目次

2.6.1.1 申請適応 6
2.6.1.2 作用機序 6
2.6.1.3 薬剤情報 6
2.6.1.3.1 原薬 6
2.6.1.3.2 製剤の組成 7
2.6.1.3.3 申請用法・用量 7
2.6.1.4 非臨床開発プログラム 7
2.6.1.4.1 薬理プロファイル 7
2.6.1.4.2 薬物動態プロファイル 7
2.6.1.4.3 安全性プロファイル 7

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
ADME	absorption, distribution, metabolism, excretion	吸収、分布、代謝、排泄
ALCL	Anaplastic large-cell lymphoma	未分化大細胞リンパ腫
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
AMP	adenosine 5'-monophosphate	アデノシン 5'-一リン酸
ASP	4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium	4-(4-ジメチルアミノスチリル)-N-メチルピリジニウム
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
A-to-B	apical-to-basolateral	頂端膜側から基底膜側
ATP	adenosine 5' -triphosphate	アデノシン 5'-三リン酸
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-24}	area under the plasma concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose	投与後 0 時間から 24 時間までの AUC
$AUC_{0-\infty}$	area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity	0 時間から無限大時間までの AUC
$AUC_{0-\tau}$	area under the plasma concentration-time curve over the dosing interval	投与間隔時間における AUC
AUC_{all}	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable time point or to the last time point that is below the limit of quantitation and assumed as zero for calculations	0 時間から最終測定可能時点又は定量下限未満を下回り計算上 0 と仮定される最終時点までの AUC
AUC_{last}	area under the plasma concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration above the lower limit of quantitation	0 時間から定量下限を上回る最終測定可能時点までの AUC
BA	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
BCRP	breast cancer resistance protein	-
BDC	bile duct-cannulated	胆管ろう形成
BSEP	bile salt export pump	-
B-to-A	basolateral-to-apical	基底膜側から頂端膜側
C2BBe1	human colon carcinoma cell line	ヒト結腸癌細胞株
Cave	average plasma concentration	平均血漿中濃度
CD74	Cluster of differentiation 74	分化抗原群 74
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	-
CL	clearance	クリアランス
CL_h	hepatic clearance	肝クリアランス
CLint	intrinsic clearance	固有クリアランス
Cmax	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CsA	cyclosporine A	シクロスポリン A
CSR	clinical study report	治験総括報告書
CYP	cytochromes P450	チトクローム P450
DFG	Asp-Phe-Gly	-
DMPO	Dimethylphosphine oxide	ジメチルホスフィンオキシド

略号	略していない表現又は説明	
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	上皮成長因子受容体
EGFR-Del	EGFR (delE746_A750)	-
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
EML4	echinoderm microtubule-associated protein-like 4	棘皮動物微小管結合蛋白質様 4
EPAR	European Public Assessment Report	欧州公開医薬品審査報告書
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
EU	European Union	欧州連合
FDA	Food and Drug Administration	（米国）食品医薬品局
FIG	Fused In Glioblastoma	膠芽細胞腫における融合
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3	-
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue	消化管関連リンパ系組織
GeoMean	Geometric mean	幾何平均
GGT	Gamma glutamyltransferase	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
GI_{50}	growth inhibition 50%	細胞増殖を 50%阻害する濃度
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
GSH	glutathione	グルタチオン
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2	ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2
hERG	human ether-a-go-go Related Gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネル遺伝子
HNSTD	Highest-non-severely-toxic-dose level (in nonrodents)	（非げっ歯類において）重篤な毒性が発現しない最大投与量
HPLC	high pressure liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	Inhibitory concentration 50%	50%阻害濃度
IC_{90}	Inhibitory concentration 90%	90%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonization	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IGF-1	insulin-like growth factor 1	インスリン様成長因子 1
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	インスリン様成長因子 1 受容体
IL-3	Interleukin-3	インターロイキン 3
INSR	Insulin receptor	インスリン受容体
IV	intravenous	静脈内
KB/P	blood to plasma ratio	血液－血漿比
Km	Michaelis-Menten constant	ミカエリス・メンテン定数
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LD_{50}	Lethal dose eliciting 50% mortality	50%致死量
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーション計数
MATE	multidrug and toxic compound extrusion	-
MDCK	Madin-Darby canine kidney	Madin-Darby イヌ腎
MDR1	multi-drug resistance 1	多剤耐性遺伝子
MET	Hepatocyte growth factor receptor	肝細胞増殖因子の受容体チロシンキナーゼ

略号	略していない表現又は説明	
MPP+	methylphenylpyridinium	メチルフェニルピリジニウム
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MTD	Maximum Tolerated Dose	最大耐量
NA	Not applicable	該当せず
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NDA	New Drug Application	新薬承認申請
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	No-observed-effect level	無影響量
NPM	nucleophosmin	ヌクレオフォスミン
NSCLC	Non-small cell lung cancer	非小細胞肺癌
NTCP	sodium taurocholate cotransporting polypeptide	-
OAT	organic anion transporter	-
OATP	organic anion-transporting polypeptide	-
OCT	organic cation transporter	-
ORR	objective response rate	客観的奏効率
P-	Phosphorylated-	リン酸化-
Papp	apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
PD	Pharmacodynamic	薬力学
PFS	progression-free survival	無増悪生存期間
P-gp	permeability-glycoprotein	P-糖蛋白質
PK	pharmacokinetic	薬物動態
PO	oral	経口
QD	once daily	1日1回
QWBA	quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RBC	red blood cell	赤血球
RET	rearranged during transfection	-
rhCYP	recombinant human Cytochromes P450	遺伝子組換えヒトチトクロム P450
ROS	c-ros oncogene 1	c-ros がん遺伝子-1
SCID	Severe combined immunodeficient	重症複合免疫不全
SD	Standard deviation	標準偏差
SDC4	Syndecan 4	シンデカン 4
SDH	Sorbitol dehydrogenase	ソルビトール脱水素酵素
SEM	Standard error of the mean	平均の標準誤差
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	シグナル伝達兼転写活性化因子 3
STD10	Severely toxic dose eliciting ≥10% lethality (in rodents)	（げっ歯類において）供試動物の 10%以上に重篤な毒性が発現する用量
$t_{1/2}$	half-life	半減期
TDI	time-dependent inhibition	時間依存的阻害
TKI	Tyrosine kinase inhibitor	チロシンキナーゼ阻害剤
Tmax	time of maximum concentration	最高濃度到達時間
TPM3	tropomyosin 3	トロポミオシン 3
TRA	total radioactivity	総放射能
Tyr	tyrosine	チロシン
USPI	United States prescribing information	米国添付文書

略号	略していない表現又は説明	
Vd	volume of distribution	分布容積
Vmax	Maximum velocity	最大速度

2.6.1.1 申請適応

Brigatinib（AP26113）は、ARIAD 社の化学構造を基にした薬物設計プラットフォームを用いて、ALK キナーゼドメインの点突然変異を含むクリゾチニブ耐性に関与する機序を克服できる、強力かつ選択的な ALK 阻害剤となるよう設計された。

Brigatinib の申請適応は、ALK 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌（NSCLC）患者の治療である。

2.6.1.2 作用機序

Brigatinib は新規の経口投与可能なチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）である。主要標的は、NSCLC 及びその他の癌で重要な役割を担っている活性化変異型 ALK 及び c-ros がん遺伝子-1（ROS1）である。

Brigatinib は in vitro 及び in vivo アッセイにおいて、ALK の自己リン酸化及び ALK 下流シグナル伝達蛋白 STAT3 のリン酸化を阻害した。Brigatinib は EML4-ALK 及び NPM-ALK 融合蛋白を発現している細胞株の in vitro での増殖を阻害し、マウスにおいて、EML4-ALK 陽性 NSCLC 異種移植片増殖の用量依存的な阻害を示した。さらに、brigatinib は、クリゾチニブ投与中に進行した患者の NSCLC 腫瘍において特定された変異を含む EML4-ALK の複数の変異型（L1196M 及び G1202R など）に対して、in vitro、in vivo 及び臨床で薬効を示した。

ALK 誘発腫瘍細胞株を頭蓋内移植したマウスに brigatinib を投与すると、抗腫瘍活性を示し、生存期間が延長した。

2.6.1.3 薬剤情報

Brigatinib の薬剤情報を以下に示す。

2.6.1.3.1 原薬

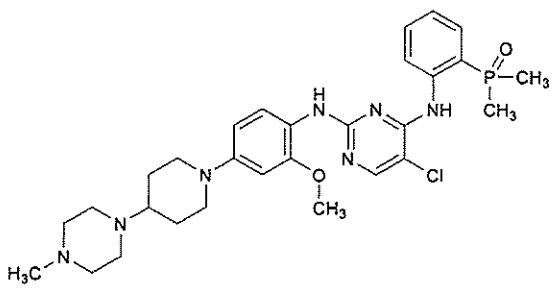
JAN　ブリグチニブ

国際一般名　brigatinib

社内コード　AP26113

化学名　{2-[(5-Chloro-2-{2-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-4-yl)amino]phenyl}dimethyl-λ^5-phosphanone

化学構造



Brigatinib はキラル中心を持たない

分子式： $C_{29}H_{39}ClN_7O_2P$
分子量： 584.09 g/mol

2.6.1.3.2 製剤の組成

Brigatinib は即放性の経口固形錠剤として提供される。市販用製剤の組成を「3.2.P.1」に示す。

2.6.1.3.3 申請用法・用量

通常、成人にはブリグチニブとして 1 日 1 回 90 mg を 7 日間経口投与により開始し、その後、維持量として 1 日 1 回 180 mg を経口投与する。なお、患者の状態により適宜減量する。

2.6.1.4 非臨床開発プログラム

Brigatinib の非臨床プログラムは、S7「安全性薬理試験」、S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価」及び M3「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験」を含む、薬剤開発に関する医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインを考慮してデザインした。非臨床開発プログラムでは、薬理、薬物動態及び毒性の 3 つの側面に注目してきた。これらのデータを 2.6.2～2.6.7 にまとめる。

2.6.1.4.1 薬理プロファイル

Brigatinib の効力を裏付ける主要及び副次的薬力学的効果の特性を評価するため、一連の in vitro 及び in vivo 試験（2.6.3 参照）を実施した。薬力学試験には、brigatinib による標的キナーゼ阻害の機序、力価及び特異性の評価が含まれた。これらの試験の結果を 2.6.2 に示す。

hERG、心肺系、CNS 及び腎臓系に対する brigatinib の影響を検討するため、一連の非臨床安全性薬理試験を実施した。安全性薬理試験の結果を 2.6.2 及び 2.6.3 に示す。

2.6.1.4.2 薬物動態プロファイル

Brigatinib の吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）を確認するため、マウス、ラット及びサルにおける一連の in vitro 試験及び in vivo 試験を実施した。これらの試験の結果を 2.6.4 及び 2.6.5 に示す。

2.6.1.4.3 安全性プロファイル

Brigatinib の非臨床安全性及び毒性プロファイルを明らかにするため、実験動物及び in vitro 試験系を用いた一連の毒性試験を実施した。これらの試験には、マウス及びラットを用いた単回投与毒性試験、ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験並びに *Salmonella*/*Escherichia coli*、培養ヒト末梢血リンパ球及びラットを用いた in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験が含まれる。また、ラットを用いた生殖発生毒性及び光毒性試験を実施した。主要な試験は全て、米国 FDA 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）の非臨床研究試験に関する規則（21 CFR 58）及び／又は欧州経済共同体指令、厚生労働省令（該当する改正を含む）を遵守して実施した。これらの試験の結果を 2.6.6 及び 2.6.7 に示す。

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 8
2.6.2.1 まとめ 8
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 10
2.6.2.2.1 Brigatinib の全般的なキナーゼ阻害プロファイル 10
2.6.2.2.2 Brigatinib の ALK 阻害活性 13
2.6.2.2.3 Brigatinib の ROS1 阻害活性 35
2.6.2.2.4 Brigatinib の EGFR 阻害活性 37
2.6.2.3 副次的薬理試験 43
2.6.2.3.1 その他のキナーゼに対する brigatinib の阻害活性及びオフターゲット候補 43
2.6.2.4 安全性薬理試験 45
2.6.2.4.1 心血管系 45
2.6.2.4.2 中枢神経系 46
2.6.2.4.3 テレメトリー装置を装着したカニクイザルにおける心肺評価 46
2.6.2.4.4 腎臓系 47
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 48
2.6.2.6 考察及び結論 48
2.6.2.6.1 考察 48
2.6.2.6.2 結論 55
2.6.2.7 参考文献一覧 56

表

表 2.6.2.2.1.1-1 93 種類のキナーゼに対する brigatinib の in vitro キナーゼ活性 11
表 2.6.2.2.1.1-2 14 種類の変異型 ALK に対する brigatinib の in vitro キナーゼ活性 12
表 2.6.2.2.2.1-1 ALK 陽性及び ALK 陰性 ALCL 細胞株の増殖に対する brigatinib、AP26123、クリゾチニブの作用 16
表 2.6.2.2.2.2-1 ALCL 細胞株における ALK リン酸化に対する bigatinib 及びクリゾチニブの作用 17
表 2.6.2.2.2.3-1 ALK 陽性及び ALK 陰性 NSCLC 細胞株の増殖に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用 17
表 2.6.2.2.2.4-1 NSCLC 細胞株における ALK リン酸化に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用 18
表 2.6.2.2.2.11-1 In vitro スクリーニングで同定された、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ、brigatinib への耐性をもたらす ALK の二次変異 25
表 2.6.2.2.2.12-1 EML4-ALK 及び 17 種類の付加変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞の生存に対する brigatinib、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの作用 28

表 2.6.2.2.2.13-1　EML4-ALK 及び付加変異型 EML4-ALK（L1196M、G1269S、S1206R）を発現する Ba/F3 腫瘍モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用 30
表 2.6.2.2.3.1-1　融合変異型 ROS1 を発現する Ba/F3 細胞の生存に対する brigatinib とクリゾチニブの作用 36
表 2.6.2.2.4.1-1　変異型 EGFR を発現する Ba/F3 細胞の生存に対する brigatinib とエルロチニブの作用 39
表 2.6.2.2.4.2-1　野生型又は変異型 EGFR を発現する NSCLC 細胞株の増殖及びシグナル伝達に対する brigatinib とエルロチニブの作用 40
表 2.6.2.4.3-1　雄性サルへの経口投与後の brigatinib 及び AP26123 の薬物動態パラメータ平均値 47
表 2.6.2.6.1.3-1　Brigatinib：in vitro キナーゼ及び細胞内阻害活性の総合要約 51
表 2.6.2.6.1.3-2　Brigatinib とクリゾチニブの臨床曝露量の要約 52

図

図 2.6.2.2.1.2-1　ALK キナーゼドメインと結合する brigatinib の結晶構造 13
図 2.6.2.2.2.5-1　KARPAS-299ALK 陽性 ALCL 異種移植モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用 19
図 2.6.2.2.2.6-1　KARPAS-299 ALCL 異種移植モデルにおける brigatinib 及びクリゾチニブの PK 及び PD 活性 20
図 2.6.2.2.2.7-1　H3122 ALK 陽性 NSCLC 異種移植モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib の作用 21
図 2.6.2.2.2.8-1　H3122 NSCLC 異種移植モデルにおける brigatinib の PK 及び PD 活性 22
図 2.6.2.2.2.9-1　H2228 ALK-陽性 NSCLC 異種移植モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用 23
図 2.6.2.2.2.10-1　ALK 陽性 NSCLC 腫瘍頭蓋内移植マウスの生存に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用 24
図 2.6.2.2.2.12-1　EML4-ALK 及び 17 種類の付加変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞の生存に対する brigatinib、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの作用の選択性 29
図 2.6.2.2.2.12-2　IC_{90} と蛋白結合の機能的影響で補正した「有効」Cmax（血漿中 TKI 濃度）の関連 29
図 2.6.2.2.2.14-1　EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞株を用いた腫瘍モデルにおける brigatinib 及びクリゾチニブの PK 及び PD 活性 31
図 2.6.2.2.2.15-1　EML4-ALK 及び G1202R 変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞株を用いた腫瘍モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib 及び他の ALK 阻害剤の作用 33
図 2.6.2.2.2.16-1　G1202R 変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞株を用いた腫瘍モデルにおける brigatinib 及び他の ALK 阻害剤の PK 及び PD 活性 35

図 2.6.2.2.3.2-1　CD74-ROS1 を発現する Ba/F3 細胞株を用いた腫瘍モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib とクリゾチニブの作用 37
図 2.6.2.2.4.3-1　HCC827 EGFR-Del NSCLC 異種移植片モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib の作用 41
図 2.6.2.2.4.4-1　HCC827 NSCLC 異種移植片モデルにおける EGFR リン酸化に対する brigatinib の作用 42
図 2.6.2.2.4.5-1　EGFR-L858R/T790M 患者由来異種移植片マウスモデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib とエルロチニブの作用 43

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
ADME	absorption, distribution, metabolism, excretion	吸収、分布、代謝、排泄
ALCL	Anaplastic large-cell lymphoma	未分化大細胞リンパ腫
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
AMP	adenosine 5'-monophosphate	アデノシン 5'-一リン酸
ASP	4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium	4-(4-ジメチルアミノスチリル)-N-メチルピリジニウム
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
A-to-B	apical-to-basolateral	頂端膜側から基底膜側
ATP	adenosine 5'-triphosphate	アデノシン 5'-三リン酸
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-24}	area under the plasma concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose	投与後 0 時間から 24 時間までの AUC
$AUC_{0-\infty}$	area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity	0 時間から無限大時間までの AUC
$AUC_{0-\tau}$	area under the plasma concentration-time curve over the dosing interval	投与間隔時間における AUC
AUC_{all}	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable time point or to the last time point that is below the limit of quantitation and assumed as zero for calculations	0 時間から最終測定可能時点又は定量下限未満を下回り計算上 0 と仮定される最終時点までの AUC
AUC_{last}	area under the plasma concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration above the lower limit of quantitation	0 時間から定量下限を上回る最終測定可能時点までの AUC
BA	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
BCRP	breast cancer resistance protein	-
BDC	bile duct-cannulated	胆管ろう形成
BSEP	bile salt export pump	-
B-to-A	basolateral-to-apical	基底膜側から頂端膜側
C2BBe1	human colon carcinoma cell line	ヒト結腸癌細胞株
Cave	average plasma concentration	平均血漿中濃度
CD74	Cluster of differentiation 74	分化抗原群 74
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	-
CL	clearance	クリアランス
CLh	hepatic clearance	肝クリアランス
CLint	intrinsic clearance	固有クリアランス
Cmax	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CsA	cyclosporine A	シクロスポリン A
CSR	clinical study report	治験総括報告書
CYP	cytochromes P450	チトクローム P450
DFG	Asp-Phe-Gly	-
DMPO	Dimethylphosphine oxide	ジメチルホスフィンオキシド

略号	略していない表現又は説明	
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	上皮成長因子受容体
EGFR-Del	EGFR (delE746_A750)	-
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
EML4	echinoderm microtubule-associated protein-like 4	棘皮動物微小管結合蛋白質様 4
EPAR	European Public Assessment Report	欧州公開医薬品審査報告書
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
EU	European Union	欧州連合
FDA	Food and Drug Administration	（米国）食品医薬品局
FIG	Fused In Glioblastoma	膠芽細胞腫における融合
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3	-
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue	消化管関連リンパ系組織
GeoMean	Geometric mean	幾何平均
GGT	Gamma glutamyltransferase	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
GI_{50}	growth inhibition 50%	細胞増殖を 50%阻害する濃度
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
GSH	glutathione	グルタチオン
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2	ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2
hERG	human ether-a-go-go Related Gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネル遺伝子
HNSTD	Highest-non-severely-toxic-dose level (in nonrodents)	（非げっ歯類において）重篤な毒性が発現しない最大投与量
HPLC	high pressure liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	Inhibitory concentration 50%	50%阻害濃度
IC_{90}	Inhibitory concentration 90%	90%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonization	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IGF-1	insulin-like growth factor 1	インスリン様成長因子 1
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	インスリン様成長因子 1 受容体
IL-3	Interleukin-3	インターロイキン 3
INSR	Insulin receptor	インスリン受容体
IV	intravenous	静脈内
KB/P	blood to plasma ratio	血液－血漿比
Km	Michaelis-Menten constant	ミカエリス・メンテン定数
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LD_{50}	Lethal dose eliciting 50% mortality	50%致死量
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーション計数
MATE	multidrug and toxic compound extrusion	-
MDCK	Madin-Darby canine kidney	Madin-Darby イヌ腎
MDR1	multi-drug resistance 1	多剤耐性遺伝子
MET	Hepatocyte growth factor receptor	肝細胞増殖因子の受容体チロシンキナーゼ

略号	略していない表現又は説明	
MPP+	methylphenylpyridinium	メチルフェニルピリジニウム
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MTD	Maximum Tolerated Dose	最大耐量
NA	Not applicable	該当せず
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NDA	New Drug Application	新薬承認申請
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	No-observed-effect level	無影響量
NPM	nucleophosmin	ヌクレオフォスミン
NSCLC	Non-small cell lung cancer	非小細胞肺癌
NTCP	sodium taurocholate cotransporting polypeptide	-
OAT	organic anion transporter	-
OATP	organic anion-transporting polypeptide	-
OCT	organic cation transporter	-
ORR	objective response rate	客観的奏効率
P-	Phosphorylated-	リン酸化-
P_{app}	apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
PD	Pharmacodynamic	薬力学
PFS	progression-free survival	無増悪生存期間
P-gp	permeability-glycoprotein	P-糖蛋白質
PK	pharmacokinetic	薬物動態
PO	oral	経口
QD	once daily	1日1回
QWBA	quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RBC	red blood cell	赤血球
RET	rearranged during transfection	-
rhCYP	recombinant human Cytochromes P450	遺伝子組換えヒトチトクロム P450
ROS	c-ros oncogene 1	c-ros がん遺伝子-1
SCID	Severe combined immunodeficient	重症複合免疫不全
SD	Standard deviation	標準偏差
SDC4	Syndecan 4	シンデカン 4
SDH	Sorbitol dehydrogenase	ソルビトール脱水素酵素
SEM	Standard error of the mean	平均の標準誤差
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	シグナル伝達兼転写活性化因子 3
STD10	Severely toxic dose eliciting ≥10% lethality (in rodents)	（げっ歯類において）供試動物の 10%以上に重篤な毒性が発現する用量
$t_{1/2}$	half-life	半減期
TDI	time-dependent inhibition	時間依存的阻害
TKI	Tyrosine kinase inhibitor	チロシンキナーゼ阻害剤
Tmax	time of maximum concentration	最高濃度到達時間
TPM3	tropomyosin 3	トロポミオシン 3
TRA	total radioactivity	総放射能

略号	略していない表現又は説明	
Tyr	tyrosine	チロシン
USPI	United States prescribing information	米国添付文書
Vd	volume of distribution	分布容積
Vmax	Maximum velocity	最大速度

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）の活性化型遺伝子再構成は、未分化大細胞リンパ腫（ALCL）患者で最初に特定され、非小細胞肺癌（NSCLC）患者の2～7%において発がんドライバーであることが明らかになっている[1][2]。ALK/ROS1/MET チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）であるクリゾチニブは、ALK 陽性 NSCLC で活性を示し、奏功率は 65-74%である[3][4]。しかし、大部分の患者は 1 年以内に進行が認められ（例えば、無増悪生存期間［PFS］中央値 8～11 ヵ月であるなど）[3][4]、複数の耐性機序が特定されている。

患者の約 30%で認められる ALK 依存性の耐性機序には、クリゾチニブ結合を抑制する ALK の二次変異の獲得、及び ALK 融合遺伝子の増幅がある。10 以上の ALK の二次変異が、患者のクリゾチニブ耐性と関連することが確認されており、最もよくみられるものが L1196M 及び G1269A である[5][6]。患者の約 50%では中枢神経系（CNS）が最初の進行部位であり[7][8]、このことは、これらの患者では脳内へのクリゾチニブの移行が不十分であること（すなわち、薬理作用不足）が、耐性の主要な原因であることを示唆している。さらに ALK とは独立した機序、例えば上皮増殖因子受容体（EGFR）、インスリン様成長因子 1 受容体（IGF-1R）、又は KIT を介したシグナル伝達経路も、クリゾチニブ耐性に寄与することが明らかになっている[5]。

近年、米国では第二世代 ALK 阻害剤であるセリチニブ及びアレクチニブの 2 剤が、クリゾチニブ治療歴のある ALK 陽性 NSCLC 患者への使用に対して迅速承認を受け、また欧州でもセリチニブ及びアレクチニブが、クリゾチニブ治療歴のある患者への使用に対して承認されている。非臨床試験では、セリチニブ及びアレクチニブは、クリゾチニブよりも ALK を強力に阻害し、クリゾチニブ耐性に関連する多くの二次変異に対する活性を維持することが示されている[9][10]。臨床では、セリチニブ及びアレクチニブは、ALK 二次変異の有無を問わず、クリゾチニブ治療歴のある患者の 49～58%に奏効をもたらす[11][12]。しかし、患者の大半は 1 年以内（PFS 中央値 6.9～8.9 ヵ月）に進行が認められ[14][15]、臨床的耐性に関連する ALK 二次変異（セリチニブで L1152R と F1174C/V、アレクチニブで I1171N/T/S、両剤で G1202R など）が同定されている[5][9][16][17][18][19]。

Brigatinib（AP26113）は、ARIAD 社の化学構造を基にした薬物設計プラットフォームを用いて、ALK キナーゼドメインの点突然変異を含めクリゾチニブ耐性に関連する機序を克服し、ALK の強力な選択的阻害剤となるよう設計された。Brigatinib はまた、ROS1 を強力に阻害し、IGF-1R に対する活性を示す。

Brigatinib の主要な薬力学的活性を評価するため、4 セットの試験を実施した。まず、brigatinib のキナーゼ選択性プロファイルを把握するために広範な in vitro スクリーニングを実施し、ALK と複合体を形成したときの brigatinib の結晶構造を明らかにした（2.6.2.2.1）。次に、一連の in vitro 及び in vivo 試験により brigatinib の抗 ALK（2.6.2.2.2）及び抗 ROS1（2.6.2.2.3）活性をそれぞれ評価した。これらの試験には、brigatinib によるキナーゼ標的阻害の機序、効力、特異性の評価を含めた。モデルとして NSCLC 及び ALCL 由来の細胞株や遺伝子操作した細胞株を用いた。多くの試験において対照薬としてクリゾチニブなどの ALK 阻害剤を用いた。Brigatinib は EGFR の特定の変異型も阻害するため、同様の試験を実施して抗 EGFR 活性を解析した（2.6.2.2.4）。Brigatinib の主要代謝物である AP26123 の活性も評価

した。さらに、brigatinib の副次的な薬力学的活性を評価するため類縁性の高いキナーゼである IGF-1R 及びインスリン受容体（INSR）に対する細胞アッセイでの効力評価など数試験を実施した（2.6.2.3）。最後に、一連の非臨床安全性薬理試験を実施した（2.6.2.4）。これらの試験の結果を以下に簡単にまとめる。

広範な in vitro スクリーニングにより、brigatinib は、野生型 ALK、融合型 ALK（すなわち、二次変異のない ALK）及び、キナーゼドメインに二次変異を持つ変異型 ALK を、非常に強力に阻害することが示された。Brigatinib は、ごく少数の別のキナーゼ（ROS1 など）に対して、in vitro で同様に強力な阻害活性を示した。

ALK 陽性 NSCLC 及び ALCL 細胞株を用いた一連の in vitro 及び in vivo 試験により、brigatinib は ALK の自己リン酸化、ALK 下流のシグナル伝達蛋白の活性化、ALK 活性化に関連した細胞・腫瘍の増殖を強力に阻害することが明らかになった。Brigatinib の作用強度はクリゾチニブを大きく上回った（細胞アッセイで約 10 倍）。同所性脳腫瘍モデルにおいても、その有効性はクリゾチニブよりも有意に大きかった。In vitro 及び in vivo アッセイにおいて、brigatinib はクリゾチニブや、セリチニブ、アレクチニブよりも二次耐性変異を起こしにくいことも判明した。検討した 17 種類の変異型の全てが brigatinib により阻害され、IC_{50} は 200 nmol/L 未満であった。In vitro アッセイにおいて、G1202R（3 つの承認済み ALK TKI に対する臨床的耐性に関連する変異）を含め、500 nmol/L の brigatinib に対し耐性をもたらすような ALK の変異は認められなかった。Brigatinib 及び 3 つの承認済み ALK TKI の臨床薬物動態学的パラメータと細胞アッセイで ALK を阻害するのに必要な薬物濃度との関連を検討するため、詳細な探索的解析を実施した。種々の評価により、brigatinib を 180 mg 投与した患者での定常状態の曝露量は、検討した全ての ALK 耐性の二次変異の阻害に必要な濃度を上回ることがわかった。これらの結果から、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブとは異なり、brigatinib は汎 ALK 阻害剤のプロファイルをもち、臨床的に達成可能な濃度において耐性をもたらしうる変異がないことが示された。

In vitro 及び in vivo アッセイにおいて、brigatinib は、ALK への阻害作用と同程度の ROS1（NSCLC 患者で認められる複数の融合変異型 ROS1 を含む）活性阻害を示すことが明らかになった。

In vitro 及び in vivo アッセイにおいて、brigatinib は NSCLC 患者に最も多い EGFR 活性化変異型（エクソン 19 の欠失を含む）のうち 1 つの変異型の活性化を阻害し、IC_{50} は 200 nmol/L 未満であった。しかし、T790M 耐性変異型 EGFR に対しては brigatinib による阻害の効力はあまり強力ではなかった。

細胞アッセイにおいて、brigatinib は IGF-1R を阻害したが（IC_{50} は 200 nmol/L 未満）、INSR は阻害しなかった。

In vitro アッセイにおいて、AP26123（brigatinib の主要代謝物）は、ALK、IGF-1R、INSR、EGFR、EGFR(L858R)、ErbB4/HER4、EGFR(L858R, T790M)、ErbB2/HER2 を、brigatinib と同程度かやや低い効力（5 倍以下）で阻害した。

安全性薬理試験には、in vitro hERG アッセイ、ラット腎・神経機能評価、サル心肺複合評価を含めた。これらの試験により、腎臓（腎機能低下）、心血管系（心拍数及び血圧の変化）、肺（呼吸数増加）が brigatinib の影響を受ける器官系であることが確認されている。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 Brigatinib の全般的なキナーゼ阻害プロファイル

Brigatinib のキナーゼ選択性プロファイルを把握するために広範な in vitro スクリーニングを実施した。300 種類以上の組換えキナーゼをスクリーニングの対象とし、そのうち約 10%には発がん活性化変異又は TKI の二次耐性変異が含まれた。

2.6.2.2.1.1 Brigatinib とその主要代謝物 AP26123 の in vitro キナーゼプロファイルの解析

添付資料番号：4.2.1.1-1（評価）

<u>試験デザイン</u>

大規模なプロテインキナーゼパネルを市販のサービス（[redacted]社による[redacted]サービス）を用いて実施し、放射測定法による結合試験により brigatinib の選択性プロファイルを評価した。本アッセイでは、組換えプロテインキナーゼを、様々な濃度の brigatinib の存在下または非存在下でペプチド基質及び ^{33}P-γ 標識 ATP とともにインキュベートした。規定のインキュベーション後、キナーゼ酵素活性に相当する放射性標識基質の量をフィルター捕捉により定量した。

4 つの解析は別々に実施した。まず、brigatinib 濃度 1 μmol/L のみを用いて 266 種類の固有のヒトキナーゼと 27 種類の変異型を加えた 293 種類の大規模なプロテインキナーゼパネルを解析した。次に、最初のアッセイで 90%以上阻害された酵素の全てと 75%以上阻害された酵素のほとんど及びその他キナーゼの合計 93 種類のキナーゼで追加の 2 つのアッセイを実施した。これらのアッセイでは、IC_{50} 値の算出に brigatinib の全濃度範囲を用いた。Brigatinib の主要代謝物 AP26123 をこれらのアッセイの 1 つに含め、一部のキナーゼに対するその効力を評価した。最後に、14 種類の他の変異型 ALK（キナーゼドメインに二次変異を有する 12 種類を含み、その大部分は過去にクリゾチニブに対する臨床的耐性と関連づけられている）を含むキナーゼパネルを 4 つ目のアッセイとして実施した。

<u>結果</u>

最初のスクリーニングで 1 μmol/L の brigatinib は 293 種類中 36 種類のキナーゼ（12%）を 90%以上、67 種類のキナーゼ（23%）を 75%以上阻害した。c-MET、Aurora B、Aurora C を含む 196 種類のキナーゼ（67%）の阻害率は 50%未満であった。

93 種類のキナーゼの詳細なスクリーニングでは（表 2.6.2.2.1.1-1）、1 種類のキナーゼ ALK（IC_{50} 0.6 nmol/L）の IC_{50} が 1 nmol/L 未満であった。EGFR（L858R）（1.5 nmol/L）、ROS1（1.9 nmol/L）、FLT3（2.1 nmol/L）を含む 11 種類のキナーゼの IC_{50} は 1～10 nmol/L であった。EGFR（L858R、T790M）（29 nmol/L）、EGFR（T790M）（56 nmol/L）、野生型 EGFR（67 nmol/L）、HER2（42 nmol/L）、RET（65 nmol/L）を含む 31 種類のキナーゼの IC_{50} は 10～100 nmol/L であった。残りの 50 種類のキナーゼは IC_{50} > 100 nmol/L であった。Brigatinib は構造的に相関性の高い 2 種類のキナーゼ IGF-1R（IC_{50} 73 nmol/L）及び INSR（IC_{50} 160 nmol/L）より、ALK に対する選択性が高いことが明らかになった。

AP26123 は、検討を行ったキナーゼ 8 種全て（ALK、IGF-1R、INSR、EGFR、EGFR(L858R)、ErbB4/HER4、EGFR(L858R, T790M)、ErbB2/HER2）を阻害し、IC_{50} 値は brigatinib と同程度か、わずかに低かった（5 倍以下）。

最後に、brigatinib は 2 種類の活性変異型 ALK（NPM1-ALK 融合型及び TPM3-ALK 融合型）及びキナーゼドメインに二次変異を有する 12 種類の変異型（L1196M 及び G1202R を含む）を強力に阻害し、IC_{50} は 0.5～4.9 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1.1-2）。

結論

Brigatinib は野生型及び変異型 ALK の in vitro キナーゼ活性を強力かつ選択的に阻害する薬剤である。ALK 及び変異型 EGFR に対する AP26123 の効力は brigatinib と同程度又はやや低かった。

表 2.6.2.2.1.1-1　93 種類のキナーゼに対する brigatinib の in vitro キナーゼ活性

IC_{50} ≦10 nmol/L		IC_{50}≦100 nmol/L		IC_{50} > 100 nmol/L			
キナーゼ	IC_{50} (nmol/L)	キナーゼ	IC_{50} (nmol/L)	キナーゼ	IC_{50} (nmol/L)	キナーゼ	IC_{50} (nmol/L)
ALK	0.6	RSK3	13	PHKg2	108	PKD2/PRKD2	285
FER	1.3	TYK1 / LTK	14	c-Kit (D816H)	111	c-Src	329
EGFR (L858R)	1.5	YES	19	LOK/STK10	123	BRSK1	338
FLT3 (D835Y)	1.5	RET (V804M)	22	BRSK2	125	FGFR3	358
ROS/ROS1	1.9	CLK1	23	MARK3	127	FMS	358
FLT3	2.1	PYK2/PTK2B/FAK2	24	MARK1	127	SIK2/SNF1KL2/QIK	466
FES/FPS	3.5	RSK2	26	FGFR1	128	FGR	492
FAK/PTK2	3.9	RET (V804L)	27	BLK	136	TAOK1	493
BRK	4.1	ErbB4/HER4	27	TSSK2	138	ABL1	500
STK22D	4.4	CAMKIId	29	Aurora A	146	LCK	512
CHK2 (I157T)	5.6	EGFR (L858R, T790M)	29	JAK2	154	PLK1	611
CHK2	6.5	CHK1	30	INSR	160	BTK	674
		RSK1	30	c-Src (T341M)	165	KDR/VEGFR2	816
		FGFR1 (V561M)	41	ABL1 (Q252H)	171	MELK	895
		RSK4/RPS6KA6	42	FGFR4	181	PKG1a	1012
		ErbB2/HER2	42	c-Kit (V560G)	195	MST1/STK4	1059
		IRR/INSRR	45	PKCmu/PKD1	197	TIE2/TEK	1123
		ARK5	47	FYN	198	NEK9	1146
		CAMKIIg	48	HCK	198	Aurora B	> 1000
		LRRK2	51	FGFR2 (N549H)	203	Aurora C	> 1000
		FRK/PTK5	52	MLK1/MAP3K9	218	c-MER	> 1000
		EGFR (T790M)	56	FGFR2	228	EPHA1	> 1000
		FLT4/VEGFR3	58	CLK2	240	EPHA7	> 1000
		RET	65	LYN	241	EPHB1	> 1000
		EGFR	67	ABL1 (T315I)	242	TRKB/NTRK2	> 1000
		IGF-1R	73				
		CAMKK2	82				
		c-Kit (D816V)	83				
		MNK1 (T385D)	88				
		MARK2 / PAR-1Ba	93				
		PKCnu/PKD3	95				

表 2.6.2.2.1.1-2　14 種類の変異型 ALK に対する brigatinib の in vitro キナーゼ活性

キナーゼ	IC_{50} (nmol/L)	キナーゼ	IC_{50} (nmol/L)
ALK-TPM3	1.9	ALK (T1151M)	0.5
ALK-NPM1	4.6	ALK (F1174S)	1.5
		ALK (T1151-L1152insT)	1.5
		ALK (L1152R)	1.7
		ALK (C1156Y)	2.1
		ALK (G1269S)	2.1
		ALK (F1174L)	2.1
		ALK (L1196M)	2.5
		ALK (S1206R)	2.8
		ALK (G1269A)	2.9
		ALK (R1275Q)	4.8
		ALK (G1202R)	4.9

注：キナーゼは IC_{50} の低い方から順に、組換え融合型を左側に、二次耐性変異を含む変異型 ALK を右側に示す。

2.6.2.2.1.2 Brigatinib 及び ALK キナーゼの X 線結晶構造解析

添付資料番号：4.2.1.1-2（参考）

試験デザイン

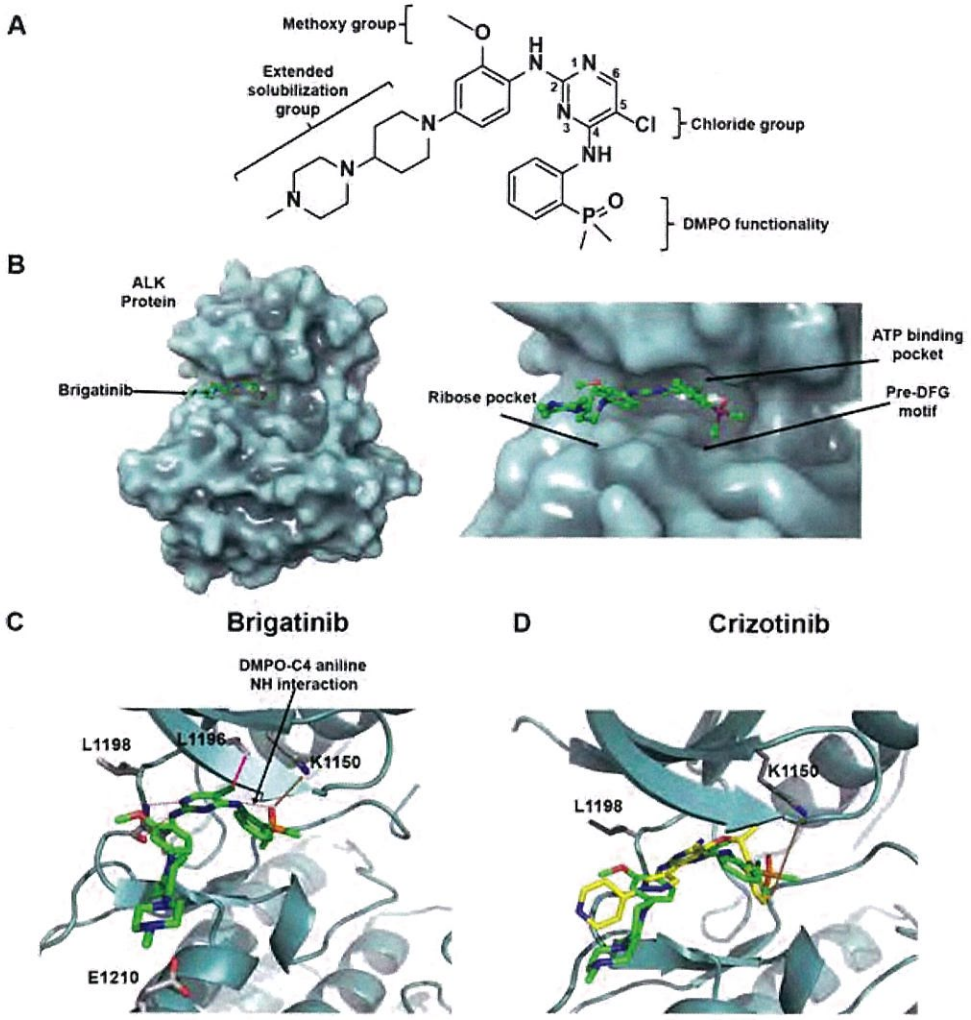
Brigatinib の強力な ALK 阻害活性に関する構造上の根拠を理解するため、野生型ヒト ALK 蛋白のキナーゼドメインと複合体を形成した brigatinib の結晶構造を 2Å の分解能で求めた。

結果

結晶構造から、brigatinib は ATP 結合部位で ALK と結合し、U 字型のリガンドコンフォメーションをとることがわかる（図 2.6.2.2.1.2-1）。ビスアニリノピリミジン母核を中心に構築される brigatinib には、ALK への親和性を高める化学的特性をいくつか備えており、その中には母核 2 位に置換したアニリンのベンゼン環上のメトキシ基や伸長した可溶性置換基、5 位に置換したクロロ基、4 位に置換したアニリンのベンゼン環上の特徴的なジメチルホスフィンオキシド（DMPO）基が含まれる。メトキシ基はヒンジ領域を構成する L1198 付近にある空間を占有し、伸長した可溶性置換基はリボース結合ポケットを占有し、αヘリックス D 上の他のアミノ酸残基（例えば、E1210）と相互作用する。母核 5 位上のクロロ基はゲートキーパーを構成する L1196 と相互作用する。DMPO 基は小型の pre-DFG（Asp-Phe-Gly）ポケットと相互作用し、また触媒性リジン（K1150）ともある程度相互作用する。さらに、DMPO 基と母核 4 位アニリン NH 間の分子内水素結合のために、brigatinib は単体でのコンフォメーションが ALK に対する結合コンフォメーションに近くなっており、そのため ALK との複合体形成時に比較的小さなエントロピーペナルティで済む可能性がある。他の ALK 阻害剤の X 線共結晶構造との比較により、brigatinib がクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブに対する耐性に関連する変異にも結合することが構造学的に説明できる。

結論

Brigatinib はヒト ALK 蛋白の ATP 結合部位に結合し、ALK 阻害剤としての高い薬効を説明しうる複数の分子相互作用を形成する。



(A)ビスアニリノピリミジン母核に結合している特長的な部分構造をハイライトした brigatinib の化学構造。(B)一部の結合部位をハイライトした brigatinib（緑）が結合した ALK 蛋白の solid-surface 表示。(C-D)brigatinib 単体（緑）での(C)またはクリゾチニブ（黄）との重ね合わせた ALK との共結晶構造(D)。ALK との結合に重要なアミノ酸残基を ALK 蛋白（シアン）構造上に図示。DMPO：ジメチルホスフィンオキシド基。

図 2.6.2.2.1.2-1　ALK キナーゼドメインと結合する brigatinib の結晶構造

2.6.2.2.2 Brigatinib の ALK 阻害活性

Brigatinib の ALK 阻害剤としての効力と有効性を評価するため、一連の in vitro 及び in vivo 試験を実施した。

癌由来細胞株を用いた brigatinib の ALK 阻害活性を評価する in vitro 試験

（2.6.2.2.2.1、2.6.2.2.2.2、2.6.2.2.2.3、2.6.2.2.2.4）

試験には、ALCL 細胞株又は NSCLC 細胞株の 2 種類の癌腫の細胞株モデルを用いた。用いた細胞株は ALCL 細胞株には NPM-ALK、NSCLC 細胞株には EML4-ALK の最も高い頻度で確認される ALK 融合変異型が含まれた。

これらの各モデルにおいて、brigatinib が ALK の活性に及ぼす影響を様々な方法で測定した。ALK 融合型は細胞増殖の重要なドライバーであるため、3 日間のアッセイで brigatinib が細胞増殖を 50%阻害する濃度（GI_{50}）（±標準偏差［SD］）を求めた。Brigatinib が ALK キナーゼ活性を阻害する能力をより直接的に評価するため、ALK チロシン（Tyr）1604（自己

リン酸化部位）のリン酸化を50%阻害する濃度（IC_{50}、±SD）を求めた。さらに、ALK下流のシグナル伝達蛋白（AKT及びSTAT3を含む）のリン酸化レベルを測定して、brigatinibがALKキナーゼ活性に及ぼす影響も評価した。最後に、その選択性を評価するため、brigatinibがALK陽性細胞に及ぼす影響をALK陰性細胞に及ぼす影響と比較した。総合すると、これらの試験によって、brigatinibによるALKキナーゼ阻害とその細胞増殖に対する影響との関連も評価することができた。

これらのbrigatinibのALK阻害活性とその選択性試験は全てクリゾチニブと比較した。Brigatinibの主要代謝物AP26123のALK阻害活性も同時に評価した。

癌由来細胞株を用いたbrigatinibのALK阻害活性を評価するin vivo試験

（2.6.2.2.2.5、2.6.2.2.2.6、2.6.2.2.2.7、2.6.2.2.2.8、2.6.2.2.2.9、2.6.2.2.2.10）

ALK陽性ALCL又はNSCLC細胞株を重症複合免疫不全（SCID）マウスの皮下に移植した3種類の異種移植モデルにおいて、brigatinibのin vivo活性を検討した。担癌マウスにbrigatinibを1日1回経口投与し、腫瘍増殖（平均腫瘍量±平均の標準誤差［SEM］）に対するbrigatinibの作用を溶媒投与マウスと比較検討した。抗腫瘍活性は腫瘍増殖率の低下（腫瘍増殖阻害）又は腫瘍サイズの縮小（腫瘍退縮）により明らかにし、統計学的有意性はDunnett検定により評価した。各用量レベルでのbrigatinibの忍容性もモニタリングした。3種類のうち2種類のモデルでは、brigatinibの薬力学的活性（ALK及び下流のシグナル伝達蛋白のリン酸化に対するbrigatinibの作用で測定）並びにbrigatinibの薬物動態／薬力学（PK/PD）的関連を検討した。これらの試験では、担癌マウス群にbrigatinibを単回又は反復経口投与し、最終投与後の様々な時点で安楽死させ、brigatinibの血漿中濃度、腫瘍におけるALK又は下流のシグナル伝達蛋白のリン酸化レベルを測定した。

ALK陽性NSCLC細胞株をマウス頭蓋内に移植した同所性脳腫瘍モデルにおいてもbrigatinibのin vivo活性を検討した。Brigatinibがマウスの生存及び脳の腫瘍量に及ぼす影響を溶媒投与マウスと比較検討した。

同所性脳腫瘍モデルを含めたこれら4つの試験でbrigatinibの作用をクリゾチニブと比較検討した。

これら全ての試験において、マウスにbrigatinib及びクリゾチニブを1日1回経口投与した。Brigatinibについては幅広い用量（5～75 mg/kg）を使用し、クリゾチニブについては、ALK陽性モデルで腫瘍退縮を誘発することが明らかになっている用量（25～200 mg/kg）を使用した[20][21]。

In vitro及びin vivoにおける遺伝子操作した細胞株を用いたbrigatinibのALK耐性変異克服能の評価並びにin vitroでの効力、臨床に基づくTKI血漿中濃度と臨床における薬効との関連性の検討

（2.6.2.2.2.11、2.6.2.2.2.12、2.6.2.2.2.13、2.6.2.2.2.14、2.6.2.2.2.15、2.6.2.2.2.16）

一連の6つのin vitro及びin vivo試験では、Ba/F3遺伝子操作細胞株系を用いて、TKI耐性に関連するキナーゼドメインに二次変異を含む変異型ALKに対するbrigatinibの活性を検討した。

Ba/F3細胞は、正常では増殖因子IL-3に依存して生存するマウスpro-B細胞である。ALK融合型を発現する遺伝子を導入すると、その細胞の形質転換が起こり、その結果IL-3の非存在下でも増殖が可能になる。これらの遺伝子操作したBa/F3細胞の生存はALK融合型の活性

に依存するため、TKI 活性は、3 日間の in vitro アッセイで細胞生存を 50%（IC_{50}）又は 90%（IC_{90}）阻害するのに必要な濃度を評価するか、又は細胞を皮下移植したマウスでの腫瘍増殖に対する影響を測定することによって評価することができる。

最初に、brigatinib 並びにクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブに対する耐性をもたらす ALK の二次変異のスクリーニングに Ba/F3 系を用いた。この in vitro 変異誘発スクリーニングでは、ALK 融合型を発現する Ba/F3 細胞を変異誘発物質に曝露させた後、様々な濃度の ALK TKI 存在下でインキュベートした。耐性に関連する変異を特定するため、TKI 曝露後に生存した細胞から ALK キナーゼドメインの配列を決定した。本解析の結果と患者における TKI に対する二次耐性変異を同定した文献レビューから、EML4-ALK と 17 種類の二次耐性変異型 EML4-ALK を含む 18 種類の Ba/F3 細胞株パネルを作製した。これらの細胞株を用いて、brigatinib、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブがそれら変異型 EML4-ALK の活性を阻害する効力を評価した。ALK 陰性 Ba/F3 細胞（すなわち、IL-3 存在下で増殖する「親」Ba/F3 細胞）を用いてこれらの作用の選択性を検討した。

Brigatinib および承認済み TKI であるクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブについて、細胞アッセイでキナーゼ活性を阻害するのに必要な濃度と、患者で達成される血中濃度との関連を調べ、EML4-ALK と種々の二次耐性変異型 ALK に対する承認済み TKI の臨床的有効性を加味し、brigatinib の臨床的有効性を予測するための探索的解析を行った。この解析では、患者で達成される TKI 濃度として様々な臨床的 PK パラメータ（例えば、Cmax や Cave）を用いた。承認済み TKI のクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの PK パラメータは公表データから得た。特に血漿蛋白結合が TKI 効力に及ぼす影響も考慮した。

最後に、これらの細胞株の一部を用いて、二次変異のない ALK 及び様々な変異型 ALK に対する brigatinib の in vivo 有効性を評価し、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブと比較検討した。PK/PD の関連も検討した。Brigatinib 及びクリゾチニブで用いた用量レベルは前述の範囲にある用量を使用した。セリチニブ（50 mg/kg）及びアレクチニブ（60 mg/kg）で用いた用量レベルは、ALK 陽性モデルにおいて腫瘍退縮を誘発することがこれまでに示されている[9][10]。

これらの試験について以下のセクションで要約する。

2.6.2.2.2.1 NPM-ALK 陽性 ALCL 細胞株の増殖に対する brigatinib、AP26123、クリゾチニブの作用

添付資料番号：4.2.1.1-3（参考）

<u>試験デザイン</u>

本試験では、5 種類の NPM-ALK 陽性 ALCL 細胞株（KARPAS-299、SU-DHL-1、DEL、L-82、SUP-M2）及び 1 種類の ALK 陰性 ALCL 細胞株（U-937）の増殖に対する brigatinib の作用を検討した。比較のため AP26123（brigatinib の主要代謝物）及びクリゾチニブも検討した。

<u>結果</u>

Brigatinib は 5 種類全ての ALK 陽性細胞株の増殖を強力に阻害し、GI_{50} は 9～31 nmol/L であった（表 2.6.2.2.2.1-1）。Brigatinib は ALK 陰性細胞株の増殖を阻害し、GI_{50} は 2,387 nmol/L であり、ALK 陽性細胞株に対して 78～271 倍の選択性を示した。

AP26123 も 5 種類全ての ALK 陽性細胞株の増殖を阻害したが、各細胞株の GI_{50}（21～41 nmol/L）は brigatinib よりも平均で約 2.5 倍高かった。

クリゾチニブは、いずれの場合にも brigatinib よりも約 10 倍高い（99～309 nmol/L）GI_{50} で 5 種類の ALK 陽性細胞株の増殖を阻害した。クリゾチニブは ALK 陰性細胞株の増殖を阻害し（GI_{50} は 928 nmol/L）、ALK 陽性細胞株に対して 3～9 倍高い選択性を示した。

結論

Brigatinib は ALK 陽性 ALCL 細胞株の増殖を強力かつ選択的に阻害し、クリゾチニブの約 10 倍の効力及び 10 倍の選択性を示した。AP26123 の ALK 陽性 ALCL 細胞株に対する効力は brigatinib よりも約 2.5 倍低かった。

表 2.6.2.2.2.1-1　ALK 陽性及び ALK 陰性 ALCL 細胞株の増殖に対する brigatinib、AP26123、クリゾチニブの作用

細胞株	ALK 状態	Brigatinib GI_{50} ± SD (nmol/L)	AP26123 GI_{50} ± SD (nmol/L)	クリゾチニブ GI_{50} ± SD (nmol/L)
KARPAS-299	NPM-ALK 融合	10.5 ± 1.5	25.7 ± 4.6	119 ± 22
SU-DHL-1	NPM-ALK 融合	8.8 ± 1.7	20.7 ± 3.8	99 ± 21
DEL	NPM-ALK 融合	30.8 ± 19.0	41.3 ± 31.5	309 ± 122
L-82	NPM-ALK 融合	10.1 ± 3.2	40.0	140 ± 49
SUP-M2	NPM-ALK 融合	15.0 ± 5.1	30.8 ± 8.5	139 ± 3.8
U-937	ALK 陰性	2387 ± 400	2540 ± 446	928 ± 155

2.6.2.2.2.2 NPM-ALK 陽性 ALCL 細胞株におけるシグナル伝達に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用

添付資料番号：4.2.1.1-4（参考）

試験デザイン

5 種類の NPM-ALK 陽性 ALCL 細胞株及び 1 種類の ALK 陰性 ALCL 細胞株において、ALK リン酸化及び ALK の下流のシグナル伝達に対する brigatinib の作用を検討した。比較のためクリゾチニブも検討した。

結果

Brigatinib は、KARPAS-299、SU-DHL-1、DEL、L-82、SUP-M2 細胞において ALK リン酸化を阻害し、IC_{50} はそれぞれ、3.2、1.5、6.6、2.1、12 nmol/L であった（表 2.6.2.2.2.2-1）。一方、クリゾチニブは、KARPAS-299 及び SU-DHL-1 細胞において、それぞれ、33 nmol/L、23 nmol/L の IC_{50} で阻害した。KARPAS-299 及び SU-DHL-1 細胞においては、brigatinib 及びクリゾチニブによる ALK の阻害に伴い、ERK、AKT、STAT3、S6 リン酸化も大きく阻害された。しかし、ALK の阻害の場合と同様、brigatinib による阻害の IC_{50} はクリゾチニブよりも約 10 倍低かった。Brigatinib は ALK 陰性 ALCL 細胞株におけるシグナル伝達に影響を及ぼさなかった。

結論

ALK 陽性 ALCL 細胞モデルにおいて、brigatinib は ALK リン酸化及び下流のシグナル伝達を強力に阻害した。シグナル伝達の阻害で測定される brigatinib の効力はクリゾチニブよりも約 10 倍高かった。

表 2.6.2.2.2.2-1　ALCL 細胞株における ALK リン酸化に対する bigatinib 及びクリゾチニブの作用

細胞株	Brigatinib IC_{50} ± SD (nmol/L)	クリゾチニブ IC_{50} ± SD (nmol/L)
KARPAS-299	3.2 ± 2.8	33 ± 15
SU-DHL-1	1.5 ± 1.3	23 ± 13
DEL	6.6 ± 3.18	ND
L-82	2.1 ± 0.52	ND
SUP-M2	12 ± 11.95	ND

ND：測定せず。

2.6.2.2.2.3 EML4-ALK 陽性 NSCLC 細胞株の増殖に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用

添付資料番号：4.2.1.1-5（参考）

試験デザイン

本試験では、2 種類の EML4-ALK 陽性（H3122、H2228）NSCLC 細胞株及び 2 種類の ALK 陰性（H23、H838）NSCLC 細胞株の増殖に対する brigatinib の作用を検討した。比較のためクリゾチニブも検討した。

結果

Brigatinib は両方の ALK 陽性細胞株の増殖を強力に阻害し、GI_{50} は 4.2、10.1 nmol/L であった（表 2.6.2.2.2.3-1）。また、ALK 陰性細胞株の増殖も阻害した（GI_{50} は 1,337、503 nmol/L）ことから、ALK 陽性細胞株に対して 50～318 倍高い選択性を示した。クリゾチニブは同じ 2 種類の ALK 陽性細胞株の増殖を阻害し、いずれの場合にも GI_{50} は brigatinib よりも少なくとも 10 倍高かった（61.5～121 nmol/L）。また、ALK 陰性細胞株の増殖を阻害した（GI_{50} は 1,773、1,307 nmol/L）ことから、ALK 陽性細胞株に対して 11～29 倍高い選択性を示した。Brigatinib 及びクリゾチニブは H2228 細胞の足場非依存性増殖を阻害した（IC_{50} はそれぞれ、2.4、86.7 nmol/L）。

結論

Brigatinib は ALK 陽性 NSCLC 細胞株の増殖を強力かつ選択的に阻害し、クリゾチニブよりも約 10 倍高い効力及び高い選択性を示した。

表 2.6.2.2.2.3-1　ALK 陽性及び ALK 陰性 NSCLC 細胞株の増殖に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用

細胞株	ALK 状態	Brigatinib GI_{50} ± SD (nmol/L)	クリゾチニブ GI_{50} ± SD (nmol/L)
H3122	EML4-ALK 融合	4.2 ± 1.2	61.5 ± 18.2
H2228	EML4-ALK 融合	10.1 ± 6.8	121 ± 61
H23	ALK 陰性	1337 ± 875	1773 ± 743
H838	ALK 陰性	503 ± 400	1307 ± 270

2.6.2.2.2.4 EML4-ALK 陽性 NSCLC 細胞株におけるシグナル伝達に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用

添付資料番号：4.2.1.1-6（参考）

試験デザイン

2 種類の EML4-ALK 陽性（H3122、H2228）NSCLC 細胞株及び 1 種類の ALK 陰性（H23）NSCLC 細胞株において、ALK リン酸化及び ALK の下流のシグナル伝達に対する brigatinib の作用を検討した。

結果

Brigatinib は H3122 及び H2228 細胞において ALK のリン酸化を阻害し、IC_{50} はそれぞれ、3.7 nmol/L、4.5 nmol/L であった（表 2.6.2.2.2.4-1）。一方、クリゾチニブは H3122 及び H2228 細胞において ALK のリン酸化を阻害し、IC_{50} はそれぞれ、43 nmol/L、55 nmol/L であった。Brigatinib 及びクリゾチニブによる ALK 阻害に伴い、ALK 陽性細胞株における ERK、AKT、S6 リン酸化も大きく阻害された。しかし、ALK の阻害の場合と同様、brigatinib による阻害の IC_{50} はクリゾチニブよりも約 10 倍低かった。Brigatinib は ALK 陰性 NSCLC 細胞株（H23）におけるシグナル伝達に影響を及ぼさなかった。

結論

Brigatinib は ALK 陽性 NSCLC 細胞モデルにおける ALK リン酸化を強力に阻害し、下流のシグナル伝達を阻害した。シグナル伝達の阻害で測定される brigatinib の効力はクリゾチニブよりも約 10 倍高かった。

表 2.6.2.2.2.4-1　NSCLC 細胞株における ALK リン酸化に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用

細胞株	Brigatinib IC_{50} ± SD (nmol/L)	クリゾチニブ IC_{50} ± SD (nmol/L)
H3122	3.7 ± 1.6	43 ± 37
H2228	4.5 ± 2.2	55 ± 4.0

2.6.2.2.2.5 KARPAS-299 ヒト ALCL 細胞株を用いた皮下異種移植モデルにおける brigatinib 及びクリゾチニブの経口投与有効性試験

添付資料番号：4.2.1.1-7（参考）

試験デザイン

本試験では、NPM-ALK 発現ヒト ALCL 細胞株である KARPAS-299 細胞を用いて、マウス異種移植モデルにおける brigatinib の有効性をクリゾチニブと比較検討した。SCID マウスに細胞を皮下注射して腫瘍を形成させ、この担癌マウスに溶媒、brigatinib（10、25、50 mg/kg）又はクリゾチニブ（25、50、100 mg/kg）を 1 日 1 回連続 14 日間経口投与した。

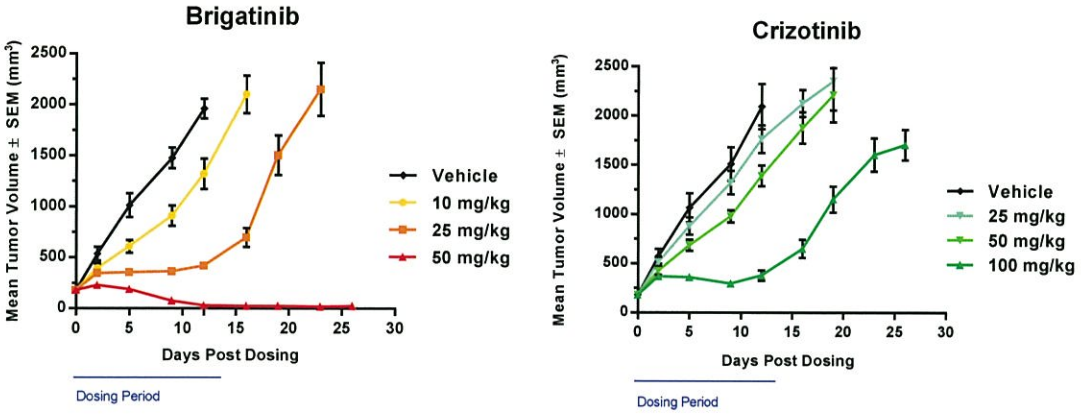
結果

腫瘍増殖に対する brigatinib の用量依存性の作用が認められ、全ての用量レベルで統計学的に有意な阻害が得られた（$p<0.001$）（図 2.6.2.2.2.5-1）。溶媒投与マウスと比較して、10 及び 25 mg/kg の brigatinib は腫瘍増殖をそれぞれ、36%、87%阻害した。50 mg/kg では、brigatinib は 84%の腫瘍退縮をもたらし、退縮は投与終了後 13 日以上維持された。これに対して、クリゾチニブでは 25、50、100 mg/kg で腫瘍増殖がそれぞれ、17%、37%、90%の阻害作用を示

すにとどまった。本試験で用いた全ての用量レベルが良好に忍容され、一般状態悪化又は薬剤関連死亡は認められなかった。

結論

NPM-ALK 依存性の KARPAS-299 ALCL 異種移植モデルにおいて、brigatinib の経口投与は腫瘍増殖を効果的に抑制し、腫瘍退縮を誘導した。



Values are mean ± SEM

図 2.6.2.2.2.5-1　KARPAS-299ALK 陽性 ALCL 異種移植モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用

2.6.2.2.2.6 KARPAS-299 ヒト ALCL 細胞株を用いた皮下異種移植モデルにおける brigatinib 及びクリゾチニブの反復投与 PK/PD 試験

添付資料番号：4.2.1.1-8（参考）

試験デザイン

本試験では、KARPAS-299 ALCL 異種皮下移植モデルにおける brigatinib 及びクリゾチニブの薬物動態学的及び薬力学的活性を検討した。担癌 SCID マウスに brigatinib（10、25、50 mg/kg）又はクリゾチニブ（25、50、100 mg/kg）を 1 日 1 回連続 4 日間経口投与した。最終投与後の様々な時点で brigatinib 又はクリゾチニブの血漿中濃度（2、6、10、16、24 時間後）及び腫瘍の ALK リン酸化レベル（p-ALK；Tyr1604）（2、10、24 時間後）を測定した。

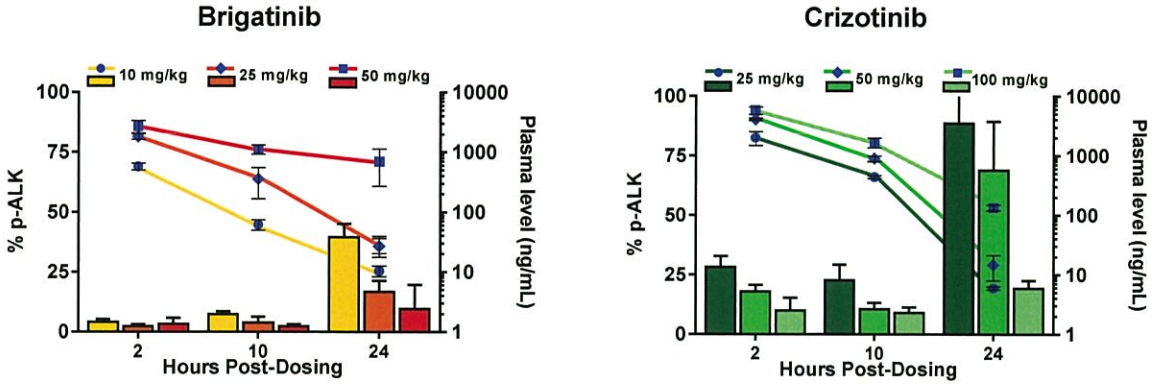
結果

Brigatinib とクリゾチニブの両方で、血漿中薬物濃度及び腫瘍の ALK 阻害レベルに用量依存性の増加が認められた（図 2.6.2.2.2.6-1）。10、25、50 mg/kg の brigatinib で投与 2 時間後に検出された最高濃度はそれぞれ、579、1,829、2,731 ng/mL、AUC は 3,039、11,827、26,211 ng·hr/mL であった。溶媒投与マウスと比較して、briganitib の 3 用量全てにおいて投与 2 及び 10 時間後に 90%を上回る p-ALK 阻害が認められた。投与 24 時間後、p-ALK レベルは 10、25、50 mg/kg 群でそれぞれ、60%、83%、90%阻害された。25 及び 50 mg/kg のクリゾチニブの血漿中濃度（2 時間後及び AUC）は同用量の brigatinib の濃度と同等であった（投与 2 時間後のレベルはそれぞれ、2,000、4,049 ng/mL）。しかし、腫瘍における p-ALK 阻害の程度は brigatinib よりも低かった（投与 24 時間後 11%、31%）。概して、クリゾチニブ 100 mg/kg

投与マウスの解析を含め、腫瘍における p-ALK の同程度の阻害レベルを達成するには、クリゾチニブの血漿中濃度は brigatinib の少なくとも 3～8 倍高い必要があった。

結論

これらの試験で、KARPAS-299 ALCL 腫瘍細胞移植マウスへの brigatinib 経口投与は、腫瘍における ALK リン酸化の用量依存性の阻害を誘導し、その効力はクリゾチニブを上回ることが示された。



Values are mean ± SD

図 2.6.2.2.2.6-1　KARPAS-299 ALCL 異種移植モデルにおける brigatinib 及びクリゾチニブの PK 及び PD 活性

2.6.2.2.2.7 H3122 ヒト NSCLC 細胞株を用いた皮下異種移植モデルにおける brigatinib の経口投与有効性試験

添付資料番号：4.2.1.1-9（評価）

試験デザイン

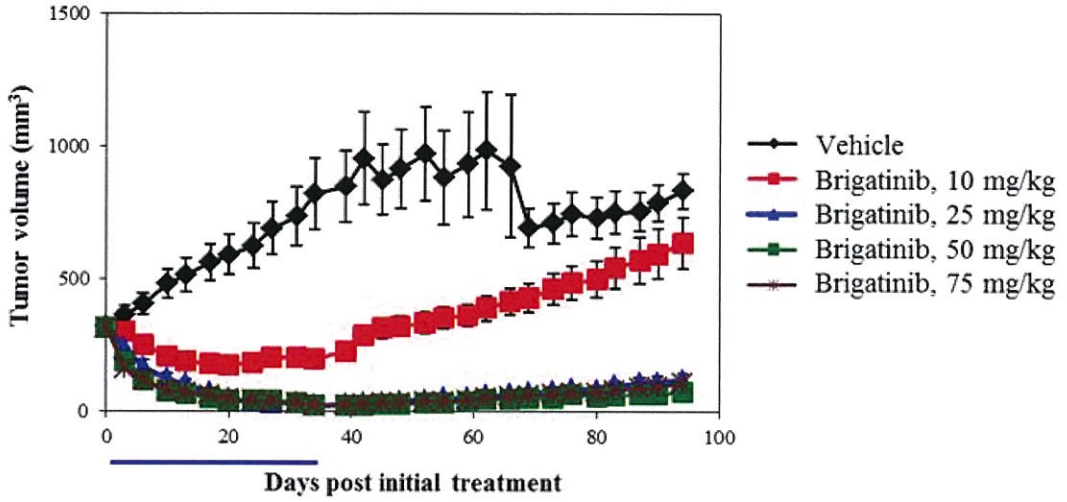
本試験では、EML4-ALK 発現ヒト NSCLC 細胞株である H3122 細胞を用いて、マウス異種移植モデルにおける brigatinib の有効性を評価した。SCID マウスに細胞を皮下注射して腫瘍を形成させ、この担癌マウスに溶媒又は brigatinib（10、25、50、75 mg/kg）を 1 日 1 回連続 35 日間経口投与した。

結果

Brigatinib は用量依存性の腫瘍増殖阻害を誘導し、全ての用量レベルで有意な腫瘍退縮（$p<0.01$）を達成した（図 2.6.2.2.2.6-1）。投与前の腫瘍サイズと比較して、腫瘍サイズは 10 mg/kg で 36%、25、50、75 mg/kg で 90%を上回り縮小した。25 mg/kg 以上の群で腫瘍退縮は投与終了後少なくとも 60 日間維持された。本試験で用いた全ての用量レベルは良好な忍容性を示し、一般状態悪化又は薬剤関連死亡は認められなかった。

結論

EML4-ALK 依存性の H3122 NSCLC 異種移植モデルにおいて、brigatinib の経口投与は腫瘍増殖を効果的に抑制し、腫瘍退縮を誘導した。



The dosing period is indicated with a blue bar. Values are mean ± SEM

図 2.6.2.2.2.7-1　H3122 ALK 陽性 NSCLC 異種移植モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib の作用

2.6.2.2.2.8 H3122 ヒト NSCLC 細胞株を用いた皮下異種移植モデルにおける brigatinib の単回投与 PK/PD 試験

添付資料番号：4.2.1.1-10（参考）

試験デザイン

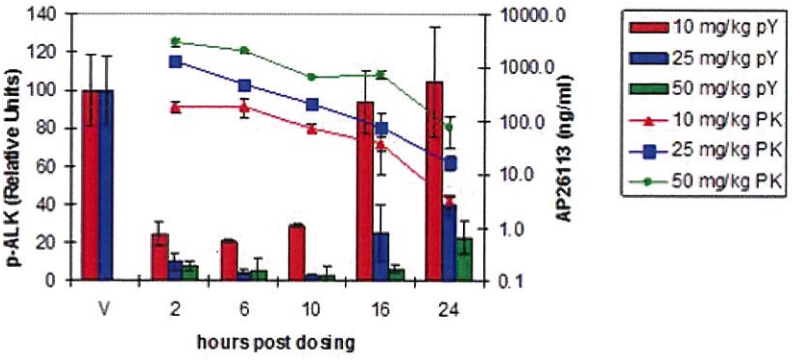
H3122 腫瘍異種移植マウスに brigatinib（10、25、50 mg/kg）を単回経口投与した。投与後様々な時点（2、6、10、16、24 時間後）で、brigatinib の血漿中濃度及び腫瘍における ALK リン酸化（p-ALK）レベルを測定した。

結果

10、25、50 mg/kg で検出された brigatinib の最高濃度（いずれも投与 2 時間後）はそれぞれ、231、1,220、2,953 ng/mL、AUC は 2,246、7,006、25,317 ng·hr/mL であった。10 mg/kg の brigatinib は、投与 2、6、10 時間後に腫瘍における p-ALK を少なくとも 75%阻害したが、25 及び 50 mg/kg では同時点で 90%を上回り阻害した（図 2.6.2.2.2.8-1）。投与 24 時間後、p-ALK は 10、25、50 mg/kg によりそれぞれ、11、66、81%阻害され、brigatinib の血漿中濃度はそれぞれ、3.2、21.9、94 ng/mL であった。これに付随して、ALK 下流のシグナル伝達蛋白（ERK、AKT、STAT3、S6）のリン酸化の低下も認められた。

結論

H3122 NSCLC 腫瘍細胞移植マウスへの brigatinib の経口投与は、腫瘍における ALK 及び下流のシグナル伝達蛋白のリン酸化を用量依存性に阻害した。Brigatinib の血漿中濃度は標的阻害の程度と正の相関を示した。



Values are mean ± SD

図 2.6.2.2.2.8-1　H3122 NSCLC 異種移植モデルにおける brigatinib の PK 及び PD 活性

2.6.2.2.2.9 H2228 ヒト NSCLC 細胞株を用いた皮下異種移植モデルにおける brigatinib 及びクリゾチニブの経口投与有効性試験

添付資料番号：4.2.1.1-11（参考）

試験デザイン

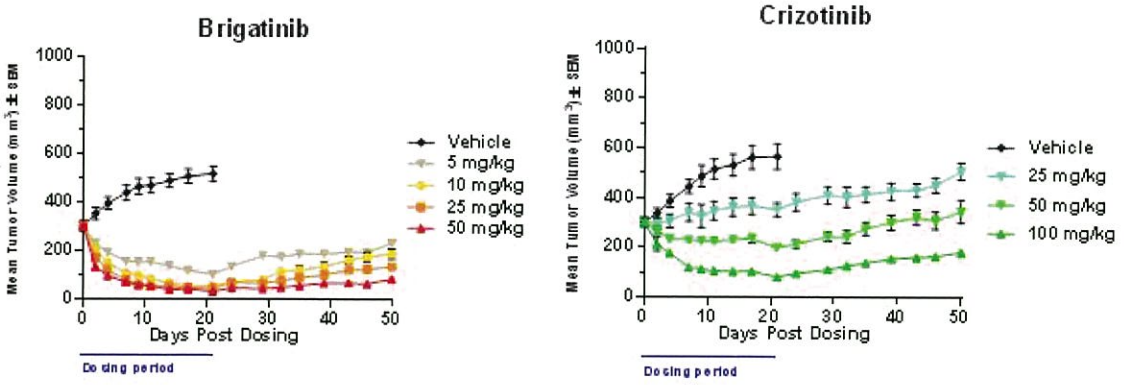
本試験では、EML4-ALK 発現ヒト NSCLC 細胞株である H2228 細胞を用いて、マウス異種移植モデルにおける brigatinib とクリゾチニブの有効性を比較検討した。SCID マウスに細胞を皮下注射して腫瘍を形成させ、この担癌マウスに溶媒、brigatinib（5、10、25、50 mg/kg）又はクリゾチニブ（25、50、100 mg/kg）を 1 日 1 回連続 21 日間経口投与した。

結果

Brigatinib は腫瘍増殖に対して用量依存性の阻害を誘発し、全ての用量レベルで有意な腫瘍退縮（$p<0.001$）を達成した（図 2.6.2.2.2.9-1）。溶媒投与マウスと比較して、brigatinib は 5、10、25、50 mg/kg で 66%、82%、85%、89%の腫瘍退縮をもたらした。全用量群で腫瘍退縮は投与終了後少なくとも 25 日間維持された。クリゾチニブも腫瘍増殖に対して用量依存性の作用を示したが、効力及び有効性は brigatinib よりも低かった。クリゾチニブは 25 mg/kg で腫瘍増殖を 80%阻害し、50 及び 100 mg/kg でそれぞれ、34%、73%の腫瘍退縮を示した。本試験で用いた全ての用量レベルは良好な忍容性を示し、一般状態悪化又は薬剤関連死亡は認められなかった。

結論

EML4-ALK 依存性の H2228 NSCLC 異種移植モデルにおいて、brigatinib の経口投与は、腫瘍増殖を効果的に抑制し、腫瘍退縮を誘導した。



Values are mean ± SEM

図 2.6.2.2.2.9-1　H2228 ALK-陽性 NSCLC 異種移植モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用

2.6.2.2.2.10 H2228 ヒト NSCLC 細胞株を用いた同所性脳腫瘍モデルにおける brigatinib とクリゾチニブを比較する経口投与有効性試験

添付資料番号：4.2.1.1-12（参考）

試験デザイン

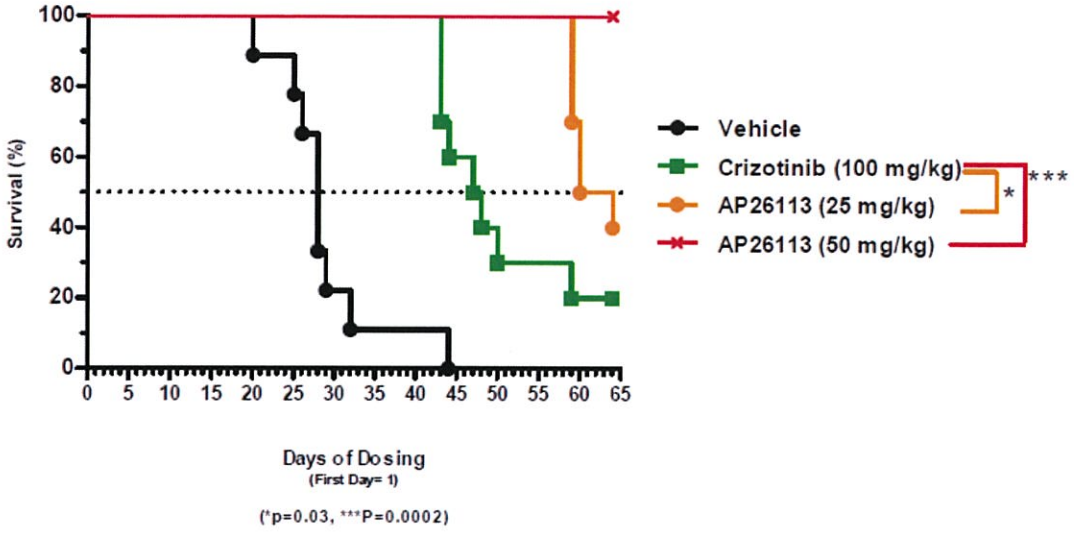
本試験では、同所性脳腫瘍マウスモデルにおける brigatinib とクリゾチニブの有効性を比較検討した。EML4-ALK 発現ヒト NSCLC 細胞株である H2228 細胞を用いて、SCID マウスに頭蓋内腫瘍を形成させた。この担癌マウスに溶媒、brigatinib（25、50 mg/kg）又はクリゾチニブ（100 mg/kg）を 1 日 1 回最長で連続 64 日間経口投与した。

結果

Brigatinib 投与マウスでは、溶媒（$p<0.0001$）又はクリゾチニブ（$p<0.05$ 以下）投与マウスと比較して、どちらの用量においても有意な用量依存性の生存期間延長が認められた（図 2.6.2.2.2.10-1）。溶媒投与マウスと比較して、25 mg/kg の brigatinib 投与により生存期間中央値は 28 日から 62 日に延長し、50 mg/kg の brigatinib により 64 日を超えた（試験終了時点［投与 64 日後］で 10 匹全てが生存）。一方、100 mg/kg のクリゾチニブ投与群における生存期間中央値は 47.5 日であった。死後組織学的評価により、50 mg/kg の brigatinib 投与群ではクリゾチニブ投与群と比較して、脳腫瘍量の有意な減少が認められた。本試験で用いた化合物及び用量レベルは全て、良好な忍容性を示し、薬剤関連死亡は認められなかった。

結論

本試験により、EML4-ALK 依存性の NSCLC 同所性脳腫瘍モデルにおいて、brigatinib の経口投与は、腫瘍増殖を効果的に抑制し、生存期間を延長することが示された。



Statisical significance for each comparison was tested using a Long-ranl Mantel-Cox Test.
P<0.05

図 2.6.2.2.2.10-1　ALK 陽性 NSCLC 腫瘍頭蓋内移植マウスの生存に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用

2.6.2.2.2.11 クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ、brigatinib への耐性をもたらす ALK の二次変異の in vitro 評価

添付資料番号：4.2.1.1-13（参考）

試験デザイン

これまで、12 種類のアミノ酸残基（G1123、T1151、L1152、C1156、I1171、F1174、L1196、G1202、D1203、S1206、F1245、G1269）での 17 種類以上の特有の ALK 二次変異がクリゾチニブ及び第二世代 ALK チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）のセリチニブ及びアレクチニブに対する臨床的耐性と関連付けられてきた[5][9][16][17][18][19][22]。Brigatinib 及びクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブに対する耐性に関連する可能性のある新しい変異を同定するため、in vitro 変異誘発スクリーニングを実施した。このために、その生存が EML4-ALK 遺伝子の活性のみに生存が依存する Ba/F3 細胞株を作製した。次に大規模な細胞プールを DNA 修飾剤に曝露させ、一般的な変異型プールを作製した後、クリゾチニブの 4 種類の濃度（500、750、1,000、1,500 nmol/L）及びより強力な ALK 阻害剤であるセリチニブ、アレクチニブ、brigatinib の 5 種類の濃度（100、200、500、1,000、1,500 nmol/L）に曝露させた。細胞増殖をモニタリングし、各 TKI への曝露から生き延びた細胞から ALK キナーゼドメインの配列を決定した。本試験は 2 回実施し、解析には統合した結果を用いた。

結果

Brigatinib は 500 nmol/L の濃度であらゆる変異型の発現を抑制するのに十分であったが、他の 3 つの TKI はいずれも、変異型発現抑制のためにはより高い濃度（1,000 又は 1,500 nmol/L）を必要とした（表 2.6.2.2.2.11-1）。検討した brigatinib の濃度の中で次に高い濃度（200 nmol/L）の存在下で生存した全てのクローンには、E1210K を除き、他の ALK TKI への耐性をもたらす変異（F1174、L1196、S1206）が含まれた。最高濃度のクリゾチニブ（1,000 nmol/L）、セ

リチニブ（500 nmol/L）、アレクチニブ（1,000 nmol/L）に抵抗できる変異はそれぞれ、L1196M、L1198F、I1171N であった。

全体的に、本スクリーニングでは 3 種類のアミノ酸での変異（E1210K、L1198F、V1180L）が同定されたが、これらはこれまで臨床的耐性と関連付けられていなかった。

結論

本 in vitro アッセイの条件下では、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブに強い抵抗性を示す変異を含め、500 nmol/L の brigatinib への曝露から生存可能な ALK の二次変異は同定されなかった。

表 2.6.2.2.2.11-1　In vitro スクリーニングで同定された、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ、brigatinib への耐性をもたらす ALK の二次変異

TKI	濃度 (nmol/L)	検出された ALK 変異
クリゾチニブ	500	I1171T/S, F1174C/I/L, S1206A, T1151K, L1196M, F1245C, G1269A
	750	I1171T/N, F1174V/C, C1156Y, L1196M
	1000	L1196M
	1500	なし
セリチニブ	100	S1206A, F1174C/V, T1151K, C1156Y, L1198F
	200	F1174C/V/I, S1206A, L1198F
	500	L1198F
	1000	なし
	1500	なし
アレクチニブ	100	I1171S/T/N, F1174V
	200	I1171N/S/T, L1196M
	500	I1171N/S, V1180L, L1196M
	1000	I1171N
	1500	なし
Brigatinib	100	S1206A, F1174C/V/I/L, I1171N, E1210K
	200	F1174V/C/I, S1206A, E1210K, L1196M
	500	なし
	1000	なし
	1500	なし

2.6.2.2.2.12 EML4-ALK 及び 17 種類の耐性付加変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞の生存に対する brigatinib とクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの作用の比較

添付資料番号：4.2.1.1-14（参考）

試験デザイン

本試験では、EML4-ALK、及び TKI 耐性に関連してキナーゼドメインに二次変異を有する 17 種類の変異型 EML4-ALK に対する brigatinib の細胞活性を検討した。これら 18 種類の変異型 ALK を Ba/F3 細胞内に遺伝子導入し、brigatinib がそれらの生存を阻害する効力（IC_{50} 及び IC_{90}）を評価した。未形質転換 Ba/F3 細胞を用いて、生存に対する非特異的な影響を評価した。比較のため、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブも並行して検討した。

TKI 単剤の in vitro データを用いた臨床的効力を評価するための適切に構築された方法はなく、ましてや複数の TKI を比較解析するための方法はないため、いくつかの方法を系統的に用いて結果を探索的に解析した。まず、IC_{50} 及び IC_{90} の絶対値比較に基づき、各 TKI が各変異型 ALK を阻害する効力を評価した。次に、1 つの TKI がそれぞれの変異型 ALK を阻害す

る効力を、ALK 非依存性生存を示す Ba/F3 細胞親株を阻害する効力と比較し、効力の選択性を評価した。さらに、臨床第 2 相試験で承認又は推奨された用量で、患者において到達すると報告された曝露レベルに対する TKI の効力を検討した。本解析のため、定常状態の血漿で認められた最高曝露レベル（Cmax）と平均曝露レベル（Cave；AUC/投与間隔）に基づき、患者の曝露レベルの複数の平均値を評価した。

- 総 Cmax 及び Cave
- 遊離 Cmax 及び Cave
  - ヒト血漿蛋白に結合しない Cmax 及び Cave
- 「有効」Cmax 及び Cave
  - 蛋白結合の機能的影響で補正した Cmax 及び Cave である。蛋白結合の機能的影響は、細胞アッセイでヒト血漿蛋白の生理的レベルが TKI の有効性に及ぼす影響を評価することで実験的に求めた。蛋白結合の機能的影響で「補正」するため、ヒト血漿蛋白の存在下での IC_{50} の変化倍率を用いた。例えば、ヒト血漿蛋白の存在下で IC_{50} が 2 倍高い場合、TKI の「有効」Cmax は、血漿で測定された総 Cmax よりも 2 倍低いと計算した。

3 つ全ての承認済み ALK TKI について、これら 6 つの薬物動態学的パラメータが以下の 2 条件に適合できるかどうかを系統的に検討した。

- 最も重要なことは、EML4-ALK に対するクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの臨床的有効性が十分に確定しているため、患者におけるこれらの TKI 曝露を適切に表せば、EML4-ALK の in vitro IC_{50} 及び／又は IC_{90} を上回るはずであるという点である。
- クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブに対する複数の臨床的二次耐性変異型が本解析対象に含まれており、患者における TKI 曝露を適切に表せば、このような二次耐性変異型の in vitro IC_{50} 及び IC_{90} よりも概ね下回るはずであると考えられた。

これらの解析は brigatinib についても実施し、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの結果と比較した。

<u>結果</u>

Brigatinib は EML4-ALK を阻害した（IC_{50} は 14 nmol/L）（表 2.6.2.2.2.12-1）。クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブはいずれも、EML4-ALK を阻害したが、その効力は brigatinib よりも低かった（IC_{50} はそれぞれ、107、37、25 nmol/L）。Brigatinib は 17 種類の変異型 ALK を阻害した（IC_{50} は 9～184 nmol/L）。クリゾチニブは全ての変異型を阻害したが、効力は L1198F 以外は brigatinib よりもかなり（2.2～77 倍）低かった。Brigatinib は 5 及び 6 種類の変異型に対し、それぞれ、セリチニブ及びアレクチニブよりも少なくとも 3 倍高い効力を示した。セリチニブとアレクチニブはいずれも、検討した 17 種類の変異型に対する効力が brigatinib の 2 倍以上上回ることはなかった。IC_{90} の比較によっても同様の結果が得られた（表 2.6.2.2.2.12-1）。

Brigatinib は EML4-ALK を阻害し、親株の Ba/F3 細胞に対して最大の選択性を示し（230 倍）、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブはいずれも選択性が低かった（それぞれ、12 倍、45 倍、83 倍）（図 2.6.2.2.2.12-1）。クリゾチニブは 11 種類の変異型を 5 倍以下の選択性で阻害し、その変異を呈したアミノ酸残基はいずれもこれまでに臨床的耐性が関連付けられているものであった。セリチニブ及びアレクチニブはそれぞれ、4 種類（L1152R/P、L1198F、

G1202R）及び3種類（I1171N、V1180L、G1202R）の変異型を5倍以下の選択性で阻害した。これに対して、brigatinibはG1202Rが最も耐性が生じやすかったが、検討した全変異型に対して少なくとも17倍の選択性を示した。したがって、brigatinibは17種類全ての変異型を阻害し、EML4-ALKに対してクリゾチニブよりも高い選択性を示した。

Brigatinib 90 mg及び180 mgを投与された患者におけるbrigatinibの総Cmax（それぞれ、945 nmol/L、2,485 nmol/L）は、EML4-ALK及び17種類全ての二次耐性変異型EML4-ALKのIC_{50}及びIC_{90}を上回った。しかし、承認済みTKIの検討により、本解析は有効性を過大に予測する傾向があることが示された。典型的な例として、クリゾチニブ（913 nmol/L）、セリチニブ（1,810 nmol/L）、アレクチニブ（1,548 nmol/L）の総Cmaxは臨床的耐性に関連することが明らかになっている変異型のIC_{50}及びIC_{90}を上回った。総Caveの解析によっても同様の傾向が観察された。

Brigaitnib 90 mg及び180 mgを投与された患者におけるbrigatinibの遊離Cmax（65.7%がヒト血漿蛋白と結合）（それぞれ、324 nmol/L、852 nmol/L）は、EML4-ALK及び17種類全ての二次耐性変異型のIC_{50}を上回る。しかし、承認済みALK TKIの検討で、本解析は有効性を過小に予測する傾向があることが示された。例えば、クリゾチニブ（85 nmol/L）、及びアレクチニブ（5 nmol/L）の遊離Cmax（蛋白結合率がそれぞれ、90.7%、99.7%と高い）は、EML4-ALKのIC_{50}を上回らなかった。遊離Caveの解析により同様の傾向が観察された。

細胞アッセイでは、生理的濃度のヒト血漿蛋白の存在下、brigatinib、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの効力はそれぞれ、2.0、2.7、2.7、4.0倍低下した。このことからクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの「有効」Cmaxはそれぞれ、338、670、387 nmol/Lと計算できた。3つ全てのALK TKIの有効Cmaxは EML4-ALKのIC_{90}を上回り、耐性に関連する複数の変異型（17種類中16種類）のIC_{90}を下回った。IC_{50}に基づく比較は予測能がより低かった。クリゾチニブの有効Caveは EML4-ALKのIC_{90}を上回らなかったという重要な例外を除き、有効Caveの解析によって同様の結果が得られた。したがって、承認済みALK TKIについて、有効Cmaxと in vitro IC_{90}の比較は、今回解析した他の方法よりも臨床的有効性を良好に予測すると示唆された。

図2.6.2.2.2.12-2に示すように、これらの結果は以下のように要約できる。

3つ全てのALK TKIについて、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの有効Cmaxは EML4-ALKのIC_{90}を上回る。クリゾチニブの有効Cmaxは、クリゾチニブに対する腫瘍の感受性を高めることが知られている変異（L1198F；[23]）を除き、検討した17種類中16種類の変異型のIC_{90}を上回らない。セリチニブ及びアレクチニブの有効Cmaxはそれぞれ、5種類の変異型（T1151Tins、L1152R/P、L1198F、G1202R）及び4種類の変異型（T1151Tins、I11711N、V1180L、G1202R）のIC_{90}を上回らない。これらの変異のいくつかはすでに、セリチニブ及びアレクチニブに対する臨床的耐性と関連付けられている。

Brigatinibについては、90 mg及び180 mgでの有効Cmaxはそれぞれ、473 nmol/L、1,243 nmol/Lである。重要なのは、180 mgのbrigatinibの有効Cmaxが EML4-ALK及び17種類全ての耐性変異型のIC_{90}を上回っている点である。

90 mgのbrigatinibの有効Cmaxは EML4-ALK及び17種類中16種類（G1202R除く）の耐性変異型のIC_{90}を上回る。

最後に、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの有効 Cmax は EML4-ALK の IC_{90} をそれぞれ、1.0 倍、6.0 倍、6.9 倍上回る（図 2.6.2.2.2.12-2 参照）。比較すると、90 mg 及び 180 mg の brigatinib の有効 Cmax は EML4-ALK の IC_{90} をそれぞれ、12.4 倍、32.7 倍上回る。これにより brigatinib はセリチニブ、アレクチニブ、及び特にクリゾチニブよりも薬理作用不足を生じにくい可能性が示唆される。

結論

全体的に、これらの結果は、EML4-ALK 又は二次耐性変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞において、brigatinib はクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブよりも強力かつ選択的に ALK を阻害することを示した。Brigatinib は、患者で達成される曝露レベルで、検討した 17 種類全ての二次耐性変異型 ALK に対する十分な活性を維持する唯一の ALK 阻害剤である。これらの結果から、brigatinib は臨床的に達成可能な用量レベルでは耐性に関連するどの変異も伴わない汎 ALK 阻害剤のプロファイルを有することが示唆された。

以上の結果は、IC_{50} と IC_{90} の単純な比較、変異型 ALK に対する効力と非特異的な阻害の比較、IC_{50} 及び IC_{90} と患者で達成された曝露レベル（種々のパラメータで評価）の比較を含め、様々な解析で裏付けられる。探索的解析では、「有効」Cmax（すなわち、蛋白結合の機能的影響で補正した Cmax）と IC_{90} の比較が、in vitro での TKI 効力と既知の臨床的有効性を最もよく関連付けることができた。

表 2.6.2.2.2.12-1　EML4-ALK 及び 17 種類の付加変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞の生存に対する brigatinib、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの作用

変異型 ALK	IC_{50} ± SD (nmol/L)				IC_{90} ± SD (nmol/L)			
	クリゾチニブ	Brigatinib	セリチニブ	アレクチニブ	クリゾチニブ	Brigatinib	セリチニブ	アレクチニブ
−	107 ± 11	14 ± 1	37 ± 8	25 ± 8	331 ± 87	38 ± 10	112 ± 15	56 ± 5
$T1151T_{ins}$	1109 ± 453	114 ± 39	283 ± 97	201 ± 12	1469 ± 413	416 ± 169	734 ± 486	444 ± 130
L1152R	844 ± 100	11 ± 2	437 ± 216	62 ± 9	1247 ± 206	34 ± 8	1270 ± 790	88 ± 59
L1152P	721 ± 141	20 ± 7	451 ± 170	48 ± 8	1528 ± 129	94 ± 34	1227 ± 624	78 ± 14
C1156Y	529 ± 152	45 ± 19	195 ± 70	67 ± 33	1421 ± 266	129 ± 41	449 ± 160	149 ± 57
I1171N	532 ± 122	124 ± 36	119 ± 42	724 ± 130	1058 ± 258	278 ± 80	201 ± 62	1191 ± 681
F1174C	238 ± 128	58 ± 27	109 ± 70	31 ± 13	718 ± 432	160 ± 73	229 ± 159	116 ± 55
F1174L	253 ± 90	55 ± 21	117 ± 53	44 ± 10	618 ± 124	137 ± 45	304 ± 145	110 ± 8
F1174V	257 ± 101	64 ± 11	121 ± 55	46 ± 19	834 ± 282	195 ± 33	271 ± 110	206 ± 164
V1180L	170 ± 47	11 ± 3	16 ± 6	597 ± 172	406 ± 123	36 ± 11	42 ± 20	1235 ± 700
L1196M	589 ± 97	41 ± 14	67 ± 17	133 ± 55	1707 ± 138	118 ± 30	166 ± 55	327 ± 105
L1198F	17 ± 6	82 ± 41	697 ± 167	84 ± 45	54 ± 23	242 ± 88	1316 ± 110	226 ± 85
G1202R	617 ± 76	184 ± 45	354 ± 73	695 ± 260	1638 ± 236	762 ± 249	1042 ± 214	1886 ± 651
D1203N	459 ± 176	79 ± 31	159 ± 76	42 ± 19	1370 ± 426	276 ± 109	420 ± 164	196 ± 114
S1206F	199 ± 61	43 ± 17	39 ± 17	34 ± 11	542 ± 155	120 ± 42	99 ± 25	133 ± 86
S1206Y	179 ± 62	36 ± 16	42 ± 13	19 ± 8	435 ± 127	109 ± 36	99 ± 19	77 ± 36
E1210K	240 ± 79	107 ± 38	80 ± 27	59 ± 27	798 ± 340	366 ± 171	202 ± 101	200 ± 85
G1269A	509 ± 146	9 ± 5	29 ± 15	56 ± 19	1413 ± 306	22 ± 10	61 ± 21	125 ± 66
親株*	1237 ± 241	3214 ± 725	1666 ± 759	2067 ± 1395	2088 ± 262	9502 ± 997	2841 ± 2239	7461 ± 3033

*IL-3 存在下で増殖する未形質転換 Ba/F3 細胞。

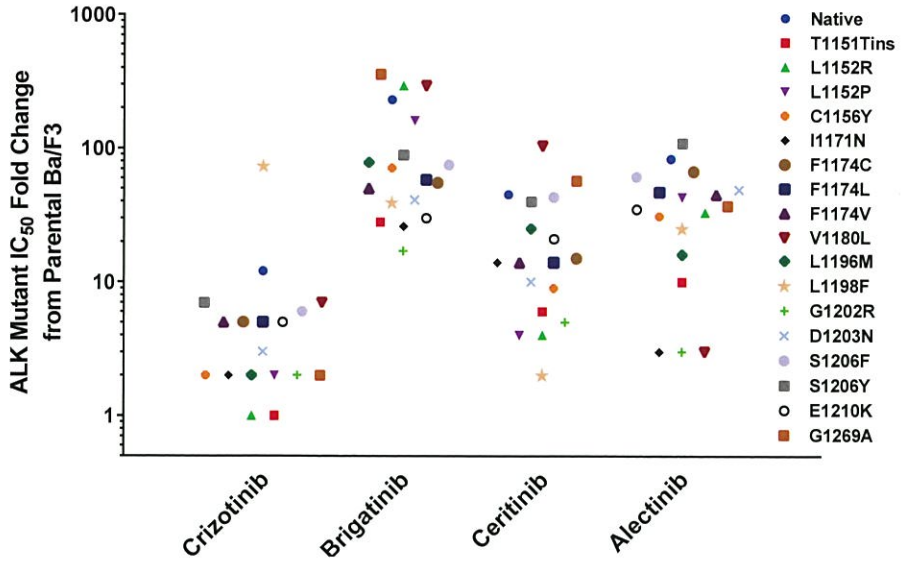
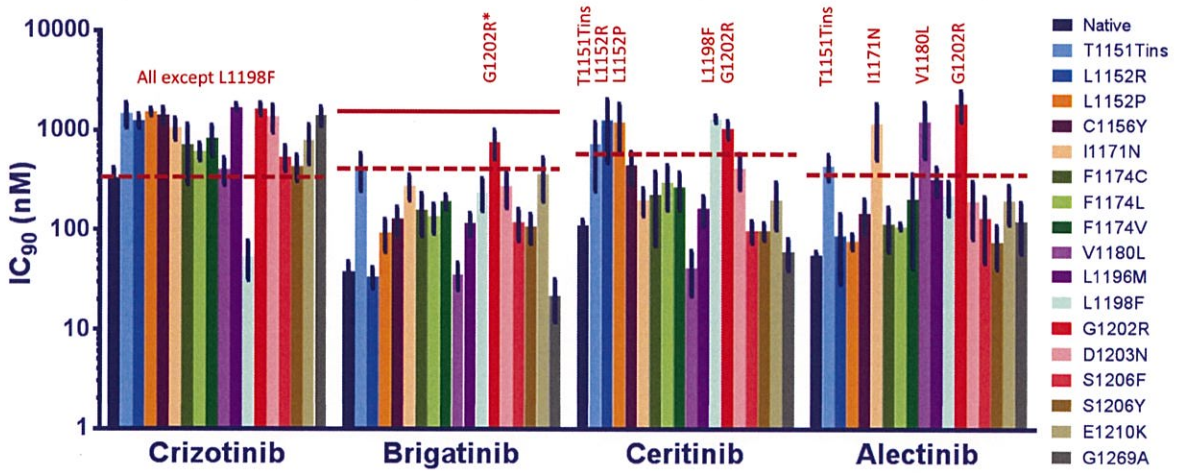


図 2.6.2.2.2.12-1　EML4-ALK 及び 17 種類の付加変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞の生存に対する brigatinib、クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブの作用の選択性



注：水平な線は患者での「有効」Cmax 濃度を示す(brigatinib 点線：90mg 実線：180mg)。IC_{90} が有効 Cmax より高い ALK 変異型は赤字で棒グラフの上に記載した。*Brigatinib については G1202R の IC_{90} は 90mg の有効 Cmax よりも高いが、180mg の有効 Cmax よりは低かった。Values are mean ± SD

図 2.6.2.2.2.12-2　IC_{90} と蛋白結合の機能的影響で補正した「有効」Cmax（血漿中 TKI 濃度）の関連

2.6.2.2.2.13 EML4-ALK 又は付加変異型 EML4-ALK 蛋白を発現する Ba/F3 細胞株を用いた皮下腫瘍モデルにおける brigatinib 及びクリゾチニブの経口投与有効性試験

添付資料番号：4.2.1.1-15（参考）

試験デザイン

EML4-ALK 又は付加変異型 EML4-ALK（L1196M、G1269S、S1206R）のいずれかを発現するよう遺伝子操作した Ba/F3 細胞株を用いて、SCID マウスに皮下腫瘍を形成させた。この担癌マウスに溶媒、brigatinib 又はクリゾチニブを 1 日 1 回連続 14 日間経口投与した。

結果

EML4-ALK モデルにおいて、25、50、75 mg/kg の brigatinib 及び 200 mg/kg のクリゾチニブで完全な腫瘍退縮（$p<0.01$）が達成された（表 2.6.2.2.2.13-1）。腫瘍増殖阻害傾向は 10 mg/kg の brigatinib 及び 100 mg/kg のクリゾチニブで認められた（有意差なし）。EML4-ALK L1196M 及び G1269S モデルにおいて、brigatinib は 25、50、75 mg/kg で有意な用量依存性の腫瘍増殖阻害又は腫瘍退縮を示した。EML4-ALK S1206R モデルにおいては、50 及び 75 mg/kg で有意な腫瘍増殖阻害が認められた。クリゾチニブは最高用量の 200 mg/kg であっても、3 種類の変異型 EML4-ALK モデルのいずれにも抗腫瘍活性を示さなかった。本試験で用いた全ての用量レベルは良好な忍容性を示し、一般状態悪化又は薬剤関連死亡は認められなかった。

結論

Brigatinib の経口投与により、クリゾチニブへの耐性をもたらす変異を有する 3 種類の EML4-ALK モデルにおける腫瘍増殖を効果的に抑制することができた。対照試験により、クリゾチニブは EML4-ALK モデルにおいて活性を示すことが確認された。しかし、本モデルでは brigatinib のほうが大きな活性を示し、25 mg/kg の brigatinib と 200 mg/kg のクリゾチニブの有効性は同程度であった。

表 2.6.2.2.2.13-1　EML4-ALK 及び付加変異型 EML4-ALK（L1196M、G1269S、S1206R）を発現する Ba/F3 腫瘍モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib 及びクリゾチニブの作用

TKI	マウス投与量（qd）mg/kg	抗腫瘍活性 (%)*			
		EML4-ALK	L1196M EML4-ALK	G1269S EML4-ALK	S1206R EML4-ALK
Brigatinib	10	22	ND	ND	ND
	25	-100	52	-29	0
	50	-100	-59	-98	29
	75	-100	-98	-100	77
クリゾチニブ	25	1	ND	ND	ND
	50	0	ND	ND	ND
	100	25	15	4	0
	200	-100	12	0	7

*腫瘍増殖阻害率は黒、腫瘍退縮率（負の値）は赤で示す。
ND：測定せず。

2.6.2.2.2.14 EML4-ALK 又は付加変異型 EML4-ALK 蛋白を発現する Ba/F3 細胞株を用いた皮下腫瘍モデルにおける brigatinib 及びクリゾチニブの単回投与 PK/PD 試験

添付資料番号：4.2.1.1-16（参考）

試験デザイン

EML4-ALK 又は付加変異型 EML4-ALK（L1196M、G1269S、S1206R）のいずれかを発現するよう遺伝子操作した Ba/F3 細胞株を用いて、SCID マウスに皮下腫瘍を形成させた。この担癌マウスに brigatinib（25、50 mg/kg）又はクリゾチニブ（200 mg/kg）を単回経口投与し、投与後 6 及び 24 時間後の薬物の血漿中濃度及び腫瘍におけるリン酸化 ALK（p-ALK）レベルを測定した。

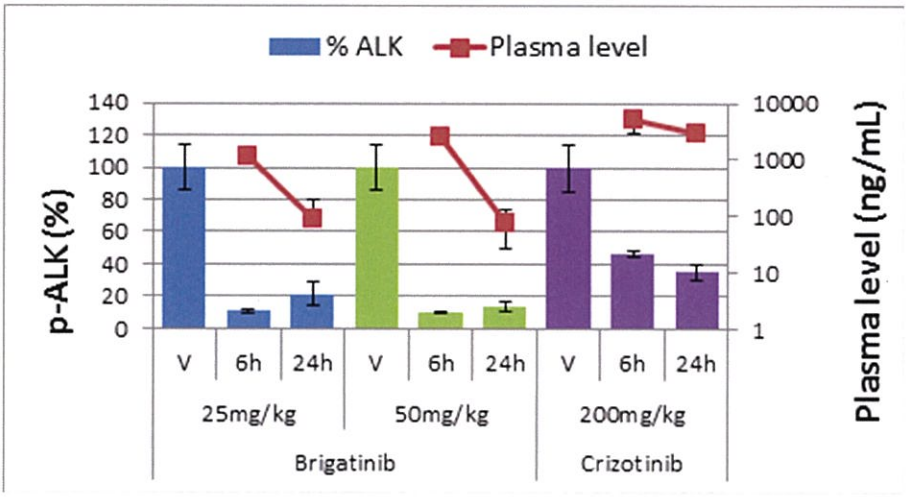
結果

50 mg/kg の brigatinib は EML4-ALK モデル（投与 6 及び 24 時間後にそれぞれ、90%、86%）並びに L1196M 変異型（91%、79%）及び G1269S 変異型（94%、82%）モデルにおいて、p-ALK

の強力な阻害を示した（図 2.6.2.2.2.14-1）。S1206R 変異型モデルにおいても、程度は低いが阻害が認められた（70%、36%）。4 種類のモデルにおいて、brigatinib の血漿中濃度は投与 6 及び 24 時間後にそれぞれ、1,432～2,922 ng/mL、76～351 ng/mL であった。25 mg/kg の brigatinib 投与マウスでも同様の傾向が認められたが、p-ALK 阻害レベルは概ね低下し、50 mg/kg の用量よりも brigatinib の血漿中濃度が低かった（投与 6 及び 24 時間後にそれぞれ、355～1,095 ng/mL、39～88 ng/mL）。EML4-ALK モデルにおいて、クリゾチニブ 200 mg/kg により p-ALK 阻害レベルは投与 6 及び 24 時間後にそれぞれ、53%、65%であった。S1206R（43%、29%）及び L1196M（35%、25%）変異型モデルにおける阻害はわずかであり、G1269S 変異型モデル（0%、8%）においては、阻害はほとんど又は全く認められなかった。4 種類のモデルにおけるクリゾチニブの血漿中濃度は投与 6 及び 24 時間後にそれぞれ、1,820～5,101 ng/mL、2,400～3,468 ng/mL であった。

結論

Brigatinib の経口投与により、マウス皮下腫瘍で検討した EML4-ALK 及び 3 種類の付加変異型 EML4-ALK のリン酸化を効果的に抑制することができた。4 種類全てのモデルにおいて、クリゾチニブは、brigatinib を上回る血漿中濃度でも、brigatinib と比較して ALK リン酸化に対しての作用が弱かった。



Values are mean ± SD

図 2.6.2.2.2.14-1　EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞株を用いた腫瘍モデルにおける brigatinib 及びクリゾチニブの PK 及び PD 活性

2.6.2.2.2.15 EML4-ALK 又は G1202R 変異型 EML4-ALK 蛋白を発現する Ba/F3 細胞株を用いた腫瘍モデルにおける bigatinib と他の ALK 阻害剤を比較する経口投与有効性試験

添付資料番号：4.2.1.1-17（参考）

試験デザイン

EML4-ALK 又は G1202R 変異型 EML4-ALK のいずれかを発現するよう遺伝子操作した Ba/F3 細胞株を用いて、SCID マウスに皮下腫瘍を形成させた。EML4-ALK 担癌マウスに溶媒、brigatinib（50 mg/kg）、アレクチニブ（60 mg/kg）、セリチニブ（50 mg/kg）を投与した。

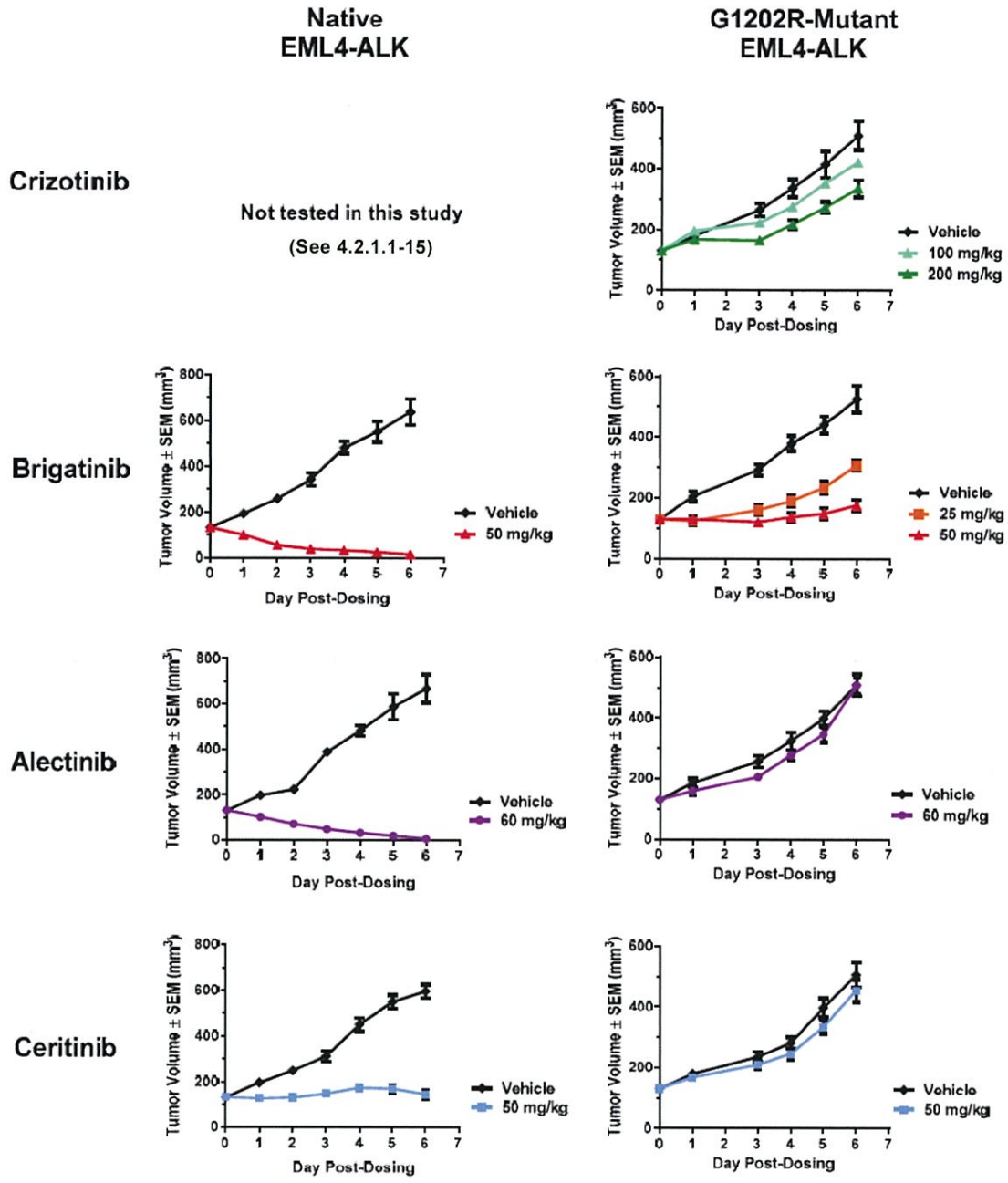
G1202R 変異型 EML4-ALK 担癌マウスには溶媒、brigatinib（25、50 mg/kg）、クリゾチニブ（100、200 mg/kg）、アレクチニブ（60 mg/kg）、セリチニブ（50 mg/kg）を投与した。化合物は 1 日 1 回連続 7 日間経口投与した。

結果

EML4-ALK モデルにおいて、50 mg/kg の brigatinib 及び 60 mg/kg のアレクチニブによりそれぞれ、89%、95%の腫瘍退縮（$p<0.0001$）が、50 mg/kg のセリチニブにより 97%の腫瘍増殖阻害（$p<0.0001$）が認められた（図 2.6.2.2.2.15-1）。G1202R 変異型 EML4-ALK モデルにおいては、25 及び 50 mg/kg の brigatinib により腫瘍増殖はそれぞれ、55%、88%阻害された（$p<0.001$）。60 mg/kg のアレクチニブ（0.4%）や 50 mg/kg のセリチニブ（14%）による有意な腫瘍増殖阻害は認められなかった。有意な腫瘍増殖阻害は 200 mg/kg のクリゾチニブで認められたが（46% ; $p<0.01$）、100 mg/kg のクリゾチニブでは認められなかった（23%）。本試験で用いた全ての用量レベルが良好に忍容され、一般状態悪化又は薬剤関連死亡は認められなかった。

結論

EML4-ALK 腫瘍の増殖を効果的に抑制する brigatinib の経口用量レベルは、G1202R 変異型腫瘍の増殖も強く抑制した。これに対して、EML4-ALK 腫瘍の増殖を効果的に抑制するアレクチニブ及びセリチニブの経口用量レベルは、G1202R 変異型腫瘍の増殖にほとんど又は全く影響を及ぼさなかった。



Values are mean ± SEM

図 2.6.2.2.2.15-1　EML4-ALK 及び G1202R 変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞株を用いた腫瘍モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib 及び他の ALK 阻害剤の作用

2.6.2.2.2.16 EML4-ALK 及び G1202R 変異型 EML4-ALK 蛋白を発現する Ba/F3 細胞株を用いた腫瘍モデルにおける brigatinib と他の ALK 阻害剤を比較する単回投与 PK/PD 試験

添付資料番号：4.2.1.1-18（参考）

試験デザイン

本試験では、EML4-ALK 又は G1202R 変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞株を移植したマウスにおいて、brigatinib の薬物動態学的及び薬力学的活性を他の ALK 阻害剤と比較検討した。EML4-ALK 担癌 SCID マウスに溶媒、brigatinib（50 mg/kg）、アレクチニブ（60 mg/kg）、セリチニブ（50 mg/kg）を単回経口投与した。G1202R 変異型 EML4-ALK 担癌マウスには溶媒、brigatinib（50 mg/kg）、クリゾチニブ（200 mg/kg）、アレクチニブ（60 mg/kg）、セリチニブ（50 mg/kg）を単回投与した。投与 6 及び 24 時間後に血漿中薬物濃度及び腫瘍検体のリン酸化 ALK レベル（p-ALK ; Tyr1604）を測定した。

結果

EML4-ALK モデルにおいて、50 mg/kg の brigatinib は腫瘍における p-ALK レベルを強力かつ持続的に低下させた。投与 6 及び 24 時間後にそれぞれ、87%、72%の阻害が認められ、同時点での血漿中薬物濃度はそれぞれ、4,819 ng/mL、1,155 ng/mL であった。G1202R 変異モデルにおいても、50 mg/kg の brigatinib は腫瘍における p-ALK レベルを強力かつ持続的に低下させた。投与 6 及び 24 時間後にそれぞれ、78%、72%の阻害が認められ、同時点での血漿中濃度はそれぞれ、4,473 ng/mL、1,487 ng/mL であった（図 2.6.2.2.2.16-1）。

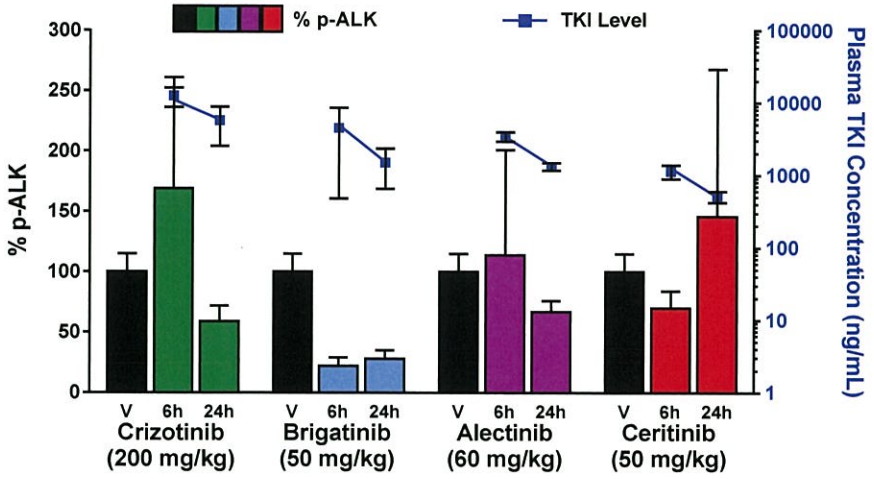
これに対して、アレクチニブは EML4-ALK 腫瘍における p-ALK レベルを強力かつ持続的に低下させたが（83%、75%）、G1202R 変異型腫瘍ではそのような変化はみられなかった（阻害なし、33%）。アレクチニブの血漿中濃度は brigatinib と同程度であった。

セリチニブは EML4-ALK 腫瘍における p-ALK レベルをさらに弱いが阻害を示し（50%、53%）、G1202R 変異型腫瘍においては一過性の低レベルの阻害しかもたらさなかった（30%、阻害なし）。セリチニブの血漿中濃度は brigatinib 及びアレクチニブよりも数倍低かった。

クリゾチニブは G1202R 変異型腫瘍における p-ALK レベルに対しわずかな影響しか示さなかった（阻害なし、41%）。血漿中濃度は他の全ての阻害剤よりも数倍高かった。別の研究では EML4-ALK 腫瘍において、クリゾチニブは p-ALK レベルを持続的に阻害することが明らかになっている（4.2.1.1-16）。

結論

本試験では、マウスモデルにおいて 50 mg/kg の brigatinib の経口投与は EML4-ALK 及び G1202R 変異型 EML4-ALK どちらの腫瘍においても ALK シグナル伝達を効果的に抑制することが示された。EML4-ALK 腫瘍において ALK シグナル伝達を抑制するクリゾチニブ、アレクチニブ、セリチニブの用量は G1202R 変異型 EML4-ALK 腫瘍における影響を大きく低下させた。



Values are mean ± SD

図 2.6.2.2.2.16-1　G1202R 変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞株を用いた腫瘍モデルにおける brigatinib 及び他の ALK 阻害剤の PK 及び PD 活性

2.6.2.2.3 Brigatinib の ROS1 阻害活性

Brigatinib の ROS1 阻害剤としての効力と有効性を明らかにするために、一連の in vitro 及び in vivo 試験を実施した（2.6.2.2.3.1、2.6.2.2.3.2）。以下に簡潔に説明するように、brigatinib の ROS1 阻害活性を明らかにするために用いた試験系は、ALK について詳述したものと類似の系を用いた（2.6.2.2.2）。

融合変異型 ROS1 を発現するように遺伝子操作した Ba/F3 細胞株を用いて、3 日間の in vitro アッセイにおいて、生存を 50%又は 90%阻害する濃度（IC_{50} 及び IC_{90}）を測定することにより、brigatinib の効力を評価した。ROS1 の自己リン酸化部位である Tyr2274 でのリン酸化と、下流のシグナル伝達に対する brigatinib の作用、さらに、キナーゼドメインに二次変異を有する変異型 ROS1 に対する brigatinib の活性も検討した。

In vivo での brigatinib の有効性は、免疫不全マウスに皮下移植した Ba/F3 ROS1 融合腫瘍のモデルを用いて検討した。これらの試験において、brigatinib は、抗 ALK 活性の評価時と同じ用量レベル（10～50 mg/kg）で、マウスに 1 日 1 回経口投与した。

これらの試験全てにおいて、比較のために ALK/ROS1/MET 阻害剤であるクリゾチニブを並行して試験した。

これらの試験の概要を以下のセクションで述べる。

2.6.2.2.3.1 ROS1 融合蛋白を発現する Ba/F3 細胞株のシグナル伝達及び生存に対する brigatinib の作用

添付資料番号：4.2.1.1-19（参考）

<u>試験デザイン</u>

本試験では、ROS1 の融合変異型 3 種（CD74-ROS1、FIG-ROS1、SDC4-ROS1）と、ROS1 キナーゼドメインに二次変異（L2026M 及び G2032R）を有する CD74-ROS1 の変異型 2 種の活性に、生存が依存するように遺伝子操作した Ba/F3 細胞を用いて、ROS1 を介するシグナ

ル伝達と細胞生存に対する brigatinib の作用を検討した。比較のために、クリゾチニブを並行して試験した。

結果

Brigatinib は、ROS1 の融合変異型 3 種を発現する Ba/F3 細胞全ての生存を強力に阻害し（IC_{50} 16～31 nmol/L、IC_{90} 41～91 nmol/L）、その効力はクリゾチニブの効力（IC_{50} 17～45 nmol/L、IC_{90} 39～99 nmol/L）と同程度であった（表 2.6.2.2.3.1-1）。生存の阻害に伴い、ROS1 と下流のシグナル伝達分子 AKT 及び ERK1/2 のリン酸化レベルが抑制された。CD74-ROS1 融合蛋白のゲートキーパー部位に突然変異を導入すると（L2026M）、brigatinib の効力には影響がなかった。一方で、クリゾチニブの効力は 5 倍低下した。しかし、brigatinib とクリゾチニブのいずれも、クリゾチニブに対する臨床的耐性に関連している G2032R 変異を有する CD74-ROS1 に対しては、十分な活性を維持しなかった（IC_{50} それぞれ 1,100 及び 1,600 nmol/L）。

結論

Brigatinib は、NSCLC に認められる活性化 ROS1 融合変異型を強力に阻害し、その効力はクリゾチニブの効力と同程度である。Brigatinib は、L2026M 付加変異をもつ融合変異型 ROS1 に対しては強力な活性を維持するが、G2032R 付加変異をもつ融合変異型 ROS1 に対しては活性を維持しなかった。

表 2.6.2.2.3.1-1　融合変異型 ROS1 を発現する Ba/F3 細胞の生存に対する brigatinib とクリゾチニブの作用

ROS1 融合蛋白	IC_{50} ± SD (nmol/L)		IC_{90} ± SD (nmol/L)	
	Brigatinib	クリゾチニブ	Brigatinib	クリゾチニブ
FIG-ROS1	31 ± 15	45 ± 21	91 ± 33	99 ± 23
SDC4-ROS1	16 ± 2	17 ± 1	41 ± 5	39 ± 3
CD74-ROS1	18 ± 3	25 ± 12	71 ± 29	93 ± 12
CD74-ROS1 (L2026M)	17 ± 6	127 ± 44	34 ± 10	251 ± 48
CD74-ROS1 (G2032R)	1100 ± 159	1600 ± 339	ND	ND

ND：検出されず。

2.6.2.2.3.2 CD74-ROS1 を発現する Ba/F3 細胞株を用いた皮下腫瘍モデルにおける brigatinib の経口有効性試験

添付資料番号：4.2.1.1-20（参考）

試験デザイン

本試験は、CD74-ROS1 融合蛋白を発現するように遺伝子操作した Ba/F3 細胞を用いたマウス腫瘍モデルにおいて、brigatinib の有効性をクリゾチニブと比較して評価することを目的として実施した。SCID マウスにおいて、細胞を皮下注射して腫瘍を形成させた。担癌マウスに溶媒、brigatinib（10、25 及び 50 mg/kg）又はクリゾチニブ（50、100 及び 200 mg/kg）の 1 日 1 回経口投与を連続 14 日間行った。

結果

腫瘍増殖に対する brigatinib の用量依存性の作用が認められ、25 及び 50 mg/kg で統計学的有意な阻害（$p<0.0001$）が認められた（図 2.6.2.2.3.2-1）。溶媒投与マウスと比較して、brigatinib 10 及び 25 mg/kg 投与マウスでは、腫瘍増殖がそれぞれ 14%及び 87%阻害された。Brigatinib 50 mg/kg 投与により、91%の腫瘍退縮が誘導された。クリゾチニブ 50 mg/kg 投与により腫瘍

増殖が 94%阻害され、クリゾチニブ 100 mg/kg 及び 200 mg/kg 投与により、それぞれ 65%及び 93%の腫瘍退縮が誘導された。本試験で用いた全ての用量で良好な忍容性が示され、一般状態悪化又は薬剤関連死亡は認められなかった。

結論

本試験では、CD74-ROS1 融合蛋白に依存するマウス腫瘍モデルにおいて、brigatinib 経口投与により、効果的に腫瘍増殖を阻害し、腫瘍サイズを縮小することが可能であることが示された。

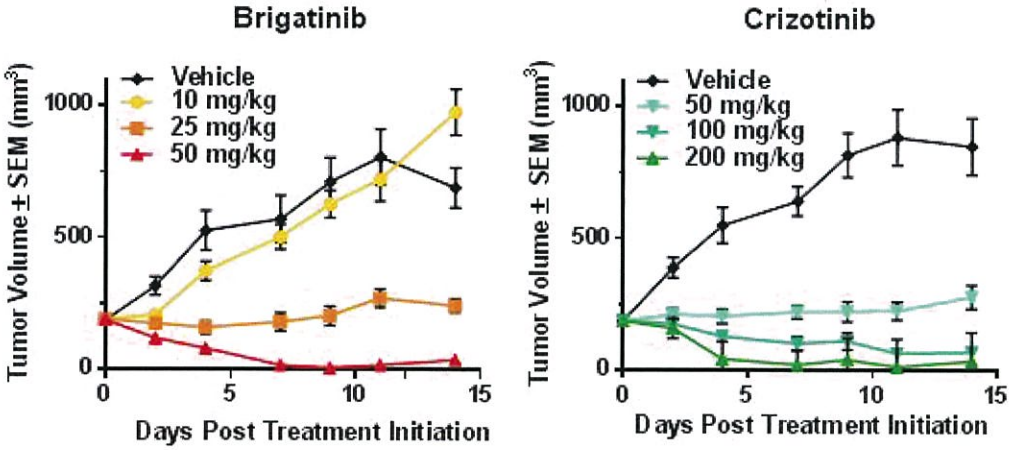


図 2.6.2.2.3.2-1　CD74-ROS1 を発現する Ba/F3 細胞株を用いた腫瘍モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib とクリゾチニブの作用

2.6.2.2.4 Brigatinib の EGFR 阻害活性

Brigatinib の EGFR キナーゼ阻害剤としての効力と有効性を明らかにするために、一連の in vitro 及び in vivo 試験を実施した（2.6.2.2.4.1、2.6.2.2.4.2、2.6.2.2.4.3、2.6.2.2.4.4、2.6.2.2.4.5）。以下に簡潔に説明するように、brigatinib の EGFR 阻害活性を明らかにするために用いた試験系は、ALK について詳述したものと類似の系を用いた（2.6.2.2.2）。

野生型 EGFR、活性化変異を有する EGFR 及び耐性変異を有する EGFR の 3 種類の EGFR に対する brigatinib の活性を評価した。野生型 EGFR は内在型の EGFR であり、その阻害は、第一及び第二世代 EGFR 阻害剤（エルロチニブ、アファチニブなど）で認められる毒性に関連する。解析を行った活性化変異型 EGFR は、最も高頻度にみられる変異型 2 種（エクソン 19 の欠失変異及びエクソン 21 の L858R 点突然変異）で、ここではそれぞれ、EGFR-Del（delE746_A750）及び EGFR-L858R と称する。第一及び第二世代 EGFR 阻害剤に対する耐性を最も高頻度に引き起こす二次変異は、キナーゼドメインのゲートキーパー部位における T790M 変異である。T790M 変異は典型的な EGFR の活性化変異として知られている。したがって、今回検討した耐性変異型 EGFR-Del/T790M 及び EGFR-L858R/T790M は、活性化変異と二次耐性変異の両方を有する二重変異型である。

変異型 EGFR（T790M を伴う又は伴わない、頻度の高い活性化変異型）を発現するように遺伝子操作した Ba/F3 細胞株を用い、3 日間の in vitro アッセイにおいて、生存を 50%阻害する濃度（IC_{50}）を測定することにより、これらの変異型に対する brigatinib の効力を慎重に評

価した。検討した変異型 EGFR に応じて用量反応曲線に興味深い差が認められたため、生存を 90%阻害する濃度（IC_{90}）も測定した。

ヒト NSCLC 細胞株パネルを用いて、自己リン酸化部位であるチロシン（Tyr）1068 での EGFR リン酸化レベルと、下流のシグナル伝達に対する作用（IC_{50}）を検討することにより、野生型 EGFR 及び種々の変異型に対する brigatinib の in vitro 効力を評価した。一部のモデルでは、50%増殖抑制濃度（GI_{50}）も測定した。これらの試験によって、EGFR キナーゼ阻害と細胞増殖に対する作用の関連性を評価することができた。

In vivo での brigatinib の有効性は、免疫不全マウスに腫瘍を皮下移植した 2 つのモデルを用いて検討した。第 1 のモデルとして、活性化変異を有する EGFR を含むヒト NSCLC 細胞株を用いた。このモデルを用いて PK/PD 試験も実施した。第 2 のモデルには、EGFR 活性化変異と T790M 耐性変異を有する NSCLC 患者由来の腫瘍を用いた。これらの試験において、brigatinib は、抗 ALK 活性の評価時と同じ用量で（10～50 mg/kg）、マウスに 1 日 1 回経口投与した。

これら多数の試験において、野生型及び変異型 EGFR に対する brigatinib の作用を、エルロチニブの作用と比較した。

これらの試験の概要を以下のセクションで述べる。

2.6.2.2.4.1 変異型 EGFR を発現する Ba/F3 細胞株の生存に対する brigatinib の作用

添付資料番号：4.2.1.1-21（参考）

<u>試験デザイン</u>

変異型 EGFR に対する brigatinib の細胞内活性を検討するために、最も頻度の高い EGFR の活性化変異型（Del 又は L858R）、又は活性化変異と T790M 耐性変異の両方を有する変異型（Del/T790M 又は L858R/T790M）を Ba/F3 細胞に導入し、それらの生存に対する brigatinib の阻害活性を評価した。比較のためにエルロチニブを試験した。

<u>結果</u>

エルロチニブは、EGFR-Del 及び EGFR-L858R を強力に阻害したが（IC_{50} それぞれ 4.7 及び 13 nmol/L）、T790M を有する変異型は阻害しなかった（IC_{50} それぞれ 6,688 及び > 10,000 nmol/L）。EGFR-Del 及び EGFR-L858R に対する IC_{90} 値は、IC_{50} 値より 3.5～6 倍高かった（IC_{90} それぞれ 29 及び 45 nmol/L）（表 2.6.2.2.4.1-1）。

Brigatinib は EGFR-Del 及び EGFR-L858R を阻害したが、その効力はエルロチニブと比較して低かった（IC_{50} それぞれ 95 及び 397 nmol/L）。エルロチニブとは対照的に、brigatinib は EGFR-Del/T790M 及び EGFR-L858R/T790M も阻害したが（IC_{50} それぞれ 272 及び 489 nmol/L）、T790M を有する変異型に対する brigatinib の効力は、頻度の高い活性化変異型に対する効力と比較して 1.2～2.9 倍低かった。興味深い点として、brigatinib の EGFR-Del 及び EGFR-L858R 阻害の IC_{90} 値（それぞれ 314 及び 1,201 nmol/L）は IC_{50} 値より約 3 倍高かった一方、EGFR-Del/T790M 及び EGFR-L858R/T790M に対する IC_{90} 値（それぞれ 2,461 及び 2,968 nmol/L）は、IC_{50} 値より 6～9 倍高かった。

結論

Brigatinib は変異型 EGFR を阻害するが、その効力は変異型に応じて様々であった。EGFR-Del に対する阻害効力が最も大きく、T790M を有する変異型に対する阻害効力が最も小さかった。

表 2.6.2.2.4.1-1　変異型 EGFR を発現する Ba/F3 細胞の生存に対する brigatinib とエルロチニブの作用

変異型 EGFR	IC_{50} ± SD (nmol/L)		IC_{90} ± SD (nmol/L)	
	Brigatinib	エルロチニブ	Brigatinib	エルロチニブ
Del	95 ± 22	4.7 ± 1.5	314 ± 128	29 ± 9
L858R	397 ± 130	13 ± 10	1,201 ± 182	45 ± 12
Del/T790M	272 ± 99	6,688 ± 2461	2,461 ± 724	> 10,000
L858R/T790M	489 ± 138	> 10,000	2,968 ± 635	> 10,000

2.6.2.2.4.2 野生型又は変異型 EGFR を発現する NSCLC 細胞株のシグナル伝達及び増殖に対する brigatinib の作用

添付資料番号：4.2.1.1-22（参考）

試験デザイン

本試験では、野生型又は変異型 EGFR を発現する NSCLC 由来細胞株を用いて、EGFR のリン酸化と EGFR を介する下流のシグナル伝達及び増殖に対する brigatinib の作用を検討した。比較のためにエルロチニブを試験した。

結果

野生型 EGFR を発現する H358 細胞において、brigatinib は EGFR リン酸化に作用を及ぼさなかったが（IC_{50} > 3,000 nmol/L）、エルロチニブはリン酸化を強力に阻害した（IC_{50} 65 nmol/L）（表 2.6.2.2.4.2-1）。EGFR-Del を発現する HCC827 細胞において、brigatinib は EGFR リン酸化を IC_{50} 値 62 nmol/L で阻害し、細胞増殖を GI_{50} 値 163 nmol/L で抑制した。エルロチニブは、brigatinib よりも強力な作用を EGFR リン酸化（IC_{50} 5 nmol/L）及び細胞増殖（GI_{50} 13 nmol/L）に対して示した。一方、EGFR-Del/T790M も発現するように遺伝子操作した HCC827 細胞においては、エルロチニブは EGFR リン酸化（IC_{50} > 10,000 nmol/L）及び細胞増殖（GI_{50} 1,831 nmol/L）にほとんど又はまったく作用を及ぼさなかったが、brigatinib はリン酸化（IC_{50} 59 nmol/L）及び増殖（GI_{50} 245 nmol/L）をともに阻害した。EGFR-L858R/T790M を発現する H1975 細胞においても同様の結果が得られ、EGFR リン酸化に対し、brigatinib は強力な阻害作用を示したが（IC_{50} 47 nmol/L）、エルロチニブは阻害作用を示さなかった（IC_{50} > 3,000 nmol/L）。HCC827 及び H1975 細胞株において、EGFR 下流のシグナル伝達に対する brigatinib の付随作用も認められた。

結論

Brigatinib は、活性化変異型及び T790M を有する耐性変異型の EGFR のリン酸化を強力に阻害した。Brigatinib は、効力の減弱はあるが、これらの変異型を発現する NSCLC 細胞株の増殖も抑制した。Brigatinib は野生型 EGFR のリン酸化を阻害しなかった。

表 2.6.2.2.4.2-1　野生型又は変異型 EGFR を発現する NSCLC 細胞株の増殖及びシグナル伝達に対する brigatinib とエルロチニブの作用

		Brigatinib		エルロチニブ	
細胞株	EGFR 変異型	p-EGFR IC_{50} ± SD (nmol/L)	細胞増殖 GI_{50} ± SD (nmol/L)	p-EGFR IC_{50} ± SD (nmol/L)	細胞増殖 GI_{50} ± SD (nmol/L)
H358	野生型	> 3,000	ND	65	ND
HCC827	Del	62 ± 12	163 ± 44	5 ± 1	13 ± 2
HCC827-Del/T790M	Del +Del/T790M	59 ± 20	245 ± 45	> 10,000	1,831 ± 137
H1975	L858R/T790M	47 ± 6	ND	> 3,000	ND

ND：測定せず。

2.6.2.2.4.3 HCC827 ヒト NSCLC 細胞株を用いた皮下異種移植片モデルにおける brigatinib の経口有効性試験

添付資料番号：4.2.1.1-23（参考）

試験デザイン

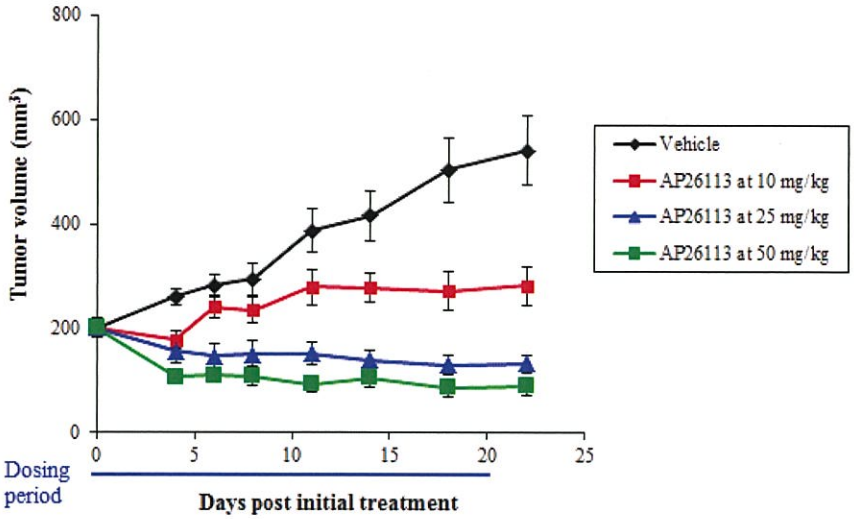
EGFR-Del 活性化変異を有するヒト NSCLC 細胞株である HCC827 を用いて、SCID マウスに皮下腫瘍異種移植片を形成した。担癌マウスに、溶媒又は brigatinib（10、25 又は 50 mg/kg）1 日 1 回経口投与を連続 21 日間行った。

結果

腫瘍増殖に対する用量依存性の作用が認められ、全ての用量レベルで統計学的有意な阻害（$p<0.01$）が得られた（図 2.6.2.2.4.3-1）。溶媒投与マウスと比較して、brigatinib 10 mg/kg 投与マウスでは、腫瘍増殖が 76%阻害された。Brigatinib 25 及び 50 mg/kg 投与によって、投与前の腫瘍サイズと比較してそれぞれ 34%及び 55%の腫瘍退縮が誘導された。全ての用量レベルで、良好な忍容性が示された。

結論

EGFR-Del 活性化変異を有するヒト NSCLC 異種移植片モデルにおいて、brigatinib の経口投与により、効果的に腫瘍増殖を抑制し、腫瘍サイズを縮小することができた。



Values are mean ± SD

図 2.6.2.2.4.3-1　HCC827 EGFR-Del NSCLC 異種移植片モデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib の作用

2.6.2.2.4.4 HCC827 ヒト NSCLC 細胞株を用いた皮下異種移植片モデルにおける brigatinib の反復投与 PK/PD 試験

添付資料番号：4.2.1.1-24（参考）

試験デザイン

本試験では、EGFR-Del 活性化変異を有する NSCLC 細胞株である HCC827 細胞を用いた皮下異種移植片モデルにおいて、brigatinib の薬物動態学的及び薬力学的活性を検討した。担癌マウスに、溶媒又は brigatinib（10、25 又は 50 mg/kg）の 1 日 1 回経口投与を連続 4 日間行った。4 回目投与後いくつかの時点（2、6、10、16 及び 24 時間）で、血漿中の brigatinib 濃度と腫瘍中のリン酸化 EGFR（p-EGFR）レベルを測定した。

結果

EGFR リン酸化に対する時間及び用量依存性の作用が認められ（図 2.6.2.2.4.4-1）、この作用は brigatinib の血漿中濃度と関連があった。10 mg/kg 投与群では、p-EGFR の部分的阻害が認められた。p-EGFR レベルは、4 回目投与 2、6、10、16、24 時間後にそれぞれ 58、62、34、38、24%低下し、これらの時点における血漿中 brigatinib 濃度は 681、320、144、10、17 ng/mL であった。25 mg/kg 投与群では、p-EGFR に対するより強力でより持続的な阻害が認められた。p-EGFR レベルは 4 回目投与 2、6、10、16、24 時間後に 86、84、87、74、42%低下し、これらの時点における血漿中 brigatinib 濃度は 1,357、1,333、1,305、73、12 ng/mL であった。50 mg/kg 投与群において、p-EGFR に対する最も強力で最も持続的な阻害が認められた。p-EGFR レベルは 4 回目投与 2、6、10、16、24 時間後に 94、92、94、87、61%低下し、これらの時点における血漿中 brigatinib 濃度は 4,447、2,447、3,480、304、508 ng/mL であった。同時に、EGFR 下流のシグナル伝達蛋白のリン酸化低下も認められた。

結論

EGFR-Del を発現する HCC827 細胞を移植したマウスに、brigatinib を経口投与すると、腫瘍中の EGFR 及び下流のシグナル伝達蛋白のリン酸化が用量依存性に阻害される。血漿中 brigatinib 濃度と標的阻害の程度には正の相関が認められた。

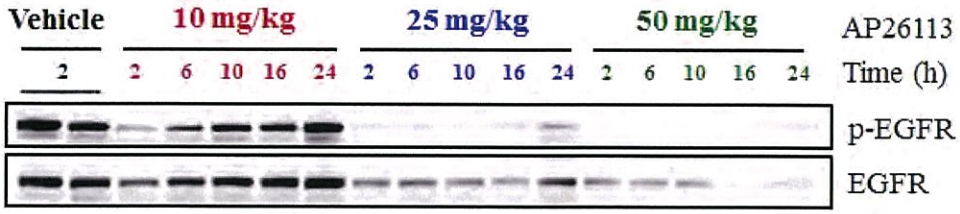


図 2.6.2.2.4.4-1　HCC827 NSCLC 異種移植片モデルにおける EGFR リン酸化に対する brigatinib の作用

2.6.2.2.4.5 EGFR-L858R/T790M 患者由来異種移植片モデルにおける brigatinib の経口有効性試験

添付資料番号：4.2.1.1-25（参考）

試験デザイン

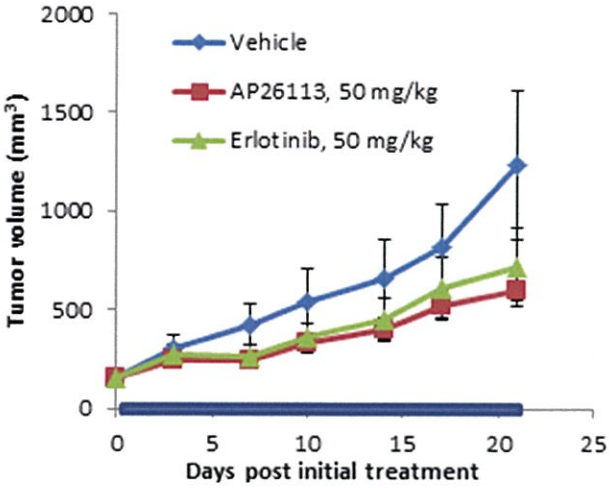
本試験は、EGFR-L858R/T790M 変異型を発現する NSCLC 患者由来腫瘍を用いた患者由来異種移植片マウスモデルにおいて、brigatinib とエルロチニブの有効性を評価することを目的として実施した（[redacted]；[redacted]）。ヒト腫瘍断片を BALB/c ヌードマウスの皮下に注入して腫瘍を形成させた担癌マウスに、溶媒、brigatinib（50 mg/kg）又はエルロチニブ（50 mg/kg）の 1 日 1 回経口投与を連続 21 日間行った。

結果

溶媒投与マウスと比較して、brigatinib 50 mg/kg 投与マウス及びエルロチニブ 50 mg/kg 投与マウスでは、腫瘍増殖がそれぞれ 58%及び 48%阻害されたが、これらの作用は統計学的有意水準に達しなかった（図 2.6.2.2.4.5-1）。本試験で用いた用量は全て忍容性が高く、一般状態悪化又は薬剤関連死亡は認められなかった。

結論

EGFR-L858R/T790M 変異型を有するヒト患者由来異種移植片マウスモデルにおいて、brigatinib の経口投与によって腫瘍増殖は抑制傾向があるが有意ではなかった。



The dosing period is indicated with a blue bar. Values are mean ± SEM

図 2.6.2.2.4.5-1　EGFR-L858R/T790M 患者由来異種移植片マウスモデルにおける腫瘍増殖に対する brigatinib とエルロチニブの作用

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 その他のキナーゼに対する brigatinib の阻害活性及びオフターゲット候補

Brigatinib のキナーゼ選択性プロファイルを解明するために実施した広範な in vitro スクリーニングの結果は、2.6.2.2.1.1 に詳細に述べた。Brigatinib による強力な又はわずかな阻害活性が認められたキナーゼの一部については、2.6.2.2（効力を裏付ける試験）においてさらなる特性評価を行わなかったが、ここでさらなる特性を明らかにする。対象とするのは、ALK と高度の構造的類似性をもつキナーゼ 2 種（インスリン様増殖因子受容体-1［IGF-1R；in vitro キナーゼ IC_{50} 73 nmol/L］及びインスリン受容体［INSR；IC_{50} 160 nmol/L］）、発がん活性をもつことが知られるいくつかのキナーゼ（FLT3［IC_{50} 2.1 nmol/L］、RET［IC_{50} 65 nmol/L］及び HER2［IC_{50} 42 nmol/L］）などである。

チロシンキナーゼのインスリン受容体スーパーファミリーに属するメンバーとして、ALK のキナーゼドメインには、IGF-1R 及び INSR のキナーゼドメインとの相同性の高い配列を持つ。INSR はグルコースの取り込み及び代謝の調節に重要な役割を果たし、IGF-1R も、INSR とのヘテロ二量体形成を介してこれらの過程に関与できる。IGF-1R の異常発現は多くのがん種にも関連しているため、IGF-1R は治療標的と考えられている。Brigatinib による IGF-1R 又は INSR の阻害が、グルコース代謝に影響を及ぼす可能性、あるいは、この化合物がもつと考えられる抗がん活性に寄与する可能性があるため、これらの受容体に対する brigatinib の活性を細胞アッセイにおいてさらに検討した。類似したアッセイを用いた試験により、ALCL 及び NSCLC の細胞モデルにおいて、brigatinib は ALK のリン酸化を阻害し、IC_{50} 値は約 5 nmol/L であることが示されている。

FLT3、RET 及び HER2 の活性化変異型は、特定のがんにおけるドライバー変異であることが明らかになっており、一部の例では、キナーゼドメインの二次変異が、阻害剤に対する耐性に関連している。耐性変異の有無にかかわらず活性化変異型パネルに対する brigatinib の活性を評価した。

最後に、brigatinib の全般的なオフターゲット活性を検討するために、単一濃度の brigatinib（10 μmol/L）を用いて in vitro 受容体結合選択性スクリーニングを実施した。

これらの試験全てにおいて対照化合物を用いた。

2.6.2.3.1.1 細胞アッセイにおける IGF-1R 及び INSR 活性に対する brigatinib の作用

添付資料番号：4.2.1.2-1（参考）

試験デザイン

IGF-1R のリン酸化に対する brigatinib の作用は、IGF-1 リガンドの曝露によって IGF-1R リン酸化が刺激されるヒト肝細胞癌細胞株である Hep G2 細胞を用いて検討した。INSR のリン酸化に対する brigatinib の作用は、インスリンリガンドの曝露によって INSR リン酸化が刺激されるラット肝癌細胞株である H-4-II-E 細胞を用いて検討した。

結果

Hep G2 細胞において、brigatinib は IGF-1 刺激による IGF-1R リン酸化を IC_{50} 値 148 nmol/L で阻害した。H-4-II-E 細胞において、brigatinib はインスリン刺激による INSR リン酸化を IC_{50} 値 9,331 nmol/L で阻害した。

結論

細胞アッセイにおいて、brigatinib は IGF-1R 及び INSR を阻害するが、その効力は、ALK に対する阻害効力と比較してそれぞれ約 30 倍及び 2,000 倍低かった。

2.6.2.3.1.2 変異型 FLT3、RET 及び HER2 を発現する Ba/F3 細胞株の生存に対する brigatinib の作用

添付資料番号：4.2.1.2-2（参考）

試験デザイン

FLT3、RET 及び HER2 に対する brigatinib の細胞内活性を検討するために、他の TKI 耐性に関連する二次変異を伴う又は伴わないこれらのキナーゼの活性化変異型を Ba/F3 細胞に導入し、細胞生存に対する brigatinib の阻害能を評価した。これらの変異型に対する効力が判明している TKI（FLT3 及び RET に対するポナチニブ；HER2 に対するアファチニブ及びネラチニブ）も試験した。

結果

Brigatinib は、活性化 FLT3（FLT3-ITD）を IC_{50} 値 158 nmol/L で阻害した。二次変異 F691L 及び D835Y によって、効力がわずかではあるがさらに低下し（IC_{50} それぞれ 263 及び 211 nmol/L）、F691I 変異によって効力は大幅に低下した（IC_{50} 1,155 nmol/L）。IC_{90} 値は IC_{50} 値の約 2～3 倍高く、同様の傾向が認められた。

Brigatinib の活性化 RET（KIF5B-RET）に対する阻害活性は、二次変異 V804L 及び V804M の有無を問わず、弱かった（IC_{50} 681～1,412 nmol/L）。IC_{90} 値は IC_{50} 値の約 2～4 倍高かった。

エクソン 20 の種々の変異により活性化される HER2 に対して、brigatinib の阻害活性は極めて弱かった（IC_{50} 1,410～4,565 nmol/L）。

結論

細胞モデルにおいて、brigatinib は、F691L 及び D835Y 二次変異の有無を問わず、活性化 FLT3 に対する阻害活性を示す。Brigatinib は、RET 又は HER2 の活性化変異型に対しては、二次変異の有無を問わず、強い阻害活性を示さなかった。

2.6.2.3.1.3 Brigatinib 及びクリゾチニブの in vitro 受容体結合選択性スクリーニング

添付資料番号：4.2.1.2-3（参考）

試験デザイン

市販の in vitro 受容体結合及び酵素アッセイを用いて、神経伝達物質受容体を含む 62 個の受容体、チャネル、トランスポーターに対する brigatinib の作用を検討した（[redacted]）。アッセイは brigatinib の単一濃度（10 μmol/L）で実施し、陽性対照の阻害を 100%とした場合の化合物の阻害率（%）として表した。比較のためにクリゾチニブ 10 μmol/L も試験した。

結果

10 μmol/L の brigatinib 存在下で、50%以上阻害された標的は 62 個中 2 個（3%）のみであった（σ 受容体［非選択的］、ナトリウムイオンチャネル［site 2］）。対照的に、10 μmol/L のクリゾチニブ存在下では、標的 11 個（18%）が 50%以上阻害された（σ 受容体［非選択的］及びナトリウムイオンチャネル［site 2］を含む）。

結論

Brigatinib 10 μmol/L は、一連の副次的薬効標的に対して、わずかなオフターゲット活性を示したのみであったことから、非特異的な薬効エフェクター標的に結合する、広範囲のオフターゲットとの交差反応性はないことが示唆された。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 心血管系

2.6.2.4.1.1 In vitro の心血管系評価：HERG アッセイ

添付資料番号：4.2.1.3-1（参考）

Brigatinib（本試験では AP25573 と称された）の心再分極を障害するポテンシャルについて、GLP 非準拠の hERG アッセイにおいて評価した。

hERG カリウムチャネルを安定発現する HEK293 細胞に対して、brigatinib を DMSO に溶解し細胞外液で希釈して、0.1、1 及び 10 μmol/L の 3 濃度を適用した。Cisapride（陽性対照）を同じ溶媒系に溶解し、10 μmol/L の濃度を適用した。DMSO を添加した細胞外液を陰性対照とした。DMSO の終濃度は、brigatinib の全濃度、陰性対照、陽性対照で 0.1%とした。[redacted] を用いたパッチクランプ法により、カリウム電流を測定した（nA 単位）。

Brigatinib の IC_{50} 値は 10 μmol/L を超えた。Cisapride は、被験濃度 10 μmol/L で 100%の hERG 阻害を示した。

2.6.2.4.2 中枢神経系

添付資料番号：4.2.1.3-2（評価）

GLP 準拠の神経機能を評価する安全性薬理試験において、雄ラット（8 匹／用量群）に brigatinib の 25、50 又は 100 mg/kg を単回経口投与し、中枢神経系に対する作用を評価した。機能観察総合評価において、定性的な中枢神経系パラメータとして、体緊張、瞳孔反射、立ち上がり、振戦、歩行、毛づくろい、立毛などを評価した。定量的なパラメータとしては、前肢及び後肢の握力、後肢開脚、体温などを評価した。Brigatinib に起因した中枢神経系作用は認められず、NOEL は 100 mg/kg だった。この神経機能を評価する安全性薬理試験では、brigatinib の全身曝露量は測定されなかったが、ラットの 14 日間試験（添付資料番号 4.2.3.2-1；2.6.6 及び 2.6.7 に記載）において 100 mg/kg 投与時の Day 1 の Cmax 値は 3,665 ng/mL であり、これは、ヒト（日本人）に brigatinib を 180 mg/日投与した時の Cmax 値 2,119 ng/mL の 1.7 倍である。これらの結果、ラットを用いた神経機能を評価する安全性薬理試験において、brigatinib が臨床予想用量においてヒトに神経学的有害作用を引き起こすような明らかな懸念はないことが示された。

2.6.2.4.3 テレメトリー装置を装着したカニクイザルにおける心肺評価

添付資料番号：4.2.1.3-3（評価）

GLP 準拠の経口（経鼻胃）心血管系／呼吸器系を評価する安全性薬理試験において、雄サルに brigatinib の 10、20 又は 30 mg/kg を単回投与し、心血管系及び呼吸器系機能に対する作用を評価した。Brigatinib 投与の 1～6 時間後に、急性作用として、全用量水準で心拍数のわずかな低下（8～10%）が認められ、20 及び 30 mg/kg で脈圧のわずかな低下（8～9%）が認められた。Brigatinib に関連した遅発性作用（概して投与 32～42 時間後に発現）として、心拍数の増加（20 及び 30 mg/kg）、収縮期血圧の上昇（10、20 及び 30 mg/kg）、拡張期血圧の上昇（30 mg/kg）、平均動脈圧の上昇（30 mg/kg）、体温の上昇（30 mg/kg）も認められた。呼吸器に対する遅発性作用（投与 19～42 時間後に発現）としては、20 及び 30 mg/kg で呼吸数増加などが認められた。Brigatinib 投与によって、心電図波形の形態、心電図間隔（PR、QRS、QT 又は QTcB）、あるいは分時換気量に変化は生じなかった。

雄サルに brigatinib の 10、20 及び 30 mg/kg を経口投与後、全ての動物が brigatinib とその代謝物 AP26123 に曝露された。brigatinib とその代謝物 AP26123 の PK パラメータを表 2.6.2.4.3-1 に要約する。

表 2.6.2.4.3-1　雄性サルへの経口投与後の brigatinib 及び AP26123 の薬物動態パラメータ平均値

測定対象	PK パラメータ	10 mg/kg		20 mg/kg		30 mg/kg	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD
Brigatinib	AUC_{last} (ng·hr/mL)	13,000	10,400	20,600	12,600	46,600	24,200
	Cmax (ng/mL)	670	425	1,760	1,260	3,000	1,370
	Tmax (hr)	8.3	6.4	2.3	1.5	2.7	1.2
	$t_{1/2}$ (hr)	9.4†[1]	NA	8.3	0.69	9.7†[2]	NA
AP26123	AUC_{last} (ng·hr/mL)	613	562	1,080	689	2,940	1,420
	Cmax (ng/mL)	30.3	16.6	103	81.3	245	137
	Tmax (hr)	8.3	6.4	2.3	1.5	2.7	1.2
	$t_{1/2}$ (hr)	NR	NA	9.1†[2]	NA	12†[2]	NA
	代謝物／親化合物比	0.044	0.007	0.051	0.003	0.065	0.020

†N で指定されている場合を除いて N＝3
NA＝該当なし
NR＝報告なし

テレメトリー装置を装着した雄カニクイザルに brigatinib を経口（経鼻胃）投与後、全用量で心肺パラメータに変化が認められたので、心血管系及び呼吸器系機能に関する無作用量（NOEL）は特定されなかった。サルを用いた心肺安全性薬理試験から、brigatinib の臨床予想用量で、ヒトにおいて呼吸器系に対する作用（呼吸数の変化）及び心血管系に対する作用（心拍数の変化）を引き起こす可能性があることが示された。

2.6.2.4.4 腎臓系

添付資料番号：4.2.1.3-4（評価）

GLP 準拠の腎機能を評価する安全性薬理試験において、雄ラット（8 匹／用量群）に brigatinib の 25、50 又は 100 mg/kg を単回経口投与し、腎機能パラメータに対する作用を観察した。評価したパラメータは、血清生化学検査（蛋白、肝トランスアミナーゼ、電解質、尿素窒素、クレアチニンなど）、尿検査（色、比重、量、pH、グルコースなど）、尿生化学検査（カルシウム、カリウム、リン、塩化物、クレアチニン、蛋白など）であった。最低用量の 25 mg/kg では、雄 Sprague-Dawley ラットの腎臓系に対する作用は最小限であり、血中の尿素窒素及びクレアチニンの中等度の上昇のみが認められた。50 及び 100 mg/kg 投与により、尿素窒素、クレアチニン、グルコースの上昇と、血中トリグリセリド及びリン酸の低下、さらに血中クレアチンキナーゼの上昇が認められた。さらに、50 及び 100 mg/kg 投与時に尿中リン排泄率の上昇と尿中クレアチニンの低下が認められ、100 mg/kg では尿中ナトリウム排泄率の上昇も認められた。NOEL は 25 mg/kg であった。この腎機能を評価する安全性薬理試験では、brigatinib の全身曝露量は測定されなかったが、ラットの 14 日間試験（添付資料番号 4.2.3.2-1；2.6.6 及び 2.6.7 に記載）において 30 mg/kg 投与時の Day1 の Cmax 値 2,447 ng/mL に基づき、NOEL である 25 mg/kg での Cmax 予測値は 2,000 ng/mL である。この腎機能を評価する安全性薬理試験における、NOEL 25 mg/kg での Cmax 予測値 2,000 ng/mL は、ヒト（日本人）における brigatinib 180 mg/日投与時の Cmax 値 2,119 ng/mL の 0.9 倍である。この結果から、ラットを用いた腎機能を評価する安全性薬理試験からは、brigatinib の臨床予想用量において、ヒトで腎機能を障害する可能性があることが示されている。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

Brigatinib の薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 考察

2.6.2.6.1.1 Brigatinib の ALK 阻害活性

Brigatinib は、in vitro キナーゼアッセイにおいて、ALK を極めて強力かつ選択的に阻害する。キナーゼ 300 種以上を網羅した広範囲のスクリーニングにおいて、IC_{50} が 1 nmol/L 未満で阻害されたキナーゼは、ALK（IC_{50} 0.6 nmol/L）のみであった。Brigatinib はまた、L1196M 及び G1202R などの ALK のキナーゼドメインに二次変異を有する、検討を行った変異型 12 種全てを強力に阻害した（IC_{50} 5 nmol/L 未満）。Brigatinib はヒト ALK の ATP 結合部位に結合し、複数の分子間相互作用を生み出すことから、ALK 阻害剤としての高い効力が説明できると示唆された。

細胞モデルにおいて、brigatinib は、ALK の自己リン酸化、ALK 下流のシグナル伝達蛋白（STAT3 など）、ALK を介する細胞増殖を極めて強力に阻害する。Brigatinib は、検討を行った全てのモデルにおいて、クリゾチニブよりも大幅に強い ALK 阻害活性を示した。ALK 陽性 NSCLC、ALCL、遺伝子操作した細胞株のパネル全体で、brigatinib は ALK を阻害し、その GI_{50} 又は IC_{50} 値はクリゾチニブと比べて 10 倍低かった。用いた細胞株には、NSCLC 及び ALCL において同定された最も頻度の高い融合変異型 ALK（それぞれ EML4-ALK 及び NPM-ALK）が含まれていた。

In vivo モデルでは、brigatinib の経口投与によって、マウスに皮下移植された EML4-ALK 又は NPM-ALK 発現腫瘍において、ALK を介するシグナル伝達が阻害され、退縮が誘導された。持続的な腫瘍退縮と持続的な ALK シグナル伝達阻害は、マウスにおいて良好に忍容された brigatinib の用量レベルで達成された（例えば、NSCLC モデルでは 10 mg/kg 1 日 1 回、増殖がより速い Ba/F3 遺伝子操作モデルでは 50 mg/kg 1 日 1 回）。Brigatinib と比較して、クリゾチニブは、同程度の有効性と ALK 阻害を得るためにより高い用量及び血漿中濃度を必要とし、これは、brigatinib の in vitro 効力がクリゾチニブよりも大きいことと一致した。

Brigatinib は、マウス ALK 陽性同所性脳腫瘍モデルにおいても、クリゾチニブより優れた有効性を示した。これは、brigatinib の中枢神経系への高い浸透性、及び brigatinib のクリゾチニブよりも高い効力によって、マウスにおいて薬理作用不足が生じにくくなることを反映している可能性がある。

Brigatinib が汎 ALK 阻害活性をもつ可能性、すなわち、耐性を付与すると思われる個々の ALK 変異型全てを阻害する可能性を評価した。EML4-ALK 融合蛋白、又はクリゾチニブ、セリチニブ及びアレクチニブに対する臨床的又は非臨床的耐性に関連している二次変異を有する変異型 EML4-ALK17 種に、細胞生存が依存するように遺伝子操作した Ba/F3 細胞株パネル試験を用いた。Brigatinib は、変異型 ALK 17 種全ての生存を、強力（IC_{50} 200 nmol/L 未満）かつ選択的に（ALK 陰性細胞と比較した選択性 > 15 倍）阻害することがわかった。この中には、クリゾチニブに対する臨床的で最も高頻度に出現する耐性変異（L1196M 及び G1269A ; [5]）と、承認済み ALK 阻害剤 3 剤全てに対する臨床的耐性との関連がこれまでに明らかにされている唯一の変異（G1202R ; [6]）が含まれている。さらに、in vitro 抵抗性獲

得試験では、brigatinib 500 nmol/L に対する耐性を付与する可能性のある ALK 変異は同定されなかった。In vivo アッセイにおいて、brigatinib は ALK を介するシグナル伝達を阻害し、その他の ALK 阻害剤に対する耐性に関連する変異（L1196M 及び G1202R など）を有する腫瘍の増殖を有意に抑制し、又は退縮を誘導した。したがって、brigatinib は汎 ALK 阻害剤のプロファイルを有すると考えられる。

AP26123 は brigatinib の主要代謝物であるが、その存在量は患者において brigatinib 量の 10%未満である（5.3.5.2-3）。In vitro キナーゼ及び細胞アッセイにおいて、AP26123 は ALK を阻害し、その効力は brigatinib より約 3 倍低かった。

2.6.2.6.1.2 ROS1、EGFR 及びその他の標的に対する brigatinib の阻害活性

広範囲の in vitro キナーゼスクリーニングにおいて、ALK に対する IC_{50} 値の 10 倍以内（6 nmol/L 未満）の IC_{50} 値で阻害されたキナーゼは、10 種（約 3%）のみであった。この中には、ROS1、EGFR-L858R 及び FLT3 が含まれた（IC_{50} 1.5～2.1 nmol/L）。ALK と高い相同性を示す 2 つのキナーゼである IGF-1R 及び INSR も阻害されたが、効力は大幅に低かった（それぞれ 73 nmol/L 及び 160 nmol/L）。クリゾチニブの主要標的の 1 つである MET も含め、検討を行ったキナーゼの大半は、阻害の IC_{50} 値が 1,000 nmol/L を超えた。

細胞及び in vivo アッセイにおいて、brigatinib は ROS1 を阻害し、その効力は ALK に対する効力と同程度であった。Brigatinib は、NSCLC 患者に認められる ROS1 融合蛋白を発現する Ba/F3 細胞の生存を、IC_{50} 値 16～31 nmol/L で阻害し、そのような腫瘍を移植したマウスでは、brigatinib 50 mg/kg 1 日 1 回経口投与によって腫瘍退縮が誘導された。

細胞及び in vivo アッセイにおいて、brigatinib は各種変異型の EGFR に対して様々なレベルの活性を示した。Brigatinib に対する感受性が最も高かった変異型は、NSCLC 患者に最も高頻度にみられる 2 つの活性化変異型 EGFR のうちの 1 つである、エクソン 19 に欠失を有する EGFR-Del であった。Brigatinib は、EGFR-Del を発現する Ba/F3 細胞の生存を IC_{50} 値 95 nmol/L で阻害し、EGFR-Del を発現する NSCLC 細胞株を移植したマウスでは、brigatinib 25 mg/kg 1 日 1 回経口投与により腫瘍退縮が誘導された。一方、細胞アッセイにおいて、brigatinib は EGFR-L858R（2 番目に多い活性化変異型）及び活性化変異と T790M 耐性変異の両方を有する変異型 EGFR を阻害したが、効力は低かった（IC_{50} 272～489 nmol/L）。興味深いことに、これら活性化変異及び T790M 耐性変異の両方を有する変異型 EGFR に対する阻害の IC_{90} 値（2,461～2,968 nmol/L）は、活性化変異のみを有する変異型、特に EGFR-Del（IC_{90} 314 nmol/L ; EGFR-L858R IC_{90} 1,201 nmol/L）に対する IC_{90} 値と比べて大幅に大きかった。これと一致して、マウスに brigatinib 50 mg/kg 1 日 1 回経口投与を行っても、EGFR-L858R/T790M を有する患者由来腫瘍の増殖は有意に抑制されなかった。最後に、brigatinib は細胞アッセイにおいて、野生型 EGFR の活性を阻害しなかった（IC_{50} > 3,000 nmol/L）。これらのキナーゼに対する brigatinib の活性については、2.6.2.6.1.3 でさらに論じる。

Brigatinib は、一連の副次的薬効標的に対して、わずかなオフターゲット活性を示したのみであったことから、非特異的な薬効エフェクターに結合する、広範囲のオフターゲットとの交差反応性はないことが示唆された。10 μmol/L の brigatinib 存在下で、50%以上阻害された標的は 62 個中 2 個（3%）のみであった（σ 受容体［非選択的］、ナトリウムイオンチャネル［site 2］）。対照的に、10 μmol/L のクリゾチニブによって、標的 11 個（18%）が 50%以

上阻害された（σ受容体とナトリウムイオンチャネルを含む）。σ受容体は、心血管系や神経系の調節などの、様々な生理的過程に関与している[24]。ナトリウムイオンチャネルは、ナトリウムイオンの流動を制御することによって、ナトリウムの血行動態恒常性を調節する[25]。Brigatinib を用いた安全性薬理試験（2.6.2.6.1.4 で論じる）では、サルにおける心拍数、血圧、呼吸数の変化を含む、限定的な心血管系に対する作用と、ラットにおける腎臓に対する作用が明らかになっている。ラット神経機能試験では、影響は認められなかった。

In vitro キナーゼアッセイにおいて、AP26123 は、検討を行ったキナーゼ 7 種全て（IGF-1R、INSR、EGFR、EGFR(L858R)、ErbB4/HER4、EGFR(L858R, T790M)、ErbB2/HER2）を阻害し、IC_{50} 値は brigatinib と同程度か、わずかに低かった（5 倍以下）。

患者における AP26123 の存在量は brigatinib 量の 10%未満であることから（ARIAD-BRI-01）、ALK 以外の標的に対する AP26123 の細胞内及び in vivo 活性はそれ以上検討しなかった。

2.6.2.6.1.3 Brigatinib の非臨床試験での効力と患者における臨床曝露量との比較

これらの非臨床試験結果がもたらしうる臨床的意味をさらに評価するために、brigatinib の ALK 及びその他の標的に対する阻害効力を、brigatinib 投与患者において認められる曝露量と関連付けて検討した。

In vitro キナーゼアッセイ及び細胞アッセイにより評価した、ALK 及びその他のキナーゼに対する brigatinib の阻害活性を、表 2.6.2.6.1.3-1 にまとめる。キナーゼデータは全て、同一のアッセイ条件（ATP 10 μmol/L など）を用いて取得し、細胞内効力データは全て、指定の変異型キナーゼを発現するように形質転換した Ba/F3 細胞を用いて取得した（野生型 EGFR、IGF-1R 及び INSR を除く）。細胞データには IC_{50} 値と IC_{90} 値の両方が含まれる。ここに示されているのは、キナーゼ及び細胞データの両方が取得された EML4-ALK と付加変異型 EML4-ALK 7 種（細胞アッセイで brigatinib に対する最高度の耐性を引き起こした変異型［G1202R］を含む）のデータである。ROS1、EGFR、FLT3、RET 及びそれらの変異型に関するデータと、ALK と高い相同性を示すキナーゼである IGF-1R 及び INSR に関するデータも示した。

表 2.6.2.6.1.3-1　Brigatinib：in vitro キナーゼ及び細胞内阻害活性の総合要約

キナーゼ	キナーゼアッセイ	細胞アッセイ*		
	IC_{50} (nmol/L)	IC_{50} (nmol/L)	IC_{90} (nmol/L)	細胞アッセイで評価した変異型キナーゼ
ALK	0.6	14	38	EML4-ALK
ALK (G1269A)	2.9	9	22	EML4-ALK (G1269A)
ALK (L1152R)	1.7	11	34	EML4-ALK (L1152R)
ALK (L1196M)	2.5	41	118	EML4-ALK (L1196M)
ALK (C1156Y)	2.1	45	129	EML4-ALK (C1156Y)
ALK (F1174L)	2.1	55	137	EML4-ALK (F1174L)
ALK (T1151Tins)	1.5	114	416	EML4-ALK (T1151Tins)
ALK (G1202R)	4.9	184	762	EML4-ALK (G1202R)
ROS1	1.9	18	71	CD74-ROS1
ROS1(L2026M)	ND	17	34	CD74-ROS1(L2026M)
ROS1 (G2032R)	ND	1100	> 1100	CD74-ROS1(G2032R)
EGFR	67	> 3000	> 3000	p-EGFR^
EGFR (Del)	ND	95	314	EGFR (E746-A750 Del)
EGFR (L858R)	1.5	397	1201	EGFR (L858R)
EGFR (Del/T790M)	ND	272	2461	EGFR (E746-A750 Del/T790M)
EGFR (L858R/T790M)	29	489	2968	EGFR (L858R/T790M)
FLT3	2.1	158	465	FLT3-ITD
FLT3 (F691I)	ND	1155	2392	FLT3-ITD (F691I)
FLT3 (F691L)	ND	263	576	FLT3-ITD (F691L)
FLT3 (D835Y)	1.5	211	638	FLT3-ITD (D835Y)
RET	65	1412	5477	KIF5B-RET
RET (V804L)	27	681	1556	KIF5B-RET-V804L
RET (V804M)	22	975	3125	KIF5B-RET-V804M
IGF-1R	73	148	ND	p-IGF-1R^
INSR	160	9331	ND	p-INSR^

*特に明記されていない限り、生存が指定の融合蛋白の活性に依存する Ba/F3 細胞を用い、細胞生存能アッセイによって評価した効力を表示している。
^野生型 EGFR、IGF-1R 及び INSR の阻害は、それぞれリガンド刺激下の H358、Hep G2 及び H-4-II-E 細胞におけるリン酸化（p-）阻害の測定により評価した。
出典：4.2.1.1-1（キナーゼ）；4.2.1.1-14（ALK）、4.2.1.1-19（ROS1）、4.2.1.1-22（野生型 EGFR）、4.2.1.1-21（変異型 EGFR）、4.2.1.2-2（FLT3 及び RET）、4.2.1.2-1（IGF-1R 及び INSR）。
ND：測定せず。

第 1 に、in vitro キナーゼアッセイと細胞アッセイにおける効力に、密接な関連が認められないことに注目を要する表 2.6.2.6.1.3-1。例えば、検討を行った ALK の二次変異型 7 種のうち、in vitro キナーゼアッセイで IC_{50} 値が最も低かった変異型（T1151Tins；IC_{50} 1.5 nmol/L）の、細胞アッセイにおける IC_{50} 値は、高いほうから 2 番目であった（IC_{50} 114 nmol/L；他の変異型と比較して最大 13 倍大きい）。さらに、検討を行ったキナーゼパネル全体で、10 種が強力に阻害され、IC_{50} 値は 2 倍の狭い範囲内に収まった（IC_{50} 1.5～2.9 nmol/L）。一方、細胞アッセイでは、これらのキナーゼに対する IC_{50} 値が 40 倍を超えた範囲にわたって変動した（IC_{50} 9 nmol/L［ALK-G1269A］～397 nmol/L［EGFR-L858R］）。以下で論じるように、細胞アッセイの結果は、患者において得られる TKI 濃度を踏まえて検討すれば、臨床データと合理的に関連付けることが可能である。一方、患者において得られる brigatinib 曝露量は、患者において強力に阻害されないことが後に示された変異型キナーゼに対する阻害の IC_{50} 値も、はるかに上回る（EGFR-L858R/T790M など；後述）。したがって、広範囲の in vitro キナーゼスクリーニングの結果は、主に、細胞及び in vivo アッセイでさらに検討するキナーゼ

の優先順位の決定に用い、患者における特定のキナーゼの阻害に必要な brigatinib 曝露量に関する直接的な結論の導出には用いなかった。

第 2 に、2.6.2.2.2.12（4.2.1.1-14）で詳細に述べられているように、臨床薬物動態パラメータを、臨床的有効性の予測を可能にするような形で、TKI の細胞内効力に関連付ける方法を見出すために、探索的解析を実施した。この解析では、承認された ALK 阻害剤であるクリゾチニブ、セリチニブ及びアレクチニブを用いて取得された細胞内 IC_{50} 値及び IC_{90} 値データ（brigatinib と並行）と、臨床試験の用量で患者において得られると報告された曝露量（幾何平均値［GeoMean］）（4.2.1.1-14）を用いた。血漿蛋白結合が TKI の効力に及ぼす機能的影響を適切に説明することに、特に重点を置いた。系統的解析（Cave 値の評価も含む）により、患者における「有効」Cmax 値（蛋白結合の機能的影響について補正した Cmax 値）を IC_{90} 値と比較した場合に、細胞内効力データが臨床的有効性と最もよく関連することが示された。4.2.1.1-14 に記されているように、細胞アッセイに生理的濃度のヒト血漿蛋白を加えると、クリゾチニブ、セリチニブ及びアレクチニブの ALK 阻害の IC_{50} 値はそれぞれ 2.7 倍、2.7 倍及び 4 倍増加する。したがって、クリゾチニブ、セリチニブ及びアレクチニブの有効 Cmax 値は、患者において測定された総 Cmax 値に対してそれぞれ 37%（1/2.7）、37%及び 25%と計算される。この解析によれば、クリゾチニブ、セリチニブ及びアレクチニブの有効 Cmax 値は、EML4-ALK に対する阻害の IC_{90} 値を上回り、この結果は、ALK 陽性 NSCLC 患者において認められる臨床的有効性と一致した。逆に、変異型 ALK 検討に用いた 18 種のうち、クリゾチニブ、セリチニブ又はアレクチニブに対する臨床的耐性に関連している複数において有効 Cmax 値が IC_{90} 値を下回った。これらの関係は、図 2.6.2.2.2.12-2 にグラフで示されている。

表 2.6.2.6.1.3-2　Brigatinib とクリゾチニブの臨床曝露量の要約

TKI	用量	Cmax (nmol/L)			Cave (nmol/L)		
		総 Cmax	「遊離」Cmax	「有効」Cmax	総 Cave	「遊離」Cave	「有効」Cave
Brigatinib	90 mg 1 日 1 回	945	324	473	582	200	291
	180 mg 1 日 1 回	2485	852	1243	1446	496	723
クリゾチニブ	250 mg 1 日 2 回	913	85	338	718	67	266

注：定常状態の血漿中 Cmax 及び Cave 幾何平均値と、血漿蛋白結合率（brigatinib 65.7%、クリゾチニブ 90.7%）は、以下の情報源から算出した：

Brigatinib（分子量 584.1）

- 添付資料番号：4.2.2.3-1、5.3.5.2-3 及び 5.3.5.2-1
- 90 mg 1 日 1 回：Cmax 552 ng/mL；Cave 340 ng/mL（$AUC_{0\text{-}24}$ 8,165 ng·hr/mL）
- 180 mg 1 日 1 回：Cmax 1,452 ng/mL；Cave 845 ng/mL（$AUC_{0\text{-}24}$ 20,276 ng·hr/mL）
- 参考：Brigatinib-2001 試験において日本人の 180 mg 1 日 1 回連投時の Cmax 2,119 ng/mL、Cave 1,297 ng/mL、$AUC_{0\text{-}24}$ 31,130 ng·hr/mL であった（5.3.5.2-1）。

クリゾチニブ（分子量 450.3）

- Clinical pharmacology review. Xalkori, Crizotinib. [26] 米国食品医薬品局医薬品評価研究センター；2011 年。報告書番号：202570
- Cmax 411 ng/mL；Cave 323 ng/mL（$AUC_{0\text{-}12}$ 3,880 ng·hr/mL）

Brigatinib の主要な第 2 相試験で検討された 2 種類の投与法である、90 mg 及び 180 mg 1 日 1 回投与時の臨床薬物動態パラメータを、表 2.6.2.6.1.3-2 に要約する。有効 Cmax 値は、90 mg 投与時に 473 nmol/L、180 mg 投与時に 1,243 nmol/L である。4.2.1.1-14 に記されているよう

に、これら有効 Cmax は患者において測定される総 Cmax 値の 50%であり、生理的濃度のヒト血漿蛋白によって、細胞アッセイにおける brigatinib の IC_{50} 値が 2 倍に上昇することと一致する。重要な点として、brigatinib 180 mg 投与時の有効 Cmax 値は、EML4-ALK 及び耐性付加変異型 EML4-ALK17 種全てに対する IC_{90} 値を上回る（表 2.6.2.6.1.3-1；4.2.1.1-14）。Brigatinib 90 mg 投与時の有効 Cmax 値は、EML4-ALK 及び二次耐性変異型 EML4-ALK17 種中 16 種（G1202R を除く）に対する IC_{90} 値を上回り、brigatinib 180 mg 投与は、90 mg 投与と比べて、全ての変異型 ALK に対して活性を示す可能性が高いことが示唆される。

さらに、臨床曝露量が EML4-ALK の阻害に必要な濃度を上回る程度から、患者における「薬理作用不足」、すなわち、主に標的の不十分な阻害に起因する耐性又は有効性欠如の可能性について、有用な情報が得られる可能性がある。表 2.6.2.6.1.3-2 に示すように、brigatinib 90 mg 投与を受けた患者の曝露量は、クリゾチニブ投与を受けた患者の曝露量と同程度であり（又は上回っており）、brigatinib 180 mg 投与を受けた患者の曝露量は、クリゾチニブ投与患者の曝露量を 2 倍以上上回り、その倍率は比較されている薬物動態パラメータによって異なる。「薬理作用不足」から、クリゾチニブ投与患者における中枢神経系進行の高い発生率が説明される可能性が高く（すなわち、血液脳関門の通過が不十分であること）、クリゾチニブ投与中に ALK に基づく耐性機序（ALK キナーゼドメインの変異など）の所見なく進行する患者が、より強力な第二世代 ALK 阻害剤に反応を示す場合が多い理由も説明されると考えられた[13][14]。この点に関して、クリゾチニブの有効 Cmax 値（338 nmol/L）は、EML4-ALK 阻害の IC_{90} 値（331 nmol/L）をわずかに上回るのみであることが注目に値した。対照的に、brigatinib 90 mg 及び 180 mg 投与時の有効 Cmax 値は、EML4-ALK に対する IC_{90} 値を、それぞれ 12.4 倍及び 32.7 倍上回った。このことから、brigatinib はクリゾチニブよりも、薬理作用不足がはるかに生じにくいという可能性が示唆された。この仮説は、脳転移を有する患者において、brigatinib による高い頭蓋内奏効率が認められること、また、ALK の二次変異の有無を問わず、患者に brigatinib への反応が認められることと一致すると示唆された（2.7.3）。

ALK 以外の標的に関しては、同様の解析によって、brigatinib 180 mg 投与で得られる有効 Cmax 値（1,243 nmol/L）が、ROS1（及び ROS1-L2026M）阻害の IC_{90} 値を大幅に上回ることが示されている。有効 Cmax 値は、EGFR-Del、EGFR-L858R、FLT3、FLT3-F691L 及び FLT3-D835Y に対する IC_{90} 値も上回るが、これらの変異を有する患者において、利用可能な他の TKI と比較して、brigatinib が臨床的に有用であるかどうかは明らかにされていない。

同様に、有効 Cmax 値は IGF-1R に対する IC_{50} 値（IC_{90} 値は算出されなかった）を上回り、IGF-1R は、臨床で予想される曝露量で阻害される可能性が示唆された。Brigatinib によって IGF-1R が阻害されると、グルコース代謝に影響が生じる可能性がある。

一方、brigatinib 180 mg 投与で得られる有効 Cmax 値（1,243 nmol/L）は、T790M 耐性変異を有する変異型 EGFR に対する IC_{90} 値を超えず、これは、患者に認められる比較的弱い臨床反応と一致する（AP26113-11-101）。最後に、180 mg 投与時の有効 Cmax 値は、RET、RET-V804L/M、野生型 EGFR、FLT3-F691I、ROS1-G2032R、及び INSR に対する IC_{90} 値も超えない（最後の 2 つは IC_{50} 値に基づく）。

この解析が探索的であることは認めるが、上述のとおり、臨床データが入手可能である場合には、患者における有効 Cmax 値と、細胞アッセイにおける IC_{90} 値との関連性が、活性化及び耐性変異を有する NSCLC 患者で認められるクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ

及びbrigatinibの有効性レベルの高度な予測因子となる。しかし、この解析方法は極めて有益な情報をもたらすと考えられる一方で、brigatinibがもたらしうる有効性に関する同様の結論は、より従来的な解析方法に基づいて導き出すことができる。例えば、表2.6.2.6.1.3-2に示されている、患者におけるbrigatinibの「総」及び「遊離」Cmax値とCave値も、総じて、細胞アッセイにおいてALK及び変異型ALKの活性を大幅に阻害するために必要な濃度を上回る（表2.6.2.6.1.3-1）。例として、brigatinibの90 mg又は180 mg投与を受けた患者において、総Cmax、遊離Cmax、総Cave及び遊離Cave値は全て、EML4-ALKと、検討を行った臨床的に重要な二次耐性変異型EML4-ALK 17種全てに対するIC_{50}値を上回る。Brigatinib 180 mg投与を受けた患者では、総Cmax、遊離Cmax及び総Cave値が、汎ALK阻害のIC_{90}値も上回る。

要約すると、患者における曝露量を、細胞アッセイにおいて必要とされる阻害濃度と関連付ける様々な評価によって、brigatinib 180 mg投与は、EML4-ALK及び全ての二次耐性変異型EML4-ALKの活性を阻害するのに十分な曝露量をもたらすと予測され、これは、汎変異型ALKに対する阻害剤としてのbrigatinibのプロファイルと一致する。

昨年、ロルラチニブが新たなALK阻害薬として承認された。ロルラチニブとbrigatinibとの相違については、非臨床実験モデルにおいてロルラチニブに耐性を示すL1256F変異型、I1171N+L1256FあるいはG1202R+G1269Aなどの二重変異型ALKに対してbrigatinibは阻害活性をもつことが今年報告された[27]。この変異型ALKに対する阻害活性の有無が臨床効果に反映される可能性がある。

2.6.2.6.1.4 安全性薬理試験

Brigatinibを用いて実施した非臨床安全性薬理試験の概要を以下に述べる。曝露量については、brigatinibの最大臨床用量である180 mg/日投与時のヒト（日本人）Cmax値2,119 ng/mL（3,628 nmol/L）に対する倍数を報告する。

In vitro hERG試験では、brigatinibのIC_{50}値は10 μmol/Lを超え、ヒトにおけるQT延長のリスクは最小限であることがわかった。さらに、サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験（4.2.1.3-3）と、サルを用いた28日（4.2.3.2-5）及び6ヵ月（4.2.3.2-6）の一般毒性試験において実施した心電図解析によって、QT延長の所見は認められなかった。

サルを用いた心血管系安全性評価では、全ての用量で心拍数及び血圧の上昇及び／又は低下が認められた。最低用量である10 mg/kg投与時のCmax値は670 ng/mLであり、これは、brigatinibの最大臨床用量180 mg/日投与時のヒト（日本人）Cmax値2,119 ng/mLに対して0.3倍である。したがって、臨床予想曝露量でサルの心血管系に対する作用が発現しており、ヒトで頻脈や高血圧などの心血管系有害事象が発現する可能性があると考えられる。

サルを用いた呼吸器系安全性評価では、Cmaxに基づく曝露量がヒトCmaxに対して0.8倍の時点で、呼吸数増加が認められ、これは、サルを用いた一般毒性評価試験において顕微鏡的に認められた空胞化泡沫状肺胞マクロファージと構造的に相関する可能性がある。サルで認められる呼吸数の増加が、臨床で認められる呼吸困難や息切れなどの呼吸器系有害事象に関連しているかどうかは不明である。

ラットを用いた単回投与試験において、神経機能に対する安全性薬理作用は認められず、NOEL である 100 mg/kg（高用量）投与時の Cmax に基づく曝露量予測値は、brigatinib の臨床用量 180 mg/日投与時のヒト（日本人）Cmax に対して 1.7 倍であった。

ラットを用いた腎安全性薬理試験では、brigatinib の臨床用量 180 mg/日投与時のヒト（日本人）Cmax に対して 0.9 倍以上の曝露量範囲で、腎機能低下が認められた。ラットを用いた一般毒性試験においても、腎機能低下と、尿細管変性などの顕微鏡的変化が認められた。腎機能低下は臨床でも認められている。

2.6.2.6.2 結論

ここで述べた非臨床薬理試験の主な結果と、それらが brigatinib の臨床開発に及ぼしうる影響を、以下に要約する。

- Brigatinib は、ALK を阻害するように合理的に設計されたチロシンキナーゼ阻害剤である
- Brigatinib は、in vitro 及び in vivo アッセイにおいて、ALK の自己リン酸化と、STAT3 などの ALK 下流シグナル伝達蛋白のリン酸化を阻害する
- Brigatinib は、EML4-ALK 及び NPM-ALK 融合蛋白を発現する細胞株の in vitro 増殖を抑制し、マウスにおける EML4-ALK 陽性 NSCLC 異種移植片の増殖を用量依存性に抑制する
- Brigatinib 投与によって、ALK 誘発性腫瘍細胞株を頭蓋内に移植したマウスにおいて、抗腫瘍活性と生存期間延長が得られる
- Brigatinib は、クリゾチニブ投与中に進行した患者の NSCLC 腫瘍において同定される L1196M、G1202R 及びその他の変異を有する複数の付加変異型 EML4-ALK に対して、in vitro 及び in vivo 活性を示す
- Brigatinib は、クリゾチニブよりも、ALK に対する阻害効力が大幅に高い
  - ALK 陽性 NSCLC、ALCL、遺伝子操作した細胞株のパネル全体で、brigatinib は ALK を、クリゾチニブよりも 10 倍高い効力で阻害した
  - In vivo モデルにおいて、brigatinib と比較してクリゾチニブは、同程度の有効性及び ALK 阻害を得るために、より高い用量及び血漿中濃度を必要とした
  - Brigatinib は、マウス ALK 陽性同所性脳腫瘍モデルにおいて、クリゾチニブよりも優れた有効性を示した
- Brigatinib の 180 mg 1 日 1 回投与は汎 ALK 阻害剤のプロファイルを有し、臨床で達成可能な濃度（第 1/2 相試験で患者において定常状態で達成された濃度幾何平均値）で、耐性を付与する可能性のある全ての変異型 ALK 全てを阻害することができる
  - Brigatinib 180 mg 1 日 1 回投与患者において
    - 総 Cmax 値（2,485 nmol/L）、遊離 Cmax 値（852 nmol/L）、蛋白結合の機能的影響について補正した有効 Cmax 値（1,243 nmol/L）のいずれも、EML4-ALK に対する IC_{90} 値（38 nmol/L）と、L1196M 及び G1202R を含む、検討を行った臨床的に重要な二次耐性変異型 EML4-ALK 17 種全てに対する IC_{90} 値（範囲 22～762 nmol/L）を上回る

■ 総 Cave 値（1,446 nmol/L）、遊離 Cave 値（496 nmol/L）、蛋白結合の機能的影響について補正した有効 Cave 値（723 nmol/L）のいずれも、EML4-ALK に対する IC_{50} 値（14 nmol/L）と、検討を行った臨床的に重要な二次耐性変異型 EML4-ALK 17 種全てに対する IC_{50} 値（範囲 9～184 nmol/L）を上回る

○ Brigatinib 90 mg 1 日 1 回投与患者において

■ 薬物動態パラメータ 6 項目全てが、EML4-ALK に対する IC_{50} 及び IC_{90} 値を上回るが、一部の薬物動態パラメータは、二次耐性変異型 EML4-ALK17 種全てに対する IC_{50} 及び IC_{90} 値を上回るわけではない

・Brigatinib は、クリゾチニブよりも、薬理作用不足がはるかに生じにくいと予測される

○ Brigatinib 180 mg 1 日 1 回投与患者において、クリゾチニブ投与患者の総 Cmax より約 2 倍大きな総 Cmax が得られ、in vitro アッセイでは、brigatinib の効力がクリゾチニブの効力より 10 倍大きい

・Brigatinib は、in vitro 及び in vivo アッセイにおいて、臨床的に達成可能な濃度で、ALK に対する効力と同程度の効力で ROS1 を阻害する

・Brigatinib は、in vitro アッセイにおいて、ALK 阻害よりも効力は低いものの、臨床的に達成可能な濃度で、IGF-1R を阻害すると示唆される

・Brigatinib は、臨床的に達成可能な濃度で、最も頻度の高い活性化変異（エクソン 19 欠失及び L858R）を有する変異型 EGFR を阻害するが、同時に T790M 耐性変異も有する変異型は阻害しない

・Brigatinib の主要であるが微量の代謝物である AP26123 の、ALK、IGF-1R、INSR 及び変異型 EGFR に対する効力は、brigatinib の効力と比較して同程度であるか、わずかに低い。

・非臨床安全性薬理試験において、brigatinib による腎臓系に対する作用（腎機能低下）、心血管系に対する作用（心拍数及び収縮期血圧の変化）、呼吸器系に対する作用（呼吸数増加）が明らかになっている。

要約すると、brigatinib は、コンピューターによる構造設計によって創生された低分子チロシンキナーゼ阻害剤である。Brigatinib は ALK の極めて強力かつ選択的な阻害剤であり、非臨床モデルにおいて、クリゾチニブ治療耐性に関与する複数の耐性機序を克服することが示された。Brigatinib 180 mg 1 日 1 回投与を受けた患者における曝露量は、L1196M 及び G1202R を含む、全ての ALK の二次耐性変異を阻害するために必要な濃度を上回る。

2.6.2.7 参考文献一覧

[1] Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2010;363(18):1693-703.

[2] Wong DW, Leung EL, So KK, Tam IY, Sihoe AD, Cheng LC, et al. The EML4-ALK Fusion Gene Is Involved in Various Histologic Types of Lung Cancers From Nonsmokers With Wild-type EGFR and KRAS. 2009;115(8):1723-33.

[3] Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. N Engl J Med. 2013;368(25):2385-94.

[4] Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. N Engl J Med. 2014;371(23):2167-77.

[5] Katayama R, Lovly CM, Shaw AT. Therapeutic Targeting of Anaplastic Lymphoma Kinase in Lung Cancer: A Paradigm for Precision Cancer Medicine. Clin Cancer Res. 2015;21(10):2227-35.

[6] Toyokawa G, Seto T. Updated Evidence on the Mechanisms of Resistance to ALK Inhibitors and Strategies to Overcome Such Resistance: Clinical and Preclinical Data. Oncol Res Treat. 2015;38(6):291-8.

[7] Weickhardt AJ, Scheier B, Burke JM, Gan G, Lu X, Bunn PA Jr, et al. Local Ablative Therapy of Oligoprogressive Disease Prolongs Disease Control by Tyrosine Kinase Inhibitors in Oncogene-Addicted Non-Small-Cell Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2012;7(12):1807-1814.

[8] Costa DB, Shaw AT, Ou SH, Solomon BJ, Riely GJ, Ahn MJ, et al. Clinical Experience With Crizotinib in Patients With Advanced ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer and Brain Metastases. J Clin Oncol. 2015;33(17):1881-8.

[9] Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, et al. The ALK Inhibitor Ceritinib Overcomes Crizotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer Discov. 2014;4(6):662-673.

[10] Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, et al. CH5424802, a Selective ALK Inhibitor Capable of Blocking the Resistant Gatekeeper Mutant. Cancer Cell. 2011;19(5):679-90.

[11] ZYKADIA® US Prescribing Information. Initial U.S. Approval: 2014 (Revised:12/2017).

[12] ALECENSA® US Prescribing Information. Initial U.S. Approval: 2015 (Revised:6/2018).

[13] Gadgeel SM, Gandhi L , Riely GJ, Chiappori AA, West HL, Azada MC, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. Lancet Oncol. 2014;15(10):1119-28.

[14] Shaw AT, Kim DW, Mehra R, Tan DS, Felip E, Chow LQ, et al. Ceritinib in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2014;370(13):1189-97.

[15] Ou SH, Ahn JS, De Petris L, Govindan R, Yang JC, Hughes B, et al. Alectinib in Crizotinib-Refractory ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase II Global Study. J Clin Oncol. 2016;34(7):661-8.

[16] Ou SH, Greenbowe J, Khan ZU, Azada MC, Ross JS, Stevens PJ, 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(2):231-4.

[17] Ou SH, Klempner SJ, Greenbowe JR, Azada M, Schrock AB, Ali SM, et al. Identification of a Novel HIP1-ALK Fusion Variant in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) and Discovery of ALK I1171 (I1171N/S) Mutations in Two ALK-Rearranged NSCLC Patients with Resistance to Alectinib. J Thorac Oncol. 2014;9(12):1821-5.

[18] Ou SH, Milliken JC, Azada MC, Miller VA, Ali SM, Klempner SJ, et al. ALK F1174V mutation confers sensitivity while ALK I1171 mutation confers resistance to alectinib. The importance of serial biopsy post progression. Lung Cancer. 2016;91:70-2.

[19] Tchekmedyian N, Ali SM, Miller VA, Haura EB. Acquired ALK L1152R Mutation Confers Resistance to Ceritinib and Predicts Response to Alectinib. J Thorac Oncol. 2016;11(7):e87-8.

[20] Christensen JG, Zou HY, Arango ME, Li Q, Lee JH, McDonnell SR, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. Mol Cancer Ther. 2007;6(12 Pt 1):3314-22.

[21] Zhang S, Wang F, Keats J, Zhu X, Ning Y, Wardwell SD, et al. Crizotinib-Resistant Mutants of EML4-ALK Identified Through an Accelerated Mutagenesis Screen. Chem Biol Drug Des. 2011;78(6):999-1005.

[22] Kodityal S, Elvin JA, Squillace R, Agarwal N, Miller VA, Ali SM, et al. A novel acquired ALK F1245C mutation confers resistance to crizotinib in ALK-positive NSCLC but is sensitive to ceritinib. Lung Cancer. 2016;92:19-21.

[23] Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, Gainor JF, Bergqvist S, Brooun A, et al. Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F. N Engl J Med. 2016;374(1):54-61.

[24] Hayashi T, Su T. The Sigma Receptor: Evolution of the Concept in Neuropsychopharmacology. Curr Neuropharmacol. 2005;3(4):267-80.

[25] Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. Structure and function of voltage-gated sodium channels. J Physiol. 1998;508(Pt 3):647-57.

[26] Crizotinib: Clinical pharmacology review. Xalkori, Crizotinib. Center for Drug Evaluation and Research: U.S. Food and Drug Administration; 2011. US NDA No. 202570.

[27] Okada K, Araki M, Sakashita T, Ma B, Kanada R, Yanagitani N, et al. Prediction of ALK mutations mediating ALK-TKIs resistance and drug re-purposing to overcome the resistance. EBioMedicine. 2019;41:105-119.

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 6
2.6.3.4 安全性薬理試験 7
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 8

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

薬理試験の一覧表　　被験物質：Brigatinib

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	添付資料番号	区分
効力を裏付ける試験					
Assessment of kinase selectivity profile in vitro	Recombinant protein kinases	In vitro	[redacted]	4.2.1.1-1	評価
X-ray crystallographic co-structure of AP26113 and ALK kinase	ALK Kinase domain	In vitro	ARIAD	4.2.1.1-2	参考
Effect on cell growth	NPM-ALK positive ALCL cell lines (KARPAS-299, SU-DHL-1, DEL, L-82, and SUP-M2) and one ALK negative ALCL cell line (U-937)	In vitro	ARIAD	4.2.1.1-3	参考
Effect on cell signaling	NPM-ALK positive ALCL cell lines (KARPAS-299, SU-DHL-1, DEL, L-82, and SUP-M2) and one ALK negative ALCL cell line (U-937)	In vitro	ARIAD	4.2.1.1-4	参考
Effect on cell growth	EML4-ALK positive NSCLC cell lines (H3122, H2228) and 2 ALK negative NSCLC cell lines (H23, H838)	In vitro	ARIAD	4.2.1.1-5	参考
Effect on cell signaling	EML4-ALK positive NSCLC cell lines (H3122, H2228) and 1 ALK negative NSCLC cell lines (H23)	In vitro	ARIAD	4.2.1.1-6	参考
Oral efficacy in a xenograft model	NPM-ALK dependent KARPAS-299 human ALCL xenograft in SCID Mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-7	参考
Multi-dose pharmacokinetic/pharmacodynamic in a xenograft model	NPM-ALK dependent KARPAS-299 human ALCL xenograft in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-8	参考
Oral efficacy in a xenograft model	EML4-ALK dependent human NSCLC (H3122) xenograft in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-9	評価
Single dose pharmacokinetic/pharmacodynamic in a xenograft model	EML4-ALK dependent human NSCLC (H3122) xenograft in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-10	参考
Oral efficacy in a xenograft model	EML4-ALK dependent H2228 Human NSCLC xenograft in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-11	参考
Oral efficacy in an orthotopic brain tumor model	EML4-ALK dependent H2228 Human NSCLC xenograft in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-12	参考
Mutagenesis screen of ALK mutants	EML4-ALK gene integrated Ba/F3 cell line	In vitro	ARIAD	4.2.1.1-13	参考
Effect on viability of Ba/F3 cells expressing TKI resistance	Ba/F3 cells expressing EML4-ALK gene or TKI resistance variants	In vitro	ARIAD	4.2.1.1-14	参考

薬理試験の一覧表（続き）　　被験物質：Brigatinib

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	添付資料番号	区分
Oral efficacy in a subcutaneous tumor model	Ba/F3 cells expressing native or mutant (L1196M, G1269S, S1206R) EML4-ALK gene tumor in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-15	参考
Single dose pharmacokinetic/pharmacodynamic in a subcutaneous tumor model	Ba/F3 cells expressing native or mutant (L1196M, G1269S, S1206R) EML4-ALK gene tumor in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-16	参考
Oral efficacy in a subcutaneous tumor model	Ba/F3 cells expressing native or mutant (G1202R) EML4-ALK gene tumor in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-17	参考
Single dose pharmacokinetic/pharmacodynamic in a subcutaneous tumor model	Ba/F3 cells expressing native or mutant (G1202R) EML4-ALK gene tumor in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-18	参考
Effect on ROS1-mediated signaling and viability	Ba/F3 cells expressing ROS1 fusions (CD74-ROS1, FIG-ROS1, SDC4-ROS1) and CD74-ROS1 variants (L2026M, G2032R)	In vitro	ARIAD	4.2.1.1-19	参考
Oral efficacy in a subcutaneous tumor model	Ba/F3 cells expressing CD74-ROS1 tumor in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-20	参考
Effects on viability of EGFR mutant variants	Ba/F3 cells expressing EGFR mutants (Del, L858R, Del/T790M, L858R/T790M)	In vitro	ARIAD	4.2.1.1-21	参考
Effects on cell signaling and growth	EGFR (H358) or EGFR-mutant (HCC827, HCC827/Del/T790M, H1975) engineered NSCLC cells	In vitro	ARIAD	4.2.1.1-22	参考
Oral efficacy in a xenograft model	EGFR-mutant (HCC827) engineered NSCLC tumor in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-23	参考
Multi-dose pharmacokinetic/pharmacodynamic in a xenograft model	EGFR-mutant (HCC827) engineered NSCLC tumor in SCID mice	In vivo	ARIAD	4.2.1.1-24	参考
Oral efficacy in a xenograft model	Patient derived EGFR L858R/T790M mutant NSCLC tumor in BALB/c nude mice.	In vivo	[redacted]	4.2.1.1-25	参考
副次的薬理試験					
Effect on IGF-1R and INSR activity	Hep G2 and H-4-II-E cells	In vitro	ARIAD	4.2.1.2-1	参考
Effect on viability of cells expressing FLT3, RET, and HER2 mutant variants	Ba/F3 cells with FLT3, RET, and HER2 mutant variants	In vitro	ARIAD	4.2.1.2-2	参考
Receptor binding selectivity screen	Enzyme, receptor, ion channel, hormone, peptide	In vitro	[redacted]	4.2.1.2-3	参考
安全性薬理試験					
Cardiovascular Assessment	HEK293 cells expressing hERG potassium channel	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-1	参考

薬理試験の一覧表（続き）　　被験物質：Brigatinib

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	添付資料番号	区分
Central Nervous System Assessment	Sprague Dawley rat	In vivo	[redacted]	4.2.1.3-2	評価
Cardiopulmonary Assessment	Cynomolgus monkeys	In vivo	[redacted]	4.2.1.3-3	評価
Renal System Safety Assessment	Sprague Dawley rats	In vivo	[redacted]	4.2.1.3-4	評価
薬力学的薬物相互作用試験					
該当なし					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験に関しては 2.6.2 薬理試験の概要文中に詳細を記載。

2.6.3.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験に関しては 2.6.2 薬理試験の概要文中に詳細を記載。

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：Brigatinib

評価対象となる系	試験系	投与方法	投与量[a] (mg/kg)	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	添付資料番号 (2)
心血管系	HEK293 Cells expressing hERG potassium channel	In vitro	0, 0.1, 1 and 10 μmol/L	-	IC_{50}>10 μmol/L Positive control: Cisapride: 100% inhibition at 10 μmol/L	非適	4.2.1.3-1
中枢神経系	ラット/SD	経口	0, 25, 50, 100	雄 8/群	None. NOEL≥100 mg/kg	適	4.2.1.3-2
心血管及び呼吸系	サル／カニクイ	経口（経鼻胃）	0, 10, 20, 30	雄 4/群	Cardiovascular effects: Decreased heart rate (all doses) and pulse pressure (20 and 30 mg/kg) from 1 to 6 hours post-dose; increased heart rate (20 and 30 mg/kg), systolic blood pressure (all doses), diastolic blood pressure (30 mg/kg), mean arterial blood pressure (30 mg/kg), and body temperature (30 mg/kg) at 32-42 hours post-dose. Pulmonary effects: Increased respiratory frequency (20 and 30 mg/kg) at 19-42 hours post-dose. No NOEL identified	適	4.2.1.3-3
心血管系（腎機能評価）	ラット/SD	経口	0, 25, 50, 100	雄 8/群	Increased UN, Cre, glucose, and decreased TG, P were noted at ≥50 mg/kg/day Increased phosphorus fractional excretion and decreased urine creatinine were also noted at ≥50 mg/kg/day. Increased fractional sodium excretion was noted at 100 mg/kg. Minimum effect on the renal system was noted at 25 mg/kg/day.	適	4.2.1.3-4

a. 特にことわりがない限り単回投与

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。