目次

2.6.1 緒言 2
2.6.1.1 原薬の物理的化学的性質 2
2.6.1.2 薬理プロファイル 2
2.6.1.3 薬物動態プロファイル 3
2.6.1.4 毒性プロファイル 4
2.6.1.5 効果・効能（案）及び用法・用量（案） 4
2.6.1.6 参考資料 5

図

図 2.6.1.1-1　フルキンチニブの化学構造式 2

2.6.1 緒言

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（mCRC）患者の治療である。

フルキンチニブは進行癌の治療を目的としているため、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。

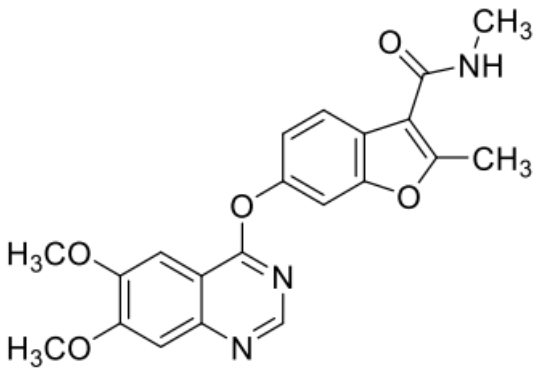
2.6.1.1 原薬の物理的化学的性質

フルキンチニブの化学構造式を図 2.6.1.1-1 に示す。

フルキンチニブの化学名は 6-[(6,7-dimethoxyquinazolin-4-yl)oxy]-*N*,2-dimethyl-1-benzofuran-3-carboxamide、分子式は $C_{21}H_{19}N_3O_5$、分子量は 393.39 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（3.2.P.1）。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を予定している。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。

非臨床安全性試験で使用した剤形又は製剤については 2.4.1.2 に示す。

図 2.6.1.1-1　フルキンチニブの化学構造式



出典：3.2.S.1.2

2.6.1.2 薬理プロファイル

フルキンチニブは、VEGFR-1、-2 及び-3 に対して強力かつ選択的な阻害活性を有するチロシンキナーゼ阻害剤である（2.6.2.2.2）。

細胞アッセイで、フルキンチニブは VEGFR ファミリーのキナーゼを阻害し、VEGFR のリン酸化を強く阻害した。同様に、フルキンチニブは VEGFR 依存性のヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖及び管形成を阻害し、漿尿膜モデルで血管新生阻害作用を示した（2.6.2.2.2）。

フルキンチニブは、複数のヒト腫瘍異種移植マウスモデルにおいて、用量依存的な抗腫瘍活性を示し、腫瘍組織における強力な血管新生阻害作用を示した（2.6.2.2.3）。

また、複数の非臨床腫瘍モデルにおいて、フルキンチニブに細胞毒性を有する化学療法（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）、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）を追加することにより、それぞれの単剤より強い抗腫瘍効果が示された（2.6.2.5）。

副次的薬理試験では、87 種類の受容体、イオンチャネル及び酵素のパネルにおいて、フルキンチニブはいずれの標的に対しても 50%を超える阻害又は結合を示さなかったことから、フルキンチニブの標的外阻害の可能性が低いことが示され、その高い選択性プロファイルを裏付けた（2.6.2.3）。

安全性薬理試験では、麻酔イヌを用いた単回投与試験において、心血管系及び呼吸系に有害な影響は認められなかった。また、イヌを用いた反復投与毒性試験では、血圧、呼吸数、酸素飽和度及び心電図の測定において、心血管系及び呼吸器系に有害な影響は認められなかった。In vivo で心血管系の所見が認められないことは、in vitro での human ether-à-go-go related gene（hERG）アッセイの結果（フルキンチニブ及び代謝物 M11）と一致しており、QTc 延長の可能性が低いことが示唆された。マウスを用いた単回投与試験では Irwin 法による行動観察及びポールテストにおいて中枢神経系への影響は認められず、イヌを用いた 13 週間毒性試験においても中枢神経系への影響は認められなかった。安全性薬理試験に基づくと、フルキンチニブは心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対するリスクは低いと考えられた（2.6.2.4）。

2.6.1.3 薬物動態プロファイル

フルキンチニブは、in vitro 及び in vivo における非臨床試験で良好な薬物動態（PK）及び代謝特性を示した。フルキンチニブは膜透過性が高く、P-糖蛋白質（P-gp）等の排出トランスポーターの基質ではなかった。フルキンチニブ及び代謝物 M11 は、いずれの動物種においても肝ミクロソームとインキュベートしたとき安定であった。In vitro で認められた高い膜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程度であった。投与後 0 時間から最終定量可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{last}）及び最高血漿中濃度（C_{max}）の平均値は、概して用量に比例して増加した。イヌの PK 試験では、顕著な摂餌の影響は認められなかった。また、ラット及びイヌに反復経口投与したときの曝露量に性差は認められず、曝露量の顕著な蓄積も認められなかった（2.6.4.3）。

ラットに[^{14}C]フルキンチニブを経口投与したとき、フルキンチニブは主に代謝及び排泄組織に分布し、また、メラニン含有組織では中程度の放射能が認められた。血液脳関門を介した分布は限定的であった（2.6.4.4）。

ヒト肝ミクロソームで生成されたフルキンチニブの代謝物は、様々な動物種と類似しており、フルキンチニブのヒト特異的な代謝物は検出されなかった（2.6.4.5）。

フルキンチニブのクリアランスは低く、ラットでは主に糞中に排泄された（2.6.4.6）。

フルキンチニブはチトクローム P450（CYP）3A4/5 及び非 CYP 酵素により代謝される。In vitro 薬物相互作用試験ではフルキンチニブは P-gp と breast cancer resistance protein（BCRP）を濃度依存的に阻害した。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。他の肝又は腎トランスポーターに対するフルキンチニブの明らかな阻害作用は認められなかった。さらに、フルキンチニブは organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 及び OATP1B3 の基質ではなかった。フルキンチニブ及び M11 は、主要な CYP 分子種に対して、顕著な阻害作用及び誘導作用を示さなかったことから、これらの CYP との相互作用を介してフルキンチニブが併用薬の薬物動態に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる（2.6.4.7）。

2.6.1.4 毒性プロファイル

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において認められた主な標的臓器は、肝胆道系、腎臓、消化菅、副腎、免疫系、造血系及び骨格系であり（2.6.6.3）、いずれも既存の VFGFR を標的とした薬剤と一致していた。骨格系の変化（切歯の破損／喪失）を除き、いずれも休薬により回復又は回復傾向を示した。

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細胞を用いた in vitro 染色体異常試験（S9 存在下／非存在下）及びコメットアッセイを含む in vivo ラット小核試験の結果、フルキンチニブは遺伝毒性を示さなかった（2.6.6.4）。

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・胎児発生毒性試験により、フルキンチニブの生殖発生毒性を評価した。雌の生殖機能及び胚形成に対する影響が認められた。ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母体及び胎児に着床後胚死亡の増加、妊娠子宮重量の減少、平均胎児体重の減少を含む毒性が、胎児に外表、内臓及び骨格異常が認められた（2.6.6.6）。

モルモットを用いた光毒性試験において、光毒性を示さなかった（2.6.6.8.2）。

2.6.1.5 効果・効能（案）及び用法・用量（案）

フルキンチニブの臨床試験では、mCRC 患者に対して統計学的に有意かつ臨床的に意義のあるベネフィットが示された（2.7.3）。mCRC 患者を対象としてフルキンチニブを評価した 2 つの第 3 相ピボタル試験〔米国、欧州、日本及びオーストラリアで実施した 2019-013-GLOB1 試験（FRESCO-2 試験）、中国で実施した 2013-013-00CH1 試験（FRESCO 試験）〕が完了している。これらの試験において、フルキンチニブ群で統計学的に有意かつ臨床的に意義のある全生存期間の改善が認められ、mCRC 患者におけるフルキンチニブの安全性プロファイルは、既知のフルキンチニブ単剤療法で確立された安全性プロファイルと一致していた。

以上より、mCRC 患者を対象とした FRESCO-2 試験及び FRESCO 試験の結果から、フルキンチニブの頑健かつ一貫した臨床的有効性及び安全性が示された。

フルキンチニブの臨床推奨用法・用量は、28 日間を 1 サイクルとして 5 mg を 1 日 1 回 3 週間経口投与／1 週間休薬であり、患者は疾患進行又は忍容不能な毒性が認められるまでフルキンチニブの投与を受ける。

2.6.1.6 参考資料

該当せず

目次

略号一覧表 4
2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 11
2.6.2.2.1 緒言 11
2.6.2.2.2 In vitro 薬理試験 12
2.6.2.2.3 In vivo 薬理試験 27
2.6.2.3 副次的薬理試験 37
2.6.2.3.1 フルキンチニブの in vitro 薬理試験（100054042 試験） 37
2.6.2.4 安全性薬理試験 38
2.6.2.4.1 In vitro 安全性薬理試験 38
2.6.2.4.2 In vivo 安全性薬理試験 39
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 43
2.6.2.5.1 非小細胞肺癌細胞株由来の複数の皮下異種移植モデルにおける EGFR 阻害剤 ゲフィチニブ又は theliatinib とフルキンチニブとを併用したときの抗腫瘍活性（Oncology 20[redacted]-013-01 試験） 43
2.6.2.5.2 非小細胞肺癌細胞株（NCI-H1993）皮下異種移植モデルにおける cMET 阻害剤 savolitinib とフルキンチニブとを併用したときの抗腫瘍活性（Oncology-20[redacted]-013-02 試験） 47
2.6.2.5.3 マウス CT26.WT 同系腫瘍モデルにおけるフルキンチニブ及び抗 PD-L1 抗体を併用投与したときの抗腫瘍効果の評価（Oncology-20[redacted]-013-03 試験） 49
2.6.2.5.4 マウス結腸癌 CT26.WT モデルにおける抗 PD-1 抗体又は化学療法と併用した フルキンチニブの抗腫瘍活性（HTM-20[redacted]-013-01 試験） 51
2.6.2.6 考察及び結論 56
2.6.2.7 参考文献一覧 58

表

表 2.6.2.1-1 薬理試験の概要 9
表 2.6.2.2-1 フルキンチニブによる VEGFR2 キナーゼ阻害作用 12
表 2.6.2.2-2 264 種類のキナーゼパネルでのフルキンチニブ（1 μM）のキナーゼ阻害活性 12
表 2.6.2.2-3 フルキンチニブ及びスニチニブのキナーゼ阻害活性 18
表 2.6.2.2-4 異なる細胞株におけるフルキンチニブとスニチニブの細胞毒性のまとめ 24
表 2.6.2.2-5 VEGFR2 キナーゼ活性に対するフルキンチニブ及び M11 の阻害活性 24
表 2.6.2.2-6 ヌードマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化に対するフルキンチニブの効果を評価するための試験デザイン 28

表 2.6.2.2-7　フルキンチニブ 2.5 mg/kg を単回経口投与時のヌードマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化阻害率並びに肺組織及び血漿中薬物濃度 28
表 2.6.2.2-8　ヌードマウス皮下移植モデルにおけるフルキンチニブの抗腫瘍活性を 評価するための試験デザイン 30
表 2.6.2.2-9　ヌードマウス皮下異種移植モデル（HT-29、NCI-H460、Caki-1 及び BGC-823）に対するフルキンチニブの抗腫瘍効果 30
表 2.6.2.2-10　NCI-H460 及び Caki-1 異種移植モデル腫瘍における CD31 発現に対するフルキンチニブの作用 37
表 2.6.2.4-1　フルキンチニブによる hERG 電流阻害率 38
表 2.6.2.4-2　M11 による hERG 電流阻害率 39
表 2.6.2.4-3　ICR マウスを用いたフルキンチニブの単回経口投与行動試験の試験デザイン 40
表 2.6.2.4-4　麻酔ビーグル犬を用いたフルキンチニブの心血管系及び呼吸系試験の 試験デザイン 40
表 2.6.2.4-5　ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 13 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復試験の試験デザイン 41
表 2.6.2.4-6　ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復試験の試験デザイン 42
表 2.6.2.4-7　ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 39 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復試験の試験デザイン 42
表 2.6.2.5-1　抗腫瘍試験のデザイン及び投与レジメン－フルキンチニブと EGFR 阻害薬との併用 44
表 2.6.2.5-2　抗腫瘍試験のデザイン及び投与レジメン－フルキンチニブと cMET 阻害薬 savolitinib との併用 47
表 2.6.2.5-3　NCI-H1993 異種移植モデルでのフルキンチニブと savolitinib の 併用試験の有効性の要約 48
表 2.6.2.5-4　CT26.WT 同系腫瘍モデルの試験デザイン 49
表 2.6.2.5-5　CT26.WT 同系腫瘍モデルにおける抗腫瘍活性 50
表 2.6.2.5-6　抗腫瘍試験のデザイン及び投与レジメン－CT26.WT におけるフルキンチニブと抗 PD-1 抗体又はイリノテカン／フルオロウラシルとの併用 51
表 2.6.2.5-7　フルキンチニブと抗 PD-1 抗体又はイリノテカン／フルオロウラシルの併用 ：TV 及び TGI 52
表 2.6.2.5-8　抗腫瘍試験のデザイン及び投与レジメン－CT26.WT におけるフルキンチニブと オキサリプラチン／フルオロウラシルとの併用（HTM-20[redacted]-015-A） 53
表 2.6.2.5-9　フルキンチニブとオキサリプラチン／フルオロウラシルの併用：TV 及び TGI 54
表 2.6.2.5-10　試験デザイン及び投与レジメン－CT26.WT モデルにおける 腫瘍微小環境バイオマーカー変化及び TV／TGI のまとめ 55
表 2.6.2.5-11　CT26.WT 腫瘍組織における TME マーカーの病理学的解析 55

図

図 2.6.2.2-1 HEK293-KDR 細胞における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化に対する阻害作用 19
図 2.6.2.2-2 HEK293-KDR 及び HUVEC における KDR シグナル伝達経路に対する阻害 20
図 2.6.2.2-3 VEGF 依存性 HUVEC 増殖に対する阻害実験 21
図 2.6.2.2-4 フルキンチニブによる HUVEC の管腔形成阻害 22
図 2.6.2.2-5 フルキンチニブによる HUVEC 管腔形成阻害 23
図 2.6.2.2-6 VEGFR2 キナーゼ活性に対するフルキンチニブ及び M11 の阻害活性 25
図 2.6.2.2-7 HEK293-KDR における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化に対する フルキンチニブ及び M11 の阻害作用 25
図 2.6.2.2-8 漿尿膜（CAM）モデルにおけるフルキンチニブによる微小血管発芽の阻害 26
図 2.6.2.2-9 ヌードマウスの肺組織における VEGF 誘導 VEGFR2 リン酸化に対する フルキンチニブの効果 29
図 2.6.2.2-10 HT-29 担癌マウスの腫瘍体積に対するフルキンチニブの効果 31
図 2.6.2.2-11 H460 担癌マウスの腫瘍体積に対するフルキンチニブの効果 32
図 2.6.2.2-12 Caki-1 担癌マウスの腫瘍体積に対するフルキンチニブの効果 33
図 2.6.2.2-13 BGC-823 担癌マウスの腫瘍体積に対するフルキンチニブの効果 34
図 2.6.2.2-14 NCI-H460 腫瘍組織における CD 31 発現に対するフルキンチニブの作用 35
図 2.6.2.2-15 Caki-1 腫瘍組織における CD31 発現に対するフルキンチニブの作用 36
図 2.6.2.5-1 PC-9 異種移植モデルにおけるフルキンチニブとゲフィチニブとの併用効果 45
図 2.6.2.5-2 NCI-H3255 異種移植モデルにおけるフルキンチニブとゲフィチニブとの併用効果 46
図 2.6.2.5-3 NCI-H292 異種移植モデルにおけるフルキンチニブとゲフィチニブとの併用効果 47
図 2.6.2.5-4 NCI-H1993 腫瘍異種移植モデルにおけるフルキンチニブと savolitinib との併用効果 48
図 2.6.2.5-5 CT26.WT モデルにおけるフルキンチニブと抗 PD-L1 抗体との併用効果 50
図 2.6.2.5-6 フルキンチニブと抗 PD-1 抗体の併用 52
図 2.6.2.5-7 フルキンチニブとイリノテカン／フルオロウラシルとの併用 53
図 2.6.2.5-8 フルキンチニブとオキサリプラチン／フルオロウラシルの併用 54

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
	英語	日本語
^{32}P-ATP	labelled adenosine 5'-triphosphate	標識アデノシン 5'ー三リン酸
AKT	protein kinase B	プロテインキナーゼ B
PD-1	programmed death-1	ー
AUC	Area under the concentration-time curve	濃度ー時間曲線下面積
AUC_{last}	Area under the concentration-time curve from time 0 to time of the last quantifiable concentration.	投与後 0 時間から最終定量可能時点までの濃度ー時間曲線下面積
BGC-823	Human gastric adenocarcinoma cells	ヒト胃腺癌（細胞）
Caki-1	clear-cell renal carcinoma cells	ヒト腎淡明細胞癌細胞
CAM	chorioallantoic membrane assay	（鶏卵）漿尿膜法
CCK-8	Cell Counting kit-8	ー
CD	cluster designation	分化抗原群
CDK	cyclin-dependent kinases	サイクリン依存性キナーゼ
CHO	Chinese hamster ovary cells	チャイニーズハムスター卵巣細胞
C_{max}	maximum observed plasma concentration	最高血漿中濃度
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
DELFIA	dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immuno assay	ー
ECG	electrocardiogram	心電図
EGFR	epidermal growth factor receptor	上皮成長因子受容体
ELISA	enzyme-linked immune-sorbent assay	酵素免疫測定法
ERK	extracellular signal-regulated kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
FBS	fetal bovine serum	ウシ胎児血清
FGFR	fibroblast growth factor receptor	線維芽細胞増殖因子受容体
Flt3	Fms-like tyrosine kinase 3	Fms 様チロシンキナーゼ 3
FRET	fluorescence resonance energy transfer	蛍光共鳴エネルギー移動
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
HEK-293-KDR	kinase insert domain receptor-overexpressed human embryonic kidney 293 cells	KDR 過剰発現 HEK-293 細胞
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HM5025423	M11 metabolite of fruquintinib	フルキンチニブの代謝物 M11
HMPL-013	fruquintinb	フルキンチニブ
HT-29	human colon adenocarcinoma cells	ヒト結腸腺癌細胞
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
KDR	kinase insert domain receptor	血管内皮増殖因子受容体-2（VEGFR2）

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
LC/MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クラマトグラフィータンデム質量分析法
M11	metabolite of fruquintinib	フルキンチニブの代謝物
M2-TAM	M2 tumor-associated macrophage(s)	M2 腫瘍関連マクロファージ
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	チアゾリルブルーテトラゾリウムブロミド
NCI-H1993	non-small cell lung cancer cells	ヒト非小細胞肺癌細胞
NCI-H292	non-small cell lung cancer cells	ヒト非小細胞肺癌細胞
NCI-H3255	non-small cell lung cancer cells	ヒト非小細胞肺癌細胞
NCI-H460	non-small cell lung cancer cells	ヒト非小細胞肺癌細胞
NMPA	national medical products administration	中国国家医薬品局
NSCLC	non-small cell lung cancer(s)	非小細胞肺癌
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
PC-9	non-small cell lung cancer cells	非小細胞肺癌細胞（ヒト肺腺癌細胞）
PD-1	programmed death-1	－
PDGFRβ	platelet-derived growth factor receptor beta	血小板由来増殖因子受容体 β
PD-L1	programmed death-ligand 1	－
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	ホスファチジルイノシトール 3－キナーゼ
PKC	protein kinase C	プロテインキナーゼ C
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	－
SKOV-3	human ovarian cancer cells	ヒト卵巣癌細胞
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase sarcoma	－
TAM	tumor-associated macrophage(s)	腫瘍関連マクロファージ
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖阻害
TME	tumor microenvironment	腫瘍微小環境
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
V_i	tumor volume on grouping day	群分け日の腫瘍体積
V_t	tumor volume post treatment	投与後の腫瘍体積
α-SMA^+CD31^+	α-smooth muscle actin positive cluster of differentiation 31 positive	α 平滑筋アクチン陽性分化抗原群 31 陽性

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

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。

フルキンチニブは進行癌治療を目的としているため、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 質疑応答集に従ってデザインした。

本モジュールに記載した効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験は、一般に認められている科学的手法及び手順に従って実施した。すべての安全性薬理試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従って中国で実施した。本試験の一覧及び試験施設の詳細を 2.6.3.1 に、GLP 適用の詳細を 2.6.3.4 に示す。

主な in vitro 薬理試験は以下のとおりであった。

- フルキンチニブ及びその主要代謝物（M11、HM5025423）の生化学的活性
- 組換えタンパク質及び細胞を用いたアッセイによるキナーゼ阻害活性及び選択性
- 細胞機能試験
- 細胞毒性試験
- 安全性プロファイリング試験
- 手動パッチクランプ法を用いたヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウムチャネルに対するフルキンチニブ又は M11 の作用

主な in vivo 薬理試験は以下のとおりであった。

- 単回経口投与薬理試験：マウスモデルにおけるフルキンチニブの VEGFR2 阻害作用及び薬物曝露量
- 反復経口投与薬理試験：ヒト結腸腺癌 HT-29、ヒト大細胞肺癌 NCI-H460、ヒト淡明細胞型腎癌 Caki-1 及びヒト胃腺癌 BGC-823 マウスモデルにおけるフルキンチニブの抗腫瘍効果
- NCI-H460 及び Caki-1 腫瘍組織を用いた血管新生阻害試験
- フルキンチニブ単剤、又は、化学療法剤、上皮成長因子受容体（EGFR）阻害剤及び cMET 阻害剤などの分子標的療法、若しくは免疫チェックポイント阻害剤［抗 programmed death-ligand 1（抗 PD-L1）抗体又は抗 programmed death-1（抗 PD-1）抗体］との併用による抗腫瘍効果
- 単回投与安全性薬理試験：マウスの行動に及ぼすフルキンチニブの作用
- 単回投与安全性薬理試験：麻酔下ビーグル犬を用いた心血管及び呼吸系に及ぼすフルキンチニブの作用

- 13 週間経口反復投与毒性試験：ビーグル犬を用いた心血管系、呼吸系及び神経系評価を含むフルキンチニブの毒性試験
- 4 週間及び 39 週間経口反復投与毒性試験：ビーグル犬を用いた心血管系評価を含むフルキンチニブの毒性試験
- フルキンチニブの開発を裏付けるために実施した薬理試験から得られた所見の簡潔な要約を以下に示す。なお、この試験デザイン及び所見の考察については 2.6.2.2～2.6.2.5 に示し、薬理学的検討から得られた所見の全体的な評価については 2.6.2.6 に記載した。また、実施した試験の一覧を表 2.6.2.1-1 に、所見の詳細を 2.6.3（薬理試験概要表）に示した。

効力を裏付ける試験

- フルキンチニブは VEGFR-1（Flt1）、-2（KDR）及び-3（Flt4）キナーゼに対し、用量依存的な阻害作用を示し、50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 33、35 及び 0.5 nM であった。
- 264 種類のキナーゼを含む選択性プロファイリングにおいて、フルキンチニブは VEGFR-1、-2 及び-3 を阻害し、線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）1 及び RET キナーゼを中等度に阻害した。フルキンチニブは、EGFR、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）及び cMET などの増殖及び細胞周期の調節に関与するキナーゼに対する阻害活性を示さなかった。フルキンチニブは、検討した血小板由来増殖因子受容体 β（PDGFRβ）及び Fms 様チロシンキナーゼ 3（Flt3）を含む他のキナーゼに対して阻害活性を示さなかったことから、キナーゼパネルにおいて高い選択性が示された。
- フルキンチニブは、VEGF 刺激による VEGFR-2 のリン酸化及び VEGF 誘発性血管新生を阻害した。
- 微小血管密度は、0.1 nM 以上のフルキンチニブにより用量依存的に減少した。
- M11 及びフルキンチニブは、細胞内 VEGFR-2 キナーゼ活性を阻害した（IC_{50} の平均値はそれぞれ 0.028±0.002 μM 及び 0.015±0.003 μM）。
- フルキンチニブは、2.5 mg/kg でヌードマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化（p-VEGFR2）を薬物曝露依存的に抑制した。
- フルキンチニブは、複数のヒト異種移植モデルにおいて、用量依存的かつ再現性のある腫瘍増殖抑制を示した。
- フルキンチニブの反復投与により NCI-H460 及び Caki-1 腫瘍組織における CD31 発現が用量依存的に抑制された。

副次的薬理試験

- 87 種類の受容体、イオンチャネル及び酵素のパネルにおいて、フルキンチニブ（1 μM）はいずれの標的に対しても 50%を超える阻害又は結合を示さなかったことから、フルキンチニブの標的外阻害の可能性が低いことが示された。

安全性薬理試験

- hERG カリウムチャネルを発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に対するフルキンチニブ及びその代謝物 M11（HM5025423）の IC_{50} はそれぞれ>13.08 μM 及び

>6.05 μM であった。これらの IC_{50} 値は、フルキンチニブの予定臨床用量（5 mg、1 日 1 回）でのヒト定常状態における非結合型最高血漿中濃度（C_{max}）のそれぞれ>370 倍及び>1000 倍であり、臨床的に意義のある曝露量において hERG に対する有意な阻害作用はないと考えられた。

- マウスに 0.5、5 又は 10 mg/kg を単回経口投与し、中枢神経系に対する作用を検討したところ、自発運動、行動及び運動協調性に対する影響はみられなかった。
- 麻酔イヌを用いた試験において、フルキンチニブは最高用量の 0.34 mg/kg まで心血管系及び呼吸系に影響を及ぼさなかった。
- イヌに最高 0.12 mg/kg/日の用量を 13 週間経口投与したところ、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。
- イヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験において、最高用量の 0.3 mg/kg/日まで心血管系に対する影響は認められなかった。イヌを用いた 39 週間反復投与毒性試験において、0.2/0.12 mg/kg/日（15 日から減量）の投与量で雄に心拍数減少が認められた。

薬力学的薬物相互作用試験

- 3 種類の非小細胞肺癌（NSCLC）異種移植モデルにおいて、フルキンチニブと EGFR チロシンキナーゼ阻害薬（ゲフィチニブ又は theliatinib）との併用で、それぞれの単剤より強い抗腫瘍効果が認められ、腫瘍増殖阻害（TGI）は 90%を上回った。
- NSCLC 異種移植モデルにおいて、フルキンチニブと cMET 阻害剤である savolitinib との併用で、それぞれの単剤より強い抗腫瘍効果が得られ、TGI は 94.6%であった。
- マウス結腸癌 CT26.WT 同系モデルにおいて、フルキンチニブとマウス抗 PD-L1 抗体の併用で、それぞれの単剤より強い抗腫瘍効果を示し、TGI は 77.8%であった。
- フルキンチニブは、CT26.WT 同系モデルにおける抗 PD-1 抗体及び化学療法の抗腫瘍効果を改善した。フルキンチニブと抗 PD-1 抗体併用時の TGI は 74.8%であった。フルキンチニブとイリノテカン／フルオロウラシルとを併用投与した時の TGI は 65.5%であり、フルキンチニブとオキサリプラチン／フルオロウラシルとを併用投与したときの TGI は 80.7%であった。

  抗 PD-1 抗体と併用した場合の抗腫瘍効果の増強は、血管新生抑制、血管正常化及び免疫調節作用と関連している可能性がある。
- フルキンチニブ単剤及び抗 PD-1 抗体との併用により、CD31 の発現が抑制され、α 平滑筋アクチン陽性 CD31 陽性（$\alpha\text{-SMA}^{+}\text{CD31}^{+}$）二重染色陽性の血管周皮細胞による腫瘍血管の覆いが増加したことから、この併用療法による抗血管新生及び血管正常化効果が示された。
- フルキンチニブ単剤及び抗 PD-1 抗体との併用により、腫瘍組織における $CD206^{+}$〔M2 腫瘍関連マクロファージ（M2-TAM）のバイオマーカー〕細胞の腫瘍組織への浸潤が有意に減少し、$CD8^{+}$T 細胞の腫瘍組織への浸潤が増加した。

表 2.6.2.1-1　薬理試験の概要

試験の種類	試験系	投与方法	試験番号 添付資料番号（区分）
効力を裏付ける試験-In vitro			
VEGFR2 キナーゼに対するフルキンチニブの生化学的活性	組換えヒト VEGFR2 キナーゼ触媒ドメインを用いた FRET-based Z'-LYTE™ kinase assay	In vitro	Oncology-20[redacted]-013-01 4.2.1.1-1（参考）
264 種類のキナーゼに対するフルキンチニブの選択性プロファイリング	種々の組換えヒトキナーゼ触媒ドメインを用いた FRET-based Z'-LYTE™ kinase assay TRANSCREENERTM fluorescence polarization ADP assay 遺伝子組換え CHK 1 触媒ドメインを用いた K-LISA™ assay 放射測定キナーゼ活性アッセイ（^{32}P-ATP 取込み）	In vitro	Oncology-20[redacted]-013-02 4.2.1.1-2（参考）
VEGFR2 リン酸化、VEGFR2 シグナル伝達経路及び VEGF 誘発性血管新生に対するフルキンチニブの阻害	VEGF 依存性 VEGFR2 リン酸化の阻害 改変 DELFIA®アッセイ/HEK-293-KDR 細胞 KDR シグナル伝達経路の阻害: ウェスタンブロット法／HEK-293-KDR 細胞及び HUVEC VEGF 依存性増殖: CCK-8 細胞生存率アッセイ／HUVEC チューブ形成: Tube formation assay on a Basement Membrane Matrix matrigel/HUVECs 細胞毒性: MTT colorimetric assay／ヒト腫瘍及び正常細胞株	In vitro	Oncology-20[redacted]-013-03 4.2.1.1-3（参考）
フルキンチニブ及び代謝物 M11 の評価 VEGFR2 キナーゼ及び VEGFR2 HEK-293-KDR 細胞におけるリン酸化	組換えヒト VEGFR2 キナーゼ触媒ドメインを用いた FRET-based Z'-LYTE™ kinase assay HEK-293-KDR 細胞を用いた ELISA	In vitro	Oncology-20[redacted]-013-01 4.2.1.1-4（参考）
効力を裏付ける試験-Ex vivo			
漿尿膜モデルにおける微小血管発芽に対するフルキンチニブの阻害	漿尿膜アッセイ／卵	Ex vivo	Oncology-20[redacted]-013-04 4.2.1.1-5（参考）
効力を裏付ける試験-In vivo			
ヌードマウスの肺組織における VEGF 刺激下 VEGFR2 リン酸化に対するフルキンチニブの阻害作用	遺伝子組換えマウス VEGF（500 ng、単回投与）で刺激した雌性 BALB/c ヌードマウス／ウェスタンブロット法による肺組織中のリン酸化 VEGFR2 及び β アクチンの検出	強制経口、単回	Oncology--20[redacted]013-05 4.2.1.1-6（参考）
ヌードマウスを用いた複数の皮下異種移植モデルにおけるフルキンチニブの抗腫瘍活性	ヒト胃腺癌細胞（BGC-823）、ヒト非小細胞肺癌細胞（NCI-H460）、ヒト結腸腺癌細胞（HT-29）又はヒト腎淡明細胞癌細胞（Caki-1）を移植した BALB/c ヌードマウス皮下異種移植モデル/%TGI	強制経口、反復投与	Oncology-20[redacted]-013-06 4.2.1.1-7（評価）
NCI-H460 及び Caki-1 皮下腫瘍組織における CD 31 発現に対するフルキンチニブの阻害作用	NCI-H460 及び Caki-1 細胞を BALB/c ヌードマウスに移植した皮下異種移植腫瘍モデルから採取した腫瘍組織検体／血管密度（血管新生）を免疫組織化学的分析による CD31 発現で評価	強制経口、反復投与	Oncology-20[redacted]-013-07 4.2.1.1-8（参考）

表 2.6.2.1-1　薬理試験の概要（続き）

試験の種類	試験系	投与方法	試験番号 添付資料番号（区分）
副次的薬理試験			
フルキンチニブの in vitro 薬理試験（[redacted]）	結合、酵素及び取込みアッセイ、イオンチャネル、トランスポーター、キナーゼ、その他の酵素	In vitro	100054042 4.2.1.2-1（参考）
安全性薬理試験			
チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に安定発現させた hERG カリウムチャネルの電流通過に対する作用	マニュアルパッチクランプ法／CHO 細胞	In vitro	215-0076-EP 4.2.1.3-1（参考）
M11:チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に安定発現させた hERG カリウムチャネルの電流通過に対する作用	マニュアルパッチクランプ法／CHO 細胞	In vitro	215-0060-EP 4.2.1.3-2（参考）
単回経口投与のマウス行動試験	ICR マウス	強制経口、単回	[redacted]49PB1 4.2.1.3-3（参考）
単回投与の麻酔ビーグル犬の心血管系及び呼吸系への影響	ビーグル犬	強制経口、単回	[redacted]49PH1 4.2.1.3-4（参考）
ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 13 週間経口投与毒性試験	ビーグル犬	経口カプセル、反復投与	8449374 4.2.3.2-5（評価）
ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 4 週間経口投与毒性試験	ビーグル犬	経口カプセル、反復投与	[redacted]49RD2 4.2.3.2-4（参考）
ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 39 週間経口投与毒性試験	ビーグル犬	経口カプセル、反復投与	[redacted]54RD2 4.2.3.2-6（参考）
薬力学的薬物相互作用			
NSCLC 細胞株由来の複数の皮下異種移植モデルにおけるフルキンチニブと EGFR 阻害剤ゲフィチニブ又は theliatinib との併用による抗腫瘍活性	BALB/c ヌードマウス異種移植腫瘍モデル／PC-9（ヒト肺腺癌細胞）、NCI-H292（ヒト粘表皮性肺癌細胞）、NCI-H3255（ヒト肺腺癌）	強制経口	Oncology-20[redacted]-013-01 4.2.1.4-1（参考）
NSCLC 皮下異種移植モデルにおけるフルキンチニブと cMET 阻害剤 savolitinib との併用による抗腫瘍活性	NCI-H1993（MET 遺伝子増幅を有するヒト肺腺癌)細胞を移植した BALB/c ヌードマウス異種移植腫瘍モデル	強制経口	Oncology-20[redacted]-013-02 4.2.1.4-2（参考）
マウス CT26.WT 同系腫瘍モデルにおけるフルキンチニブと抗 PD-L1 抗体との併用による抗腫瘍活性	CT26.WT（結腸癌細胞）を移植した BALB/c マウス同系腫瘍モデル	強制経口	Oncology-20[redacted]-013-03 4.2.1.4-3（参考）
マウス結腸癌 CT26.WT モデルにおけるフルキンチニブと抗 PD-1 抗体又は化学療法との併用による抗腫瘍活性	CT26.WT（結腸癌細胞）を移植した BALB/c マウス同系腫瘍モデル	強制経口	HTM-20[redacted]-013-01 4.2.1.4-4（参考）

^{32}P-ATP：標識アデノシン 5'-三リン酸、ADP：アデノシン二リン酸、CCK-8：Cell Counting Kit-8、CHK1：チェックポイントキナーゼ 1、CD31：分化抗原群 31、EGFR：上皮成長因子受容体、ELISA：酵素免疫測定法、FRET：蛍光共鳴エネルギー移動、HEK-293：ヒト胎児腎 293 細胞、hERG：ヒト遅延清流性カリウムイオンチャネル遺伝子、HUVEC：ヒト臍帯静脈内皮細胞、KDR：血管内皮増殖因子受容体 2（VEGFR2）、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423）、MTT：チアゾリルブルーテトラゾリウムブロミド、NSCLC：非小細胞肺癌、PD-1: programmed death-1、PD-L1：programed death-ligand 1、TGI：腫瘍増殖阻害、VEGF：血管内皮細胞成長因子、VEGFR：血管内皮成長因子受容体。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 緒言

血管新生は、正常な生理的条件下では不可欠かつ調節されたプロセスであるが、腫瘍発生時には調節不全となる[1][2]。ヒトの悪性腫瘍では、肺、胃、乳房、子宮頸部、結腸直腸、頭頸部、肝臓、卵巣、膵臓、前立腺、腎臓などの様々ながん種において異常な血管新生が認められている[1][2]。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知られている[3]。

VEGFR-1（Flt1）、VEGFR-2（KDR）、VEGFR-3（Flt4）等の VEGFR ファミリー及び FGFR1 は主に血管内皮細胞の表面に発現し、血管新生に重要な役割を果たしている[4][5]。VEGFR2 は血管モデリングと形成のプロセスにおける主要な分子の 1 つである。VEGFA がその受容体 VEGFR2 の細胞外ドメインに結合すると、ホスホイノシチド 3-キナーゼ（PI3K）、プロテインキナーゼ B（AKT）、プロテインキナーゼ C（PKC）、RAF 及び RAS キナーゼ、並びに P38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（P38）経路などの多くの下流の細胞シグナルカスケードの活性化が誘発される。これらの下流経路が活性化されると、血管内皮細胞の増殖、分岐、遊走が促進され、血管形成又は血管新生が生じる[6]。

さらに、VEGFR が腫瘍免疫調節において重要な役割を果たすというエビデンスがある。腫瘍細胞は VEGF を分泌し、それが T 細胞における VEGFR シグナル伝達経路を活性化して PD-1 発現のアップレギュレーションをもたらす。PD-1 のアップレギュレーションによりエフェクターT 細胞（CD8+T 細胞）の機能障害が生じ、T 細胞の本来の抗腫瘍活性が低下し、異常な腫瘍免疫寛容が起こる[7]。単球は、ケモカイン及び補体成分を含む多様な走化性物質に反応して腫瘍に動員される。腫瘍において、単球は腫瘍関連マクロファージ（TAM）と呼ばれるマクロファージに分化する。これらの TAM は上皮成長因子や VEGF などの多くの増殖因子を産生することにより、がん細胞の増殖、浸潤及び転移を促進し、腫瘍血管新生を刺激し、T 細胞を介した抗腫瘍免疫反応を回避する。これらのすべてが腫瘍の進行をもたらす[8][9]。

したがって、VEGF、VEGFR シグナル伝達経路を阻害することは、分子標的癌治療法の最も有望な候補の一つと考えられている[3]。ベバシズマブ、ラムシルマブ、anlotinib などの VEGFR 阻害薬が固形がんの治療選択肢となっていることから、VEGFR は重要な創薬標的であることが示されている。しかし、これらの初期の 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[10][11][12][13][14]。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。

HUTCHMED Limited は、高い選択性と許容可能な安全性プロファイルを有する血管新生阻害剤であるフルキンチニブを転移性大腸癌の治療薬として開発した。

2.6.2.2.2 In vitro 薬理試験

転移性大腸癌患者の治療に関するフルキンチニブの効力を裏付ける一連の in vitro 試験を実施した。これらの in vitro 試験には、作用機序、効力及び選択性の検討が含まれる。すべての in vitro インキュベーションは特に明記しない限り、5% CO_2、37°C で実施した。

なお、in vitro 薬理試験データの概要表は 2.6.3.2 に示した。

2.6.2.2.2.1 フルキンチニブの VEGFR2 キナーゼに対する生化学的活性（Oncology-20[redacted]-013-01 試験）

：添付資料番号 4.2.1.1-1（参考）

Oncology-20[redacted]-013-01 試験では 30 μM までの濃度のフルキンチニブの VEGFR2 阻害作用を組換えヒト VEGFR2 触媒ドメインと FRET (fluorescence resonance energy transfer)-based Z'-LYTE™ kinase - Tyrosine 1 peptide assays（Invitrogen、PV3190）を用いて評価した。

フルキンチニブは VEGFR2 キナーゼに対して用量依存的な阻害作用を示し、3 つの独立した試験で得られた IC_{50} 値の平均値は 0.025 ± 0.010 μM であった（表 2.6.2.2-1）。対照化合物であるスニチニブの IC_{50} 値の平均値は 0.116 ± 0.013 μM であった。

表 2.6.2.2-1　フルキンチニブによる VEGFR2 キナーゼ阻害作用

化合物	試験番号	VEGFR2 キナーゼに対する IC_{50}（μM）
フルキンチニブ	1	0.015
	2	0.025
	3	0.034
	平均値±標準偏差	0.025 ± 0.010
スニチニブ	1	0.103
	2	0.128
	3	0.116
	平均値±標準偏差	0.116 ± 0.013

出典：Oncology-20[redacted]-013-01 試験　Table 1
IC_{50}：50%阻害濃度、VEGFR2：血管内皮増殖因子受容体 2

2.6.2.2.2.2 264 種類のキナーゼに対するフルキンチニブの選択性（ONCOLOGY-20[redacted]-013-02）

：添付資料番号 4.2.1.1-2（参考）

Oncology-20[redacted]-013-02 試験では、古典的な標識アデノシン 5'ー三リン酸（^{32}P-ATP）取込みアッセイを用いて、計 264 種類のキナーゼの酵素活性に対する 1 μM のフルキンチニブ及びスニチニブ（対照化合物）の阻害活性を検討した（表 2.6.2.2-2）。

表 2.6.2.2-2　264 種類のキナーゼパネルでのフルキンチニブ（1 μM）のキナーゼ阻害活性

キナーゼ	キナーゼ活性（%）[a]	IH（%）[b]
PDGFRα (V561D)	-2	102
VEGFR1 [Flt1]	2	98
cKit (V560G)	3	97
VEGFR2 [KDR]	5	95
VEGFR3 [Flt4]	6	94
Fms	6	94
FGFR2 (N549H)	7	93

表 2.6.2.2-2　264 種類のキナーゼパネルでのフルキンチニブ（1 μM）のキナーゼ阻害活性（続き）

キナーゼ	キナーゼ活性（%）[a]	IH（%）[b]
FGFR1	13	87
cKit (V654A)	18	82
Fms (Y969C)	18	82
Ret	18	82
PDGFRα	31	69
FGFR2	34	66
cKit	38	62
FGFR3	46	54
MAPK1	47	53
PDGFRα (D842V)	51	49
Abl (H396P)	56	44
Abl (M351T)	61	39
CK2α2	68	32
Flt3 (D835Y)	74	26
MuSK	74	26
Tie2 (Y897S)	74	26
MS3	75	25
PI3K (p110b/p85a)	77	23
PDGFRβ	78	22
MRCKβ	79	21
cKit (D816H)	80	20
Abl (Y253F)	81	19
CDK2/cyclinE	82	18
Mer	82	18
Abl (T315I)	84	16
BrSK2	84	16
GSK3α	85	15
Abl	86	14
Tie2 (R849W)	86	14
Ret (V804M)	87	13
CDK5/p35	88	12
ErbB4	88	12
Met (Y1248C)	88	12
MLK1	88	12
Yes	88	12
ARK5	89	11
JAK3	89	11
CaMKIδ	90	10
PKBα	90	10
EphA2	103	-3
EphA5	103	-3
Fgr	103	-3
MSK1	103	-3
PKA	103	-3
PKCδ	103	-3
Plk1	103	-3
TrkA	103	-3
ASK1	104	-4
BrSK1	104	-4
Fyn	104	-4
Mnk2	104	-4
MSK2	104	-4
PKBγ	104	-4

表 2.6.2.2-2　264 種類のキナーゼパネルでのフルキンチニブ（1 μM）のキナーゼ阻害活性（続き）

キナーゼ	キナーゼ活性（%）[a]	IH（%）[b]
STK33	104	-4
BRK	105	-5
DAPK1	105	-5
EGFR (T790M)	105	-5
EphB1	105	-5
Fer	105	-5
JNK2α2	105	-5
MAPKAP-K2	105	-5
MAPKAP-K3	105	-5
Met (D1246H)	105	-5
Met (M1268T)	105	-5
PAK2	105	-5
Pim-2	105	-5
SAPK2a	105	-5
SAPK2a (T106M)	105	-5
SAPK4	105	-5
SGK	105	-5
TSSK2	105	-5
CDK3/cyclinE	106	-6
CHK2 (R145W)	106	-6
EphA1	106	-6
IRR	106	-6
Lyn	106	-6
MST2	106	-6
NEK3	106	-6
PhKγ2	106	-6
ROCK-I	106	-6
Snk	106	-6
TrkB	106	-6
TSSK1	106	-6
WNK2	106	-6
CHK1	107	-7
Rsk1	90	10
Txk	90	10
EphA7	91	9
Src (T341M)	91	9
CHK2	92	8
JAK2	92	8
MARK1	92	8
SGK2	92	8
SRPK1	92	8
cSRC	93	7
EphA3	93	7
FGFR4	93	7
SGK3	93	7
CDK9/cyclin T1	94	6
PKGIα	94	6
CaMKIIβ	95	5
DAPK2	95	5
DAPK2	95	5
HIPK3	95	5
Met (Y1248H)	95	5
p70S6K	95	5

表 2.6.2.2-2　264 種類のキナーゼパネルでのフルキンチニブ（1 μM）のキナーゼ阻害活性（続き）

キナーゼ	キナーゼ活性（%）[a]	IH（%）[b]
PAK3	95	5
Ron	95	5
TBK1	95	5
Tec activated	95	5
Hck	96	4
IKKP	96	4
NEK7	96	4
VRK2	96	4
ZIPK	96	4
ALK4	97	3
EphB3	97	3
GRK5	97	3
MKK7β	97	3
PKC	97	3
PTK5	97	3
Rsk3	97	3
SIK	97	3
Src (1-530)	97	3
Syk	97	3
DDR2	98	2
Haspin	98	2
Met (D1246N)	98	2
Met (Y1248D)	98	2
NEK2	98	2
Pim-3	98	2
PKCμ	98	2
Rsk2	98	2
TAO1	98	2
CaMKIV	99	1
EphB4	107	-7
GCK	107	-7
MLCK	107	-7
SAPK2b	107	-7
CK1γ3	108	-8
CK1δ	108	-8
c-RAF	108	-8
FAK	108	-8
Lck	108	-8
Met	108	-8
mTOR	108	-8
mTOR/FKBP12	108	-8
PKCβII	108	-8
PrKX	108	-8
ROCK-II	108	-8
Ros	108	-8
DMPK	109	-9
EphA4	109	-9
IRAK4	109	-9
JNK3	109	-9
MEK1	109	-9
NEK11	109	-9
PAR-1Bα	109	-9
PI3K (p110d/p85a)	109	-9

表 2.6.2.2-2　264 種類のキナーゼパネルでのフルキンチニブ（1 μM）のキナーゼ阻害活性（続き）

キナーゼ	キナーゼ活性（%）[a]	IH（%）[b]
TAK1	109	-9
CaMKIIδ	110	-10
CK1γ2	110	-10
MINK	110	-10
ALK	111	-11
CDK5/p25	111	-11
IRAK1	111	-11
LIMK1	111	-11
PAK5	111	-11
PKCβI	111	-11
PKCη	111	-11
Plk3	111	-11
WNK3	111	-11
Aurora-A	112	-12
Bmx	112	-12
CK2	112	-12
EGFR	112	-12
GRK 6	112	-12
MAPK2	112	-12
Tie2	112	-12
ACK1	113	-13
Flt3	113	-13
GSK3β	113	-13
IR, activated	113	-13
IGF-1R	114	-14
MST1	114	-14
CDK7/cyclinH/MAT1	99	1
FGFR1 (V561M)	99	1
GRK7	99	1
Hc activated	99	1
HIPK 1	99	1
MRCKα	99	1
PI3 Kinase (p120g)	99	1
Ret (V804L)	99	1
RIPK2	99	1
Rsk4	99	1
BTK (R28H)	100	0
CaMKIIγ	100	0
cKit (D816V)	100	0
CLK2	100	0
DRAK1	100	0
PKCε	100	0
PKCζ	100	0
HIPK2	101	-1
MK6	101	-1
MSSK1	101	-1
PKCι	101	-1
Pyk2	101	-1
SAPK3	101	-1
SRPK2	101	-1
BTK	102	-2
CaMKI	102	-2
CHK2 (I157T)	102	-2

表 2.6.2.2-2　264 種類のキナーゼパネルでのフルキンチニブ（1 μM）のキナーゼ阻害活性（続き）

キナーゼ	キナーゼ活性（%）[a]	IH（%）[b]
CKIγl	102	-2
CLK3	102	-2
EphA8	102	-2
NEK6	102	-2
NLK	102	-2
PDK1	102	-2
PKCγ	102	-2
TAO3	102	-2
EGFR (L858R)	103	-3
ULK3	114	-14
PKCθ	115	-15
TAO2	115	-15
Arg	116	-16
IR	116	-16
PKD2	116	-16
Abl (Q252H)	117	-17
CDK2/cyclinA	117	-17
PKBβ	117	-17
PKGIβ	117	-17
Rse	117	-17
Itk	118	-18
ZAP-70	118	-18
LOK	119	-19
EphB2	120	-20
LKB	120	-20
PRK2	120	-20
IKka	122	-22
TLK 2	122	-22
ULK2	122	-22
PAK6	123	-23
PRAK	123	-23
Pim-1	124	-24
EGFR (T790M, L 858R)	125	-25
Ax1	126	-26
IGF-IR, activated	130	-30
DCAMKL2	131	-31
Fes	133	-33
PAK4	135	-35
PASK	136	-36
CDK1/cyclinB	139	-39
eEF-2K	139	-39
CSK	142	-42
JNK1α1	143	-43
MELK	144	-44
EGFR (L861Q)	148	-48

出典：Oncology-20[redacted]-013-02 試験　Table 2

IH：キナーゼ活性阻害率

[a] キナーゼ活性（%）は、化合物未処理のキナーゼ活性に対する化合物のキナーゼ活性の比から求めた。

[b] IH%：100%－キナーゼ活性%。

特定のキナーゼに対するフルキンチニブの阻害作用の選択性についても、FRET based Z'-LYTE assay、[^{32}P-ATP] incorporation、K-LISA assay 又は Fluorescence Polarization adenosine diphosphate を用いて検討した（表 2.6.2.2-3）。

表 2.6.2.2-3　フルキンチニブ及びスニチニブのキナーゼ阻害活性

キナーゼ	フルキンチニブ IC_{50}（nM）	スニチニブ IC_{50}（nM）
VEGFR1 (Flt1)	33 [a]	9 [a]
VEGFR2 (KDR)	35 [a]	22 [a]
VEGFR3 (Flt4)	0.5 [a]	0.2 [a]
FGFR1(h)	181 [a]	327 [a]
Ret(h)	128 [a]	34 [a]
EGFR	> 30,000	17625
CDK1	> 10,000	> 1,000
CDK2	> 10,000	> 1,000
CDK5	> 10,000	> 1,000
PDGFRβ	> 10,000	97, 159 [a]
Flt3	> 10,000	1, 6 [a]
cKit(h)	458 [a]	109 [a]
FGFR2(h)	553 [a]	689 [a]
PDGFRα(h)	601 [a]	97 [a]
Fms(h)	698 [a]	0.2 [a]
FGFR(h)	738 [a]	39 [a]
EphB4	>3,000	2700
c-Met	>10,000	>3,000
Tie2	>10,000	>1,000
CHK1	>10,000	874
Abl(h)	-	602 [a]

出典：Oncology-20[redacted]-013-02 試験　Table 3
CDK：サイクリン依存性キナーゼ、EGFR：上皮成長因子受容体、FGFR1：線維芽細胞増殖因子受容体 1、Flt3：Fms 関連受容体チロシンキナーゼ 3、h：ヒト、IC_{50}：50%阻害濃度、PDGFRβ：血小板由来増殖因子受容体、VEGFR：血管内皮成長因子受容体
[a]　キナーゼ活性は、^{32}P-ATP 取込みアッセイを使用して検出した。

全体として、フルキンチニブは VEGFR-1、-2、及び-3 を強力にかつ高い選択性を持って阻害した。フルキンチニブは FGFR1 及び RET を中程度に阻害したが、EGFR、CDK 及び cMET などの増殖及び細胞周期の調節に関与するキナーゼや、PDGFRβ 及び Flt3 に対しては阻害活性を示さなかった。それに対して、スニチニブ（対照化合物）は Flt3 や PDGFRβ を 100 nM 以下の IC_{50} 値で阻害した。

2.6.2.2.2.3 VEGFR2 リン酸化及び VEGF 誘導血管新生に対するフルキンチニブの阻害効果（Oncology-20[redacted]-013-03 試験）

：添付資料番号 4.2.1.1-3（参考）

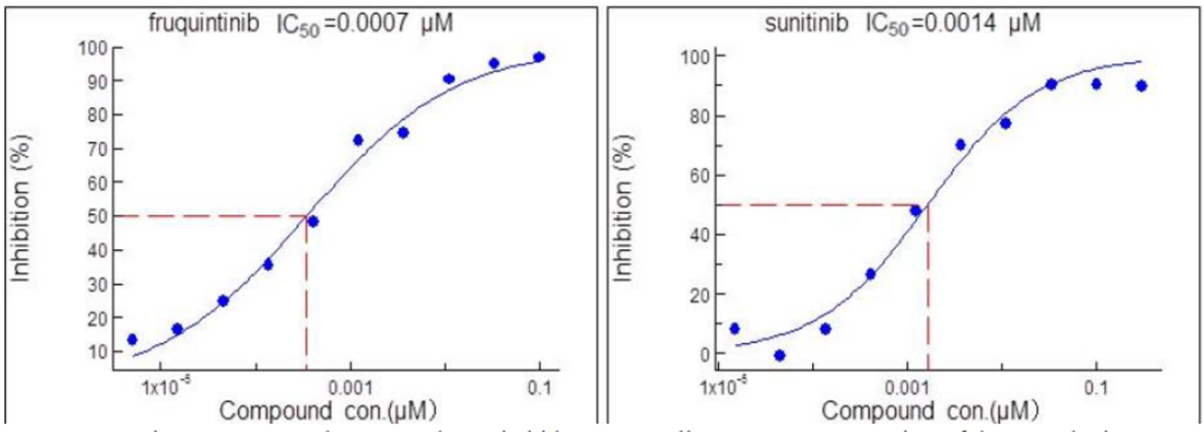
Oncology-20[redacted]-013-03 試験において、VEGFR2（KDR）過剰発現ヒト胎児腎 293 細胞（以下、「HEK-293-KDR」）を用いて、VEGFR2 のリン酸化に対するフルキンチニブの阻害作用が検討された。さらに、初代培養ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いて、VEGF 依存性増殖及び管形成に対するフルキンチニブの作用を評価した。さらに、一連のヒト腫瘍及び非悪性細胞株の生存に対するフルキンチニブの潜在的な細胞毒性作用を、チアゾリルブルーテトラゾリウムブロミド（MTT）比色法及び Cell Counting Kit 8（CCK-8）を用いて評価した。

（1）VEGF 誘導 VEGFR2 リン酸化に対するフルキンチニブの抑制効果

本試験では、ウシ胎児血清（FBS）を含まない培地を用い 96 ウェルプレートに HEK-293-KDR 細胞を 2×10^4 個／ウェルの割合で播種した。FBS フリー培地で一晩静置した後、細胞を 5.08 pM から 0.1 µM の濃度範囲のフルキンチニブ又は 15.2 pM から 0.3 µM の濃度範囲のスニチニブ（対照化合物）で 30 分間処理した。その後、50 ng/mL の組換えヒト VEGF で 8 分間刺激した。細胞を溶解し、溶解液をプレコートしたアッセイプレート（モノクローナル抗 KDR 抗体でコーティング）に入れ、1 時間インキュベートした。続いて、溶解物中の VEGFR2 リン酸化を、DELFIA (dissociation-enhanced lanthanide fluorescence) immunoassay を用い分析した。阻害率を算出し、IC_{50} を算出した。

独立した 3 試験の結果から、フルキンチニブは HEK-293-KDR 細胞における VEGF 刺激による VEGFR2 リン酸化を用量依存的に強力に阻害することが示され、その IC_{50} 値は 0.0006 ± 0.0002 µM であった。スニチニブの IC_{50} 平均値は 0.0018 ± 0.0009 µM であった。これら 3 回の実験のうち 1 回で得られた阻害曲線を図 2.6.2.2-1 に示す。

図 2.6.2.2-1　HEK293-KDR 細胞における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化に対する阻害作用



出典：Oncology-20[redacted]-013-03 試験　Figure 1
con：濃度、HEK293：ヒト胎児腎 293 細胞、IC_{50}：50%阻害濃度、KDR：血管内皮増殖因子受容体 2（VEGFR2）、VEGF：血管内皮増殖因子、VEGFR2：血管内皮増殖因子受容体 2

（2）フルキンチニブによる VEGF 誘発性 VEGFR 2 リン酸化とその下流シグナル阻害作用

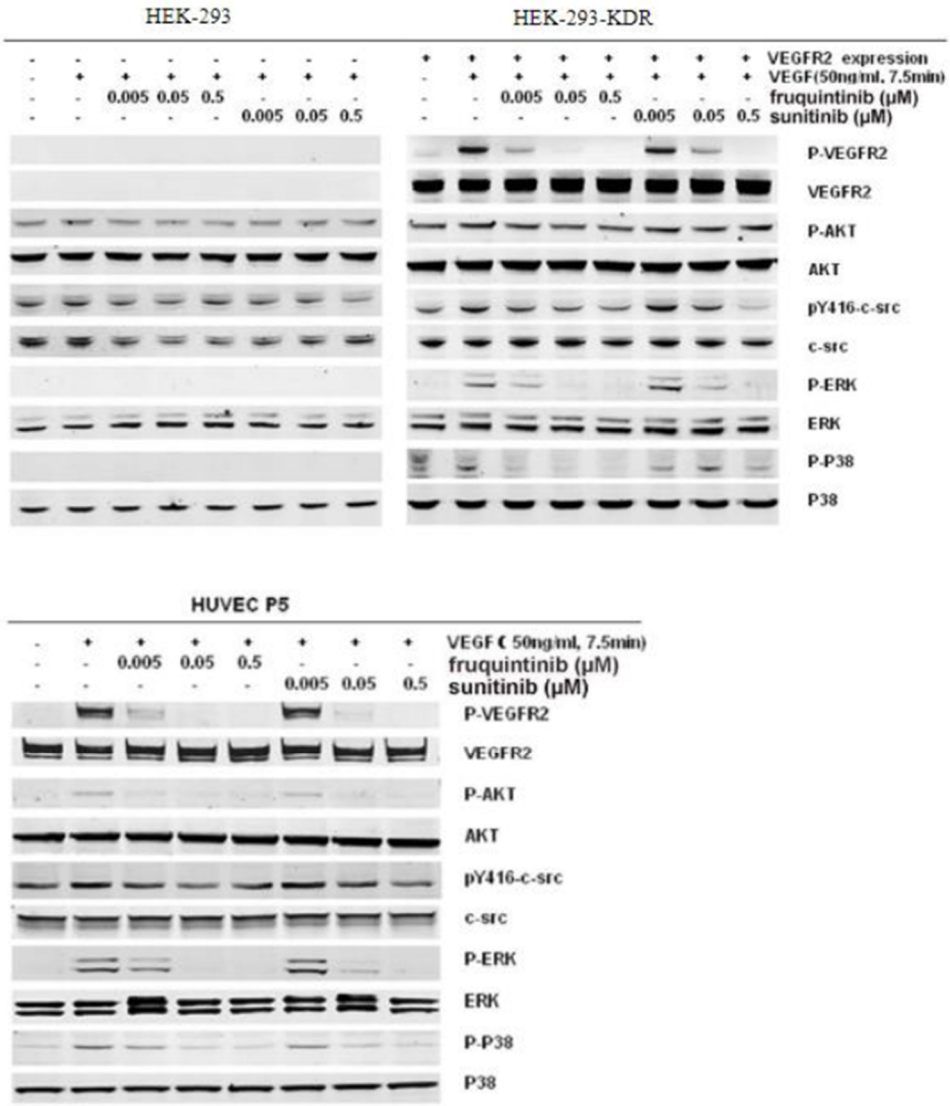
VEGF 刺激条件下の VEGFR2 リン酸化とその下流シグナル分子に対するフルキンチニブの阻害作用を、それぞれ HEK-293-KDR と HUVEC を用いてウェスタンブロット法で検討した。

この試験では、HEK-293-KDR 又は HUVEC を 5×10^5 個／ウェルの細胞を 6 ウェルプレートに播種し、10% FBS を含む完全培地で一晩インキュベートした。FBS フリー培地で 16 時間スターベーションした後、フルキンチニブ又はスニチニブ（対照化合物）を 0.005～0.5 µM の濃度で 30 分間添加した。その後、細胞を 50 ng/ml の組換えヒト VEGF で 7.5 分間刺激した。細胞を溶解し、抽出物をウェスタンブロット法と LI-COR Odyssey® Infrared Imaging System で分析した。

HEK293-KDR 細胞及び HUVEC のいずれにおいても、VEGF 刺激による VEGFR2 リン酸化を用量依存的に阻害した（図 2.6.2.2-2）。VEGFR2 及びその下流シグナル伝達カスケードで

ある AKT、細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）、Src 及び p38 は VEGF 刺激により活性化され、フルキンチニブにより阻害された（図 2.6.2.2-2）。

図 2.6.2.2-2　HEK293-KDR 及び HUVEC における KDR シグナル伝達経路に対する阻害



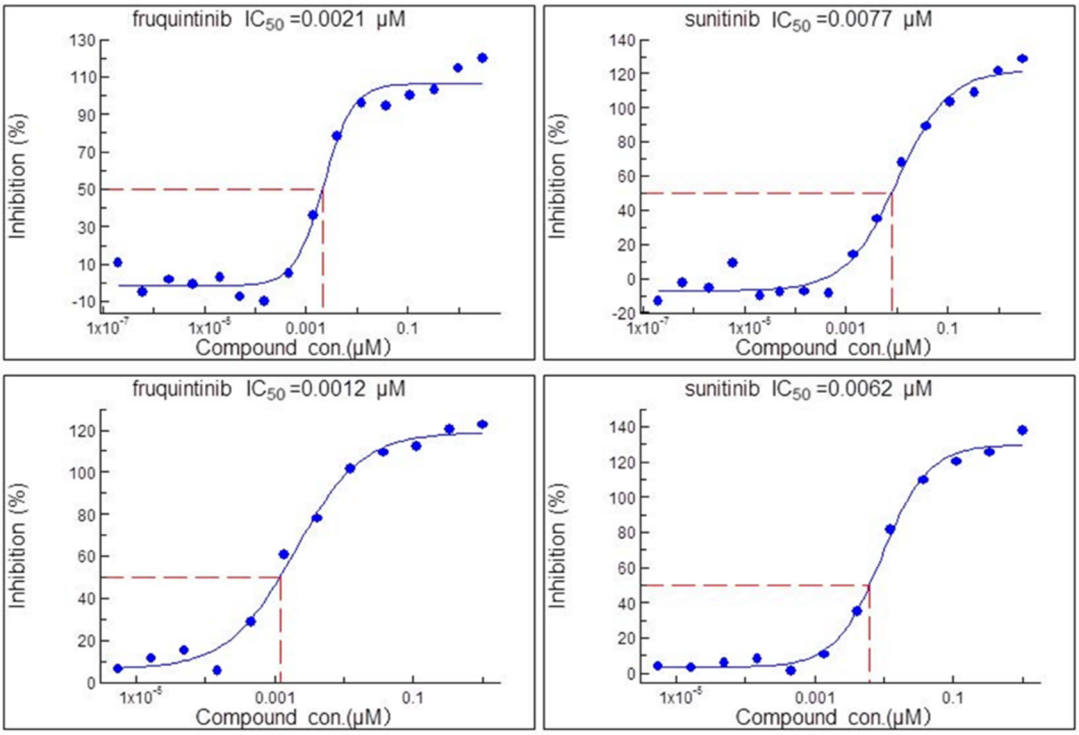
出典：Oncology-20[redacted]-013-03 試験　Figure 2
AKT：プロテインキナーゼ B、ERK：細胞外シグナル調節キナーゼ、HEK293：ヒト胎児腎 293 細胞、HUVEC：ヒト臍帯静脈内皮細胞、KDR：　血管内皮増殖因子受容体 2（VEGFR2）、P：リン酸化、P38：p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ、pY416：リン酸化チロシン 416、VEGF：血管内皮増殖因子、VEGFR2：血管内皮増殖因子受容体 2

（3）HUVEC 増殖に対するフルキンチニブの阻害作用

本試験では、HUVEC を 0.2%ゼラチンコートした 96 ウェルプレートに 5×10^3 cell／ウェルで播種し、一晩インキュベートした。その後、ヒト組換え型 VEGF（50 ng/mL）の存在下で、0.2 pM から 3 μM の濃度のフルキンチニブ又はスニチニブ（対照化合物）で細胞を処理し、更に 48 時間インキュベートした。インキュベーション終了時に、CCK-8 溶液を添加して細胞の生存率を定量し、各濃度での阻害率及び IC_{50} を算出した。

フルキンチニブは VEGF 依存性 HUVEC 増殖を用量依存的に阻害した。2 つの独立した阻害アッセイから求めた IC_{50} の平均値は、フルキンチニブで 1.6 nM、スニチニブで 7.0 nM であった（図 2.6.2.2-3）。

図 2.6.2.2-3　VEGF 依存性 HUVEC 増殖に対する阻害実験



出典：Oncology-20[redacted]-013-03　Figure 3
con：濃度、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

（4）管腔形成試験

管腔形成において、内皮細胞は増殖して新しい血管を形成すると同時に、基底膜を通って元々存在した場所から移動しなければならない。必要なシグナル伝達経路が阻害されると、完全な管腔が形成されなくなる。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する。チューブの全長によって測定される血管密度は、血管新生阻害薬の効果を評価するために使用できるパラメータである。したがって、本試験では、代表的なモデルとして HUVEC を用いた管腔形成試験を用いて、in vitro での血管新生に対するフルキンチニブの効果を検討した。

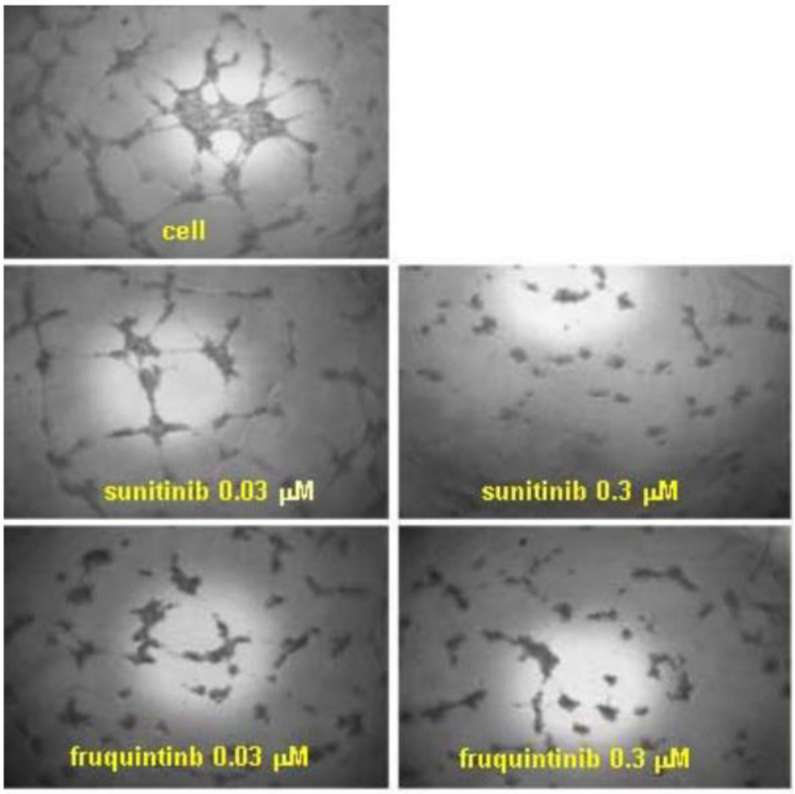
初代培養 HUVEC を、基底膜マトリックスのマトリゲルでプレコートした 96 ウェルプレートに 2×10^4 個／ウェルの密度で播種し、0.5% FBS 含有 RPMI1640 培地で 30 分間インキュベートした。細胞をそれぞれ濃度 0.03 及び 0.3 μM のフルキンチニブ又は対照化合物スニチニブで処理し、18 時間インキュベートした。

対照ウェルは 0.5%ジメチルスルホキシド含有 RPM I 1640 培地で処理した。顕微鏡下で 40 倍の倍率で以下のインキュベーション画像を撮影した（図 2.6.2.2-4）。ウェルの管長の合計を測定し、抑制率を算出した（図 2.6.2.2-5）。

フルキンチニブはHUVECの管腔形成に対して用量依存的な影響を示し、阻害率は0.03 μMで74%、0.3 μMで94%であった。対照化合物であるスニチニブの阻害率は0.03 μM及び0.3 μMでそれぞれ35%及び93%であった。

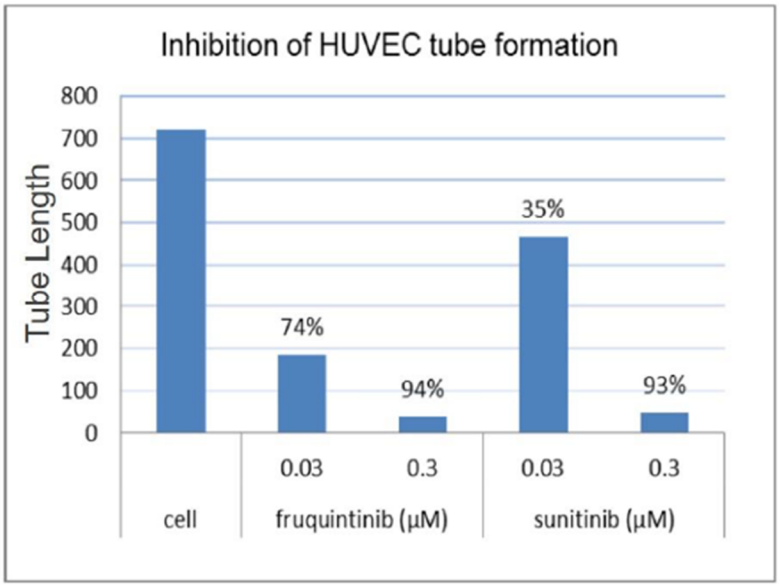
VEGFR2が媒介するHUVECの増殖及び管腔形成の抑制は、VEGFR2のリン酸化に対する阻害活性と一致していた。

図 2.6.2.2-4　フルキンチニブによるHUVECの管腔形成阻害



出典：Oncology-20[redacted]-013-03 試験　Figure 4
HUVEC：ヒト臍帯静脈内皮細胞、Cell：対照、Sunitinib：対照化合物

図 2.6.2.2-5　フルキンチニブによる HUVEC 管腔形成阻害



出典：Oncology-20[redacted]-013-03 試験　Figure 5
HUVEC：ヒト臍帯静脈内皮細胞
cell：対照
%：管長の抑制率

（5）様々なヒト細胞株に対するフルキンチニブの細胞毒性

本試験では、表 2.6.2.2-4 に示した 11 種類のヒト腫瘍細胞株と 1 種類の正常ヒト細胞株を用いて、フルキンチニブの細胞毒性を評価した。10% FBS 含有培地中で細胞を 5×10^3 から 3×10^4 個／ウェルの密度で 96 ウェルプレートに播種し、一晩インキュベートした。細胞を 2 nM～3 μM の濃度範囲のフルキンチニブ又は 1.5 nM～3 μM の濃度範囲のスニチニブ（対照化合物）で処理し、更に 48 時間インキュベートした。MTT 比色法を用いて細胞の代謝活性を測定し、各濃度での阻害率及び各化合物の IC_{50} 値を算出した。加えて、HUVEC の生存率を CCK-8 キットを用いて測定した。

VEGFR に対するキナーゼ選択性と一致して、フルキンチニブの細胞毒性は低いことが示された。表 2.6.2.2-4 に示したように、大部分の試験細胞株において、フルキンチニブは細胞毒性を示さず、IC_{50} は 30 μM 以上であった。フルキンチニブは HUVEC においてわずかな細胞毒性を示し、IC_{50} 値は 18.7 μM であった。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的な殺細胞作用を示し、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、スニチニブはオフターゲットと思われるより強力な細胞毒性を有することが示された。したがって、スニチニブと比較して、フルキンチニブは細胞毒性が低く、これは高いキナーゼ選択性によるものと考えられる。

表 2.6.2.2-4　異なる細胞株におけるフルキンチニブとスニチニブの細胞毒性のまとめ

組織源	細胞名	培地+10% FBS	細胞数/ウェル	フルキンチニブ	スニチニブ
ヒト乳癌	Bcap-37	DMEM	8000	>30	4.7
ヒト卵巣腺癌	SKOV-3	IMDM	8000	>30	>30
ヒト非小細胞肺癌	A549	DMEM	8000	>30	3.9
ヒト大細胞肺癌	NCI-H460	RPMI 1640	8000	>30	6.5
ヒト肝細胞癌	HEPG2	DMEM	8000	>30	5.4
ヒト胃腺癌	AGS	IMDM	8000	>30	15.5
ヒト結腸線癌	SW620	L-15	8000	>30	6.9
ヒト結腸線癌	HT-29	M-5A	8000	>30	5.2
ヒト皮膚類表皮癌	A431	DMEM	8000	>30	9.8
ヒト皮膚悪性黒色腫	A375	DMEM	30000	>30	9.4
ヒト肝細胞癌	QSG-7701	DMEM	8000	>30	10.4
ヒト臍帯静脈内皮細胞	HUVEC（自家調製）	RPMI 1640	5000	18.7	3.5

出典：Oncology-20[redacted]-013-03 試験　Table 9
DMEM：ダルベッコ改変イーグル培地、FBS：ウシ胎児血清、IC_{50}：50%阻害濃度、IMDM：イスコフ改変ダルベッコ培地、L-15：ライボビッツ L-15 培地、M-5A：マッコイ 5A 培地。

2.6.2.2.2.4 HEK-293-KDR 細胞における VEGFR2 キナーゼ及び VEGFR2 リン酸化に対するフルキンチニブ及び代謝物 M11 の評価（Oncology-20[redacted]-013-01 試験）

：**添付資料番号 4.2.1.1-4（参考）**

Oncology-20[redacted]-013-01 試験ではフルキンチニブ及びヒト循環血中で認められたフルキンチニブの主要代謝物である M11 の生化学的活性を評価した。

（1）フルキンチニブ及び M11 の VEGFR2 キナーゼに対する生化学的活性

本試験では、フルキンチニブ及び M11（3 μM までの濃度）の VEGFR2 キナーゼに対する阻害作用を検討した。組み換え VEGFR2 の触媒ドメインを用いた FRET-based Z'-LYTE kinase-Tyrosine 1 peptide assays で評価した。

M11 は VEGFR キナーゼを用量依存的に阻害し、3 回の独立した実験から得られた IC_{50} 平均値は 0.028±0.002 μM であった（表 2.6.2.2-5）。この試験におけるフルキンチニブの平均 IC_{50} は 0.015±0.003 μM であり、M11 はフルキンチニブよりも活性が低いことが示された。

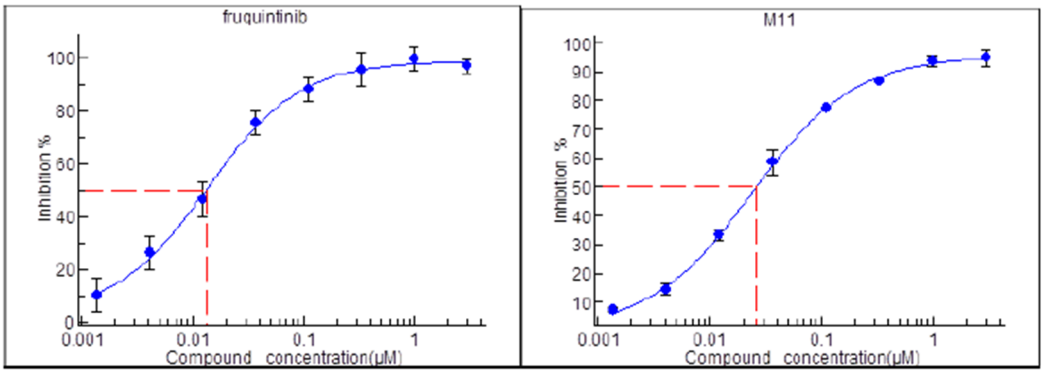
表 2.6.2.2-5　VEGFR2 キナーゼ活性に対するフルキンチニブ及び M11 の阻害活性

化合物	アッセイ番号	VEGFR2 キナーゼに対する IC_{50}（μM）
フルキンチニブ	1	0.013
	2	0.018
	3	0.013
	平均値±標準偏差	0.015±0.003
M11	1	0.028
	2	0.031
	3	0.026
	平均値±標準偏差	0.028±0.002

出典：Oncology-20[redacted]-013-01 試験　Table 1
IC_{50}=50%阻害濃度;M11=フルキンチニブの代謝物;VEGFR2=血管内皮増殖因子受容体 2
M11 は本報告書では HM5025423 と記載されている。

図 2.6.2.2-6 は、VEGFR2 キナーゼ活性に対するフルキンチニブ及び M11 の作用を示す。

図 2.6.2.2-6　VEGFR2 キナーゼ活性に対するフルキンチニブ及び M11 の阻害活性



出典：Oncology-20[redacted]-013-01 試験　Figure 1
M11：フルキンチニブの代謝物、VEGFR2：血管内皮増殖因子受容体 2

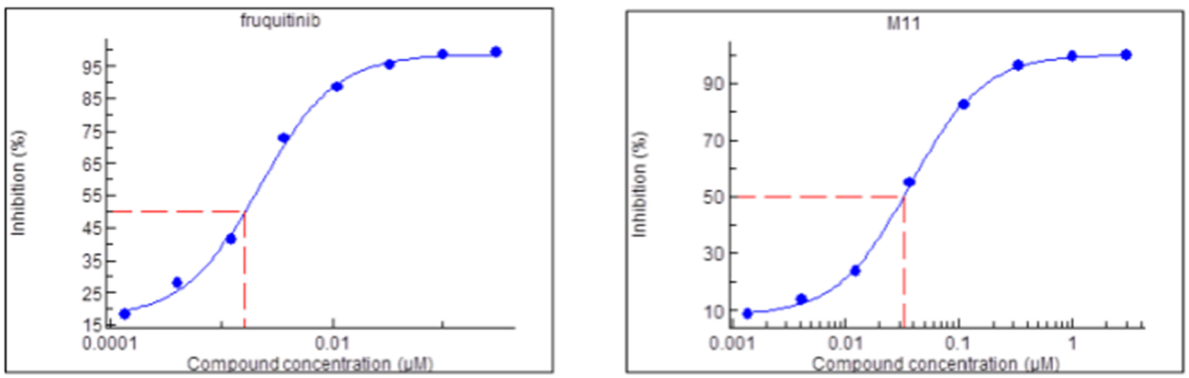
（2）VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化の阻害

本試験では、FBS を含まない培地を用い 96 ウェルプレートに HEK-293-KDR 細胞を 5×10^4 細胞／ウェルの密度で播種した。FBS を含まない培地で一晩スターベーションした後、0.137 nmol/L から 0.3 μmol/L の濃度のフルキンチニブ又は 1.37 nmol/L から 3 μmol/L の濃度の M11 で 60 分間処置した。その後、50 又は 100 ng/mL（それぞれ M11 及びフルキンチニブ）の組換えヒト VEGF で 8 分間刺激した。細胞を溶解して抽出物を分析し、VEGF で刺激される VEGFR2 リン酸化に対する M11 の IC_{50} 値を、酵素免疫測定法（ELISA）を用いて測定した。

M11 は、HEK293-KDR 細胞における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化を用量依存的に阻害し、IC_{50} は 0.033 μM であった。フルキンチニブの IC_{50} は 0.002 μM であり、M11 の活性はフルキンチニブの 1/10 であった。

図 2.6.2.2-7 は、HEK293-KDR の VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化に対するフルキンチニブ及び M11 の阻害作用を示したものである。

図 2.6.2.2-7　HEK293-KDR における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化に対する
フルキンチニブ及び M11 の阻害作用



出典：Oncology-20[redacted]-013-01 試験　Figure 2
略語:HEK293：ヒト胎児腎 293 細胞、KDR：血管内皮増殖因子受容体 2（VEGFR2）、M11：フルキンチニブの代謝物、VEGF：血管内皮増殖因子、VEGFR2：血管内皮増殖因子受容体 2

以上、M11 は VEGFR2 キナーゼ活性及び VEGFR2 リン酸化を強力に阻害したことから、M11 はフルキンチニブの活性代謝物であると示唆された。しかし、M11 の細胞での活性はフルキンチニブの 1/10 であった。

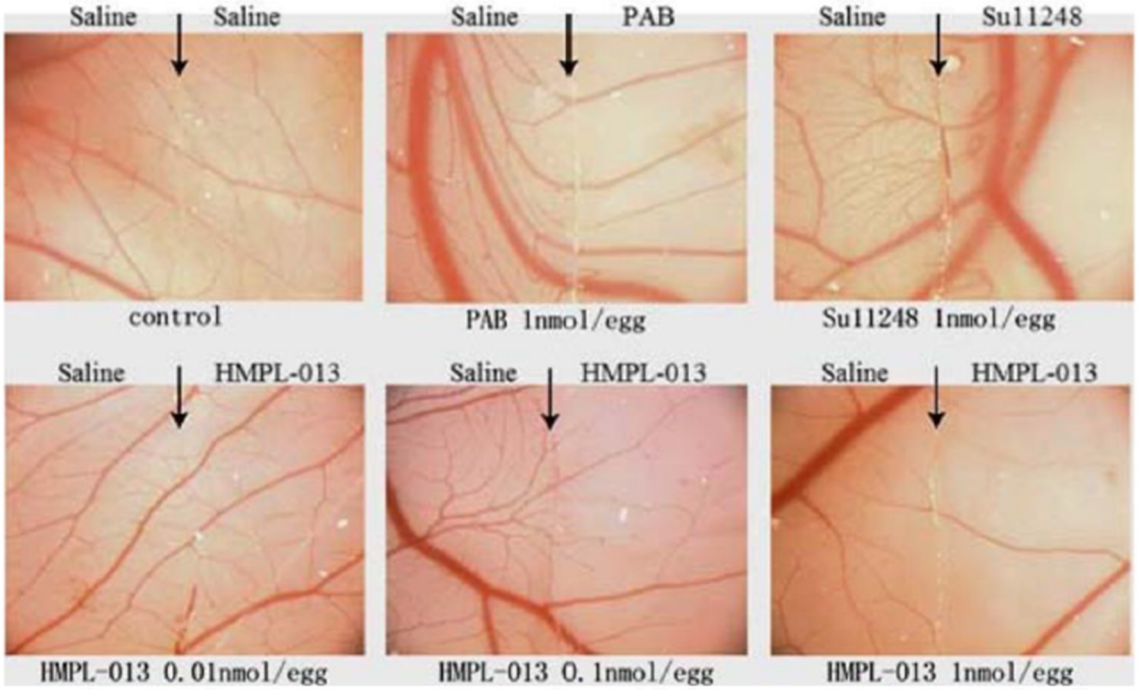
2.6.2.2.2.5 漿尿膜モデルにおける微小血管発芽に対するフルキンチニブの阻害効果（Oncoiogy-20[redacted]-013-04 試験）

：添付資料番号 4.2.1.1-5（参考）

生きたニワトリ受精卵 40 個を受精 6 日後に 4 群に分け、24 時間（37°C、湿度 50%）培養した。培養後、卵の殻に小さな窓を作り、生理食塩水又は 0.01～1 nmol／卵の濃度範囲のフルキンチニブをロードしたスライドを漿尿膜の上に置いた。Pseudolarix 酸 B を陽性対照として用い、1 nmol／卵のスニチニブを参照化合物として用いた。窓を再封し、卵を更に 48 時間培養後、漿尿膜を写真撮影した。

図 2.6.2.2-8 で示したように、微小血管密度は、48 時間の培養後、用量依存的にフルキンチニブの作用により減少した。フルキンチニブは、0.1 nmol／卵及び 1 nmol／卵の用量で微小血管発芽に対して阻害作用を示したことから、フルキンチニブは極めて強力な血管新生阻害剤であることが示唆された。

図 2.6.2.2-8　漿尿膜（CAM）モデルにおけるフルキンチニブによる微小血管発芽の阻害



出典：Oncology-20[redacted]-013-04 試験　Figure 1
CAM：漿尿膜、HMPL-013：フルキンチニブ、PAB：プソイドラリクス酸 B、Su 11248：スニチニブ
矢印で示す境界の左右のパネルは、それぞれ生理食塩水及び評価化合物で処理した。
PAB を陽性対照として用いた。

2.6.2.2.3 In vivo 薬理試験

フルキンチニブを用いて、種々のヒト癌細胞株を異種移植した in vivo 試験を実施した。さらに、フルキンチニブを用いた PK/PD を実施し、ヌードマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化を評価した。

なお、in vivo 薬理データの概要表を 2.6.3.2 に示す。

2.6.2.2.3.1 ヌードマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化に対するフルキンチニブの阻害作用（Oncology-20[redacted]-013-05 試験）

：**添付資料番号 4.2.1.1-6（参考）**

VEGFR2 の活性化は VEGF 誘発性血管新生において重要な役割を果たす。Oncology-20[redacted]-013-05 試験の目的は BALB/c ヌードマウスの肺組織における VEGF 刺激による VEGFR2 リン酸化を評価することである。

健常 12 週齢雌 BALB/c ヌードマウス（体重 20～24 g）を、対照群（VEGF 刺激なし）、モデル対照群（VEGF 刺激あり）、フルキンチニブ又はスニチニブ（対照化合物）投与群（n=3/群）に無作為に割り付けた。

フルキンチニブ投与群のマウスには 2.5 mg/kg のフルキンチニブを単回経口投与し、スニチニブ投与群のマウスには 40 mg/kg のスニチニブを単回経口投与した。フルキンチニブ投与群では投与後 1、4、8、16 又は 24 時間に、モデル対照群及びスニチニブ投与群では投与後 4 時間に、マウスに 2.5 μg/mL の VEGF を 0.2 mL（合計 500 ng/マウス）尾静脈注射し刺激した。対照群には、投与 4 時間後にリン酸緩衝生理食塩水 0.2 mL を投与した（表 2.6.2.2-6）。

VEGF 又はリン酸緩衝生理食塩水注射 5 分後の血漿試料を採取し、その後マウスを安楽死させ、肺を採取し、組織中フルキンチニブ濃度を液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC/MS/MS）により、また VEGFR2 リン酸化をウェスタンブロット法により評価した。

表 2.6.2.2-7 に示すように、フルキンチニブは、2.5 mg/kg の用量でヌードマウスの肺における VEGFR2 のリン酸化を時間依存的に阻害し、投与後 4 時間までは VEGFR2 のリン酸化を完全に阻害した。阻害率は、投与後 1 時間で 134.7%、投与後 4 時間で 123.1%であり、投与後 8 時間には 85.8%に低下し、投与後 16 及び 24 時間では 0%であった（図 2.6.2.2-9、表 2.6.2.2-7）。

血漿中のフルキンチニブ濃度は標的阻害と相関し、血漿中薬物濃度が 424 ng/mL（2.5 mg/kg 投与後 4 時間）を超えると VEGFR2 のリン酸化が完全に阻害された（表 2.6.2.2-7）。肺組織中におけるフルキンチニブの C_{max} は血漿中濃度よりも低く、投与後 1 時間の 328 ng/mL から投与後 4 時間及び 8 時間にそれぞれ 140 及び 57 ng/mL に低下した。投与後 16 及び 24 時間において、フルキンチニブはほとんど検出されなかった（表 2.6.2.2-7）。AUC_{last} は、2.5 mg/kg のフルキンチニブを投与後、肺組織中で 1260 ng·h/g、血漿中で 4032 ng·h/mL であった。

表 2.6.2.2-6　ヌードマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化に対するフルキンチニブの効果を評価するための試験デザイン

グループ	用量	投与経路	VEGF 刺激 [a]	時点（投与後時間）	動物数／群
対照群	0.5% CMC-Na	経口	0.01 M PBS 注射液	4	3
モデル対照群	0.5% CMC-Na	経口	あり	4	3
スニチニブ 40 - 4 時間	40 mg/kg	経口	あり	4	3
フルキンチニブ 2.5 - 1 時間	2.5 mg/kg	経口	あり	1	3
フルキンチニブ 2.5 - 4 時間	2.5 mg/kg	経口	あり	4	3
フルキンチニブ 2.5 - 8 時間	2.5 mg/kg	経口	あり	8	3
フルキンチニブ 2.5 - 16 時間	2.5 mg/kg	経口	あり	16	3
フルキンチニブ 2.5 - 24 時間	2.5 mg/kg	経口	あり	24	3

出典：Oncology-20[redacted]-013-05 試験　Table 9.1-2

CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム、PBS：リン酸緩衝生理食塩水、VEGF：血管内皮増殖因子、VEGFR2：血管内皮増殖因子受容体 2

[a] VEGF 500 ng 静脈内投与により刺激した。

表 2.6.2.2-7　フルキンチニブ 2.5 mg/kg を単回経口投与時のヌードマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化阻害率並びに肺組織及び血漿中薬物濃度

群	VEGF 刺激時点（薬物投与後時間）	p-VEGFR2/β-アクチン強度比	阻害率（%） [a]	肺内濃度（ng/g）	血漿中濃度（ng/mL）
対照群	4	0.068±0.014	NA	NA	NA
モデル対照群	4	0.134±0.010**	NA	NA	NA
スニチニブ 40 mg/kg	4	0.037±0.017##	146.6	NA	NA
フルキンチニブ 2.5 mg/kg	1	0.045±0.015##	134.7	328±172	740±354
	4	0.053±0.013##	123.1	140±70.5	424±109
	8	0.077±0.018##	85.8	56.9±38.5	176±53.5
	16	0.228±0.033	0（-141.3）	BLQ	2.98 [b]
	24	0.157±0.028	0（-35.1）	BLQ	BLQ

出典：Oncology-20[redacted]-013-05 試験　Table 9.1-3

BLQ：定量限界未満、DR：強度比、IR：阻害率、NA：該当せず、p-VEGFR：リン酸化血管内皮増殖因子受容体 2、VEGF：血管内皮増殖因子、VEGFR2：血管内皮増殖因子受容体 2

[a] IR (%) = ($DR_{モデル対照群}$ − $DR_{薬物投与群}$) / ($DR_{モデル対照群}$ − $DR_{対照群}$) ×100%

[b] 1 検体のみ

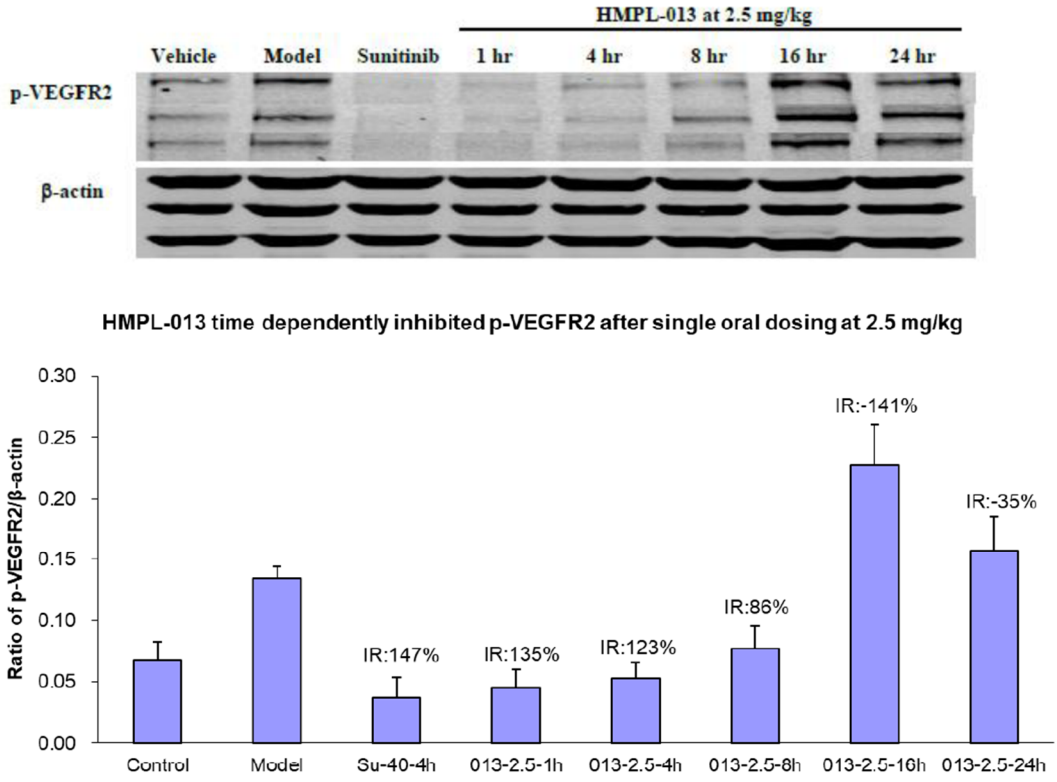
**P<0.01 vs 対照群

##P<0.01 vs モデル対照群

2.5 mg/kg を投与したときのフルキンチニブの AUC_{24} は、肺で 1260 ng h/g、血漿で 4032 ng·h/mL、C_{max} は肺で 328 ng/g、血漿で 740 ng/mL であった。

対照群及びモデル対照群には溶媒（0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム）を投与した。

図 2.6.2.2-9　ヌードマウスの肺組織における VEGF 誘導 VEGFR2 リン酸化に対するフルキンチニブの効果



出典：Oncology-20[redacted]-013-05 試験　Figure 9.2-1
HMPL-013：フルキンチニブ、IR：阻害率、p-VEGFR2：リン酸化血管内皮増殖因子受容体 2、VEGF：血管内皮増殖因子

以上から、フルキンチニブはマウスの肺組織における VEGF 誘発性 VEGFR2 リン酸化を時間依存的に阻害し、in vivo での標的活性が確認された。

2.6.2.2.3.2 ヒト腫瘍のヌードマウス皮下異種移植モデルにおけるフルキンチニブの抗腫瘍活性（Oncology-0[redacted]-013-06 試験）

：添付資料番号 4.2.1.1-7（評価）

Onclology-20[redacted]-013-06 試験において、BALB/c ヌードマウス（6～7 週齢）の腹部皮下に、BGC-823（ヒト胃腺癌）、NCI-H460（非小細胞肺癌）、HT-29（ヒト結腸腺癌）又は Caki-1（腎淡明細胞癌細胞）を移植した。腫瘍の平均サイズが 100 mm^3 から 500 mm^3 に達した時点で、マウスを対照群と投与群に無作為に割り付けた（表 2.6.2.2-8）。腫瘍移植後 8～17 日までにフルキンチニブ又はスニチニブ（対照化合物）の投与を開始し、20 又は 21 日間の投与期間後に終了した。すべての化合物は 1 日 1 回約 3 週間、経口投与した。試験デザインの詳細は表 2.6.2.2-8 に示す。腫瘍体積及び体重は週 2～3 回測定した。

表 2.6.2.2-8　ヌードマウス皮下移植モデルにおけるフルキンチニブの抗腫瘍活性を評価するための試験デザイン

モデル	用量（mg/kg）	投与経路	投与スケジュール	動物数／群
HT-29	0.77、1.92、4.8 又は 12 mg/kg（実験 1）、2 又は 12 mg/kg（実験 2）	経口	1 日 1 回 20 又は 21 日間	6～8
NCI-H460	0.77、1.92、4.8 又は 12 mg/kg（実験 1）、2 又は 12 mg/kg（実験 2）	経口	1 日 1 回 21 日間	6～8
Caki-1	2 mg/kg（実験 1）、0.8、2 又は 5 mg/kg（実験 2）	経口	1 日 1 回 21 日間	6～8
BGC-823	0.5、1 又は 2 mg/kg（実験 1）、2、5 又は 20 mg/kg（実験 2）	経口	1 日 1 回 21 日間	6～8

出典：Oncology-20[redacted]-013-06 試験　Table 9.1-1
BGC-823：ヒト胃腺癌細胞、Caki-1：淡明細胞腎癌細胞、HT-29：ヒト結腸腺癌細胞、NCI-H460：非小細胞肺癌細胞

いずれのモデル及びいずれの用量においても毒性を示す一般状態の変化は認められなかった。

表 2.6.2.2-9　ヌードマウス皮下異種移植モデル（HT-29、NCI-H460、Caki-1 及び BGC-823）に対するフルキンチニブの抗腫瘍効果

		TGI（%）							
	用量	HT-29 (colon)		NCI-H460 (lung)		Caki-1 (kidney)		BGC-823 (gastric)	
薬物	mg/kg	実験 1	実験 2	実験 1	実験 2	実験 1	実験 2	実験 1	実験 2
スニチニブ	30	NT	81.6**	NT	NT	78.2**	NT	100.0**	NT
	40	99.0**	NT	89.5**	83.9**	NT	80.5**	NT	111.5** (8/8, 42% Reg)
フルキンチニブ	0.5	NT	NT	NT	NT	NT	NT	62.3	NT
	0.77	46.4*	NT	40.9*	NT	NT	NT	NT	NT
	0.8	NT	NT	NT	NT	NT	34.0*	NT	NT
	1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	74.2*	NT
	1.92	60.8**	NT	56.9**	NT	NT	NT	NT	NT
	2	NT	76.4**	NT	65.1**	56.6*	51.6**	95.4**	98.6**
	4.8	80.6**	NT	71.8**	NT	NT	NT	NT	NT
	5	NT	NT	NT	NT	NT	63.2**	NT	106.5** (8/8, 24% Reg)
	12	89.2**	88.1**	79.3**	81.2**	NT	NT	NT	NT
	20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	113.3** (8/8, 49% Reg)

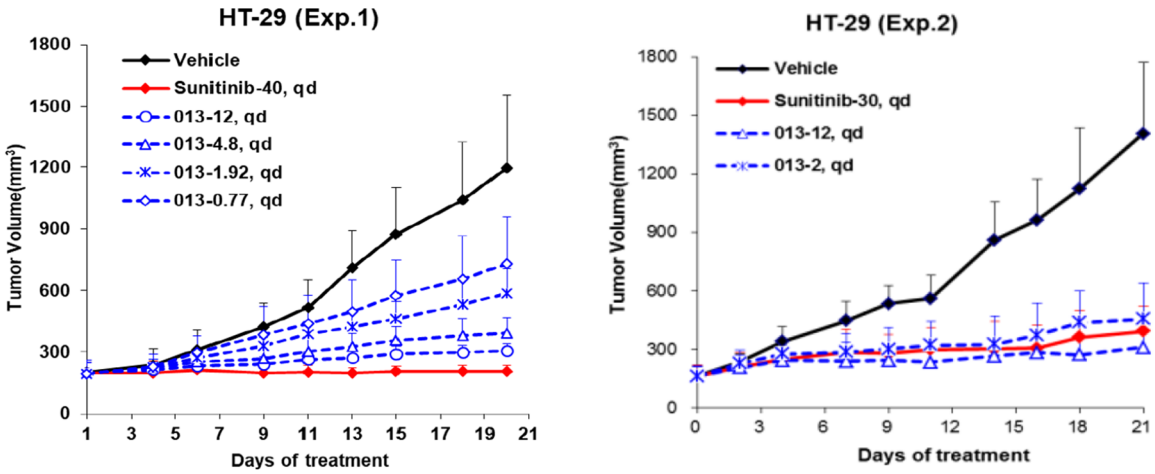
出典：Oncology-20[redacted]-013-06 試験　Table 1
BGC-823：ヒト胃腺癌細胞、Caki-1：淡明細胞腎癌細胞、HT-29：ヒト結腸腺癌細胞、NCI-H460：非小細胞肺癌細胞、NT：評価せず、Reg：腫瘍退縮、TGI：腫瘍増殖阻害
[a]　$TGI = [1 - (V_t - V_i)_{処理群} / (V_t - V_i)_{溶媒対照群}] \times 100\%$
* $P < 0.05$ vs 溶媒対照
** $P < 0.01$ vs 溶媒対照

（1）ヒト結腸腺癌（HT-29）皮下移植腫瘍モデルにおける腫瘍増殖に対するフルキンチニブの阻害効果

表 2.6.2.2-9 及び図 2.6.2.2-10 に示すように、実験 1 では、0.77、1.92、4.8 及び 12 mg/kg/日のフルキンチニブ投与群の TGI 率はそれぞれ 46.4%、60.8%、80.6%及び 89.2%であった。再実験（実験 2）では、2 及び 12 mg/kg/日の投与群の抗腫瘍効果はそれぞれ 76.4%及び 88.1%であり、実験 1 の再現性が確認された。2 mg/kg/日のフルキンチニブは、30 mg/kg/日のマル

チターゲット型チロシンキナーゼ阻害剤スニチニブと同程度の抗腫瘍効果を示した（76.4%対 81.6%）。

図 2.6.2.2-10　HT-29 担癌マウスの腫瘍体積に対するフルキンチニブの効果

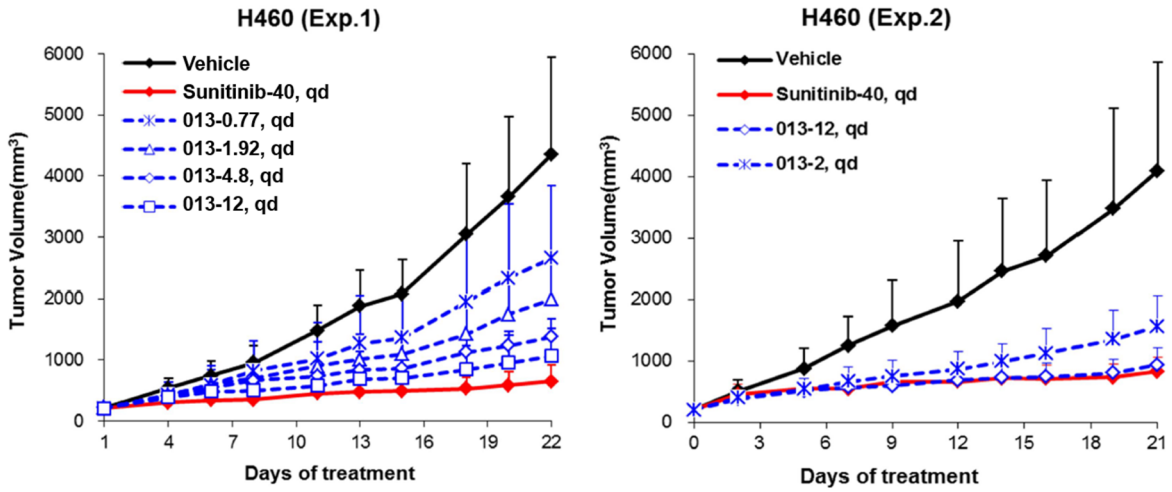


出典：Oncology-20[redacted]-013-06 試験　Figure 9.2-1
013：フルキンチニブ、Exp.：実験、HT-29：ヒト結腸腺癌細胞、qd：1 日 1 回
投与群：Sunitinib-40, qd：スニチニブ 40 mg/kg を 1 日 1 回投与、Sunitinib-30, qd：スニチニブ 30 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-12 qd：フルキンチニブ 12 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-4.8, qd：フルキンチニブ 4.8 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-1.92, qd：フルキンチニブ 1.92 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-0.77, qd：フルキンチニブ 0.77 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-2, qd：フルキンチニブ 2 mg/kg を 1 日 1 回投与。
腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

（2）ヒト非小細胞肺癌（NCI-H460）の皮下移植腫瘍モデルにおけるフルキンチニブ増殖阻害効果

実験 1 において、マウスに 0.77、1.92、4.8 及び 12 mg/kg/日の用量で経口投与したときの TGI 率は、それぞれ 40.9%、56.9%、71.8%及び 79.3%であった（表 2.6.2.2-9、図 2.6.2.2-11）。再実験（実験 2）では、2 及び 12 mg/kg/日の投与群の抗腫瘍効果はそれぞれ 65.1%及び 81.2%であり、実験 1 の再現性が確認された。

図 2.6.2.2-11　H460 担癌マウスの腫瘍体積に対するフルキンチニブの効果

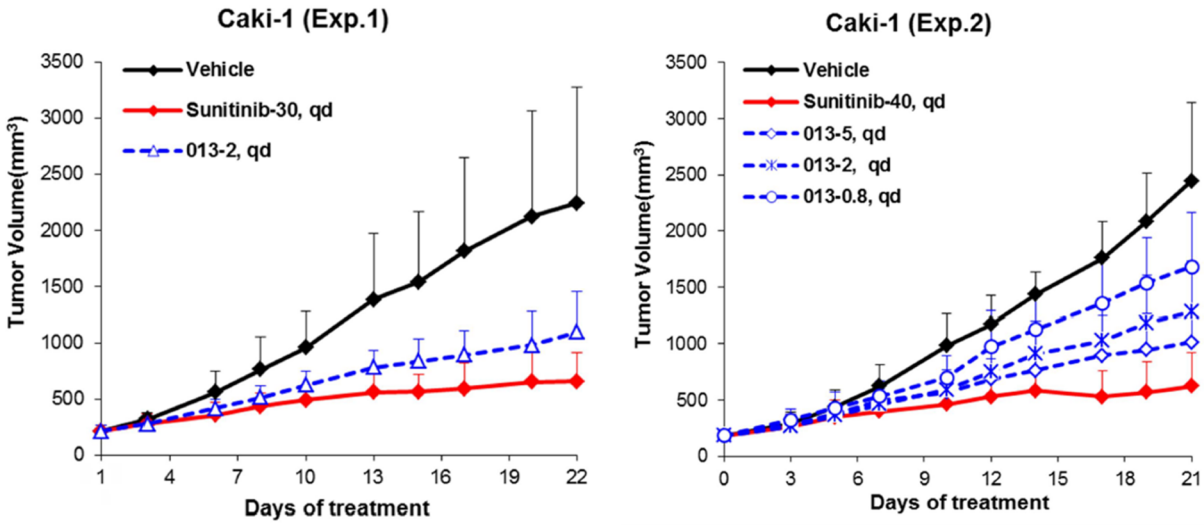


出典：Oncology-20[redacted]-013-06 試験　Figure 9.2-2
013：フルキンチニブ、Exp.：実験、H460：非小細胞肺癌、qd：1 日 1 回
投与群：Sunitinib-40, qd: スニチニブ 40 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-12, qd: フルキンチニブ 12 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-4.8, qd：フルキンチニブ 4.8 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-1.92, qd：フルキンチニブ 1.92 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-0.77, qd：フルキンチニブ 0..77 mg//kg を 1 日 1 回投与。
腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

（3）ヒト腎淡明細胞癌細胞（Caki-1）の皮下移植腫瘍モデルにおけるフルキンチニブの増殖阻害効果

実験 1 において、マウスに 2 mg/kg/日の用量で経口投与したときの TGI 率は 56.6%であった（表 2.6.2.2-9、図 2.6.2.2-12）。再実験（実験 2）では、2 及び 5 mg/kg/日の投与群の抗腫瘍効果はそれぞれ 51.6%及び 63.2%であり、実験 1 の再現性が確認された。

図 2.6.2.2-12　Caki-1 担癌マウスの腫瘍体積に対するフルキンチニブの効果

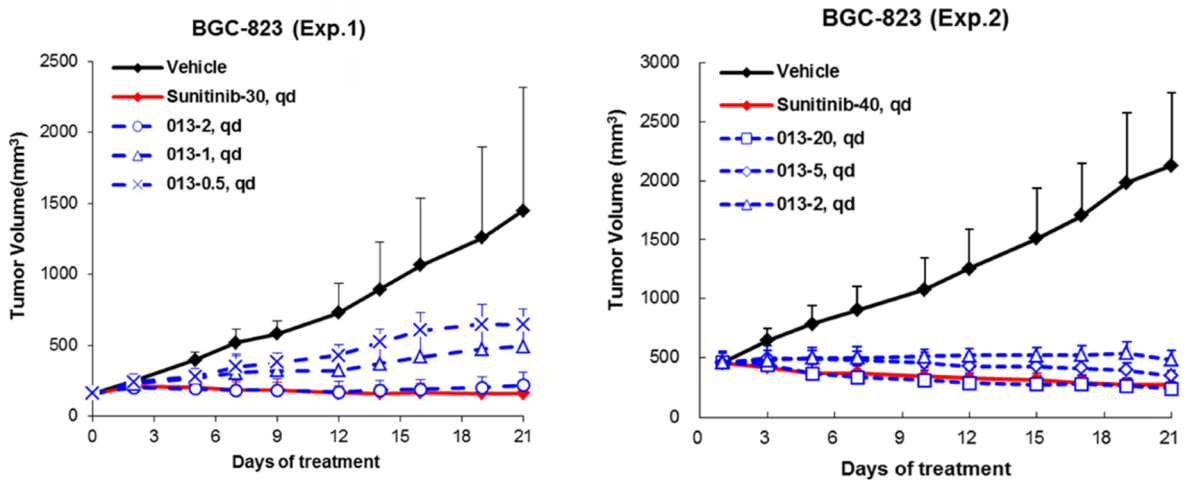


出典：Oncology-20[redacted]-013-06 試験　Figure 9.2-3
013：フルキンチニブ、Caki-1：腎淡明細胞癌細胞、Exp.：実験、qd：1 日 1 回
投与群：Sunitinib-40, qd：スニチニブ 40 mg/kg を 1 日 1 回投与、Sunitinib-30, qd：スニチニブ 30 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-5, qd、フルキンチニブ 5 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-2, qd、フルキンチニブ 2 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-0.8, qd：フルキンチニブ 0.8 mg/kg を 1 日 1 回投与。
腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

（4）ヒト胃癌（BGC-823）の皮下移植腫瘍モデルにおけるフルキンチニブ増殖阻害効果

検討したてのモデルのうち、最も感受性が高かったのは胃腺癌株 BGC-823 であった（表 2.6.2.2-9, 図 2.6.2.2-13）。実験 1 では、マウスに 0.5、1 又は 2 mg/kg/日の用量でフルキンチニブを経口投与した後の TGI 率は、それぞれ 62.3%、74.2%及び 95.4%であった。反復実験（実験 2）では、フルキンチニブ経口投与の 2, 5 又は 20 mg/kg/日の TGI 率は、それぞれ 98.6%、106.5%及び 113.3%であり、5 及び 20 mg/kg/日ではそれぞれ 24%及び 49%の腫瘍退縮が認められた。

図 2.6.2.2-13　BGC-823 担癌マウスの腫瘍体積に対するフルキンチニブの効果



出典：Oncology-20[redacted]-013-06 試験　Figure 9.2-4
013：フルキンチニブ、BGC-823：ヒト胃腺癌細胞、Exp.：実験、qd：1 日 1 回
投与群:Sunitinib-40, qd：スニチニブ 40 mg/kg を 1 日 1 回投与、Sinitinib 30, qd：スニチニブ 30 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-20, qd：フルキンチニブ 20 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-5, qd：フルキンチニブ 5 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-2, qd：フルキンチニブ 2 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-1, qd：フルキンチニブ 1 mg/kg を 1 日 1 回投与、013-0.5, qd：フルキンチニブ 0.5 mg/kg を 1 日 1 回投与。
腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

以上、複数のヒト異種移植モデルにおいて、フルキンチニブは用量依存的かつ再現性のある腫瘍増殖抑制作用を示した。

2.6.2.2.3.3 NCI-H460 及び Caki-1 皮下腫瘍組織における CD31 発現に対するフルキンチニブの阻害作用（Oncology-20[redacted]-013-07 試験）

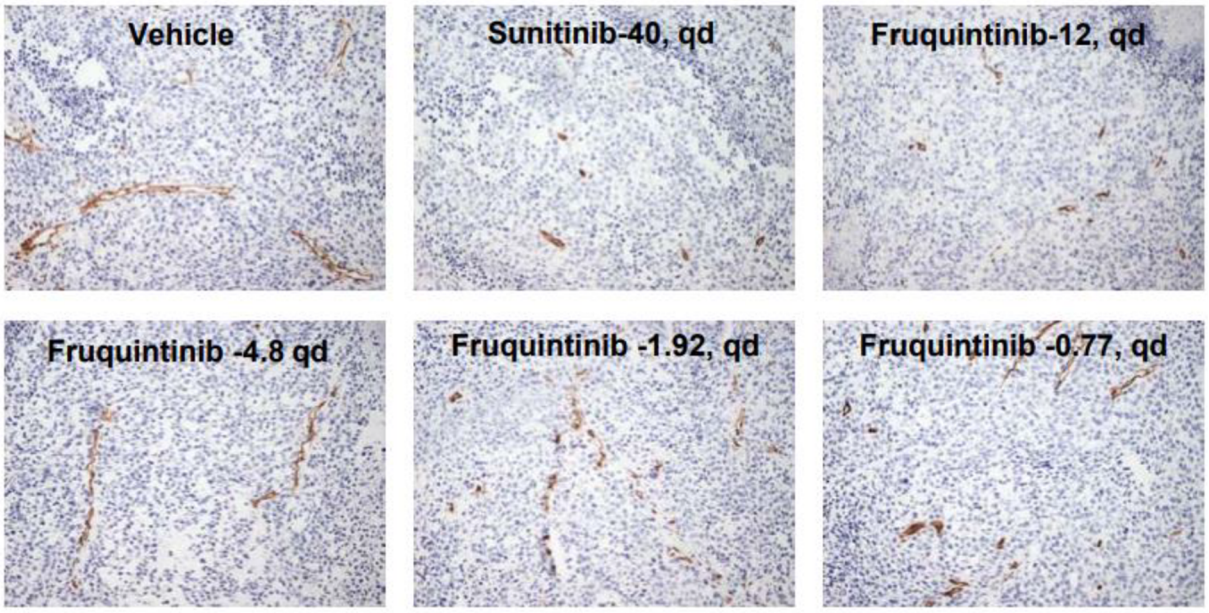
：添付資料番号 4.2.1.1-8（参考）

極めて特異的な血管内皮マーカーである CD31 は 130 KDa の膜貫通タンパク質であり、血管内皮細胞に安定的に発現する。腫瘍組織における CD31 発現を検出する免疫組織化学は、血管密度（血管新生）を評価するために広く使用されている方法の 1 つである。In vivo でのフルキンチニブの血管新生抑制作用を検討するため、Oncology-20[redacted]-013-07 試験では、Oncology-20[redacted]-013-06 試験終了時に NCI-H460 及び Caki-1 担癌マウスから採取した皮下腫瘍サンプル中の CD31 発現を評価した。

腫瘍組織における CD31 発現を免疫組織化学的分析で評価し、阻害率を計算した。

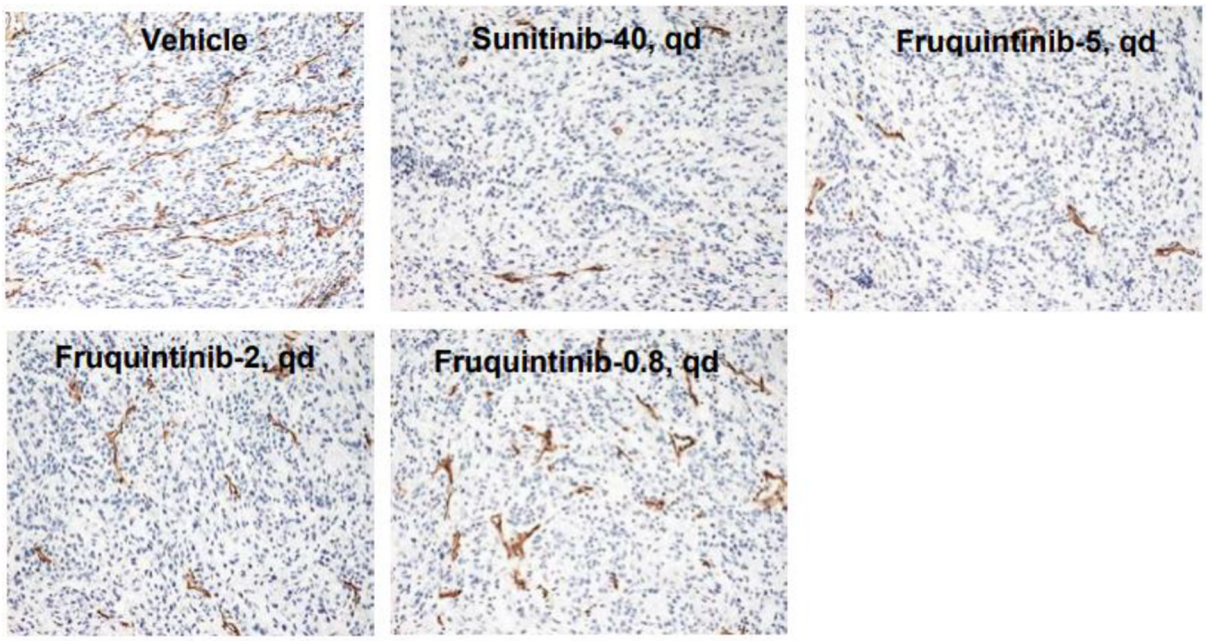
充分に生着した NCI-H460 皮下腫瘍にフルキンチニブを 1 日 1 回、3 週間経口投与したとき、CD31 陽性面積は 0.77 mg/kg で 13.8%、1.92 mg/kg で 41.1%、4.8 mg/kg で 52.2%、12 mg/kg で 66.6%抑制された（図 2.6.2.2-14, 表 2.6.2.2-10）。Caki-1 腫瘍モデルでは、0.8、2 及び 5 mg/kg における抑制率は、それぞれ 25.6%、53.4%及び 73.0%であった（図 2.6.2.2-15, 表 2.6.2.2-10）。

図 2.6.2.2-14　NCI-H460 腫瘍組織における CD 31 発現に対するフルキンチニブの作用



出典：Oncology-20[redacted]-013-07 試験　Figure 8.2-1
CD：分化抗原群、NCI-H460：非小細胞肺癌細胞、qd：1 日 1 回
投与群：Sunitinib-40, qd：スニチニブ 40 mg/kg を 1 日 1 回投与、Fruquitinib-12, qd：フルキンチニブ 12 mg/kg を 1 日 1 回投与、Fruquintinib-4.8, qd：フルキンチニブ 4.8 mg/kg を 1 日 1 回投与、Fruquintinib-1.92, qd：フルキンチニブ 1.92 mg/kg を 1 日 1 回投与、Fruquintinib-0.77, qd：フルキンチニブ 0.77 mg/kg を 1 日 1 回投与。
CD31 免疫組織化学染色（× 200）。褐色の染色部分は内皮細胞を示す。上段左から溶媒対照群、スニチニブ 40 mg/kg qd 群、フルキンチニブ 12 mg/kg, qd 群、下段左からフルキンチニブ 4.8 mg/kg, qd 群、フルキンチニブ 1.92 mg/kg, qd 群及びフルキンチニブ 0.77 mg/kg, qd 群。

図 2.6.2.2-15　Caki-1 腫瘍組織における CD31 発現に対するフルキンチニブの作用



出典 Oncology-20[redacted]-013-07 試験　Figure 8.2-2
Caki-1：腎淡明細胞腎癌細胞、CD：分化抗原群、qd：1 日 1 回
投与群 : Sunitinib-40, qd : スニチニブ 40 mg/kg を 1 日 1 回投与、Fruquitinib-5, qd : フルキンチニブ 5 mg/kg を 1 日 1 回投与、Fruquintinib-2、qd：フルキンチニブ 2 mg/kg を 1 日 1 回投与、Fruquintinib-0.8, qd：フルキンチニブ 0.8 mg/kg を 1 日 1 回投与。
CD31 免疫組織化学染色（× 200）。褐色の染色部分は内皮細胞を示す。上段左から溶媒対照群、スニチニブ 40 mg/kg, qd 群、フルキンチニブ 5 mg/kg, qd 群、フルキンチニブ 2 mg/kg, qd 群及びフルキンチニブ 0.8 mg/kg, qd 群。

表 2.6.2.2-10　NCI-H460 及び Caki-1 異種移植モデル腫瘍における CD31 発現に対するフルキンチニブの作用

群	NCI-H460 腫瘍モデル			Caki-1 腫瘍モデル		
	腫瘍検体数	血管陽性面積%（VA/TA%）平均値±SD	阻害割合（%）[a]	腫瘍検体数	血管陽性面積%（VA/TA%）平均値±SD	阻害割合（%）[a]
溶媒対照	5	0.7642±0.2471	NA	7	1.5951±0.2337	NA
スニチニブ 40 mg/kg, qd	4	0.2078±0.0740**	72.8	7	0.3121±0.1002**	80.4
フルキンチニブ 0.77 mg/kg, qd	5	0.6591±0.1645	13.8	0	NT	NT
フルキンチニブ 0.8 mg/kg, qd	0	NT	NT	7	1.2704±0.2131*	25.6
フルキンチニブ 1.92 mg/kg, qd	5	0.4497±0.2422*	41.1	0	NT	NT
フルキンチニブ 2 mg/kg, qd	0	NT	NT	7	0.7425±0.2316**	53.4
フルキンチニブ 4.8 mg/kg, qd	5	0.3653±0.0992**	52.2	0	NT	NT
フルキンチニブ 5 mg/kg, qd	0	NT	NT	7	0.4301±0.1349**	73.0
フルキンチニブ 12 mg/kg, qd	5	0.2550±0.1345**	66.6	0	NT	NT

出典：Oncology-20[redacted]-013-07 試験　Table 8.1-1 及び Table 8.1-2
Caki-1：淡明細胞型腎癌細胞、NA：該当せず、NCI-H460：非小細胞肺癌細胞、NT：試験せず、qd：1 日 1 回、SD：標準偏差、TA：腫瘍面積、VA：血管陽性面積
表中の値は、溶媒対照群に対する平均値±標準偏差を示す。
[a] 阻害率（%）=100×(VA/TA%$_{溶媒投与群}$-VA/TA%$_{薬物投与群}$)/VA/TA%$_{溶媒投与群}$。VA/TA は画像解析における腫瘍面積に対する血管陽性面積の比を示す。
* P<0.05 vs 溶媒対照
** P<0.01 vs 溶媒対照

要約すると、これらの結果は、フルキンチニブが用量依存的に CD31 陽性細胞数を有意に減少させることを示しており、このことは腫瘍組織における血管新生が阻害されたことを示唆し、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という仮説を裏付けている。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 フルキンチニブの in vitro 薬理試験（100054042 試験）

：添付資料番号 4.2.1.2-1（参考）

100054042 試験では、結合、酵素及び取込みアッセイにより、1 µmol/L の濃度で 87 種類の受容体、イオンチャネル及び酵素に対するフルキンチニブ（[redacted]）の安全性プロファイルを評価した。

化合物結合は各標的に対する放射性標識リガンド特異的結合の阻害率として算出し、化合物酵素阻害作用は酵素活性の阻害率として算出した。50%を超える阻害又は刺激を示す結果を有意な作用と判断した。

いずれの標的に対しても 50%を超える阻害及び結合は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。

なお、2.6.3.3 に、副次的薬理試験の概要を表にまとめた。

2.6.2.4 安全性薬理試験

ICR マウス及びビーグル犬を用いて、呼吸系、心血管系、中枢神経系及び末梢神経系に対するフルキンチニブの有害な薬理作用を検討するため、一連の安全性薬理試験を実施した。さらに、心室再分極遅延の可能性を評価する in vitro 安全性薬理試験（hERG アッセイ）をフルキンチニブ及びヒト主要代謝物 M11 を用いて実施した。

安全性薬理データの概要表を 2.6.3.4 に示す。

2.6.2.4.1 In vitro 安全性薬理試験

2.6.2.4.1.1 心血管系

（1）hERG チャネルを安定発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞におけるマニュアルパッチクランプ法を用いたフルキンチニブの hERG テール電流に及ぼす影響（215-0076-EP 試験）

：添付資料番号 4.2.1.3-1（参考）

hERG を発現させた CHO 細胞を用いて、hERG テール電流に対するフルキンチニブの作用をパッチクランプ法により評価した。1～20 μM の濃度範囲のフルキンチニブで各群 3 又は 4 個の細胞を処置し、解析した。

表 2.6.2.4-1 に示すように、フルキンチニブは hERG チャネルを阻害せず、IC_{50} 値は>13.08 μM であった。陽性対照のテルフェナジンでは、100 nM で hERG 阻害率が 79.55%であったことから、本試験の実験条件の妥当性が示された。

表 2.6.2.4-1　フルキンチニブによる hERG 電流阻害率

灌流液の濃度（μM）		hERG 電流阻害率（%）				
開始時	終了時	細胞 1	細胞 2	細胞 3	細胞 4	平均阻害率
1	0.8995	1.32	3.30	-4.00	NT	0.21±3.78
3	2.578	3.96	3.35	5.78	NT	4.36±1.26
10	8.971	5.71	4.70	10.72	NT	7.04±3.23
20	13.08	-3.46	-7.30	8.79	12.26	2.57±9.42

出典：215-0076-EP 試験　Table 4
hERG：ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子、NT：試験せず
阻害率（%）は平均値±標準偏差で示す。

IC_{50} 値>13.08 μM（>5146 ng/mL）は、ヒト予定臨床用量（5 mg/日）を投与したときの定常状態における非結合型 C_{max}（総幾何平均濃度 291 ng/mL、蛋白結合率 95.3%に基づく非結合型濃度 13.7 ng/mL）の>370 倍であることから、臨床的に意味のある曝露量では、フルキンチニブは hERG チャネルに対して有意な阻害作用を示さず、ヒトにおいて QT 間隔延長の可能性は低いことが示唆された。

（2）hERG チャネルを安定発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞におけるマニュアルパッチクランプ法を用いた M11（HM5025423）の hERG テール電流に及ぼす影響（215-0060-EP 試験）

：添付資料番号 4.2.1.3-2（参考）

ヒトの主要代謝物である M11 についても、hERG 発現 CHO 細胞を用いて hERG テール電流に対する阻害能を評価した。0.3～10 μM の濃度範囲の M11 で各群 3 個の細胞を処置し、解析した。

表 2.6.2.4-2 に示すように、M11 は hERG チャネルを阻害せず、IC_{50} 値は>6.05 μM であった。陽性対照のテルフェナジンでは、100 nM で hERG 阻害率が 83.41%であったことから、本試験の実験条件の妥当性が示された。

表 2.6.2.4-2　M11 による hERG 電流阻害率

濃度 (μM)	灌流後の測定濃度 (μM)	hERG 電流阻害率（%）			平均阻害率 (%)
		細胞 1	細胞 2	細胞 3	
0.3	0.28	6.34	0.99	0.09	2.47 ± 3.38
1	0.91	9.32	6.13	1.01	5.49 ± 4.19
3	2.65	10.22	10.66	1.20	7.36 ± 5.34
10	6.05	12.42	13.10	0.72	8.75 ± 6.96

出典：215-0060-EP 試験　table 4
hERG：ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子、M11：フルキンチニブの代謝物
報告書では M11 を HM5025423 と記載している。
阻害率は平均値±標準偏差で示す。

IC_{50} 値>6.05 μM（>2295 ng/mL）は、ヒト予定臨床用量（5 mg/日）を投与したときの定常状態における M11 の非結合型 C_{max}（総幾何平均濃度 77.4 ng/mL、蛋白結合率 97.7%に基づく非結合型濃度 1.8 ng/mL）の>1000 倍であることから、フルキンチニブと同様、M11 も、臨床的に意味のある曝露量では、hERG カリウムチャネルに対して有意な阻害作用を示さないと考えられた。

2.6.2.4.2 In vivo 安全性薬理試験

2.6.2.4.2.1 中枢神経系

（1）ICR マウスを用いたフルキンチニブの単回経口投与行動試験（[redacted]49PB1 試験）

：添付資料番号 4.2.1.3-3（参考）

中国国家医薬品局（NMPA）の GLP 規則に従って実施した GLP 適用安全性薬理試験において、雌雄 ICR マウス体重 16.4～23.3 g）にフルキンチニブを単回経口投与し、2 種類の行動検査によって中枢神経系に対する影響を評価した。

ポールテストでは、長さ 80 cm、直径 0.5 cm の垂直に固定した滑らかな表面の金属棒からの下降動作により、マウスの運動協調性を 0～3 の基準スケールで採点した。Irwin 法による行動観察では、マウスの尾を持ち上げ 3～4 回回転させ、マウスの着地姿勢を 0～8 段階評価基準スケールで採点した。

マウスを各群 20 例の 5 群に無作為に割り付け（雌雄各 10 例、各検査につき雌雄各 5 例）、フルキンチニブの 0（溶媒対照）、0.5、5 及び 10 mg/kg 又は陽性対照として鎮静作用を有す

るジアゼパムの 2.5 mg/kg を単回強制経口投与し、投与前、投与後 0.5、1、2、3、4、5、6 及び 24 時間に検査を実施した。

表 2.6.2.4-3　ICR マウスを用いたフルキンチニブの単回経口投与行動試験の試験デザイン

群番号	被験物質	投与量（mg/kg）	濃度（mg/mL）	投与経路	動物数（雌/雄）
1	溶媒（0.5% CMC-Na）	0	0	経口	10/10
2	フルキンチニブ	0.5	0.025	経口	10/10
3	フルキンチニブ	5	0.25	経口	10/10
4	フルキンチニブ	10	0.5	経口	10/10
5	ジアゼパム	2.5	0.125	経口	10/10

出典：[redacted]49PB1 試験　Section 3.2 Randomization
CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム
陽性対照としてジアゼパムを用いた。

ジアゼパムを投与したマウスでは、ポールテスト（投与後 4、5、6 及び 24 時間を除く）及び Irwin 法による行動観察（投与 6 及び 24 時間後を除く）において有意な変化（$P<0.01$）が認められ、この実験条件の妥当性が確認された。すべての評価時点で、溶媒対照群と比較して、フルキンチニブ投与マウスでは影響は認められなかった（$P>0.05$）ことから、フルキンチニブはマウスの自発運動、行動及び運動協調性に影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.4.2.2 心血管系及び呼吸系

（1）麻酔ビーグル犬を用いたフルキンチニブ単回強制経口投与の心血管系及び呼吸系に対する影響（[redacted]49PH1 試験）

：添付資料番号 4.2.1.3-4（参考）

NMPA GLP 適用試験において、ビーグル犬の心血管系及び呼吸系に対するフルキンチニブの影響を評価した。

24 例の 6 ヵ月齢ビーグル犬（体重 6.6～9.5 kg）を無作為に 4 群（各群雌雄各 3 例）に割り付け、ペントバルビタール麻酔下でフルキンチニブの 0（溶媒対照）、0.085、0.17 又は 0.34 mg/kg（2 mL/kg）を単回強制経口投与し、心電図（ECG）、心拍数、血圧（収縮期、拡張期及び平均）及び呼吸数を投与前並びに投与後 0.5、1、2、3、4、5 及び 6 時間に記録した。ECG パラメータとしては PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔、QTc 間隔、ST 振幅及び T 振幅を評価した。なお、QT 間隔は Van de Water 法を用いて補正した（QTc）[15]。

表 2.6.2.4-4　麻酔ビーグル犬を用いたフルキンチニブの心血管系及び呼吸系試験の試験デザイン

群番号	被験物質	投与量（mg/kg）	濃度（mg/mL）	投与経路	動物数（雌/雄）
1	溶媒（0.5% CMC-Na）	0	0	経口	3/3
2	フルキンチニブ	0.085	0.0425	経口	3/3
3	フルキンチニブ	0.17	0.0850	経口	3/3
4	フルキンチニブ	0.34	0.1700	経口	3/3

出典：[redacted]49PH1 試験　Section 3.2 Allocation and Randomization
CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム

すべての投与群において、ECG パラメータ、血圧（収縮期、拡張期及び平均）及び呼吸数に、投与前と比較して有意な変化は認められなかった。0.085 及び 0.17 mg/kg 群では投与後

0.5～5 時間に、0.34 mg/kg 群では投与後 3 時間に、同時点の溶媒対照群と比較して心拍数の増加が認められた。これらの一過性の心拍数増加は、投与前の評価と比較して影響が認められず、用量反応性も認められなかったことから、投薬との関連はないと考えられた。

（2）ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 13 週間経口投与毒性及び 4 週間回復試験（8449374 試験）

：添付資料番号 4.2.3.2-5（評価）

米国食品医薬品局（US FDA）／経済協力開発機構／NMPA に準拠した GLP 試験において、雌雄ビーグル犬にフルキンチニブの 0（溶媒対照）、0.03、0.06 又は 0.12 mg/kg/日を 1 日 1 回 13 週間経口投与し、心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対するフルキンチニブの影響を評価した（2.6.6 及び 2.6.7）。

ECG は、投与前期間に 1 回、投与 1、24 及び 87 日の投与後 1～2 時間に 1 回、回復期間終了時に 1 回それぞれ測定し、ECG パラメータ（PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔、QTc 間隔、心拍数）に加えて、ECG の異常の有無を定性的に評価した。呼吸数、酸素飽和度及び血圧を投与前期間に 1 回、投与 1 及び 87 日の投与後 1～2 時間に 1 回、回復期間終了時に 1 回それぞれ測定した。また、神経学的検査を投与前期間に 1 回、投与 1 及び 88 日の投与後 1～2 時間に 1 回、回復期間中に 1 回それぞれ実施した。

表 2.6.2.4-5　ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 13 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復試験の試験デザイン

群番号	被験物質	投与量（mg/kg/日）	投与経路	動物数（雌/雄）
1	プラセボ [a]	0	経口	5/5
2	フルキンチニブ	0.03	経口	5/5
3	フルキンチニブ	0.06	経口	5/5
4	フルキンチニブ	0.12	経口	5/5

出典：8449374 試験　Section 3.1.5 Study Design
MCCPH101：微結晶性セルロース
ビーグル犬を主試験で各群雌雄各 5 例の 4 群に割り付け、13 週間の投与期間終了時に各群雌雄各 3 例を剖検し、残りの動物は 4 週間の回復期間終了後に剖検した。
[a]　対照群には MCCPH101（99.7%）及びドロモール（0.3%）を充填したプラセボカプセルを投与した。

ECG パラメータ、血圧（収縮期、拡張期及び平均）、呼吸数、パルスオキシメトリー及び神経学的検査において、フルキンチニブに関連した影響は認められなかった。ECG の定性的評価では、フルキンチニブに起因する異常な ECG 波形や不整脈はみられなかった。

以上のことから、フルキンチニブの 0.03、0.06 又は 0.12 mg/kg/日を 13 週間経口投与したとき、安全性薬理評価項目は影響を受けなかった。0.12 mg/kg/日の雌雄の総 C_{max} 及び遊離型 C_{max} の投与 91 日の平均値はそれぞれ 105 ng/mL 及び 12 ng/mL であった。

（3）ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 4 週間経口投与毒性及び 4 週間回復試験（[redacted]49RD2 試験）

：添付資料番号 4.2.3.2-4（参考）

NMPA に準拠した GLP 試験において、雌雄ビーグル犬にフルキンチニブの 0（溶媒対照）、0.03、0.1 又は 0.3 mg/kg/日を 1 日 1 回 4 週間経口投与し、心血管系に対するフルキンチニブ

の影響を評価した（2.6.6 及び 2.6.7）。ECG は投与前期間に 2 回、4 週間の投与期間終了時に 1 回、回復期間終了時に 1 回それぞれ測定した。評価項目は PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔、QTc 間隔、ST 振幅及び心拍数であった。

表 2.6.2.4-6　ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復試験の試験デザイン

群番号	被験物質	投与量（mg/kg/日）	投与経路	動物数（雌/雄）
1	プラセボ [a]	0	経口	3/3
2	フルキンチニブ	0.03	経口	3/3
3	フルキンチニブ	0.1	経口	3/3
4	フルキンチニブ	0.3	経口	3/3

出典：[redacted]49RD2 試験
MCCPH101：微結晶性セルロース
ビーグル犬を主試験で各群雌雄各 3 例の 4 群に割り付け、4 週間の投与期間終了時に各群雌雄各 2 例を剖検し、残りの動物は 4 週間の回復期間終了後に剖検した。
[a]　対照群には MCCPH101（99.7%）及びドロモール（0.3%）を充填したプラセボカプセルを投与した。

いずれのパラメータにおいてもフルキンチニブに関連した影響は認められなかった。

0.3 mg/kg/日の投与 1 日の雌雄の総 C_{max} 及び遊離型 C_{max} の平均値はそれぞれ 77.6 ng/mL 及び 9.2 ng/mL であった。なお、本用量の試験終了時の曝露量は、死亡／瀕死状態のため得られていない。

（4）ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 39 週間経口投与毒性及び 4 週間回復試験（[redacted]54RD2 試験）

：添付資料番号 4.2.3.2-6（参考）

NMPA に準拠した GLP 試験において、雌雄ビーグル犬にフルキンチニブの 0（溶媒対照）、0.01、0.03、0.1/0.06（15 日から減量）又は 0.2/0.12（15 日から減量）mg/kg/日を 1 日 1 回、39 週間経口投与し、心血管系に対するフルキンチニブの影響を評価した（2.6.6 及び 2.6.7）。ECG は、投与 1、91 及び 273 日の投与前、投与後 2 及び 24 時間並びに回復期間終了時に測定した。評価項目は PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔、QTc 間隔、ST 振幅及び心拍数であった。

表 2.6.2.4-7　ビーグル犬を用いたフルキンチニブの 39 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復試験の試験デザイン

群番号	被験物質	投与量（mg/kg/日）	投与経路	動物数（雌/雄）
1	プラセボ [a]	0	経口	5/5
2	フルキンチニブ	0.01	経口	5/5
3	フルキンチニブ	0.03	経口	5/5
4	フルキンチニブ	0.1/0.06 [b]	経口	5/5
5	フルキンチニブ	0.2/0.12 [b]	経口	5/5

出典：[redacted]54RD2 試験
[a]　対照群にはデンプン（50%）、結晶セルロース（49%）及びタルク（1%）を充填したプラセボカプセルを投与した。
[b]　投与 15 日から減量。
本試験では、ビーグル犬を各群雌雄各 5 例の 5 群に割り付け、13 週間の投与期間終了時に各群雌雄各 2 例、39 週間の投与期間終了時に各群雌雄各 2 例、4 週間の回復期間終了後に各群雌雄各 1 例をそれぞれ剖検した。

273 日の 0.2/0.12 mg/kg/日群の雄で、投与前、投与後 2 及び 24 時間に心拍数減少が認められた。その他の ECG パラメータへの影響は認められなかった。

0.2/0.12 mg/kg/日の雌雄の総 C_{max} 及び遊離型 C_{max} の投与 273 日の平均値はそれぞれ 126 ng/mL 及び 15 ng/mL であった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

種々のヒト腫瘍を移植した異種移植モデルにおける腫瘍増殖に対するフルキンチニブ単剤療法又は EGFR 及び cMET 阻害剤などの分子標的療法との併用療法の有効性を検討する試験、及びマウス腫瘍を移植した同系モデルにおける腫瘍増殖に対する化学療法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）との併用療法の有効性を検討する試験を実施した。これらの試験を以下の項に要約する。

なお、2.6.3.5 に薬力学的作用の概要表を示す。

2.6.2.5.1 非小細胞肺癌細胞株由来の複数の皮下異種移植モデルにおける EGFR 阻害剤ゲフィチニブ又は theliatinib とフルキンチニブとを併用したときの抗腫瘍活性（Oncology 20[redacted]-013-01 試験）

：**添付資料番号 4.2.1.4-1（参考）**

Oncology 20[redacted]-013-01 試験では、NSCLC の 3 つの異種移植モデルにおいて EGFR 阻害剤ゲフィチニブ又は theliatinib とフルキンチニブとの併用投与の抗腫瘍活性を評価した。

雌 BALB/c ヌードマウス（6～7 週齢；17～19 g）に、PC-9 又は NCI-H292 の腫瘍細胞をそれぞれ 5.0×10^6 個／マウス又は 2.0×10^6 個／マウスで側腹部皮下に接種した。NCI-H3255 モデルでは、腫瘍細胞を雌性 BALB/c ヌード（6～7 週齢：17～19 g）の右側腹部皮下に接種し、異種移植モデルの P_0 世代を得た。腫瘍容積が約 800 mm^3（移植後約 3 ヵ月）のとき、P_0 腫瘍を小片に切断し、レシピエントヌードマウスに皮下移植して P_1 腫瘍を形成した。その後、P_2 世代の皮下腫瘍を有効性試験で使用した。

動物をすべての群の開始時の平均腫瘍体積が同程度になるように無作為に群分けした。平均腫瘍体積が 200～300 mm^3 に達した時点で投与を開始し、腫瘍モデルに応じて 3～7 週間継続した。試験デザイン及び用法・用量の詳細は表 2.6.2.5-1 に示す。

表 2.6.2.5-1　抗腫瘍試験のデザイン及び投与レジメンーフルキンチニブと EGFR 阻害薬との併用

モデル	処置－用量（mg/kg）	投与経路	投与スケジュール	動物数／群
PC-9 （EGFR エクソン 19 欠失)	溶媒－0.5%CMC-Na	経口	qd×32 日間	8
	フルキンチニブ - 2			8
	ゲフィチニブ－5			16
	フルキンチニブ－2／ゲフィチニブ - 5			16
NCI-H3255 （EGFR L858R 変異)	溶媒－0.5%CMC-Na	経口	qd×49 日間	7
	フルキンチニブ－2			7
	ゲフィチニブ－1			7
	フルキンチニブ－2／ゲフィチニブ－1			7
NCI-H292 （野生型 EGFR の高発現）	溶媒－0.5%CMC-Na	経口	qd×21 日間	7
	フルキンチニブ－2			7
	theliatinib－15			7
	フルキンチニブ－2／theliatinib－15			7

出典：Oncology 20[redacted]-013-01 試験　Table 9.1-1、Table 9.1-2、Table 9.1-3 及び Table 9.1-4
CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム、EGFR：上皮成長因子受容体、qd：1 日 1 回

腫瘍体積及び体重は週 1～2 回測定した。

単剤投与又は併用投与にかかわらず、いずれのモデルにおいても毒性又は体重減少の一般状態の変化は認められなかった。

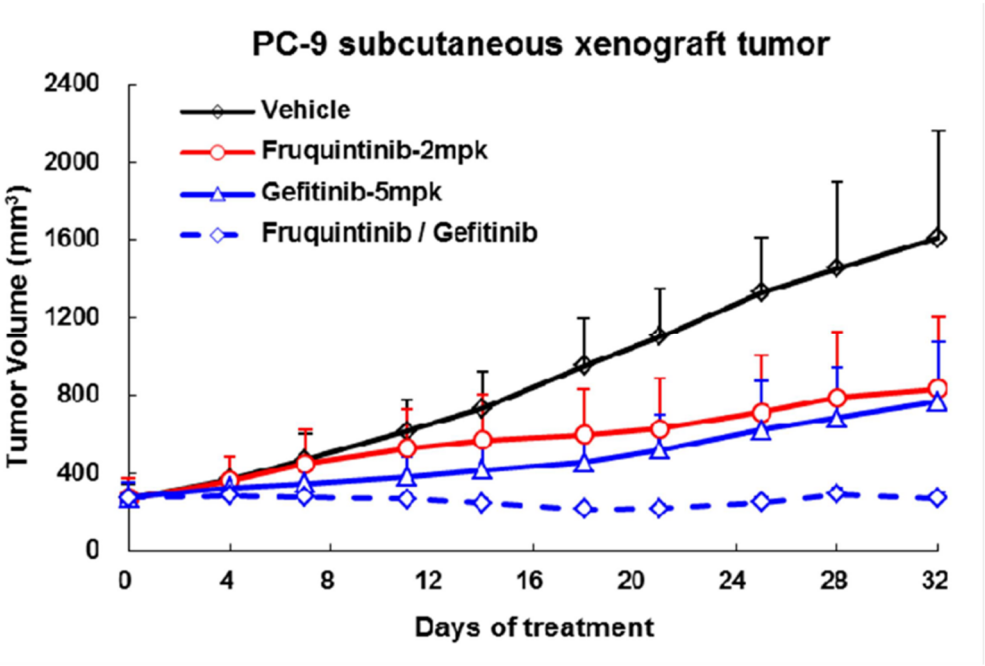
NCI-H292 異種移植モデルにおけるフルキンチニブ及び theliatinib の血漿暴露量並びに PC-9 異種移植モデルにおけるフルキンチニブ及びゲフィチニブの血漿曝露量の予備的解析を実施した。その結果、単独投与群のフルキンチニブ、theliatinib 又はゲフィチニブの薬物濃度は、それらの併用群の薬物濃度と有意差がないことが示され、薬物動態相互作用は腫瘍増殖に対する併用効果に関与しないことが示唆された。

EGFR 経路活性化を伴う 3 つの NSCLC 異種移植モデルで、フルキンチニブは EGFR 阻害剤ゲフィチニブ又は theliatinib との併用で大幅に抗腫瘍効果を増強した。併用療法における抗腫瘍効果の増強は、腫瘍細胞における EGFR シグナル伝達阻害と腫瘍微小環境における VEGFR 抑制の同時遮断に起因する可能性がある。個々の異種移植モデルのデータは、2.6.2.5.1.1、2.6.2.5.1.2 及び 2.6.2.5.1.3 に示す。

2.6.2.5.1.1 PC-9 異種移植モデル。

PC-9 異種移植モデルにおいて、フルキンチニブ 2 mg/kg 又はゲフィチニブ 5 mg/kg を単独投与した場合、中等度の抗腫瘍効果を示し、TGI 率はそれぞれ 58.3%及び 63.3%であった（図 2.6.2.5-1）。一方、フルキンチニブとゲフィチニブを併用投与した場合、抗腫瘍効果は有意に改善し、TGI は 100.4%であった（P<0.01 vs フルキンチニブ単独又はゲフィチニブ単独）（図 2.6.2.5-1）。

図 2.6.2.5-1　PC-9 異種移植モデルにおけるフルキンチニブとゲフィチニブとの併用効果

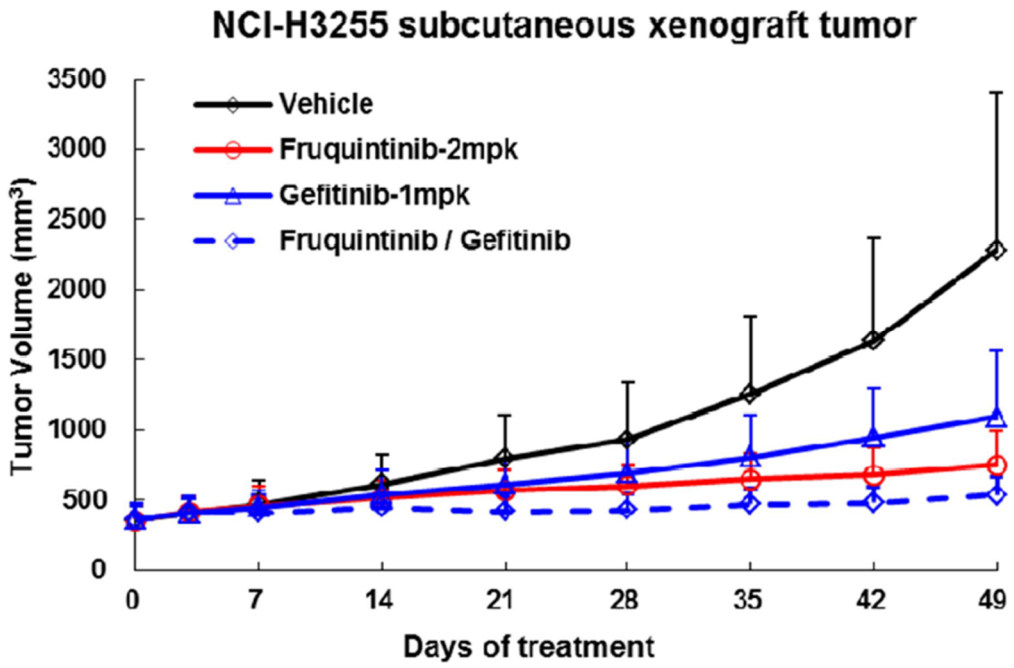


出典：Oncology 20[redacted]-013-01 試験　Figure 9.2-1
mpk：mg/kg
腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

2.6.2.5.1.2 NCI-H3255 異種移植モデル

NCI-H3255 モデルにおいて、2 mg/kg のフルキンチニブ又は 1 mg/kg のゲフィチニブを単独投与したときの TGI は、それぞれ 79.8%及び 62.4%であった（図 2.6.2.5-2）。フルキンチニブとゲフィチニブの併用により抗腫瘍効果が改善され、併用時の TGI は 91.1%であった（P<0.05 vs フルキンチニブ単独、P<0.01 vs ゲフィチニブ単独）（図 2.6.2.5-2）。

図 2.6.2.5-2　NCI-H3255 異種移植モデルにおけるフルキンチニブとゲフィチニブとの併用効果

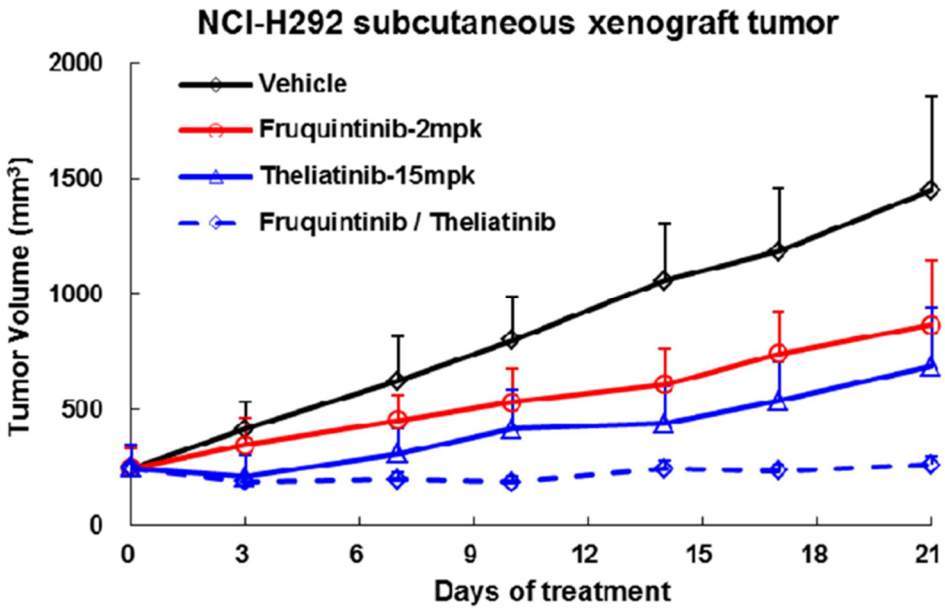


出典：Oncology 20[redacted]-013-01 試験　Figure 9.2-2
mpk：mg/kg
腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

2.6.2.5.1.3 NCI-H292 異種移植モデル

NCI-H292 モデルにおいて、2 mg/kg のフルキンチニブ又は 15 mg/kg の theliatinib を単独投与したときの TGI は、それぞれ 48.7%及び 63.5%であった（図 2.6.2.5-3）。フルキンチニブと theliatinib を併用投与したときの TGI は 98.7%であった（*P*<0.01 vs フルキンチニブ単独又はゲフィチニブ単独）（図 2.6.2.5-3）。

図 2.6.2.5-3　NCI-H292 異種移植モデルにおけるフルキンチニブとゲフィチニブとの併用効果



出典：Oncology 20[redacted]-013-01 試験　Figure 9.2-3
mpk：mg/kg
腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

2.6.2.5.2 非小細胞肺癌細胞株（NCI-H1993）皮下異種移植モデルにおける cMET 阻害剤 savolitinib とフルキンチニブとを併用したときの抗腫瘍活性（Oncology-20[redacted]-013-02 試験）

：添付資料番号 4.2.1.4-2（参考）

Oncology-20[redacted]-013-02 試験では、フルキンチニブ単独又は cMET 阻害剤（savolitinib）との併用時の抗腫瘍活性を cMET 遺伝子増幅 NSCLC 異種移植モデルで評価した。

雌性 BALB/c ヌードマウス（6～7 週齢；17～19 g）に 5×10^6 個／マウスの NCI-H1993（NSCLC）細胞を接種した。腫瘍を 11 日間定着させた後、マウスにフルキンチニブを単独又は savolitinib との併用で投与した。動物をすべての群の開始時の平均腫瘍体積が同程度（約 250 mm^3）になるように無作為に群分けした。試験デザイン及び用法・用量の詳細を表 2.6.2.5-2 に示す。

表 2.6.2.5-2　抗腫瘍試験のデザイン及び投与レジメン－フルキンチニブと cMET 阻害薬 savolitinib との併用

群	用量（mg/kg）	濃度（mg/mL）	投与経路	投与スケジュール	動物数／群
溶媒 [a]	0	0	経口	qd×21 日間	8
フルキンチニブ	2	0.2	経口	qd×21 日間	8
savolitinib	30	3	経口	qd×21 日間	8
フルキンチニブ／savolitinib	2／30	0.2／3	経口/経口	qd×21 日間／qd×21 日間	8

出典：Oncology-20[redacted]-013-02 試験　Table 9.1-1
CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム
[a]　溶媒の組成（試験報告書未記載）は 0.5% CMC-Na+0.5%酸性 CMC-Na pH=2.1 であった。

腫瘍体積と体重は週 2 回測定した。試験終了時に腫瘍組織を採取した。

単剤投与した場合も併用投与した場合も、フルキンチニブ及び savolitinib に毒性を示す一般状態の変化は認められなかった。

cMET 遺伝子増幅 NCI-H1993 異種移植モデルにおいて、単剤投与したときの 2 mg/kg のフルキンチニブ又は 30 mg/kg の savolitinib の TGI はそれぞれ 53.9%及び 58.5%であったが（表 2.6.2.5-3、図 2.6.2.5-4）、フルキンチニブと savolitinib の併用投与はより強い抗腫瘍効果を示し、TGI は 94.6%であった（*P*<0.01 vs.フルキンチニブ単剤又は savolitinib 単剤）（表 2.6.2.5-3 及び図 2.6.2.5-4）。

表 2.6.2.5-3　NCI-H1993 異種移植モデルでのフルキンチニブと savolitinib の併用試験の有効性の要約

群	用量 (mg/kg)	TV [a] (mm³) 開始時	TV [a] (mm³) 21 日	TGI (%) [b]	TW (g) 終了時	IR_{TW} (%)
溶媒	0	257.84±56.68	1374.24±581.38	NA	0.6689±0.4089	NA
フルキンチニブ－2	2	249.96±57.56	764.75±192.82	53.9	0.3114±0.0897	53.4
savolitinib－30	30	250.90±48.75	714.38±133.09	58.5	0.3190±0.0926	52.3
フルキンチニブ／savolitinib	2／30	260.68±59.87	321.08±100.95 [e, f]	94.6	0.1385±0.0381 [e, f]	79.3

出典：Oncology-20[redacted]-013-02 試験　Table 9.1-3

CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム、IR：阻害率、NA：該当せず、TGI：腫瘍増殖阻害、TV：腫瘍体積、TW：腫瘍重量、V_i：群分け日の腫瘍体積、V_t：投与後の腫瘍体積

腫瘍体積及び腫瘍重量は平均値±標準偏差で示す。

[a] TV=長径 × 短径 ²/2

[b] $TGI= [1 - (V_t - V_i)_{薬物治療群}/(V_t-V_i)_{溶媒対照群}]\times 100\%$

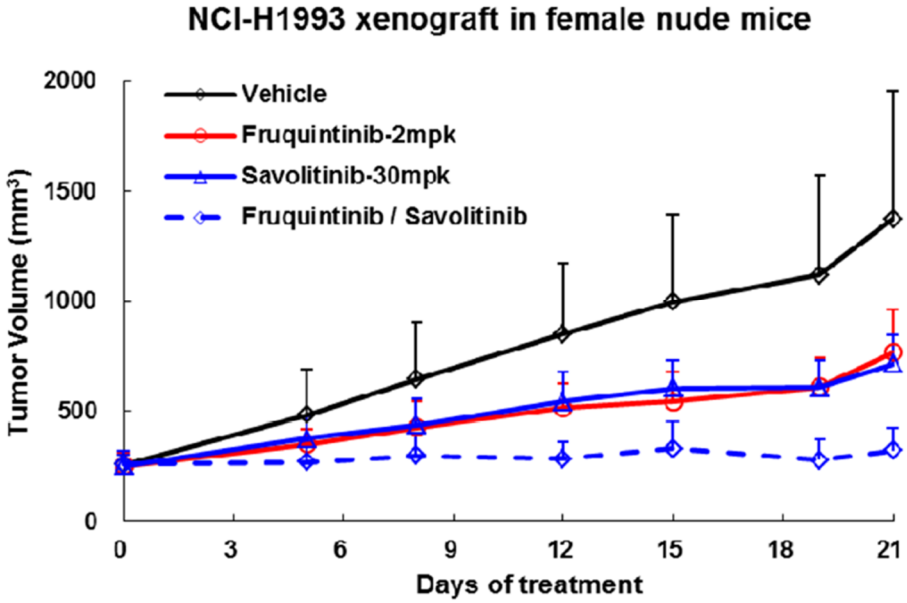
[c] $IR_{TW}(\%)= [(TW_{溶媒群}-TW_{実薬群})/TW_{溶媒群}]\times 100\%$

[d] 溶媒の組成（試験報告書未記載）は 0.5% CMC-Na + 0.5%酸性 CMC-Na pH=2.1

[e] P<0.01 併用療法 vs フルキンチニブ単剤療法

[f] *P*<0.01 併用 vs savolitinib 単独

図 2.6.2.5-4　NCI-H1993 腫瘍異種移植モデルにおけるフルキンチニブと savolitinib との併用効果



出典：Oncology-20[redacted]-013-02 試験　Figure 9.2-1

mpk：mg/kg

腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

最終投与後の試験終了時に、血漿中のフルキンチニブ及び savolitinib の予備的な曝露量解析を実施した。全体として、投与群のフルキンチニブ、savolitinib の薬物濃度は、それらの併用群の薬物濃度と同程度で、薬物動態相互作用は腫瘍増殖に対する併用効果に関与しないことが示唆された。

要約すると、cMET 遺伝子増幅を伴う NCI-H1993 NSCLC 異種移植モデルにおいて、フルキンチニブと savolitinib の併用は抗腫瘍活性を大幅に増強させた。併用療法における抗腫瘍効果の増強は、腫瘍細胞における cMET シグナル伝達阻害と腫瘍微小環境における VEGFR 抑制の同時遮断に起因する可能性がある。

2.6.2.5.3 マウス CT26.WT 同系腫瘍モデルにおけるフルキンチニブ及び抗 PD-L1 抗体を併用投与したときの抗腫瘍効果の評価（Oncology-20[redacted]-013-03 試験）

：添付資料番号 4.2.1.4-3（評価・参考）

Oncology-20[redacted]-013-03 試験では、マウス CT26.WT 同系腫瘍モデルを用いて、フルキンチニブ単独又はマウス抗 PD-L1 抗体との併用による抗腫瘍効果を検討した。

雌性 BALB/c マウス（9～11 週齢）に 3.0×10^5 個／マウスの CT26.WT（結腸癌細胞）を移植した。腫瘍を 8 日間定着させた後、マウスにフルキンチニブを単独又は抗 PD-L1 抗体との併用で投与した。適切なアイソタイプ対照を用いた。各群の開始時の平均腫瘍体積が約 60 mm^3 で同程度になるように、腫瘍体積に従って動物を無作為に群分けした。試験デザイン及び用法・用量の詳細は表 2.6.2.5-4 に示す。

表 2.6.2.5-4　CT26.WT 同系腫瘍モデルの試験デザイン

群	用量（mg/kg）	濃度（mg/mL）	投与経路	投与スケジュール	動物数/群（終了時／開始時）
溶媒－IgG2b アイソタイプ	5	0.5	腹腔内	週 2 回×2 週間（計 4 回投与）	13 [a]/15
抗 PD-L1 抗体	5	0.5	腹腔内	週 2 回×2 週間（計 4 回投与）	14 [b]/15
フルキンチニブ	5	0.5	経口	qd x 14 日間	15/15
フルキンチニブ+抗 PD-L1 抗体	5/5	0.5/0.5	経口 腹腔内	qd x 14 日間／週 2 回 2 週間（計 4 回投与）	15/15

出典：Oncology-20[redacted]-013-03 試験　Table 10.1-2

IgG2b：免疫グロブリン G2b、PD-L1：programmed death-ligand 1、qd：1 日 1 回

[a] 11 日目に腫瘍潰瘍が認められたため 2 例のマウスを安楽死させた。

[b] 10 日目に腫瘍潰瘍が認められたため 1 例のマウスを安楽死させた。

体重及び腫瘍体積を 1 週間あたり 3 回測定し、試験終了時に腫瘍組織を採取した。

溶媒投与群及び抗 PD-L1 抗体投与群で腫瘍性潰瘍が認められた。2 週間の試験期間中に毒性又は体重低下の一般状態の変化は認められなかった。

フルキンチニブ 5 mg/kg 又はマウス抗 PD-L1 抗体 5 mg/kg を単独投与したとき、中等度の TGI（それぞれ 37.5%及び 42.6%）が認められた（表 2.6.2.5-5、図 2.6.2.5-5）。

一方、フルキンチニブと抗 PD-L1 抗体との併用では、より強い抗腫瘍効果が得られ、TGI は 77.8%であった（P<0.01 vs.フルキンチニブ又は抗 PD-L1 抗体単独）（表 2.6.2.5-5, 図 2.6.2.5-5）。腫瘍体積（TV）の変化（V_t-V_i）は、いずれかの単剤療法と比較して併用療法で統計学的に有意であった。

表 2.6.2.5-5　CT26.WT 同系腫瘍モデルにおける抗腫瘍活性

群	用量 (mg/kg)	TV [a] (mm³) 開始日:1 日目	TV [a] (mm³) 終了:14 日目	TGI [b] (%)	動物数／群 (終了時／開始時)
溶媒－IgG 2b アイソタイプ	5	61.36 ± 8.81	1045.67 ± 508.09	NA	13 [c]/15
抗 PD-L1 抗体	5	58.29 ± 10.77	623.10 ± 329.63	42.6	14 [d]/15
フルキンチニブ	5	60.16 ± 10.18	674.93 ± 507.34	37.5	15/15
フルキンチニブ+抗 PD-L1 抗体	5 + 5	59.82 ± 9.76	278.79 ± 200.01	77.8 [e, f]	15/15

出典：Oncology-20[redacted]-013-03 試験　Table 10.1-4

IgG2b：免疫グロブリン G2b、NA：該当せず、PD-L1：programmed death-ligand 1、TGI：腫瘍増殖阻害、TV：腫瘍体積、V_i：開始日の腫瘍体積、V_t：評価日の腫瘍体積

[a] TV=長径 × 短径 ^{2}/2

[b] $TGI = [1 - (V_t - Vi)_{薬物治療群}/(V_t - Vi)_{溶媒対照群}] \times 100\%$

[c] 11 日目に腫瘍潰瘍のためマウス 2 例を安楽死させた。

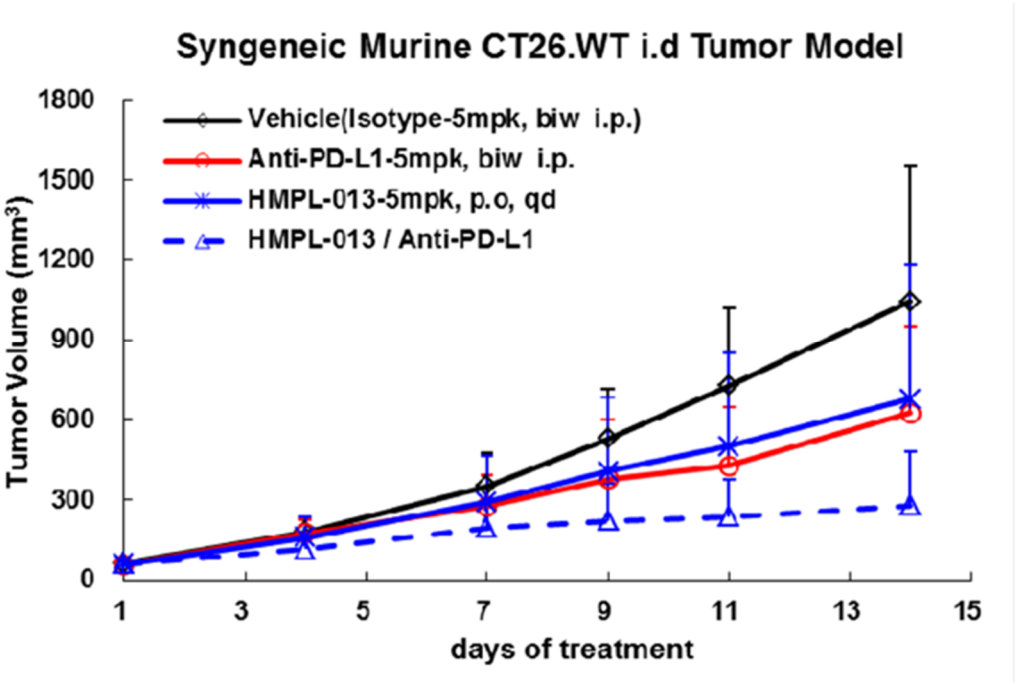
[d] 10 日目に腫瘍潰瘍のためマウス 1 例を安楽死させた。

[e] *P*<0.01 併用療法 vs フルキンチニブ単剤療法

[f] *P*<0.01 併用 vs 抗 PD-L1 抗体

腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

図 2.6.2.5-5　CT26.WT モデルにおけるフルキンチニブと抗 PD-L1 抗体との併用効果



出典：Oncology-20[redacted]-013-03 試験　Figure 10.2-1

biw：週 2 回、HMPL-013：フルキンチニブ、ip：腹腔内、mpk：mg/kg、PD-L1：programmed death-ligand 1、p.o.：経口投与、qd：1 日 1 回

腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

結論として、フルキンチニブは抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果を有意に改善した。