

2.6.2.2.6.1 T315I 変異型 BCR-ABL 依存性白血病マウスモデルを用いた AP24534 の効力試験 (II) (ARIAD Report ARP033)

試験デザイン及び方法

最初に、SCID マウスに T315I 変異型 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、ポナチニブの抗腫瘍効果を評価した。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 1.25, 2.5, 5, 15 及び 25 mg/kg/日で最長 19 日間、連続経口投与した。細胞播種日から死亡日又は瀕死による切迫屠殺日まで、各動物の生存期間を観察した。各投与群と対照群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中央値は 16 日であった（表 2.6.2-7）。ポナチニブを投与することにより、用量依存的に生存期間が延長した。1.25 又は 2.5 mg/kg/日群では、生存期間の有意な延長は認められなかった（対照群と比較して 3%の生存期間延長）。5 mg/kg/日群では、生存期間中央値が 19.5 日へと有意な延長（ $p < 0.01$ ）が認められた（22%の生存期間延長）。また、15 及び 25 mg/kg/日群では、生存期間がそれぞれ 26 及び 30 日へと有意な延長（ $p < 0.01$ ）が観察された（63% 及び 88%の生存期間延長）。

表 2.6.2-7 T315I 変異型 BCR-ABL 依存性マウスモデル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	16.0	該当せず	該当せず
2	ポナチニブ	1.25	1 日 1 回 19 日間	16.5	3	> 0.05
3	ポナチニブ	2.5	1 日 1 回 19 日間	16.5	3	> 0.05
4	ポナチニブ	5	1 日 1 回 19 日間	19.5	22	< 0.01
5	ポナチニブ	15	1 日 1 回 19 日間	26.0	63	< 0.01
6	ポナチニブ	25	1 日 1 回 19 日間	30.0	88	< 0.01

出典：ARIAD Report ARP033

2.6.2.2.6.2 T315I 変異型 BCR-ABL 依存性腫瘍を皮下移植したマウスモデルにおける AP24534 の経口投与効力試験 (ARIAD Report ARP035)

試験デザイン及び方法

nu/nu ノードマウスに T315I 変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 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、ポナチニブの抗腫瘍効果を評価した。平均腫瘍体積が約 500 mm³に達した時点で、マウスを 6 試験群（各群 8 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 2.5, 5, 10, 30 及び 50 mg/kg/日で最長 19 日間連続経口投与した。腫瘍の測定及び統計学的評価については、2.6.2.2.5 (ARIAD Report ARP087) で記載したとおり行った。

結果及び結論

ポナチニブは T315I 変異型 BCR-ABL を発現する腫瘍の増殖を用量依存的に抑制した (図 2.6.2-6)。2.5 mg/kg/日群 (%T/C = 87) 及び 5 mg/kg/日群 (%T/C = 81) で、腫瘍増殖の抑制が認められたが、統計学的に有意なものではなかった。10 mg/kg/日群 (%T/C = 60, $p < 0.01$) では、腫瘍増殖が有意に抑制され、30 mg/kg/日群 (%T/C = -1.2, $p < 0.01$) では、静止状態に達した。さらに、50 mg/kg/日群 (%T/C = -96, $p < 0.01$) では、有意な腫瘍退縮が認められた。

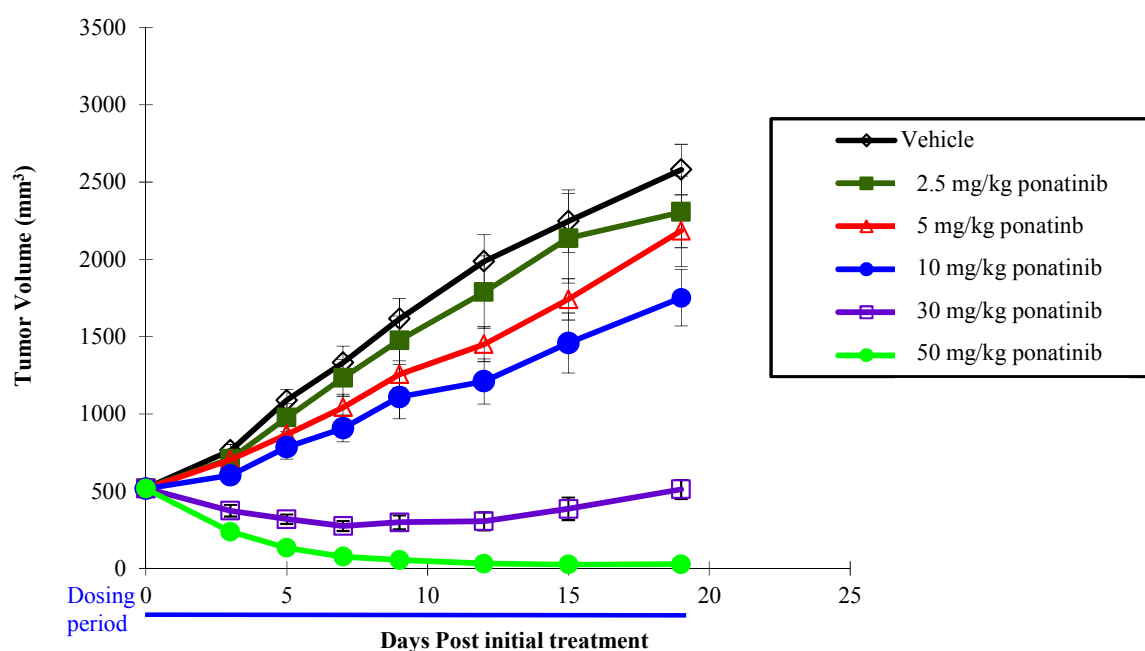


図 2.6.2-6 T315I 変異型 BCR-ABL 依存性マウスモデルでの腫瘍増殖に対するポナチニブの影響

出典: [ARIAD Report ARP035](#)

2.6.2.2.6.3 T315I 変異型 BCR-ABL 腫瘍を皮下移植したマウスモデルにおける AP24534 (2.5~30 mg/kg) の単回投与 PK/PD 試験 ([ARIAD Report ARP074](#))

試験デザイン及び方法

Ba/F3 腫瘍モデルを用いて、T315I 変異型 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、各測定時点での血漿中ポナチニブ濃度と腫瘍組織での BCR-ABL シグナル伝達阻害との関係について検討した。nu/nu ノードマウスに T315I 変異型 BCR-ABL を発現する Ba/F3 細胞を皮下移植した。平均腫瘍体積が約 500 mm³ 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投与量 2.5, 5, 10 又は 30 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、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により定量した。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、リン酸化 BCR-ABL 及びリン酸化 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 T315I 変異型 BCR-ABL のリン酸化を用量依存的に抑制した。2.5 又は 5 mg/kg 群では、シグナル伝達の顕著な阻害は認められなかった。10 mg/kg 群では、リン酸化 BCR-ABL レベルが 50%を超えた一過性の減少がみられ (図 2.6.2-7) , 30 mg/kg 群では、リン酸化 BCR-ABL レベルの持続的な減少が誘発された (全測定時点で 50%超の減少)。細胞モデルの場合と同様 (2.6.2.2.3 参照) , ポナチニブに対する CRKL リン酸化の感受性は BCR-ABL リン酸化に比べて低く、当該試験では、リン酸化 CRKL レベルの大幅な減少は認められなかった。血漿中ポナチニブ濃度と BCR-ABL のリン酸化阻害との間に正の相関関係が認められた (図 2.6.2-7)。

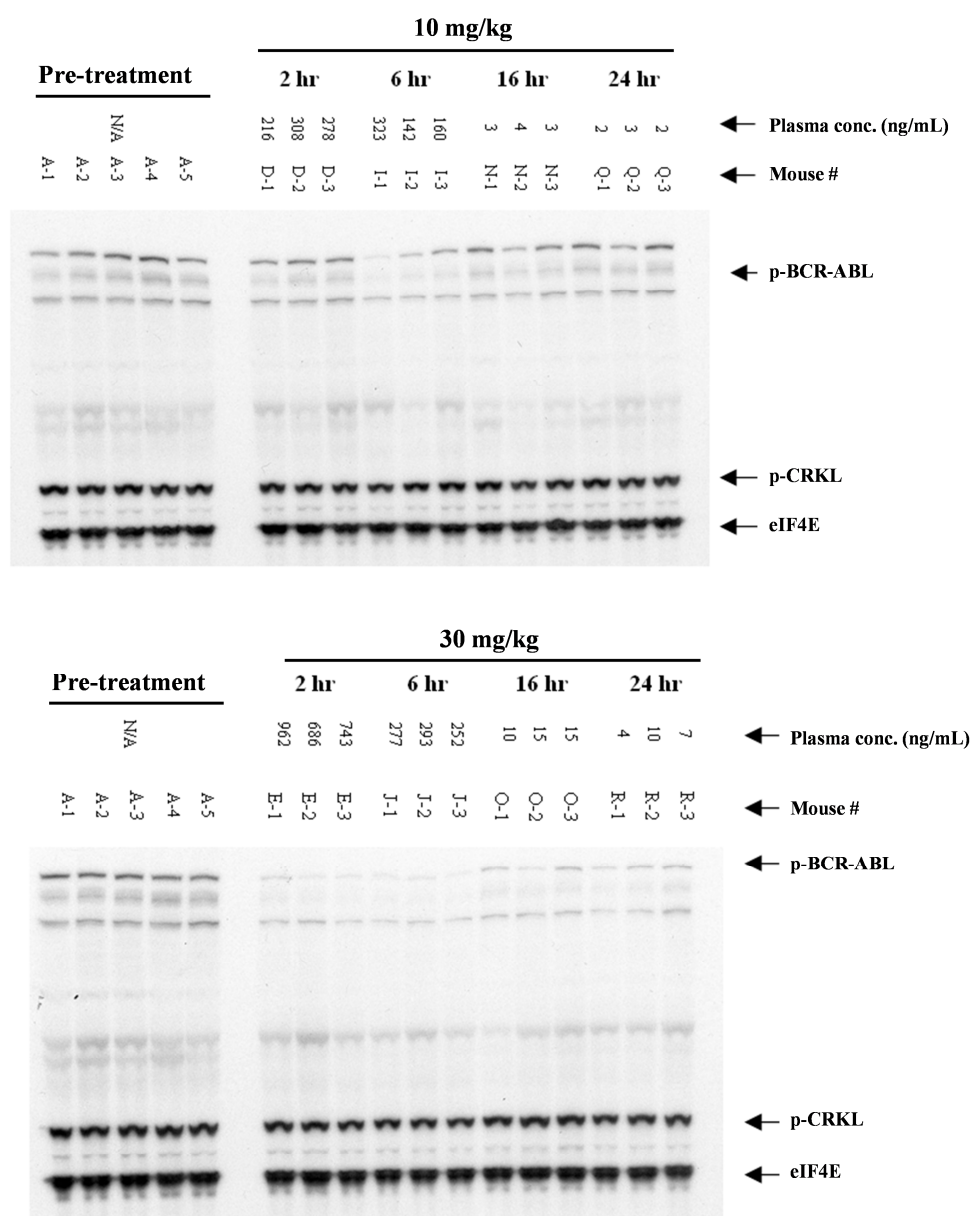


図 2.6.2-7 T315I 変異型 BCR-ABL 依存性マウスモデルのシグナル伝達に対するポナチニブの影響

出典 : ARIAD Report ARP074

要約すると, T315I 変異型 BCR-ABL を発現する腫瘍を移植したマウスにボ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。

2.6.2.3 副次的薬理試験

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に実施した広範な *in vitro* スクリーニング試験 ([ARIAD Report ARP280](#)) の結果については、本 CTD [2.6.2.2.1](#) で詳述した。ポナチニブは BCR-ABL 以外のキナーゼについても、20 nM 以下の IC₅₀ 値で阻害することが明らかになった。これには、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。これらのキナーゼに対するポナチニブの阻害作用について、細胞を用いる試験及び *in vivo* 試験で更に検討した。

活性型 FLT3 に対するポナチニブの活性を検討した試験により、AML 患者での効果の探索検討について支持する結果が得られたことから、これらの非臨床試験について詳細に解説する ([2.6.2.3.1](#) 参照)。また、治療的意義があると推察されるほかの数種のキナーゼに対するポナチニブの抑制活性について更に検討した試験を、[2.6.2.3.2](#) で概説する。

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

FLT3-ITD 変異は、AML 患者の 30% 近くに認められている ([Meshinchi and Appelbaum, 2009](#))。 *In vitro* 試験で、ポナチニブは FLT3 キナーゼ活性を阻害し、その IC₅₀ 値は 13 nM であった ([ARIAD Report ARP280](#))。

2.6.2.3.1.1 FLT3-ITD を介するシグナル伝達及び細胞の増殖に対するポナチニブの影響 ([ARIAD Report ARP281](#))

試験デザイン及び方法

この試験では、FLT3-ITD-陽性白血病細胞株である MV-4-11 を使用して、活性型 FLT3 に対するポナチニブの細胞内及び *in vivo* における活性を検討した。細胞を用いる試験では、MV-4-11 細胞又は野生型 FLT3 を発現する白血病細胞 (RS4;11) の増殖に対するポナチニブの阻害活性を検討した。また、リン酸化 FLT3 の定量により、FLT3-ITD を介するシグナル伝達に対するポナチニブの影響についても評価した。MV-4-11 の異種皮下移植モデルを用いて、FLT3-ITD 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、各時点の血漿中ポナチニブ濃度と腫瘍組織での FLT3-ITD シグナル伝達の阻害との関係について検討した。ポナチニブを担癌マウスに投与量 1, 2.5, 5 及び 10 mg/kg で単回経口投与し、6 時間後にリン酸化 FLT3-ITD (p-FLT3) 及び下流エフェクターであるリン酸化 STAT5 (p-STAT5) レベルを測定するとともに、血漿中ポナチニブ濃度を測定した。

結果及び結論

細胞を用いる試験では、ポナチニブは MV-4-11 細胞の増殖を阻害し (IC₅₀ 値 : 2 nM) , MV-4-11 細胞での FLT3-ITD のリン酸化を阻害した (IC₅₀ 値 : 0.3 nM)。これに対して、ポナチニブは野生型 FLT3 を発現する RS4;11 細胞の増殖を強力に阻害することはなかった (IC₅₀ 値 : > 100 nM)。

MV-4-11 の異種移植モデルでは、ポナチニブを投与量 2.5 mg/kg で単回経口投与した結果、FLT3 及び STAT5 のリン酸化が部分的に阻害され、投与量 5 及び 10 mg/kg では、ほぼ完全に阻害された。血漿中ポナチニブ濃度とシグナル伝達阻害の間に正の相関関係が認められた ([図 2.6.2-8](#))。

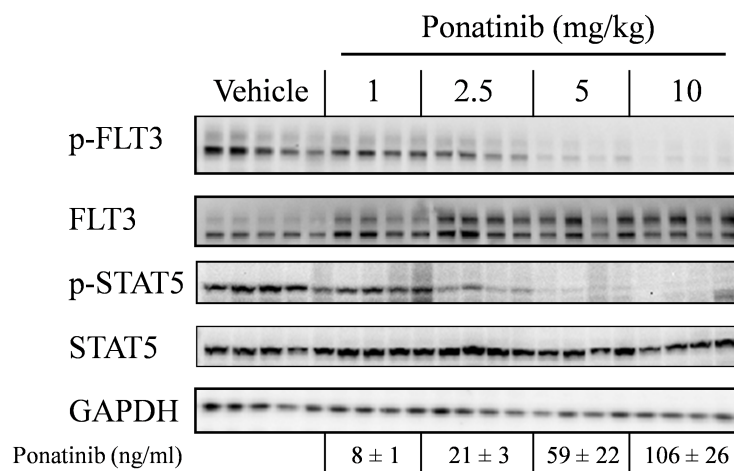


図 2.6.2-8 FLT3-ITD 依存性マウスモデルでのシグナル伝達に対するポナチニブの影響

出典：ARIAD Report ARP281

CML での BCR-ABL と同様，細胞を用いる試験及び CML 患者では，FLT3 キナーゼドメインの点突然変異により，FLT3 阻害薬に対する抵抗性が生じることが明らかになっている (Smith et al, 2012)。このような突然変異の 1 つである F691I は，FLT3 キナーゼドメインの「ゲートキーパー」残基で起こる。ポナチニブは，付加的 F691I 抵抗性変異を有する活性型 FLT3 を発現する Ba/F3 細胞の増殖を強力に阻害することが示されている (Zirm et al, 2012; Gozgit et al, 2012b)。

2.6.2.3.1.2 ヒト AML 細胞株 MV-4-11 の異種皮下移植モデルにおける AP24534 の効力試験 (ARIAD Report ARP242)

試験デザイン及び方法

nu/nu ノードマウスに MV-4-11 細胞を皮下移植することにより作製した AML 腫瘍モデルを用いて，ポナチニブの *in vivo* 活性を評価した。平均腫瘍体積が約 250 mm³ に達した時点で，マウスを 5 試験群（各群 10 例）の各群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 21 日間連続経口投与した。腫瘍サイズの測定及び統計学的評価は，ARIAD Report ARP087, Section 2.5 のとおり行った。

結果及び結論

ポナチニブは MV-4-11 腫瘍の増殖を用量依存的に抑制し，投与量 2.5 mg/kg/日以上で統計学的に有意な ($p < 0.01$) 抑制が認められた (図 2.6.2-9)。腫瘍増殖は 1 mg/kg/日投与群で部分的に抑制され (%T/C = 64)，2.5 mg/kg/日投与群では，更に強力に抑制された (%T/C = 17)。5 及び 10 mg/kg/日投与群では，腫瘍退縮が認められ，%T/C 値はそれぞれ -42 及び -96 であった。

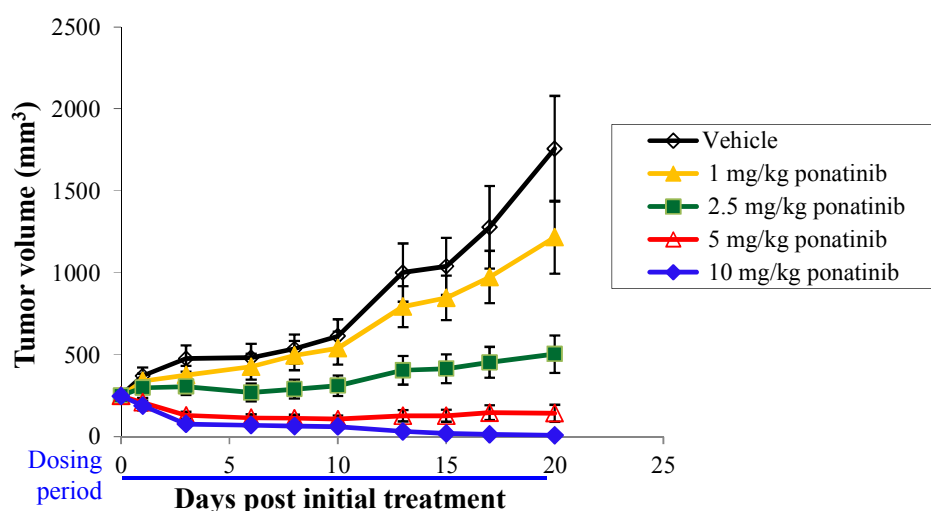


図 2.6.2-9 FLT3-ITD 依存性マウスモデルでの腫瘍増殖に対するポナチニブの影響

出典：ARIAD Report ARP242

これらの細胞及び *in vivo* モデルを用いる試験より、ポナチニブは FLT3-ITD の強力な阻害薬であることが示された。

2.6.2.3.2 FGFR, KIT, PDGFR α 及び RET の活性に対するポナチニブの影響

複数のがん、様々なメカニズムによる線維芽細胞増殖因子受容体ファミリーキナーゼ (FGFR1～4) の調節異常が認められている (Turner and Grose, 2010)。これらのメカニズムとして、キナーゼドメインの活性化突然変異、リガンド結合親和性を上昇させる変異及び FGFR タンパク発現を増加させる遺伝子増幅等が含まれる。*In vitro* 試験で、ポナチニブは 4 種類の FGFR 全てのキナーゼ活性を阻害することが明らかにされた (IC₅₀ 値：2～18 nM) (ARIAD Report ARP280)。さらに、細胞モデル及び *in vivo* モデルを用いて、4 種類の FGFR 全てに対するポナチニブの活性を検討する一連の試験を実施した (Gozgit et al, 2012a)。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細胞の生存を強力に阻害し (IC₅₀ 値：40 nM 未満)、Ba/F3 親細胞と比較して高い選択性を示した。また、様々なメカニズムにより FGFR の調節異常が起こった複数の腫瘍タイプ (子宮内膜癌、膀胱癌、胃癌、乳癌、肺癌及び結腸癌) を代表する 14 種類のがん細胞株を用いた一連の試験では、ポナチニブは FGFR を介するシグナル伝達を阻害し (IC₅₀ 値：40 nM 未満)、GI₅₀ 値 (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) 7～181 nM で細胞増殖を抑制した。一方、FGFR の調節異常が認められない細胞に対するポナチニブの活性は大幅に低下していた。検討した 3 種類の FGFR 誘発マウスモデル全てで、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。これらの結果から、ポナチニブは 4 種類の FGFR ファミリーメンバー全ての強力な阻害薬であり、複数の FGFR 誘発性がんが活性が示された。

多発性がん、KIT 及び PDGFR α の活性化突然変異が特定され、消化管間質腫瘍ではそれぞれ

85%及び7%で変異が確認されている (Gramza et al, 2009)。 *In vitro* 試験では、ポナチニブは KIT (IC₅₀ 値 : 12.5 nM) 及び PDGFR α (IC₅₀ 値 : 1.1 nM) のキナーゼ活性を阻害することが明らかにされた (ARIAD Report ARP280)。細胞モデルを用いて、KIT 及び PDGFR α に対するポナチニブの活性について更に検討した (Gozgit et al, 2011)。KIT の活性化突然変異 (N822K) を有する細胞株で、ポナチニブは細胞増殖及び KIT のリン酸化を、それぞれ 8 及び 20 nM の IC₅₀ 値で阻害した。また、活性型 PDGFR α (FIP1L1-PDGFR α 融合) を有する細胞株で、ポナチニブは細胞増殖及び PDGFR α のリン酸化をそれぞれ、0.5 及び 0.6 nM の IC₅₀ 値で阻害した。細胞を用いる試験及び患者では、KIT (T670I) 及び PDGFR α (T674I) のキナーゼドメインのゲートキーパー残基での変異は、KIT 及び PDGFR α 阻害薬に対する抵抗性を示すことが明らかになっている (Zhang et al, 2009)。ポナチニブは、ゲートキーパー残基での付加的な抵抗性変異を含む活性型 KIT 又は PDGFR α を発現する Ba/F3 細胞の増殖も強力に阻害することが明らかになっている (Gozgit et al, 2012b)。

甲状腺髄様がんの 50~95% (Santoro and Carlomagno, 2006) 及び肺腺がんの 1~2% (Kohno et al, 2012) で、RET の活性化突然変異が特定されている。 *In vitro* 試験では、ポナチニブは RET のキナーゼ活性を阻害した (IC₅₀ 値 : 0.16 nM) (ARIAD Report ARP280)。さらに、活性型 RET を発現するよう遺伝子改変した Ba/F3 細胞で、ポナチニブは細胞増殖及び RET のリン酸化をそれぞれ、8 及び 5 nM の IC₅₀ 値で強力に阻害した (Gozgit et al, 2012b)。

これらの試験より、ポナチニブは活性型 KIT, PDGFR α 及び RET (細胞モデル) 並びに FGFR (細胞モデル及び *in vivo* モデル) の強力な阻害薬であることが示された。

2.6.2.4 安全性薬理試験

ポナチニブの安全性薬理試験を実施した。これらの試験には、hERG アッセイに加えて、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マウス、ラット又はイヌを用いた *in vivo* 試験により評価した。これらの *in vivo* 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。また、これらの試験では、溶媒対照として 25 mM クエン酸緩衝液 (pH 2.75) を使用した。それぞれの安全性薬理試験の概要を以下に示す。試験は全て GLP に準拠して実施した。

2.6.2.4.1 hERG アッセイ

試験番号 [S07092](#)、試験結果の概要を [2.6.3.4](#) に示す。

心室の再分極を遅延させる可能性について検討するため、hERG チャネルに対するポナチニブの影響を評価する *in vitro* 試験を実施した。このアッセイでは、試験系として、hERG を安定的に発現させた HEK-293 細胞 (ヒト胎児腎細胞) を使用した。hERG をトランスフェクトした HEK-293 細胞は、心室の再分極に関与する K^+ 電流に対するポナチニブなどの薬剤の影響を電気生理学的に直接検討できるため、アッセイに使用した。ポナチニブの濃度は 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 及び 9.0 μ M とした。陽性対照として、濃度 25 nM のシサプリドを使用した。

ポナチニブは 1.0 μ M (1000 nM) 以上で用量依存的に hERG 電流を阻害し、濃度 1.0, 3.0 及び 9.0 μ M での阻害率は、それぞれ 14.3%, 57.2% 及び 91.4% であった。IC₅₀ 値は 2.33 μ M (2330 nM) であった。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ときの血漿中 C_{max} 平均値は 145 nM (77 ng/mL) であった。

hERG アッセイでは、臨床での血漿 C_{max} 平均値の約 16 倍に相当する高い IC₅₀ 値が得られたことから、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。陽性対照であるシサプリドは hERG 電流を 75% 阻害し、既知の安全性薬理試験結果と一致していた。

2.6.2.4.2 マウスにおける神経薬理学的プロファイル

試験番号 [0200MA53.004](#)、試験結果の概要を [2.6.3.4](#) に示す。

ポナチニブを投与量 10, 30 及び 100 mg/kg で雌マウス (各群 10 例) に単回経口投与した際の神経系機能への影響を検討するため、神経薬理学的試験を実施した。対照群の雌マウス 10 例には溶媒を投与し、処置群と同様な試験を行った。投与 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 24, 48 及び 72 時間後に一般行動、神経反射及び運動機能を評価するとともに、投与 1 時間後に体温を測定した。

いずれの用量でも、投与後 72 時間にわたる観察期間を通して、ポナチニブに関連した神経症状若しくは毒性徴候、又は体温に対する影響は認められなかった。したがって、当該試験における無影響量は 100 mg/kg と推定された。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、無影響量は臨床用量の約 11 倍に相当した。

2.6.2.4.3 マウスにおける自発運動量

報告書番号 [1001MA53.006](#)、試験結果の概要を [2.6.3.4](#) に示す。

ポナチニブを投与量 10, 30 及び 100 mg/kg で雌マウス (各群 10 例) に単回経口投与し、自発

運動量 (SMA) に及ぼす影響を検討した。対照群の雌マウス 10 例には溶媒を投与し、処置群と同様な試験を行った。投与 60 分後に、コンピュータを用いたフォトビーム式自発運動量測定装置を用いて、20 分間にわたり SMA を評価した (データは連続した各 5 分間の平均運動量で示した)。同様に、投与 24、48 及び 72 時間後にも、連続した 5 分間の測定を 4 回実施した。

SMA 平均値 (フォトビームの遮断回数) を [Report 1001MA53.006, Table 1, Table 2, Table 3, Table 4](#) に示した。投与 1 時間後では、いずれの投与群についても (10、30 及び 100 mg/kg)、対照群と比較して、SMA に統計学的に有意な変化は認められなかった。投与 24、48 及び 72 時間後での 10 及び 30 mg/kg 投与群の SMA は投与 1 時間後と同程度であり、投与後 72 時間にわたり SMA は変化しないと考えられた。100 mg/kg 投与群では、投与後 24 時間に、溶媒対照群と比較して SMA の低下 (平均 16%) が認められたが、投与 48 及び 72 時間後には、SMA の低下は認められなかった。

したがって、ポナチニブを投与量 10 及び 30 mg/kg で経口投与しても、溶媒対照群と比較して、全ての測定時間において SMA に対する影響は認められなかった。一方、100 mg/kg 投与群では、投与 24 時間後のみで、溶媒対照群と比較して、可逆的な SMA の減少が認められた。したがって、当該試験における無影響量は 30 mg/kg と推定された。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、無影響量は臨床用量の約 3 倍に相当した。

2.6.2.4.4 マウスにおける運動協調性

試験番号 [0225MA53.006](#), 試験結果の概要を [2.6.3.4](#) に示す。

ポナチニブを投与量 10、30 及び 100 mg/kg で雌マウス (各群 10 例) に単回経口投与し、運動協調性に及ぼす影響を検討した。対照群の雌マウス (10 例) には溶媒を投与し、処置群と同様な試験を行った。

5 rpm の速度で回転する木製の回転棒 (直径 1 インチ) の上にマウスを乗せ、1 分間にわたりバランスを保つよう事前訓練した (ロータロッド試験)。訓練したマウスにポナチニブ又は溶媒を投与し、投与 30 及び 60 分、並びに 24、48 及び 72 時間後にロータロッド試験を実施した。1 分間の試験時間内にマウスが回転棒から 2 回以上落下した場合、運動協調性なしとみなした。運動協調性なしと判定された群当たりの動物数に 10 を乗じた値を、その群の神経毒性百分率とした。

[Report 0225MA53.006, Table 1](#) に示すように、ポナチニブを投与量 10、30 及び 100 mg/kg で経口投与した際、いずれの測定時点でも試験結果への影響は認められなかった。したがって、ポナチニブを投与量 10、30 及び 100 mg/kg で経口投与しても、投与後 72 時間まで運動協調性に対する影響はみられなかった。したがって、当該試験における無影響量は 100 mg/kg と推定された。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、無影響量は臨床用量の約 11 倍に相当した。

2.6.2.4.5 ラットにおける電解質濃度及び尿量

試験番号 [0209RA53.006](#), 試験結果の概要を [2.6.3.4](#) に示す。

ポナチニブを投与量 3、10 又は 30 mg/kg で Sprague-Dawley 雄ラット (各群 10 例) に単回経口投与し、尿量、尿 pH 及び電解質濃度に及ぼす影響を検討した。対照群の雄ラット 10 例には溶媒を投与し、処置群と同様な試験を行った。ラットを代謝ケージに入れ、投与後 4 時間まで尿を採

取し、尿量及び尿 pH を測定した。尿中の電解質 (Na^+ , K^+ 及び Cl^-) 濃度を測定し、これらの電解質排泄量 ($\mu\text{Eq}/100\text{g}$ 体重) を算出した。

尿量、尿 pH 及び電解質濃度の平均値を [Report 0209RA53.006, Table 1](#) に示す。

ポナチニブを投与量 3, 10 及び 30 mg/kg で経口投与した場合、それぞれ 42%, 51% 及び 46% の生物学的意義のある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^-) も増加したが、対照群と比較して統計学的有意差 ($p \leq 0.05$) が認められたのは、10 mg/kg 投与群の Na^+ 排泄量増加のみであった。ポナチニブを投与量 3, 10 及び 30 mg/kg で経口投与しても、電解質濃度 (Na^+ , K^+ 及び Cl^-) 及び尿 pH に対する影響は認められなかった。

したがって、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ことで、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。低投与量 3 mg/kg でも影響が認められたことから、臨床用量 45 mg との比較による安全域は推定できなかった。なお、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、低投与量 3 mg/kg は臨床用量の約 0.6 倍に相当した。

2.6.2.4.6 覚醒ラットにおける呼吸系評価

試験番号 [1275RA53.001](#), 試験結果の概要を [2.6.3.4](#) に示す。

覚醒下の Sprague-Dawley 雄ラットを用いて、ポナチニブの呼吸系機能に及ぼす影響を検討した。

投与前日に、ヘッドアウト式プレチスモグラフチャンバーにラットを 5~15 分間入れて馴化させた。投与当日に、各動物をプレチスモグラフチャンバーに入れて、約 5 分間安定させた後、投与前の呼吸数、1 回換気量及び分時換気量を 5 分間測定した。その後、ラット (各群 4 例) をチャンバーから取り出し、ポナチニブを投与量 3, 10 及び 30 mg/kg で単回経口投与した。対照群の動物には溶媒を投与した。投与後、各動物を指定のプレチスモグラフチャンバーに戻し、被験物質の投与 15 分 (± 3 分) 並びに 1, 2, 4 及び 6 時間 (± 5 分) 後に呼吸パラメータを測定した。各測定前に、ラットを少なくとも 5 分間にわたりプレチスモグラフチャンバー内で安静にさせ、その後、1 回換気量、分時換気量及び呼吸数を測定及び解析した。

溶媒並びにポナチニブを 3, 10 及び 30 mg/kg で投与した際の影響を [Report 1275RA53.001, Table 1](#) に示した。

ポナチニブを投与量 3, 10 及び 30 mg/kg で覚醒下の雄ラットに経口投与しても、呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に生物学的に問題となる影響は認められなかった。経口投与による急性毒性試験 ([Study QAA00120](#)) では、ポナチニブを 30 mg/kg で投与したときの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は 20300 ng·h/mL であった。この AUC 値は、ヒトの定常状態での血漿中 AUC 平均値 1296 ng·h/mL ([Study AP24534-07-101, Appendix 16.1.13](#)) の約 16 倍に相当した。

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

試験番号 [0239RA53.001](#), 試験結果の概要を [2.6.3.4](#) に示す。

ラットを用いて、ポナチニブの蠕動運動及び胃内容排出能に及ぼす影響を検討した。

1 群当たり 10 例の Sprague-Dawley 系雄ラットを 3 群設け、ポナチニブの投与量 3, 10 及び 30 mg/kg を投与容量 10 mL/kg で単回経口投与した。対照群の雄ラット 10 例には、溶媒を投与容量 10 mL/kg で同様に投与した。

ポナチニブ又は溶媒投与 2 時間後に、0.25%メチルセルロース溶液に懸濁した 10%活性炭液を投与容量 3 mL/ラット（重量換算値 3.16 g/ラット）で経口投与した。活性炭投与 30 分（± 5 分）後にラットを安楽死させ、腸管を摘出して湿らせた紙の上に置いた。各ラットの腸管（幽門括約筋から盲腸まで）の全長及び活性炭の移動距離（腸管の全長に占める割合）を測定した。また、胃（及び内容物）を切除して重量（胃内容物を含む場合と含まない場合）を測定し、胃内容排出能を評価した。

活性炭移動に関する値は効果百分率で表示し、以下の方法で算出した。まず、各ラットについて、活性炭の移動距離（cm）を腸管の全長で除した。個別値及び平均値を計算した後、以下の式を用いて効果百分率を算出した。

$$\text{効果百分率} = [(\text{対照群の平均値} - \text{投与群の平均値}) / \text{対照群の平均値}] \times 100$$

また、各ラットの胃内容物の重量は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{胃内容物の重量} = \text{内容物を含む全胃重量} - \text{内容物を含まない胃重量}$$

各動物の胃から排出された活性炭量は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{排出された活性炭量} = \text{活性炭懸濁液 3 mL の平均重量 (3.16 g)} - \text{胃内容物の重量}$$

ポナチニブを投与量 3, 10 及び 30 mg/kg でラットに経口投与しても、溶媒投与群と比較して、腸管運動に有意な変化はみられなかった。しかし、ポナチニブを投与量 3, 10 及び 30 mg/kg で経口投与した際の胃内容物重量は、それぞれ 90%, 192%及び 62%増加したことから、胃排出能はそれぞれ、30%, 65%及び 21%低下した。最大の影響が 10 mg/kg 投与群で認められたことから、用量依存性はみられなかった。それぞれの溶媒対照値と比較して、10 mg/kg 投与で誘発された胃排出能低下のみに統計学的な有意差が認められた（ $p < 0.05$ ）。

したがって、ポナチニブを投与量 3, 10 及び 30 mg/kg でラットに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、胃内容排出能は低下した。低投与量 3 mg/kg で影響が認められたことから、臨床用量 45 mg との比較による安全域は推定できなかった。なお、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、低投与量 3 mg/kg は臨床用量の約 0.6 倍に相当した。

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

試験番号 1259DA53.004, 試験結果の概要を 2.6.3.4 に示す。

ポナチニブを経口投与した際の心血管系機能及び 6 誘導心電図に及ぼす影響を検討するため、テレメトリー装置を装着した覚醒下の雌雄イヌを用いた試験を実施した。

投薬歴のある（十分なウォッシュアウト期間を経た）ビーグル犬（雌雄各 2 例）にテレメトリー送信機を植え込み、ポナチニブを経口投与し、心拍数、血圧（拡張期、収縮期、平均）及び第 II 誘導心電図を測定することにより、心血管系機能に対する影響を評価した。

4 例のイヌにそれぞれ溶媒及び 3 投与量（2, 5 及び 10 mg/kg）のポナチニブを最低 7 日間の投与間隔を空けて強制経口投与した（各動物で 4 回投与）。無作為化ラテン方格デザインを用いて、各動物の投与順序を決定した。循環器専門の獣医師が投与 15 分前及び投与 30 分, 1, 2, 4, 8, 12 及び 24 時間後に 1 分間の心電図波形を記録し評価した。

心血管系パラメータに関する所見を Report 1259DA53.004, Figure 1, Figure 2, Figure3, Figure4 及び Table 3, Table 4, Table 5, Table 6, Table 7, Table 8, Table 9, Table 10 に示す。

心拍数及び血圧のごくわずかな増加又は低下がランダムに認められたが、このモデルでは自然変動範囲内の変化と考えられた。テレメトリー装置を装着した覚醒下のビーグル犬にポナチニブの 2, 5 及び 10 mg/kg を経口投与しても、心拍数、及び血圧に顕著な影響はみられなかった。

ポナチニブ 10 mg/kg 投与群では、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、投与 90 分後には投与前値まで回復した。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。しかし、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回復した。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 測定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(2.6.5 薬物動態試験の概要表 13 頁参照)。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 又は 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。

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ないと結論された。例外として、10 mg/kg 投与群の 1 例で一過性に QTc 間隔が延長したが、この動物では、ポナチニブの血中濃度が C_{max} に達すると予想される時間のかなり前の時点で、QTc 間隔が投与前値まで回復したことから、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。したがって、関連性があるとした場合、当該試験における無影響量は 5 mg/kg と推定された。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、無影響量 5 mg/kg は臨床用量の約 3.7 倍に相当した。一方、関連性がないとした場合、当該試験における無影響量は 10 mg/kg と推定され、約 7.4 倍の安全域が確保された。

2.6.2.4.9 *In vitro* 血小板凝集試験

試験番号 600075, 試験結果の概要を 2.6.3.4 に示す。

チロシンキナーゼ阻害薬であるダサチニブは、*in vitro* で血小板機能を阻害することが示されている(Quintas-Cardama et al, Blood 2009)。血小板の活性化に重要な役割を果たしている Src ファミリーキナーゼ(SFK)である LYN 及び FYN の阻害がこの現象に寄与していると考えられている。ダサチニブは SFK の強力な阻害薬である(LYN の IC_{50} 値: 11 nM, FYN の IC_{50} 値: 0.2 nM)。

ポナチニブを投与した患者で、主にグレード 4 の血小板減少症がある場合に出血性事象の発症が観察されている(Iclusig Prescribing Information)。患者 5 例にポナチニブを投与した試験では、顕著な出血傾向は認められなかったが、一次止血に関する *in vitro* 試験で、閉止時間の延長として、血小板機能の異常が検出されている(Neelakantan et al, 2012)。*In vitro* では、ポナチニブは SFK に対しても阻害作用を示した(LYN の IC_{50} 値: 0.2 nM, FYN の IC_{50} 値: 0.4 nM)。しかし、細胞を用いる試験でのポナチニブの SFK 阻害作用強度、また SFK 機能を阻害し、血小板凝集に影響を及ぼすようなポナチニブ濃度が患者で得られるか否かについては、明らかになっていない。

血小板凝集に対するポナチニブの作用について更に評価するため、健康志願者 6 例(男性 3 例、女性 3 例)からクエン酸加全血を採取し、多血小板血漿 (PRP) 又は全血のプール試料を調製し

た。臨床推奨治療量である 45 mg を投与したときに求めた血漿中 $C_{\max}$ (77 ng/mL) に比べて 1～100 倍高い濃度 0.07, 0.7 及び 7 $\mu\text{g/mL}$ の適用により、ポナチニブの血小板凝集阻害作用を検討した。血小板凝集阻害薬としてアブシキシマブ (Reopro) を陽性対照薬として使用した。10 μM アデノシン二リン酸 (ADP) 又は 2 $\mu\text{g/mL}$ コラーゲンのいずれかの存在下、PRP の場合は透光度法、全血の場合はインピーダンス法により、血小板凝集能を測定した。両方法に関して、緩衝液対照に対する被験物質存在下の平均凝集強度の比を算出した。比の平均値が 2.0 を超える場合、被験物質の有意な影響であると判断した。

試験結果を表 2.6.2-8 に要約した。全ての被験者について、対照群の血小板凝集能は全て許容可能であると判断された。ヒト PRP 及び全血をポナチニブで処理したとき、濃度 0.7 $\mu\text{g/mL}$ まで有意な血小板凝集阻害は認められなかった。ポナチニブの最高適用濃度 (7 $\mu\text{g/mL}$) では、ヒト PRP 及び全血試料において、有意な血小板凝集阻害が認められた。ただし、例外として、女性から採取の PRP 試料においては、ADP 凝集に対して有意な阻害は認められなかった。

表 2.6.2-8 *In vitro* ヒト血小板凝集阻害

多血小板血漿					
被験物質	ポナチニブ ($\mu\text{g/mL}$)	平均凝集強度の比			
		ADP 10 μM		コラーゲン 2 $\mu\text{g/mL}$	
		男性	女性	男性	女性
クエン酸緩衝液対照	0	N/A	N/A	N/A	N/A
アブシキシマブ (陽性対照)	0	N/A	N/A	N/A	N/A
ポナチニブ	0.07	1.01	0.99	1.01	0.99
ポナチニブ	0.7	1.06	1.04	1.02	1.02
ポナチニブ	7	2.11 ^a	1.30	78.67 ^a	44.09 ^a
全血					
被験物質	ポナチニブ ($\mu\text{g/mL}$)	平均凝集強度の比			
		ADP 10 μM		コラーゲン 2 $\mu\text{g/mL}$	
		男性	女性	男性	女性
クエン酸緩衝液対照	0	N/A	N/A	N/A	N/A
アブシキシマブ (陽性対照)	0	N/A	N/A	N/A	N/A
ポナチニブ	0.07	1.25	1.25	1.56	1.46
ポナチニブ	0.7	1.04	1.25	1.56	1.27
ポナチニブ	7	55.00 ^a	2.13 ^a	98.00 ^a	5.17 ^a

a: 比の平均値が 2.0 を超える場合、被験物質の有意な影響であると判断した。

N/A: 該当せず

ポナチニブは臨床推奨治療量である 45 mg を投与したときに求めた血漿中 $C_{\max}$ と比較して 10 倍高い濃度でも、血小板凝集阻害を示さず、100 倍高い濃度でのみ血小板凝集を有意に阻害したことから、本試験結果が臨床的に問題となる可能性は低いと考えられた。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

ポナチニブ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) ポナチニブに固有の特徴として、野生型 BCR-ABL 及び変異型 BCR-ABL (T315I ゲートキパー変異体を含む) の両方に対して作用を持つよう設計されている。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、アミノ酸変異による影響を受けにくくする最適な結合配列をもつ。

(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。

(3) 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。

(4) 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) でも細胞増殖を阻害しなかった。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。

(5) 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。

(6) ポナチニブは汎 BCR-ABL 阻害薬のプロファイルを有する。細胞を用いた試験では、ポナチニブは、既承認の BCR-ABL 阻害薬に対して抵抗性を示す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示す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示す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、細胞を用いる加速突然変異誘発試験では、3 種類の既承認の BCR-ABL 阻害薬すべてに対して臨床的抵抗性を示す変異体を検出できていたが、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 ([Bradeen et al, 2006](#))。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 クローンの増殖又は出現を抑制することが予測された。治療効果が認められない患者の一部で、同じ 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](#))。ポナチニブを用いて実施した加速突然変異誘発試験では、40 nM 以上のポナチニブのみで阻害される T315I 又は E255V が関与する複合変異体が検出された (640 nM の高濃度を必要とする変異体もあった) ([O'Hare et al, 2009](#))。患者では、複

合変異体が連続的に出現することから、複合変異体の出現を許容するようなほかの阻害薬を用いる逐次治療よりも、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試験成績から示唆された。

(7) ポナチニブは複数の標的に対するキナーゼ阻害薬である。ポナチニブは BCR-ABL 以外に多数のキナーゼに対しても強力な阻害作用を示す。*In vitro* キナーゼ試験で、ポナチニブは RET, FLT3, KIT, 並びに FGFR, PDGFR, VEGFR, EPH 及び SRC ファミリーの活性を阻害した (IC₅₀ 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 PDGFR α に対して強力な阻害作用を示し、細胞及び *in vivo* モデルでは、FLT3 及び FGFR に対して強力な阻害作用を示すことが明らかにされた。さらに、これらのモデルで、一部のキナーゼのゲートキーパー変異体に対して有望な活性が認められている。以上の結果から、これらのキナーゼによって誘発される腫瘍、例えば AML (FLT3-ITD 変異体)、子宮内膜癌、膀胱癌及び胃癌 (FGFR 変異体)、消化管間質腫瘍 (KIT 及び PDGFR α 変異体)、並びに非小細胞肺癌 (RET 及び FGFR 変異体) のような腫瘍に対して、ポナチニブは臨床効果を示す可能性が示唆された。

(8) 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影響を評価する安全性薬理試験において、ポナチニブは良好なプロファイルを示した。ラットでは、低投与量 3 mg/kg で胃内容排出能の低下、尿量増加及び尿中電解質濃度の上昇が認められた (安全域: 0.6 未満)。ラットでのこれらの変化の臨床的意義は不明であるが、極めて軽微であると考えられた。心血管系に関する試験では、テレメトリー装置を装着したイヌに 10 mg/kg を経口投与した結果、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を下回ると考えられる時点での所見であることから、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。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以前に投与前値まで回復し、その後 24 時間まで投与前値を維持していた。

(9) *In vitro* 試験では、ポナチニブは臨床血中濃度域の適用ではヒト血小板凝集を阻害しなかった。

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チロシンキナーゼ阻害薬であり、BCR-ABL キナーゼ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これまでにない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 T315I を含む検討した全ての変異型 BCR-ABL キナーゼに対して強力な活性を示した。更に、ポナチニブは 40 nM (21 ng/mL) であらゆる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 キナーゼ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。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影響を評価する安全性薬理試験では、ポナチニブは良好なプロファイルを示すことが明らかにされた。

2.6.2.7 図表

本文中に記載した。

2.6.2.8 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.

Gozgit JM, Wong MJ, Moran L, Wardwell S, Mohemmad QK, Narasimhan NI, et al. Ponatinib (AP24534), a multitargeted pan-FGFR inhibitor with activity in multiple FGFR-amplified or mutated cancer models. *Mol Cancer Ther*. 2012a Mar;11(3):690-9.

Gozgit JM, Wong MJ, Wardwell S, Tyner JW, Loriaux MM, Mohemmad QK, et al. Potent activity of ponatinib (AP24534) in models of FLT3-driven acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Mol Cancer Ther*. 2011 Jun;10(6):1028-35.

Gozgit JM, Wong MJ, Zhu X, Clackson T, Rivera VM. Ponatinib, a potent pan-BCR-ABL inhibitor, retains activity against gatekeeper mutants of FLT3, RET, KIT, PDGFRA/B and FGFR1. *Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*. 2012b;Mar 31-Apr 4, Chicago, IL. Poster nr 853.

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.

Huang WS, Metcalf CA, Sundaramoorthi R, Wang Y, Zou D, Thomas RM, et al. Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *J Med Chem*. 2010 Jun 24;53(12):4701-19.

ICLUSIG (ponatinib) Tablets for Oral Use Prescribing Information. ARIAD Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA. December 2012.

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.

Liu Y, Gray NS. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol*. 2006 Jul;2(7):358-64.

Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 1;15(13):4263-9.

Neelakantan P, Marin D, Laffan M, Goldman J, Apperley J, Milojkovic D. Platelet dysfunction associated with ponatinib, a new pan BCR-ABL inhibitor with efficacy for chronic myeloid leukemia resistant to multiple tyrosine kinase inhibitor therapy. *Haematologica*. 2012 Sep;97(9):1444. doi: 10.3324/haematol.2012.064618. Epub 2012 Apr 24.

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.

O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, et al. In vitro activity of Bcr-Abl

inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res.* 2005 Jun 1;65(11):4500-5.

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.

Rusnak DW, Zhihong L, Lansing TJ, Rhodes N, Gilmer T, Copeland RA. A simple method for predicting serum protein binding of compounds from IC50 shift analysis for in vitro assays. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004 May 3; 14(9):2309-12.

Santoro M, Carlomagno F. Drug insight: Small-molecule inhibitors of protein kinases in the treatment of thyroid cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006 Jan;2(1):42-52.

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.* 2000 Sep 15;289(5486):1938-42.

Shah NP, Kasap C, Weier C, Balbas M, Nicoll JM, Bleickardt E, et al. Transient potent BCR-ABL inhibition is sufficient to commit chronic myeloid leukemia cells irreversibly to apoptosis. *Cancer Cell.* 2008 Dec 9;14(6):485-93.

Shah NP, Skaggs BJ, Branford S, Hughes TP, Nicoll JM, Paquette RL, et al. 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.

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

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

Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Bruggen J, Cowan-Jacob SW, Ray A, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell.* 2005 Feb;7(2):129-41.

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

Zhou T, Commodore L, Huang WS, Wang Y, Thomas M, Keats J, et al. Structural mechanism of the Pan-BCR-ABL inhibitor ponatinib (AP24534): lessons for overcoming kinase inhibitor resistance. *Chem Biol Drug Des*. 2011 Jan;77(1):1-11.

Zhou T, Parillon L, Li F, Wang Y, Keats J, Lamore S, et al. Crystal structure of the T315I mutant of Abl kinase. *Chem Biol Drug Des*. 2007 Sep;70(3):171-81.

Zirm E, Spies-Weisschart B, Heidel F, Schnetzke U, Bohmer FD, Hochhaus A, et al. Ponatinib may overcome resistance of FLT3-ITD harbouring additional point mutations, notably the previously refractory F691I mutation. *Br J Haematol*. 2012 May;157(4):483-92.

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）

2.6.3 薬理試験概要表

大塚製薬株式会社

目次

目次	2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表	3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験	5
2.6.3.3 副次的薬理試験	6
2.6.3.4 安全性薬理試験	7
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験	9

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

2.6.3.1

薬理試験

一覧表 (1)

被験物質：ポンチニブ

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Assessment of kinase selectivity profile in vitro	Recombinant protein kinases	<i>In vitro</i>	██████████	ARP280	4.2.1.1
Effect on cell viability	Human leukemia cell lines and Ba/F3 cells expressing native or mutant BCR-ABL	<i>In vitro</i>	██████	OHSU-001	4.2.1.1
Effect on cell viability compared to imatinib, nilotinib, and dasatinib	Ba/F3 cells expressing native or mutant BCR-ABL	<i>In vitro</i>	ARIAD	ARP025	4.2.1.1
Effect of AP24600 on cell viability	Ba/F3 cells expressing native or T315I mutant BCR-ABL	<i>In vitro</i>	ARIAD	ARP282	4.2.1.1
Effect on apoptosis	K562 cells and Ba/F3 cells expressing native or T315I mutant BCR-ABL	<i>In vitro</i>	ARIAD	ARP043	4.2.1.1
Effect on cell signaling	K562 cells and Ba/F3 cells expressing native or T315I mutant BCR-ABL	<i>In vitro</i>	ARIAD	ARP027	4.2.1.1
Accelerated mutagenesis assay	Ba/F3 cells expressing native BCR-ABL	<i>In vitro</i>	██████	OHSU-002	4.2.1.1
Efficacy in a CML disease model	SCID mice injected with Ba/F3 cells expressing native BCR-ABL	<i>In vivo</i>	ARIAD	ARP036	4.2.1.1
Anti-tumor activity in a xenograft model	SCID mice implanted with K562 cells expressing native BCR-ABL	Oral	ARIAD	ARP087	4.2.1.1
PK/PD assessment in a xenograft model	SCID mice implanted with K562 cells expressing native BCR-ABL	Oral	ARIAD	ARP075	4.2.1.1
Efficacy in a CML disease model	SCID mice injected with Ba/F3 cells expressing T315I mutant BCR-ABL	Oral	ARIAD	ARP033	4.2.1.1

(続く)

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1

薬理試験

一覧表 (2)

被験物質：ポナチニブ

(続き)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Anti-tumor activity in a xenograft model	Nu/nu mice implanted with Ba/F3 cells expressing T315I mutant BCR-ABL	Oral	ARIAD	ARP035	4.2.1.1
PK/PD assessment in a xenograft model	Nu/nu mice implanted with Ba/F3 cells expressing T315I mutant BCR-ABL	Oral	ARIAD	ARP074	4.2.1.1
Secondary Pharmacodynamics					
Effect on cell viability and PK/PD assessment in a xenograft model	MV-4-11 cells and nu/nu mice implanted with MV-4-11 cells expressing FLT3-ITD	<i>In vitro</i> and oral	ARIAD	ARP281	4.2.1.2
Anti-tumor activity in a xenograft model	Nu/nu mice implanted with MV-4-11 cells expressing mutant FLT3-ITD	Oral	ARIAD	ARP242	4.2.1.2
Safety Pharmacology					
hERG Assay	HEK-293 cells stably transfected with hERG	<i>In vitro</i>	██████████	S07092	4.2.1.3
Neuropharmacologic Profile	Female mice	Oral	██████████	0200MA53.004	4.2.1.3
Spontaneous Motor Activity	Female mice	Oral	██████████	1001MA53.006	4.2.1.3
Motor Coordination	Female mice	Oral	██████████	0225MA53.006	4.2.1.3
Electrolyte Concentration and Volume Diuresis	Male rats	Oral	██████████	0209RA53.006	4.2.1.3
Pulmonary Assessment	Male rats	Oral	██████████	1275RA53.001	4.2.1.3
Gastrointestinal Propulsion and Gastric Emptying	Male rats	Oral	██████████	0239RA53.001	4.2.1.3
Cardiovascular (hemodynamic) Evaluation	Telemetered dogs	Oral	██████████	1259DA53.004	4.2.1.3
Platelet Aggregation	Human	<i>In vitro</i>	██████████	6000075	4.2.1.3
Pharmacodynamic Drug Interactions					
None performed					

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の結果は薬理試験の概要文に記載した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験の結果は薬理試験の概要文に記載した。

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.4 安全性薬理試験 (1)

被験物質：ポナチニブ

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
hERG Activity	HEK-293 cells transfected with functional hERG channel	<i>In vitro</i>	0, 0.1, 0.3, 1, 3, 9 μ M	- -	Ponatinib inhibited hERG current in a dose dependent manner with an IC ₅₀ of 2.33 μ M. Percent inhibition at each test concentration (lowest to highest) were: - 7, 3, 14, 57, and 91%.	Yes	S07092
Neuropharmacologic Profile	Mouse/CD-1	Oral gavage	0, 10, 30, 100	Female/10	No neuropharmacological or toxicological signs observed during a 72-hour observation period	Yes	0200MA53.004
Spontaneous Motor Activity	Mouse/CD-1	Oral gavage	0, 10, 30, 100	Female/10	No effect was observed 1-hour post-dose. A decrease in spontaneous activity was observed in the 100 mg/kg dose group 24 hours post-dose, after which the activity trended closer to what was observed in the control group.	Yes	1001MA53.006
Motor Coordination	Mouse/CD-1	Oral gavage	0, 10, 30, 100	Female/10	No effect on motor coordination observed during a 72-hour observation period	Yes	0225MA53.006
Renal: Electrolyte Concentrations and Volume Diuresis	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage	0, 3, 10, 30	Male/10	Biologically relevant increases in urine volume of 42, 51, and 46% over a 4-hour period following the administration of 3, 10, and 30 mg/kg, respectively	Yes	0209RA53.006
Pulmonary Assessment	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage	0, 3, 10, 30	Male/4	No biologically relevant effects on respiratory rate, tidal volume, or minute volume in conscious rats	Yes	1275RA53.001
Gastrointestinal Propulsion and Gastric Emptying	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage	0, 3, 10, 30	Male/10	No effect on gastrointestinal motility. Decrease in gastric emptying at 3, 10, and 30 mg/kg	Yes	0239RA53.001

(続く)

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.4

安全性薬理試験 (2)

被験物質：ポナチニブ

(続き)

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular (Hemodynamic) Evaluation	Dog/Beagle	Oral gavage	0, 2, 5, 10	Male and Female/2 per sex	No effects on cardiac, circulatory functions, or electrocardiogram in conscious telemetered dogs	Yes	1259DA53.004
Platelet Aggregation	Human	<i>In vitro</i>	0, 0.07, 0.7, 7 µg/mL	Male and Female/3 per sex	Significant inhibition of platelet aggregation at the highest test concentration (7 µg/mL); no effect at 0.07 or 0.7 µg/mL	Yes	6000075

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施していない。