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）

：添付資料番号 4.2.1.4-4（参考）

2.6.2.5.4.1 フルキンチニブを抗 PD-1 抗体又はイリノテカン／フルオロウラシルと併用した場合の抗腫瘍効果

雌 BALB/c マウスに 3.0×10^5 個／マウスの CT26.WT（結腸癌細胞）を移植した。腫瘍を十分な日数定着させ、その後、マウスにフルキンチニブ単独、抗 PD-1 抗体又は化学療法（イリノテカン／フルオロウラシル）との併用で投与を行った。試験デザイン及び用法・用量の詳細は表 2.6.2.5-6 に示す。TGI は 18 日までモニタリングした。

表 2.6.2.5-6　抗腫瘍試験のデザイン及び投与レジメンー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

群	用量（mg/kg）	剤形	投与経路	投与スケジュール	動物数／群
溶媒－0.5% CMC-Na	0	0.5% CMC-Na	経口	qd x18 日間	14
フルキンチニブ	2	0.5% CMC-Na	経口	qd x18 日間	14
抗 PD-1 抗体	10	DPBS	腹腔内	biw（1、5、8、12、15 日）	14
フルキンチニブ+抗 PD-1 抗体	2 + 10	0.5% CMC-Na+DPBS	経口+腹腔内	qd x18 日間 biw（1、5、8、12、15 日）	14
イリノテカン／フルオロウラシル	5/50	生理食塩水／生理食塩水	腹腔内／腹腔内	1、8、15 日／ 25 mg/kg（第 1 週：1、5 日）及び 50 mg/kg（第 2 週：8 日、第 3 週：15 日）[a] に qw	14
フルキンチニブ+イリノテカン／フルオロウラシル	2 + 5/50	0.5% CMC-Na+生理食塩水／生理食塩水	経口+腹腔内／腹腔内	qd x 18 日間+ 1、8、15 日／ 25 mg/kg（第 1 週：1、5 日）及び 50 mg/kg（第 2 週：8 日、第 3 週：15 日目）に qw	14

出典：HTM-20[redacted]-013-01 試験　Table 2

biw：週 2 回、CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム、DPBS：ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、PD-1：programmed death-1、qd：1 日 1 回、qw：週 1 回

[a] フルオロウラシルの投与量を 25 mg/kg（第 1 週：1、5 日）から 50 mg/kg（第 2 週：8 日、第 3 週：15 日）に変更した（投与の最初の週に明らかな抗腫瘍活性が認められなかったため）。試験は投与 18 日に終了した〔溶媒を投与したマウスの平均腫瘍体積が約 2000 mm^3 に達したため（個体によっては 4000 mm^3 を超えた）〕。

イリノテカン／フルオロウラシルの併用療法は臨床標準化学療法を模した。

腫瘍体積及び体重を週 2 又は 3 回測定し、動物の身体的又は行動的異常又は毒性の徴候を注意深くモニタリングした。

いずれの投与群（単独投与又は併用投与）のマウスでも、顕著な体重減少及び毒性は認められなかった。

2 mg/kg のフルキンチニブ単剤、10 mg/kg の抗 PD-1 抗体単剤及び化学療法（イリノテカン／フルオロウラシル併用療法）は中等度の腫瘍増殖抑制を示し、投与後 18 日目の TGI はそれぞれ 48.2%、37.1%及び 30.9%であった。フルキンチニブと抗 PD-1 抗体との併用の TGI は 74.8%（$P<0.05$ vs 各単剤療法）、フルキンチニブと化学療法との併用の TGI は 65.5%（$P<0.01$ vs 化学療法）であった（表 2.6.2.5-7、図 2.6.2.5-6、図 2.6.2.5-7）。フルキンチニブは CT26.WT

モデルで抗 PD-1 抗体及び化学療法の効果を増強した。この効果増強は血管新生、血管正常化及び免疫調節が関係している可能性がある。

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

群	用量 (mg/kg)	TV [a] (mm^3) 開始日	TV [a] (mm^3) 13 日	TGI [b] (%)
溶媒	0	77.76 ± 25.53	2372.25 ± 1187.98	-
フルキンチニブ	2	76.40 ± 21.42	1264.80 ± 1002.08	48.2*
抗 PD-1 抗体	10	79.10 ± 19.77	1521.29 ± 1107.43	37.1
フルキンチニブ+抗 PD-1 抗体	2 + 10	78.05 ± 26.16	656.29 ± 484.14	74.8**,#,&
イリノテカン／フルオロウラシル	5/50	75.96 ± 20.23	1662.05 ± 955.94	30.9
フルキンチニブ+イリノテカン／フルオロウラシル	2 + 5/50	80.60 ± 14.11	872.11 ± 493.45	65.5**,ΔΔ

出典：HTM-20[redacted]-013-01 試験　Table 4

DPBS：ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、PD-1：programmed death-1、TGI：腫瘍増殖阻害、TV：腫瘍体積、V_i：投与開始前日の腫瘍体積、V_t：評価日（13 日）の腫瘍体積

[a] TV=長径 × 短径 ^{2}/2

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

* P<0.05 vs 溶媒

** P<0.01 vs 溶媒

# P<0.05 vs 抗 PD-1 抗体単剤療法

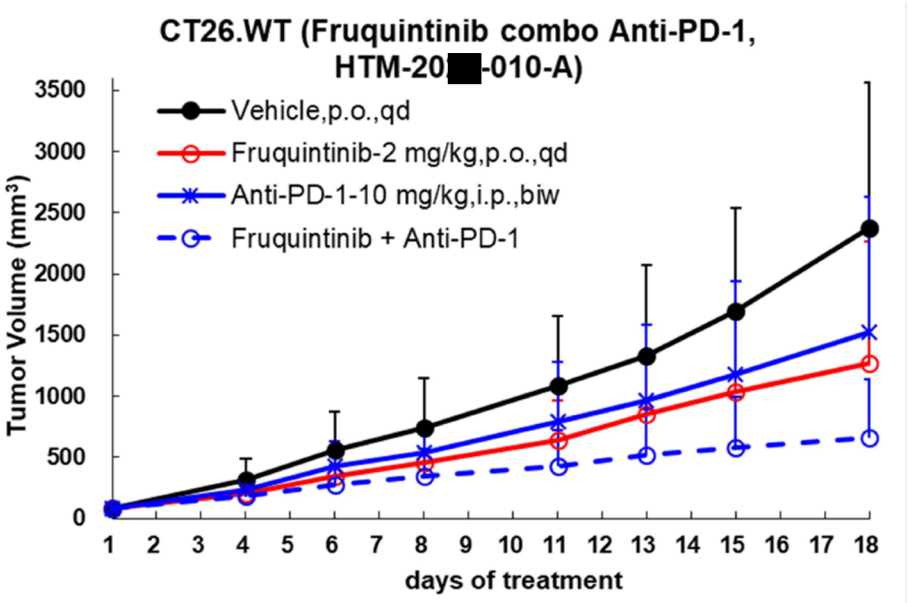
& P<0.05 vs フルキンチニブ単剤療法

ΔΔ P<0.01 vs イリノテカン／フルオロウラシル化学療法

腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

投与経路及び投与剤型：溶媒及びフルキンチニブは 0.5% CMC-Na 溶液を経口投与、抗 PD-1 抗体は DPBS 溶液を腹腔内投与、イリノテカン及びフルオロウラシルは生理食塩水溶液を腹腔内投与した。

図 2.6.2.5-6　フルキンチニブと抗 PD-1 抗体の併用

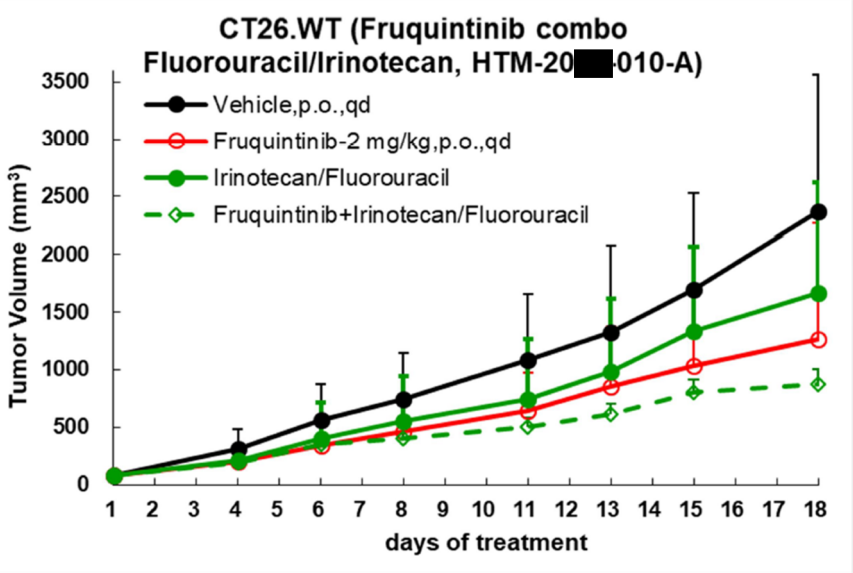


出典：HTM-20[redacted]-013-01 試験　Figure 1

biw：週 2 回、mpk：mg/kg、PD-1：programmed death-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。

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



出典：HTM-20[redacted]-013-01 試験　Figure 2
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。

2.6.2.5.4.2 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の抗腫瘍効果

雌 BALB/c マウスに 3.0×10^5 個／マウスの CT26.WT（結腸癌細胞）を移植した。腫瘍を十分な日数にわたって定着させた後、マウスにフルキンチニブを単独あるいは化学療法（オキサリプラチン／フルオロウラシル）との併用で投与した。試験デザイン及び用法・用量の詳細は表 2.6.2.5-8 に示す。

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）

群	用量(mg/kg)	剤形	投与経路	用法・用量	動物数／群
媒体－0.5% CMC-Na	0	0.5% CMC-Na	経口	qd x 12 日間	7
フルキンチニブ	2	0.5% CMC-Na	経口	qd x 12 日間	7
オキサリプラチン／フルオロウラシル	4/50	5%ブドウ糖注射液／生理食塩水	静脈内／腹腔内	1 及び 8 日 1 及び 8 日	7
フルキンチニブ+オキサリプラチン／フルオロウラシル	2 + 4/50	0.5% CMC-Na／5%ブドウ糖注射液／生理食塩水	経口+静脈内／腹腔内	qd x 12 日間 1 及び 8 日 1 及び 8 日	7

出典：HTM-20[redacted]-013-01 試験　Table 2
CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム、qd：1 日 1 回
オキサリプラチン／フルオロウラシルの併用療法は臨床標準化学療法を模した。

13 日目に TGI を評価した。腫瘍体積及び体重を週 2 又は 3 回測定し、動物の身体的異常、行動的異常又はその他の毒性の徴候を注意深くモニタリングした。

いずれの投与群（単独投与又は併用投与）のマウスでも、顕著な体重減少及び毒性は認められなかった。

2 mg/kg のフルキンチニブ単剤、及び化学療法（オキサリプラチン 4 mg/kg 静脈内投与／フルオロウラシル 50 mg/kg 腹腔内投与）の投与により、中等度の腫瘍増殖抑制が認められ、13

日目の TGI はそれぞれ 50.5%及び 59.3%であった。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%（*P*<0.05 vs 各単独療法）であった（表 2.6.2.5-9、図 2.6.2.5-8）。フルキンチンブは CT 26.WT モデルにおいてオキサリプラチン／フルオロウラシル治療の効果を改善した。

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

群	用量 (mg/kg)	TV [a] (mm^3) 開始日	TV [a] (mm^3) 13 日	TGI [b] (%)
溶媒	0	140.74 ± 51.17	2187.78 ± 1203.90	-
フルキンチニブ	2	154.13 ± 45.07	1168.26 ± 548.66	50.5
オキサリプラチン／フルオロウラシル	4/50	146.78 ± 43.07	980.45 ± 437.17 (59.3*)	59.3*
フルキンチニブ+ オキサリプラチン／フルオロウラシル	2 + 4/50	155.95 ± 52.61	551.65 ± 261.45	80.7**, &, Δ

出典：HTM-20[redacted]-013-01 試験　Table 9

CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム、TGI：腫瘍増殖阻害、TV：腫瘍体積、V_i：投与開始前日の腫瘍体積、V_t：評価日（13 日）の腫瘍体積

[a] TV=長径 × 短径 ^{2}/2

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

* *P*<0.05 vs 溶媒

** *P*<0.01 vs 溶媒

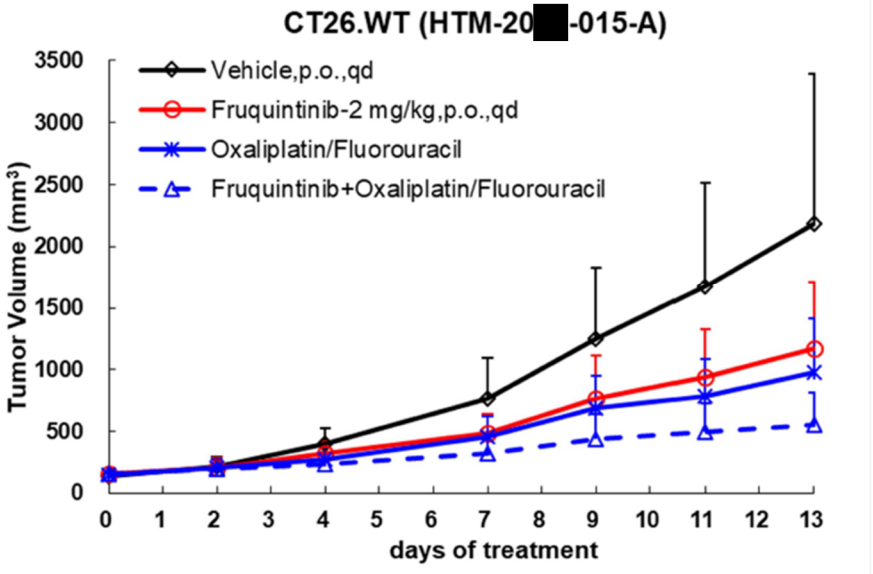
& *P*<0.05 vs フルキンチニブ単剤療法

Δ *P*<0.05 vs オキサリプラチン／フルオロウラシル化学療法

腫瘍体積は平均値±標準偏差で示す。

投与経路及び投与剤型：溶媒及びフルキンチニブは 0.5% CMC-Na 溶液を経口投与、オキサリプラチンは 5% glucose 注射液を静脈内投与、フルオロウラシルは生理食塩水溶液を腹腔内投与した。

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



出典：HTM-20[redacted]-013-01 試験　Figure 8

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。

2.6.2.5.4.3 CT26.WT モデルにおける腫瘍微小環境バイオマーカーの変化

腫瘍微小環境（TME）バイオマーカーの変化に関する試験の詳細は、2.6.2.5.4.1 項に記載した内容と同じである。ただし、TME 解析のため腫瘍検体を採取した日は 11 日である。TV 及び TGI の結果の要約に加えて、試験デザイン及び投与レジメンの詳細を表 2.6.2.5-10 に示す。

表 2.6.2.5-10　試験デザイン及び投与レジメンー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

群	用量 (mg/kg)	投与スケジュール	動物数	TV [a]（mm³）		TGI [b]
				開始日	終了日	
溶媒	0	qd x 10 日間	8	125.57±40.32	1436.65±467.96	
フルキンチニブ	2	qd x 10 日間	8	131.42±36.18	774.64±388.84	50.9**
抗 PD-1 抗体	10	1、5、8 日	8	139.90±36.48	1063.88±667.05	29.5
フルキンチニブ +抗 PD-1 抗体	2+10	qd x 10 日間／1、5、8 日	8	130.38±36.17	551.53±418.81	67.9**

出典：HTM-20[redacted]-013-01 試験　Table 6

CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム、DPBS：ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、PD-1：programmed death-1、qd：1 日 1 回、TGI：腫瘍増殖阻害、TV：腫瘍体積、V_i：群分け日の腫瘍体積、V_t：投与後の腫瘍体積

[a] TV=長径× 短径 ²/2

[b] $TGI=[1-(V_t - V_i)_{投与薬物}/(V_t - V_i)_{媒体対照}]\times 100\%$

** P<0.01 vs 溶媒

TV は平均値±標準偏差で示す。

投与経路及び投与剤型：溶媒及びフルキンチニブは 0.5% CMC-Na 溶液を経口投与、抗 PD-1 抗体は DPBS 溶液を腹腔内投与した。

フルキンチニブの最終投与から約 24 時間後及び抗 PD-I 抗体の最終投与から約 72 時間後に腫瘍検体を採取した。免疫組織化学又は免疫蛍光染色法を染色に用いた。

フルキンチニブ単独及び抗 PD-1 抗体との併用により、血管マーカーCD31 の発現が強力に阻害されたが、α-SMA$^+$CD31$^+$二重染色陽性の周皮細胞による腫瘍血管の被覆が増加したことから（表 2.6.2.5-11）、抗血管新生作用及び血管正常化作用が示された。さらに、抗 PD-1 抗体の有無にかかわらず、フルキンチニブは有意に腫瘍組織浸潤している CD206$^+$（M2-TAM のバイオマーカー）細胞を減少させた（表 2.6.2.5-11）。抗 PD-1 抗体単独又はフルキンチニブとの併用の結果、CD8$^+$T 細胞浸潤が増加する傾向が認められた（表 2.6.2.5-11）。

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

マーカー	溶媒 (N=8)	フルキンチニブ (N=8)	抗 PD-1 抗体 (N=7) [a]	併用 (N=7) [a]
CD31 陽性面積%	2.8 ± 0.6	1.79 ± 0.8*	2.74 ± 0.5	1.593 ± 0.6**
a-SMA$^+$CD31$^+$面積%（20×HPF）	0.3 ± 0.08	0.5 ± 0.2*	0.3 ± 0.09	0.53 ± 0.2*
20×HPF 中の CD8 陽性細胞数	145 ± 44	163 ± 65	182 ± 73	203 ± 93
CD206$^+$マクロファージ面積%（20×HPF）	10.9 ± 2.1	5.8 ± 2.5***	9.3 ± 2.3	6.8 ± 2.4**

出典：HTM-20[redacted]-013-01 試験　Table 8

CD：分化抗原群、HPF：高倍率視野、PD-1：programmed death-1、SMA：平滑筋アクチン、TME: 腫瘍微小環境

[a] 抗 PD-1 抗体群及び併用群の各 1 例は、壊死組織面積が 90%を超えたため、評価対象としなかった。

* P<0.05 vs 溶媒対照

**P<0.01 vs 溶媒対照

*** P<0.001 vs 溶媒対照

20×：対物レンズ倍率 20 倍。

平均値±標準偏差

2.6.2.6 考察及び結論

腫瘍は増殖中に大量の VEGF を分泌し、これが血管内皮細胞上の VEGFR に結合して VEGFR を活性化する。結果としてアダプター蛋白質及び非受容体キナーゼを含む下流分子が、VEGFR 上の異なるチロシンリン酸化部位に結合することによって活性化され、それにより PI3K/AKT、RAS/RAF/ERK1/2、Src、P38 及び PKC を含む細胞生物学的機能に密接に関連する複数のシグナル伝達経路が活性化される。これらの経路の活性化は、細胞の生存、増殖、遊走、血管内腔形成、血管透過性などの一連の生物学的機能の変化をもたらし、腫瘍増殖のための栄養素を供給するための新たな血管の形成及び構築を可能にする。フルキンチニブの主な作用機序の 1 つは、VEGFR ファミリーを阻害することによる腫瘍血管新生過程をターゲットとしている。

効力を裏付ける試験：

実施した試験は、in vitro ヒト細胞系、マウス異種移植モデル及びマウス PK/PD 試験であった。In vitro アッセイでは、フルキンチニブは高度に選択的で主な標的は VEGFR ファミリーの受容体 VEGFR-1、-2 及び-3 であり、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では、フルキンチニブは、CDK1、2、5、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有意に阻害せず、264 種類のキナーゼパネルでの 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 IC_{50} 値 0.0006 μM で抑制し、AKT、ERK、Src キナーゼ及び 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 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 の細胞での活性はフルキンチニブの 1/10 であった。癌患者にフルキンチニブ 5 mg を 1 日 1 回投与したときの定常状態における AUC（幾何平均値）は、M11 の 1668 ng·h/mL に対しフルキンチニブは 5777 ng·h/mL であったことから、M11 はフルキンチニブの総薬理活性に臨床的に意味のある寄与をしないと予想される（2015-013-00US1 試験）。

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。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抑制した。

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、

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しか認められなかった（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 増殖の IC_{50}（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、同じ試験で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} は 3.5 から 15.5 μM の範囲であった。これは、スニチニブがオフターゲットに由来するであろう細胞毒性活性を有することを示す。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。

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、阻害率は投与後 1 時間に 134.7%、4 時間に 123.1%、その後 8 時間に 85.8%に低下し、16 及び 24 時間に 0%であった。血漿中のフルキンチニブ濃度は、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 NCI-H460 及び 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 C26.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。

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%を超える阻害あるい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。

安全性薬理：

フルキンチニブの hERG 阻害 IC_{50} は、>13.08 μM（>5146 ng/mL）であり、これはヒト予定臨床用量（5 mg/日）のヒト定常状態における非結合型 C_{max}（13.7 ng/mL、総 C_{max} 291 ng/mL、蛋白結合率 95.3%）の>370 倍であった。同様に、M11 は hERG チャネルを阻害せず、その IC_{50} 値は>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}〔総濃度 77.4 ng/mL、非結合型濃度：1.8 ng/mL（蛋白結合率 97.7%）〕の>1000 倍であった。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である M11 は hERG カ

リウムチャネルに対して顕著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 における安全性薬理評価では、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ころ、運動協調性又は行動への影響は認められなかった。また、イヌに 0.085～0.34 mg/kg の用量で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/日投与時の総 C_{max} 及び遊離型 C_{max}（Day 91 にそれぞれ 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ンチニブの臨床 C_{max}（すなわち、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 及び 39 週間の NMPA 準拠 GLP 反復投与毒性試験で 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）で ECG の変化は認められなかったが、イヌを用いた 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 週時には、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。

安全性薬理試験に基づくと、フルキンチニブは、ヒトに予定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と考えられた。

薬力学的薬物相互作用：

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 試験も実施した。複数の非臨床腫瘍モデルにおいて、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）とフルキンチニブの併用は、それぞれの単剤より強い抗腫瘍効果を示した。

総合すると、これらの非臨床薬理データは、転移性結腸・直腸癌患者におけるフルキンチニブの使用を支持するものである。

2.6.2.7 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] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature. 1995 Jul 6;376:62-6.

[5] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. Genes Cancer. 2011 Dec;2(12): 1097-105.

[6] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. J Clin Oncol. 2002 Nov 1;20(21):4368-80. '

[7] Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. J Exp Med. 2015 Feb 9;212(2):139-48.

[8] Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. Oncoimmunology. 2019 Apr 13;8(7):1596004.

[9] Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. Nat Rev Clin Oncol. 2017 Jul;14(7):399-416.

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

[11] 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.

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

[13] Satore-Bianchi A, Zeppellini A, Amatu A, Ricotta R, Bencardino K, Siena S. Regorafenib in metastatic colorectal cancer. Exp Rev Anticancer Ther. 2014 Mar;14(3):255-265.

[14] 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 Aug 20;23(24):5474-83.

[15] Van de Water A, Verheyen J, Xhonneux R, Reneman RS. An improved method to correct the QT interval of the electrocardiogram for changes in heart rate. J Pharmacol Methods. 1989 Nov 1;22(3):207-17.

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験の一覧表....2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験....7
2.6.3.3 副次的薬理試験 13
2.6.3.4 安全性薬理試験 14
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.... 15

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験の一覧表

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Test System/Test Assay	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	添付資料番号	区分
Primary Pharmacodynamics (in vitro)						
Biochemical activity of fruquintinib on VEGFR2 kinase	FRET-based Z'-LYTE™ kinase assay with recombinant human VEGFR2 kinase catalytic domain	In vitro	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-01	4.2.1.1-1	参考
Selectivity profiling of fruquintinib against 264 kinases	Panel of 264 kinases: Radiometric kinase activity assay (^{32}p-ATP incorporation) Flt3, PDGFRβ , EGFR, Tie2, CHK1, CDK1, CDK2 and CDK5: FRET-based Z'-LYTE kinase assay/recombinant EGFR catalytic domain cMET and EphB4: TRANSCREENER™ fluorescence polarization ADP assay CHK1: K-LISA™ assay/ recombinant CHK1 catalytic domain	In vitro	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-02	4.2.1.1-2	参考
Inhibitory effect of fruquintinib on VEGFR2 phosphorylation, VEGFR2 (KDR) signaling pathways, and VEGF-induced angiogenesis	Inhibition of VEGF-dependent VEGFR2 phosphorylation: Modified DELFIA® assay/HEK-293-KDR cells Inhibition of KDR signaling pathways: Western blot/HEK-293-KDR cells and HUVECs VEGF-dependent proliferation: CCK-8 cell viability assay/HUVECs Tubular formation: Tube formation assay on a Basement Membrane Matrix matrigel/HUVECs Cell cytotoxicity: MTT colorimetric assay/panel of human tumor and normal cell lines	In vitro	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-03	4.2.1.1-3	参考

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Test System/Test Assay	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	添付資料番号	区分
Inhibitory effect of fruquintinib and metabolite M11 on VEGFR2 Kinase and VEGFR2 phosphorylation in HEK-293-KDR cells	Inhibitory effect of fruquintinib and M11 on VEGFR2 kinase: FRET Z'-LYTE kinase assay with recombinant human VEGFR2 kinase catalytic domain Inhibitory effect of fruquintinib and M11 of VEGF-dependent phosphorylation of VEGFR2: ELISA assay in HEK-293-KDR cells (VEGFR2 phosphorylation)	In vitro	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-01	4.2.1.1-4	参考
Primary Pharmacodynamics (ex vivo)						
Inhibitory effect of fruquintinib on microvessel sprouting in a chorioallantoic membrane assay (CAM) model	Chorioallantoic membrane assay/chick embryos	Ex vivo	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-04	4.2.1.1-5	参考
Primary Pharmacodynamics (in vivo)						
Inhibitory effect of fruquintinib on VEGF-stimulated VEGFR2 phosphorylation in the lung tissues of nude mice	Female BALB/c nude mice stimulated with 500 ng recombinant mouse VEGF (single dose)/detection of phosphoVEGFR2 and β-actin in lung tissue by Western blot	Oral gavage, single dose	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-05	4.2.1.1-6	参考
Antitumor activity of fruquintinib in subcutaneous xenograft tumor models in nude mice	Subcutaneous xenograft models in BALB/c nude mice bearing tumors from: human gastric adenocarcinoma cells (BGC-823), human non-small cell lung cancer cells (NCI-H460), human colon adenocarcinoma cells (HT-29) or human clear-cell renal carcinoma cells (Caki-1)/ TGI	Oral gavage, repeat dose	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-06	4.2.1.1-7	評価
Inhibitory effect of fruquintinib on CD31 expression in NCI-H460 and Caki-1 subcutaneous tumor tissues	Tumor tissue samples from subcutaneous xenograft tumor model in BALB/c nude mice bearing tumors from: NCI-H460 and Caki-1 cells/CD31 expression in tumor tissues evaluating vessel density (angiogenesis) using immunohistochemical analysis	Oral gavage, repeat dose	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-07	4.2.1.1-8	参考

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Test System/Test Assay	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	添付資料番号	区分
Secondary Pharmacodynamics						
In vitro pharmacology study of fruquintinib[a]	Binding, enzyme, and uptake assays, ion channels, transporters, kinases, other enzymes	In vitro	[redacted], France	100054042	4.2.1.2-1	参考
Safety Pharmacology						
Effects of fruquintinib on hERG potassium channels stably expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells using manual patch-clamp technique	Manual patch-clamp technique/CHO cells	In vitro	[redacted], China	215-0076-EP[b]	4.2.1.3-1	参考
Effects of M11 on hERG potassium channels stably expressed in CHO cells using manual patch-clamp technique	Manual patch-clamp technique/CHO cells	In vitro	[redacted], China	215-0060-EP[b]	4.2.1.3-2	参考
Behavior test of fruquintinib in ICR mice following single oral administration	ICR mice	Oral gavage, single dose	[redacted], China	[redacted]49PB1[b]	4.2.1.3-3	参考
Cardiovascular and respiratory effects of fruquintinib on anesthetized Beagle dogs following single oral gavage administration	Beagle dog	Oral gavage, single dose	[redacted], China	[redacted]49PH1[b]	4.2.1.3-4	参考
4-Week oral capsules toxicity and toxicokinetic study with fruquintinib in Beagle dogs with a 4-week recovery	Beagle dog	Oral capsules, repeat dose	[redacted], China	[redacted]49RD2[b]	4.2.3.2-4	参考

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Test System/Test Assay	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	添付資料番号	区分
13-Week oral capsules toxicity and toxicokinetic study with fruquintinib in Beagle dogs with a 4-week recovery	Beagle dog	Oral capsules, repeat dose	[redacted], China	8449374 [b]	4.2.3.2-5	評価
39-Week oral capsules toxicity and toxicokinetic study with fruquintinib in Beagle dogs with a 4-week recovery	Beagle dog	Oral capsules, repeat dose	[redacted], China	[redacted]54RD2 [b]	4.2.3.2-6	参考
Pharmacodynamic Drug Interactions						
Evaluation of antitumor activity of fruquintinib in combination with the EGFR inhibitors gefitinib or theliatinib in multiple subcutaneous xenograft models derived from NSCLC cell lines	Female BALB/c nude mice/ Xenograft models bearing tumors from: PC-9 (human lung adenocarcinoma) cells, NCI-H292 (human mucoepidermoid pulmonary carcinoma) cells, NCI-H3255 (human lung adenocarcinoma) /TGI	Oral gavage	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-01	4.2.1.4-1	参考
Evaluation of antitumor activity of fruquintinib in combination with the cMET inhibitor savolitinib in a NSCLC subcutaneous xenograft model	Female BALB/c nude mice/ Xenograft models bearing tumors from: NCI-H1993 (NSCLC cells) carrying MET gene amplification/TGI	Oral gavage	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-02	4.2.1.4-2	参考
Evaluation of antitumor activity of fruquintinib in combination with an anti- PD-L1 in a murine CT26.WT syngeneic tumor model	Female BALB/c immune competent mice Xenograft models bearing tumors from CT26.WT cells/TGI	Oral gavage [c]	HUTCHMED, Shanghai, China	Oncology-20[redacted]-013-03	4.2.1.4-3	参考

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Test System/Test Assay	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	添付資料番号	区分
Antitumor activity of fruquintinib in combination with anti-PD-1 antibody or chemotherapies in murine colon cancer CT26.WT model	Female BALB/c mice Xenograft models bearing tumors from CT26.WT cells/TGI	Oral gavage [c]	HUTCHMED, Shanghai, China	HTM-20[redacted]-013-01	4.2.1.4-4	参考

^{32}p-ATP: labelled adenosine 5'-triphosphate; ADP: adenosine diphosphate; Anti-PD-1: anti-programmed cell death-1; Anti-PD-L1: anti-programmed cell death-1 ligand; CCK-8: cell counting kit-8; CD31: cluster of differentiation 31; CDK: cyclin-dependent kinases; CHK1: checkpoint kinase 1; CHO: Chinese hamster ovary; DELFIA: dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay; EGFR: epidermal growth factor receptor; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; EphB4: Ephrin type-B receptor 4; Flt3: Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3; FRET: fluorescence resonance energy transfer; HEK-293: human embryonic kidney-293 cells; hERG: human *ether-à-go-go*-related gene; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; KDR: Kinase Insert Domain Receptor; M11: metabolite of fruquintinib (also coded HM5025423); MET: hepatocyte growth factor receptor; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NSCLC: non-small cell lung cancer; PDGFRβ: Platelet-derived growth factor receptor beta; TGI: tumor growth inhibition; Tie2: tyrosine kinase with immunoglobulin-like loops and epidermal growth factor homology domains-2; VEGF: vascular endothelial growth factor; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor.

[a] The report refers to fruquintinib as [redacted].

[b] This study is compliant with Good Laboratory Practice regulations.

[c] The other products were administered either intravenously or by intraperitoneal injection.

Fruquintinib is referred to as HMPL-013 in some study reports.

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)/ Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
Biochemical activity of fruquintinib on VEGFR2 kinase	Recombinant human VEGFR2 kinase catalytic domain	In vitro	Concentrations up to 30 μM	NA	Mean IC_{50} derived from 3 independent experiments = 0.025 ± 0.010 μM.	Oncology-20[redacted]-013-01	4.2.1.1-1
Selectivity profiling of fruquintinib against 264 kinases	Recombinant kinases	In vitro	Inhibition of Flt3, PDGFβ , Tie2, CHK1, CDK1, CDK2, CDK5 kinases: 0.00457 to 10 μM of fruquintinib Inhibition of EGFR kinase: 0.0137 to 30 μM of fruquintinib Inhibition of cMET kinase: 0.00457 to 10 mM of fruquintinib Inhibition of EphB4 kinase: 3 μM of fruquintinib Panel 264 kinases: 1 μM of fruquintinib	NA	Fruquintinib potently inhibited VEGFR1, 2 and 3 (IC_{50} of 33 nM, 35 nM and 0.5 nM, respectively). Also fruquintinib moderately inhibited FGFR1 and RET (IC_{50} of 181 nM and 128 nM, respectively). Fruquintinib is not an inhibitor of the kinases involved in the regulation of growth and cell cycle (EGFR, CDKs and cMET) or other kinases tested, including PDGFRβ and Flt3 (IC_{50}>10 μM). This suggests that fruquintinib is highly selective for VEGFR-1, -2 and -3.	Oncology-20[redacted]-013-02	4.2.1.1-2

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)/ Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
Inhibitory effect of fruquintinib on VEGFR2 phosphorylation VEGFR2 (KDR) signaling pathways, and VEGF-induced angiogenesis	VEGFR2 phosphorylation: HEK-293-KDR cells KDR signaling pathways: HEK-293-KDR cells/HUVECs VEGF-dependent proliferation: HUVECs Tubular formation: HUVECs Cell cytotoxicity: Human cell lines: Bcap-37, SKOV-3, A549, NCI-H460, HEPG2, AGS, SW620, HT-29, A431, A375, QSG-7701, HUVECs	In vitro	VEGFR2 phosphorylation: 0.00000508 to 0.10 μM of fruquintinib KDR signaling pathways: 0.005 to 0.5 μM of fruquintinib VEGF-dependent proliferation: 0.0000002 to 3 μM of fruquintinib Tubular formation: 0.03 and 0.3 μM of fruquintinib Cell cytotoxicity: 0.002 to 30 μM for all cell types except HUVECs (0.00914 to 20 μM)	NA	VEGFR2 phosphorylation: Potently inhibited by fruquintinib in HEK-293-KDR cells (Mean IC_{50} = 0.0006 ± 0.0002 μM). KDR signaling pathways: Fruquintinib inhibited VEGF- stimulated VEGFR2 phosphorylation in both HEK293-KDR cells and primary HUVECs in a dose-dependent manner. KDR and its downstream signaling cascade, including AKT, ERK, Src and P38 were activated upon VEGF stimulation and inhibited significantly by fruquintinib. VEGF-dependent proliferation: Inhibition of VEGFR2 resulted in the blockage of VEGFR- mediated angiogenesis, such as proliferation of endothelial cells (IC_{50} = 0.0016 μM in HUVECs). Tubular formation: Tube formation was inhibited in vitro (74% and 94% inhibition at of 0.03 and 0.3 μM in HUVECs, respectively). Cell cytotoxicity: Consistent with selectivity to VEGFR kinase, fruquintinib was found to have low cytotoxicity. Fruquintinib showed no significant cytotoxicity in most cell lines with the IC_{50} greater than 30 μM. Fruquintinib showed slight cytotoxicity in HUVECs with an IC_{50} value of 18.7 μM.	Oncology-20[redacted]-013-03	4.2.1.1-3

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)/ Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
Inhibitory effect of fruquintinib and metabolite M11 on VEGFR2 Kinase and VEGFR2 phosphorylation in HEK-293-KDR cells	Inhibitory effect of fruquintinib and M11 on VEGFR2 kinase: Recombinant human VEGFR2 kinase catalytic domain in HEK-293-KDR cells Inhibitory effect of fruquintinib and M11 of VEGF- dependent phosphorylation of VEGFR2: HEK-293-KDR cells	In vitro	Inhibitory effect of fruquintinib and M11 on VEGFR2 kinase: 0.00137 to 3 μM of fruquintinib 0.00137 to 3 μM of M11 Inhibitory effect of fruquintinib and M11 of VEGF-dependent phosphorylation of VEGFR2: 0.000137 to 0.3 μM of fruquintinib 0.00137 to 3 μM of M11	NA	Inhibitory effect of fruquintinib and M11 on VEGFR2 kinase: M11 and fruquintinib inhibited VEGFR2 kinase activity (mean IC_{50} of 0.028 ± 0.002 μM and 0.015 ± 0.003 μM, respectively). Inhibitory effect of fruquintinib and M11 of VEGF-dependent phosphorylation of VEGFR2: M11 inhibited VEGF-induced VEGFR2 phosphorylation in HEK293-KDR cells in a dose- dependent manner, with an IC_{50} of 0.033 μM, which is 10 times less potent than the IC_{50} of fruquintinib (IC_{50} = 0.002 μM).	Oncology-20[redacted]-013-01	4.2.1.1-4
Inhibitory effect of fruquintinib on microvessel sprouting in a chorioallantoic membrane assay (CAM) model	Chorioallantoic membrane assay/chick embryos	Ex vivo	0.01 to 1 nmol/egg	NA	Microvessel density was reduced by fruquintinib in a dose-dependent manner at concentrations of ≥ 0.1 nmol/egg suggesting that fruquintinib is a potent inhibitor of angiogenesis.	Oncology-20[redacted]-013-04	4.2.1.1-5

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)/ Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
Inhibitory effect of fruquintinib on VEGF stimulated VEGFR2 phosphorylation in the lung tissues of mice	Mouse/BALB/c nude	Oral gavage	Fruquintinib: 2.5 mg/kg, single dose Sunitinib [a]: 40 mg/kg, single dose Control (without VEGF stimulation): 0.5% CMC-Na Model control group (with VEGF stimulation): 0.5% CMC-Na	F:3	Fruquintinib treatment resulted in dose- and time-dependent inhibition of VEGF-induced VEGFR2 phosphorylation in lung tissue. The inhibitory rates were 134.7% and 123.1% at 1 and 4 hours post dose and then dropped to 85.8% at 8 hours. Fruquintinib achieved near complete target inhibition (> 80%) that was maintained for > 8 hours following a single oral dose of 2.5 mg/kg with a corresponding plasma drug concentration at the 8-hour time point of 176 ng/mL.	Oncology-20[redacted]-013-05	4.2.1.1-6
Antitumor activity of fruquintinib in subcutaneous xenograft tumor models in nude mice	Mouse/BALB/c nude Xenograft models bearing tumors from: BGC-823 (human gastric adenocarcinoma) cells	Oral gavage	BGC-823 model: 0.5, 1 or 2 mg/kg (Experiment 1), 2, 5 or 20 mg/kg (Experiment 2), qd, for 3 weeks	BGC-823 model: M: Up to 8	Fruquintinib demonstrated dose-dependent and reproducible tumor growth inhibition in multiple human xenograft models. BGC-823 model: The highest sensitivity (TGI values) with fruquintinib at 0.5, 1 or 2 mg/kg were 62.3%, 74.2% and 95.4% respectively (Exp 1) or 98.6%, 106.5% and 113.3% at doses of 2, 5 or 20 mg/kg (Exp 2) respectively. A reduction in tumor size by 24% and 49% was observed at 5 and 20 mg/kg respectively.	Oncology-20[redacted]-013-06	4.2.1.1-7

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)/ Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
	NCI-H460 (non-small cell lung cancer) cells HT-29 (human colon adenocarcinoma) cells Caki-1 (human clear-cell renal cell carcinoma) cells		NCI-H460 model: 0.77, 1.92, 4.8 or 12 mg/kg (Experiment 1), 2 or 12 mg/kg (Experiment 2) qd, for 3 weeks HT-29 model: 0.77, 1.92, 4.8 or 12 mg/kg (Experiment 1), 2 or 12 mg/kg (Experiment 2) qd for 3 weeks Caki-1 model: 2 mg/kg (Experiment 1), 0.8, 2 or 5 mg/kg (Experiment 2), qd for 3 weeks Sunitinib [a]: 30 or 40 mg/kg, qd, for 3 weeks, in all experiments	NCI-H460 model: M: 7 HT-29 model: M: Up to 8 Caki-1 model: M and F/ Up to 7	NCI-H460 model: TGI rates at doses of 0.77, 1.92, 4.8 and 12 mg/kg were 40.9%, 56.9%, 71.8% and 79.3%, respectively (Exp 1) and 65.1% and 81.2% at doses of 2 mg/kg and 12 mg/kg respectively (Exp 2). HT-29 model: TGI rates at doses of 0.77, 1.92, 4.8 and 12 mg/kg were 46.4%, 60.8%, 80.6% and 89.2%, respectively (Exp 1) and 76.4% and 88.1% at doses of 2 mg/kg and 12 mg/kg respectively (Exp 2). Caki-1 model: TGI rates at a dose of 2 mg/kg was 56.6% (Exp 1), and 34.0%, 51.6% and 63.2% at doses of 0.8, 2 mg/kg and 5 mg/kg respectively (Exp 2). The MED was considered to be 0.5 mg/kg (TGI ≥ 58%, $p<0.05$; BGC-823 model), the corresponding AUC in plasma at this dose was 898 ng·h/mL.		

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)/ Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
Inhibitory effect of fruquintinib on CD31 expression in NCI-H460 and Caki-1 subcutaneous tumor tissues	Mouse/BALB/c nude Xenograft models bearing tumors from NCI-H460 and Caki-1 subcutaneous tumor tissues	Oral gavage	NCI-H460 model: 0.77, 1.92, 4.8 and 12 mg/kg, qd for 3 weeks Caki-1 model: 0.8, 2 and 5 mg/kg, qd for 3 weeks Sunitinib[a] 40 mg/kg, qd for 3 weeks	NCI-H460 model: n = 5 tumors Caki-1 model: n = 7 tumors	Fruquintinib resulted in dose-dependent inhibition of CD31-positive vascular areas in NCI-H460 and Caki-1 tumor tissues after repeated dosing. 13.8%, 41.1%, 52.2% and 66.6% inhibition at 0.77, 1.92, 4.8 and 12 mg/kg, respectively in the NCI-H460 (non-small cell lung cancer) tumor model. 25.6%, 53.4% and 73.0% inhibition at 0.8, 2 and 5 mg/kg, respectively in the Caki-1 (human clear-cell renal carcinoma) tumor model. This indicates that the antitumor activity of fruquintinib could be closely associated with anti-angiogenesis.	Oncology-20[redacted]-013-07	4.2.1.1-8

CD31: cluster of differentiation 31; CDK: cyclin-dependent kinases; CHK1: checkpoint kinase 1; EGFR: epidermal growth factor receptor; EphB4: Ephrin type-B receptor 4; Exp: experiment, F: female; Flt3: Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3; HEK-293: human embryonic kidney-293 cells; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; IC_{50}: half maximal inhibitory concentration; KDR: Kinase Insert Domain Receptor; M: male; M11: metabolite of fruquintinib (also coded HM5025423); MED: minimum effective dose; MET: hepatocyte growth factor receptor; N: number; NA: not applicable; PDGFRβ: platelet-derived growth factor receptor beta; qd: once daily; TGI: tumor growth inhibition; Tie2: tyrosine kinase with immunoglobulin-like loops and epidermal growth factor homology domains-2, VEGF: vascular endothelial growth factor; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor.

[a] Reference compound.

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.3 副次的薬理試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
In Vitro pharmacology study of fruquintinib [a]	NA	In vitro	1 μM	NA	No significant effect (inhibition or stimulation higher than 50%) was observed on any of the receptors studied.	100054042	4.2.1.2-1

NA: not applicable.

[a] The report refers to fruquintinib as [redacted].

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：フルキンチニブ or M11

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg) /Concentrations(μM)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	添付資料番号
Cardiovascular	CHO cells expressing hERG	In vitro	1, 3, 10 and 20 μM of fruquintinib [a]	NA	IC_{50} > 13.08 μM	US FDA, OECD, NMPA GLP	215-0076-EP	4.2.1.3-1
Cardiovascular	CHO cells expressing hERG	In vitro	0.3, 1, 3 and 10 μM of M11[b]	NA	IC_{50} > 6.05 μM	US FDA, OECD, NMPA GLP	215-0060-EP	4.2.1.3-2
Central nervous system	Mouse/ICR	Oral gavage	0, 0.5, 5, and 10 mg/kg of fruquintinib [c] 2.5 mg/kg of diazepam [d]	M/10; F/10	Fruquintinib had no effect on motor activity, behavior or co-ordination in mice (Irwin's behavior grading test and pole-climbing test)	NMPA GLP	[redacted]49PB1	4.2.1.3-3
Cardiovascular, respiratory	Dog/Beagle	Oral gavage	0, 0.085, 0.17, and 0.34 mg/kg of fruquintinib [c]	M/3; F/3	Fruquintinib had no effect on the respiratory and cardiovascular systems of anesthetized dogs	NMPA GLP	[redacted]49PH1	4.2.1.3-4
Cardiovascular	Dog/Beagle	Oral capsule	0, 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg qd for 4 weeks	M/3; F/3	No fruquintinib-related effects were noted on ECG measurements	NMPA GLP	[redacted]49RD2	4.2.3.2-4
Cardiovascular, respiratory, central nervous system	Dog/Beagle	Oral capsule	0, 0.03, 0.06, and 0.12 mg/kg qd for 13 weeks	M/5; F/5	No fruquintinib-related effects were noted on ECG measurements, blood pressure, respiration rate, pulse oximetry, and neurological examination	US FDA, OECD, NMPA GLP	8449374	4.2.3.2-5
Cardiovascular	Dog/Beagle	Oral capsule	0, 0.01, 0.03, 0.1/0.06 mg/kg (dose level decreased from Day 15), 0.2/0.12 mg/kg (dose level decreased from Day 15) qd for 39 weeks	M/5; F/5 (M/2 and F/2, week 13; M/2 and F/2, week 39; M/1 and F/1, recovery)	Decreased heart rate in males in the 0.2/0.12 mg/kg dose group on Day 273. No fruquintinib related effects were noted on ECG measurement.	NMPA GLP	[redacted]54RD2	4.2.3.2-6

CHO: Chinese hamster ovary; F: female; FDA: Food and Drug Administration; GLP: Good Laboratory Practice; hERG: human *ether-à-go-go*-related gene; IC_{50}: half maximal inhibitory concentration; ICR: Institute of Cancer Research; M: male; M11: metabolite of fruquintinib (also coded HM5025423); NMPA: China's National Medical Products Administration; NA: not applicable; OECD: Organization for Economic Co-operation and Development; qd: once daily; US: United States.

[a] Batch number of fruquintinib used was [redacted].
[b] Batch number of M11 used was [redacted].
[c] Batch number of fruquintinib used was [redacted].
[d] Reference Compound.

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
Evaluation of antitumor activity of fruquintinib in combination with the EGFR inhibitors gefitinib or theliatinib in multiple subcutaneous xenograft models derived from NSCLC cell lines	Mouse/BALB/c nude Xenograft models bearing tumors from: PC-9 (human lung adenocarcinoma)	Oral gavage	PC-9 model: fruquintinib 2 mg/kg, gefitinib 5 mg/kg, fruquintinib /gefitinib combination 2/5 mg/kg, qd for 32 days	PC-9 model: F: Up to 16/group	PC-9 model: TGI of 58.3%, 63.3% and 100.4% for fruquintinib, gefitinib and the combination, respectively.	Oncology 20[redacted]-013-01	4.2.1.4-1
	NCI-H3255 (human lung adenocarcinoma)		NCI-H3255 model: fruquintinib 2 mg/kg, gefitinib 1 mg/kg, or fruquintinib/gefitinib combination 2/1 mg/kg, qd for 49 days	NCI-H3255 model: F:7/group	NCI-H3255 model: TGI of 79.8%, 62.4% and 91.1% for fruquintinib, gefitinib and the combination, respectively.		
	NCI-H292 (human mucoepidermoid pulmonary carcinoma)		NCI-H292 model: fruquintinib 2 mg/kg, theliatinib 15 mg/kg fruquintinib /theliatinib combination 2/15 mg/kg, qd for 21 days	NCI-H292 model: F:7/group	NCI-H292 model: TGI of 48.7%, 63.5% and 98.7% for fruquintinib, theliatinib, and the combination, respectively.		

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
Evaluation of antitumor activity of fruquintinib in combination with the cMET inhibitor savolitinib in a NSCLC subcutaneous xenograft model	Mouse/BALB/c nude Xenograft models bearing tumors from NCI-H1993 (human lung adenocarcinoma) carrying MET gene amplification	Oral gavage	2 mg/kg of fruquintinib qd for 21 days, 30 mg/kg of savolitinib qd for 21 days, Combination of fruquintinib and savolitinib 2/30 mg/kg qd for 21 days	F:8/group	TGIs of 53.9% or 58.5% for fruquintinib or savolitinib, respectively, when dosed as monotherapy. Fruquintinib in combination with savolitinib produced antitumor efficacy with a TGI of 94.6% ($P < .01$ versus fruquintinib or savolitinib alone).	Oncology-20[redacted]-013-02	4.2.1.4-2
Evaluation of antitumor activity of fruquintinib in combination with an anti- PD-L1 in a murine CT26.WT syngeneic tumor model	Mouse/BALB/c / syngeneic models bearing tumors from CT26.WT (Colon carcinoma cells)	Oral gavage [a]	5 mg/kg of vehicle- IgG 2b isotype [b] biw for 2 weeks, 5 mg/kg of fruquintinib qd for 14 days, 5 mg/kg of anti-PD- L1 biw for 2 weeks, 5/5 mg/kg of fruquintinib/ Anti-PD-L1 combination qd for 14 days/biw for 2 weeks	F:15/group	TGIs of 37.5% or 42.6% fruquintinib, or a mouse anti-PD-L1 antibody respectively. Fruquintinib in combination with a mouse anti-PD-L1 produced antitumor efficacy with a TGI of 77.8%.	Oncology-20[redacted]-013-03	4.2.1.4-3

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
Antitumor activity of fruquintinib in combination with anti-PD-1 antibody or chemotherapies in murine colon cancer CT26.WT model	Mouse/BALB/c syngeneic models bearing tumors from CT26.WT (Colon carcinoma cells)	Oral gavage [a]	Fruquintinib monotherapy: 2 mg/kg Anti-PD-1 monotherapy: 10 mg/kg Fruquintinib/anti-PD-1 combination: 2 + 10 mg/kg Irinotecan/fluorouracil: 5/50 mg/kg Fruquintinib and irinotecan/fluorouracil: 2 + 5/50 mg/kg Oxaliplatin/ fluorouracil: 4/50 mg/kg Fruquintinib and oxaliplatin/ fluorouracil: 2 + 4/50 mg/kg	Fruquintinib monotherapy: F:14 Anti-PD-1 monotherapy: F:14 Fruquintinib/anti PD-1 combination: F:14 Irinotecan/fluorouracil: F:14 Fruquintinib and irinotecan/fluorouracil: F:14 Oxaliplatin/ fluorouracil: F:7 Fruquintinib and oxaliplatin/ fluorouracil: F:7	Fruquintinib at 2 mg/kg, an anti- PD-1 antibody at 10 mg/kg when dosed as monotherapy or the chemotherapies (irinotecan/fluorouracil in combination) displayed moderate tumor growth inhibition with TGIs of 48.2%, 37.1% and 30.9% on Day18 post-treatments, respectively. The fruquintinib/anti-PD-1 antibody combination treatment resulted in a TGI of 74.8% ($P < .05$ versus either monotherapy), and the combination treatment of fruquintinib and irinotecan/fluorouracil displayed a TGI of 65.5% ($P < .01$ versus irinotecan/fluorouracil). Fruquintinib at 2 mg/kg, when dosed as monotherapy or the chemotherapies (oxaliplatin/fluorouracil in combination) displayed moderate tumor growth inhibition with TGIs of 50.5% and 59.3% on Day 13 respectively. The combination treatment of fruquintinib and oxaliplatin/fluorouracil achieved a TGI of 80.7% ($P < .05$ versus either monotherapy).	HTM-20[redacted]-013-01	4.2.1.4-4

2.6.3 薬理試験概要表（続き）

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	添付資料番号
				TME biomarker analysis: F:8	Fruquintinib alone and its combination with an anti-PD-1 antibody strongly inhibited the blood vessel marker CD31 expression, but increased α-SMA^{+}CD31^{+} double stained pericytes coverage of tumor vascular, indicating anti-angiogenesis and vascular normalization effects. In addition, fruquintinib with or without anti-PD-1 antibody significantly decreased CD206 $^{+}$ (biomarker of M2 tumor-associated macrophages) cell infiltration in tumor tissues. Anti-PD-1 antibody alone or its combination with fruquintinib exhibited a trend of increased CD8 $^{+}$ T-cells infiltration.		

α-SMA: alpha smooth muscle actin; Anti-PD-1: anti-programmed cell death-1; Anti-PD-L1: anti-programmed cell death-1 ligand; biw: twice weekly; CD206: cluster of differentiation 206; CD31: cluster of differentiation 31; CD8: cluster of differentiation 8; EGFR: epidermal growth factor receptor; F: female; ip: intraperitoneal; iv: intravenous; MET: hepatocyte growth factor receptor; NSCLC: non-small cell lung cancer; qd: once daily; TGI: tumor growth inhibition; TME: tumor microenvironment.

[a] The other products were administered either intravenously or by intraperitoneal injection.

[b] Reference Compound