目次

1. 緒言 5
2. 参考文献一覧 7

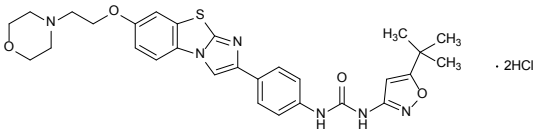
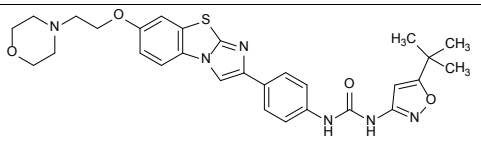
図一覧

図 2.6.1-1　キザルチニブの構造式 5

略語一覧

略語	略していない表現（英）	略していない表現（日）
AML	acute myeloid leukemia	急性骨髄性白血病
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3	FMS 様チロシンキナーゼ 3
ITD	internal tandem duplication	遺伝子内縦列重複
RTK	receptor tyrosine kinase	受容体型チロシンキナーゼ

化合物一覧

一般名	化学名	構造式
キザルチニブ塩酸塩	1-(5-*tert*-Butyl-1,2-oxazol-3-yl)-3-(4-{7-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]imidazo[2,1-*b*][1,3]benzothiazol-2-yl}phenyl)urea dihydrochloride	
キザルチニブ	1-(5-*tert*-Butyl-1,2-oxazol-3-yl)-3-(4-{7-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]imidazo[2,1-*b*][1,3]benzothiazol-2-yl}phenyl)urea	

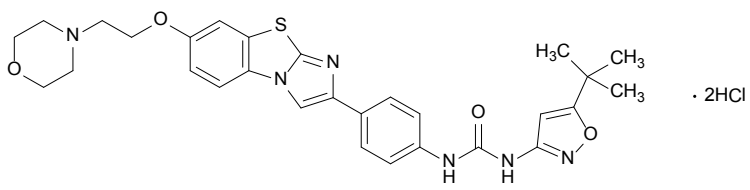
1. 緒言

本緒言には、キザルチニブの基本的な薬理学的特性、開発の根拠、及び化学構造の簡潔な概要を示す。製品開発の根拠の詳細は 2.5.1 に示す。

キザルチニブは、FMS 様チロシンキナーゼ 3（FMS-like tyrosine kinase 3: FLT3）に対して強力かつ選択的な阻害作用を示す新規かつ第二世代のクラス III の受容体型チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase: RTK）阻害薬である。キザルチニブは、Ambit Biosciences 社が独自に創薬し、第一三共株式会社が現在開発中である。

キザルチニブ塩酸塩は白色～類白色の結晶性粉末であり、分子式は $C_{29}H_{32}N_6O_4S \cdot 2HCl$、塩酸塩及びフリー体の分子量はそれぞれ 633.59 及び 560.67 である。化学構造を図 2.6.1-1 に示す。

図 2.6.1-1　キザルチニブの構造式



RTK を介するシグナル伝達は、疾患において調節異常が認められることが多い。FLT3 は、二分されたキナーゼ領域を有するクラス III の RTK ファミリーに属する膜貫通チロシンキナーゼである。FLT3 は主として幼若な造血前駆細胞に発現するほか、一部の成熟した骨髄系細胞及びリンパ球にも発現する [1,2,3]。FLT3 リガンドが結合すると活性化し、これにより受容体が二量体を形成し、キナーゼ活性亢進と Stat5、Ras、PI3 キナーゼなどの下流シグナル伝達経路の活性化を引き起こす [4,5,6]。FLT3 は、特に他の RTK 及びサイトカイン受容体との相互作用により、造血前駆細胞の生存及び増殖に関わっている [7,8,9]。また、FLT3 は急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia: AML）細胞での発現が患者の約 90%で認められ、白血病性芽球の生存及び増殖を促す [10,11,12]。

FLT3 の変異は AML 患者の約 30%で認められる [13,14]。AML における変異には、主に、膜近傍領域の遺伝子内縦列重複（internal tandem duplication: ITD）（約 24%）及び活性化ループの変異（約 7%）の 2 種類がある [14]。FLT3 変異を有する患者は、野生型 FLT3 患者と比較して、従来の化学療法で治療したときの予後が不良である [15]。低分子の FLT3 阻害薬を用いた初期の試験では、従来の AML の各種治療法にこれらの化合物を追加したところ、変異型 FLT3 を有する患者に有意な臨床的ベネフィットがあると考えられ、有望な結果が得られた [16]。

キザルチニブは、AML を含む FLT3 依存性の悪性腫瘍において in vitro 及び in vivo で強力な活性を示す第二世代のクラス III の新規 RTK 阻害薬である。また、キザルチニブは FLT3 選択性が高く、他のクラス III の RTK（KIT、CSF1R、及び PDGFRα/β）及び RET への親和性を示す（2.6.2）。

マウス、ラット、イヌ、及びサルを用いた薬物動態の検討（2.6.4）では、キザルチニブの全身曝露(最高血漿中濃度及び血漿中濃度－時間曲線下面積)及びクリアランスが確認され、選択した臨床用量及び投与間隔の妥当性がさらに裏付けられた。

キザルチニブの非臨床毒性試験では、ラット、イヌ、及びサルでの無毒性量が確認されたほか、認められた毒性が回復性を示すことが明らかになった（2.6.6）。また、げっ歯類及び非げっ歯類で認められた両化合物の標的臓器毒性（骨髄毒性を除く）の程度又は重篤度が軽度かつ可逆的であったことから、進行がん患者にキザルチニブを長期連日投与することは、非臨床データから妥当と判断した（2.4）。

キザルチニブは現在、AML、特に FLT3 受容体活性化変異陽性の AML の治療薬として開発中である。キザルチニブの適応は、再発又は難治性の FLT3-ITD 変異陽性の AML 患者の治療を目的とする単剤療法である。キザルチニブ特有の作用機序、並びに薬理、薬物動態、及び毒性の非臨床データから、FLT3 受容体活性化変異陽性 AML 患者の治療薬としてのキザルチニブの開発が妥当であることが示されている。

2. 参考文献一覧

1. Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, et al. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF-1R family. Oncogene. 1991;6:1641-50.
2. Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, et al. Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. Oncogene. 1993;8:909-18.
3. Rosnet O, Bühring HJ, de Lapeyrière O, et al. Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. Acta Haematol. 1996;95:218-23.
4. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, et al. Tandem-duplicated FLT3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. Oncogene. 2000;19:624-31.
5. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. FLT3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. Blood. 2000;96:3907-14.
6. Zhang S, Broxmeyer HE. p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human FLT3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in FLT3 ligand-stimulated hematopoietic cells. Biochem Biophys Res Commun. 1999;254:440-5.
7. Hudak S, Hunte B, Culpepper J, et al. FLT3/FLK2 ligand promotes the growth of murine stem cells and the expansion of colony-forming cells and spleen colony-forming units. Blood. 1995;85:2747-55.
8. Piacibello W, Fubini L, Sanavio F, et al. Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth;heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. Blood. 1995;86:4105-14.
9. Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, et al. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. Immunity. 1995;3:147-61.
10. Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, et al. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. Blood. 1996;87:1089-96.
11. Drexler HG. Expression of FLT3 Receptor and Response to FLT3 Ligand by Leukemic Cells. Leukemia. 1996;10:588-99.
12. Stacchini A, Fubini L, Severino A, et al. Expression of type III receptor tyrosine kinases FLT3 and KIT and responses to their ligands by acute myeloid leukemia blasts. Leukemia. 1996;10:1584-91.
13. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2013; 2013:220-6.
14. Gilliland G, Griffin JD. The Roles of FLT3 in Hematopoiesis and Leukemia. Blood 2002;100:1532-42.
15. Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients

entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. Blood. 2001;98(5):1312-20.

16. Levis M, Small D. FLT3 Tyrosine Kinase Inhibitors. Intl J Hematol. 2005;82:100-7.

目次

1. まとめ....7
2. 効力を裏付ける試験....11
2.1 キザルチニブの in vitro 薬理試験....11
2.1.1 キザルチニブの生化学的作用の強さ及び選択性（K_d 値）....11
2.1.2 AC886 の生化学的作用の強さ及び選択性（K_d 値）....11
2.1.3 細胞内 FLT3 活性に対するキザルチニブの阻害作用....12
2.1.4 白血病細胞に対するキザルチニブの増殖阻害作用....12
2.2 キザルチニブの in vivo 薬理試験....13
2.2.1 キザルチニブの薬力学解析....13
2.2.2 腫瘍異種移植モデルにおけるキザルチニブの有効性....14
2.2.3 播種性腫瘍移植モデルにおけるキザルチニブの有効性....15
3. 副次的薬理試験....17
3.1 In vitro 試験....17
3.1.1 キナーゼ以外に対するキザルチニブの生化学的作用の選択性....17
4. 安全性薬理試験....18
4.1 In vitro 試験....18
4.1.1 hERG を導入した HEK293 細胞の hERG カリウム電流に対するキザルチニブ及び AC886 の影響....18
4.1.2 イヌ分離心筋細胞及び I_{Ks} 発現 CHO 細胞のナトリウム（I_{Na}）、カリウム（I_{Ks}）、及びカルシウム（$I_{Ca\text{-}L}$）電流に対するキザルチニブ及び AC886 の影響....19
4.1.3 ウサギ心室組織の活動電位に対するキザルチニブ及び AC886 の影響....20
4.1.4 ウサギ摘出心臓の電気生理学的及び機械的パラメータに対するキザルチニブ及び AC886 の影響....21
4.1.5 HEK293 細胞に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対するキザルチニブ及び AC886 の影響....22
4.1.6 HEK293 細胞に発現させたクローン化 hKvLQT1/minK カリウムチャネルに対するキザルチニブ及び AC886 の影響....22
4.1.7 HEK293 細胞に発現させたクローン化ナトリウムチャネルに対するキザルチニブ及び AC886 の影響....23
4.1.8 HEK293 細胞に発現させたクローン化チャネルからの遅延ナトリウム電流に対するキザルチニブ及び AC886 の影響....24
4.1.9 CHO細胞に発現させたクローン化L型カルシウムチャネルに対するキザルチニブ及び AC886 の影響....24
4.2 In vivo 試験....25
4.2.1 カニクイザルの心血管系に対する影響....25

5. 薬力学的薬物相互作用.....27
6. 考察及び結論.....27
7. 参考文献一覧.....29

表一覧

表 2.6.2.1-1　薬理試験の概要: キザルチニブの効力を裏付ける試験 8
表 2.6.2.1-2　薬理試験の概要: キザルチニブの副次的薬理試験 8
表 2.6.2.1-3　薬理試験の概要: キザルチニブの安全性薬理試験 9
表 2.6.2.3-1　キナーゼ以外に対するキザルチニブの阻害活性 17
表 2.6.2.6-1　臨床用量であるキザルチニブ塩酸塩 60 mg（キザルチニブとして 53 mg）／日と、QT 延長に対する無作用量又は毒性用量での全身曝露量（Cmax）の比較に基づくキザルチニブ及び AC886 の曝露マージン 28

図一覧

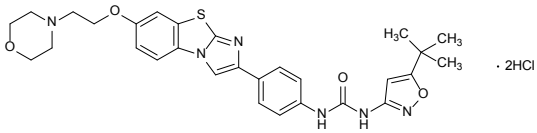
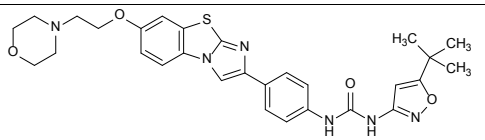
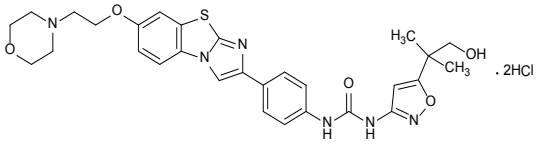
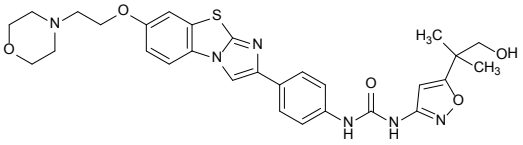
図 2.6.2.2-1　MV4-11 細胞内の FLT3-ITD の自己リン酸化に対する阻害作用 12
図 2.6.2.2-2　MV4-11 腫瘍の% p-FLT3 に対するキザルチニブ塩酸塩 10 mg/kg の作用 14
図 2.6.2.2-3　MV4-11 細胞を用いた腫瘍異種移植モデルにおけるキザルチニブ塩酸塩の有効性 15
図 2.6.2.2-4　MV4-11 細胞を用いた播種性腫瘍（白血病）モデルの生存期間に対するキザルチニブ塩酸塩の 31 日間投与又は継続投与の作用 16

略語一覧

略語	略していない表現（英）	略していない表現（日）
% p-FLT3	normalized p/tFLT3 ratio, calculated as 100 × (p/tFLT3 ratio) / (Vehicle 0.25 h p/tFLT3 ratio)	p/tFLT3 比の補正値 以下の数式を用いて算出: 100 ×（p/tFLT3 比）/（溶媒投与 0.25 時間後の p/tFLT3 比）
AML	acute myeloid leukemia	急性骨髄性白血病
APD_n	action potential duration at n% repolarization	n%再分極時活動電位持続期間
AUC_{0-a}	area under the plasma concentration-time curve up to time a	投与後 a までの血漿中濃度ー時間曲線下面積
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
Cmax	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	ダルベッコ改変イーグル培地
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
dLVP/dtmax	rate of contraction	収縮速度
dV/dt	maximal rate of depolarization	最大脱分極速度
FBS	fetal bovine serum	ウシ胎児血清
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3	FMS 様チロシンキナーゼ 3
HEK293	human embryonic kidney 293	ヒト胎児腎臓由来 293
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HPβCD	2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin	2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
I_{Ca-L}	L-type calcium currents	L 型カルシウム電流
I_{Kr}	rapidly activating component of delayed rectifier potassium currents	急速活性型遅延整流カリウム電流
I_{Ks}	slowly activating component of delayed rectifier potassium currents	緩徐活性型遅延整流カリウム電流
I_{Na}	sodium currents	ナトリウム電流
$I_{Na,L}$	late sodium currents	遅延ナトリウム電流
ILS	increased life span	延命効果
ITD	internal tandem duplication	遺伝子内縦列重複
K_d	dissociation constant	解離定数
LVP	left ventricular pressure	左室圧
MAP	monophasic action potential	単相性活動電位
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt	ー
MTV	median tumor volume	腫瘍体積中央値
MV4-11	human leukemia cell line (homozygous for the FLT3 internal tandem duplication mutation)	ヒト白血病細胞株（FLT3 遺伝子内縦列重複変異のホモ接合体）
NOD/SCID	nonobese diabetic/severe combined immunodeficient	非肥満糖尿病／重症複合免疫不全
NOEL	no observed effect level	無作用量
p-FLT3	phosphorylated FLT3	リン酸化 FLT3
p/tFLT3 比	ratio of p-FLT3 to total FLT3	総 FLT3 に対する p-FLT3 の比
PR	partial regression	部分退縮
RS4;11	human leukemia cell line (acute lymphoblastic leukemia) that expresses wild-type FLT3	野生型 FLT3 を発現するヒト白血病（急性リンパ性白血病）細胞株
RTK	receptor tyrosine kinase	受容体型チロシンキナーゼ
SCID	severe combined immunodeficient	重症複合免疫不全
Tmax	time to reach maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
$T_{1/2}$	terminal elimination half-life	終末相の消失半減期
Vmax	amplitude of the action potential	活動電位振幅
Vrest	resting membrane potential	静止膜電位

ー: 該当する表記なし

化合物一覧

一般名	化学名	構造式
キザルチニブ塩酸塩	1-(5-*tert*-Butyl-1,2-oxazol-3-yl)-3-(4-{7-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]imidazo[2,1-*b*][1,3]benzothiazol-2-yl}phenyl)urea dihydrochloride	
キザルチニブ	1-(5-*tert*-Butyl-1,2-oxazol-3-yl)-3-(4-{7-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]imidazo[2,1-*b*][1,3]benzothiazol-2-yl}phenyl)urea	
AC886 塩酸塩	1-[5-(1-Hydroxy-2-methylpropan-2-yl)-1,2-oxazol-3-yl]-3-(4-{7-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]imidazo[2,1-*b*][1,3]benzothiazol-2-yl}phenyl)urea dihydrochloride	
AC886	1-[5-(1-Hydroxy-2-methylpropan-2-yl)-1,2-oxazol-3-yl]-3-(4-{7-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]imidazo[2,1-*b*][1,3]benzothiazol-2-yl}phenyl)urea	

1. まとめ

キザルチニブの薬理試験プログラムの概要は、2.6.3.1 に示す。効力を裏付ける試験については、表 2.6.2.1-1 及び 2.6.3.2 に一覧を示すとともに、2 項で論じる。副次的薬理試験については、表 2.6.2.1-2 及び 2.6.3.3 に示すとともに、3 項で論じる。キザルチニブとその主要代謝物 AC886 の安全性薬理試験については、表 2.6.2.1-3 及び 2.6.3.4 に一覧を示すとともに、4 項で論じる。薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。本概要では、特記しない限り、投与量及び濃度はフリー体換算で表示する。

キザルチニブの薬効薬理は、in vitro アッセイ及び in vivo モデル系の両方で広範に評価した。無細胞系を用いた一連の in vitro 結合アッセイでは、クラス III の受容体型チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase: RTK）である FMS 様チロシンキナーゼ 3（FMS-like tyrosine kinase 3: FLT3）の阻害薬としてのキザルチニブの作用の強さ及び選択性が確認された。細胞系を用いたアッセイでは、MV4-11 細胞（FLT3-遺伝子内縦列重複［internal tandem duplication: ITD］変異を有するため FLT3 が活性化されているヒト白血病細胞株）の細胞内 FLT3 活性及び細胞増殖に対するキザルチニブの阻害作用が示された。

キザルチニブは FLT3 に対して強力かつ選択的な阻害作用を示し、生化学的な競合的結合アッセイでの解離定数（dissociation constant: K_d）は 1.3 nM であった。キザルチニブは FLT3 に対し最も高い親和性で結合し、KIT にはそれよりも低い親和性で結合した。他のいくつかのクラス III の RTK 及び RET にも、FLT3 に対する K_d の約 10 倍以内の親和性で結合するが、その他のキナーゼには高い親和性では結合しない。In vitro での AC886 の作用の強さ及び選択性プロファイルは、キザルチニブと極めて類似している。

キザルチニブは、細胞内 FLT3-ITD キナーゼの活性を阻害することが示されている。MV4-11 細胞での FLT3-ITD の自己リン酸化活性は、キザルチニブの濃度範囲 0.8～20 nM で著しく阻害された。キザルチニブは、MV4-11 細胞の FLT3 依存性の細胞増殖も阻害し、50%阻害濃度（50% inhibitory concentration: IC_{50}）は 0.3 nM であった。

薬力学的試験では、MV4-11 細胞を用いた固形腫瘍移植マウスモデルにおいて、キザルチニブ投与により、腫瘍溶解液中のリン酸化 FLT3（phosphorylated FLT3: p-FLT3）レベルが低下した。固形腫瘍異種移植及び液性腫瘍／播種性腫瘍移植（すなわち、白血病）のマウスモデルにおいて、キザルチニブの in vivo 抗腫瘍作用を評価した。これらの試験では、マウスに MV4-11 細胞を皮下移植及び静脈内接種することにより、それぞれ固形腫瘍及び播種性腫瘍を形成させた。腫瘍の形成後、キザルチニブ塩酸塩を 0.1～10 mg/kg の投与量で経口投与した。

キザルチニブは、MV4-11 細胞を用いたマウスモデルで強力な抗腫瘍作用を示した。抗腫瘍作用の大きさは、投与量の増加及び投与期間の延長により増大した。

MV4-11 細胞を用いた固形腫瘍モデルでは、キザルチニブ投与により、腫瘍増殖が著明に阻害された。キザルチニブ塩酸塩を 1 mg/kg で投与後、腫瘍増殖が著しく遅延し、反復投与又はより高用量（3～10 mg/kg）の投与後には、腫瘍増殖がさらに大きく遅延した。低用量 1 mg/kg の 1 日 1 回群でも、腫瘍の退縮が認められた。

液性腫瘍／播種性腫瘍移植モデルでは、MV4-11 細胞の静脈内接種により骨髄浸潤性の播種性腫瘍が形成された。キザルチニブ投与により、用量依存的な延命作用が得られた。キザルチニブ塩酸塩の 1 mg/kg 1 日 1 回 31 日間投与では、55%の延命効果（increased life span: ILS）が得られ、投与量の増加及び投与期間の延長により延命作用が増大した。

表 2.6.2.1-1　薬理試験の概要: キザルチニブの効力を裏付ける試験

試験	試験系	投与経路	添付資料番号
キザルチニブの競合的結合アッセイ	T7 ファージ株（宿主大腸菌［BL21 株］で作製）又は HEK-293 細胞に発現させた 441 種のキナーゼ	In vitro	4.2.1.1-1
AC886 の競合的結合アッセイ	T7 ファージ株（宿主大腸菌［BL21 株］で作製）又は HEK-293 細胞に発現させた 391 種のキナーゼ	In vitro	4.2.1.1-2
キナーゼの活性に対するキザルチニブの阻害作用	FLT3-ITD 変異陽性の MV4-11 細胞	In vitro	4.2.1.1-3
細胞増殖に対するキザルチニブの阻害作用	FLT3-ITD 変異陽性の MV4-11 細胞	In vitro	4.2.1.1-4
キザルチニブの薬力学解析	MV4-11 腫瘍細胞を異種移植した雌 C.B-17-SCID マウス	強制経口	4.2.1.1-5
腫瘍異種移植モデルにおけるキザルチニブの有効性	MV4-11 細胞を皮下固形腫瘍として増殖させた雌無胸腺ヌードマウス	強制経口	4.2.1.1-6
播種性腫瘍移植モデルにおけるキザルチニブの有効性	MV4-11 細胞を骨髄に播種させた雌 NOD/SCID マウス	強制経口	4.2.1.1-7

HEK: ヒト胎児腎臓由来、ITD: 遺伝子内縦列重複、NOD: 非肥満糖尿病、SCID: 重症複合免疫不全

キザルチニブの副次的薬理作用を、in vitro 試験系で評価した。キナーゼ以外の標的（ヒト、ブタ、ウサギ、ラット、及びその他の動物種由来の酵素、受容体、チャネル、及びトランスポーター［計 118 種］）に対する in vitro 選択性の評価では、キザルチニブはクラス III の RTK ファミリー以外に対する活性が極めて低く、高い選択性を特徴とした。

表 2.6.2.1-2　薬理試験の概要: キザルチニブの副次的薬理試験

試験	試験系	投与経路	添付資料番号
キナーゼ以外に対するキザルチニブの選択性の生化学的アッセイ	ヒト、ブタ、ウサギ、ラット、及びその他の動物種由来の酵素、受容体、チャネル、及びトランスポーター（計 118 種）	In vitro	4.2.1.2-1

キザルチニブの安全性薬理試験は in vitro 及び in vivo 試験系を用いて評価した。In vitro 試験として、ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（human ether-à-go-go-related gene: hERG）チャネル電流（hERG を導入したヒト胎児腎臓由来 293［human embryonic kidney 293: HEK293］細胞を使用）、活動電位（ウサギ心室組織を使用）、種々のイオンチャネル電流（ナトリウム電流［sodium currents: I_{Na}］、緩徐活性型遅延整流カリウム電流［slowly activating component of delayed rectifier potassium currents: I_{Ks}］及び L 型カルシウム電流［L-type calcium currents: $I_{Ca\text{-}L}$］）

（イヌ心筋細胞又は I_{Ks} 発現チャイニーズハムスター卵巣［Chinese hamster ovary: CHO］細胞を使用）、並びに心臓の電気生理学的及び機械的パラメータに対する作用に関する試験（ウサギ摘出心臓を使用）を開発初期に実施した。しかし、上記の in vitro 試験で評価したキザルチニブ及び AC886 の濃度範囲（1～30 µM）は以下に示すように高い濃度と考えられた。臨床推奨用量であるキザルチニブ塩酸塩 60 mg（キザルチニブとして 53 mg）のヒトにおける最高血漿中濃度（maximum plasma concentration: Cmax）はキザルチニブが 487 ng/mL（0.9 µM：分子量 560.67 をもとに算出）及び AC886 が 192 ng/mL（0.3 µM：分子量 576.67 をもとに算出）であった（添付資料番号：5.3.5.2-2）。キザルチニブ及び AC886 ともに高いタンパク結合率（≥99%）のため、非結合型薬物の Cmax はそれぞれ約 1%と推定され、上記の 4 つの in vitro 安全性薬理試験で用いた 1～30 µM の濃度範囲はヒトにおける非結合型薬物の Cmax の 100～10,000 倍高い濃度であった。さらに、検体液の濃度の実測値は設定濃度より 20%以上低値であった。また、分離したイヌ心筋細胞を用いて I_{Na} 及び $I_{Ca\text{-}L}$ に対する作用を評価した。これらを踏まえ、より適切な濃度範囲及び細胞を用いて、hERG 電流、I_{Ks}、I_{Na}、遅延ナトリウム電流（late sodium currents: $I_{Na,L}$）、及び $I_{Ca\text{-}L}$ に対するイオンチャネルアッセイを、ヒト遺伝子を導入した培養細胞を用いて 0.1～3 µM の濃度範囲で追加実施した。さらに、カニクイザルを用いた in vivo 心血管系テレメトリー試験を実施した。

表 2.6.2.1-3　薬理試験の概要: キザルチニブの安全性薬理試験

試験	試験系	投与経路	添付資料番号
hERG 電流 [a]	HEK293 細胞	In vitro	4.2.1.3-1
	HEK293 細胞	In vitro	4.2.1.3-5
心筋活動電位 [a]	ニュージーランドホワイト（New Zealand White: NZW）ウサギ（心室組織）	In vitro	4.2.1.3-3
ナトリウム（I_{Na}）、カリウム（I_{Ks}）、及びカルシウム（$I_{Ca\text{-}L}$）電流 [a]	ビーグル犬（分離心筋細胞）又は I_{Ks} 発現 CHO 細胞	In vitro	4.2.1.3-2
カリウム（I_{Ks}）電流 [a]	HEK293 細胞	In vitro	4.2.1.3-6
ナトリウム（I_{Na}）電流 [a]	HEK293 細胞	In vitro	4.2.1.3-7
遅発性ナトリウム（$I_{Na,L}$）電流 [a]	HEK293 細胞	In vitro	4.2.1.3-8
カルシウム（$I_{Ca\text{-}L}$）電流 [a]	CHO 細胞	In vitro	4.2.1.3-9
心臓の電気生理学的及び機械的パラメータ [a]	NZW ウサギ（摘出心臓）	In vitro	4.2.1.3-4
心血管系 [a]	カニクイザル	強制経口	4.2.1.3-10

CHO: チャイニーズハムスター卵巣、HEK: ヒト胎児腎臓由来、hERG: ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
a: 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice: GLP）遵守試験。

心血管系安全性薬理試験では、キザルチニブは 30 µM までの濃度で、hERG、I_{Na}、$I_{Ca\text{-}L}$ 電流、及びウサギ心室組織の活動電位に有意な影響を及ぼさなかった。一方、I_{Ks} 阻害率は最大 37%であり、阻害率は 1 µM でプラトーに達した。これに対し、AC886 は、hERG 電流に対して濃度非依存性の阻害作用を示すとともに（最大阻害率 36.5%）、ウサギ心室組織の活動電位持続時間を延長させた。AC886 は、10 及び 30 µM で $I_{Ca\text{-}L}$ を統計学的に有意に阻害し、阻害

率はそれぞれ 23.6%及び 17.3%であった。AC886 は、濃度範囲 1～30 μM で I_{Ks} を阻害し、阻害率は 29%でプラトーに達し、I_{Na} を濃度依存的に阻害した（IC_{50}: 24.4 μM）。ウサギ摘出心臓では、キザルチニブ及び AC886 は 3 μM 以上の濃度で、心室の再分極パラメータを濃度依存的に延長させた。追加の in vitro 試験では、キザルチニブ及び AC886 ともに hERG 電流及び I_{Ks} を阻害した。3 μM のキザルチニブ及び AC886 は、hERG 電流を統計学的有意にそれぞれ 16.4%及び 12.0%阻害した。I_{Ks} に対しては、キザルチニブは 0.1～2.9 μM の濃度範囲で評価した結果、2.9 μM で最大 67.5%阻害し、AC886 も 0.3～2.9 μM の濃度範囲で評価した結果、2.9 μM で最大 26.9%阻害した。キザルチニブ及び AC886 ともに I_{Na}、$I_{Na,L}$、及び $I_{Ca\text{-}L}$ に対する影響は最高濃度まで認められなかった。これらから、キザルチニブ及び AC886 は hERG 電流と I_{Ks} を阻害し、ネット再分極電流の減少により QT 間隔の延長を惹起することが示唆された。I_{Ks} に対する作用は hERG 電流に対するよりも顕著であった。サルでは、キザルチニブの経口投与により、10 mg/kg 以上の投与量で QTc が延長し、100 mg/kg 以上の投与量で体血圧が上昇した。

キザルチニブの中枢神経系（central nervous system: CNS）及び呼吸器系に対する安全性薬理試験は実施しなかった。ラット、イヌ、及びサルを用いた 13 週間反復投与毒性試験では、CNS 及び肺に対する影響はみられなかった（2.6.6.3）。

2. 効力を裏付ける試験

2.1 キザルチニブの in vitro 薬理試験

2.1.1 キザルチニブの生化学的作用の強さ及び選択性（K_d 値）

添付資料番号：4.2.1.1-1

KinomeScan™テクノロジー（生化学的な競合的結合アッセイ）を用いて、広範なキナーゼ（441 種類）に対するキザルチニブ（クラス III の RTK 阻害薬）の生化学的作用の強さ及び選択性を評価した。本アッセイでは、キナーゼと、固相化された既知の ATP 部位結合リガンドの間の相互作用に対する被験物質の競合的な阻害作用を測定した。キナーゼは、T7 バクテリオファージ表面にコートタンパク質として発現させたか、HEK293 細胞株に発現させた。定量的ポリメラーゼ連鎖反応により、リガンドに結合している DNA タグ標識キナーゼを検出した。キザルチニブを 3 倍系列希釈により 11 濃度ポイントに調製し、各キナーゼ（441 種類）に対する K_d を求めた。

キザルチニブは FLT3 に対し最も高い親和性で結合し（K_d = 1.3 nM）、KIT にはそれよりも低い親和性で結合した（K_d = 4.9 nM）。他のいくつかのクラス III の RTK（CSF1R/FMS［K_d = 9.6 nM］、PDGFRα［K_d = 14 nM］、PDGFRβ［K_d = 8.4 nM］）及びクラス III ではない RTK である RET（K_d = 7.1 nM）にも結合した。評価した 441 種類のキナーゼのうち、FLT1（K_d = 44 nM）、FLT4（K_d = 49 nM）、及び DDR1（K_d = 81 nM）もキザルチニブとの結合が確認されたほか、クラス III 以外の RTK のうち、10 種類がキザルチニブに中程度の親和性で結合し（K_d 値: 100～1000 nM）、31 種類がキザルチニブに弱く結合した（K_d 値: >1000 nM）。以上のように、この生化学的な結合アッセイでは、キザルチニブは特定のクラス III の RTK に対して高い親和性を示した。

2.1.2 AC886 の生化学的作用の強さ及び選択性（K_d 値）

添付資料番号：4.2.1.1-2

キザルチニブ（クラス III の RTK 阻害薬）の主要代謝物 AC886 の生化学的作用の強さ及び選択性も、KinomeScan テクノロジーを用いて評価した。使用した生化学的な競合的結合アッセイについては、2.1.1 項で説明している。

AC886 は FLT3 に対し最も高い親和性で結合し（K_d = 0.54 nM）、KIT にはそれよりも低い親和性で結合した（K_d = 0.97 nM）。他のいくつかのクラス III の RTK（CSF1R/FMS［K_d = 8.6 nM］、PDGFRα［K_d = 3.6 nM］、PDGFRβ［K_d = 1.8 nM］）及び RET（K_d = 14 nM）にも結合した。評価した 391 種類のキナーゼのうち、FLT1（K_d = 94 nM）及び FLT4（K_d = 69 nM）も AC886 との結合が確認されたほか、クラス III 以外の RTK のうち、5 種類が AC886 に中程度の親和性で結合し（K_d 値: 100～1000 nM）、31 種類が AC886 に弱く結合した（K_d 値: >1000 nM）。以上のように、この生化学的な結合アッセイでは、AC886 は特定のクラス III の RTK に対して高い親和性を示した。

2.1.3　細胞内 FLT3 活性に対するキザルチニブの阻害作用

添付資料番号：4.2.1.1-3

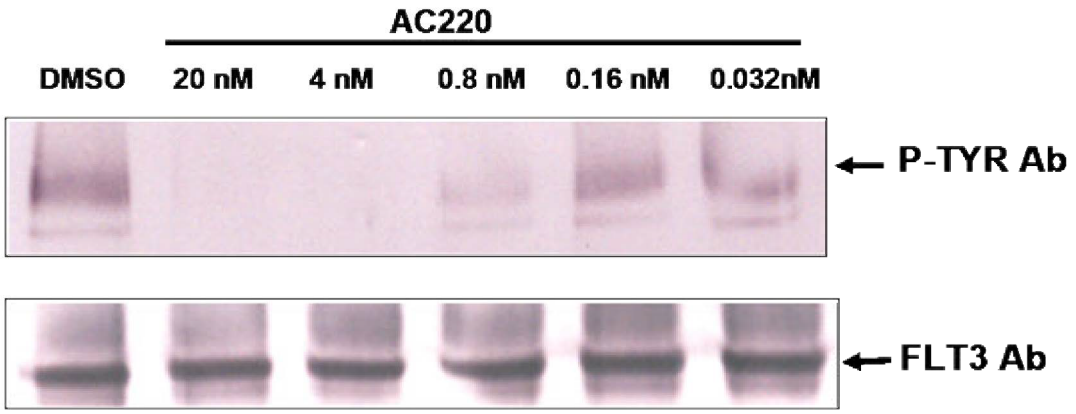
細胞内 FLT3 キナーゼの活性に対するキザルチニブの阻害作用は、キザルチニブ添加時におけるヒト白血病細胞 MV4-11 内の FLT3 の自己リン酸化の程度を測定することにより評価した。MV4-11 細胞は、急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia: AML）患者由来の細胞株であり、FLT3-ITD 変異（AML で最も高頻度にみられる FLT3 変異）陽性である [1]。

0.1%ウシ胎児血清（fetal bovine serum: FBS）含有のダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM）を培地とし、5 濃度（0.032～20 nM）のキザルチニブ存在下で、MV4-11 細胞を 37°C で 30 分間インキュベートした。ジメチルスルホキシド（dimethyl sulfoxide: DMSO）のみによる処理を陰性対照とした。キザルチニブへの曝露後、細胞内の FLT3 タンパクを免疫沈降させた。その後、総 FLT3 及び p-FLT3 をウエスタンブロット法により解析し、陰性対照（DMSO 処理）と比較した。

ウエスタンブロット解析では、キザルチニブは、MV4-11 細胞内で FLT3-ITD のキナーゼ活性（すなわち、自己リン酸化）を強力に阻害することが示された（図 2.6.2.2-1）。

本アッセイでのキザルチニブの作用の強さはウエスタンブロットの目視により評価したため、半定量的なデータであったものの、キザルチニブは、濃度 0.8～20 nM で FLT3 のリン酸化を著しく阻害することが明らかになった。

図 2.6.2.2-1　MV4-11 細胞内の FLT3-ITD の自己リン酸化に対する阻害作用



Ab: 抗体、AC220: キザルチニブ、DMSO: ジメチルスルホキシド、ITD: 遺伝子内縦列重複、P-TYR Ab: リン酸化チロシンに対する特異的抗体
上パネルには、リン酸化チロシンに対する特異的抗体を用いて検出したリン酸化 FLT3 を示す。下パネルには、FLT3 特異的抗体を用いて検出した総 FLT3 を示す。

2.1.4　白血病細胞に対するキザルチニブの増殖阻害作用

添付資料番号：4.2.1.1-4

白血病細胞株 MV4-11 の増殖に対するキザルチニブの阻害作用を評価した。対照として、RS4;11 細胞株（野生型 FLT3 を発現しており、FLT3 非依存性の増殖を示す白血病細胞株）の増殖に対する阻害作用も評価した。MV4-11 細胞及び RS4;11 細胞の増殖に対するキザルチニ

ブの IC_{50} 値を求めた。

0.5% FBS 含有 DMEM を培地として、MV4-11 細胞及び RS4;11 細胞をプレートに播種し、10 濃度（0.169～3 μM）のキザルチニブで 72 時間（MV4-11 細胞）又は 48 時間（RS4;11 細胞）処理した。細胞増殖は、テトラゾリウム化合物 MTS を用いた標準的な非放射性アッセイにより測定した。

キザルチニブは、MV4-11 細胞株の FLT3 依存性の細胞増殖を強力に阻害すること（IC_{50} = 0.3 nM）、また、対照細胞株（RS4;11 細胞株）の FLT3 非依存性細胞増殖に対する阻害活性は、MV4-11 細胞株に対する阻害活性より 1000 倍以上弱いこと（IC_{50} = 990 nM）が確認された。

2.2　キザルチニブの in vivo 薬理試験

この章においてキザルチニブの投与量は塩酸塩として表示する。

2.2.1　キザルチニブの薬力学解析

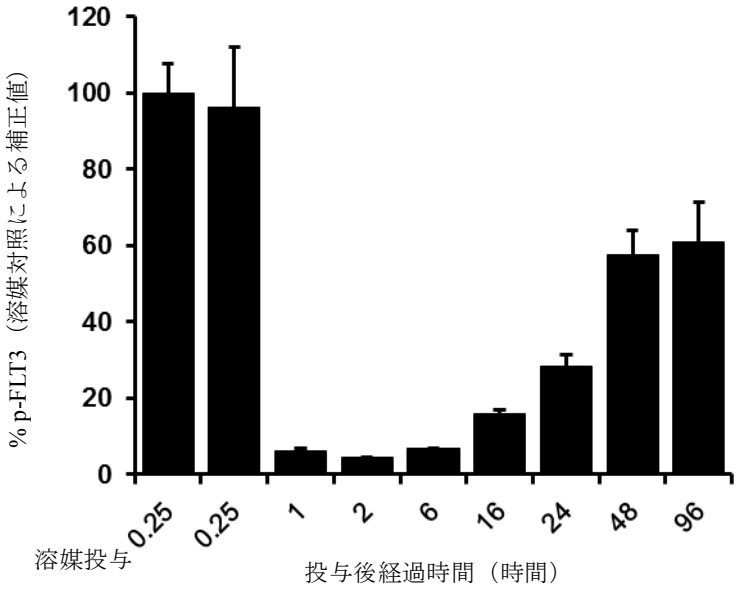
添付資料番号：4.2.1.1-5

MV4-11 細胞を用いた固形腫瘍移植マウスモデルを用いて、p-FLT3 発現量及び FLT3 タンパクの総発現量に対するキザルチニブ投与時の作用推移を評価した。雌 C.B-17-SCID マウスの皮下で MV4-11 細胞を固形腫瘍として増殖させた。腫瘍体積が約 150～350 mm^3 に達した時点でマウス 68 例を選択し、17 の投与群（各群 4 例）に無作為に割り付けた（腫瘍体積の群平均値は約 210～230 mm^3）。腫瘍採取の 96、48、24、16、6、2、1、及び 0.25 時間前に、溶媒（2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン［2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin: HPβCD］の 5%溶液）又はキザルチニブ塩酸塩 10 mg/kg を単回経口投与した（1 投与時点につき 4 例）。0 時間の時点で各群のマウスを解剖し、組織を採取した。

採取した腫瘍は FLT3 の解析に使用し、血漿検体はキザルチニブ及び AC886 の薬物動態解析に使用した。腫瘍溶解液中の p-FLT3 及び総 FLT3 タンパクは Meso Scale Discovery 社の解析法により測定し、総 FLT3 に対する p-FLT3 の比（ratio of p-FLT3 to total FLT3: p/tFLT3 比）を算出した後、溶媒投与 0.25 時間後の p/tFLT3 比で補正し、p/tFLT3 比の補正値（normalized p/tFLT3 ratio: % p-FLT3）を算出した。

溶媒投与群では、FLT3 のリン酸化率は一定に推移し、70%～126%の範囲であった。キザルチニブ塩酸塩 10 mg/kg の単回投与群では、FLT3 のリン酸化率が時間依存的に低下した（図 2.6.2.2-2）。最大の作用が認められたのは投与 1、2、及び 6 時間後であり、FLT3 のリン酸化率はそれぞれ 6%、4%、及び 7%であった。投与 48 及び 96 時間後には、FLT3 のリン酸化率が回復したものの、約 60%で頭打ちとなった。キザルチニブ及び AC886 の曝露量は、投与後 48 時間にわたり、腫瘍検体中と血漿検体中で同程度であった。

図 2.6.2.2-2　MV4-11 腫瘍の% p-FLT3 に対するキザルチニブ塩酸塩 10 mg/kg の作用



p-FLT3: リン酸化 FLT3、p/tFLT3 比: 総 FLT3 に対する p-FLT3 の比
% p-FLT3（溶媒対照による補正値）=（p/tFLT3 比）/（溶媒投与 0.25 時間後の p/tFLT3 比）× 100。各群 4 例。
データは平均値及び標準誤差で示す。

2.2.2　腫瘍異種移植モデルにおけるキザルチニブの有効性

添付資料番号：4.2.1.1-6

腫瘍増殖に対するキザルチニブの作用は、MV4-11 細胞を用いた腫瘍異種移植マウスモデルで評価した。雌無胸腺ヌードマウスの皮下で MV4-11 細胞を固形腫瘍として増殖させた。平均腫瘍体積が約 150～200 mm^3 に達した時点で、マウス 60 例を選択し、6 つの投与群（各群 10 例: 腫瘍体積の群平均値 160 mm^3）に層別化した。被験物質を以下のように 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。

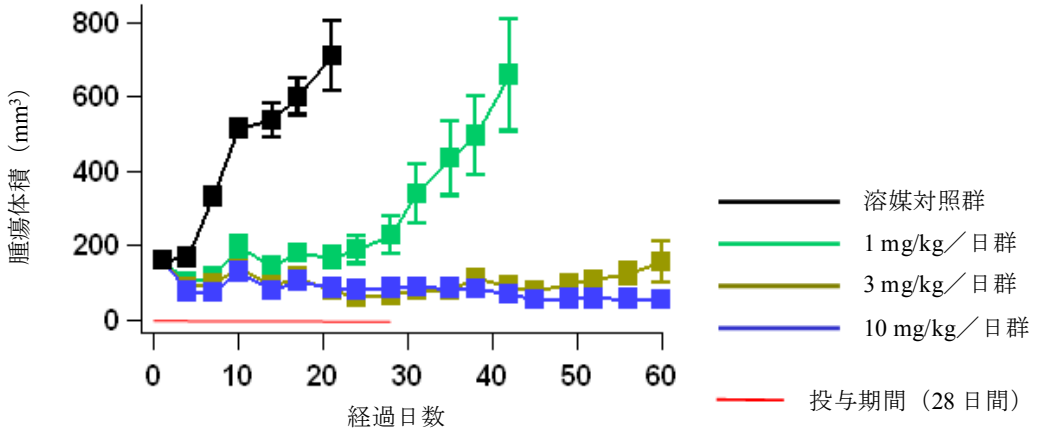
- 無投与
- キザルチニブ塩酸塩 1 mg/kg／日（22% HPβCD を溶媒とする）
- キザルチニブ塩酸塩 3 mg/kg／日（22% HPβCD を溶媒とする）
- キザルチニブ塩酸塩 10 mg/kg／日（22% HPβCD を溶媒とする）
- 22% HPβCD（溶媒対照）
- AB530 10 mg/kg／日（陽性対照）（F-101 を溶媒とする）

計 60 日間の試験期間中（28 日間の投与期間 ＋32 日間の投与中止後期間）、腫瘍体積を週 2 回測定した。腫瘍体積が 1000 mm^3 に達したマウスは、試験終了前に安楽死処置した。

キザルチニブは、本モデルで強力かつ用量依存的な抗腫瘍作用を示した（図 2.6.2.2-3）。1 mg/kg 1 日 1 回群で著しい作用が認められ、試験 60 日目における腫瘍体積中央値（median tumor volume: MTV）は 411 mm^3（生存マウス 4 例に基づく）、部分退縮（partial regression: PR）は 1 例であった。抗腫瘍作用は 3 mg/kg 1 日 1 回群でほぼ最大に達し、MTV は 63 mm^3（10

例に基づく）、PR は 7 例であった。10 mg/kg 1 日 1 回群で最大作用が認められた（MTV は 52 mm^3［10 例に基づく］、PR は 9 例）。10 mg/kg 1 日 1 回群では、投与中止後、32 日間の経過観察期間を通して腫瘍の再増殖はみられなかった。さらに、いずれの投与群でも、体重（群平均値）の減少をはじめとする毒性の徴候はみられなかった。

図 2.6.2.2-3　MV4-11 細胞を用いた腫瘍異種移植モデルにおけるキザルチニブ塩酸塩の有効性



各群 10 例。データは平均値及び標準誤差で示す。溶媒対照として 22% HPβCD を用いた。

2.2.3　播種性腫瘍移植モデルにおけるキザルチニブの有効性

添付資料番号：4.2.1.1-7

MV4-11 細胞を静脈内接種し骨髄に播種させた非肥満糖尿病／重症複合免疫不全（nonobese diabetic/severe combined immunodeficient: NOD/SCID）マウスでも、キザルチニブの活性を評価した。雌 NOD/SCID マウス 120 例に対し、シクロホスファミド 150 mg/kg を試験 4 及び 3 日前に 1 日 1 回腹腔内投与した。試験 0 日目に、MV4-11 細胞 5×10^6 個を側尾静脈から静脈内接種した。マウスを 12 群（各群 10 例）に層別化し、試験 23 日目に以下の投与を開始した。

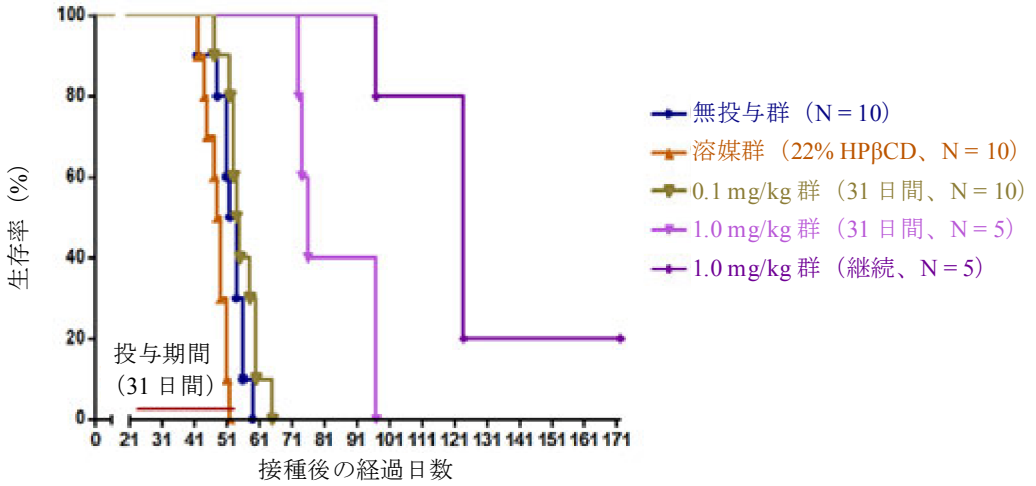
- 無投与
- 0.9%生理食塩水（溶媒）を 1 日 2 回 5 日間腹腔内投与
- 5-アザシチジン 0.125 mg/kg、0.25 mg/kg、又は 0.375 mg/kg を 1 日 2 回 5 日間腹腔内投与
- クラドリビン 2.5 mg/kg、10 mg/kg、又は 20 mg/kg を 1 日 2 回 5 日間腹腔内投与
- 22% HPβCD（溶媒）を 1 日 1 回 30 日間経口投与
- キザルチニブ塩酸塩 0.1 mg/kg（10 例）、1 mg/kg（5 例）、又は 10 mg/kg（5 例）を 1 日 1 回 31 日間、あるいは 1 mg/kg（5 例）又は 10 mg/kg（5 例）を 150 日間経口投与（150 日間投与は「継続投与」と表記）

5-アザシチジン（0.125 mg/kg、0.25 mg/kg、又は 0.375 mg/kg 1 日 2 回）の 1 サイクル投与は、延命作用を示さなかった。クラドリビン（10 又は 20 mg/kg 1 日 2 回）の 1 サイクル投与

は、生存期間中央値をわずかに延長した。

キザルチニブ投与群では、用量依存的な延命作用が認められた（図 2.6.2.2-4）。キザルチニブ塩酸塩 0.1 mg/kg、1 mg/kg 及び 10 mg/kg の 1 日 1 回 31 日間投与群では、溶媒群と比較して、それぞれ 12%、55%、及び 250%超の ILS が得られた。1 mg/kg 1 日 1 回の 150 日間継続投与群では、153%の ILS が得られ、31 日間投与群を大幅に上回る延命作用が得られた。10 mg/kg 1 日 1 回の継続投与群は、試験終了までに死亡率が 50%に達しなかったため、ILS は 250%超であった。

図 2.6.2.2-4　MV4-11 細胞を用いた播種性腫瘍（白血病）モデルの生存期間に対するキザルチニブ塩酸塩の 31 日間投与又は継続投与の作用



継続: 150 日間投与した群

3. 副次的薬理試験

3.1 In vitro 試験

3.1.1 キナーゼ以外に対するキザルチニブの生化学的作用の選択性

添付資料番号：4.2.1.2-1

キザルチニブが「キナーゼ以外」に目的外の活性を有する可能性を、生化学的アッセイにて評価した。一次スクリーニングでは、キナーゼ以外の広範な酵素、受容体、チャネル、及びトランスポーター（計 118 種）とともにキザルチニブ 10 μM をインキュベートした。一次スクリーニングでキザルチニブによる阻害率が 50%を超えた標的は 6 種であり、続いて、この 6 種に対するキザルチニブの IC_{50} を求めた。表 2.6.2.3-1 に、一次スクリーニングで得られた阻害率（%）、及びその後のアッセイで 5 段階の濃度（1～100 μM）を用いて求めた IC_{50} を示す。

評価したキナーゼ以外（118 種）の標的のうち、キザルチニブが 2 μM を下回る IC_{50} 値を示したものはなく、10 μM を下回る IC_{50} 値を示したものは 5 種のみであった。アッセイの結果、キザルチニブはキナーゼ以外の少数の標的に対し、弱い活性を示したにすぎず（主要な標的 FLT3 に対する活性と比較して 1000 倍以上弱かった）、FLT3 選択性の高い化合物であることが明らかになった。

表 2.6.2.3-1　キナーゼ以外に対するキザルチニブの阻害活性

アッセイ	阻害率（%） （10 μM）	IC_{50}（μM）
リポキシゲナーゼ（15-LO）	68	5.12
ペプチダーゼ（レニン）	67	10.3
プロスタノイド受容体（EP_4）	70	5.55
シグマ受容体（σ_1）	57	7.16
シグマ受容体（σ_2）	62	5.04
ナトリウムチャネル（site 2）	81	2.71

IC_{50}: 50%阻害濃度

4. 安全性薬理試験

4.1 In vitro 試験

開発初期にキザルチニブ及び AC886 に対して hERG 電流（4.1.1）、ナトリウム（I_{Na}）、カリウム（I_{Ks}）、及びカルシウム（I_{Ca-L}）電流（4.1.2）、ウサギ心室組織における心筋活動電位（4.1.3）、並びにウサギ摘出心臓を用いた心臓の電気生理学的及び機械的パラメータ（4.1.4）に対する作用に関する 4 種の in vitro 安全性薬理試験を高い濃度（1～30 μM）で実施した。臨床推奨用量であるキザルチニブ塩酸塩 60 mg（キザルチニブとして 53 mg）を投与したヒトの Cmax はキザルチニブが 487 ng/mL（0.9 μM：分子量 560.67 をもとに算出）及び AC886 が 192 ng/mL（0.3 μM：分子量 576.67 をもとに算出）であった（添付資料番号：5.3.5.2-2）。キザルチニブ及び AC886 は、ともに高いタンパク結合率（≥99%）を示すため、非結合型薬物の Cmax はそれぞれ約 1%と推定され、上記の 4 つの in vitro 安全性薬理試験で用いた 1～30 μM はヒトにおける非結合型薬物の Cmax の 100～10,000 倍高い濃度であった。さらに、検体液の実際の濃度は設定濃度より 20%以上低値であった。また、I_{Na} 及び I_{Ca-L} に対する作用の評価には分離したイヌ心筋細胞を用いた。これらを踏まえ、より適切な濃度範囲及び細胞を用いて、キザルチニブ及び AC886 の hERG 電流（4.1.5）、I_{Ks}（4.1.6）、I_{Na}（4.1.7）、$I_{Na,L}$（4.1.8）、及び I_{Ca-L}（4.1.9）に対する作用をそれぞれ hERG-HEK293 細胞、hKvLQT1/minK-HEK293 細胞、hNav1.5-HEK293 細胞、late hNav1.5-HEK293 細胞、及び hCav1,2-CHO 細胞を用いて追加検討した。

4.1.1 hERG を導入した HEK293 細胞の hERG カリウム電流に対するキザルチニブ及び AC886 の影響

添付資料番号：4.2.1.3-1

hERG を導入した HEK293 細胞を用いて、hERG 電流（急速活性型遅延整流カリウム電流［rapidly activating component of delayed rectifier potassium currents: I_{Kr}］）に対するキザルチニブ及び AC886 の影響を、ホールセルパッチクランプ法にて評価した。

最終濃度 1 μM、3 μM、10 μM、及び 30 μM のキザルチニブ塩酸塩（n = 7）又は AC886 塩酸塩（n = 7）に、HEK293 細胞を低濃度から順に曝露した（24 時間以上経過後に測定した濃度は、キザルチニブが 0.03 μM、0.07 μM、3.39 μM、及び 17.51 μM、AC886 が 0.14 μM、0.24 μM、2.76 μM、及び 22.78 μM であった）。濃度の目標値と実測値が一致しなかった原因を詳細に解析した結果、被験物質は調製の 8 時間後まで安定であることが示された。被験物質の調製後 6 時間以内に細胞を曝露した条件では、被験物質の消失率が 10%未満であることが確認された。しかし、本濃度測定のための輸送時間と分析時間によっては、細胞曝露時の実際の溶液中の被験物質濃度は適切に定量できないことがあった。被験物質の作用機序を検討するため、AC4915（n = 3）及び AC5195（n = 3）の 3 及び 30 μM を内部基準化合物として用いた。また、QT 延長作用を示すことが知られているキナーゼ阻害剤ニロチニブ（n = 3）を外部基準化合物とし、3 μM、10 μM、及び 15 μM で試験した。強力かつ選択的な I_{Kr} 阻害剤であるテルフェナジン 500 nM（n = 3）を、陽性対照とした。被験物質の各濃度に 5 分間曝露した後、hERG 電流を記録した。溶媒の影響及び電流の経時的減少（ランダウン）で、全データポイントを

補正した。

キザルチニブは濃度範囲 1～30 μM で、hERG 電流に統計学的に有意な影響を及ぼさなかった。AC886 は濃度範囲 1～30 μM で、hERG 電流に対して濃度非依存性かつ統計学的に有意な阻害作用を示した（最大阻害率 36.5%）。AC4915（30 μM）は hERG 電流を統計学的に有意に阻害した一方（阻害率 19.4%）、AC5195（3 及び 30 μM）は hERG 電流に統計学的に有意な影響を及ぼさなかった。ニロチニブ（3 μM、10 μM、及び 15 μM）は、hERG 電流を統計学的に有意に阻害した（最大阻害率 60%）。テルフェナジン 500 nM は、hERG 電流を統計学的に有意に阻害し（阻害率 91.9%）、本アッセイの感度が確認された。

以上の結果より、キザルチニブは 30 μM までの濃度で、hERG 電流に統計学的に有意な影響を及ぼさなかった。AC886 は濃度範囲 1～30 μM で、hERG 電流に対して濃度非依存性かつ統計学的に有意な阻害作用を示した（最大阻害率 36.5%）。

4.1.2　イヌ分離心筋細胞及び I_{Ks} 発現 CHO 細胞のナトリウム（I_{Na}）、カリウム（I_{Ks}）、及びカルシウム（I_{Ca-L}）電流に対するキザルチニブ及び AC886 の影響

添付資料番号：4.2.1.3-2

イヌ新鮮心室組織から分離した心筋細胞及びヒト KvLQT1/minK-CHO（I_{Ks} 発現 CHO）細胞を用いて、I_{Na}、I_{Ks}、及び I_{Ca-L} 電流に対するキザルチニブ及び AC886 の影響を、ホールセルパッチクランプ法にて評価した。濃度 1 μM、3 μM、10 μM、及び 30 μM のキザルチニブ塩酸塩（n = 7）又は AC886 塩酸塩（n = 7）に、これらの細胞を低濃度から順に曝露した（24 時間以上経過後に測定した濃度は、キザルチニブが 0（n/a）～0.07 μM、0.12～0.38 μM、3.12～5.92 μM、及び 19.70～22.89 μM、AC886 が 0（n/a）～0.15 μM、0.19～0.52 μM、2.06～4.65 μM、及び 17.24～22.26 μM であった）。濃度の目標値と実測値が一致しなかった原因を詳細に解析した結果、被験物質は調製の 8 時間後まで安定であることが示された。被験物質の調製後 6～7 時間以内に曝露した条件では、被験物質の消失率が 5%未満であることが確認された。しかし、本濃度測定のための輸送時間と分析時間によっては、細胞曝露時の実際の溶液中の被験物質濃度は適切に定量できないことがあった。各被験物質の作用機序を検討するため、AC4915（n = 3）及び AC5195（n = 3）の 3 及び 30 μM を内部基準化合物として用いた。また、ニロチニブ（n = 3 又は 4）を外部基準化合物とし、3 μM、10 μM、及び 15 μM で試験した。さらに、3 種の陽性対照（テトロドトキシン［選択的 I_{Na} 阻害剤］3 μM、クロマノール 293B［選択的 I_{Ks} 阻害剤］30 μM、及びニフェジピン［選択的 I_{Ca-L} 阻害剤］10 μM）を使用し、3 種の標的の感度を確認した。被験物質の各濃度に 5 分間曝露した後、各電流を記録した。溶媒の影響及び電流の経時的減少（ランダウン）で、全データポイントを補正した。

キザルチニブは、濃度範囲 1～30 μM で I_{Na} 及び I_{Ca-L} を阻害しなかったが、I_{Ks} 阻害率は最大 37%であり、阻害率は 1 μM でプラトーに達した。AC886 は、10 及び 30 μM で I_{Ca-L} を統計学的に有意に阻害し、阻害率はそれぞれ 23.6%及び 17.3%であった。AC886 は、濃度範囲 1～30 μM で I_{Ks} 阻害率が 29%でプラトーに達したほか、I_{Na} を濃度依存的に阻害した（IC_{50}: 24.4 μM）。AC4915 及び AC5195 はいずれも、3 及び 30 μM で、I_{Ca-L} 及び I_{Na} を統計学的に有

意に阻害しなかった。AC5195 は、30 μM で I_{Ks} を統計学的に有意に阻害した一方（阻害率 23.4%）、AC4915 は I_{Ks} に影響を及ぼさなかった。ニロチニブ（3 μM、10 μM、及び 15 μM）は、$I_{Ca\text{-}L}$ 及び I_{Ks} に影響を及ぼさなかった一方、15 μM で I_{Na} を統計学的に有意に阻害した（阻害率 42.9%）。3 種の陽性対照により各電流が阻害され、本アッセイの感度が確認された。

4.1.3　ウサギ心室組織の活動電位に対するキザルチニブ及び AC886 の影響

添付資料番号：4.2.1.3-3

ニュージーランドホワイトウサギ心臓から分離した心室組織の活動電位の挙動及び振幅に対するキザルチニブ及び AC886 の影響を、高インピーダンス微小電極を用いた細胞内記録法にて評価した。濃度 1 μM、3 μM、10 μM、及び 30 μM のキザルチニブ塩酸塩（n = 5）又は AC886 塩酸塩（n = 5）に、心室組織を低濃度から順に曝露した（24 時間以上経過後に測定した濃度は、キザルチニブが 0.20 μM、0.78 μM、4.16 μM、及び 20.14 μM、AC886 が 0.23 μM、1.35 μM、5.25 μM、及び 21.09 μM）。濃度の目標値と実測値が一致しなかった原因を詳細に解析した結果、被験物質は調製の 8 時間後まで安定であることが示された。被験物質の調製後 7 時間以内に組織を曝露した条件では、被験物質の消失率が 10%未満であることが確認された。しかし、本濃度測定のための輸送時間と分析時間によっては、細胞曝露時の実際の溶液中の被験物質濃度は適切に定量できないことがあった。各被験物質の作用機序を検討するため、AC4915（n = 3）及び AC5195（n = 3）の 3 及び 30 μM を内部基準化合物として用いた。また、ニロチニブ（n = 3）を外部基準化合物とし、3 μM、10 μM、及び 15 μM で試験した。テルフェナジン 500 nM（n = 3）を、陽性対照とした。被験物質の各濃度に 10 分間曝露した後、活動電位を記録した。評価したパラメータは、静止膜電位（Vrest）、最大脱分極速度（dV/dt）、活動電位振幅（Vmax）、30%再分極時活動電位持続期間（action potential duration at 30% repolarization: APD_{30}）、APD_{60}、APD_{90}、及び APD_{30} と APD_{90} の差（活動電位波形の三角形化のパラメータ、$APD_{90\text{-}30}$）であった。いずれのパラメータも、被験物質への曝露前に求めたベースライン値で補正した。

キザルチニブは、濃度範囲 1～30 μM で活動電位パラメータに統計学的に有意な影響を及ぼさなかった。AC886 は、濃度範囲 1～30 μM で APD_{30} に影響を及ぼさなかったが、APD_{90} 及び $APD_{90\text{-}30}$ を延長させた。AC4915 は、3 及び 30 μM で活動電位波形の三角形化を引き起こす傾向にあり、APD_{30} を短縮させた一方、AC5195 は、3 及び 30 μM で活動電位を変化させなかった。ニロチニブは活動電位を変化させなかった。テルフェナジンは APD_{90} を延長させ、本アッセイの感度が確認された。

以上の結果より、キザルチニブは、30 μM までの濃度で活動電位パラメータに統計学的に有意な影響を及ぼさなかった。AC886 は、濃度範囲 1～30 μM で APD_{30} に影響を及ぼさなかったが、APD_{90} 及び $APD_{90\text{-}30}$ を延長させた。

4.1.4　ウサギ摘出心臓の電気生理学的及び機械的パラメータに対するキザルチニブ及び AC886 の影響

添付資料番号：4.2.1.3-4

ニュージーランドホワイトウサギからの摘出心標本を用いたランゲンドルフ試験にて、心臓の電気生理学的パラメータ（単相性活動電位［monophasic action potential: MAP］、QT、QRS、RR、PR、及び QTc 間隔［Van de Water の補正式を用いて心拍数で補正された QT 間隔］）及び機械的パラメータ（左室圧［left ventricular pressure: LVP］及び収縮速度［rate of contraction: dLVP/dtmax］）に対するキザルチニブ及び AC886 の影響を評価した。

濃度 1 μM、3 μM、10 μM、及び 30 μM のキザルチニブ塩酸塩（n = 5）又は AC886 塩酸塩（n = 5）に、摘出心臓を低濃度から順に曝露した（24 時間以上経過後に測定した濃度は、キザルチニブが 0.02 μM、0.93 μM、5.62 μM、及び 21.42 μM、AC886 が 0.16 μM、0.47 μM、5.05 μM、及び 22.19 μM）。濃度の目標値と実測値が一致しなかった原因を詳細に解析した結果、被験物質は調製の 8 時間後まで安定であることが示された。被験物質の調製後 1 時間以内にウサギ摘出心臓を曝露した条件では、被験物質の消失率が 10%未満であることが確認された。しかし、本濃度測定のための輸送時間と分析時間によっては、細胞曝露時の実際の溶液中の被験物質濃度は適切に定量できないことがあった。各被験物質の作用機序を検討するため、AC4915（n = 3）及び AC5195（n = 3）の 3 及び 30 μM を内部基準化合物として用いた。また、ニロチニブ（n = 3）を外部基準化合物とし、3 μM、10 μM、及び 15 μM で試験した。ベラパミル 1 μM とテルフェナジン 500 nM の併用（陰性変力作用を示す処理条件）を陽性対照として、本アッセイの感度を確認した。溶媒（0.015%～0.5% DMSO）を陰性対照とした。被験物質の各濃度に 10 分間曝露し、曝露時間中の電気生理学的及び機械的パラメータを記録した。各条件への曝露終了前 1 分以内に発生した 3 回の心拍について、これらのパラメータを測定し、各条件における全心臓の測定値を平均した。ベースラインからの変化量は、ベースライン平均値から被験物質存在下での平均値を減じることにより集計した。ベースラインからの変化量の算出には、全心臓のベースライン値の平均でなく、個々の心臓で求めたベースライン平均値を使用した。

キザルチニブ及び AC886 はいずれも、濃度範囲 1～30 μM で MAP、RR、PR、及び QT 間隔を延長させた。統計学的に有意な延長作用を示したキザルチニブ濃度は、RR 及び PR 間隔に対しては 10 μM 以上、QT 間隔に対しては 3 μM 以上、MAP に対しては 1 μM 以上であった。RR、PR、及び QT 間隔、並びに MAP に対し統計学的に有意な延長作用を示した AC886 濃度は、それぞれ 10 μM 以上、1 μM 以上、3 μM 以上、及び 30 μM であった。両被験物質のウォッシュアウト後、QT 間隔及び MAP の延長は回復しなかった。一方、RR 及び PR 間隔はウォッシュアウト後も延長し続けた。3 μM 以上のキザルチニブ及び 10 μM 以上の AC886 による QT 延長は、ウォッシュアウト後も統計学的に有意であった。キザルチニブ及び AC886 は、dLVP/dtmax も低下させたが、LVP に有意な影響を及ぼさなかった。AC4915 は、30 μM で PR 間隔を統計学的に有意に延長させた。AC4915 及び AC5195 は、その他のパラメータを統計学的に有意に変化させなかった。ニロチニブは MAP、RR、及び QT 間隔を延長させ、

hERGチャネルへの親和性が確認された。ニロチニブはQRS及びPR間隔に影響を及ぼさず、機械的パラメータを変化させなかった。

4.1.5　HEK293細胞に発現させたクローン化hERGカリウムチャネルに対するキザルチニブ及びAC886の影響

添付資料番号：4.2.1.3-5

hERG遺伝子を導入したHEK293細胞を用いて、キザルチニブ及びAC886のhERG電流に及ぼす影響をパッチクランプ法により追加検討した。HEK293細胞に0.1 μM、0.3 μM、1 μM、及び3 μMのキザルチニブ塩酸塩あるいはAC886塩酸塩を低濃度から順に曝露した。陽性対照としてテルフェナジン（n = 2）を用いた。

キザルチニブはhERG電流を0.1 μMで1.8% ± 1.6%（n = 3、平均値 ± 標準誤差）、0.3 μMで3.8% ± 0.5%（n = 3）、1 μMで4.3% ± 0.9%（n = 3）、及び3 μMで16.4% ± 2.1%（n = 6）阻害した。陰性対照群の阻害は−0.1% ± 1.0%（n = 3）であり、キザルチニブは3 μMで対照群と比較して統計学的に有意（$P < 0.05$）にhERG電流を阻害した。AC886（n = 3）は0.1 μMで−0.4% ± 0.8%（平均値 ± 標準誤差）、0.3 μMで3.3% ± 0.1%、1 μMで3.9% ± 1.6%、及び3 μMで12.0% ± 2.0% hERG電流を阻害した。陰性対照群（n = 3）の阻害は0.1% ± 1.0%であり、AC886は3 μMで対照群と比較して統計学的に有意（$P < 0.05$）にhERG電流を阻害した。一方、テルフェナジンは60 nMでhERG電流を80.3%阻害し、本アッセイの感度が確認された。

以上の結果から、キザルチニブ及びAC886はともに3 μMでhERG電流を阻害した。また、両化合物とも1 μMまではhERG電流に対する阻害作用を示さなかった。

4.1.6　HEK293細胞に発現させたクローン化hKvLQT1/minKカリウムチャネルに対するキザルチニブ及びAC886の影響

添付資料番号：4.2.1.3-6

hKvLQT1/minK遺伝子を導入したHEK293細胞を用いて、キザルチニブ及びAC886のI_{Ks}に及ぼす影響をパッチクランプ法により追加検討した。HEK293細胞に0.1 μM、0.3 μM、1 μM、及び2.9 μMのキザルチニブ塩酸塩あるいは0.1 μM、0.3 μM、0.9 μM、及び2.9 μMのAC886塩酸塩を低濃度から順に曝露した。陽性対照としてクロマノール293B（n = 4）を用いた。

キザルチニブはI_{Ks}を0.1 μMで28.9% ± 7.5%（n = 5、平均値 ± 標準誤差）、0.3 μMで55.2% ± 4.2%（n = 3）、1 μMで56.5% ± 2.5%（n = 7）、及び2.9 μMで67.5% ± 3.3%（n = 5）阻害した。陰性対照群の阻害は2.0% ± 1.5%（n = 3）で、キザルチニブはI_{Ks}を0.1 μM、0.3 μM、1 μM、及び2.9 μMで対照群と比較して統計学的に有意（$P < 0.05$）に阻害した。濃度−反応関係が緩やかだったため、キザルチニブのI_{Ks}阻害におけるIC_{50}は算出されなかったが、0.3 μM未満と推測された。AC886はI_{Ks}を0.1 μMで11.0% ± 3.3%（n = 4、平均値 ± 標準誤差）、0.3 μMで20.6% ± 4.0%（n = 4）、0.9 μMで21.2% ± 2.7%（n = 5）、及び2.9 μMで26.9% ± 2.7%

（n = 5）阻害した。陰性対照群（n = 3）の阻害は 2.0% ± 1.5%で、AC886 は I_{Ks} を 0.3 μM、0.9 μM、及び 2.9 μM で対照群と比較して統計学的に有意（$P < 0.05$）に阻害した。AC886 の I_{Ks} 阻害における IC_{50} は算出されなかったが、2.9 μM より高いと推測された。クロマノール 293B（n = 4）は 30 μM で I_{Ks} を 74.5% ± 2.7%阻害し、本アッセイの I_{Ks} 阻害に対する感度が確認された。

以上の結果から、キザルチニブは今回のアッセイで用いた最も低濃度の 0.1 μM で I_{Ks} に対する阻害作用を示した。AC886 は 0.3 μM 以上で I_{Ks} に対する阻害作用を示した。AC886 の 0.1 μM では影響はなかった。

4.1.7　HEK293 細胞に発現させたクローン化ナトリウムチャネルに対するキザルチニブ及び AC886 の影響

添付資料番号：4.2.1.3-7

hNav1.5 を発現させた HEK293 細胞を用いて、キザルチニブ及び AC886 の I_{Na} に及ぼす影響をパッチクランプ法により追加検討した。HEK293 細胞に 0.1 μM、0.3 μM、1 μM、及び 3 μM のキザルチニブ塩酸塩あるいは AC886 塩酸塩を低濃度から順に曝露した。0.1 Hz の周波数の繰り返しに伴う 2 パルスパターンを用いて作用発現時（test pulse 1）と定常状態（test pulse 2）の阻害を測定した。陽性対照としてリドカイン（n = 2）を用いた。

キザルチニブは test pulse 1（n = 3）では I_{Na} を 0.1 μM で−3.1% ± 1.2%（平均値 ± 標準誤差）、0.3 μM で 0.8% ± 0.2%、1 μM で 1.0% ± 1.0%、及び 3 μM で 0.9% ± 0.4%阻害した。陰性対照群（n = 3）の阻害は 1.3% ± 0.9%で、キザルチニブは I_{Na} を 0.1 μM で対照群と比較して統計学的に有意に（$P < 0.05$）活性化させた。しかし、その活性化は軽度であり、かつ濃度相関がみられなかったため、毒性学的な意義はないと判断した。キザルチニブは test pulse 2（n = 3）では I_{Na} を 0.1 μM で−1.9% ± 1.0%、0.3 μM で 1.1% ± 1.2%、1 μM で−0.5% ± 1.9%、及び 3 μM で 0.7% ± 0.5%阻害した。陰性対照群（n = 3）の阻害は 1.3% ± 0.1%で、キザルチニブは I_{Na} に対していずれの濃度でも対照群と比較して統計学的に有意な阻害作用を示さなかった。AC886 は test pulse 1 では I_{Na} を 0.1 μM で 1.2% ± 0.7%（n = 3）、0.3 μM で 2.6% ± 0.3%（n = 4）、1 μM で−0.2% ± 1.1%（n = 4）、及び 3 μM で 2.8% ± 1.5%（n = 3）阻害した。陰性対照群（n = 3）の阻害は 1.3% ± 0.9%で、AC886 は I_{Na} に対していずれの濃度でも対照群と比較して統計学的に有意な阻害作用を示さなかった。AC886 は test pulse 2 では I_{Na} を 0.1 μM で 0.6% ± 3.3%（n = 3）、0.3 μM で 4.6% ± 0.8%（n = 4）、1 μM で 1.4% ± 2.1%（n = 4）、及び 3 μM で 4.9% ± 3.7%（n = 3）阻害した。陰性対照群（n = 3）の阻害は 1.3% ± 0.1%で、AC886 は I_{Na} に対していずれの濃度でも対照群と比較して統計学的に有意な阻害作用を示さなかった。リドカインは 300 μM で I_{Na} を 42.8%（test pulse 1）あるいは 95.4%（test pulse 2）阻害し、本アッセイの I_{Na} 阻害に対する感度が確認された。

以上の結果から、キザルチニブ及びAC886はともにアッセイに用いた最高濃度である3 μMまで有意なI_{Na}阻害作用を示さなかった。

4.1.8　HEK293細胞に発現させたクローン化チャネルからの遅延ナトリウム電流に対するキザルチニブ及びAC886の影響

添付資料番号：4.2.1.3-8

hNav1.5を発現させたHEK293細胞を用いて、キザルチニブ及びAC886の$I_{Na,L}$に及ぼす影響をパッチクランプ法により追加検討した。HEK293細胞に0.1 μM、0.3 μM、1 μM、及び3 μMのキザルチニブ塩酸塩あるいは0.1 μM、0.2 μM、0.8 μM、及び2.5 μMのAC886塩酸塩を低濃度から順に曝露した。陽性対照としてラノラジン二塩酸塩（n = 2）を用いた。

キザルチニブは$I_{Na,L}$を0.1 μMで1.7% ± 0.6%（n = 5、平均値 ± 標準誤差）、0.3 μMで2.0% ± 0.6%（n = 4）、1 μMで2.2% ± 0.6%（n = 3）、及び3 μMで4.7% ± 0.9%（n = 3）阻害した。陰性対照群（n = 3）の阻害は0.7% ± 1.0%で、キザルチニブは$I_{Na,L}$を3 μMで対照群と比較して統計学的に有意（$P < 0.05$）に阻害した。しかし、その阻害は軽度であったため、毒性学的な意義はないと判断した。AC886は$I_{Na,L}$を0.1 μMで1.5% ± 2.0%（n = 3）、0.2 μMで1.7% ± 1.1%（n = 6）、0.8 μMで0.8% ± 2.4%（n = 3）、及び2.5 μMで4.4% ± 1.4%（n = 5）阻害した。陰性対照群（n = 3）の阻害は0.7% ± 1.0%で、AC886は$I_{Na,L}$に対していずれの濃度でも対照群と比較して統計学的に有意な阻害作用を示さなかった。ラノラジン二塩酸塩は100 μMで$I_{Na,L}$を72.1%阻害し、本アッセイの$I_{Na,L}$阻害に対する感度が確認された。

以上の結果から、キザルチニブはアッセイに用いた最高濃度である3 μMまで、AC886は最高濃度である2.5 μMまでそれぞれ有意な阻害作用を示さなかった。

4.1.9　CHO細胞に発現させたクローン化L型カルシウムチャネルに対するキザルチニブ及びAC886の影響

添付資料番号：4.2.1.3-9

hCav1.2カルシウムチャネルを過剰発現させたCHO細胞を用いて、キザルチニブ及びAC886の$I_{Ca\text{-}L}$に及ぼす影響をパッチクランプ法により追加検討した。CHO細胞に0.1 μM、0.3 μM、1 μM、及び2.3 μMのキザルチニブ塩酸塩あるいは0.1 μM、0.2 μM、1 μM、及び3 μMのAC886塩酸塩を低濃度から順に曝露した。陽性対照としてニフェジピン(n = 2)を用いた。

キザルチニブは$I_{Ca\text{-}L}$を0.1 μMで0.6% ± 0.6%（n = 3、平均値 ± 標準誤差）、0.3 μMで0.3% ± 0.4%（n = 3）、1 μMで1.0% ± 1.4%（n = 4）、及び2.3 μMで1.6% ± 2.8%（n = 3）阻害した。陰性対照群（n = 3）の阻害は−1.5% ± 2.3%で、キザルチニブは$I_{Ca\text{-}L}$に対していずれの濃度でも対照群と比較して統計学的に有意な阻害作用を示さなかった。AC886は$I_{Ca\text{-}L}$を0.1 μMで0.5% ± 0.9% (n = 3)、0.2 μMで−1.1% ± 0.8% (n = 3)、1 μMで1.1% ± 0.4% (n = 3)、

及び 3 μM で 2.8% ± 0.6%（n = 4）阻害した。陰性対照群（n = 3）の阻害は−1.5% ± 2.3%で、AC886 は $I_{Ca\text{-}L}$ に対していずれの濃度でも対照群と比較して統計学的に有意な阻害作用を示さなかった。ニフェジピンは 0.1 μM で $I_{Ca\text{-}L}$ を 95.3%阻害し、本アッセイの $I_{Ca\text{-}L}$ 阻害に対する感度が確認された。

以上の結果から、キザルチニブ及び AC886 はともにアッセイに用いた最高濃度（キザルチニブは 2.3 μM、AC886 は 3 μM）まで有意な $I_{Ca\text{-}L}$ 阻害作用を示さなかった。

4.2　In vivo 試験

4.2.1　カニクイザルの心血管系に対する影響

添付資料番号：4.2.1.3-10

心血管系に対するキザルチニブの影響は、雄カニクイザル（4 例）を用いてテレメトリー法にて評価した。キザルチニブ塩酸塩を 22% HPβCD に懸濁し、各動物に強制経口投与した。最初に、4 × 4 ラテン方格法によるクロスオーバーデザインにて、0 mg/kg、30 mg/kg、100 mg/kg、及び 200 mg/kg を投与し、投与間に休薬期間を 3 日間ずつ設けた（第 1 期）。その後、投与量を調整し、ラテン方格デザインから投与法を変更して、0 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg、及び 30 mg/kg を投与した（第 2 期）。投与間に休薬期間を 3 日以上設けた。第 2 期の試験が完了後、全例にキザルチニブ塩酸塩 3 mg/kg を投与し、キザルチニブ及び AC886 の血漿中濃度を確認した。一般状態、体血圧（収縮期血圧、拡張期血圧、平均動脈圧、及び脈圧）、心拍数、心電図パラメータ（PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔、及び QTc 間隔［心拍数で補正された QT 間隔］）、並びに血漿中薬物濃度を評価した。各投与前、並びに投与の約 0.25、0.5、1、2、4、5、6、7、8、12、及び 24 時間後に、心電図波形異常を 2 回ずつ定性的に評価した。

試験期間中に死亡例はなかった。一般状態変化として、嘔吐、軟便、及び褐色の泡状物質（粒子を含む場合と含まない場合あり）が認められた。3 mg/kg では、キザルチニブ投与に関連する心血管系パラメータの変化はみられなかった。10 mg/kg 以上の投与量で、用量依存的な体血圧上昇が記録された。100 及び 200 mg/kg でみられた体血圧の変動は一過性であり、体血圧の上昇は投与後約 1～8 時間持続した。収縮期血圧、拡張期血圧、平均動脈圧、及び脈圧には、同様の影響がみられた。用量依存的な変化を示した一例として、収縮期血圧の最大変化量を以下に示した（投与前値からの変化量: 10 mg/kg、30 mg/kg［第 1 期］、30 mg/kg［第 2 期］、100 mg/kg、及び 200 mg/kg でそれぞれ 14.8 mmHg［17.4%］、22.4 mmHg［26.8%、第 1 期］、17.9 mmHg［21.4%、第 2 期］、26.1 mmHg［29.8%］、及び 37.3 mmHg［38.3%］）。30 mg/kg で認められた拡張期血圧、平均動脈圧、及び脈圧の変化、並びに 10 mg/kg で認められたすべての体血圧の変化は、生物学的意義のないものと判断した。

10 mg/kg 以上の投与量で、QTc の用量依存的な延長が認められた。この延長は投与約 1 時間後から全モニタリング期間を通して認められた。QTc の最大延長（平均）は、10 mg/kg、30 mg/kg（第 1 期）、30 mg/kg（第 2 期）、100 mg/kg、及び 200 mg/kg で、それぞれ 33.4 ms（13.4%）、87.9 ms（36.1%、第 1 期）、74.5 ms（29.3%、第 2 期）、118.1 ms（43.8%）、及び 135.2 ms（53.1%）

であった。

心電図記録の解析では、高用量の投与時に 2 例で心室期外収縮が発生し、発生時期は 2 例とも、推定される最高血漿中濃度到達時間（time to reach maximum plasma concentration: Tmax）の付近（投与の約 4.5 時間後）であったと判断された。1 例で 3 mg/kg、10 mg/kg、及び 30 mg/kg 投与後に房室接合部性の補充収縮、10 mg/kg 投与後に房室接合部調律が一定時間認められた。しかし、房室接合部不整脈（房室接合部性の補充収縮及び房室接合部調律）がみられたのはこの 1 例のみであり、その一部は推定 Tmax から離れた時点（すなわち、投与 1 及び 24 時間後）で発生した。また、発現率に用量依存的な影響がみられず、10 mg/kg 投与時の発現率が最も高かったことから、この 1 例にみられた房室接合部不整脈は、正常範囲内の変動を反映している可能性があると考えられた。

3 mg/kg 単回投与後にキザルチニブ及び AC886 のトキシコキネティクスを評価した。キザルチニブは速やかに吸収され、Tmax は 1～4 時間であった。AC886 の Cmax 及び血漿中濃度－時間曲線下面積［area under the plasma concentration-time curve: AUC］）は、キザルチニブより高かった。個々の動物における Cmax 及び $AUC_{0\text{-}48}$ の AC886／キザルチニブ比の平均値は、それぞれ 5.07 及び 8.62 であった。AC886 の終末相の消失半減期はキザルチニブより長かった（それぞれ 8.33 及び 4.95 時間）。Cmax 及び $AUC_{0\text{-}48}$ の平均値は、キザルチニブがそれぞれ 47.4 ng/mL（85 nM）及び 446 ng·h/mL、AC886 がそれぞれ 188 ng/mL（326 nM）及び 2940 ng·h/mL であった。

以上の結果より、キザルチニブは 10 mg/kg 以上で QTc 間隔を著明かつ用量依存的に延長させ、この延長は 24 時間のモニタリング期間を通して認められた。100 及び 200 mg/kg では、体血圧に対する有意かつ用量依存的な影響も認められ、この影響は 24 時間のモニタリング期間を通しての一過性の血圧上昇を特徴とした。3 mg/kg では、生物学的に重要な影響はみられなかった。試験結果に基づき、無作用量（no observed effect level: NOEL）は 3 mg/kg と判断した。

5. 薬力学的薬物相互作用

キザルチニブの薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

6. 考察及び結論

本概要に示す非臨床薬理データから、キザルチニブは FLT3 に対して強力かつ選択的な阻害作用を示す経口投与可能なクラス III の RTK 阻害薬であり、ヒト白血病のマウスモデルで強力な抗腫瘍作用を示すことが明らかになった。

In vitro 試験では、キザルチニブは生化学的な競合的結合アッセイで FLT3 に高い親和性で結合するとともに（K_d = 1.3 nM）、細胞内 FLT3 キナーゼの活性及び FLT3-ITD 依存性の細胞増殖を阻害した。キザルチニブは FLT3 に対し最も高い親和性で結合し、KIT にはそれよりも低い親和性で結合した。他のいくつかのクラス III の RTK にも、FLT3 に対する K_d の約 10 倍以内の親和性で結合した。他のキナーゼには高い親和性では結合しなかった。主要代謝物 AC886 はキザルチニブと極めて類似した結合プロファイルを示した。

MV4-11 細胞（FLT3-ITD 変異を有するヒト白血病細胞株）を用いた異種移植マウスモデルで、キザルチニブ塩酸塩の経口投与は有効性を示した。キザルチニブ塩酸塩は 1 mg/kg 以上の 1 日 1 回投与で、MV4-11 固形腫瘍の増殖を著しく遅延させるとともに、腫瘍を退縮させた。MV4-11 細胞を用いた液性腫瘍／播種性腫瘍移植モデルでは、キザルチニブは延命効果を示した。これらのモデルでは、効果の大きさが用量依存性を示したほか、投与期間の延長により効果が増大した。

キザルチニブは、極めて高い選択性を特徴とするため、標的以外には意味のある作用をもたらさないと予想される。キナーゼ以外の一連の標的（すなわち、キナーゼ以外の酵素、受容体、チャネル、及びトランスポーター）に対する活性を検討したところ、クラス III の RTK ファミリー以外に対する in vitro 活性は極めて低かった。

心血管系安全性薬理試験では、サルにおいてキザルチニブの 10 mg/kg 以上の投与量で QTc が延長し、100 mg/kg 以上の投与量で体血圧が上昇した。開発初期に実施した in vitro 試験のなかで、ウサギ摘出心臓を用いたアッセイでは、キザルチニブ及び AC886 はいずれも、濃度範囲 1～30 μM で MAP、RR、PR、及び QT 間隔を延長させた。3 μM 以上のキザルチニブ及び 10 μM 以上の AC886 による QTc 延長も統計学的に有意であった。キザルチニブは、30 μM までの濃度で hERG、I_{Na}、及び $I_{Ca\text{-}L}$ 電流、並びにウサギ心室組織の活動電位パラメータに有意な影響を及ぼさなかったが、1 μM で I_{Ks} を 37%阻害した。これに対し、AC886 は、hERG 電流に対する濃度非依存性の阻害作用（最大阻害率 36.5%）、I_{Ks} に対するプラトーに達する阻害作用、I_{Na} に対する濃度依存的な阻害作用（IC_{50}: 24.4 μM）、及び $I_{Ca\text{-}L}$ に対する阻害作用を示したほか、ウサギ心室組織の活動電位持続時間を延長させた。しかし、上記の in vitro 試験で評価した濃度範囲は高い濃度であり、かつ検体液の濃度の実測値は設定濃度より 20%以上低値であった。また、I_{Na} 及び $I_{Ca\text{-}L}$ に対する作用の評価には分離したイヌ心筋細胞を用いた。これらを踏まえ、適切な濃度範囲及び細胞を用いて、hERG 電流、I_{Ks}、I_{Na}、$I_{Na,L}$、及び $I_{Ca\text{-}L}$ に対するイオンチャネルアッセイを、ヒト遺伝子を導入した培養細胞を用いて追加実施

した。追加試験では、キザルチニブ及び AC886 ともに hERG 電流及び I_{Ks} を阻害した。3 μM のキザルチニブ及び AC886 は hERG 電流を統計学的有意にそれぞれ 16.4%及び 12.0%阻害した。I_{Ks} に対しては、キザルチニブは 0.1～2.9 μM の濃度範囲で評価した結果、2.9 μM で最大 67.5%阻害した。AC886 も 0.3～2.9 μM の濃度範囲で評価した結果、2.9 μM で最大 26.9%阻害した。キザルチニブ及び AC886 ともに最高濃度まで I_{Na}、$I_{Na,L}$、及び $I_{Ca\text{-}L}$ に対する阻害作用を示さなかった。これらから、キザルチニブ及び AC886 は hERG 電流と I_{Ks} を阻害し、再分極電流の減少により QT 間隔の延長を惹起することが示唆された。I_{Ks} に対する作用は hERG 電流に対するよりも顕著であった。キザルチニブと AC886 の正確な寄与率は不明である。表 2.6.2.6-1 に示すように、サルでの QT 延長に対する NOEL（3 mg/kg）でのキザルチニブ及び AC886 の Cmax、並びに両化合物の Cmax の和は、キザルチニブ塩酸塩 60 mg（キザルチニブとして 53 mg）を被験者に投与したときの Cmax を下回るか同程度であった。

表 2.6.2.6-1　臨床用量であるキザルチニブ塩酸塩 60 mg（キザルチニブとして 53 mg）／日と、QT 延長に対する無作用量又は毒性用量での全身曝露量（Cmax）の比較に基づくキザルチニブ及び AC886 の曝露マージン

動物種	投与量	投与日	キザルチニブ		AC886		キザルチニブ ＋ AC886	
			Cmax（ng/mL）	MOE	Cmax（ng/mL）	MOE	Cmax（ng/mL）	MOE
ヒト	53 mg/man	1[a]	112	NA	33	NA	144	NA
		15[a]	487	NA	192	NA	742	NA
カニクイザル	3 mg/kg（NOEL）	1[b]	47	0.42	188 (47)[d]	5.7 (1.4)	235 (94)[d]	1.6 (0.65)
		91[c]	113	0.23	367 (92)[d]	1.9 (0.48)	480 (205)[d]	0.65 (0.28)
	10 mg/kg（毒性用量）	1[c]	206	1.8	727 (182)[d]	22 (5.5)	933 (388)[d]	6.5 (2.7)
		91[c]	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Cmax: 最高血漿中濃度、NA: 該当なし

[a] ヒトにおける Cmax は代表的な幾何平均の値（添付資料番号：5.3.5.2-2）

[b] サルテレメトリー試験のデータ（添付資料番号：4.2.1.3-10）

[c] サル 13 週間反復投与毒性試験のデータ（添付資料番号：4.2.3.2.7）。Cmax 値は雌雄の平均値

[d] サル血液中の AC886 濃度は、氷中保存条件では 37°C 保存条件と比べて 4 倍高かったため、血液を氷中保存した場合には最大増加率「4」で補正した濃度を括弧内に示す（2.6.4.2.4）。

7. 参考文献一覧

1. Yee KW, O'Farrell AM, Smolich BD, et al. SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. Blood. 2002;100(8):2941-9.

目次

1. 薬理試験：一覧表 2
2. 効力を裏付ける試験 4
2.1 In vitro 試験 4
2.2 In vivo 試験 5
3. 副次的薬理試験 6
4. 安全性薬理試験 7
5. 薬力学的薬物相互作用試験 11

1. 薬理試験：一覧表

				Test Article: Quizartinib dihydrochloride		
Type of Study	Test System	Test Article	Method of Admin.	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics						
Competition binding assay	T7 phage strains prepared in an E. coli host (BL21 strain) or in HEK-293 cells for 441 kinases	Quizartinib Quizartinib dihydrochloride	In vitro	[redacted]	4.2.1.1-1	4.2.1.1
Competition binding assay	T7 phage strains prepared in an E. coli host (BL21 strain) or in HEK-293 cells for 391 kinases	AC886 AC886 dihydrochloride	In vitro	[redacted]	4.2.1.1-2	4.2.1.1
Inhibition of kinase activity	MV4-11 cells with ITD activating mutation	Quizartinib dihydrochloride	In vitro	Ambit Biosciences Corp.	4.2.1.1-3	4.2.1.1
Inhibition of cell proliferation	MV4-11 cells with ITD activating mutation	Quizartinib dihydrochloride	In vitro	Ambit Biosciences Corp.	4.2.1.1-4	4.2.1.1
Pharmacodynamic analysis	MV4-11 tumor xenograft transplanted in female C.B-17-SCID mice	Quizartinib dihydrochloride	Oral (gavage)	Ambit Biosciences Corp.	4.2.1.1-5	4.2.1.1
Efficacy in tumor xenograft model	Female athymic nude mice in which MV4-11 cells were grown as subcutaneous solid tumors	Quizartinib dihydrochloride	Oral (gavage)	[redacted]	4.2.1.1-6	4.2.1.1
Efficacy in disseminated engraftment model	Female NOD/SCID mice in which MV4-11 cells were disseminated to bone marrow	Quizartinib dihydrochloride	Oral (gavage)	Ambit Biosciences Corp.	4.2.1.1-7	4.2.1.1
Secondary Pharmacodynamics						
Selectivity against non-kinases	118 enzymes, receptors, channels, and transporters from human, pig, rabbit, rat, and other species	Quizartinib dihydrochloride	In vitro	[redacted]	4.2.1.2-1	4.2.1.2

				Test Article: Quizartinib dihydrochloride		
Type of Study	Test System	Test Article	Method of Admin.	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Safety Pharmacology						
hERG currents [a]	HEK 293 cells	Quizartinib, AC886	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-1	4.2.1.3
	HEK 293 cells	Quizartinib, AC886	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-5	4.2.1.3
Cardiac action potential [a]	Rabbit/NZW (ventricular tissues)	Quizartinib, AC886	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-3	4.2.1.3
Sodium (I_{Na}), potassium (I_{Ks}), and calcium (I_{Ca-L}) currents [a]	Dog/Beagle (dispersed cardiomyocytes), I_{Ks}-expressing CHO cells	Quizartinib, AC886	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-2	4.2.1.3
Potassium (I_{Ks}) currents [a]	Cloned hKvLQT1/minK-HEK293 cells	Quizartinib, AC886	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-6	4.2.1.3
Sodium (I_{Na}) currents [a]	Cloned hNav1.5-HEK293 cells	Quizartinib, AC886	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-7	4.2.1.3
Sodium-late ($I_{Na,L}$) currents [a]	Cloned late hNav1.5-HEK293 cells	Quizartinib, AC886	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-8	4.2.1.3
Calcium (I_{Ca-L}) currents [a]	Cloned hCav1,2-CHO cells	Quizartinib, AC886	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-9	4.2.1.3
Electrophysiological and mechanical parameters [a]	Rabbit/NZW (whole heart)	Quizartinib, AC886	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-4	4.2.1.3
Cardiovascular System [a]	Cynomolgus monkey	Quizartinib	Oral (gavage)	[redacted]	4.2.1.3-10	4.2.1.3
Pharmacodynamic Drug Interactions						
No studies conducted						

CHO: Chinese hamster ovary; HEK: Human embryonic kidney; hERG: Human ether à go go-related gene; ITD: Internal tandem duplication; NOD: Nonobese diabetic; SCID: Severe combined immunodeficient.
a: Studies were conducted in accordance with GLP.

2. 効力を裏付ける試験

2.1 In vitro 試験

				Test Article: Quizartinib dihydrochloride		
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Dose	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Competition binding assay of quizartinib	T7 phage strains prepared in an E. coli host (BL21 strain) or in HEK-293 cells for 441 kinases	In vitro	NA	NA	High binding affinity (Kd < 100 nM) was demonstrated for CSF1R, DDR1, FLT1, FLT3, FLT3 (D835H), FLT3 (D835Y), FLT3 (ITD), FLT3 (K663Q), FLT3 (N841I), FLT3 (R834Q), FLT4, KIT, KIT (A829P), KIT (L576P), KIT (V559D), KIT (V559D, T670I), KIT (V559D, V654A), PDGFRα, PDGFRβ, RET, RET (M918T), RET (V804L), and RET (V804M). Quizartinib was highly potent against FLT3 and closed related RTKs.	4.2.1.1-1
Competition binding assay of AC886	T7 phage strains prepared in an E. coli host (BL21 strain) or in HEK-293 cells for 391 kinases	In vitro	NA	NA	High binding affinity (Kd < 100 nM) was demonstrated for CSF1R, FLT1, FLT3, FLT3 (D835H), FLT3 (D835Y), FLT3 (ITD), FLT3 (K663Q), FLT3 (N841I), FLT4, KIT, KIT (L576P), KIT (V559D), KIT (V559D, T670I), KIT (V559D, V654A), PDGFRα, PDGFRβ, RET, RET (M918T), RET (V804L), and RET (V804M). AC886 was highly potent against FLT3 and closed related RTKs.	4.2.1.1-2
Inhibition of kinase activity of quizartinib	MV4-11 cells with ITD activating mutation	In vitro	NA	NA	Quizartinib was a highly potent intracellular inhibitor of FLT3-ITD catalytic activity in the leukemia cell line. The western blot clearly showed inhibition of FLT3 phosphorylation at concentrations of quizartinib from 0.8 to 20 nM.	4.2.1.1-3
Inhibition of cell proliferation of quizartinib	MV4-11 cells with ITD activating mutation; RS4;11 cell line (control)	In vitro	NA	NA	Quizartinib inhibited proliferation of the MV4-11 cell line with the IC_{50} of 0.3 nM. Quizartinib was found to be a highly potent inhibitor of FLT3-dependent proliferation.	4.2.1.1-4

CSF1R: Colony stimulating factor 1 receptor; DDR: Discoidin domain receptor; FLT: Fms-related tyrosine kinase; HEK: Human embryonic kidney cells; IC_{50}: 50% inhibitory concentration; ITD: Internal tandem duplication; Kd: Dissociation constant; NA: Not applicable; PDGFRα: Alpha-type platelet-derived growth factor receptor; PDGFRβ: Beta-type platelet-derived growth factor receptor; RET: Rearranged during transfection; RTK: Receptor tyrosine kinase.

2.2 In vivo 試験

				Test Article: Quizartinib dihydrochloride		
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Dose (mg/kg)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Pharmacodynamic analysis	MV4-11 tumor xenograft transplanted in female C.B-17-SCID mice	Oral (gavage)	0 (vehicle) or 10 mg/kg	Female 4 per timepoint	A time-dependent reduction of p-FLT3 was observed following a single dose of 10 mg/kg quizartinib dihydrochloride. The maximal effect was observed at 2 h post-dose, with % p-FLT3 reduced to 4%. Levels of % p-FLT3 rebounded at 48 and 96 h post-dose but plateaued at approximately 60%. The % p-FLT3 for vehicle-treated animals remained stable over time.	4.2.1.1-5
Efficacy in tumor xenograft model	Athymic nude mice in which MV4-11 cells were grown as subcutaneous solid tumors	Oral (gavage)	0 (vehicle), 1, 3, or 10 mg/kg	Female 10 per group	Quizartinib dihydrochloride produced strong dose-dependent activity in the MV4-11 solid flank tumor. At the end of the study, a median tumor volume of 52 mm^3 with 9 partial regression responses was observed in the 10 mg/kg group; and a median tumor volume of 63 mm^3, with 7 partial regression responses was observed in the 3 mg/kg group. At 10 mg/kg no tumor re-growth was observed during the follow-up period. There were no deaths in the 3 and 10 mg/kg groups.	4.2.1.1-6
Efficacy in disseminated engraftment model	NOD/SCID mice in which MV4-11 cells were disseminated to bone marrow	Oral (gavage)	0 (vehicle), 0.1, 1, or 10 mg/kg	Female 10 per group	Quizartinib treatment provided a dose-dependent survival advantage in the mice. Quizartinib dihydrochloride dosed for 31 days at 1 and 10 mg/kg QD provided an increased life span (ILS) of 55% and >250%, respectively, compared to vehicle. At 1 mg/kg QD, quizartinib dihydrochloride dosed continuously gave an ILS of 153% and provided a markedly higher survival advantage compared to 31-day dosing. At 10 mg/kg, the study was terminated prior to reaching 50% mortality, yielding an ILS of >250%.	4.2.1.1-7

FLT: Fms-related tyrosine kinase; ILS: Increased life span; NOD/SCID: Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient; p-FLT3: Phosphorylated FLT3; SCID: Severe combined immunodeficiency; QD: Once daily.
In this 2.6.3.2.2 section, doses of quizartinib are expressed as a dihydrochloride form.

3. 副次的薬理試験

				Test Article: Quizartinib dihydrochloride		
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Dose	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Selectivity against non-kinases of quizartinib	118 enzymes, receptors, channels, and transporters from human, pig, rabbit, rat, and other species	In vitro	NA	NA	Quizartinib had very limited activity against targets other than kinases. Quizartinib activity with an IC_{50} value below 10 μM was observed in only 5 of the 118 non-kinase assays: lipoxygenase 15-LO, prostanoid EP4, sigma σ1, sigma σ2, and sodium channel site 2.	4.2.1.2-1

IC_{50}: 50% inhibitory concentration; NA: Not applicable.

4. 安全性薬理試験

				Test Article: Quizartinib dihydrochloride			
Organ Systems Evaluated	Test System	Method of Admin.	Doses	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
hERG currents	Cloned hERG-HEK 293 cells	In vitro	Quizartinib: 1, 3, 10, and 30 µM (measured concentrations: 0.03, 0.07, 3.39, and 17.51 µM) AC886: 1, 3, 10, and 30 µM (measured concentrations: 0.14, 0.24, 2.76, and 22.78 µM)	7 cells /group	Quizartinib at concentrations ranging from 1 to 30 µM did not cause a statistically significant effect on the hERG currents. AC886 at concentrations ranging from 1 to 30 µM caused a statistically significant 36.5% maximal inhibition of the hERG currents that was concentration-independent. Statistical method: Paired Student's t-tests ($P \leq 0.05$).	Yes	4.2.1.3-1
hERG currents	Cloned hERG-HEK 293 cells	In vitro	Quizartinib and AC886: 0.1, 0.3, 1, and 3 µM	3 to 6 cells /group	Both quizartinib and AC886 at 3 µM caused a statistically significant inhibition of the hERG currents by 16.4% and 12.0%, respectively. No hERG inhibition was seen at up to 1 µM for both compounds. Statistical method: ANOVA with Dunnett's post-test ($P < 0.05$).	Yes	4.2.1.3-5
Sodium (I_{Na}), potassium (I_{Ks}), and calcium (I_{Ca-L}) currents	Dog/Beagle (dispersed cardiomyocytes), Cloned hKvLQT1/ mink-CHO cells	In vitro	Quizartinib: 1, 3, 10, and 30 µM (measured concentrations: 0-0.07, 0.12-0.38, 3.12-5.92, and 19.70-22.89 µM) AC886: 1, 3, 10, and 30 µM (measured concentrations: 0-0.15, 0.19-0.52, 2.06-4.28, and 17.24-22.26 µM)	7 cells /group	Quizartinib at concentrations ranging from 1 to 30 µM did not effect on the I_{Na} and I_{Ca-L} currents, whereas it caused a plateau inhibition of 37% the I_{Ks} currents as of a concentration of 1 µM. AC886 at 10 and 30 µM caused statistically significant inhibition of 23.6 and 17.3% of the I_{Ca-L}. AC886 at concentrations ranging from 1 to 30 µM caused a plateau inhibition of 29% of the I_{Ks} currents and a dose-dependent inhibition of the I_{Na} currents with an IC_{50} reached at 24.4 µM. Statistical method: Paired Student's t-tests ($P \leq 0.05$).	Yes	4.2.1.3-2

				Test Article: Quizartinib dihydrochloride			
Organ Systems Evaluated	Test System	Method of Admin.	Doses	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Potassium (I_{Ks}) currents	Cloned hKvLQT1/ minK-HEK293 cells	In vitro	Quizartinib: 0.1, 0.3, 1, and 3 µM (measured concentrations: 0.1, 0.3, 1, and 2.9 µM) AC886: 0.1, 0.3, 1, and 3 µM (measured concentrations: 0.1, 0.3, 0.9, and 2.9 µM)	3 to 7 cells /group	Quizartinib showed inhibitory effects on I_{Ks} at 0.1 µM, the lowest concentration tested. AC886 at 0.3 µM or more showed inhibitory effects on I_{Ks}. AC886 at 0.1 µM had no effects on I_{Ks}. Statistical method: ANOVA with Dunnett's post-test ($P < 0.05$).	Yes	4.2.1.3-6
Sodium (I_{Na}) currents	Cloned hNav1.5-HEK293 cells	In vitro	Quizartinib and AC886: 0.1, 0.3, 1, and 3 µM	3 to 4 cells /group	Onset (test pulse 1) and steady-state (test pulse 2) inhibition was measured using a two-pulse pattern repeated with a frequency of 0.1 Hz. Neither quizartinib nor AC886 had significant inhibitory effects on I_{Na} at up to the highest concentration tested.	Yes	4.2.1.3-7
Sodium-late ($I_{Na,L}$) currents	Cloned late hNav1.5-HEK293 cells	In vitro	Quizartinib: 0.1, 0.3, 1, and 3 µM AC886: 0.1, 0.3, 1, and 3 µM (measured concentrations: 0.1, 0.2, 0.8, and 2.5 µM)	3 to 6 cells /group	Neither quizartinib nor AC886 had significant inhibitory effects on $I_{Na,L}$ at up the highest concentrations tested.	Yes	4.2.1.3-8
Calcium (I_{Ca-L}) currents	Cloned hCav1,2-CHO cells	In vitro	Quizartinib: 0.1, 0.3, 1, and 3 µM (measured concentrations: 0.1, 0.3, 1, and 2.3 µM) AC886: 0.1, 0.3, 1, and 3 µM (measured concentrations: 0.1, 0.2, 1, and 3 µM)	3 to 4 cells /group	Neither quizartinib nor AC886 had significant inhibitory effects on I_{Ca-L} at up the highest concentrations tested.	Yes	4.2.1.3-9

				Test Article: Quizartinib dihydrochloride			
Organ Systems Evaluated	Test System	Method of Admin.	Doses	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiac action potential	Rabbit/NZW (ventricular tissues)	In vitro	Quizartinib: 1, 3, 10, and 30 μM (measured concentrations: 0.20, 0.78, 4.16, and 20.14 μM) AC886: 1, 3, 10, and 30 μM (measured concentrations: 0.23, 1.35, 5.25, and 21.09 μM)	5 tissues /group	Quizartinib at concentrations ranging from 1 to 30 μM did not cause any statistically significant effect on the action potential parameters. AC886 at concentrations ranging from 1 to 30 μM did not effect on the APD_{30}, whereas it caused a prolongation of the APD90 and APD90-30. Statistical method: Paired Student's t-tests ($P \leq 0.05$).	Yes	4.2.1.3-3
Electrophysiological and mechanical parameters	Rabbit/NZW (whole heart)	In vitro	Quizartinib: 1, 3, 10, and 30 μM (measured concentrations: 0.02, 0.93, 5.62, and 21.42 μM) AC886: 1, 3, 10, and 30 μM (measured concentrations: 0.16, 0.47, 5.05, and 22.19 μM)	5 organs /group	Quizartinib and AC886 at concentrations ranging from 1 to 30 μM, both caused prolongations of the MAP, RR, PR, and QT intervals. For quizartinib, these effects were statistically significant at ≥10 μM for the RR and PR intervals, at ≥3 μM for the QT interval, and at ≥1 μM for the MAP. For AC886, the prolongations were statistically significant at ≥10, ≥1, ≥3 and ≥30 μM for the above-mentioned parameters, respectively. Washout of either test article stopped, but did not reverse, the QT and MAP prolongations, while the RR and PR intervals continued to increase after the washout period. QTc prolongation was still statistically significant at quizartinib concentrations ≥3 μM and AC886 concentrations ≥10 μM. Quizartinib and AC886 also both caused a decrease in dLVP/dtmax without causing a significant effect on the LVP. Statistical method: Non-paired Student's t-tests ($P \leq 0.05$).	Yes	4.2.1.3-4

				Test Article: Quizartinib dihydrochloride			
Organ Systems Evaluated	Test System	Method of Admin.	Doses	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular system	Cynomolgus Monkey	Oral (gavage)	Phase 1: 0 (vehicle), 30, 100, 200 mg/kg Phase 2 ‡: 0 (vehicle), 30, 10, 3 mg/kg Dose levels were subsequently adjusted.	Male/4	Quizartinib elicited a marked, dose-related increase in QTc interval over a 24-h monitoring period at ≥10 mg/kg. Quizartinib at 100 or 200 mg/kg also produced significant dose-related effects on systemic blood pressure characterized by transient elevations in blood pressure over a 24-h monitoring period. Quizartinib at 30 mg/kg produced significant dose-related effects on systolic blood pressure only. Quizartinib at 3 mg/kg did not show the biologically significant effects. Statistical method: t-tests with Bonferroni correction ($P \leq 0.05$).	Yes	4.2.1.3-10

APD: Action potential duration; HEK: Human embryonic kidney; CHO: Chinese Hamster Ovary.
‡ Dose levels were subsequently adjusted.

5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。