TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 1
LIST OF FIGURES 1
1. 緒言 2

LIST OF TABLES

Table 1. 発癌性を有する ROS1 融合遺伝子に関する報告（社内試験を含む） 6

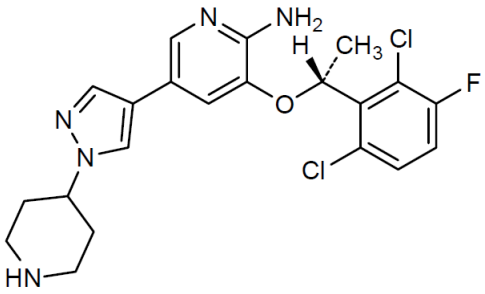
LIST OF FIGURES

Figure 1. クリゾチニブの化学構造式 2
Figure 2. ROS1 の恒常的活性化によるシグナル伝達経路 3
Figure 3. ROS1 融合遺伝子の構造 4
Figure 4. SDC4-ROS1 を発現した 3T3 細胞における催腫瘍性 5

1. 緒言

クリゾチニブ（ザーコリ®，開発番号： PF-02341066 ， 化学名： 3-[(1*R*)-1-(2,6-Dichloro-3-fluorophenyl)ethoxy]-5-[1-(piperidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-4-yl]pyridin-2-amine, 分子量：450.34）は，未分化リンパ腫キナーゼ（anaplastic lymphoma kinase：ALK）の受容体チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase：RTK）およびその発癌性変異体（ALK 融合蛋白質および特定の ALK 変異体），肝細胞増殖因子受容体（hepatocyte growth factor receptor：HGFR，c-Met）チロシンキナーゼならびに ROS1 キナーゼに対する，ATP 競合性の選択的低分子経口阻害剤として開発された（Figure 1）。クリゾチニブは，ALK 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺がん（NSCLC）患者を適応として申請され，本邦では 2012 年 3 月に承認された。

Figure 1.　クリゾチニブの化学構造式

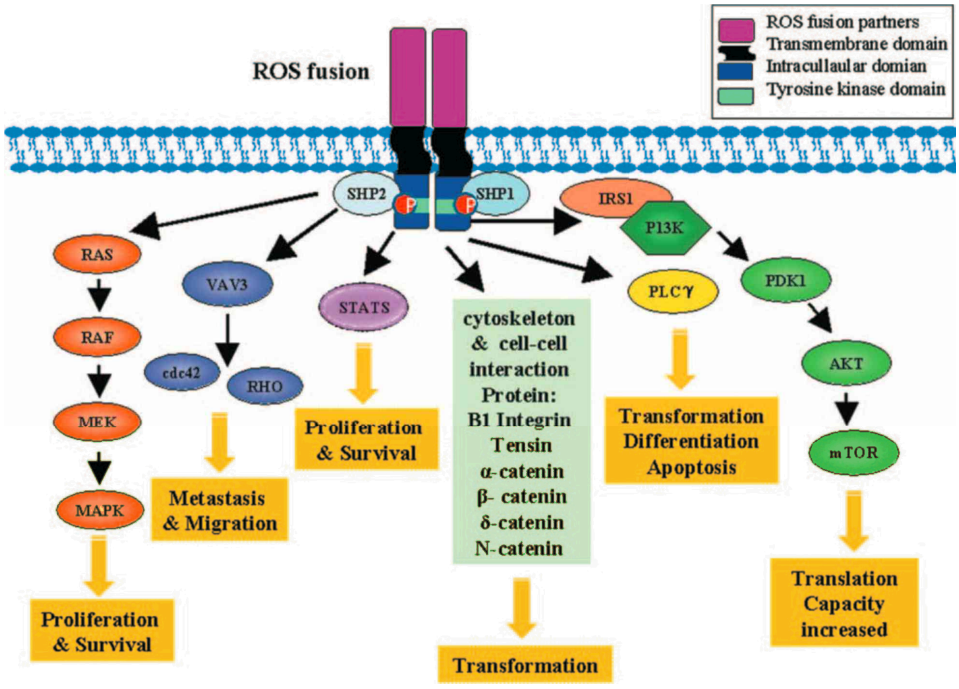


分子式：$C_{21}H_{22}Cl_2FN_5O$

NSCLC の細胞株および保存された臨床検体において，ヒト 2 番染色体短腕上で逆位が起こることにより，微小管会合蛋白（echinoderm microtubule associated protein-like 4：EML4）遺伝子と ALK 遺伝子の融合遺伝子が形成されることが，2007 年に確認された[1]。その後，NSCLC において別の融合パートナー遺伝子である kinesin family member 5B（KIF5B）などが報告された[2,3,4]。

近年，臨床および非臨床の探索的研究により，クリゾチニブは RTK である ROS1 のターゲットとなることが示唆され[5,6]，ALK 融合遺伝子陽性の NSCLC 患者に対してクリゾチニブが治療薬として有効であるように，ROS1 融合遺伝子陽性の NSCLC 患者に対してもクリゾチニブが有効である可能性が報告された。ALK 融合遺伝子のように，ROS1 にも CD74-ROS1，SLC34A2-ROS1 および SDC4-ROS1 などの癌を誘発する様々な融合遺伝子が発見されている[7,8]。ROS1 は，細胞外ドメイン，膜貫通ドメインおよび細胞内キナーゼドメインからなる RTK 蛋白質をコードしている。ROS1 のリガンドは明らかにされていないが，細胞外ドメインにリガンドが結合して活性化することで，2 つの RTK が互いに結合して二量体化し，自己阻害状態を開放することで細胞内キナーゼドメインのチロシンを相互にリン酸化する。その後，アダプター蛋白質がリン酸化されたチロシンに結合し，mitogen-activated protein kinases（MAPK），プロテインキナーゼ B（AKT）ならびに細胞増殖，細胞死抵抗性を維持する他の癌関連シグナル伝達経路などの下流のシグナル伝達経路を活性化することが明らかにされている[9]（Figure 2）。

Figure 2.　ROS1 の恒常的活性化によるシグナル伝達経路



（Chin LP, et al. J Thorac Oncol. 2012;7:1625-30. Figure 1）

ROS1 のような RTK をコードする遺伝子において染色体再配列（転座および逆位など）が起きると，ROS1 キナーゼが恒常的に活性化するキメラ型 mRNA および蛋白質が形成されることがある。このような ROS1 融合遺伝子には，以下の特徴が挙げられる。

1) 特定の癌種において ROS1 の融合パートナー遺伝子が発癌性に寄与する

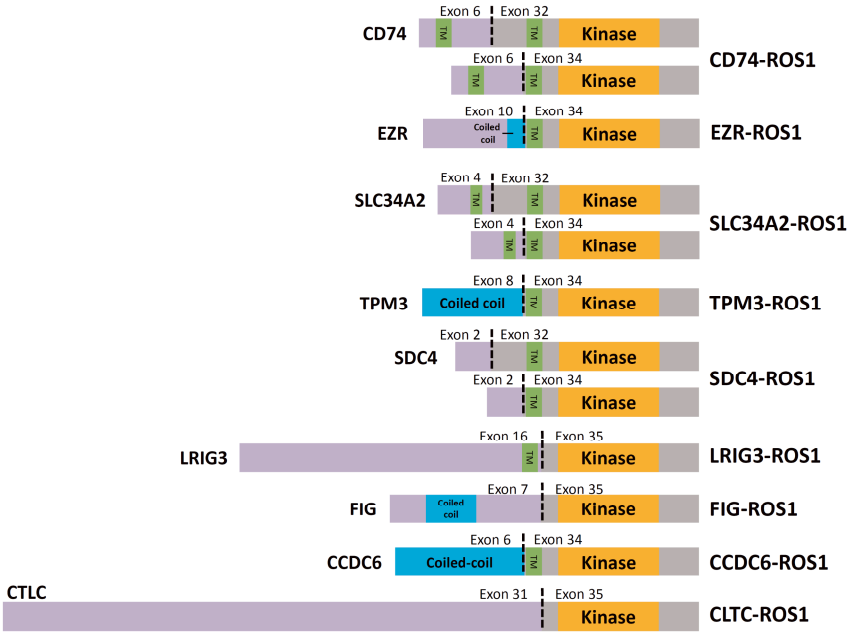
染色体再配列によるキナーゼドメインの活性化に起因する発癌性については，融合パートナーによらず様々な報告があるが，癌種ごとに特徴もみられる。NSCLC においては ALK の融合パートナー遺伝子として主に EML4 が知られているが，未分化大細胞型リンパ腫においては NPM-ALK 融合遺伝子が，炎症性筋線維芽細胞腫においては RANBP2-ALK 融合遺伝子の発現が報告されている[10,11]。同様に，ROS1 遺伝子の融合相手も癌種により異なることが明らかにされており，例えば胆管癌においては FIG(GOPC)-ROS1 融合遺伝子が，肺癌においては SDC4-ROS1，CD74-ROS1 または SLC34A2-ROS1 融合遺伝子の発現などが報告されている[12,13]。

2) ROS1 の染色体再配列において完全なキナーゼドメインが保持されている

染色体再配列により発癌性が生じるには，下流のシグナル伝達に重要な役割を果たすキナーゼドメインには変異が生じないことが前提条件と考えられている。これまでに報告された ROS1 融合遺伝子には完全なキナーゼドメインが保持されていることから（Figure 3）[14]，ROS1 融合遺伝子の融合点がいずれの領域に検出されたとしても，キナーゼドメインにおける残りの遺伝子配列に

変異がなければ，その ROS1 融合遺伝子は発癌活性を有する可能性があり，治療のターゲットとなる可能性があると考えられる。

Figure 3.　ROS1 融合遺伝子の構造



ROS1 チロシンキナーゼドメイン（オレンジ），ROS1 膜貫通ドメイン（TM : 緑），コイルドコイルドメイン（青）

（Kohno T, et al. Transl Lung Cancer Res. 2015;4:156-64. Figure 2）

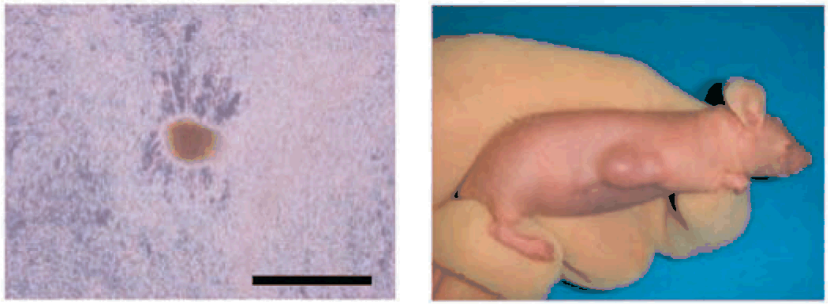
3) ROS1 の融合パートナーがキナーゼドメインの二量体化を直接的に促進, もしくは野生型 RTK がコードする不活性型のキナーゼドメインを間接的に活性化する

固形癌のドライバー遺伝子として初めて報告された EML4-ALK では, EML4 遺伝子にコードされるコイルドコイルドメインが ALK キナーゼドメインの活性化に重要な役割を果たしている[1]。これと同様に，ROS1 融合遺伝子パートナーである FIG(GOPC)，TPM3，EZR および CCDC6 も，コイルドコイルドメインを有している（Figure 3）。また CD74 は MHC クラス II 蛋白をコードしており，オリゴマー形成ドメインを有していることから[15]，これもコイルドコイルドメインと同様に ROS1 キナーゼドメインの二量体化を促進し，細胞増殖等の癌関連シグナル伝達経路が恒常的に活性化されると考えられる。なお，後述するように 2 量体化またはオリゴマー形成を促進するドメインとの融合のみが，発癌活性を有する ROS1 融合遺伝子の形成に必要な唯一の条件ではないと考えられる。

例えば，NSCLC 患者で検出された SDC4-ROS1 はコイルドコイルドメインを有していないが（Figure 3），SDC4-ROS1 を導入した NIH 3T3 細胞は形質転換フォーカスを形成し，この細胞を移植したマウスにおいて腫瘍が形成された[8]（Figure 4）。また，SDC4-ROS1 遺伝子を Ba/F3 細胞（マウス B 細胞）に導入したところ，MAPK，AKT および signal transducer and activator of

transcription 3（STAT3）のリン酸化活性が増加して細胞増殖および腫瘍形成が誘発されたが，これはクリゾチニブおよび他の ROS1 阻害剤により阻害された[13]。さらに，SDC4-ROS1 と同様にコイルドコイルドメインを有さない SLC34A2-ROS1（Figure 3）は，ヒト NSCLC 由来の HCC78 細胞に発現しており，SLC34A2-ROS1 を NIH3T3 細胞に発現させたところ細胞増殖および腫瘍形成が誘発され，SLC34A2-ROS1 を発現する細胞における細胞増殖はクリゾチニブおよび他の ROS1 阻害剤により阻害された[8,13,16]。したがって，詳細な活性化のメカニズムは明らかにされていないものの，SDC4-ROS1 および SLC34A2-ROS1 融合蛋白質は発癌活性に必要な条件を満たしていると考えられ，キナーゼの恒常的な活性化にコイルドコイルドメインまたは二量体化は必ずしも重要ではないことを示唆している。

Figure 4.　SDC4-ROS1 を発現した 3T3 細胞における催腫瘍性



SDC4-ROS1 を導入した NIH3T3 細胞における形質転換フォーカス（左図），SDC4-ROS1 を導入した NIH3T3 細胞をヌードマウスに移植したときの腫瘍形成（右図）

（Takeuchi K, et al. Nat Med. 2012;18:378-81. Figure 1D）

4) ROS1 阻害活性を有する薬剤のみが ROS1 融合遺伝子陽性の腫瘍に効果を示す

ROS1 融合遺伝子による発癌性の特徴は ALK 融合遺伝子の特徴と共通しているものの，ROS1 融合遺伝子と ALK 融合遺伝子およびその他のドライバー遺伝子とは通常相互排他的に発現することから[17,18]，ROS1 融合遺伝子は NSCLC における独立した遺伝子型サブタイプであると考えられている。SLC34A2-ROS1 を発現するヒト NSCLC 由来の HCC78 細胞を用いた in vitro の検討において，クリゾチニブが細胞増殖阻害作用を示した一方で[19]，イマチニブ（ABL，KIT，PDGFR 阻害剤），ソラフェニブ（RAF，KIT，FLT-3，RET，VEGFR，PDGFR 阻害剤），エルロチニブ（EGFR，MAP3K，ILK，ARG 阻害剤）を当該細胞株に添加したところ，細胞増殖阻害作用はほとんど認められないことが報告されている[20]。さらに，種々の ROS1 融合遺伝子を発現する細胞株をクリゾチニブのような ROS1 阻害剤で処理することにより，融合パートナー遺伝子の種類に関わらず，抗腫瘍効果を得られることが多数報告されている（Table 1）。これらのことから，クリゾチニブのような ROS1 阻害活性を有する薬剤のみが ROS1 融合遺伝子陽性の腫瘍に効果を示し，融合パートナー遺伝子は阻害剤の効果に影響を及ぼさないことが示唆された。

Table 1.　発癌性を有する ROS1 融合遺伝子に関する報告（社内試験を含む）

融合遺伝子	概要	文献
FIG(GOPC)-ROS1	FIG(GOPC)-ROS1 を発現するヒト膠芽腫細胞株または FIG(GOPC)-ROS1 を発現させた NIH3T3 または Ba/F3 細胞株に対して，クリゾチニブまたはその他の ROS1 阻害剤は細胞増殖阻害を示した。また，FIG(GOPC)-ROS1 を導入したトランスジェニックマウスでは胆管癌形成が認められた。	19,21,22
SLC34A2-ROS1	NIH3T3 細胞株に SLC34A2-ROS1 を導入したところ，腫瘍形成が確認された。また，SLC34A2-ROS1 を導入した NIH3T3 細胞または SLC34A2-ROS1 を発現するヒト NSCLC 細胞株に対して，クリゾチニブまたはその他の ROS1 阻害剤は細胞増殖阻害を示した。さらに，SLC34A2-ROS1 を発現させた 3T3 細胞を移植したモデルマウスにおいて，クリゾチニブは抗腫瘍効果を示した。	8,13,16,19,23
SDC4-ROS1	SDC4-ROS1 を発現させた NIH3T3 または Ba/F3 細胞株に対して，クリゾチニブまたは他の ROS1 阻害剤は細胞増殖阻害を示した。	8,13
CD74-ROS1	CD74-ROS1 を NIH3T3 細胞株に導入したところ，腫瘍形成が確認され，これに対しクリゾチニブは抗腫瘍効果を示した。また，CD74-ROS1 を発現させた細胞を移植したモデルマウスにおいて，クリゾチニブは抗腫瘍効果を示した。	8,19,23
EZR-ROS1	NIH3T3 細胞株に EZR-ROS1 を導入したところ，腫瘍形成が確認された。また，EZR-ROS1 を導入したトランスジェニックマウスを作成したところ，肺癌形成が認められた。	8,24
LRIG3-ROS1	LRIG3-ROS1 を導入した NIH3T3 細胞株を移植したマウスにおいて腫瘍形成が認められた。	8
TPM3-ROS1	TPM3-ROS1 を発現する細胞を用いた in vitro または in vivo 試験は実施されていないが，TPM3 は ALK または NTRK1 の融合パートナー遺伝子となることが知られており，いくつかのチロシンキナーゼに対して共通の融合パートナーとなる可能性がある。	25,26
CCDC6-ROS1	CCDC6-ROS1 を発現する細胞を用いた in vitro または in vivo 試験は実施されていないが，RET の融合パートナー遺伝子となることが知られており，いくつかのチロシンキナーゼに対して共通の融合パートナーとなる可能性がある。	8
CLTC-ROS1	CLTC-ROS1 発現する細胞を用いた in vitro または in vivo 試験は実施されていないが，ALK の融合パートナー遺伝子となることが知られており，いくつかのチロシンキナーゼに対して共通の融合パートナーとなる可能性がある。	27

以上のことから，ROS1 が特定の腫瘍のドライバー遺伝子となること，およびクリゾチニブがそれらの腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが示唆されている。今回の申請にあたり，クリゾチニブの有効性に関する特徴を明らかにする目的で，ROS1 融合遺伝子陽性のモデルを用いた非臨床薬理試験を実施した。また，初回申請後に実施された追加の副次的薬理試験および不純物の毒性試験についても評価結果を記載した。

クリゾチニブについて予定している効能・効果および用量・用法を次頁に示す。

クリゾチニブの効能・効果（案）および用法・用量（案）

【効能・効果】
*ALK*融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌
*ROS1*融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌

【用法・用量】
通常、成人にはクリゾチニブとして1回250mgを1日2回経口投与する。なお、患者の状態により適宜減量する。

参考文献

1 Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. Nature. 2007; 448: 561-6.

2 Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. Clin Cancer Res. 2009; 15: 3143-9.

3 Perner S, Wagner PL, Demichelis F, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: A rare acquired event. Neoplasia. 2008; 10:298-302.

4 Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. Cell. 2007; 14;131:1190-203.

5 Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. N Engl J Med, 2014; 371(21):1963–71.

6 El-Deeb IM, Yoo KH, Lee SH. ROS receptor tyrosine kinase: a new potential target for anticancer drugs. Med Res Rev. 2011;31(5):794-818.

7 Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. J Clin Oncol, 2012; 30:863-70.

8 Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nat Med. 2012;18(3):378-81.

9 Chin LP, Soo RA, Soong R, et al. Targeting ROS1 with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a promising therapeutic strategy for a newly defined molecular subset of non-small-cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2012;7:1625-30.

[10] Mossé YP, Lim MS, Voss SD, et al. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. Lancet Oncol. 2013;14:472-80.

[11] Sasaki T, Okuda K, Zheng W, et al. The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. Cancer Res. 2010;70:10038-43.

[12] Gu TL, Deng X, Huang F, et al. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. PLoS One. 2011; 6:e15640.

[13] Davies KD, Le AT, Theodoro MF, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2012;18:4570-9.

[14] Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, et al. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. Transl Lung Cancer Res. 2015;4:156-64.

[15] Busch R, Doebele RC, Patil NS, et al. Accessory molecules for MHC class II peptide loading. Curr Opin Immunol. 2000;12:99-106.

[16] Davies KD, Mahale S, Astling DP, et al. Resistance to ROS1 inhibition mediated by EGFR pathway activation in non-small cell lung cancer. PLoS One. 2013;8:e82236.

[17] Saito M, Shimada Y, Shiraishi K, et al. Development of lung adenocarcinomas with exclusive dependence on oncogene fusions. Cancer Res. 2015;75:2264-71.

[18] Wu S, Wang J, Zhou L, et al. Clinicopathological characteristics and outcomes of ROS1-rearranged patients with lung adenocarcinoma without EGFR, KRAS mutations and ALK rearrangements. Thorac Cancer. 2015;6:413-20.

[19] 社内資料：PF-02341066_[redacted]_144804

[20] Yasuda H, de Figueiredo-Pontes LL, Kobayashi S, et al. Preclinical rationale for use of the clinically-available multitargeted tyrosine kinase inhibitor crizotinib in ROS1 translocated lung cancer. J Thorac Oncol. 2012;7:1086-90.

[21] Davare MA, Saborowski A, Eide CA, et al. Foretinib is a potent inhibitor of oncogenic ROS1 fusion proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:19519-24.

[22] Saborowski A, Saborowski M, Davare MA, et al. Mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma validates FIG-ROS as a potent fusion oncogene and therapeutic target. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:19513-8.

[23] 社内資料：PF-02341066_[redacted]_181812

[24] Arai Y, Totoki Y, Takahashi H, et al. Mouse model for ROS1-rearranged lung cancer. PLoS One. 2013;8:e56010.

[25] Lamant L, Dastugue N, Pulford K, et al. A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. Blood. 1999;93:3088-95.

[26] Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. Nat Med. 2013;19:1469-72.

[27] Bridge JA, Kanamori M, Ma Z, et al. Fusion of the ALK gene to the clathrin heavy chain gene, CLTC, in inflammatory myofibroblastic tumor. Am J Pathol. 2001;159:411-5.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 1
LIST OF FIGURES 1
略号・用語の定義一覧 3
1. まとめ 4
2. 効力を裏付ける試験 6
2.1. In vitro 薬理試験 6
2.1.1. 酵素レベルにおけるクリゾチニブの ROS1 に対する効果 6
2.1.2. 細胞レベルにおけるクリゾチニブの ROS1 に対する効果 6
2.1.3. ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍細胞におけるクリゾチニブの抗腫瘍効果および作用機序 7
2.2. In vivo 薬理試験 10
2.2.1. ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果 10
2.2.2. ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍モデルにおけるリン酸化阻害作用と抗腫瘍効果の用量反応性 11
2.2.3. ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍モデルにおける PK/PD 相関 14
3. 副次的薬理試験 15
3.1. 5-HT_{2B} 受容体への作用 15
4. 安全性薬理試験 15
5. 薬力学的薬物相互作用試験 15
6. 考察および結論 16
7. 図表 17
8. 参考文献 17

LIST OF TABLES

Table 1. ROS1 RTK および ROS1 融合蛋白質に対するクリゾチニブの in vitro 阻害作用 7
Table 2. ROS1 が関与する細胞機能に対する作用 8
Table 3. ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍モデルにおけるクリゾチニブの抗腫瘍効果 14

LIST OF FIGURES

Figure 1. (A)SLC34A2-ROS1 および(B)CD74-ROS1 の染色体転座 4

Figure 2. HCC78 細胞における SLC34A2-ROS1 融合蛋白質および下流のシグナル伝達系分子に対する作用およびアポトーシス誘導作用 9

Figure 3. ROS1 融合遺伝子を発現させた NIH-3T3 細胞移植モデルマウスにおけるクリゾチニブの腫瘍増殖に対する阻害作用 11

Figure 4. CD74-ROS1 (s) 融合遺伝子を発現させた NIH-3T3 細胞移植モデルにおける ROS1 リン酸化および腫瘍増殖に対する阻害作用 12

Figure 5. SLC34A2-ROS1(L)融合遺伝子を発現させた NIH-3T3 細胞移植モデルにおける ROS1 リン酸化および腫瘍増殖に対する阻害作用 13

略号・用語の定義一覧

略号，用語	省略していない表現または定義
AKT	protein kinase B：プロテインキナーゼ B
ALK	anaplastic lymphoma kinase：未分化リンパ腫キナーゼ
ATP	adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
BID	twice daily：1 日 2 回
C_{stasis}	free plasma concentration which was correlated to the effect of tumor stasis：腫瘍増殖静止濃度
$C_{trough,ss}$	steady-state trough concentration：定常状態におけるトラフ血漿中濃度
EC_{50}	concentration producing 50% of maximal effect：50%効果濃度
Gab1	growth factor receptor bound 2 (Grb2)-associated binder-1：増殖因子受容体結合蛋白質 2（Grb2）結合蛋白質 1
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HGFR	hepatocyte growth factor receptor：肝細胞増殖因子受容体
IC_{50}	50% inhibitory concentration：50%阻害濃度
JAK	janus kinase：ヤヌスキナーゼ
Ki	inhibition constant：阻害定数
MAPK	mitogen-activated protein kinases
NSCLC	non-small cell lung cancer：非小細胞肺癌
PD	pharmacodynamics：薬力学
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase : ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ
PK	pharmacokinetics：薬物動態
PLCγ	phospholipase C γ：ホスホリパーゼ C γ
RTK	receptor tyrosine kinase：受容体チロシンキナーゼ
SHP2	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3

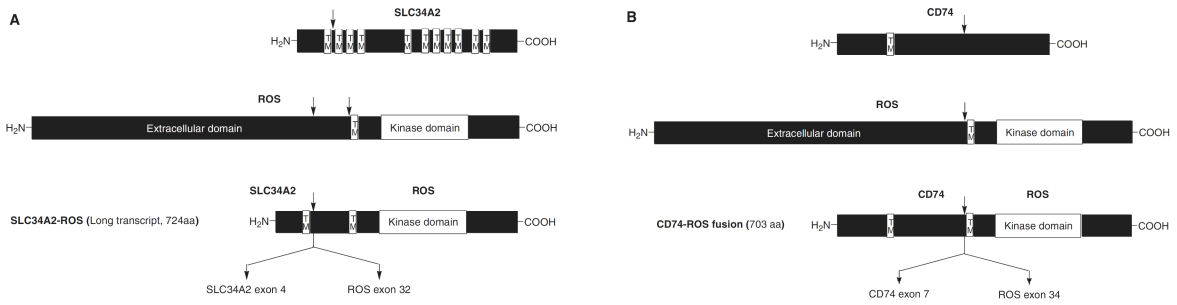
1. まとめ

クリゾチニブ（PF-02341066, ザーコリ®）は, 未分化リンパ腫キナーゼ（anaplastic lymphoma kinase : ALK）の受容体チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase : RTK）およびその発癌性変異体（ALK 融合蛋白質および特定の ALK 変異体）ならびに肝細胞増殖因子受容体（hepatocyte growth factor receptor：HGFR，c-Met）チロシンキナーゼに対する，ATP 競合性の選択的低分子経口阻害剤として開発された。クリゾチニブは, ALK 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺がん（NSCLC）患者を適応として申請され，本邦では 2012 年 3 月に承認された。クリゾチニブの非臨床薬理プロファイルは，初回申請時（eCTD 受付番号 230228001）に in vitro および in vivo 薬理試験（効力を裏付ける試験および副次的薬理試験）ならびに安全性薬理試験により検討された。

臨床および非臨床の探索的研究により，クリゾチニブは RTK である ROS1 のターゲットとなることが示唆され[1,2]，ALK 融合遺伝子陽性の NSCLC 患者に対してクリゾチニブが治療薬として有効であるように，ROS1 融合遺伝子陽性の NSCLC 患者に対してもクリゾチニブが有効である可能性が報告された。

ROS1 キナーゼは, ヒトの RTK スーパーファミリーのオーファンレセプターのうちの 1 つである[3]。催腫瘍性を有する ROS1 融合遺伝子は，最初に膠芽腫における染色体 6q21 のホモ接合体欠失により生じる Fig-ROS1 融合遺伝子として 1987 年に報告された[4]。この報告以降，ヒト NSCLC では SLC34A2-ROS1（short[s]/long[L]）, CD74-ROS1, TPM-ROS1, SDC4-ROS1 (s/L), CD74-ROS1(L), EZR-ROS1，LRIG3-ROS1，Fig-ROS1 (s)が[5,6,7,8,9,10,11,12,13,14]，胆管がんでは Fig-ROS1 (s/L)が ROS1 融合遺伝子として特定された[15]。ROS1 融合遺伝子は，それぞれ異なる融合パートナー遺伝子の切断および ROS1 との融合により生じる不均一な集団であるが，ROS1 キナーゼの触媒活性部位を有する C 末端蛋白質とパートナー遺伝子由来の N 末端蛋白質で構成される融合蛋白質が生じるという点で共通している[2,16]（Figure 1）。

Figure 1.　(A)SLC34A2-ROS1および(B)CD74-ROS1の染色体転座



TM：Trans Membrane domain（膜貫通ドメイン）
（El-Deeb IM, et al. 2011;31(5):794-818. Figure 2）

EML4-ALK 融合遺伝子のように, ROS1 遺伝子の再配列により生じ, 恒常的に活性化されたキナーゼは，STAT3，PLCγ，AKT および MAPK を含む重要な下流経路を介したシグナル伝達経路の活性化を誘導し[2,17]，in vitro および in vivo において強力な形質転換能を示した[2,9,15,16]。また ROS1

融合遺伝子は，NSCLC の約 1.1～1.7%に認められ[5,7,8,9]，主に若齢で非喫煙者の患者でみられている。これらの特徴は ALK 融合遺伝子陽性の NSCLC と共通しているものの，ROS1 融合遺伝子と ALK 融合遺伝子は通常相互排他的に発現することから[18,19]，ROS1 融合遺伝子は NSCLC における独立した遺伝子型サブタイプであると考えられる[5,7,8,9]。

ROS1 に対するクリゾチニブの阻害活性および ROS1 依存的な細胞機能に対するクリゾチニブの特性を評価するために，(1)酵素レベルおよび細胞レベルにおける ROS1 および ROS1 融合蛋白質に対するリン酸化阻害能，(2) SLC34A2-ROS1 融合遺伝子を発現する HCC78 ヒト NSCLC 細胞を用いた ROS1 融合遺伝子依存的なシグナル伝達および細胞増殖や細胞生存などの癌の進行により変化する細胞機能に対する作用, (3)ヒト ROS1 融合遺伝子を発現させた NIH-3T3 細胞を移植したマウスを用いた in vivo 腫瘍モデルによる ROS1 阻害および抗腫瘍効果，ならびに(4)腫瘍増殖の阻害および腫瘍退縮における薬物動態学的/薬力学的（PK/PD）相関について評価した。これらの薬理試験ではクリゾチニブの遊離塩基を用い，血漿中濃度はマウス血漿の非結合型分率 0.036 で補正した非結合型濃度として算出した。

一連の薬理試験では，クリゾチニブは ROS1 キナーゼを強力に阻害し，in vitro および in vivo のいずれにおいても ROS1 融合遺伝子を発現させた種々の腫瘍モデルで顕著な腫瘍縮小効果を示した。これらのクリゾチニブの作用は，ROS1 リン酸化阻害および ROS1 を介したシグナル伝達に対する阻害およびアポトーシス誘導と相関していた。またクリゾチニブの抗腫瘍効果は用量依存的であり，in vivo における ROS1 リン酸化阻害作用と相関していた。PK/PD モデル解析の結果，ROS1 融合遺伝子陽性の移植モデルでは，非結合型血漿中濃度として 84 nmol/L（38 ng/mL）～99 nmol/L（45 ng/mL）の範囲で顕著な抗腫瘍効果（100%増殖阻害，TGI）が得られた。

初回申請時における副次的薬理試験では，放射性リガンド結合試験および機能活性測定試験において，クリゾチニブはセロトニン 5-HT_{2B} 受容体のアゴニスト結合部位に対して結合親和性を示した（Ki 値：160 nmol/L，72.1 ng/mL）。そこで，5-HT_{2B} 受容体へのアゴニスト活性を評価するため，細胞を用いたカルシウム測定を実施したところ，クリゾチニブは 5-HT_{2B} 受容体に対して機能的なアゴニスト活性を有さないことが示された。

2. 効力を裏付ける試験

2.1. In vitro 薬理試験

2.1.1. 酵素レベルにおけるクリゾチニブの ROS1 に対する効果

報告書番号 PF 02341066_[redacted]_144804，概要表 2.6.3.2

クリゾチニブの遺伝子組換えヒト ROS1 に対する作用を，酵素レベルで評価した。

クリゾチニブは遺伝子組換えヒト ROS1 に対して ATP 競合的な阻害作用を示し，その阻害定数（Ki）値は 0.48 nmol/L であった（Table 1）。

2.1.2. 細胞レベルにおけるクリゾチニブの ROS1 に対する効果

報告書番号 PF 02341066_[redacted]_144804

酵素レベルで認められた ROS1 に対するクリゾチニブの阻害作用を細胞レベルで検討するため，ROS1 発現細胞を用いてクリゾチニブのキナーゼリン酸化阻害作用を評価した。t (4p15,6q22) 染色体転座により SLC34A-ROS1(short[s]/long[L]) [a]融合遺伝子を発現する HCC78 ヒト NSCLC 細胞および 6q21 染色体上の 240kb のホモ接合体欠失により Fig-ROS1[b]を発現する U138MG ヒト膠芽腫細胞を用いて，クリゾチニブの ROS1 リン酸化阻害について検討した。さらに，様々な ROS1 融合遺伝子に対するクリゾチニブのリン酸化阻害能を評価するために，種々の発癌性 ROS1 融合遺伝子（CD74-ROS1[c], SLC34A2-ROS1[s][a]，SLC34A2-ROS1 [L] [a], Fig-ROS1[s] [b]，Fig-ROS1[L][d]）を発現させた NIH-3T3 細胞についても，同様に検討した。

SLC34A-ROS1 融合遺伝子を発現する HCC78 細胞において，クリゾチニブは濃度依存的に ROS1 のリン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 47 nmol/L であった（Table 1）。また，Fig-ROS1 融合遺伝子を発現する U138MG ヒト膠芽腫細胞において，クリゾチニブは濃度依存的に ROS1 のリン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 60 nmol/L であった（Table 1）。さらに，種々の発癌性 ROS1 融合遺伝子（CD74-ROS1, SLC34A2-ROS1 [L]，SLC34A2-ROS1[s]，Fig-ROS1 [L]，Fig-ROS1 [s]）を発現させた NIH-3T3 細胞においても，クリゾチニブは濃度依存的に ROS1 のリン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 11 nmol/L～104 nmol/L であった（Table 1）。

これらの結果から，ROS1 はクリゾチニブの薬理活性発現の標的となることが示唆された。

---

[a] SLC34A 遺伝子の 12 番目のエクソンおよび ROS1 遺伝子の 32 番目のエクソン間で生じた融合遺伝子(Long)ならびに SLC34A 遺伝子の 12 番目のエクソンおよび ROS1 遺伝子の 34 番目のエクソン間で生じた融合遺伝子(short)

[b] Fig 遺伝子の 7 番目のエクソンおよび ROS1 遺伝子の 36 番目のエクソン間で生じた融合遺伝子

[c] CD74 遺伝子の 6 番目のエクソンおよび ROS1 遺伝子の 34 番目のエクソン間で生じた融合遺伝子

[d] Fig 遺伝子の 7 番目のエクソンおよび ROS1 遺伝子の 35 番目のエクソン間で生じた融合遺伝子

Table 1. ROS1 RTK および ROS1 融合蛋白質に対するクリゾチニブの in vitro 阻害作用

試験系	Ki値またはIC$_{50}$値[a]	
	nmol/L	ng/mL
酵素レベル		
ROS1	0.48	0.22
細胞レベル		
SLC34A2-ROS1リン酸化（HCC78ヒトNSCLC細胞）	47±23[b]	21
Fig-ROS1リン酸化（U138MGヒト膠芽腫細胞）	60[c]	27
CD74-ROS1リン酸化（NIH-3T3-CD74-ROS1(s)細胞）	11±3.6[d]	5
SLC34A2-ROS1(s)リン酸化（NIH-3T3-SLC34A2-ROS1(s)細胞）	42±21[e]	19
SLC34A2-ROS1(L)リン酸化（NIH-3T3-SLC34A2-ROS1(L)細胞）	104±45[d]	47
Fig-ROS1(s)リン酸化（NIH-3T3-Fig-ROS1(s)細胞）	74±48[d]	33
Fig-ROS1(L)リン酸化（NIH-3T3- Fig-ROS1(L)細胞）	35±11[f]	16

平均値±標準偏差

a: 酵素レベルの評価についてはKi値，細胞レベルの評価についてはIC$_{50}$値

b: n=12，c: n=1，d: n=6，e: n=7，f: n=5

報告書番号PF-02341066_[redacted]_144804

2.1.3. ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍細胞におけるクリゾチニブの抗腫瘍効果および作用機序

報告書番号 PF 02341066_[redacted]_144804，概要表 2.6.3.2

ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍モデルにおけるクリゾチニブの抗腫瘍効果および作用機序を検討するために，細胞増殖阻害作用，ROS1 が関与するシグナル伝達系およびアポトーシス誘導に対する作用を評価した。

SLC34A2-ROS1 融合遺伝子を発現する HCC78 ヒト NSCLC 細胞において，クリゾチニブは細胞増殖を阻害し，その IC$_{50}$ 値は 46 nmol/L であった（Table 2）。また CD74-ROS1[a]融合遺伝子を BaF3 細胞に発現させた BaF3-CD74-ROS1 細胞において，クリゾチニブは細胞増殖を阻害し，その IC$_{50}$ 値は 5.8 nmol/L であった（Table 2）。これらの細胞増殖阻害に対する IC$_{50}$ 値は，同じ細胞におけるリン酸化阻害作用に対する IC$_{50}$ 値と同程度であった（Table 1）。

恒常的に活性化した ROS1 融合蛋白質は，細胞内のチロシンキナーゼ領域における様々なチロシン残基のリン酸化能を示し，シグナル伝達分子などの基質との結合を制御する [2,20]。ROS1 のシグナル伝達の下流には，PLCγ および PI3K ファミリーだけでなく，JAK/STAT，MAPK および PI3K/AKT のように細胞生存や細胞増殖に寄与するシグナル蛋白質を活性化する SHP2 および Gab1 のようなアダプター蛋白質が含まれている [2,17]。HCC78 細胞を用い，これらのシグナル伝達

[a] CD74 遺伝子の 6 番目のエクソンおよび ROS1 遺伝子の 34 番目のエクソン間で生じた融合遺伝子

系およびアポトーシスにおけるクリゾチニブの作用をイムノブロット法で評価した。HCC78 細胞をクリゾチニブで 3 時間処理したところ，クリゾチニブは，SLC34A2-ROS1 (L/s)および SHP2, STAT3，ERK1/2 および AKT のリン酸化に対して濃度依存的な抑制作用を示した（Figure 2.A）。さらに，活性化カスパーゼ 3 も濃度依存的に増加したことから，クリゾチニブによりアポトーシスが誘導されたことも示された（Figure 2.B）。

これらの結果から，ROS1 および下流のシグナル伝達系分子に対するクリゾチニブの濃度依存的なリン酸化抑制は, HCC78 細胞における腫瘍細胞増殖阻害およびアポトーシスの誘導と相関することが示された。

Table 2.　ROS1 が関与する細胞機能に対する作用

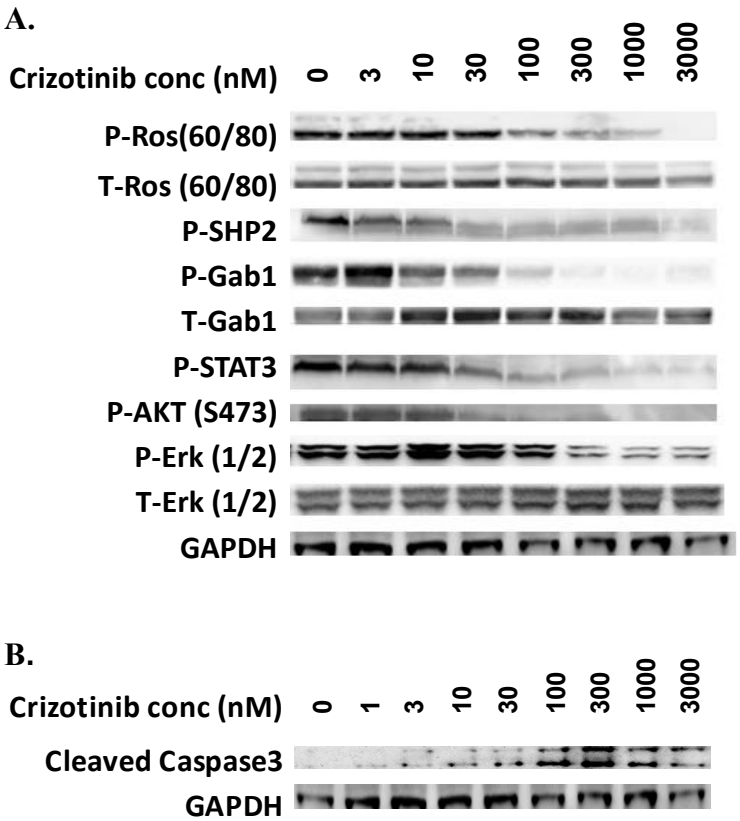
試験系	IC_{50}値	
	nmol/L	ng/mL
腫瘍細胞		
細胞増殖（SLC34A2-ROS1陽性 HCC78ヒトNSCLC細胞）	46±13[a]	21
細胞増殖（CD74-ROS1発現BaF3細胞）	5.8±4.4[b]	2.6

平均値±標準偏差

a: n=5，b: n=4

報告書番号 PF-02341066_[redacted]_144804

Figure 2.　HCC78細胞におけるSLC34A2-ROS1融合蛋白質および下流のシグナル伝達系分子に対する作用およびアポトーシス誘導作用



P: Phospho（リン酸化），T: Total（総）
HCC78細胞をクリゾチニブで3時間処理し，イムノブロット法にてシグナル伝達系分子に対するクリゾチニブの作用およびアポトーシス誘導作用を評価した。（報告書番号PF 02341066_[redacted]_144804，Figure 4，Figure 5）

2.2. In vivo 薬理試験

2.2.1. ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

報告書番号 PF-02341066_[redacted]_144804，概要表 2.6.3.2

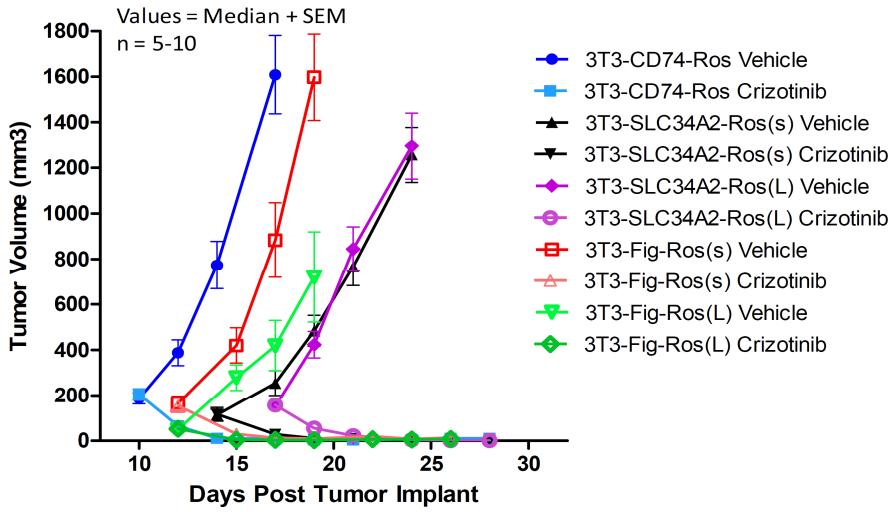
ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍モデルにおけるクリゾチニブの抗腫瘍効果を検討するため，種々の ROS1 融合遺伝子（SLC34A2-ROS1 [L]，SLC34A2-ROS1 [s]，CD74-ROS1, Fig-ROS1 [L]，Fig-ROS1 [s]）を発現させた NIH-3T3 細胞[a]を胸腺欠損マウスに移植し，この腫瘍モデルマウスにクリゾチニブを 75 mg/kg BID（1 日 2 回）で 11～17 日間経口投与した。

すべての NIH-3T3-ROS1 腫瘍モデルマウスにおいて，溶媒対照群では急速な腫瘍増殖が認められた一方で，クリゾチニブ投与群では投与開始後 5～7 日にほぼ完全な腫瘍の退縮が認められた（Figure 3）。

このことから，クリゾチニブは ROS1 依存性の腫瘍に対して，in vivo で増殖阻害作用を示すことが明らかにされた。

[a] ROS1 融合遺伝子を発現するヒト NSCLC 由来の HCC78 細胞およびヒト膠芽細胞腫由来の U138MG 細胞は胸腺欠損マウスに定着せず，これらのヒト腫瘍細胞を用いた異種移植モデルを樹立できなかったことから，NIH-3T3 細胞に種々の ROS1 融合遺伝子を発現させた細胞を移植したモデルマウスを用いた。

Figure 3.　ROS1融合遺伝子を発現させたNIH-3T3細胞移植モデルマウスにおけるクリゾチニブの腫瘍増殖に対する阻害作用



様々なROS1融合遺伝子を発現させたNIH-3T3細胞を胸腺欠損マウスの右側腹部に移植し，腫瘍が定着した（100-200 mm^3）マウスにクリゾチニブを75 mg/kg BIDで11～17日間経口投与した。（報告書番号PF 02341066_[redacted]_144804，Figure 7）

2.2.2. ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍モデルにおけるリン酸化阻害作用と抗腫瘍効果の用量反応性

報告書番号 PF-02341066_[redacted]_144804，概要表 2.6.3.2

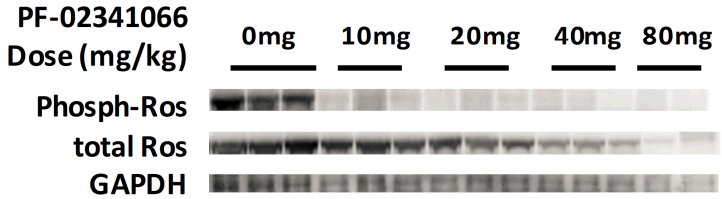
クリゾチニブによる ROS1 リン酸化の阻害および腫瘍増殖阻害の関係について検討するため，CD74-ROS1 発現 NIH-3T3 細胞移植モデルおよび SLC34A2-ROS1(L)発現 NIH-3T3 細胞移植モデルを用いて用量反応性を評価した。

NIH-3T3-CD74-ROS1 および NIH-3T3-SLC34A2-ROS1(L)細胞移植モデルのそれぞれにおいて，クリゾチニブは用量依存的に ROS1 のリン酸化を阻害した（Figure 4.A，Figure 5.A）。また，NIH-3T3-CD74-ROS1 および NIH-3T3-SLC34A2-ROS1(L)腫瘍モデルにクリゾチニブを 10 mg/kg BID～80 mg/kg BID で 10～11 日間経口投与したところ，10 mg/kg BID および 20 mg/kg BID では腫瘍増殖が阻害され（それぞれ 34%～43%および 78%～91%），40 mg/kg BID～80 mg/kg BID では顕著に腫瘍が退縮した（84%～95%，Figure 4.B，Figure 5.B）。このように，クリゾチニブ投与後に認められた用量依存的な ROS1 リン酸化の阻害は，用量依存的な腫瘍増殖阻害および腫瘍退縮と相関していた。なお，いずれの試験においても，クリゾチニブ投与後に体重減少はみられなかった。

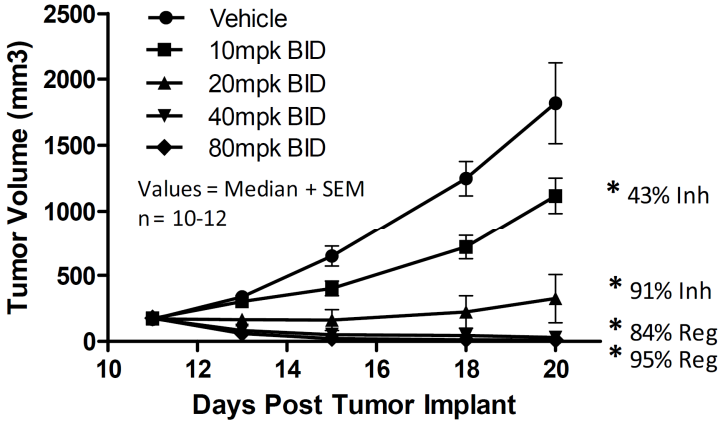
これらの結果から，ほぼ完全に ROS1 リン酸化を抑制する用量でクリゾチニブを反復投与することにより，良好な忍容性を維持しながら治療効果を最大化することが可能であることが示唆された。

Figure 4.　CD74-ROS1 (s) 融合遺伝子を発現させたNIH-3T3細胞移植モデルにおけるROS1リン酸化および腫瘍増殖に対する阻害作用

A.



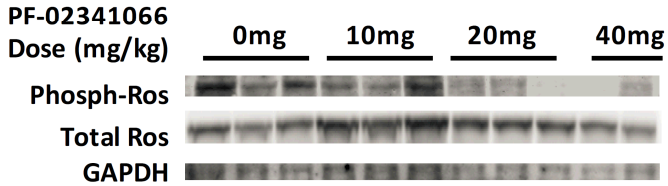
B.



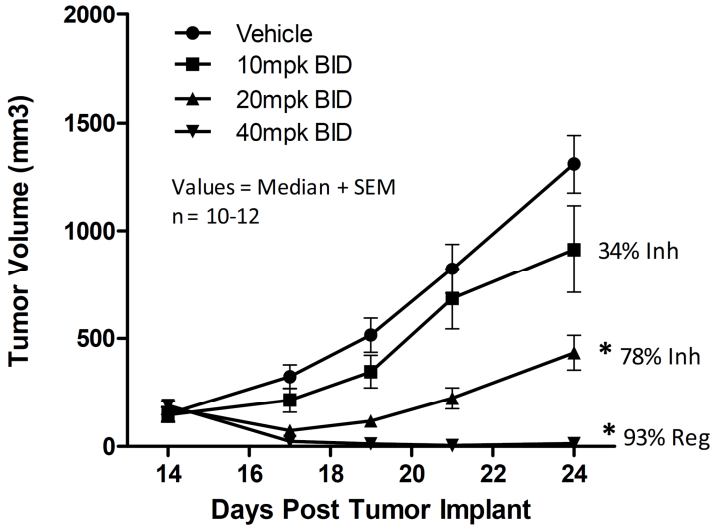
胸腺欠損マウスにヒトCD74-ROS1 (s) 融合遺伝子を発現させたNIH-3T3細胞を移植し，腫瘍が定着した（約200 mm^3）マウスにクリゾチニブ（10，20，40または80 mg/kg BID）もしくは溶媒を10日間経口投与した。（A）はクリゾチニブのROS1リン酸化阻害作用，（B）は腫瘍増殖阻害作用を示す。腫瘍増殖阻害率は，試験20日（投与後10日）の腫瘍容積に基づき，次式で算出した。100×（1－［（クリゾチニブ群の試験20日の腫瘍容積）－（クリゾチニブ群の試験11日の腫瘍容積）］/［（対照群の試験20日の腫瘍容積）－（対照群の試験11日の腫瘍容積）］）。
* P <0.00001：対照群との比較（一元配置分散分析）。（報告書番号PF-02341066_[redacted]_144804，Figure 8）

Figure 5.　SLC34A2-ROS1(L)融合遺伝子を発現させたNIH-3T3細胞移植モデルにおけるROS1リン酸化および腫瘍増殖に対する阻害作用

A.



B.



胸腺欠損マウスにヒトSLC34A2-ROS1(L) 融合遺伝子を発現させたNIH-3T3細胞を移植し，腫瘍が定着した（約200 mm^3）マウスにクリゾチニブ（10，20または40 mg/kg BID）もしくは溶媒を11日間経口投与した。（A）はクリゾチニブのROS1リン酸化阻害作用，（B）は腫瘍増殖阻害作用を示す。腫瘍増殖阻害率は，試験24日（投与後11日）の腫瘍容積に基づき，次式で算出した。100×（1－［（クリゾチニブ群の試験24日の腫瘍容積）－（クリゾチニブ群の試験14日の腫瘍容積）］/［（対照群の試験24日の腫瘍容積）－（対照群の試験14日の腫瘍容積）］）。
* P <0.00002：対照群との比較（一元配置分散分析）。（報告書番号PF-02341066_[redacted]_144804，Figure 9）

2.2.3. ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍モデルにおける PK/PD 相関

報告書番号 crizotinib_[redacted]_181812

クリゾチニブの血漿中濃度と腫瘍増殖阻害の PK/PD 相関を検討するため，NIH-3T3-CD74-ROS1 および NIH-3T3-SLC34A2-ROS1(L)腫瘍モデルマウスにクリゾチニブを 10 mg/kg BID～80 mg/kg BID の用量で 9～10 日間投与し（2.6.2.2.2.2 項と同じ動物モデル），1-コンパートメント一次吸収モデルを用いた非線形混合効果モデル[21]およびロジスティック関数を用いた間接反応モデル[22]による定量的なモデル解析を行った。

モデル解析の結果，NIH-3T3-CD74-ROS1 および NIH-3T3-SLC34A2-ROS1(L)移植モデルにおける腫瘍増殖の静止（100%の腫瘍増殖阻害）が得られる非結合型血漿中濃度，すなわち腫瘍増殖静止濃度（C_{stasis}）は，それぞれ 99 nmol/L（45 ng/mL）および 84 nmol/L（38 ng/mL）と推定された（Table 3）。2.6.2.2.2.2 項で述べた NIH-3T3-CD74-ROS1 および NIH-3T3-SLC34A2-ROS1(L)移植モデルを用いた試験の結果と総合すると，ROS1 のリン酸化阻害の程度は抗腫瘍効果の程度とよく相関しており，腫瘍増殖の静止（100%の腫瘍増殖阻害）を得るためには投与期間全体を通じて ROS1 キナーゼ活性を強く阻害する必要があることが示された。

これらの結果から，臨床におけるクリゾチニブの非結合型 C_{max} 54 ng/mL[a]および非結合型 $C_{trough,ss}$ 35 ng/mL[b]は，概ね C_{stasis} を達成していることが確認された。

Table 3. ROS1 融合遺伝子陽性腫瘍モデルにおけるクリゾチニブの抗腫瘍効果

試験系	非結合型血漿 C_{stasis}	
	nmol/L	**ng/mL**
腫瘍増殖阻害（CD74-ROS1発現NIH-3T3細胞移植モデル）	99	45
腫瘍増殖阻害（SLC34A2-ROS1 (L) NIH-3T3細胞移植モデル）	84	38

報告書番号 PF-02341066_[redacted]_144804

[a] 初回申請時（eCTD 受付番号 230228001）CTD2.7.2：A8081001 試験，第 2 サイクル第 1 日における日本人の Cmax をヒトの非結合型分率 0.093 で補正した

[b] CTD2.7.2.2.2, Table 4：A8081001 試験，第 1 サイクル第 15 日目以降におけるアジア人の C_{trough} をヒトの非結合型分率 0.093 で補正した

3. 副次的薬理試験

3.1. 5-HT_{2B}受容体への作用

報告書番号 SP8111，概要表 2.6.3.3

初回申請時における放射性リガンド結合試験および機能活性測定試験において，クリゾチニブはセロトニン 5-HT_{2B}受容体のアゴニスト結合部位に対して結合親和性を示した（Ki 値：160 nmol/L，72.1 ng/mL）。そこで，5-HT_{2B}受容体へのアゴニスト活性を評価するため，蛍光イメージングプレートリーダーを用いたカルシウム測定を実施した。カルシウム感受性色素およびプロベネシドを含む緩衝液中で CHO-Bcl2-hu5HT_{2B}細胞をプレインキュベーションした後，クリゾチニブ（0.17 nmol/L～10 μmol/L，n=4）による細胞内カルシウム放出を検出し，アゴニスト活性を評価した。なお，陽性対照としてセロトニン（0.95 pmol/L～1 μmol/L，n=4）を用いた。

クリゾチニブは，10 μmol/L まで 5-HT_{2B}受容体に対するアゴニスト活性を示さなかった。一方，陽性対照であるセロトニンの EC_{50}値は 0.45 μmol/L であった。

このことから，クリゾチニブは 5-HT_{2B}受容体に対して，機能的なアゴニスト活性を有さないと考えられた。

4. 安全性薬理試験

該当する試験なし。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験なし。

6. 考察および結論

クリゾチニブは，ALK および c-Met/HGFR の強力な阻害剤としてスクリーニングされ，ALK または c-Met に依存的な腫瘍モデルにおいて，顕著な抗腫瘍効果を示した。その後，クリゾチニブは ROS1 に対しても，強力な阻害作用を示すことが明らかにされた。

ROS1 融合遺伝子は，NSCLC および膠芽腫において発見され，これらの腫瘍の発症機序に関与していることが示唆されている。ROS1 融合遺伝子の特徴として，(1)特定の癌種において ROS1 の融合パートナー遺伝子が発癌性に寄与していること，(2) ROS1 の染色体再配列において完全なキナーゼドメインが保持されていること，(3) ROS1 の融合パートナーがキナーゼドメインの二量体化を直接的に促進，もしくは野生型 RTK がコードする不活性型のキナーゼドメインを間接的に活性化すること，(4) ROS1 阻害活性を有する薬剤のみが ROS1 融合遺伝子陽性の腫瘍に効果を示すこと[a]，ならびに(5) ROS1 融合遺伝子陽性の NSCLC に対するクリゾチニブの臨床的有用性が示唆されていることから[b]，ROS1 が特定の腫瘍のドライバー遺伝子となり，クリゾチニブがそれらの腫瘍に対して抗腫瘍効果を示す可能性が示唆されている。

In vitro では，クリゾチニブは強力な ROS1 リン酸化阻害能を示し，CD74-ROS1(s), SLC34A2-ROS1 (s/L)および Fig-ROS1 (s/L)を発現するヒト腫瘍細胞またはヒト ROS1 融合遺伝子を発現させた NIH-3T3 細胞においても ROS1 リン酸化を阻害した。また SLC34A2-ROS1 融合遺伝子を発現するヒト NSCLC 由来の HCC78 細胞において，クリゾチニブは細胞増殖を阻害し，アポトーシスを誘導した。クリゾチニブによる ROS1 融合遺伝子を発現する腫瘍に対するこれらの作用は，ROS1 を介するシグナル伝達の阻害と相関していた。

In vivo では，ROS1 融合遺伝子を発現させた NIH-3T3 細胞を移植したマウスモデルにおいて，クリゾチニブは強力な抗腫瘍効果（TGI および退縮）および良好な忍容性を示した。クリゾチニブによる抗腫瘍効果は用量依存的であり，また腫瘍組織における ROS1 リン酸化阻害作用と相関していた。クリゾチニブの血漿中濃度と抗腫瘍効果の PK/PD 相関について検討するために，CD74-ROS1(s)または SLC34A2-ROS1(L)を発現させた NIH-3T3 細胞を移植したマウスモデルを用いて PK/PD モデル解析を行ったところ，ROS1 融合遺伝子陽性の移植モデルにおいて顕著な抗腫瘍効果（100% TGI）を得るためには，投与期間を通じて非結合型血漿中濃度として 84 nmol/L（38 ng/mL）以上に達する必要があることが示唆された。これらのことから，CD74-ROS1(s)または SLC34A2-ROS1(L)を発現させた NIH-3T3 細胞を移植したマウスモデルにおける ROS1 リン酸化阻害は抗腫瘍効果と相関しており，また強力な抗腫瘍効果（100%TGI）を得るためには，投与期間中に ROS1 リン酸化阻害を維持することが重要であることが示唆された。

初回申請時における副次的薬理試験では，放射性リガンド結合試験および機能活性測定試験において，クリゾチニブはセロトニン 5-HT_{2B} 受容体のアゴニスト結合部位に対して結合親和性を示した。そこで，5-HT_{2B} 受容体へのアゴニスト活性を評価するため，細胞を用いたカルシウム測定を実施したところ，クリゾチニブは 5-HT_{2B} 受容体に対して機能的なアゴニスト活性を有さない

[a] CTD2.6.1.1 項

[b] CTD2.7.3 項

ことが示された。初回申請時には，麻酔イヌで認められた拡張期圧の低下とクリゾチニブの $5\text{-}HT_{2B}$ 受容体に対する作用が関連している可能性が示唆されていたが[a]，当該試験結果からその可能性は低いことが示された。

これらの非臨床薬理試験成績は，ROS1 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌の治療におけるクリゾチニブの有効性を裏付けるものと考えられた。

7. 図表

表および図は，本文中または概要表 2.6.3 に適宜記載した。

8. 参考文献

1 Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. N Engl J Med, 2014; 371(21):1963–71.

2 El-Deeb IM, Yoo KH, Lee SH. ROS receptor tyrosine kinase: a new potential target for anticancer drugs. Med Res Rev. 2011;31(5):794-818.

3 Charest A, Lane K, McMahon K, et al. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). Genes Chromosomes Cancer. 2003; 37:58-71.

4 Birchmeier C, Sharma S, Wigler M. Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987; 198(84):9270-4.

5 Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. J Clin Oncol, 2012; 30:863-70.

6 Li C, Fang R, Sun Y, et al. Spectrum of oncogenic driver mutations in lung adenocarcinomas from East Asian never smokers. PLoS One. 2011; 6:e28204.

7 Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. Cell. 2007;131(6):1190-203.

8 Rimkunas V, Crosby K, Kelly M, et al. Frequencies of ALK and ROS in NSCLC FFPE tumor samples utilizing a highly specific immunohistochemistry-based assay and FISH analysis. J. Clin. Oncol. 28(15s Suppl.) (2010) (Abstract 10536).

[a] 初回申請時（eCTD 受付番号 230228001）CTD2.4.5.2 項，CTD2.6.2.6 項および CTD2.6.6.9(3)項

[9] Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, et al. Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion. Clin Cancer Res.2012;18(16):4449-57.

[10] Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nat Med. 2012;18(3):378-81.

[11] Giacomini CP, Sun S, Varma S, et al. Breakpoint analysis of transcriptional and genomic profiles uncovers novel gene fusions spanning multiple human cancer types. PLoS Genet. 2013; 9(4):e1003464.

[12] Davies KD, Le AT, Theodoro MF, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2012;18:4570-9.

[13] Matsuura S, Shinmura K, Kamo T, et al. CD74-ROS1 fusion transcripts in resected non-small cell lung carcinoma. Oncol Rep. 2013;30:1675-80.

[14] Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. Am J Surg Pathol. 2013;37:554-62.

[15] Gu TL, Deng X, Huang F, et al. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. PLoS One. 2011; 6:e15640.

[16] Ou SH, Tan J, Yen Y, et al. ROS1 as a 'druggable' receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway. Expert Rev Anticancer Ther. 2012;12(4):447-56.

[17] Chin LP, Soo RA, Soong R, et al. Targeting ROS1 with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a promising therapeutic strategy for a newly defined molecular subset of non-small-cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2012;7(11):1625-30.

[18] Saito M, Shimada Y, Shiraishi K, et al. Development of lung adenocarcinomas with exclusive dependence on oncogene fusions. Cancer Res. 2015;75(11):2264-71.

[19] Wu S, Wang J, Zhou L, et al. Clinicopathological characteristics and outcomes of ROS1-rearranged patients with lung adenocarcinoma without EGFR, KRAS mutations and ALK rearrangements. Thorac Cancer. 2015;6(4):413-20.

[20] Ou SH, Chalmers ZR, Azada MC, et al. Identification of a novel TMEM106B-ROS1 fusion variant in lung adenocarcinoma by comprehensive genomic profiling. Lung Cancer. 2015;88(3):352-4.

[21] Beal SL and Sheiner LB (1992) NONMEM user guides. NONMEM project group, University of California at San Francisco, San Francisco, CA.

[22] Jusko WJ, Ko HC. Physiologic indirect response models characterize diverse types of pharmacodynamic effects. Clin Pharmacol Ther. 1994;56(4):406-19.

TABLE OF CONTENTS

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS 3
2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS 5

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PF-02341066

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics				
In Vitro Pharmacology	Enzyme Ki, cellular kinase activities, cell functional and biomarker assays.	In Vitro	PGRD	PF-02341066_[redacted]_144804
In Vivo Pharmacology				
	Kinase target inhibition, antitumor efficacy, PK/PD relationships and biomarker analysis in ROS fusion driven tumor models in Nu/ Nu mice in vivo.	PO	PGRD	PF-02341066_[redacted]_144804
PK/PD Understanding				
PK-PD Modeling of Crizotinib in 3T3-SLC34A2-ROS(L) AND 3T3-CD74-ROS(S) Xenograft Mouse Models	PK-PD analysis of tumor growth inhibition versus plasma PK values in 3T3-SLC34A2-ROS(L) AND 3T3-CD74-ROS(S) xenograft tumor models in athymic Nu/Nu mice.	PO	PGRD	PF-02341066_[redacted]_181812
Secondary Pharmacodynamics				
In vitro fluorescence cell-based calcium assay	Functional agonist activity against the 5-HT_{2B} receptor	In Vitro	PGRD	SP8111
Safety Pharmacology				
None				
Pharmacodynamic Drug Interactions				
None				

Ki = Equilibrium dissociation constant; PGRD = Pfizer Global Research & Development; PK/PD = Pharmacokinetics/pharmacodynamics; PO = Orally; ROS = c-ROS oncogene 1, receptor tyrosine kinase.

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-02341066

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (nM, μM or mg/kg)	Gender and No. Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Potency Determination in Recombinant Enzyme Assays	In Vitro	In Vitro	0.0001 uM to 6 μM	Not applicable	Ki of PF-02341066 against: ROS = 0.48 nM (0.22 ng/mL) at 56 μM (~ Km for ATP)	No	PF-02341066_[redacted]_144804
Potency Determination in Cell-based Tyrosine Kinase Phosphorylation Assays	In Vitro	In Vitro	0.04 nM to 10 μM	Not applicable	IC_{50} values of PF-02341066 against: SLC34A2-ROS variants = 42 to 104 nM (19 to 47 ng/mL). Fig-ROS variants = 35 to 74 nM (16 to 33 ng/mL). CD74-ROS = 11 nM (5 ng/mL).	No	PF-02341066_[redacted]_144804
Potency on ROS Fusion Driven Tumor Cell Proliferation	In Vitro	In Vitro	0.04 nM to 10 μM	Not applicable	IC_{50} values of PF-02341066 against ROS fusion positive cell proliferation: HCC78 = 46 nM (21 ng/mL) BaF3-CD74-ROS = 5.8 nM (2.6 ng/mL)	No	PF-02341066_[redacted]_144804
HCC78 Cell Apoptosis	In Vitro	In Vitro	1 nM to 3 μM	Not applicable	PF-02341066 dose-dependently increased cleaved-caspase 3 levels in HCC78 cells harboring SLC34A2-ROS fusion	No	PF-02341066_[redacted]_144804
Inhibition of ROS Phosphorylation in Xenograft Tumors	Mouse/nu nu	PO	10 to 80 mg/kg BID	Female n = 10 to 12	PF-02341066 dose-dependently inhibited ROS phosphorylation in xenograft tumors expressing oncogenic ROS fusion variants.	No	PF-02341066_[redacted]_144804

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-02341066

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (nM, μM or mg/kg)	Gender and No. Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Antitumor Efficacy in Subcutaneous ROS Fusion Positive Xenograft Models in Mice	Mouse/nu nu	PO	10 to 80 mg/kg BID	Female n = 10 to 12	PF-02341066 dose-dependently inhibited tumor growth and induced tumor regression in ROS fusion driven tumor xenograft models	No	PF-02341066_[redacted]_144804

ATP = Adenosine triphosphate; BID = Twice a day; Fig = Fused in glioblastoma; Ki = Equilibrium dissociation constant; Km = Michaelis constant; PO = Orally; ROS = c-ROS oncogene 1.

2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-02341066

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (μM)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Human 5HT2B receptor	CHO-Bcl2-hu5HT$_{2B}$ cells	In Vitro	≤10 μM	NA	Crizotinib did not display agonist activity at the 5-HT$_{2B}$ receptor at concentrations up to 10 μM	No	SP8111

GLP = Good laboratory practice; NA = Not applicable.
[a] Single dose unless specified otherwise.