2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

タスルグラチニブ（「本薬」とも称す）は，経口投与可能な新規線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）阻害剤である。FGFR は，ヒトでは 4 種類（FGFR1，FGFR2，FGFR3 及び FGFR4）が同定されており，*FGFR* 遺伝子の異常（遺伝子融合・点変異・増幅等）による FGF シグナルの活性化は様々な癌種においてがんの発生と進行に重要な役割を担っていると考えられている（Katoh, 2019）。タスルグラチニブは，非臨床及び臨床試験において，FGF シグナルが活性化している腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている（Miyano, et al., 2016; Koyama, et al., 2020）。

タスルグラチニブは，無細胞系のキナーゼ阻害アッセイにおいて FGFR1，FGFR2，FGFR3 に対して選択的に強い阻害活性を示した。また in vitro 培養系において，タスルグラチニブは *FGFR* 遺伝子異常を有する各種癌細胞株の増殖を抑制し，これは FGFR のリン酸化阻害に基づく作用であることが示唆された。In vivo の検討では，タスルグラチニブは *FGFR* 遺伝子異常を有する各種癌細胞株のマウス皮下移植モデル，及び *FGFR* 遺伝子異常を有する患者由来胆管癌移植片のマウス皮下移植モデルにおいて抗腫瘍効果を示した。

以上より，タスルグラチニブは *FGFR* 遺伝子異常を有するがん患者の新たな治療選択肢となることが期待される。

本薬の化学構造式を図 2.6.1-1 に示す。

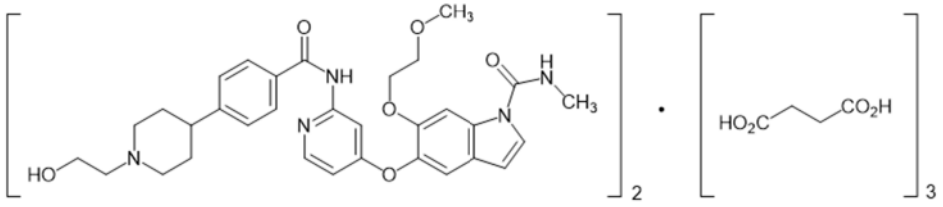
構造式： 
化学名：5-[2-({4-[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]ベンゾイル}アミノ)ピリジン-4-イル]オキシ-6-(2-メトキシエトキシ)-*N*-メチル-1*H*-インドール-1-カルボキシアミド　セスキコハク酸塩
分子式：$(C_{32}H_{37}N_5O_6)_2 \cdot (C_4H_6O_4)_3$
分子量：1529.6

図 2.6.1-1　タスルグラチニブコハク酸塩

本薬の効能又は効果（案）並びに用法及び用量（案）は以下のとおりである。

【効能又は効果】 がん化学療法歴のある *FGFR2* 融合遺伝子陽性の治癒切除不能な胆道癌
【用法及び用量】 通常，成人には，タスルグラチニブとして 1 日 1 回 140 mg を経口投与する。なお，患者の状態により適宜減量する。

参考文献

Katoh M. Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology. Nat Rev Clin Oncol. 2019;16:105–22.

Koyama T, Shimizu T, Iwasa S, Fujiwara Y, Kondo S, Kitano S, et al. First-in-human phase I study of E7090, a novel selective fibroblast growth factor receptor inhibitor, in patients with advanced solid tumors. Cancer Sci. 2020;111:571–9.

Miyano SW, Yamamoto Y, Kodama K, Miyajima Y, Mikamoto M, Nakagawa T, et al. E7090, a novel selective inhibitor of fibroblast growth factor receptors, displays potent antitumor activity and prolongs survival in preclinical models. Mol Cancer Ther. 2016;15:2630–9.

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.2.3 副次的薬理試験 13
2.6.2.4 安全性薬理試験 13
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 14
2.6.2.6 考察及び結論 14
2.6.2.7 図表 16
2.6.2.8 参考文献 16

薬理試験の概要文の略号一覧表

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
bFGF	basic fibroblast growth factor	塩基性線維芽細胞増殖因子
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
FGF	fibroblast growth factor	線維芽細胞増殖因子
FGFR	fibroblast growth factor receptor	線維芽細胞増殖因子受容体
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価
hERG	human ether-à-go-go related gene	＊日本語の表現はありません
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
QD×n	once a day for n days	1 日 1 回，n 日間投与
QTc	QTc interval	QTc 間隔
T/C	change in treatment/change in control	処理群での変化／対照群での変化
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4disulfophenyl)-2*H*-tetrazolium, monosodium salt	WST-8（生細胞数測定試薬）

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

タスルグラチニブは，線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）1，2，3 のキナーゼ活性を選択的に阻害する受容体型チロシンキナーゼ阻害剤である。タスルグラチニブは，非臨床及び臨床試験において，FGF シグナルが活性化している腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている（Miyano, et al., 2016; Koyama, et al., 2020）。

本概要文ではタスルグラチニブの効力を裏付ける試験として以下の in vitro 及び in vivo 試験が実施された。

効力を裏付ける in vitro 薬力学的試験；

- キナーゼ阻害プロファイル
- 各種ヒト癌細胞株に対する細胞増殖抑制作用
- FGFR の自己リン酸化阻害作用
- FGF 誘導性の血管内皮細胞増殖抑制作用

効力を裏付ける in vivo 薬力学的試験；

- 各種ヒト癌細胞株のマウス移植モデルにおける抗腫瘍効果
- *FGFR2* 融合遺伝子強制発現細胞株のマウス移植モデルにおける抗腫瘍効果
- *FGFR2* 融合遺伝子陽性胆管癌患者由来腫瘍片のマウス移植モデルにおける抗腫瘍効果

タスルグラチニブは無細胞系のキナーゼ阻害アッセイにおいて，野生型 FGFR1～3 に対して 50%阻害濃度（IC_{50}）値 0.38～1.8 nmol/L で阻害した。一方，野生型 FGFR4 に対する IC_{50} 値は 94～120 nmol/L であり FGFR1～3 と比較して弱かった。

タスルグラチニブは in vitro 培養系において，FGFR が恒常的に活性化しているヒト胃癌細胞株 SNU-16，ヒト肺癌細胞株 NCI-H1581，ヒト子宮体癌細胞株 AN3 CA 及びヒト膀胱癌細胞株 RT112/84 の細胞増殖を濃度依存的に抑制し，IC_{50} 値はそれぞれ，5.7，7.2，17 及び 34 nmol/L であった。タスルグラチニブの代謝物である M2（ER-000602516）は，SNU-16 の細胞増殖を抑制しタスルグラチニブの 0.72 倍の in vitro 活性を示すことがわかった。またタスルグラチニブは SNU-16 細胞内の FGFR の自己リン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 1.2 nmol/L であった。

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた in vitro 塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）誘導細胞増殖試験において，タスルグラチニブは細胞増殖を濃度依存的に抑制し，IC_{50} 値は 22 nmol/L であった。

SNU-16 及び NCI-H1581 を用いたマウス皮下移植モデルにおいて，タスルグラチニブの 1 日 1 回，14 日間の経口投与は 6.25～50 mg/kg の用量で用量依存的に有意な抗腫瘍効果を示し，最高用量では腫瘍増殖がほぼ完全に抑制された。*FGFR2* 融合遺伝子を発現させた NIH/3T3 を用いたマウス皮下移植モデルにおいて，タスルグラチニブの 1 日 1 回，7 日間の経口投与は 6.25～50 mg/kg の用量で用量依存的に有意な抗腫瘍効果を示した。*FGFR2* 融合遺伝子を有する胆管癌患者由来腫瘍片のマウス皮下移植モデルにおいて，タスルグラチニブの 1 日 1 回，15 日間の経口投与は 15 及び 50 mg/kg の用量で有意な抗腫瘍効果を示し，50 mg/kg では腫瘍縮小がみられた。

以上の結果から，タスルグラチニブはFGFR1～3の選択的阻害に基づく新規抗がん剤として有用である可能性が示唆された。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

タスルグラチニブは，受容体型チロシンキナーゼ以外の受容体，神経伝達物質トランスポーター及びイオンチャネルから成る86種の分子パネルに対して，10 μmol/LではBZD (peripheral)，D_1，5-HT_{1B}，sigma receptor及びNa^+ channel (site2) に，1.0 μmol/Lではsigma receptorのリガンド結合に対する50%以上の阻害を示したが，これら以外に顕著な結合阻害はみられなかった。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

心血管系に対する評価として，in vitro試験では，human ether-à-go-go related gene（hERG）チャネルを発現したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた電気生理学的な影響を検討した。その結果，タスルグラチニブは，hERG カリウム電流を濃度依存的に阻害し，最高濃度である 29.37 μmol/L で 48.50%阻害した。In vivo 試験では，テレメトリー送信機を埋め込んだ覚醒イヌを用いてタスルグラチニブ（フリー体として，0，30，100 及び 300 mg/kg）を経口投与し，心血管系への影響を検討した。その結果，300 mg/kg まで心拍数，平均血圧及び心電図にタスルグラチニブの直接作用に起因する変化はみられなかった。また，イヌを用いた4週間反復投与毒性試験（コハク酸塩として0，1.5，5.4，27 mg/kg）においても，投与23日目又は24日目に心電図に対する影響を検討した。その結果，高用量として設定した 27 mg/kg まで心電図の変化はみられなかった。

中枢神経系及び呼吸系に対する評価は，ラットを用いた4週間反復投与毒性試験（コハク酸塩として0，2，7，27 mg/kg）において，投与初日又は2日目又は3日目に実施した。その結果，高用量として設定した27 mg/kgまで，いずれの検査項目にも変化はみられなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の一覧表は2.6.3.1項に記載した。

2.6.2.2.1 In vitro 試験

2.6.2.2.1.1 キナーゼ阻害プロファイル（添付資料 4.2.1.1.1［試験番号 CBS-130198］，添付資料 4.2.1.1.2［CBS-200137］，添付資料 4.2.1.1.3［試験番号 CBS-210205］）

本試験では，無細胞系における FGFR（FGFR1～4）に対するタスルグラチニブのキナーゼ阻害作用を評価した。併せてタスルグラチニブの代謝物である M2 及び (*R*)-M9（ER-001428566）のキナーゼ阻害作用も評価した。各酵素のキナーゼ活性を有するドメインについてヒト遺伝子組換え体を調製し，タスルグラチニブコハク酸塩の系列希釈液を加え，キナーゼごとに至適化した条件において酵素活性を mobility shift assay で測定した。

FGFR1～4及び血管内皮増殖因子（VEGFR）2に対する阻害作用を評価した2回の試験結果，また変異型FGFRを含む141キナーゼ活性に対する阻害作用を評価した試験結果をそれぞれ，表2.6.2.2.-1～3に示した。これらの結果から，FGFR1～4 対するタスルグラチニブの IC_{50} 値は，それぞれ 0.89～1.1，0.38～0.56，1.3～1.8 及び 94～120 nmol/L であった。変異型 FGFR（FGFR1[V561M]，FGFR2[V564I]，FGFR3[K650E]，FGFR3[K650M]，FGFR3[V555L]，FGFR3[V555M]，FGFR4[N535K]，FGFR4[V550E]，FGFR4[V550L]）に対するタスルグラチニブ

の IC_{50} 値はそれぞれ，>1000，100，5.5，18，>1000，>1000，220，>1000 及び>1000 nmol/L であった。FGFR 以外に IC_{50} 値が 20 nmol/L 以下のキナーゼには，DDR1/2，RET，変異型 RET，VEGFR1 及び VEGFR2 が含まれていた（表 2.6.2-1，表 2.6.2-2，表 2.6.2-3）。

表 2.6.2-1　タスルグラチニブのキナーゼ阻害プロファイル 1

Kinase	IC_{50} (nmol/L)	
	Mean	95% Confidence Interval
FGFR1	0.89	0.75～1.1
FGFR2	0.56	0.50～0.62
FGFR3	1.8	1.7～1.8
FGFR4	120	110～140
VEGFR2	18	17～20

データは 3 回の独立した実験（各 2 重測定）の平均値及び 95%信頼区間を示す。IC_{50} = 50%阻害濃度。

表 2.6.2-2　タスルグラチニブのキナーゼ阻害プロファイル 2

Kinase	IC_{50} (nmol/L)	
	Mean	95% Confidence Interval
FGFR1	0.94	0.83～1.0
FGFR2	0.38	0.34～0.41
FGFR3	1.3	1.1～1.5
FGFR4	94	65～120
VEGFR2	18	17～19

データは 3 回の独立した実験（各 2 重測定）の平均値及び 95%信頼区間を示す。IC_{50} = 50%阻害濃度。

表 2.6.2-3　タスルグラチニブのキナーゼ阻害プロファイル 3

Kinase	IC_{50} (nmol/L)	Kinases	IC_{50} (nmol/L)
FGFR1	1.1	DDR1	7.3
FGFR1[V561M]	>1000	DDR2	4.8
FGFR2	0.41	RET	4.1
FGFR2[V564I]	100	RET[G691S]	4.7
FGFR3	1.4	RET[M918T]	15
FGFR3[K650E]	5.5	RET[S891A]	1.8
FGFR3[K650M]	18	RET[Y791F]	5.4
FGFR3[V555L]	>1000	VEGFR1	7.1
FGFR3[V555M]	>1000	VEGFR2	20
FGFR4	110		
FGFR4[N535K]	220		
FGFR4[V550E]	>1000		

表 2.6.2-3　タスルグラチニブのキナーゼ阻害プロファイル 3

Kinase	IC_{50} (nmol/L)	Kinases	IC_{50} (nmol/L)
FGFR4[V550L]	>1000		

データは 1 回の実験結果（各 2 重測定）を示す。IC_{50} = 50%阻害濃度。

代謝物 M2 の FGFR1～4 に対する IC_{50} 値はそれぞれ 0.95，0.37，1.4，93 nmol/L であり，タスルグラチニブのこれらのキナーゼに対する IC_{50} 値と同等であった。一方，代謝物 (*R*)-M9 の FGFR1～4 に対する IC_{50} 値はそれぞれ 2.8，0.95，3.1，140 nmol/L であり，タスルグラチニブ及び M2 と比較して弱かった。

2.6.2.2.1.2 キナーゼ-タスルグラチニブ複合体の X 線結晶構造解析（参考資料 4.2.1.1.4［試験番号 W-20190756］）

FGFR1-タスルグラチニブ複合体の X 線結晶構造解析により，タスルグラチニブの FGFR1 に対する結合様式を調べた。ヒト FGFR1 のキナーゼドメイン（Ser461-Asp774）を含む組換えタンパク質を調製し，タスルグラチニブと反応させた。得られた FGFR1-タスルグラチニブ複合体を結晶化し，2.79 Å の解像度で X 線構造解析を行った。

表 2.6.2-4 に示すように，タスルグラチニブから 3.9 Å 以内の位置にあるキナーゼのアミノ酸残基は，FGFR1 チロシンキナーゼドメインのアデノシン三リン酸（ATP）結合部位（キナーゼに共通する領域），それに隣接するアロステリック領域（キナーゼごとに異なる調節領域），両者の境界に位置するゲートキーパーに分類された（Traxler and Furet, 1999）。

表 2.6.2-4　FGFR1-タスルグラチニブ複合体内でタスルグラチニブから 3.9 Å 以内に位置するアミノ酸残基

Site/Region	Amino Acid Residues
ATP-binding site	Leu484, Val492, Ala512, Glu562, Ala564, Ser565, Gly567, Leu630, Ala640, Asp641
Gate keeper	Val561
Allosteric region	Lys514, Glu531, Met535, Phe642

各アミノ酸残基の領域区分（Site/Region）は Traxler and Furet (1999) に従った。各アミノ酸残基の通し番号は Universal Protein Resource Knowledgebase の 11362 ページに記載の FGFR1 の一次構造に従った。ATP = アデノシン三リン酸。

2.6.2.2.1.3 FGFR が恒常的に活性化しているヒト癌細胞株の細胞増殖に対する抑制作用（添付資料 4.2.1.1.5［試験番号 M13021］）

本試験では，ヒト胃癌細胞株 SNU-16，ヒト肺癌細胞株 NCI-H1581，ヒト子宮体癌細胞株 AN3 CA，ヒト膀胱癌細胞株 RT112/84 の細胞増殖に対するタスルグラチニブの抑制作用を検討した。SNU-16 では *FGFR2* 遺伝子増幅（Kunii, et al., 2008），NCI-H1581 では *FGFR1* 遺伝子増幅（Dutt, et al., 2011），AN3 CA では，*FGFR2* の K310R 及び N549K 変異（Pollock, et al., 2007），RT112/84 では，*FGFR3* の *TACC3* との遺伝子融合（Williams, et al., 2013）により，それぞれ FGFR が恒常的に活性化し，FGF シグナル依存的に増殖することが知られている。これらの細胞株を 96 ウェルプレートに播種し，一晩培養後，タスルグラチニブコハク酸塩の系列希釈液（最終濃度 0.78～400 nmol/L）を加えて 3 日間培養後，各ウェルに WST-8 試薬を加え，マイクロプレートリーダー

を用いて吸光度を測定することで生細胞数を測定した。

タスルグラチニブはこれらの細胞株の細胞増殖を濃度依存的に抑制し，表 2.6.2-5 に示すように，IC_{50} 値はそれぞれ，5.7，7.2，17 及び 34 nmol/L であった。

表 2.6.2-5　各種ヒト癌細胞の増殖に対する抑制効果

Cancer Cell Line	IC_{50} (nmol/L)	
	Mean	95% Confidence Interval
SNU-16	5.7	4.0～8.2
NCI-H1581	7.2	5.2～10
AN3 CA	17	8.2～34
RT112/84	34	26～45

データは 3 回の独立した実験（各 4 重測定）の平均値及び 95%信頼区間を示す。IC_{50} = 50%阻害濃度。

2.6.2.2.1.4 代謝物 M2 のヒト癌細胞株の増殖に対する抑制作用（添付資料 4.2.1.1.6［試験番号 M16017］）

本試験では，タスルグラチニブの代謝物である M2 の in vitro 活性を SNU-16 の細胞増殖に対する抑制作用で評価した。SNU-16 を 96 ウェルプレートに播種し，一晩培養後，M2 及び対照としたタスルグラチニブコハク酸塩の系列希釈液（最終濃度 0.78～400 nmol/L）を加えて 3 日間培養後，各ウェルに WST-8 試薬を加え，マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定することで生細胞数を測定した。

M2 は比較対照として用いたタスルグラチニブと同様に，SNU-16 の細胞増殖を濃度依存的に抑制し，IC_{50} 値はそれぞれ，10 nmol/L，7.2 nmol/L であった。M2 とタスルグラチニブのそれぞれの IC_{50} 値の比較から，M2 はタスルグラチニブの 0.72 倍の in vitro 活性を示すことがわかった。

2.6.2.2.1.5 細胞内 FGFR の自己リン酸化に対する阻害作用（添付資料 4.2.1.1.7［試験番号 M13017］）

本試験では，細胞系における FGFR の自己リン酸化に対するタスルグラチニブの阻害作用を検討した。SNU-16 細胞にタスルグラチニブコハク酸塩の系列希釈液（最終濃度 0.4～100 nmol/L）を添加し，4 時間培養した。細胞を可溶化後，タンパク質量をそろえて還元条件下で電気泳動を行い，FGFR2 及びリン酸化 FGFR に対する抗体でイムノブロットを行った。化学発光によって可視化後，リン酸化 FGFR バンドの化学発光強度を測定した。

図 2.6.2-1 に示すように，タスルグラチニブは濃度依存的に FGFR の自己リン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 1.2 nmol/L (95%信頼区間：0.28～5.3)であった。この値は無細胞系における FGFR（FGFR1～3）阻害の IC_{50} 値と近いものであった。

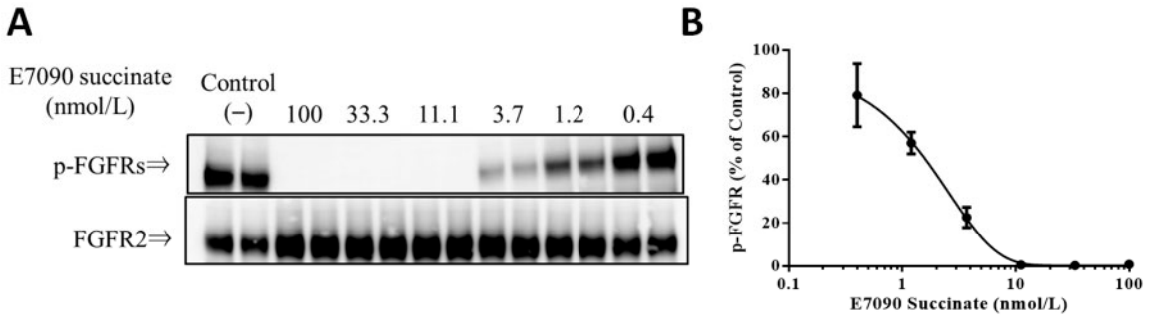


図 2.6.2-1　SNU-16 細胞内 FGFR リン酸化に対する作用

A: 3 回の実験結果より代表例を示す。B: 各点は 3 回の独立した実験（各 2 重測定）の平均値±標準誤差を示す。p-FGFRs 及び FGFR2 は，それぞれリン酸化 FGFRs 及び FGFR2 に対応するバンドを示す。E7090 = タスルグラチニブ。

2.6.2.2.1.6 *FGFR2* 融合遺伝子を発現させたマウス胎児線維芽細胞株の足場非依存性増殖に対する抑制作用（参考資料 4.2.1.1.8［試験番号 W-20220553］）

本試験では，胆道癌において報告されている *FGFR2* 融合遺伝子である *FGFR2-AHCYL1*，*FGFR2-BICC1* type1，*FGFR2-BICC1* type2，*FGFR2-TXLNA* 及び *FGFR2-KCTD1* を発現させたマウス胎児線維芽細胞株 NIH/3T3 の足場非依存性増殖に対するタスルグラチニブの抑制作用を検討した。非臨床試験において，これらの *FGFR2* 融合遺伝子を発現させた NIH/3T3 は足場非依存性増殖能を獲得することが報告されている（Arai, et al., 2014; Nakamura, et al., 2015）。これらの細胞株を 96 ウェルプレートに 0.66%の寒天含有培地とともに播種し，タスルグラチニブコハク酸塩の系列希釈液（最終濃度 0.14～100 nmol/L）を加えて 14 日間培養後，各ウェルに WST-8 試薬を加え，マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定することで生細胞数を測定した。

表 2.6.2-6 に示すように，タスルグラチニブは，*FGFR2-AHCYL1*，*FGFR2-BICC1* type1，*FGFR2-BICC1* type2，*FGFR2-TXLNA* 及び *FGFR2-KCTD1* 発現 NIH/3T3 の足場非依存性増殖を濃度依存的に抑制し，IC_{50} 値はそれぞれ，0.78，2.4，16，2.3 及び 2.1 nmol/L であった。一方，同様に足場非依存性増殖が知られている *KRAS* (G12V) 発現 NIH/3T3（Tong, et al., 2014）の増殖に対する IC_{50} 値は 170 nmol/L であり，*FGFR2* 融合遺伝子発現 NIH/3T3 に対する抑制作用と比較して弱かった。

表 2.6.2-6　*FGFR2* 融合遺伝子発現 NIH/3T3 の足場非依存性増殖に対する抑制効果

Cell Line	IC_{50} (nmol/L)
NIH/3T3 expressing *FGFR2-AHCYL1*	0.78
NIH/3T3 expressing *FGFR2-BICC1* type1	2.4
NIH/3T3 expressing *FGFR2-BICC1* type2	16
NIH/3T3 expressing *FGFR2-TXLNA*	2.3
NIH/3T3 expressing *FGFR2-KCTD1*	2.1
NIH/3T3 expressing *KRAS* (G12V)	170

データは 2 回の独立した実験（Blank，タスルグラチニブ: 6 重測定，Control: 12 重測定）の平均値を示す。IC_{50} = 50%阻害濃度。

2.6.2.2.1.7 bFGF 又は VEGF によって誘導されるヒト血管内皮細胞の増殖に対する抑制作用（添付資料 4.2.1.1.9［試験番号 M13022］）

本試験では，ヒト bFGF 又は VEGF によって誘導される HUVEC の増殖に対するタスルグラチニブの抑制作用を検討した。HUVEC を 96 ウェルプレートに播種し，一晩培養後，タスルグラチニブコハク酸塩の系列希釈液（最終濃度 2.0～1000 nmol/L）及び終濃度 10 ng/mL のヒト遺伝子組換え bFGF 又は VEGF を各ウェルに添加した。3 日間培養後，各ウェルに WST-8 試薬を加え，マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定することで生細胞数を測定した。

表 2.6.2-7 に示すように，タスルグラチニブは bFGF 又は VEGF によって誘導される HUVEC の増殖を濃度依存的に抑制し，IC_{50} 値はそれぞれ，22 及び 280 nmol/L であった。

表 2.6.2-7　HUVEC の bFGF 又は VEGF 誘導性増殖に対する抑制効果

HUVEC Proliferation	IC_{50} (nmol/L)	
	Mean	95% Confidence Interval
bFGF-driven HUVEC growth	22	18～25
VEGF-driven HUVEC growth	280	230～350

データは 3 回の独立した実験（各 4 重測定）の平均値及び 95%信頼区間を示す。bFGF = 塩基性線維芽細胞増殖因子，HUVEC = ヒト臍帯静脈内皮細胞，IC_{50} = 50%阻害濃度，VEGF = 血管内皮増殖因子。

2.6.2.2.2 In vivo 試験

2.6.2.2.2.1 ヒト胃癌細胞株 SNU-16 移植モデルにおける抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.10［試験番号 M13026］）

本試験では，SNU-16 に対するタスルグラチニブの抗腫瘍効果を，ヌードマウス移植モデルを用いて検討した。SNU-16 を 7 週齢の雌性ヌードマウスに皮下移植し，移植後 5 日目（Day 1）に各群を 6 例とし，媒体対照の蒸留水（10 mL/kg）又はタスルグラチニブ（コハク酸塩として 6.25，12.5，25 及び 50 mg/kg）の 1 日 1 回，14 日間の経口投与を開始した。腫瘍体積及び体重は週に 2 回測定を行った。腫瘍体積は「腫瘍体積（mm^3）= 長径(mm) × (短径 [mm])^2 × 1/2」によって算出した。腫瘍体積の T/C は「T/C（%）=（処理群の投与初日からの腫瘍体積変化／対照群の投与初日からの腫瘍体積変化）×100」により求めた。以下，腫瘍体積及び T/C はこの方法で算出し記載した。

図 2.6.2-2 に示すように，タスルグラチニブは SNU-16 移植モデルにおいて，投与した全ての用量において有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。全ての処理群において顕著な体重減少（>20%）は認められなかった。Day 15 での 6.25，12.5，25 及び 50 mg/kg 投与における T/C は，それぞれ 51%，26%，13%及び 0%であり，最高用量では腫瘍増殖がほぼ完全に抑制された。

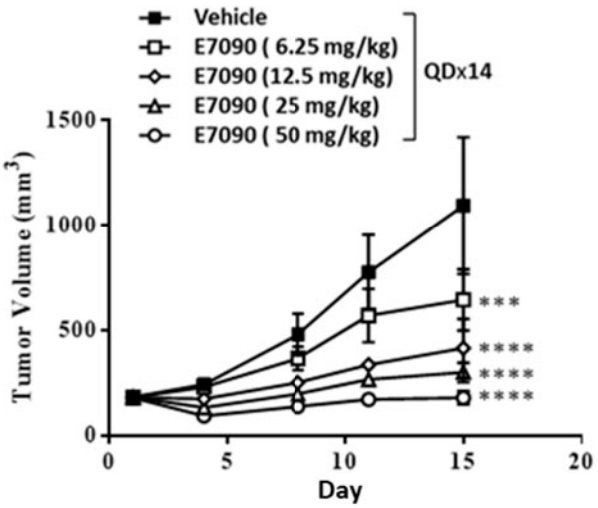


図 2.6.2-2　SNU-16 移植モデルに対する抗腫瘍効果

データは平均±標準偏差（n=6）を示す。E7090 = タスルグラチニブ，QD×14 = 1 日 1 回，14 日間。*** $P<0.001$, **** $P<0.0001$，Day 15 における媒体対照との比較（one-way analysis of variance followed by the Dunnett multiple comparison test）。

2.6.2.2.2.2 ヒト肺癌細胞株 NCI-H1581 移植モデルにおける抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.11 ［試験番号 M13027］）

本試験では，NCI-H1581 に対するタスルグラチニブの抗腫瘍効果を，ヌードマウス移植モデルを用いて検討した。NCI-H1581 を 7 週齢の雌性ヌードマウスに皮下移植し，移植後 9 日目（Day 1）に各群を 6 例とし，媒体対照の蒸留水（10 mL/kg）又はタスルグラチニブ（コハク酸塩として 6.25，12.5，25 及び 50 mg/kg）の 1 日 1 回，14 日間の経口投与を開始した。腫瘍体積及び体重は週に 2 回測定を行った。

図 2.6.2-3 に示すように，タスルグラチニブは NCI-H1581 移植モデルにおいて，投与した全ての用量において有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。全ての処理群において顕著な体重減少は認められなかった。Day 15 での 6.25，12.5，25 及び 50 mg/kg 投与における腫瘍体積の T/C は，それぞれ，37%，17%，5%及び 1%であり，最高用量では腫瘍増殖がほぼ完全に抑制された。

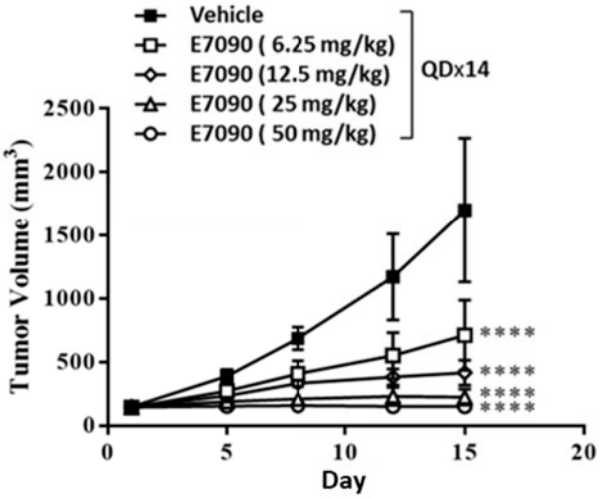


図 2.6.2-3　NCI-H1581 移植モデルにおける抗腫瘍効果

データは平均±標準偏差（n=6）を示す。E7090 = タスルグラチニブ，QD×14 = 1 日 1 回，14 日間。**** $P<0.0001$，Day 15 における媒体対照との比較（one-way analysis of variance followed by the Dunnett multiple comparison test）。

2.6.2.2.2.3 *FGFR2*融合遺伝子を発現させた NIH/3T3 移植モデルにおける抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.12［試験番号 M21001］，参考資料 4.2.1.1.13［試験番号 W-20220551］，参考資料 4.2.1.1.14［試験番号 W-20220552］）

本試験では，*FGFR2* 融合遺伝子である *FGFR2-KCTD1* を発現させた NIH/3T3 に対するタスルグラチニブの抗腫瘍効果を，ヌードマウス移植モデルを用いて検討した。*FGFR2-KCTD1* 発現 NIH/3T3 を 6 週齢の雌性ヌードマウスに皮下移植し，移植後 8 日目（Day 1）に各群を 6 例（腫瘍体積の平均：129 mm^3）とし，媒体対照の 10 mmol/L 塩酸又はタスルグラチニブ（コハク酸塩として 6.25，12.5，25 及び 50 mg/kg）の 1 日 1 回，7 日間の経口投与を開始した。腫瘍体積及び体重は Day 1，3，5 及び 8 に行った。

図 2.6.2-4 に示すように，タスルグラチニブは *FGFR2-KCTD1* 発現 NIH/3T3 移植モデルにおいて，投与した全ての用量において有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。全ての処理群において顕著な体重減少は認められなかった。Day 8 での 6.25，12.5，25 及び 50 mg/kg 投与における腫瘍体積の T/C は，それぞれ 59%，44%，27%及び 18%であった。

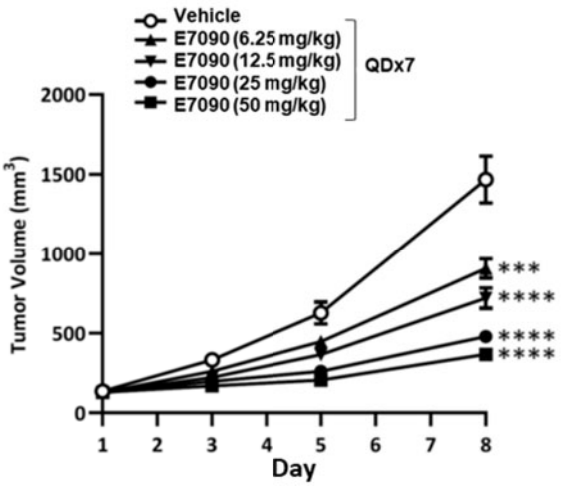


図 2.6.2-4　*FGFR2-KCTD1* 発現 NIH/3T3 移植モデルにおける抗腫瘍効果

データは平均±標準誤差（n=6）を示す。E7090＝タスルグラチニブ，QD×7＝1 日 1 回，7 日間。*** P<0.001，**** P<0.0001，Day 8 における媒体対照との比較（one-way analysis of variance followed by the Dunnett multiple comparison test）。

FGFR2-KCTD1 以外の *FGFR2* 融合遺伝子である *FGFR2-BICC1* type2 又は *FGFR2-TXLNA* を発現させた NIH/3T3 移植モデルにおいて同様の検討を行い，タスルグラチニブは両モデルにおいても投与した全ての用量（6.25～50 mg/kg）において有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。

2.6.2.2.2.4 胆管癌患者由来腫瘍片 CC6204 移植モデルにおける抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.15［試験番号 E0606-U1511］）

本試験では，*FGFR2* 融合遺伝子（*FGFR2-BICC1*）を有する胆管癌患者由来腫瘍片 Huprime®CC6204 に対するタスルグラチニブの抗腫瘍効果を，ヌードマウス移植モデルを用いて検討した。CC6204 腫瘍片を 7～8 週齢の雌性ヌードマウスに皮下移植し，移植後 32 日目（Day 1）に各群を 7 例（腫瘍体積の平均：193 mm^3）とし，媒体対照の蒸留水又はタスルグラチニブ（コハク酸塩として 5，15 及び 50 mg/kg）の 1 日 1 回，15 日間の経口投与を開始した。腫瘍体積及び体重は週に 2 回測定を行った。

図 2.6.2-5 に示すように，タスルグラチニブは CC6204 移植モデルにおいて，15 及び 50 mg/kg の用量において有意な腫瘍増殖抑制作用を示した。Day 15 での 15 及び 50 mg/kg 投与における腫瘍体積の T/C は，それぞれ，42%，–18%であり，最高用量では腫瘍縮小がみられた。タスルグラチニブの 15 及び 50 mg/kg 投与群ではそれぞれ 1 例ずつを顕著な体重減少（それぞれ投与開始時にくらべ Day 12 に–28%，Day 5 に–20%）のため安楽死させたが，それ以外の 5 mg/kg 投与群を含む全てのマウスでは顕著な体重減少はみられなかった。Day 15 まで生存した各マウスの投与開始時から Day 15 までの体重の変化率（%）の平均値は，媒体対照群，タスルグラチニブ投与群（5，15 及び 50 mg/kg）でそれぞれ+5.2%，–1.7%，–2.3%，+6.1%であった。

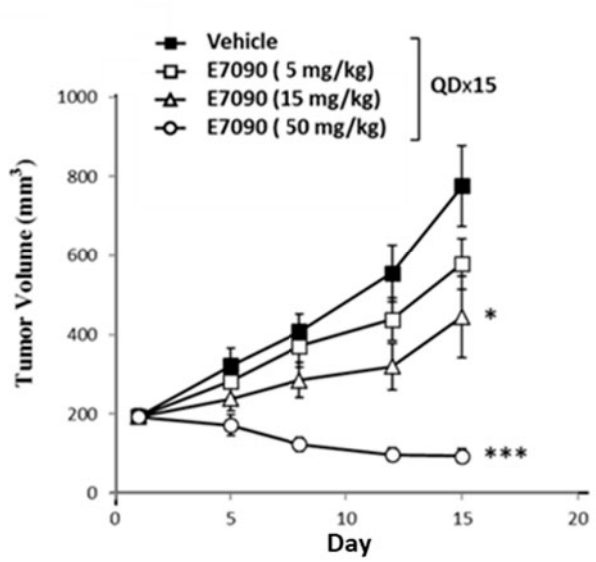


図 2.6.2-5　胆管癌患者由来腫瘍片 CC6204 移植モデルにおける抗腫瘍効果

データは平均±標準誤差（n=6～7）を示す。E7090 = タスルグラチニブ，QD×15 = 1 日 1 回，15 日間。* P<0.05，*** P<0.001，Day 15 における媒体対照との比較（one-way analysis of variance followed by the Dunnett multiple comparison test）。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 受容体，トランスポーター及びイオンチャネルに対する結合性試験（添付資料 4.2.1.2.1［試験番号 100006525］）

本試験では，タスルグラチニブ（1.0，10 μmol/L）の選択性を評価するため，受容体型チロシンキナーゼ以外の受容体，神経伝達物質トランスポーター及びイオンチャネルから成る 86 種の分子パネルに対する結合性を放射性リガンド結合性試験により評価した。

タスルグラチニブは，10 μmol/L では BZD (peripheral) (87.5%)，D_1（55.1%），5-HT_{1B}（68.3%），sigma receptor（89.4%）及び Na^+ channel (site2)（71.3%）に，1.0 μmol/L では sigma receptor（54.5%）に 50%以上の阻害を示した。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 hERG カリウム電流に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.1［試験番号：SBL038-096］）

hERG チャネルを発現させた CHO 細胞（5 細胞/濃度）にタスルグラチニブの 0，3，10 及び 30 μmol/L の濃度を適用（灌流時間約 7 分）し，whole-cell patch-clamp 法を用いて hERG 末尾電流に及ぼす影響を検討した。その結果，タスルグラチニブの灌流液中濃度は 2.70，9.45 及び 29.37 μmol/L であり，hERG 末尾電流をそれぞれ，5.40，19.56 及び 48.50%阻害した。IC_{50} 値は，29.37 μmol/L より大であった。

2.6.2.4.2 心拍数，血圧及び心電図に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.2［試験番号：T12101］，添付資料 4.2.3.2.5［試験番号：T13032］）

テレメトリー送信器を埋め込んだ覚醒イヌ（雌 3 例/群）にタスルグラチニブのフリー体として 0，30，100 及び 300 mg/kg を単回経口投与し，心拍数，平均血圧，心電図（PR 間隔，QRS 時間，QTc）の測定及び一般状態の観察を実施した。その結果，30 及び 100 mg/kg では何も影響が

観察されなかった。300 mg/kg では，心拍数の上昇，PR 間隔の短縮，QTc の延長が投与後 2 時間以内に観察された。これらの変化は，タスルグラチニブの直接作用に起因する変化ではなかった。投与後 2 時間以内に，30 mg/kg では 1 例，100 mg/kg では 2 例，300 mg/kg では全例で嘔吐が観察された。

また 4 週反復投与毒性試験において，タスルグラチニブのコハク酸塩として 0，1.5，5.4 及び 27 mg/kg を雌雄各群 5 例（1.5 mg/kg 群のみ 3 例）に経口投与し，投与前及び第 4 週のタイミングで心電図を評価した（27 mg/kg 群は毒性のため 13 日目が最終投与であったが，同タイミングで心電図を測定した）。その結果，心電図に有意な変化は認められなかった。

2.6.2.4.3 ラットの中枢神経系に及ぼす影響（添付資料 4.2.3.2.2［試験番号：K13100］）

中枢神経系に対する影響については，ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験（投与量：タスルグラチニブコハク酸塩として 0，2，7，27 mg/kg）で評価した。各投与群の雄 6 例を使用し，投与初日又は 2 日目又は 3 日目の投与前，投与 2 及び 6 時間後に Functional Observational Battery（FOB）法により，一般症状，オープンフィールドでの観察，刺激への反応，前肢及び後肢握力，体温などを調べた。その結果，いずれの投与量においても中枢神経系への影響を示唆する変化はみられなかった。

2.6.2.4.4 ラットの呼吸系に及ぼす影響（添付資料 4.2.3.2.2［試験番号：K13100］）

呼吸機能に対する影響については，ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験（投与量：タスルグラチニブコハク酸塩として 0，2，7，27 mg/kg）で評価した。各投与群の雄 6 例を使用し，投与初日又は 2 日目又は 3 日目の投与前，投与 2 及び 6 時間後に無拘束呼吸機能測定システムを用いて，呼吸機能（呼吸数，1 回換気量及び分時換気量）を測定した。その結果，いずれの投与量においても呼吸機能パラメータには変化みられなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

タスルグラチニブは，経口投与可能な新規 FGFR チロシンキナーゼ阻害剤である。

無細胞系のキナーゼ阻害アッセイにおいて，タスルグラチニブは野生型 FGFR1～3 に対して選択的に強い阻害活性を示した。一方，変異型 FGFR に対する阻害活性は FGFR3[K650E]及び FGFR3[K650M]に対しては野生型と比較して 10 倍程度の減弱に留まったが，ゲートキーパー変異として知られる FGFR1[V561M]，FGFR2[V564I]，FGFR3[V555L]及び FGFR3[V555M]（Yue, et al., 2021）に対しては軒並み阻害活性が減弱した。FGFR1-タスルグラチニブ複合体の X 線結晶構造解析により，タスルグラチニブは ATP 結合サイト及び隣接するアロステリック領域の両方に結合し，キナーゼ阻害活性とキナーゼ選択性を発揮していることが示唆された（Liao, 2007; Zuccotto, et al., 2010; Blanc, et al., 2013）。In vitro 培養系において，タスルグラチニブは *FGFR* 遺伝子異常による FGF シグナル依存性増殖が知られている各種ヒト癌細胞株（ヒト胃癌細胞株 SNU-16［*FGFR2* 遺伝子増幅］，ヒト肺癌細胞株 NCI-H1581［*FGFR1* 遺伝子増幅］，ヒト子宮体癌細胞株 AN3 CA［*FGFR2* 変異］及びヒト膀胱癌細胞株 RT112/84［*FGFR3* 融合遺伝子］）に対して増殖

抑制作用を示した。タスルグラチニブはFGFRのリン酸化を阻害することでその下流シグナル伝達分子（FRS2，ERK1/2，Akt）のリン酸化を阻害し（Miyano, et al., 2016），FGFシグナル依存性細胞増殖を抑制していることが示唆された。

近年，肝内胆管癌で検出される *FGFR2* 融合遺伝子の機能に関しては，下記の非臨床試験成績が報告されている。

- マウス由来線維芽細胞に対して，肝内胆管癌で検出される *FGFR2-AHCYL1*，*FGFR2-BICC1* のいずれかを発現させることでコロニー形成能及びマウスにおける造腫瘍性が付与された。さらに，FGFR阻害剤処理によりこれらのコロニー形成能が抑制された（Arai, et al., 2014）。
- *Tp53* 遺伝子ノックアウトマウス由来肝オルガノイドに対して，肝内胆管癌で検出される *FGFR2-BICC1*，*FGFR2-MGEA5*，*FGFR2-TACC3*，*FGFR2-CCDC6* のいずれかを発現させることで，マウス皮下若しくはマウス肝臓における造腫瘍性が付与された。さらに，このうち *FGFR2-BICC1* 発現肝オルガノイドのマウス皮下移植モデルにおいて，FGFR 阻害剤投与により腫瘍増殖抑制作用が認められた（Cristinziano, et al., 2021）。

また，胆道癌において *FGFR2* 融合遺伝子は *KRAS*，*BRAF*，*IDH1/2* の遺伝子異常とは排他的であることが報告されている（Farshidfar, et al., 2017; Arai, et al., 2014）。これらのことから，*FGFR2* 融合遺伝子は胆道癌における oncogenic driver であることが示唆されており，FGFR阻害剤の有望な分子標的であると考えられている（Mahipal, et al., 2019）。タスルグラチニブは，*FGFR2* 融合遺伝子（*FGFR2-AHCYL1*，*FGFR2-BICC1* type1，*FGFR2-BICC1* type2，*FGFR2-TXLNA*，又は *FGFR2-KCTD1*）を強制発現させた NIH/3T3 に対して増殖抑制作用を示した。一方，Raf-MEK-ERK シグナル経路の活性化と足場非依存性増殖が知られている *KRAS* (G12V) 発現 NIH/3T3（Tong, et al., 2014）に対するタスルグラチニブの増殖抑制作用は，*FGFR2* 融合遺伝子発現NIH/3T3に対する増殖抑制作用と比較して弱かった。この結果から，タスルグラチニブはFGFシグナルに依存した足場非依存性増殖に対して選択的に作用することが示唆された。

FGF シグナルは腫瘍血管新生において重要な役割を果たしていることが報告されており，FGFシグナルの阻害は腫瘍血管新生阻害治療として有用である可能性がある（Zhao and Adjei, 2015）。タスルグラチニブは，ヒト bFGF 依存性の HUVEC の増殖に対して抑制作用を示したことから，腫瘍血管新生に FGF シグナルが寄与するがん腫においては，タスルグラチニブの薬効に FGF シグナル阻害による腫瘍血管新生抑制が加味される可能性が示唆された。

タスルグラチニブは，SNU-16 及び NCI-H1581 を用いたヌードマウス皮下移植モデルにおいて有意な抗腫瘍効果を示し，最高用量（50 mg/kg）では腫瘍増殖がほぼ完全に抑制された。*FGFR2* 融合遺伝子（*FGFR2-KCTD1*，*FGFR2-BICC1* type2，又は *FGFR2-TXLNA*）を発現させた NIH/3T3 のヌードマウス皮下移植モデルにおいて，いずれのモデルにおいても有意な抗腫瘍効果を示した。またタスルグラチニブは *FGFR2* 融合遺伝子である *FGFR2-BICC1* を有する胆管癌患者由来腫瘍片 CC6204 のヌードマウス皮下移植モデルにおいて有意な抗腫瘍効果を示し，最高用量の50 mg/kg では腫瘍縮小がみられた。

タスルグラチニブの 1.0 及び 10 μmol/L の濃度において，受容体型チロシンキナーゼ以外の受容体，神経伝達物質トランスポーター及びイオンチャネルから成る 86 種の分子パネルに対して，10 μmol/L では BZD (peripheral)，D_1，5-HT_{1B}，sigma receptor 及び Na^+ channel (site2) に，1.0 μmol/L では sigma receptor のリガンド結合に対する 50%以上の阻害を示したが，これら以外

に顕著な結合阻害はみられなかった。

心血管系に対する評価として，in vitro 試験では，hERG チャネルを発現した CHO 細胞を用いた電気生理学的な影響を検討した。その結果，タスルグラチニブは，hERG カリウム電流を濃度依存的に阻害し，最高濃度である 29.37 μmol/L で 48.50%阻害した。テレメトリー送信機を埋め込んだ覚醒イヌを用いてタスルグラチニブ（フリー体として，0，30，100 及び 300 mg/kg）を経口投与し，心血管系への影響を検討した。300 mg/kg では，心拍数の上昇，PR 間隔の短縮，QTc の延長が投与後 2 時間以内に認められたが，同時刻帯に認められた頻回嘔吐による心拍数増加，心拍数増加に対する適応反応である PR 間隔短縮，タスルグラチニブの hERG 阻害作用は弱く，かつ大きな心拍数増加による補正不十分な結果としての QTc 延長であると説明できることから，300 mg/kg まで心血管系にタスルグラチニブの直接作用に起因する変化はみられなかったと考えられた。また，イヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験（コハク酸塩として 0，1.5，5.4，27 mg/kg）においても，投与 23 日目又は 24 日目に心電図に対する影響を検討した（27 mg/kg 群は毒性のため 13 日目が最終投与であったが，同タイミングで心電図を測定した）。その結果，高用量として設定した 27 mg/kg まで心電図の変化はみられなかった。中枢神経系及び呼吸系に対する評価は，ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験（コハク酸塩として 0，2，7，27 mg/kg）において，投与初日又は 2 日目又は 3 日目に実施した。その結果，高用量として設定した 27 mg/kg まで，いずれの検査項目にも変化はみられなかった。

以上の非臨床薬理試験の結果から，タスルグラチニブは *FGFR* 遺伝子異常を有する進行・再発固形がんに対して，FGFR のリン酸化阻害に基づく新たな治療選択肢を提供できることが示唆された。また，タスルグラチニブの心血管系，呼吸系及び中枢神経系への影響は小さいことが示唆された。

2.6.2.7 図表

図表は，本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, Shirota T, Hama N, Nakamura H, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. Hepatology. 2014;59:1427–34.

Blanc J, Geney R, Menet C. Type II kinase inhibitors: an opportunity in cancer for rational design. Anticancer Agents Med Chem. 2013;13:731–47.

Cristinziano G, Porru M, Lamberti D, Buglioni S, Rollo F, Amoreo CA, et al. FGFR2 fusion proteins drive oncogenic transformation of mouse liver organoids towards cholangiocarcinoma. J Hepatol. 2021;75:351–62.

Dutt A, Ramos AH, Hammerman PS, Mermel C, Cho J, Sharifnia T, et al. Inhibitor-sensitive FGFR1 amplification in human non-small cell lung cancer. PLoS One. 2011;6:e20351.

Farshidfar F, Zheng S, Gingras MC, Newton Y, Shih J, Robertson AG, et al. Integrative genomic analysis of cholangiocarcinoma identifies distinct IDH-mutant molecular profiles. Cell Rep. 2017;18:2780–94.

Koyama T, Shimizu T, Iwasa S, Fujiwara Y, Kondo S, Kitano S, et al. First-in-human phase I study of E7090, a novel selective fibroblast growth factor receptor inhibitor, in patients with advanced solid tumors. Cancer Sci. 2020;111:571–9.

Kunii K, Davis L, Gorenstein J, Hatch H, Yashiro M, Di Bacco A, et al. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. Cancer Res. 2008;68:2340–8.

Liao JJ. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. J Med Chem. 2007;50:409–24.

Mahipal A, Tella SH, Kommalapati A, Anaya D, Kim R. FGFR2 genomic aberrations: Achilles heel in the management of advanced cholangiocarcinoma. Cancer Treat Rev. 2019;78:1–7.

Miyano SW, Yamamoto Y, Kodama K, Miyajima Y, Mikamoto M, Nakagawa T, et al. E7090, a novel selective inhibitor of fibroblast growth factor receptors, displays potent antitumor activity and prolongs survival in preclinical models. Mol Cancer Ther. 2016;15:2630–9.

Nakamura II, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. Nat Genet. 2015;47:1003–10.

Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. Oncogene. 2007;26:7158–62.

Tong JH, Lung RW, Sin FM, Law PP, Kang W, Chan AW, et al. Characterization of rare transforming KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. Cancer Biol Ther. 2014;15:768–76.

Traxler P, Furet P. Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors. Pharmacol Ther. 1999;82:195–206.

Williams SV, Hurst CD, Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. Hum Mol Genet. 2013;22:795–803.

Yue S, Li Y, Chen X, Wang J, Li M, Chen Y, et al. FGFR-TKI resistance in cancer: current status and perspectives. J Hematol Oncol. 2021;14:23.

Zhao Y, Adjei AA. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving beyond vascular endothelial growth factor. Oncologist. 2015;20:660–73.

Zuccotto F, Ardini E, Casale E, Angiolini M. Through the "gatekeeper door": Exploiting the active kinase conformation. J Med Chem. 2010;53:2681–94.

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 9
2.6.3.4 安全性薬理試験 10

2.6.3 薬理試験概要表
2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: Tasurgratinib succinate

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Pharmacodynamics (In Vitro Studies)					
Kinase inhibition profiling	Human (recombinant)/ 5 protein kinases Cell free kinase assay	in vitro	[redacted]	CBS-130198	4.2.1.1.1
Kinase inhibition profiling	Human (recombinant)/ 141 protein kinases Cell free kinase assay	in vitro	[redacted]	CBS-200137	4.2.1.1.2
Kinase inhibition profiling of tasurgratinib metabolites	Human (recombinant)/ 5 protein kinases Cell free kinase assay	in vitro	[redacted]	CBS-210205	4.2.1.1.3
Crystal structure analysis	Human (recombinant)/ FGFR1 X-ray crystal structural analysis	in vitro	[redacted]	W-20190756	4.2.1.1.4
Inhibition of cancer cell proliferation	Human/ SNU-16 (stomach), NCI-H1581 (lung), AN3 CA (uterus), and RT112/84 (bladder) Cell proliferation assay	in vitro	Eisai Co., Ltd.	M13021	4.2.1.1.5
Inhibition of cancer cell proliferation	Human/ SNU-16 (stomach) Cell proliferation assay	in vitro	Eisai Co., Ltd.	M16017	4.2.1.1.6
Inhibition of kinase phosphorylation in cancer cell	Human/ SNU-16 (stomach) Western blot analysis	in vitro	Eisai Co., Ltd.	M13017	4.2.1.1.7
Inhibition of anchorage-independent cell proliferation	Mouse/ NIH/3T3 stably transfected with *FGFR2*-fusion genes, and with *KRAS* (G12V)	in vitro	Eisai Co., Ltd.	W-20220553	4.2.1.1.8
Inhibition of bFGF- or VEGF-driven endothelial cell proliferation	Human/ HUVEC Cell proliferation assay	in vitro	Eisai Co., Ltd.	M13022	4.2.1.1.9

Test Article: Tasurgratinib succinate

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Pharmacodynamics (In Vivo Studies)					
Effects on tumor growth in human cancer xenograft model in mice	Mouse/ BALB/c-nu Human/ SNU-16 (stomach)	PO	Eisai Co., Ltd.	M13026	4.2.1.1.10
Effects on tumor growth in human cancer xenograft model in mice	Mouse/ BALB/c-nu Human/ NCI-H1581 (lung)	PO	Eisai Co., Ltd.	M13027	4.2.1.1.11
Effects on tumor growth in mouse allograft model in mice	Mouse/ BALB/c-nu Mouse/ NIH/3T3 stably transfected with *FGFR2-KCTD1* fusion gene	PO	Eisai Co., Ltd.	M21001	4.2.1.1.12
Effects on tumor growth in mouse allograft model in mice	Mouse/ BALB/c-nu Mouse/ NIH/3T3 stably transfected with *FGFR2-BICC1* type2 fusion gene	PO	Eisai Co., Ltd.	W-20220551	4.2.1.1.13
Effects on tumor growth in mouse allograft model in mice	Mouse/ BALB/c-nu Mouse/ NIH/3T3 stably transfected with *FGFR2-TXLNA* fusion gene	PO	Eisai Co., Ltd.	W-20220552	4.2.1.1.14
Effects on tumor growth in patient-derived xenograft model in mice	Mouse/ BALB/c-nu Human/ CC6204 (bile duct)	PO	[redacted]	E0606-U1511	4.2.1.1.15
Secondary Pharmacodynamics					
Effects on a panel of 86 cellular targets (receptors, channels, and transporters)	High-throughput profile study (ExpresSProfile) using a panel of cellular targets	in vitro	[redacted]	100006525	4.2.1.2.1
Safety Pharmacology					
Effects on hERG potassium currents in CHO cells expressing hERG channels	hERG channel expressing CHO cells	in vitro	[redacted]	SBL038-096	4.2.1.3.1
An exploratory study to assess effects on heart rate, blood pressure, and electrocardiographic	Dog/Beagle	PO	Eisai Co., Ltd.	T12101	4.2.1.3.2

Test Article: Tasurgratinib succinate

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
parameters by oral administration in conscious dogs					
A 4-week oral toxicity study with 4-week recovery period in dogs	Dog/Beagle	PO	Eisai Co., Ltd.	T13032	4.2.3.2.5
A 4-week oral toxicity study with 4-week recovery period in rats	Rat/ Crl:Wistar Hannover	PO	Sunplanet Co., Ltd.	K13100	4.2.3.2.2

CHO = Chinese hamster ovary, CTD = Common Technical Document, FGFR = fibroblast growth factor receptor, hERG = human ether-à-go-go related gene, HUVEC = human umbilical vein endothelial cell, PO = oral

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article: Tasurgratinib succinate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Sex	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Kinase inhibition profiling	IC_{50} values were determined by measuring cell-free kinase activities using ELISA or MSA optimized for each kinase.	Human/ 5 protein kinases (recombinant) Human/ 141 protein kinases (recombinant) Human/ 5 protein kinases (recombinant)	NA	in vitro (cell free)	0.08 – 1000 nmol/L 0.28 – 9200 nmol/L 0.03 – 1000 nmol/L	IC_{50} values of tasurgratinib versus FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 were 0.89 to 1.1, 0.38 to 0.56, 1.3 to 1.8, 94 to 120 nmol/L, respectively. The kinases with IC_{50} values below 20 nmol/L other than FGFRs include DDR1/2, RET, mutant RETs, VEGFR1, VEGFR2. IC_{50} values of a major metabolite of tasurgratinib (M2) versus FGFR1, FGFR2, FGFR3, and FGFR4 were 0.95, 0.37, 1.4, and 93 nmol/L, respectively.	CBS-130198, CBS-200137, CBS-210205
Crystal structure analysis	Recombinantly expressed human FGFR1 including kinase domain (Ser461-Asp774) was crystalized with tasurgratinib. The resulting crystals of kinase-inhibitor complexes were subjected to x-ray structural analysis	Human/ FGFR1 (recombinant)	NA	in vitro (cell free)	NA	Tasurgratinib binds to the ATP-binding site and the neighboring allosteric region.	W-20190756

Test Article: Tasurgratinib succinate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Sex	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Inhibition of cancer cell proliferation	Inhibition of human cancer cells proliferation was measured by a colorimetric assay using WST-8.	Human/ SNU-16 (stomach), NCI-H1581 (lung), AN3CA (uterus), and RT112/84 (bladder)	NA	in vitro	0.78 – 400 nmol/L	IC_{50} values for SNU-16, NCI-H1581, AN3CA, and RT112/84 cells were 5.7, 7.2, 17, and 34 nmol/L, respectively.	M13021
Inhibition of cancer cell proliferation	Inhibition of human cancer cells proliferation was measured by a colorimetric assay using WST-8.	Human/ SNU-16 (stomach)	NA	in vitro	0.78 – 400 nmol/L	Tasurgratinib: IC_{50} = 7.2 nmol/L M2: IC_{50} = 10 nmol/L	M16017
Inhibition of kinase phosphorylation in cancer cell	Inhibition of the FGFR1-3 auto-phosphorylation in SNU-16 was evaluated by a western blot analysis.	Human/ SNU-16 (stomach)	NA	in vitro	0.4 – 100 nmol/L	Tasurgratinib inhibited phosphorylation of FGFRs in a concentration-dependent manner with an IC_{50} value of 1.2 nmol/L.	M13017
Inhibition of anchorage-independent cell proliferation	Inhibition of cells proliferation in soft ager medium was measured by a colorimetric assay using WST-8.	Mouse/ NIH/3T3 expressing *FGFR2*-fusion genes (*FGFR2-AHCYL1*, *FGFR2-BICC1* type1, *FGFR2-BICC1* type 2, *FGFR2-TXLNA* and *FGFR2-KCTD1*) and *KRAS* (G12V)	NA	in vitro	0.14 – 1000 nmol/L	IC_{50} values for NIH/3T3 expressing *FGFR2-AHCYL1*, *FGFR2-BICC1* type1, *FGFR2-BICC1* type 2, *FGFR2-TXLNA*, *FGFR2-KCTD1*, and *KRAS* (G12V) were 0.78 2.4, 16, 2.3, 2.1, and 170 nmol/L, respectively.	W-20220553

Test Article: Tasurgratinib succinate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Sex	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Inhibition of bFGF- or VEGF-driven endothelial cell proliferation	Inhibition of bFGF- or VEGF-driven HUVEC proliferation were measured by a colorimetric assay using WST-8.	Human/ HUVEC	NA	in vitro	1.95 – 1000 nmol/L	IC_{50} values for bFGF- and VEGF-driven HUVEC proliferation were 22, and 280 nmol/L, respectively.	M13022
Effects on tumor growth in human cancer xenograft model in mice	Xenografts were generated by SC inoculation of the cancer cells. Dosing was initiated after 5 days. The TV and the body weight of mice were measured twice a week.	Mouse/ BALB/c-nu Human/ SNU-16 (stomach)	6 female / group	PO	6.25, 12.5, 25, 50 mg/kg, QD×14	Tasurgratinib showed significant antitumor activity in a dose-dependent manner without severe BWL.	M13026
Effects on tumor growth in human cancer xenograft model in mice	Xenografts were generated by SC inoculation of the cancer cells. Dosing was initiated after 9 days. The TV and the body weight of mice were measured twice a week.	Mouse/ BALB/c-nu Human/ NCI-H1581 (lung)	6 female / group	PO	6.25, 12.5, 25, 50 mg/kg, QD×14	Tasurgratinib showed significant tumor growth inhibition in a dose-dependent manner without severe BWL.	M13027
Effects on tumor growth in mouse allograft model in mice	Allografts were generated by SC inoculation of the cancer cells. Dosing was initiated after 8 days. The TV and the body weight of mice were measured on Days 1, 3, 5 and 8.	Mouse/ BALB/c-nu Mouse/ NIH/3T3 expressing *FGFR2-KCTD1*	6 female / group	PO	6.25, 12.5, 25, 50 mg/kg, QD×7	Tasurgratinib showed significant antitumor activity in a dose-dependent manner without severe BWL.	M21001

Test Article: Tasurgratinib succinate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Sex	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Effects on tumor growth in mouse allograft model in mice	Allografts were generated by SC inoculation of the cancer cells. Dosing was initiated after 6 days. The TV and the body weight of mice were measured on Days 1, 3, 5 and 8.	Mouse/ BALB/c-nu Mouse/ NIH/3T3 expressing *FGFR2-BICC1* type2	5 female / group	PO	6.25, 12.5, 25, 50 mg/kg, QD×7	Tasurgratinib showed significant antitumor activity in a dose-dependent manner without severe BWL.	W-20220551
Effects on tumor growth in mouse allograft model in mice	Allografts were generated by SC inoculation of the cancer cells. Dosing was initiated after 6 days. The TV and the body weight of mice were measured on Days 1, 3, 5, 8 and 12.	Mouse/ BALB/c-nu Mouse/ NIH/3T3 expressing *FGFR2-TXLNA*	5 female / group	PO	6.25, 12.5, 25, 50 mg/kg, QD×11	Tasurgratinib showed significant antitumor activity in a dose-dependent manner without severe BWL.	W-20220552
Effects on tumor growth in patient-derived xenograft (PDx) model in mice	PDxs were generated by SC inoculation of the tumor fragments. Dosing was initiated after 32 days. The TV and the body weight of mice were measured twice a week.	Mouse/ BALB/c-nu Human/ CC6204 (bile duct)	7 female / group	PO	5, 15, 50 mg/kg, QD×15	Tasurgratinib showed significant antitumor activity in dose of 15 and 50 mg/kg. One mouse was removed from each of 15 and 50 mg/kg groups due to severe BWL.	E0606-U1511

BWL = body weight loss, ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, HUVEC = human umbilical vein endothelial cell, IC_{50} = 50% inhibitory concentration, MSA = mobility shift assay, PDx = patient-derived xenograft, PO = oral, QD×n = once daily for n days, SC = subcutaneous, TV = tumor volume

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test Article: Tasurgratinib succinate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Sex	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Effects on a panel of 86 cellular targets (receptors, channels, and transporters)	Radioactive ligand binding assay for a panel of 86 cellular targets (ExpresSProfile) known to play important biological roles including receptors, neurotransmitter transporters, and ion channels.	NA	NA	in vitro	1, 10 µmol/L	Tasurgratinib showed significant (>50%) inhibition against the ligand bindings of benzodiazepine receptor (peripheral) (87.5%), dopamine receptor D_1 (55.1%), serotonin receptor 5-HT_{1B} (68.3%), sigma receptor (89.4%), and Na^+ channel site2 (71.3%) at a concentration of 10 µmol/L, and sigma receptor (54.5%) at a concentration of 1.0 µmol/L.	100006525

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: Tasurgratinib succinate

Type of Study	Methods	Species/ Strain	Number/ Sex	Route	Dose or Concentration	Observations	Study/ Report No.
Effects on hERG potassium current (in vitro)	Whole-cell patch clamp method	hERG channel expressing CHO cells	5 cells/concentration	In vitro	0, 3, 10, 30 µmol/L	Actual concentrations: 2.70, 9.45, and 29.37 µmol/L, % of inhibition: 5.40%, 19.56%, and 48.50%, IC_{50}: ≥ 29.37 µmol/L	SBL038-096
Effects on CV system in dogs in single dose study	Telemetry system for blood pressure, heart rate, ECG recording	Dog/Beagle	3 female/dose	PO	0, 30, 100, 300 mg/kg	All doses: no CV changes	T12101
Effects on CV system in dogs in 4-week toxicity study	Standard limb leads recording method	Dog/Beagle	3 or 5/group/sex	PO	0, 1.5, 5.4, 27 mg/kg	All doses: no ECG changes	T13032
Effects on CNS and respiratory parameters in rats in 4-week toxicity study	FOB test for CNS and whole body plethysmography for respiratory functions	Rat/Wistar Hannover	6 male/group	PO	0, 2, 7, 27 mg/kg	All doses: no effects on CNS or respiratory functions	K13100

CHO = Chinese hamster ovary, CNS = central nervous system, CV = cardiovascular, ECG = electrocardiogram, FOB = functional observation battery, hERG = human ether-à-go-go-related gene, PO = oral.