TABLE OF CONTENTS

LIST OF FIGURES 1
1. 緒言 2

LIST OF FIGURES

Figure 1. ロルラチニブの構造式 2

1. 緒言

ロルラチニブ［開発番号 PF-06463922，化学名 (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(metheno)pyrazolo[4,3-h][2,5,11] benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile］は未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）および ROS1 受容体チロシンキナーゼ（RTK）に選択的で，ALK 阻害剤耐性に関わる変異型 ALK も強く阻害する，脳移行性のある経口投与可能な ATP 競合的低分子阻害剤である（Figure 1）。

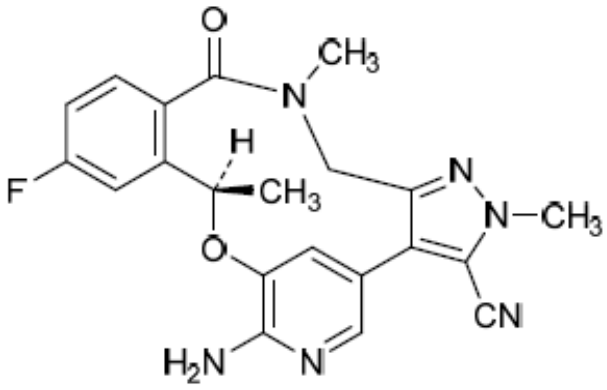


Figure 1.　ロルラチニブの構造式

ALK および *ROS1* の融合遺伝子はそれぞれ肺腺癌患者の一部において認められ，腫瘍細胞の生存，増殖および転移の調節に重要な役割を担っており[a,b]，ALK および ROS1 を標的とする治療法は，これらの融合タンパクを発現する腫瘍を有する患者に対し，新たな治療の機会を提供するものである。第 1 世代の ALK，ROS1 および Met 阻害剤であるクリゾチニブは，ALK および ROS1 融合タンパク陽性の肺癌において顕著な臨床的有用性を示した[c,d]。しかしながら，クリゾチニブの投与を受けた患者は最終的には治療に対して抵抗性を示す[e]。ALK キナーゼドメインの変異および脳転移は，クリゾチニブ治療における 2 つの主要な再発機序である[e,f]。アレクチニブおよびセリチニブなどの第 2 世代の ALK RTK 阻害剤は臨床試験で治療効果を示すが，これらに対して耐

[a] 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.

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

[c] Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2010;363:1693-703.

[d] Shaw AT, Ou SHI, Bang YJ, et al. Crizotinib in *ROS1*-Rearranged Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 2014;371:1963-71.

[e] Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. J Clin Oncol 2013;31:1105-11.

[f] Camidge DR. Taking aim at ALK across the blood-brain barrier. J Thorac Oncol 2013;8:389-90.

性となる ALK 変異も臨床で認められている[a,b,c,d,e]。ロルラチニブは, クリゾチニブよりも強力で, 臨床的に認められる ALK 二次変異を有する腫瘍に対して効果を示し，かつ血液脳関門を通過することができる薬剤として開発された。

In vitro 薬理試験において, ロルラチニブは野生型 ALK, 変異型 ALK（G1269A, L1196M, C1156Y, L1152R，S1206Y，1151Tins，G1202R，F1174L および I1171T）ならびに ROS1 キナーゼの活性を酵素レベルおよび細胞レベルで強力かつ濃度依存的に阻害した。ロルラチニブはまた，ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）細胞株における ALK および ROS1 依存性の発がんに関わる機能活性を阻害し，ALK および ROS1 融合タンパクならびに臨床的に認められる二次変異を有する変異型 ALK の融合タンパクを発現する腫瘍細胞株において強力かつ選択的な増殖阻害作用およびアポトーシス誘導作用を示した。In vivo では，EML4-ALKv1^{L1196M}，EML4-ALKv1^{G1269A}，EML4-ALKv1^{I1171T} および EML4-ALKv1^{G1202R} 変異体などの ALK および ROS1 融合タンパクを発現する腫瘍異種移植モデルにおいて顕著な抗腫瘍効果を示した。また，マウスの脳同所性移植モデル（EML4-ALKv1 および EML4-ALKv1^{L1196M}）においても腫瘍縮小効果および延命効果を示した。

ロルラチニブの効能・効果および用法・用量は添付文書（案）（CTD 1.8.1 項）に記載した。

[a] Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, et al. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. Cancer Discov 2016;6:1118-33.

[b] Friboulet L, Li N, Katayama R, et al. The ALK Inhibitor Ceritinib Overcomes Crizotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer Discov 2014;4:662-73.

[c] Ou SHI, Azada M, Hsiang DJ, et al. Next-generation sequencing reveals a novel NSCLC ALK F1174V mutation and confirms ALK G1202R mutation confers high-level resistance to alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-rearranged NSCLC patients who progressed on crizotinib. J Thorac Oncol 2014;9:549-53.

[d] Toyokawa G, Hirai F, Inamasu E, et al. Secondary Mutations at I1171 in the ALK Gene Confer Resistance to Both Crizotinib and Alectinib. J Thorac Oncol 2014;9:E86-E87.

[e] Ou SHI, Greenbowe J, Khan ZU, et al. I1171 missense mutation (particularly I1171N) is a common resistance mutation in ALK-positive NSCLC patients who have progressive disease while on alectinib and is sensitive to ceritinib. Lung Cancer 2015;88:231-4.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 3
LIST OF FIGURES 3
略語・用語の定義一覧 5
1. まとめ 6
2. 効力を裏付ける試験 7
2.1. In vitro 試験 7
2.1.1. ALK および ROS1 キナーゼ領域に対する作用（酵素レベル） 7
2.1.1.1. 野生型 ALK および ROS1 ならびに変異型 ALK に対する作用 7
2.1.1.2. 野生型 ALK および変異型 ALK^{I1171T} に対する作用 9
2.1.1.3. 代謝物 PF-06895751 の作用 9
2.1.2. キナーゼ選択性（酵素および細胞レベル） 10
2.1.3. 標的キナーゼリン酸化阻害作用（細胞レベル） 11
2.1.3.1. 変異型 ALK に対する作用 11
2.1.3.2. EML4-$ALKv1^{I1171T}$ 自己リン酸化阻害作用 13
2.1.3.3. ROS1 に対する作用 14
2.1.4. 細胞増殖阻害作用 14
2.2. In vivo 試験 16
2.2.1. ALK 融合タンパク発現腫瘍皮下移植モデル 16
2.2.1.1. H3122-EML4-$ALKv1^{L1196M}$ モデル：経口投与時の標的リン酸化阻害，抗腫瘍効果および PK/PD 相関（QD と BID の比較） 16
2.2.1.2. H3122-EML4-$ALKv1^{L1196M}$ モデル：経口投与時の標的リン酸化阻害および抗腫瘍効果（BID 経口投与） 19
2.2.1.3. H3122-EML4-$ALKv1^{L1196M}$ モデル：皮下投与時の抗腫瘍効果と標的リン酸化阻害の関係 21
2.2.1.4. H3122-EML4-$ALKv1^{G1269A}$ モデル：皮下投与時の抗腫瘍効果および PK/PD 相関 24
2.2.1.5. H3122-EML4-ALKv1 モデル：皮下投与時の抗腫瘍効果および PK/PD 相関 26
2.2.1.6. NIH3T3-EML4-$ALKv1^{I1171T}$ モデル：皮下投与時の抗腫瘍効果および PK/PD 相関 26
2.2.1.7. NIH3T3-EML4-$ALKv1^{G1202R}$ モデル：皮下投与時の抗腫瘍効果 29
2.2.2. 脳同所性移植モデル 31

2.2.3. ROS1 モデル 34
2.2.4. バイオマーカーおよびシグナル伝達系の解析 35
2.2.4.1. 機能的バイオマーカーの解析 35
2.2.4.2. シグナル伝達系の解析 36
3. 副次的薬理試験 38
3.1. ロルラチニブ 38
3.1.1. 各種受容体，酵素，トランスポーターおよびイオンチャネルに対する作用 38
3.2. 代謝物 PF-06895751 38
3.2.1. 各種受容体，酵素，トランスポーターおよびイオンチャネルに対する作用 38
4. 安全性薬理試験 38
4.1. ロルラチニブ 40
4.1.1. 心血管系 40
4.1.1.1. hERG カリウムチャネル 40
4.1.1.2. Nav1.5 ナトリウムチャネル 40
4.1.1.3. L 型カルシウムおよびナトリウムチャネル 41
4.1.1.4. 血管収縮（ラット大動脈リング） 41
4.1.1.5. 心機能（モルモット ランゲンドルフ心） 41
4.1.1.6. ラット in vivo 試験 42
4.1.1.7. イヌ in vivo 試験 42
4.1.2. 中枢神経系 43
4.1.2.1. 長期増強（ラット海馬スライス標本） 44
4.1.2.2. $GABA_A$ 受容体を介したクロライド電流 44
4.1.2.3. 認知機能に関するラット in vivo 試験 44
4.1.2.4. 認知機能に関するラット in vivo 試験：TrkB 阻害剤との比較 45
4.1.3. 呼吸器系 46
4.1.3.1. ラット呼吸器系試験 46
4.2. 代謝物 PF-06895751 47
4.2.1. hERG カリウムチャネル 47
5. 薬力学的薬物相互作用試験 47
6. 考察及び結論 47
7. 図表 48

LIST OF TABLES

Table 1. ALK および ROS1 キナーゼに対する阻害作用（酵素レベル） 8
Table 2. 野生型 ALK および変異型 ALK^{I1171T} に対する阻害作用（酵素レベル） 9
Table 3. 代謝物 PF-06895751 およびロルラチニブの野生型 ALK に対する阻害作用（酵素レベル） 10
Table 4. ロルラチニブのキナーゼ選択性（酵素レベル） 10
Table 5. ロルラチニブのキナーゼ選択性（細胞レベル） 11
Table 6. ALK 融合タンパクバリアントおよび変異型 ALK のリン酸化に対する作用（細胞レベル） 13
Table 7. ROS1 融合タンパクのリン酸化に対する作用（細胞レベル） 14
Table 8. ロルラチニブの細胞増殖阻害作用 15
Table 9. ALK および ROS1 融合タンパク発現腫瘍モデルにおけるロルラチニブの抗腫瘍効果 18
Table 10. マウス ALK および ROS1 融合タンパク発現腫瘍モデルにおける PK/PD 解析による有効血漿中濃度（非結合型）の要約 24
Table 11. ロルラチニブの安全性薬理評価の概要 39

LIST OF FIGURES

Figure 1. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} および H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} 細胞株のクリゾチニブ耐性 12
Figure 2. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} NSCLC モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化（A）および腫瘍増殖（B）に対する阻害作用：QD と BID の比較（経口投与） 17
Figure 3. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} NSCLC モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化（A）および腫瘍増殖（B）に対する阻害作用（BID 経口投与） 19
Figure 4. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} NSCLC モデルにおける用量依存的（A）および時間依存的（B）腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化阻害作用（BID 経口投与） 21
Figure 5. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} NSCLC モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化（A）および腫瘍増殖（B）に対する阻害作用（皮下持続投与） 22
Figure 6. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} NSCLC モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化および腫瘍増殖に関する PK/PD 相関（持続皮下投与） 23
Figure 7. H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} NSCLC モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{G1269A} リン酸化および腫瘍増殖に関する PK/PD 相関（持続皮下投与） 25
Figure 8. H3122-EML4-ALKv1 モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1 リン酸化および腫瘍増殖に関する PK/PD 相関（持続皮下投与） 27

Figure 9. NIH3T3-EML4-ALKv1^{I1171T} モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{I1171T} リン酸化阻害（A），腫瘍増殖阻害（B）および体重変化（C）（持続皮下投与） 28
Figure 10. NIH3T3-EML4-ALKv1^{I1171T} モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{I1171T} リン酸化および腫瘍増殖阻害の PK/PD 相関（持続皮下投与） 29
Figure 11. NIH3T3-EML4-ALKv1^{G1202R} モデルにおける腫瘍増殖阻害（A）および EML4-ALKv1^{G1202R} リン酸化阻害（B）（持続皮下投与） 30
Figure 12. NIH3T3-EML4-ALKv1^{G1202R} モデルにおける EML4-ALKv1^{G1202R} リン酸化および腫瘍増殖阻害の PK/PD 相関（持続皮下投与） 31
Figure 13. H3122 脳同所性移植モデルに対する抗腫瘍効果 32
Figure 14. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 脳同所性移植モデルに対する抗腫瘍効果 33
Figure 15. NIH3T3-CD74-ROS1 モデルにおける ROS1 阻害（A）および抗腫瘍効果（B） 35
Figure 16. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデルにおけるカスパーゼ 3（A）および BIM（B）誘導 36
Figure 17. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデルにおける Ki67 阻害 36
Figure 18. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデルにおけるシグナル伝達阻害 37

略語・用語の定義一覧

略号・用語	省略していない表現または用語の定義
ALK	Anaplastic lymphoma kinase，未分化リンパ腫キナーゼ
ALP	Alkaline phosphatase，アルカリホスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase：アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the plasma concentration-time curve，血漿中濃度－時間曲線下面積
BID	Bis in die，1 日 2 回
C_{av}	Mean concentration，平均血漿中濃度
C_{max}	Maximum concentration，最高血漿中濃度
DMSO	Dimethyl sulfoxide，ジメチルスルホキシド
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay，酵素結合免疫吸着法
E_{max}	Maximum efficacy，最大の薬理効果
GABA	γ-aminobutyric acid，γ-アミノ酪酸
GLDH	Glutamate dehydrogenase：グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
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
HEK	Human embryonic kidney，ヒト胎児腎臓
hERG	Human ether-à-go-go related gene，ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC_x	x% inhibitory concentration，x%阻害濃度
K_i	Inhibition constant，阻害定数
K_m	Michaelis constant，ミカエリス定数
NSCLC	Non-small cell lung cancer，非小細胞肺癌
PD	Pharmacodynamics，薬力学
PK	Pharmacokinetics，ファーマコキネティクス
QD	Quaque die，1 日 1 回
RTK	Receptor tyrosine kinase，受容体チロシンキナーゼ
TGI	Tumor growth inhibition，腫瘍増殖阻害
TKI	Tyrosine kinase inhibitor，チロシンキナーゼ阻害剤
T_{max}	Time to reach C_{max}，最高血漿中濃度到達時間

1. まとめ

ロルラチニブは未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）および ROS1 受容体チロシンキナーゼ（RTK）に選択的で経口投与可能な，脳移行性のある ATP 競合的低分子阻害剤であり，ALK 阻害剤耐性に関わる変異型 ALK も強く阻害する。*ALK* および *ROS1* の融合遺伝子はそれぞれ肺腺癌患者の一部において認められ，腫瘍細胞の生存，増殖および転移の調節に重要な役割を担っており[a,b]，ALK および ROS1 を標的とする治療法は，これらの融合タンパクを発現する腫瘍を有する患者に対し，新たな治療の機会を提供するものである。第 1 世代の ALK，ROS1 および Met 阻害剤であるクリゾチニブは，ALK および ROS1 融合タンパク陽性の肺癌において顕著な臨床的有用性を示した[c,d]。しかしながら，クリゾチニブの投与を受けた患者は最終的には治療に対して抵抗性を示す[e]。ALK キナーゼドメインの変異および脳転移は，クリゾチニブ治療における 2 つの主要な再発機序である[e,f]。アレクチニブおよびセリチニブなどの第 2 世代の ALK RTK 阻害剤（TKI）は臨床試験で治療効果を示すが，これらに対して耐性となる ALK 変異も臨床で認められている[g,h,i,j,k]。ロルラチニブは，クリゾチニブよりも強力で，臨床的に認められる ALK 二次変異を有する腫瘍に対して効果を示し，かつ血液脳関門を通過することができる薬剤として開発された。

ロルラチニブの ALK および ROS1 チロシンキナーゼ活性阻害，キナーゼ選択性，抗腫瘍効果，PK/PD 相関ならびに作用機序について，種々の in vitro および in vivo 試験によって評価した。In vitro で，ロルラチニブは野生型 ALK，二次変異を有する変異型 ALK（G1269A, L1196M, C1156Y, L1152R，S1206Y，1151Tins，G1202R，F1174L および I1171T）ならびに ROS1 キナーゼの活性を酵素レベル（Ki 値：0.005 nmol/L 未満～0.9 nmol/L）および細胞レベル（IC_{50} 値：0.2～65 nmol/L）で強力かつ濃度依存的に阻害した。ロルラチニブはまた，ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）細胞株に

[a] 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.

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

[c] Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2010;363:1693-703.

[d] Shaw AT, Ou SHI, Bang YJ, et al. Crizotinib in *ROS1*-Rearranged Non–Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 2014;371:1963-71.

[e] Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. J Clin Oncol 2013;31:1105-11.

[f] Camidge DR. Taking aim at ALK across the blood-brain barrier. J Thorac Oncol 2013;8:389-90.

[g] Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, et al. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. Cancer Discov 2016;6:1118-33.

[h] Friboulet L, Li N, Katayama R, et al. The ALK Inhibitor Ceritinib Overcomes Crizotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer Discov 2014;4:662-73.

[i] Ou SHI, Azada M, Hsiang DJ, et al. Next-generation sequencing reveals a novel NSCLC ALK F1174V mutation and confirms ALK G1202R mutation confers high-level resistance to alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-rearranged NSCLC patients who progressed on crizotinib. J Thorac Oncol 2014;9:549-53.

[j] Toyokawa G, Hirai F, Inamasu E, et al. Secondary Mutations at I1171 in the ALK Gene Confer Resistance to Both Crizotinib and Alectinib. J Thorac Oncol 2014;9:E86-E87.

[k] Ou SHI, Greenbowe J, Khan ZU, et al. I1171 missense mutation (particularly I1171N) is a common resistance mutation in ALK-positive NSCLC patients who have progressive disease while on alectinib and is sensitive to ceritinib. Lung Cancer 2015;88:231-4.

おける ALK および ROS1 依存性の発がんに関わる機能活性を阻害し，ALK および ROS1 融合タンパクならびに臨床的に認められる二次変異を有する変異型 ALK の融合タンパクを発現する腫瘍細胞株において強力かつ選択的な増殖阻害作用およびアポトーシス誘導作用を示した。In vivo では，EML4-ALKv1^{L1196M}，EML4-ALKv1^{G1269A}，EML4-ALKv1^{I1171T} および EML4-ALKv1^{G1202R} 変異体などの ALK および ROS1 融合タンパクを発現する腫瘍異種移植モデルにおいて顕著な抗腫瘍効果を示した。また，マウスの脳同所性移植モデル（EML4-ALKv1 および EML4-ALKv1^{L1196M}）においても腫瘍縮小効果および延命効果を示した。ロルラチニブの抗腫瘍効果は用量依存的であり，ALK または ROS1 リン酸化の阻害と強い相関を示した。ロルラチニブが EML4-ALKv1^{L1196M} のリン酸化阻害作用および EML4-ALKv1^{L1196M} 依存的ヒト NSCLC モデルにおいて抗腫瘍効果を示すのに必要な血漿中濃度を用いて，臨床試験開始にあたっての目標ヒト血漿中濃度を予測した。

これらの非臨床試験成績から，ロルラチニブが ALK および ROS1 キナーゼの強力な阻害剤であることが示された。ロルラチニブは，臨床的に報告されているクリゾチニブ，アレクチニブおよびセリチニブに耐性の多くの変異型 ALK 融合タンパクに対して阻害作用を示した。また，脳同所性移植モデルにおいて野生型および変異型の ALK 融合タンパクを発現する腫瘍に対して退縮効果を示した。

副次的薬理試験ならびに心血管系，中枢神経系および呼吸器系安全性薬理試験を実施してロルラチニブの安全性を評価した。副次的薬理試験において，ロルラチニブは安全性薬理評価において関与する可能性のある複数のイオンチャネルに対して作用を示し，またトロポミオシン受容体キナーゼ B（TrkB）を阻害した。心血管系の評価では，ロルラチニブはヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウムチャネルを弱く阻害した。また，L 型カルシウムチャネルを阻害し，遅延ナトリウム電流を増加させた。Ex vivo ランゲンドルフ心モデルでは PR 間隔を最大 46.9%増加させ，大動脈リングモデルでは血管収縮を惹起しなかった。ロルラチニブをラットに単回投与したところ，収縮期血圧，拡張期血圧および平均血圧が上昇し，心拍数は二相性に変化した。イヌへの反復投与では，心拍数の増加，収縮期血圧の低下ならびに QRS および PR 間隔の延長が認められた。中枢神経系の評価では，ラットの文脈更新モデルにおいて，軽度で用量依存性のない認知機能障害の可能性が示唆された。ラット海馬スライスモデルでは，1 µmol/L で長期増強が減少したが 0.1 µmol/L では影響は認められなかった。γ-アミノ酪酸（$GABA_A$）受容体を介したクロライド電流は阻害しなかった。呼吸器系の評価においてロルラチニブをラットに投与したところ，一回換気量が減少したが呼吸数および分時換気量に変化は認められなかった。ロルラチニブのヒトにおける主要代謝物である PF-06895751 は hERG カリウムイオンチャネルを阻害しなかった。

2. 効力を裏付ける試験

2.1. In vitro 試験

2.1.1. ALK および ROS1 キナーゼ領域に対する作用（酵素レベル）

2.1.1.1. 野生型 ALK および ROS1 ならびに変異型 ALK に対する作用

PF-06463922_[redacted]_174542

臨床的に認められる種々の変異型 ALK を含む，ヒト ALK（自己リン酸化により活性化されたアミノ酸残基 1093～1411）および ROS1（アミノ酸残基 1883～2347）キナーゼドメインを用いて，生化学酵素アッセイにおける標的 RTK に対するロルラチニブの活性を測定した。

ロルラチニブの組換えヒト野生型 ALK に対する阻害定数（K_i 値）は 0.2 nmol/L 未満であり，L1196M，G1269A，F1174L，C1156Y，L1152R，1151Tins，および S1206Y といった第 2 世代 ALK 阻害剤耐性変異を含む種々の変異型 ALK に対しては 0.1～0.9 nmol/L の K_i 値で阻害した（Table 1）。

ロルラチニブはまた，組換え野生型 ROS1 キナーゼを 0.005 nmol/L 未満の Ki 値で阻害した。ロルラチニブの阻害活性は野生型 ALK および野生型 ROS1 に対してクリゾチニブよりそれぞれ 4 倍以上および 24 倍以上強力であり，各変異型 ALK に対しては 6 倍以上～22 倍以上強力であった（Table 1）。

Table 1.　ALK および ROS1 キナーゼに対する阻害作用（酵素レベル）

	K_i 値［幾何平均値（95%信頼区間 [a]）］						**活性比 [b]**
	ロルラチニブ			**クリゾチニブ**			
ALK 野生型および変異体	**nmol/L**	**ng/mL**	**n**	**nmol/L**	**ng/mL**	**n**	
野生型 ALK	<0.2	<0.08	3	0.7 (0.7-0.8)	0.3	127	>4
ALK^{L1196M}	0.7 (0.4-1.3)	0.3	3	8.1 (7.6-8.7)	3.6	143	12
ALK^{G1269A}	0.9 (0.8, 1)	0.4	2	20 (18-23)	9.1	4	22
ALK^{F1174L}	<0.1	<0.04	1	0.8 (0.7-0.9)	0.4	3	>8
ALK^{C1156Y}	<0.1	<0.04	1	0.6 (0.1-3.3)	0.3	3	>6
ALK^{L1152R}	<0.1	<0.04	1	2.2 (1.3-3.6)	1.0	3	>22
$ALK^{1151Tins}$	0.1	0.04	1	2.2	1.0	1	22
ALK^{S1206Y}	0.2	0.08	1	1.3	0.6	1	7
ROS1	**nmol/L**	**ng/mL**	**n**	**nmol/L**	**ng/mL**	**n**	
野生型 ROS1	<0.005 (<0.005, <0.005)	<0.002	2	0.1 (0.1-0.2)	0.06	3	>24

a: n=2 の場合には個別値を示した。
b: クリゾチニブの K_i 値をロルラチニブの K_i 値で除した値。

2.1.1.2. 野生型 ALK および変異型 ALK^{I1171T} に対する作用

PF-06463922_[redacted]_055600

ALK^{I1171T} 変異は，アレクチニブ治療に耐性となった NSCLC 患者に報告されている[a,b,c]。ロルラチニブは，ATP 競合的酵素キナーゼアッセイにおいて組換え野生型 ALK および ALK^{I1171T} キナーゼドメインを阻害し，Ki 値はそれぞれ 0.1 nmol/L 未満および 0.25 nmol/L であった。1 mmol/L の ATP 存在下における野生型 ALK および ALK^{I1171T} に対する見かけの K_i 値（K_i^{app}；酵素に対する阻害剤の強固な結合に基づいて補正した IC_{50} 値）は，それぞれ 0.65 nmol/L および 7.8 nmol/L であった（Table 2）。クリゾチニブの野生型 ALK および ALK^{I1171T} に対する結合は弱く（それぞれの K_i 値：0.73 nmol/L および 1.03 nmol/L），K_i^{app} 値もロルラチニブより高値であった。一方，クリゾチニブの K_i 値は野生型 ALK および ALK^{I1171T} に対して同様であったが，ALK^{I1171T} に対する K_i^{app} 値は野生型より 4 倍高値を示した（Table 2）。ALK^{I1171T} における ATP のミカエリス定数（K_m 値：35 µmol/L）は野生型の K_m 値（97 µmol/L）の約 1/3 であり，これが ATP 競合的阻害剤であるクリゾチニブの ALK^{I1171T} に対する耐性に寄与している可能性が考えられる。

Table 2. 野生型 ALK および変異型 ALK^{I1171T} に対する阻害作用（酵素レベル）

化合物	K_i 値（nmo/L）		K_i^{app} 値（nmol/L）	
	野生型	I1171T	野生型	I1171T
ロルラチニブ	<0.1	0.3	0.7	7.8
クリゾチニブ	0.7	1.0	8.3	30

n=1
酵素はあらかじめ活性化させた後，マイクロ流体移動度シフトアッセイにより測定した。競合的阻害の Ki 値の算出には実験的に求めた ATP の K_m 値（野生型：97 µmol/L，ALK^{I1171T}：35 µmol/L）を用いた。

2.1.1.3. 代謝物 PF-06895751 の作用

PF-06463922_[redacted]_025806

ロルラチニブのヒトにおける主要代謝物である PF-06895751 は，K_m レベルの ATP 存在下において，0.1，1 および 10 µmol/L の濃度で野生型 ALK に対して活性を示さなかった。一方，ロルラチニブはこれらの濃度で ALK を 100%阻害した（Table 3）。PF-06895751 は ROS1 および他の 40 種の様々なキナーゼに対しても 1 µmol/L で活性を示さなかったが，ロルラチニブの ROS1 に対す

[a] Katayama R, Friboulet L, Koike S, et al. Two Novel ALK Mutations Mediate Acquired Resistance to the Next-Generation ALK Inhibitor Alectinib. Clin Cancer Res 2014;20:5686-96.

[b] Toyokawa G, Hirai F, Inamasu E, et al. Secondary Mutations at I1171 in the ALK Gene Confer Resistance to Both Crizotinib and Alectinib. J Thorac Oncol 2014;9:E86-E87.

[c] Ou SHI, Greenbowe J, Khan ZU, et al. I1171 missense mutation (particularly I1171N) is a common resistance mutation in ALK-positive NSCLC patients who have progressive disease while on alectinib and is sensitive to ceritinib. Lung Cancer 2015;88:231-4.

る K_i 値は 0.005 nmol/L 未満であった（Table 1）。これらのことから，PF-06895751 は ALK および ROS1 に対して薬理学的活性を有しないものと考えられる。

Table 3. 代謝物 PF-06895751 およびロルラチニブの野生型 ALK に対する阻害作用（酵素レベル）

濃度（μmol/L）	阻害率（%）	
	PF-06895751	ロルラチニブ
0.1	-2	100
1	1	99
10	-2	101

阻害率（n=1）はK_mレベルのATP（25 μmol/L）存在下で測定した。

2.1.2. キナーゼ選択性（酵素および細胞レベル）

PF-06463922_[redacted]_174542

ロルラチニブのキナーゼ選択性を標的キナーゼである ALK および ROS1 と比較するために，206 種の組換えキナーゼに対する生化学的キナーゼスクリーニングアッセイを実施した。この予備的スクリーニングから，ロルラチニブが ALK^{L1196M} と比較して 100 倍未満の選択性を示すキナーゼとして Table 4 に示す 11 種が同定された。

Table 4. ロルラチニブのキナーゼ選択性（酵素レベル）

キナーゼ	IC_{50} 値（K_i 値）[a]		選択性[c]
	nmol/L	ng/mL	
ALK^{L1196M} (陽性対照)	0.7 (K_i)[b]	0.3 (K_i)	1
ROS1 (陽性対照)	<0.005 (K_i)	<0.002 (K_i)	<0.01
LTK (TYK1)	2.7	1.1	4
FER	3.3	1.3	5
FES (FPS)	6	2.4	9
PTK2B (FAK2)	14	5.5	19
TNK2 (ACK)	17	6.7	24
PTK2 (FAK)	17	7.1	25
NTRK2 (TRKB)	23 (K_i)	9.3 (K_i)	33
NTRK1 (TRKA)	24	9.8	34
NTRK3 (TRKC)	46	19	66
FRK (PTK5)	53	22	76
EGFR (ErbB1) T790M L858R	56	23	80

n = 1
EGFR = 上皮増殖因子受容体；FAK = 接着斑キナーゼ； FRK = Fyn 関連キナーゼ；LTK = 白血球チロシンキナーゼ；NTRK =神経栄養因子チロシン受容体キナーゼ；PTK = タンパクチロシンキナーゼ；TNK = 非受容体チロシンキナーゼ；TRK = トロポミオシン受容体キナーゼ；TYK = チロシンキナーゼ
a. 阻害活性は K_m レベル ATP 存在下の IC_{50} 値または K_i 値（表中に示す）で示した。
b. K_i 値は Table 1 より引用。
c. それぞれの IC_{50} 値または K_i 値を ALK^{L1196M} の K_i 値で除して求めた。

上述の生化学的アッセイで活性の可能性が示唆されたキナーゼの一部について，ロルラチニブの選択性を細胞レベルでさらに評価した。陽性対照として EML4-ALKv1^{L1196M} を発現させた NIH3T3 細胞を用いた。その結果，ロルラチニブの ALKL^{1196M} に対する活性（IC_{50} 値 : 21 nmol/L）は TrkA および TrkB と比較してそれぞれ 476 倍および 11 倍強力であった（Table 5）。

Table 5.　ロルラチニブのキナーゼ選択性（細胞レベル）

		IC_{50} 値 [a]		ALK-L1196M との選択性
細胞	**測定対象**	**nmol/L**	**ng/mL**	
NIH3T3-EML4-ALKv1^{L1196M}	EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化	21	8.5	1
TrkA-PAE	NGF 刺激による TrkA リン酸化	10000	4064	476
TrkB-PAE	BDNF 刺激による TrkB リン酸化	229	93	11
A549	EGF 刺激による野生型 EGFR リン酸化	>10000	>4064	>476
PC9	内因性 EGFR$^{E746\text{-}A750\ Del}$ リン酸化	>10000	>4064	>476
NCI-H3255	内因性 EGFR^{L858R} リン酸化	>10000	>4064	>476
NCI-H1975	内因性 EGFR$^{L858R/T790M}$ リン酸化	>10000	>4064	>476

n = 1
BDNF = 脳由来神経栄養因子；EGF = 上皮増殖因子；NGF = 神経成長因子；PAE = ブタ大動脈内皮細胞
a. RTK リン酸化は ELISA 法によって測定し，Km レベル ATP 存在下の IC_{50} 値で示した。

2.1.3. 標的キナーゼリン酸化阻害作用（細胞レベル）

2.1.3.1. 変異型 ALK に対する作用

PF-06463922_[redacted]_174542

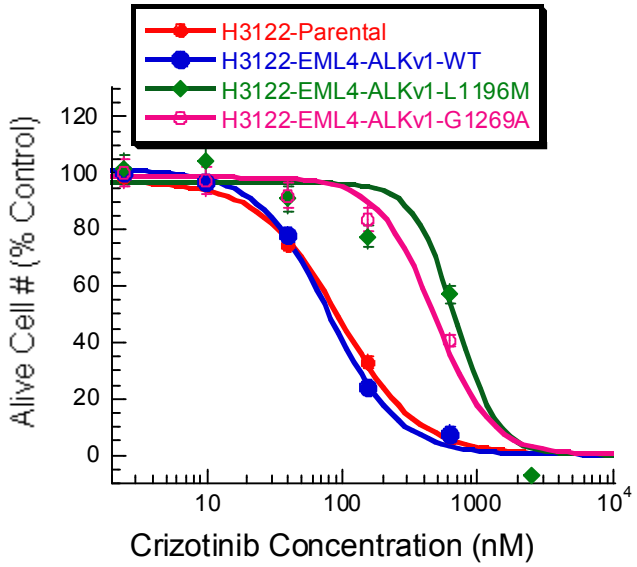
ロルラチニブの細胞における標的キナーゼに対する阻害作用を評価するために，ALK 融合タンパク，臨床的に認められるクリゾチニブ耐性変異型 ALK 融合タンパクおよび ROS1 融合タンパクのリン酸化に対する阻害活性を ELISA 法またはウェスタンブロット法によって測定し，IC_{50} 値を算出した。

NCI-H3122（以後 H3122 と表記）および NCI-H2228（以後 H2228 と表記）はヒト肺腺癌細胞株で，染色体逆位によりそれぞれ EML4-ALK 融合タンパクバリアント 1（v1）およびバリアント 3（v3a/b）を発現している。ロルラチニブは，H3122 細胞における EML4-ALKv1 および H2228 細胞における EML4-ALKv3a/b の 1604 番目のチロシン残基（Y1604）リン酸化を強く阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 2.4 および 1.3 nmol/L であった。一方，クリゾチニブの H3122 および H2228 細胞における IC_{50} 値はそれぞれ 87 および 206 nmol/L であった（Table 6）。

ヒト EML4-ALKv1，EML4-ALKv1^{L1196M} または EML4-ALKv1^{G1269A} を H3122 細胞に導入して，EML4-ALKv1 変異体を発現するヒト細胞株を樹立した。H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 細胞株における ALK の総発現量は H3122 親細胞株の約 2 倍であったことから，この細胞株における内因性 EML4-ALKv1 と導入された EML4-ALKv1^{L1196M} の発現量が同程度であることが示唆された。これらの細胞株のクリゾチニブ耐性を確認するために，細胞生存率および ALK リン酸化を評価した。クリゾチニブで 72 時間処理した後，細胞生存率を測定したところ，L1196M および G1269A の変

異型 ALK を発現する H3122 細胞はクリゾチニブに対して耐性であったことが示された（Figure 1）。また，ALK リン酸化を ELISA 法により評価したところ，変異型 EML4-ALKv1^{L1196M} および EML4-ALKv1^{G1269A} を発現する H3122 細胞に対するクリゾチニブの活性は，EML4-ALKv1 を発現する H3122 細胞と比較して約 1/6 に減少した。H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} および H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} 細胞株に対して，ロルラチニブはクリゾチニブよりそれぞれ 49 倍および 30 倍強力であった（Table 6）。

Figure 1.　H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} および H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} 細胞株のクリゾチニブ耐性



H3122 親細胞株（EML4-ALKv1 を内因的に発現する）ならびに EML4-ALKv1，EML4-ALKv1^{L1196M} および EML4-ALKv1^{G1269A} を導入した H3122 細胞株を種々の濃度のクリゾチニブで 72 時間処理した後，細胞数を CellTiter-Glo®アッセイキットを用いて測定した。エラーバーは標準偏差を示す。

数種類の ALK 融合タンパクバリアント（EML4-ALKv1，-ALKv2，-ALKv3a，-ALKv3b および KIF5B-ALK）を安定に発現する NIH3T3 マウス線維芽細胞株を樹立した。これらの遺伝子導入細胞株の ALK リン酸化（Y1604）をロルラチニブは同程度に阻害し，IC_{50} 値は 1.5 nmol/L（v1），1.4 nmol/L（v2），0.9 nmol/L（v3a），1.0 nmol/L（v3b）および 0.5 nmol/L（KIF5B）であった（Table 6）。

臨床において ALK 阻害剤治療後に認められる EML4-ALK の変異には，L1196M, G1269A, F1174L, C1156Y，L1152R，G1202R，S1206Y，1151Tins および I1171T などがある。これらの変異型 EML4-ALKv1 を発現する遺伝子導入 NIH3T3 細胞株の ALK リン酸化（Y1604）に対するロルラチニブの IC_{50} 値は 0.2 nmol/L（F1174L），1.6 nmol/L（C11156Y），4.2 nmol/L（S1206Y），9 nmol/L（L1152R），15 nmol/L（G1269A），21 nmol/L（L1196M），46 nmol/L（1151Tins），65 nmol/L（G1202R）および 7.1 nmol/L（I1171T）であった（Table 6）。これらの一連の変異型 ALK に対するロルラチニブの IC_{50} 値が 0.2 ～65 nmol/L と広範囲にわたったことから，変異型 ALK の酵素活性に対するロルラチニブの阻害活性が，そのタイプまたは ALK タンパク上の位置に依存する可能性が示唆された。最も頻繁に発生する 2 種類の二次変異である EML4-ALKv1^{L1196M} および

EML4-ALKv1^{G1269A} に対するロルラチニブの IC_{50} 値はそれぞれ 21 および 15 nmol/L で，野生型 EML4-ALKv1 融合タンパクを発現する NIH3T3 細胞（1.5 nmol/L）よりも約 10 倍弱かった。クリゾチニブとの比較では，ロルラチニブの阻害活性はこれらの変異体に対して 40 倍～825 倍強力であった（Table 6）。

Table 6. ALK 融合タンパクバリアントおよび変異型 ALK のリン酸化に対する作用（細胞レベル）

	IC_{50} 値（平均 ± 標準誤差 [a]）				IC_{50} 比 クリゾチニブ/ ロルラチニブ
	ロルラチニブ		クリゾチニブ		
	nmol/L	n	nmol/L	n	
内因性発現タンパク					
EML4-ALKv1（H3122 細胞）	2.4 ± 0.3	3	87 ± 9	29	36
EML4-ALKv3a/b（H2228 細胞）	1.3 ± 0.4	3	206 ± 41	3	158
遺伝子導入 H3122 細胞株					
H3122-EML4-ALKv1^{L1196M}	11 ± 0.3	7	535 ± 73	6	49
H3122-EML4-ALKv1^{G1269A}	17 ± 1.9	3	504 ± 135	3	30
遺伝子導入 NIH3T3 細胞株					
EML4-ALKv1	1.5 ± 0.4	5	80 ± 37	101	53
EML4-ALKv2	1.4 (1.3, 1.5)	2	96 (100, 92)	2	69
EML4-ALKv3a	0.9 (0.8, 0.9)	2	55 (58, 53)	2	61
EML4-ALKv3b	1.0 (0.9, 1.0)	2	76 (89, 63)	2	76
KIF5B-ALK	0.5 ± 0.2	3	29 ± 6	3	58
EML4-ALKv1^{L1196M}	21 ± 2	5	843 ± 382	101	40
EML4-ALKv1^{G1269A}	15 (6, 23)	2	605 ± 90	4	40
EML4-ALKv1^{F1174L}	0.2 (0.2, 0.2)	2	165 ± 36	4	825
EML4-ALKv1^{C1156Y}	1.6 (0.3, 3)	2	478 ± 153	4	299
EML4-ALKv1^{L1152R}	9 (2, 16)	2	1026 ± 71	4	114
EML4-ALKv1^{G1202R}	65 ± 23	4	1148 ± 471	4	18
EML4-ALKv1^{1151Tins}	46 (46, 45)	2	3039 (3000, 3078)	2	66
EML4-ALKv1^{S1206Y}	4.2	1	626	1	149
EML4-ALKv1^{I1171T}	7.1 ± 2.0	3	240 ± 68	3	34

細胞はロルラチニブ，クリゾチニブまたは溶媒で無血清培地中 1 時間処理した後溶解させた。細胞溶解液中の ALK 第 1604 チロシン残基（Y1604）のリン酸化は PathScan® Phospho-ALK 化学蛍光サンドイッチ ELISA キットを用いて測定した。IC_{50} 値は 4 パラメータ分析法を用いて濃度－反応曲線をフィッティングさせて算出した。
a: n=2 の場合には個別値を括弧内に示した。

（PF-06463922_[redacted]_174542, PF-06463922_[redacted]_055600）

2.1.3.2. EML4-ALKv1^{I1171T} 自己リン酸化阻害作用

PF-06463922_[redacted]_055600

非小細胞肺癌（NSCLC）患者においてアレクチニブ治療後に認められる耐性変異である ALKv1^{I1171T} の酵素活性に対するロルラチニブの阻害作用を評価した。

NIH3T3 細胞株にヒト EML4-ALKv1^{I1171T} 融合遺伝子を導入した。これらの細胞株における導入遺伝子の状態は配列解析によって確認した。薬物処理後のこれらの細胞における EML4-ALKv1^{I1171T} の自己リン酸化（Y1604 で測定）を ELISA 法によって評価した。

ロルラチニブは NIH3T3 細胞における ALKv1^{I1171T} のリン酸化を 7.1 nmol/L の IC_{50} 値で阻害した。この阻害活性はクリゾチニブ（IC_{50} 値：240 nmol/L）と比較して 34 倍強力であった（Table 6）。

2.1.3.3. ROS1 に対する作用

PF-06463922_[redacted]_174542

HCC78 ヒト NSCLC 細胞株は染色体転座（4p15, 6q22）により恒常的に活性化された SLC34A2-ROS1(short[s]/long[L])融合タンパクを発現する。この HCC78 細胞株を用いてロルラチニブの ROS1 リン酸化阻害活性を評価した。さらに，NIH3T3 細胞に種々の *ROS1* 融合遺伝子を導入して ROS1 融合タンパクを発現する細胞株を樹立した。導入した遺伝子は *SLC34A2-ROS1(L)* (Se12; Re32)，*SLC34A2-ROS1(s)*，*CD74-ROS1(s)*，*FIG-ROS1(L)*および *FIG-ROS1(s)*であった。ヒト CD74-ROS1(s)融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞株（マウスインターロイキン 3 依存性プロ B 細胞株）についても評価した。

ロルラチニブは HCC78 細胞の SLC34A2-ROS1(s/L)リン酸化を 0.14 nmol/L の IC_{50} 値で阻害し，その活性はクリゾチニブより 686 倍強力であった（Table 7）。種々の ROS1 融合タンパク質を発現する NIH3T3-ROS1 細胞株においてロルラチニブは ROS1 キナーゼ活性を 0.23～1.30 nmol/L の IC_{50} 値で阻害し，その活性はクリゾチニブと比較して 60 倍以上強力であった（Table 7）。

Table 7.　ROS1 融合タンパクのリン酸化に対する作用（細胞レベル）

細胞株	ROS1 融合タンパク	IC_{50} 値（平均 ± 標準偏差）				IC_{50} 比 クリゾチニブ/ ロルラチニブ
		ロルラチニブ		クリゾチニブ		
		nmol/L	n	nmol/L	n	
HCC78	Endogenous SLC34A2-ROS1(s/L)	0.14 ± 0.09	4	96 ± 55	10	686
NIH3T3	Engineered CD74-ROS1(s)	0.23 ± 0.18	4	16 ± 6	6	70
NIH3T3	Engineered FIG-ROS1(s)	0.31 ± 0.41	4	104 ± 48	6	335
NIH3T3	Engineered FIG-ROS1(L)	0.29 ± 0.11	4	48 ± 25	5	166
NIH3T3	Engineered SLC34A2-ROS1(s)	1.00 ± 1.14	6	61 ± 44	7	61
NIH3T3	Engineered SLC34A2-ROS1(L)	1.30 ± 0.55	6	123 ± 42	6	95

細胞は各薬物で 1 時間処理した後溶解させてタンパクを抽出した。細胞溶解液中の ROS1 総リン酸化は PathScan® Phospho-ROS1 サンドイッチ ELISA キットを用いて測定した。IC_{50} 値は 4 パラメータ分析法を用いて濃度－反応曲線をフィッティングさせて算出した。

2.1.4. 細胞増殖阻害作用

PF-06463922_[redacted]_174542, PF 06463922_[redacted]_055600

種々のALK融合タンパクまたはROS1融合タンパクを発現するヒトNSCLC細胞およびマウスBa/F3細胞株を用いてロルラチニブの細胞増殖阻害活性を評価した。ロルラチニブは内因性EML4-ALK融合タンパクを発現するH3122およびH2228ヒトNSCLC細胞の増殖をそれぞれ2.4および1.3 nmol/LのIC_{50}値で阻害した。また，H3122細胞において4.9 nmol/LのIC_{50}値でアポトーシス

を誘導した（Table 8）。変異型EML4-ALKv1^{L1196M}およびEML4-ALKv1^{G1269A}を発現するH3122細胞に対して，ロルラチニブはいずれの変異型においても30 nmol/LのIC_{50}値で増殖を阻害し，それぞれ29および28 nmol/LのIC_{50}値でアポトーシスを誘導した（Table 8）。これらの濃度はEML4-ALKリン酸化を阻害するのに必要な濃度（IC_{50}値はそれぞれ11および17 nmol/L；Table 6）とほぼ同程度であった。ロルラチニブのヒト推奨用量（100 mg QD）での非結合型C_{max}は495 nmol/L[a]（201 ng/mL）であることから，これらの結果は，ロルラチニブは二次変異の有無にかかわらず，ALK融合タンパクを発現する細胞において，臨床的に到達可能な濃度で腫瘍細胞の機能を阻害したことを示している。クリゾチニブとの比較では，ロルラチニブはEML4-ALKv1^{I1171T}，EML4-ALKv1^{G1296A}，EML4-ALKv1^{L1196M}およびEML4-ALKv1^{L1196M}に対してそれぞれ16倍，21倍，28倍および45倍強力な細胞増殖阻害活性を示した（Table 8）。

Table 8.　ロルラチニブの細胞増殖阻害作用

		IC_{50} 値（平均 ± 標準偏差）				IC_{50} 比
		ロルラチニブ		クリゾチニブ		クリゾチニブ/ロルラチニブ
細胞株	ALK / ROS1 融合タンパク	nmol/L	n	nmol/L	n	
	ALK 融合タンパク：細胞増殖阻害 [a]					
H3122	内因性 EML4-ALK v1	2.4 ± 0.3	4	108 ± 29	4	45
H2228	内因性 EML4-ALK v3a/b	1.3 ± 0.1	3	118 ± 14	3	91
H3122	導入 EML4-ALK v1^{L1196M}	30 ± 7	3	838 ± 154	3	28
H3122	導入 EML4-ALK v1^{G1269A}	30 ± 16	4	623 ± 251	4	21
Ba/F3	導入 EML4-ALKv1^{I1171T}	14 ± 12	5	225 ± 148	5	16
	ALK 融合タンパク：アポトーシス誘導 [b]					
H3122	内因性 EML4-ALK v1	4.9 ± 0.2	3	149 ± 8	3	30
H3122	導入 EML4-ALK v1^{L1196M}	29 ± 6	3	1520 ± 372	3	52
H3122	導入 EML4-ALK v1^{G1269A}	28 ± 5	3	1526 ± 291	3	55
	ROS1 融合タンパク：細胞増殖阻害					
HCC78	内因性 SLC34A2-ROS1	2.6 ± 3	3	41 ± 14	3	16
BaF3	導入 CD74-ROS1(s)	0.6 ± 0.5	4	5.9 ± 4.4	4	10

a. 細胞増殖は CellTiter-Glo®アッセイキットを用いて測定した。
b. アポトーシス誘導は Caspase-Glo® 3/7 アッセイキットを用いて測定した。
（PF-06463922_[redacted]_174542, PF-06463922_[redacted]_055600）

[a] 2.7.2.2.2.2.1.3 項 Table 28：日本人患者にロルラチニブを 100 mg QD で反復投与したときの第 1 サイクル第 15 日における C_{max}（591.1 ng/mL）に非結合型分率 0.340（2.6.4.4.4.1 項）を乗じて算出

2.2. In vivo 試験

ヌードマウスのヒト腫瘍異種移植モデルを用いて，ロルラチニブの in vivo 作用を評価した。皮下移植モデルでは ALK および ROS1 融合タンパクならびに二次変異型 ALK について評価した。また，ルシフェラーゼを発現する H3122-EML4-ALKv1 および H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 融合タンパクについては，同所性移植脳転移モデルについても評価した。ロルラチニブは種々の用量で 1 日 1 回（QD）または 2 回（BID）の経口投与，あるいはミニポンプを用いた持続皮下投与を行った。特記ない限り，血漿中薬物濃度はマウス血漿タンパク結合率（76%）[a]より算出した非結合型濃度で示した。

H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデルでは腫瘍検体を採取して種々のバイオマーカーの分析を実施し，ロルラチニブの作用機序および臨床的に関連する可能性のあるバイオマーカーについて検討した。

2.2.1. ALK 融合タンパク発現腫瘍皮下移植モデル

皮下異種移植モデルでは，恒常的に活性化された EML4-ALKv1，EML4-ALKv1^{L1196M} および EML4-ALKv1^{G1269A} 融合タンパクを発現する H3122 ヒト肺腺癌モデルならびに EML4-ALKv1^{I1171T}，EML4-ALKv1^{G1202R} および CD74-ROS1(s)融合タンパクを発現する NIH3T3 モデルを用いた。

2.2.1.1. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデル：経口投与時の標的リン酸化阻害，抗腫瘍効果および PK/PD 相関（QD と BID の比較）

PF-06463922_[redacted]_174736

H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 皮下移植モデルを用いた用量漸増試験を実施して，ALKv1^{L1196M} により誘発される腫瘍に対するロルラチニブの経口投与による効果および PK/PD 相関を評価した。

皮下に H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍が定着した（280 mm^3）マウスにロルラチニブを 3，10 および 30 mg/kg QD または 5 mg/kg BID, あるいはクリゾチニブを 80 mg/kg BID で 13 日間経口投与した。対照群には溶媒を投与した。ロルラチニブは投与 13 日に腫瘍における EML4-ALKv1^{L1196M} のリン酸化を阻害し，3～30 mg/kg/日で用量依存的な抗腫瘍効果を示した（Figure 2，Table 9）。30 mg/kg QD（33%腫瘍退縮）および 5 mg/kg BID（35%腫瘍退縮）における抗腫瘍効果は 10 mg/kg QD（3%腫瘍退縮）よりも顕著に強かった。しかし，5 mg/kg BID における C_{max}（787 nmol/L）は 10 mg/kg QD（1636 nmol/L）および 30 mg/kg QD（3193 nmol/L）よりも低く，このことからロルラチニブの抗腫瘍効果は C_{max} に依存しないことが示された（Table 9）。

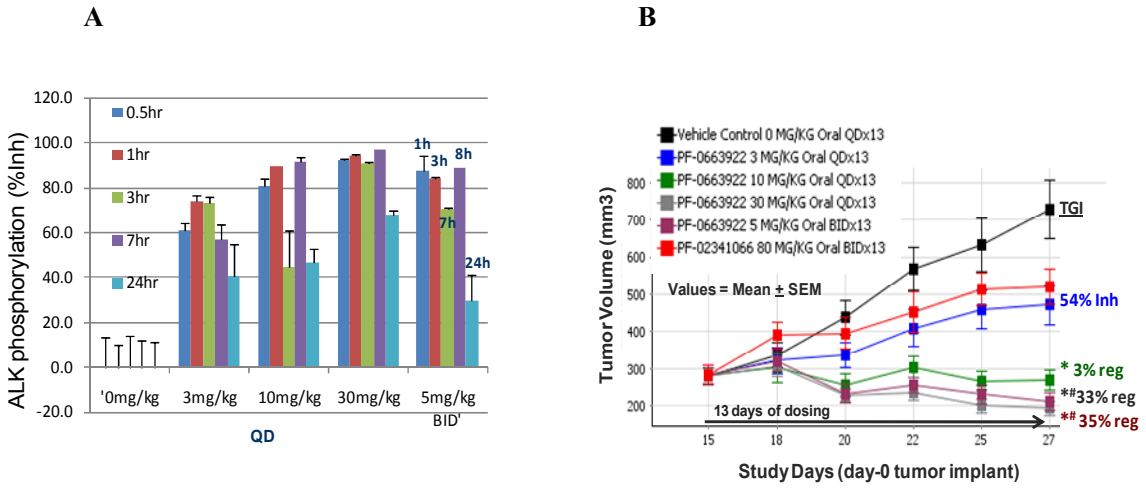
クリゾチニブは 80 mg/kg BID で野生型 H3122 モデルに対して有効性を示す血漿中濃度[b]（非結合型 C_{av} は約 250 nmol/L）が得られたが，H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 皮下腫瘍モデルはクリゾチニブに対して耐性を示した（Figure 2B）。

---

[a] 2.6.4.4.4.1 項

[b] クリゾチニブ CTD 2.6.2.2 項：H3122 モデルにおける EC_{50} 値は 23 nmol/L

Figure 2.　H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} NSCLC モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化（A）および腫瘍増殖（B）に対する阻害作用：QD と BID の比較（経口投与）



皮下に H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍が定着した（280 mm^3）マウス（n=15）にロルラチニブを QD または BID，あるいはクリゾチニブを BID で 13 日間投与した。腫瘍体積は週 3 回測定した。投与終了時に血漿および腫瘍検体を採取して PK/PD 解析を実施した。総リン酸化 ALK 量は ELISA 法により測定し，対照群に対する阻害率（%inh）で示した。エラーバーは標準誤差を示す。*: $p < 0.0001$（対照群との比較，一元配置分散分析および最小有意差法），#: $p < 0.04$（10 mg/kg QD との比較，一元配置分散分析），PF-0663922：ロルラチニブ，PF-02341066：クリゾチニブ

Table 9. ALKおよびROS1融合タンパク発現腫瘍モデルにおけるロルラチニブの抗腫瘍効果

腫瘍モデル	投与経路，スケジュールおよび用量 (mg/kg)	C_{max}/C_{av} (nmol/L，非結合型)[a]	リン酸化阻害率（%）					抗腫瘍効果	P 値
			1h	3h	7h	8h	24h		
H3122-EML4-ALKv1-L1196M No. 1	PO,QD, 3	521/102	74	73	57	NA	41	54% TGI (d13)	0.02833
	PO,QD, 10	1636/508	90	57	92	NA	47	3% Reg (d13)	<0.00001
	PO,QD, 30	3193/1728	95	91	97	NA	68	33% Reg (d13)	<0.00001
	PO,BID, 10	787/395	88	84	71	89	30	35% Reg (d13)	<0.00001
H3122-EML4-ALKv1-L1196M No. 2	PO,BID, 0.6	25/12	34	42	6	13	-161	52% TGI (d13)	<0.0005
	PO,BID, 2	100/48	67	59	32	29	-120	70% TGI (d13)	<0.00001
	PO,BID, 6	310/152	67	69	42	58	-224	98% TGI (d13)	<0.00001
	PO,BID, 20	1542/760	91	89	81	82	59	63% Reg (d13)	<0.00001
	PO,BID, 40	3730/1786	94	91	91	87	76	61% Reg (d13)	<0.00001
H3122-EML4-ALKv1-L1196M No. 3	SC Infus, 0.5	15	6.2					49% TGI (d13)	0.00342
	SC Infus, 1.5	38	27					84% TGI (d13)	<0.00001
	SC Infus, 5	150	60					30% Reg (d13)	<0.00001
	SC Infus, 15	346	89					57% Reg (d13)	<0.00001
	SC Infus, 40	961	94					57% Reg (d13)	<0.00001
H3122-EML4-ALKv1-G1269A	SC Infus, 0.2	3.2	9					9% TGI (d12)	0.33445
	SC Infus, 0.6	5.2	59					59% TGI (d12)	0.00069
	SC Infus, 2	23	41					50% TGI (d12)	0.00546
	SC Infus, 6	65	49					96% TGI (d12)	<0.00001
	SC Infus, 20	272	86					52% Reg (d12)	<0.00001
	SC Infus, 25	366	87					59% Reg (d12)	<0.00001
H3122-EML4-ALKv1	SC Infus, 0.06	2.0	45					0% TGI (d13)	0.01368
	SC Infus, 0.2	3.1	43					49% TGI (d13)	0.00019
	SC Infus, 0.6	10	46					6% Reg (d13)	<0.00001
	SC Infus, 1.5	25	70					45% Reg (d13)	<0.00001
	SC Infus, 3	75	83					59% Reg (d13)	<0.00001
NIH3T3-CD74-ROS1	PO,BID, 0.02	0.95/0.52	NA					26% TGI (d9)	0.41253
	PO,BID, 0.06	2.2/1.2	NA					38% TGI (d9)	0.09265
	PO,BID, 0.2	6.5/2.3	NA					84% TGI (d9)	0.00002
	PO,BID, 0.6	15/5.3	NA					20% Reg (d9)	<0.00001
	PO,BID, 2	46/21	NA					73% Reg (d9)	<0.00001
	PO,BID, 6	191/80	NA					85% Reg (d9)	<0.00001
NIH3T3-EML4-ALKv1-I1171T	SC Infus, 0.3	NA	NA					63% TGI (d9)	<0.001
	SC Infus, 1	NA	NA					27% Reg (d9)	<0.001
	SC Infus, 3	118	NA					50% Reg (d9)	<0.001
NIH3T3-EML4-ALKv1-G1202R	SC Infus, 0.75	28	15					13% TGI (d6)	n.s.
	SC Infus, 2.5	109	8					71% TGI (d6)	<0.005
	SC Infus, 7.5	388	49					34% Reg (d6)	<0.005
	SC Infus, 20	624	80					76% Reg (d6)	<0.005
	SC Infus, 25	725	82					77% Reg (d6)	<0.005

a. 皮下持続投与試験では C_{av} のみを示す。

PO：経口，SC：皮下，Infus：持続投与，NA：測定せず，TGI：腫瘍増殖阻害，Reg：腫瘍退縮，n.s.：有意差なし

(PF-06463922_[redacted]_174736, PF-06463922_[redacted]_055600, PF-06463922_[redacted]_020236)

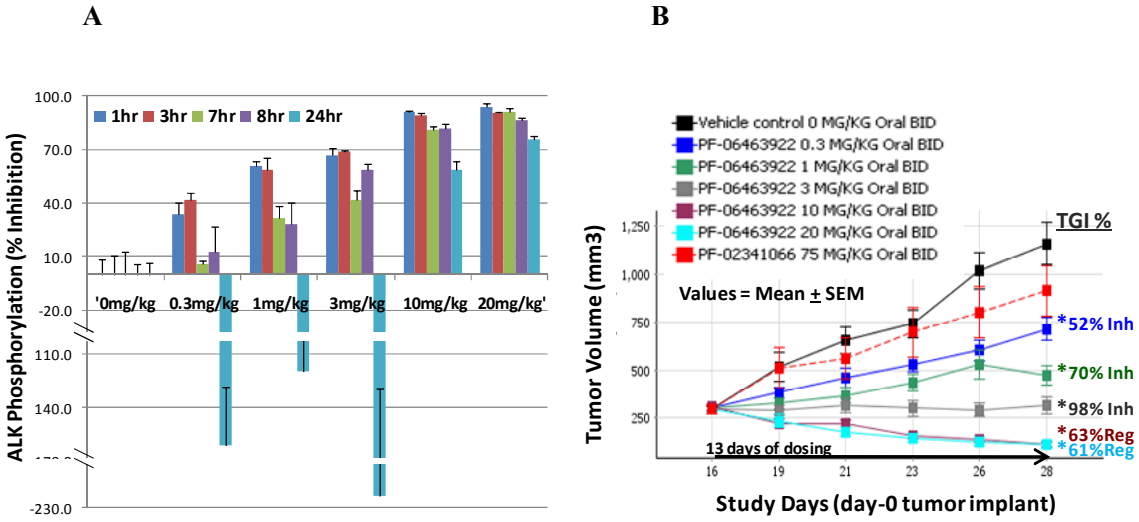
2.2.1.2. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデル：経口投与時の標的リン酸化阻害および抗腫瘍効果（BID 経口投与）

PF-06463922_[redacted]_174736

皮下に H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍が定着した（300 mm^3）マウスに溶媒，ロルラチニブ 0.3，1，3，10 および 20 mg/kg BID，あるいはクリゾチニブ 75 mg/kg BID を 13 日間経口投与した。投与 13 日に，ロルラチニブは 0.3，1 および 3 mg/kg BID でそれぞれ 52%，70%および 98%の腫瘍増殖阻害（TGI）が認められ，10 および 20 mg/kg BID ではそれぞれ 63 および 61%の腫瘍退縮が認められた（Figure 3B，Table 9）。いずれの用量においても，ロルラチニブの抗腫瘍効果は溶媒対照と比較して統計学的に有意であった。

低用量（0.3，1 および 3 mg/kg BID）では投与 24 時間後に ALK リン酸化の顕著なリバウンドが認められ，この腫瘍細胞において ALK シグナリングの代償的メカニズムが存在する可能性が示唆された（Figure 3A）。

Figure 3.　H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} NSCLC モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化（A）および腫瘍増殖（B）に対する阻害作用（BID 経口投与）



皮下に H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍が定着した（300 mm^3）マウス（n=15）にロルラチニブまたはクリゾチニブを BID で 13 日間投与した。腫瘍体積は週 3 回測定した。投与終了時に血漿および腫瘍検体を採取して PK/PD 解析を実施した。総リン酸化 ALK 量は ELISA 法により測定し，対照群に対する阻害率（% Inhibition）で示した。エラーバーは標準誤差を示す。*: $p < 0.0005$（対照群との比較，一元配置分散分析および最小有意差法），
PF-06463922：ロルラチニブ，PF-02341066：クリゾチニブ

2.2.1.2.1. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデル：経口投与時の PK/PD 相関

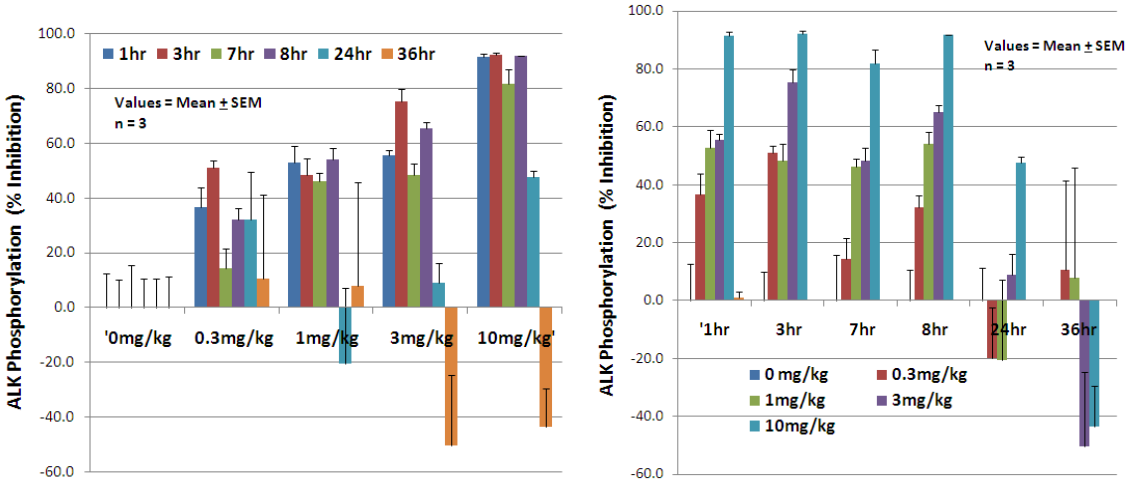
PF06463922_[redacted]_174736

ロルラチニブの経口投与時の PK/PD 相関を評価するために, 上述の試験で用いたマウスの一部から腫瘍組織を投与 12 日に採取し，PK/PD 解析を実施した。また，別途試験を実施して，腫瘍が定着した（約 500 mm^3）マウスにロルラチニブを 0.3，1，3 および 10 mg/kg BID で 4 日間投与した。

いずれの検討においても，ロルラチニブの 4 日間または 12 日間の反復経口投与によって腫瘍における EML4-ALKv1^{L1196M} のリン酸化は用量および時間に依存して阻害され，12 日間投与試験では 20 および 40 mg/kg/日で最大の薬理効果（E_{max}）が得られた。また，投与後 24～36 時間には ALK リン酸化の顕著なリバウンドが認められた（Figure 3，Figure 4）。さらに，ALK 阻害に対するロルラチニブ血漿濃度の PK/PD 相関を数学的プール PK/PD モデルを用いて定量化した。プールされた PK/PD モデルは，ALK 阻害反応の経時変化の実測値と良く適合した。非結合型薬物濃度の EC_{50} 推定値は 36 nmol/L で，Hill 式によって算出した EC_{75} 値および EC_{90} 値はそれぞれ 100 および 280 nmol/L であった。

Figure 4.　H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} NSCLC モデルにおける用量依存的（A）および時間依存的（B）腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化阻害作用（BID 経口投与）

A　　**B**



皮下に H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍が定着した（約 500 mm^3）マウスにロルラチニブを BID で 4 日間経口投与した。血漿および腫瘍検体を投与終了時に採取して PK/PD 解析を実施した。エラーバーは標準誤差を示す。

2.2.1.2 項に記載した 13 日間投与試験でも，ロルラチニブ血漿中濃度と抗腫瘍効果の PK/PD 相関を検討した。この試験ではロルラチニブは用量依存的な抗腫瘍効果を示し，高用量（10 および 20 mg/kg BID）では E_{max}（約 62%の腫瘍退縮）に到達した（Figure 3B）。ロルラチニブ血漿中濃度と抗腫瘍効果の PK/PD 相関を，ロルラチニブが最終的に腫瘍増殖速度を低下させるとの仮定のもと，修正間接反応 PK/PD モデルによって定量的に評価した。この PK/PD モデルは，対照群および薬物処置群における個々の腫瘍増殖曲線の実測値と良く適合した。抗腫瘍効果が C_{av} または AUC に依存すると仮定したときの腫瘍増殖停止（100% TGI）に必要な非結合型濃度の推定値は 51 nmol/L であった。

以上のことから，ALK 阻害に関する EC_{50} 値（36 nmol/L；2.2.1.2.1 項）は腫瘍増殖停止に必要な濃度（51 nmol/L）とほぼ同程度であり，ALK を 50%阻害することにより腫瘍増殖が停止することが示唆された。

2.2.1.3. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデル：皮下投与時の抗腫瘍効果と標的リン酸化阻害の関係

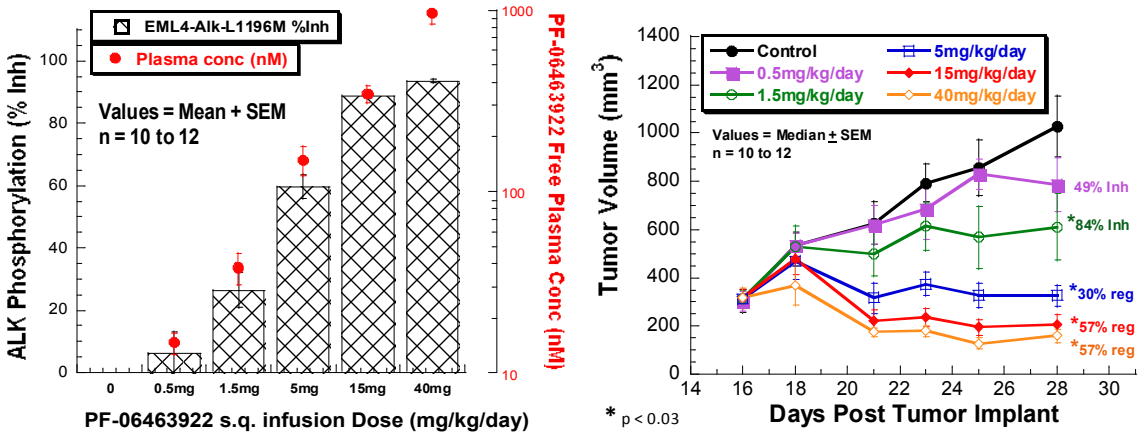
PF-06463922_[redacted]_174736

ロルラチニブを皮下ミニポンプを用いて 0.5，1.5，5，15 および 40 mg/kg/日で 13 日間持続投与した。0.5 および 1.5 mg/kg/日ではそれぞれ 49%および 84%の TGI が認められ，より高い用量（5，15 および 40 mg/kg/日）では 30～57%の腫瘍退縮が認められた（Figure 5，Table 9）。

この皮下持続投与試験では ALK リン酸化のリバウンドはみられなかった。このことから，ALK シグナル伝達を抑制して最大の抗腫瘍効果を得るためには，有効血中濃度で持続的に曝露される

必要がある可能性が示唆された。本試験では，ALK の持続的阻害が 89%以上で最大の抗腫瘍効果（57%腫瘍退縮）が得られ，60%の ALK 阻害では 30%の腫瘍退縮，約 30%の ALK 阻害では 84%の TGI，約 10%の ALK 阻害で約 50%の TGI が認められた（Figure 5，Table 9）。

Figure 5.　H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} NSCLC モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化（A）および腫瘍増殖（B）に対する阻害作用（皮下持続投与）



皮下に H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍が定着した（310 mm^3）マウス（n = 10～12）の皮下に種々の濃度のロルラチニブ（PF-06463922）を放出するよう設定した Alzet 浸透圧ポンプを埋設し，0.5 µl/hr の一定速度で 12 日間投与した。腫瘍体積は週 3 回測定し，投与 12 日に血漿および腫瘍検体を採取して PK/PD 解析に供した。腫瘍移植後 16 日の時点では血漿中薬物濃度が定常状態に達しておらず，また腫瘍増殖が対数線形的でなかったことから，TGI または腫瘍退縮は移植後 18 日の時点における腫瘍体積をもとに計算した。エラーバーは標準誤差を示す。*: p< 0.03（対照群との比較，一元配置分散分析および最小有意差法）

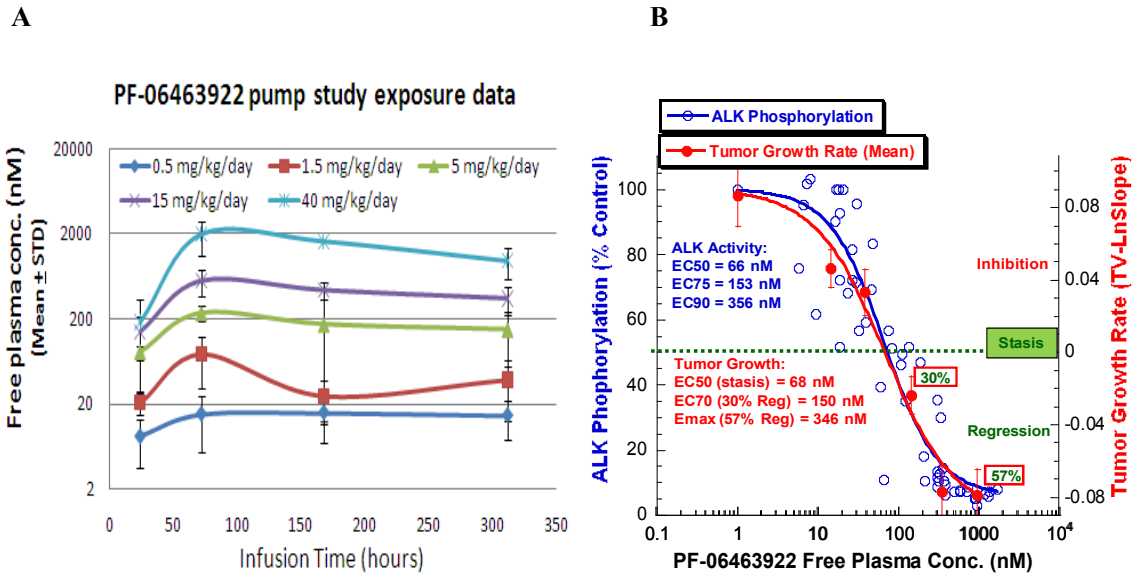
2.2.1.3.1. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデル：皮下投与時の PK/PD 相関

PF-06463922_[redacted]_174736

上述の皮下持続投与試験において，ロルラチニブの定常状態における血漿中濃度と EML4-ALKv1^{L1196M} のリン酸化阻害および抗腫瘍効果との関係についてさらに検討した。ロルラチニブは広い用量範囲で ALKv1^{L1196M} リン酸化および腫瘍増殖を用量依存的に阻害した。15 および 40 mg/kg/日の用量ではこの両方の PD エンドポイントについて E_{max} が得られ，ALKv1^{L1196M} リン酸化阻害はそれぞれ 89%および 94%，腫瘍退縮はいずれも 57%であり，またこのときの最小非結合型 C_{av} は 346 nmol/L であった（Table 9）。投与期間中のロルラチニブの血漿中濃度は安定しており，用量比例的であった（Figure 6A）。定常状態の非結合型血漿中濃度と ALKv1^{L1196M} リン酸化阻害および腫瘍増殖阻害の関係を Hill 関数解析によって検討し，PK/PD 相関を評価した（Figure 6B）。なお，腫瘍移植後 16 日，すなわち投与開始直後の時点では血漿中薬物濃度が定常状態に達しておらず（Figure 6A），また腫瘍増殖が対数線形的でなかったことから，この日の血漿中濃度および腫瘍体積のデータは Hill 関数解析には用いなかった。解析の結果，ALK 阻害に関する EC_{50} 値は 66 nmol/L，抗腫瘍効果に関する EC_{50} 値（腫瘍増殖静止に対応する）は 68 nmol/L であり，50%の ALK 阻害によって腫瘍増殖停止がもたらされることが示された（Figure 6B）。持続皮下投与試験における ALK 阻害についての EC_{50}，EC_{75} および EC_{90} 値はそれぞれ 66，153 および

357 nmol/L であり，経口投与試験の PK/PD 解析から算出された EC_{50}，EC_{75} および EC_{90} 値（36，100 および 280 nmol/L）と同程度であった。また，腫瘍増殖停止に必要な濃度も皮下持続投与試験では 68 nmol/L，経口投与試験では 51 nmol/L と同程度であった（Table 10）。

Figure 6.　H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} NSCLC モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化および腫瘍増殖に関する PK/PD 相関（持続皮下投与）



皮下に H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍が定着した（310 mm^3）マウス（n = 10～12）の皮下に種々の濃度のロルラチニブ（PF-06463922）を放出するよう設定した Alzet 浸透圧ポンプを埋設し，0.5 µl/hr の一定速度で 12 日間投与した。A：非結合型血漿中濃度の経時変化，B：腫瘍内 EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化および腫瘍増殖の用量－反応相関。エラーバーは A：標準偏差，B：標準誤差を示す。

Table 10. マウス ALK および ROS1 融合タンパク発現腫瘍モデルにおける PK/PD 解析による有効血漿中濃度（非結合型）の要約

モデルおよび投与経路	標的キナーゼ阻害						抗腫瘍効果			
	EC_{50} 値		EC_{75} 値		EC_{90} 値		腫瘍増殖停止		E_{max}（35～63% 腫瘍退縮）	
	nM	ng/mL	nM	ng/mL	nM	ng/mL	nM	ng/mL	nM	ng/mL
H3122-EML4–ALKv1^{L1196M} 経口 BID	36	15	100	41	280	114	51	21	395	161
H3122-EML4–ALKv1^{L1196M} 皮下持続投与	66	27	153	62	356	145	68	28	346	141
H3122-EML4–ALKv1^{G1269A} 皮下持続投与	31	13	104	42	351	143	54	22	308	125
H3122 親株 EML4-ALKv1 皮下持続投与	4.4	1.8	13	5.3	39	14	6.5	2.6	25-75	10-30
NIH3T3-CD74-ROS1 経口 BID	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.6	9.2	NA	NA

NA = 算出せず

（Study PF-06463922_[redacted]_174736）

これらの結果から，ロルラチニブはクリゾチニブ耐性変異である ALKv1^{L1196M} を有する腫瘍異種移植モデルに対して顕著かつ用量依存的な抗腫瘍効果を示し，その効果は ALK 標的阻害の程度および持続時間に直接関係していることが示された。また，ロルラチニブの忍容性はいずれの用量においても良好で，いずれの in vivo 試験においても投与に関連した体重減少は認められなかったことから，ロルラチニブは薬理学的に意義のある血漿中濃度で安全に使用できることが示唆された。

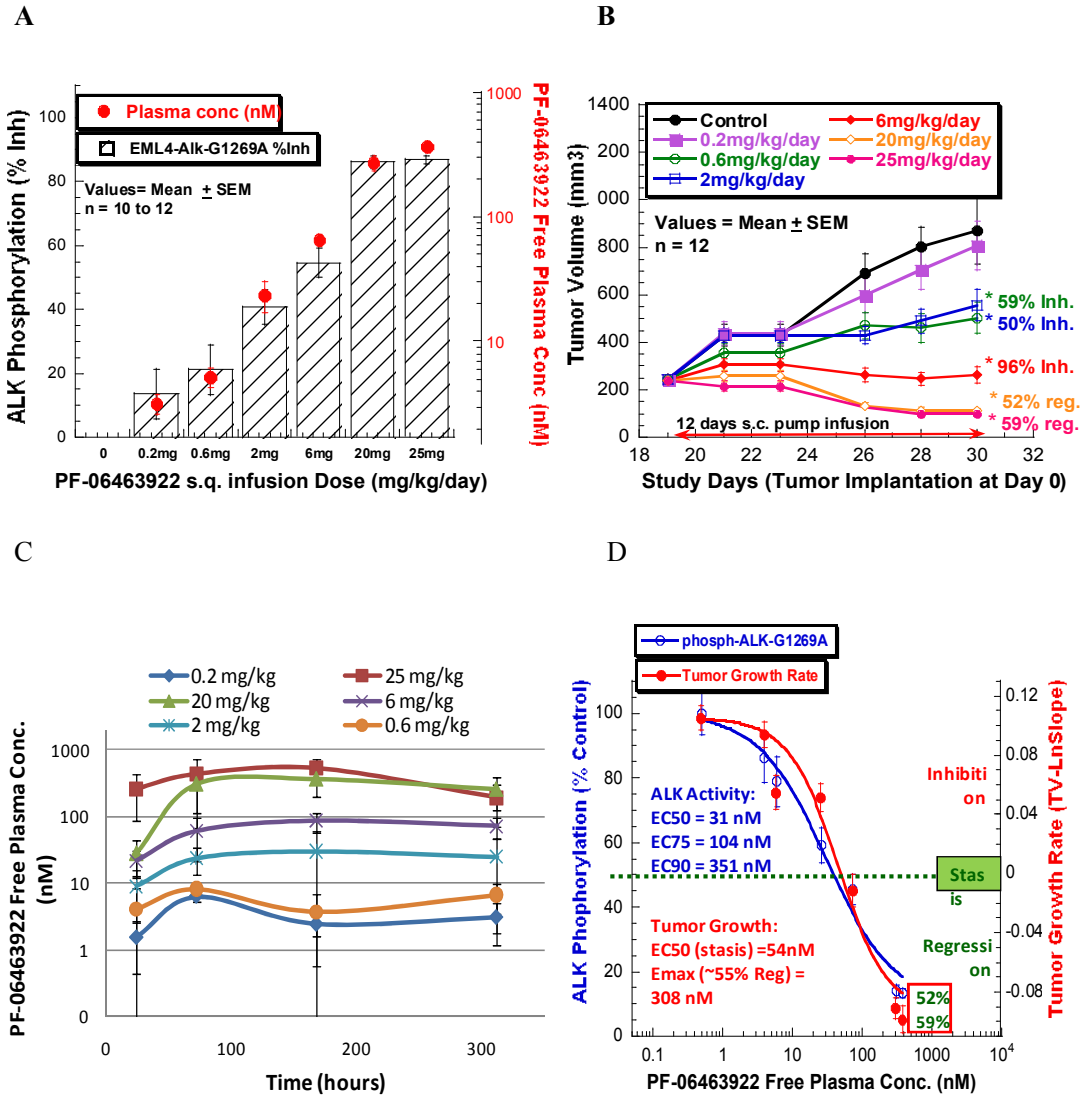
2.2.1.4. H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} モデル：皮下投与時の抗腫瘍効果および PK/PD 相関

PF-06463922_[redacted]_174736

H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} ヒト NSCLC 異種移植モデルを用いて，クリゾチニブ耐性変異である ALKv1^{G1269A} に対するロルラチニブの抗腫瘍効果を評価した。H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} 腫瘍が定着したマウスの皮下に浸透圧ミニポンプを埋設して，0.2，0.6，2，6，20 および 25 mg/kg/日の用量になるよう，一定速度で 12 日間持続投与した。H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデルを用いた皮下持続投与試験と同様に，ロルラチニブは用量依存的に腫瘍内の ALKv1^{G1269A} リン酸化を阻害し，また広範囲な抗腫瘍効果を示した。すなわち，0.2 mg/kg/日では無効，0.6 および 2 mg/kg/日では

部分的（約 50%）な TGI，6 mg/kg/日では腫瘍増殖停止（96% TGI），20 および 25 mg/kg では E_{max}（52～59%腫瘍退縮）が得られた（Figure 7B，Table 9）。ロルラチニブの血漿中濃度は用量比例的であった（Figure 7C，Table 9）。Hill 関数解析によって PK/PD 相関を検討した結果，ALKv1^{G1269A} リン酸化に関する EC_{50}，EC_{75} および EC_{90} 値はそれぞれ 31，104 および 351 nmol/L で，腫瘍増殖停止をもたらす EC_{50} 値は 54 nmol/L であった（Figure 7D，Table 10）。本試験で得られたロルラチニブの有効血漿中濃度は ALKv1^{L1196M} モデルと類似しており，ロルラチニブはこれら 2 つの ALK 融合変異体に対して同程度の効力を有することが示された。

Figure 7.　H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} NSCLC モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{G1269A} リン酸化および腫瘍増殖に関する PK/PD 相関（持続皮下投与）



皮下に H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} 腫瘍が定着した（約 220 mm^3）マウス（n =10～12）の皮下に種々の濃度のロルラチニブ（PF-06463922）を放出するよう設定した Alzet 浸透圧ポンプを埋設し，0.5 µl/hr の一定速度で 12 日間投与した。A：腫瘍内 EML4-ALKv1^{G1269A} リン酸化に対する作用，B：腫瘍増殖に対する作用，C：非結合型血漿中濃度の経時変化，D：腫瘍内 EML4-ALKv1^{G1269A} リン酸化および腫瘍増殖の用量－反応相関。エラーバーは標準誤差を示す。

2.2.1.5. H3122-EML4-ALKv1 モデル：皮下投与時の抗腫瘍効果および PK/PD 相関

PF-06463922_[redacted]_174736

野生型 H3122 細胞株を皮下に異種移植して，ロルラチニブの EML4-ALKv1 融合タンパクに対する in vivo 効果を評価した。H3122-EML4-ALKv1 腫瘍が定着したマウスの皮下に浸透圧ミニポンプを埋設して，0.06，0.2，0.6，1.5 および 3 mg/kg/日の用量になるよう，一定速度で 13 日間持続投与した。ロルラチニブは広い用量範囲にわたって用量依存的な抗腫瘍効果を示し，0.06 mg/kg/日（C_{av} = 2 nmol/L）では無効，0.2 mg/kg/日（C_{av} = 3.1 nmol/L）では部分的（49%）な TGI，0.6 mg/kg/日（C_{av} = 10 nM）では 6%の腫瘍退縮，1.5 mg/kg/日（C_{av} = 25nM）では 45%の腫瘍退縮，3 mg/kg/日（C_{av} = 75 nmol/L）では 59%の腫瘍退縮が認められた（Figure 8B）。抗腫瘍効果は用量依存的な ALK 標的阻害と関連していた（Figure 8A）。Hill 関数解析より，ロルラチニブの野生型 ALK のリン酸化阻害に関する EC_{50}，EC_{75} および EC_{90} 値はそれぞれ 4.4，13 および 39 nmol/L で，6.5 nmol/L の C_{av} で腫瘍増殖が停止することが示された（Figure 8D）。ロルラチニブの EML4-ALKv1 腫瘍に対する効力は EML4-ALKv1^{L1196M} または EML4-ALKv1^{G1269A} 腫瘍と比較して約 10 倍強力であった。

2.2.1.6. NIH3T3-EML4-ALKv1^{I1171T} モデル：皮下投与時の抗腫瘍効果および PK/PD 相関

PF-06463922_[redacted]_055600

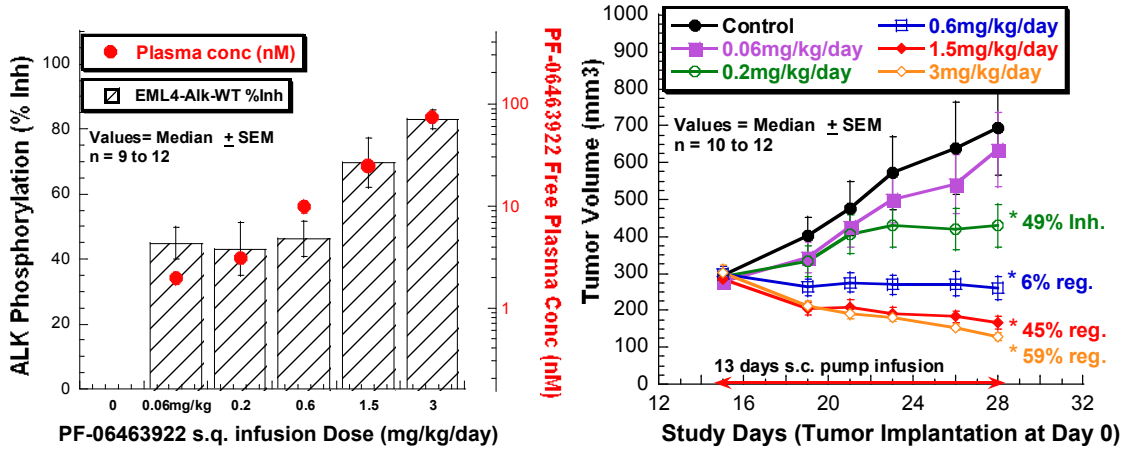
NIH3T3-EML4-ALKv1^{I1171T} モデルにロルラチニブを皮下ミニポンプを用いて 0.3，1 および 3 mg/kg/日の用量で 9 日間持続投与して抗腫瘍効果を評価した。ロルラチニブは用量依存的に EML4-ALKv1^{I1171T} リン酸化および腫瘍増殖を阻害し，0.3 mg/kg/日では 63%の TGI，1 および 3 mg/kg/日ではそれぞれ 27%および 50%の腫瘍退縮が認められた（Figure 9B）。また，投与期間中に体重減少は認められなかった（Figure 9C）。一方，クリゾチニブを 30 mg/kg BID で 12 日間投与したところ，臨床曝露量（非結合型 C_{av} = 53 nmol/L）に近い C_{av}（56 nmol/L）において腫瘍増殖は認められなかった。

本モデルにおけるロルラチニブの定常状態における血漿中濃度と ALK リン酸化および腫瘍増殖阻害の間の PK/PD 相関を検討した。ロルラチニブは ALKv1^{I1171T} リン酸化および腫瘍増殖を用量依存的に阻害し，3 mg/kg/日では ALK^{I1171T} リン酸化（100%阻害）および抗腫瘍効果（50%腫瘍退縮）の両方の PD エンドポイントについて E_{max} に到達し，このときの非結合型 C_{av} は 118 nmol/L であった（Figure 10A，Table 9）。投与期間中のロルラチニブの血漿中濃度は用量比例的であった（Figure 10A）。Hill 関数解析により定常状態の血漿中濃度と ALKv1^{I1171T} 阻害および腫瘍増殖阻害の関係を定量化して，PK/PD 相関を評価した。その結果，ALKv1^{I1171T} 阻害に関する EC_{50} 値は 6.4 nmol/L であった。腫瘍増殖阻害に関する EC_{50} 値（腫瘍増殖停止に対応する）は 19 nmol/L で，この値は ALKv1^{I1171T} 標的阻害に関する EC_{78} 値（18 nmol/L）に相当した。

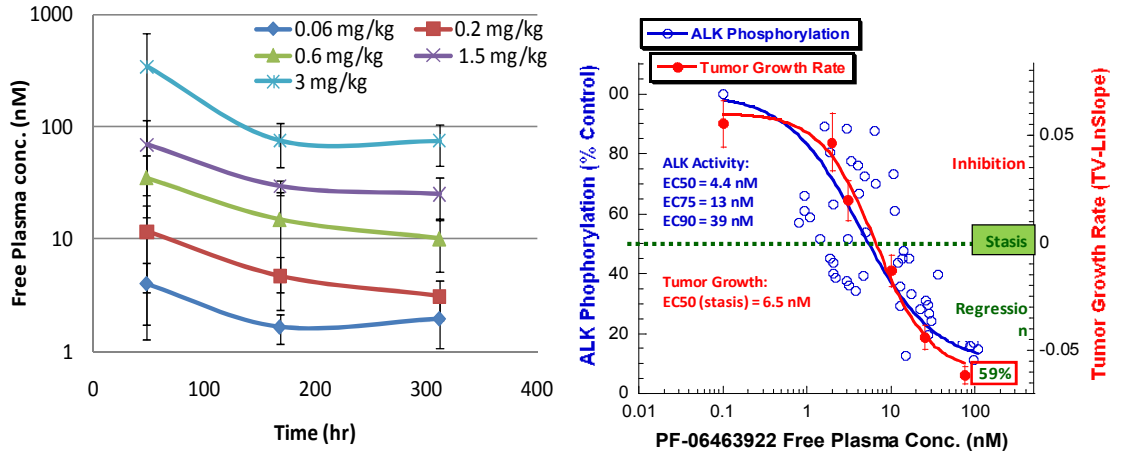
以上の結果から，EML4-ALKv1^{I1171T} 阻害の程度および持続時間が抗腫瘍効果の程度と直接関連しており，強力な抗腫瘍効果を得るためには，治療期間全体にわたって ALKv1^{I1171T} キナーゼ活性を十分に阻害する必要があることが示された。

Figure 8.　H3122-EML4-ALKv1 モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1 リン酸化および腫瘍増殖に関する PK/PD 相関（持続皮下投与）

A　　B

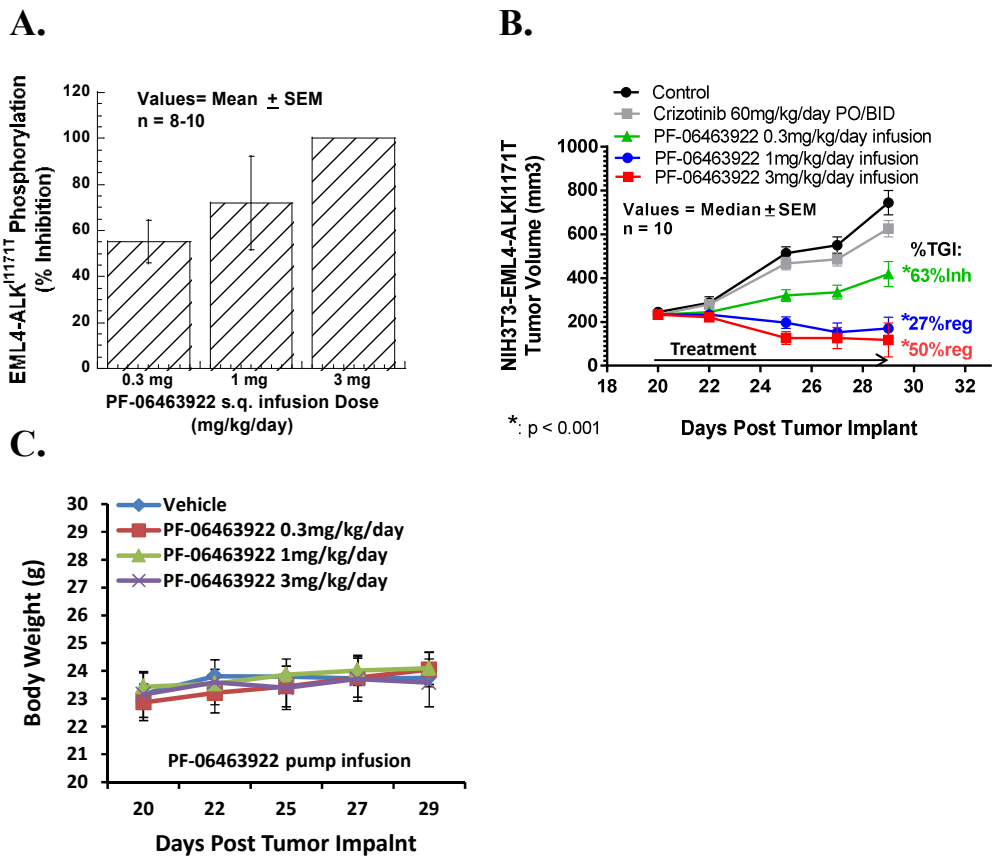


C　　D



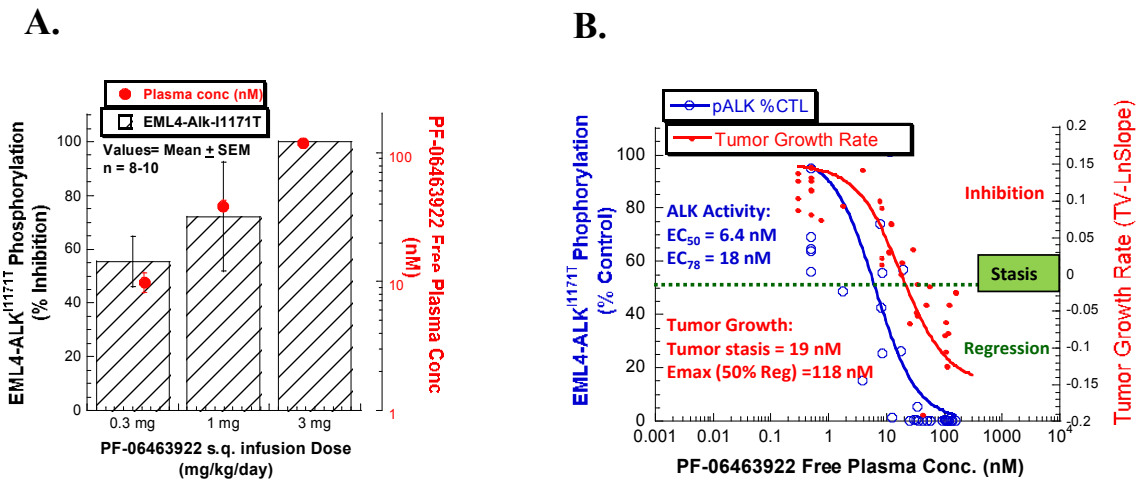
皮下に H3122-EML4-ALKv1 腫瘍が定着した（約 280 mm^3）マウス（n = 10～12）の皮下に種々の濃度のロルラチニブ（PF-06463922）を放出するよう設定した Alzet 浸透圧ポンプを埋設し，0.5 µl/hr の一定速度で 13 日間投与した。A：腫瘍内 EML4-ALKv1 リン酸化に対する作用，B：腫瘍増殖に対する作用，C：非結合型血漿中濃度の経時変化，D：腫瘍内 EML4-ALKv1 リン酸化および腫瘍増殖の用量－反応相関。エラーバーは標準誤差を示す。

Figure 9.　NIH3T3-EML4-ALKv1^{I1171T} モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{I1171T} リン酸化阻害（A），腫瘍増殖阻害（B）および体重変化（C）（持続皮下投与）



NIH3T3-EML4-ALKv1^{I1171T} 腫瘍が定着したマウス（n = 10）に種々の濃度のロルラチニブ（PF-06463922）を放出するよう設定した Alzet 浸透圧ポンプを埋設し，0.5 µl/hr の一定速度で 9 日間投与した。腫瘍体積は週 3 回測定し，投与 9 日に血漿および腫瘍検体を採取して PK/PD 解析に供した。エラーバーは標準誤差を示す。* : p < 0.001（対照群との比較，一元配置分散分析および最小有意差法）

Figure 10. NIH3T3-EML4-ALKv1^{I1171T} モデルにおける腫瘍内 EML4-ALKv1^{I1171T} リン酸化および腫瘍増殖阻害の PK/PD 相関（持続皮下投与）



NIH3T3-EML4-ALKv1^{I1171T} 腫瘍が定着したマウス（n = 10）に種々の濃度のロルラチニブ（PF-06463922）を放出するよう設定した Alzet 浸透圧ポンプを埋設し, 0.5 µl/hr の一定速度で 9 日間投与した。腫瘍体積は週 3 回測定し, 投与 9 日に血漿および腫瘍検体を採取して PK/PD 解析に供した。エラーバーは標準誤差を示す。A：腫瘍内 EML4-ALKv1^{I1171T} リン酸化に対する作用，B：腫瘍内 EML4-ALKv1^{I1171T} リン酸化および腫瘍増殖の用量－反応相関。

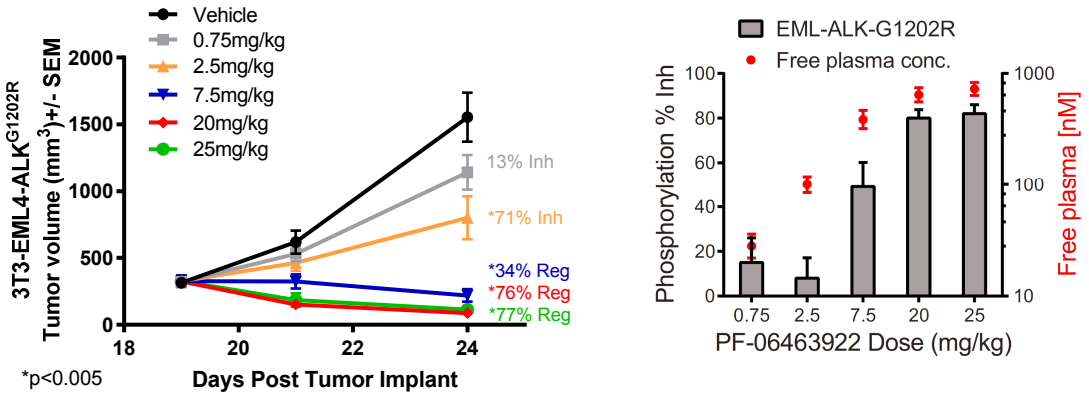
2.2.1.7. NIH3T3-EML4-ALKv1^{G1202R} モデル：皮下投与時の抗腫瘍効果

PF-06463922_[redacted]_020236

NIH3T3-EML4-ALKv1^{G1202R} モデルにロルラチニブを皮下ミニポンプを用いて 0.75，2.5，7.5，20 および 25 mg/kg/日で 6 日間持続投与して抗腫瘍効果を評価した。ロルラチニブは用量依存的に EML4-ALKv1^{G1202R} のリン酸化および腫瘍増殖を阻害し，7.5 mg/kg/日以上の用量では統計学的に有意な腫瘍退縮が認められた（Figure 11，Table 9）。

Figure 11. NIH3T3-EML4-ALKv1^{G1202R}モデルにおける腫瘍増殖阻害（A）および EML4-ALKv1^{G1202R}リン酸化阻害（B）（持続皮下投与）

A **B**



NIH3T3-EML4-ALKv1^{G1202R}腫瘍が定着したマウス（n = 8～12）に種々の濃度のロルラチニブ（PF-06463922）を放出するよう設定した Alzet 浸透圧ポンプを埋設し，0.5 µl/hr の一定速度で 6 日間投与した。腫瘍体積は週 3 回測定し，試験 6 日に血漿および腫瘍検体を採取して PK/PD 解析に供した。エラーバーは標準誤差を示す。* : $p < 0.005$（対照群との比較，一元配置分散分析および最小有意差法）

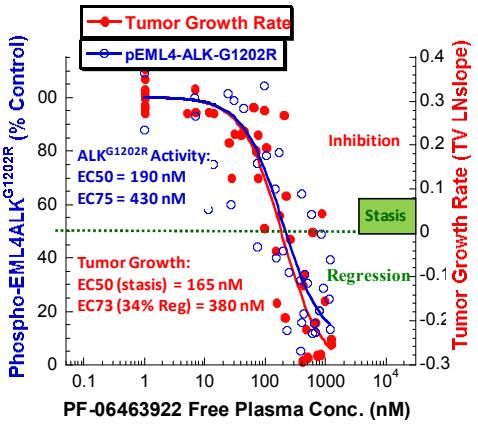
2.2.1.7.1. NIH3T3-EML4-ALKv1^{G1202R}モデル：皮下投与時の PK/PD 相関

PF-06463922_[redacted]_020236

上述の試験におけるロルラチニブの定常状態における血漿中濃度と ALK リン酸化および腫瘍増殖阻害との間の PK/PD 相関を検討した。

本試験において，ロルラチニブは広い用量範囲にわたって用量依存的に ALKv1^{G1202R}リン酸化および腫瘍増殖を阻害した。25 mg/kg/日では ALKv1^{G1202R}リン酸化（82%阻害）および抗腫瘍効果（77%腫瘍退縮）の両方の PD エンドポイントについて E_{max} に到達し，このときの非結合型 C_{av} は 725 nmol/L であった（Figure 12）。ロルラチニブの血漿中濃度は用量に比例していた（Figure 11B）。Hill 関数解析により定常状態の血漿中濃度と ALKv1^{G1202R}阻害および腫瘍増殖阻害の関係を定量化して，PK/PD 相関を評価した。その結果，ALKv1^{G1202R}阻害に関する EC_{50} 値は 190 nmol/L，腫瘍増殖阻害に関する EC_{50} 値（腫瘍増殖停止に対応する）は 165 nmol/L であった（Figure 12）。

Figure 12. NIH3T3-EML4-ALKv1^{G1202R} モデルにおける EML4-ALKv1^{G1202R} リン酸化および腫瘍増殖阻害の PK/PD 相関（持続皮下投与）



NIH3T3-EML4-ALKv1^{G1202R} 腫瘍が定着したマウス（n = 8～12）に種々の濃度のロルラチニブ（PF-06463922）を放出するよう設定した Alzet 浸透圧ポンプを埋設し，0.5 µl/hr の一定速度で 6 日間投与した。腫瘍体積は週 3 回測定し，試験 6 日に血漿および腫瘍検体を採取して PK/PD 解析に供した。

2.2.2. 脳同所性移植モデル

PF-06463922_[redacted]_174736

脳転移はクリゾチニブ治療に対する主要な耐性機序の一つであり，最初にクリゾチニブが奏功した後病状が進行した患者において最も多い転移先である[a,b]。クリゾチニブは強力な ALK 阻害剤であるが，中枢には移行しない。一方，ロルラチニブのラット脳および脳脊髄液における曝露量は血漿中濃度のそれぞれ 25%および 37%（2.6.4.4.1 項）で，ヒトにおいて脳に移行すると予測されている[c]。NSCLC 脳転移モデルとしてルシフェラーゼを発現する H3122 および H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 脳同所性異種移植モデルを用いて，ロルラチニブの抗腫瘍効果を評価した。H3122 を用いた予備的検討では，ロルラチニブは脳に定着した腫瘍に対して顕著な抗腫瘍効果を示し，6 mg/kg/日，27 日間の持続皮下投与により溶媒対照および中枢移行性のない強力な ALK 阻害剤である PF-06439015（36 mg/kg/日，34 日間投与）と比較して腫瘍が縮小し，また，溶媒対照と比較して生存期間が延長した［溶媒対照が試験 33 日に死亡したのに対し，ロルラチニ

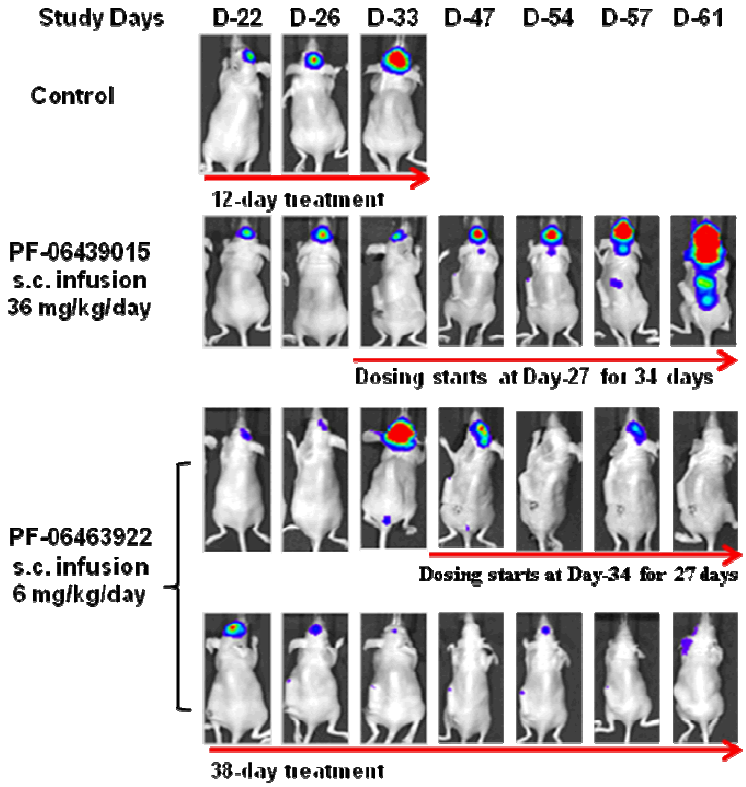
[a] Otterson GA, Riely GJ, Shaw AT, et al. Clinical characteristics of ALK+ NSCLC patients (pts) treated with crizotinib beyond disease progression (PD): potential implications for management. J Clin Oncol 2012;30(Suppl):Abstr 7600.

[b] Camidge DR. Taking aim at ALK across the blood-brain barrier. J Thorac Oncol 2013;8:389-90.

[c] Johnson TW, et al. Discovery of (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(metheno)pyrazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broadspectrum potency against ALK-resistant mutations. J Med Chem 2014;57:4720-4744.

ブ投与群は試験終了時（試験 61 日）まで生存；Figure 13］。H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデルでは，ロルラチニブは臨床的に到達可能な曝露量[a]（非結合型血漿中濃度：215～571 nmol/L）で同所性脳腫瘍の増殖を用量依存的に顕著に阻害した（Figure 14）。これらの結果から，ロルラチニブは ALKv1^{L1196M} 変異体を含む ALK 融合タンパクに依存する脳腫瘍または脳転移の治療に有効である可能性が示された。

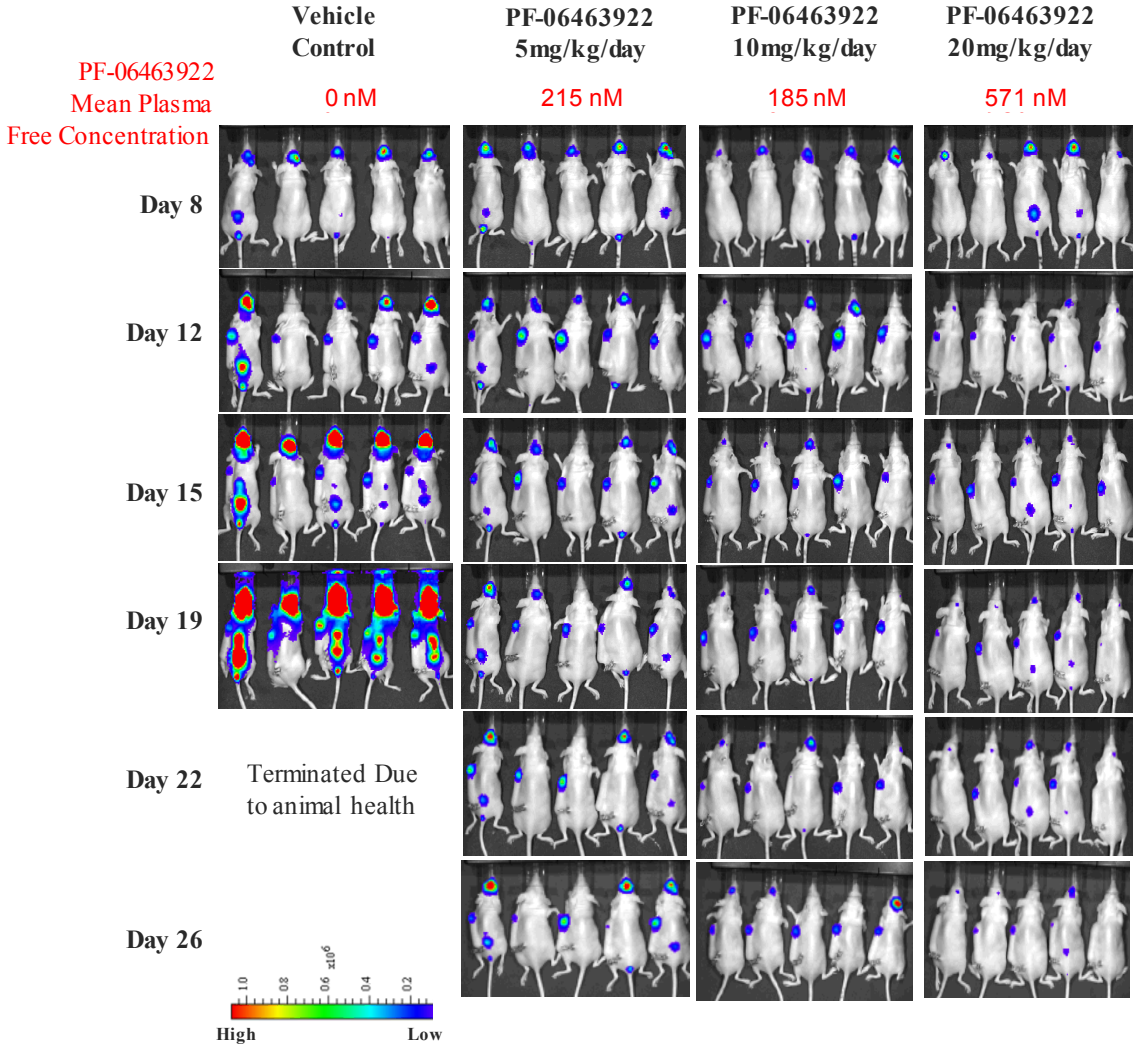
Figure 13.　H3122 脳同所性移植モデルに対する抗腫瘍効果



ルシフェラーゼを発現する H3122 細胞 1×10^5 個をマウス（n = 1～2）の脳内に同所移植した（試験 0 日）。腫瘍は Xenogen システムを用いて週 2 回，蛍光シグナルを定量化することによりモニターした。溶媒，ロルラチニブ（PF-06463922）および PF-06439015 は図中に示した投与期間，皮下ミニポンプを用いて持続皮下投与した。

[a] 2.7.2.2.2.2.1.3 項 Table 28：日本人患者にロルラチニブを 100 mg QD で反復投与したときの第 1 サイクル第 15 日における非結合型 C_{max} は 495 nmol/L

Figure 14. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 脳同所性移植モデルに対する抗腫瘍効果



ルシフェラーゼを発現する H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 細胞 1×10^5 個をマウス（n = 5）の脳内に同所的に移植した（試験 0 日）。腫瘍は Xenogen システムを用いて週 2 回，蛍光シグナルを定量化することによりモニターした。ロルラチニブ（PF-06463922）は腫瘍が定着した試験 8 日より，皮下ミニポンプを用いて 19 日間持続皮下投与した。試験 3 日および 26 日に採血して血漿中薬物濃度を測定した。

2.2.3. ROS1 モデル

PF-06463922_[redacted]_174736

種々の ROS1 融合タンパクが NSCLC，膠芽細胞腫，胆管癌および胃癌などの複数のヒト腫瘍におけるドライバー遺伝子として同定されている[a,b,c,d]。第 1 世代の ALK，ROS1 および c-Met 阻害剤であるクリゾチニブは，ROS1 融合タンパク陽性 NSCLC の治療において臨床効果を示している[e,f]。ロルラチニブは細胞レベルの検討において，約 1 nmol/L もしくはそれ以下の濃度で種々の ROS1 融合変異体に対して有効性を示した（2.1.3.3 項）ことから，in vivo 抗腫瘍効果をさらに評価した。

NIH3T3-CD74-ROS1 異種移植モデルにおいて，ロルラチニブを 0.01～3 mg/kg BID で 9 日間経口投与したところ, 腫瘍内の ROS1 リン酸化および腫瘍増殖が用量依存的に阻害された（Figure 15）。0.3 mg/kg（C_{av}：5.3 nmol/L）で 20%の腫瘍退縮が認められ，1 および 3 mg/kg（C_{av}：それぞれ 21 および 80 nmol/L）では E_{max}（それぞれ 73%および 85%腫瘍退縮）が得られた（Figure 15B）。

指数関数的腫瘍増殖モデルを用いて, ロルラチニブの血漿中濃度と抗腫瘍効果の PK/PD 相関を検討した。各投与群の腫瘍増殖曲線は指数関数的腫瘍増殖モデルに良く適合した。薬理作用が C_{av} または AUC に依存すると仮定したときの腫瘍増殖停止に必要な非結合型血漿中濃度の推定値は 5.6 nmol/L であった。これらの結果よりロルラチニブは数 nmol/L 程度の濃度でマウスにおける NIH3T3-CD74-ROS1 腫瘍の増殖を停止および退縮させ，本モデルに対して有効であることが示された。

[a] Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nature Medicine 2012;18:378-381.

[b] Birchmeier C, Sharma S, Wigler M. Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:9270-4.

[c] 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.

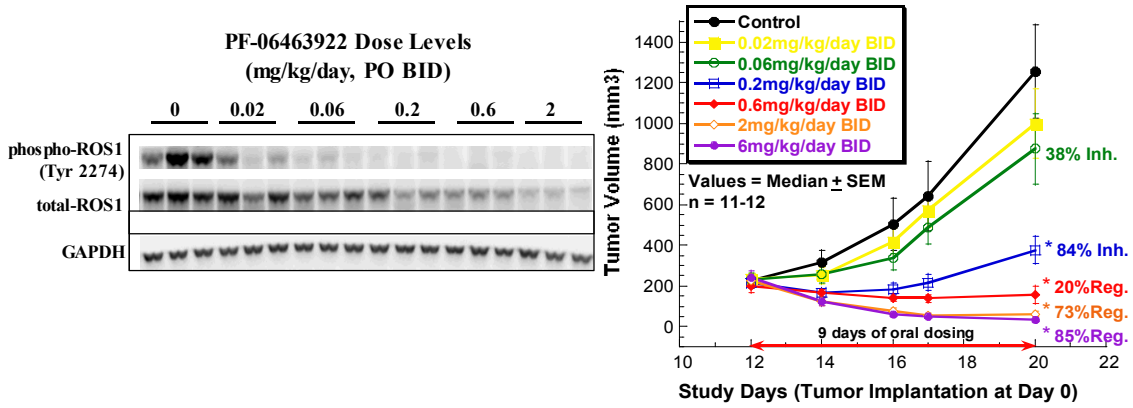
[d] Lee J, Lee SE, Kang SY, et al. Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma. Cancer 2013;119:1627-35.

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

[f] 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.

Figure 15.　NIH3T3-CD74-ROS1 モデルにおける ROS1 阻害（A）および抗腫瘍効果（B）

A　　**B**



皮下に NIH3T3-CD74-ROS1 腫瘍が定着した（約 250 mm^3）マウス（n = 11～12）にロルラチニブ（PF-06463922）を BID で 9 日間投与した。腫瘍体積は図に示す日に測定した。最終投与 7 時間後に腫瘍検体を採取してタンパク抽出物を調製し，イムノブロット法により総 ROS1 およびリン酸化 ROS1 を測定した。エラーバーは標準誤差を示す。*: $p < 0.0001$（対照群との比較，一元配置分散分析および最小有意差法），GAPDH: グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ

2.2.4. バイオマーカーおよびシグナル伝達系の解析

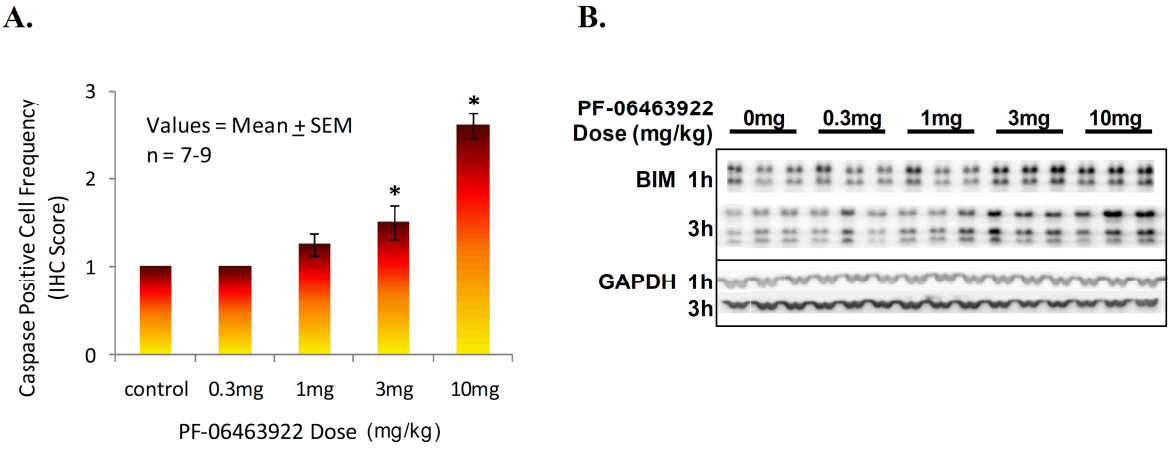
ロルラチニブの抗腫瘍作用の機序を解明し，臨床的に利用しうるバイオマーカーを探索する目的で，H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 融合タンパクを発現する腫瘍モデルを用いて，ロルラチニブ投与後の腫瘍検体についてバイオマーカー解析を実施した。作用機序に関わるバイオマーカーとして，1）細胞増殖のマーカーである Ki67 およびアポトーシスのマーカーであるカスパーゼ-3 などの機能的バイオマーカー，および 2）STAT3，ERK，AKT などの EML4-ALK を介した機能を調節する重要なシグナル伝達タンパクについて評価した。これらのマーカーの有用性を評価するために，これらに対するロルラチニブの作用について検討した。

2.2.4.1. 機能的バイオマーカーの解析

PF-06463922_[redacted]_174736

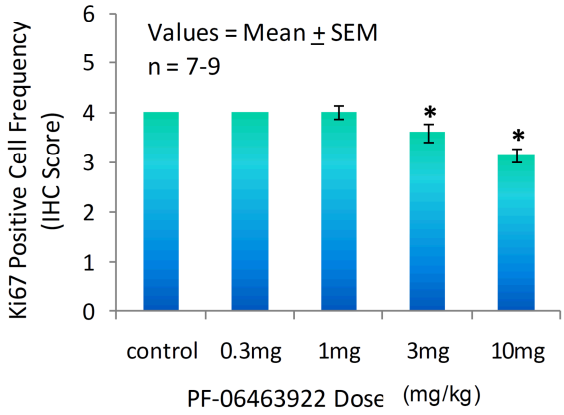
EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍が定着したマウスにロルラチニブを 0.3，1，3 および 10 mg/kg BID で 4 日間経口投与して，Ki67（有糸分裂のマーカー）およびカスパーゼ 3（アポトーシスのマーカー）を免疫組織化学（IHC）法およびイムノブロット法により測定した。ロルラチニブが腫瘍増殖停止または腫瘍退縮作用を示した 3 および 10 mg/kg BID（Figure 3）において，カスパーゼ 3 が統計学的に有意に誘導され，またアポトーシス促進性タンパクである Bcl-2 様タンパク 11（BIM）のアップレギュレーションが認められた（Figure 16）。さらに，3 および 10 mg/kg BID では Ki67 陽性細胞の頻度が統計学的に有意に減少した（Figure 17）。これらの結果から，アポトーシス誘導および細胞増殖阻害は，抗腫瘍効果と相関することが示された。

Figure 16. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデルにおけるカスパーゼ 3（A）および BIM（B）誘導



皮下に H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍が定着したマウス（n = 7～9）にロルラチニブを 0.3，1，3 および 10 mg/kg BID で 4 日間経口投与した。最終投与後に腫瘍組織を採取した。カスパーゼ 3 レベルはホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍検体を免疫組織化学染色して測定した。総 BIM 量はイムノブロット法により測定した。*: $p < 0.002$（対照群との比較，一元配置分散分析および最小有意差法），GAPDH: グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ

Figure 17. H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデルにおける Ki67 阻害



Ki67 レベルはホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍検体を免疫組織化学染色して測定した。SEM : 標準誤差，*: $p < 0.002$（対照群との比較，一元配置分散分析および最小有意差法）

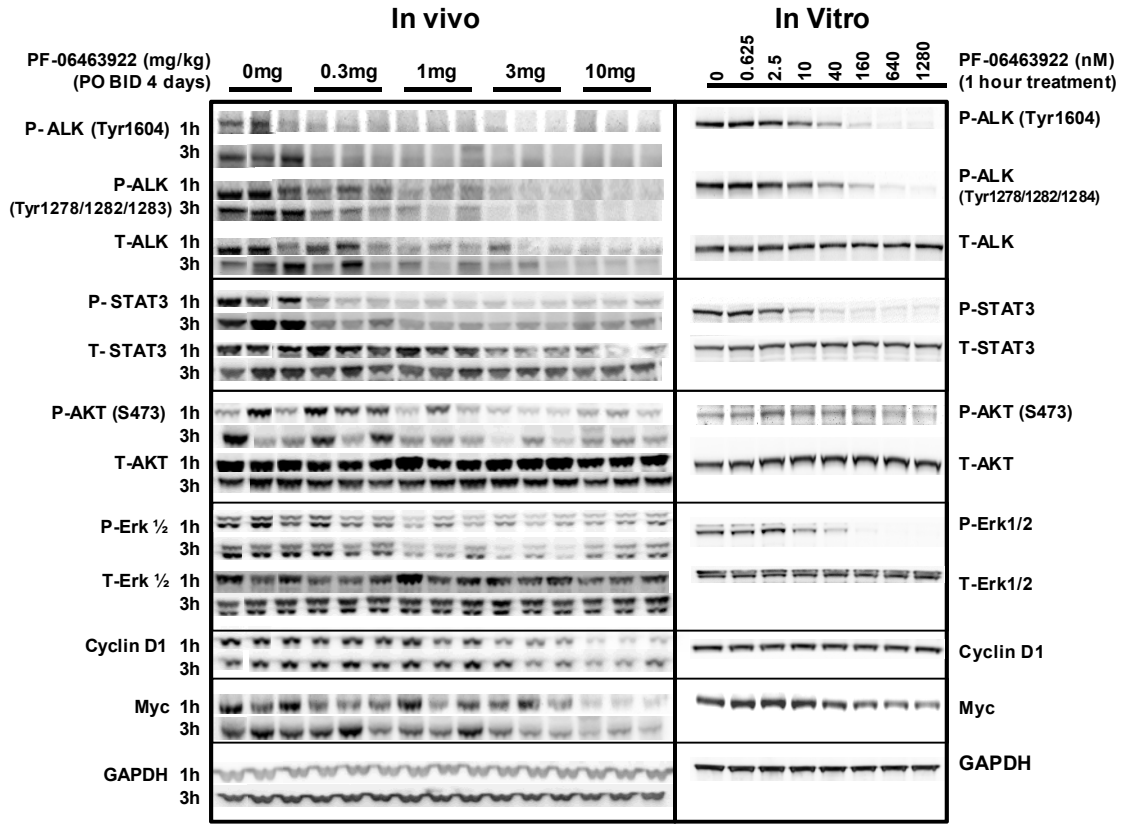
2.2.4.2. シグナル伝達系の解析

PF-06463922_[redacted]_174736

上述の試験において，H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍組織および細胞における ALK 融合タンパクを介したシグナル伝達に対するロルラチニブの用量および時間依存的作用をイムノブロット法により検討した。評価したバイオマーカーは，1）ALK を介した重要な機能を調節することが知られているシグナル伝達分子である STAT3，AKT および ERK のリン酸化，ならびに 2）細胞周期進行および癌遺伝子転写を調節するマーカーであるサイクリン D1 および Myc であった。ロル

ラチニブは 1 mg/kg BID 以上の用量で，4 日間の投与終了後 1 時間および 3 時間に採取した腫瘍組織における ALK（アミノ酸残基 Y1604 および Y1278/1282/1283），STAT3，ERK および Akt のリン酸化を用量依存的に顕著に阻害した（Figure 18）。細胞を in vitro においてロルラチニブで 1 時間処理した場合にも，AKT 以外のマーカーについて同様の作用が認められた。AKT に対する in vitro での作用が腫瘍組織に比べて弱かったのは，処理時間の短さ（1 時間）に起因している可能性が考えられる。総 ALK レベルは腫瘍組織において用量依存的に減少し，3 および 10 mg/kg BID ではほぼ完全に消失したが，細胞を in vitro で 1 時間処理したときにはこのような変化はみられなかった。In vivo でロルラチニブを長期間投与した際に総 ALK レベルが低下する機序は，現在のところ不明である。また，in vivo での 3 および 10 mg/kg BID ならびに in vitro 細胞アッセイにおいてサイクリン D1 および Myc レベルの顕著な減少が認められ，細胞増殖阻害（Ki67），アポトーシス誘導（カスパーゼ 3）およびこれらの用量で観察された顕著な抗腫瘍効果と対応した。

Figure 18.　H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} モデルにおけるシグナル伝達阻害



皮下に H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} 腫瘍が定着したマウス（n = 7～9）にロルラチニブを 0.3，1，3 および 10 mg/kg BID で 4 日間経口投与した。最終投与 1 時間および 3 時間後に腫瘍組織を採取した。腫瘍組織よりタンパク溶解液を調製して SDS-PAGE 法により分離し，各タンパク量をイムノブロット法により測定した。In vitro 試験では，細胞を溶媒または図に示した濃度のロルラチニブで 1 時間処理した後，溶解させてタンパクを抽出した。各タンパクはウェスタンブロット法によって測定した。GAPDH: グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ

3. 副次的薬理試験

3.1. ロルラチニブ

3.1.1. 各種受容体，酵素，トランスポーターおよびイオンチャネルに対する作用

100001517

ロルラチニブ（遊離塩基）の各種受容体，酵素，トランスポーターおよびイオンチャネルに対する作用を最大 10 µmol/L の濃度で評価した。アセチルコリンエステラーゼ［10 µmol/L で 73.0%阻害，IC_{50} 値 5.3 µmol/L（以下同じ）］，AurA / Aur2 キナーゼ（87.0%，3.8 µmol/L），EGFR（73.6%，5.0 µmol/L）および Lck（53.4%，65 µmol/L）を除き 50%以上の結合または酵素阻害は認められず，これらの IC_{50} 値は ALK^{L1196M} に対する IC_{50} 値（0.7 nmol/L，0.3 ng/mL，Table 1）より 5000 倍以上高値であった。

ロルラチニブのキナーゼ選択性は，206 種の組換えキナーゼに対する生化学的キナーゼスクリーニングアッセイによっても評価した。その結果，ロルラチニブが ALK^{L1196M} と比較して 100 倍未満の選択性を示すキナーゼとして 11 個のキナーゼが同定された（2.1.2 項，Table 4）。このうちのいくつかは，ロルラチニブ投与による毒性に寄与している可能性があり，特に TrkB の阻害は末梢および中枢神経系ならびに脂質プロファイルおよび体重の変化に影響を及ぼす可能性がある（2.6.6.9.1.7，2.6.6.9.1.8 および 2.6.6.9.1.11 項）。

3.2. 代謝物 PF-06895751

3.2.1. 各種受容体，酵素，トランスポーターおよびイオンチャネルに対する作用

100034152

代謝物 PF-06895751 の各種受容体，酵素，トランスポーターおよびイオンチャネルに対する作用を 10 µmol/L の濃度で評価した。PF-06895751 は，評価したいずれの標的に対しても 50%以上の阻害を示さなかった。この結果から，PF-06895751 はオフターゲットの薬理活性を示す可能性は低いと考えられる。

4. 安全性薬理試験

ロルラチニブの心血管系，呼吸器系および中枢神経系に対する作用を評価した。心血管系および神経機能の評価は，ラットまたはイヌにおける反復投与毒性試験（2.6.6.3 項）にも組み込んで実施した。ロルラチニブが中枢神経系に移行し，シナプス可塑性，長期増強および記憶過程に関与する TrkB 受容体を阻害することから，認知障害を引き起こす可能性を評価するための ex vivo および in vivo 試験も実施した。大部分の in vivo 安全性薬理試験はロルラチニブの遊離塩基（PF-06463922，無水物）を用いて行ったが，一部の試験では塩酸塩（PF-06463922-01）または酢酸溶媒和物（PF-06463922-14）を使用した。ロルラチニブの安全性薬理試験の概要を Table 11 に示す。

Table 11.　ロルラチニブの安全性薬理評価の概要

試験の種類 [a,b]	投与経路	試験系
In vitro および ex vivo 試験		
心血管系		
hERG カリウムチャネル [c]	In vitro	HEK 細胞
Nav1.5 ナトリウムチャネル	In vitro	CHO 細胞
L 型カルシウムおよびナトリウムチャネル [d]	Ex vivo	単離モルモット心室筋細胞
血管収縮	Ex vivo	単離ラット胸部大動脈
心機能	Ex vivo	モルモット ランゲンドルフ灌流心
中枢神経系		
長期増強 [d]	Ex vivo	単離ラット海馬
GABA 受容体	In vitro	CHO 細胞
代謝物を用いた試験		
hERG カリウムチャネル [c,f]	In vitro	HEK 細胞
In vivo 試験		
心血管系		
ラット：血圧および心拍数 [d]	経口	Wistar Han ラット
イヌ：血圧，心拍数，心電図，および心エコー[d]	経口	ビーグル犬
中枢神経系		
ラット：認知機能	経口	Wistar Han ラット
ラット：認知機能	経口	Wistar Han ラット
呼吸系		
ラット：呼吸数，1 回換気量および分時換気量 [c,e]	経口	Wistar Han ラット
毒性試験における安全性薬理評価		
心血管系		
ラット：心エコー[g]	経口	Wistar Han ラット
イヌ：血圧，心拍数，心電図 [d,h]	経口	ビーグル犬
イヌ：心拍数，心電図 [c,i]	経口	ビーグル犬
中枢神経系		
ラット：FOB[g]	経口	Wistar Han ラット
ラット：FOB[c,e,j]	経口	Wistar Han ラット
ラット：FOB[c,k]	経口	Wistar Han ラット

HEK: ヒト胎児腎臓，CHO: チャイニーズハムスター卵巣
a: 特記ない限り，試験は GLP 非適用で実施した。
b: 特記ない限り，被験物質にはロルラチニブ遊離塩基（無水物）を用いた。
c: GLP 適用試験
d: 被験物質にロルラチニブ塩酸塩（PF-06463922-01）を用いた。
e: 被験物質にロルラチニブ酢酸溶媒和物（PF-06463922-14）を用いた。
f: 被験物質に代謝物 PF-6895751 を用いた。
g: ラット 14 日間投与毒性試験で評価
h: イヌ 14 日間投与毒性試験で評価
i: イヌ 13 週間投与毒性試験で評価
j: ラット 4 週間投与毒性試験で評価
k: ラット 13 週間投与毒性試験で評価

4.1. ロルラチニブ

4.1.1. 心血管系

以下に記載した心血管系安全性薬理試験に加えて，ラット 14 日間投与毒性試験（2.6.6.3.1.3 項：GLP 非適用）で心エコーを評価し，イヌ 14 日間（2.6.6.3.1.4 項：GLP 非適用）および 13 週間投与毒性試験（2.6.6.3.2.4 項：GLP 適用）で血圧，心拍数または心電図の評価を実施した。

イヌ 14 日間投与毒性試験でテレメトリー検査を実施したところ，15 mg/kg/日で試験 11 日に，50 mg/kg/日では試験 2 および 11 日に心拍数の増加および血圧の低下が認められた（50 mg/kg/日の投与後 12～22 時間で収縮期血圧-37 mmHg；心拍数+9 bpm）。そのほかに PR 間隔，QT 間隔および QTc 間隔の一過性の延長（投与後 1～3 時間）がみられたが，ロルラチニブの最大曝露の時間との関連性はなく，ロルラチニブ投与との関連性は不明であった。5 mg/kg/日では心血管系への影響はなかった。

イヌ 13 週間投与毒性試験で心電図検査を実施したところ, 25 mg/kg/日まで心電図パラメータ（心拍数，PR，QT および QTc 間隔ならびに QRS 幅）に対する影響は認められなかった。

ラット 14 日間投与毒性試験で実施した心エコー検査では, 試験 2 および 10 日に 20 mg/kg/日以上で心室拡張末期容積，拡張期面積，壁厚，1 回拍出量，左室急速流入血流速度，心房収縮期流入血流速度の用量依存的な増加が認められ，試験 10 日にはそれらの値が増大したが，機能的なパラメータに変化はなかった。これらの変化は左心室腔の拡大，左心室壁厚の増大および心容積の増大を示唆していた。この変化は高血圧の代償性変化を反映したものであり，心臓の病理組織学的変化がなかったことからも心組織への直接的な作用ではないと考えられた。

4.1.1.1. hERG カリウムチャネル

[redacted]GR052

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に安定的に発現したヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウムチャンネル電流に対するロルラチニブの作用を，ホールセルパッチクランプ法を用いて評価した。陽性対照として用いたテルフェナジンは 60 nmol/L の濃度で hERG 電流を 76.7%阻害した。ロルラチニブを 10，30，100 および 300 µmol/L の濃度で評価したところ，30 µmol/L 以上で hERG 電流を濃度依存的かつ溶媒対照と比較して統計学的に有意に阻害した（10，30，100 および 300 µmol/L でそれぞれ 2.7%，11.1%，30.7%，60.9%；$p < 0.05$）。hERG カリウム電流に対するロルラチニブの阻害作用に関する IC_{50} 値は 203.1 µmol/L（82489 ng/mL）であった。

4.1.1.2. Nav1.5 ナトリウムチャネル

[redacted]GR078（参考）

Nav1.5 ナトリウムチャネルを安定的に発現したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いて，心臓活動電位の脱分極において重要な Nav1.5 電流に対するロルラチニブの作用を，ホールセルパッチクランプ法を用いて評価した。細胞をプロパフェノン（陽性対照）0.3, 1 および 3 µmol/L またはロルラチニブ 10，30 および 100 µmol/L で 5 分間処理した。プロパフェノンは Nav1.5 電流を阻害し，IC_{50} 値は 0.5 µmol/L であった。ロルラチニブの Nav1.5 電流に対する阻害率は 10，30，

および 100 µmol/L でそれぞれ-0.9%，3.5%および-0.4%で，いずれの濃度でも統計学的に有意な阻害は認められなかった。Nav1.5 電流に対するロルラチニブの阻害作用に関する IC_{50} 値は 100 µmol/L 超（40600 ng/mL 超）であった。

4.1.1.3. L 型カルシウムおよびナトリウムチャネル

[redacted]GR038（参考）

単離したモルモット心室筋細胞における L 型カルシウムチャネルおよびナトリウムチャネル電流に対するロルラチニブの作用を，ホールセルパッチクランプ法を用いて評価した。L 型カルシウムチャネルおよびナトリウムチャネル電流を，異なる脱分極電圧を用いた単一電圧プロトコルによって誘導した。細胞を-80 mV で保持し，100 msec の間-40 mV に脱分極してナトリウム電流を誘導し，続いて 300 msec の間 0 mV まで脱分極して L 型カルシウム電流を誘導した。ロルラチニブは灌流緩衝液に漸増的に添加し, 0.1% DMSO で 3, 5 および 7 分間灌流したときの電流を 10, 30 および 100 µmol/L のロルラチニブで処理したときの溶媒対照とした。

ロルラチニブは L 型カルシウム電流を統計学的に有意に阻害し（$p < 0.01$），10，30 および 100 µmol/L における阻害率はそれぞれ 21.4%，43.7%および 65.0%で，IC_{50} 値は 44.0 µmol/L（17871 ng/mL）であった。ロルラチニブは最大ナトリウム電流に対しては 100 µmol/L までの濃度で有意な作用を示さなかったが，遅延ナトリウム電流を 10，30 および 100 µmol/L でそれぞれ 46.9%，103.4%および 310.5%増加させ，100 µmol/L での作用は統計学的に有意（$p < 0.01$）であった。

4.1.1.4. 血管収縮（ラット大動脈リング）

SP3912（参考）

血管収縮に対するロルラチニブの直接的効果を, ラットから単離した大動脈組織を用いて ex vivo で評価した。雄性 Wistar Han ラットから単離した大動脈リングを，通気した組織浴中で漸増濃度のフェニレフリン（陽性対照 ; 3 nmol/L～3 µmol/L）またはロルラチニブ（30 nmol/L～30 µmol/L）で 8～10 分間処理した。フェニレフリンは大動脈リングを濃度依存的に収縮させ，EC_{50} 値は 80.7 nmol/L であった。ロルラチニブは 30 µmol/L（12200 ng/mL）までの濃度で血管収縮を惹起しなかった。

4.1.1.5. 心機能（モルモット ランゲンドルフ心）

[redacted]LJ106（参考）

心機能に及ぼすロルラチニブの直接的な作用を，単離モルモット ランゲンドルフ灌流心モデルを用いて ex vivo で評価した。雄性モルモットから単離した心臓をランゲンドルフ灌流システムに設置し，漸増濃度のロルラチニブ（10 nmol/L～30 µmol/L）または溶媒（0.1% DMSO）で 5 分間灌流した。評価した心機能パラメータは dP/dt（収縮性），左心室圧，冠動脈灌流圧ならびに PR，QRS および QT 間隔であった。ロルラチニブの作用はベースラインからの変化率として計算し，溶媒対照の値と比較した。ロルラチニブは PR 間隔を 1 µmol/L（406 ng/mL）～30 µmol/L（12193 ng/mL）で濃度依存的に延長させ，1，3，および 10 µmol/L での変化は統計学的に有意（p

<0.05）であった。PR 間隔の最大の延長は 30 µmol/L（46.9%）で認められた（30 µmol/L は n = 2 であったため統計解析を実施しなかった）。その他のパラメータに影響は認められなかった。

4.1.1.6. ラット in vivo 試験

[redacted]LJ029（参考）

テレメータを装着した無麻酔 Wistar Han ラットにロルラチニブを単回経口投与して血圧および心拍数に対する作用を評価した。ロルラチニブを 0（溶媒），10 または 30 mg/kg の用量で雄ラット（8 匹/群）に投与した。心拍数ならびに収縮期，拡張期および平均血圧を投与後約 24 時間，連続して測定した。

ロルラチニブを 10 mg/kg で投与したとき，投与後 0～18 時間に収縮期，拡張期および平均血圧が上昇した。最大の上昇は投与後 2～3 時間でみられ，それぞれ 22，20 および 22 mmHg であった。30 mg/kg では投与後 0～21 時間に収縮期，拡張期および平均血圧が上昇した。最大の上昇は投与後 2～3 時間でみられ，それぞれ 37，33 および 35 mmHg であった。心拍数は投与後 0～2 時間に減少（最大の減少は投与後 1～2 時間，-36 bpm）し，投与後 12～21 時間には増加した（最大の増加は投与後 18～21 時間，29 bpm）。30 mg/kg では投与後 0～2 時間に減少（最大の減少は投与後 0～1 時間，-33bpm）し，投与後 15～21 時間には増加した（最大の増加は投与後 18～21 時間，32 bpm）。

以上，ロルラチニブの 10 および 30 mg/kg の経口投与により，収縮期，拡張期および平均血圧の上昇ならびに心拍数における二相性変化（最初に減少し，その後増加）が認められた。本試験では曝露量は測定しなかったが，ラット単回投与毒性試験（[redacted]LJ011）では，10 および 30 mg/kg 投与後約 1 時間（T_{max} に相当）における非結合型 C_{max} はそれぞれ 524 および 1640 ng/mL，非結合型 AUC_{24} はそれぞれ 4700 および 16200 ng•h/mL であった。

4.1.1.7. イヌ in vivo 試験

[redacted]LJ083（参考）

テレメータを装着した無麻酔ビーグル犬にロルラチニブを反復経口投与して心血管系に対する作用を評価した。雌雄イヌ（2 匹/性別/群）にパラレル試験デザインで，0（溶媒）または 1 mg/kg BID のロルラチニブを 5 日間投与した。2 日間の回復期間の後，0 または 7.5 mg/kg BID で 12 日間投与した。心血管系以外の評価項目は一般状態，体重ならびに血液学的検査および血液生化学的検査［試験-1（ベースライン），5，12，19 および 25 日（回復期間）］とした。心血管系パラメータはジャケット型外部テレメトリー（JET）データシステムを用いて試験-1（ベースライン），1，5，8，12，15，19 および 25 日（回復期間）の投与約 1 時間前から投与後約 22 時間まで測定し，心電図は試験-1（ベースライン），1，5，8，12，19 および 25 日（回復期間）に測定した。収集したパラメータは収縮期，拡張期および平均血圧，心拍数ならびに RR，PR，QRS，QT および QTc 間隔であった。また，心エコー検査を試験-1（ベースライン），2，4，9，11，16，18 および 24 日（回復期間）の投与後約 2 時間に行い，心拍数および左室内径短絡率を測定した。試験 4 日（1 mg/kg BID）および 11 日（7.5 mg/kg BID）に採血を行い，血漿中薬物濃度を測定した。

1 mg/kg BID ではロルラチニブ投与に関連した所見は認められなかった。心拍数が試験 1 日の投与後 1～6 時間に統計学的に有意に減少（-11 bpm）したが，1 匹の動物でのみ観察された変化で投薬馴化によるものと考えられ，ロルラチニブ投与との関連はないと考えられた。

7.5 mg/kg BID の 1 匹の雌において，一般状態変化として嘔吐，軟便/水様便および流涎が認められた。ロルラチニブ投与に関連した血液学的変化として白血球数，好中球数および単球数の増加ならびに好塩基球の減少が，血液生化学的変化として ALT，AST，ALP，GLDH，リパーゼ，血液尿素窒素およびクレアチニンの増加が認められた。これらの臨床病理学的変化は，イヌ反復投与毒性試験でみられたものと一致した。

7.5 mg/kg BID では，収縮期血圧，心拍数，PR，QRS および QT 間隔ならびに左室内径短絡率に変化が認められた。収縮期血圧の低下（-10～-22 mmHg）は試験 12，15 および 19 日の全測定期間（投与後 1～22 時間）に認められた。心拍数の増加は試験 12 日（13 bpm, 投与後 12～22 時間），15 日（10～17 bpm，投与後 1～22 時間）および 19 日（17 および 9 bpm，投与後 1～6 および 12～22 時間）に認められた。PR 間隔の延長は試験 8 日（9 msec, 投与後 1～6 時間）および 15 日（6 msec, 投与後 12～22 時間）に認められた。さらに，QRS 間隔の延長が試験 8 日（1 msec，投与後 1～6 時間）および 19 日（3 msec および 2 msec ; 投与後 1～6 および 12～22 時間）に観察された。QRS 間隔の変化はロルラチニブ投与と関連する可能性があると考えられるが，全例で観察されたものではなく，波形パターンの変化に伴う二次的な変化である可能性が考えられる。QT 間隔が試験 19 日に短縮（-16 msec，投与後 1～6 時間）したが，同時期に認められた心拍数の増加に伴う二次的変化と考えられ，心拍数で補正した QT 間隔（QTc 間隔）に影響はみられなかった。また，左室内径短絡率の増加が試験 18 日に認められた（4%，投与後 2～3 時間）。すべての心血管系パラメータは 5 日間の回復期間後にはベースライン値に戻り，完全な回復を示した。

以上，ロルラチニブは 1 mg/kg BID では心血管系に影響を及ぼさず，このときの非結合型 C_{max} および AUC_{24} はそれぞれ 68 ng/mL および 890 ng•h/mL であった。7.5 mg/kg BID では収縮期血圧の低下，心拍数の増加ならびに PR および QRS 間隔の延長が認められ，非結合型 C_{max} および AUC_{24} はそれぞれ 519 ng/mL および 6690 ng•h/mL であった。

4.1.2. 中枢神経系

下記に記載した神経機能に関する安全性薬理試験に加えて，機能観察総合評価（FOB）をラット 14 日間（2.6.6.3.1.3 項 : GLP 非適用），4 週間（2.6.6.3.2.1 項 : GLP 適用）および 13 週間（2.6.6.3.2.2 項 : GLP 適用）投与毒性試験で実施した。ラット 14 日間投与毒性試験では，試験 3 日および試験 13 日に 60 mg/kg/日で異常行動（歯打ち音），不随意運動（後方突進および震え），取り扱い時の反応性低下，覚醒状態の低下，歩行異常，反射反応の低下（協調性のない空中正向反射および伸筋突伸反応の低下）などが認められた。ロルラチニブを最高 30 mg/kg/日までの用量で投与したラット 4 週間投与試験または 13 週間投与試験では，14 日間反復投与毒性試験で 60 mg/kg/日を投与したときと同程度の曝露量に達していたにもかかわらず，FOB で異常は認められなかった。

4.1.2.1. 長期増強（ラット海馬スライス標本）

[redacted]GR133（参考）

記憶の分子的メカニズムの一つと考えられている長期増強[a]に対するロルラチニブの作用を，ex vivo 海馬脳スライスモデルを用いて評価した。雄性 Sprague-Dawley ラットから海馬脳スライスを単離し，細胞外興奮性シナプス後場電位（fEPSP）を海馬の CA1 領域から多電極アレイシステムを用いて記録した。40 分間の安定したベースライン fEPSP 振幅が得られた後，脳スライスを 0（溶媒対照），0.1 または 1 µmol/L のロルラチニブで 20 分間処理した。シータバースト刺激（TBS）によって長期増強を誘導し，さらに 50 分間記録を続けた。長期増強の程度は，ベースラインからの fEPSP 振幅の変化率で表した。ロルラチニブは 1 µmol/L で TBS 誘発長期増強を溶媒対照と比較して有意に減少させた（ロルラチニブ 134.1%，溶媒対照 157.0%；$p < 0.05$）が，0.1 µmol/L では影響は認められなかった。ロルラチニブはいずれの濃度でも，長期増強誘発前のベースライン fEPSP に対して作用を示さなかった。

4.1.2.2. $GABA_A$ 受容体を介したクロライド電流

[redacted]GR081（参考）

γ-アミノ酪酸（$GABA_A$）受容体を介したクロライド電流に対するロルラチニブの作用を，ホールセルパッチクランプ法を用いて，ヒト GABAα1，ヒト化ラット GABAβ2 およびヒト GABAγ2 遺伝子を導入した CHO 細胞を用いて評価した。リガンド依存性クロライド電流は，細胞を 10 µmol/L の GABA で 3 秒間処理することによって誘発した。細胞は，ジアゼパム（陽性対照）1 µmol/L を 10 µmol/L の GABA 存在下で処理するか，ロルラチニブ 1，3，10，30 および 100 µmol/L を 10 µmol/L の GABA 存在下（GABA 誘発クロライド電流に対する作用を評価）または非存在下（クロライド電流に対する直接作用を評価）で処理した。ジアゼパムはベースラインより 124%の増強反応を示したが，ロルラチニブは GABA 存在下または非存在下でクロライド電流に対して統計学的に有意な作用を示さなかった。

4.1.2.3. 認知機能に関するラット in vivo 試験

[redacted]GR137（参考）

ロルラチニブが認知機能に影響を及ぼす可能性について，ラットの文脈更新モデルを用いて評価した。Wistar Han ラットを訓練，記憶消去および試験の 3 段階からなる文脈更新パラダイム下で訓練した。訓練段階では，ラットは特定の環境状況と視覚刺激の組み合わせによって餌報酬が得られることを学習した。次に，記憶消去段階では，ラットを餌報酬が得られない別の環境状況に移すことによってこの行動が消滅した。その後の試験段階において，ラットを訓練段階で用いた元の環境状況に戻し，ロルラチニブ投与の影響を評価した。試験段階では，認知機能のエンドポイントと考えられる記憶想起スコア（memory recall score）および手掛かり誘導更新応答（cue-induced renewal responding）ならびに一般的活動の間接的指標として nose poke（装置内の穴に鼻を入れる行動）の総数を測定した。

[a] Cooke SF, Bliss TVP. Plasticity in the human central nervous system. Brain 2006;129:1659-73.

クロスオーバーデザインを用いて，雄性ラット（合計 16 匹）にランダムな順序でロルラチニブ 0（溶媒），0.3，3，10 および 30 mg/kg を単回経口投与，ならびにスコポラミン（陽性対照；ムスカリン性アセチルコリンエステラーゼ阻害剤で，動物モデルで記憶障害を誘発することが報告されている）0.5 mg/kg を単回皮下投与した。試験段階は，各薬物の T_{max} に合わせ，溶媒またはロルラチニブの投与 1 時間後ならびにスコポラミンの投与 30 分後に実施した。各群 3 匹からなるサテライト群を設け，全用量のロルラチニブ投与 1 時間後の血液および脳検体を採取し，ロルラチニブ濃度を測定した。さらに，ロルラチニブ 30 mg/kg 群ではトキシコキネティクス分析のために採血を行い，投与 24 時間後の脳検体も採取した。

ロルラチニブ 3 mg/kg 以上では，用量依存的ではないが，溶媒対照と比較して統計学的に有意な記憶想起スコアの減少が認められた。手掛かり誘導更新応答および nose poke の総数に対しては，いずれの用量のロルラチニブでも影響は認められなかった。スコポラミンでは，溶媒対照と比較して統計学的に有意な記憶想起スコアおよび手掛かり誘導更新応答の減少ならびに nose poke の総数の増加が認められた。記憶想起スコアに対するスコポラミンの作用はロルラチニブよりも強かった。

ロルラチニブ投与 1 時間後における非結合型血漿中濃度（0.3，3，10 および 30 mg/kg でそれぞれ 14.1，225，782 および 2190 ng/mL）および非結合型脳内濃度（0.3，3，10 および 30 mg/kg でそれぞれ 3.6，31.4，137 および 511 ng/g[a]）は投与量の増加とともに増加した。ロルラチニブ 30 mg/kg 投与時の非結合型 C_{max} および AUC_{24} はそれぞれ 2240 ng/mL および 30600 ng•h/mL であった。同用量での投与 24 時間後における非結合型脳内濃度は 61.1 ng/g であった。

以上，ロルラチニブ 3 mg/kg 以上の投与により，用量依存的ではないが統計学的に有意な記憶想起スコアの減少が認められたが，手掛かり誘導更新応答および nose poke の総数に対しては無影響であった。本試験におけるロルラチニブの認知機能に関する無影響量（NOEL）は 0.3 mg/kg と考えられた。

4.1.2.4. 認知機能に関するラット in vivo 試験：TrkB 阻害剤との比較

[redacted]GR207（参考）

ロルラチニブおよび PF-06471402（類似した構造を持つ ALK / TrkB 阻害剤）が認知機能に影響を及ぼす可能性について，ラットの文脈更新モデルを用いて評価した。前項と同様，試験段階では記憶想起スコア，手掛かり誘導更新応答および nose poke の総数を測定した。クロスオーバーデザインを用いて，雄性ラット（合計 16 匹）にランダムな順序でロルラチニブを 0（溶媒），1 および 3 mg/kg，PF-06471402 を 3 および 15 mg/kg ならびに CE-245677（陽性対照；TrkB を阻害し，動物モデルおよびヒトにおいて記憶障害を誘発することが知られている化合物）を 10 mg/kg の用量でランダムな順序で単回経口投与した。試験段階は，各薬物の T_{max} に合わせ，溶媒，ロルラチニブまたは PF-06471402 の投与 1 時間後ならびに CE-245677 の投与 3 時間後に実施した。試験段

[a] 脳重量 1 g が 1 mL に相当すると仮定した。ロルラチニブの Wistar Han ラットにおける脳内非結合型分率は 0.12 であった。

階終了後，ロルラチニブおよび PF-06471402 投与 1 時間後ならびに CE-245677 投与 3 時間後に血液および脳検体を採取し，薬物濃度を測定した。

ロルラチニブはいずれの用量でも記憶想起スコア，手掛かり誘導更新応答および nose poke の総数に影響を及ぼさなかった。PF-06471402 はいずれの用量でも記憶想起スコアの減少が認められたが，手掛かり誘導更新応答および nose poke の総数に変化はみられなかった。CE-245677 では溶媒対照と比較して統計学的に有意な記憶想起スコアおよび手掛かり誘導更新応答の減少が認められたが，nose poke の総数に変化はみられなかった。

ロルラチニブの 1 および 3 mg/kg 投与 1 時間後における非結合型血漿中濃度はそれぞれ 73.3 および 142 ng/mL，非結合型脳内濃度はそれぞれ 16.2 および 24.6 ng/g であった。PF-06471402 の 3 および 15 mg/kg 投与 1 時間後における総血漿中濃度はそれぞれ 212 および 1010 ng/mL，総脳内濃度はそれぞれ 141 および 624 ng/g であった。また，CE-245677 の 10 mg/kg 投与 3 時間後における総血漿中濃度は 576 ng/mL，総脳内濃度は 140 ng/g であった。

以上，ロルラチニブは 1 および 3 mg/kg の単回投与で評価したいずれのパラメータにも影響を及ぼさず，PF-06471402 は 3 および 15 mg/kg で記憶想起スコアを減少させたが手掛かり誘導更新応答および nose poke の総数に対しては無影響であった。本試験におけるロルラチニブの認知機能に関する NOEL は 3 mg/kg と考えられた。

4.1.3. 呼吸器系

4.1.3.1. ラット呼吸器系試験

[redacted]GR378

呼吸機能に対するロルラチニブの作用を，Wistar Han ラットに単回経口投与して評価した。ロルラチニブを雄性ラット（各群 6 匹）に 0（溶媒），10，30 および 100 mg/kg の用量で投与した。評価項目は一般状態，体重ならびに呼吸パラメータ（一回換気量，呼吸数および分時換気量）とした。ラットを無拘束下で全身プレチスモグラフに入れ，60 分間馴化させた後チャンバーから取り出してロルラチニブを投与し，再度チャンバーに戻して呼吸パラメータを約 240 分間測定した。

ロルラチニブ投与後に死亡または一般状態変化は認められなかった。ロルラチニブ 10 mg/kg では呼吸パラメータに影響は認められなかった。一回換気量は 30 および 100 mg/kg の投与後 60 分（-8%）ならびに 100 mg/kg の投与後 200～240 分（-8%～-15%）に減少し，溶媒対照と比較して統計学的に有意（$p < 0.05$）であったが，投与後 60 分で観察された一回換気量の減少は投与後 80 分までに溶媒対照と同程度にまで回復したことから，一過的な変化と考えられた。呼吸数および分時換気量には 100 mg/kg までの用量で有意な変化は認められなかった。

以上，ロルラチニブを雄性ラットに単回経口投与したとき，30 および 100 mg/kg で一回換気量が統計学的に有意に減少した。投与後 60 分における一回換気量に対する影響はロルラチニブの T_{max}（約 60～90 分：[redacted]LJ011）に関連する可能性が考えられ，100 mg/kg の投与後 240 分の血中濃度（4840 ng/mL）は 30 mg/kg 投与後 60 分の値（5070 ng/mL）と同程度であったことから，このときの変化も薬物の曝露と関連している可能性は否定できない。しかしながら，一回換気量の減少は最大で-15%と軽度であったことから偶発的な変化である可能性も考えられ，また呼吸数および分時換気量には影響が認められなかったことから，毒性学的意義の低い変化と考えられた。呼吸

パラメータの変化は 10 mg/kg では認められず，このときの非結合型 C_{max} は 524 ng/mL であった（[redacted]LJ011）。

4.2. 代謝物 PF-06895751

4.2.1. hERG カリウムチャネル

[redacted]GR095

HEK293 細胞に安定的に発現した hERG カリウムチャンネル電流に対する PF-06895751 の作用を，ホールセルパッチクランプ法を用いて評価した。陽性対照として用いたテルフェナジンは 60 nmol/L の濃度で hERG 電流を 74.2%阻害した。PF-06895751 を 30 および 300 µmol/L の濃度で評価したところ，300 µmol/L では hERG 電流を統計学的に有意に阻害（-11.8%；$p < 0.05$）したが，30 µmol/L では有意な変化はみられなかった（-2.7%）。hERG カリウム電流に対する PF-06895751 の IC_{50} 値は 300 µmol/L（55260 ng/mL）超であった。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6. 考察及び結論

ロルラチニブの ALK および ROS1 チロシンキナーゼに対する阻害作用，キナーゼ選択性，抗腫瘍効果，PK/PD 相関ならびにアポトーシス，細胞増殖およびシグナル伝達のバイオマーカーに関して，種々の in vitro および in vivo モデルを用いて評価した。In vitro において，ロルラチニブは酵素レベルおよび細胞レベルで野生型および変異型 ALK ならびに ROS1 キナーゼの活性を濃度依存的かつ強力に阻害した。ロルラチニブはまた，ヒト NSCLC 細胞株における ALK および ROS1 依存性の発がんに関わる機能活性を阻害し，ALK および ROS1 融合タンパクならびに臨床的に認められる二次変異を有する変異型 ALK の融合タンパクを発現する腫瘍細胞株において強力かつ選択的な増殖阻害作用およびアポトーシス誘導を示した。In vivo では，EML4-ALKv1^{L1196M}，EML4-ALKv1^{G1269A}，EML4-ALKv1^{I1171T} および EML4-ALKv1^{G1202R} といった変異型 ALK および ROS1 融合タンパクを発現する腫瘍異種移植モデルにおいて，ロルラチニブは顕著な抗腫瘍効果を示した。また，マウスの脳同所性移植モデル（EML4-ALKv1 および EML4-ALKv1^{L1196M}）においても腫瘍縮小効果および延命効果を示した。ロルラチニブの抗腫瘍効果は用量依存的であり，ALK または ROS1 リン酸化の阻害と強い相関を示した。ALK または ROS1 融合タンパクを発現する腫瘍モデルを用いた PK/PD 解析より，ロルラチニブの血漿中濃度とキナーゼリン酸化または抗腫瘍効力との関係が明らかにされた。クリゾチニブ耐性の H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} ヒト NSCLC モデルにおいて，EML4-ALKv1^{L1196M} リン酸化阻害（ほぼ EC_{50}）および抗腫瘍効果（腫瘍増殖がほぼ静止する）を示すのに必要なロルラチニブの非結合型血漿中濃度は 50 nmol/L（20 ng/mL）と推定された。ロルラチニブのヒト推奨用量（100 mg QD）での非結合型 C_{max} は

495 nmol/L[a]（201 ng/mL）であり，これらの結果はロルラチニブが臨床的に到達可能な血漿中濃度でマウスモデルにおいて抗腫瘍効果を発揮することを示唆している。

安全性薬理試験を実施して，ロルラチニブの心血管系，中枢神経系および呼吸器系に及ぼす影響を評価した。In vitro 心血管系試験において，ロルラチニブは，hERG カリウム電流［IC_{50} 値：201.1 µmol/L，82489 ng/mL；ヒトにおける非結合型 C_{max}（495 nmol/L）の 410 倍］および L 型カルシウムチャネル（IC_{50} 値：44.0 µmol/L，17871 ng/mL；ヒトにおける非結合型 C_{max} の 89 倍）を弱く阻害し，遅延ナトリウム電流を増加させた［100 µmol/L（ヒトにおける非結合型 C_{max} の 200 倍）で統計学的に有意］。Ex vivo ランゲンドルフ心臓モデルでは PR 間隔を 30 µmol/L（12193 ng/mL；ヒトにおける非結合型 C_{max} の 61 倍）で最大 46.9%増加させたが，ラット大動脈リングモデルでは 30 µmol/L までの濃度で血管収縮を惹起しなかった。ラットを用いた in vivo 試験では 10 mg/kg（非結合型 C_{max}：524 ng/mL；ヒトにおける非結合型 C_{max} の 2.6 倍）以上の単回投与で収縮期，拡張期および平均血圧の上昇ならびに心拍数における二相性変化が認められた。イヌにおいては，15 mg/kg/日（非結合型 C_{max}：519 ng/mL；ヒトにおける非結合型 C_{max} の 2.6 倍）で心拍数の増加，収縮期血圧の低下ならびに PR および QRS 間隔の延長が認められた。ラット文脈更新モデルを用いた検討では，3 mg/kg（非結合型血漿中濃度：225 ng/mL；ヒトにおける非結合型 C_{max} の 1.1 倍）以上で軽度かつ用量非依存性的に認知機能障害を示す可能性が示唆された。ラット海馬スライスモデルにおいては，ロルラチニブは TBS によって誘発された長期増強を 1 µmol/L（406 ng/mL；ヒトにおける非結合型 C_{max} の 2.0 倍）で有意に抑制した。呼吸器系の検討では，雄ラットにおいて 30 および 100 mg/kg の単回投与で 1 回換気量を統計学的に有意に低下させたが，呼吸数および分時換気量には影響を及ぼさなかった。また，10 mg/kg（非結合型 C_{max}：524 ng/mL；ヒトにおける非結合型 C_{max} の 2.6 倍）では呼吸パラメータに変化は認められなかった。ロルラチニブの主要なヒト代謝物である PF-06895751 は，hERG カリウム電流を阻害しなかった［IC_{50} 値：300 µmol/L（55260 ng/mL）超］。

以上のロルラチニブの薬理学的プロファイルは，ALK チロシンキナーゼ阻害剤に抵抗性または不耐容の *ALK* 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の NSCLC に対する治療薬としての本薬の有効性および安全性を裏付けるものと考えられる。

7. 図表

表および図は，本文中および 2.6.3 薬理試験概要表に適宜記載した。

[a] 2.7.2.2.2.2.1.3 項 Table 28：日本人患者にロルラチニブを 100 mg QD で反復投与したときの第 1 サイクル第 15 日における C_{max}（591.1 ng/mL）に非結合型分率 0.340（2.6.4.4.4.1 項）を乗じて算出

TABLE OF CONTENTS

2.6.3.1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS 4
2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS 10
2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY 11

2.6.3.1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PF-06463922

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics				
In Vitro Pharmacology of Lorlatinib Against ALKv1, ALKv2, ALKv3a, ALKv3b, ALK^{G1269A}, ALK^{L1196M}, ALK^{C1156Y}, ALK^{L1152R}, ALK^{F1174L}, ALK^{G1202R}, ALK^{S1206Y}, ALK^{1151Tins}, ROS1	Enzyme Ki, cellular kinase activities, cell functional, and biomarker assays	In vitro	Pfizer WRD	PF-06463922_[redacted]_174542
In Vitro Characterization Lorlatinib Activity Against ALK^{I1171T}	Enzyme Ki, cellular kinase activity, cell proliferation	In vitro	Pfizer WRD	PF-06463922_[redacted]_055600
Biochemical Profile of Lorlatinib Major Metabolite, PF-06895751	FRET-based kinase assay	In vitro	Pfizer WRD	PF-06463922_[redacted]_025806
In Vivo Activity of Lorlatinib in ALK (EML4-ALKv1, EML4-ALKv1^{L1196M}, EML4-ALKv1^{G1269A}) or ROS1 (CD74-ROS1) fusion driven tumor models	Kinase target inhibition, antitumor efficacy, PK/PD relationships, and biomarker analysis	PO, SC Infusion	Pfizer WRD	PF-06463922_[redacted]_174736
In Vivo Activity of Lorlatinib in an EML4-ALKv1^{L1196M} Orthotopic Brain NSCLC Xenograft Model	Antitumor efficacy (luminescence signal)	SC Infusion	Pfizer WRD	PF-06463922_[redacted]_174736
In Vivo Characterization of Lorlatinib Activity Against ALK^{I1171T}	Antitumor efficacy, target, inhibition, and PK/PD	SC Infusion	Pfizer WRD	PF-06463922_[redacted]_055600
In Vivo Activity of Lorlatinib in ALK^{G1202R} Driven Tumor Model	Antitumor efficacy, target inhibition, and PK/PD	SC Infusion	Pfizer WRD	PF-06463922_[redacted]_020236
Secondary Pharmacodynamics				
[redacted] Wide Ligand Profile Screen	Binding, Cellular and Nuclear Receptor Functional, Enzyme and Uptake Assays	In vitro	[redacted][a]	100001517
[redacted] Wide Ligand Profile Screen with PF-06895751[b]	Binding, Cellular and Nuclear Receptor Functional, Enzyme and Uptake Assays	In vitro	[redacted][a]	100034152
Safety Pharmacology				
hERG Patch Clamp	HEK cells stably expressing hERG channels	In vitro	[redacted][c]	[redacted]0207.QHJ

2.6.3.1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: PF-06463922

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
hERG Patch Clamp with PF-06895751[b]	HEK cells stably expressing hERG channels	In vitro	[redacted][c]	[redacted]0313.QHJ
Nav1.5 Patch Clamp	CHO cells stably transfected with human Nav1.5 gene	In vitro	Pfizer WRD	[redacted]GR078
GABA Patch Clamp	CHO cells transfected with human GABAα1, humanized rat GABAβ2 and human GABAγ2 genes	In vitro	Pfizer WRD	[redacted]GR081
Long-Term Potentiation	Rat hippocampus	Ex vivo	Pfizer WRD	[redacted]GR133
Vasoconstriction	Rat isolated aorta	Ex vivo	Pfizer WRD	SP3912
Cardiac L-Type Calcium and Sodium Currents	Guinea pig isolated ventricular myocyte	Ex vivo	Pfizer WRD	[redacted]GR038
Cardiac Function and Conduction	Langendorff-perfused guinea pig isolated heart (paced)	Ex vivo	Pfizer WRD	[redacted]LJ106
Pulmonary Assessment (Plethysmography)	Rat/Wistar Han	Oral gavage	Pfizer WRD	[redacted]GR378
Neurofunctional Assessment (Contextual Renewal Model)	Rat/Wistar Han	Oral gavage	Pfizer WRD	[redacted]GR137
Neurofunctional Assessment (Contextual Renewal Model)	Rat/Wistar Han	Oral gavage	Pfizer WRD	[redacted]GR207
Cardiovascular Assessment (Telemetry)	Rat/Wistar Han	Oral gavage	Pfizer WRD	[redacted]LJ029
Cardiovascular Assessment (Telemetry and Echocardiography)	Dog/Beagle	Oral gavage	Pfizer WRD	[redacted]LJ083
Pharmacodynamic Drug Interactions				
Not conducted				

ALK = Anaplastic lymphoma kinase; CHO = Chinese hamster ovary; FRET = Fluorescence resonance energy transfer; GABA = Gamma-aminobutyric acid; HEK = Human embryonic kidney; hERG = Human ether-à-go-go-related gene; Ki = Inhibition constant; PK/PD = Pharmacokinetic/pharmacodynamic; PO = Per os ROS1 = c-ROS oncogene 1; SC = Subcutaneous; WRD = Worldwide Research & Development.

a. [redacted] France.

b. Ma o human circulating metabolite of lorlatinib.

c. [redacted]

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-06463922

Study Type	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Inhibition potency of Wild-type ALK, Wild-type ROS, and Mutant ALK Kinase Activity in an Enzyme Assay	In Vitro	In Vitro	NA	n = 1 to 3	Ki (nM) following Lorlatinib: Wild-type ALK: <0.2 ALK^{L1196M}: 0.7 ALK^{G1269A}: 0.9 ALK^{F1174L}: <0.1 ALK^{C1156Y}: <0.1 ALK^{L1152R}: <0.1 $ALK^{1151Tins}$: 0.1 ALK^{S1206Y}: 0.2 Wild-type ROS1: <0.005	No	PF-06463922_[redacted]_174542
Inhibition of ALK^{I1171T} Kinase Activity in a Biochemical Enzyme Assay	In Vitro	In Vitro	NA	n = 1 duplicate samples per dilution	Wild-type ALK: <0.1 nM ALK^{I1171T}: 0.25 nM	No	PF-06463922_[redacted]_055600
Biochemical Profile of Lorlatinib Major Metabolite, PF-06895751	In Vitro	In Vitro	NA	n = 1 duplicate samples	PF-06895751 was inactive against wild-type ALK, wild-type ROS1, and a diverse panel of 40 other kinases.	No	PF-06463922_[redacted]_025806
Kinase Selectivity in an Enzyme-based Assay	In Vitro	In Vitro	NA	n = 1	Against a panel of 206 kinases, 11 kinases were identified for which lorlatinib exhibited some activity with selectivity margins <100x compared to the ALK^{L1196M} mutant.	No	PF-06463922_[redacted]_174542
Kinase Selectivity in a Cell-based Phosphorylation Assay	In Vitro	In Vitro	NA	n = 1	NIH3T3 cells expressing EML4-$ALKv1^{L1196M}$: IC_{50} = 21 nM; Lorlatinib selectivity ratio for $ALKv1^{L1196M}$ was 476x and 11x relative to TrkA and TrkB, respectively.	No	PF-06463922_[redacted]_174542

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-06463922

Study Type	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Potency Determination of ALK and ROS fusions in Cell-Based Tyrosine Kinase Phosphorylation Assays	In Vitro	In Vitro	NA	n = 1 to 7	**IC50's of PF-06463922 against:** **Endogenous cell lines expressing:** EML4-ALKv1 in H3122 cell = 2.4 nM EML4-ALKv3a/b in H2228 cells = 1.3 nM **NCI-H3122 engineered cells expressing:** H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} = 11 nM H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} = 17 nM **NIH3T3 engineered cells expressing:** EML4-ALKv1 = 1.5 nM EML4-ALKv2 = 1.4 nM EML4-ALKv3a = 0.9 nM EML4-ALKv3b = 1.0 nM KIF5B-ALK = 0.5 nM EML4-ALKv1^{L1196M} = 21 nM EML4-ALKv1^{G1269A} = 15 nM EML4-ALKv1^{F1174L} = 0.2 nM EML4-ALKv1^{C1156Y} = 1.6 nM EML4-ALKv1^{L1152R} = 9 nM EML4-ALKv1^{G1202R} = 65 nM EML4-ALKv1^{1151Tins} = 46 nM EML4-ALKv1^{S1206Y} = 4.2 nM **Endogenous cell lines expressing:** SLC34A2-ROS1(s/L) in HCC78 = 0.14 nM **NIH3T3 engineered cells expressing:** CD74-ROS1(s) = 0.23 nM Fig-ROS1(s) = 0.31 nM Fig-ROS1(L) = 0.29 nM SLC34A2-ROS1(s) = 1.0 nM SLC34A2-ROS1(L) = 1.3 nM	No	PF-06463922_[redacted]_174542

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-06463922

Study Type	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Potency Determination in Cell-Based Tyrosine Kinase Phosphorylation Assays with ALK^{I1171} Mutant	In Vitro	In Vitro	NA	n = 3	**IC_{50}'s of PF-06463922 against:** NIH3T3 -EML4-$ALKv1^{I1171T}$ = 7.1 nM	No	PF-06463922_[redacted]_055600
Potency on ALK or ROS Fusion Driven Cell Proliferation	In Vitro	In Vitro	NA	n = 3 to 4	**IC_{50} values of PF-06463922 against:** Endogenous cell lines expressing: EML4-ALKv1 in H3122 = 2.4 nM EML4-ALKv3a/b in H2228 = 1.3 nM SLC34A2-ROS1 in HCC78 = 2.6 nM H3122 engineered cell lines: H3122-EML4-ALK^{L1196M} = 30 nM H3122-EML4-ALK^{G1269A} = 30 nM BaF3 engineered cell line: BaF3-CD74-ROS1 = 0.6 nM	No	PF-06463922_[redacted]_174542
Potency on ALK Fusion Driven Tumor Cell Apoptosis	In Vitro	In Vitro	NA	n = 3	**EC_{50} values of PF-06463922 induction of apoptosis:** H3122 = 4.9 nM H3122-EML4-ALK^{L1196M} = 29 nM H3122-EML4-ALK^{G1269A} = 28 nM	No	PF-06463922_[redacted]_174542

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-06463922

Study Type	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Inhibition of ALK Phosphorylation in ALKv1, ALK^{L1196M}, ALK^{G1269A}, Xenograft Tumors	Mouse, athymic nu/nu	PO BID or subcutaneous pump infusion	0.06 to 40 mg/kg/day PO BID or subcutaneous infusion 12 to 13 days	Female; n = 9 to 15 per group	PF-06463922 dose-dependently inhibited ALK activity in the ALK fusion driven tumor xenograft models. **EC_{50}s of PF-06463922 against ALK phosphorylation in tumors:** ALK in H3122 model = 4.4 nM ALK^{L1196M} in H3122-EML4-ALK^{L1196M} model = 36 nM (BID study) ALK^{L1196M} in H3122-EML4-ALK^{L1196M} model = 66 nM (SC infusion pump study) ALK^{G1269A} in H3122-EML4-ALK^{G1269A} model = 31 nM	No	PF-06463922_[redacted]_174736
Inhibition of ALK Phosphorylation in ALK^{I1171T} Xenograft Tumors	Mouse, athymic nu/nu	Subcutaneous pump infusion	0.3, 1, and 3 mg/kg/day for 9 days	Female; n = 10 per group	ALK^{I1171T} in NIH3T3-EML4-ALK^{1171T} model = 6.4 nM	No	PF-06463922_[redacted]_055600
Inhibition of ALK Phosphorylation in ALK^{G1202R} Xenograft Tumors	Mouse, athymic nu/nu	Subcutaneous pump infusion	0.75, 2.5, 7.5, 20, or 25 mg/kg/day for 6 days	Female; n = 8 to 12 per group	ALK^{G1202R} in NIH3T3-EML4-ALK^{G1202R} model = 190 nM	No	PF-06463922_[redacted]_020236

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-06463922

Study Type	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Antitumor Efficacy in Subcutaneous ALK Fusion Positive Human Xenograft Models in Mice (ALKv1, ALKv1^{L1196M}, and ALKv1^{G1269A})	Mouse, athymic nu/nu	PO BID or subcutaneous pump infusion	0.06 to 40 mg/kg/day BID or subcutaneous infusion 12 to 13 days	Female; n = 10 to 12 per group	PF-06463922 dose-dependently inhibited tumor growth and induced tumor regression in ALK fusion driven tumor xenograft models. H3122 model: 59% regression at 3 mg/kg/day SC infusion; H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} model: 63% regression at 20 mg/kg/day PO BID; 57% regression at 15 mg/kg/day SC infusion; H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} model: 59% regression at 25 mg/kg/day SC infusion **PF-06463922 plasma concentration to achieve tumor stasis:** H3122 model = 6.5 nM H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} model (PO, BID) = 51 nM H3122-EML4-ALKv1^{L1196M} model (SC infusion) = 68 nM H3122-EML4-ALKv1^{G1269A} model = 54 nM	No	PF-06463922_[redacted]_174736
Antitumor Efficacy in Subcutaneous ALK^{I1171T} Fusion Positive Human Xenograft Model in Mice	Mouse, athymic nu/nu	Subcutaneous pump infusion	0.3, 1, and 3 mg/kg/day for 9 days	Female; n = 10 per group	Dose dependent antitumor efficacy of PF-06463922 and correlation to inhibition of EML4-ALK^{I1171T} phosphorylation observed. ALK^{I1171T} phosphorylation (100% inhibition) and antitumor efficacy (50% regression) achieved in the 3 mg/kg/day dose group with a mean unbound plasma Cav of 118 nM. **PF-06463922 plasma concentration to achieve tumor stasis:** NIH3T3-EML4-ALK^{I1171T} model = 19 nM	No	PF-06463922_[redacted]_055600

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-06463922

Study Type	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Antitumor Efficacy in Subcutaneous ALK^{G1202R} Fusion Positive Human Xenograft Model in Mice	Mouse, athymic nu/nu	Subcutaneous pump infusion	0.75, 2.5, 7.5, 20, or 25 mg/kg/day for 6 days	Female; n = 8 to 12 per group	Dose dependent antitumor efficacy of PF-06463922 and correlation to inhibition of EML4-ALK^{G1202R} phosphorylation observed. At 2.5 mg/kg/day, 71% TGI and tumor regression of 34%, 76%, and 77% at the 7.5, 20, and 25 mg/kg/day, respectively. EC_{50} for tumor growth inhibition was 165 nM which correlated with tumor stasis concentration.	No	PF-06463922_[redacted]_020236
Antitumor Efficacy in Subcutaneous ROS1 Fusion Positive Xenograft Model in Mice	Mouse, athymic nu/nu	PO BID	0.02 to 6 mg/kg/day for 9 days	Female; n = 11 to 12 per group	PF-06463922 dose-dependently inhibited tumor growth and induced tumor regression (85% regression at 6 mg/kg/day) in ROS1 fusion driven tumor xenograft model. **PF-06463922 plasma concentration to achieve tumor stasis:** NIH3T3-CD74-ROS1 model = 5.6 nM	No	PF-06463922_[redacted]_174736
Antitumor Efficacy in Brain Orthotopic EML4-ALK Fusion Models in Mice	Mouse, athymic nu/nu	Subcutaneous pump infusion	6 mg/kg/day in H3122-luciferase model; 5, 10, and 20 mg/kg/day in H3122-EML4-ALK^{L1196M}-luciferase model	Female; n =1 to 5 per group	Lorlatinib reduced tumor burden at 6 mg/kg/day in H3122-luciferase and at 5, 10, and 20 mg/kg/day in H3122-EML4-ALK^{L1196M}-luciferase model (with plasma exposure levels ranging from 215 nM to 571 nM of free drug).	No	PF-06463922_[redacted]_174736

ALK = Anaplastic lymphoma kinase; BID = Twice per day; Cav = Average concentration; EC_{50} = 50% effective concentration; GLP = Good Laboratory Practice; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; Ki = Inhibition constant; μM = Micromolar; nM = Nanomolar; NA = Not applicable; PO = Per os (by mouth); ROS1 = c-ROS oncogene 1; SC = Subcutaneous; TGI = Tumor growth inhibition.

2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: PF-06463922

Type of Test	Test Cells/ Tissues	Concentration	Noteworthy Findings		GLP Compliance	Study Number
Ligand binding assays, cellular functional assays, and enzyme and uptake assays with lorlatinib (PF-06463922)	Cloned cells, isolated enzymes	Up to 10 μM	Acetylcholinesterase: AurA/Aur2 kinase: EGFR kinase: Lck kinase:	IC_{50} = 5.3 μM; 73.0% Inhibition IC_{50} = 3.8 μM; 87.0% Inhibition IC_{50} = 5.0 μM; 73.6% Inhibition IC_{50} = 65 μM; 53.4% Inhibition	No	100001517
Ligand binding assays, cellular functional assays, and enzyme and uptake assays with major human circulating metabolite of lorlatinib (PF-06895751)	Cloned cells, isolated enzymes	10 μM	None. IC_{50} >10 μM		No	100034152

EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor; GLP = Good Laboratory Practice; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; μM = Micromolar.

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PF-06463922

In Vitro

Type of Test	Test Cells/ Tissues	Test Concentration (μM)	Results	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
hERG Patch-clamp	HEK cells stably expressing hERG	0, 10, 30, 100, 300	3.5%, 2.7%, 11.1%*, 30.7%*, and 60.9%* inhibition of hERG current at 0, 10, 30, 100, and 300 μM, respectively; IC_{50} = 203.1 μM.	Yes	[redacted]0207.QHJ ([redacted]GR052)
hERG Patch-clamp with PF-06895751[a]	HEK cells stably expressing hERG	0, 30, 300	3.2%, 2.7%, and 11.8%* inhibition of hERG current at 0, 30, and 300 μM, respectively; IC_{50} >300 μM.	Yes	[redacted]0313.QHJ ([redacted]GR095)
Nav 1.5 Patch-clamp	CHO cells stably transfected with human Nav1.5 gene	10, 30, 100	-0.9%, 3.5%, and -0.4% inhibition of Nav1.5 sodium current at 10, 30, and 100 μM, respectively; IC_{50} >100 μM.	No	[redacted]GR078
GABA Patch-clamp	CHO cells transfected with human GABAα1, humanized rat GABAβ2, and human GABAγ2 genes	1, 3, 10, 30, 100	6.0%, 4.9%, 5.1%, -3.9%, and -22.2% inhibition of current amplitude at 1, 3, 10, 30, and 100 μM, respectively. When studied in the presence of 10 μM GABA, Lorlatinib had no effect on the $GABA_A$ Cl- current amplitude.	No	[redacted]GR081

Ex Vivo

Long-Term Potentiation	Rat isolated hippocampus	0, 0.1, 1	At 1 μM, statistically significant ($p < 0.05$) reduction of mean LTP (134.1%) compared with vehicle controls (157.0%). No significant effect at 0.1 μM (153.7%). Basal fEPSP was not affected at either test concentration.	No	[redacted]GR133
Vasoconstriction	Rat isolated thoracic aorta	0, 0.03 to 30	Lorlatinib did not produce a vasoconstriction response in the rat isolated aorta tissue-bath preparation at any concentration tested. EC_{50} >30 μM.	No	SP3912

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PF-06463922 (continued)

Ex Vivo

Type of Test	Test Cells/ Tissues	Test Concentration (μM)	Results	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
Cardiac Function and Conduction	Langendorff-perfused guinea pig isolated heart (paced)	0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30	Concentration-dependent, statistically significant ($p < 0.05$ at 1, 3, and 10 μM) increase in PR interval (atrio-ventricular conduction time) starting at ≥1 μM. Maximum increase in PR interval (46.9% versus baseline) occurred at 30 μM. No concentration-dependent or biologically relevant effects on cardiac contractility, left ventricular pressure, coronary perfusion pressure, QRS interval, or QT interval at any concentration tested.	No	[redacted]LJ106
Cardiac L-Type Calcium and Sodium Currents	Isolated single guinea pig ventricular myocytes	0, 10, 30, 100	Compared with time-matched controls, statistically significant ($p < 0.01$) inhibition of the L-type calcium current by 21.4%, 43.7%, and 65.0% at 10, 30, and 100 μM, respectively; IC_{50} = 44.0 μM. No significant effects on peak sodium currents at any test concentration (5.5%, 6.4%, and 11.0% at 10, 30, and 100 μM, respectively). Statistically significant ($p < 0.01$) increase (310.5%) in late sodium current at 100 μM; no significant effect at 10 (46.9%) or 30 (103.4%) μM.	No	[redacted]GR038

∗ $p < 0.05$; statistically different from vehicle control alone.
CHO = Chinese hamster ovary; EC_{50} = 50% effective concentration; fEPSP = Extracellular field excitatory postsynaptic potential; GABA = Gamma-aminobutyric acid; GLP = Good Laboratory Practice; hERG = Human ether-à-go-go-related gene; HEK = Human embryonic kidney; IC_{50} = 50% Inhibitory concentration; LTP = Long term potentiation; μM = Micromolar.
a. Major human circulating metabolite of lorlatinib.

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PF-06463922 (continued)

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain /Model	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
Pulmonary RR, TV, MV	Rat/Wistar Han	Oral gavage, 11.1 mL/kg (0.001N HCl) Lot GR07970	0, 10, 30, 100	6M	**≥30 mg/kg:** ↓ TV (8%) at 60 mpd **100 mg/kg:** ↓ TV (8-15%) at 200-240 mpd	Yes	[redacted]GR378
Central Nervous System Cognitive Function	Rat/Wistar Han (Contextual Renewal Model)	Oral gavage, 10 mL/kg (HCl acidified water, pH 2.75) Lot PF-06463922-00-0002	0, 0.3, 3, 10, 30	16M	**≥3 mg/kg:** ↓ memory recall scores	No	[redacted]GR137
Central Nervous System Cognitive Function	Rat/Wistar Han (Contextual Renewal Model)	Oral gavage, 10 mL/kg (HCl acidified water, pH 2.75) Lot PF-06463922-00-0002	0, 1, 3	16M	None	No	[redacted]GR207

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PF-06463922 (continued)

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain /Model	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
Cardiovascular System HR Systemic Arterial BP: SBP, DBP, MBP	Rat/Wistar Han (Ambulatory Telemetry)	Oral gavage, 10 mL/kg (HCl acidified water, pH 2.75) Lot PF-06463922-01-0001	0, 10, 30	8M	**10 mg/kg:** ↑ SBP, ↑ DBP, ↑ MBP (up to +22 mmHg; 0-18 HPD), ↓ HR (up to -36 bpm; 0-2 HPD), ↑ HR (up to +29 bpm; 12-21 HPD) **30 mg/kg:** ↑ SBP, ↑ DBP, ↑ MBP (up to +37 mmHg; 0-21 HPD), ↓ HR (up to -33 bpm; 0-2 HPD), ↑ HR (up to +32 bpm; 15-21 HPD)	No	[redacted]LJ029

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PF-06463922 (continued)

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain /Model	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
Cardiovascular System ECG: RR-I, PR-I, QRS-I, QT-I, QTc-I HR Systemic Arterial BP: SBP, DBP, MBP Activity Echocardiography: FS	Dog/Beagle (JET[b])	Oral gavage, 5 mL/kg (HCl acidified water, pH 2.75) Lot PF-06463922-01-0003	0, 2, 15 (0, 1, 7.5 BID) mg/kg/day[c] (~3-week duration)	2M, 2F	**15 mg/kg/day:** ↑ HR Day 12 (+13 bpm; 12-22 HPD), Day 15 (+10 to +17 bpm; 1-22 HPD), Day 19 (+17 bpm; 1-6 HPD and +9 bpm; 12-22 HPD); ↓ SBP Days 12, 15, 19 (-10 to -22 mmHg; 1-22 HPD);↑ PR-I Day 8 (+9 msec; 1-6 HPD), Day 15 (+6 msec; 12-22 HPD); ↑ QRS-I Day 8 (+1 msec; 1-6 HPD), Day 19 (+3 msec; 1-6 HPD and +2 msec; 12-22 HPD); ↓ QT-I Day 19 (-16 msec; 1-6 HPD); ↑ FS Day 18 (+4%; 2-3 HPD) Following a 5-day recovery phase, cardiovascular effects observed during the dosing phase returned to baseline values, indicating complete recovery from lorlatinib-related effects. ↑ WBC, ↑ neutrophils, ↑ monocytes, ↓ basophils, ↑ ALT, ↑ AST, ↑ ALP, ↑ GLDH, ↑ cholesterol, ↑ lipase, ↑ BUN, ↑ creatinine	No	[redacted]LJ083

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: PF-06463922 (continued)

Cognitive Function Study ([redacted]GR137) Toxicokinetic Parameters:					
Dose (mg/kg)	0	0.3	3	10	30
C_{max} (ng/mL)	NA[d]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	7400
AUC_{24} (ng•h/mL)	NA[d]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	101000
T_{max} (hour)	NA[d]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	3.0
PF-06463922 Concentration (Day 1, 1 HPD)					
Plasma (ng/mL)	NA[d]	46.4	743	2580	7220
Brain (ng/g)	NA[d]	29.6	262	1140	4260[f]

Cognitive Function Study ([redacted]GR207) Toxicokinetic Parameters:			
Dose (mg/kg)	0	1	3
PF-06463922 Concentration (Day 1, 1 HPD)			
Plasma (ng/mL)	NA[d]	242	470
Brain (ng/g)	NA[d]	135	205

Cardiovascular Study ([redacted]LJ083) Toxicokinetic Parameters:			
Dose (mg/kg)	0	2 (Day 4)	15 (Day 11)
C_{max} (ng/mL)	NA[g]	236	1810
AUC_{24} (ng•h/mL)	NA[g]	3100	23300
T_{max} (hour)	NA[g]	6.25	2.75

ALP = Alkaline phosphatase; ALT = Alanine aminotransferase; AST = Aspartate aminotransferase; AUC_{24} = Area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours; BID = Twice per day; BP = Blood pressure; bpm = Beats per minute; BUN = Blood urea nitrogen; C_{max} = Maximum observed concentration; DBP = Diastolic BP; ECG = Electrocardiogram; F = Female; FS = Fractional shortening; GLDH = Glutamate dehydrogenase; GLP = Good Laboratory Practice; HCl = Hydrochloride; HPD = Hours postdose; HR = Heart rate; I = Interval; JET = Jacketed external telemetry; M = Male; MBP = Mean BP; mpd = Minutes postdose; MV = Minute Volume; NA = Not applicable; QTc = Corrected QT interval; RR = Respiratory Rate; SBP = Systolic BP; Tmax = Time to reach peak (maximum) concentration following drug administration; TV = Tidal Volume; WBC = White blood cells.

a. Single dose unless specified otherwise.

b. Blood pressure and heart rate were collected over a 24-hour period on Days -1 (predose), 1, 5, 8, 12, 15, 19, and 25 (recovery) with ECG collection included on Days -1, 5, 8, 12, 19, and 25.

c. Animals (2/sex/group) were administered vehicle or 2 mg/kg/day lorlatinib on Days 1 to 5. Following a 2-day washout period (Days 6 and 7), the same animals were administered vehicle or 15 mg/kg/day lorlatinib on Days 8 to 19.

d. Samples not collected.

e. Per protocol, samples only collected at the 1-hour time point; therefore, toxicokinetic evaluation could not be performed.

f. At 24 HPD on Day 1, mean brain lorlatinib concentration was 509 ng/g.

g. Samples collected but not analyzed for plasma lorlatinib concentrations.