TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 2
略号および用語の定義一覧 3
1. 非臨床試験計画概略 5
2. 薬理試験 6
2.1. 効力を裏付ける試験 6
2.1.1. 抗癌治療標的としての HER2 6
2.1.2. ツカチニブの HER2 チロシンキナーゼ阻害能 7
2.1.3. ツカチニブの HER2 チロシンキナーゼ選択性 8
2.1.4. HER2 陽性腫瘍移植モデルにツカチニブ単独投与またはトラスツズマブと併用投与したときの抗腫瘍効果 9
2.1.5. 頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルにおけるツカチニブの抗腫瘍効果 10
2.2. 副次的薬理試験 11
2.2.1. 各種キナーゼに対するツカチニブの作用 11
2.3. 安全性薬理試験 11
2.4. 薬力学的薬物相互作用試験 12
3. 薬物動態試験 12
3.1. 分析法 12
3.2. 吸収 12
3.3. 分布 12
3.4. 代謝 13
3.5. 排泄 13
3.6. 薬物動態学的薬物相互作用 14
4. 毒性試験 14
4.1. 単回投与毒性 14
4.2. 反復投与毒性 15
4.2.1. 用量制限毒性：重篤な状態悪化および消化管毒性 15
4.2.2. 生殖器への影響 16
4.2.3. 肝臓への影響 17
4.2.4. その他の所見 17
4.3. 遺伝毒性 17

4.4. がん原性 17
4.5. 生殖発生毒性 18
4.5.1. 受胎能及び初期胚発生に関する試験 18
4.5.2. 胚・胎児発生に関する試験 18
4.5.3. 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 18
4.6. 局所刺激性 18
4.7. その他の毒性 18
4.7.1. 光安全性試験 18
4.7.2. 不純物の毒性試験 18
5. 総括及び結論 19
6. 参考文献 21

LIST OF TABLES

Table 1. 主な毒性試験とヒトのツカチニブ曝露量の比 16

LIST OF FIGURES

Figure 1. HER2 に起因する MAP キナーゼおよび PI3 キナーゼのシグナル伝達経路とツカチニブの作用機序 7
Figure 2. 細胞の HER2 発現レベルとツカチニブの細胞毒性活性の相関性 8
Figure 3. BT-474 細胞における HER2 キナーゼ活性および A431 細胞における EGFR キナーゼ活性に対するツカチニブの阻害能 9
Figure 4. ツカチニブの BT-474 細胞および A431 細胞に対する細胞毒性の濃度反応性 9
Figure 5. BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを単独投与，またはトラスツズマブと併用投与したときの抗腫瘍効果 10
Figure 6. ツカチニブ経口投与による頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルの生存率の改善 11

略号および用語の定義一覧

略号，用語	省略していない表現または定義
ADC	antibody-drug conjugate：抗体薬物複合体
ALT	alanine aminotransferase：アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
AUC	area under the concentration-time curve：濃度‐時間曲線下面積
AUC_{12h}	area under the concentration-time curve through 12 hours：投与後 12 時間までの濃度−時間曲線下面積
AUC_{24h}	area under the concentration-time curve through 24 hours：投与後 24 時間までの濃度−時間曲線下面積
AUC_{inf}	area under the concentration-time curve from 0 to infinity： 0 時間から無限大時間までの濃度−時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein
BDC	bile duct cannulated：胆管カニューレーション
BSEP	bile salt export pump
CL	total body clearance：全身クリアランス
C_{max}	maximum observed plasma concentration：最高血漿中濃度
CYP	cytochrome P450：シトクロム P450
EC_{50}	half maximal effective concentration：50%効果濃度
EGFR	epidermal growth factor receptor：上皮増殖因子受容体
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay：酵素結合免疫吸着
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
HER	human epidermal receptor：ヒト上皮増殖因子受容体
hERG	human ether-à-go-go-related gene：ヒト ether- à-go-go 関連遺伝子
HNSTD	highest non-severely toxic dose：重篤な毒性が発現しない最大投与量
IC_{50}	half maximal 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
Ki	intrinsic inhibition constant (in units of inhibitor concentration) that defines the affinity of a reversible inhibitor for an enzyme：阻害定数
K_I	inhibitor concentration causing half-maximal inactivation：最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害薬の濃度
k_{inact}	maximal rate constant of enzyme inactivation：最大酵素不活性化速度定数
Km	ミカエリス定数
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry：液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計

略号，用語	省略していない表現または定義
MAP	mitogen-activated protein：分裂促進因子活性化タンパク質
MATE	multidrug and toxin extrusion
mRNA	messenger ribonucleic acid：メッセンジャーリボ核酸
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
PBPK	Physiologically based pharmacokinetic：生理学的薬物速度論
P-gp	P-glycoprotein：P-糖蛋白質
PI3	phosphatidylinositol-3：ホスファチジルイノシトール 3
PK	pharmacokinetic
STD10	severely toxic dose in 10% of the animals：供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量
T-DM1	trastuzumab emtansine：トラスツズマブ・エムタンシン
TGI	tumor growth inhibition：腫瘍増殖抑制率
TK	thymidine kinase：チミジンキナーゼ
UGT	uridine diphosphate glucuronosyl transferase：ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素

1. 非臨床試験計画概略

ツカチニブ（別名 ONT-380，ARRY-380 または AR00432380）は，ヒト上皮増殖因子受容体 2 型（HER2）を標的とする低分子の可逆的チロシンキナーゼ阻害薬であり，臨床投与経路は経口投与である。

HER2 は膜貫通性の受容体型チロシンキナーゼで，細胞の増殖、分化および生存に関係している。HER2 はがん遺伝子であり，その過剰発現または増幅は HER2 陽性悪性腫瘍における重要な因子である。HER2 陽性乳癌は全乳癌の 15%～20%を占めており，また，胃癌，食道癌，膀胱癌，結腸直腸癌，肺癌などの他の癌でも過剰発現が認められる例が存在する[1,2,3]。腫瘍で HER2 が過剰発現すると，リガンド非依存的に HER2-HER2 ホモ二量体または HER2-HER3 ヘテロ二量体を形成し，それぞれ MAP キナーゼ経路または PI3 キナーゼ経路を活性化することで，腫瘍細胞の増殖，生存および転移がもたらされる[4,5]。これまでに HER2 を標的とした薬剤として，HER2 細胞外ドメインに対する抗体であるトラスツズマブやペルツズマブ，抗体薬物複合体（ADC）であるトラスツズマブ・エムタンシン（T-DM1）および低分子チロシンキナーゼ阻害薬であるラパチニブなどが上市されており，HER2 過剰発現癌に対する臨床的な有用性が示されている。

ツカチニブの今回の申請にあたり，ツカチニブの効果および安全性に関する特徴を明らかにする目的で，薬理，薬物動態および毒性の各非臨床試験を実施した。

薬理試験では，生化学的および細胞生物学的手法による各種 in vitro 試験を実施し，ツカチニブの効力および選択性を評価した。また，in vitro 試験および HER2 陽性腫瘍移植モデル動物を用いた in vivo 試験により，ツカチニブの抗腫瘍活性を検討した。ツカチニブの安全性薬理試験として，心血管系，中枢神経系，呼吸系および消化器系の機能に対する影響を検討するために Good Laboratory Practice（GLP）試験を実施した。

薬物動態試験では，薬理試験および毒性試験で用いた非臨床動物種ならびにヒトにおけるツカチニブの薬物動態プロファイルについて，種々の in vitro および in vivo 試験により検討した。また，ヒト血漿中における主代謝物である ONT-993（M1，AR00440993 または SGD-8281：エナンチオマー*R* 体と *S* 体の混合）についても蛋白結合率および薬物相互作用関連の in vitro 試験を実施した。In vivo 試験は主として毒性試験で使用した動物種であるマウス，ラットおよびカニクイザルを用いて検討した。単回投与による血漿中濃度推移を検討した試験の投与経路は，静脈内または臨床投与経路である経口投与とした。吸収，分布，代謝および薬物トランスポーターに関する検討には目的に応じた in vitro 試験系を用いた。分布，代謝および排泄の検討には[^{14}C]ツカチニブも使用した。

毒性試験では，医薬品規制調和国際会議（ICH）の抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9 および ICH S9 Q&A）に従い，HER2 陽性乳癌の治療における使用を支持する一連の試験によりツカチニブの毒性を評価した。すべての重要な試験は，GLP に準拠して実施した。単回投与毒性試験はラットを用いて，反復投与毒性試験はラットおよびカニクイザルを用いて実施した。ラットはげっ歯類の中で豊富な背景データが存在することから選択された。また，ツカチニブの単回投与により，カニクイザルに比べてイヌにおける嘔吐の頻度が高かったことから，非げっ歯類の動物種にはカニクイザルを用いることとした。臨床での投与経路に基づき，毒性試験における投与経路は経口（カニクイザル 5 日間および 28 日間投与試験では経鼻

胃管）投与とした。ツカチニブの反復投与毒性試験として，カニクイザルを用いた 5 日間投与用量設定試験，ならびにラットまたはカニクイザルを用いた 28 日間および 13 週間の反復投与毒性試験を実施した。また，遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験，光毒性試験を実施した。加えて，ツカチニブの類縁物質のうち，[redacted]分解物（[redacted]），[redacted]不純物（[redacted]）および[redacted]不純物（[redacted]）（CTD 2.3.S.3.2.1）について in silico 遺伝毒性評価およびラット 28 日間投与毒性試験を実施した。

2. 薬理試験

2.1. 効力を裏付ける試験

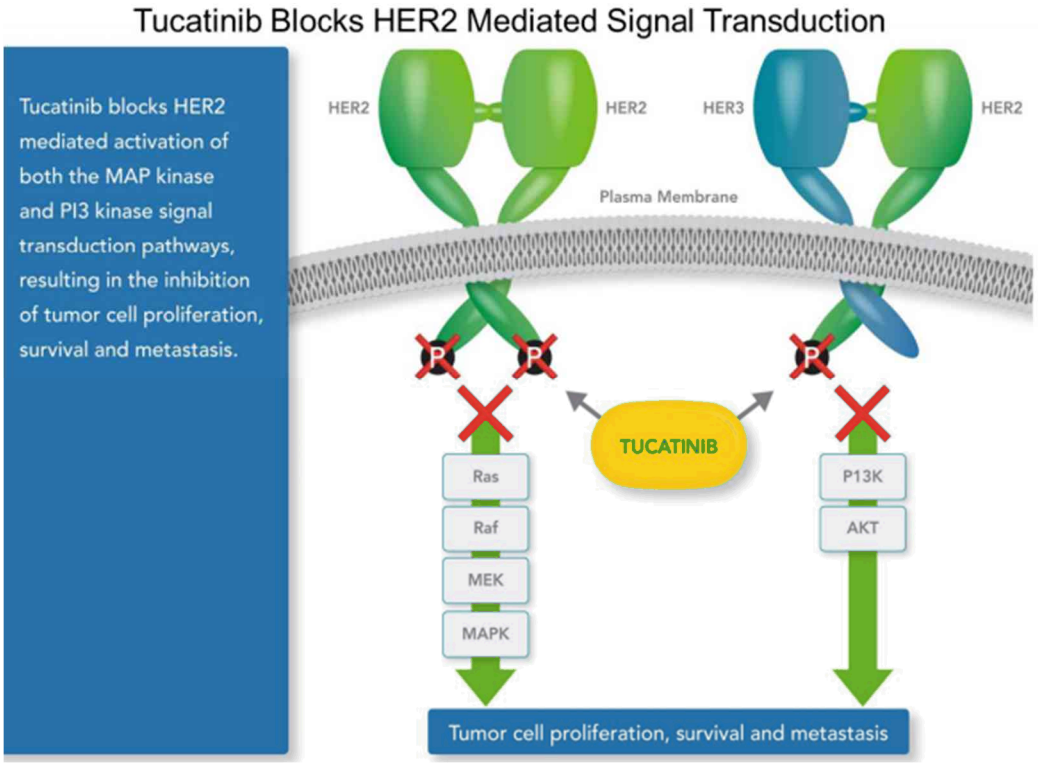
2.1.1. 抗癌治療標的としての HER2

HER2 は，上皮増殖因子受容体（EGFR），HER3 および HER4 とともに HER ファミリーに属する。これらの受容体型チロシンキナーゼは，ホモ二量体またはヘテロ二量体の形成を誘導する細胞外リガンド結合ドメイン，細胞内キナーゼドメインおよび細胞内 C 末端シグナル伝達テールから成る。EGFR，HER3，HER4 に対する結合リガンドは複数同定されているが，HER2 に対する既知のリガンドはなく，通常の生理的条件下では，HER2 は他の HER ファミリー受容体とヘテロ二量体を形成し，キナーゼ活性化の起点をそれらに依存している。EGFR，HER2 および HER4 はキナーゼ活性を示す一方，HER3 はキナーゼ活性を欠いており，主に他の HER ファミリー受容体の基質として機能すると考えられている[6]。HER ファミリー受容体のリガンド誘導性ホモ二量体またはヘテロ二量体は，キナーゼ活性を刺激し，その結果，C 末端シグナル伝達テールにあるチロシン残基のリン酸化がもたらされる。その後，種々のシグナル伝達タンパク質がこれらのリン酸化チロシン残基に結合し，細胞の分化，増殖および生存のための細胞内シグナルを伝達する[7,8,9,10]。

腫瘍細胞では，HER2 タンパク質量が正常細胞の 10 倍から 100 倍に増加することが知られている[5,11]。HER2 タンパク質量の増加は，HER2 遺伝子の転写調節の変化に基づく可能性も考えられるが，HER2 遺伝子の増幅，または HER2 遺伝子が局在する 17 番染色体の異数性が主な原因と考えられている[12,13,14,15,]。HER2 を標的とする薬剤は，HER2 タンパク質過剰発現（免疫組織化学スコア 3+で定義：高い頻度で HER2 遺伝子増幅とともに観察される）の患者に使用した場合に，最も高い臨床的な有用性を示す[16,17]。腫瘍で過剰発現すると，HER2 はリガンド非依存的にホモ二量体を形成し，自己リン酸化する。これにより，Grb2 と Shc アダプタータンパク質の結合が可能となり，HER2 のリン酸化した末端領域を認識し，MAP キナーゼシグナル伝達経路を活性化する。また，HER2 の過剰発現は，リガンド非依存的に HER2-HER3 ヘテロ二量体の形成も促進し，HER2 のキナーゼドメインが HER3 をリン酸化する。これにより，PI3 キナーゼの p85 制御サブユニットの結合および PI3 キナーゼシグナル伝達経路の活性化が可能となる[18,19,20,21,22]。

MAP キナーゼ経路および PI3 キナーゼ経路の活性化により腫瘍細胞の増殖，生存および転移がもたらされる。ツカチニブは HER2 過剰発現腫瘍において，これら経路のシグナル伝達を阻害し，抗腫瘍効果をもたらすと考えられる（Figure 1）。

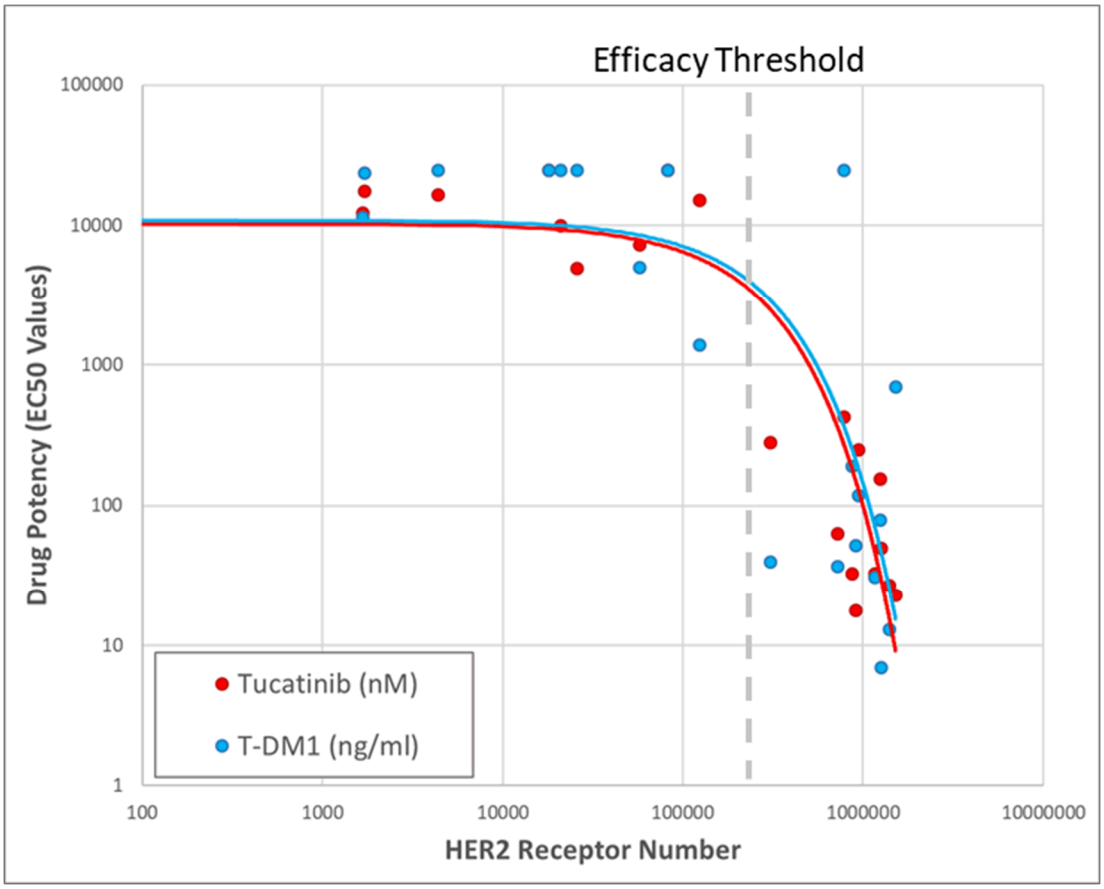
Figure 1.　HER2 に起因する MAP キナーゼおよび PI3 キナーゼのシグナル伝達経路とツカチニブの作用機序



2.1.2. ツカチニブの HER2 チロシンキナーゼ阻害能

精製組換え HER2 キナーゼを用いた生化学的評価では，ツカチニブは基質のリン酸化を阻害し，Ki 値は 0.8～2.6 nmol/L であった。HER2 を過剰発現するヒト乳癌由来細胞株 BT-474 を用い，腫瘍細胞での HER2 リン酸化に対するツカチニブの阻害能を検討したところ，50%阻害濃度（IC_{50}）値は 9.88 nmol/L であった。BT-474 細胞を用いてツカチニブの HER2 下流シグナル伝達に対する阻害能を検討した。ツカチニブは HER3，AKT，ERK1/2 および MEK1 キナーゼのリン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 0.24～4.9 nmol/L であった。HER2 発現数が異なる種々のヒト乳癌由来細胞株を用いた試験では，1 細胞あたり 300,000 以上の HER2 を発現する細胞株に対して強力な細胞毒性活性活性［50%効果濃度（EC_{50} 値）：500 nmol/L 未満］を示し，HER2 発現が 1,000,000 前後（700,000～1,500,000）の細胞株に対しては，EC_{50} 値は 100 nmol/L を下回った（Figure 2）。一方，HER2 低発現および HER2 陰性の細胞株に対する細胞毒性活性は低かった。ツカチニブの今回の試験成績は陽性対照である T-DM1 と類似しており，ツカチニブの細胞毒性作用が細胞の HER2 発現レベルに依存することがさらに示された。

Figure 2.　細胞の HER2 発現レベルとツカチニブの細胞毒性活性の相関性

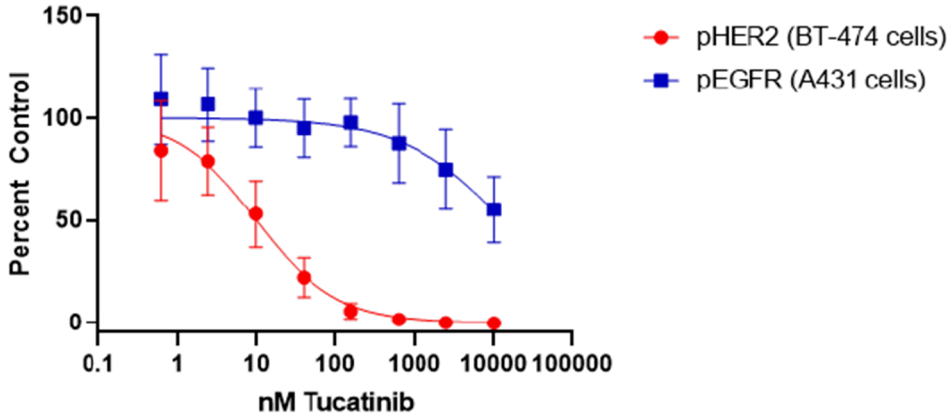


種々の HER2 陽性ヒト乳癌由来細胞株にツカチニブ（赤丸）または T-DM1（青丸）を 96 時間曝露し，細胞毒性活性を Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay により評価した。横軸には定量的フローサイトメトリー（qFACS）によって測定した細胞当たりの HER2 発現数を，縦軸に EC_{50} 値を示す。
出典：試験報告書 TRN-5430

2.1.3. ツカチニブの HER2 チロシンキナーゼ選択性

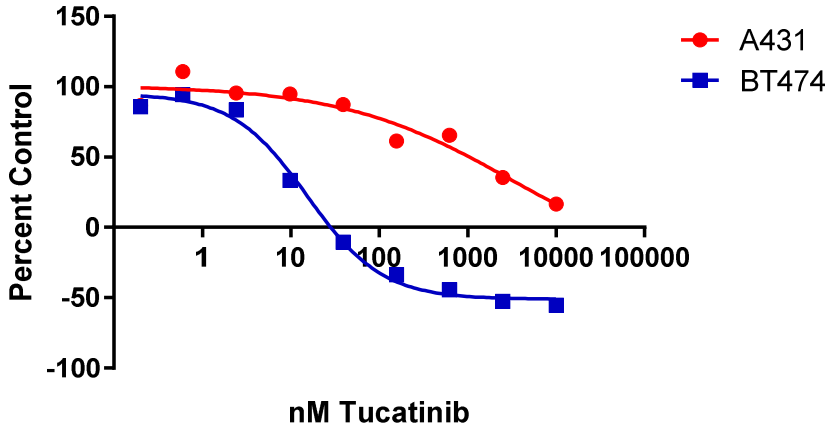
EGFR，HER2 および HER4 に対するツカチニブの効力と選択性を評価するため，各精製キナーゼに対するツカチニブの阻害能を生化学的手法により評価した結果，ツカチニブの HER2 に対する Ki 値は 0.8～2.6 nmol/L であり，EGFR の 28～88 倍，HER4 の 92～105 倍の効力が示された。BT-474 細胞，および EGFR 遺伝子の増幅が認められるヒト上皮様細胞癌由来細胞株 A431 を用い，細胞ベースで選択性を評価した。BT-474 細胞での HER2 および A431 細胞での EGFR のリン酸化に対するツカチニブの IC_{50} 値はそれぞれ 9.88 および 13,220 nmol/L であり，ツカチニブは HER2 に対して EGFR の 1000 倍超の選択性を示した（Figure 3）。また，ツカチニブは BT-474 細胞に対し，A431 細胞の約 200 倍の効力で細胞毒性作用を示した（Figure 4）。

Figure 3.　BT-474 細胞における HER2 キナーゼ活性および A431 細胞における EGFR キナーゼ活性に対するツカチニブの阻害能



リン酸化活性を ELISA 法により測定した。
出典：試験報告書 TRN-5477 および TRN-5480

Figure 4.　ツカチニブの BT-474 細胞および A431 細胞に対する細胞毒性の濃度反応性



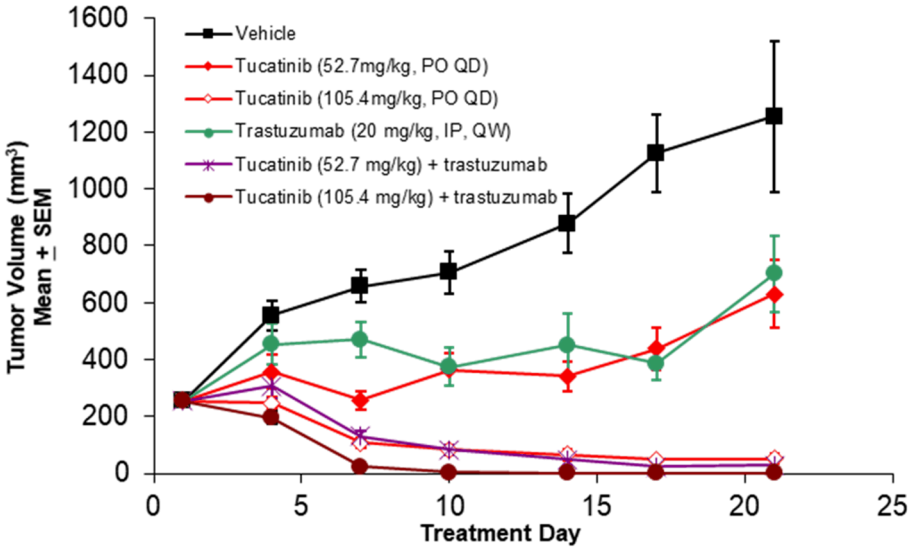
Cell Titer Blue Cell Viability Assay を用いて測定した。
出典：試験報告書 TRN-5456

2.1.4. HER2 陽性腫瘍移植モデルにツカチニブ単独投与またはトラスツズマブと併用投与したときの抗腫瘍効果

3T3-rErbB2 細胞株［形質転換誘導変異 V664E を有する ErbB2（ラット HER2 オーソログ）を恒常的に過剰発現するように操作された NIH 3T3 マウス線維芽細胞］同種移植モデル，各種 HER2 陽性腫瘍細胞株異種移植モデルおよび各種患者由来 HER2 陽性腫瘍異種移植モデルを用い，ツカチニブの in vivo 抗腫瘍効果を評価した。3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルマウスにツカチニブを単回投与してツカチニブの血漿中濃度および腫瘍中リン酸化 ErbB2 を測定した。ErbB2 のリン酸化を 50%および 90%阻害したときのツカチニブの血漿中濃度は，それぞれ 490 および 1830 ng/mL であった。11 種の HER2 陽性腫瘍細胞株異種移植モデルまたは患者由来 HER2 陽性腫瘍異種移植モデルにツカチニブを反復投与したところ，腫瘍増殖抑制率（TGI）は 48%～117%であった（代表例として BT-474 腫瘍異種移植モデルを用いた試験の結果を Figure 5 に示

す）。これらのモデルマウスにおけるトラスツズマブ投与による TGI は-34%～109%，ツカチニブとトラスツズマブの併用投与による TGI は 85%～137%であった。また，ツカチニブまたはトラスツズマブの単独投与群に比べてツカチニブとトラスツズマブの併用投与群で腫瘍退縮例数が増加し，併用投与による抗腫瘍効果が認められた。ツカチニブはドセタキセルとの併用においても，それぞれの単独投与と比べてより顕著な抗腫瘍効果を示した。

Figure 5.　BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを単独投与，またはトラスツズマブと併用投与したときの抗腫瘍効果

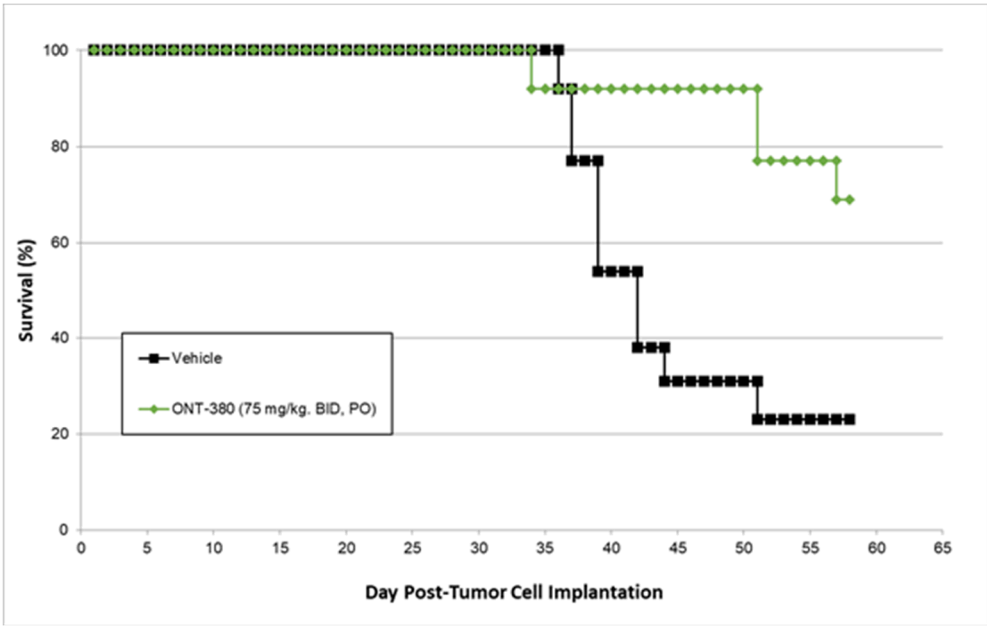


BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを 52.7 mg/kg または 105.4 mg/kg の用量で 1 日 1 回（QD）経口投与（PO）し，併用投与群においてはさらにトラスツズマブを 20 mg/kg の用量で週 1 回（QW）腹腔内投与（IP）した。
出典：試験報告書 TRN-5452

2.1.5. 頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルにおけるツカチニブの抗腫瘍効果

HER2 陽性乳癌は HER2 陰性乳癌と比較すると脳転移の発現頻度が高いことが知られている[23]。頭蓋内の腫瘍の増殖に対するツカチニブの阻害能を評価するため，BT-474 細胞を頭蓋内移植し，ツカチニブを 75 mg/kg の用量で 1 日 2 回反復投与した。試験 56 日における溶媒対照群およびツカチニブ投与群の生存率はそれぞれ 23%および 69%であり，ツカチニブの経口投与による生存率の改善が示された（Figure 6）。溶媒対照群およびツカチニブ投与群のいずれの例においても脳ホモジネート中に HER2 が検出され，腫瘍の生着が確認された。ツカチニブ投与群の脳ホモジネート中のリン酸化 HER2 レベルは溶媒対照群の 29%であった。

Figure 6.　ツカチニブ経口投与による頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルの生存率の改善



雌 nu/nu ヌードマウスに BT-474 細胞を頭蓋内移植し，頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルを作製した。ツカチニブを 75 mg/kg の用量で 1 日 2 回（BID）経口投与（PO）した。
出典：試験報告書 TRN-5455

2.2. 副次的薬理試験

2.2.1. 各種キナーゼに対するツカチニブの作用

KinaseProfiler を用いて，223 種のキナーゼに対するツカチニブの作用を検討した。[redacted] 社の仕様に従ってそれぞれのキナーゼの Km 値付近の ATP 濃度を用いた。各測定に用いたツカチニブの濃度は 1 µmol/L および 10 µmol/L とし，これらはそれぞれツカチニブの HER2 に対する Ki 値（2.1.2 項）のそれぞれ約 500 倍および 5000 倍に当たる。評価の対象としたキナーゼのうち，75%超の酵素阻害（対照値の 25%未満）が示されたのは EGFR，HER4 および EGFR の 4 つの変異型のみであった。これらのキナーゼはいずれも ErbB ファミリーに属すものであり，ツカチニブが ErbB ファミリーの選択的阻害剤であることと符合する結果が得られた。なお，HER2 は本試験の対象キナーゼに含めなかった。

2.3. 安全性薬理試験

ツカチニブの human ether-à-go-go-related gene（hERG）チャネル機能に対する阻害作用は弱かった（IC_{50} 値：13.51 µmol/L）。また，サルを用いたテレメトリー試験において 90 mg/kg/日までの用量で心機能異常は認められなかった。消化器機能への影響を評価したラット試験では，100 mg/kg までの用量で消化管輸送能への影響は認められなかった。ラットに 100 mg/kg のツカチニブを投与したところ胃液の分泌量および酸度の変化が認められ，胃刺激性が示されたが，30 mg/kg 群では影響はみられなかった。ツカチニブは，100 mg/kg までの用量でラットの中枢神経系および呼吸系への影響を示さなかった。

2.4. 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。

3. 薬物動態試験

3.1. 分析法

In vivo 薬物動態試験において，各種動物種に対してツカチニブまたは[^{14}C]ツカチニブを投与し，ツカチニブまたは ONT-993（一部の試験ではキラルカラムを用いて *R* 体と *S* 体の比率を検討した）の生体試料中濃度を測定した。GLP 試験における血漿中のツカチニブ濃度は，バリデートされた液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いた方法により定量した。[^{14}C]ツカチニブを投与した試験では，対象の生体試料中の放射能を定量的全身オートラジオグラフィーまたは液体シンチレーション計数法により測定した。

3.2. 吸収

マウス，ラットおよびカニクイザルにツカチニブを単回経口投与または静脈内投与したときの PK を評価した。ツカチニブを 0.5 または 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときのクリアランス（CL）はラットで中程度，カニクイザルで高かった。種々の溶液，懸濁液またはカプセル剤でのツカチニブの経口投与後，最高血漿中濃度（C_{max}）および血漿中濃度–時間曲線下面積（AUC）は，マウス（20～100 mg/kg），ラット（10～100 mg/kg）およびカニクイザル（15～45 mg/kg）で用量の増加に伴って増加した。いずれの動物種においても，単回経口投与後の半減期は 2～4 時間であった。ラットの 28 日間および 13 週間投与毒性試験におけるトキシコキネティクス評価では，C_{max} および AUC_{12h} は用量の増加に伴って増加した。投与初日から最終投与日の間に 2～4 倍の蓄積が認められた。カニクイザルの 28 日間および 13 週間投与毒性試験の両試験で，曝露量は用量の増加に伴って増加し，性差は概してみられず，蓄積は 2 倍未満であった。ラット，カニクイザルおよびウサギを用いた毒性試験においてトキシコキネティクスを評価した。各毒性試験でのツカチニブ曝露量を CTD 2.6.6 の Table 2 および本モジュール Table 1 に示した。

3.3. 分布

ツカチニブの血漿蛋白結合率は 0.1～50 µmol/L の間で同程度であり，いずれの動物種においても 93%を上回った。1 µmol/L（480 ng/mL）におけるヒトでの血漿蛋白結合率は 97.1%であった。ヒトでのツカチニブの血液/血漿中濃度比は 0.2～20 µmol/L の濃度で約 1 であり，血球と血漿にほぼ均等に分布した。ツカチニブは，Caco-2 細胞および MDR1 発現 LLC-PK1 細胞で高い透過性を有することが示された。Long Evans ラットを用いた組織分布試験では，[^{14}C]ツカチニブ由来の放射能が投与後 1 時間までに広範な組織にわたって分布し，多くの組織で投与後 168 時間までに消失した。

HER2 を過剰発現するヒト乳癌由来細胞株 BT-474 を頭蓋内に移植したマウスに[^{14}C]ツカチニブを経口投与したところ，放射能の脳への分布は限定的であったが，投与後 3 時間の腫瘍移植領域（右脳）の正常脳（左脳）に対する放射能比は 3.6～10.9 であったことから，[^{14}C]ツカチニブ由来の放射能が血液脳腫瘍関門を通過し，腫瘍を移植した右脳線条体に優先的に分布したことが示された。ツカチニブの脳腫瘍への分布機構は不明であるが，脳転移患者におけるツカチニブの脳への分布は，いくつかの要因によって正常時と比較して増加する可能性が考えられる。

例えば，比較的酸性の腫瘍微小環境下においては，ツカチニブ（pKa = 6.15）のような弱塩基性薬物に対する P-gp/BCRP を介した排出は減少する。加えて，正常な血液脳関門と比較して転移性脳腫瘍において P-gp などのトランスポーターの発現は低下する。また，脳腫瘍存在下においては，血液脳関門のタイトジャンクションが障害を受けることが報告されている[24,25,26,27]。これらの要因が，ツカチニブ投与による頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルの生存率改善（2.1.5 項）に寄与した可能性が考えられた。

3.4. 代謝

In vitro ならびにラット，カニクイザルおよびヒトでの in vivo 試験によりツカチニブの代謝を検討した。ヒト試料を用いた in vitro 評価により同定された代謝物は，いずれも 1 種以上の動物種由来の試料を用いた試験でも認められた。同定された代謝物は概ね酸化代謝物（水酸化，脱水素化および脱アルキル化など）であった。CYP2C8 によるツカチニブのジメチルジヒドロオキサゾール環におけるメチル基の水酸化は in vitro での主要な代謝経路であり，キラル代謝物である ONT-993 が生成する。ヒトまたはカニクイザル由来試料を用いた in vitro 試験およびヒトまたはカニクイザルにツカチニブ投与後の尿中における ONT-993 の *S* 体に対する *R* 体の比率は 3.2～4.85 であった。BT-474 細胞株に対する *R* 体および *S* 体の細胞毒性作用に関する EC_{50} 値はそれぞれ 60 および 87 nmol/L であり，ツカチニブの EC_{50} 値（27 nmol/L）の 2～3 倍であった（CTD 2.6.2.2.4.3）。また，ONT-993 の EGFR に対する阻害能は，HER2 に比べて顕著に低かった。ONT-993 のヒト血漿蛋白結合率は 97.1%であった。

健康成人に[^{14}C]ツカチニブを 300 mg（150 µCi）の用量で単回経口投与したところ，血漿中の主要な薬物関連物質は未変化体および ONT-993 であり，血漿中曝露量（AUC_{24h}）はそれぞれ 5210（血漿中放射能の 75.6%）および 631 ng eq•h/mL（同 9.16%）であった。また，LC-MS/MS 測定における血漿中 AUC_{inf} はそれぞれ 3220 および 582 ng•h/mL であった。定常状態における血漿中代謝物について検討するためにツカチニブを 300 mg の用量で 14 日間反復投与したところ，ONT-993 は総薬物関連物質の 6.46%と算出され，総薬物関連物質の 10%を超える代謝物は認められなかった。ヒトで総薬物関連物質の 10%を超える代謝物は認められず，いずれも他の動物種でも認められたことから，代謝物の毒性試験は実施しなかった。さらに，ONT-993 の効力はツカチニブと比較して低く，未変化体と同等の高い血漿蛋白結合率（97.1%）を示したことから，ツカチニブをヒトに投与したときの有効性および安全性に対する代謝物の寄与は軽微であると結論付けた。

3.5. 排泄

胆管カニューレーション（BDC）処置および未処置ラット，カニクイザルならびにヒトに[^{14}C]ツカチニブを単回経口投与したところ，放射能の回収率はそれぞれ 93.6%，91.4%，82.8%および 89.9%であった。放射能の多くは代謝物として糞便中（BDC ラットでは胆汁中）に回収され，ヒトを含むいずれの動物種においても，ツカチニブの主な消失経路は代謝および胆汁排泄であることが示された。カニクイザルの糞便中では ONT-993 が最も多く排泄された薬物関連物質であり，投与量の 16.4%を占め，次いで未変化体が投与量の 11.8%であった。ヒトにおいても ONT-993 が糞便中に最も多く存在する薬物関連物質であり，投与量の 36.8%を占め，次いで未変化体が投与量の 15.9%であった。ラット，カニクイザルおよびヒトの尿中に回収された放射能は投与量の 5%未満であった。ヒトに[^{14}C]ツカチニブを 300 mg の用量で単回経口投与した後に

回収された糞便中の代謝物および尿中の放射能の合計から，投与量の 70%超が吸収されたことが示唆された。

3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

In vitro 試験の成績から，ツカチニブは主に CYP2C8，次いで CYP3A4，CYP3A5 およびアルデヒドオキシダーゼといった複数の薬物代謝酵素によって代謝されることが示された。この結果は，後に実施した臨床薬物相互作用試験において，gemfibrozil 1-glucuronide（強い CYP2C8 阻害薬）およびイトラコナゾール（強い CYP3A 阻害薬）がツカチニブの AUC をそれぞれ約 3 倍および約 1.3 倍に増加させたことと一致した（ONT-380-012 試験）。ツカチニブ（最高 30 µmol/L）による CYP1A2，CYP2B6 および CYP3A の酵素活性誘導，ならびにそれらの mRNA 量の増加は認められなかった。ツカチニブは CYP2C8，CYP2C9 および CYP3A に対して阻害作用を示し，K_i 値はそれぞれ 0.170，4.57 および 0.805 µmol/L であった。CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9 および CYP2D6 に対する時間依存性阻害は認められなかった。一方，CYP3A に対しては時間依存的な阻害を示し，k_{inact} 値は 0.011 min^{-1}，K_I 値は 0.54 µmol/L であった。なお，臨床薬物相互作用試験（ONT-380-012 試験）において，ツカチニブとの併用投与により CYP3A4 の基質であるミダゾラムの AUC が約 5.7 倍に増加し，CYP2C8 の基質であるレパグリニドの AUC は約 1.7 倍に増加した。

ツカチニブは P-gp および BCRP の基質となることが示唆された一方，OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3，MATE1，MATE2-K および BSEP の基質とはならなかった。BCRP，BSEP，OATP1B1 および OATP1B3 に対するツカチニブの阻害がみられ，IC_{50} 値は 4.36～8.98 µmol/L であった。生理学的薬物速度論（PBPK）モデルでは，ロスバスタチンの OATP1B1 および OATP1B3 を介した輸送に関する薬物相互作用は予測されなかった（R_SEAT_1_B 試験）。ツカチニブは腎近位尿細管トランスポーターである OCT2，MATE1 および MATE2-K を介したメトホルミンの輸送を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 14.7，0.340 および 0.135 µmol/L であった。また，クレアチニンをプローブ基質としたところ OCT2 および MATE1 に対する IC_{50} 値はそれぞれ 0.107 および 0.0855 µmol/L と低下した。この結果から，腎取り込みトランスポーターに対するツカチニブの阻害が OCT2 に対してより顕著であることが示唆された。OCT2，MATE1 および MATE2-K の基質であるメトホルミンを用いた臨床薬物相互作用試験（SGNTUC-020 試験）において，ツカチニブとの併用投与によりメトホルミンの曝露量が約 40%増加し，腎機能に影響を与えることなく血清クレアチニンの一時的な増加を引き起こした。血清クレアチニンの増加は，OCT2 および MATE1 を介したクレアチニンの尿細管分泌の阻害によるものと考えられた。

ツカチニブを 300 mg の用量で 1 日 2 回経口投与したときの未変化体および ONT-993 の血漿中濃度を検討する PBPK モデルを開発した（R_SEAT_1_B 試験）。PBPK モデルにより，ツカチニブを臨床用量投与時に得られる曝露量において，CYP2C9，OATP1B1，OATP1B3 および UGT1A1 を阻害する可能性は低いと予測された。

4. 毒性試験

4.1. 単回投与毒性

ラットにツカチニブを 0，30，100 または 300 mg/kg の用量で単回経口投与したところ，ツカチニブ投与に関連する一般状態の変化，死亡および眼科学的所見は認められなかった。300 mg/kg

群の摂餌量および体重増加量の軽度な増加傾向は毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。100 または 300 mg/kg 群で試験 2 日にみられた赤血球パラメータおよびカルシウムの減少ならびにコレステロール，グルコースおよび総ビリルビンの増加は，試験 14 日には認められず，回復性が示された。300 mg/kg 群の雌で肝臓重量の増加がみられたが，病理組織学的変化は認められず，毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。ツカチニブ投与に関連する病理組織学的変化として，100 および 300 mg/kg 群の雄でヒラメ筋における軽微な単核球浸潤または筋線維変性/壊死の発現頻度増加が認められた。また，ツカチニブ投与との関連性が否定できない所見として，300 mg/kg 群の雌でリンパ組織における軽微なリンパ球減少が認められた。リンパ球の減少はストレスに起因する可能性も考えられ，必ずしもツカチニブ投与に直接関連しているわけではないと考えられた。これらのことから，ラットにツカチニブを最高 300 mg/kg の用量で単回投与したときの忍容性が示された。

4.2. 反復投与毒性

ツカチニブの反復投与毒性試験をラットおよびカニクイザルを用いて実施した。臨床での用法・用量に基づき，毒性試験における投与経路は経口（カニクイザル 5 日間および 28 日間投与試験では経鼻胃管）投与とし，いずれの試験においても 1 日 2 回投与した。反復投与毒性試験として，カニクイザルを用いた 5 日間経口投与用量設定試験に加え，ラットおよびカニクイザルを用いた 28 日間および 13 週間投与毒性試験を実施した。

4.2.1. 用量制限毒性：重篤な状態悪化および消化管毒性

ラットおよびカニクイザルを用いた 28 日間投与毒性試験の高用量群で，中途死亡（状態悪化に伴う安楽殺を含む）が認められた。反復投与毒性試験における用量制限毒性は，死戦期を招いた重篤な状態悪化を示す一般状態変化（活動および摂餌量減少，円背位，正向反射喪失，冷感など）および消化管毒性（水様便，脱水など）であり，すなわち，死亡に先行してこれらモニター可能な毒性兆候が認められた。

忍容性が示された用量でみられた一般状態の変化の程度は概ね軽微から軽度で，休薬による回復性が示された。忍容性が示された用量でのツカチニブ投与に起因する変化として，臨床病理検査値の軽微な変化，体重低値，臓器重量増加ならびに肝臓，生殖器（雌ラット），骨格筋および乳腺（雄ラット）における病理組織学的変化がみられた。

13 週間投与毒性試験のラットの STD10（供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量）およびカニクイザルの HNSTD（重篤な毒性が発現しない最大投与量）はそれぞれ 60 mg/kg/日超および 40 mg/kg/日であり，C_{max} はそれぞれ 6.36 および 1.83 µg/mL，AUC_{12h} はそれぞれ 41.1 および 9.92 µg•h/mL であった。主な毒性試験と，ヒトに 300 mg の用量で 1 日 2 回反復投与したときの曝露量の比を Table 1 に示す。

なお，ツカチニブ単剤を投与した第 1 相試験（ARRAY-380-101 試験）での下痢（全グレード）の発現割合は 52%であった。下痢はツカチニブの臨床試験を通じてよくみられた有害事象であり，ツカチニブの重要な特定されたリスクである。下痢に関する臨床データは，CTD 2.7.4.2.1.5.1 に記されている。

Table 1.　主な毒性試験とヒトのツカチニブ曝露量の比

試験番号	試験	投与量 (mg/kg/日)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{12h} (μg•h/mL)	AUC 比 [a]
8369684	ラット 13 週間試験	60（STD10 および無毒性量）[b,c]	6.36	41.1	11.8
8369685	サル 13 週間試験	40（HNSTD）[d]	1.83	9.92	2.9
20160869	ラット胚・胎児試験	母動物: 150（HNSTD）[b,e]	9.55	60.6	17.5
		胚胎児: 120（毒性発現）[e]	3.84	31.6	9.1
20144956	ウサギ胚・胎児試験	母動物: 150（HNSTD）[e]	5.86	25.9	7.5
		胚胎児: 90（催奇形性発現）[e]	2.03	6.1	1.8
20129137	ラット光毒性試験	60（無影響量）[b,c]	6.3	28.3	8.2
ONT-380-012[f]	反復投与臨床試験	300 mg 1 日 2 回（申請用法用量）	0.667	3.47	—

いずれの試験もツカチニブを 1 日 2 回，経口投与した。曝露量は，ヒト定常状態（臨床試験 ONT-380-012）または毒性試験の最終測定時の血漿中濃度データに基づき，幾何平均濃度を用いて算出した。
a: 各毒性試験で得られた AUC_{12h} と臨床試験 ONT-380-012 でのヒト定常状態における AUC_{12h} の比。
b: これらの投与量ではツカチニブ投与に関連する死亡はみられなかった。STD10 はこれら忍容性が示された投与量を上回るものと考えられた。
c: 60 mg/kg/日はこれらの試験の高用量であり，無毒性量（13 週間投与試験）または無影響量（光毒性試験）であった。
d: 40 mg/kg/日で抗生物質の処置を伴う糞便異常がみられたことに基づき，無毒性量は 20 mg/kg/日であった。
e: 生殖発生毒性試験の曝露量は母動物のトキシコキネティクスデータに基づく。ラットおよびウサギの胚・胎児発生に関する試験では，高用量（いずれも 150 mg/kg/日）で母動物の死亡や重篤な毒性は認められなかった。母動物の無毒性量は，ラットでは低用量の 90 mg/kg/日で毒性がみられたため得られず，ウサギでは 90 mg/kg/日であった。また，ラットおよびウサギの胚・胎児の無毒性量はそれぞれ 90 および 60 mg/kg/日であった。なお，表中に示したラットおよびウサギの胚・胎児毒性発現用量（それぞれ 120 および 90 mg/kg/日）のヒト換算用量はそれぞれ 19.35 および 29.16 mg/kg/日である。
f: 試験報告書：ONT-380-012, Part D

4.2.2. 生殖器への影響

ラットを用いた 28 日間または 13 週間投与毒性試験において，雌の生殖器ならびに雄の乳腺および前立腺の変化が観察された。その所見として，子宮萎縮，膣の粘液産生，黄体の変化（以上雌），乳腺小葉萎縮（雄），ならびに生殖器の臓器重量減少［子宮/子宮頸部（雌）および前立腺（雄）］がみられた。休薬期間を経て，20 mg/kg/日以上の投与群の雌における卵巣の所見が回復傾向にとどまったのを除き，病理組織学的所見は回復した。

ラット試験においてみられた生殖器の一連の変化は，ラットにおいてドーパミンの枯渇または拮抗作用によるプロラクチンの増加後に観察される変化と類似していた[28,29]。HER2 は正常な下垂体のプロラクチン分泌細胞で発現しているが[30]，HER2 拮抗薬により HER2 発現下垂体細胞によるプロラクチン合成および放出は増加せず，むしろ減少したことが報告されている[31]。また，カニクイザルでは生殖器への影響は認められなかった。これらのことから，ラットの生殖器に対するツカチニブの影響は，中枢におけるプロラクチン分泌に対する影響を介したものである可能性は低いと考えられた。

4.2.3. 肝臓への影響

ラットまたはカニクイザルの試験において，忍容性が示された用量では，血清肝機能マーカー［総ビリルビン，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST），アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）など：概ね 2.5 倍以下］および肝臓重量の増加ならびに小葉中心性肝細胞肥大がみられたが，肝細胞の損傷を示す病理組織学的変化（変性，炎症，壊死など）は認められなかった。カニクイザルを用いた 28 日間投与毒性試験では，忍容性が示されなかった用量において，中途死亡例では肝臓の脆弱化および肝細胞の腫脹/淡明化が死戦期の変化として認められた一方で，肝細胞の損傷を示す病理組織学的変化および血清肝機能マーカーの変化はみられなかった。以上のことから，両動物種のいずれにおいても，ツカチニブの肝毒性を示唆する変化は認められなかった。血清肝機能マーカーの軽度な変化，肝臓重量の増加および小葉中心性肝細胞肥大がみられ，肝細胞または肝胆道系の傷害を示す病理組織学的所見は認められなかったことは，ツカチニブによる酵素誘導の二次的変化を示唆する可能性が考えられた[32]。

なお，ツカチニブ単剤を投与した第 1 相試験（ARRAY-380-101 試験）において，ツカチニブ単剤投与の用量制限毒性として，一過性で可逆的なトランスアミナーゼの上昇（Grade 3）が認められた。そのため，その後のツカチニブの臨床試験では AST，ALT およびビリルビン値の観察を行い，それら検査値の特定の異常に対しては用量調節を必要とした。肝毒性はツカチニブの重要な特定されたリスクであり，肝毒性に関する臨床データは，CTD 2.7.4.2.1.5.2 に記されている。

4.2.4. その他の所見

反復投与毒性試験においてみられた上記以外の変化として，臨床病理検査値の変化（赤血球パラメータの減少ならびに網状赤血球，白血球，好中球，単球，血小板およびコレステロールの増加），臓器重量変化（副腎重量増加）ならびに骨格筋における病理組織学的変化がみられた。臨床病理検査値および臓器重量の変化は軽微なものであり，関連する病理組織学的所見を伴わなかった。ラットを用いた 28 日間投与毒性試験の病理組織学的検査では，200/120 mg/kg/日[a]群の雄の骨格筋（ヒラメ筋）において筋線維変性/ヒラメ筋再生がみられ，腰筋で単核球浸潤の発現頻度増加が認められた。これらは用量に伴う変化ではなかったか，対照群でもみられたため，毒物学的意義は低いと考えられた。

4.3. 遺伝毒性

ツカチニブの遺伝毒性を評価するため，細菌を用いた復帰突然変異試験，L5178Y 細胞を用いるマウスリンフォーマ *Tk* 試験およびマウスを用いた in vivo 小核試験を実施した。結果はいずれも陰性であり，ツカチニブは遺伝毒性を有さないと判断した。

4.4. がん原性

ツカチニブのがん原性試験は実施していない。

---

[a] 試験開始時は高用量群の用量を 200 mg/kg/日としていたが，死亡例（死亡発見または瀕死例の安楽殺）が多発し，試験 8 日に 120 mg/kg/日に減量したことからこのように表記した。

4.5. 生殖発生毒性

4.5.1. 受胎能及び初期胚発生に関する試験

ツカチニブの受胎能及び初期胚発生に関する試験は実施していない。

4.5.2. 胚・胎児発生に関する試験

erbb2 遺伝子欠失ホモ接合型のマウス胚は，心臓の肉柱および末梢神経系の欠陥を伴い，妊娠 10.5 日に死亡したことから，HER2 は胚発生に不可欠であることが報告されている[33]。また，ErbB2 キナーゼ不活性化変異を有するマウス胚も同様の結果を示し，HER2 キナーゼの触媒活性が胚発生において重要であることが示されている[34]。

ラットまたはウサギを用いたツカチニブの胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験において，胚・胎児毒性がみられた。ラットでは母動物で毒性（体重，体重増加量および摂餌量の減少）がみられた 90 mg/kg/日よりも高い用量である 120 mg/kg/日以上で胚・胎児毒性（着床数，総胎児数および生存胎児数の減少，着床前後の胚損失率および吸収胚数の増加，骨格変異）が認められた。ウサギでは母動物において顕著な毒性がみられなかった一方で，卵巣および子宮の検査では，90 mg/kg/日以上の投与群において後期吸収胚，総吸収胚および着床後損失率の増加がみられ，それらに関連して生存胎児数および雄胎児率の減少が認められた。胎児においては，90 mg/kg/日以上の投与群でドーム状頭部，脳室拡張，頭蓋骨前頭骨および頭頂骨の骨化不全および頭頂部の大泉門開大がみられた。このようにツカチニブはウサギに対して催奇形性を示し，この時の曝露量は臨床曝露量と同程度であった（Table 1）。

以上のことから，胚・胎児毒性をツカチニブの重要な潜在的リスクに挙げ，また，添付文書（CTD 1.8.1）にこれら試験結果を記載して注意喚起することとした。以上の用量設定試験においてツカチニブの催奇形性が認められたことから，ICH S9 Q&A に従い本試験は実施しなかった。

4.5.3. 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

ツカチニブの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施していない。

4.6. 局所刺激性

ツカチニブの局所刺激性試験は実施していない。なお，安全性薬理試験の一環としてツカチニブの胃刺激性を検討した試験については，2.3 項に示した。

4.7. その他の毒性

4.7.1. 光安全性試験

In vitro 光毒性試験ではツカチニブが光毒性を有する可能性が示されたが，その後の有色ラットを用いた in vivo 光毒性試験では，皮膚反応観察，眼科学的検査および眼の病理組織学的検査で変化はみられず，ツカチニブの光毒性は認められなかった。

4.7.2. 不純物の毒性試験

ツカチニブの類縁物質のうち，ツカチニブの毒性試験では評価に十分な用量での投与が予想されない[redacted]分解物（[redacted]），[redacted]不純物（[redacted]）および[redacted]不純物

（[redacted]）（CTD 2.3.S.3.2.1）について，ラットを用いた 28 日間投与毒性試験および in silico 遺伝毒性評価を実施した。28 日間投与毒性試験では，それぞれの類縁物質についてヒト等価用量の 10 倍量を高用量としてラットに反復投与したところ，毒性変化はみられなかった。In silico 評価の結果，これらの類縁物質の遺伝毒性アラートは示されなかった。

5. 総括及び結論

HER2 は，EGFR，HER3 および HER4 とともに HER ファミリーに属する受容体型チロシンキナーゼである。HER2 はがん遺伝子として知られ，乳癌をはじめ，胃癌，食道癌，膀胱癌，結腸直腸癌，肺癌などの癌において過剰発現が認められる例が存在する。ツカチニブは HER2 を標的とする低分子のチロシンキナーゼ阻害薬であり，HER2 過剰発現腫瘍において，MAP キナーゼ経路および PI3 キナーゼ経路のシグナル伝達を阻害し，抗腫瘍効果をもたらすと考えられる。

In vitro 薬理試験において，ツカチニブは HER2 のリン酸化，細胞内 HER2 下流シグナル伝達，および HER2 陽性細胞の増殖を阻害した。HER2 発現数が異なる種々のヒト乳癌由来細胞株を用いた試験では，HER2 を多く発現する細胞株に対して強力な細胞毒性活性を示した一方，HER2 低発現および HER2 陰性の細胞株に対する細胞毒性活性は低かった。また，HER2 陽性腫瘍移植モデル動物にツカチニブを単独投与，もしくはトラスツズマブまたはドセタキセルと併用投与したところ，それぞれの単独投与と比べてより顕著な抗腫瘍効果が認められた。頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを反復経口投与したところ，溶媒対照群と比べて脳ホモジネート中のリン酸化 HER2 レベルは低値であり，また，生存率の改善をもたらした。

細胞内シグナル伝達試験では，ツカチニブは HER2 の自己リン酸化に対する阻害能が高く，HER2 に対して EGFR の 1000 倍超の選択性を示した。223 種のキナーゼに対するツカチニブの作用を検討したところ，ツカチニブ（HER2 に対する Ki 値の約 500 倍または 5000 倍に当たる濃度）が 75%超の酵素阻害を示したのは EGFR，HER4 および EGFR の 4 つの変異型のみであった。

安全性薬理試験において，ツカチニブの心血管系，中枢神経系および呼吸系への影響は認められなかった。消化器機能への影響を評価した試験では，消化管輸送能への影響は認められなかったが，高用量投与時にのみ胃液の分泌量および酸度の変化が認められ，胃刺激性が示された。これらの試験から，ツカチニブの潜在的リスクは示されなかった。

ツカチニブを静脈内投与したときの CL はラットで中程度であり，カニクイザルでは高く肝血流量を上回った。1 日 2 回反復経口投与後，概してツカチニブの曝露量は用量の増加に伴って増加し，投与初日から最終投与日の間に曝露量の増加がみられた。

血漿蛋白結合率はヒトで 97.1%であり，いずれの動物種においても 93%を上回った。Long Evans ラットを用いた組織分布試験では，[^{14}C]ツカチニブ由来の放射能が投与後 1 時間までに広範な組織にわたって分布し，多くの組織で投与後 168 時間までに消失した。最終測定時点である投与後 672 時間では，放射能が検出されたのは雌雄共にぶどう膜および眼のみであった。なお，カニクイザルを用いた毒性試験において眼への影響はみられていない（CTD 2.6.6）。[^{14}C]ツカチニブを頭蓋内 BT-474 腫瘍移植マウスに経口投与したところ，放射能の脳への分布は限定的であったものの，腫瘍移植領域に優先的に分布した。転移性脳腫瘍存在下では，弱塩基性薬物の

排出減少，排出トランスポーター発現低下，血液脳関門のタイトジャンクション障害などから，生理的状況下に比べて中枢への分布が増強される可能性が考えられる。

ツカチニブは主に CYP2C8（ONT-993 を生成），次いで CYP3A4 などの複数の薬物代謝酵素によって代謝されることが示された。ヒト試料を用いた in vitro 評価により同定された代謝物は，いずれも 1 種以上の非臨床動物種由来試料を用いた試験でも認められた。総薬物関連物質の 10%を超える代謝物は認められず，主代謝物である ONT-993 の HER2 に対する効力はツカチニブと比較して低く，また，EGFR 阻害能は顕著に低かった。したがって，ツカチニブをヒトに投与したときの有効性および安全性に対する代謝物の寄与は軽微なものと考えられた。

ラット，カニクイザルおよびヒトに[^{14}C]ツカチニブを単回経口投与後に放射能の多くは代謝物として糞便中に回収され，ツカチニブの主な消失経路は代謝および胆汁排泄であることが示された。ツカチニブの尿中排泄は限定的であった。ヒトのマスバランス試験では，回収された糞便中の代謝物および尿中の放射能の合計から，投与量の 70%超が吸収されたことが示唆された。

ツカチニブによる P450 誘導はみられなかったが，CYP2C8，CYP2C9 および CYP3A に対する阻害が認められた。また，ツカチニブおよび ONT-993 の CYP3A に対する時間依存的阻害が認められた。臨床薬物相互作用試験において，ミダゾラムおよびレパグリニドの曝露量はツカチニブとの併用によりそれぞれ約 5.7 倍および約 1.7 倍に増加した。ツカチニブは P-gp および BCRP の基質であり，また，腎トランスポーターOCT2，MATE1 および MATE2-K を in vitro で阻害した。ツカチニブおよびメトホルミンを用いた臨床薬物相互作用試験で観察された血清クレアチニンの増加は，OCT2 および MATE1 を介したクレアチニンの尿細管分泌に対するツカチニブの阻害によるものと考えられたものの，腎機能に影響を与えなかった。構築した PBPK モデルによる解析の結果，ツカチニブを臨床用量投与時に得られる曝露量において，CYP2C9，OATP1B1，OATP1B3 および UGT1A1 を阻害する可能性は低いと予測された。

ツカチニブの毒性プロファイルは一連の非臨床試験により十分に特徴付けられた。ラットを用いた単回投与毒性試験では，ツカチニブを最高 300 mg/kg の用量で単回投与したときの忍容性が示された。ラットおよびサルを用いた反復投与毒性試験では，用量制限毒性として死戦期にみられた重篤な状態悪化または水様便などを含む消化管毒性を示唆する一般状態変化がみられた。標的臓器として消化管，肝臓，生殖器（雌ラット），骨格筋および乳腺（雄ラット）が特定された。HER2 ファミリーに属する受容体を標的とする他の薬剤投与でも下痢は認められていることから，ツカチニブの消化管への影響は薬理作用に関連する変化である可能性が考えられた。その他の臓器でみられた所見とツカチニブの薬理作用との関連性は不明である。13 週間投与毒性試験のラットの STD10 およびカニクイザルの HNSTD における C_{max} はそれぞれ 6.36 および 1.83 µg/mL，AUC_{12h} はそれぞれ 41.1 および 9.92 µg•h/mL であった。なお，ヒトに本申請の用量である 300 mg を 1 日 2 回経口投与したときの C_{max} および AUC_{12h} はそれぞれ 0.667 µg/mL および 3.47 µg•h/mL であった（Table 1）。

ツカチニブは遺伝毒性および光毒性を示さなかった。一方で，ツカチニブの投与に関連する胚・胎児毒性が認められた。ツカチニブはウサギに対して催奇形性を示し，この時の曝露量は臨床曝露量と同程度であった。HER2 は胚発生に不可欠であることから，ツカチニブの催奇形性

は HER2 阻害に起因するものと考えられた。ツカチニブの分解物/不純物の毒性は示されなかった。

以上のように，今回の申請にあたり，ツカチニブの効果および安全性に関する特徴を明らかにする目的で，薬理，薬物動態および毒性の各非臨床試験を実施した。ツカチニブの非臨床プロファイルは十分に特徴付けられ，得られた結果はツカチニブの臨床使用を裏付けるものと考えられた。

6. 参考文献

[1] Cronin KA, Harlan LC, Dodd KW, et al. Population-based estimate of the prevalence of HER-2 positive breast cancer tumors for early stage patients in the US. Cancer Invest. 2010;28(9):963-8.

[2] Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. Lancet. 2017;389(10087):2415-29.

[3] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987;235(4785):177-82.

[4] Junttila TT, Akita RW, Parsons K, et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. Cancer Cell. 2009;15(5):429-40.

[5] Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, et al. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). Semin Oncol. 1999;26(4 Suppl 12):60-70.

[6] Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. Exp Cell Res. 2003;284(1):54-65.

[7] Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. EMBO J. 2000;19(13):3159-67.

[8] Riese DJ, 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. Bioessays. 1998;20(1):41-8.

[9] Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. Cell. 2002;110(6):669-72.

[10] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2(2):127-37.

[11] Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh SC, et al. Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. EMBO J. 1987;6(3):605-10.

[12] Halilovic A, Verweij DI, Simons A, et al. HER2, chromosome 17 polysomy and DNA ploidy status in breast cancer; a translational study. Sci Rep. 2019;9(1):11679.

[13] Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, et al. Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. Nature. 2008;456(7222):663-6.

[14] Lahusen T, Henke RT, Kagan BL, et al. The role and regulation of the nuclear receptor co-activator AIB1 in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2009;116(2):225-37.

[15] Vranic S, Teruya B, Repertinger S, et al. Assessment of HER2 gene status in breast carcinomas with polysomy of chromosome 17. Cancer. 2011;117(1):48-53.

[16] Varga Z, Noske A, Ramach C, et al. Assessment of HER2 status in breast cancer: overall positivity rate and accuracy by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in a single institution over 12 years: a quality control study. BMC Cancer. 2013;13:615.

[17] Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. J Clin Oncol. 2018;36(20):2105-22.

[18] Barros FFT, Powe DG, Ellis IO, et al. Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments. Histopathology. 2010;56(5):560-72.

[19] Dankort D, Maslikowski B, Warner N, et al. Grb2 and Shc adapter proteins play distinct roles in Neu (ErbB-2)-induced mammary tumorigenesis: implications for human breast cancer. Mol Cell Biol. 2001;21(5):1540-51.

[20] Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, et al. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. Cancer Res. 2008;68(14):5878-87.

[21] Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. Breast Cancer Res. 2001;3(6): 385-9.

[22] Prigent SA, Gullick WJ. Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. EMBO J. 1994;13(12):2831-41.

[23] Kuksis M, Gao Y, Tran W, et al. The incidence of brain metastases among patients with metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Neuro Oncol. 2021;23(6):894-904.

[24] Gerstner ER, Fine RL. Increased permeability of the blood-brain barrier to chemotherapy in metastatic brain tumors: establishing a treatment paradigm. J Clin Oncol. 2007;25(16):2306-12.

[25] Fortin D. The blood-brain barrier: its influence in the treatment of brain tumors metastases. Curr Cancer Drug Targets. 2012;12(3):247-59.

[26] Li J, Wu J, Bao X, et al. Quantitative and Mechanistic Understanding of AZD1775 Penetration across Human Blood–Brain Barrier in Glioblastoma Patients Using an IVIVE–PBPK Modeling Approach. Clin Cancer Res. 2017;23(24):7454-66.

[27] Kabraji S, Ni J, Lin NU, et al. Drug resistance in HER2-positive breast cancer brain metastases: Blame the barrier or the brain? Clin Cancer Res. 2018;24(8):1795-804.

[28] Lucas JN, Rudmann DG, Credille KM, et al. The rat mammary gland: morphologic changes as an indicator of systemic hormonal perturbations induced by xenobiotics. Toxicol Pathol. 2007;35(2):199-207.

[29] Rudmann DG, Foley GL. Chapter 60. Female reproductive system. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, 3rd ed. 2013:2599-663.

[30] Cooper O, Vlotides G, Fukuoka H, et al. Expression and function of ErbB receptors and ligands in the pituitary. Endocr Relat Cancer. 2011;18(6):R197-211.

[31] Fukuoka H, Cooper O, Mizutani J, et al. HER2/ErbB2 receptor signaling in rat and human prolactinoma cells: strategy for targeted prolactinoma therapy. Mol Endocrinol. 2011;25(1):92-103.

[32] Hall AP, Elcombe CR, Foster JR, et al. Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes--conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. Toxicol Pathol. 2012;40(7):971-94.

[33] Lee KF, Simon H, Chen H, et al. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. Nature. 1995;378(6555):394-8.

[34] Chan R, Hardy WR, Laing MA, et al. The catalytic activity of the ErbB-2 receptor tyrosine kinase is essential for embryonic development. Mol Cell Biol. 2002;22(4):1073-8.