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）

2.6.1 緒言

大塚製薬株式会社

目次

目次 2
略号一覧 3
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 申請する適応症 4
2.6.1.1.1 疾患 4
2.6.1.1.2 作用機序 5
2.6.1.1.3 用法及び用量 5
2.6.1.1.4 構造及び薬理学的特性 5
2.6.1.1.5 非臨床開発計画 6
2.6.1.2 参考文献 7

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）
ALL	急性リンパ性白血病（acute lymphoblastic leukemia）
AP-	移行期（Accelerated phase）
ATC 分類	解剖治療化学分類（Anatomical Therapeutic Chemical Classification）
BCR	切断点クラスタ領域（Breakpoint Cluster Region）
BCR-ABL	BCR と ABL 融合遺伝子及びそのタンパク質産物
BP-	急性転化期（blast phase）
CML	慢性骨髄性白血病（Chronic myeloid leukemia）
CP-	慢性期（Chronic phase）
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）
FLT3	Fms 様チロシンキナーゼ 3（FMS-like tyrosine kinase 3）
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）
IC_{50}	50%阻害濃度（Concentration producing 50% inhibition）
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonisation）
INN	国際一般名（International Nonproprietary Name）
IUPAC	（International Union of Pure and Applied Chemistry）
JAN	日本医薬品一般的名称（Japanese Accepted Names）
KIT	幹細胞因子受容体 SCFR（v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog）
PDGFR	血小板由来増殖因子受容体（Platelet-Derived Growth Factor Receptor）
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）
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
TKI	チロシンキナーゼ阻害薬（Tyrosine kinase inhibitor）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

2.6.1.1　申請する適応症

ポナチニブは, チロシンキナーゼ阻害薬（TKI）による前治療に抵抗性又は不耐容を示す慢性期, 移行期又は急性転化期の慢性骨髄性白血病（CML）成人患者，若しくはフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病（Ph+ ALL）の成人患者に適応される。

2.6.1.1.1　疾患

CML は，成人における白血病の約 15～20%を占めるクローン性骨髄増殖性疾患である（Deininger et al, 2000; Pinilla-Ibarz et al, 2008）。CML の根本原因は，造血幹細胞における 9 番染色体と 22 番染色体の相互転座 t（9;22）により生じる融合がんタンパク質 BCR-ABL である。フィラデルフィア染色体又は Ph+と呼ばれるこの染色体異常は，CML 患者全体の約 95%にみられ，急性リンパ性白血病（ALL）成人患者の約 20～25%にも認められる（Conter et al, 2004; National Cancer Institute, 2011a）。転座によって切断点クラスタ領域（BCR）遺伝子のコード配列と Abelson murine leukemia virus の発がん遺伝子（ABL）のチロシンキナーゼコード領域の融合が誘導される。この融合の結果，ABL キナーゼ活性の恒常的活性化が起きる。BCR-ABL は，細胞の増殖及び生存に寄与する複数の下流経路を活性化する（Hazlehurst et al, 2009）。

通常，CML は慢性期（CP-CML），移行期（AP-CML）及び急性転化期（BP-CML）の 3 つの病期を経て進行し，疾患の特徴及び予後は，各病期で異なる。慢性期が最も長く，10 年以上続く場合もある（Padmanabhan et al, 2008）。しかし，一旦 AP-CML へ移行すると，生存期間の中央値は一般的に 1 年未満となり，BP-CML 期の患者（急性白血病と類似）の生存期間は通常わずか数ヵ月である。患者の大部分は CP-CML と診断され，無症状であるか，若しくは疲労，貧血，体重減少，寝汗又は脾腫大などの症状を呈する。

CML は稀な疾患であるが（OrphaNet, National Organization on Rare Diseases），より多くの患者，特に CP-CML に治療を受けた患者が，最新の治療法により生存するようになると，有病率は大幅に上昇すると予想される（Jemal et al, 2006; Siegel et al, 2012）。

ALL は，リンパ系細胞が悪性化して異常に増殖する疾患である。米国において，2008 年時点で白血病に罹患している又は寛解状態で生存中の患者数は 274,930 人と推定され，このうち 58,854 例（21%）が ALL 患者であった（National Cancer Institute, 2011b）。ALL 患者の大部分に染色体及び遺伝子の異常が認められ，成人 ALL 患者の約 25%は Ph+であり，BCR-ABL の転座があることで，予後不良となる（Radich, 2001）。

イマチニブ，ダサチニブ及びニロチニブのような，BCR-ABL キナーゼドメインを標的とする TKI は, CP-CML, AP-CML, BP-CML 及び Ph+ ALL の望ましい治療薬である（NCCN guidelines 2012, ELN）。しかし，多数の患者がこれらの治療に対して不耐容に至り，BCR-ABL キナーゼドメインの遺伝子突然変異又は別様式の抵抗性を示して，疾患の制御不能に陥る。複数の文献において解説されているように（Jones et al, 2009; Terasawa et al, 2010; O'Hare et al, 2011），BCR-ABL 変異の中で，イマチニブが結合できなくなる ABL キナーゼドメインの点突然変異は，イマチニブ治療に

対する抵抗性を示す唯一の主な原因であり，抵抗性を示す症例の約 40～50%を占める（Branford et al, 2003; Jabbour et al, 2006）。同様に，ダサチニブ又はニロチニブに対する抵抗性を示す固有の BCR-ABL 遺伝子変異が特定されており，これには，ダサチニブに抵抗性を示す V299L，T315A，F317L/V/I/C 変異及びニロチニブに抵抗性を示す Y253H，E255K/V，F359V/C/I 変異が含まれる（NCCN guidelines 2012）。重要なこととして，イマチニブ，ダサチニブ及びニロチニブはいずれも，抵抗性ゲートキーパーT315I 変異体に対して一様に無効である（Hughes et al, 2006）。

以上を要約すると，TKI が導入されて CML 治療が大幅に進歩したにもかかわらず，既存の TKI への抵抗性又は不耐容により，かなりの割合の患者が時間経過に伴い治療中止に至っている。ABL キナーゼドメインに突然変異があることが多いこのような患者の治療選択肢は限られており，第二世代の TKI による奏効率は低く，効果持続時間も限られていると考えられる。したがって，TKI による前治療に抵抗性又は不耐容を示した CML 又は Ph+ ALL 患者，特に，現在治療法が存在しない T315I 変異を有する患者において，医療上のアンメットニーズは大きい。そこで，野生型 BCR-ABL キナーゼ及び発現する可能性のある一連の変異型 BCR-ABL キナーゼに強力な抑制活性を示し，このような変異体の出現抑制に役立つ新たな治療薬，すなわち，汎 BCR-ABL 阻害薬は依然として必要である。

2.6.1.1.2　　作用機序

ポナチニブは野生型BCR-ABL キナーゼに高い親和性で結合する強力な汎BCR-ABL 阻害薬であり，炭素間三重結合を含む構造的要素により，変異型 ABL キナーゼに対しても高い親和性で結合することができる。

ポナチニブは野生型 ABL 及び T315I 変異型 ABL の両方のキナーゼ活性を阻害し，50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 0.37 及び 2.0 nM であった。細胞を用いるアッセイ系において，ポナチニブは BCR-ABL キナーゼドメインの変異を介したイマチニブ，ダサチニブ及びニロチニブ抵抗性株に対しても効果を示した。また，細胞を用いる加速突然変異誘発試験において，ポナチニブに対して抵抗性を示す BCR-ABL 変異体が検出されることもなかった。野生型又は T315I 変異型 BCR-ABL キナーゼを発現する担がんマウスにおいて，ポナチニブは腫瘍を退縮させ，生存期間を延長させた。ポナチニブは 20 nM 未満の IC_{50} 値で臨床的に重要な他のキナーゼ活性も阻害し，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），並びにキナーゼファミリー線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）及び血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）などに対する活性が確認されている。

2.6.1.1.3　　用法及び用量

ポナチニブの推奨開始用量は 1 日 1 回 45 mg の経口投与であり，食事の有無に関係なく投与できる。

2.6.1.1.4　　構造及び薬理学的特性

ポナチニブはチロシンキナーゼ阻害薬である（提案される解剖治療化学分類［ATC 分類］：L01XE，プロテインキナーゼ阻害薬）。

ポナチニブの名称は以下のように規定されている。

- International Union of Pure and Applied Chemistry（IUPAC）名は，
  3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide monohydrochloride
- 日本医薬品一般的名称（JAN）はポナチニブ塩酸塩である。
- 国際一般名（INN）は Ponatinib である。

構造式を図 2.6.1-1 に示した。

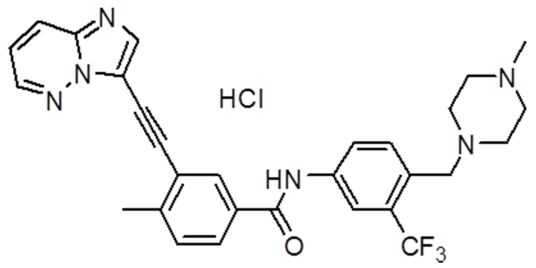


図 2.6.1-1　　ポナチニブ塩酸塩の構造

注：ポナチニブ塩酸塩は不斉中心を持たない。

分子式：　$C_{29}H_{28}ClF_3N_6O$（塩酸塩）
　　$C_{29}H_{27}F_3N_6O$（遊離塩基）
分子量：　569.02 g/mol（塩酸塩）
　　532.56 g/mol（遊離塩基）

2.6.1.1.5　　非臨床開発計画

ポナチニブの非臨床開発計画は，日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）の薬物開発に関するガイドラインである S6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」，S7「安全性薬理試験ガイドライン」及び M3「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」を考慮して立案した。CML 治療薬として提案されている使用を裏付けるデータを収集するため，動物を用いてポナチニブの安全性及び有効性を評価する複数の試験を実施した。ポナチニブの主な標的は BCR-ABL キナーゼであり，これは，CML 及び Ph+ ALL の特徴である異常なチロシンキナーゼである。ポナチニブは非常に高い活性で幅広い BCR-ABL キナーゼに対して，その酵素活性を阻害するよう設計されており，野生型 BCR-ABL キナーゼだけでなく，既存の TKI 治療に対して抵抗性を示す変異型 BCR-ABL キナーゼ，特に有効な治療法が存在しない T315I 変異体をも標的とする。したがって，ポナチニブの最初の適応として，TKI による前治療に抵抗性又は不耐容を示した，慢性期，移行期又は急性転化期の CML 成人患者，若しくは Ph+ ALL 成人患者について検討することとした。

In vitro 及び *in vivo* での一連の効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験において，ポナチニブの特性評価を行った。これらの薬理試験では，ポナチニブの作用機序，標的キナーゼ阻害作用の効力及び特異性などについて評価した。また，安全性薬理試験として，*in vitro* 試験（hERG アッセイ及び血小板凝集試験）並びに *in vivo* 試験（テレメトリー装置を装着したイヌの心血管系機能，

マウスの神経系機能，マウスの消化器系機能及びラットの腎/泌尿器系機能に及ぼす影響）を実施した。これらの試験結果を非臨床試験の概括評価，薬理試験の概要文及び薬理試験概要表に示した。

ヒトで予定されているポナチニブの投与方法は，推奨用量である 45 mg を 1 日 1 回経口投与である。ポナチニブの吸収，分布，代謝及び排泄（ADME）を明らかにするため，マウス，ラット及びサルを用いた一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。これらの試験結果を薬物動態試験の概要文及び薬物動態試験概要表に示した。

また，実験動物及び *in vitro* 試験系を用いる一連の安全性試験を実施し，ポナチニブの安全性及び毒性プロファイルを明らかにした。これらの試験には，マウス，ラット及びカニクイザルを用いた単回投与毒性試験，マウス，ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験，並びにネズミチフス菌／大腸菌及び培養ヒト末梢血リンパ球を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験，並びに *in vivo* 遺伝毒性試験が含まれる。さらに，ラットを用いたがん原性試験，生殖発生毒性試験及び光毒性試験も実施した。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）に関する米国食品医薬品局（FDA）規制（21 CFR Part 58），欧州経済共同体理事会指令，日本の厚生労働省省令，及びこれらの改訂版に従い実施した。上記試験の結果を毒性試験の概要文及び毒性試験概要表に示した。

2.6.1.2 参考文献

Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. Blood. 2003 Jul 1;102(1):276-83.

Conter V, Rizzari C, Sala A, Chiesa R, Citterio M, Biondi A. Acute lymphoblastic leukemia. Orphanet Encyclopedia [serial on the Internet]. 2004: Available from: http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-ALL.pdf.

Deininger MW, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. Cancer Res. 2000 Apr 1;60(7):2049-55.

Hazlehurst LA, Bewry NN, Nair RR, Pinilla-Ibarz J. Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation. Cancer Control. 2009 Apr;16(2):100-7.

Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood. 2006 Jul 1;108(1):28-37.

Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Talpaz M, Bekele N, O'Brien S, et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. Leukemia. 2006;20(1):1767-1773.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin. 2006 Mar-Apr;56(2):106-30.

Jones D, Kamel-Reid S, Bahler D, Dong H, Elenitoba-Johnson K, Press R, et al. Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting BCR-ABL Drug Resistance Mutations in Chronic Myelogenous Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report of the Association for Molecular Pathology. Journal of Molecular Diagnostics. 2009 Jan;11(1):4-11.

National Cancer Institute. Adult acute lymphoblastic leukemia treatment (PDQ)2011a; Available at http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adultALL/Patient/page1/AllPages/Print. [Accessed 23 April 2012].

National Cancer Institute. SEER cancer statistics review, 1975-2008. Bethesda2011b. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/.

National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: chronic myelogenous leukemia. Version 2.2011.

National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: chronic myelogenous leukemia. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp. Version 2.2012 [accessed 26 March 2012].

O'Hare T, Deininger MW, Eide CA, Clackson T, Druker BJ. Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. Clin Cancer Res. 2011 Jan 15;17(2):212-21.

Padmanabhan S, Ravella S, Curiel T, Giles F. Current status of therapy for chronic myeloid leukemia: a review of drug development. Future Oncol. 2008 Jun;4(3):359-77.

Pinilla-Ibarz J, Bello C. Modern approaches to treating chronic myelogenous leukemia. Curr Oncol Rep. 2008 Sep;10(5):365-71.

Radich JP. Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2001 Feb;15(1):21-36.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.

Terasawa T, Dahabreh I, Trikalinos TA. BCR-ABL1 mutation testing to predict response to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. PLoS Curr. 2010 Dec 7;2:RRN1204.

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）

2.6.2 薬理試験の概要文

大塚製薬株式会社

目次

目次 2
略号一覧 4
2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.1.1 ポナチニブの全般的なキナーゼ阻害プロファイル 7
2.6.2.1.2 効力を裏付ける試験の概要 7
2.6.2.1.3 副次的薬理試験の概要 10
2.6.2.1.4 安全性薬理試験の概要 11
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 12
2.6.2.2.1 ポナチニブの全般的なキナーゼ阻害プロファイル 12
2.6.2.2.2 ポナチニブのデザイン特性 13
2.6.2.2.3 野生型及び変異型 BCR-ABL 依存性細胞の増殖及びシグナル伝達に対するポナチニブの影響 16
2.6.2.2.4 加速突然変異誘発スクリーニング試験での BCR-ABL 抵抗性変異の出現に対するポナチニブの影響 20
2.6.2.2.5 野生型 BCR-ABL 依存性マウス異種移植モデルでのポナチニブの有効性及び薬力学的活性 22
2.6.2.2.6 T315I 変異型 BCR-ABL 依存性マウス異種移植モデルでのポナチニブの効力及び薬力学的活性 25
2.6.2.3 副次的薬理試験 30
2.6.2.3.1 FLT3-ITD 依存性の急性骨髄性白血病モデルにおけるポナチニブの有効性及び薬力学的活性 30
2.6.2.3.2 FGFR，KIT，PDGFRα 及び RET の活性に対するポナチニブの影響 32
2.6.2.4 安全性薬理試験 34
2.6.2.4.1 hERG アッセイ 34
2.6.2.4.2 マウスにおける神経薬理学的プロファイル 34
2.6.2.4.3 マウスにおける自発運動量 34
2.6.2.4.4 マウスにおける運動協調性 35
2.6.2.4.5 ラットにおける電解質濃度及び尿量 35
2.6.2.4.6 覚醒ラットにおける呼吸系評価 36
2.6.2.4.7 ラットにおける腸の蠕動運動及び胃内容排出能 36
2.6.2.4.8 テレメトリー装置を装着した覚醒イヌにおける心血管系機能 37
2.6.2.4.9 *In vitro* 血小板凝集試験 38

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 40
2.6.2.6 考察及び結論 41
2.6.2.7 図表 43
2.6.2.8 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
ADP	アデノシン二リン酸（Adenosine diphosphate）
AML	急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia）
ANOVA	一元配置分散分析（Analysis of variance）
ATP	アデノシン三リン酸（Adenosine triphosphate）
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration-time curve）
BCR	切断点クラスタ領域（Breakpoint Cluster Region）
BCR-ABL	BCR と ABL 融合遺伝子及びそのタンパク質産物
CDK	サイクリン依存性キナーゼ（Cyclin-dependent kinase）
C_{max}	最高血漿中濃度（Maximum observed plasma concentration）
CML	慢性骨髄性白血病（Chronic myeloid leukemia）
CP CML	慢性期 CML（Chronic phase CML）
CRKL	39 kDa adaptor protein (V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog-Like)
DFG	D（アスパラギン酸）-F（フェニルアラニン）-G（グリシン）のトリペプチド
EC_{50}	50%有効濃度（Half-maximal effective concentration）
EPH	エフリン受容体（Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma）
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）
GI_{50}	処置細胞の増殖を無処置細胞の半分に抑制させるのに必要な薬物濃度（Concentration for 50% of maximal inhibition of cell proliferation）
hERG	ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子（Human ether-a-go-go related gene）
HSA	ヒト血清アルブミン（Human serum albumin）
IC_{50}	50%阻害濃度（Concentration producing 50% inhibition）
IGF-1R	インスリン様増殖因子‐1 受容体（Insulin-like growth factor 1 receptor）

IL-3	インターロイキン 3（Interleukin 3）
IR	インスリン受容体（Insulin receptor）
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）
LC/MS/MS	高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析（Liquid Chromatography / tandem mass specrometry）
MAPK	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（Mitogen-activated protein kinase）
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
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）
PI 3‐キナーゼ	ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ（Phosphatidylinositol 3-kinase）
PIM	セリン・トレオニンキナーゼの 1 種（PIM）
PRP	多血小板血漿（Platelet rich plasma）
RET	グリア細胞株由来神経栄養因子 GDNF の受容体（rearranged during transfection）
SFK	Src ファミリーキナーゼ（Src family kinase）
SMA	自発運動量（Spontaneous motor activity）
SRC	がん原遺伝子 Src 由来チロシンキナーゼ（Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src）
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
VEGFR	血管内皮細胞増殖因子受容体（Vascular Endothelial Growth Factor Receptor）

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

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（フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病：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，並びに更に強力な第二世代の阻害薬であるダサチニブ及びニロチニブの 3 薬物が，慢性期 CML（CP CML）と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示す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，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も承認されている（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，イマチニブ抵抗性の多数の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 及び F317L/V/I/C の変異，並びにニロチニブに対する抵抗性を示す Y253H，E255K/V 及び F359V/C/I の変異に対しては，両薬物とも無効である（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，既承認の BCR-ABL 阻害作用を有する 3 薬物全てが無効である（O'Hare et al, 2007; National Comprehensive Cancer Network, 2012）。

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）変異体 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変異型 BCR-ABL に対して強力な活性を示し，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有する新規薬物が求められている。ポナチニブは，これらのニーズに対応するため，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である。特に，野生型 BCR-ABL 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 キナーゼ活性を強力に阻害するように設計されている。

ポナチニブの効力及び副次的薬理作用を評価するために実施された 3 種類の試験について解説する。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，広範囲な *in vitro* スクリーニングを実施した（2.6.2.2.1）。第二に，一連の細胞を用いた試験及び動物を用いた *in vivo* 試験を通して，ポナチニブの BCR-ABL 阻害活性を評価した（2.6.2.2.2，2.6.2.2.3，2.6.2.2.4，2.6.2.2.5，2.6.2.2.6）。第三に，数種のほかのキナーゼに対するポナチニブの活性を評価した（2.6.2.3）。さらに，一連の安全性薬理試験も実施した（2.6.2.4）。薬力学的試験では，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。これらの試験の一部では，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。特に重点的に評価したのは，イマチニブ，ダサチニブ及び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，あらゆる単一の変異型 BCR-ABL に対して阻害活性を示す汎 BCR-ABL 阻害薬としてのポナチニブの効力であった。また，ヒト血漿中での主要代謝物 AP24600 及び微量代謝物 AP24567 の阻害活性についても評価した。これらの試験結果について，以下で簡潔に概説するとともに（2.6.2.1.1，2.6.2.1.2，2.6.2.1.3，2.6.2.1.4），2.6.2.2，2.6.2.3 及び 2.6.2.4 の各項で詳述する。実施した全ての試験の一覧表は薬理試験概要表（2.6.3.1）に示す。

2.6.2.1.1　　ポナチニブの全般的なキナーゼ阻害プロファイル

In vitro キナーゼアッセイを実施し，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。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，50%阻害濃度（IC_{50}）値は 0.3～2.0 nM の間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），並びに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）であり，IC_{50} 値は 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。

2.6.2.1.2　　効力を裏付ける試験の概要

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 並び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等）に対して阻害作用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的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 酵素を阻害できるようになっていることである。

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阻害活性を測定した。これらのうち多数の試験で，細胞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 に対する阻害活性（IC_{50} 値：0.5～0.8 nM）は，イマチニブ（IC_{50} 値：260～462 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。

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 nM 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，ヒト血漿中で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，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 50%有効濃度（EC_{50}）2～57 nM でアポトーシスを誘導し，25～78 nM の IC_{50} 値で 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，白血病患者由来の 3 種類の BCR-ABL 陰性細胞株では阻害しないことが示された。BCR-ABL 陽性細胞株の 1 つである K562 細胞では，強力なアポトーシス誘導及び BCR-ABL のリン酸化阻害も認められた。

BCR-ABL キナーゼドメインに単一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明確に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）。

3 回実施した加速突然変異誘発試験の結果をまとめて，以下に概説する。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，増殖が著しく抑制され，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 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。

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の変異型 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。

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* 活性を明らかにした。

野生型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を静脈内に播種したマウス生存モデルに，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 投与量全てで $p < 0.01$）。

野生型 BCR-ABL を発現する K562 細胞を皮下に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，対照群の動物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（各群 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 のリン酸化の阻害が観察された。

T315I 変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を静脈内に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）と比較して，用量依存的な生存期間の延長が認められた。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，対照群の動物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抑制又は静止状態が認められた。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。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。

要約すると，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って引き起こされる立体障害を回避できるような新たな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）に対して強力な阻害活性を示した。さらに，ポナチニブは濃度 40 nM（21 ng/mL）であらゆる単一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。

これらの試験成績より，ポナチニブは強力な汎 BCR-ABL 阻害薬であることが裏付けられた。

2.6.2.1.3　副次的薬理試験の概要

包括的なポナチニブの *in vitro* キナーゼ阻害作用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* 試験で更に検討した。

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 の細胞増殖を強力に阻害し，IC_{50} 値は 2 nM であった。MV-4-11 細胞を皮下移植したマウス異種移植モデルに，ポナチニブを投与することにより，腫瘍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。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パネルアッセイで，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}（処置細胞の増殖を無処置細胞の半分に抑制させ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，ポナチニブの投与量 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，PDGFR のサブタイプ α（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示されている（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。

これらの試験により，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。

2.6.2.1.4　　安全性薬理試験の概要

ポナチニブの安全性薬理試験を臨床試験開始前に実施した。中枢神経系，心血管系，呼吸系，腎/泌尿器系及び消化器系に対するポナチニブの影響を評価するため，安全性薬理試験として，ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子（hERG）アッセイ，並びにマウス，ラット及びイヌを用いた *in vivo* 試験を計画した。

hERG チャネルに対するポナチニブの影響を評価する *in vitro* 試験では，心室再分極を遅延させる可能性について検討した。hERG をトランスフェクトした HEK-293 細胞を用いて，心室の再分極に関与する K^+電流に対するポナチニブの影響を電気生理学的に評価した。ポナチニブの適用濃度は 0.1，0.3，1.0，3.0 及び 9.0 µM とし，陽性対照としてシサプリドを適用濃度 0.025 µM で使用した。ポナチニブは 1.0 µM 以上の濃度で用量依存的に hERG 電流を阻害し，IC_{50} 値は 2.33 µM であった。陽性対照薬であるシサプリドは hERG 電流を平均で 75%阻害し，既知の安全性薬理試験成績と一致していた。

In vivo 試験では，25 mM クエン酸緩衝液（pH 2.75）を用いて調製したポナチニブ投与液を，経口投与した。ポナチニブを最高投与量 100 mg/kg までマウスに単回経口投与しても，神経薬理学的所見及び神経毒性に関する所見はいずれも観察されなかった。

ポナチニブを投与量 3，10 及び 30 mg/kg でラットに単回経口投与したところ，尿量及び電解質排泄量（Na^+，K^+及び Cl^-）は増加したが，尿 pH 及び電解質濃度に影響はみられなかった。また，ポナチニブを投与量 3，10 及び 30 mg/kg で覚醒下ラットに経口投与しても，呼吸機能に対して生物学的に意義のある影響はみられなかった。

ラットを用いて，蠕動運動及び胃内容排出能に対するポナチニブの影響を評価した。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，これらの投与量では，胃内容排出能の用量に依存しない低下が認められた。

テレメトリー装置を装着した覚醒下イヌに，ポナチニブを投与量 2，5 又は 10 mg/kg で単回経口投与しても，心拍数，拡張期血圧，収縮期血圧，平均血圧及び心電図に対して，ポナチニブに関連すると考えられる生物学的影響は認められなかった。例外として，10 mg/kg 投与群のイヌ 1 例で QTc 間隔が一過性に延長したが，この動物では，ポナチニブ濃度が最高血漿中濃度（C_{max}）に達すると予想される時間以前に，QTc 間隔が投与前値までに回復したことから，この所見とポナチニブ投与との関連性は低いものと考えられた。

ポナチニブを投与した患者で報告されている出血性事象（Iclusig Prescribing Information）及び血小板機能異常（Neelakantan et al, 2012）を考慮して，ヒト血小板を用いた *in vitro* 試験を実施し，血小板凝集に対するポナチニブの影響を評価した。ヒト推奨治療量である 45 mg を投与したときに求めた血漿 C_{max} と比較して 10 倍高い濃度でも，血小板凝集抑制は認められなかった。血漿 C_{max} 実測値に比べて 100 倍高い濃度でのみ，ポナチニブは血小板凝集を有意に抑制したことから，臨床的に問題となる可能性は低いと考えられた。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　ポナチニブの全般的なキナーゼ阻害プロファイル

2.6.2.2.1.1　AP24534 及びその主要代謝物である AP24600 の *in vitro* キナーゼ選択性プロファイル解析（ARIAD Report ARP280）

試験デザイン及び方法

ポナチニブのキナーゼ選択性プロファイルを明らかにするため，広範囲な *in vitro* スクリーニングアッセイを実施した。このスクリーニングアッセイでは，正常なキナーゼの突然変異体も含めて，ヒトキノームのほぼ半分を対象とすることで，ポナチニブのキナーゼ阻害活性について広範囲に検討した。このパネルには，野生型 ABL，並びに第一世代及び第二世代の ABL 阻害薬に対して抵抗性を示す変異型 ABL が含まれていた。

2 回の連続的スクリーニングアッセイを実施した。最初に，235 種類の広範囲なプロテインキナーゼ（222 種類のヒト固有キナーゼ及び 13 種類の突然変異体）について，ポナチニブの単一濃度（1 μM）を用いて分析した。次に，最初のスクリーニングアッセイで強力に阻害された酵素を含む 108 種類のキナーゼに関する 2 番目のスクリーニングアッセイを実施し，ポナチニブの IC_{50} 値を決定した。野生型及び T315I 変異型 ABL については，ポナチニブの主要代謝物である AP24600 の IC_{50} 値も算出した。

結果及び結論

ポナチニブ濃度 1 μM の存在下，235 中 56 種類のキナーゼで 90%以上のキナーゼ活性阻害が認められた。阻害率が 10%未満であった残りの 179 種類のキナーゼについては，ARIAD Report ARP280, Table 1 に示す。これには，Aurora A，インスリン受容体（IR），インスリン様増殖因子 - 1 受容体（IGF-1R），並びにホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ（PI 3 - キナーゼ），マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK），PIM，プロテインキナーゼ C 及びサイクリン依存性キナーゼ（CDK）ファミリーに属するキナーゼが含まれていた。

108 種類のキナーゼについて算出された IC_{50} 値を表 2.6.2-1 に示す。ポナチニブは，野生型 ABL 及び T315I を含む検討した全 5 種類の変異型 ABL を強力に阻害し，その IC_{50} 値は 0.3～2.0 nM の範囲内であった。ポナチニブは，このほかに 25 種類のキナーゼに加えて 5 種類の突然変異体に対しても阻害作用を示し，IC_{50} 値は 20 nM 以下であった。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 等が含まれていた。これらの ABL 以外の数種のキナーゼに対するポナチニブの活性に関して更に検討した試験については，2.6.2.3「副次的薬理試験」に記載する。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 ABL 及び T315I 変異型 ABL のキナーゼ活性を阻害しなかった（IC_{50} 値：> 3000 nM）。また，ヒト血漿中の微量代謝物である AP24567 は，野生型 ABL 及び T315I 変異型 ABL のキナーゼ活性に対して独立した阻害活性を示し，その活性はポナチニブと比較して約 3 倍強力であった（文献［Huang et al, 2010］の Table 5 における化合物 20g［ポナチニブ］と化合物 20j［AP24567］の比較を参照）。

要約すると，ポナチニブは野生型及び変異型（T315I を含む）BCR-ABL に対して，強力な阻害活性を示す多標的なキナーゼ阻害薬である。

表 2.6.2-1　　ポナチニブの 108 種類のキナーゼに対する *in vitro* 阻害プロファイル

IC50 ≤2 nM		IC50 ≤20 nM		IC50 ≤200 nM		IC50 >200 nM	
Kinase	IC50 (nM)	Kinase	IC50 (nM)	Kinase	IC50 (nM)	Kinase	IC50 (nM)
ABL	0.4	BLK	6.1	BMX/ETK	47	AKT2/PKBb	>1000
ABL (H396P)	0.3	CSK	12.7	BRK	51	ALK	>1000
ABL (M351T)	0.3	DDR2	16.1	EPHA1	143	Aurora A	>1000
ABL (Q252H)	0.4	EPHA2	2.1	ERBB4/HER4	176	Aurora B	543
ABL (T315I)	2.0	EPHA3	6.7	JAK1	32	Aurora C	>1000
ABL (Y253F)	0.3	EPHA7	8.5	JAK2	169	AXL	>1000
ABL2/ARG	0.8	EPHA8	2.5	JAK3	91	BTK	849
EPHA4	1.1	EPHB4	10.2	KIT (D816V)	152	BTK(E41K)	>1000
EPHA5	0.7	FGFR1	2.2	KIT (V654A)	78	CDK2/cyclin E	>1000
EPHB1	1.2	FGFR1 (V561M)	7.3	P38b	173	CTK/MATK/HYL	>1000
EPHB2/HEK5	0.6	FGFR3	18.2	P70S6K	94	EGFR	>1000
EPHB3	1.1	FGFR4	7.7	PYK2/FAK2	35	EGFR (L858R/T790M)	>1000
FGFR2	1.6	FLT1/VEGFR1	3.7	TYK2	177		
FGFR2 (N549H)	0.4	FLT3	12.6			EGFR (L858R)	211
FGR	0.5	FLT4	2.3			EGFR (L861Q)	536
FRK/PTK5	1.3	FMS	8.6			EGFR (T790M)	>1000
FYN	0.4	KDR/VEGFR2	2.9			ERBB2/HER2	>1000
HCK	0.1	KIT	12.5			FAK/PTK2	>1000
KIT (V560G)	0.4	KIT (D816H)	16.0			FER	560
LCK	0.3	P38a	9.8			FES/ FPS	768
LYN	0.2	PDGFRα (D842V)	15.6			FLT3 (D835Y)	948
LYNB	0.2	PDGFRα (T674I)	3.0			IGF1R	>1000
PDGFRα	1.1	PDGFRβ	7.7			IR	>1000
PDGFRα (V561D)	0.8	RAF/RAF1	13.7			IRR/INSRR	>1000
RET	0.2	RET (V804L)	3.7			ITK	>1000
RET (V804M)	1.4	SRC	5.4			MER	406
Yes	0.9	TIE2	14.3			MET	>1000
		TRKA/NTRK1	11.4			mTOR	>1000
		TRKB/NTRK2	15.1			MUSK	694
		TRKC/NTRK3	13.2			PKA	613
						PKCtheta	>1000
						RON/MST1R	>1000
						ROS	>1000
						SRC (T341M)	>1000
						SYK	>1000
						TEC	>1000
						TYK1/LTK	>1000
						TYRO3/SKY	>1000
						ZAP70	>1000

出典：ARIAD Report ARP280

2.6.2.2.2　　ポナチニブのデザイン特性

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新規の経口投与可能な合成チロシンキナーゼ阻害薬である。本薬は，特に野生型 BCR-ABL，並びに全ての既承認の BCR-ABL 阻害薬（イマチニブ，ニロチニブ及びダサチニブ）に対して抵抗性を示す T315I ゲートキーパー変異体を含む変異型 BCR-ABL に対して阻害活性を有するように設計されている。

本薬は，野生型及び変異型の両方の BCR-ABL に対して活性を示すように，不活性の DFG-out 型コンフォメーションを標的とすることにより，ABL との最適な結合相互作用を最大限にするように設計されている。このコンフォメーションでは，標準的な活性型キナーゼに比べて，ABL 活性化ループに位置する DFG（Asp-Phe-Gly）トリペプチドモチーフが構造変化を起こし，付加的に

アロステリックな結合ポケットが出現する（Liu and Gray, 2006; Schindler et al, 2000; Weisberg et al, 2005）。本薬はこの結合ポケットを利用して，DFG モチーフ残基との相互作用により，付加的な結合を獲得する。さらに，本薬は不活性型 ABL キナーゼの上部及び下部ドメインの両方に結合するとともに，収縮構造のアデノシン三リン酸（ATP）－リン酸結合ループにも結合するように設計されているため，誘導された立体構造変化を介して，更に ABL－阻害薬間の結合相互作用が最大になる機会が与えられる。ABL に結合したポナチニブの結晶構造より，全般的な阻害薬の結合様式として，ABL のリン酸結合ループ並びに上部及び下部ドメインの相対的配向に設計どおり，立体構造変化が誘導されることが確認されている（図 2.6.2-1）（Zhou et al, 2011; O'Hare et al, 2009）。そのうえ，ポナチニブが DFG-out 構造に結合する様式により，長い結合部位上で全体的に結合親和性を均等に分散させて，多数の接触点で ABL と結合できるようになることが結晶構造から明確にされている。このような接触点の配列により，ABL に対して高い結合親和性を示すだけでなく，単一のアミノ酸変異が生じても，結合への影響を受けにくくなっている（Zhou et al, 2011; O'Hare et al, 2009）。

ABL と分子上の多数の接触点で結合できることに加えて，ポナチニブの化学構造設計には，直線状の炭素間三重結合が組み込まれており，T315 ゲートキーパー残基付近での突然変異により誘発される立体障害を克服できるようになっている。ATP ポケットのゲートキーパー残基は，ATP 競合型阻害薬によりしばしば占有される疎水性ポケットの縁に位置し，この疎水性ポケットへのアクセスを制限するため，T315I 変異型 ABL は阻害されにくいことが証明されている。コンピュータを用いた化学構造のモデル化により，T315I 変異型 ABL では，既承認の BCR-ABL 阻害薬の高い結合親和性に必要とされる極めて重要な水素結合相互作用が消失し，ATP-結合ポケットの形状が変化し，疎水性ポケットへの阻害薬のアクセスが妨げられることが明らかになっている（Zhou et al, 2007）。T315I 領域に限られた空間しか存在しないため，直線状の炭素間三重結合は，ATP 結合部位に結合する官能基をゲートキーパー残基の後部に位置する疎水性ポケットに結合する官能基と結びつけるように設計されている。ポナチニブが結合した ABL の結晶構造から，ポナチニブのほかの官能基が結合ポケット内で最適な位置を維持したまま，この三重結合リンカーが，ゲートキーバー残基（野生型 ABL の T315 又は変異型の I315 のいずれか）を避けて通っていることが明らかになっている（図 2.6.2-2）（Zhou et al, 2011; O'Hare et al, 2009）。

本薬は最適化された DFG-out 型結合構造を持っているため，RET, FLT3, KIT 及び PDGFRα 等，臨床的意義を有するほかのキナーゼに対しても DFG-out 構造に結合する様式により阻害活性を示す可能性がある。さらに，これらのキナーゼでは，ABL の T315I と類似した薬剤抵抗性ゲートキーパー変異として，RET の V804M/L，FLT3 の F691I/L，KIT の T670I，PDGFRα の T674M/I が出現しているが，このようなポナチニブのデザイン特性から，これらの変異型キナーゼに対しても阻害活性を示す可能性があると考えられる。

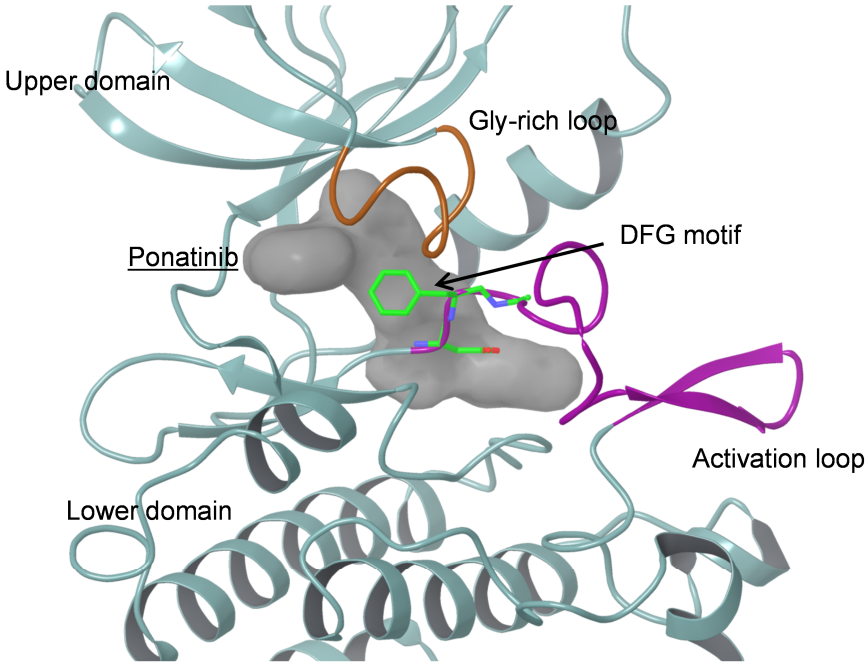


図 2.6.2-1　　T315I 変異型 ABL キナーゼに結合したポナチニブの結晶構造

ポナチニブの分子表面を灰色で示す。活性化ループ及びグリシンリッチループをそれぞれ，紫色及び茶色で示す。
活性化ループに位置する DFG トリペプチドモチーフの側鎖を緑色で示す。
出典：ポナチニブと複合体を形成した T315I ABL の公表済み座標データから導き出した画像（PDB ID: 3IK3; www.pdb.org）。

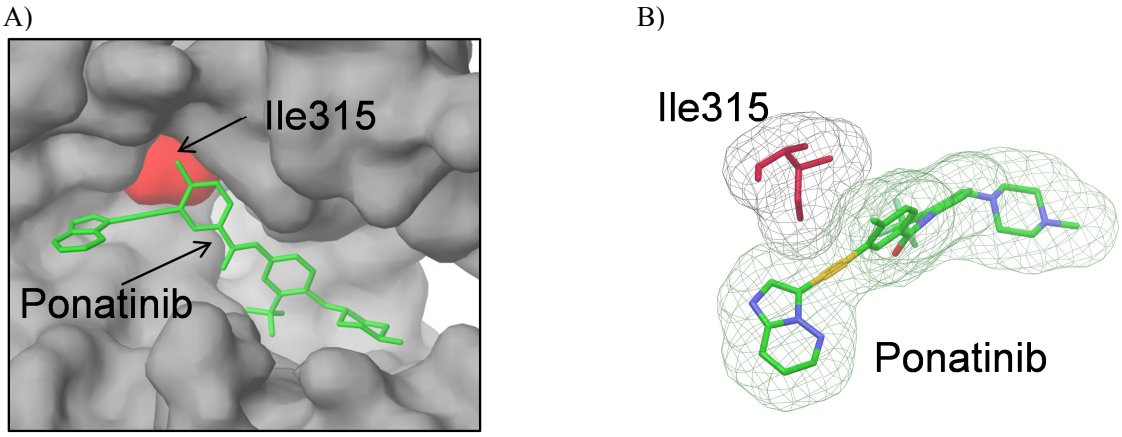


図 2.6.2-2　　T315I 変異型 ABL キナーゼの ATP 結合部位でのポナチニブと Ile315 の相互作用

A) ABL タンパク質及び Ile315 の分子表面をそれぞれ灰色及び赤色で示し，ポナチニブを緑色で示す。
B) Ile315 とポナチニブの間の分子表面パッキング相互作用。ポナチニブの炭素間三重結合を黄色で強調表示する。
出典：ポナチニブと複合体を形成した T315I ABL の公表済み座標データから導き出した画像（PDB ID: 3IK3; www.pdb.org）。

2.6.2.2.3　野生型及び変異型 BCR-ABL 依存性細胞の増殖及びシグナル伝達に対するポナチニブの影響

2.6.2.2.3.1　BCR-ABL 非発現細胞及び野生型又は変異型 BCR-ABL 発現細胞の増殖に対する AP24534 の影響（Report OHSU-001）

2.6.2.2.3.2　野生型 BCR-ABL 又は変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞株の増殖に対する AP24534 の阻害活性（ARIAD Report ARP025）

2.6.2.2.3.3　野生型 BCR-ABL 又は T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞の増殖に対する AP24534 の主要代謝物である AP24600 の影響（ARIAD Report ARP282）

上記の 3 試験では同様の試験方法が用いられ，ポナチニブの BCR-ABL 阻害活性について一部重複した評価を行った。そのため，これらの試験を以下のとおり要約する。

試験デザイン及び方法

3 試験全てで，遺伝子改変した Ba/F3 細胞系を用いて野生型 BCR-ABL 及び変異型 BCR-ABL キナーゼ活性に対するポナチニブの影響を評価した。Ba/F3 細胞は，増殖因子のインターロイキン 3（IL-3）に依存するマウス前駆 B 細胞性白血病細胞である。BCR-ABL 遺伝子を導入して細胞を形質転換させると，IL-3 非存在下でも細胞増殖が可能である。このように遺伝子改変した Ba/F3 細胞株では，その増殖は BCR-ABL キナーゼ活性に依存するようになることから，野生型 BCR-ABL 及び変異型BCR-ABL キナーゼに対する BCR-ABL 阻害薬の活性を評価するのに有用な試験系であり，これを目的として広く使用されてきた（O'Hare et al, 2007）。

この試験系を用いて，野生型 BCR-ABL 及び変異型 BCR-ABL キナーゼ（イマチニブに対する臨床的に抵抗性を示すことが明らかになっている T315I を含む）に対するポナチニブの阻害活性を検討した。細胞に溶媒又は様々な濃度の被験薬を添加してインキュベートし，72 時間後に細胞増殖率を測定した。各細胞株について，溶媒と共にインキュベートした場合と比較して，細胞増殖率が 50%阻害される被験薬濃度（IC_{50} 値）を算出した。

Report OHSU-001 では，野生型 BCR-ABL 及び 14 種類の変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を用いて，ポナチニブの阻害活性を測定した。さらに，3 種類の BCR-ABL 発現ヒト白血病細胞株（K562，KY01 及び LAMA），並びに 3 種類の BCR-ABL 非発現ヒト白血病細胞株（Marimo，HEL 及び CMK）を用いて，ポナチニブの阻害活性を測定した。

ARIAD Report ARP025 では，野生型 BCR-ABL 及び 5 種類の変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を用いて，ポナチニブの阻害活性を測定した。なお，この試験では，イマチニブ，ニロチニブ及びダサチニブの検討も同時に行い，効力の直接比較を可能にした。さらに，ポナチニブは血清タンパク質，特にヒト血清アルブミン（HSA）に対して高い結合親和性を示し，ポナチニブの薬力学的活性に悪影響を及ぼす可能性があることから，ポナチニブの阻害活性に対するヒト血清タンパク質の影響についても評価した。この目的のため，通常の細胞培養条件下及び生理学的に意味のある濃度（340 μM）の HSA 存在下で，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を比較することにより，「IC_{50} シフト解析」（Rusnak et al, 2004）を実施した。

ARIAD Report ARP282 では，野生型 BCR-ABL 及び T315I 変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3

細胞を用いて，ヒトで認められるポナチニブの主要代謝物である AP24600 の活性をポナチニブと比較した。

結果及び結論

Report OHSU-001 では，ポナチニブは検討した全 15 種類の Ba/F3 細胞株の増殖を強力に阻害し，IC_{50} 値は 0.5 nM（野生型 BCR-ABL）～36 nM（E225V 変異体）の範囲であることが明らかになった。BCR-ABL 遺伝子を有さず，IL-3 存在下で増殖する Ba/F3 親細胞に対するポナチニブの阻害活性は著しく低かった（IC_{50} 値：1713 nM）。これらの結果を要約して表 2.6.2-2 に示す。比較のため，これらの細胞株を用いて別の試験で測定したイマチニブ，ニロチニブ及びダサチニブの細胞増殖阻害作用の IC_{50} 値も示す（O'Hare et al, 2005; O'Hare et al, 2007）。

ARIAD Report ARP025 では，ポナチニブ及び 3 種類の既承認の BCR-ABL 阻害薬の野生型 BCR-ABL 及び 5 種類の変異型 BCR-ABL に対する阻害活性を同時に検討し，効力を直接評価した。表 2.6.2-3 に示すように，これらの変異型細胞株及び対照細胞株に関する結果は，表 2.6.2-2 に示した結果とほぼ一致していた。さらに，ポナチニブは T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞の増殖を阻害し，その効力は，通常の細胞培養条件下（IC_{50} 値：8 nM）及び生理学的に意味のある濃度の HSA 存在下（IC_{50} 値：14 nM）で同程度であることが明らかになった。

表 2.6.2-2　野生型 BCR-ABL 又は 14 種類の変異型 BCR-ABL 依存性の Ba/F3 細胞の増殖に対するポナチニブ，イマチニブ，ニロチニブ及びダサチニブの影響

Ba/F3 細胞増殖抑制活性 IC_{50}（nM）				
BCR-ABL	ポナチニブ [1]	イマチニブ [2]	ニロチニブ [2]	ダサチニブ [2]
野生型	0.5	260	13	0.8
M244V	2.2	2000	38	1.3
G250E	4.1	1350	48	1.8
Q252H	2.2	1325	70	3.4
Y253F	2.8	3475	125	1.4
Y253H	6.2	> 6400	450	1.3
E255K	14	5200	200	5.6
E255V	36	> 6400	430	11
T315A	1.6	971	61	125
T315I	11	> 6400	> 2000	> 200
F317L	1.1	1050	50	7.4
F317V	10	350	nd	53
M351T	1.5	880	15	1.1
F359V	10	1825	175	2.2
H396P	1.1	850	41	0.6
親細胞	1713	> 6400	> 2000	> 200

1:　ARIAD Report OHSU-001

2:　O'Hare T. et al (2005) Cancer Res. 65: 4500-4505. O'Hare T. et al (2007) Blood. 110: 2242-2249.

nd = 測定せず。

表 2.6.2-3　　野生型 BCR-ABL 又は 5 種類の変異型 BCR-ABL 依存性の Ba/F3 細胞の増殖に対するポナチニブ，イマチニブ，ニロチニブ及びダサチニブの影響に関する同時検討

Ba/F3 細胞増殖抑制活性 IC_{50}（nM）				
BCR-ABL	ポナチニブ	イマチニブ	ニロチニブ	ダサチニブ
野生型	0.8	462	21	0.9
Y253F	0.9	3111	66	0.6
E255K	3.2	3731	106	1.5
T315I	8	> 10000	> 10000	> 10000
M351T	1.0	1429	13	0.9
H396P	0.6	996	20	0.4
親細胞	1126	> 10000	> 10000	> 10000

出典：ARIAD Report ARP025

これらの試験から，ポナチニブは野生型 BCR-ABL を阻害し（IC_{50} 値：0.5～0.8 nM），その効力はイマチニブ（IC_{50} 値：260～462 nM）と比較して約 500 倍，ニロチニブ（IC_{50} 値：13～21 nM）と比較して約 25 倍強力であり，ダサチニブ（IC_{50} 値：0.8～0.9 nM）とは同程度又はわずかに上回る程度であることが明らかになった。検討した 14 種類の変異型 BCR-ABL 全てに対して強力な活性を示した阻害薬はポナチニブのみであり，全細胞株の増殖を 40 nM 未満の IC_{50} 値で阻害した。T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞の増殖に対して阻害活性を示したのは，ポナチニブのみであり（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）でも阻害活性を示さなかった。これらの試験では，ポナチニブによる阻害活性が最も弱かった変異体は E255V（IC_{50} = 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も明らかになった（IC_{50} 値はそれぞれ 11 nM，430 nM 及び 6400 nM 超）。T315I に加えて，ポナチニブは，ダサチニブ及びニロチニブを用いる治療が推奨されない変異型 BCR-ABL（すなわち，ダサチニブの場合，T315A，F317L 及び F317V，ニロチニブの場合，Y253H，E255K，E255V 及び F359V）を発現する細胞の増殖に対しても強力な阻害活性を示した（National Comprehensive Cancer Network, 2012）。

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 BCR-ABL 又は 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）（ARIAD Report ARP282）。また，別の試験では，ヒト血漿中のポナチニブの微量代謝物である AP24567 は，野生型又は T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞の増殖に対して阻害活性を示し，その活性はポナチニブの約 1/4 であることが明らかになった（Huang et al, 2010，表 5 の化合物 20g［ポナチニブ］と化合物 20j［AP24567］の比較参照）。

さらに，白血病患者に由来する 3 種類の BCR-ABL 陽性細胞株及び 3 種類の BCR-ABL 陰性細胞株に対するポナチニブの活性についても検討した（Report OHSU-001）。ポナチニブは 3 種類の BCR-ABL 陽性細胞株（K562，KY01 及び LAMA）を 0.3～3.9 nM の IC_{50} 値で阻害したが，3 種類の BCR-ABL 陰性細胞株（Marimo，HEL 及び CMK）に対する阻害活性は大幅に低下しており，IC_{50} 値は 1652～2522 nM であった。

2.6.2.2.3.4　野生型BCR-ABL及びT315I変異型BCR-ABLを発現する細胞に対するAP24534のアポトーシス誘導（ARIAD Report ARP043）

試験デザイン及び方法

ポナチニブが BCR-ABL を発現する細胞のアポトーシスを誘導するか否かを検討するため，野生型 BCR-ABL を発現する CML 細胞株 K562，及び野生型 BCR-ABL 又は T315I 変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞株をポナチニブと共にインキュベートし，24～48 時間後にカスパーゼ活性を評価した。これと並行して，ニロチニブ及びダサチニブの活性も測定した。

結果及び結論

3 種類の細胞株全てで，ポナチニブに反応してアポトーシスの大幅な誘導が認められた。最大レベルのアポトーシスの 50%を示すポナチニブ濃度（EC_{50}）は，2～57 nM の範囲であった（表 2.6.2-4）。また，比較として，ニロチニブ及びダサチニブの EC_{50} 値も示す。ニロチニブ（EC_{50}：34～332 nM）及びダサチニブ（EC_{50}：2～17 nM）はいずれも，野生型 BCR-ABL を発現する細胞のアポトーシスを誘導したが，T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞のアポトーシスを誘導しなかった（EC_{50} : > 5000 nM）。これらのデータから，ポナチニブは唯一野生型 BCR-ABL 及び T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞を強力に死滅させることが示された。

表 2.6.2-4　野生型 BCR-ABL 又は T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞に対するポナチニブ，ニロチニブ及びダサチニブによるアポトーシスの誘導

EC_{50}（nM）

	K562 野生型 BCR-ABL	Ba/F3 野生型 BCR-ABL	Ba/F3 T315I 変異型 BCR-ABL
ポナチニブ	2	16	57
ニロチニブ	34	332	> 5000
ダサチニブ	2	17	> 5000

出典：ARIAD Report ARP043

2.6.2.2.3.5　野生型 BCR-ABL 又は T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞での AP24534 による BCR-ABL 及び CRKL シグナル伝達阻害の立証（ARIAD Report ARP027）

試験デザイン及び方法

BCR-ABL 発現細胞の増殖に対するポナチニブの影響に付随して BCR-ABL の標的が阻害されるか否かについて検討するため，シグナル伝達に関するアッセイを実施した。野生型 BCR-ABL を発現する CML 細胞株 K562, 並びに野生型 BCR-ABL 又は T315I 変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞株をポナチニブと共に 3 時間インキュベートし，BCR-ABL のリン酸化レベル（p-BCR-ABL）及び BCR-ABL の下流基質である CRKL のリン酸化レベル（p-CRKL）を測定した。これと並行して，ニロチニブ及びダサチニブの阻害活性も測定した。

結果及び結論

3 種類の細胞株全てで, ポナチニブは BCR-ABL のリン酸化を 7～78 nM の IC_{50} 値で阻害し, CRKL のリン酸化を 68～580 nM の IC_{50} 値で阻害した（表 2.6.2-5）。また，比較として，ニロチニブ及

びダサチニブの IC_{50} 値も示す。ニロチニブ（IC_{50} = 21～607 nM）及びダサチニブ（IC_{50} 値：0.6～19 nM）は，野生型 BCR-ABL を発現する細胞の BCR-ABL 及び CRKL のリン酸化を阻害したが，T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞のシグナル伝達に対しては影響しなかった（IC_{50} 値：> 1000 nM）。これらのデータから，ポナチニブは唯一野生型 BCR-ABL 及び T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞の BCR-ABL を介するシグナル伝達を阻害することが示された。特記すべき点として，3 種類の BCR-ABL 阻害薬全てにより，CRKL のリン酸化は一貫して阻害されたが，その効力は BCR-ABL のリン酸化と比較して低かった。過去に K562 細胞を用いた試験において，ダサチニブ及びイマチニブによりこれと一致する結果が報告されており（Shah et al, 2008），その説明として，これらの細胞株では，CRKL の脱リン酸化に関与するホスファターゼは BCR-ABL キナーゼの脱リン酸化に関与するホスファターゼと比較して活性が低いこと，又は CRKL リン酸化の絶対量の方が BCR-ABL リン酸化の絶対量と比較して高いことが考えられる。

表 2.6.2-5　野生型 BCR-ABL 又は T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞での ABL 及び CRKL のリン酸化に対するポナチニブ，ニロチニブ及びダサチニブの影響

IC_{50}（nM）

	K-562 野生型 BCR-ABL		Ba/F3 野生型 BCR-ABL		Ba/F3 T315I 変異型 BCR-ABL	
	p-BCR-ABL	p-CRKL	p-BCR-ABL	p-CRKL	p-BCR-ABL	p-CRKL
ポナチニブ	7	68	25	83	78	580
ニロチニブ	21	607	53	125	> 1000	> 1000
ダサチニブ	0.6	16	4	19	> 1000	> 1000

出典：ARIAD Report ARP027

全般的な要約

要約すると，細胞を用いる試験で，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）に対して強力な阻害活性を示すことが明らかにされた。また，野生型 BCR-ABL 又は T315I 変異型 BCR-ABL を発現する細胞の増殖阻害と同時に，BCR-ABL シグナル伝達の阻害及びアポトーシスの誘導が認められた。

2.6.2.2.4　加速突然変異誘発スクリーニング試験での BCR-ABL 抵抗性変異の出現に対するポナチニブの影響

2.6.2.2.4.1　AP24534 の細胞を用いる *in vitro* 加速突然変異スクリーニング試験（Report OHSU-002）

試験デザイン及び方法

2.6.2.2.3 で解説した試験成績より，ポナチニブは野生型 BCR-ABL 及び過去にイマチニブ，ニロチニブ又はダサ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 14 種類の変異型 BCR-ABL の活性を強力に阻害することが明らかになった。ポナチニブに対する抵抗性を示す BCR-ABL キナーゼドメインのその他の突然変異があるか否かを検討するため，加速突然変異誘発

スクリーニング試験を実施した。当該試験では，BCR-ABL を発現する細胞株を変異原物質に曝露させた後，これらの細胞を様々な濃度の BCR-ABL 阻害薬を含む組織培養ウェルに播種した。抵抗性サブクローンの出現を示す細胞増殖がみられた場合，BCR-ABL 遺伝子の配列を解析し，突然変異を特定した。この分析法は，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，重要なこととして，これらの阻害薬の臨床成績を予測できることが証明されている（Bradeen et al, 2006）。例えば，このスクリーニング試験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 種類の変異のうち，19 種類はイマチニブ抵抗性患者で特定されたものであった（Bradeen et al, 2006; Apperley, 2007）。また，臨床での使用経験に合致して，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）。

当該試験では，野生型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を用いたスクリーニングを実施し（別々に 3 回），変異原物質に曝露させた Ba/F3 細胞を，様々な濃度のポナチニブを添加した合計 1440 のウェルに播種した。

結果及び結論

図 2.6.2-3 のデータは，3 回の独立した試験の結果を要約したものである。10 nM のポナチニブに曝露させた細胞では，限定的な増殖が認められ（ウェルの 11.7%），大部分のサブクローンは BCR-ABL 変異を含まず，様々な変異を含む他のサブクローンがそれぞれ低発現率で検出された。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（ウェルの 0.2%），E255V 及び T315I の 2 種類の変異体のみが生存していた。40 nM のポナチニブでは，3 回の試験全てで抵抗性変異体の出現が完全に抑制された。

要約すると，この細胞を用いた加速突然変異誘発試験で，40 nM のポナチニブに抵抗性を示す BCR-ABL の単一突然変異は検出されなかった。したがって，この評価結果から，ポナチニブは汎 BCR-ABL 阻害薬であると考えられた。

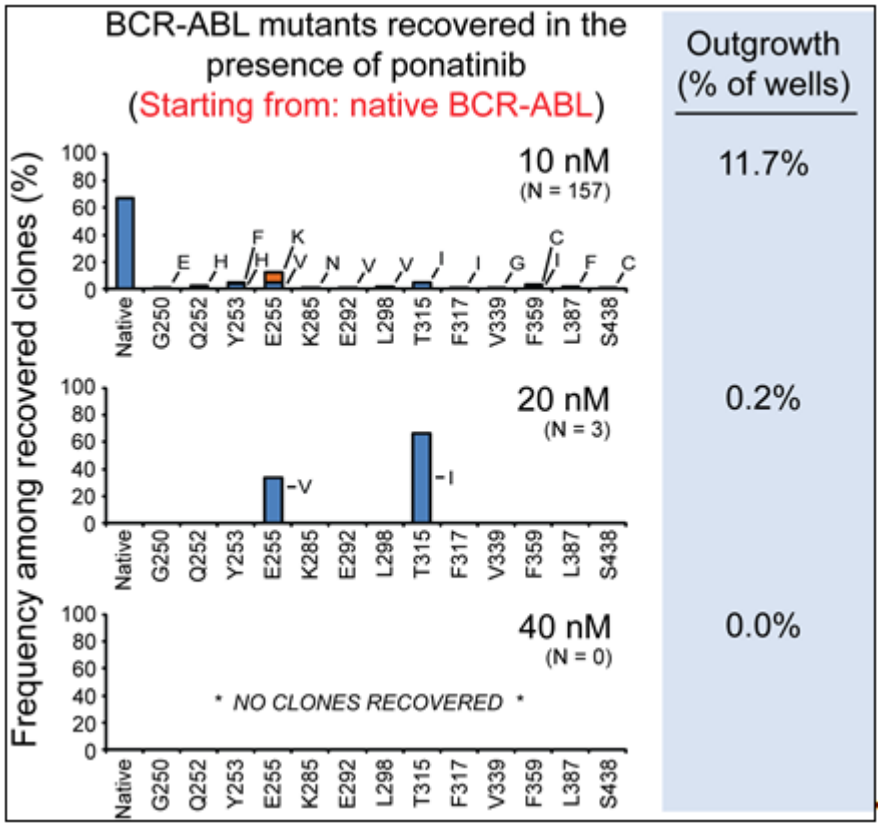


図 2.6.2-3　　細胞を用いた突然変異誘発スクリーニング試験における抵抗性 BCR-ABL 変異体の出現に対するポナチニブ単独の抑制作用

野生型 BCR-ABL 遺伝子を発現する Ba/F3 細胞を N-エチル-N-ニトロソウレア（ENU）で処理し，漸増濃度のポナチニブ（10，20，40 nM）の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。

出典：Report OHSU-002

2.6.2.2.5　野生型 BCR-ABL 依存性マウス異種移植モデルでのポナチニブの有効性及び薬力学的活性

2 種類のマウスモデルを用いて，野生型 BCR-ABL に対するポナチニブの *in vivo* 活性を評価した。これらの試験では，25 mM クエン酸緩衝液（pH 2.75）を用いてポナチニブ投与液を調製し，強制経口投与した。

2.6.2.2.5.1　野生型 BCR-ABL 依存性白血病マウスモデルを用いた AP24534 の効力試験（ARIAD Report ARP036）

試験デザイン及び方法

最初に，SCID マウスに野生型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を静脈内に播種することにより作製したマウス生存モデルを用いて，ポナチニブの有効性を評価した。細胞播種 3 日後から開始して，担がんマウス（各群 10 例）に溶媒又はポナチニブを投与量 0.5，1，2.5，5 及び 10 mg/kg/日で最長 19 日間連続して経口投与した。細胞播種日から死亡又は瀕死による屠殺日まで，各動物の生存期間を確認した。各投与群と対照群との生存期間中央値をログランク検定で比較した結果，

p 値が 0.05 未満である場合，統計学的有意差ありとみなした。

結果及び結論

溶媒投与群のマウスの生存期間の中央値は 19 日であった（表 2.6.2-6）。検討した最低投与量 0.5 mg/kg でポナチニブを投与したところ，生存期間は 24 日へと有意に延長した（$p < 0.05$，対照群と比較して 26%の生存期間延長）。これよりも高い投与量 1，2.5，5 及び 10 mg/kg では，それぞれ 32%，45%，63%及び 100%の有意な（$p < 0.01$）生存期間の延長が認められた。

表 2.6.2-6　　野生型 BCR-ABL 依存性マウスモデルでの生存期間に対するポナチニブの影響

群	被験物質	投与量（mg/kg）	投与法	生存期間中央値（日）	生存期間延長率（%）	p 値
1	溶媒	0	1 日 1 回 19 日間	19.0	該当せず	該当せず
2	ポナチニブ	0.5	1 日 1 回 19 日間	24.0	26	< 0.05
3	ポナチニブ	1	1 日 1 回 19 日間	25.0	32	< 0.01
4	ポナチニブ	2.5	1 日 1 回 19 日間	27.5	45	< 0.01
5	ポナチニブ	5	1 日 1 回 19 日間	31.0	63	< 0.01
6	ポナチニブ	10	1 日 1 回 19 日間	38.0	100	< 0.01

出典：ARIAD Report ARP036

2.6.2.2.5.2　野生型 BCR-ABL 依存性 K562 細胞を皮下移植したマウス腫瘍モデルにおける AP24534 の効力を裏付ける試験（ARIAD Report ARP087）

試験デザイン及び方法

SCID マウスに野生型 BCR-ABL を発現する K562 細胞を皮下移植することにより作製した CML 腫瘍モデルを用いて，ポナチニブの効力を評価した。平均腫瘍体積が約 200 mm^3 に達した時点で，マウスを 6 つの試験群（各群 10 例）の 1 つに無作為に割り付けた。次に，各群のマウスに溶媒又はポナチニブを投与量 1，2.5，5 及び 10 mg/kg/日で最長 18 日間連日投与又は投与量 30 mg/kg で週 2 回（投与日：0，3，7，10，14 及び 17 日目）経口投与した。投与期間終了後，更に 8 週間にわたりマウスを観察し，腫瘍の再増殖状況を観察した。

少なくとも週 2 回の頻度で，ノギスを用いて腫瘍サイズを二次元的（長さ［L］及び幅［W］）に測定し，$L \times W^2 \times 0.5$ の式を用いて腫瘍体積（mm^3）を計算した。さらに，2 種類の式のうちの 1 つを用いて，対照群（C）と比較した投与群（T）の相対的腫瘍増殖率（%T/C）を計算した。投与期間中，投与群の腫瘍体積が増加した場合，$\%T/C = (\Delta T/\Delta C) \times 100$ の式を使用した。ここで，ΔT = 投与群の平均腫瘍体積変化，ΔC = 対照群の平均腫瘍体積変化である。また，投与期間中，投与群の腫瘍体積が減少した場合，$\%T/C = (\Delta T/Ti) \times 100$ を使用した。ここで，Ti = 投与開始時の投与群の平均腫瘍体積である。データを収集し，一元配置分散分析（ANOVA）検定を用いて解析した。さらに Dunnett 検定を用いて，ポナチニブ各投与群と溶媒対照群の有意差検定を行った。p 値が 0.05 未満である場合，統計学的有意差ありとみなした。

結果及び結論

ポナチニブは K562 腫瘍増殖を用量依存的に抑制した（図 2.6.2-4）。1 mg/kg/日群では，腫瘍増

殖が有意に抑制された（%T/C = 15，p < 0.01）。また，2.5，5 及び 10 mg/kg/日群では，全てのマウスで腫瘍退縮がみられ，%T/C 値はそれぞれ - 86，- 99 及び - 88 であった。30 mg/kg（週 2 回投与）群の全てのマウスでも腫瘍退縮がみられた（%T/C = - 93，p < 0.01）。最終投与後 8 週間の観察期間中，1 mg/kg/日群では腫瘍増殖が継続したが，その他の 4 投与群では，40 例全てのマウスで腫瘍退縮が維持された。

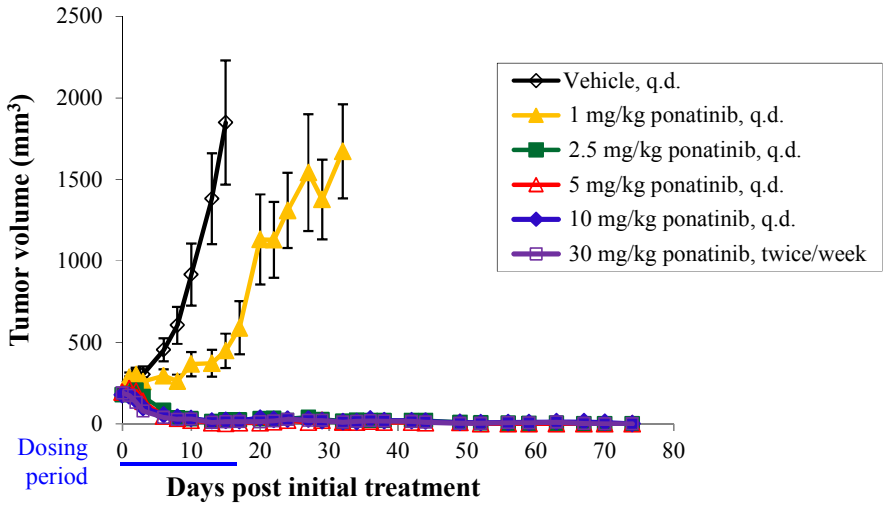


図 2.6.2-4　　野生型 BCR-ABL 依存性マウスモデルの腫瘍増殖に対するポナチニブの影響

出典：ARIAD Report ARP087

2.6.2.2.5.3　K562 皮下移植マウス腫瘍モデルを用いた AP24534（1～10 mg/kg）の単回投与 PK/PD 試験（ARIAD Report ARP075）

試験デザイン及び方法

K562 腫瘍モデルを用いて，野生型 BCR-ABL を介する *in vivo* シグナル伝達に対するポナチニブの影響を検討するとともに，各測定時点における血漿中ポナチニブ濃度と腫瘍組織での野生型 BCR-ABL シグナル伝達抑制との関係について検討した。SCID マウスに K562 細胞を皮下移植し，平均腫瘍体積が約 800 mm^3 に達した時点で，マウスを対照群（無処置群 5 例），並びにポナチニブの 1，2.5，5 又は 10 mg/kg 単回経口投与群（各群 3 例）に無作為に割り付けた。ポナチニブ投与後のいくつかの時点（投与後 2，6，16 及び 24 時間）で，血液及び腫瘍組織を採取した。血漿中ポナチニブ濃度は，除タンパク後，高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS）法により測定し，ブランクマウス血漿で作成した検量線を用いて定量した。また，腫瘍溶解液をウェスタンブロット法により分析し，対照タンパク（eIF4E）レベルと比較して，p-BCR-ABL 及び p-CRKL レベルを測定した。

結果及び結論

ポナチニブは腫瘍組織の BCR-ABL 及び CRKL のリン酸化を用量依存的に抑制した（図 2.6.2-5）。1 mg/kg 群では，2 又は 6 時間後のシグナル伝達に阻害作用はみられなかったが，2.5 mg/kg 群ではリン酸化 BCR-ABL のレベルが 50%を超えた一過性の減少が認められた。5 又は 10 mg/kg 群では，

リン酸化 BCR-ABL のレベルが持続的に減少した（全時点で 50%超の減少）。細胞モデルの場合と同様（2.6.2.2.3 参照），CRKL リン酸化のポナチニブに対する感受性は，BCR-ABL リン酸化に比べて低かった。CRKL リン酸化のレベルの大幅な減少は，10 mg/kg 群で一過性に認められたのみであった。全体として，血漿中ポナチニブ濃度と BCR-ABL 及び CRKL リン酸化阻害の間に正の相関関係が認められた（図 2.6.2-5）。

要約すると，野生型 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と，BCR-ABL シグナル伝達が阻害され，腫瘍が縮小し，生存期間が延長した。

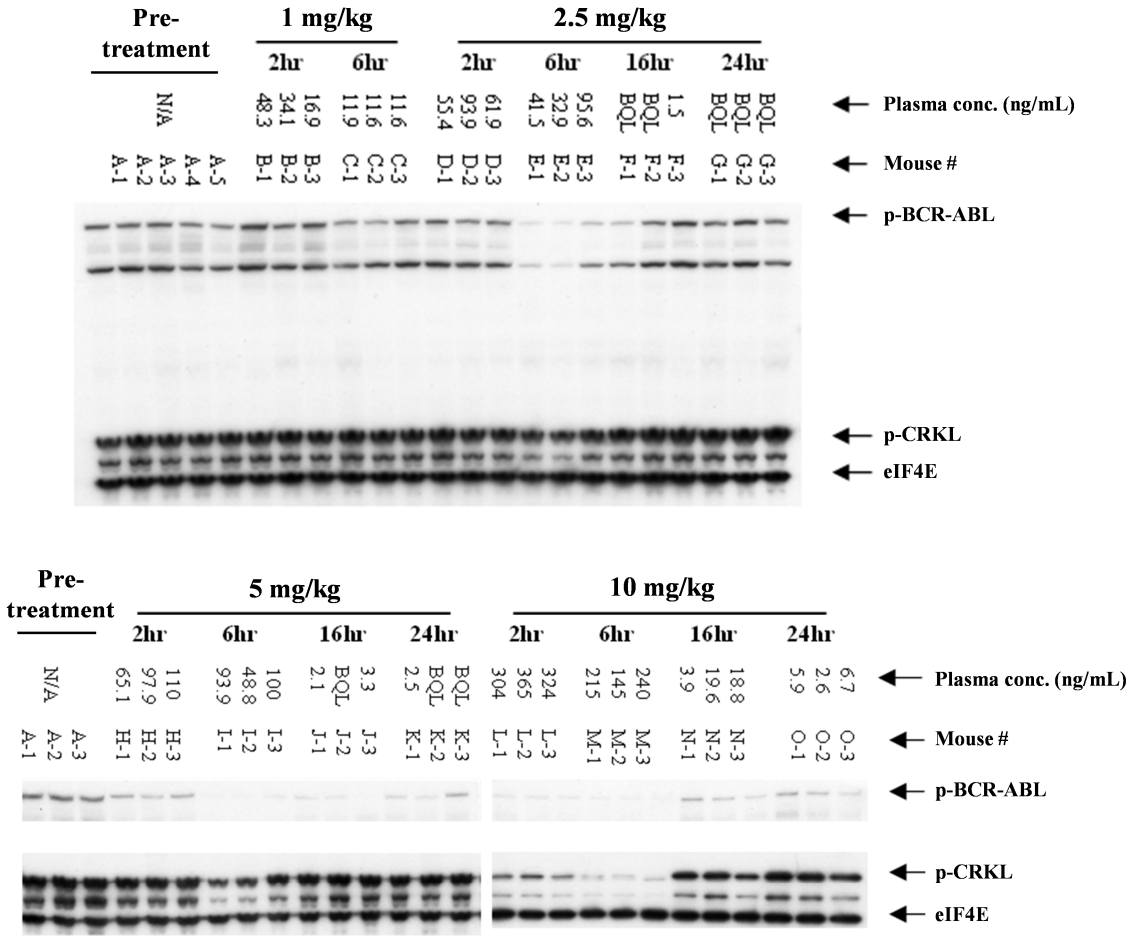


図 2.6.2-5　　野生型 BCR-ABL 依存性マウスモデルでのシグナル伝達に対するポナチニブの影響

BQL = 定量限界未満

出典：ARIAD Report ARP075

2.6.2.2.6　T315I 変異型 BCR-ABL 依存性マウス異種移植モデルでのポナチニブの効力及び薬力学的活性

2 種類のマウスモデルを用いて，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。試験では，25 mM クエン酸緩衝液（pH 2.75）を用いてポナチニブ投与液を調製し，マウスモデルに強制経口投与した。