要代謝物は AP24600 及びそのグルクロン酸抱合体であった。糞中放射能の主

成分はポナチニブ及び水酸化体（M31）であり，それぞれ糞中総放射能の 23.7%及び 20.4%であった。AP24567 及びメチル化体（M43）は合計で放射能の 13%であった。この他に 7 種の微量代謝物が認められ，それぞれ総放射能の約 2～4%であった。クロマトグラフィーで分離不十分な複数の代謝物も合計で糞中放射能の 17.2%であったが, 個々の代謝物が総放射能に占める割合は 2～3%にすぎなかった（Report ARP257，ARP395，2.6.5.9.5，2.6.5.9.6）。経口投与における主要代謝経路は，水酸化，N-脱メチル化及びメチル化であり，それぞれ投与した放射能の 17.67%，8.32%及び 8.40%に相当した。これらの代謝物は投与量の 30%未満の量であり，これらの代謝経路は全消失に対して大きく寄与するものではないと考えられた。

ヒトで同定された代謝物は，マウス，ラット又はサルにおいて検出された。AP24600 はヒト及びラット血漿中の主要代謝物であったが，サル血漿中での存在量はわずかであった。ラット，サル及びヒト血漿中でポナチニブが総放射能に占める割合はそれぞれ 19.1%，56.3%及び 25.5%であった。AP24600 及びその代謝物は，全ての動物種の尿中に認められた。ラット，サル及びヒトでは，ポナチニブは主に代謝によって消失し，ヒト血漿中で認められた全ての代謝物がラット又はサル血漿中でも検出された。ラット，サル及びヒト血漿中には AP24592 及びその代謝物は認められなかった。

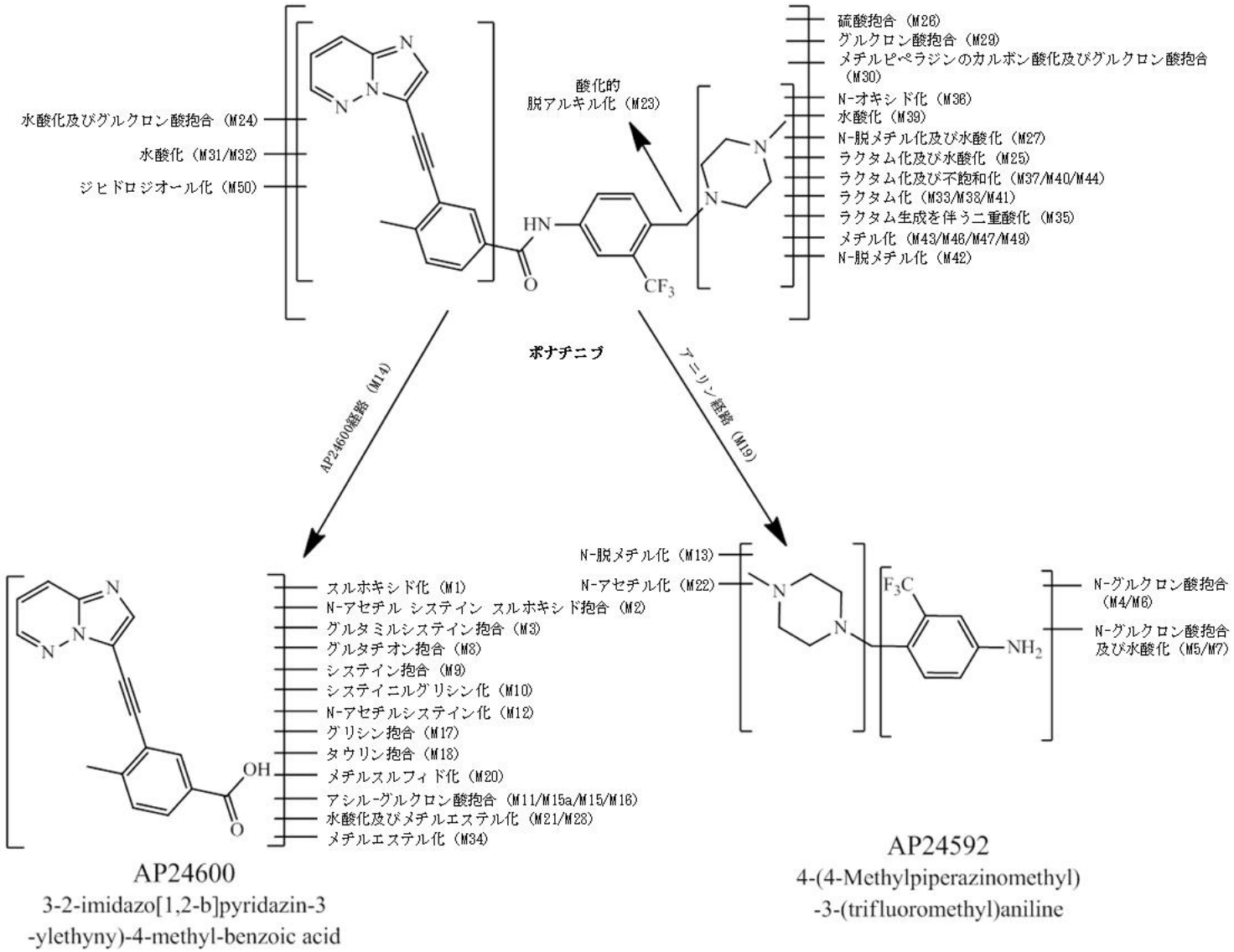


図 2.4-2　　ポナチニブの推定代謝経路

2.4.3.4.1　肝臓及び小腸ミクロソーム，S9 画分及び肝細胞，並びに組換えヒト CYP による *in vitro* 代謝

ラット，サル及びヒト由来の肝臓及び小腸ミクロソーム，S9 画分，並びに肝細胞によるポナチニブの代謝プロファイルは定性的に同様であった。ポナチニブの主代謝経路は，N-脱メチル化，N-オキシド化及び水酸化であった。ヒト肝ミクロソーム／肝細胞により生成した全ての代謝物はラット又はサルのミクロソーム／肝細胞でも認められた。

肝臓及び小腸ミクロソーム，S9 画分，並びに肝細胞とインキュベーションした場合，AP24600 は認められなかった。また，ポナチニブを組換え cDNA 発現ヒトカルボキシルエステラーゼ 1b/1c 及び 2 と共にインキュベーションしたときにも，AP24600 は認められなかった。

反応表現型解析から，ポナチニブは主に CYP3A4 によって代謝され，CYP2D6，CYP2C8 及び CYP3A5 によっても一部代謝されることが明らかになった（Report ARP258, 2.6.5.10.1～2.6.5.10.3）。

2.4.3.4.2　ポナチニブのヒトチトクローム P450 阻害作用及び誘導作用

ヒト肝ミクロソームを用いた検討において，ポナチニブは CYP の可逆的阻害作用を示した。各 CYP 分子種に対する阻害の IC_{50} 値を表 2.4-3 に示す。

表 2.4-3　　ポナチニブによる CYP 可逆的阻害に関する IC_{50} 値

CYP 分子種	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	3A4/5[a]	3A4/5[b]
IC_{50} (μM)	13.3	5.6	6.1	10.8	5.2	11.6	8.3	13.6

a：テストステロン 6β-水酸化
b：ミダゾラム 1'-水酸化

全ての CYP に対する可逆的阻害の阻害定数（Ki）（= IC_{50}/2）は 2.6～6.8 μM の範囲であった。阻害薬としての C_{max}/Ki 比が 0.1 未満である場合（Guidance for Industry: Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing and Labeling, - Recommendations - Draft Guidance, Center for Drug Evaluation and Research ［CDER］, February 2012），また，Ki が非結合型濃度の 50 倍よりも大きい場合（CHMP guideline on the investigation of drug interactions ［CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 - 21 June 2012］），薬物相互作用（DDI）が生じる可能性は低い。

ヒトにポナチニブを 45 mg の用量で投与したときの定常状態の C_{max} は 0.145 μM（77.4 ng/mL）であり（Study AP24534-07-101 CSR），Ki の最低値 2.6 μM の 18 分の 1 未満である。また，ヒト定常状態におけるポナチニブの非結合型 C_{max} は *in vitro* 血漿タンパク結合率試験結果（結合%: 99.92）から 0.000116 μM であり，Ki の最低値 2.6 μM の 22400 分の 1 未満である。ポナチニブは各 CYP に対して時間依存的又は代謝依存的阻害作用を示さなかった。したがって，*in vivo* でポナチニブによって CYP 酵素が阻害されるリスクは低いと考えられる。また，ヒト血漿中主要代謝物であり薬理学的に不活性である AP24600 による 7 種類の CYP 阻害に対する IC_{50} 値は 100 μM を超えており，AP24600 による CYP 阻害によって DDI が起こる可能性は非常に低いと考えられる。

ポナチニブは主に CYP3A4 及び酵素的加水分解によって代謝される。強力な CYP3A4 阻害薬によるポナチニブ代謝の阻害によって，ポナチニブの曝露量が増加する可能性がある。同様に，併

用薬による CYP3A4/5 の誘導によって，ポナチニブの曝露量が減少する可能性がある。ポナチニブはエステラーゼ（又はアミダーゼ）によって AP24600 へと代謝される可能性があるが，エステラーゼ／アミダーゼは遍在性であることから，これらの酵素の阻害によってポナチニブの血漿中濃度が上昇する可能性は非常に低いと考えられる。ラットでの検討において，BNPP 併用によるエステラーゼ／アミダーゼ阻害により，AP24600 の生成が 77～80%減少したが，経口投与したポナチニブの血漿中濃度（又は AUC）の上昇は認められなかった（Report ARP261，2.6.5.9.3）。

ヒト肝細胞で, ポナチニブは 0.2 μM まで, CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 及び Multiple drug resistance protein（MDR）1 の活性又は mRNA 発現を誘導しなかった。検討した最高濃度（2 μM）においても，ポナチニブによる CYP1A2，CYP2B6 及び CYP3A4/5 に対する活性誘導作用の平均値は，それぞれの陽性対照誘導薬による誘導レベルのそれぞれ 10.8%，4.47%及び 10.6%にすぎなかった。さらに，ポナチニブは 2 μM まで，MDR1 の mRNA 発現をほとんど誘導しないか，又は変化させなかった（Report XT103117，2.6.5.12.2）。培養ヒト肝細胞を用いた追加試験において，ポナチニブは 5 μM まで，CYP1A2，CYP2B6 及び CYP3A4/5 活性を誘導しないが（2 倍未満の変化又は陽性対照の 20%未満），CYP3A4/5 活性が濃度依存的に減少することが確認された。同様に，濃度 10 μM までのポナチニブで処理しても，CYP1A2 の mRNA 発現は誘導されなかった。また，肝細胞検体 3 例中 2 例で，2 μM を超える濃度のポナチニブで CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現量の減少が一貫して確認された。CYP3A4 の mRNA 発現量については，ポナチニブ濃度 2 μM の 2 検体で 2 倍をわずかに超える程度の増加が認められた。これらの軽度増加は陽性対照であるリファンピシンの 15%未満であった（Report [redacted]133050，2.6.5.12.3）。以上の結果より，ポナチニブが CYP の誘導によって DDI を誘発する可能性は低いと考えられる。

2.4.3.5　排泄

BDC ラットに ^{14}C-ポナチニブを投与したときの投与後 72 時間までの総放射能回収率の平均値は 103.21%（n = 6）であった。放射能は主に胆汁を介して排泄され（54.36%），糞及び尿中への放射能排泄率はそれぞれ 28.70%及び 9.68%であった。屍体中には，投与した放射能の 9.07%が残存していた。^{14}C-ポナチニブを投与したときの放射能の吸収率は，胆汁，尿及び屍体中回収率の合計から 73.1%と算出された。

ラットに ^{14}C-ポナチニブを投与したときの投与後 120 時間までの総放射能回収率の平均値は 101.44%であった。放射能の大部分（88.38%）は糞中に排泄された。尿中には総放射能の 10.15%が排泄され，屍体中には投与した放射能の 2.09%が残存していた。投与後 0～72 時間の尿及び糞中の放射能排泄率が 97.3%であったことから，経口投与した放射能の排泄は 3 日間でほぼ完了することが示された（Report ARP260，2.6.5.13.1，2.6.5.14.1）。

サルに ^{14}C-ポナチニブを投与したとき，投与後 168 時間までの放射能の総回収率（平均）は 88.95%（n = 3）であった。サル 3 例中 2 例で嘔吐が認められ，投与した放射能のそれぞれ 22.12%及び 12.22%が嘔吐物に含まれていた。サルでは，投与量の 70.35%（嘔吐物を含めると，合計で 81.80%）が糞中に排泄された。尿中には投与後 168 時間までに投与した放射能の 2.2%が排泄された。ケージ残渣，ケージ洗浄液及びケージ拭き取り中の回収率は合計で 4.98%であった（Report ARP259，2.6.5.13.2）。

ヒト（健康被験者）に ^{14}C-ポナチニブを 45 mg の用量で経口投与したときの尿及び糞中の総放

射能排泄率は92.01%であった。尿及び糞への放射能排泄率（平均値）は，それぞれ5.38%及び86.63%であった。投与量の大部分（回収率 96.77%）は投与後 192 時間以内に排泄された（Report ARP257, 2.6.5.13.3）。

動物及びヒトにポナチニブを投与したときの主排泄経路は糞中排泄であった。

2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用

非臨床試験動物種を用いた *in vivo* 薬物相互作用試験は実施しなかった。

In vitro 試験において，イブプロフェン，ニフェジピン，プロプラノロール，サリチル酸，ワルファリンのような高血漿タンパク結合薬物によって，ポナチニブがヒト血漿タンパク質の結合部位から置換されることはなかった。したがって，臨床においてポナチニブの血漿タンパク結合部位からの置換によって薬物相互作用が起きる可能性は低いと考えられた。

ポナチニブの CYP による代謝を検討した *in vitro* 試験から，ポナチニブは主に CYP3A4 によって代謝され，これより少ない程度で CYP2D6，CYP2C8 及び CYP3A5 によって代謝されることが明らかとなった。したがって，CYP3A4 誘導薬及び阻害薬を併用投与したとき，ポナチニブは薬物相互作用の影響を受ける可能性がある。

ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 阻害試験において，CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 及び CYP3A に対するポナチニブの IC_{50} 値は 5.2～13.6 μM の範囲であり，Ki 値（IC_{50}/2）は 2.6～6.8 μM の範囲であった。ヒトにポナチニブを 1 日 1 回 45 mg の用量で投与したときの定常状態の C_{max} は 0.145 μM（77.4 ng/mL）であり（Study AP24534-07-101 CSR），Ki の最低値 2.6 μM の 18 分の 1 未満である。また，ヒト定常状態におけるポナチニブの非結合型 C_{max} は 0.000116 μM であり，Ki の最低値 2.6 μM の 22400 分の 1 未満である。ポナチニブは代謝依存的又は時間依存的阻害薬ではなく，薬理学的に不活性なヒト血漿中主要代謝物 AP24600 も CYP の阻害薬ではない。以上のことから，臨床適用量においてポナチニブの CYP 阻害に基づく薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。

培養ヒト肝細胞を最高 10 μM のポナチニブで処理しても，CYP1A2, CYP2B6 及び CYP3A4/5 活性が誘導されることはなかった。したがって，臨床的な血漿中濃度においてポナチニブの CYP 誘導に基づく薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。

ポナチニブは排出トランスポーターである P-gp 及び BCRP の基質ではなく，OATP1B1, OATP1B3 及び OCT1 の基質でもなかった。また，ポナチニブは OATP1B1，OATP1B3，OCT1, OAT1, OAT3 及び OCT2 を阻害しないが，P-gp，BCRP 及び BSEP をそれぞれ，IC_{50} 値 0.491，0.013 及び 32.0 μM で阻害した。したがって，P-gp 又は BCRP の基質をポナチニブと併用投与した場合，それらの血漿中濃度を上昇させる可能性がある。評価したその他のトランスポーターに対する阻害薬及び基質とポナチニブが臨床的な薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられる。

2.4.4　毒性試験

主要な毒性試験は全て GLP に準拠して実施した。主要な毒性試験の概要を表 2.4-4 に示す。全ての試験でポナチニブはクエン酸緩衝液（pH 2.75）に溶解して投与した。

表 2.4-4　　主要な毒性試験の概要

試験の種類	動物種／系統	試験期間	投与量 (mg/kg)	1 群あたりの 雌雄各動物数	試験又は報告書番号
単回投与毒性試験	CD-1 マウス	単回投与	0, 50, 150, 450	主試験：10 TK 試験：24	QAA00123
	Sprague Dawley ラット	単回投与	0, 10, 30, 100	主試験：10 TK 試験：8	QAA00120
	カニクイザル	単回投与	0, 5, 15, 45	主試験：2	QAA00124
反復投与毒性試験	Sprague Dawley ラット	4 週間投与＋ 4 週間休薬	0, 1.5, 3, 6	主試験：10 回復試験：5 TK 試験：8	QAA00122
		6 ヵ月間投与＋ 2 ヵ月間休薬	0, 0.25, 0.75, 2	主試験：15 回復試験：10 TK 試験：9	QAA00193
	カニクイザル	4 週間投与＋ 4 週間休薬	0, 1, 2.5, 5	主試験：3 回復試験：2	QAA00121
		6 ヵ月間投与＋ 2 ヵ月間休薬	0, 0.25, 0.75, 2	主試験：4 回復試験：2	QAA00194
遺伝毒性試験	ネズミチフス菌／大腸菌を用いる復帰突然変異試験	*in vitro*	10～5000 μg/プレート	NA	6843-152
	培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験	*in vitro*	0.375 – 30 μg/mL	NA	6843-153
	マウス小核試験	*in vivo*	125, 500, 1000, 2000	主試験：5	6843-154
がん原性試験	Sprague Dawley ラット	最長 101 週間	雄：0, 0.05, 0.1, 0.2 雌：0, 0.2, 0.4, 0.8	主試験：75 TK 試験：20	805826
受胎能及び着床までの初期胚発生毒性試験	Sprague Dawley ラット	雄：交配前 28 日～剖検前日 雌：交配前 14 日～妊娠 7 日	0, 0.25, 0.75, 1.5	主試験：25 TK 試験：6	2424-001
胚・胎児発生毒性試験	Sprague Dawley ラット	妊娠 7～17 日	0, 0.3, 1, 3	主試験：25 TK 試験：6	20009232
新生児を用いた毒性試験	Sprague Dawley ラット	分娩後 15～35 日	0, 0.75, 1.5, 3	主試験：10 回復試験：5 TK 試験：3/採血ポイント	902650
光毒性試験	Long Evans ラット	単回投与	0, 2.5, 5, 10	主試験：5 TK 試験：3	20011779

2.4.4.1　単回投与毒性試験

2.4.4.1.1　マウス

試験番号 QAA00123，データを 2.6.7.5.1 に示す。

マウスを用いた単回経口投与毒性／TK 試験では，1 群あたり雌雄各 10 例のマウスにポナチニブを投与量 0，50，150 及び 450 mg/kg で単回投与した。これに加えて，別途サテライト群を設け，マウスにポナチニブを同一投与量で投与し，TK パラメータを求めた。

投与後 2 週間の観察期間中，死亡例はみられず，50 及び 150 mg/kg 投与群で一般状態の変化は観察されなかった。450 mg/kg 投与群で粗毛，並びに体重増加量及び摂餌量の可逆的な減少が認められた。いずれの投与群でも，観察期間終了時に実施した血液学的検査及び血液生化学的検査に変化はみられず，剖検でも肉眼的異常は認められなかった。

本試験における概略の致死量は 450 mg/kg を超えると考えられた。マウスにポナチニブを単回投与した場合の無毒性量（NOAEL）は 150 mg/kg であった。

2.4.4.1.2　ラット

試験番号 QAA00120，データを 2.6.7.5.1 に示す。

ラットを用いた経口投与による急性毒性／TK 試験では，1 群あたり雌雄各 10 例のラットを主試験群に無作為に割り付け，ポナチニブを投与量 0，10，30 及び 100 mg/kg で単回投与した。これに加えて，別途サテライト群（1 群あたり雌雄各 8 例）を設け，ラットにポナチニブを同一用量で投与し，TK パラメータを算出した。

主試験群では，10 mg/kg 投与群の動物に一般状態の変化はみられなかったが，例外として，雌雄各 1 例で疎毛が観察された。10 mg/kg 投与群では，網状赤血球，アルブミン及び A/G 比の一過性低下も認められた。TK サテライト群では，10 mg/kg 投与群で雌 1 例の死亡が 2 日目に発見されたが，この死亡は採血手技に関連していた可能性が高いと考えられた。

100 mg/kg 投与群では，雄 10 例中 8 例及び雌 10 例全例が 3～7 日目に死亡又は瀕死状態に至った。また，TK サテライト群の 100 mg/kg 投与群で雌 1 例の死亡が 3 日目に発見された。さらに，30 mg/kg 投与群の雌 2 例が 5 日目に瀕死状態に至ったため，安楽死に供した。病理組織学的検査により，これらの多くの動物の瀕死状態及び死亡はポナチニブ投与に伴う免疫抑制（リンパ球枯渇による影響）に関連があると考えられた。免疫抑制の二次的影響として細菌性敗血症が認められ，敗血症／血流低下／ショックによる二次的影響と考えられる多数の全身組織に変化が観察された。さらに，100 mg/kg 投与群の一部の早期死亡例で，膵臓外分泌腺及び腸陰窩上皮細胞の単細胞壊死が認められた。

30 及び 100 mg/kg 投与群における一般状態の変化として，体重及び摂餌量減少，粗毛，フレーク状乾燥皮膚，皮膚紅斑，疎毛，前肢腫脹，鼻若しくは眼周囲の赤色乾燥物質の付着，排便減少，円背位及び嗜眠が観察された。このほかに 100 mg/kg 投与群では，眼瞼下垂，削痩，努力呼吸，冷感及び粘膜蒼白化が認められた。

30 及び 100 mg/kg 投与群における血液学的及び血液生化学的検査では，網状赤血球数及び血小板数の減少，並びに好中球（30 mg/kg 投与群のみ），単球及び好塩基球数の増加，アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT），アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）（100 mg/kg

投与群のみ），γ グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）及び血中尿素窒素（BUN）の上昇，並びに総タンパク，アルブミン及び A/G 比の低下が認められた。

ラットにポナチニブを単回経口投与した場合の NOAEL は 10 mg/kg，概略の致死量は 30 mg/kg と考えられた。

2.4.4.1.3　サル

試験番号 QAA00124，データを 2.6.7.5.1 に示す。

サルを用いた経口投与による急性毒性／TK 試験では，1 群あたり雌雄各 2 例のサルにポナチニブを投与量 0，5，15 及び 45 mg/kg で単回投与した。全ての投与量で 14 日間の観察期間中の忍容性は良好であった。特記すべき一般状態の変化として，15 及び 45 mg/kg 投与群のフレーク状乾燥皮膚及び軽度から中等度の皮膚紅斑のみが認められた。また，15 又は 45 mg/kg 投与群の一部動物で 2，3 及び 4 日目頃に軽度から重度の軟便が集中的に観察された。これらの症状はポナチニブ投与と関連している可能性が考えられた。15 及び 45 mg/kg 投与群で投与後 1 週目に，軽微かつ可逆的な体重及び摂餌量の減少が認められた。血液学的検査，血液生化学的検査，凝固検査及び尿検査にポナチニブ投与と関連する変化は認められなかった。

投与後 13 日に実施した理学的検査より，45 mg/kg 投与群の雄 1 例及び 5 mg/kg 投与群の雌 1 例で収縮期心雑音が認められた。試験前の理学的検査では心雑音はみられなかった。後述のとおり，心雑音はカニクイザルを用いた 28 日間反復投与毒性試験の一部動物でも，投与終了時近くに認められ，28 日間の休薬期間中に回復することが明らかになった。この心雑音がポナチニブの直性作用か，又はストレス若しくは他の生理学的要因に起因した二次的な影響か否かは不明である。大動脈及びその他の弁の検査を含め，剖検及び病理組織学的検査では，これらの動物の心臓に関連する所見は認められなかった。

病理組織学的検査の結果，15 mg/kg 投与群の雌 2 例中 1 例，並びに 45 mg/kg 投与群の雄 2 例中 1 例及び雌 2 例中 2 例で甲状腺に濾胞萎縮が観察された。この変化は軽微から軽度に分類され，45 mg/kg 投与群の雌で程度が高かった。45 mg/kg 投与群の雄 2 例及び雌 1 例で腹部，胸部，前肢，頸部又は陰嚢の皮膚に白色病巣が認められた。これらの白色巣は，病理組織学的に軽微な角化亢進であった。

対照群，並びに 5 及び 15 mg/kg 投与群の雌雄で，脾臓の白脾髄にリンパ濾胞過形成が観察されたが，この所見はカニクイザルで典型的に認められる背景所見（自然発生病変）である。しかし，45 mg/kg 投与群では，雌雄いずれにも白脾髄に濾胞過形成は検出されなかった。最高投与量群の全ての動物で，このような予想される背景所見が認められなかったことは，ポナチニブ投与と関連している可能性があり，本薬の免疫抑制作用が示唆される。

試験期間中，死亡例は認められず，全ての用量でポナチニブの忍容性は良好であった。したがって，概略の致死量は 45 mg/kg を超えると考えられた。カニクイザルにポナチニブを 5 mg/kg の用量で単回経口投与した場合の忍容性は良好であったが，心雑音の根本的な原因及びポナチニブ投与との関連はあるとしても不明であった。心雑音が低投与量群でも認められたことから，当該試験における NOAEL は，より慎重に評価すると 5 mg/kg 未満と考えられた。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

2.4.4.2.1　ラットにおける 28 日間経口投与毒性試験

試験番号 QAA00122，データを 2.6.7.7.1 に示す。

ラットを用いた 28 日間投与毒性試験では，雌雄ラットにポナチニブを投与量 0（溶媒），1.5，3 及び 6 mg/kg/日（計 4 群）で 1 日 1 回経口投与した。

主試験群の 6 mg/kg/日投与群では，30 例中 7 例（雄 2 例，雌 5 例）が 5～9 日目に死亡後に発見されるか，又は瀕死状態のために屠殺された。この高投与量群では，動物の健康状態の悪化が認められたため，投与を中止し，本来，28 日間の投与期間終了時に剖検する予定であった動物を 9 日目（雌）及び 10 日目（雄）に屠殺した。当初の予定では回復性試験に供することになっていた動物については，残りの投与期間を通して，予定されていた休薬期間終了時まで継続して観察した。これらの休薬群の動物 1 例（雌）を 13 日目に瀕死状態のために屠殺した。加えて，TK サテライト群の 6 mg/kg/日投与群の雌 2 例を 7 日目に瀕死状態のために屠殺し，雄 1 例の死亡が 14 日目に発見された。

主試験群の 3 mg/kg/日投与群では，30 例中 3 例（雄 1 例，雌 2 例）が 9～13 日目に死亡後に発見されるか，又は瀕死状態のために屠殺された。このほかに雌 1 例が採血後の 8 日目に死亡後に発見されたが，ポナチニブ投与との関連はないと考えられた。これに加えて，TK サテライト群の 3 mg/kg/日投与群の動物 3 例（雄 2 例，雌 1 例）が 12，24 及び 28 日目に死亡後に発見され，薬物投与と関連していると考えられた。したがって，3 mg/kg/日投与群での 46 例中 6 例（13%）の死亡はポナチニブ投与との関連があると考えられた。

主試験群の 1.5 mg/kg/日投与群では，30 例中 1 例（雄）の死亡が 28 日目に発見された。この死亡は外傷性や偶発的原因によるものではなかったことから，ポナチニブ投与と関連があると考えられた。したがって，毒性部分の動物 30 例中 1 例（3%）の死亡，すなわち，1.5 mg/kg/日投与群の 46 例中 1 例（2%）の死亡はポナチニブ投与と関連があると考えられた。

3 及び 6 mg/kg/日投与群の早期死亡に関連した一般状態の変化として，粗毛，食欲不振，削痩，嗜眠，円背位，冷感，眼／鼻／顔面／前肢周囲の乾燥赤色物質付着（ポルフィリン着色），排便減少，尿による被毛の汚れ，暗黄色尿，眼瞼下垂及び努力呼吸が観察された。多数の早期死亡例で前肢のフレーク状乾燥皮膚も認められた。病理組織学的検査で関連した所見は認められなかったが，多数の早期死亡例で消化管拡張が観察された。6 mg/kg/日投与群の多数の早期死亡例で，中等度の副腎皮質壊死及び軽度から重度の胸腺壊死（リンパ球枯渇）も認められ，ストレスの二次的影響と考えられた。死亡又は瀕死状態の原因となる病理組織学的変化は特定されなかった。

投与期間中，3 及び 6 mg/kg/日投与群では，体重増加量及び摂餌量の減少が認められた。

ポナチニブ投与に関連した典型的な血液学的検査の変化として，全ての投与量で散発的に，好中球数，単球数及び好酸球数の平均値の軽度増加，並びにリンパ球数の減少が認められたが，3 及び 6 mg/kg/日投与群で最も顕著であった。

全ての用量のポナチニブ投与群で ALT，AST，BUN，グルコース及びトリグリセリド濃度が一過性に上昇した。しかし，これらの変化は軽度であり（概して対照値の 2 倍未満），毒性学的意義は乏しいと考えられた。ポナチニブを投与量 1.5 又は 3 mg/kg/日で反復投与することにより，投与期間終了時点で甲状腺ホルモンのトリヨードチロニン（T3）が軽度に減少した。しかし，病理

組織学的検査では，これらの変化に関連する甲状腺の所見は観察されなかった。

9 又は 10 日目に屠殺した 6 mg/kg/日投与群の動物から採取した組織の病理組織学的検査では，骨髄の軽微から中等度の顆粒球系細胞過形成及び軽微から軽度の大腿骨骨端軟骨板の軟骨過形成が観察された。また，胃の様々な所見として，前胃の扁平上皮角化亢進，粘膜下織水腫，並びに腺胃部及び前胃部の散発的な粘膜壊死も認められた。さらに，6 mg/kg/日投与群の多数の雌雄で，9 又は 10 日目に軽微から重度の胸腺壊死が認められた。3 mg/kg/日投与群では，28 日間の投与期間終了時点で，雌 7 例中 3 例に大腿骨骨端軟骨板の軟骨過形成が認められた。1.5 mg/kg/日投与群では，本試験の投与終了時の病理組織学的検査で，ポナチニブ投与に関連した変化は認められなかった。休薬期間終了時では, ポナチニブ投与に関連した病理組織学的所見は認められなかった。

全ての投与群の 1 日目，6 mg/kg/日投与群の 8 日目（投与中止前），1.5 及び 3 mg/kg/日投与群の 15 及び 28 日目にポナチニブの TK パラメータをモニタリングした。

6 mg/kg/日投与群の 8 日目（投与中止前）における定常状態での TK パラメータから，平均 C_{max} は雄で 170 ng/mL，雌で 162 ng/mL，AUC 平均値は雄で 2970 ng·h/mL，雌で 2510 ng·h/mL であった。

28 日目の最終投与後の平均 C_{max} は, 1.5 mg/kg/日投与群の雄で 57 ng/mL, 雌で 51 ng/mL, 3 mg/kg/日投与群の雄で 101 ng/mL，雌で 65 ng/mL であった。また，AUC 平均値は，1.5 mg/kg/日投与群の雄で 938 ng·h/mL，雌で 704 ng·h/mL，3 mg/kg/日投与群の雄で 1500 ng·h/mL，雌で 1220 ng·h/mL であった。

ラット 28 日間投与毒性試験における NOAEL は 1.5 mg/kg/日未満であった。

2.4.4.2.2　　ラットにおける 6 ヵ月間経口投与毒性試験

試験番号 QAA00193，データを 2.6.7.7.2 に示す。

ラット（1 群あたり雌雄各 25 例）を用いた 6 ヵ月間投与毒性試験では，ポナチニブを投与量 0（溶媒），0.25，0.75 及び 2 mg/kg/日（計 4 群）で連日経口投与した。

0.25 mg/kg/日投与群の 1 例で原因不明の死亡がみられたが，溶媒対照群でも同様の発現頻度で原因不明の死亡が認められ，ポナチニブ投与と関係はないと考えられた。

0.75 mg/kg/日投与群の 68 例中 3 例（4.4%）でポナチニブ投与に関連する死亡が認められた。

2 mg/kg/日投与群で 20 例（68 例中 20 例：29.4%）の想定外の死亡がみられたが，いずれの動物でも，外傷性や偶発的原因によるものではないと考えられた。2 mg/kg/日投与群の瀕死及び早期死亡例でポナチニブ投与に関連する所見として，胸腺，脾臓及びリンパ節のリンパ球枯渇が認められ，これに加えて，大腿骨骨髄の低細胞性も観察された。また，0.75 及び 2 mg/kg/日投与群でポナチニブに関連した所見として，大腿骨骨梁骨の減少を伴うこともある骨端軟骨板の軟骨細胞減少が認められた。

ポナチニブを投与量 0.75 及び 2 mg/kg/日で投与した場合，対照群と比較して，平均体重及び摂餌量の減少が認められた。

0.75 及び 2 mg/kg/日投与群におけるポナチニブ投与と関連があると考えられる血液学的パラメータの変化として，好中球数，単球数及び好酸球数の平均値の増加のみが認められた。これらの増加と関連した病理組織学的変化として，雄及び雌でそれぞれ包皮腺及び陰核腺に炎症が認められた。これに加えて，ポナチニブ投与に関連してフィブリノーゲン濃度が用量依存的に上昇し，

これも包皮腺及び陰核腺の炎症所見と関連していると考えられた。

2 mg/kg/日投与群におけるポナチニブ投与に関連する血液生化学的パラメータの変化として，BUN 及びクレアチニンの上昇，並びにアルブミン，グロブリン及び総タンパクの低下が認められた。また，尿検査より，2 mg/kg/日投与群で尿タンパク濃度の上昇が明らかになった。これらの血液生化学的検査及び尿検査の変化に関連して，慢性進行性腎症の出現頻度の上昇が認められた。尿タンパク質の濃度上昇は，休薬期間終了時にも顕著な変化のままであった。

6 ヵ月間の投与期間終了時における病理組織学的検査では, 0.25 mg/kg/日投与群でポナチニブ投与と関連する変化は認められなかった。2 mg/kg/日投与群では胸腺のリンパ球枯渇が認められた。0.75 及び 2 mg/kg/日投与群で対照群と比較して大腿骨の骨端軟骨板に軟骨細胞の減少が認められた。溶媒及びポナチニブ投与群の一部動物の腎臓で慢性進行性腎症が認められたが，この所見の出現頻度及び程度は 2 mg/kg/日投与群で高く，加齢ラットでみられる腎臓病変がポナチニブの高用量投与により悪化したことが示唆された。慢性進行性腎症はラットで認められる加齢性変化である。慢性進行性腎症はげっ歯類に特異的な所見であることから，通常，化学物質に関連したこの増悪所見をヒトのリスク評価で外挿するのは適切でないとみなされる。2 ヵ月間の休薬期間終了時には，胸腺のリンパ球枯渇は観察されなくなったものの，0.75 及び 2 mg/kg/日投与群での大腿骨の変化，並びに 2 mg/kg/日投与群の腎臓の変化は残存していた。

投与期間終了時点での血漿中ポナチニブ濃度の C_{max} 平均値は，0.25 mg/kg/日投与群の雄で 5.7 ng/mL，雌で 4.3 ng/mL，0.75 mg/kg/日投与群の雄で 27.8 ng/mL，雌で 23.2 ng/mL，2 mg/kg/日投与群の雄で 85.5 ng/mL，雌で 61.0 ng/mL であった。また，AUC 値は，0.25 mg/kg/日投与群の雄で 92 ng·h/mL, 雌で 24 ng·h/mL, 0.75 mg/kg/日投与群の雄で 445 ng·h/mL, 雌で 374 ng·h/mL, 2 mg/kg/日投与群の雄で 1434 ng·h/mL，雌で 1064 ng·h/mL であった。

ラットにポナチニブを 6 ヵ月間連日経口投与した場合の NOAEL は 0.25 mg/kg/日であった。

要約

要約すると，ラットを用いた 28 日間及び 6 ヵ月間投与毒性試験の両試験でリンパ系器官のリンパ球枯渇が観察された。したがって，ラットにポナチニブを投与した場合の主要な毒性学的標的器官はリンパ系器官であると特定された。胸腺，脾臓及びリンパ節のリンパ球枯渇は，投与中止することで回復することが示された。

ラットの両試験で骨端軟骨板の軟骨細胞の過形成性／低形成性変化も認められた。

さらに，6 ヵ月間投与試験では，好中球数，単球数，好酸球数の増加及びフィブリノーゲン濃度の上昇を伴う炎症性変化が包皮腺及び陰核腺に認められた。

6 ヵ月間投与試験では加齢に伴う慢性進行性腎症の悪化が認められ，これに関連して，BUN 及びクレアチニン濃度の上昇，血清アルブミン，グロブリン及び総タンパクの低下，並びに尿タンパク濃度の上昇が認められた。しかし，これらの所見は，サルでは認められなかったことから，ラットに特異的な所見であると考えられた。

28 日間投与試験では，病理組織学的検査で胃の変化が認められるとともに，形態学的変化を伴わない血液生化学的パラメータの変化（肝酵素活性の軽度上昇及び血清 T3 の低下）が認められたが，6 ヵ月間投与試験では認められなかった。したがって，これらの所見の毒性学的意義は不明である。

2.4.4.2.3　カニクイザルにおける 28 日間経口投与毒性試験

試験番号 QAA00121，データを 2.6.7.7.3 に示す。

カニクイザルを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験では，雌雄カニクイザルにポナチニブを投与量 0（溶媒），1，2.5 及び 5 mg/kg/日（計 4 群）で投与した。

5 mg/kg/日投与群の動物 3 例を瀕死状態のために安楽死させた（19 日目に雌 1 例，21 日目に雄 1 例，22 日目に雄 1 例）。これらの動物で早期屠殺前に認められた一般状態の所見は，脱水，眼漏（透明又は緑色），重度の軟便，円背位，嗜眠，掻く動作（頸部及び顔面），広範なフレーク状乾燥皮膚，軽度から重度の皮膚紅斑，横臥，鼻周囲の乾燥赤色物質付着，粘膜蒼白化，悪液質及び口腔内潰瘍形成であった。これらの動物では，体重減少，摂餌量の減少又は無も認められた。さらに，屠殺時点で認められた BUN 及びクレアチニンの上昇は，病理組織学的検査で関連する腎臓所見が観察されなかったことから，脱水症状によるものと考えられた。これらの動物では，アルブミン平均濃度が投与前値と比較して低下し，グロブリン濃度が上昇した結果，最終の A/G 比が低下した。早期死亡例の屠殺時に血清電解質にも様々な変化が認められた。これらの動物のうち 2 例でトリグリセリドが投与前値と比較して上昇した。これらの動物の死亡時の栄養状態は不良であり，悪液質が認められたことから，これらの変化がポナチニブの直接作用である可能性は低いと考えられた。

5 mg/kg/日投与群の早期死亡例で認められたポナチニブ投与に関連する主な病理組織学的所見は，リンパ系器官，甲状腺，皮膚及び膵臓に認められた。全ての早期死亡例で，複数のリンパ系器官にリンパ球枯渇が認められ，胸腺で最も顕著な変化が認められた。リンパ球枯渇が観察されたにもかかわらず，これらの動物で末梢血中のリンパ球数が大きく変化することはなかった。その他のポナチニブ投与に関連した所見として，甲状腺の軽度な多巣性濾胞萎縮，膵臓の軽微な腺房細胞壊死及び複数部位の皮膚の角化亢進が観察された。5 mg/kg/日投与群の早期死亡 3 例全例で，屠殺時の血清中の甲状腺刺激ホルモン（TSH），T3 及びチロキシン（T4）濃度に変化が認められ，甲状腺の病変を反映していると考えられた。また，ポナチニブ投与に関連している可能性がある変化として，早期に死亡した雄 2 例で精巣の生殖細胞上皮の軽度な変性が認められた。この変化は，これらの動物のストレス／悪液質の二次的な影響であると考えられたが，ポナチニブの直接的な影響である可能性を否定することはできなかった。

予定された屠殺時まで生存した動物で，ポナチニブを 5 mg/kg/日で 28 日間連続経口投与により，フレーク状乾燥皮膚及び軽度から重度の皮膚紅斑が観察され，これに伴い皮膚を掻く動作が時折認められた。5 mg/kg/日投与群で認められた軟便の発現頻度及び程度は，低用量群及び対照群の動物と比較して高かった。

ポナチニブ 2.5 mg/kg/日投与時の忍容性は良好であったが，例外として，雌 1 例で 5 mg/kg/日投与群の一部の早期死亡例で認められたものと同様な一般状態の変化が認められた。しかし，これらの所見のうち，5 mg/kg/日投与群で認められた程度に達したものはなかった。この雌動物で認められた一般状態の変化は，21～26 日目の中等度から重度の軟便，26 日目の冷感，25～30 日目の嗜眠，28～30 日目の粘膜蒼白化であった。これらの所見は長期間にわたり発現し，5 mg/kg/日投与群の動物で認められた徴候と類似していたことから，これらの所見はポナチニブ投与と関連していると考えられた。

ポナチニブを投与量 1, 2.5 又は 5 mg/kg/日で経口投与した場合, 投与前値と比較して体重減少, 又は対照群と比較して体重増加抑制が認められた。最大の体重減少は 5 mg/kg/日投与群の動物で認められた。2.5 及び 5 mg/kg/日投与群の雄，並びに 1，2.5 及び 5 mg/kg/日投与群の雌で摂餌量減少がみられた。体重及び摂餌量の減少傾向は 28 日間の休薬期間中に回復した。

投与最終週の理学的検査では, 1 mg/kg/日投与群の雄 1 例, 2.5 mg/kg/日投与群の雌 1 例, 5 mg/kg/日投与群の雌雄各 1 例に収縮期心雑音が認められた。試験前の理学的検査では，これらの動物及び他の動物で心雑音は検出されなかった。28 日間の回復性試験に供した低投与量及び高投与量群の雄では，休薬期間終了時には心雑音が認められなかった。この心雑音がポナチニブの直接作用なのか，又はストレス若しくは他の生理学的要因の二次的影響か否かは不明である。大動脈及びその他の弁を含め，剖検所見及び病理組織学的検査では，これらの動物の心臓に関連する所見は認められなかった。その後実施したカニクイザルの 6 ヵ月間経口投与毒性試験では，心雑音は認められなかった。

このほかに投与最終週に 5 mg/kg/日投与群で認められた理学的検査では，フレーク状乾燥皮膚，眼漏，軽度の脱水，肺雑音（高用量群及び中用量群の雄各 1 例）及び腹部膨満若しくは腸管内ガス貯留が観察された。皮膚乾燥及び眼漏を除き，これらの所見は，1 又は 2.5 mg/kg/日投与群の動物でも散発的に認められた。休薬期間終了時に実施した理学的検査では，ポナチニブ投与に関連した所見は認められなかった。

投与期間中又は休薬期間終了時では，眼科学的検査及び質的な心電図検査に異常は認められなかった。

投与期間終了時に実施した病理組織学的検査では，ポナチニブ投与に関連した所見として，2.5 mg/kg/日投与群の雌及び 5 mg/kg/日投与群の雌雄でリンパ球枯渇が認められた。このほかに，2.5 及び 5 mg/kg/日投与群で用量依存性のない甲状腺の濾胞萎縮（多くの場合，T3 濃度の低下及び TSH 濃度の上昇傾向を伴う），5 mg/kg/日投与群の雄で様々な膵臓の変化（腺房細胞壊死，線維素性炎，線維化及び腺房細胞萎縮），5 mg/kg/日投与群の雌雄で皮膚の広範な痂疲形成又は角化亢進が観察された。また，投与期間終了時に実施した病理組織学的検査でポナチニブ投与に関連している可能性がある所見として，5 mg/kg/日投与群の動物の卵巣で閉鎖卵胞の増加が認められ，精巣で軽微な生殖細胞の変性が認められた。この卵巣変化は子宮内膜の萎縮を伴っていた。これらの精巣及び卵巣変化は，これらの動物のストレス／悪液質による二次的な影響と考えられたが，ポナチニブの直接的な影響である可能性を否定することはできなかった。休薬期間終了時までに認められたポナチニブ投与に関連した病理組織学的所見は, 5 mg/kg/日投与群の残りの雄 1 例での軽度な甲状腺の多巣性濾胞萎縮のみであった。1 mg/kg/日投与群の病理組織学的検査ではポナチニブ投与に関連した変化は認められなかった。

28 日目の最終投与後の C_{max} 平均値は，1 mg/kg/日投与群の雄で 20 ng/mL，雌で 16 ng/mL，2.5 mg/kg/日投与群の雄で 114 ng/mL，雌で 145 ng/mL，5 mg/kg/日投与群の雄で 272 ng/mL，雌で 662 ng/mL であった。また，AUC 値は，1 mg/kg/日投与群の雄で 162 ng·h/mL，雌で 115 ng·h/mL，2.5 mg/kg/日投与群の雄で 1240 ng·h/mL, 雌で 1670 ng·h/mL, 5 mg/kg/日投与群の雄で 4310 ng·h/mL, 雌で 7000 ng·h/mL であった。

カニクイザルにポナチニブを 28 日間連続経口投与した場合の NOAEL は 1 mg/kg/日であった。

2.4.4.2.4　カニクイザルにおける 6 ヵ月間経口投与毒性試験

試験番号 QAA00194，データを 2.6.7.7.4 に示す。

カニクイザルを用いた 6 ヵ月間投与毒性試験では，4 群の動物にポナチニブを投与量 0（溶媒），0.25，0.75 及び 2 mg/kg/日で経口投与した。

ポナチニブの短期間の反復投与毒性試験で認められた所見から判断して，この 6 ヵ月間投与毒性試験の投与量選択は適切であると考えられた。しかし，2 mg/kg/日投与群では，比較的強い毒性発現が予想されたが，認められた毒性は予想よりも軽度であった。その理由として，予想された曝露量と比較して，実際の曝露量が低かったことが原因である可能性は高い。28 日間投与毒性試験の 2.5 mg/kg/日投与群の定常状態（28 日目）における AUC 値は，雄及び雌でそれぞれ 1240 及び 1670 ng·h/mL であったのに対し，6 ヵ月間投与毒性試験の 2 mg/kg/日投与群の定常状態（182 日目）での AUC 値は，雄及び雌でそれぞれ 533 及び 681 ng·h/mL であった。

本試験期間中に死亡はなく，全ての投与量で忍容性は良好であった。一般状態，体重，摂餌量，眼科学的検査，心電図検査（定性的評価），血液学的検査，凝固系検査，甲状腺ホルモン，器官重量，剖検及び病理組織学的検査所見にポナチニブ投与に関連した変化は認められなかった。

本試験で散発的に発現したか，又は用量依存性が認められなかったため，偶発的と考えられた一般状態の変化として，常同運動，軽度から重度の軟便，フレーク状乾燥皮膚，及び軽度から重度の皮膚紅斑が観察された。しかし，軟便，フレーク状乾燥皮膚及び皮膚紅斑は他の試験でも認められ，ポナチニブ投与との関連性が明らかになっている。したがって，本試験でみられたこれらの症状は，ポナチニブ投与と関連している可能性がある。

0.25, 0.75 及び 2 mg/kg/日投与群で 6 ヵ月間の投与期間終了時に，数例の動物で ALT 値及び AST 値の上昇が認められたが，これらの変化は全て 2 ヵ月間の休薬期間終了時までに回復した。これらの変化は数例の動物で一貫して認められたものではなく，関連する病理学的変化が認められず，可逆的であったことから，試験報告書に照らして毒性とは考えられなかった。ただし，これらはポナチニブ投与に関連したものであると考えられ，試験報告書でこの 6 ヵ月間投与毒性試験での NOAEL は 2 mg/kg/日とされたが，より慎重に評価すると，本試験における NOAEL は 0.25 mg/kg/日未満と考えられた。これは，全てのポナチニブ投与群の数例で臨床的に重要であると考えられる ALT 値及び AST 値の上昇が認められたことを反映している。

投与期間終了時の C_{max} 平均値は，0.25 mg/kg/日投与群の雄で 2.7 ng/mL，雌で 3.3 ng/mL，0.75 mg/kg/日投与群の雄で 21 ng/mL，雌で 12 ng/mL，2 mg/kg/日投与群の雄で 57 ng/mL，雌で 88 ng/mL であった。また，AUC_{24h} 値は，0.25 mg/kg/日投与群の雄で 19 ng·h/mL，雌で 17 ng·h/mL，0.75 mg/kg/日投与群の雄で 141 ng·h/mL，雌で 78 ng·h/mL，2 mg/kg/日投与群の雄で 533 ng·h/mL，雌で 681 ng·h/mL であった。

上記で考察したように，投与期間終了時に全投与量群の一部動物で ALT 及び AST 値に対する影響が認められたことから判断して，カニクイザルにポナチニブを 1 日 1 回 6 ヵ月間経口投与した場合の NOAEL は 0.25 mg/kg/日未満と考えられた。これは，試験報告書に示されている 2 mg/kg/日の NOAEL よりも慎重に評価した。

要約

要約すると，サルの 28 日間投与毒性試験では毒性が発現した標的器官として，リンパ系器官，

甲状腺，膵臓及び精巣／卵巣が特定された。これらの変化は，6 ヵ月間投与毒性試験では認められなかったが，これは 6 ヵ月間投与試験でのポナチニブ曝露量が予想よりも低かったことに関係している可能性が高い。サルを用いた反復投与毒性試験及び単回投与毒性試験の特に高用量投与時に，皮膚に痂疲形成，過角亢進及び紅斑の変化が認められた。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

ICH S2(R1)ガイドラインに従い一連の標準的な遺伝毒性試験を実施し，ポナチニブの遺伝毒性を評価した。ネズミチフス菌及び大腸菌試験菌株を用いた標準的な Ames 試験により，*in vitro* での復帰突然変異誘発能を検討した（試験番号 6843-152，データを 2.6.7.8.1 に示す）。また，ヒトリンパ球を用いて，*in vitro* での染色体異常誘発能を検討した（試験番号 6843-153，データを 2.6.7.8.2 に示す）。さらに，マウス小核試験において，ポナチニブの染色体異常誘発能を *in vivo* で検討した（試験番号 6843-154，データを 2.6.7.9.1 に示す）。

上記のいずれの試験においても陰性結果が得られ，ポナチニブは遺伝毒性を示さないと考えられた。

2.4.4.4　がん原性試験

試験番号 805826，データを 2.6.7.10.1 に示す。

雄ラットにポナチニブを投与量 0.05，0.1 及び 0.2 mg/kg/日，雌ラットに投与量 0.2，0.4 及び 0.8 mg/kg/日で最長 101 週間まで経口投与し，一般状態の観察，体重及び摂餌量の測定，剖検所見及び病理組織学的検査を実施した。

本試験では，ポナチニブの投与に関連した一般状態及び摂餌量の変化はみられなかった。

雄では，0.1 mg/kg/日以上の投与群で投与 51 週以降に溶媒対照群と比較して平均体重のわずかな減少（5～9%）がみられ，最長投与 83 週まで統計学的に有意な体重減少が認められたが，投与 84 週から試験終了までの平均体重は溶媒対照群と同程度であった。雄ラットではがん原性は認められなかった。

雌では，0.2 mg/kg/日以上の投与群において投与に関連した平均体重の減少（4～22%）が認められた。病理組織学的検査において，ポナチニブの投与に関連した腫瘍性所見として，0.4 及び 0.8 mg/kg/日投与群の雌で卵巣の性索間質性過形成及び混合型性索間質性良性腫瘍，並びに 0.8 mg/kg/日投与群で陰核腺の扁平上皮癌の発生頻度上昇が認められた。非増殖性又は非腫瘍性所見として，0.4 及び 0.8 mg/kg/日投与群の雌で腸管の拡張，炎症，浮腫あるいは平滑筋肥大，脾臓の線維化あるいは萎縮の出現頻度上昇，並びに肝臓の胆管過形成が認められ，ポナチニブの投与に関連するものと考えられた。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

2.4.4.5.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

試験番号 2424-001，データを 2.6.7.12.1 に示す。

ラットを用いたポナチニブの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では，無処置動物と交配した雌雄ラットを用い，ポナチニブを 0.25，0.75 及び 1.5 mg/kg/日で経口投与した。雌は妊

娠 13 日に帝王切開を実施した。一般状態，体重，摂餌量，病理解剖所見，性周期，精子パラメータ，生殖能（交尾及び受胎能）を評価した。

本試験では，死亡動物はみられなかった。一般状態の観察において，投与に関連した変化は認められなかった。いずれの投与群においても，性周期及び交配成績（雌雄）に影響はみられず，ポナチニブを投与した雄と交尾した無処置雌の子宮内所見にも変化は認められなかった。また，精子検査，生殖器重量，剖検所見又は精巣の病理組織学的検査に変化は認められなかった。

0.25 mg/kg/日投与群では，体重及び摂餌量に変化はみられなかった。

0.75 mg/kg/日以上の投与群では，ポナチニブの投与に関連した体重減少及び体重増加抑制が認められた。

1.5 mg/kg/日投与群の雌では，着床数及び生存胚の減少，吸収胚の増加，着床前及び着床後胚損失率の増加が認められた。ポナチニブに関連した器官重量の変化は，統計学的に有意な頚部を含む子宮重量の減少（絶対重量の平均値は，対照群と比較して約 31%減少）が認められたのみであり，着床前及び着床後胚死亡の増加が寄与したものと考えられる。

したがって，雌雄ラットの一般毒性に関する NOAEL は 0.25 mg/kg/日，雌雄の生殖能に関する NOAEL はそれぞれ 0.75 mg/kg/日及び 1.5 mg/kg/日と考えられた。

2.4.4.5.2 胚・胎児発生に関する試験

Study 20009232，データは毒性試験概要表 2.6.7.13.1 に示す。

妊娠ラットにポナチニブを投与量 0.3, 1 及び 3 mg/kg/日で妊娠 7 日から 17 日まで経口投与した。妊娠 21 日に帝王切開し，子宮を観察した。全ての胎児について外表検査を実施した。また，各同腹児の約半数は内臓検査，残りの胎児は骨格検査を実施した。

0.3 mg/kg/日投与群では，母動物に毒性はみられず，胎児発生に影響は認められなかった。この投与量の定常状態での AUC 値は 36 ng·h/mL（ヒト AUC の約 0.03 倍）であった。

1 mg/kg/日投与群では，母動物に毒性は認められなかったが，胎児には複数の内臓異常及び骨格異常，並びに骨化遅延が認められた。定常状態での AUC 平均値は 314 ng·h/mL（ヒト AUC の約 0.24 倍）であった。

3 mg/kg/日投与群では，母動物の毒性として，死亡（4%），体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。また，胎児への影響として，着床後死亡の増加（早期，後期及び総吸収胚），体重減少，外表異常，複数の内臓異常及び骨格異常，並びに骨化数の変異が認められた。定常状態での平均 AUC は 1275 ng·h/mL（ヒト AUC の約 1 倍）であった。母動物の一般状態に関する NOAEL は 1 mg/kg/日，発生毒性に関する NOAEL は 0.3 mg/kg/日と考えられた。

これらの試験成績より，第二の動物種を用いた胚・胎児発生に関する試験を追加する必要はないと ICH S9 ガイドラインに従い判断されたため，該当試験を実施しなかった。

2.4.4.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験

ポナチニブのように進行がん患者の治療を目的した医薬品の場合, ICH S9 ガイドラインに従い，出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は必要としないと判断されたために実施しなかった。

2.4.4.5.4　　新生児を用いた試験

試験番号 902650，データを 2.6.7.15 に示す。

ポナチニブの小児を対象とする臨床試験を計画する上で必要なデータを収集するため，幼若ラットに離乳前から離乳後までポナチニブを経口投与した後，4 週間の休薬期間を設定した毒性試験を実施し，ポナチニブの毒性に対する幼若動物の感受性を成熟動物と比較し検討した。幼若ラットにポナチニブを投与量 3.0 mg/kg/日で分娩後 15 日から 35 日まで 1 日 1 回経口投与した場合，投与開始後 6 又は 7 日に炎症性変化に関連する死亡が認められた。ポナチニブの明白な毒性に対する幼若ラットのこのような高い感受性は，ポナチニブの初回投与後の血漿中ポナチニブ濃度が成熟ラットと比較して幼若ラットで高かったことによると考えられた。分娩後 35 日のポナチニブ曝露量は，分娩後 15 日の曝露量と比較して大幅に低かった。幼若ラットに分娩後 15 日から 35 日まで，ポナチニブを投与量 0.75 及び 1.5 mg/kg/日で投与した場合，離乳前及び初期離乳後投与期間中, 明らかな体重増加抑制が認められたが, 分娩後 35 日から 63 日までの投与後には回復した。重要なこととして，幼若ラットで明白な毒性及び体重増加量に対する影響が確認されたにもかかわらず，当該試験では，これ以外に幼若ラットの発生毒性パラメータ（膣開口，包皮分離又は骨幅及び長さの計測）に対する影響は認められなかった。全ての投与量で体重に影響が認められたことから，幼若ラットでのポナチニブの NOAEL は推定できなかった。しかし，重要な発生毒性指標に関する NOAEL は 1.5 mg/kg/日と推定された。

2.4.4.5.5　　乳汁排泄

ポナチニブの乳汁排泄に関する動物試験の成績は得られていない。ポナチニブ及びその代謝物がヒト乳汁中に排泄されるか否かは不明である。

2.4.4.6　　局所刺激性試験

ポナチニブの局所刺激性は反復投与毒性試験内で評価した。

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験で軟便が認められおり，ポナチニブの反復投与と関連している可能性があると考えられた。

2.4.4.7　　その他の毒性試験

2.4.4.7.1　　光毒性試験

試験番号 20011779，データを 2.6.7.17.1 に示す。

有色ラットにポナチニブを投与量 2.5，5 及び 10 mg/kg で単回経口投与した。投与後 8 時間（ラット血漿中ポナチニブ濃度の t_{max}），擬似太陽光を 30 分間照射し，皮膚及び眼を 3 日間観察後，眼科学的検査及び病理組織学的検査を実施した。

2.5 mg/kg 投与群で皮膚及び眼に変化はみられなかった。光照射時点の血漿中ポナチニブ平均濃度は 73 ng/mL であり, ヒトに 45 mg/日の用量で投与した場合の定常状態における C_{max}（77.4 ng/mL）と同程度であった。

5 mg/kg 投与群で皮膚に変化はみられなかった。眼には軽度の光毒性とみなされる水晶体上皮の過形成が観察された。投与後 8 時間での血漿中ポナチニブ平均濃度は 169 ng/mL であった。

10 mg/kg 投与群で皮膚に変化はみられなかった。眼には軽度の光毒性とみなされる角膜水腫，炎症性変化及び水晶体上皮の過形成が観察された。投与後 8 時間での血漿中ポナチニブ平均濃度は 380 ng/mL であった。

2.4.4.7.2　免疫毒性試験

ポナチニブの免疫毒性は反復投与毒性試験内で評価した。ラット及びサルにおいても，ポナチニブ投与によりリンパ系器官に可逆的なリンパ球枯渇が誘発されたことから，ポナチニブはヒト曝露量以上に相当する高用量で免疫抑制作用を示す可能性が高いと考えられた。

2.4.4.7.3　代謝物の毒性試験

ヒト血漿中で認められる全ての代謝物が動物でも定性的に検出されている。したがって，ポナチニブの主要代謝物の安全性は反復投与毒性試験内で評価されたと考えられる。

2.4.4.7.4　不純物の毒性試験

ポナチニブの不純物プロファイルを 3.2.S.3.2「不純物」に，最終製造規格を 3.2.S.4.1「規格」に示す。ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験及び臨床試験で検討したバッチ内に各規格設定不純物が存在していた（2.6.7.4 参照），又はそれぞれの存在量が原薬中の不純物閾値に関する ICH ガイドライン（ICH Q3A Guidance）で許容される濃度であったことから，各規格設定不純物の安全性は確認されていると考えられた。

2.4.5　総括及び結論

ポナチニブはタンパク質の構造情報に基づく計算化学的医薬品分子設計法により発見された低分子型チロシンキナーゼ阻害薬であり，BCR-ABL の活性部位に対して高い親和性で最適な結合を示すよう設計されているとともに，T315I 変異体の 315 位のかさ高いイソロイシン残基により引き起こされる立体障害を回避できる新たな炭素間三重結合を持っている。細胞を用いる試験では，ポナチニブは野生型 BCR-ABL 及び検討した全ての変異型 BCR-ABL（T315I を含む）に対して強力な抑制活性を示した。さらに，ポナチニブは濃度 40 nM（21 ng/mL）で全ての単一突然変異体の出現を抑制することも明らかになった。野生型又は T315I 変異型 BCR-ABL を発現する腫瘍を移植したマウスにポナチニブを経口投与することにより，BCR-ABL シグナル伝達が阻害され，腫瘍の縮小及び生存期間の延長効果が認められた。これらの非臨床試験成績より，強力な汎 BCR-ABL 阻害薬としてのポナチニブの特徴が裏付けられた。

ポナチニブを経口投与したときのバイオアベイラビリティ，代謝経路及び代謝物プロファイルを明らかにするため，*in vitro* 及び *in vivo* ADME 試験を実施した。マウス，ラット及びカニクイザルにポナチニブを経口投与したとき，吸収されて全身循環に入ることが明らかになった。ラット及びサルにポナチニブを経口投与したときの吸収は緩徐であり，t_{max} はそれぞれ 6 及び 4 時間であった。ラット及びサルに経口投与したときのバイオアベイラビリティはそれぞれ 54.0%及び 20.6%であった。静脈内投与後の終末相半減期は，ラットで 9.7 時間，サルで 5.3 時間であった。ラットでの血中クリアランスは中程度であったが，カニクイザルでは低かった。

ラットに ^{14}C-ポナチニブを経口投与したとき，放射能は全身に広く分布した。^{14}C-ポナチニブ由

来放射能のメラニンへの結合性が示唆された。ポナチニブの血漿タンパク結合率は高く，マウス，ラット，サル及びヒト血漿でそれぞれ，99.99%，99.99%，99.78%及び 99.92%であった。ポナチニブは P-gp，BCRP 及び OCT1 の基質ではなかった。ポナチニブは OATP1B1，OATP1B3，OCT1，OAT1，OAT3 及び OCT2 の阻害薬ではなかった。一方，ポナチニブは P-gp，BCRP 及び BSEP に対し阻害作用を示し，IC_{50} 値はそれぞれ 0.491，0.013 及び 32.0 μM であった。

ポナチニブの *in vitro* での主な代謝経路は，N-脱メチル化及び N-オキシド化であり，ヒト及び試験した動物種間で類似していた。ポナチニブは主に CYP3A4 によって代謝され，CYP2D6，CYP2C8 及び CYP3A5 によっても一部が代謝された。*In vivo* においてポナチニブはアミド結合の加水分解を受けて，カルボン酸代謝物及びアニリン代謝物を生成した。AP24600 はラット及びヒト血漿中の主要代謝物であったが，サル血漿中では主要代謝物ではなかった。AP24600 がさらに代謝された代謝物は，主に尿及び血漿中に認められた。治療量を投与したときの C_{max} に相当する濃度では，ポナチニブは CYP 阻害作用及び誘導作用を示さなかった。ポナチニブは CYP の可逆的，代謝依存的又は時間依存的阻害作用を示さなかった。AP24600 にも CYP 阻害作用はなかった。

ラット，サル及びヒトにポナチニブを経口投与したときの主要排泄経路は糞中排泄であり，尿中には投与量の 2～10%のみが回収された。全体として，ポナチニブは主に代謝により消失した。

ポナチニブは IC_{50} 値 2.33 μM で hERG 電流を阻害した。この IC_{50} 値は，ヒトに治療量 45 mg のポナチニブを 1 日 1 回投与した場合の定常状態における C_{max}（0.145 μM）の約 16 倍に相当する。テレメトリー装置を装着したイヌに 10 mg/kg を経口投与した場合，4 例中 1 例で QTc 間隔の延長が認められた。しかし，この所見の持続時間は短く，全身曝露量が最高値に達する以前と考えられる早い時点で認められた所見であることから，この所見とポナチニブ投与との因果関係は疑わしい。この動物の QTc 間隔は，全身曝露量が最高値に達すると予想される時点より前に投与前値に回復し，24 時間の観察期間の残り時間を通して投与前値に維持された。イヌでの無影響量を 10 mg/kg とみなし、臨床用量 45 mg と体表面積あたりの用量（ヒト等価用量）で比較すると、約 7.4 倍の安全域が確保された。第 I 相用量漸増試験で QTcF 間隔及びポナチニブの薬物動態と薬力学との関係を検討した結果，ポナチニブは被験者の心室再分極に対して顕著な影響を及ぼさないことが明らかになった。

カニクイザルを用いた単回投与毒性試験及び 28 日間反復投与毒性試験で認められた収縮期心雑音の意義は不明である。収縮期心雑音は，ポナチニブ投与とある程度の関連があると考えられるが，この心雑音はポナチニブの直接作用なのか，ストレス又は他の生理学的要因に起因する二次的作用なのかは不明である。ポナチニブの臨床試験では，収縮期心雑音の報告はなかった。

ポナチニブの患者における推奨用量は 45 mg/日である。ポナチニブの毒性に対する動物種の感受性が比較的高いことから，反復投与毒性試験及び胚・胎児発生に関する試験では，ヒトに 45 mg/日を経口投与した場合に得られる曝露量との比較より安全域を推定することはできなかった。ヒトでは，非臨床試験で不耐容であった曝露量を上回る臨床曝露量のポナチニブが忍容されることが明らかになっている。したがって，基礎疾患の重篤性を考慮すると，本薬の治療による利益は推定されるリスクを上回ると考えられる。

リンパ系器官でのリンパ球枯渇を特徴とするリンパ系器官の毒性は，反復投与毒性試験に共通してみられた所見であり，ポナチニブの免疫抑制作用が示唆される。

サルを用いた 28 日間反復投与毒性試験での毒性学的標的器官は膵臓であり，これに関連して，臨床プログラムでの用量制限毒性として膵炎が特定された。ヒトでは，膵酵素の上昇及び膵炎が認められている。臨床での膵炎の大部分は，治療初期の 30 日間に発現した。膵炎及び膵酵素上昇は，通常，短期間の投与中断により管理され，大部分の患者でポナチニブ投与が再開された。

28 日間反復投与毒性試験では，甲状腺ホルモン濃度の変化に関連して，病理組織学的検査で甲状腺に変化が認められたが，ヒトでは，甲状腺ホルモン濃度に特記すべき変化は認められなかった。ラットを用いた 28 日間及び 6 ヵ月間投与毒性試験で大腿骨に認められた病理組織学的変化は，サルを用いた 28 日間及び 6 ヵ月間投与毒性試験では認められなかったため，種特異的な変化と考えられた。ただし，イマチニブ及びおそらくその他の TKI でも，長期投与を受けた小児で発育遅延という問題が起きていることから（Suttorp 2010），小児にポナチニブを投与する場合，成長のモニタリングを行う必要がある。

反復投与毒性試験では，臨床的に意味のある曝露量以下で軽度の肝酵素上昇が認められたが，肝臓の病理組織学的検査でこれに関連する組織学的変化は認められなかった。臨床試験で肝酵素（ALT 及び AST など）上昇が認められたが，これらの所見は概して軽度から中等度であり，大部分の患者でポナチニブ投与が継続された。ポナチニブの臨床開発プログラムで薬剤性肝障害に関する Hy's Law に該当する症例は確認されていない。

反復投与毒性試験では，臨床的に意味のある曝露量でフレーク状乾燥皮膚が共通して認められた。臨床試験では皮膚乾燥及び発疹を含む皮膚事象が高頻度に報告された。これらの事象は概して軽度から中等度であり，これらにより，ポナチニブ投与が中止されることはなかった。

一連の標準的な遺伝毒性試験でポナチニブは遺伝毒性を示さなかった。

妊娠ラットにポナチニブを器官形成期中に経口投与した場合，胚・胎児毒性が認められた。幼若ラットでは，成熟ラットと比較して血漿中濃度が高くなるため，ポナチニブ毒性に対する感受性は高くなると考えられるが，新生児を用いた毒性試験では，ポナチニブは重要な発生毒性パラメータに悪影響を及ぼさなかった。

サルを用いた 28 日間反復投与毒性試験では，ポナチニブに関連すると推定される所見として，5 mg/kg/日投与群の雄で精子細胞数の減少を伴う生殖細胞の変性，雌で子宮内膜の萎縮を伴う閉鎖卵胞の増加が認められた。これらの変化は，これらの動物のストレス／悪液質による二次的な影響と考えられたが，受胎能に対するポナチニブの直接的影響である可能性は否定できない。

光毒性試験で皮膚に変化は認められなかった。軽度の光毒性として，5 mg/kg 投与群で水晶体上皮の過形成，10 mg/kg 投与群で角膜水腫及び炎症性変化，並びに水晶体上皮の過形成が認められた。臨床試験では軽度から中等度の視覚障害が散発的に報告されたが，眼光毒性に関する報告はなかった。

以上，ポナチニブを既存の TKI による前治療に抵抗性又は不耐容な CML 及び Ph+ ALL 成人患者への適応で承認申請する場合，これらの非臨床安全性評価は承認申請を支持できるものと考えられた。

2.4.6 参考文献

Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. Lancet Oncol. 2007 Nov;8(11):1018-29.

Bradeen HA, Eide CA, O'Hare T, Johnson KJ, Willis SG, Lee FY, et al. Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. Blood. 2006 Oct 1;108(7):2332-8.

Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science. 1990 Feb 16;247(4944):824-30.

Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas DA, Kantarjian HM. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia- current concepts and future perspectives. Rev Clin Exp Hematol. 2002 Jun;6(2):142-60; discussion 200-2.

GLEEVEC (imatinib mesylate) Tablets for Oral Use Prescribing Information. Novartis Pharmaceuticals Corporation: East Hanover, NJ. January 2012.

Gramza AW, Corless CL, Heinrich MC. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors. Clin Cancer Res. 2009 Dec 15;15(24):7510-8.

ICH Guidance for Industry: Q3A Impurities in New Drug Substances

ICH Guideline for Industry: S1A The Need for Long-term Rodent Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals

ICH Topic S 9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals

Khorashad JS, Milojkovic D, Mehta P, Anand M, Ghorashian S, Reid AG, et al. In vivo kinetics of kinase domain mutations in CML patients treated with dasatinib after failing imatinib. Blood. 2008 Feb 15;111(4):2378-81.

Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. Nat Med. 2012 Mar;18(3):375-7.

Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res. 2009 Jul 1;15(13):4263-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1123.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines Version 2.2012 Chronic myelogenous leukemia. National Comprehensive Cancer Network. 2012;Version 2.

O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. Blood. 2007 Oct 1;110(7):2242-9.

O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. Cancer Cell. 2009 Nov 6;16(5):401-12.

Quintás-Cardama A, Han X, Kantarjian H, Cortes J. Tyrosine kinase inhibitor-induced platelet dysfunction in patients with chronic myeloid leukemia. Blood. 2009 Jul 9;114(2):261-3. doi: 10.1182/blood-2008-09-180604. Epub 2009 May 4.

Shah NP, Skaggs BJ, Branford S, Hughes TP, Nicoll JM, Paquette RL, Sawyers CL. Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. J Clin Invest. 2007 Sep;117(9):2562-9.

Smith CC, Wang Q, Chin CS, Salerno S, Damon LE, Levis MJ, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. Nature. 2012 May 10;485(7397):260-3.

Sprycel® (dasatinib) Tablet for Oral Use Prescribing Information. Bristol-Myers Squibb: Princeton, NJ. October 2011.

Suttorp M, Millot F. Treatment of pediatric chronic myeloid leukemia in the year 2010: use of tyrosine kinase inhibitors and stem-cell transplantation. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010;2010:368-76.

Tasigna® (nilotinib) Capsules Prescribing Information. Novartis: East Hanover, NJ. October 2011.

Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. Nat Rev Cancer. 2010 Feb;10(2):116-29.

Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nat Rev Cancer. 2009 Jan;9(1):28-39.