## 第 2 部 CTD の概要

| | |
|---|---|
| | |
| **JAN あるいは販売名：** | ゾンゲルチニブ |
| **剤形・含量：** | フィルムコート錠・60 mg |
| **文書名：** | 2.6.1 緒言 |
| **文書作成日：** | 5 January 2025 |



**Proprietary confidential information**
**© 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved.**
This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

# 目　次

目　次 ..... 2
1.　緒　言 ..... 3

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

# 1. 緒 言

ゾンゲルチニブ（Boehringer Ingelheim コード番号：BI 1810631）は，上皮成長因子受容体（ERBB1/EGFR）野生型（WT）を阻害しない新規のヒト上皮成長因子受容体 2（ERBB2/HER2）阻害剤であり，HER2 WT 及びエクソン 20 挿入変異を含むすべての主要な変異型 HER2 に対する強力な阻害活性を有する。

ゾンゲルチニブの化学構造式を図 1: 1 に示す。

ゾンゲルチニブの化学名は *N*-[1-(8-{3-メチル-4-[(1-メチル-1*H*-1,3-ベンズイミダゾール-5-イル)オキシ]アニリノ}ピリミド[5,4-*d*]ピリミジン-2-イル)ピペリジン-4-イル]プロパ-2-エナミドであり，分子量は 535.6 である。

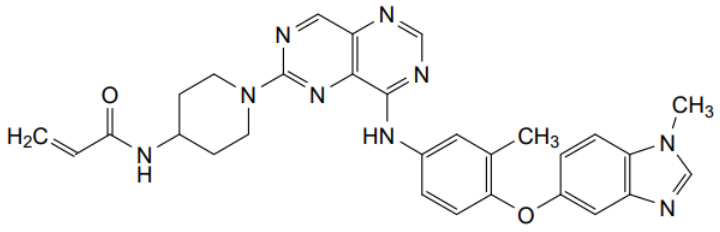


**図 1: 1 ゾンゲルチニブの化学構造式**

本申請で予定している効能・効果及び用法・用量は［CTD 1.8］に記載する。

## 第 2 部 CTD の概要

| | |
|---|---|
| | |
| **JAN あるいは販売名：** | ゾンゲルチニブ |
| **剤形・含量：** | フィルムコート錠・60 mg |
| **文書名：** | 2.6.2 薬理試験の概要文 |
| **文書作成日：** | 23 July 2025 |



**Proprietary confidential information**
**© 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved.**
This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

# 目　次

目　次 ..... 2
略号一覧表 ..... 3
1. まとめ ..... 4
2. 効力を裏付ける試験 ..... 6
3. 副次的薬理試験 ..... 21
4. 安全性薬理試験 ..... 22
5. 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 26
6. 考察及び結論 ..... 27
7. 図表 ..... 28
8. 参考文献 ..... 29

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 略号一覧表

| | | |
|---|---|---|
| b.i.d. | bis in die, twice daily | 1 日 2 回 |
| CDX | cell line-derived xenograft | 細胞株由来異種移植 |
| $C_{max}$ | maximum concentration in plasma | 最高血漿中濃度 |
| $C_{max,ss}$ | maximum concentration in plasma at steady state | 定常状態における最高血漿中濃度 |
| CNS | central nervous system | 中枢神経系 |
| COSMIC | Catalogue of Somatic Mutations in Cancer | - |
| DUSP6 | dual-specificity phosphatase 6 | 二重特異性ホスファターゼ-6 |
| ECD | extra cellular domain | 細胞外ドメイン |
| EGFR | epidermal growth factor receptor | 上皮成長因子受容体 |
| ERBB | erythroblastic leukaemia oncogene B | - |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase | 細胞外シグナル調節キナーゼ |
| 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 |
| GPCR | G protein-coupled receptor | G タンパク質共役受容体 |
| HER2 | human epidermal growth factor receptor 2 | ヒト上皮成長因子受容体 2 |
| hERG | human ether-a-go-go related gene | ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 |
| HH3 | histone H3 | ヒストン H3 |
| $IC_{50}$ | 50% inhibitory concentration | 50%阻害濃度 |
| ICH | International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use | 医薬品規制調和国際会議 |
| IL | interleukin | インターロイキン |
| KRAS | Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog | - |
| LV $dP/dt_{max}$ | maximum rate of rise of left ventricular pressure | 左室圧最大増加率 |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase | - |
| PD | pharmacodynamic | 薬力学 |
| PDX | patient-derived xenograft | 患者由来異種移植 |
| pERK | phosphorylated extracellular signal-regulated kinase | リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ |
| q.d. | quaque die, once daily | 1 日 1 回 |
| SD | standard deviation | 標準偏差 |
| SNV | single nucleotide variant | 単一塩基変異 |
| TGI | tumor growth inhibition | 腫瘍増殖抑制 |
| TKD | tyrosine kinase domain | チロシンキナーゼドメイン |
| WT | wild type | 野生型 |

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 1. まとめ

ゾンゲルチニブは，上皮成長因子受容体（erythroblastic leukaemia oncogene B［ERBB］1/EGFR）野生型（WT）を阻害しない，経口投与可能な新規の共有結合性選択的ヒト上皮成長因子受容体 2（ERBB2/HER2）チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）であり，HER2 WT 及びエクソン 20 挿入変異を含むすべての主要な変異型 HER2 に対する強力な阻害活性を有する。

HER2 は, EGFR を含む ERBB 受容体チロシンキナーゼファミリーに属する受容体である。HER2 のリガンドは同定されていないが，HER2 が他の ERBB ファミリー分子と二量体を形成することにより下流のシグナル伝達が開始され，細胞の増殖が促進され，生存も維持される［CTD 4.3-1_R20-1872，CTD 4.3-2_R09-6185，CTD 4.3-3_R20-1990］。HER2 の変異は，下流のシグナルの過剰な活性化を引き起こし，その結果，過剰な細胞増殖，アポトーシスの阻害，並びに腫瘍の増殖，浸潤及び転移が亢進される。種々のがん種において，HER2 を恒常的に活性化させるチロシンキナーゼドメイン（TKD）の変異が認められる。非小細胞肺癌（NSCLC）では，2%～4%の患者に HER2 の変異が認められ，そのうち約半数は TKD の変異であり，特にエクソン 20 挿入変異が多いことが報告されている［CTD 4.3-4_P13-05288，CTD 4.3-5_P19-09678］。

ゾンゲルチニブの効力を裏付ける試験を *in vitro* 及び *in vivo* で実施した。*In vitro* 試験ではゾンゲルチニブのキナーゼ阻害作用，がん細胞に対する増殖抑制作用を評価するとともに，薬力学的作用を反映するバイオマーカー（薬力学［PD］バイオマーカー）の変化を評価した。*In vivo* 試験では，肺がんの異種移植モデルマウスを用いて，腫瘍増殖抑制作用を検証するとともに，PD バイオマーカーの変化を評価した。

*In vitro* 分子キナーゼアッセイにおいて，ゾンゲルチニブの HER2 に対する選択的なキナーゼ阻害作用が認められた。HER2 バリアントを発現させた NIH 3T3 マウス線維芽細胞を用いたフォーカス形成アッセイにおいて HER2 の変異により細胞の形質が変化することが確認された。また，NIH 3T3 細胞において形質転換能が認められた HER2 バリアントを発現させた Ba/F3 細胞を用いた細胞増殖アッセイにおいてゾンゲルチニブの増殖抑制作用が示された。さらに，がん細胞株を用いた試験において，ゾンゲルチニブは，HER2 の増幅又は変異を有する細胞の増殖を強力かつ選択的に抑制したが，EGFR WT の増幅を有する細胞の増殖を抑制しなかった。HER2 変異を有するがん細胞をゾンゲルチニブで短時間処理後，標的結合の直接的バイオマーカーであるリン酸化 HER2，並びに間接的バイオマーカーであるリン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ（pERK）及び二重特異性ホスファターゼ-6（DUSP6）を測定した結果，用量依存的な減少が認められた。

HER2 エクソン 20 変異を有する肺がん細胞株由来異種移植（CDX）モデルマウス，HER2 増幅を有する NCI-N87 胃がん CDX モデルマウス及び/又は HER2 エクソン 20 変異を有する肺がん患者由来異種移植（PDX）モデルマウスを用いた *in vivo* 試験において，ゾンゲルチニブは腫瘍増殖抑制作用を示し，腫瘍サンプル中の pERK 及び DUSP6 発現量が減少した。また，ゾンゲルチニブを投与したマウスでは，試験したすべての用量で忍容性が認められた。

副次的薬理試験として，G タンパク質共役受容体（GPCR），核内ホルモン受容体，トランスポーター，イオンチャネル及び酵素とのオフターゲット相互作用を，受容体リガンド結合アッセイ

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

及び酵素に対するアッセイを用いて評価した。その結果，ゾンゲルチニブが 50%以上の阻害活性を示した標的は 5 種類であった。

ゾンゲルチニブの安全性薬理試験として，*in vitro* 試験，並びにラット及びイヌを用いた *in vivo* 試験を実施した。その結果，中枢神経系（CNS）機能，心血管系機能，呼吸系機能，並びに胃腸管，腎/泌尿器及び肝臓の機能に対して，ゾンゲルチニブ投与に関連する影響は認められなかった。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 2. 効力を裏付ける試験

### 2.1 *In vitro* 試験

#### 2.1.1 キナーゼ阻害作用

SelectScreen®キナーゼプロファイリング（Thermo Fisher Scientific）により，397 種類のヒトキナーゼに対するゾンゲルチニブの阻害作用を評価した。1 μmol/L の濃度で 55%を上回る阻害を示したキナーゼに対するゾンゲルチニブのキナーゼ阻害作用の 50%阻害濃度（$IC_{50}$）を表 2.1.1: 1 に示す［CTD 4.2.1.1-01_n00280432］。これらの分子アッセイの条件下において，HER2 に対する $IC_{50}$ 値（8 nmol/L）は，EGFR に対する $IC_{50}$ 値（410 nmol/L）の約 1/50 倍であった。このことから，ゾンゲルチニブの EGFR WT に対する阻害活性は弱く，ゾンゲルチニブが HER2 を選択的に阻害することが示された。

表 2.1.1: 1 ゾンゲルチニブにより阻害されるキナーゼに対する $IC_{50}$ 値

| Kinase | $IC_{50}$ [nmol/L] |
|---|---|
| ERBB2 (HER2) | 8 |
| ERBB4 (HER4) | 49 |
| RIPK3 | 98 |
| CDK11 (inactive) | 157 |
| BMX | 170 |
| EGFR | 410 |
| CDK8 Cyclin C | 437 |
| CDK11 Cyclin C | 748 |

BMX: bone marrow kinase on chromosome X, CDK: cyclin-dependent kinase, EGFR: epidermal growth factor receptor, HER2: human epidermal growth factor receptor 2, HER4: human epidermal growth factor receptor 4, $IC_{50}$: 50% inhibitory concentration, RIPK3: receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3

#### 2.1.2 腫瘍形成との関連が報告されている種々の HER2 バリアントの形質転換能，及びゾンゲルチニブによる HER2 バリアントを発現する細胞の増殖抑制能の評価

HER2 をコードする ERBB2 遺伝子の様々な異常が複数のがんで同定されている。これらの異常には，コーディング領域の変異，遺伝子のコピー数が増える増幅及びまれにその他の異常が含まれる。HER2 の活性化に関与する変異として，細胞外ドメイン（ECD）の変異や TKD の一部をコードするエクソン 20 の挿入/重複変異などが知られているが，がん患者で見つかったすべての単一塩基変異（SNV）や挿入/重複変異が HER2 を活性化するわけではない。そのため，Catalogue of Somatic Mutations in Cancer（COSMIC）データベースから選択した臨床的に腫瘍形成との関連が報告されている HER2 バリアントを発現させた細胞株を用い，HER2 の変異が細胞に与える影響を評価した。また，腫瘍形成能を有することが示された HER2 バリアントを発現させた細胞株を用いて，ゾンゲルチニブの細胞増殖抑制作用を評価した［CTD 4.2.1.1-02_VV-NC-108532, CTD 4.2.1.1-03_n00283036］。

##### 2.1.2.1 HER2 変異の腫瘍形成能の評価

HER2 WT 又は 181 種類の HER2 バリアントを発現させた NIH 3T3 マウス線維芽細胞を用いて，古典的な *in vitro* 腫瘍形成の評価系であるフォーカス形成アッセイを実施した。細胞の形質転換

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

は，培養プレート内の細胞の形態と数に基づいて評価し，次の 4 つのグループに分類した。1：形質転換した細胞が観察されなかった（腫瘍形成能なし），2：形質転換した細胞が部分的に観察された（軽度の腫瘍形成能），3：広範に形質転換した細胞が束になって積み上がっている（中等度の腫瘍形成能），4：丸型で基質への接着性のない細胞が広範に観察された（強度の腫瘍形成能）。腫瘍形成能を有する EGFR バリアント又は Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog（KRAS）バリアントを発現する細胞を陽性対照とした。HER2 WT 及び変異を有する HER2 バリアントを発現する細胞の約 93%が中等度（約 78%）又は強い（約 15%）腫瘍形成能を示した。このアッセイで評価したバリアントの約 7%は腫瘍形成能を示さない又は弱い腫瘍形成能を示した。

本アッセイの結果，ECD，トランスメンブレンドメイン（TMD），ジャクスタメンブレンドメイン（JMD），TKD，及び構造化されていない C 末端部分を含む ERBB2 のコーディング領域のあらゆる部位の変異で HER2 の活性化及び形質転換が認められた。変異の種類としては SNV 及び下記に示すエクソン 20 挿入/重複変異が含まれていた：M774_A775insAYVM，A775_G776insA，A775_G776insVA，G776_V777insVC，G776_V777insVGC，G776_V777insL，V777_S779dup，V777_G778insCG，G778_P780dup，G778_S779insLPG，G778_S779insLPS，P780_Y781insGSP 及び A771_Y772insYVMA = Y772_A775dup。

さらに，COSMIC データベースから選択した 8 つの HER2 バリアント（R34W，G743V，L755F，R756S，K762N，G776A，E698_P699insLL 及び R849W）を発現させた NIH 3T3 細胞を作製し，フォーカス形成アッセイを用いて腫瘍形成能を評価した。その結果，R34W，R756S，K762N，G776A 及び E698_P699insLL では NIH 3T3 細胞の形質転換が生じたが，G743V，L755F 及び R849W では形質転換が生じなかった［CTD 4.2.1.1-02_VV-NC-108532］。

これらの結果は，がん患者で見つかる HER2 変異の多くが悪性腫瘍の発生に関連するという概念に一致するものであった。

### 2.1.2.2 Ba/F3 細胞におけるゾンゲルチニブの増殖抑制作用

ゾンゲルチニブの HER2 変異依存的な細胞増殖に対する抑制プロファイルを，Ba/F3 細胞を用いたハイスループットスクリーニングアッセイ（mixed-all-nominated-mutants-in-one method［MANO］法）を用いて評価した［CTD 4.2.1.1-02_VV-NC-108532］。上記の実験（2.1.2.1 項）で，NIH 3T3 細胞における形質転換能が認められた HER2 バリアントを発現させた Ba/F3 細胞をゾンゲルチニブの存在下又は非存在下で 5 日間培養し，細胞増殖を評価した。なお，Ba/F3 細胞はインターロイキン（IL）-3 依存的な増殖を示すことから，HER2 シグナルのみに依存する細胞増殖に対する抑制作用を評価するために，アッセイは IL-3 非存在下で実施した。その結果，HER2 バリアントを発現させた細胞は増殖し，その増殖はゾンゲルチニブにより抑制された。ゾンゲルチニブは，本アッセイにおいて，腫瘍形成能を有する EGFR バリアント又は KRAS バリアントを発現する Ba/F3 細胞の増殖を抑制しない又は弱い抑制であった。発現させた様々な HER2 バリアントによる細胞増殖に対するゾンゲルチニブの $IC_{50}$ 値はすべて 44 nmol/L 以下であった。評価した HER2 バリアントには，肺がん患者で最も頻繁に見つかる挿入変異である HER2 A775_G776insYVMA などの分子標的治療が確立されていない HER2 エクソン 20 挿入変異が含まれる。また，ECD の変異であ

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

る S310F 及び S310Y のように，TKD 以外のドメインに変異を有する HER2 を発現する細胞に対しても，ゾンゲルチニブの細胞増殖抑制作用が認められた。

同様に，腫瘍形成能を有する 5 種類の HER2 バリアント（R34W，R756S，K762N，G776A 及び E698_P699insLL）を発現させた Ba/F3 細胞でも，ゾンゲルチニブの細胞増殖抑制作用を評価した。その結果，ゾンゲルチニブは R34W，R756S，K762N，G776A 及び E698_P699insLL を発現する細胞に対しても増殖抑制を示した。

これらの結果から，ゾンゲルチニブは ERBB2 のコーディング領域のあらゆる部位の HER2 変異による細胞増殖に対する抑制作用を有することが示された。

さらに，ゾンゲルチニブの HER2 阻害作用の感度を確認するため，HER2 のエクソン 8，17，18，19，20，21 及び 23 に変異を有する Ba/F3 細胞を用いて増殖アッセイを実施し，細胞増殖に対するゾンゲルチニブの抑制作用を評価した。様々な濃度のゾンゲルチニブの存在下又は非存在下で EGFR WT，HER2 WT 又は HER2 バリアントを発現させた Ba/F3 細胞を 3 日間培養し，細胞の増殖を CellTiter-Glo®（Promega）により測定した。なお，Ba/F3 細胞は IL-3 依存的な増殖を示すことから，HER2 シグナルのみに依存する細胞増殖に対する抑制作用を評価するため，アッセイは IL-3 非存在下で実施した。細胞増殖に対するゾンゲルチニブの抑制作用の $IC_{50}$ 値は，個々のアッセイから得られた幾何平均値であり，アッセイに用いた EGFR 及び HER2 バリアントそれぞれの用量反応曲線から算出した（表 2.1.1: 1）。その結果，HER2 を発現させた細胞の増殖に対する抑制作用の $IC_{50}$ 値は 25 nmol/L 以下であり，EGFR WT を発現させた Ba/F3 細胞の増殖に対する抑制作用の $IC_{50}$ 値は約 1.5 µmol/L であった［CTD 4.2.1.1-03_n00283036］。このことから，細胞系においてゾンゲルチニブが HER2 を高感度かつ選択的に抑制することが示された。

表 2.1.2.2: 1　　Ba/F3 細胞増殖アッセイにおけるゾンゲルチニブの抑制作用

| Ba/F3 cell line | Exon | $IC_{50}$ [nmol/L][1)] |
|---|---|---|
| Empty vector (IL-3-dependent) | not applicable | 2185 |
| EGFR WT (EGF-dependent) | not applicable | 1541 |
| HER2 WT | not applicable | 7 |
| HER2 S310F | 8 | 4 |
| HER2 S310Y | 8 | 2 |
| HER2 S335C | 8 | 4 |
| HER2 V659D | 17 | 2 |
| HER2 G660D | 17 | 3 |
| HER2 V697L | 18 | 3 |
| HER2 G727A | 18 | 1 |

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

表 2.1.2.2: 1　　Ba/F3 細胞増殖アッセイにおけるゾンゲルチニブの抑制作用（続き）

| Ba/F3 cell line | Exon | $IC_{50}$ [nmol/L][1)] |
|---|---|---|
| HER2 T733I | 18 | 1 |
| HER2 L755A | 19 | 9 |
| HER2 L755P | 19 | 25 |
| HER2 I767M | 19 | 2 |
| HER2 D769H | 19 | 1 |
| HER2 D769Y | 19 | 4 |
| HER2 A775_G776insYVMA | 20 | 16 |
| HER2 A775_G776insVVMA | 20 | 7 |
| HER2 A775_G776insSVMA | 20 | 3 |
| HER2 G776delinsVC | 20 | 15 |
| HER2 G776V | 20 | 1 |
| HER2 G776delinsVV | 20 | 11 |
| HER2 G776delinsLC | 20 | 4 |
| HER2 G776delinsAVGC | 20 | 4 |
| HER2 G776S_V777_G778insE | 20 | 5 |
| HER2 V777L | 20 | 1 |
| HER2 V777_G778insCG | 20 | 1 |
| HER2 G778_S779insCPG | 20 | 3 |
| HER2 P780_Y781insGSP | 20 | 3 |
| HER2 V842I | 21 | 7 |
| HER2 T862A | 21 | 11 |
| HER2 L869R | 21 | 2 |
| HER2 R929W | 23 | 4 |

1)　$IC_{50}$ values derived from CellTiter-Glo® assays of a panel of Ba/F3 cell expressing HER2 variants
EGF: epidermal growth factor, EGFR: epidermal growth factor receptor, HER2: human epidermal growth factor receptor 2, $IC_{50}$: 50% inhibitory concentration, IL: interleukin, ins: insertion, WT: wild type

### 2.1.3　　*In vitro* におけるがん細胞増殖抑制作用

EGFR WT 又は HER2 WT の増幅を有するがん細胞，並びに HER2 の変異を有するがん細胞を用いて，ゾンゲルチニブの細胞増殖抑制作用を評価した。様々ながん種由来の細胞株を，様々な濃度のゾンゲルチニブの存在下又は非存在下で 3 日間培養し，CellTiter-Glo®（Promega）によりがん細胞の増殖に対するゾンゲルチニブの抑制作用を評価した。$IC_{50}$ 値は個々のアッセイから得られた幾何平均値であり，アッセイに用いた細胞株ごとの用量反応曲線から算出した。ゾンゲルチニブは, EGFR WT の増幅を有する細胞株である A431 の増殖には影響しなかった（$IC_{50}$>5000 nmol/L）。一方，HER2 WT の増幅を有する複数のがん種由来の細胞株では，ゾンゲルチニブによって細胞増殖が強く抑制され，その $IC_{50}$ 値は 6 nmol/L 以下であった（表 2.1.3: 1）。

HER2 の挿入変異である HER2 A775_G776insYVMA による細胞増殖に対するゾンゲルチニブの作用を評価するために，HER2 A775_G776insYVMA バリアントを発現する PC-9_YVMA 細胞及び NCI-H2170_YVMA 細胞を作製した［CTD 4.3-6_P22-06610］。PC-9_YVMA 細胞は，HER2A775_G776insYVMA を過剰発現しており，EGFR del19 のノックアウトにより HER2A775_G776insYVMA 依存的な増殖をするように改変した PC-9 細胞である。また，NCI-H2170_YVMA 細胞は，内因性 HER2 をコードする ERBB2 遺伝子座を HER2 A775_G776insYVMA バリアントを発現するように改変した NCI-H2170 細胞である。ゾンゲルチニブは PC-9_YVMA 及

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

び NCI-H2170_YVMA 細胞の増殖を *in vitro* で抑制し，その $IC_{50}$ 値はそれぞれ 36 及び 33 nmol/L であった。また，ゾンゲルチニブは HER2 エクソン 20 挿入変異を有する肺がん細胞株である NCI-H1781 細胞の増殖を抑制し，その $IC_{50}$ 値は 34 nmol/L であった（表 2.1.3: 1）。EGFR WT の増幅を有する細胞に対する $IC_{50}$ 値は腫瘍形成能を示す HER2 を有する細胞に対する $IC_{50}$ 値より 100 倍高く，ゾンゲルチニブは EGFR WT を抑制しないことが示された［CTD 4.2.1.1-03_n00283036］。

表 2.1.3: 1　　細胞増殖アッセイにおけるゾンゲルチニブの増殖抑制作用

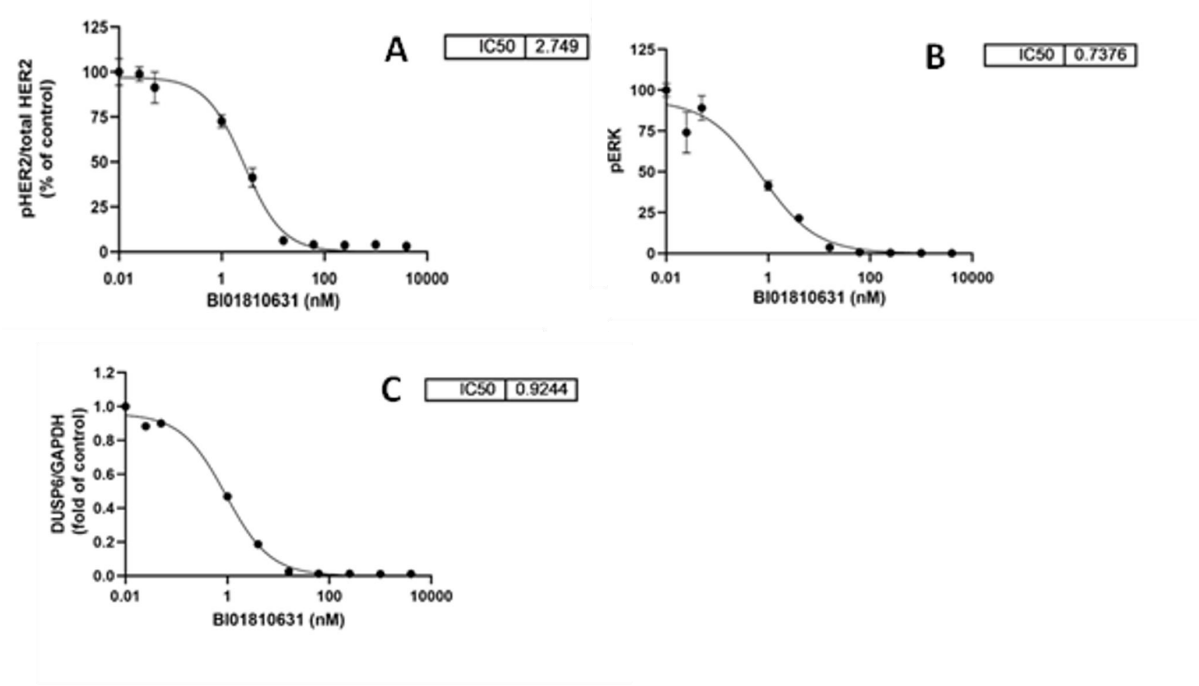
| Cell line | Tumor tissue | ERBB aberration | $IC_{50}$ [nmol/L] 1) |
|---|---|---|---|
| A431 | Epidermis | EGFR WT amplification | >5000 |
| PC-9_YVMA | Lung | HER2 YVMA (ERBB2 A775_G776insYVMA) | 36 |
| NCI-H2170_YVMA | Lung | HER2 YVMA (ERBB2 A775_G776insYVMA) | 33 |
| NCI-H1781 | Lung | HER2 exon20insVC | 34 |
| BT-474 | Breast | HER2 WT amplification | 4 |
| AU565 | Breast | HER2 WT amplification | 6 |
| NCI-N87 | Stomach | HER2 WT amplification | 1 |
| OE19 | Esophagus | HER2 WT amplification | 6 |

1)　$IC_{50}$ values were derived from CellTiter-Glo® assays of compound-treated cancer cell lines carrying HER2 aberrations
EGFR: epidermal growth factor receptor, HER2: human epidermal growth factor receptor 2, $IC_{50}$: 50% inhibitory concentration, ins: insertion, WT: wild type

### 2.1.4　　ゾンゲルチニブによる *in vitro* での薬力学的バイオマーカーの変化

PC-9_YVMA 細胞（2.1.3 項参照）を様々な濃度のゾンゲルチニブの存在下又は非存在下で短時間培養し，PD バイオマーカーの変化を評価した。直接的な HER2 の標的結合のバイオマーカーとして HER2 のリン酸化を，間接的な標的結合のバイオマーカーとして HER2 シグナル伝達の下流エフェクターである pERK 及び DUSP6 を測定した。PC-9_YVMA 細胞をゾンゲルチニブで 2 時間処理したところ，HER2 のリン酸化（$IC_{50}$ 値 : 2.7 nmol/L），pERK（$IC_{50}$ 値 : 0.7 nmol/L）及び DUSP6（$IC_{50}$ 値：0.9 nmol/L）が用量依存的に減少した（図 2.1.4: 1）［CTD 4.2.1.1-03_n00283036］。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies




DUSP6: dual specificity phosphatase 6, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, HER2: human epidermal growth factor receptor 2, $IC_{50}$: 50% inhibitory concentration, nM: nanomolar, pERK: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, pHER2: phosphorylated human epidermal growth factor receptor 2
PC-9_YVMA cells were cultured in dimethyl sulfoxide (DMSO) (vehicle control, non-treated) and treated with increasing concentrations of zongertinib (0.05 to 4000 nM) for 2h. (A) pHER2 and total HER2 protein levels were analysed with the Mesoscale platform. pHER2 data were normalized to total HER2 protein levels, normalized to DMSO and expressed as % of control. (B) pERK and total ERK protein levels were analysed with the Mesoscale platform. pERK data were normalized to total ERK protein levels, normalized to DMSO and expressed as % of control. Data in (A) and (B) are presented as a mean of three technical repeats with standard deviation. (C) *DUSP6* (HER2 effector) and *GAPDH* (endogenous control) mRNA levels were measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Target messenger ribonucleic acid (mRNA) levels were normalized to GAPDH levels and plotted as fold-change relative to vehicle control. The mean of two technical repeats with standard deviation is presented. All $IC_{50}$ values were calculated with Graphpad prism using non-linear regression analysis with variable slope.

図 2.1.4: 1　　PC-9_YVMA 細胞における PD バイオマーカーの変化

## 2.2　*In vivo* 試験

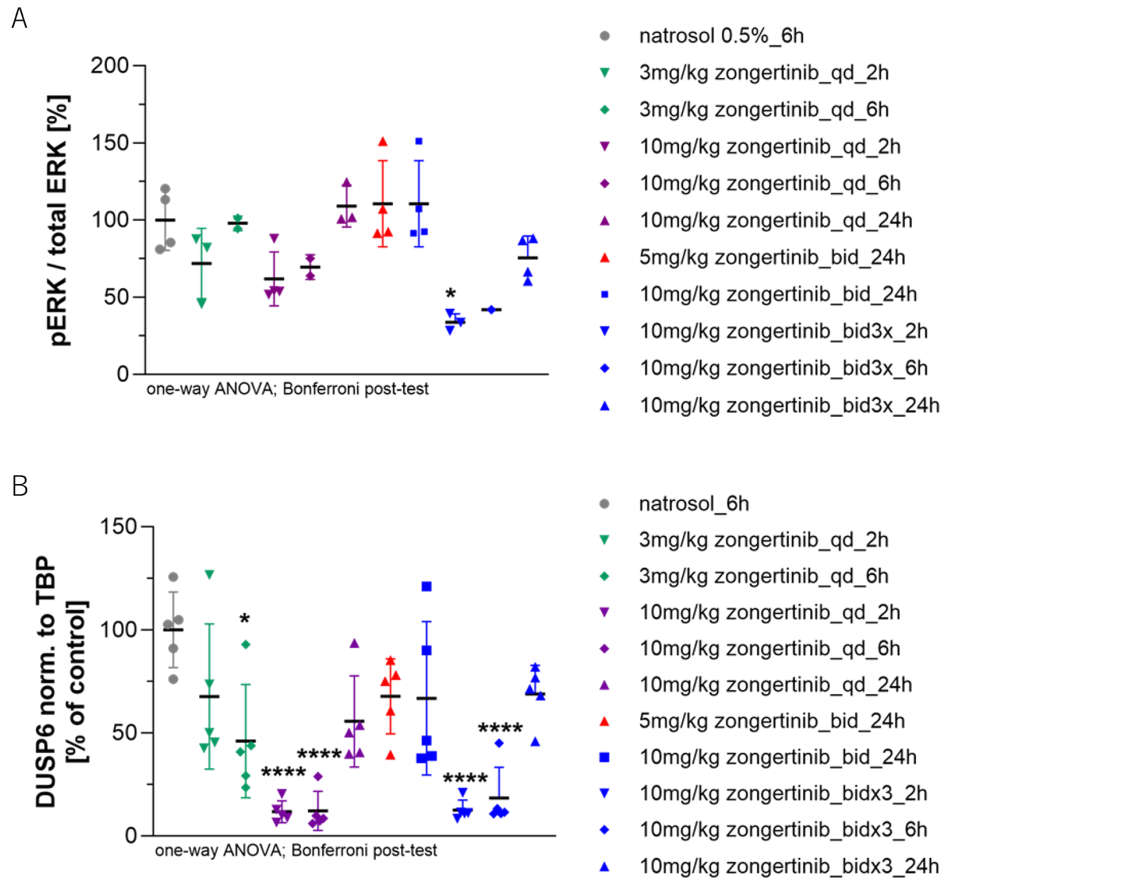
### 2.2.1　HER2 エクソン 20 変異を有する肺がん細胞株由来異種移植モデルにおけるゾンゲルチニブ投与による PD バイオマーカーの変化

HER2 エクソン 20 変異を有する PC-9_YVMA 細胞（2.1.3 項参照）を用いた CDX モデルマウスにゾンゲルチニブを投与したときの PD バイオマーカーの変化を評価した。PC-9_YVMA 細胞を皮下に移植した NMRI-Foxn1$^{nu}$ マウスにゾンゲルチニブを 3，5 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回，若しくは 1 日 2 回で 1 又は 3 日間，単回又は反復強制経口投与した。溶媒対照群には 0.5%ヒドロキシエチルセルロースを投与した。投与後 2，6 及び 24 時間に，腫瘍サンプルを採取し，細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）及び DUSP6 を測定した。また，Meso Scale Discovery（MSD）免疫アッセイを用いて，腫瘍サンプル中の pERK 量及び総 ERK 量を測定し，その比により，mitogen-

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

activated protein kinase（MAPK）経路の活性度を評価した（図 2.2.1: 1 A）。さらに，Quantigene アッセイを用いて pERK の下流のマーカーである DUSP6 の遺伝子発現量を測定した（図 2.2.1: 1 B）。いずれの投与群においても，溶媒対照群と比較して，ゾンゲルチニブ投与後 2 及び 6 時間に pERK の減少傾向がみられ，DUSP6 発現量の有意な減少が認められた。このことから，ゾンゲルチニブ投与により MAPK 経路が強く抑制されることが示唆された。また，10 mg/kg 群では，1 日 1 回及び 1 日 2 回投与のいずれにおいても，投与後 24 時間に pERK 及び DUSP6 発現量の回復が認められた［CTD 4.2.1.1-04_n00280498］。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies




ANOVA: analysis of variance, b.i.d: bis in die (twice daily), DUSP6: dual-specificity phosphatase 6, ERK: extracellular signal-regulated kinase, h: hour, pERK: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, q.d.: quaque die (once daily), TBP: TATA-box binding protein
Analysis of the HER2 downstream effectors pERK (A) and *DUSP6* (B) in the zongertinib-treated, HER2-exon20 mutant PC-9_YVMA xenograft model: Tumour-bearing mice were treated with vehicle or zongertinib at indicated doses either for 1 day (q.d. or b.i.d.) or for 3 consecutive days (b.i.d. x3). Samples were collected at the indicated time points. Activation of ERK was determined by Meso Scale Discovery (MSD) immunoassay and *DUSP6* gene expression by Quantigene assay. Mean values and standard deviation (SD) are plotted derived from individual values per group. Statistical analysis (*treatment versus control; one-way ANOVA and Bonferroni post-test) was conducted with Graphpad Prism 8. *p<0.05, ****p<0.0001.

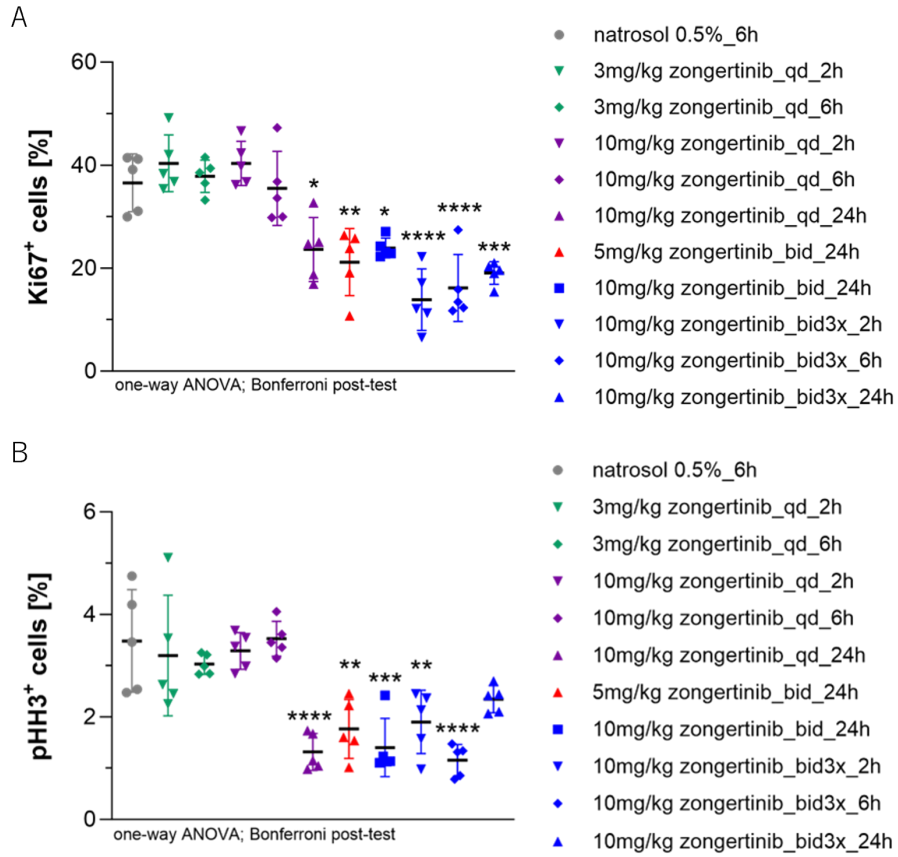
図 2.2.1: 1　HER2 エクソン 20 変異を有する PC-9_YVMA 肺がん細胞株由来異種移植モデルマウスにおけるゾンゲルチニブ投与による PD バイオマーカーの変化

上記の試験で使用した PC-9_YVMA 細胞を皮下に移植した NMRI-Foxn1$^{nu}$ マウスにおいてゾンゲルチニブ投与後の腫瘍の増殖を，細胞増殖マーカーである Ki67 及びリン酸化ヒストン H3（HH3）の陽性細胞数を指標に免疫組織化学より評価した（図 2.2.1: 2）。ゾンゲルチニブを 10 mg/kg の用量で，1 日 1 回又は 1 日 2 回，強制経口投与したとき，単回投与後 24 時間における Ki67 陽性細胞及びリン酸化 HH3 陽性細胞の割合は，溶媒対照群ではそれぞれ約 40%及び約 4%であったが，10 mg/kg 群ではそれぞれ約 20%及び約 1.3%と有意に低かった。ゾンゲルチニブを 10 mg/kg の用

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

量で 1 日 2 回，3 日間反復投与したとき，Ki67 及びリン酸化 HH3 陽性細胞の割合はいずれも，溶媒対照群と比較して低かった［CTD 4.2.1.1-04_n00280498］。

以上より，PC-9_YVMA 肺がん CDX モデルマウスにゾンゲルチニブを強制経口投与したとき，ゾンゲルチニブは腫瘍増殖に対して強い抑制作用を示した。




ANOVA: analysis of variance, b.i.d: bis in die (twice daily), h: hour, pHH3: phosphorylated histone H3, q.d.: quaque die (once daily)
Analysis of proliferation markers Ki67 (A) and pHH3 (B) in the zongertinib-treated, HER2-exon20 mutant PC-9_YVMA xenograft model: Tumour-bearing mice were treated with vehicle or zongertinib at indicated doses either for 1 day (q.d. or b.i.d.) or for 3 consecutive days (b.i.d. 3x). Samples were collected at the indicated time points, and Ki67 and pHH3 levels were analyzed by immunohistochemistry. Mean values and standard deviation (SD) are plotted along with the individual values per group. Statistical analysis (*treatment versus control; one-way ANOVA and Bonferroni post-test) was conducted with Graphpad Prism 8. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

図 2.2.1: 2　HER2 エクソン 20 変異を有する PC-9_YVMA 肺がん細胞株由来異種移植モデルマウスにおけるゾンゲルチニブによる腫瘍増殖抑制作用

## 2.2.2　HER2 エクソン 20 変異又は HER2 増幅を有するがん細胞株由来異種移植モデルを用いたゾンゲルチニブの腫瘍増殖抑制作用と投与スケジュールの評価

PC-9_YVMA 細胞を皮下に移植した NMRI-Foxn1$^{nu}$ マウスにゾンゲルチニブを 5，10 及び 20 mg/kg の用量で 1 日 1 回，又は 2.5，5 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 2 回強制経口投与したときの

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

腫瘍の大きさを測定し，腫瘍増殖抑制作用を評価した。なお，腫瘍増殖抑制率（TGI）は 12 日目に評価した。溶媒対照群には 0.5%ヒドロキシエチルセルロースを投与した。さらに，これら 2 つの投与スケジュールにおけるゾンゲルチニブの腫瘍増殖抑制作用を比較した［CTD 4.2.1.1-05_n00294118］。

ゾンゲルチニブは用量依存的に腫瘍の増殖を抑制した（図 2.2.2: 1 A，C，D）。

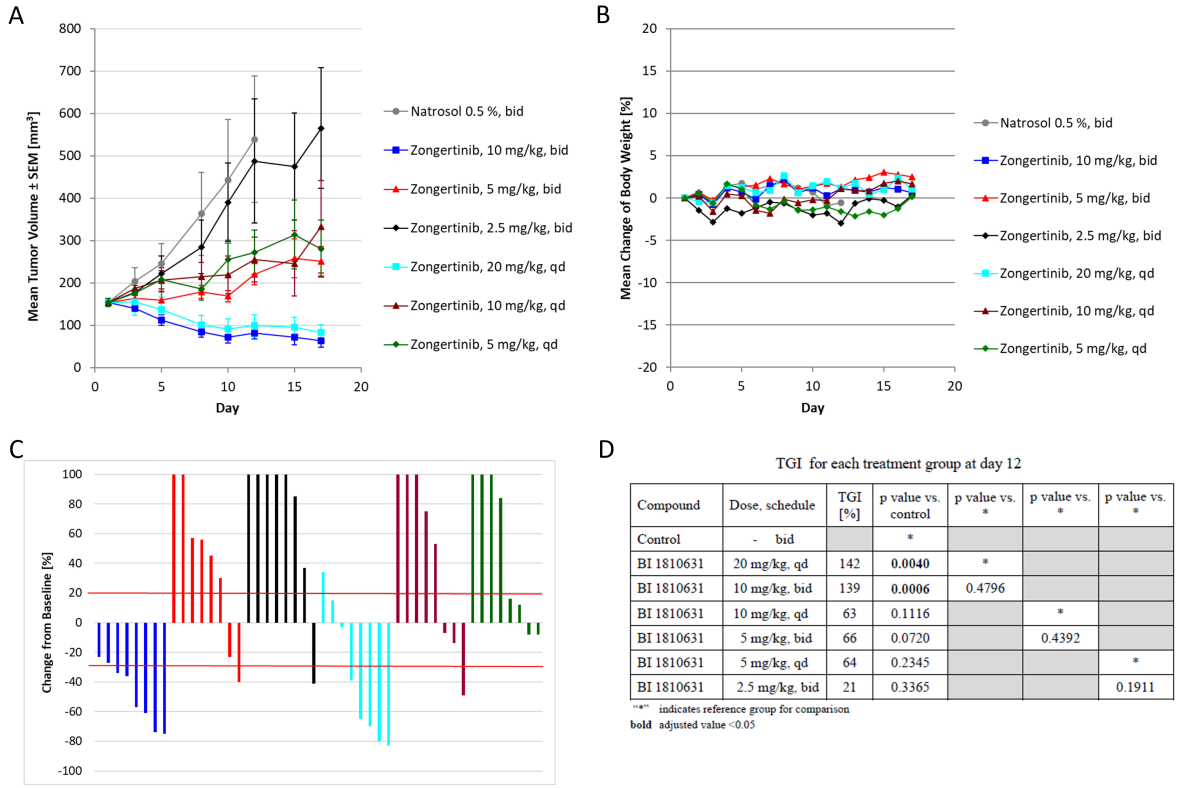
ゾンゲルチニブを 1 日 1 回投与したところ，5，10 及び 20 mg/kg 群のそれぞれ 8 例中 2，3 及び 6 例で腫瘍退縮が認められた。TGI の中央値はそれぞれ 64%，63%及び 142%で，20 mg/kg 群では対照群と比較して腫瘍増殖が有意に抑制された。

ゾンゲルチニブを 1 日 2 回投与したところ，2.5，5 及び 10 mg/kg 群のそれぞれ 8 例中 1，2 及び全例で腫瘍退縮が認められた。TGI の中央値はそれぞれ 21%，66%及び 139%であり，10 mg/kg 群では対照群と比較して腫瘍増殖が有意に抑制された。

1 日 1 回及び 1 日 2 回の投与スケジュール間で腫瘍増殖抑制作用を比較したところ，1 日あたりの投与量が同じ群では同程度の作用を示した。また，評価したすべての用法・用量で良好な忍容性を示し，対照群と比較して，動物の体重増加に統計学的に有意な差はみられなかった（図 2.2.2: 1 B）。

これらの結果から，1 日あたりの総投与量が同じ場合，1 日 1 回投与及び 1 日 2 回投与で腫瘍増殖抑制作用は同程度であることが示唆された。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies




D

TGI for each treatment group at day 12

| Compound | Dose, schedule | TGI [%] | p value vs. control | p value vs. * | p value vs. * | p value vs. * |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | - bid | | * | | | |
| BI 1810631 | 20 mg/kg, qd | 142 | **0.0040** | * | | |
| BI 1810631 | 10 mg/kg, bid | 139 | **0.0006** | 0.4796 | | |
| BI 1810631 | 10 mg/kg, qd | 63 | 0.1116 | | * | |
| BI 1810631 | 5 mg/kg, bid | 66 | 0.0720 | | 0.4392 | |
| BI 1810631 | 5 mg/kg, qd | 64 | 0.2345 | | | * |
| BI 1810631 | 2.5 mg/kg, bid | 21 | 0.3365 | | | 0.1911 |

"*" indicates reference group for comparison
**bold** adjusted value <0.05

BI 1810631: zongertinib, b.i.d: bis in die (twice daily), Control: Natrosol 0.5%, q.d.: quaque die (once daily), SEM: standard error of the mean
Efficacy and dose scheduling in the HER2-exon20 mutant PC-9_YVMA xenograft model comparing two schedules, q.d. versus b.i.d., for three different doses: (A) The growth of PC-9_YVMA tumors, treated with different doses of zongertinib and administered q.d. or b.i.d. as indicated, and (B) relative changes in body weight (in %) were monitored over the course of treatment. (C) The waterfall plot shows treatment-induced changes in tumor growth relative to tumor size at start of treatment (baseline) for each animal of the three dosing groups. The redlines indicate the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) criteria (>20% progressive disease, 20% to -30% stable disease, <-30% partial response, -100% complete response). (D) Summary of TGI values obtained and statistics. One-sided non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon U-tests were applied to compare all treatment groups with the control, as well as the combination therapy group with the corresponding monotherapy groups.

図 2.2.2: 1　HER2 エクソン 20 変異を有する PC-9_YVMA 肺がん細胞株由来異種移植モデルマウスにおけるゾンゲルチニブの異なる用法・用量での腫瘍増殖抑制作用及び体重増加への影響

本試験でみられたゾンゲルチニブの抗腫瘍作用について，別途独立した PC-9_YVMA 肺がん CDX モデルを用いた試験を行った［CTD 4.2.1.1-06_n00279896］。PC-9_YVMA 細胞を皮下に移植した NMRI-Foxn1$^{nu}$ マウスにゾンゲルチニブを 1 日 1 回投与したところ，10 mg/kg 群では TGI の中央値は 98%であった（p=0.003）。ゾンゲルチニブを 1 日 2 回投与したところ，TGI の中央値は，1 及び 3 mg/kg 群ではそれぞれ 42%及び 48%で溶媒対照群と比較して有意な差はみられなかったが，5 及び 10 mg/kg 群ではそれぞれ 104%（p=0.0062）及び 113%（p<0.0003）であり，溶媒対照群と比較して有意な差が認められた。また，体重の変化に溶媒対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。これらのことから，ゾンゲルチニブの抗腫瘍作用の再現性が示された。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

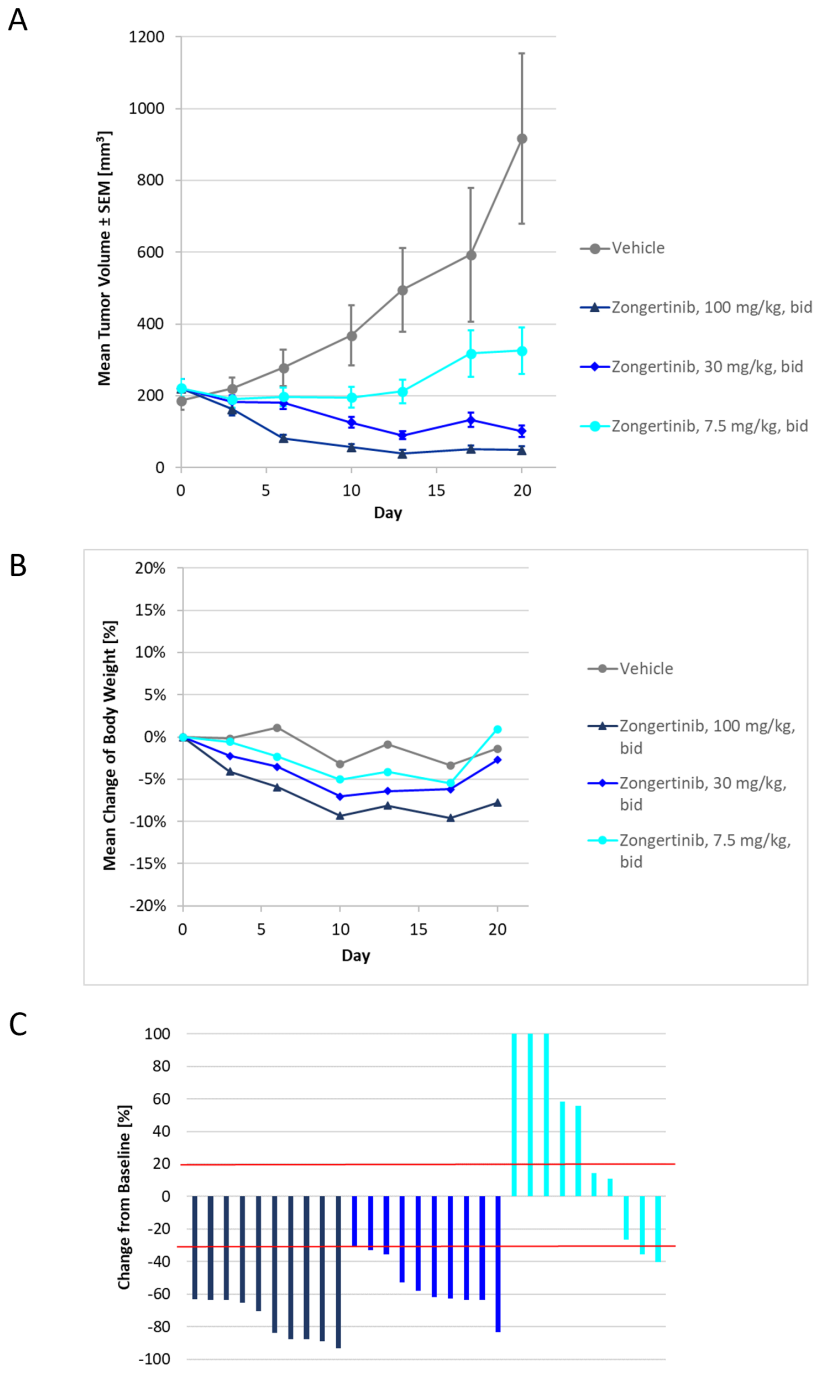
さらに，HER2 増幅型の腫瘍モデルのひとつである HER2 増幅 NCI-N87 胃がん CDX モデル用いて，ゾンゲルチニブの腫瘍増殖抑制作用を評価した。さらに，異なる 2 つの投与スケジュールにおけるゾンゲルチニブの腫瘍増殖抑制作用を比較した［CTD 4.2.1.1-07_n00294119］。NCI-N87 細胞を皮下に移植した NMRI-Foxn1$^{nu}$ マウスにゾンゲルチニブを 1 日 1 回投与したところ，TGI の中央値は 5, 10 及び 20 mg/kg 群でそれぞれ 76%（p=0.0014），114%（p=0.0006）及び 121%（p=0.0006）であった。ゾンゲルチニブを 1 日 2 回投与したところ，TGI の中央値は 2.5，5 及び 10 mg/kg 群でそれぞれ 56%（p=0.0015），115%（p=0.0006）及び 121%（p=0.0006）であった。1 日 1 回及び 1 日 2 回の投与スケジュール間で腫瘍増殖抑制作用を比較したところ，1 日あたりの投与量が同じ群では同程度の作用を示した。すべての用法・用量で忍容性は良好であった。これらのことから，HER2 増幅型の CDX モデルにおいても腫瘍増殖抑制作用を示した。また，本試験においてもゾンゲルチニブの 1 日あたりの投与量が同じ場合には同程度の抗腫瘍作用が認められたことから，PC-9_YVMA 肺がん CDX モデルにおける結果が支持された。

### 2.2.3 HER2 エクソン 20 変異を有する肺がん患者由来異種移植モデルにおけるゾンゲルチニブの腫瘍増殖抑制作用

HER2 YVMA 変異型の腫瘍増殖に対するゾンゲルチニブの抑制作用を，患者由来肺がん細胞である ST3107 細胞及び CTG-2543 細胞を移植した PDX モデルを用いて評価した。

ST3107 細胞を皮下に移植した Foxn1$^{nu}$ ヌードマウスにゾンゲルチニブを 7.5，30 及び 100 mg/kg の用量で，1 日 2 回強制経口投与したときの腫瘍増殖抑制作用を評価した（図 2.2.3: 1）。溶媒対照群には 0.5%ヒドロキシエチルセルロースを投与した。30 及び 100 mg/kg 群では 10 例全例で，7.5 mg/kg 群では 10 例中 2 例で，腫瘍退縮が認められた（図 2.2.3: 1 C）。TGI は 7.5，30 及び 100 mg/kg 群でそれぞれ 92%，119%及び 130%であり，溶媒対照群と比較して腫瘍の増殖が有意に抑制された（p<0.0001）。ゾンゲルチニブの忍容性は良好で，10%を超えない程度の体重減少がみられたが，投与に関連した死亡は認められなかった（図 2.2.3: 1 B）［CTD 4.2.1.1-08_n00283050］。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies



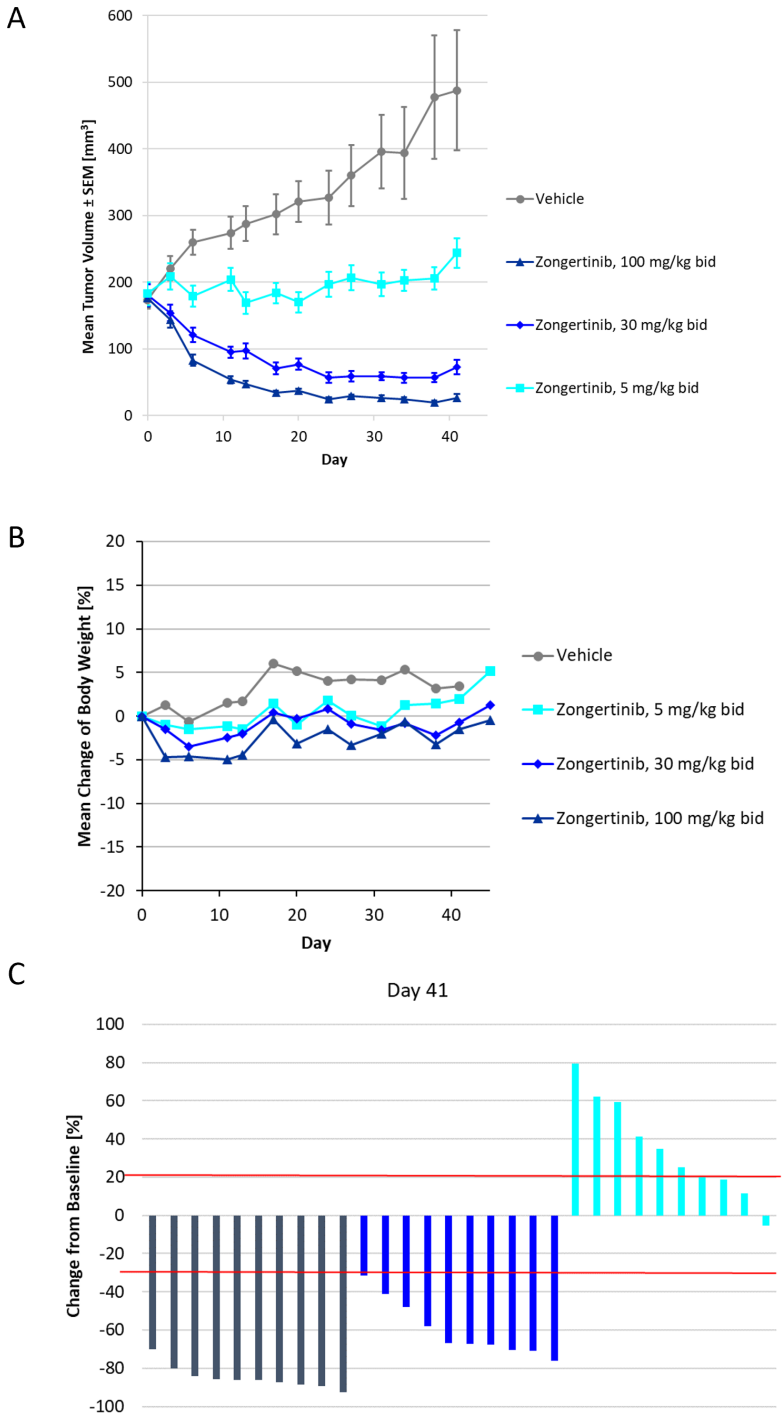

b.i.d: bis in die (twice daily), SEM: standard error of the mean
Efficacy study in ST3107, a HER2-exon20-driven lung cancer PDX model, treated with three different doses of zongertinib and vehicle (control): (A) depicts subcutaneous (*s.c.*) tumor growth over time. Tumour size was measured by digital calliper and mean tumor volumes are plotted over time. (B) shows relative body weight changes (in %) over time. Treatment-induced changes in tumor growth relative to tumor size at start of treatment (baseline) are depicted in (C) for each animal of the three dosing groups. The red lines indicate the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) criteria (>20% progressive disease, 20% to - 30% stable disease, <-30% partial response, -100% complete response).

図 2.2.3: 1　　HER2 エクソン 20 変異を有する ST3107 を用いた患者由来異種移植モデルにおけるゾンゲルチニブの腫瘍増殖抑制作用

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

2 つ目の HER2 エクソン 20 YVMA 変異を有する CTG-2543 PDX モデルを用いて同様の試験を行った。CTG-2543 細胞を皮下に移植した Foxn1$^{nu}$ ヌードマウスに，ゾンゲルチニブを 5，30 又は 100 mg/kg の用量で 1 日 2 回，強制経口投与した（図 2.2.3: 2）。溶媒対照群には 0.5%ヒドロキシエチルセルロースを投与した。ゾンゲルチニブは，腫瘍増殖を抑制し，30 及び 100 mg/kg 群で，それぞれ 10 例中 3 例及び全例で腫瘍退縮が認められ，TGI はそれぞれ 134%及び 148%であった（図 2.2.3: 2 C）。5 mg/kg 群では，TGI が 81%で腫瘍増殖を抑制したが，腫瘍退縮は認められなかった。ゾンゲルチニブの忍容性は良好で，10%を超えない程度の体重減少がみられたが，投与に関連した死亡は認められなかった（図 2.2.3: 2 B）［CTD 4.2.1.1-09_n00281764］。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies




b.i.d: bis in die (twice daily), SEM: standard error of the mean
Efficacy study in the HER2 YVMA-driven lung cancer PDX model CTG-2543 treated with different doses of zongertinib and vehicle (control): (A)Tumor size was measured by digital calliper and mean tumor volumes are plotted over time. Relative body weight changes are shown in (B), and treatment-induced changes in tumor growth relative to tumor size at start of treatment (baseline) are depicted in (C). The red lines indicate the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) criteria (>20% progressive disease, 20% to -30% stable disease, <-30% partial response, -100% complete response).

図 2.2.3: 2　　HER2 エクソン 20 変異を有する CTG-2543 を用いた患者由来異種移植モデルにおけるゾンゲルチニブの腫瘍増殖抑制作用

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 3. 副次的薬理試験

### 3.1 受容体パネル試験

38 種類の GPCR，核内ホルモン受容体，トランスポーター又はイオンチャネル及び 6 種類の酵素とのオフターゲット相互作用を，受容体リガンド結合アッセイ及び酵素に対するアッセイ（Eurofins Cerep）を用いてゾンゲルチニブ濃度 10 μmol/L で評価した。評価した 44 種類の標的のうち，ゾンゲルチニブが 50%以上の阻害活性を示した標的は 5 種類であった（表 3.1: 1 ）［CTD 4.2.1.2-01_n00279084］。

表 3.1: 1 ゾンゲルチニブの受容体リガンド結合と酵素に対する阻害活性

| Assay | % Inhibition at 10 μmol/L | |
|---|---|---|
| | Binding Assay | Enzymatic Assay |
| kappa (h) (KOP) (agonist radioligand) | 52.9% | − |
| 5-$HT_3$ (h) (antagonist radioligand) | 88.9% | − |
| GR (h) (agonist radioligand) | 53.0% | − |
| $Na^+$ channel (site 2) (antagonist radioligand) | 61.3% | − |
| PDE4D2 (h) (enzymatic assay) | − | 79.1% |

−: not evaluated, KOP: kappa-type opioid receptor, 5-$HT_3$: 5-hydroxytryptamine type-3 receptor, GR: glucocorticoid receptor, h: human, PDE4D2: phosphodiesterases 4D2
Compound binding was calculated as % inhibition of the binding of a radioactively labelled ligand specific for each target.
Compound enzyme inhibition effect was calculated as % inhibition of control enzyme activity.

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 4. 安全性薬理試験

医薬品規制調和国際会議（ICH） S7A「安全性薬理試験ガイドライン」及び ICH S7B「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価」に準拠した安全性薬理コアバッテリー試験は，*in vitro* アッセイを含むすべての試験を GLP 適用下で実施した。臨床用量に対する曝露量比は，ヒトに 120 mg を 1 日 1 回投与したときの定常状態における最高血漿中濃度（$C_{max,ss}$）である 2730 nmol/L［CTD 5.3.3.5-01_c44247865］に基づいて算出した。以下の *in vivo* 試験では，溶媒に 0.5%ヒドロキシエチルセルロース水溶液を使用した。

安全性薬理試験（GLP 適用）の主な結果を表 4: 1 に示す。

表 4: 1 安全性薬理試験（GLP 適用）の概要

| **Study type** | **Species/Test system** | **Dosage/ Concentration** | **Main result** | **GLP** | **Reference** |
|---|---|---|---|---|---|
| Effect on hERG channel current (36± 1°C) | HEK293 cells expressing the hERG channel *in vitro* | 0.3, 1, 3, 10 µmol/L | $IC_{50}$ = 11.41 µmol/L (based on achieved concentrations) | Yes | [CTD 4.2.1.3-02_n00282101] |
| CNS Assessment (Modified Irwin) | Conscious rat (RccHan®:WIST) | 0, 30, 90, 270 mg/kg | No relevant effects | Yes | [CTD 4.2.1.3-01_n00281017] |
| Respiratory function | Conscious rat (RccHan®:WIST) | 0, 30, 90, 270 mg/kg | No relevant effects | Yes | [CTD 4.2.1.3-04_n00279420] |
| Cardiovascular function | Conscious telemetered Beagle dog | 0, 5, 10, 20 mg/kg | No relevant effects on cardiovascular parameters | Yes | [CTD 4.2.1.3-03_n00282102] |

$IC_{50}$：50% inhibitory concentration

### 4.1 中枢神経系に及ぼす影響

#### 4.1.1 ラットを用いた Irwin 試験及び夜間自発運動量測定

Wistar Han ラットを用いて Irwin 試験（1 群雄 6 例）及び夜間自発運動量測定（1 群雄 7 例）を行った［CTD 4.2.1.3-05_n00279789］（GLP 非適用）。ゾンゲルチニブを 0（溶媒対照），1，3 及び 10 mg/kg の用量で単回強制経口投与し，Irwin 変法により CNS 関連機能を評価し，ビデオトラッキングにより夜間自発運動量を評価した。

試験したいずれの時間帯又は用量においても，反射及び握力を含む一般的な顕在及び潜在行動に対して，ゾンゲルチニブ投与に関連した，又はゾンゲルチニブの用量に依存した影響はみられなかった。また，自発運動量の変化，全身状態及びストレスに対する影響は，試験したいずれの時間帯及び用量においても認められなかった。

#### 4.1.2 中枢神経系コアバッテリー試験

Wistar Han ラット（1 群雌雄各 6 例）にゾンゲルチニブを 0（溶媒対照），30，90 及び 270 mg/kg の用量で単回強制経口投与し，Irwin 変法による評価に加え，一般状態，体重，体温及び自発運動量を評価した［CTD 4.2.1.3-01_n00281017］（GLP 適用）。

ゾンゲルチニブは，溶媒対照群と比較して，行動，生理的状態，体温，体重及び自発運動量に対して，毒性又は用量制限毒性と考えられる，生物学的に意義のある影響を示さなかった。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 4.2 心血管系に及ぼす影響

### 4.2.1 HEK293 細胞の hERG を介したカリウム電流に及ぼす影響

ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）を発現させた HEK 293 細胞を用いて，ゾンゲルチニブのカリウム電流への影響を評価した［CTD 4.2.1.3-02_n00282101］（GLP 適用）。

生理学的に近い温度（36± 1°C）下で，ゾンゲルチニブの濃度を 0.3，1，3 及び 10 µmol/L として評価したところ，hERG 電流阻害に対するゾンゲルチニブの $IC_{50}$ 値は 11.41 µmol/L で，ヒル係数は 0.74 であった。

### 4.2.2 ラットを用いた心血管系テレメトリー試験

テレメトリー装置を装着した Wistar Han ラット（1 群雄 7 又は 8 例）に，ゾンゲルチニブを 0（溶媒対照），1，3 及び 10 mg/kg の用量で単回強制経口投与した［CTD 4.2.1.3-06_n00279894］（GLP 非適用）。投与前 1.5 時間から投与後 7 時間にわたり，拡張期及び収縮期動脈血圧，心拍数，心電図及び呼吸パラメータを評価した。

10 mg/kg 群で拡張期動脈血圧のわずかではあるが有意な減少が認められたが，その他の評価項目において，ゾンゲルチニブ投与による影響は認められなかった。

### 4.2.3 イヌを用いた心血管系テレメトリー試験

テレメトリー装置を装着した Labrador/Mongrel 犬（雌雄各 2 例）に，ゾンゲルチニブを 0（溶媒対照：0.5%ヒドロキシエチルセルロース+0.015% Tween 80+20% 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン），3，10 及び 30 mg/kg の用量でクロスオーバーデザインにて単回強制経口投与し，投与後 7 時間にわたり，血圧（収縮期及び拡張期），最大左室圧，左室圧最大増加率（LV $dP/dt_{max}$），心拍数，心電図及び体温を評価した［CTD 4.2.1.3-07_n00279787］（GLP 非適用）。

いずれの用量においても，収縮期又は拡張期動脈血圧，最大左室圧，心拍数，LV $dP/dt_{max}$ 及び体温に，ゾンゲルチニブ投与による影響はみられなかった。また，心電図においても投与に関連した影響は認められなかった。

### 4.2.4 心血管系コアバッテリー試験

テレメトリー装置を装着したビーグル犬（1 群雌雄各 4 例）に，ゾンゲルチニブを 0（溶媒対照），5，10 及び 20 mg/kg の用量で単回強制経口投与した［CTD 4.2.1.3-03_n00282102］（GLP 適用）。トキシコキネティクス（TK）では，試験期間中，いずれの用量においてもゾンゲルチニブの全身曝露が認められ，20 mg/kg 群における最高血漿中濃度（$C_{max}$）は，雄で 1270 nmol/L，雌で 5800 nmol/L であった。

ゾンゲルチニブ投与により，すべての用量で歯肉の発赤がみられ，10 及び 20 mg/kg 群では投与後，歯肉に擦過傷が認められた［CTD 2.6.6_3.2 項参照］。これらの一般状態所見は，用量に依存して頻度が増加した。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

いずれの用量においても，収縮期，拡張期及び平均血圧，心拍数，体温，左室圧パラメータ（左室収縮期圧及び LV $dP/dt_{max}$），心電図第 II 誘導間隔（PR，QRS，QT 及び QTcR），並びに心電図波形の形態にゾンゲルチニブ投与による影響は認められなかった。

### 4.2.5 反復投与毒性試験における心血管系に及ぼす影響

ビーグル犬を用いた反復投与毒性試験［CTD 2.6.6_3 項］の一部として，心血管系の評価を実施した（GLP 適用）。

ビーグル犬を用いた 4 週間毒性試験［CTD 4.2.3.2-06_n00278943］では，ゾンゲルチニブ 10，20 及び 50 mg/kg/日の用量を投与した動物で，PQ 間隔，QRS 間隔及び QT 間隔/QTcF/QTcV，並びに心電図波形の形態に，毒性学的に意味のある一貫した影響は認められなかった。50 mg/kg/日群では，投与 10 及び 25 日目（投与前及び投与後）に心拍数の減少（その後の RR 間隔の延長を伴う）が認められた。しかし，いずれの評価時点においても徐脈は認められなかった。50 mg/kg/日群における $C_{max}$ は，雄及び雌でそれぞれ 11400 及び 11800 nmol/L であった。20 mg/kg/日群における $C_{max}$ は雄及び雌でそれぞれ 1950 及び 2160 nmol/L で，ヒトにおける $C_{max}$ のそれぞれ約 0.7 及び 0.8 倍であった。

ビーグル犬を用いた 13 週間毒性試験［CTD 4.2.3.2-07_n00301353］では，高用量 6 mg/kg/日を含むすべての用量において，心電図パラメータにゾンゲルチニブ投与に関連した量的及び質的な影響は認められなかった。6 mg/kg/日群における $C_{max}$ は，雄及び雌でそれぞれ 2120 及び 3230 nmol/L であり，ヒトにおける $C_{max}$ のそれぞれ約 0.8 及び 1.2 倍であった。

結論として，これらの非臨床安全性試験成績は，ゾンゲルチニブ投与に関連した心血管リスクを示さなかった。

## 4.3 呼吸系に及ぼす影響

### 4.3.1 ラットを用いた呼吸系テレメトリー試験

テレメトリー装置を装着した Wistar Han ラット（1 群雄 7 又は 8 例）に，ゾンゲルチニブを 0（溶媒対照），1，3 及び 10 mg/kg の用量で単回強制経口投与した［CTD 4.2.1.3-06_n00279894］（GLP 非適用）。投与前 1.5 時間から投与後 7 時間にわたり，呼吸パラメータとして呼吸数及び分時換気量を測定した。

いずれの呼吸パラメータにおいても，ゾンゲルチニブ投与による影響は認められなかった。

### 4.3.2 呼吸系コアバッテリー試験

Wistar Han ラット（1 群雄 8 例）にゾンゲルチニブを 0（溶媒対照），30，90 及び 270 mg/kg の用量で単回強制経口投与し，全身プレチスモグラフィー法により，換気パラメータ（呼吸数，1 回換気量及び分時換気量）を投与前から投与後最高 330 分まで測定した［CTD 4.2.1.3-04_n00279420］（GLP 適用）。

いずれの呼吸系パラメータにおいても，ゾンゲルチニブ投与による影響は認められなかった。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 4.4 他の器官系に及ぼす影響

### 4.4.1 腎/泌尿器・肝臓系に及ぼす影響

Wistar Han ラット（1 群雄 8 例）にゾンゲルチニブを 0（溶媒対照），3，10 及び 30 mg/kg の用量で単回強制経口投与し，投与後 4，8 及び 24 時間に採尿して，尿量，pH，電解質，グルコース，タンパク，クレアチニン，尿素，各種酵素の活性，並びに赤血球及び白血球の存在を評価するとともに，投与後 24 時間に採血して血清の血液生化学的パラメータを評価した［CTD 4.2.1.3-08_n00280042］（GLP 非適用）。

ゾンゲルチニブを 30 mg/kg の用量で投与後，抱合型ビリルビン及び総ビリルビンの軽微な増加が認められたが，その他の評価パラメータにはゾンゲルチニブ投与による影響は認められなかった。

### 4.4.2 胃腸管系に及ぼす影響

Wistar Han ラット（1 群雄 8 例）にゾンゲルチニブを 0（溶媒対照），3，10 及び 30 mg/kg の用量で単回強制経口投与し，投与後 90 分（ゾンゲルチニブの最高血漿中濃度到達時間付近）に硫酸バリウム試験食を与えた［CTD 4.2.1.3-09_n00279980］（GLP 非適用）。その 30 分後，硫酸バリウムの腸管通過率を指標として腸管輸送能に対する影響を評価した。また，投与後 2 時間に採血し，血漿中ゾンゲルチニブ濃度を測定した。

いずれの用量においても，胃内容排出速度，腸管輸送時間及び腸管内容物の稠度にゾンゲルチニブ投与による影響は認められなかった。3，10 及び 30 mg/kg 群の投与後 2 時間における血漿中ゾンゲルチニブ濃度は，それぞれ 3140，18300 及び 84700 nmol/L であった。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験はない。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 6. 考察及び結論

ゾンゲルチニブは EGFR WT を阻害しない，経口投与可能な新規の共有結合性選択的 HER2 TKI であり，HER2 WT 及びエクソン 20 挿入変異を含むすべての主要な変異型 HER2 に対する強力な阻害活性を有する。

*In vitro* のキナーゼ阻害アッセイにおいて，ゾンゲルチニブの HER2 に対する $IC_{50}$ 値は，EGFR WT に対する $IC_{50}$ 値の約 1/50 倍であった。また，がん細胞株を用いた試験において，ゾンゲルチニブは，HER2 の増幅又は変異を有する細胞の増殖を強力かつ選択的に抑制したが，EGFR WT の増幅を有する細胞の増殖を抑制しなかった。このことから，ゾンゲルチニブは HER2 を選択的に阻害することが示された。

EGFR WT, HER2 WT 及び様々な HER2 変異を有する細胞株を用いた *in vitro* 試験, 並びに HER2 依存性の, PC-9_YVMA 肺がん CDX モデル, NCI-N87 胃がん CDX モデル及び肺がん PDX（ST3107 及び CTG-2543）モデルマウスを用いた *in vivo* 試験において，ゾンゲルチニブは HER2 WT の増幅及びエクソン 20 挿入変異などの分子標的薬の標準治療が存在しない TKD 変異を含む HER2 変異を有する腫瘍の増殖を抑制することが示された。ゾンゲルチニブは nmol/L 濃度で *in vitro* におけるがん細胞増殖の抑制を示し，PC-9_YVMA 肺がん CDX モデル，NCI-N87 胃がん CDX モデル及び肺がん PDX モデルマウスにおいてはゾンゲルチニブにより腫瘍増殖抑制作用が認められた。

PC-9_YVMA 細胞を用いた *in vitro* PD バイオマーカーアッセイにおいて，ゾンゲルチニブで処理すると，HER2 のリン酸化，ERK のリン酸化及び DUSP6 の発現が用量依存的に減少した。また，PC-9_YVMA 肺がん CDX モデルマウスにゾンゲルチニブを投与したとき，ゾンゲルチニブ投与後 2 及び 6 時間に腫瘍サンプル中の ERK のリン酸化に減少傾向がみられ，DUSP6 発現量は有意に低下した。これらの結果から，ゾンゲルチニブは HER2 に結合することで，HER2 の恒常的なリン酸化とその下流の MAPK シグナルを強く抑制することが示された。さらに，PC-9_YVMA 肺がん CDX モデルマウスにゾンゲルチニブを強制経口投与したとき，溶媒対照群と比較して細胞増殖マーカーである Ki67 及びリン酸化 HH3 陽性細胞の割合が減少したことから，ゾンゲルチニブは腫瘍増殖を強く抑制することが示された。以上のことから，ゾンゲルチニブは，HER2 に結合してチロシンキナーゼ活性を抑制し，HER2 下流のシグナル伝達を抑制することにより，腫瘍の増殖を抑制することが示唆された。

PC-9_YVMA 肺がん CDX モデル及び NCI-N87 胃がん CDX モデルマウスを用いてゾンゲルチニブの投与スケジュールを評価した結果，ゾンゲルチニブの 1 日あたりの総投与量が同じ場合，1 日 1 回投与と 1 日 2 回投与で腫瘍増殖抑制作用は同程度であることが示唆された。

副次的薬理試験において，ゾンゲルチニブが 50%以上の阻害活性を示した標的は 5 種類であった。

*In vitro* 試験，並びにラット及びイヌを用いて実施された安全性薬理試験において，CNS 機能，心血管系機能，呼吸系機能，並びに胃腸管，腎/泌尿器及び肝臓の機能に，ゾンゲルチニブの投与に関連する影響は認められなかった。

ゾンゲルチニブは，HER2 を標的とする優れた薬理学的プロファイルを有し，HER2 に変異を有するがん患者に臨床的な利益が期待できる。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 7. 図表

図表は，本文中に記載した。

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 8. 参考文献

P13-05288 Mazieres J, Peters S, Lepage B, Cortot AB, Barlesi F, Beau-Faller M, et al. Lung cancer that harbors an *HER2* mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. J Clin Oncol 2013;31:1997-2003. (CTD 4.3-4)

P19-09678 Robichaux JP, Elamin YY, Vijayan RSK, Nilsson MB, Hu L, He J, et al. Pan-cancer landscape and analysis of *ERBB2* mutations identifies poziotinib as a clinically active inhibitor and enhancer of T-DM1 activity. Cancer Cell 2019;36(4):444-457. (CTD 4.3-5)

P22-06610 Wilding B, Scharn D, Bose D, Baum A, Santoro V, Chetta P, et al. Discovery of potent and selective HER2 inhibitors with efficacy against HER2 exon 20 insertion-driven tumors, which preserve wild-type EGFR signaling. Nat Cancer 2022;3(7):821-836. (CTD 4.3-6)

R09-6185 Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. Curr Opin Cell Biol 2009;21:177-184. (CTD 4.3-2)

R20-1872 Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:505-516. (CTD 4.3-1)

R20-1990 Wang Z. ErbB receptors and cancer. Methods Mol Biol 2017;1652:3-35. (CTD 4.3-3)

## 第 2 部 CTD の概要

| | |
|---|---|
| **JAN あるいは販売名：** | ゾンゲルチニブ |
| **剤形・含量：** | フィルムコート錠・60 mg |
| **文書名：** | 2.6.3 薬理試験概要表 |
| **文書作成日：** | 15 January 2025 |



**Proprietary confidential information**
**© 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved.**
This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

目　次

目　次 ..... 2
1.　薬理試験：一覧表 ..... 3
1.　薬理試験：一覧表（続き） ..... 4
1.　薬理試験：一覧表（続き） ..... 5
2.　効力を裏付ける試験 ..... 6
2.1　*In vitro* 効力を裏付ける試験 ..... 6
2.1　*In vitro* 効力を裏付ける試験（続き） ..... 7
2.2　*In vivo* 効力を裏付ける試験 ..... 9
2.2　*In vivo* 効力を裏付ける試験（続き） ..... 10
3.　副次的薬理試験 ..... 11
4.　安全性薬理試験 ..... 12
5.　薬力学的薬物相互作用試験 ..... 13

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 1. 薬理試験：一覧表

被験物質： ゾンゲルチニブ（BI 1810631）

| Type of study | Test System | Method of administration | Test Facility | Report No. | CTD No. |
|---|---|---|---|---|---|
| 効力を裏付ける試験 | | | | | |
| Assessing the impact of zongertinib on the kinome (mutli-kinase panel) | SelectScreen® kinase profiler (Thermo Fisher Scientific) | *In vitro* | BI RCV | n00280432 | CTD 4.2.1.1-01 |
| Assessing the transforming potential of a large panel of HER2-mutated variants | Focus formation assay | Cell culture, *in vitro* | [redacted] | VV-NC-108532 | CTD 4.2.1.1-02 |
| Analysis of zongertinib activity on the growth of Ba/F3-derivates expressing a large panel HER2-mutated variants | MANO method | Cell culture, *in vitro* | [redacted] | VV-NC-108532 | CTD 4.2.1.1-02 |
| Analysis of zongertinib activity on the growth of Ba/F3-derivates expressing different HER2-mutated variants | CellTiter-Glo® Assay (Promega) | Cell culture, *in vitro* | BI RCV | n00283036 | CTD 4.2.1.1-03 |
| Analysis of zongertinib activity on the growth of HER2-altered (mutated, amplified) human cancer cell lines | CellTiter-Glo® Assay (Promega) | Cell culture, *in vitro* | BI RCV | n00283036 | CTD 4.2.1.1-03 |
| Impact of zongertinib on PD marker in cultured cells | Mesoscale® Assay (Mesoscale Discovery), qRT-PCR | Cell culture, *in vitro* | BI RCV | n00283036 | CTD 4.2.1.1-03 |
| Activity of zongertinib on HER2-related PD marker in the human HER2-exon20-mutant lung cancer CDX model PC-9_YVMA | Subcutaneous CDX: human HER2-exon20-mutant lung cancer model PC-9_YVMA | Oral | BI RCV | n00280498 | CTD 4.2.1.1-04 |
| Zongertinib efficacy study in the human HER2-exon20-mutant lung cancer CDX model PC-9_YVMA including comparison of b.i.d. vs. q.d. dosing schedule | Subcutaneous CDX: human HER2-exon20-mutant lung cancer model PC-9_YVMA | Oral | BI RCV | n00294118 | CTD 4.2.1.1-05 |

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 1. 薬理試験：一覧表（続き）

| Type of study | Test System | Method of administration | Test Facility | Report No. | CTD No. |
|---|---|---|---|---|---|
| Zongertinib efficacy studies in the human HER2-exon20-mutant lung cancer CDX model PC-9_YVMA including comparison of b.i.d. vs. q.d. dosing schedule | Subcutaneous CDX: human HER2-exon20-mutant lung cancer model PC-9_YVMA | Oral | BI RCV | n00279896 | CTD 4.2.1.1-06 |
| Zongertinib efficacy study in the human HER2-amplified gastric cancer CDX model NCI-N87 including comparison of b.i.d. vs. q.d. dosing schedule | Subcutaneous CDX: human HER2-amplified gastric cancer model NCI-N87 | Oral | BI RCV | n00294119 | CTD 4.2.1.1-07 |
| Zongertinib efficacy study in the HER2-exon20-mutant driven lung cancer PDX model ST3107 | Subcutaneous PDX: HER2-exon20-mutant driven lung cancer model ST3107 | Oral | [redacted] | n00283050 | CTD 4.2.1.1-08 |
| Zongertinib efficacy study in the HER2-exon20-mutant driven lung cancer PDX model CTG-2543 | Subcutaneous PDX: HER2-exon20-mutant driven lung cancer model CTG-2543 | Oral | [redacted] | n00281764 | CTD 4.2.1.1-09 |
| 副次的薬理試験 | | | | | |
| *In vitro* pharmacology study of several compounds | Binding, enzyme, and uptake assays | *In vitro* | [redacted] | n00279084 | CTD 4.2.1.2-01 |
| 安全性薬理試験 | | | | | |
| Central nervous system | Rat, Crl:WI(Han) | Oral | [redacted] | n00281017 | CTD 4.2.1.3-01 |
| Cardiovascular (hERG assay) | HEK293 cells | *In vitro* | [redacted] | n00282101 | CTD 4.2.1.3-02 |
| Cardiovascular system | Dog, beagle | Oral | [redacted] | n00282102 | CTD 4.2.1.3-03 |
| Respiratory system | Rat, Crl:WI(Han) | Oral | [redacted] | n00279420 | CTD 4.2.1.3-04 |
| Central nervous system | Rat, Wistar | Oral | BI | n00279789 | CTD 4.2.1.3-05 |

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 1. 薬理試験：一覧表（続き）

| Type of study | Test System | Method of administration | Test Facility | Report No. | CTD No. |
|---|---|---|---|---|---|
| Cardiovascular system | Rat, Wistar | Oral | BI | n00279894 | CTD 4.2.1.3-06 |
| Cardiovascular system | Dog, beagle | Oral | BI | n00279787 | CTD 4.2.1.3-07 |
| Renal and hepatic | Rat, Wistar | Oral | BI | n00280042 | CTD 4.2.1.3-08 |
| Gastrointestinal | Rat, Wistar | Oral | BI | n00279980 | CTD 4.2.1.3-09 |

薬力学的薬物相互作用試験
該当する試験はない

b.i.d: bis in die (twice daily), CDX: cell line-derived xenograft, HER2: human epidermal growth factor receptor type2, hERG: human ether-a-go-go related gene, PD: pharmacodynamic, PDX: patient-derived xenograft, q.d.: quaque die (once daily), qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction,

BI: Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Germany
BI RCV: Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG, Vienna, Austria

[redacted]

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

# 2. 効力を裏付ける試験

## 2.1 *In vitro* 効力を裏付ける試験

| Type of Study | Test System | Method | Noteworthy Findings | Document Number |
|---|---|---|---|---|
| Assessing the impact of zongertinib on the kinome (multi-kinase panel) | SelectScreen® kinase profiler (Thermo Fisher) | BI 1810631 was tested at a concentration of 1 µmol/L against 397 recombinant wild type kinases using kinase specific assay technologies. The Z′-LYTE® and the Adapta® assay format measure kinase activity (phosphorylation of substrate and ADP formation) while the LanthaScreen® assay assesses the competitive binding of the inhibitor. | In the cell-free kinase assays zongertinib showed high selectivity for HER2 over all other kinases tested. Zongertinib inhibited only 7 kinases by more than 55%: beside HER2 only HER4, BMX, RIPK3, CDK11, CDK8 and EGFR. The $IC_{50}$ value obtained for EGFR wild type was >50 fold higher than that for the primary target HER2.. | CTD 4.2.1.1-01_n00280432 |
| Assessing the transforming potential of a large panel of HER2-mutated variants | Focus formation assay | NIH 3T3 mouse fibroblasts expressing HER2 wildtype and clinically annotated HER2 mutations were cultured for two weeks. Fibroblasts were subsequently stained with Giemsa solution and focus formation was scored according to: 1, no focus was observed; 2, transformed cells were partially observed; 3, diffusely transformed cells piled up in bundles; and 4, round-shaped and anchorage-independent focuses were diffusely observed. | Investigating the oncogenic potential of a large panel of HER2 variants (> 180 HER2 mutations from COSMIC database and WT) in a focus formation assay revealed that the majority (> 90%) yet not all clinically annotated and tested HER2 variants are activating and transforming NIH 3T3 fibroblasts. | CTD 4.2.1.1-02_VV-NC-108532 |
| Analysis of zongertinib activity on the growth of Ba/F3-derivates expressing a large panel HER2-mutated variants | MANO method | A panel of 182 barcode-labeled different variants of WT and mutated HER2, and controls were expressed in Ba/F3 cells and cultured under IL-3-free conditions in absence or presence of increasing concentrations of zongertinib[1)] for five days. Cell numbers were calculated from the read out of bar codes for each variant and treatment condition. | In this study zongertinib was found to inhibit cell growth stimulated by a variety of clinically annotated and activating HER2 variants (> 170 HER2 mutations and wild type), with $IC_{50}$ values in the low nanomolar range. Zongertinib showed activity on HER2-mutations located within the TKD, including exon 20 insertion mutations, and outside the TKD. | CTD 4.2.1.1-02_VV-NC-108532 |

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 2.1 *In vitro* 効力を裏付ける試験（続き）

| Type of Study | Test System | Method | Noteworthy Findings | Document Number |
|---|---|---|---|---|
| Analysis of zongertinib activity on the growth of Ba/F3-derivates expressing different HER2-mutated variants | CellTiter-Glo® Assay (Promega) | EGFR WT, HER2 WT or 30 different HER2 mutated variant-expressing Ba/F3 cells were incubated for 72 h with BI 1810631 under IL-3-free conditions. A CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay were performed and hemoluminescence is measured. | This study demonstrates that zongertinib strongly inhibited the growth of Ba/F3 cells driven by WT and mutant HER2, with IC50 values in the low nanomolar range. Zongertinib showed activity on HER2-mutations located within the TKD, including exon 20 insertion mutations, and outside the TKD. The $IC_{50}$ value for zognertinib on EGFR-WT-stimulated growth was found to be > 1.5 µmol/L. | CTD 4.2.1.1-03_n0028303 6 |
| Analysis of zongertinib activity on the growth of HER2-altered (mutated, amplified) human cancer cell lines | CellTiter-Glo® Assay (Promega) | BI 1810631 were added one day after plating the 8 cancer cell lines characterized by amplification of EGFR and HER2 and by mutations in HER2. Treated cells were incubated for 72 h. CellTiter-Glo® Luminescent Cell 30 Viability Assay was performed and chemoluminescence is measured. | This study confirmed zongertinib´s selectivity and growth inhibitory activity in a panel of cancer cell lines driven by amplified HER2 and HER2 exon 20 insertion mutations. While the $IC_{50}$ value for zognertinib on EGFR-WT-growth was found to be > 5000 nmol/L, the $IC_{50}$ values for zognertinib on amplified HER2 and HER2 mutation were 1-36 nmol/L. | CTD 4.2.1.1-03_n0028303 6 |
| Impact of zongertinib on PD marker in cultured cells | Mesoscale® Assay, qRT-PCR | PC-9_YVMA cells were treated with increasing concentrations of BI 1810631 (0.05-4000 nmol/L) for 2h. pHER2, total HER2 protein, pERK and total ERK protein levels were then analysed with the Mesoscale platform. DUSP6 mRNA was measure via qRT-PCR. GAPDH was used as endogenous control. | This study shows that zongertinib clearly affected the activation of HER2 and its downstream effectors ERK and DUSP6. A dose-dependent inhibition of pHER2 ($IC_{50}$=2.7 nmol/L), pERK ($IC_{50}$=0.7 nmol/L) and *DUSP6* ($IC_{50}$=0.9 nmol/L) following a 2h-treatment of cells with zongertinib was observed. | CTD 4.2.1.1-03_n0028303 6 |

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1) Zongertinib (BI 1810631) = BI-31

ADP: adenosine diphosphate, BI 1810631: zongertinib, BMX: bone marrow kinase on chromosome X, CDK: cyclin-dependent kinase, COSMIC: catalogue of somatic mutations in cancer, DUSP6: dual-specificity phosphatase 6, EGFR: epidermal growth factor receptor, ERK: extracellular signal-regulated kinase, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, HER2: human epidermal growth factor receptor type2, HER4: human epidermal growth factor receptor 4, $IC_{50}$: 50% inhibitory concentration, PD: pharmacodynamic, pERK: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, pHER2: phosphorylated human epidermal growth factor receptor 2, qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction , RIPK3: receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3, TKD: tyrosine-kinase domain, WT: wild type

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 2.2 *In vivo* 効力を裏付ける試験

| Type of Study | Species/Strain, age | Method of administration | Doses – Schedule | Gender and No. per group | Noteworthy Findings | Document Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Activity of zongertinib on HER2-related PD marker in the human HER2-exon20-mutant lung cancer CDX model PC-9_YVMA | NMRI-Foxn1$^{nu}$ mice, 8-10 weeks old | Oral (gavage), Mesoscale® Assay, qRT-PCR, IHC | Zongertinib: 3 mg/kg q.d. (sampling: 2h and 6h); 5 mg/kg b.i.d. (sampling: 24h); 10 mg/kg q.d. (sampling: 2h, 6h and 24h); 10 mg/kg b.i.d. (sampling: 24h); 10 mg/kg b.i.d. x3 (sampling: 2h, 6h and 24h). | female, 5/group | Zongertinib tended to reduce pERK at the 2 and 6h time point post treatment for different doses and it also reduced the expression of DUSP6. Treatment with zongertinib induced a reduction of proliferation markers Ki67 and pHH3 positive cells. | CTD 4.2.1.1-04_n00280498 |
| Zongertinib efficacy study in the human HER2-exon20-mutant lung cancer CDX model PC-9_YVMA including comparison of b.i.d. vs. q.d. dosing schedule | NMRI-Foxn1$^{nu}$ mice, 8-10 weeks old | Oral (gavage) | Comparision of b.i.d. vs. q.d dosing of zongertinib: 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, b.i.d. vs. 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, q.d. | female, 8/treatment group, 10/control group | The anti-tumor activities of b.i.d treatments were similarly effective as q.d. treatments comparing the same total daily doses. All doses were well tolerated. | CTD 4.2.1.1-05_n00294118 |
| Zongertinib efficacy studies in the human HER2-exon20-mutant lung cancer CDX model PC-9_YVMA including comparison of b.i.d. vs. q.d. dosing schedule | NMRI-Foxn1$^{nu}$ mice, 8-10 weeks old | Oral (gavage) | Study 1 - zongertinib: 1 mg/kg, 3 mg/kg and 10 mg/kg b.i.d.. Study 2 - zongertinib: 5 mg/kg b.i.d. and 10 mg/kg q.d.. | female, 8/treatment group, 10/control group | Zongertinib treatment showed significant anti-tumor activity at 5 mg/kg and 10 mg/kg b.i.d. and 10 mg/kg q.d.. All doses were well tolerated. | CTD 4.2.1.1-06_n00279896 |

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 2.2 *In vivo* 効力を裏付ける試験（続き）

| Type of Study | Species/Strain, age | Method of administration | Doses – Schedule | Gender and No. per group | Noteworthy Findings | Document Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Zongertinib efficacy study in the human HER2-amplified gastric cancer CDX model NCI-N87 including comparison of b.i.d. vs. q.d. dosing schedule | NMRI-Foxn1$^{nu}$ mice, 8-10 weeks old | Oral (gavage) | Comparision of b.i.d. vs. qd dosing of zongertinib: 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, b.i.d. vs. 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, q.d. | female, 8/treatment group, 10/control group | The anti-tumor activities of b.i.d. treatments were similarly effective as q.d. treatments comparing the same total daily doses. All doses were well tolerated. | CTD 4.2.1.1-07_n00294119 |
| Zongertinib[1)] efficacy study in the HER2-exon20-mutant driven lung cancer PDX model ST3107 | Athymic nude mice, 6-12 weeks old | Oral (gavage) | Zongertinib: 7.5 mg/kg, 30 mg/kg and 100 mg/kg, b.i.d. | female, 10/group | Zongertinib was found to inhibit potently the growth of tumors at different doses with a TGI of 119% and 10/10 tumour regressions at 30 mg/kg b.i.d. and a TGI of 130% and 10/10 tumour regressions at 100 mg/kg b.i.d. All doses of zongertinib were well tolerated. | CTD 4.2.1.1-08_n00283050 |
| Zongertinib[1)] efficacy study in the HER2-exon20-mutant driven lung cancer PDX model CTG-2543 | Athymic nude-Foxn1nu mice, at least 6-8 weeks old | Oral (gavage) | Zongertinib: 5 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg, b.i.d. | female, 10/group | Zongertinib was found to inhibit potently the growth of tumors at different doses with a TGI of 134% and 3/10 tumour regressions at 30 mg/kg b.i.d. and a TGI of 148% and 10/10 tumour regressions at 100 mg/kg b.i.d.. All doses of zongertinib were well tolerated. | CTD 4.2.1.1-09_n00281764 |

1) Zongertinib (BI 1810631) = BI-31

BI 1810631: zongertinib, b.i.d: bis in die (twice daily), CDX: cell line-derived xenograft, DUSP6: dual-specificity phosphatase 6, EGFR: Epidermal growth factor receptor, HER2: human epidermal growth factor receptor type2, IHC: immunohistochemistry, PD: pharmacodynamic, PDX: patient-derived xenograft, pERK: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, pHER2: phosphorylated human epidermal growth factor receptor 2, pHH3: phosphorylated histone H3, q.d.: quaque die (once daily), qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction , RIPK3: receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3, TGI: tumor growth inhibition

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 3. 副次的薬理試験

| Type of Study | Test System | Method | Noteworthy Findings | Document Number |
|---|---|---|---|---|
| *In vitro* pharmacology study of several compounds [1)] | Binding, enzyme and uptake assays | BI 1810631 was tested at a concentration of 1 µmol/L against 44 GPCRs, nuclear hormone receptors, transporters, or ion channels. Binding and enzyme assays were performed. | Out of the 44 targets tested at 10 µmol/L only 5 exhibited sensitivities by more than 50%.<br>kappa (h) (KOP) (agonist): 52.9%<br>5-$HT_3$(h) (antagonist): 88.9%<br>GR (h) (agonist): 53.0%<br>$Na^+$ channel (site 2) (antagonist): 61.3%<br>PDE4D2 (h) (enzymatic assay): 79.1% | CTD 4.2.1.2-01_n0027908 4 |

1) Zongertinib (BI 1810631) = Compound 17965036

5-$HT_3$: 5-hydroxytryptamine type-3 receptor, GPCRs: G protein-coupled receptors, GR: glucocorticoid receptor, KOP: Kappa-type opioid receptor, h: human, PDE4D2: phosphodiesterases 4D2

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 4. 安全性薬理試験

被験物質：ゾンゲルチニブ

| Organ Systems Evaluated | Species / Strain | Method of Administration | Doses[a] (mg/kg) or concentrations | Gender and No. per Group | Noteworthy Finding | GLP Compliance | Location in CTD/ Doc. Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Central nervous system | Rat, Wistar | Oral (gavage) | 0, 1, 3, 10 | Males 6 - 7 | No relevant effects | No | CTD 4.2.1.3-05/ n00279789 |
| Central nervous system | Rat, Crl:WI(Han) | Oral (gavage) | 0, 30, 90, 270 | Males 6 Females 6 | No relevant effects | Yes | CTD 4.2.1.3-01/ n00281017 |
| Cardiovascular (hERG assay) | HEK293 cells | *In vitro* | 0.3, 1, 3, 10 µM | NA | $IC_{50}$ = 11.41 µM (based on achieved concentrations) | Yes | CTD 4.2.1.3-02/ n00282101 |
| Cardiovascular and respiratory system | Rat, Wistar | Oral (gavage) | 0, 1, 3, 10 | Males 7 - 8 | Slight decrease in the diastolic arterial pressure at 10 mg/kg<br>No relevant effects on respiratory system | No | CTD 4.2.1.3-06/ n00279894 |
| Cardiovascular system | Dog, Beagle | Oral (gavage) | 0, 3, 10, 30 | Males 2 Females 2 | No changes in any of the hemodynamic or electrocardiographic parameters measured | No | CTD 4.2.1.3-07/ n00279787 |
| Cardiovascular system | Dog, beagle | Oral (gavage) | 0, 5, 10, 20 | Males 4 Females 4 | No relevant effects on cardiovascular parameters | Yes | CTD 4.2.1.3-03/ n00282102 |
| Respiratory system | Rat, Crl:WI(Han) | Oral (gavage) | 0, 30, 90, 270 | Males 8 | No relevant effects | Yes | CTD 4.2.1.3-04/ n00279420 |
| Renal and hepatic | Rat, Wistar | Oral (gavage) | 0, 3, 10, 30 | Males 8 | A slight increase in conjugated and total bilirubin at 30 mg/kg | No | CTD 4.2.1.3-08/ n00280042 |
| Gastrointestinal | Rat, Wistar | Oral (gavage) | 0, 3, 10, 30 | Males 8 | No relevant effects | No | CTD 4.2.1.3-09/ n00279980 |

a Single dose unless specified otherwise

** Zongertinib (BI 1810631) = Compound 17965036

NA: not applicable

Proprietary confidential information © 2025 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

## 5. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。