目次

略号一覧表 3
2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.1.1 序文 5
2.4.1.2 有効成分／試験薬物 6
2.4.1.3 非臨床試験の概要 6
2.4.1.3.1 薬理試験 6
2.4.1.3.2 薬物動態試験 7
2.4.1.3.3 毒性試験 8
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.1.1 In vitro 薬理試験 8
2.4.2.1.2 Ex vivo 薬理試験 9
2.4.2.1.3 In vivo 薬理試験 9
2.4.2.2 副次的薬理試験 10
2.4.2.3 安全性薬理試験 10
2.4.2.4 薬力学的相互作用 11
2.4.3 薬物動態試験 11
2.4.3.1 分析法 11
2.4.3.2 吸収 11
2.4.3.2.1 単回投与試験 11
2.4.3.2.2 反復投与試験 12
2.4.3.3 分布 12
2.4.3.4 代謝 12
2.4.3.5 排泄 13
2.4.3.6 薬物間相互作用 13
2.4.4 毒性試験 14
2.4.4.1 単回投与毒性試験 14
2.4.4.2 反復投与毒性試験 14
2.4.4.2.1 ラットにおける反復投与毒性試験 14
2.4.4.2.2 イヌにおける反復投与毒性試験 15
2.4.4.3 遺伝毒性試験 17
2.4.4.4 がん原性試験 17
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 17
2.4.4.6 局所刺激性試験 18
2.4.4.7 その他の毒性試験 18
2.4.4.7.1 不純物に関する試験 18
2.4.4.7.2 光毒性試験 18

2.4.5 総括及び結論 18
2.4.6 参考文献一覧 23

表

表 2.4.4.7-1 臨床用量（5 mg）におけるフルキンチニブの曝露マージン 21
表 2.4.4.7-2 臨床用量（5 mg）における M11 の曝露マージン 22

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
	英語	日本語
A/G	albumin/globulin ratio	アルブミン／グロブリン比
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the concentration-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	－
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CAM	chorioallantoic membrane	（鶏卵）漿尿膜
CD	cluster of differentiation	－
CFDA	China Food and Drug Administration	中国食品医薬品局
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CHOL	cholesterol	コレステロール
C_{max}	maximum observed concentration	最高血漿中濃度
CMC-Na	sodium carboxymethyl cellulose	カルボキシメチルセルロースナトリウム
cMET	hepatocyte growth factor receptor	肝細胞増殖因子（HGF）受容体
CT26.WT	Colon carcinoma cells	（マウス結腸癌細胞）
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
ECG	electrocardiogram	心電図
EGFR	epidermal growth factor receptor	上皮成長因子受容体
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK-293	human embryonic kidney-293 cells	ヒト胎児腎 293 細胞
hERG	human ether-à-go-go-related gene	human ether-a-go-go 関連遺伝子
HNSTD	highest non-severely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonization	医薬品規制調和国際会議
LOAEL	Lowest-Observed-Adverse-Effect Level	最小毒性量
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーションカウンター
M11	metabolite of fruquintinib (also known as HM5025423 or M379-3)	フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）
MATE	multidrug and toxin extrusion transporter	－
MHRA	Medicines and Healthcare Products Regulatory	英国医薬品庁
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NMPA	national medical products administration	中国国家医薬品局
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect Level	無毒性量
OAT	organic anion transporter	－
OATP	organic anion transporting polypeptide	－
OCT	organic cation transporter	－
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構

略号一覧表（続き）

略号	略していない表現又は説明	
	英語	日本語
P38	P38 mitogen-activated protein kinase	P38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
P_{app}	apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
$P_{app\ A>B}$	apparent permeability coefficient from apical side to basolateral side	（頂端側膜側から基底膜側への）見かけの透過係数
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PD-1	programmed death-1	－
PD-L1	programmed death-ligand 1	－
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白質
PDGFRβ	platelet-derived growth factor receptor beta	血小板由来増殖因子受容体 β
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
R_B	blood-to-plasma concentration ratio	血液／血漿中濃度比
STD_{10}	severely toxic dose in 10% of the animals	供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量
TG	Triglycerides	トリグリセリド
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
US FDA	United States Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor	血管内皮増殖因子受容体

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

2.4.1.1 序文

フルキンチニブ（HMPL-013/TAK-113）は、血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）-1、-2 及び-3 に対して高い選択性を示す強力なチロシンキナーゼ阻害剤である。VEGFR を介した血管内皮増殖因子（VEGF）によるシグナル伝達は、腫瘍血管新生及び腫瘍増殖において重要な役割を果たし、VEGF シグナル伝達経路は結腸・直腸癌を含む抗癌治療標的として広く認められている。フルキンチニブは現在、結腸・直腸癌、胃癌、子宮内膜癌及び乳癌を含む多数の固形癌を対象として開発中である。

フルキンチニブの臨床推奨用法・用量は 5 mg を 1 日 1 回、3 週間経口投与／1 週間休薬の 28 日間の投与サイクルである。フルキンチニブの予定する適応は、転移性結腸・直腸癌患者の治療である。

フルキンチニブは、VEGFR 特異的なキナーゼを選択的に阻害することによって、腫瘍血管新生を効果的に阻害することができる[1][2]。異常な血管新生は、肺、胃、乳房、子宮頸部、結腸直腸、頭頸部、肝臓、卵巣、膵臓、前立腺、腎臓などに発生するがんや、消化管、膵島細胞由来の神経内分泌腫瘍などで広く認められている。低酸素状態で急速に増殖する腫瘍は、内皮細胞増殖を刺激する様々な血管新生促進性増殖因子を分泌し、栄養と酸素の両方を供給するために腫瘍に過剰な新しい血管を形成させる。これらの急速に形成された血管系は、多くの場合細胞間の結合が粗く、漏出性であり、腫瘍細胞が滲出して循環し、腫瘍転移に至る。血管新生に関連する主要な成長因子の 1 つは腫瘍から分泌される VEGF であり、VEGF は内皮細胞表面の VEGFR に結合して VEGFR シグナル伝達経路を活性化し、内皮細胞を増殖させる。VEGF/VEGFR シグナル伝達経路の阻害は、腫瘍血管新生を阻害し、腫瘍への栄養及び酸素供給を妨げることが示されている[3]。

VEGF に対する高度に選択的なモノクローナル抗体であるベバシズマブの成功により、抗癌治療標的としての VEGF/VEGFR が検証され、いくつかのがん種に対する標準治療を変化させた。経口低分子 VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤においても、腎淡明細胞癌及び消化管間質腫瘍に対するスニチニブ[4]、肝細胞癌及び腎細胞癌に対するソラフェニブ[5]、結腸・直腸癌に対するレゴラフェニブ[6][7]などの初期世代の薬剤が同様に効果を示した。しかし、これらの初期世代の VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤のほとんどは、複数の標的をターゲットとするマルチキナーゼ阻害剤であり、管理困難な「オフターゲット」毒性が発現するという問題がある[4][5][6][7][8]。したがって、安全性及び忍容性が改善され、効くべきがん種に確実に抗腫瘍効果を示す、強力かつより選択的な VEGFR 阻害剤が強く望まれる。

フルキンチニブはオンコロジー領域での開発を目的としていることから、非臨床開発プログラムは日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S9 ガイダンス（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン）及び ICH S9 に関する質疑応答集に従ってデザインした。薬理試験は、種々の細胞株を用いた in vitro 試験、ex vivo モデルを用いた血管新生試験、並びに異種移植及び同系腫瘍モデルを用いた in vivo 試験で実施した。また、ヒトにおけるフルキンチニブの主要代謝物である M11（HM5025423）について in vitro 薬理評価を実施した。

In vitro 及び in vivo 薬物代謝試験の結果から、ヒト肝ミクロソームで生成されるフルキンチニブの代謝物は、ラット、イヌ及びサル肝ミクロソームで認められるものと類似しており、ヒト

特異的代謝物は認められなかった。したがって、毒性評価にはSprague Dawleyラット及びビーグル犬を選択した。これら動物種及び系統では、種々の医薬品に対する反応性及び多くの背景データが得られており、所見の評価及びヒトへの外挿性の評価に利用可能である。

非臨床試験の投与経路は、ヒトで予定されている投与経路である経口投与を採用した。

フルキンチニブの開発を裏付けるための非臨床安全性試験は、米国食品医薬品局（US FDA）、中国国家医薬品局〔NMPA、旧中国食品医薬品局（CFDA）〕、経済協力開発機構（OECD）及び／又は英国医薬品庁（MHRA）の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に則り、中国、米国又は英国で実施した。

試験受託機関及び申請者が実施した非GLP試験は、得られた結果の完全性及び妥当性を保証するため、確立された標準操作手順書、管理及び承認された試験方法に従って実施した。

2.4.1.2 有効成分／試験薬物

有効成分はフルキンチニブである。市販予定製剤は、有効成分として5 mgのフルキンチニブ及び添加剤として結晶セルロース、トウモロコシデンプン、タルクを含有した混合物を、1号硬ゼラチンカプセルに充てんしたものである。また、減量を容易にするため、有効成分として1 mgのフルキンチニブを含むカプセルも市販予定である。1 mgカプセルは、[redacted] 3号硬ゼラチンカプセルに充てんしたものである。

非臨床試験と臨床試験で使用したフルキンチニブの製剤は添加剤のみが異なる。マウス、ラット及びモルモットを用いた薬物動態（PK）試験及びトキシコキネティクス（TK）試験に使用した非臨床経口投与用の製剤組成は、非臨床薬理試験及び毒性試験で使用した製剤組成と同じであり、フルキンチニブを0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC-Na）溶液に懸濁したものである。イヌを用いた経口PK及びTK試験では、毒性試験で使用した製剤と同じ成分（CMC-Na又はカプセル）からなる製剤を用いた。

原薬の規格に、ICH Q3A(R2) に基づく安全性確認の必要な閾値である0.15%を超える不純物はなかった。さらに、フルキンチニブの合成に使用される全ての原材料、中間体及び試薬、並びに潜在的不純物について、[redacted] v[redacted] 及び [redacted] v[redacted] の両バージョンを用いて、遺伝毒性の可能性をICH M7(R1)に従って評価した。特定されたすべての潜在的な遺伝毒性不純物は、パージデータ及び／又はパージファクター評価に基づき、ICH M7(R1)に示される毒性学的懸念の閾値に基づく許容摂取量を下回るレベルまで製造工程で効果的に除去されている。

2.4.1.3 非臨床試験の概要

2.4.1.3.1 薬理試験

フルキンチニブの活性を評価した薬理試験の概要を2.6.2.1に、完了した試験の一覧を表2.6.2.1-1に示す。

フルキンチニブの効力を裏付けるin vitro及びex vivo薬理試験には以下を含む：1）VEGFR-1、-2及び-3を含む264種類のキナーゼパネルに対するフルキンチニブの活性及び選択性の検討、2）VEGFRリン酸化、VEGF依存性の下流シグナル伝達、細胞増殖及び管腔形成に対する作用の検討、3）漿尿膜（CAM）血管新生モデルにおける血管形成に対する作用の検討、4）細胞増殖及び生存アッセイを用いたヒト正常細胞株及び腫瘍細胞株パネルにおける細胞毒性作用の検討。

フルキンチニブの代謝物である M11 を用いた主な in vitro 薬理試験には以下を含む：1）VEGFR2 キナーゼに対する阻害活性の検討、2）細胞での VEGFR リン酸化に対する作用の検討。

In vivo におけるフルキンチニブの効力を裏付ける試験には以下を含む：1）ヌードマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化に対する作用の検討、2）ヒト結腸腺癌細胞株、非小細胞肺癌細胞株、腎淡明細胞癌細胞株及び胃腺癌細胞株を移植したヌードマウス異種移植モデルにおける有効性の検討、3）ヌードマウス皮下異種移植腫瘍組織における血管新生マーカーCD31 の発現に及ぼす作用の検討。

フルキンチニブの副次的薬理作用を in vitro で評価し、受容体、トランスポーター及びイオンチャネルを含む 87 種類の標的からなる広範な薬理パネルを用いて、標的外の阻害活性を評価した。

安全性薬理試験として、フルキンチニブ及び M11 の human ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネル活性の in vitro 評価（いずれも US FDA 及び OECD GLP 適用）、心血管系及び呼吸系に関する in vivo 評価として、麻酔イヌを用いた心血管系及び呼吸系への影響（NMPA GLP 適用）、並びにイヌを用いた 13 週間毒性試験の一環として心電図（ECG）、呼吸数、パルスオキシメトリー及び血圧を評価した（US FDA 及び OECD GLP 適用）。また、イヌを用いた 4 週間及び 39 週間反復投与毒性試験（NMPA GLP 適用）でも ECG を測定した。さらに、中枢神経系機能に関する in vivo 評価として、マウス単回投与後に Irwin 行動評価試験及びポールクライミング試験（NMPA GLP 適用）、並びにイヌ 13 週間毒性試験（US FDA 及び OECD GLP 適用）の一環として単回及び反復投与後に神経学的検査を実施した。

In vivo における薬力学的薬物相互作用を、抗 programmed death-ligand 1（PD-L1）抗体、抗 programmed death-1（PD-1）抗体、イリノテカン／フルオロウラシル、又はオキサリプラチン／フルオロウラシルとフルキンチニブを併用投与したマウス結腸癌同系モデル（CT26.WT）を用いて評価した。また、上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害剤（ゲフィチニブ又は theliatinib）又は肝細胞増殖因子受容体（cMET）阻害剤（savolitinib）とフルキンチニブを併用投与した非小細胞肺癌異種移植モデルでも in vivo における薬力学的薬物相互作用を評価した。

2.4.1.3.2 薬物動態試験

実施したフルキンチニブの PK 試験の概要を 2.6.4.1 に、完了した試験の一覧を 2.6.5.1 に示す。

フルキンチニブ及び／又はその代謝物を用いた主な in-vitro PK 試験には以下を含む：1）ヒト結腸癌由来細胞（Caco-2 細胞）膜透過性及び P-糖蛋白質（P-gp）及び breast cancer resistance protein（BCRP）の基質評価、2）血漿蛋白結合率及び血球移行、3）肝ミクロソームへの結合率、4）肝ミクロソームにおける安定性、5）代謝経路の解明及び代謝物の同定、6）Organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 又は OATP1B3 の基質評価、7）P-gp に対する阻害能、8）BCRP に対する阻害能、9）チトクローム P450（CYP）に対する可逆的阻害作用、10）CYP に対する時間依存的阻害作用、11）CYP3A4、CYP2P6 及び CYP1A2 の誘導作用、12）ヒト胎児腎 293 細胞（HEK-293）に発現させた各トランスポーター〔OATP1B1、OATP1B3、organic anion transporter（OAT）1、OAT3、organic cation transporter（OCT）2、multidrug and toxin extrusion transporter（MATE）1 及び MATE2-K〕に対する阻害作用。

主な in vivo PK 試験には以下を含む：1）マウス、ラット及びイヌに経口又は静脈内単回投与及び／又は反復投与したときの吸収及びバイオアベイラビリティ、2）マウス、ラット及びイヌにおける PK、3）ラット、モルモット及びイヌにおける TK、4）有色及び白色ラットにおける放射能の組織分布、5）ラットにおける代謝物の同定、6）ラットにおける排泄及びマスバランス。PK 試験で使用した動物種及び系統は、毒性試験で使用した動物種及び系統に合わせて選択した。使用した動物種及び系統は ICR マウス、Sprague Dawley ラット、Hartley モルモット及びビーグル犬であった。

ヒト血漿中の M11 の AUC はフルキンチニブ由来の総 AUC の 10%超であったことから、CYP 及びトランスポーターを介した薬物動態学的薬物相互作用の可能性を明らかにするため、フルキンチニブ及び M11 を用いた in vitro 試験を実施した。

2.4.1.3.3 毒性試験

フルキンチニブの毒性試験の概要を 2.6.6.1 に、完了した試験の一覧を表 2.6.6.1-1 に示す。

フルキンチニブの毒性試験として、ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験、ラット及びイヌを用いたそれぞれ最長 26 週間及び 39 週間の反復投与毒性試験、一連の in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験、ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する毒性試験、ラットを用いた胚・胎児発生毒性試験、並びにモルモットを用いた光毒性試験を実施した。これらの試験は、US FDA、NMPA、OECD 及び／又は MHRA の GLP に従って、中国、米国又は英国で実施した。免疫毒性及び局所刺激性は、ラット及びイヌを用いた GLP 反復投与毒性試験の一環として評価した。

NMPA GLP 規則に従って実施した in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験、並びに胚・胎児発生毒性試験を US FDA、OECD 及び／又は MHRA の GLP 規則に従って再度実施し、本申請資料に示した。

フルキンチニブは進行癌患者のみを対象としているため、ICH S9 に準拠して、がん原性試験は実施しなかった。

2.4.2 薬理試験

フルキンチニブ及び M11 を用いた効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験の概要を 2.6.2.1 に、試験の一覧を表 2.6.2.1-1 に示す。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 In vitro 薬理試験

In vitro 試験では、フルキンチニブは高い選択性を示し、主に VEGFR ファミリー受容体である VEGFR-1、-2 及び-3 を標的とし、50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 33、35 及び 0.5 nM であった。キナーゼ選択性試験から、フルキンチニブはサイクリン依存性キナーゼ（CDK）1、2 及び 5、血小板由来増殖因子受容体 β（PDGFRβ）、EGFR、cMET などの細胞周期又は細胞増殖に関連するキナーゼを阻害せず、264 種類のキナーゼパネルにおける IC_{50} は 10 μM を超えていたことから、高いキナーゼ選択性が確認された。

フルキンチニブは、VEGFR2 を過剰発現させた改変細胞株 HEK-293-KDR において、VEGFR キナーゼを細胞レベルで阻害した。フルキンチニブは、VEGF-A 刺激による VEGFR2 のリン酸化を 0.0006 μM の IC_{50} で抑制し、プロテインキナーゼ B（AKT）、細胞外シグナル調節キナー

ゼ（ERK）、Src キナーゼ及び P38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（P38）などの下流シグナル分子のリン酸化を阻害した。同様に、初代培養ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）において、フルキンチニブは VEGF-A 刺激による VEGFR2 及びその下流シグナル分子の活性化を阻害した。M11（ヒト血漿中で認められたフルキンチニブの主要な循環血中代謝物）も評価したところ、VEGFR2 キナーゼ活性及び VEGFR2 リン酸化を阻害したことから、M11 は活性を有する代謝物であることが示された。しかし、フルキンチニブの活性代謝物 M11 の細胞における活性はフルキンチニブの 1/10 であったことから、M11 はフルキンチニブと比較して有効性に大きく寄与しないと考えられる。

フルキンチニブによる VEGFR2 経路の阻害は細胞機能にも影響を及ぼした。フルキンチニブは HUVEC の VEGF-A 依存性増殖を 1.6 nM の IC_{50} で抑制した。フルキンチニブによる VEGFR シグナル伝達の阻害は、VEGF-A/C 依存性の HUVEC 増殖を効果的に阻害しただけでなく、血管新生に関連する VEGF シグナル伝達も阻害した。

VEGFR キナーゼに対する選択性と一致して、フルキンチニブの細胞毒性は低いことが認められた。11 種類のヒト腫瘍細胞株及び 1 種類の正常ヒト細胞株を用いた細胞毒性試験の結果、初代培養 HUVEC（IC_{50}=18.7 μM）を含む 12 種類の細胞株に対して弱い直接殺細胞効果のみが認められた（ほとんどの IC_{50} は 30 μM 以上）。オンターゲット効果である VEGF 依存性 HUVEC 増殖抑制（IC_{50}=1.6 nM）と比較して、マージンが大きい（1 万倍超）ことは、オフターゲット効果の可能性が非常に小さいことを示している。対照的に、同じ試験において、スニチニブはこれらの細胞株に対して直接殺作用を示し、ヒト卵巣癌細胞（SKOV-3）（IC_{50}>30 μM）を除いて、IC_{50} の範囲は 3.5～15.5 μM であったことから、スニチニブがオフターゲット由来のより強力な細胞毒性を有することが示された。これらの結果から、フルキンチニブは VEGFR ファミリーのキナーゼを標的とする選択性の高い抗血管新生阻害薬であり、オフターゲット効果はほとんどないことが示唆された。

2.4.2.1.2 Ex vivo 薬理試験

In vitro で培養した HUVEC は、血管形態に類似した管状又は内腔様構造血管を形成でき、血管密度は血管新生阻害剤の効果を評価するために使用できる。フルキンチニブは 300 nM の濃度で HUVEC における管形成を 94%阻害した。さらに、CAM モデルにおいて、フルキンチニブは 0.1 nmol／卵以上の用量で血管新生を有意に抑制した。

2.4.2.1.3 In vivo 薬理試験

VEGFR2 の活性化は VEGF 誘導性血管新生において重要な役割を果たす。PK／PD 試験では、フルキンチニブはヌードマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化を薬物曝露量依存的に阻害することが示された。2.5 mg/kg では、阻害率は投与 1 時間後に 134.7%、4 時間後に 123.1%、その後 8 時間後に 85.8%に低下し、16 及び 24 時間後に 0%であった。フルキンチニブの血漿中濃度は、標的阻害と良好な相関を示した。

BALB/c ヌードマウスを用いた複数のヒト腫瘍モデルにおいて、フルキンチニブは用量依存的な抗腫瘍活性を示し、腫瘍組織において強力な血管新生阻害作用を示した。検討したすべての腫瘍モデルにおいて、2 mg/kg/日の低用量で統計学的に有意に腫瘍増殖を抑制した。標的阻害と抗腫瘍活性との PK/PD の関係に関しては、2.5 mg/kg のフルキンチニブ単回経口投与により、

VEGFR2 リン酸化が 80%超阻害され、その VEGFR 阻害作用は 8 時間を超えて持続した（176 ng/mL を超える血漿中濃度が持続した）。さらに、フルキンチニブの反復投与後のヒト非小細胞肺癌細胞（NCI-H460）及びヒト腎淡明細胞癌細胞（CaKi-1）腫瘍組織における CD31 発現の用量依存的な抑制は、フルキンチニブの抗腫瘍活性が抗血管新生と密接に関連している可能性を示した。

マウス結腸癌 CT26.WT モデルを用いて実施した試験では、フルキンチニブが抗腫瘍効果を示し、腫瘍組織中の免疫抑制性マクロファージ数を有意に減少させることが示された。さらに、抗 PD-L1 抗体又は抗 PD-1 抗体との併用により抗腫瘍効果が増強されたことから、腫瘍微小環境に対して免疫調節作用を有することが示唆された。

2.4.2.2 副次的薬理試験

パネルに含まれる 87 種類の受容体、イオンチャネル及び酵素のいずれについても 50%を超える阻害又は結合が認められなかったことから、フルキンチニブが標的外作用を示す可能性は低いことが示され、その高い選択性プロファイルが更に裏付けられた。

2.4.2.3 安全性薬理試験

フルキンチニブの hERG 阻害 IC_{50} は>13.08 μM（>5146 ng/mL）であり、これはヒトで予定されている臨床用量（5 mg/日）のヒト定常状態における非結合型の最高血漿中濃度（C_{max}）（13.7 ng/mL、総 C_{max} 291 ng/mL、蛋白結合率 95.3%）の 370 倍超であった。同様に M11 は hERG チャネルを阻害せず、その IC_{50} は>6.05 μM であり、これは M11 のヒト定常状態における非結合型 C_{max}（1.8 ng/mL、総 C_{max} 77.4 ng/mL、蛋白結合率 97.7%）の 1000 倍超であった。このことから、臨床的に意味のある曝露量では、フルキンチニブ及びそのヒト主要代謝物 M11 は hERG カリウムチャネルに対して有意な阻害作用を示さず、QTc 延長の可能性は低いことが示唆された。

In vivo 安全性薬理試験では、マウスに 0.5～10 mg/kg の用量範囲でフルキンチニブを単回経口投与したとき、運動協調性又は行動に影響は認められなかった。また、ビーグル犬に 0.085～0.34 mg/kg の用量範囲でフルキンチニブを単回経口投与したところ、心血管系（ECG 及び血圧）及び呼吸系（呼吸数）に対する有害作用は認められなかった。さらに、米国で実施したビーグル犬を用いた GLP 適用 13 週間毒性試験では、0.12 mg/kg/日の用量で投薬に起因する心血管系、呼吸系及び中枢神経系への影響は認められなかった。最高用量である 0.12 mg/kg/日における総 C_{max} 及び遊離型 C_{max}（投与 91 日でそれぞれ 105 及び 12 ng/mL）は、申請用量である 5 mg 投与時に予想されるフルキチニブの臨床 C_{max}（それぞれ 291 及び 13.7 ng/mL）と同程度であった。イヌを用いた 4 週間及び 39 週間反復投与毒性試験（NMPA GLP 適用）では ECG を測定し、4 週間反復投与毒性試験では最高用量群（0.3 mg/kg/日）まで ECG の変化は認められなかったが、39 週間反復投与毒性試験の最高用量群（0.2/0.12 mg/kg/日）の投与 39 週時に雄で心拍数の減少が認められた。この用量では、瀕死状態、水様便、摂餌量減少及び体重減少が認められ、忍容性は概して良好ではなく、心拍数減少は当該用量の動物の一般状態に関連した二次的な影響である可能性が示唆された。

これらの安全性薬理試験の結果から、フルキンチニブはヒトで予定されている臨床用量を投与した場合、心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対するリスクは比較的低いことが示唆された。

2.4.2.4 薬力学的相互作用

他の抗がん剤と併用したときのフルキンチニブの有効性を評価する追加の in vivo 試験を実施した。複数の非臨床腫瘍モデルにおいて、フルキンチニブは、種々の細胞傷害性化学療法（オキサリプラチン／フルオロウラシル／イリノテカン）、分子標的療法（EGFR 又は cMET 阻害剤）又は免疫チェックポイント阻害剤（抗 PD-L1 抗体又は抗 PD-1 抗体）との併用で、それぞれの単剤より強い抗腫瘍効果を示した。

2.4.3 薬物動態試験

フルキンチニブ及び／又はその代謝物を用いて実施した PK 試験の概要を 2.6.4.1 に、試験一覧を 2.6.5.1 に示す。

2.4.3.1 分析法

種々の生体マトリックス中でのフルキンチニブの安定性に関する検討、並びに種々の動物種を用いた PK 及び TK 試験のために分析法を確立した。主な非臨床毒性試験を実施するため、ラット、モルモット及びイヌの血漿中のフルキンチニブ及び／又は M11 をバリデート済みの高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）法及び超高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析（UPLC-MS/MS）法を用いて測定した（2.6.4.2）。すべての分析方法及び定量限界は、フルキンチニブの PK 及び TK を評価するうえで、十分な特異性及び感度を有していた。

[^{14}C]フルキンチニブを用いた試験では、尿、胆汁、ケージ洗浄液、血漿、糞抽出物及び投与検体に含まれる放射能は、液体シンチレーションカウンター（LSC）により測定した。組織中放射能濃度の測定は定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）法により行った。

2.4.3.2 吸収

Caco-2 細胞を用いて、フルキンチニブの膜透過性及び排出輸送を in vitro で検討した。フルキンチニブは見かけの透過係数（P_{app}）が高く（$P_{app\ A>B}$ は約 30×10^{-6} cm/s）、1 に近い排出比を示し、P-gp などの排出トランスポーターの基質である可能性は低いことが示された（2.6.4.3.1）。In vitro で認められた良好な透過性及び代謝安定性と一致して、マウス、ラット及びイヌを用いた PK 試験では、フルキンチニブの血漿クリアランスは低く（肝血流量の 20%未満）、経口バイオアベイラビリティは中等度（約 50%）であった（2.6.4.3.2）。

2.4.3.2.1 単回投与試験

マウス、ラット、モルモット及びイヌにフルキンチニブを単回静脈内投与又は単回経口投与したときの PK を評価した。フルキンチニブを単回経口投与したときの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）は、ラットでは 0.5～2 mg/kg の用量範囲で用量比を上回る増加を示したが、モルモットでは 25～100 mg/kg の用量範囲で用量を下回る増加が認められ、イヌでは 0.1～1 mg/kg の用量範囲で概して用量に比例した増加が認められた。イヌでは、フルキンチニブの PK パラメータに顕著な摂餌の影響又は性差は認められなかった。

2.4.3.2.2 反復投与試験

一般毒性試験、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験の一環として、フルキンチニブを反復経口投与したときの TK を検討した。フルキンチニブを反復経口投与したときの曝露量は、妊娠の有無にかかわらず、ラットでは概して用量比を下回る増加を示したが、イヌではほぼ用量に比例して増加が認められた（2.6.4.3.3）。ラット又はイヌにおけるフルキンチニブの曝露量に明らかな性差（2 倍未満）は認められなかった。ラット及びイヌにフルキンチニブを最長 26 週間及び 39 週間反復経口投与したとき、曝露量の顕著な蓄積は認められなかった。M11 の曝露量はフルキンチニブよりも低く、ラット及びイヌのいずれにおいても概ね用量に比例して増加し、明らかな性差は認められなかった。

2.4.3.3 分布

フルキンチニブ及び主代謝物 M11 の血漿蛋白結合率は、評価したすべての動物種（マウス、ラット、イヌ及びヒト）で高かった（2.6.4.4.1.1、2.6.4.4.1.2）。1、3 及び 10 μM における蛋白結合率は、それぞれマウスでは 91.2%、92.7%及び 92.8%、ラットでは 96.2%、95.6%及び 96.5%、イヌでは 87.3%、88.7%及び 88.2%、ヒト血漿中で 95.4%、95.3%及び 95.3%であった。1 μM における M11 の血漿蛋白結合率は、マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトで、それぞれ 96.8%、96.6%、94.8%、95.6%及び 97.7%と同程度であった。

フルキンチニブを 1 μM の濃度で血液に添加後 10 及び 60 分での血液／血漿中濃度比（R_B）はヒトでそれぞれ 0.458 及び 0.601、イヌでそれぞれ 0.851 及び 0.792、ラットでそれぞれ 0.709 及び 0.733 であった（2.6.4.4.1.3）。1 及び 10 μM の濃度におけるフルキンチニブのヒト肝ミクロソーム中での蛋白結合率は、極めて低いことが示された（2.6.4.4.1.4）。

Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブ 1 mg/kg（100 μCi/kg）を単回静脈内投与したとき、投与後 5 分から 48 時間までの放射能の R_B の平均値は 0.34～0.83（雌）及び 0.57～1.28（雄）であり、血球成分への顕著な結合はないと考えられた。

Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg（100 μCi/kg）を単回経口投与したとき、投与後 10 分から 48 時間までの放射能の R_B の平均値は 0.53～0.77（雌）及び 0.51～1.01（雄）であり、血球成分への顕著な結合はないと考えられた。また、組織中の総放射能は、系統や雌雄を問わず、主に代謝及び排泄器官（消化管、肝臓及び腎臓）に分布した（2.6.4.4.2）。脳内に認められた放射能はわずかであり（血漿中 AUC の 10%以下）、血液脳関門を介した分布は限定的であることが示唆された。Long-Evans ラットでは、メラニン含有組織（眼、ぶどう膜及び有色皮膚）に明らかな放射能の分布が認められたことから、[^{14}C]フルキンチニブ由来放射能のメラニン親和性が示唆された。投与後 168 時間までに、大部分の組織中の放射能濃度は定量不能となったことから、組織中の総放射能は速やかに消失することが示された。

2.4.3.4 代謝

複数の動物種の肝ミクロソームとインキュベートしたとき、フルキンチニブ及び主代謝物 M11 は非常に安定であった。

肝ミクロソーム中での代謝安定性から予測したフルキンチニブの全身クリアランスは、いずれの動物種においても肝血流量より低く、フルキンチニブの肝抽出率は低いことが示された（雄

サルでは中程度）。検討したすべての動物種でフルキンチニブのミクロソーム代謝に明らかな性差は認められなかった（雌サルでは未検討）。

フルキンチニブをラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームとインキュベーションしたとき、6 種類の主代謝物が認められた。これらの代謝物は、主に CYP による O-脱メチル化体（M1、M7 及び M11）、水酸化体（M2 及び M10）及びカルボン酸体（M9）であり、主に CYP によって代謝されると考えられた。ヒト肝ミクロソームで認められた代謝物の種類は他の動物種と同様であったが、各代謝物の相対量には差がみられた。ヒト特異的代謝物は確認されなかった。

ヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブの代謝には、複数の CYP が関与することが明らかになったが、CYP3A4/5 が主要な代謝酵素であると考えられた。

ヒト肝ミクロソームにおける主代謝物は M10 であり、ラット、イヌ及びサルと同様に、副次的代謝物として M1+M7 及び M2 が認められた。ラット肝ミクロソームでは、M1+M7 が主代謝物であった。また、ラットにフルキンチニブを経口投与したとき、M2 及び M11 が血漿中に認められた（2.6.4.5.2）。ヒト血漿中で最も多く認められたフルキンチニブの代謝物は M11（脱メチル体 HM5025423）であり、主に M10 由来であった。M10 は主に CYP3A4/5 により代謝された。フルキンチニブをヒト血漿及びヒト肝ミクロソームとインキュベートしたところ、少量の代謝物 M205 が認められた。ヒト肝ミクロソームにおける M205 の生成は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）に依存しなかったことから、フルキンチニブから M205 への代謝に CYP は関与しないことが示された。ヒト特異的代謝物は認められなかった。ラット及びイヌにおける代謝プロファイルがヒトに類似したことから、フルキンチニブの毒性試験に用いる動物種としてラット及びイヌの選択が妥当であると考えられた。また、代謝プロファイルに性差は認められなかった。

雌雄 Sprague Dawley ラットを用いて、[^{14}C]フルキンチニブの in vivo 代謝を検討した。ラットの血漿、胆汁、尿及び糞中で、未変化体のほかに 19 種類の代謝物が暫定的に同定された。フルキンチニブはラットにおいて大幅に代謝され、主要な第一相代謝経路は、1）N-又は O-脱メチル化、2）酸化、3）O-脱キナゾリン化であった。第二相代謝経路として、グルクロン酸抱合及び硫酸抱合が認められた。

2.4.3.5 排泄

Sprague Dawley ラットに経口投与したとき、フルキンチニブは主に糞中に排泄され、雌雄ラットの糞中排泄率は同程度であった（投与後 168 時間までの放射能の糞中排泄率は、雄及び雌でそれぞれ投与量の平均 69.65%及び 73.11%）（2.6.4.6.1）。ラットでは、未変化体として尿中に排泄されたのは投与量の 25%未満であったことから、尿排泄は主要な消失経路ではないことが示唆された。雌雄の胆管カニューレ挿入（BDC）ラットでは、尿、糞及び胆汁中にほぼ同量のフルキンチニブが排泄された（2.6.4.6.1.1）。

2.4.3.6 薬物間相互作用

フルキンチニブは P-gp 及び BCRP を用量依存的に阻害し、IC_{50} はそれぞれ 4.60 μM 及び 1.29 μM であった。M11 は BCRP を阻害したが（IC_{50}：1.03 μM）、P-gp に対しては顕著な阻害作用を示さなかった（IC_{50} >20 μM）。M9 は BCRP を阻害したが（IC_{50}：7.6 μM）、P-gp に対しては顕著な阻害作用を示さなかった（IC_{50} >20 μM）（2.6.4.7.1）。

フルキンチニブは、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K に対する明らかな阻害作用を示さなかった。一方、M11 は OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K を阻害したが、10 μM における阻害率は 40%未満であった（2.6.4.7.2）。

フルキンチニブは in vitro において P-gp 等の排出トランスポーターの基質である可能性は低く、OATP1B1 又は OATP1B3 の基質ではなかった。

フルキンチニブは、10 μM までの濃度で、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対して顕著な可逆的阻害作用を示さず（IC_{50} >10 μM）、CYP1A2、2B6 及び 3A4 に対して誘導作用を示さなかった。フルキンチニブは、10 μM の濃度で CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対して顕著な時間依存的阻害を示さなかった。同様に、M11 は、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 2E1 に対して顕著な可逆的阻害作用を示さなかった（IC_{50} >50 μM）。M11 は、CYP3A4/5 に対して弱い可逆的阻害作用を示した（IC_{50}：38 μM）。M9 及び M11 は、いずれも 10 μM の濃度で CYP1A2、2C9、2D6 及び CYP3A4/5 に対して時間依存的な阻害作用を示さなかった。また、M11 は、CYP2B6、2C8 及び 2C19 に対して時間依存的な阻害作用を示さなかった（2.6.4.7.1）。

2.4.4 毒性試験

実施したフルキンチニブの毒性試験プログラムの概要を 2.6.6.1 に、試験一覧を表 2.6.6.1-1 に示す。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

Sprague Dawley ラット及びビーグル犬におけるフルキンチニブの最大耐量（MTD）は、それぞれ 2000 mg/kg 及び 1000 mg/kg であった。主な所見として、ラット（雄のみ）では、2000 mg/kg で体重増加抑制又は体重減少、及び下痢が、イヌでは、体重及び摂餌量の減少、活動性低下、下痢、並びに血便が認められた。両動物種とも、標的臓器は消化管であった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

2.4.4.2.1 ラットにおける反復投与毒性試験

ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験では、Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを 0、2、20 又は 60 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 4 週間反復経口投与し、その後 4 週間の回復期間を設けた（2.6.6.3.1）。主な所見として立毛、円背位、自発運動の低下、眼脂、下痢、削痩、口及び鼻孔周囲の乾燥物、切歯の破損、摂餌量、体重増加量及び体重の減少、白血球（主にリンパ球）、赤血球、ヘモグロビン及び血小板の減少、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の増加、総蛋白、アルブミン及びアルブミン／グロブリン比（A/G）の減少、クレアチニン増加及び尿蛋白陽性、並びにアミラーゼ及びリパーゼの増加がみられ、20 mg/kg/日以上で死亡例／瀕死による安楽殺が生じた。主な標的臓器は、肝臓（小葉間胆管過形成及び／又は肝細胞壊死）、腎臓（尿細管上皮細胞の壊死、糸球体変性、硝子円柱）、胸腺（萎縮）、脾臓（萎縮）、副腎（出血及びうっ血）、胃（出血）、十二指腸（出血）及び骨髄（増殖抑制）であった。上記所見は、4 週間の回復期間中に、肝臓、腎臓及び胸腺の変化は一部回復し、その他の変化はいずれも完全に回復した。無毒性量（NOAEL）は 2 mg/kg/日であった。

ラットを用いた13週間反復投与毒性試験では、Sprague Dawleyラットにフルキンチニブを0、0.3、0.6又は1.2 mg/kg/日の用量で1日1回13週間反復経口投与し、その後4週間の回復期間を設けた（2.6.6.3.2）。1.2 mg/kg/日は、投与44日以降、2.4 mg/kg/日に増量した。1.2/2.4 mg/kg/日を投与した雄1例は、フルキンチニブに関連した瀕死状態のため、投与78日に安楽殺した。フルキンチニブに関連した変化として、切歯の破損、削痩、円背位、体重の低値／減少及び摂餌量減少が主に1.2/2.4 mg/kg/日群で認められ、このうち切歯の破損を除いて、回復期間中に回復性を示した。精子検査パラメータに、投薬に関連した影響は認められなかった。フルキンチニブに関連した臨床病理学的変化として、脱水、蛋白質及び電解質の喪失、並びに肝細胞及び／又は肝胆道系の変化を示唆する変化がすべての用量で認められた。1.2/2.4 mg/kg/日群の雄及び0.3 mg/kg/日以上の群の雌では、投与期間終了時に胸腺重量の減少が認められ、回復期間後も持続した。フルキンチニブに関連する剖検所見は認められなかった。フルキンチニブに関連した病理組織学的所見は、主に1.2/2.4 mg/kg/日群で認められ、副腎（変性及び壊死）、脾臓（鉱質沈着）、腸間膜リンパ節（肥満細胞浸潤）、肝臓（細胞質内色素沈着）、十二指腸のブルンナー腺（炎症）、大腿骨（骨端軟骨の肥厚）、骨髄（大腿骨及び胸骨の造血細胞減少）、並びに下顎切歯（変性、壊死、破損及び炎症）であった。回復期間終了時に1.2/2.4/mg/kg/日群の雄1例の脾臓に、投薬終了時の病理組織学的検査ではみられなかった鉱質沈着が認められた。1.2/2.4 mg/kg/日群でみられた死亡は、歯の異常に起因した顕著な体重減少によるものと考えられた。1.2/2.4 mg/kg/日群では、その他の重度の所見は認められなかったことから、本用量が供試動物の10%に重篤な毒性が発現する用量（STD_{10}）であった。NOAELは0.3 mg/kg/日と判断した。

ラットを用いた26週間反復投与毒性試験では、Sprague Dawleyラットに0、0.5/0.25（投与50日から減量）、1.5/0.75（投与50日から減量）、5/3/1.5（投与29日／投与50日から減量）又は10/6（投与29日から減量）mg/kg/日の用量で1日1回26週間反復経口投与し、その後4週間の回復期間を設けた（2.6.6.3.3）。1.5/0.75 mg/kg/日以上の群で死亡が認められた。0.5/0.25 mg/kg/日以上の群で認められた主な所見は、切歯の脱落、鼻腔汚染、眼脂、水様便、活動性低下、体重増加抑制及び体重減少、摂餌量減少、ALT、アルカリホスファターゼ（ALP）、コレステロール（CHOL）、トリグリセリド（TG）及び血中尿素窒素（BUN）の増加、グルコースの減少、低蛋白血症、尿検査の尿蛋白及び白血球陽性、並びに胸骨骨髄の増殖抑制であった。また、病理組織学的検査では、肝臓（壊死）、胆管（拡張／肥厚）、腎臓（糸球体腫大、尿細管上皮細胞変性、壊死、硝子円柱）、副腎（出血、皮質細胞壊死）、胸腺（萎縮）、脾臓（萎縮）、切歯の破損及び脱落、並びに大腿骨骨幹端の軟骨細胞肥大及び骨端異形成が認められた。切歯の破損及び喪失は回復しなかったが、その他の所見は4週間の回復期間終了時までに部分的に回復した。主な毒性標的臓器は肝臓、腎臓、副腎、胸腺、脾臓、及び骨髄（胸骨及び大腿骨）であり、本試験における最小毒性量（LOAEL）は0.5/0.25 mg/kg/日であった。

2.4.4.2.2 イヌにおける反復投与毒性試験

イヌを用いた4週間反復投与毒性試験では、ビーグル犬にフルキンチニブを0、0.03、0.1又は0.3 mg/kg/日の用量でカプセルに充てんして1日1回、4週間連続経口投与し、その後4週間の回復期間を設けた（2.6.6.3.4）。0.3 mg/kg/日では、活動性低下、摂餌量及び体重の減少、下痢、血便、後肢脱力、並びに死亡が認められた。これらの所見は4週間の回復期間中に概ね回

復した。主な標的臓器は胸腺（萎縮、皮髄境界不明瞭、皮質リンパ球減少）、脾臓（萎縮及びリンパ球減少）、腎臓（尿細管拡張及び硝子円柱）、消化管（出血及びうっ血）、副腎（腫脹、出血及びうっ血）、及び肝臓（変性）であった。本試験の条件下における NOAEL は 0.1 mg/kg/日であった。

イヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験では、ビーグル犬にフルキンチニブを 0、0.03、0.06 又は 0.12 mg/kg/日の用量でカプセルに充てんして 1 日 1 回、13 週間反復経口投与し、その後 4 週間の回復期間を設けた（2.6.6.3.5）。投薬に起因した一般状態の変化として、0.12 mg/kg/日群で口腔粘膜の赤色化、口腔粘膜潰瘍及び褐色歯の発現頻度増加が、0.06 mg/kg/日群で口腔粘膜の赤色化又は褐色化の発現頻度増加が認められた。0.12 mg/kg/日群では体重減少が認められた。これらの所見は回復期間中に回復性を示した。精子検査パラメータには、投薬に関連した影響は認められなかった。臨床病理学的変化として、0.12 mg/kg/日群でフィブリノゲン及びグロブリン濃度の増加、並びに A/G の減少が認められた。これらの所見は回復期間終了時に回復性を示した。病理組織学的検査では、副腎、大腿骨及び大腿骨骨髄に投薬に関連した所見が認められた。副腎では 0.03 mg/kg/日以上の群で副腎皮質球状帯の空胞の増加、大腿骨では 0.03 mg/kg/日以上の群の雄及び 0.12 mg/kg/日群の雌で大腿骨骨端軟骨の肥厚、0.12 mg/kg/日群の雌雄で大腿骨骨髄の細胞充実性低下が認められた。いずれの病理組織学的所見も回復期間中に回復性が認められた。所見の程度は軽度であり、0.12 mg/kg/日群においても十分な忍容性が認められたことから、重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）は 0.12 mg/kg/日と判断された。

イヌを用いた 39 週間反復投与毒性試験では、ビーグル犬にフルキンチニブを 0、0.01、0.03、0.1/0.06（投与 15 日から減量）及び 0.2/0.12 mg/kg/日（投与 15 日から減量）の用量で 1 日 1 回、39 週間反復経口投与し、その後 4 週間の回復期間を設けた（2.6.6.3.6）。0.2/0.12 mg/kg/日群では、死亡例がみられ、忍容性は良好ではなかった。主な毒性所見は、活動性低下、水様便、血便、摂餌量低下、体重減少、白血球減少、低蛋白血症、肝毒性（空胞化、肝細胞腫大、肉芽腫性炎症、肝細胞色素沈着、クッパー細胞増加）、腎毒性（尿細管上皮空胞化、尿蛋白陽性）、免疫抑制（胸腺萎縮、白脾髄辺縁帯リンパ球減少、腸間膜リンパ節皮質リンパ球減少）、及び大腿骨骨幹端の成長板過形成であった。ECG 検査では、0.2/0.12 mg/kg/日群の雄の投与 273 日（投与前、投与 2 及び 24 時間後）に心拍数減少が認められた。4 週間の回復期間終了時には、いずれの所見も回復性が認められた。主な毒性標的臓器は、消化管、肝臓、腎臓、免疫系（胸腺、脾臓、リンパ節）及び大腿骨であった。NOAEL は 0.03 mg/kg/日であった。

ラット及びイヌを用いたフルキンチニブの反復投与毒性試験では、フルキンチニブの主な毒性標的臓器は、肝胆道系（ALP、ALT、AST、CHOL 及び TG の増加、並びに肝細胞の壊死／変性及び胆管過形成）、腎臓（BUN 増加、腎糸球体変性、硝子円柱）、消化管（下痢及び消化管出血）、副腎（うっ血及び出血）、免疫系（胸腺のリンパ球の減少及び萎縮、脾臓の萎縮、腸間膜リンパ節の肥満細胞浸潤、ブルンナー腺の変性、壊死及び炎症）、造血系（骨髄の造血細胞減少）、並びに骨格系（大腿骨骨幹端の成長版過形成、切歯の破損／喪失）であった。これらの毒性変化は、一部の骨格系の変化（ラットにおける歯の破損／喪失）を除き、いずれも回復期間中に回復又は回復傾向を示した。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

NMPA GLP 規則に従って in vitro 及び in vivo の遺伝毒性試験を実施したが、US FDA、OECD 及び／又は MHRA の GLP 規則に従って再度実施した試験を本申請資料で使用する（2.6.6.4）。

サルモネラ菌を用いた in vitro 復帰突然変異試験（S9 存在下／非存在下）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた in vitro 染色体異常試験（S9 存在下／非存在下）、並びに in vivo ラット小核及びコメットアッセイ試験の結果から、フルキンチニブは遺伝毒性を有さないと考えられた。サルモネラ菌（試験菌株 TA98、TA100、TA102、TA1535 及び TA1537）を用いた復帰突然変異試験において、フルキンチニブは変異原性を示さなかった。CHO 細胞を沈澱が生じる高濃度のフルキンチニブで 3 時間（S9 存在下／非存在下）及び 20 時間（S9 非存在下）培養、分析したところ、フルキンチニブは染色体の構造異常を誘発しなかった。また、ラットを用いた試験では、2000 mg/kg/日までの用量を 1 日 3 回連続投与した結果、骨髄の小核を有する多染性赤血球を増加させず、肝臓の DNA 鎖切断も誘発しなかった。

2.4.4.4 がん原性試験

ICH S9 に準拠して、フルキンチニブのがん原性試験は実施していない。ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験では、投薬に関連した増殖性病変及び前癌病変は認められず、遺伝毒性も認められなかったことから、フルキンチニブ投与によるがん原性のリスクは低いと考えられる。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

Sprague Dawley ラットを用いたフルキンチニブの受胎能及び着床までの初期胚・胎児発生に関する試験では、雄には交配 4 週間前から剖検前日まで、0、0.3、1 又は 3 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回経口投与し、雌には交配 2 週間前から妊娠 7 日まで、0、0.05、0.15 又は 0.5 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回経口投与した（2.6.6.6.1）。雄の交尾、授精、剖検及び精子検査パラメータに、フルキンチニブに関連した変化は認められなかった。精巣及び精巣上体の病理組織学的検査では、フルキンチニブに関連した変化は認められなかった。0.5 mg/kg/日群の雌では、対照群と比較して、吸収胚数及び着床後胚死亡率の増加、並びに生存胎児数及び生存胎児率の減少が認められた。雌の交配、妊娠パラメータ及び性周期にフルキンチニブに関連した変化は認められなかった。本試験における雄の受胎能に対する NOAEL は 3 mg/kg/日、雌の受胎能に対する NOAEL は 0.5 mg/kg/日、初期胚発生に対する NOAEL は 0.15 mg/kg/日であった。

フルキンチニブの遺伝毒性試験と同様に、交配ラットを用いた最終的な胚・胎児発生毒性試験は、US FDA の GLP 規則に従って再実施した。

胚・胎児発生毒性試験では、妊娠 Sprague Dawley ラットの器官形成期（妊娠 6～17 日）に、フルキンチニブ 0（0.5% CMC-Na）、0.025、0.1 又は 0.25 mg/kg/日を 1 日 1 回経口投与した（2.6.6.6.3）。0.25 mg/kg/日群では、投薬に関連した生存胎児数の減少が認められた。発生毒性として、0.1 又は 0.25 mg/kg/日群の胎児で外表、内臓及び骨格異常が認められた。外表異常として、頭部及び尾部の奇形及び浮腫が認められた。内臓検査では血管系の位置異常又は欠損の奇形の増加が、骨格検査では脊椎異常の増加並びに未骨化前肢中手骨及び／又は指節骨などの変異の発生率の増加が認められた。0.25 mg/kg/日群の母動物において、投与期間中に統計学的に有意な平均体重増加量の減少が認められたが、有害ではないと判断された。0.1 mg/kg/日以下の

群では、母動物への影響は認められなかった。これらの結果から母動物及び胚・胎児発生に対する NOAEL は、それぞれ 0.25 及び 0.025 mg/kg/日であった。

2.4.4.6 局所刺激性試験

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験の一環として、一般状態、消化管の肉眼的及び病理組織学的評価を実施し、フルキンチニブの局所刺激性を評価した。

2.4.4.7 その他の毒性試験

2.4.4.7.1 不純物に関する試験

原薬の規格には、ICH Q3A（R2）に基づく安全性確認の必要な閾値である 0.15%を超える個別規格設定不純物はなかった（2.6.7.4、3.2.S.4）。さらに、フルキンチニブの合成に使用するすべての出発物質、中間体及び試薬、並びに潜在的不純物について、[redacted] V.[redacted] 及び [redacted] V.[redacted] の両バージョンを用いて、遺伝毒性の可能性を ICH M7(R1)に従って評価した。特定されたすべての潜在的な遺伝毒性不純物は、パージデータ及び／又はパージファクター評価に基づき、ICH M7(R1)に示される毒性学的懸念の閾値に基づく許容摂取量を下回るレベルまで製造工程で効果的に除去されている（3.2.S.2.6）。そのため、患者集団（進行癌）及び予想投与期間が 3～4 ヵ月であることに基づいて、ICH S9 に準拠し、申請規格の裏付けとなる追加評価は実施しなかった。

2.4.4.7.2 光毒性試験

フルキンチニブは、290～700 nm の波長範囲で光を吸収し（3.2.S.3.1）、モル吸光係数は 1000 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ を上回る吸収極大を示し、ラット全身オートラジオグラフィー試験において、フルキンチニブはメラニン含有組織（ぶどう膜、眼、皮膚など）に分布することが示された（2.6.4.4.2.2）。そのため、モルモットを用いた in vivo 光毒性試験を実施し、本薬の光毒性について検討した（2.6.6.8.2）。その結果、フルキンチニブを最高用量の 100 mg/kg まで単回投与しても光毒性は認められなかった。

2.4.5 総括及び結論

キナーゼパネルに対するフルキンチニブの活性及び選択性を検討したところ、フルキンチニブは VEGFR-1、-2 及び-3 に高い選択性を示した。フルキンチニブの高い選択性は、副次的薬理スクリーニングからも裏付けられた。細胞アッセイにおいて、フルキンチニブは VEGFR のリン酸化を抑制し、VEGF 誘発性の血管新生を阻害した。動物モデルを用いた PK/PD 試験において、2.5 mg/kg のフルキンチニブの単回経口投与により、投与後 8 時間を超えて持続する 80%超の標的阻害（ヌードマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 のリン酸化を抑制）が示され、投与後 8 時間の血漿中薬物濃度は 176 ng/mL であった。複数のヒト腫瘍異種移植マウスモデルにおいて、フルキンチニブは用量依存的な抗腫瘍活性を示し、腫瘍組織において強力な血管新生阻害作用を示した。さらに、複数の非臨床腫瘍モデルにおいて、フルキンチニブと細胞障害性化学療法（オキサリプラチン又はドセタキセル）、分子標的療法（EGFR 又は MET 阻害剤）又は免疫チェックポイント阻害剤との併用は、それぞれの単剤より強い抗腫瘍効果を示した。

In vitro 及び in vivo 安全性薬理試験の結果から、心血管系、中枢神経系及び呼吸系に対する有害作用のリスクは低いことが示された。また、M11 を用いた hERG アッセイの結果、QTc 延長のリスクは低いと考えられた。

フルキンチニブの膜透過性は高く、P-gp 等の排出トランスポーターの基質ではないことが示された。

PK 試験では、in vitro で認められた良好な透過性及び代謝安定性と一致して、マウス、ラット及びイヌにおけるフルキンチニブの血漿クリアランスは低く、経口バイオアベイラビリティは中等度であった。概して、性別、妊娠の有無、検体採取日間及び摂餌条件の違いで全身曝露量に差は認められなかった。フルキンチニブ及び M11 の血漿蛋白結合率は、評価したすべての動物種で高かった。ラットでは、[^{14}C]フルキンチニブは主に代謝及び排泄器官に分布し、メラニン含有組織では中等度の放射能が認められた。フルキンチニブを種々の動物種の肝ミクロソームとインキュベーションしたとき、6 種類の主代謝物が認められた。これらの代謝物は、O-脱メチル化体、水酸化体及びカルボン酸体であり、主に CYP による代謝で生成された。ヒト血漿中で最も多く認められたフルキンチニブの代謝物は M11 であり、主に M10 由来であった。M10 は主に CYP3A4/5 により生成された。ヒト特異的代謝物は認められなかった。ラット及びイヌにおける代謝プロファイルがヒトに類似したことから、フルキンチニブの毒性試験に用いる動物種としてラット及びイヌの選択が妥当であると考えられた。ラットでは投与されたフルキンチニブが、主に糞中に排泄された。

In vitro 薬物相互作用試験から、フルキンチニブは P-gp 及び BCRP を用量依存的に阻害した。M11 は BCRP を阻害したが、P-gp に対しては顕著な阻害作用を示さなかった。種々のトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K）に対するフルキンチニブの顕著な阻害作用は認められなかったことから、重要な薬物相互作用のリスクはないものと考えられた。フルキンチニブ及び M11 は、種々の CYP に対して明らかな阻害作用又は誘導作用を示さなかったことから、これら CYP との相互作用を介してフルキンチニブが併用薬の PK に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

単回投与毒性試験におけるフルキンチニブの MTD は、ラットで 2000 mg/kg、イヌで 1000 mg/kg であった。

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験では、フルキンチニブの主な毒性標的臓器は、肝胆道系（ALP、ALT、AST、CHOL 及び TG の上昇、並びに肝細胞の壊死／変性及び胆管過形成）、腎臓（BUN 上昇、腎糸球体変性、硝子円柱）、消化管（下痢及び消化管出血）、副腎（うっ血及び出血）、免疫系（胸腺のリンパ球の減少及び萎縮、脾臓の萎縮、腸間膜リンパ節の肥満細胞の浸潤、ブルンナー腺の変性、壊死及び炎症）、造血系（骨髄の造血細胞減少）、及び骨格系（大腿骨骨端軟骨の肥厚及び切歯の破損／喪失）であった。これらの毒性変化は、一部の骨格系の変化（ラットにおける切歯の破損／喪失）を除き、いずれも回復期間中に回復又は回復傾向を示した。ラット及びイヌのいずれにおいても、精子検査パラメータに投薬に関連した影響は認められなかった。

ラットを用いた反復投与毒性試験では、4 週間試験の NOAEL は 2 mg/kg/日、13 週間試験の NOAEL 及び STD_{10} は 0.3 mg/kg/日及び 1.2/2.4 mg/kg/日（投与 44 日から増量）、26 週間試験の LOAEL は 0.5/0.25 mg/kg/日（投与 50 日から減量）であった。イヌを用いた反復投与毒性試験で

は、4 週間及び 39 週間試験の NOAEL は 0.1 及び 0.03 mg/kg/日、13 週間試験の HNSTD は 0.12 mg/kg/日であった。これらの値を曝露量比の算出に用いた。

標準的な in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験の結果から、フルキンチニブは遺伝毒性を示さないと考えられた。

ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚・胎児発生に関する試験において、雌雄の受胎能に影響は認められなかったが、吸収胚数及び着床後胚死亡率の増加、生存胎児数及び生存胎児率の低下が認められた。ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母体及び胎児にフルキンチニブに関連した影響がみられ、生存胎児数の減少が認められた。発生毒性として、胎児の外表、内臓及び骨格異常が認められた。

フルキンチニブはモルモットを用いた光毒性試験で光毒性を示さなかった。

ラット及びイヌの反復投与毒性試験、ラットの胚・胎児発生毒性試験及びモルモットの光毒性試験の NOAEL 以上の用量における曝露量と 2015-013-00US1 試験における臨床曝露量（5 mg/日を 1 日 1 回投与後、定常状態に達したサイクル 1 の投与 14 日の値）を比較した、フルキンチニブ及び M11 の曝露マージンをそれぞれ表 2.4.4.7-1 及び表 2.4.4.7-2 に示す。また、フルキンチニブ及び M11 の遊離型 AUC 並びに総 C_{max} 及び遊離型 C_{max} の曝露マージンを示す。

表 2.4.4.7-1 に示すように、13 週間反復投与毒性試験の STD_{10} 及び HNSTD における総 AUC は、フルキンチニブの 5 mg の臨床曝露量に対して、ラットで約 3 倍、イヌで 1 倍未満であった。ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母体毒性及び胎児発生に関する NOAEL におけるフルキンチニブの曝露量比は 1 未満であった。モルモットを用いた光毒性試験では、評価した最高用量でのフルキンチニブの曝露量はヒト曝露量の 4 倍であった。

表 2.4.4.7-1　臨床用量（5 mg）におけるフルキンチニブの曝露マージン

試験の種類／試験番号	NOAEL／LOAEL／STD_{10}／HNSTD（mg/kg/day）	AUC (ng•hr/mL)[a]		C_{max} (ng/mL)[a]		AUC 比		C_{max} 比	
		総濃度	遊離型濃度	総濃度	遊離型濃度	総濃度	遊離型濃度	総濃度	遊離型濃度
ヒト（患者）／2015-013-00US1	5 mg/day	5777	272	291	13.7	NA	NA	NA	NA
ラット 4 週間／[redacted]49RD1	2（NOAEL）	6805	265	800	31	1.2	1.0	2.7	2.3
	20	44467	1734	3301	129	7.7	6.4	11	9.4
	60	75597[b]	2948	5946[b]	232	13	11	20	17
ラット 13 週間／8426159	0.3（NOAEL）	1640	64	305	12	0.3	0.2	1.0	0.9
	0.6	3260	127	628	24	0.6	0.5	2.2	1.8
	1.2/2.4（STD_{10}）	15900	620	1880	73	2.8	2.3	6.5	5.3
ラット 26 週間／[redacted]54RD1	0.5/0.25（LOAEL)、	3676	143	327	13	0.6	0.5	1.1	0.9
	1.5/0.75	5928	231	632	25	1.0	0.8	2.2	1.8
	5/3/1.5	9809	383	890	35	1.7	1.4	3.1	2.6
	10/6	48374[b]	1887	4260[b]	166	8.4	6.9	15	12
イヌ 4 週間／[redacted]49RD2	0.1（NOAEL)	618	74	48	5.7	0.1	0.3	0.2	0.4
	0.3	1399[b]	166	78[b]	9.3	0.2	0.6	0.3	0.7
イヌ 13 週間／8449374	0.03	298	35	18	2.1	0.05	0.1	0.1	0.2
	0.06	698	83	39	4.6	0.1	0.3	0.1	0.3
	0.12（HNSTD)	1480	176	105	13	0.3	0.6	0.4	0.9
イヌ 39 週間／[redacted]54RD2	0.03（NOAEL）	343	41	31	3.7	0.06	0.2	0.1	0.3
	0.1/0.06	968	115	132	16	0.2	0.4	0.5	1.2
	0.2/0.12	1771	211	130	15	0.3	0.8	0.4	1.1
ラット胚・胎児発生／8449387	0.25（母動物 NOAEL)	1260	49	187	7.3	0.2	0.2	0.6	0.5
	0.025（胚・胎児発生 NOAEL）	114	4.4	19	0.7	0.02	0.02	0.07	0.05
モルモット光毒性／[redacted]186PT02	100（NOAEL）	94200	ND	6400	ND	16	ND	22	ND

AUC：血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度; GD：妊娠；HNSTD：重篤な毒性が発現しない最大投与量、LOAEL：最小毒性量、NA：該当せず、ND：評価せず、NOAEL：無毒性量、QD：1 日 1 回、STD_{10}：供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量

AUC 及び C_{max} は雌雄の平均値を用いた。

フルキンチニブの血漿蛋白結合率：ラット（96.1%）、イヌ(88.1%)、ヒト（95.3%）。

フルキンチニブ 1 日 1 回 5 mg を患者に投与後の定常状態（サイクル 1 の 14 日）における AUC 及び C_{max} を、ヒトにおける定常状態の曝露量として用いた。

C_{max} 比：動物におけるフルキンチニブの C_{max}／ヒトにおけるフルキンチニブの C_{max}。

AUC 比：動物におけるフルキンチニブの C_{max}／ヒトにおけるフルキンチニブの C_{max}。

[a] 特記しない場合、毒性試験の最終投与日の曝露量を示す。すなわち、4 週間、13 週間、26 週間及び 39 週間反復投与毒性試験では、それぞれ投与 28 日、91 日、182 日及び 273 日における曝露量を、胚・胎児発生試験では妊娠 17 日、光毒性試験では投与 1 日の曝露量である。

[b] 死亡のため投与 1 日の曝露量のみが得られた

表 2.4.4.7-2　臨床用量（5 mg）における M11 の曝露マージン

試験の種類／試験番号	NOAEL／LOAEL／STD_{10}／HNSTD（所見／標的臓器）（mg/kg/day）	AUC (ng·hr/mL) [a]		C_{max} (ng/mL) [a]		AUC 比		C_{max} 比	
		総濃度	遊離型濃度	総濃度	遊離型濃度	総濃度	遊離型濃度	総濃度	遊離型濃度
ヒト（患者）／2015-013-00US1	5 mg/day	1668	38.4	77.4	1.8	NA	NA	NA	NA
ラット 13 週間／8426159	3（NOAEL）	30.3	1.03	2.50	0.085	0.02	0.03	0.03	0.05
	0.6	66.8	2.27	4.56	0.16	0.04	0.06	0.06	0.09
	1.2/2.4（STD_{10}）	371	12.6	22.3	0.76	0.2	0.3	0.3	0.4
イヌ 13 週間／8449374	0.03	18.3	0.95	1.11	0.06	0.01	0.02	0.01	0.03
	0.06	38.8	2.0	2.17	0.11	0.02	0.05	0.03	0.06
	0.12（HNSTD）	87.8	4.6	4.96	0.26	0.05	0.1	0.06	0.1
モルモット光毒性／[redacted]186PT02	100（NOAEL）	7250	ND	500	ND	4.3	ND	6.5	ND

AUC：血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度; GD：妊娠；HNSTD：重篤な毒性が発現しない最大投与量、NA：該当せず、ND：評価せず、NOAEL：無毒性量、STD_{10}：供試動物の 10% に重篤な毒性が発現する投与量

AUC 及び C_{max} は雌雄の平均値を用いた。

M11 は代謝物 HM5025423 である。

M11 の血漿蛋白結合率：ラット（96.6%）、イヌ（94.8%）、ヒト（97.7%）。

フルキンチニブ 1 日 1 回 5 mg を患者に投与後の定常状態（サイクル 1 の 14 日）における AUC 及び C_{max} を、ヒトにおける定常状態の曝露量として用いた。

C_{max} 比：動物における血漿中 M11 の C_{max}／ヒトにおける血漿中 M11 の C_{max}。

AUC 比：動物における M11 の AUC／ヒトにおける M11 の AUC。

[a] 動物試験における最終投与日の曝露量（13 週反復投与毒性試験の投与 91 日及び光毒性試験の投与 1 日における曝露量）。

フルキンチニブの薬理、安全性薬理、PK 特性及び毒性を特徴づける包括的な非臨床プログラムを実施した。ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験における主な標的臓器は、肝臓、腎臓、消化管、副腎、胸腺、脾臓、リンパ節、骨髄（胸骨）、大腿骨及び歯であった。健康な動物では、急速に分裂している組織の受容体を標的とする腫瘍関連化合物への曝露により有害作用が予想されるため、非臨床安全性試験で特定された標的臓器は、フルキンチニブの薬理作用に起因すると考えられる。フルキンチニブが標的とする各受容体チロシンキナーゼは、癌の発生と進行に重要な役割を果たしている。癌の病態形成において、腫瘍は腫瘍脈管構造の形成を刺激し、酸素と栄養の供給を増加させるために様々な因子を分泌する。このような腫瘍血管系は、急速な内皮細胞増殖によってしばしば細胞間の結合が粗く漏出性であり、透過性の増加と腫瘍細胞の血液循環への漏出をもたらす。癌患者において腫瘍量を減らすために効果的な標的の阻害が、正常な分裂組織にも有害作用を引き起こしうる。動物試験における STD_{10}、HNSTD、LOAEL 又は NOAEL と患者集団における臨床有効用量との曝露量比は低いが、非臨床安全性プロファイルは作用機序と一致しており、臨床開発中の臨床安全性モニタリングが可能である。

結論として、フルキンチニブは VEGFR-1、-2 及び-3 に対して強力かつ高い選択性を示す経口低分子チロシンキナーゼ阻害剤であり、複数のヒト腫瘍異種移植マウスモデルにおいて頑健な有効性を示した。これらのデータは、その非臨床 PK 及び安全性プロファイルとともに、転移性結腸・直腸癌患者の治療を目的としたフルキンチニブの申請臨床用量 5 mg を支持するものである。

2.4.6 参考文献一覧

[1] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer 2003 Jun;3(6):401-10.

[2] Kerbel RS. Tumor angiogenesis. N Engl J Med 2008 May 8; 358(19):2039-49.

[3] Duda DG, Batchelor TT, Willett CG, Jain RK. VEGF-targeted cancer therapy strategies: current progress, hurdles and future prospects. Trends Mol Med. 2007;13(6):223-30.

[4] Grandinetti CA, Goldspiel BR. Sorafenib and sunitinib: novel targeted therapies for renal cell cancer. Pharmacotherapy. 2007;27(8):1125-44.

[5] Keating GM, Santoro A. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. Drugs. 2009;69(2):223-40.

[6] Mross K, Frost A, Steinbild S, Hedbom S, Büchert M, Fasol U, et al. A phase I dose-escalation study of regorafenib (BAY 73- 4506), an inhibitor of oncogenic, angiogenic, and stromal kinases, in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res. 2012 May 1;18(9):2658-67.

[7] Satore-Bianchi A, Zeppellini A, Amatu A, Ricotta R, Bencardino K, Siena S. Regorafenib in metastatic colorectal cancer. Exp Rev Anticancer Ther. 2014; 14(3), 255-65.

[8] Rugo HS, Herbst RS, Liu G, Park JW, Kies MS, Steinfeldt HM, et al. Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results. J Clin Oncol. 2005;23(24):5474-83.