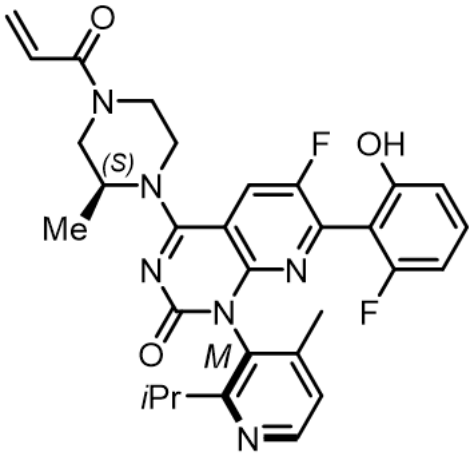
1. 構造的な特徴及び薬理学的作用機序

sotorasibは、共有結合によりKRAS G12Cタンパクを阻害する低分子化合物である。分子式は$C_{30}H_{30}F_2N_6O_3$であり、分子量は560.61 g/molである。

sotorasibの構造式を図 1に示す。

図 1　sotorasibの構造式



Kirstenラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ（KRAS）は、細胞の増殖、分化及び生存において重要な調節因子である。*KRAS p.G12C*遺伝子変異は、多くの癌において腫瘍形成に関与する発癌ドライバーとして特定されている（Simanshu et al, 2017）。*KRAS p.G12C*遺伝子変異は一塩基の変異に起因しており、12番目のアミノ酸がグリシンからシステインに変換される。このタンパクの構造変化によりKRAS G12Cタンパクが活性型に安定化し、下流のシグナル伝達が亢進することで腫瘍細胞の増殖及び生存を引き起こす（Scheffzek et al, 1997）。

sotorasibは低分子化合物であり、KRAS G12Cタンパクにおいて変異したシステイン12に隣接するP2ポケットに結合し、特異的かつ不可逆的な共有結合を形成する（Canon et al, 2019）。sotorasibが結合することで、KRAS G12Cタンパクが不活性状態に固定され、KRASタンパクとRAFプロトオンコジーンセリン／スレオニンタンパクキナーゼなどのエフェクターとの相互作用を阻害する。この阻害作用により、細胞外シグナル調節キナーゼのリン酸化を含む、下流の発癌シグナルを抑制する。sotorasibがKRAS G12Cタンパクを不活化することにより、*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する腫瘍細胞に対する選択的な細胞増殖の抑制、アポトーシスの促進及び抗腫瘍性炎症反応の誘導が報告されている（Canon et al, 2019）。動物を用いた腫瘍モデルにsotorasibを投与した場合、*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する細胞株を用いた腫瘍モデルにおいてのみ、長期間の腫瘍退縮作用及び抗腫瘍免疫の誘導が認められた（Canon et al, 2019）。

2. 非小細胞肺癌（NSCLC）の疾患背景

肺癌（小細胞及び非小細胞）は世界中で最も多くみられる癌である（World Health Organization, 2018）。2020年には、米国だけでも228820例の新規の肺癌症例が認められ、135720例が肺癌で死亡すると推定される（American Cancer Society, 2020）。進行性の非小細胞肺癌（NSCLC）における5年生存率は、そのステージに依存するものの6～35%である（American Cancer Society, 2020）。

ラット肉腫プロトオンコジーンは、NSCLCを含むいくつかの癌における腫瘍形成の発癌ドライバーとして同定されている（Prior et al, 2012）。KRASは、ほとんどの癌において最も高頻度に変異が認められるアイソフォームである（Prior et al, 2012）。ヒトの癌における*KRAS*遺伝子変異の役割は確認されているものの、KRAS変異を特異的に標的とする抗癌剤の開発はこれまで成功しておらず、低分子化合物によりKRASタンパクを阻害することは非常に困難であると考えられていた（McCormick, 2016）。

*KRAS*遺伝子変異のうち、約80%がコドン12に発現している（Prior et al, 2012）。*KRAS p.G12C*遺伝子変異は、白人における肺腺癌（又は非扁平上皮型NSCLC）の約13%、結腸直腸癌（CRC）の約3%、その他の多数の固形癌（膵癌、子宮内膜癌、膀胱癌、卵巣癌及び小細胞肺癌を含む）の1～2%に発現していると推定される（The AACR Project GENIE Consortium, 2017、Biernacka et al, 2016、Neumann et al, 2009）。

現在、*KRAS p.G12C*遺伝子変異を含む、*KRAS*遺伝子変異を有する癌をターゲットとした治療薬は承認されていない。転移性又は切除不能な*KRAS*遺伝子変異を有するNSCLC患者は、通常、一次治療としてプラチナ製剤を含む治療を受け、次にタキサンの二次治療を血管内皮細胞増殖因子（VEGF）阻害薬の併用又は非併用下で受けている（NCCN, 2018）。最近、化学療法の併用、あるいは化学療法は併用しないものの、抗programmed cell death-1（PD-1）阻害薬の使用が、一及び／又は二次治療として承認されている。上皮成長因子受容体（EGFR）、BRAF及びヒト上皮細胞増殖因子受容体2（HER2）の体細胞変異、並びに未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）、ROS及びrearranged during transfection（RET）の再配列は、これらの変異タンパクを標的とする治療に対する強力な予測バイオマーカーとして確立されており、これらの遺伝子変異を有する患者における治療選択肢を拡大している。*KRAS*遺伝子変異を有する患者において、これらの他の変異を発現することはまれであることから、通常、これらの治療法の対象とはならない（Scheffler et al, 2019、Gainor et al, 2013）。sotorasibは、KRAS変異を有する患者において治療上のアンメットメディカルニーズを満たし、特異的な治療選択肢を提供する。

3. 参考文献

AACR Project GENIE Consortium. AACR project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discovery*. 2017;7:818-831.

American Cancer Society: *Cancer Facts & Figures* 2020: https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2020.html, Accessed March 2021

Biernacka A, Tsongalis PD, Peterson JD, de Abreu FB, Black CC, Gutmann EJ, et al. The potential utility of re-mining results of somatic mutation testing: KRAS status in lung adenocarcinoma. *Cancer genetics*. 2016;209:195-198.

Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*. 2019;575:217-223.

Gainor JF, Varghese AM, Ou S-HI, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, et al. ALK Rearrangements Are Mutually Exclusive with Mutations in EGFR or KRAS: An Analysis of 1,683 Patients with Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19:4273-4281.

McCormick F. K-Ras protein as a drug target. *J Mol Med*. 2016;94:253-258.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Non-Small Cell Lung Cancer Version 3. 2018 - February 21, 2018Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. Pathology – Research and Practice. 2009;205:858-862.

Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research*. 2012;72:2457-2467.

Scheffler M, Ihle MA, Hein R, Merkelbach-Bruse S, Scheel AH, Siemanowski J, et al. K-ras Mutation Subtypes in NSCLC and Associated Co-occuring Mutations in Other Oncogenic Pathways. *Journal of Thoraic Oncol*. 2019;14:606-616.

Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*. 1997;277:333-338.

Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*. 2017;170:17-33.

World Health Organization, 2018: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer, Accessed March 2021

目次

1. まとめ 5
2. 効力を裏付ける試験.....11
2.1 In vitroにおけるsotorasibの薬理作用 11
2.1.1 sotorasibの構造特性 11
2.1.2 sotorasibの生化学的特性 12
2.1.3 sotorasibの細胞特性 13
2.2 In vivoにおけるsotorasibの薬理作用 18
2.2.1 sotorasibの薬理作用、薬物動態及び占有率の検討 18
2.2.2 *KRAS p.G12C*及び*KRAS p.G12V*遺伝子変異を有する腫瘍細胞株を用いた異種移植モデルを用いたsotorasibの薬理作用の検討 23
2.2.3 *KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する患者由来細胞腫瘍異種移植モデルにおけるsotorasibの効力の検討 26
2.3 sotorasibとの併用投与に関する試験 28
2.3.1 sotorasibとMAPK阻害剤あるいは化学療法剤との併用試験.....28
2.3.2 sotorasibと他の分子標的薬との併用投与試験 33
2.4 抗腫瘍炎症反応に対するsotorasibの作用 34
2.4.1 In vitroにおけるsotorasibの作用機序に関する試験.....34
2.4.2 In vivoにおけるsotorasibの作用機序に関する試験.....36
2.4.3 sotorasibとチェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体との併用試験 40
2.4.4 sotorasibを用いた抗腫瘍免疫反応試験 41
3. 副次的薬理試験.....45
3.1 In vitroにおける一般的な選択性プロファイル.....45
3.2 In vitroにおける共有結合選択性プロファイル.....46
4. 安全性薬理試験.....47
4.1 In vitro試験.....47
4.2 In vivo試験 48
4.2.1 テレメトリーを装着した雄のビーグル犬にsotorasibを単回経口投与したときの覚醒時における心血管系に対する安全性薬理試験.....48
5. 薬力学的薬物相互作用.....48
6. 考察及び結論.....48
7. 参考文献 51

略語一覧

略語又は用語	定義／説明
Å	Angstrom　オングストローム
AKT	also known as protein kinase B; a serine/threonine-specific protein kinase that plays a key role in multiple cellular processes such as glucose metabolism, apoptosis, cell proliferation, transcription, and cell migration　プロテインキナーゼBとしても知られ、糖代謝、アポトーシス、細胞増殖、転写、細胞移動などの複数の細胞プロセスで重要な役割を果たすセリン/スレオニン特異的プロテインキナーゼ
ALK	anaplastic lymphoma kinase　未分化リンパ腫キナーゼ
AMG 510/ sotorasib	previously known as 3365648 or AMG3365648　以前は3365648又はAMG 3365648とも表記
BRAF	serine/threonine protein kinase B-Raf　セリン/スレオニンプロテインキナーゼB-Raf
C118A	alanine substitution for cysteine at amino acid position 118　アミノ酸位置118におけるシステインのアラニン置換
C118S	serine substitution for cysteine at amino acid position 118　アミノ酸位置118におけるシステインのセリン置換
C12	cysteine at amino acid position 12　アミノ酸位置12のシステイン
C51S	serine substitution for cysteine at amino acid position 51　アミノ酸位置51におけるシステインのセリン置換
C80L	leucine substitution for cysteine at amino acid position 80　アミノ酸位置80におけるシステインのロイシン置換
C_{max}	maximum observed concentration　最大血中濃度
c-RAF	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase　RAFプロトオンコジーンのセリン/スレオニンプロテインキナーゼ
CRC	colorectal cancer　結腸直腸癌
CT-26	murine colorectal tumor model　マウス結腸直腸癌由来細胞株
Cys12	cysteine at amino acid position 12　アミノ酸位置12のシステイン
DMSO	dimethyl sulfoxide　ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribonucleic acid　デオキシリボ核酸
ECG	electrocardiogram or electrocardiographic　心電図
EGFR	epidermal growth factor receptor　上皮成長因子受容体
ERK1/2	extracellular signal regulated kinase 1/2　細胞外シグナル制御キナーゼ1/2
G12C	cysteine substitution for glycine at amino acid position 12　アミノ酸位置12におけるグリシンのシステイン置換
GAPs	GTPase-activating proteins　GTPase活性化タンパク
GDP	guanosine 5’-diphosphate　グアノシン5'-二リン酸
GEFs	guanine nucleotide exchange factors　グアニンヌクレオチド交換因子
GLP	Good Laboratory Practices　医薬品の安全性に関する非臨床性試験の実施の基準
GTP	guanosine 5’-triphosphate　グアノシン5'-三リン酸
H95	histidine at amino acid position 95　アミノ酸位置95のヒスチジン
HEK	human embryonic kidney　ヒト胚腎臓
HER2	human epidermal growth factor receptor 2　ヒト上皮成長因子受容体2
hERG	human ether-à-go-go-related gene　ヒトether-à-go-go関連遺伝子
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog Harvey　Harveyラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ
$[I]_{50}$	apparent binding affinity　見かけの結合親和性
IC_{50}	half-maximal inhibition concentration　50%阻害濃度
IC_{90}	inhibitor concentration which achieves 90% inhibition　90%阻害濃度
K_i	inhibitory constant for reversible enzyme inhibition　可逆的酵素阻害定数
K_{inakt}	maximal rate of covalent bond formation　共有結合形成の最大速度
K_{obs}	observed rate of covalent bond formation　観察された共有結合形成速度

略語又は用語	定義／説明
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (protein)　Kirstenラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ（タンパク）
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (gene)　Kirstenラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ（遺伝子）
KRAS C118A	KRAS protein with a C118A amino acid substitution　C118Aアミノ酸置換を伴うKRASタンパク
KRAS G12C	KRAS protein with a G12C amino acid substitution　G12Cアミノ酸置換を有するKRASタンパク
KRAS G12C/C118A	KRAS protein with G12C and C118A amino acid substitutions　G12C及びC118Aアミノ酸置換を伴うKRASタンパク
KRAS G12C/C51SS/C80L/C118S	KRAS protein with G12C, C51S, C80L, and C118S amino acid substitutions G12C、C51S、C80L及びC118Sアミノ酸置換を伴うKRASタンパク
KRAS G12C-GDP	GDP-bound KRAS protein with a G12C amino acid substitution　G12Cアミノ酸置換を伴うGDP結合KRASタンパク
KRAS p.G12 C	*KRAS* gene with a mutation resulting in a G12C amino acid substitution　G12Cアミノ酸置換をもたらす突然変異を有するKRAS遺伝子
LUAR	lung adenocarcinoma　肺腺癌
MAPK	mitogen-activated protein kinase　マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase　マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ
MHC	major histocompatibility complex　主要組織適合遺伝子複合体
MIA PaCa-2	human pancreatic cell line　ヒト膵癌由来細胞株
MIA PaCa-2 T2	human pancreatic cell linere-selected in vivo　In vivoで再選択されたヒト膵癌由来細胞株
MSD	MesoScale Discovery　MesoScale検出
NCI-H358	human lung cancer cell line　ヒト肺癌由来細胞株
ND	not detectable　検出不可
NF1	Neurofibromin　ニューロフィブロミン1
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog　神経芽細胞腫RASウイルス癌遺伝子ホモログ
NSCLC	non-small cell lung cancer　非小細胞肺癌
pan-ErbB	Pan-erythroblastic leukemia viral oncogene homolog　汎赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ
PD	Pharmacodynamic　薬力学
PDB ID	Protein Data Bank identifier　タンパクデータバンク識別子
PDX	patient-derived xenograft　患者由来異種移植片
p-ERK	phosphorylated ERK1/2　リン酸化ERK 1/2
PI3K	phosphoinositide 3-kinase　ホスホイノシチド3キナーゼ
PK	Pharmacokinetic　薬物動態学
PLCε	phospholipase C episilon　ホスホリパーゼCε
PO	by mouth; oral　経口
POC	percentage of control　対照に対する割合
Q99	glutamine at amino acid position 99　アミノ酸位置99のグルタミン
QD	once per day　1日1回
RAS	rat sarcoma viral oncogene homolog; small GTPase　ラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ；低分子GTPアーゼ
RNA	ribonucleic acid　リボ核酸
ROS1	c-ros oncogene1, receptor tyrosine kinase　c-ros癌遺伝子1
SD	standard deviation　標準偏差
SEM	standard error of the mean　平均標準誤差
SHP-2	src homology region 2 domain-containing phosphatase-2　srcホモログ2ドメイン含有ホスファターゼ2
SOS1	son-of-sevenless homolog 1　son-of-sevelessホモログ1

略語又は用語	定義／説明
SW480-1AC	human colorectal carcinoma　ヒト結腸直腸癌由来細胞株
$t_{1/2}$	half-life　半減期
TGI	tumor growth inhibition　腫瘍増殖抑制
Veh	Vehicle　溶媒
WT	wild type　野生型
Y96	tyrosine at amino acid position 96　アミノ酸位置96のチロシン

1. まとめ

*KRAS*遺伝子（Kristenラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ；Kirsten and Mayer, 1967）は、KRASとも呼ばれる低分子GTPaseシグナル伝達タンパクをコードする癌遺伝子である（Chang et al, 1982）。KRASは、HRAS（Harveyラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ；Harvey, 1964、Chang et al, 1982）やNRAS（神経芽細胞腫RASウイルス癌遺伝子ホモログ；Hall et al, 1983、Taparowsky et al, 1983）などのラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ（RAS）ファミリーに属するタンパクである。これらは、細胞の増殖や生存に関与する多数の細胞内シグナル伝達経路の必須メディエーターである低分子膜結合型グアノシン5'-三リン酸（GTP）結合タンパクである（Barbacid, 1987、Simanshu et al, 2017）。RASタンパクは、不活性型のGDP結合状態と活性型のGTP結合状態を交互に繰り返すことにより、分子スイッチとして機能する（Pai et al, 1989、Milburn et al, 1990）。Son-of-sevenlessホモログ1（SOS1）等のグアニンヌクレオチド交換因子（GEFs）は、GTPを付加しRASの活性化を促進するが、ニューロフィブロミン1（NF1）等のGTPase活性化タンパク（GAPs）は、GTPからGDPへの加水分解とRASの不活性化を促進する（Simanshu et al, 2017）。RASへのGTPの結合により、スイッチ1及び2領域の立体配座がシフトすることにより、RASをそのエフェクターであるRAFプロトオンコジーン、セリン／スレオニンプロテインキナーゼ（c-RAF）、ホスホイノシチド3キナーゼ（PI3K）及びホスホリパーゼCε（PLCε）（Vetter and Wittinghofer, 2001）と結合するため有利に配向させる。これらのエフェクターは、次にマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）経路を含む、それぞれのシグナル伝達経路のトリガーとして、細胞外シグナル調節キナーゼ1/2（ERK1/2）のリン酸化及び活性化を誘導する（Cully and Downward, 2008）。体細胞でのRASの活性化変異は癌の特徴であり、GAPとRASの関連を阻害しすることでエフェクター結合を安定化し、RASシグナルの伝達を増強する（Scheffzek et al, 1997）。

*KRAS*遺伝子及びKRASタンパクは、正常ヒト組織に普遍的に発現する（Muñoz-Maldonado et al, 2019、Newlaczyl et al, 2017）。公表されている情報と同様に、Amgen社で実施したmRNAの発現を評価した試験の結果、野生型の*KRAS*遺伝子は肺を含む正常ヒト組織に普遍的に発現しており、採取したすべての組織で中等度から非常に高度のmRNAの発現が認められた（125831試験）。一方、*KRAS p.G12C*を含む*KRAS*遺伝子変異はNSCLCを含め腫瘍組織のみで確認されており、正常組織では認められていない（Román et al, 2018、AACR Project GENIE Consortium, 2017、Karnoub and Weinberg, 2008、Barbacid, 1987）。

体細胞でのRASファミリーメンバーの活性化変異は、すべての癌の推定21%にみられる腫瘍のドライバー変異である（AACR Project GENIE Consortium, 2017）。変異の発現率が高いにもかかわらず、RAS変異は発見後35年以上、治療上の標的とすることは難しかった。EGFR、HER2、ALK及びBRAFなどの癌遺伝子とは対照的に、RASを標的とした治療法は承認されていない（Hobbs et al, 2016）。RASにおける最も一般的な発癌性変異はKRASのG12、G13及びQ61でみられ、これらは固形癌において高頻度に認められる（Hobbs et al, 2016、Karnoub and Weinberg, 2008、AACR Project GENIE Consortium, 2017）。NSCLCの発症において、いくつかの癌遺伝子の変異が関与している（Román et al, 2018）。これらの中で、RASファミリーの変異は最も多く知られている。癌種によって関連するRASの特定のアイソフォームは異なっており、*KRAS*遺伝子はほとんどの癌で最も高頻度に変異しているアイソフォームである（Prior et al, 2012）。特に注目すべきKRAS変異の1つである

G12Cは、白人で肺腺癌（LUAD）の約13%、結腸直腸癌（CRC）の3%、及びその他の固形癌の症例の1～2%に存在する（AACR Project GENIE Consortium, 2017）。

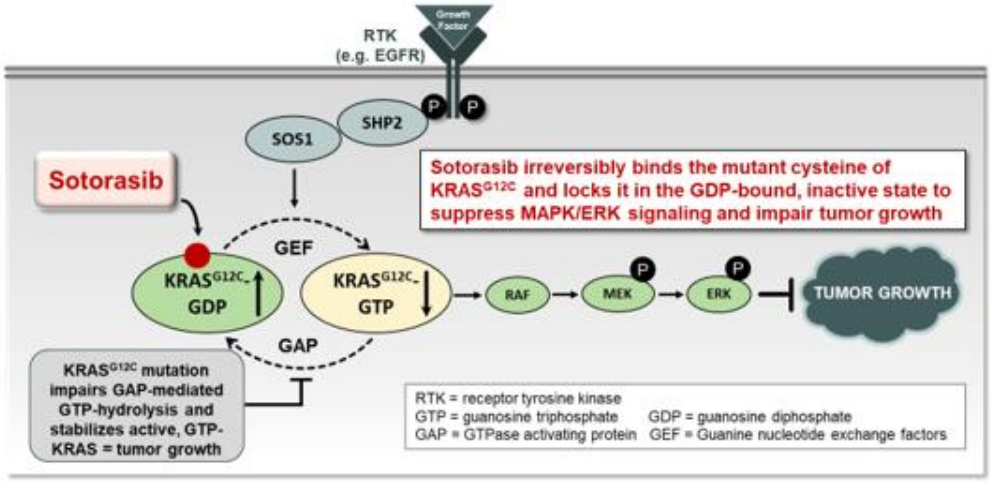
癌を誘発する他の*RAS*遺伝子変異と同様に、*KRAS p.G12C*変異によりKRAS G12Cタンパクが発現することで、GTPase活性化タンパク（GAPs）とKRASとの結合が阻害され、腫瘍の増殖及び生存のシグナル伝達が増強する（Canon et al, 2019）。腫瘍細胞株を用いた試験では、*KRAS*遺伝子の発現をノックダウンした場合、*KRAS p.G12C*を含む*KRAS*遺伝子変異を有する細胞株のみ生存率が低下することが示されている（McDonald et al, 2017）。同様に、KRAS G12Cを選択的に阻害することで、*KRAS p.G12C*変異を持つ細胞株でのみRAS-MAPKシグナル伝達の阻害及び細胞生存率の低下が認められた（Canon et al, 2019、R20150199試験）。また、*KRAS p.G12C*変異を導入した遺伝子改変マウスモデルにおいて、肺上皮でKRAS G12Cタンパクが発現し、肺腺癌が誘導された（Li et al, 2018）。加えて、新規の癌患者の診断において、*KRAS*遺伝子の変異は、他の癌遺伝子である上皮成長因子受容体（*EGFR*）遺伝子、未分化リンパ腫キナーゼ（*ALK*）遺伝子、v-rafマウス肉腫ウイルス癌遺伝子産物ホモログB1（*BRAF*）遺伝子、癌遺伝子チロシンプロテインキナーゼROS（*ROS 1*）又は神経栄養因子チロシンキナーゼ受容体（*NTRK*）遺伝子等の他の遺伝子の発癌性変異と同時に生じることは稀である（モジュール2.5 1.1.2項）。これは、これらの患者の腫瘍において、*KRAS p.G12C*が癌遺伝子であることを示唆している。以上のことから、現在、*KRAS p.G12C*を含む*KRAS*遺伝子の変異は、腫瘍の発生及び進展のドライバーとして確立されている。

*KRAS p.G12C*変異腫瘍を有するNSCLC患者の大部分で*KRAS p.G12C*変異はtruncal mutationとして特徴付けられ、これらの患者のほとんどでドライバー変異である可能性が示唆されている（Thein et al, 2020）。肺腺癌の分析から、最も頻度の高い*KRAS*遺伝子変異である*KRAS p.G12C*変異は、C>A移行により特徴づけられる喫煙と関係した変異パターンに関連しており、主要ドライバーとして分類されている。これと比較して、*KRAS p.G12D*及び*KRAS p.G12V*変異は小型ドライバーに分類されており、NSCLSにおいてドライバー遺伝子としての活性は低い（Temko et al, 2018）。加えて、それぞれのKRAS変異は、異なるシグナル伝達経路を活性化することが報告されている。*KRAS p.G12C*及び*KRAS p.G12V*変異を有する細胞株では、野生型または他のKRAS変異と比較して、RAS-like（RAL）シグナル伝達経路の活性増強及びリン酸化AKT経路の活性低下を示す。一方、*KRAS p.G12D*変異を有する細胞株では、優先的にPI3K-AKTシグナル伝達経路が有意となることで、リン酸化AKTの活性を増強する（Addeo et al, 2021）。

KRAS G12Cにおけるシステインは、KRASの不活性GDP結合型に存在し、最近特徴が明らかにされたポケット構造又は溝構造（P2ポケット）に隣接している（Ostrem et al, 2013）。最近の報告では、反応性を有する低分子がP2ポケットに結合し、アミノ酸位置12のシステインと選択的に共有結合を形成し、KRAS G12C活性を阻害することが示唆されている（Patricelli et al, 2016、Ostrem and Shokat, 2016、Janes et al, 2018）。

sotorasibはKRAS G12C阻害剤であり、アミノ酸位置95のヒスチジン（H95）における溝構造との新規の相互作用及び変異したシステインとの共有結合によりP2ポケットに不可逆的に結合することで、KRAS G12Cに対する選択性を高めている（Canon et al, 2019）。sotorasibが結合すると、KRAS G12Cは不活性型のGDP結合型立体配座に固定され、SOS1が触媒するGDPとGTPのヌクレオチド交換が妨げられる（Canon et al, 2019）。このKRAS G12Cの阻害により、RAF等の下流のエフェクター

との相互作用が阻害されることで、ERKのリン酸化が阻害される（Ostrem et al, 2013、Simanshu et al, 2017、Canon et al, 2019）。



sotorasibは、in vitroにおいて組換えKRAS G12C細胞株でSOS1が触媒するヌクレオチド交換を阻害したが［50%阻害濃度（IC_{50}）=0.09 μM］、G12が野生型（WT）であるKRAS細胞株にはほぼ作用しなかった（R20150198試験）。sotorasibは、すべての*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する細胞株においてKRAS G12Cを共有結合的に修飾し、KRAS G12Cによるシグナル伝達を阻害したが（IC_{50}：0.01～0.12 μM）、他の様々なKRAS変異細胞株、WTのKRAS及び他の癌遺伝子変異を有する細胞株ではERK1/2のリン酸化（p-ERK）を阻害しなかった。また、sotorasibは、すべてのKRAS G12C変異を有する細胞株の生存を阻害したが（IC_{50}：0.004～0.032 μM）、他のKRAS変異又はWTのKRAS及び他の癌遺伝子変異を有する細胞株の生存率に影響しなかった。本試験において、sotorasibの共有結合形成の最大速度（k_{obs}）及び見かけの結合親和性（$[I]_{50}$）を*KRAS p.G12C*変異を有するヒト膵癌由来細胞株（MIA PaCa-2）で測定した結果、それぞれ0.0013 sec^{-1}及び7.0×10^{-7} Mであり、最大の$k_{obs}/[I]_{50}$比は1.9×10^{3} M^{-1} sec^{-1}であった（R20150199試験）。

In vivoにおいて、sotorasibの効果を*KRAS p.G12C*変異を有するヒトNSCLC由来細胞株（NCI-H358）及びin vivoで再選択されたヒト膵癌由来細胞株（MIA PaCa-2 T2）を用い、腫瘍異種移植モデルにより検討した（R20190129試験、R20150188試験）。sotorasibは、KRAS G12Cを共有結合的に修飾し、3 mg/kgの低用量で用量依存的かつ有意にp-ERKを阻害した。sotorasibの曝露量は0.5時間後に最大となり、続いて腫瘍におけるp-ERKの最大阻害効果が1～2時間後に最大となった。p-ERKの有意な阻害は、sotorasibの30又は100 mg/kgを単回投与した後48時間まで持続した。sotorasibによるKRAS G12Cの共有結合による修飾作用はp-ERKの阻害と相関しており、最大阻害作用は2時間までに認められた。

腫瘍異種移植モデルを用いた薬効薬理試験において、sotorasibは3 mg/kgで有意な腫瘍増殖抑制（TGI）作用を示し、NCI-H358及びMIA PaCa-2 T2において、100 mg/kgでそれぞれ49及び62%の腫瘍退縮作用を示した。sotorasibは、ヒト又はマウスの結腸直腸癌由来細胞株（*KRAS p.G12V*変異を有するSW480-1AC又は*KRAS p.G12D*変異を有するCT-26）を用いた異種移植モデルにおいて、それぞれ100及び200 mg/kgの用量でも効果はみられず（R20150191試験、R20190128試験）、また、いずれ

の試験においても体重に影響しなかった（R20150189試験、R20150190試験、R20150191試験）。*KRAS p.G12C*変異を有する結腸直腸癌患者由来異種移植片（PDX）モデルでは、sotorasibはp-ERKを用量依存的に阻害した。100 mg/kgの単回投与では、2時間後にp-ERKの最大阻害効果が認められ、この阻害は48時間まで持続した。同モデルを用いた薬効薬理試験では、sotorasibの投与により腫瘍の増殖が用量依存的かつ有意に抑制され、100 mg/kgで45%の腫瘍退縮作用が認められた。

In vitroでの腫瘍細胞の生存に関する併用投与試験において、複数の*KRAS p.G12C*変異細胞株を用い、MAPK経路におけるRASの上流及び下流に存在する種々のエフェクターに対する阻害剤、並びにAKTセリン／スレオニンキナーゼ（AKT）経路に対する阻害剤を用い、sotorasibとの併用効果について検討した結果、相乗的な腫瘍傷害作用が認められた（153894試験）。また、in vivoにおいて、sotorasibとEGFR/pan-erb-b 2受容体チロシンキナーゼファミリー（ErbB）、プロテインチロシンホスファターゼ非受容体Type 11（SHP-2）又はMAPK/ERKキナーゼ（MEK）阻害剤との併用で抗腫瘍活性の有意な増強が認められたが、死亡又は体重減少の徴候は認められず、カルボプラチン化学療法との併用でも毒性の増強は認められなかった（R20180033試験、153358試験、153397試験、R20180032試験）。

抗腫瘍炎症及び免疫応答に対するsotorasibの影響を評価する目的で、遺伝子操作によりKRAS G12Cを内因性に発現させた結腸直腸癌由来細胞株（CT-26）を用いた同種移植マウスモデルを作製した。In vitroにおいて、sotorasib処理によりp-ERKと腫瘍の生存性を阻害し、また、主要組織適合性複合体（MHC）クラスI及び炎症性サイトカインの発現も増強した。sotorasibの投与により、*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26腫瘍移植マウスの80%で恒久的な腫瘍の完全退縮が認められた。sotorasibと免疫チェックポイントに対する阻害剤［抗programmed cell death protein 1（PD-1）抗体］を併用することで、sotorasibの単剤投与よりも低い用量で、腫瘍への効果が有意に増加した。作用機序検討試験において、sotorasibが腫瘍内における炎症性サイトカイン及び抗原提示成分の産生を増強することにより、炎症性の腫瘍微小環境を誘導することが明らかとなっている。これらの作用に続き、増殖性のエフェクターT細胞、樹状細胞及びマクロファージを含む多数の抗腫瘍免疫細胞サブセットが浸潤した。再移植試験では、*KRAS*変異の有無にかかわらず、一度腫瘍が消失したマウスにおいてCT-26に対する抗腫瘍免疫が誘導されることが確認された。

In vitroにおける、受容体、酵素、イオンチャネル及びトランスポーターを含む種々の標的に対するsotorasibの選択性について評価した。sotorasibは、KRAS G12Cに対して高い選択性を有することが示唆された。NCI-H358では、システインのプロテオームプロファイリングにより、sotorasibがアミノ酸12位のシステイン（Cys12）のみをKRAS G12Cから取り込むことが示された。

sotorasibのヒトether-à-go-go関連遺伝子（hERG）に対するIC_{50}は54.8 μMであり、臨床予定用量の範囲においてhERGチャネルとの臨床的に重要な相互作用は予測されなかった。医薬品の非臨床性試験実施の基準（GLP）条件下で実施したテレメトリー装着イヌを用いた心血管系安全性薬理試験において、sotorasibは300 mg/kgまでの用量で心電図（ECG）又は血行動態パラメータに影響しなかった。sotorasibの非臨床薬理試験を表 1に示す。

表 1　sotorasibを用いた非臨床薬理試験一覧

Amgen Study No.	Study Title	Status
Primary Pharmacodynamics – In Vitro		
R20150198	Biochemical Characterization of AMG 510 and Metabolites in $KRAS^{G12C/C118A}$ and $KRAS^{C118A}$ Nucleotide Exchange Assays	Non-GLP Final
R20150199	Cellular Characterization of AMG 510	Non-GLP Final
R20190078	Effects of AMG 510 on KRAS Signaling in NCI-H358 and MIA PaCa-2 Cells In Vitro	Non-GLP Final
153894	In Vitro Combination Effects of AMG 510 with MAPK Pathway, PI3K Pathway, and Other Targeted Inhibitors	Non-GLP Final
Primary Pharmacodynamics – In Vivo		
R20150188	AMG 510 Inhibits Phospho-ERK1/2 Signaling in *KRAS p.G12C* Pancreatic MIA PaCa-2 T2 Tumors in Female Athymic Nude Mice	Non-GLP Final
R20190129	AMG 510 Inhibits ERK1/2 Phosphorylation Signaling and Results in Covalent Occupancy of $KRAS^{G12C}$ in *KRAS p.G12C* NSCLC NCI-H358 Tumors in Female Athymic Nude Mice	Non-GLP Final
R20150192	Effect of AMG 510 on Phospho-ERK1/2 Signaling at Early Timepoints (0.25 to 2 hours) in *KRAS p.G12C* Pancreatic MIA PaCa-2 T2 Tumors in Female Athymic Nude Mice	Non-GLP Final
R20150189	The Effect of Once-daily Dosing of AMG 510 on Tumor Growth in the *KRAS p.G12C* Pancreatic MIA PaCa-2 T2 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice	Non-GLP Final
R20150190	The Effect of Once-daily Dosing of AMG 510 on Tumor Growth in the *KRAS p.G12C* NSCLC H358 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice	Non-GLP Final
R20150191	The Effect of Once-dailing Dosing of AMG 510 on Tumor Growth in the *KRAS p.G12V* Colorectal Carcinoma SW480-1AC Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice	Non-GLP Final
R20190130	AMG 510 Inhibited ERK 1/2 Phosphorylation in a Time and Dose Dependent Manner in Human KRAS *p.G12C* CRC Patient-derived Xenograft Tumors in Female NOD/SCID IL2rg (NSG) Mice	Non-GLP Final
R20190131	Once Daily Dosing of AMG 510 Inhibited Tumor Growth in a Human *KRAS p.G12C* CRC Patient-dervied Xenograft Model in Female NSG Mice	Non-GLP Final
R20180033	The Effect of AMG 510 in Combination with MEK Inhibitor 1009089 (PD-0325901) in the *KRAS p.G12C* NSCLC H358 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice	Non-GLP Final
153358	Effect of AMG 510 in Combination with Afatinib on Tumor Growth in the *KRAS p.G12C* NSCLC NCI-H358 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice	Non-GLP Final
153397	The Effect of AMG 510 in Combination with RMC-4550 (SHP2i), on Tumor Growth in the *KRAS p.G12C* NSCLC NCI-H358 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice	Non-GLP Final
R20180032	The Effect of AMG 510 in Combination with Carboplatin on Tumor Growth in the *KRAS p.G12C* NSCLC H358 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice	Non-GLP Final
R20180002	AMG 510 Inhibits ERK1/2 Phosphorylation in Murine Colorectal CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Tumors in Female BALB/c Mice	Non-GLP Final
R20190110	AMG 510 Inhibits ERK1/2 Phosphorylation in Murine Colorectal CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Tumors in Female BALB/c Mice	Non-GLP Final

Footnotes are included on the last page of the table.

表 1　sotorasibを用いた非臨床薬理試験一覧（続き）

Amgen Study No.	Study Title	Status
Primary Pharmacodynamics – In Vivo		
R20190128	The Effect of Once-daily Dosing of AMG 510 on Tumor Growth in the Parental CT-26 *KRAS p.G12D* Colorectal Carcinoma Syngeneic Model in Female BALB/c Mice	Non-GLP Final
R20180034	The Effect of AMG 510 in Combination with anti-PD-1 antibody on Tumor Growth in the Murine Colorectal CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Syngeneic Model in Female BALB/c Mice	Non-GLP Final
R20180035	The Effect of AMG 510 on Tumor Infiltrating Lymphocytes in CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Colorectal Tumors in Female BALB/c Mice	Non-GLP Final
R20190105	The Effect of AMG 510 and/or Anti-PD-1 on CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Colorectal Tumors by Immunohistochemistry (IHC) in the Female BALB/c Mouse	Non-GLP Final
R20180036	The Effect of AMG 510 on Gene Expression and T-Cell Priming in CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Colorectal Tumors in Female BALB/c Mice	Non-GLP Final
Secondary Pharmacodynamics		
125831	mRNA Expression Assessment of *KRAS*	Non-GLP Final
124452	In Vitro Pharmacology Study of 3365648[a] and 3365626[b] – Early Panel	Non-GLP Final
124453	In Vitro Pharmacology Late Panel Study of 3365648[a] and 3365626[b]	Non-GLP Final
124787	In Vitro Kinase Screening Panel Study of 3365648#1[a]	Non-GLP Final
R20150219	Cysteine Proteome Profiling of AMG 510 in NCI-H358	Non-GLP Final
Safety Pharmacology		
150431	Effect of AMG 510 on Cloned hERG Potassium Channels Expressed in Human Embryonic Kidney Cells	GLP Final
150458	AMG 510: Single-dose Oral Gavage Cardiovascular Safety Pharmacology Evaluation in Male Telemetry-instrumented Conscious Beagle Dogs	GLP Final

BALB/c = Bagg albino, immunodeficient inbred mouse strain; CT-26 = murine colorectal tumor model; CRC = colorectal carcinoma; GLP = Good Laboratory Practices; hERG = human ether-à-go-go-related gene; IHC = immunohistochemistry; KRAS = Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (gene); MAPK = mitogen-activated protein kinase; MIA PaCa-2 = human pancreatic cancer cell line; mRNA = messenger ribonucleic acid; NCI-H358 = human lung cancer cell line; NSCLC = non-small cell lung cancer; NOD/SCID = nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency; PI3K = phosphoinositide-3 kinase; PDX = patient-derived xenograft; SW480-1AC = human colorectal carcinoma cell line.

[a] AMG 510 = sotorasib, AMG 510 was previously known as 3365648 or AMG3365648.

[b] Studies 124452 and 124453: 3365626 was another KRASG12C inhibitor in early development that was not developed further.

3種類のヒト血中代謝物であるAMG3368167（M24）、AMG3375854（M10）及びAMG3413829（M18）を同定した（モジュール2.7.2）。3種類の代謝物中、M18はsotorasibと同じ共有結合部分を有したが、M24及びM10は共有結合部分を持たなかった。M18のみが薬理作用を有し、ある程度の効力を示したが、その効果はsotorasibと比較して著しく弱かった。これらの代謝物を用いた副次的薬理試験では、臨床的に意義のある又は重要なオフターゲット薬理活性は認められなかった。これらの代謝物を用いたin vitro hERGアッセイにおいて、臨床的に意義のある又は有意な相互作用はみられなかった。効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験及び毒性試験の全般的プロファイルについては、モジュール2.6.6においても考察する。代謝物の非臨床薬理試験の一覧を表 2 に示す。

表 2　代謝物であるAMG3368167、AMG3375854及びAMG3413829を用いた非臨床薬理試験一覧

Amgen Study No.	Study Title	Status
Secondary Pharmacodynamics		
124807	In Vitro Pharmacology Study of 3368167 Early Panel	Non-GLP Final
124808	In Vitro Pharmacology Study of 3368167 Late Panel	Non-GLP Final
153413	In Vitro Pharmacology Study of Metabolites (M10 [AMG3375854] and M18 [AMG3413829]) - Early Panel	Non-GLP Final
153414	In Vitro Pharmacology Study of Metabolites (M10 [AMG3375854] and M18 [AMG3413829]) - Late Panel	Non-GLP Final
153415	In Vitro Kinase Screening Panel Study of Metabolites (M10 [AMG3375854] and M18 [AMG3413829])	Non-GLP Final
Safety Pharmacology		
124803	AMG3368167: Acute In Vitro Effect on hERG Recorded from HEK Cells	Non-GLP Final
153419	hERG ^{3}H-Dofetilide Filter Binding Assay – Study of 3375854#1 and 3413829#1	Non-GLP Final

GLP = Good Laboratory Practices; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene

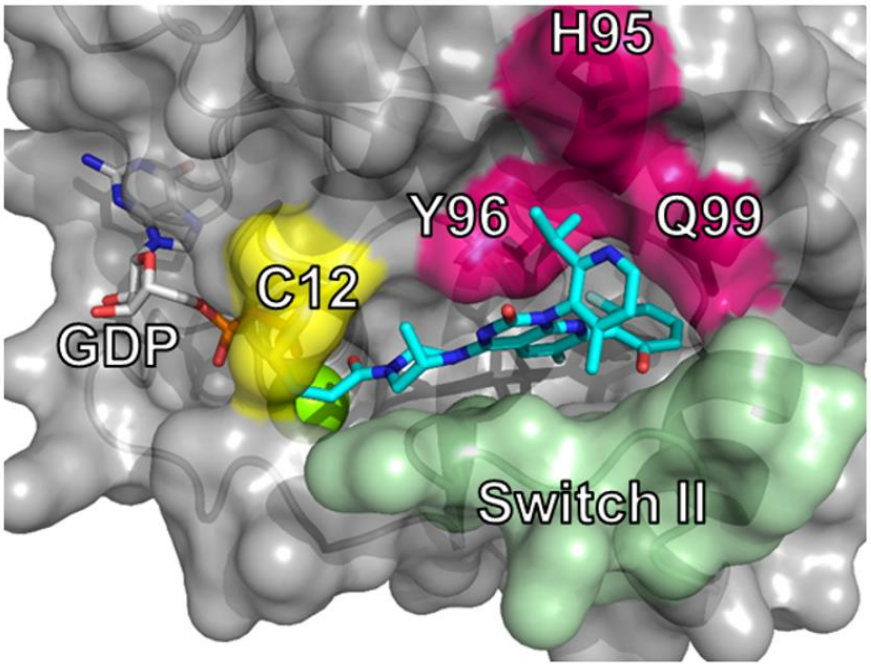
2.　効力を裏付ける試験

2.1　In vitroにおけるsotorasibの薬理作用

2.1.1　sotorasibの構造特性

X線結晶解析を用い、sotorasibのKRAS G12Cへの結合特性について構造解析を実施した。構造解析の結果、sotorasibは不活性型のKRAS G12CにおけるP2ポケットへの結合（KRAS G12C-GDP）、及びsotorasibのアクリルアミド部位と置換されたシステインにおけるチオールとの間に共有結合を形成することが確認された。この構造解析から、H95の選択的配向により生成した新規の溝構造にsotorasibが特異的に結合し、KRAS G12Cとの相互作用を増強することが確認された（図 1）。sotorasibに存在する置換基が、H95の溝構造に存在する25のリガンド-タンパク接触構造を構築することで、他の置換基を持たない分子と比較して10倍以上高い効力が得られる（Canon et al, 2019、R20150198試験）。

図 1　KRAS G12Cの潜在的溝に対するsotorasibの結合



GDP = guanosine 5'-diphosphate; C12 = cysteine at amino acid position 12; H95 = histidine at amino acid position 95; Y96 = tyrosine at amino acid position 96; Q99 = glutamine at amino acid position 99; G12C = cysteine substitution for glycine at amino acid position 12; C51S = serine substitution for cysteine at amino acid position 51; C80L = leucine substitution for cysteine at amino acid position 80; C118S = serine substitution for cysteine at amino acid position 118; PDB ID = Protein Data Bank identifier

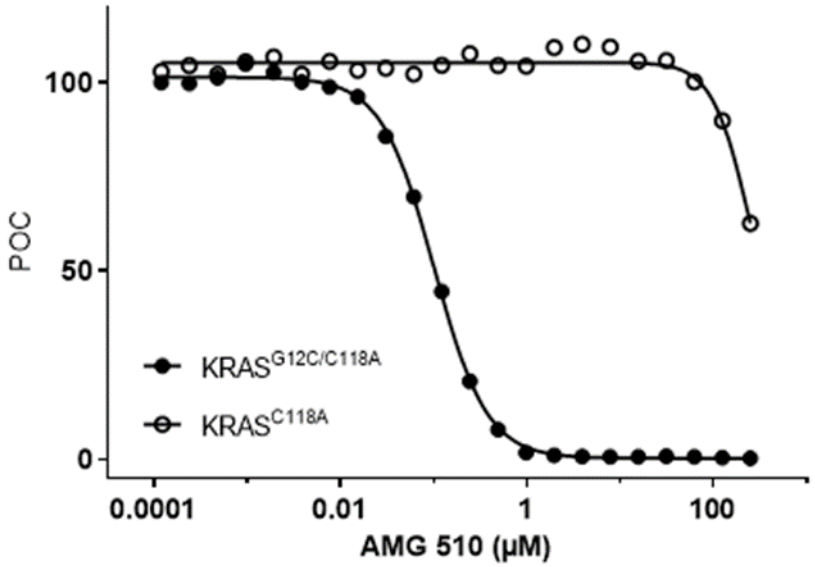
X-ray co-crystal structure of KRAS G12C/C51S/C80L/C118S bound to GDP and AMG 510 at a resolution of 1.65 Å. (PDB ID:6OIM)

Source: Canon et al, 2019

2.1.2　sotorasibの生化学的特性

sotorasibの効力及びその選択性を評価する目的で、sotorasibと3種類のヒト血中代謝物を、組換え酵素を用いたヌクレオチド交換アッセイにより検討した（R20150198試験）。本試験では、SOS1を触媒とするGDPとGTPのヌクレオチド交換により、cRAFのエフェクタードメイン（RAS結合ドメイン又はRBD）のKRAS G12C又はWT KRASに対する結合を促進した。5分間のプレインキュベーション後、sotorasibは、RBDとKRAS G12Cとの結合をIC_{50}の平均として0.09 μMで阻害したが、WTのKRASへのRBDの結合はほとんど阻害しなかった（図 2）。これらの代謝物のうち、M18はsotorasibと同様に共有結合部位を有し、sotorasibよりも弱い活性を示したが、そのIC_{50}の平均は0.31 μMであった。M24及びM10は共有結合部位を保持せず、ヌクレオチド交換アッセイにおいて極めて弱い阻害作用しか示さなかった。

図 2　SOS1を触媒とするKRAS G12Cのヌクレオチド交換に対するsotorasibの選択的阻害作用



AMG 510 = sotorasib; Alpha = Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay; POC = percentage of control; SOS1 = son-of-sevenless homolog1

The potency of AMG 510 as a covalent inhibitor of SOS1-catalyzed nucleotide exchange activity of mutant KRAS G12C and "wildtype" KRAS was measured using Alpha technology.

Source: Study R20150198

2.1.3　sotorasibの細胞特性

sotorasibの細胞特性を調べる目的で、22種類の細胞株パネル［*KRAS p.G12C*変異、その他の*KRAS*変異を有する10種類（*p.G12D*、*p.G12V*、*p.G12S*又は*p.G13C*変異）又は*KRAS*以外の遺伝子変異］を用い、p-ERKを測定する免疫アッセイ又は細胞生存アッセイを実施した（Canon et al, 2019、R20150199試験）。sotorasibを添加し2時間処理したところ、基礎p-ERKは阻害された。*KRAS p.G12C*細胞株におけるIC_{50}は0.01 μM（Calu-1）から0.12 μM（NCI-H2122）であった（表 3及び図 3）。しかしながら、sotorasibは*KRAS p.G12C*以外の*KRAS*遺伝子及び他の遺伝子変異を有する細胞株に対し、p-ERKを阻害しなかった（IC_{50}＞10 μM、表 3及び図 4）。sotorasibを添加し72時間処理することで、*KRAS p.G12C*変異を有する細胞株はSW1573を除き、全てのホモ接合及びヘテロ接合を有する細胞株の生存を低下し、そのIC_{50}は0.004 μM（NCI-H358）から0.032 μM（NCIH2122）であった（表 3及び図 4）。sotorasibはすべての*KRAS p.G12C*変異を有する株において、p-ERKに対して同様の最大阻害効果を示し、細胞生存率に対する最大効果は変異株により異なっていた。*KRAS p.G12C*遺伝子変異以外又は*KRAS*以外の遺伝子変異を有する細胞株は、sotorasibに感受性を示さなかった（IC_{50}＞7.5 μM、表 3及び図 4）。これらの結果から、sotorasibは*KRAS p.G12C*変異を有する細胞株においてのみKRAS G12Cのシグナル伝達を阻害し、細胞生存率を低下させた。ヌクレオチド交換アッセイにおいて活性を示す、唯一の代謝物であるM18について細胞アッセイで検討したところ、p-ERK及び生存率アッセイにおけるIC_{50}の平均から、sotorasibと比較して効力はそれぞれ1/11及び1/39であった。

表 3　基礎ERK1/2リン酸化及び細胞生存に対するsotorasibの効果

Cell Line	Tissue of Origin	Mutation	Basal p-ERK IC_{50}, 2 hours (μM)	Cell Viability IC_{50}, 72 hours (μM)
MIA PaCa-2	Pancreas	*KRAS p.G12C* homozygous	0.036 ± 0.002 N = 3	0.005 ± 0.001 N = 64
NCI-H1373	Lung	*KRAS p.G12C* homozygous	0.010 ± 0.0001 N = 2	0.021 ± 0.008 N = 3
NCI-H2030	Lung	*KRAS p.G12C* homozygous	0.040 ± 0.020 N = 2	0.006 ± 0.003 N = 3
NCI-H2122	Lung	*KRAS p.G12C* homozygous	0.123 ± 0.006 N = 2	0.032 ± 0.005 N = 2
SW1463	Rectum	*KRAS p.G12C* homozygous	0.033 ± 0.004 N = 3	0.015 ± 0.007 N = 4
SW1573	Lung	*KRAS p.G12C* homozygous	0.027 ± 0.001 N = 2	> 7.5 N = 2
UM-UC-3	Bladder	*KRAS p.G12C* homozygous	0.029 ± 0.016 N = 2	0.005 ± 0.001 N = 2
Calu-1	Lung	*KRAS p.G12C* heterozygous	0.013 ± 0.004 N = 2	0.004 ± 0.001 N = 2
NCI-H1792	Lung	*KRAS p.G12C* heterozygous	0.045 ± 0.023 N = 2	0.011 ± 0.008 N = 2
NCI-H23	Lung	*KRAS p.G12C* heterozygous	0.090 ± 0.017 N = 2	0.006 ± 0.001 N = 2
NCI-H358	Lung	*KRAS p.G12C* heterozygous	0.035 ± 0.003 N = 3	0.004 ± 0.001 N = 3
SW837	Rectum	*KRAS p.G12C* heterozygous	0.018 ± 0.002 N = 3	0.009 ± 0.006 N = 4
AsPC-1	Pancreas	*KRAS p.G12D* homozygous	> 10 N = 3	> 7.5 N = 3
A-427	Lung	*KRAS p.G12D* heterozygous	> 10 N = 2	> 7.5 N = 2
LS 174T	Colon	*KRAS p.G12D* heterozygous	> 10 N = 1	> 7.5 N = 1
SW480	Colon	*KRAS p.G12V* homozygous	> 10 N = 2	> 7.5 N = 2
A549	Lung	*KRAS p.G12S* homozygous	> 10 N = 3	> 7.5 N = 64
NCI-H1355	Lung	*KRAS p.G13C* heterozygous	> 10 N = 2	> 7.5 N = 2
HCC-827	Lung	*EGFR* p.E746_A750del heterozygous	> 10 N = 2	> 7.5 N = 2

Footnotes are included on the next page.

表 3　基礎ERK1/2リン酸化及び細胞生存に対するsotorasibの効果（続き）

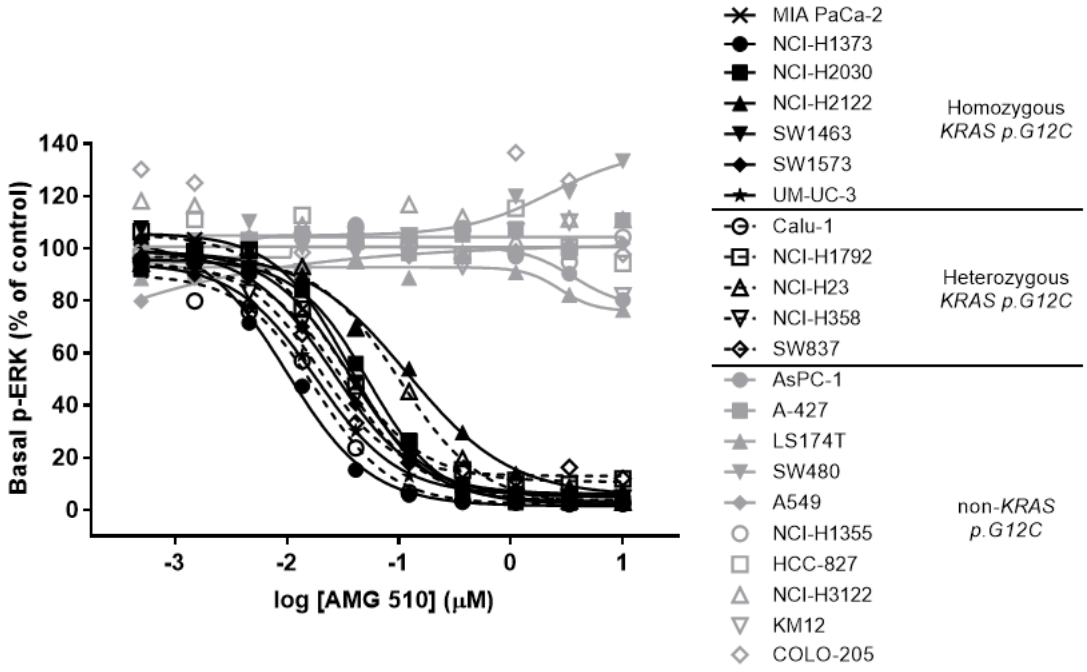
Cell Line	Tissue of Origin	Mutation	Basal p-ERK IC_{50}, 2 hours (μM)	Cell Viability IC_{50}, 72 hours (μM)
NCI-H3122	Lung	*EML4-ALK* fusion	> 10 N = 2	> 7.5 N = 2
KM12	Colon	*TPM3-NTRK1* fusion	> 10 N = 2	> 7.5 N = 2
COLO-205	Colon	*BRAF p.V600E* heterozygous	> 10 N = 2	> 7.5 N = 2

AMG 510 = sotorasib; ERK1/2 = extracellular signal regulated kinase 1/2; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; p-ERK = phosphorylated ERK1/2; POC = percentage of control;

Cell lines were seeded in 96-well (basal p-ERK1/2 assay) or 384-well (viability assay) plates and were treated with serially diluted AMG 510 for 2 hours (basal p-ERK1/2) or 72 hours (viability). IC_{50} values of AMG 510 for both assays were determined by fitting POC values at each test concentration with a four-parameter logistic model in Genedata Screener® (Genedata AG; Basel, Switzerland) and were reported as the mean ± standard deviation, with the number of independent experiments indicated.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20150199

図 3　*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する細胞株におけるsotorasibの基礎p-ERKの選択的阻害作用

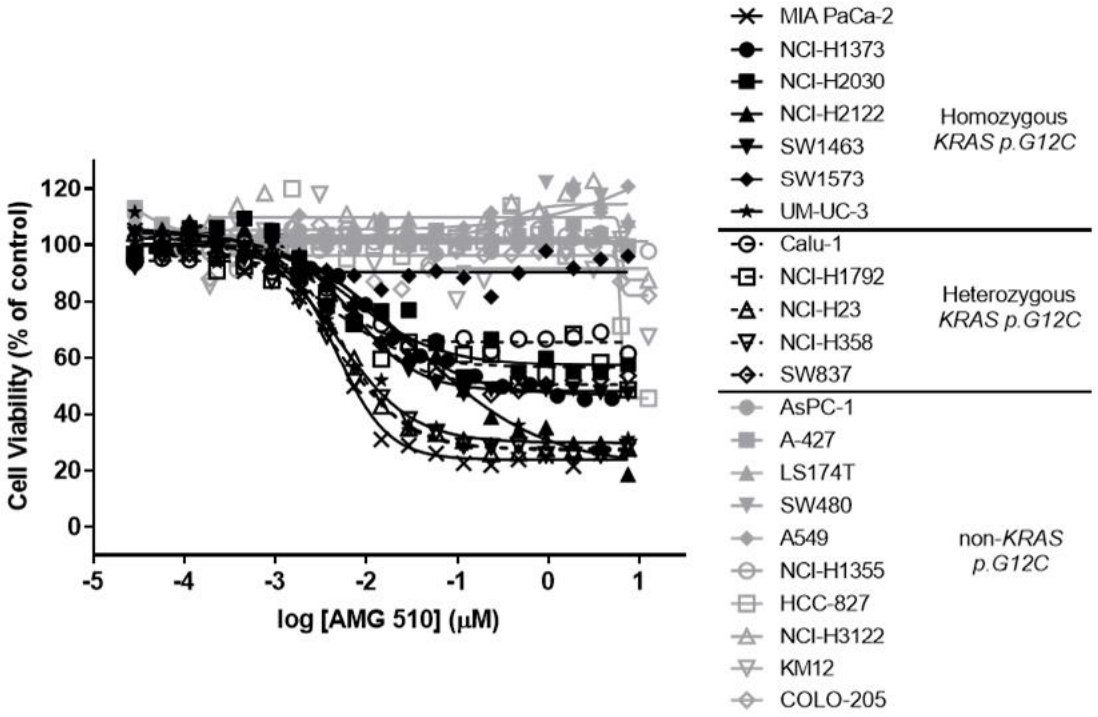


AMG 510 = sotorasib; ERK1/2 extracellular signal regulated kinase 1/2; p-ERK = phosphorylated ERK1/2

Cell lines were seeded in 96-well plates and were treated with serially diluted AMG 510 for 2 hours. Inhibition of p-ERK was measured by immunoassay (MesoScale Discovery or MSD). Representative dose-response curves are shown.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20150199

図 4　*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する細胞株におけるsotorasibの選択的な増殖抑制効果



AMG 510 = sotorasib; Cell lines were seeded in 384-well plates and were treated with serially diluted AMG 510 for 72 hours. Effects of AMG 510 on cell viability were measured using a CellTiter-Glo® luminescent assay. Representative dose response curves are shown.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20150199

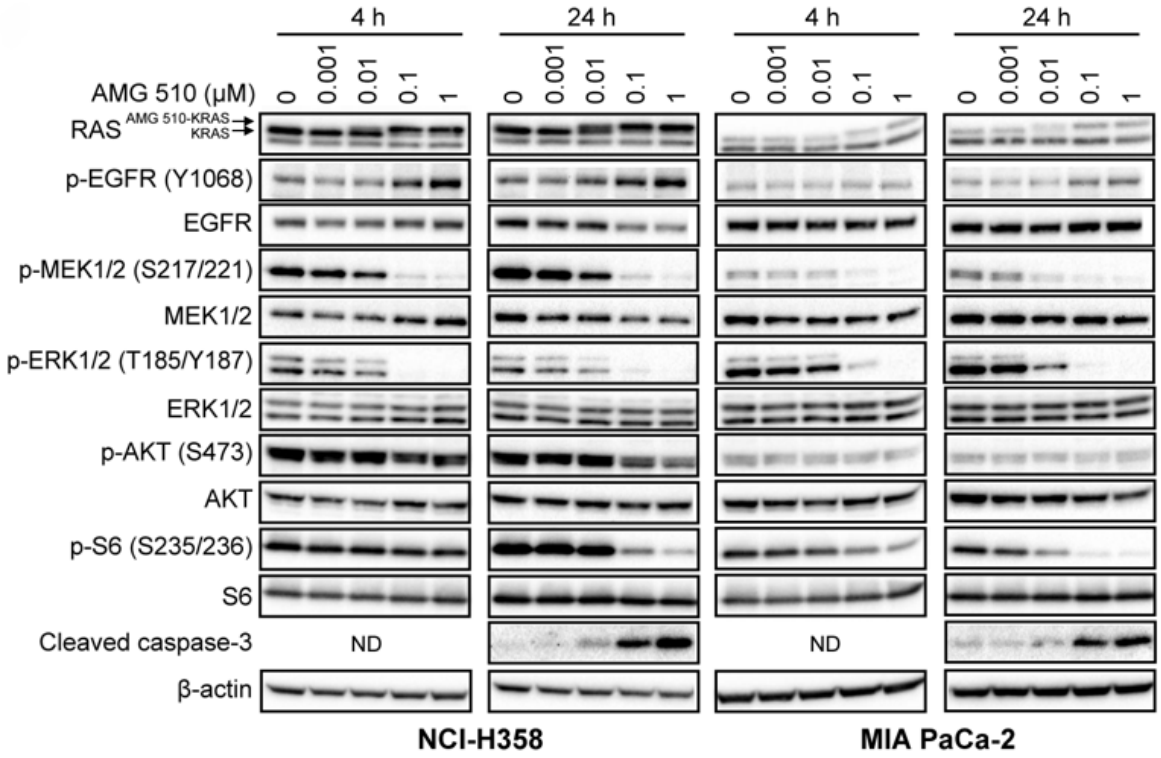
共有結合性阻害剤活性は、共有結合形成の最大速度（k_{inact}又はk_{obs}）及び阻害剤の見かけの結合親和性（K_i又は$[I]_{50}$）に依存する。これらの動態パラメータを測定するため、基礎p-ERKの阻害の時間経過を用いて、MIA PaCa-2細胞株におけるsotorasibに対する細胞内最大k_{obs}及び$[I]_{50}$を測定した。k_{obs}と$[I]_{50}$は0.0013 sec^{-1}及び7.0×10^7 Mであり、$k_{obs}/[I]_{50}$の比は1.9×10^3 M^{-1} sec^{-1}（R20150199試験）であり、共有結合性のEGFR阻害剤で報告されている範囲内（3.6×10^2 M^{-1} sec^{-1}～1.1×10^6 M^{-1} sec^{-1}）であった（Miyahisa et al, 2015）。

MAPK及びPI3K経路のシグナル伝達に対するsotorasibの作用を検討する目的で、2種類の*KRAS p. G12C*変異を有する細胞株であるNCI-H358（ヒトNSCLC由来）及びMIA PaCa-2を用い、sotorasibを連続滴定により4又は24時間処理し、多重シグナル伝達ノードをイムノブロット解析した。sotorasibの0.1 μMを用い、種々の処理時間での効果についても検討した（Canon et al, 2019、R20190078試験）。

sotorasibとKRASとの共有結合付加物（上部の矢印）は時間及び用量とともに増加し、両細胞株におけるMAPK経路の下流への阻害（すなわち、p-MEK1/2及びp-ERK1/2）と相関していた（図 5）。sotorasibによるKRAS阻害も活性型EGFR（p-EGFR Y1068）の蓄積を誘発した。AKTのリン酸化（p-AKT）の阻害は、一方の細胞株で明らかであったが、リボソームタンパクであるS6（p-S6）のリン酸化の低下は、両細胞株で24時間において観察された。カスパーゼ3の切断についても、両細胞株で24時間において観察され、これはアポトーシス（図 5）の誘導を示唆するものであった。処理時間に関する検討では、sotorasibの0.1 μMを処理することでMAPK及びEGFR経路シグナル伝達に対し、

早期（2時間未満）かつ持続的（24時間超）な効果がみられたが、p-S6及びカスパーゼの切断は、両細胞株において8～16時間の処理により発現した（図 6）。

図 5　sotorasib処理による用量依存的なMAPK及びPI3K経路シグナルの減少

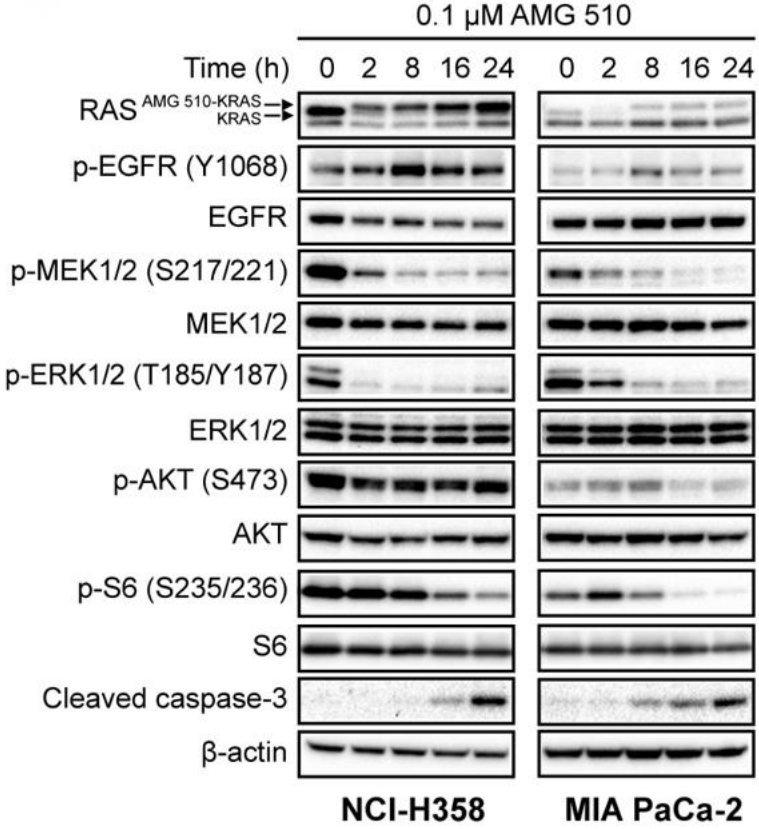


AMG 510 = sotorasib; MIA PaCa-2 = human pancreatic cancer cell line; NCI-H358 = human lung cancer cell line

NCI-H358 and MIA PaCa-2 cells were treated with DMSO or the indicated concentrations of AMG 510 for four or 24 hours. Following treatment, cell lysates were prepared, and multiple signaling nodes were analyzed by immunoblot. ND = not detectable.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20190078

図 6　sotorasibの処理時間依存的なMAPK及びPI3K経路シグナルの減少



AMG 510 = sotorasib; MIA PaCa-2 = human pancreatic cancer cell line; NCI-H358 = human lung cancer cell line

NCI-H358 and MIA PaCa-2 cells were treated with DMSO (0 h) or 0.1 μM AMG 510 for 2, 8, 16, or 24 hours. Following treatment, cell lysates were prepared, and multiple signaling nodes were analyzed by immunoblot.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20190078

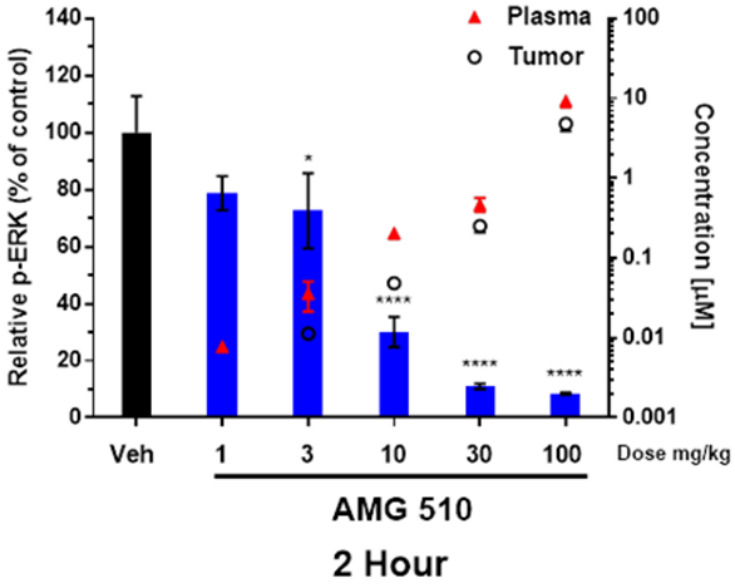
2.2　In vivoにおけるsotorasibの薬理作用

2.2.1　sotorasibの薬理作用、薬物動態及び占有率の検討

sotorasibの薬理作用である、sotorasibのKRAS G12Cへの共有結合及びKRAS G12Cシグナル伝達の阻害作用について、MIA PaCa-2 T2（R20150188試験）及びNCI-H358（R20190129試験）による腫瘍異種移植モデルを用い、p-ERKを測定することで評価した。雌の胸腺欠損ヌードマウスを用い、NCI-H358を皮下移植し、腫瘍容積が約400 mm^3に到達した時点で、溶媒及びsotorasibの1、3、10、30又は100 mg/kgを単回経口（PO）投与した（図 7）。投与2時間後に腫瘍検体を採取し、p-ERKレベル及びKRAS G12Cの共有結合修飾（占有率）について解析した。腫瘍及び血漿試料におけるsotorasibを定量する目的で、薬物動態（PK）試験も実施した。

NCI-H358腫瘍異種移植モデルにおいて、sotorasibは3 mg/kgのPO投与によりp-ERKを有意に阻害し、100 mg/kgで溶媒対照群と比較して最大阻害作用を示した（図 7）。sotorasibは用量依存的な阻害を示し、これはsotorasibの曝露量（図 7）及びKRAS G12C占有率（図 8）の用量依存的な増加と一致していた。なお、MIA PaCa-2T2腫瘍異種移植モデルにおいても同様の作用が認められた（R20150188試験）。

図 7　NCI-H358腫瘍異種移植モデルにおけるsotorasibの有意なpERK阻害作用

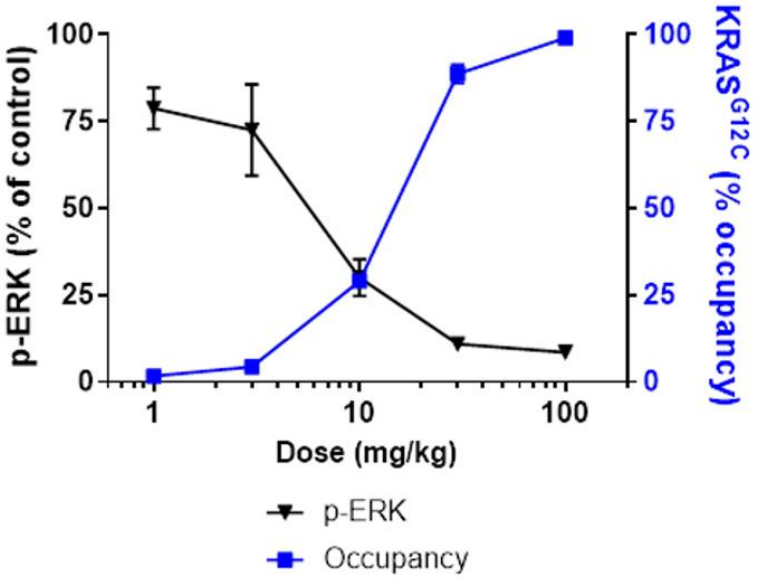


AMG 510 = sotorasib; NCI-H358 = human lung cancer cell line; p-ERK = phosphorylated ERK1/2; SEM = standard error of the mean; Veh = vehicle

NCI-H358 tumors were collected on day 14 (2 hours post-dose) and snap frozen for p-ERK analysis (n = 3). Bars represent relative p-ERK (percent of control). *p < 0.05, ****p < 0.0001, one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc compared to vehicle. Terminal plasma and tumor samples were assayed to quantify AMG 510; red triangles represent total plasma concentration, and open black circles represent total tumor concentration. Data represent mean ± SEM for each group.

Source: Study R20190129

図 8　NCI-H358腫瘍移植モデルにおけるsotorasibのKRAS G12Cに対する用量依存的な共有結合修飾とpERKレベルとの逆相関性



AMG 510 = sotorasib; NCI-H358 = human lung cancer cell line; p-ERK = phosphorylated ERK1/2; SEM = standard error of the mean

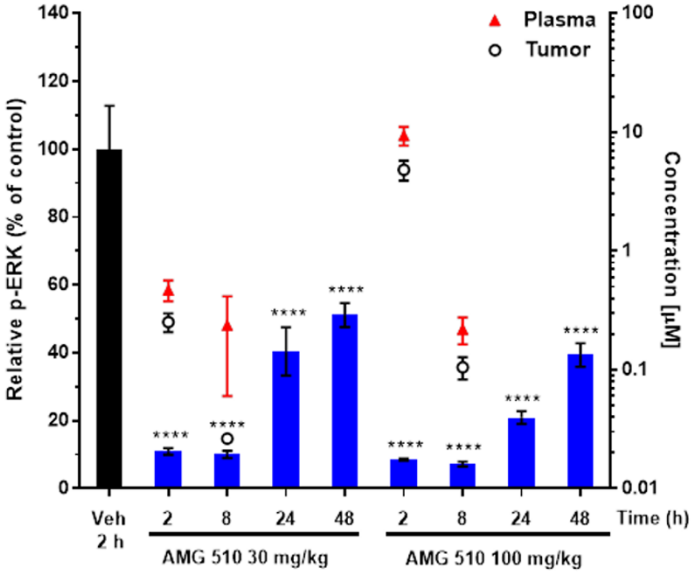
NCI-H358 tumors were collected on day 14 (2 hours post-dose) and snap frozen for KRAS G12C occupancy analysis (n = 3). Occupancy data are shown along with p-ERK data for direct comparison. Data represent mean ± SEM for each group.

Source: Study R20190129

マウスにsotorasibを単回投与したときの曝露期間、KRAS G12Cとの共有結合相互作用及びKRAS G12Cシグナル伝達阻害作用を評価する目的で、PK/PDの経時変化について解析した（R20190129試験）。NCI-H358を皮下移植した担癌マウスを用い、sotorasibを30又は100 mg/kgで単回投与した後、投与2、8、24又は48時間後に血漿及び腫瘍を採取した。腫瘍検体のp-ERKレベル及び占有率を測定し、腫瘍及び血漿についてPK解析を行った。

sotorasibは、p-ERKを48時間にわたり有意に阻害し、最大阻害作用は投与後2～8時間に認められた（図 9）。sotorasibの血漿中濃度及び腫瘍中濃度は、初回測定時に最高値に達し（2時間）、投与後8時間までに低下し、投与後24時間には検出不能となった（図 9）。経時的なp-ERKレベルはsotorasibによるKRAS G12Cの占有率と逆相関を示し、最大占有率は投与後2～8時間において観察された（図 10）。

図 9　NCI-H358腫瘍移植モデルにおけるsotorasibの単回投与によるp-ERKの最大阻害作用（2時間）及び阻害持続時間（48時間）

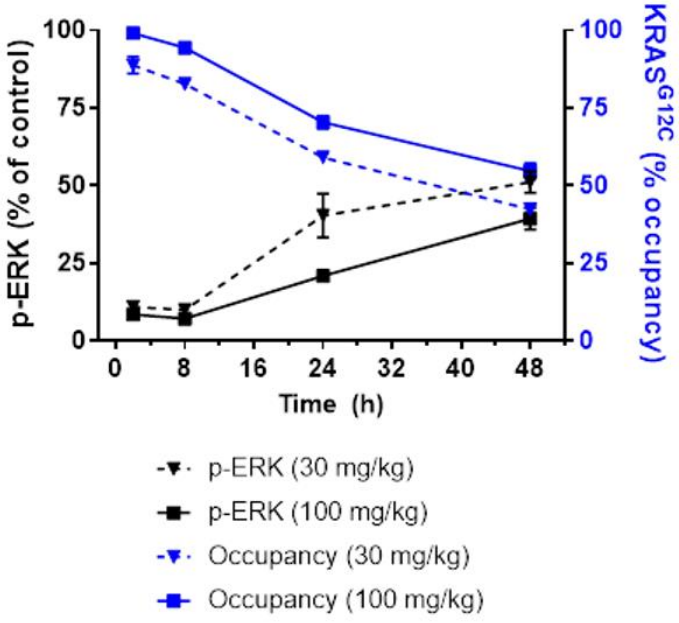


AMG 510 = sotorasib; NCI-H358 = human lung cancer cell line; p-ERK = phosphorylated ERK1/2; SEM = standard error of the mean; Veh = vehicle

NCI-H358 tumors were collected on day 14 (2 and 8 hours post-dose), on day 15 (24 hours post-dose), and on day 16 (48 hours post-dose) then snap frozen for p-ERK analysis (n = 3). Bars represent relative p-ERK (percent of control). ****p < 0.0001, one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc compared to vehicle.　Terminal plasma and tumor samples were assayed to quantify AMG 510; red triangles represent total plasma concentration, and open black circles represent total tumor concentration. Data represent mean ± SEM for each group.

Source: Study R20190129

図 10　NCI-H358腫瘍移植モデルにおけるsotorasibのKRAS G12Cに対する共有結合修飾とp-ERKとの経時的な逆相関性



NCI-H358 = human lung cancer cell line; p-ERK = phosphorylated ERK1/2; SEM = standard error of the mean

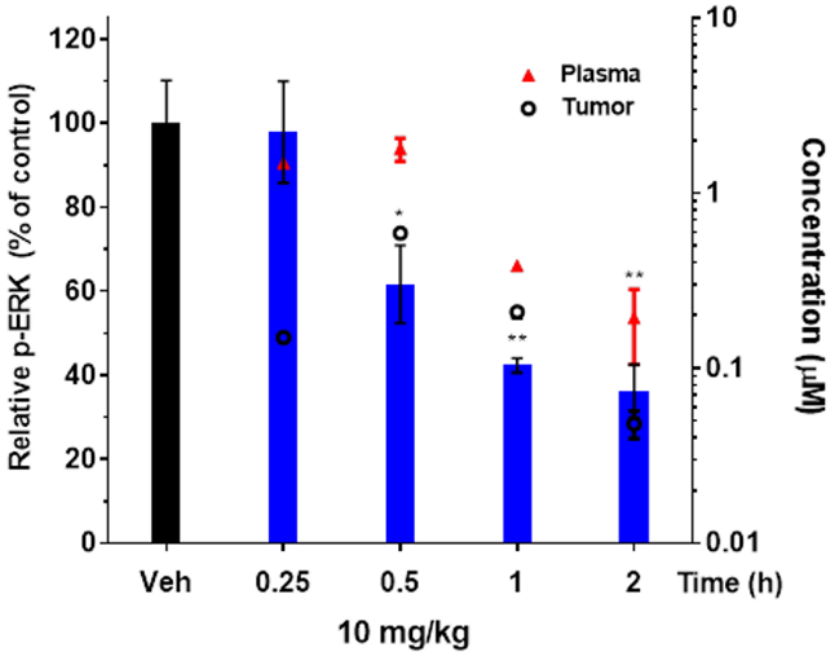
NCI-H358 tumors were collected on day 14 (2 and 8 hours post-dose), on day 15 (24 hours post-dose), on day 16 (48 hours post-dose) and snap frozen for KRAS G12C occupancy analysis (n = 3). Occupancy data are shown along with p-ERK data for direct comparison. Data represent mean ± SEM for each group.

Source: Study R20190129

次に、MIA PaCa-2T2腫瘍移植モデルを用いた短時間（0～2時間）での試験を行い、sotorasibの曝露量及びp-ERK及びKRAS G12C占有率に対する阻害作用について検討した（R20150192試験）。sotorasibの10 mg/kgを単回投与し、投与0.25、0.5、1及び2時間後に血漿及び腫瘍検体を採取した。腫瘍検体のp-ERKレベル及び占有率を測定し、腫瘍及び血漿におけるPK解析を実施した。

sotorasibの血漿中曝露量及び腫瘍中の曝露量は投与0.5時間後に最高値に達し（血漿中濃度：1.8 μM）、投与1時間後には1/4～1/5に低下し（血漿中濃度：0.39 μM）、投与2時間後には1/9～1/10に低下した（血漿中濃度：0.19 μM、図 11）。投与0.5時間後におけるsotorasibのKRAS G12Cに対する占有率を、p-ERK（図 12）の阻害から厳密にトレースした。NCI-H358及びMIA PaCa-2 T2腫瘍移植モデルを用い、sotorasibをそれぞれ100 mg/kg又は10 mg/kgで単回投与した時のPK/PD試験の結果を合わせると、sotorasibの曝露がみられる約1～2時間と同じ期間に、KRAS G12Cシグナル伝達の阻害作用が最大となった。KRAS G12C活性は、24時間までに徐々に回復したが、投与後48時間まで有意な阻害作用が持続した。sotorasibは、比較的短い曝露時間でも共有結合によりKRAS G12Cを長時間阻害することから、KRAS等の長時間活性を持つタンパクに対する阻害剤として期待される（$t_{1/2}$=20～24時間：Canon et al, 2019）。

図 11　MIA PaCa-2 T2腫瘍移植モデルにsotorasibの10 mg/kgを単回投与したときの投与1から2時間におけるp-ERKの最大阻害活性

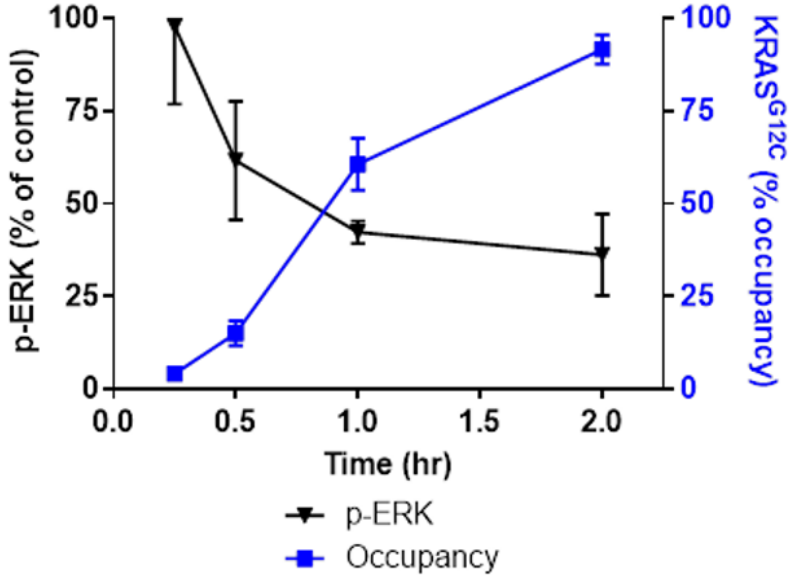


AMG 510 = sotorasib; p-ERK = phosphorylated ERK1/2; PK = pharmacokinetics; SEM = standard error of the mean; Veh = vehicle

MIA PaCa-2 T2 tumors were collected on day 26 and snap frozen for p-ERK analysis (n = 3). Bars represent relative p-ERK (percent of control). *p < 0.05, **p < 0.001 one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc compared to vehicle. Terminal exposures were assessed; red triangles represent total plasma concentration of AMG 510, and open black circles represent total tumor concentration. Data represent mean ± SEM for each group.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20150192

図 12　MIA PaCa-2 T2腫瘍移植モデルにおけるKRAS G12Cに対するsotorasibの共有結合性修飾とp-ERKとの逆相関性



MIA PaCa-2 = human pancreatic cell line; p-ERK = phosphorylated ERK1/2; SD = standard deviation

MIA PaCa-2 T2 tumors were collected on day 26 and snap frozen for KRAS G12C occupancy analysis (n = 3). Occupancy data are shown along with p-ERK data for direct comparison. Data represent mean ± SD for each group.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20150192

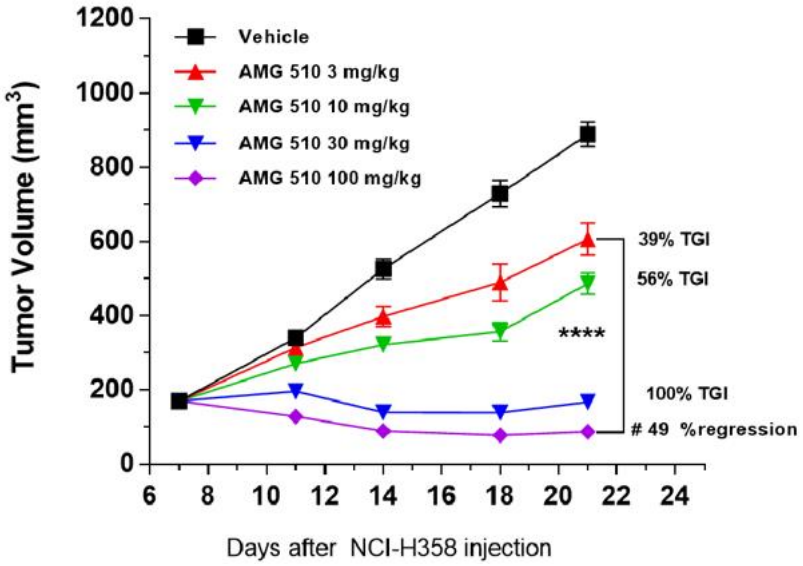
2.2.2　*KRAS p.G12C*及び*KRAS p.G12V*遺伝子変異を有する腫瘍細胞株を用いた異種移植モデルを用いたsotorasibの薬理作用の検討

In vivo試験でみられたKRAS G12Cシグナル伝達阻害作用により、抗腫瘍効果が発現するかを確認する目的で、*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する腫瘍細胞株（NSCLC由来NCI-H358細胞株及びヒト膵癌由来MIA PaCa-2 T2細胞株）及び*KRAS p.G12V*遺伝子変異を有する腫瘍細胞株（大腸癌由来SW4801AC細胞株）を胸腺欠損ヌードマウスに皮下移植したヒト腫瘍異種移植マウスモデルを用い、sotorasibの増殖抑制作用について評価した（Canon et al, 2019、R20150189試験、R20150190試験、R20150191試験）。NCI-H358腫瘍モデルでは、腫瘍容積の平均が170 mm^3に到達した7日目から、溶媒あるいはsotorasibの3、10、30又は100 mg/kgを1日1回PO投与した。MIA PaCa-2 T2腫瘍モデルでは、腫瘍容積の平均が170 mm^3に到達した10日目から、溶媒あるいはsotorasibの10、30又は100 mg/kgを1日1回PO投与した。SW480-1AC腫瘍モデルでは、腫瘍容積の平均が197 mm^3に到達した10日目から、溶媒又はsotorasibの30又は100 mg/kgを1日1回PO投与した。腫瘍容積及び体重は、週2回測定した。MIA PaCa-2 T2腫瘍移植モデルを用いた試験では、投与0.5、1、2、4及び8時間後に腫瘍及び血漿検体を採取し、PK解析を実施した。NCI-H358及びSW480-1AC腫瘍移植モデルを用いた試験では、最終投与の0.25、0.5、1、2及び8時間後に検体を採取した。

sotorasibは溶媒対照群と比較して、すべての用量でNCI-H358の増殖を有意に抑制した（図 13）。100%のTGIを指標とした増殖抑制作用は、sotorasibの30 mg/kgでみられたが、sotorasibの100 mg/kgにおける腫瘍退縮作用は49%であった（図 13）。血漿中の曝露量が、細胞内p-ERKに対するIC_{90}を2時間を超えて増加し、腫瘍退縮作用が認められた（図 14）。MIA PaCa-2 T2腫瘍移植モデルを用いた試験では、sotorasibの30及び100 mg/kgの投与により腫瘍退縮作用がみられた（それぞれ34及び

62%、図 15）。sotorasibは、SW480-1ACの増殖には影響しなかった（図 16）。腫瘍及び血漿中のsotorasibの曝露量は用量の増加に伴って増加し、これらの試験間で同程度であった。いずれの投与群でも、死亡あるいはその他の一般状態の変化はみられなかった（R20150189試験、R20150190試験、R20150191試験）。これらの試験はin vitro試験の結果を裏付けるものであり、sotorasibは*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する腫瘍の増殖を顕著に阻害し、また、*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有さない腫瘍に対して影響しないことが示された。

図 13　NCI-H358腫瘍異種移植モデルにおけるsotorasibの1日1回投与による腫瘍増殖阻害作用

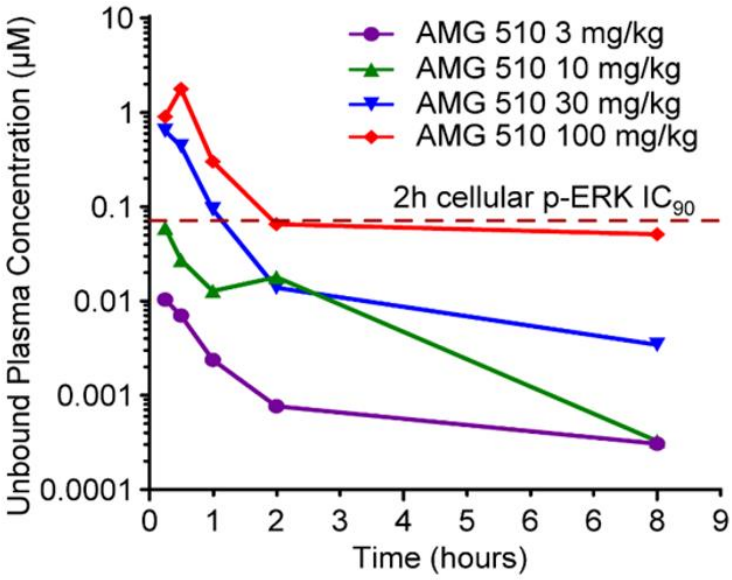


AMG 510 = sotorasib; NCI-H358 = human lung cancer cell line; NSCLC = non-small cell lung carcinoma; PO = oral administration; QD = once per day; SEM = standard error of the mean; TGI = tumor growth inhibition

NCI-H358 cells (5×10^6) were injected subcutaneously in the right flank of female athymic nude mice. Animals were randomized based on tumor volume on day 7 (n = 10). Animals were treated PO, QD with vehicle or AMG 510 at 3, 10, 30, or 100 mg/kg. ****$p < 0.0001$ (TGI), two-way RMANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test compared to vehicle; #$p < 0.0001$ (regression) by paired t-test out to day 21. Tumor volume was measured twice per week, and data represent mean ± SEM for each group.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20150190

図 14　NCI-H358腫瘍移植モデルにおけるsotorasibの非結合型血漿中濃度

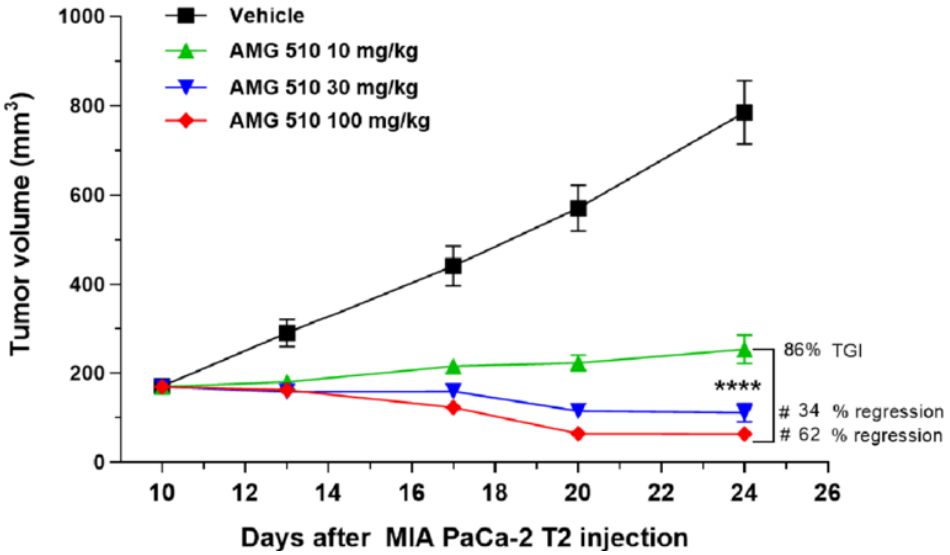


AMG 510 = sotorasib; NCI-H358 = human lung cancer cell line; NSCLC = non-small cell lung carcinoma; PO = oral administration; QD = once per day; IC_{90} = inhibitor concentration which achieves 90% inhibition.

Animals were treated PO, QD with vehicle or AMG 510 at 3, 10, 30, or 100 mg/kg. Terminal plasma samples were collected from the AMG 510 treatment groups for pharmacokinetic analyses at 0.25, 0.5, 1, 2, and 8 hours post final dose (n = 2). Unbound plasma concentration was calculated by multiplying total plasma concentration by fraction unbound in plasma as determined by ultracentrifugation. Dashed line represents the p-ERK IC_{90} values in cells after 2-hour treatment with AMG 510.

Source: Canon et al, 2019

図 15　MIA PaCa-2 T2腫瘍異種移植モデルにおけるsotorasibの1日1回投与による腫瘍増殖阻害作用

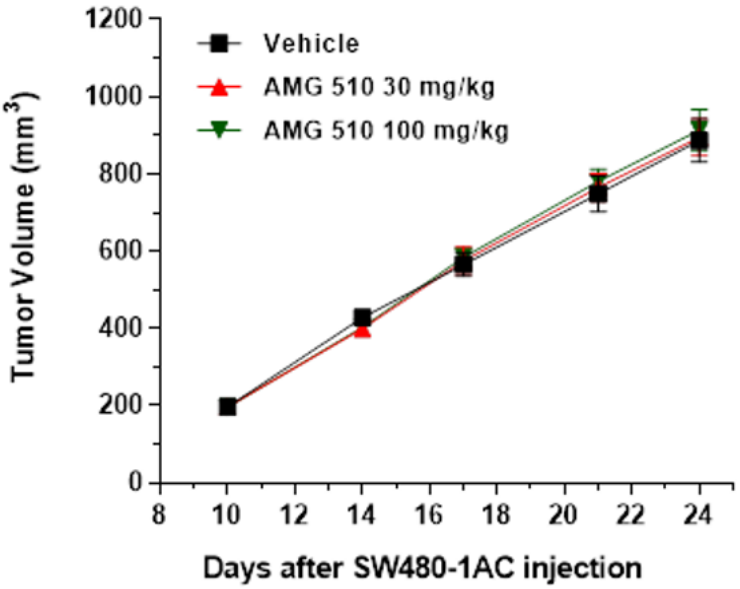


AMG 510 = sotorasib; MIA PaCa-2 = human pancreatic cell line; PO = oral administration; QD = once per day; SEM = standard error of the mean; TGI = tumor growth inhibition

MIA PaCa-2 T2 cells (5×10^6) were injected subcutaneously in the right flank of female athymic nude mice. Animals were randomized based on tumor volume on day 10 (n = 10). Animals were treated PO, QD with vehicle or AMG 510 at 10, 30, or 100 mg/kg. ****$p < 0.0001$ (TGI) two-way RMANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test compared to vehicle; #$p < 0.02$ (regression) by paired t-test out to day 24. Tumor volume was measured twice per week, and data represent mean ± SEM for each group.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20150189

図 16　SW480-1AC腫瘍異種移植モデルにおけるsotorasibの1日1回投与による腫瘍増殖阻害作用



AMG 510 = sotorasib; PO = by mouth (oral gavage); QD = once per day; SEM = standard error of the mean; SW480-1AC = human colorectal carcinoma cell line

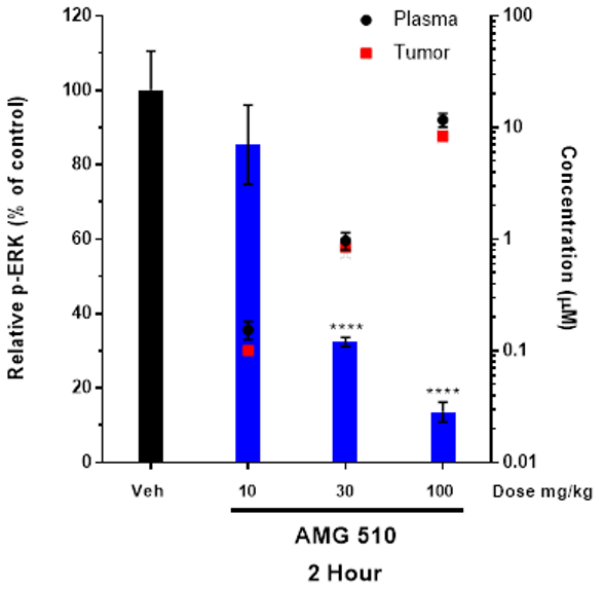
SW480-1AC cells (5×10^6) were injected subcutaneously in the right flank of female athymic nude mice. Animals were randomized based on tumor volume on day 10 (n = 10, except for n = 9 in the 30 mg/kg group). Animals were treated PO, QD with vehicle or AMG 510 at 30 or 100 mg/kg. Tumor volume was measured twice per week, and data represent mean ± SEM for each group. Statistically, AMG 510 treatment groups were not significantly different compared to vehicle control.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20150191

2.2.3　*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する患者由来細胞腫瘍異種移植モデルにおけるsotorasibの効力の検討

ヒト細胞腫瘍異種移植モデルを用いた試験に加え、*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有するヒト結腸直腸癌（CRC）由来患者腫瘍細胞異種移植（PDX）モデルによりsotorasibについて評価した。*KRAS p.G12C*変異を有するヒトCRC細胞株を用いたPDX腫瘍において、sotorasibは時間及び用量依存的に有意にp-ERKを阻害した（R20190130試験）。sotorasibの30 mg/kgを投与した2時間後にp-ERKの有意な阻害がみられ、100 mg/kgで溶媒対照群と比較して最大阻害活性が認められた（それぞれ68及び86%、図 17）。この阻害作用は48時間以上持続し、このとき59%の阻害作用が認められた（図 18）。PK解析の結果、血漿及び腫瘍中のsotorasib濃度は用量の増加に伴い増加し（図 17）、投与後24時間ではsotorasibは検出されなかった（図 18）。これらの結果は、sotorasibは短時間の曝露によりKRAS G12Cの広範な阻害作用を示す（48時間超）という以前のデータを裏付けていた。

図 17 *KRAS p.G12C*遺伝子変異を有するCRC由来腫瘍を用いたPDXモデルにおけるsotorasibのp-ERK阻害作用

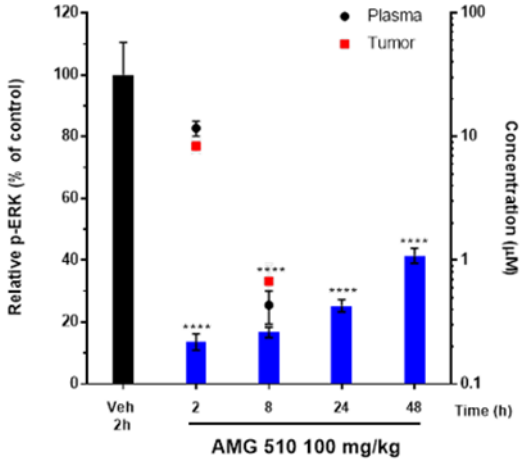


AMG 510 = sotorasib; ANOVA = analysis of variance; BQL = below quantifiable limit; PDX = patient-derived xenograft; p-ERK = phosphorylated ERK1/2; SEM = standard error of the mean

Colorectal carcinoma (CRC) *KRAS p.G12C* PDX tumors were collected on day 49 (2 hours post-dose) and snap frozen for p-ERK analysis (n = 3). Bars represent relative p-ERK (percent of control). ****p < 0.0001, one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc compared to vehicle. Terminal plasma and tumor samples were assayed to quantify AMG 510; black circles represent total plasma concentration, and red squares represent total tumor concentration. All samples from the vehicle group were BQL and are not represented on the graph. Data represent mean ± SEM for each group.

Source: Study R20190130

図 18 *KRAS p.G12C*遺伝子変異を有するCRC由来腫瘍を用いたPDXモデルにおけるsotorasibの投与48時間後におけるp-ERK阻害作用



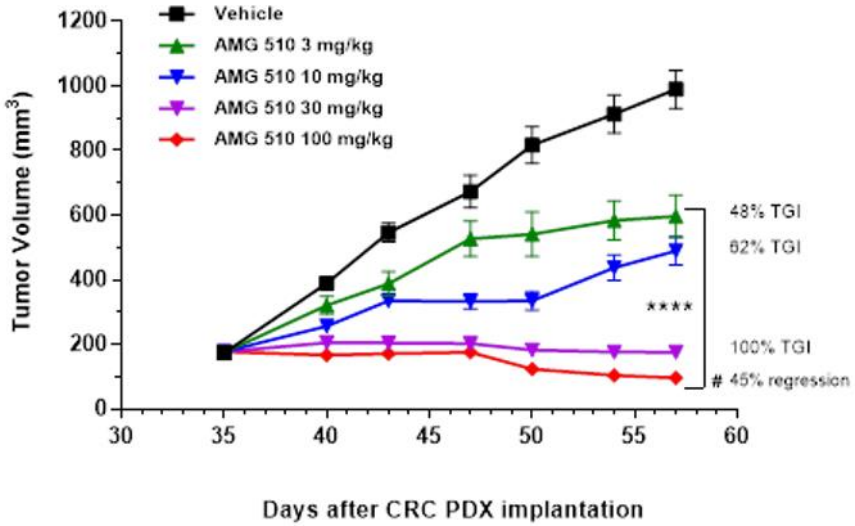
AMG 510 = sotorasib; ANOVA = analysis of variance; BQL = below quantifiable limit; PDX = patient-derived xenograft; p-ERK = phosphorylated ERK1/2; SEM = standard error of the mean

Colorectal carcinoma (CRC) *KRAS p.G12C* PDX tumors were collected on day 49 (2 and 8 hours post-dose), on day 50 (24 hours post-dose), and on day 51 (48 hours post-dose) and snap frozen for p-ERK analysis (n = 3). Bars represent relative p-ERK (percent of control). ****p < 0.0001, one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc compared to vehicle. Terminal plasma and tumor samples were assayed to quantify AMG 510; black circles represent total plasma concentration, and red squares represent total tumor concentration. All samples from the vehicle group were BQL and are not represented on the graph. Data represent mean ± SEM for each group.

Source: Study R20190130

有効性の検討において、溶媒対照群と比較して、sotorasibはすべての用量で*KRAS p.G12C*を有するCRC由来PDXモデルにおける腫瘍の増殖を有意に抑制した（図 19）。sotorasibの100 mg/kg投与により、45%の有意な腫瘍退縮作用が得られた（図 19）。いずれの投与群でも、死亡又は体重変化に基づくその他一般状態の変化は認められなかった。血漿及び腫瘍中のsotorasib濃度は、用量の増加に伴い増加した（R20190131試験）。

図 19　*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有するCRC由来腫瘍を用いたPDXモデルにおけるsotorasibの1日1回投与による腫瘍退縮作用



AMG 510 = sotorasib; CRC = colorectal carcinoma; PDX = patient-derived xenograft; PO = by mouth (oral gavage); QD = once per day; RMANOVA = repeated measures analysis of variancce; SEM = standard error of the mean; TGI = tumor growth inhibition

Human CRC *KRAS p.G12C* PDX tumor fragments were implanted subcutaneously into the right flank of female NOD/SCID IL2rg mice. Animals were randomized based on tumor volume on day 35. On day 36, animals were treated PO, QD with vehicle or AMG 510 at 3, 10, 30 or 100 mg/kg (n = 10). ****p < 0.0001 (TGI) two-way RMANOVA followed by Dunnett's post hoc compared to vehicle; #p < 0.0001 (regression) by paired t-test out to day 57. Tumor volume was measured twice per week, and data represent mean ± SEM for each group.

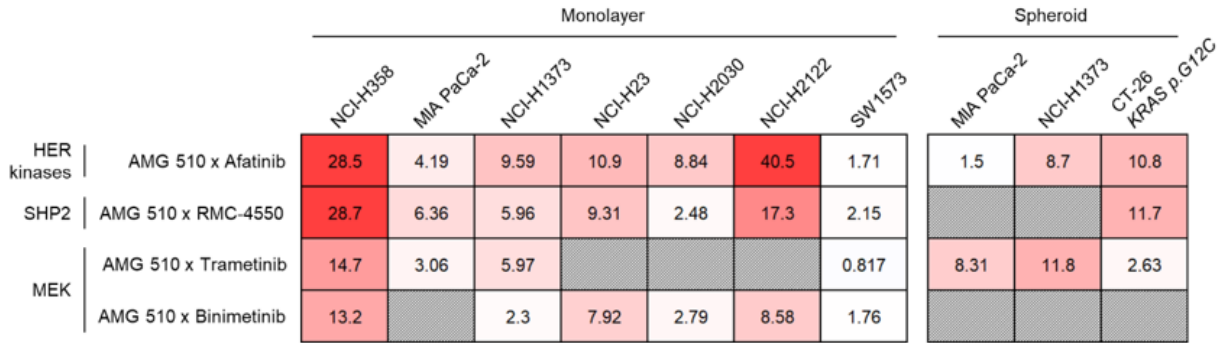
Source: Study R20190131

2.3　sotorasibとの併用投与に関する試験

2.3.1　sotorasibとMAPK阻害剤あるいは化学療法剤との併用試験

BRAF阻害剤及びMEK阻害剤の併用療法により、臨床上有用性が認められていることから、sotorasibとMAPKシグナル伝達経路に対する他の阻害剤との併用が、腫瘍細胞死を増強し、耐性を克服する可能性が示唆されている。したがって、複数の*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する細胞株を用い、in vitroにおける併用投与試験を、sotorasibの用量反応及びMAPKシグナル伝達における種々の経路に対する阻害剤を用いて実施した（153894試験）。sotorasibとpan-ErbBキナーゼ阻害薬であるアファチニブ、SHP-2阻害剤であるRMC-4550又はMEK阻害剤（MEKi）であるトラメチニブ及びビニメチニブとの併用により、NCI-H358及びNCI-H2122に対し極めて相乗的な腫瘍傷害作用が示された（図 20）。他の細胞株では、これらの併用投与により、弱いが相乗的な腫瘍細胞傷害作用が認められた（図 20）。トラメチニブとの相乗的な腫瘍細胞傷害作用は、スフェロイドの増殖条件下において顕著に増強された（図 20）。

図 20　In vitroにおけるsotorasibとMAPK経路阻害剤の併用による相乗的な細胞傷害作用



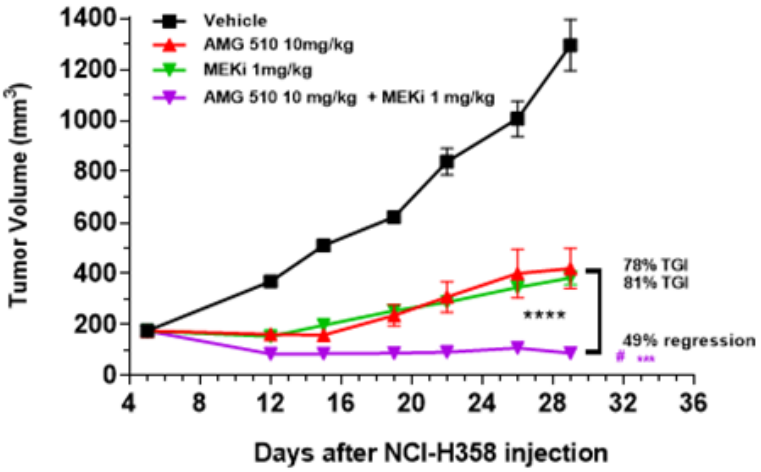
AMG 510 = sotorasib; HER = human epidermal growth factor receptor; MEK = mitogen-activated protein kinase kinase; SHP2 = Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2

Synergy scores for AMG 510 combinations with targeted agents were calculated using a Loewe additivity excess algorithm in Chalice Analyzer software and are represented as a heatmap. Higher scores (darker red color) denote stronger synergistic interactions. Gray shaded cells indicate combinations which were not tested.

Source: Study 153894

In vitroにおける併用投与での結果をin vivoに拡大する目的で、NSCLC由来NCI-H358腫瘍異種移植モデルを用い、in vivo試験で既に結果が得られているMEKiであるPD0325901とsotorasibによる併用投与試験により評価した（R20180033試験）。sotorasibは、腫瘍細胞を用いたPDアッセイにおけるp-ERKに対するED_{50}に相当する10 mg/kg（図 7）を、MEKiは臨床用量に該当すると報告されている用量（1 mg/kg）を投与した（Jousma et al, 2015）。いずれの薬剤も単剤投与で有意なTGIが確認されたが、両薬剤を併用投与することで抗腫瘍活性が有意に増強され、49%の腫瘍退縮作用が得られた（図 21）。いずれの投与群でも、死亡又はその他一般状態の変化は認められなかった。一般状態所見は、体重の変化により評価した（R20180033試験）。

図 21　sotorasib及びMEK阻害剤の併用によるNCI-H358腫瘍退縮作用



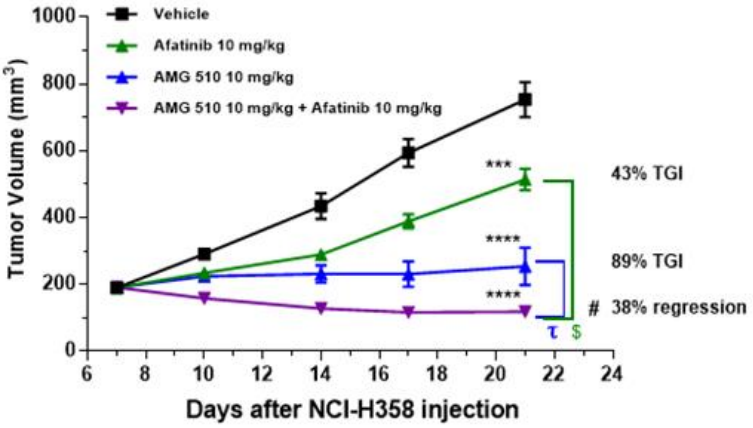
AMG 510 = sotorasib; ANOVA = analysis of variance; MEK = mitogen-activated protein kinase kinase; MEKi = MEK inhibitor; NCI-H358 = human lung cancer cell line; SEM = standard error of the mean; TGI = tumor growth inhibition

NCI-H358 cells (5×10^6) were injected subcutaneously in the right flank of female athymic nude mice. Treatment began on day 5 when tumors reached approximately 176 mm^3. Animals were treated with either 1) vehicle; 2) AMG 510 (10 mg/kg); 3) MEKi (1 mg/kg); or 4) AMG 510 (10 mg/kg) plus MEKi (1 mg/kg) PO once per day through day 29 (n = 10). Tumor volume was measured 2 to 3 times per week, and data represent mean ± SEM for each group. ***$p < 0.001$ for combination treatment compared with the single agent, ****$p < 0.0001$ for treatment group compared with vehicle by repeated measures ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test; #$p < 0.0001$ regression by paired t-test.

Source: Study R20180033

MAPK経路における、RASシグナル伝達経路の上流であるEGFR及びSHP-2に対する阻害剤について、in vivoにおけるヒトNSCLC由来NCI-H358腫瘍異種移植モデルを用いた併用投与試験により評価した（153358試験）。EGFR/pan-ErbB阻害薬であるアファチニブの単剤投与では、顕著な腫瘍増殖阻害作用が報告されている最低用量である10 mg/kgを投与した。sotorasibは、腫瘍増殖抑制試験におけるED_{50}にほぼ相当する10 mg/kg（図 7）を投与した。MEKiの結果と同様に、sotorasib又はアファチニブの単剤投与でも、溶媒対照群と比較して有意な腫瘍増殖阻害作用が認められた（図 22）。両剤の併用投与では、それぞれの単剤投与と比較して有意かつ顕著なTGIが認められ、38%の有意な腫瘍退縮作用を示した（図 22）。いずれの投与群でも、死亡又はその他一般状態の変化は認められなかった。一般状態所見は、体重の変化により評価した（153358試験）。

図 22　sotorasib及びアファチニブとの併用によるNCI-H358腫瘍退縮作用



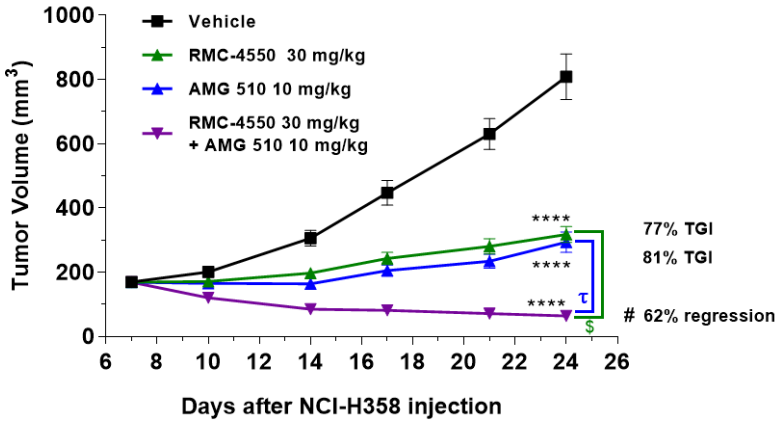
AMG 510 = sotorasib; NCI-H358 = human lung cancer cell line; RMANOVA = repeated measures analysis of variance; SEM = standard error of the mean; TGI = tumor growth inhibition

NCI-H358 cells (5×10^6) were injected subcutaneously in the right flank of female athymic nude mice. Treatment began on day 7 when tumors had reached approximately 190 mm^3. Animals were treated with either 1) vehicle; 2) afatinib (10 mg/kg); 3) AMG 510 (10 mg/kg); or 4) AMG 510 (10 mg/kg) plus afatinib (10 mg/kg) once per day (n = 10). Treatments for each group were spaced at least 2 hours apart. Data represent mean ± SEM for each group. ***p = 0.0004 (TGI) two-way RMANOVA followed by Tukey's post hoc compared to vehicle; ****p < 0.0001 (TGI) two-way RMANOVA followed by Tukey's post hoc compared to vehicle; τ and $ signify statistical differences between the combination group and single agents (p = 0.0308 and p < 0.0001, respectively); #p = 0.0002 (regression) by paired t-test out to day 21.

Source: Study 153358

sotorasibの10 mg/kg及びSHP-2阻害剤であるRMC-4550の最大有効用量である30 mg/kg（Nichols et al, 2018）を用い、in vivoでの併用投与試験を実施した（153397試験）。sotorasib又はRMC-4550のいずれも単剤投与により有意な腫瘍増殖抑制作用がみられたが、併用投与では有意な効果の増強が認められ、62%の腫瘍退縮作用が得られた（図 23）。いずれの投与群でも、死亡又は体重の変化に基づくその他一般状態の変化は認められなかった（153397試験）。

図 23　sotorasib及びRMC-4550との併用によるNCI-H358腫瘍退縮作用



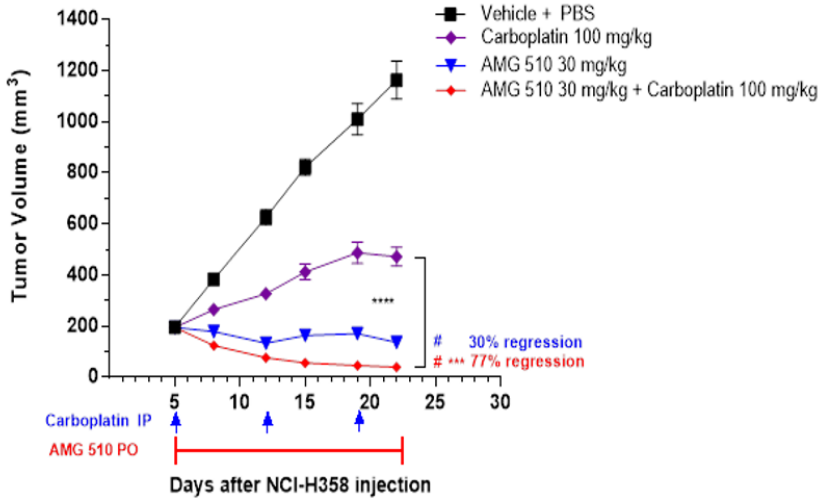
AMG 510 = sotorasib; NCI-H358 = human lung cancer cell line; RMANOVA = repeated measures analysis of variancce; SEM = standard error of the mean; TGI = tumor growth inhibition

NCI-H358 cells (5×10^6) were injected subcutaneously in the right flank of female athymic nude mice. Treatment began on day 7 when tumors had reached approximately 170 mm^3. Animals were treated with either 1) vehicle; 2) RMC-4550 (30 mg/kg); 3) AMG 510 (10 mg/kg); or 4) AMG 510 (10 mg/kg) plus RMC-4550 (30 mg/kg) by oral gavage once per day for 17 days (n = 10). Treatments for each group were spaced at least 2 hours apart. ****p < 0.0001 (TGI) two-way RMANOVA followed by Tukey's post hoc compared to vehicle. Ƭ and $ p values correspond to statistical differences between the combination group and single agents (Ƭ, p = 0.0010 and $, p < 0.0001); #p < 0.0001 (regression) by paired t-test out to day 24. Tumor volume was measured twice per week, and data represent mean ± SEM for each group.

Source: Study 153397

NSCLCにおける*KRAS p.G12C*遺伝子変異の発現率を考慮し、NCI-H358腫瘍異種移植モデルを用い、sotorasibとNSCLCの標準化学療法薬であるカルボプラチンとの併用効果について検討した。（R20180032試験）。sotorasibの30 mg/kg投与により有意な腫瘍退縮作用がみられ、また、カルボプラチンの投与により有意なTGIが認められた（図 24）。しかし、sotorasibの10 mg/kgあるいは30 mg/kgの併用投与により、実質的な毒性の増強もなく、有意な抗腫瘍効果の増強がみられた（図 24、R20180032試験）。カルボプラチンとsotorasibの30 mg/kgの併用により、有意な腫瘍退縮作用が認められた（図 24）。

図 24　sotorasib及びカルボプラチンとの併用によるNCI-H358腫瘍退縮作用



AMG 510 = sotorasib; IP = intraperitoneally; NCI-H358 = human lung cancer cell line; PBS = phosphate buffered saline; PO = by mouth (oral gavage); SEM = standard error of the mean

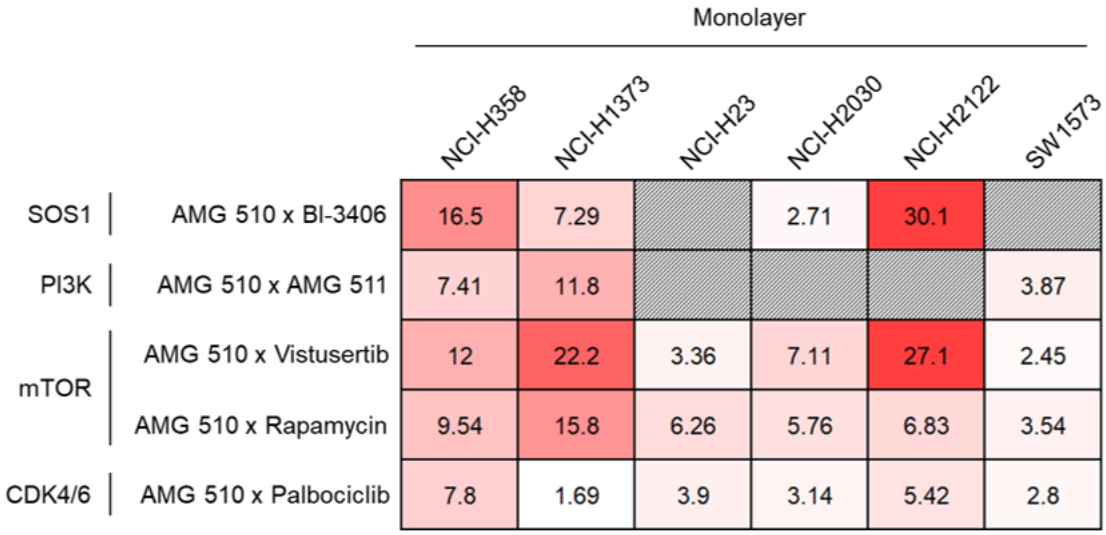
NCI-H358 cells (5×10^6) were injected subcutaneously in the right flank of female athymic nude mice. Treatment began on day 5 when tumors had reached approximately 195 mm^3. Animals were treated with vehicle or AMG 510 (30 mg/kg) by oral gavage once per day for 17 days (day 22). PBS or carboplatin (100 mg/kg) were administered by IP on days 5, 12, and 19. Tumor volume was measured twice per week, and data represent mean ± SEM for each group (n = 10, except for AMG 510 + carboplatin, where n = 9 after day 14). ***p < 0.001 for comparison of the combination treatment to each single agent by Dunnett's. Results from all treatment groups were significant in comparison to vehicle; ****p < 0.0001 by Dunnett's; #p < 0.001 regression by paired t-test.

Source: Study R20180032

2.3.2　sotorasibと他の分子標的薬との併用投与試験

sotorasibとともに、他のMAPKシグナル伝達因子（例えばSOS1）、異なる発癌シグナル伝達経路（例えばPI3K/mTOR）又は細胞周期調節因子（例えばCDK4/6）等の阻害剤との潜在的な相乗効果を評価する目的で、in vitroにおいて追加の併用試験を実施した（153894試験）。sotorasibとSOS1阻害剤であるBI-3406をin vitroで併用した場合、NCI-H358及びNCI-H2122で相乗的な腫瘍細胞障害作用が認められた（図 25）。sotorasibとPI3K阻害剤（AMG 511）又はmTOR阻害剤（ビストセルチブ又はラパマイシン）の併用でも、複数の細胞株で相乗的な腫瘍細胞傷害作用が認められ、sotorasibとCDK4/6阻害剤（palbociclib）との併用では、検討したほとんどの細胞株で中程度の相乗的な腫瘍細胞障害作用が認められた（図 25）。

図 25　In vitroにおけるsotorasibと分子標的薬との併用による相乗的な腫瘍細胞障害作用



AMG 510 = sotorasib; AMG 511 = PI3K inhibitor; BI-3406 = SOS1 inhibitor; CDK4/6 = cyclin-dependent kinase 4/6; mTOR = mammalian target of rapamycin; PI3K = phosphoinositide 3-kinase; SOS1 = son-of-sevenless homolog 1

Synergy scores for AMG 510 combinations with targeted agents were calculated using a Loewe additivity excess algorithm in Chalice Analyzer software and are represented as a heatmap. Higher scores (darker red color) denote stronger synergistic interactions. Gray shaded cells indicate combinations which were not tested.

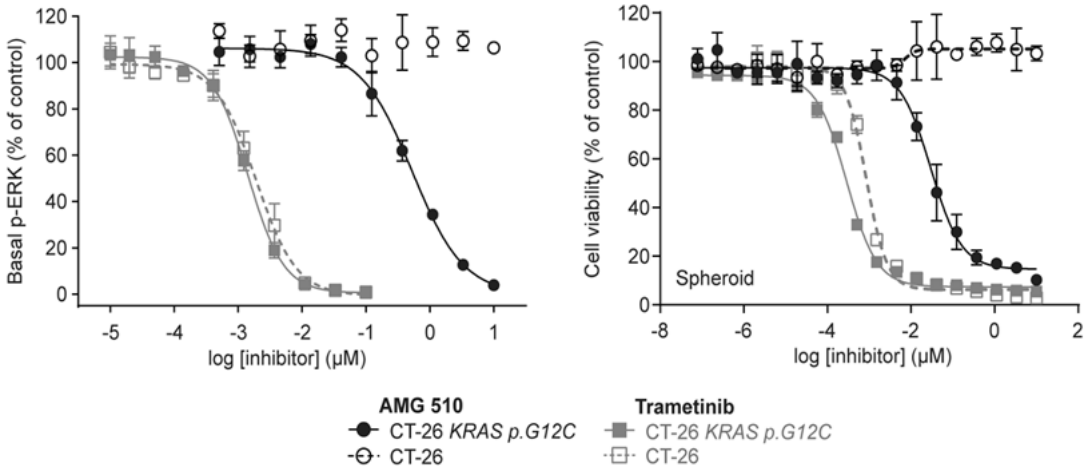
Source: Study 153894

2.4　抗腫瘍炎症反応に対するsotorasibの作用

2.4.1　In vitroにおけるsotorasibの作用機序に関する試験

これまでに、腫瘍においてMAPK経路（例えばMEK）を阻害することで、抗腫瘍免疫反応を誘導することが報告されている（Ebert et al, 2016）。sotorasibのKRAS G12C阻害による、腫瘍での炎症及び免疫反応に対する影響を検討する目的で、腫瘍細胞株を用いたマウス同種移植モデルを作製した。マウス結腸直腸癌細胞株であるCT-26を用い、CRISPR技術により*KRAS p.G12D*アレルを*KRAS p.G12C*に置換した。得られた*KRAS p.G12C*遺伝子を導入したCT-26細胞は、sotorasibによるp-ERKの阻害及びin vitroにおける生存率の低下がみられ、効果は*p.G12C*の変異に依存していた（図 26）。マウス由来の*KRAS p.G 12C*変異を有する細胞株に対するsotorasibの効力は、同系統のヒト腫瘍細胞株における効力と比較して1/2～1/3であった（図 3、図 4、図 26）。MEKiであるトラメチニブは、MAPKシグナル伝達経路を阻害し、両細胞株における生存率を低下させたが、sotorasibは親細胞株である、*KRAS p.G12D*変異を有するCT-26細胞において、p-ERK及び生存率に影響しなかった（図 26）。

図 26　*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有するCT-26細胞におけるsotorasibのp-ERK及び生存率に対する影響



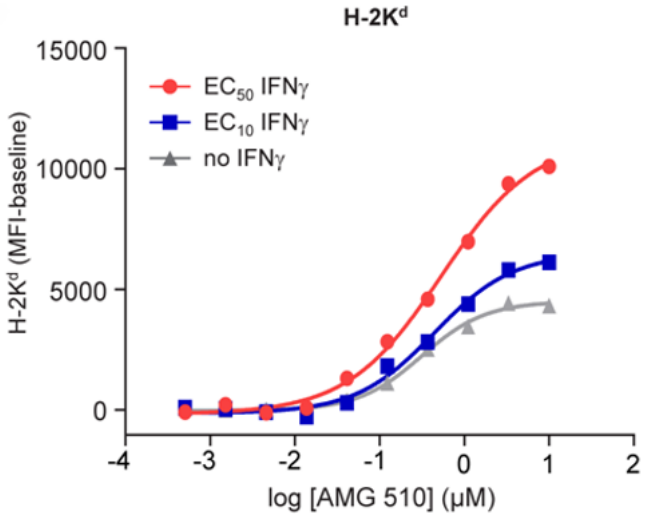
AMG 510 = sotorasib; CT-26 = murine colorectal tumor model; ERK1/2 = extracellular signal regulated kinase 1/2; p-ERK = phosphorylated ERK1/2; MEK = mitogen activated protein kinase kinase;　MSD = MesoScale Discovery; SD = standard deviation

CT-26 or CT-26 *KRAS p.G12C* cells were seeded in 96-well plates and were treated with serially diluted AMG 510 or the MEK inhibitor trametinib for 2 hours (p-ERK) or 72 hours (viability). Inhibition of p-ERK was measured by immunoassay (MesoScale Discovery or MSD). Effects of AMG 510 on cell viability were measured using a CellTiter-Glo luminescent assay. Data represent mean ± SD (n ≥ 2).

Source: Canon et al, 2019

*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26を用い、sotorasibのKRAS G12C阻害による炎症マーカーへの影響について評価した。MHCクラスI分子の細胞表面における抗原発現状況をフローサイトメトリーにより、また、炎症性サイトカインであるCXCL10及びCXCL11の産生をリボ核酸（RNA）転写産物解析及びELISA法により測定したところ、sotorasib処理24時間後にMHCクラスI抗原の発現が用量依存的に増加し、その増加は炎症性サイトカインであるIFN-γの添加により増強した（図 27）。*Cxcl10*及び*Cxcl11*のRNA発現レベルについても、sotorasibの5 μMで24時間処理することで増加し、この作用はCXCL10（IP-10）タンパクの分泌と同様であった（図 28）。いずれの場合でも、sotorasibは*KRAS p.G12D*変異を有するCT-26細胞株に作用せず、サイトカイン産生の増加作用はは、MEKiの最大有効濃度におけるサイトカイン産生と比較して有意に強かった（図 28）。

図 27　*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26におけるsotorasibによるMHCクラスI抗原発現誘導

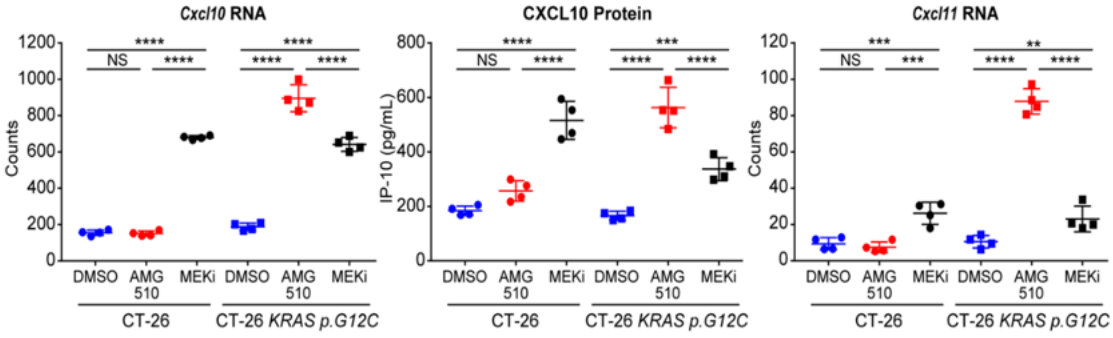


AMG 510 = sotorasib; CT-26 = murine colorectal tumor model; BSA = bovine serum albumin; EC_{50} = Half maximal effective concentration; IFNγ = interferon gamma; PBS = phosphate-buffered saline; PE = phycoerythrin

CT-26 *KRAS p.G12C* cells (5×10^4 cells/well) were seeded in a 96-well plate and treated with a serial dilution of AMG 510 in the absence or presence of IFNγ for 24 hours. Cells were non-enzymatically detached from the wells, washed with staining buffer (PBS/0.5% BSA), and then incubated with PE-conjugated anti-H-2Kd antibody (BioLegend) for 30 min on ice. After washing, cells were resuspended in staining buffer containing SYTOX™ Blue Dead Cell Stain (Life Technologies), and then >1000 cells were analyzed by flow cytometry. Acquisition and analysis were performed on a BD LSRFortessa flow cytometer using BD FACSDiva software.

Source: Canon et al, 2019

図 28　*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26におけるsotorasibによるサイトカインCXCL10及びCXCL11の発現誘導



AMG 510 = sotorasib; CT-26 = murine colorectal tumor model; DMSO = dimethyl sulfoxide; MEK = mitogen-activated protein kinase kinase; MEKi = MEK inhibitor; SD = standard deviation

Quantitation of *Cxcl10* or *Cxcl11* transcript, as well as secreted CXCL10 (IP-10) protein, following 24-hour treatment of parental CT-26 or CT-26 *KRAS p.G12C* cells with 5 μM AMG 510 or 0.02 μM PD-0325901 (MEKi). Data are mean ± SD; ****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, NS = not significant by Tukey's.

Source: Canon et al, 2019

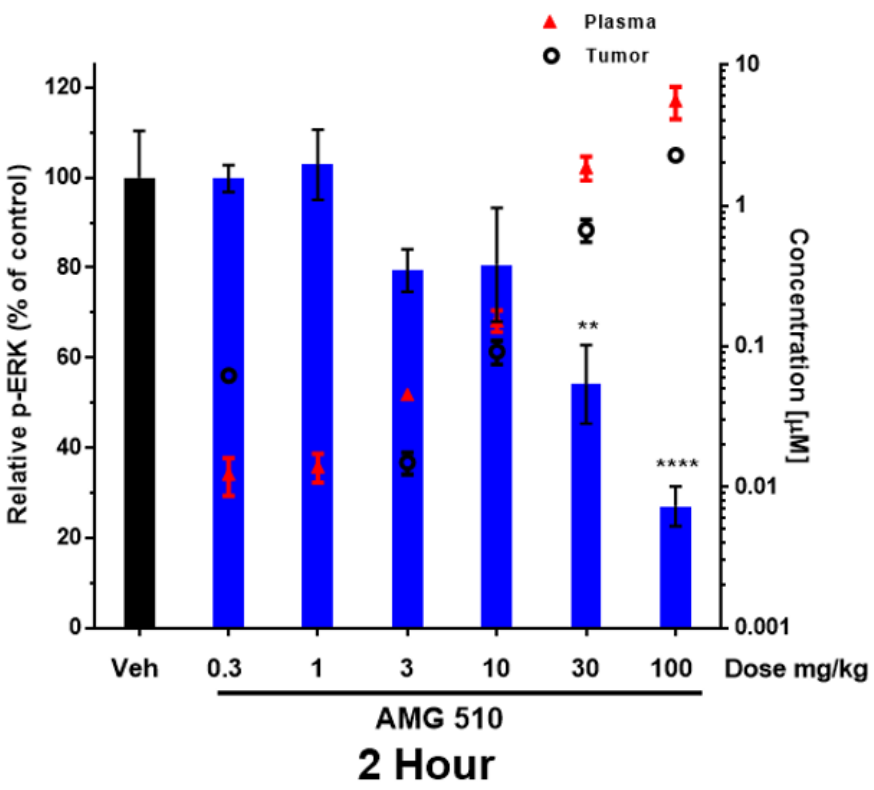
2.4.2　In vivoにおけるsotorasibの作用機序に関する試験

免疫不全マウスに*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26を同種腫瘍したモデルを用いたPK/PD試験において、sotorasibは30及び100 mg/kgでp-ERKを有意に阻害した（図 29A）。これは、CT-26におけるKRAS G12Cに対するsotorasibの作用の低下と一致しており（図 26）、sotorasibの200 mg/kgでp-ERK

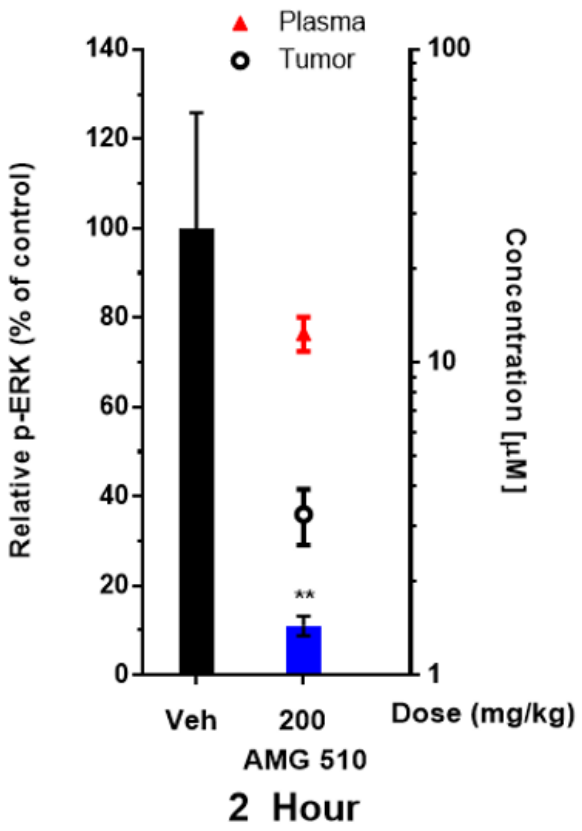
の阻害が最大となった（図 29B）。同様に、同種あるいは異種移植腫瘍モデルを用いた薬効薬理試験において、sotorasibは100及び200 mg/kgで有意な腫瘍退縮作用を示した（Canon et al, 2019）。しかし、sotorasibの100 mg/kg投与における腫瘍退縮作用は持続性がなく、試験終了時に腫瘍が消失したのは10例中2例のみであった（Day 29、図 30）。PK/PD試験におけるp-ERKの抑制が大きかったことと一致して、sotorasibの200 mg/kgという高用量においてより持続的な効果が得られ、10例中8例で試験終了時に腫瘍が認められなかった（図 30）。同じ用量であるsotorasibの200 mg/kg投与では、*KRAS p.G12D*変異を有するCT-26の増殖に影響しなかった（図 30）。

図 29　*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26におけるsotorasibのp-ERK阻害作用

A.



B.



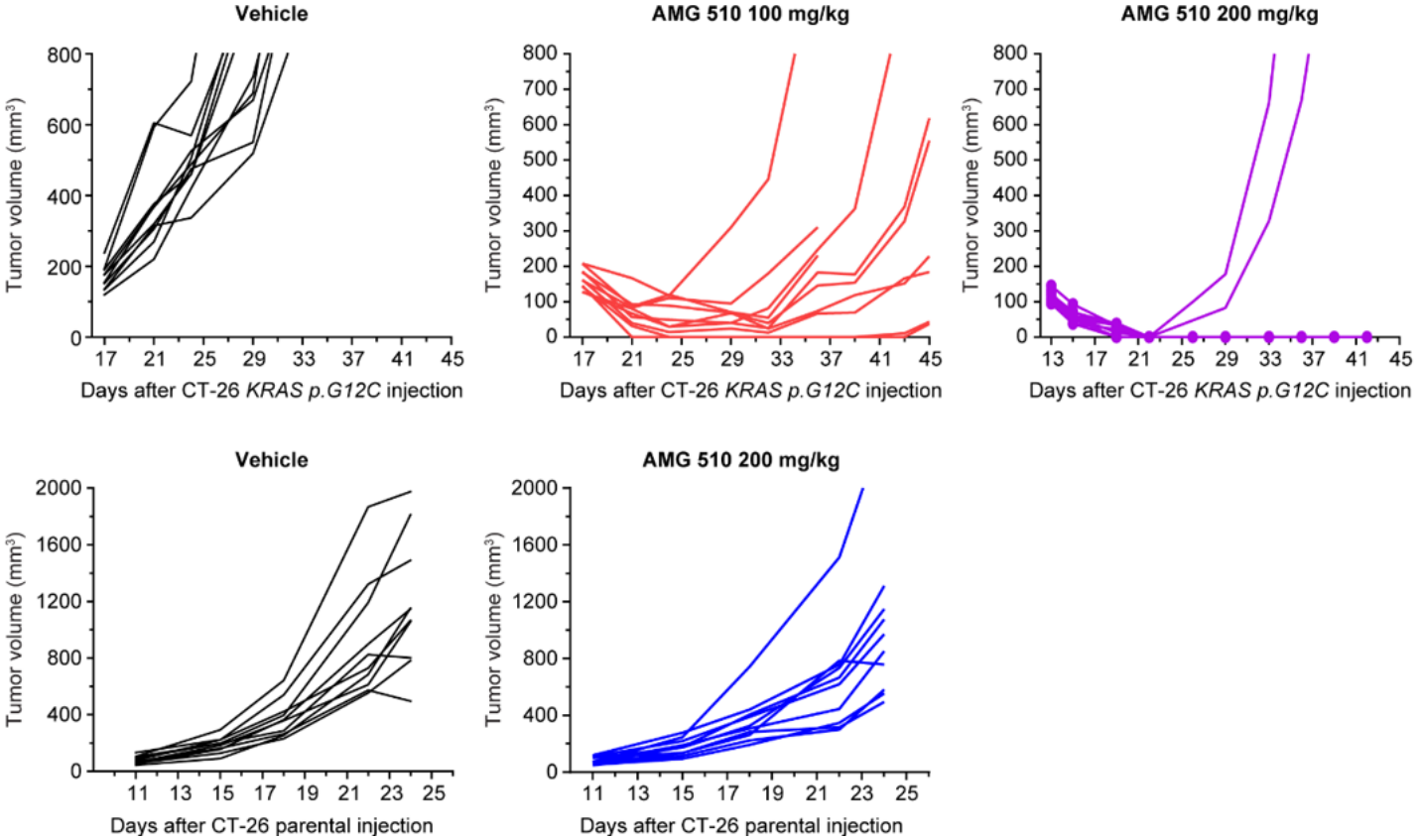
AMG 510 = sotorasib; ANOVA = analysis of variance; BQL = below quantifiable limit; CT-26 = murine colorectal tumor model; p-ERK = phosphorylated ERK 1/2; SEM = standard error of the mean

Panel A. CT-26 *KRAS p.G12C* tumors were collected on day 30 (2 hours post-dose) and snap frozen for p-ERK analysis (n = 3). Bars represent relative p-ERK (percent of control). **p < 0.01; ****p < 0.0001, one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc compared to vehicle.

Panel B. CT-26 *KRAS p.G12C* tumors were collected on day 22 (2 hours post-dose) and snap frozen for p-ERK analysis (n = 3). Bars represent relative p-ERK (percent of control). **p < 0.01, one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc compared to vehicle. Terminal plasma and tumor samples were assayed to quantify AMG 510; red triangles represent total plasma concentration, and black open circles represent total tumor concentration. All samples from the vehicle group were BQL and are not represented on the graph. Data represent mean ± SEM for each group.

Source: Studies R20180002 and R20190110

図 30　*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26腫瘍移植マウスモデルにおけるsotorasibの腫瘍抑制効果



AMG 510 = sotorasib; BALB/c = Bagg albino, immunodeficient inbred mouse strain; CT-26 = murine colorectal tumor model; PO = by mouth (oral gavage); QD = once per day; SEM = standard error of the mean

CT-26 *KRAS p.G12C* cells (top row) or CT-26 cells (bottom row) were injected subcutaneously in the right flank of female BALB/c mice. Animals were randomized based on tumor volume on day 11, 13, or 17. Animals were treated PO, QD with vehicle or AMG 510 at 100 or 200 mg/kg (n = 10). Tumor volume was measured twice per week, and data represent mean ± SEM for each group.

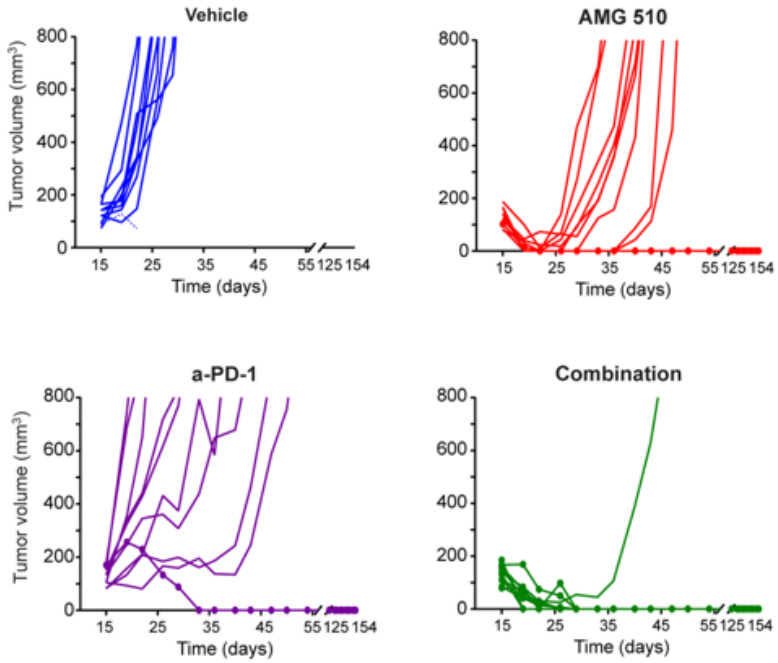
Source: Canon et al, 2019 and Study R20190128

2.4.3 sotorasibとチェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体との併用試験

免疫チェックポイントであるprogrammed cell death 1/programmed death ligand 1（PD-1/PD-L1）を阻害することは、癌の治療法として臨床的に検証されている。In vitroにおける炎症マーカーの誘導及びMHCクラスI抗原発現のアップレギュレーション、並びに*KRAS p. G12C*変異を有するCT-26細胞株を用いた同種移植モデルにおけるsotorasibの効果が長期間持続することから、sotorasib投与により抗腫瘍免疫応答が得られることが示されている（Canon et al, 2019）。

sotorasibと抗PD-1抗体の併用投与試験では、sotorasibの100 mg/kgを投与した。これは、sotorasibの単剤投与で腫瘍退縮作用を示すものの、マウス10例中わずか1例でのみ持続的な腫瘍退縮作用が認められた用量であった（図 31）。抗PD-1抗体の100 μgを単剤投与した場合、腫瘍増殖のわずかな遅延がみられたものの、試験終了時まで腫瘍が認められなかったマウスは10例中わずか1例であった（図 31）。併用投与の結果、10例中9例で完全寛解が得られた（図 31）。Day 43の投与中止時においても、完全寛解が得られた個体の全てで見かけ上腫瘍が消失し、試験終了時であるDay 112でも腫瘍の消失がみられた。生存を確認するための代替エンドポイント（腫瘍容積＞800 mm^3）を用いた場合、併用投与により有意な生存延長が認められた（図 32）。いずれの投与群でも、死亡又は体重の変化に基づくその他一般状態の変化はみられなかった（R20180034試験）。

図 31 *KRAS p.G12C*変異を有するCT-26腫瘍移植マウスモデルにおけるsotorasibとチェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体との併用効果

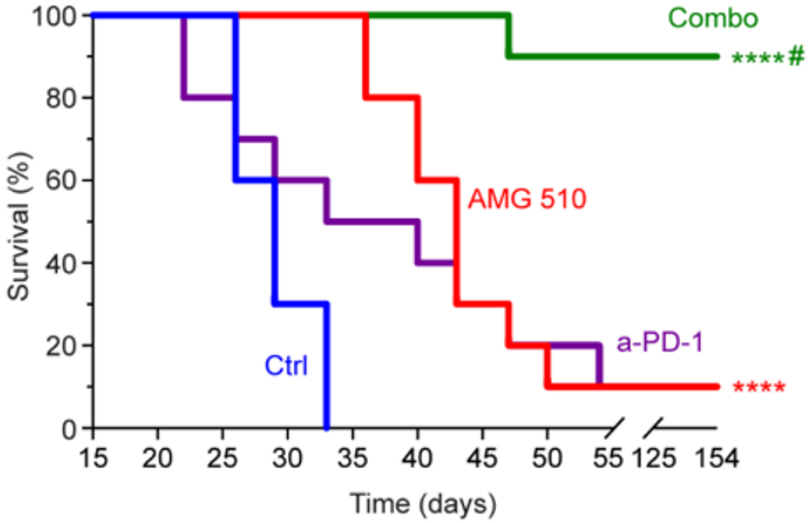


AMG 510 = sotorasib; a-PD-1 = anti-PD-1; PBS = phosphate-buffered saline; QD = once per day; Q3Dx3 = once every third day for a total of 3 injections

CT-26 *KRAS p.G12C* tumor growth in individual mice treated with either vehicle orally (QD) + PBS intraperitoneally (Q3D×3), AMG 510 orally (100 mg/kg QD) + PBS intraperitoneally (Q3D×3), vehicle orally (QD) + anti-PD-1 antibody intraperitoneally (100 μg/dose Q3D×3); AMG 510 orally (100 mg/kg QD) + anti-PD-1 antibody (100 μg/dose, Q3D×3) (n = 10/group) starting on day 15. Treatment was stopped on day 43. Lines with circles indicate tumor-free mice.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20180034

図 32　*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26腫瘍移植マウスモデルにおけるsotorasibとチェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体との併用による生存延長効果



AMG 510 = sotorasib; a-PD-1 = anti-PD-1 antibody; Ctrl = control; PD-1 = programmed cell death protein 1

Kaplan-Meier analysis of surrogate survival endpoint (tumor size > 800 mm^3).　Mantel-Cox log-rank test ****$p < 0.0001$ compared to control, #$p < 0.001$ compared to either AMG 510 or anti-PD-1 antibody alone.

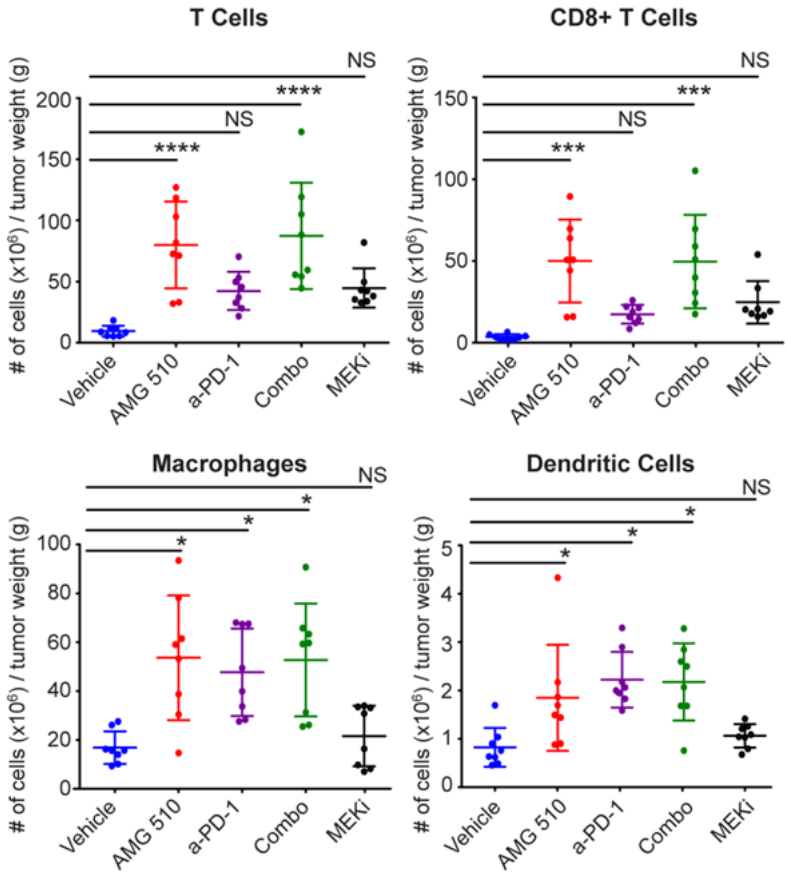
Source: Canon et al, 2019 and Study R20180034

2.4.4　sotorasibを用いた抗腫瘍免疫反応試験

sotorasibにより誘導される抗腫瘍免疫応答の機序の詳細について、*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26細胞株を移植した担癌マウスを用いて検討した。溶媒、MEKiの単剤投与、sotorasibの単剤投与、抗PD-1抗体の単剤投与、あるいはsotorasibと抗PD-1抗体の併用投与のいずれかの条件下で4日間処理した。腫瘍における免疫表現型をフローサイトメトリーにより同定し、免疫細胞組成について評価した（R20180035試験）。sotorasibの単剤投与により、腫瘍へのT細胞、主にCD8陽性T細胞の浸潤が有意に増加した（図 33）。この浸潤増加は、抗PD-1抗体の単剤投与でみられた作用よりも有意に強く、sotorasibと抗PD-1抗体の併用投与により維持された。対照薬剤として、追加でMEKiによる単剤投与を行ったところ、*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26細胞株を移植した担癌マウスモデルにおけるsotorasibの単独投与と同様のTGIが認められた（Canon et al, 2019）ものの、CD8陽性T細胞数の有意な浸潤増加はみられなかった（図 33）。

sotorasib処理により、T細胞のプライミングと活性化に重要でありT細胞動員に関与するCD103陽性交差提示樹状細胞を含む、マクロファージと樹状細胞の浸潤が有意に増加した（図 33、R20180035試験、Canon et al, 2019）。抗PD-1抗体の単剤投与及びsotorasibとの併用投与では、これらの細胞浸潤を同様に増強したが、MEKiの単剤投与では影響はみられなかった（図 33、R20180035試験、Canon et al, 2019）。

図 33 *KRAS p.G12C*変異を有するCT-26腫瘍同種移植モデルにおける sotorasibの炎症誘発性腫瘍微小環境誘導作用



AMG 510 = sotorasib; a-PD-1 = anti-PD-1; ANOVA = analysis of variance; MEK = mitogen-activated protein kinase kinase; MEKi = MEK inhibitor; PD-1 = programmed cell death protein 1; QD = once per day; SD = standard deviation

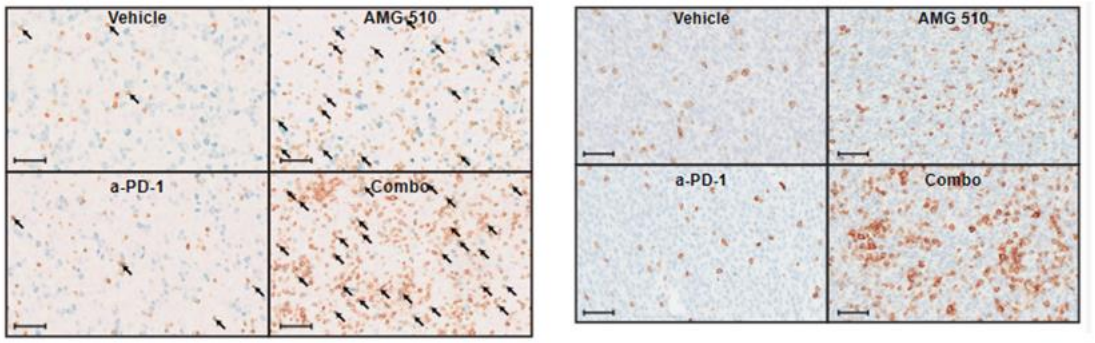
CT-26 *KRAS p.G12C* tumors from mice treated over four days with either vehicle QD, AMG 510 (100 mg/kg QD), anti-PD-1 (single intraperitoneal 100 µg dose), AMG 510 (100 mg/kg) combined with anti-PD-1 (single intraperitoneal 100 µg dose) or MEKi orally (10 mg/kg QD) were immunophenotyped by flow cytometry (n = 8). Data represent mean ± SD.

****p < 0.0001, ***p < 0.001, *p < 0.05, NS = not significant; one-way ANOVA followed by Tukey's.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20180035

併用投与試験では、sotorasib、抗PD-1抗体又は両薬剤を4日間併用投与したマウスから単離した腫瘍組織を用い、浸潤T細胞の免疫組織化学的解析を実施した（R20190105試験）。解析の結果、sotorasib投与による腫瘍内でのCD3陽性T細胞数及び増殖率の増加、並びにCD8陽性T細胞数の増加がみられ、抗PD-1抗体との併用投与によりさらに増加した（図 34）。

図 34　*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26腫瘍同種移植モデルにおける sotorasibの増殖性エフェクターT細胞の浸潤



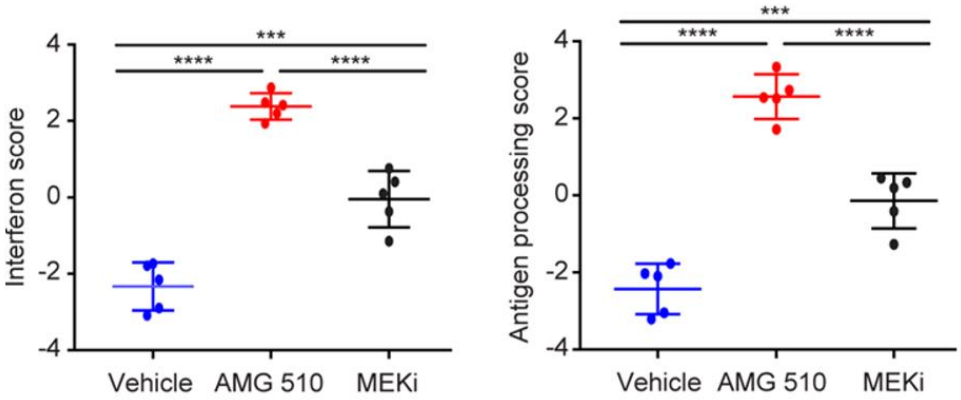
AMG 510 = sotorasib; a-PD-1 = anti-PD-1; CD3 = protein complex and T cell co-receptor involved in activating both the cytotoxic T cell and T helper cells; CD8 = transmembrane glycoprotein that serves as a co-receptor for the T-cell receptor; PBS = phosphate-buffered saline; PD-1 = programmed cell death protein 1; QD = once per day

Photomicrographs of anti-CD3 and anti-Ki67 dual-stained tissue sections (Panel A) and anti-CD8 (Panel B) immunohistochemically stained CT-26 *KRAS p.G12C* tumors from BALB/c mice treated for 4 days with either vehicle PO (QD) + PBS intraperitoneally (once); AMG 510 PO (100 mg/kg QD) + PBS intraperitoneally (once); vehicle PO (QD) + anti-PD-1 antibody intraperitoneally (100 μg/dose once); and AMG 510 PO (100 mg/kg QD) + anti-PD-1 antibody intraperitoneally (100 μg/dose once) starting on day 20. Tumor tissue was harvested on day 24. Ki-67 is shown in blue and has a nuclear localization; CD3 and CD8 stains are shown in brown and are cytoplasmic. Arrows highlight examples that are double positive for CD3 and Ki-67. Original objective = 10x; scale bars, 50 μm.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20190105

抗腫瘍性炎症及び免疫細胞機能に関与する遺伝子発現の変化を評価する目的で、sotorasibを2日間処理後、免疫関連遺伝子パネルの転写プロファイリング解析のため、腫瘍組織からRNAを単離し精製した。sotorasibは、炎症誘発性の微小環境の誘導を示唆する遺伝子の発現を誘導した。これらの変化には、インターフェロンのシグナル伝達、ケモカインの産生（*Cxcl11*を含む）、抗原プロセシング、細胞傷害性及びナチュラルキラー細胞の活性、並びに自然免疫系の刺激マーカーに関与する遺伝子の発現増加を含む（Canon et al, 2019）。sotorasib処理により確認された遺伝子発現の増強は、MEKiにより誘導された効果と比較して有意に強かった（図 35、R20180036試験）。In vitroにおいて、sotorasibがMHCクラスI抗原（図 27）及びケモカイン（図 28）の発現を誘導するとともに、これらの結果はsotorasib処理による腫瘍抗原及びケモカイン発現の増加、増殖性T細胞及び樹状細胞の浸潤誘導、並びに免疫監視機構の亢進との関連が示唆された。炎症を起こした腫瘍微小環境により、T細胞プライミングの増加、腫瘍抗原の認識及び長期間の抗腫瘍T細胞応答が誘導されるものと考えられた。

図 35　*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26腫瘍同種移植モデルにおけるsotorasibのインターフェロンのシグナル伝達及び抗原プロセシング関連遺伝子の発現



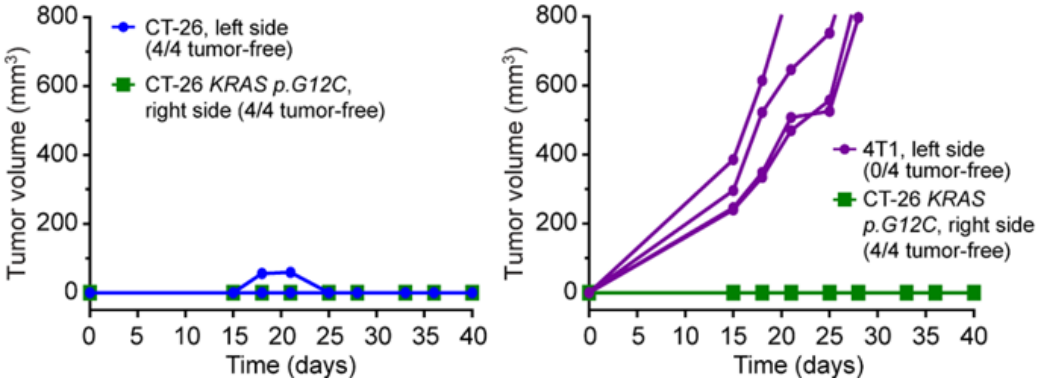
AMG 510 = sotorasib; ANOVA = analysis of variance; CT-26 = murine colorectal tumor model; MEK = mitogen-activated protein kinase kinase; MEKi = MEK inhibitor;　QD = once per day; RNA = ribonucleic acid

RNA was isolated from CT-26 *KRAS p.G12C* tumors from mice treated over two days, three total doses, with either vehicle, AMG 510 orally (100 mg/kg QD), or MEKi orally (10 mg/kg QD) (n = 5). RNA expression was scored using NanoString (n = 5). ****p < 0.0001, ***p < 0.001, one-way ANOVA multiple comparisons followed by Tukey's post hoc test. Results are expressed as individual measurements with mean bars; error bars represent standard deviation.

Source: Canon et al, 2019 and Study R20180036

sotorasibの投与により、腫瘍に対する免疫記憶が確立されるか検討する目的で、sotorasibと抗PD-1抗体（図 31）の併用投与により腫瘍が消失したマウスモデルを用い、*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26及びオリジナルのCT-26を両側性に移植、又は*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26細胞株及び非血縁マウスの乳癌由来4T1細胞株を両側性に移植した（Canon et al, 2019）すべての4T1細胞株において腫瘍細胞は定着したが（4例中4例）、*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26（8例中0例）及びオリジナルのCT-26（4例中0例）において腫瘍細胞の定着はみられなかった（図 36）。これらの結果は、sotorasibと抗PD 1抗体の併用により長期間に渡り腫瘍特異的T細胞応答の確立が促進されたことを示唆する。その後、これらのT細胞は、*KRAS*変異の有無にかかわらず、共通の抗原認識を通じてCT-26の定着を阻害した。したがって、異種性の*KRAS*アレルを発現する腫瘍においても、sotorasib処理により*KRAS p.G12C*を有する腫瘍細胞に対する免疫応答が発現し、同じ抗原を発現する腫瘍細胞を消失させる可能性が示された。

図 36　*KRAS p.G12C*及び*KRAS p.G12D*変異を有する腫瘍移植マウスモデルにおけるsotorasibと抗PD-1抗体併用投与による抗腫瘍免疫反応及び腫瘍拒絶反応



AMG 510 = sotorasib; 4T1 = tumor produced mimics an animal stage IV human breast cancer; CT-26 = murine colorectal tumor model; PD-1 = programmed cell death protein 1

Tumor growth in individual mice that were cured by combining AMG 510 with anti-PD-1 antibody treatment and were then rechallenged with CT-26 *KRAS p.G12C*, CT-26, or 4T1 cells.

Source: Canon et al, 2019

3.　副次的薬理試験

3.1　In vitroにおける一般的な選択性プロファイル

WTのKRASは正常ヒト組織に普遍的に発現しており、採取したすべての組織検体において中等度から非常に高いRNAの発現がみられた（125831試験）。sotorasibは、WTのKRASと比較してKRAS G12Cに対して高い選択性を示し（2.1項）、また、*KRAS p.G12C*変異は腫瘍組織でのみ認められ、正常組織では発現しない（Karnoub and Weinberg, 2008、AACR Project GENIE Consortium, 2017）。

sotorasibの一般的なオフターゲットに対する選択性について、受容体、酵素、イオンチャネル及びトランスポーターを含む種々の標的に対するin vitro放射性リガンド置換試験及び酵素活性アッセイにより評価した（124452試験、124453試験）。初期のパネルでは41種類の標的について評価し、後期のパネルでは105種類の標的について評価した。化合物への結合は、各標的に対する結合特性は、特異的な放射性標識リガンドの結合阻害率（%）として算出した。複合酵素阻害効果は、対照酵素活性の阻害率（%）として算出した。sotorasibは10 µMの濃度で、すべてのターゲットに対し対照活性の50%を超える阻害あるいは刺激活性を示さなかった。10 µmol/Lの濃度は、絶食下でsotorasibの960 mgをQD投与した20170543試験第I相部分パート2aでの、ヒトのC_{max}である7650 ng/mL（モジュール2.7.2 表2）におけるsotorasibの非結合型の濃度（約1.5 µM）と比較して約6.5倍高かった［1.5 µM=7650 ng/mL/560.61（sotorasibの分子量換算）× 0.112（ヒト血漿中のsotorasibの平均非結合型分率）、モジュール2.6.4 4項］。これらのin vitroにおける選択性プロファイル試験の結果、sotorasibはKRAS G12Cに対して高い選択性を有することが示唆された。

sotorasibについて、sotorasibと454種類のヒトキナーゼ［54種類の疾患関連変異体（例えば*ALK*、*BRAF* [*V600E*]、*EGFR*[*T790M*]、*ROS1*等）、126種類のチロシンキナーゼ及び22種類の脂質キナーゼを含む］、11種類のヒトキナーゼ変異体並びに3種類の病原体キナーゼとの相互作用を定量的に測定するため、活性部位特異的競合結合分析を用いたキナーゼスクリーニングパネル（KINOME scanMAX）により評価した（124787試験）。結合データは対照値に対する割合（%）として算出し、数字が小さいほど結合が強いことを示す。10 µMの濃度では、すべてのキナーゼに対する

sotorasibの結合性は対照値の＞35%であり、評価した468種類のヒトキナーゼのいずれとも強い相互作用はないことが示された。

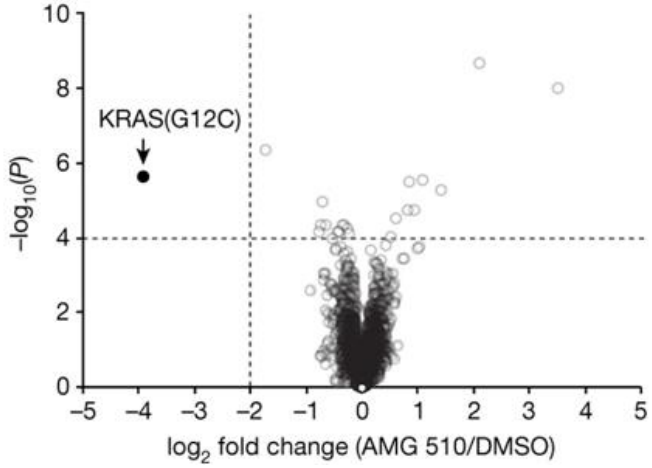
以上のことから、in vitroにおける選択性プロファイル試験の結果、sotorasibはKRAS G12Cに対して高い選択性を有することが示唆された。

ヒト血中での3種類の代謝物であるM24、M18及びM10のオフターゲットに対する選択性について、sotorasibと同様の方法で評価した（M24を評価した124807試験及び124808試験、M18及びM10を評価した153413試験及び153414試験）。また、M18及びM10について、sotorasibと同じキナーゼスクリーニングパネルで評価した（153415試験）。検討した受容体、酵素、イオンチャネル又はトランスポーターはいずれも、10 μMの濃度で50%を超える阻害あるいは刺激活性を示さなかったが、初期パネルでM24を評価した2つの受容体、すなわち、ニューロキニンNK1及びNK2受容体では、それぞれ61.0及び52.3%の阻害活性を示した（124807試験）。10 μMの濃度は、絶食下でsotorasibの960 mgをQD投与した20170543試験第I相部分パート2aでの、M24のヒトのC_{max}である1180 ng/mLにおけるM24の非結合型の濃度（約0.072 μM）と比較して、約138倍高かった（モジュール2.7.2）［0.072 μM=1180 ng/mL/424.4（M24の分子量換算）× 0.026（ヒト血漿中のM24の平均非結合型分率）、モジュール2.6.4 4項］。以上のことから、予定臨床用量の範囲では、代謝物であるM24とこれらのオフターゲット受容体との臨床的に重要な相互作用は予想されなかった。

3.2 In vitroにおける共有結合選択性プロファイル

sotorasibとKRAS G12C及び細胞内の他のオフターゲットであるシステイン含有タンパクとの共有結合による相互作用について検討する目的で、質量分析によるシステイン-プロテオームプロファイリング試験を実施した（R20150219試験、Patricelli et al, 2016）。NCI-H358細胞株を用い、sotorasibの1 μM又はDMSOで4時間処理したところ、KRAS G12Cシグナル伝達活性は処理2時間後に完全に阻害された（図 4、R20150199試験）。sotorasibの反応性について、6451種類の同定されたユニークなシステイン含有ペプチドを用いてプロファイリングした。Cys 12ペプチドは、KRAS G12Cにおいてsotorasibが共有結合を形成する標的として基準を満たす、同定された唯一のペプチドであった（図37、R20150219試験）。これらの結果から、sotorasibが細胞内のKRAS G12Cを完全に阻害する濃度において、KRAS G12Cに対して高い選択性を有することが示唆された。

図 37　NCI-H358におけるsotorasibのシステインプロテオームプロファイリングによるKRAS G12C由来システイン12ペプチドの同定



AMG 510 = sotorasib; Cys12 = cysteine at amino acid position 12; DMSO = dimethyl sulfoxide; KRAS(G12C) = KRAS protein with a glycine to cysteine amino acid substitution at position 12; NCI-H358 = human lung cancer cell line

NCI-H358 cells were treated with 1 μM AMG 510 or DMSO for 4 hours. Samples were processed for cysteine-proteome profiling by mass spectrometry. 6451 unique cysteine-containing peptides were identified. One peptide comprising Cys12 of KRAS G12C was significantly engaged by AMG 510. Peptides which displayed a $\log_2$ fold decrease in abundance greater than 2 and a p-value less than 0.0001 were identified as covalent targets of AMG 510 (n = 5 biological replicates).

Source: Canon et al, 2019 and Study R20150219

4.　安全性薬理試験

sotorasibは野生型KRASよりもKRAS G12Cに対して高い選択性を示す。*KRAS p.G12C*遺伝子変異は腫瘍組織でのみ認められ、正常組織ではみられていない（Barbacid, 1987、Karnoub and Weinberg, 2008、AACR Project GENIE Consortium, 2017、Román et al, 2018）。多数の様々な受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び様々なキナーゼを含む酵素を含む広範なオフターゲットに対するスクリーニング試験では、臨床的に重要なオフターゲット作用は認められなかった（3.1項及び3.2項）。したがって、中枢神経系及び呼吸系に対する影響について、特に懸念すべき点は認められなかった。

以上のことから、ICH S9に基づき中枢神経系及び呼吸系を対象とした独立した動物を用いた安全性薬理試験は実施しなかったが、GLP適用下で実施したイヌを用いた28日間及び3カ月間反復投与毒性試験（モジュール2.6.6 3.6項、モジュール2.6.6 3.7項）の試験パラメータにおいて、詳細な一般状態観察及び心電図検査を含めた。また、イヌを用いた3カ月間反復投与試験において、呼吸数についても測定した。これらの試験の結果、sotorasibの中枢神経系又は呼吸系への影響を示唆する変化は認められなかった。

4.1　In vitro試験

In vitroにおけるhERGカリウムチャネルに対するsotorasibの作用について、GLP条件下で試験を実施して検討した。sotorasibはhERG電流を阻害し、IC_{50}は54.8 μMであった。IC_{50}である54.8 μMは、絶食下でsotorasibの960 mgをQD投与した20170543試験第I相部分パート2aでの、ヒトC_{max}である7650 ng/mLにおけるsotorasibの非結合型の濃度（約1.5 μM）と比較して約36倍高かった（モジュール2.7.2）。したがって、臨床予定用量の範囲では、hERGチャネルとの臨床的に重要な相互作用は予想

されなかった。これは、イヌを用いた単回及び反復投与試験において、sotorasibの300 mg/kgまでQT間隔に影響が認められなかったことと一致していた（150458試験、150429試験）。

3種類の代謝物であるM24、M18及びM10のhERGチャネルに対する影響について、in vitroで評価した（124803試験：M24を用いた機能試験、153419試験：M18及びM10を用いた結合試験）。IC_{50}は、検討した最高濃度（M24で30 μM、M18及びM10で29.9 μM）よりも高かったことから、sotorasibと同様に臨床的に重要な相互作用は予想されなかった。

4.2 In vivo試験

4.2.1 テレメトリーを装着した雄のビーグル犬にsotorasibを単回経口投与したときの覚醒時における心血管系に対する安全性薬理試験

GLP条件下で実施した本試験では、テレメトリーを装着した雄のビーグル犬8例を用い、sotorasibを0、30、100及び300 mg/kgで経口投与したときの心血管系に対する影響について評価した（150458試験）。sotorasibは、2%（w/v）ヒドロキシプロピルメチルセルロース及び1%（w/v）Tween® 80を含む逆浸透脱イオン水で調製し、試験1、4、8及び11日目に投与した。テレメトリーデータを投与1時間以上前から投与25時間後まで、連続的に収集した。sotorasibは、300 mg/kgまでの用量で心電図に対する質的な影響を示さず、PR間隔、QRS間隔、QT間隔、補正QT間隔、心拍数、動脈圧、左室拡張終期圧、dP/dt_{max}又は体温に対し量的な変化も示さなかった。心血管系の機能に対する無作用量は、検討した最高用量である300 mg/kgであり、この時の曝露量は、イヌを用いた28日間反復投与毒性試験（150429試験）においてsotorasibの300 mg/kgを投与した時の投与1日目における曝露量に相当する（C_{max}：3.31 μg/mL、AUC：13.1 μg·h/mL）。

本試験で心血管系パラメータに対し急性変化が認められなかったことは、イヌを用いた28日間反復投与毒性試験（150429試験）においてsotorasibの30、100又は300 mg/kgをPO投与した3日目又は26日目においてECGパラメータに影響がみられなかった結果と一致していた。（モジュール2.6.6 3.6項）。

5. 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施していない。

6. 考察及び結論

sotorasibは、KRAS G12Cタンパクの強力かつ選択的な共有結合型の阻害薬であり、KRAS G12C変異を有する進行固形癌患者の治療に対する開発を進めている。sotorasibは、KRAS G12CのP2ポケットにおいて、H95に存在する溝構造との相互作用及びシステイン12との共有結合を介して不可逆的に結合する。sotorasibが結合すると、KRAS G12Cは不活性なGDP結合型立体配座に固定され、GTPの付加が回避される。これにより、RAFなどの下流にあるエフェクターとの相互作用が阻害され、p-ERKが阻害される。生化学的アッセイでは、sotorasibは遺伝子組換えKRAS G12Cの活性化を強力に阻害したが、WTのKRASの活性化は阻害しなかった。また、sotorasibは*KRAS p.G12C*変異を有す

る細胞株中1細胞株を除き強力に阻害したが、*KRAS p.G12C*変異を持たない細胞株には影響しなかった。これらの結果から、sotorasibは*KRAS p.G12C*変異にのみ効力を有することを示す。

In vivoにおいて、sotorasibはKRAS G12Cを共有結合的に修飾し、3 mg/kgの低用量でヒト腫瘍異種移植モデルにおけるp-ERKを有意に阻害した。sotorasibの阻害作用は単回投与後約2時間で最大となり、少なくとも48時間持続した。sotorasibは3 mg/kgの低用量でも腫瘍増殖を有意に阻害し、100 mg/kgでは最大62%の腫瘍退縮作用を示した。sotorasibは、*KRAS p.G12C*変異を有さない細胞株を用いた腫瘍モデルに対し作用を示さず、また、いずれの試験においても体重への影響は認められなかった。*KRAS p.G12C*変異を有する結腸直腸癌患者由来異種移植（PDX）モデルにおいて、sotorasibは用量に依存してp-ERKと腫瘍増殖を阻害し、100 mg/kgで46%の腫瘍退縮作用を示した。これらの試験結果は、sotorasibが*KRAS p.G12C*変異腫瘍に対し、単剤投与において効果を有する可能性を示唆している。

In vitro併用試験では、sotorasibは複数の*KRAS p.G12C*変異を有する細胞株において、RASの上流及び下流でのMAPK経路のノード阻害剤及びAKT経路の阻害剤との併用で効果の増強を示した。
In vivoにおいて、sotorasibとEGFR/pan-ErbB、SHP-2又はMEK阻害剤との併用、及びカルボプラチンによる化学療法との併用でも、抗腫瘍活性の有意な増強が認められた。*KRAS p.G12C*変異を発現させたマウス結腸直腸癌細胞株であるCT-26において、sotorasib処理によりin vitroでp-ERK及び生存を阻害し、MHCクラスI抗原と炎症性サイトカインの発現も増強した。sotorasibの投与により、80%の動物で*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26腫瘍の永続的かつ完全な腫瘍退縮作用が認められた。
sotorasibと抗PD-1阻害剤の併用は、sotorasibの至適用量以下で抗腫瘍活性を有意に増強した。作用機序に関する検討から、sotorasibの投与は、腫瘍における炎症性サイトカインの産生及びMHCクラスI発現を増強することにより、炎症性の腫瘍微小環境を誘導し、その結果、増殖エフェクターT細胞、樹状細胞及びマクロファージを含む抗腫瘍免疫細胞サブセットの浸潤を誘導することが明らかになった。再移植試験では、*KRAS*変異の有無にかかわらず、治癒したマウスにCT-26に対する抗腫瘍免疫応答が認められた。これらの結果は、sotorasibが抗腫瘍炎症及び免疫を誘導すること、また、PD-1シグナル伝達を遮断する薬剤との併用で特に有効である可能性を示唆している。

In vitroにおけるsotorasibの一般的な選択性について、受容体、酵素、イオンチャネル及びトランスポーターを含む様々な標的を用いて評価した結果、sotorasibは、KRAS G12Cに対して高い選択性を有することが示唆された。NCI-H358細胞株を用いたシステインプロテオームプロファイリングの結果、sotorasibがKRAS G12C由来のCys12含有ペプチドのみに関与することが示された。sotorasibの心血管系への影響は認められず、sotorasibのhERGに対するIC_{50}は54.8 μMであった。予定している臨床用量の範囲では、hERGチャネルとの臨床的に重要な相互作用は予想されなかった。In vivoでは、GLP条件下で実施したテレメトリー装着イヌを用いた心血管系に対する安全性薬理試験において、sotorasibを300 mg/kgの用量まで投与しても、定性的及び定量的心電図又は血行動態パラメータに変化はみられなかった。同様に、イヌを用いた28日間反復投与毒性試験においても、心電図パラメータに対する影響は認められなかった。

ヒト血中代謝物であるM24、M10及びM18の潜在的な効力を裏付ける又は副次的薬理作用及びin vitro hERGカリウムチャネルに対する作用について評価した。3種類の代謝物中、M18はsotorasibと同じ共有結合部位を持っていたが、M24とM10は共有結合部位を持っていなかった。M18のみが

効力を維持していたが、sotorasibと比較した場合、その作用は著しく弱く、これら3種類の代謝物の副次的薬理試験では、臨床的に意味のある、又は重要なオフターゲットに対する薬理活性は認められなかった。これらの代謝物を用いたin vitro hERG試験では、臨床的に問題となる又は重大な相互作用はみられなかった。

7. 参考文献

AACR Project GENIE Consortium. AACR project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discovery*. 2017;7:818-831.

Addeo A, Banna GL and Friedlaender A. KRAS G12C Mutations in NSCLC: From Target to Resistance. *Cancers*. 2021;13:2541.

Barbacid M. Ras genes. *Annual Review of Biochemistry*. 1987;56:779-827.

Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*. 2019;575:217-223..

Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982;79:4848-4852.

Cully M, Downward J. SnapShot: Ras Signaling. *Cell*. 2008;133:1292-1292.e1291.

Ebert PJ, Cheung J, Yang Y, McNamara E, Hong R, Moskalenko M, et al. MAP kinase inhibition promotes T cell and anti-tumor activity in combination with PD-L1 checkpoint blockade. *Immunity*. 2016;44:609-621.

Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, Weiss RA. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature*. 1983;303:396-400.

Harvey JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature*. 1964;204:1104-1105.

Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*. 2016;129:1287-1292.

ICH Harmonized Tripartite Guideline S9: Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals. 2009.

Janes MR, Zhang J, Li LS, Hansen R, Peters U, Guo X, et al. Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell*. 2018;172:578-589.

Jousma E, Rizvi TA, Wu J, Janhofer D, Dombi E, Dunn RS, et al. Preclinical assessments of the MEK inhibitor PD‐0325901 in a mouse model of Neurofibromatosis type 1. *Pediatric blood & cancer*. 2015;62:1709-1716.

Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9:517–531.

Kirsten WH, Mayer LA. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *Journal of the National Cancer Institute*. 1967;39:311-335.

Li S, Liu S, Deng J, Akbay EA, Hai J, Ambrogio C, et al. Assessing Therapeutic Efficacy of MEK Inhibition in a KRASG12C-Driven Mouse Model of Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2018;24:4854-4864.

Mcdonald ER, 3rd, De Weck A, Schlabach MR, Billy E, Mavrakis KJ, Hoffman GR, et al. Project DRIVE: A Compendium of Cancer Dependencies and Synthetic Lethal Relationships Uncovered by Large-Scale, Deep RNAi Screening. *Cell*. 2017;170:577-592.

Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brünger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, et al. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*. 1990;247:939-945.

Miyahisa I, Sameshima T, Hixon MS. Rapid Determination of the Specificity Constant of Irreversible Inhibitors (kinact/KI) by Means of an Endpoint Competition Assay. *Angewandte Chemie*. 2015;127:14305-14308.

Muñoz-Maldonado C, Zimmer Y and Medová M. A Comparative Analysis of Individual RAS Mutations in Cancer Biology. *Front Oncol*. 2019;9: 1088.

Newlaczyl AU, Coulson JM and Prior IA. Quantification of spatiotemporal patterns of Ras isoform expression during development. *Sci Rep*. 2017;7:41297.

Nichols RJ, Haderk F, Stahlhut C, Schulze CJ, Hemmati G, Wildes D, et al. RAS nucleotide cycling underlies the SHP2 phosphatase dependence of mutant BRAF-, NF1-and RAS-driven cancers. *Nature cell biology*. 2018;20:1064-1073.

Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*. 2013;503:548-551.

Ostrem JM, Shokat KM. Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;15:771-785.

Pai EF, Kabsch W, Krengel U, Holmes KC, John J, Wittinghofer A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature*. 1989;341:209-214.

Patricelli MP, Janes MR, Li LS, Hansen R, Peters U, Kessler LV, et al. Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State. *Cancer Discov*. 2016;6:316-329.

Prior IA, Lewis PD and Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2012;72:2457-2467.

Román M, Baraibar I, López I, Nadal E, Rolfo C, Vicen S, et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Mol Cancer*. 2018; 17: 33.

Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*. 1997;277:333-338.

Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*. 2017;170:17-33.

Temko D, Tomlinson IPM, Severini S, Schuster-Böckler B and Graham BA. The effects of mutational processes and selection on driver mutations across cancer types. *Nature Com*. 2018;9:1857.

Thein K, Banks K, Saam J, Raymond VM, Roszik J, Meric-Bernstam F, et al. The prevalence of $KRAS^{G12C}$ mutations utilizing circulating tumor DNA (ctDNA) in 80,911 patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2020;38: Issue15 suppl. 3547.

Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell*. 1983;34:581-586.

Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001;294:1299-1304.

表 1　薬理試験一覧表

被験物質：sotorasib

Type of Study	Study Title (Study Number)	Study Objective	Test System	Method/Route of Administration
Primary Pharmacodynamics, in vitro	Biochemical Characterization of AMG 510 and Metabolites in KRAS G12C/C118A and KRAS C118A Nucleotide Exchange Assays (R20150198)	Determine the potency of AMG 510 as an inhibitor of the SOS1-catalyzed nucleotide exchange activity of mutant KRAS G12C/C118A or "wildtype" KRAS C118A, as well as the potency of its dione metabolite 3368167	KRAS G12C/C118A or KRAS C118A proteins	in vitro
Primary Pharmacodynamics, in vitro	Cellular Characterization of AMG 510 (R20150199)	1) To profile AMG 510 across a panel of human tumor cell lines bearing the *KRAS. pG12C* mutation, other *KRAS* mutants (non-*p.G12C*), and cell lines with mutations in genes other than *KRAS*, for its effects on ERK1/2 phosphorylation and cell viability 2) Determine the rate constant of covalent bond formation (k_{inact}) and the non-covalent binding affinity (K_i) of AMG 510 with KRAS G12C	MIA PaCa-2 cells	in vitro
Primary Pharmacodynamics, in vitro	Effects of AMG 510 on KRAS Signaling in NCI-H358 and MIA PaCa-2 Cells In Vitro (R20190078)	To examine the effects of AMG 510 on MAPK and PI3K pathway signaling in NCI-H358 and MIA PaCa-2, testing various concentrations of AMG 510 for varying treatment durations	Human non-small cell lung carcinoma (NCI-H358) and human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2)	in vitro

Footnotes are on the last page of the table

表 1　薬理試験一覧表（続き）

被験物質：sotorasib

Type of Study	Study Title (Study Number)	Study Objective	Test System	Method/Route of Administration
Primary Pharmacodynamics, in vitro	In Vitro Combination Effects of AMG 510 with MAPK Pathway, PI3K Pathway, and Other Targeted Inhibitors (153894)	To examine the possible synergistic effects on cell viability in several *KRAS p.G12C* cell lines in vitro using combinations of AMG 510 with inhibitors of HER kinases, SHP2, MEK, SOS1, PI3K, and mTOR; as well as combinations of AMG 510 with palbociclib	CT-26 *KRAS p.G12C*; MIA PaCa-2; NCI-H1373; NCI-H2030; NCI-H2122; NCI-H23; NCI-H358; SW1573	in vitro
Primary Pharmacodynamics, in vivo	AMG 510 Inhibits Phospho-ERK1/2 Signaling in *KRAS p.G12C* Pancreatic MIA PaCa-2 T2 Tumors in Female Athymic Nude Mice (R20150188)	Determine if treatment with the KRAS G12C inhibitor, AMG 510, would covalently modify KRAS G12C and inhibit phospho-ERK1/2 in MIA PaCa-2 T2 pancreatic xenografts grown in athymic nude mice	Female athymic nude mice	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	AMG 510 Inhibits ERK1/2 Phosphorylation Signaling and Results in Covalent Occupancy of KRAS G12C in *KRAS p.G12C* NSCLC NCI-H358 Tumors in Female Athymic Nude Mice (R20190129)	Evaluate AMG 510 in 30% Captisol pH 2.2 formulation and determine the dose for suboptimal inhibition of phospho-ERK signaling in human NSCLC NCI-H358 xenograft model	Female athymic nude mice bearing NCI-H358 tumor cells	Oral gavage

Footnotes are on the last page of the table

表 1　薬理試験一覧表（続き）

被験物質：sotorasib

Type of Study	Study Title (Study Number)	Study Objective	Test System	Method/Route of Administration
Primary Pharmacodynamics, in vivo	Effect of AMG 510 on Phospho-ERK1/2 Signaling at Early Timepoints (0.25 to 2 hours) in *KRAS p.G12C* Pancreatic MIA PaCa-2 T2 Tumors in Female Athymic Nude Mice (R20150192)	1) Determine the effect of AMG 510 on phospho-ERK1/2 signaling and KRAS G12C occupancy at early timepoints (0.25 to 2 hours) 2) To understand the relationship between the concentration of AMG 510 in plasma and tumor tissue and the inhibition of phospho-ERK1/2	Female athymic nude mice bearing MIA PaCA-2 T2 tumor cells	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of Once-daily Dosing of AMG 510 on Tumor Growth in the *KRAS p.G12C* Pancreatic MIA PaCa-2 T2 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice (R20150189)	Determine if treatment with the KRAS G12C inhibitor, AMG 510, would inhibit the growth of *KRAS p.G12C* MIA PaCa-2 T2 human pancreatic tumor xenografts in immunocompromised mice	Female athymic nude mice	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of Once-daily Dosing of AMG 510 on Tumor Growth in the *KRAS p.G12C* NSCLC H358 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice (R20150190)	Determine if treatment with AMG 510 inhibits tumor growth in *KRAS p.G12C* NCI-H358 human NSCLC tumor xenografts in immunocompromised mice	Female athymic nude mice	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of Once-dailing Dosing of AMG 510 on Tumor Growth in the *KRAS p.G12V* Colorectal Carcinoma SW480-1AC Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice (R20150191)	Determine if treatment with $KRAS^{G12C}$ inhibitor, AMG 510, would inhibit tumor growth in the *KRAS p.G12V* SW480-1AC tumor xenografts in immunocompromised mice	Female athymic nude mice	Oral gavage

Footnotes are on the last page of the table

表 1　薬理試験一覧表（続き）

被験物質：sotorasib

Type of Study	Study Title (Study Number)	Study Objective	Test System	Method/Route of Administration
Primary Pharmacodynamics, in vivo	AMG 510 Inhibited ERK 1/2 Phosphorylation in a Time and Dose Dependent Manner in Human KRAS *p.G12C* CRC Patient-derived Xenograft Tumors in Female NOD/SCID IL2rg (NSG) Mice (R20190130)	Evaluate dose response and time course for 100 mg/kg PKPD study using AMG 510 in human *KRAS p.G12C* CRC PDX tumors	Female NOD/SCID IL2rg mice bearing *KRAS p.G12C* CRC PDX tumor cells	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	Once Daily Dosing of AMG 510 Inhibited Tumor Growth in a Human *KRAS p.G12C* CRC Patient-dervied Xenograft Model in Female NSG Mice (R20190131)	Determine if treatment with AMG 510 would inhibit the growth of human *KRAS p.G12C* CRC PDX tumors in immune compromised NOD/SCID IL2rg mice	Female NOD/SCID IL2rg mice bearing *KRAS p.G12C* CRC PDX tumor cells	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of AMG 510 in Combination with MEK Inhibitor 1009089 (PD-0325901) in the *KRAS p.G12C* NSCLC H358 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice (R20180033)	Evaluate the anti-tumor effect of AMG 510 and MEK inhibitor PD-0325901 treatment in the *KRAS p.G12C* NCI-H358 human NSCLC xenograft model	Female athymic nude mice bearing NCI-H358 tumor cells	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	Effect of AMG 510 in Combination with Afatinib on Tumor Growth in the *KRAS p.G12C* NSCLC NCI-H358 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice (153358)	Evaluate the anti-tumor effect of AMG 510 in combination with afatinib in the *KRAS p.G12C* NCI-H358 human NSCLC xenograft model	Female athymic nude mice bearing *KRAS p.G12C* NCI-H358 tumor cells	Oral gavage

Footnotes are on the last page of the table

表 1　薬理試験一覧表（続き）

被験物質：sotorasib

Type of Study	Study Title (Study Number)	Study Objective	Test System	Method/Route of Administration
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of AMG 510 in Combination with RMC-4550 (SHP2i), on Tumor Growth in the *KRAS p.G12C* NSCLC NCI-H358 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice (153397)	Evaluate the anti-tumor effect of AMG 510 in combination with the SHP2i, RMC-4550, in the *KRAS p.G12C* NCI-H358 human NSCLC xenograft model	Female athymic nude mice bearing *KRAS p.G12C* NCI-H358 tumor cells	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of AMG 510 in Combination with Carboplatin on Tumor Growth in the *KRAS p.G12C* NSCLC H358 Xenograft Model in Female Athymic Nude Mice (R20180032)	Evaluate the anti-tumor effect of AMG 510 in combination with carboplatin in the *KRAS p.G12C* NCI-H358 human NSCLC xenograft model	Female athymic nude mice bearing NCI-H358 tumor cells	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	AMG 510 Inhibits ERK1/2 Phosphorylation in Murine Colorectal CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Tumors in Female BALB/c Mice (R20180002)	Determine if treatment with AMG 510 inhibits ERK1/2 phosphorylation in murine colorectal CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 tumors in BALB/c mice	Female BALB/c mice bearing CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 tumor cells	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	AMG 510 Inhibits ERK1/2 Phosphorylation in Murine Colorectal CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Tumors in Female BALB/c Mice (R20190110)	Determine if treatment with AMG 510 inhibits ERK1/2 phosphorylation when dosed at 200 mg/kg or twice daily for one day at 100 mg/kg in murine colorectal CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 tumors in BALB/c mice	Female BALB/c mice bearing CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 tumor cells	Oral gavage

Footnotes are on the last page of the table

表 1　薬理試験一覧表（続き）

被験物質：sotorasib

Type of Study	Study Title (Study Number)	Study Objective	Test System	Method/Route of Administration
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of Once-daily Dosing of AMG 510 on Tumor Growth in the Parental CT-26 *KRAS p.G12D* Colorectal Carcinoma Syngeneic Model in Female BALB/c Mice (R20190128)	Evaluate if AMG 510 treatment inhibits tumor growth in parental CT-26 syngeneic model	Female BALB/c mice bearing murine colorectal non-KRAS G12C model (CT-26) tumor cells	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of AMG 510 in Combination with anti-PD-1 antibody on Tumor Growth in the Murine Colorectal CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Syngeneic Model in Female BALB/c Mice (R20180034)	1) Evaluate the anti-tumor effect of AMG 510 in combination with anti-PD-1 in murine colon carcinoma CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 tumor model 2) Determine if durable cures persist upon rechallenge in mice bearing bilateral tumors, CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 and CT26 or *KRAS p.G12C*-H10 and 4T1 tumors	Female BALB/c mice bearing CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 tumor cells	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of AMG 510 on Tumor Infiltrating Lymphocytes in CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Colorectal Tumors in Female BALB/c Mice (R20180035)	Determine if AMG 510 treament affects local tumor microenviroment of murine colon carcinoma CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 tumors	Female BALB/c mice bearing CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 tumor cells	Oral gavage

Footnotes are on the last page of the table

表 1　薬理試験一覧表（続き）

被験物質：sotorasib

Type of Study	Study Title (Study Number)	Study Objective	Test System	Method/Route of Administration
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of AMG 510 and/or Anti-PD-1 on CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Colorectal Tumors by Immunohistochemistry (IHC) in the Female BALB/c Mouse (R20190105)	Determine the effects of AMG 510 and/or an anti-PD-1 antibody on murine colon carcinoma CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 syngeneic tumors in the immune competent female BALB/c mouse	Female BALB/c mice bearing CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 tumor cells	Oral gavage
Primary Pharmacodynamics, in vivo	The Effect of AMG 510 on Gene Expression and T-Cell Priming in CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 Colorectal Tumors in Female BALB/c Mice (R20180036)	1) Determine effect of AMG 510 on gene expression in CT-26 *KRAS p.G12C-H*10 tumors 2) Determine effect of AMG 510 treatment on T-cell priming in tumor-bearing mice	Female BALB/c mice bearing CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 tumor cells	Oral gavage
Secondary Pharmacodynamics	mRNA Expression Assessment of *KRAS* (125831)	Evaluate the mRNA expression of the proto-oncogene *KRAS*	Tissues and cell types from human, cynomolgus monkey, dog, mouse, and rat	In Vitro
Secondary Pharmacodynamics	In Vitro Pharmacology Study of 3365648 and 3365626 – Early Panel (124452)[a]	Test 3365648 (AMG 510) and 3365626 in binding assays.	Antagonist and agonist radioligand panel	In Vitro

Footnotes are on the last page of the table

表 1　薬理試験一覧表（続き）

被験物質：sotorasib

Type of Study	Study Title (Study Number)	Study Objective	Test System	Method/Route of Administration
Secondary Pharmacodynamics	In Vitro Pharmacology Late Panel Study of 3365648 and 3365626 (124453)[a]	Test 3365648 (AMG 510) and 3365626 in binding and enzyme and uptake assays.	Binding assays: antagonist and agonist radioligand panel Enzyme and uptake assays: enzyme panel	In Vitro
Secondary Pharmacodynamics	In Vitro Kinase Screening Panel Study of 3365648#1 (124787)	Test 3365648#1 (AMG 510) in the KINOMEscan screening platform; an active site-direct competition binding assay that quantitatively measures interactions between test compounds, human kinases, and disease-relevant mutant variants	KINOMEscan screening platform	In Vitro
Secondary Pharmacodynamics	In Vitro Pharmacology Study of 3368167 Early Panel (124807)	Test 3368167, a metabolite of AMG 510, in binding assays	Antagonist and agonist radioligand panel	In Vitro
Secondary Pharmacodynamics	In Vitro Pharmacology Study of 3368167 Late Panel (124808)	Test 3368167, a metabolite of AMG 510, in binding and enzyme and uptake assays	Binding assays: antagonist and agonist radioligand panel. Enzyme and uptake assays: enzyme panel	In Vitro

Footnotes are on the last page of the table

表 1　薬理試験一覧表（続き）

被験物質：sotorasib

Type of Study	Study Title (Study Number)	Study Objective	Test System	Method/Route of Administration
Secondary Pharmacodynamics	In Vitro Pharmacology New Early Panel Study of 3375854 and 3413829 [b] (153413)	Test metabolites M10 and M18 in binding assays, enzyme inhibition, cellular agonist/antogonist	Binding, enzyme and uptake and cellular and nuclear receptor functional assays	In Vitro
Secondary Pharmacodynamics	In Vitro Pharmacology New Late Panel Study of 3375854 and 3413829[b] (153414)	Test metabolites M10 and M18 in binding and enzyme and uptake assays	Binding, cellular and nuclear receptor functional and enzyme and uptake and ion channel assays	In Vitro
Secondary Pharmacodynamics	In Vitro Kinase Screening Panel Study of 3375854#1 and 3413829#1 [b] (153415)	Test 3375854#1 (M10) and 3413829#1 (M18) in the KINOMEscan screening platform; an active site-direct competition binding assay that quantitatively measures interactions between test compounds, human kinases, and disease-relevant mutant variants	KINOMEscan screening platform	In Vitro
Secondary Pharmacodynamics	Cysteine Proteome Profiling of AMG 510 in NCI-H358 (R20150219)	Determine the covalent interaction of AMG 510 with KRAS G12C and with any other “off-target” cysteine-containing proteins in NCI-H358 cells by mass spectrometry	Human non-small cell lung cancer NCI-H358 cells	In Vitro

Footnotes are on the last page of the table

表 1　薬理試験一覧表（続き）

被験物質：sotorasib

Type of Study	Study Title (Study Number)	Study Objective	Test System	Method/Route of Administration
Safety Pharmacology	Effect of AMG 510 on Cloned hERG Potassium Channels Expressed in Human Embryonic Kidney Cells (150431)	Examine the in vitro effects of AMG 510 on the hERG channel current (a surrogate for I_{Kr}) at near-physiological temperature.	Human embryonic kidney cells	In Vitro
Safety Pharmacology	AMG 510: Single-dose Oral Gavage Cardivascular Safety Pharmacology Evaluation in Male Telemetry-instrumented Conscious Dogs (150458)	Evaluate the potential cardiovascular effects of AMG 510 in male telemetry-instrumented beagle dogs	Male beagle dogs	Oral gavage in a double Latin square dosing design
Safety Pharmacology	AMG3368167: Acute In Vitro Effect on hERG Recorded From HEK Cells (124803)	Examine the acute effects AMG3368167, a metabolite of AMG 510, on hERG current recorded from stably transfected HEK cells	Human embryonic kidney cells	In Vitro
Safety Pharmacology	hERG ^{3}H-Dofetilide Filter Binding Assay – Study of 3375854#1 and 3413829#1 [b] (153419)	Test 3375854#1 (M10) and 3413829#1 (M18) in the hERG [^{3}H]-dofetilide filter binding assay	Human embryonic kidney cells	In Vitro
Pharmacodynamic Drug Interactions	NA			

AMG 510 = sotorasib, AMG 510 was previously known as AMG3365648 and 3365648(#1); 4T1 tumors = breast cancer cell line derived from the mammary gland tissue of a mouse BALB/c; C118A = amino acid substitution of alanine for cysteine at position 118; CRC = colorectal carcinoma; CT-26 KRAS p.G12C-H10 = murine CT-26 colorectal carcinoma with *KRAS p.G12C* mutation; ERK1/2 = extracellular signal-regulated kinase 1/2; GLP = good laboratory practices; HEK = human embryonic kidney cells; hERG = human ether-à-go-go-related gene; I_{Kr} = rapidly activating delayed rectifier cardiac potassium current; Ki = non-covalent binding affinity; K_{intact} = rate constant of covalent bond formation; KRAS = Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; KRAS G12C = Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog with an amino acid substitution of cysteine for glycine at position 12; MEK = mitogen-activated protein kinase kinase; MAPK = mitogen-activated protein kinase;MIA PaCa-2 = human pancreatic carcinoma; mRNA = messenger ribonucleic acid; mTOR = mammalian target of rapamycin; NA = not applicable; NCI-H358 = a human non-small cell lung cancer cell line; NOD/SCID IL2rg (NSG) = non-obese diabetic / severe combined immune deficiency interleukin 2 receptor gamma; NSCLC = non-small cell lung cancer; p.G12C = notation for G12C mutation in the KRAS gene; PD-1 = programmed cell death 1; PDX = patient-derived xenograft; PI3K = phosphatidylinositol-3-kinase; PKPD = pharmacokinetic/pharmacodynamic; RMC-4550 = RMC-4550 is a potent, selective and oral available small molecule allosteric inhibitor of SHP2, acting by stabilizing the SHP2 protein in an inactive conformation that is unable to transmit cell growth signals; also referred to as 3388052 (SHP2i); SW480-1AC = human colorectal carcinoma; SHP2 = Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2; SHP2i = SH2-containing inositol phosphatase 2 inhibitor; SOS1 = son-of-seveless homolog 1;TIL = tumor infiltrating lymphocyte.

[a] Studies 124452 and 124453: 3365626 was another KRAS compound in early development that was not developed further.

[b] AMG3375854 and 3375854(#1) is metabolite M10; AMG3413829 and 3413829(#1) is metabolite M18.

表 2A　安全性薬理試験

被験物質：sotorasibあるいは代謝物（AMG3368167、AMG3375854及びAMG3413829）

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration	No. per Group	Organ System Evaluated	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Inhibition of hERG potassium channel current	HEK-293 cells expressing hERG potassium channels	In vitro	AMG 510: 0 (vehicle), 10, 30, 100 and 300 μM Terfenadine 60 nM	AMG 510/ vehicle: 3 cells Terfenadine: 2 cells	Cardiovascular	hERG current inhibition (mean ± SEM): 100 μM: 62.2 ± 1.2% 300 μM: 84.0 ± 0.6% IC_{50}: 54.8 μM	Yes	150431
Inhibition of hERG potassium channel current	HEK-293 cells expressing hERG potassium channels	In vitro	AMG3368167 [a] 1, 3, 10, 30 μM	3 cells	Cardiovascular	IC_{50}: > 30 μM	No	124803
Inhibition of hERG potassium channel current	HEK-293 cells expressing hERG potassium channels	In vitro	metabolites M10: (AMG3375854) M18: (AMG3413829)	2 cells	Cardiovascular	IC_{50}: > 29.9 μM for both metabolites	No	153419

AMG 510 = sotorasib; GLP = good laboratory practices; hERG = human ether-à-go-go-related gene; HEK-293 = human embryonic kidney 293 cells; IC_{50}: = 50% inhibition concentration; SEM = standard error of the mean.

[a] AMG3368167 is a metabolite of AMG 510.

表 2B　安全性薬理試験

被験物質：sotorasib

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Sex and No. per Group	Organ System Evaluated	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular (telemetry-instrumented)	Dog/Beagle	Oral gavage, single dose	0, 30, 100, 300	8M	Cardiovascular	No noteworthy findings NOEL = 300 mg/kg	Yes	150458

GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NOEL = no observed effect level.