1. 緒言

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。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。

ツカチニブは，in vitro 試験において HER2 に対する強力な阻害作用を示し，細胞内シグナル伝達の評価試験では，HER2 と同じく ErbB キナーゼファミリーに属するチロシンキナーゼである上皮増殖因子受容体（EGFR）と比較し，HER2 に対する選択性は 1000 倍を上回った。ツカチニブは，in vitro 試験および in vivo 試験（ツカチニブ単独投与，もしくはトラスツズマブまたはドセタキセルとの併用投与）において抗腫瘍活性を示した。また，マウス頭蓋内腫瘍異種移植モデルにおいても効果が認められた。

ツカチニブの評価に用いた動物種における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，尿中排泄は限定的であった。ツカチニブは主に CYP2C8 によって代謝され，主要代謝物である ONT-993 を含め，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。In vitro 試験においてツカチニブは P-gp および BCRP の基質となることが示唆され，CYP2C8，CYP2C9，CYP3A，OCT2，MATE1，MATE2-K などに対する阻害作用が認められた。

ツカチニブの毒性プロファイルは一連の毒性試験により十分に明らかとなり，認められた所見は概ね作用機序から予想された変化，または他の抗 HER2 薬の毒性プロファイルと一致していた。

これまでに実施した非臨床試験の成績は，ツカチニブの臨床使用を裏付けるものと考えられた。

ツカチニブの効能・効果および用法・用量ならびに化学構造式は添付文書（案）（CTD 1.8.1）に記載した。

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 3
略号および用語の定義一覧 5
1. まとめ 7
1.1. ツカチニブの HER2 チロシンキナーゼ選択性 7
1.2. ツカチニブの HER2 選択的阻害を介した細胞毒性作用 8
1.3. HER2 陽性腫瘍移植モデル動物におけるツカチニブの作用 8
1.4. ツカチニブの安全性薬理試験 9
2. 効力を裏付ける試験 9
2.1. ツカチニブの作用機序 9
2.1.1. ツカチニブの HER2 キナーゼ活性に対する選択的阻害能 9
2.1.2. BT-474 細胞における HER2 キナーゼ活性に対するツカチニブの阻害能 11
2.1.3. 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 12
2.1.4. HER2 キナーゼ下流シグナル伝達に対するツカチニブの影響 12
2.2. ツカチニブの抗腫瘍効果を評価する in vitro 試験 18
2.2.1. 各種 HER2 陽性乳癌細胞株に対するツカチニブの増殖抑制作用 18
2.2.2. HER2 発現細胞株および EGFR 発現細胞株に対するツカチニブの細胞毒性作用 20
2.3. ツカチニブの抗腫瘍効果を評価する in vivo 薬理試験 21
2.3.1. 3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルにツカチニブを単独投与したときの抗腫瘍効果 21
2.3.2. 3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルにおけるツカチニブの ErbB2 リン酸化阻害 23
2.3.3. BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを単独投与したときの抗腫瘍効果 25
2.3.4. 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 26
2.3.5. BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブとトラスツズマブまたはドセタキセルを併用投与したときの抗腫瘍効果 28
2.3.6. 種々の HER2 陽性腫瘍異種移植モデルにツカチニブとトラスツズマブを併用投与したときの抗腫瘍効果 32
2.4. ツカチニブの水酸化代謝物 ONT-993 の薬理活性評価 34
2.4.1. ONT-993 の HER2 キナーゼ活性阻害能 35
2.4.2. BT-474 細胞における HER2 キナーゼ活性に対する ONT-993 エナンチオマーの阻害能 35

2.4.3. BT-474 細胞および A431 細胞に対する ONT-993 エナンチオマーの細胞毒性作用 37
3. 副次的薬理試験 38
3.1. 各種キナーゼに対するツカチニブの作用 38
3.2. 各種キナーゼに対する ONT-993 の作用 39
4. 安全性薬理試験 40
4.1. hERG チャネルに対する影響の評価 40
4.2. テレメトリーを用いたサルにおける心血管系評価 41
4.3. Irwin 法による行動および生理学的機能への影響の評価 41
4.4. 呼吸系への影響の評価 41
4.5. 胃液分泌への影響の評価 42
4.6. 消化管輸送能への影響の評価 42
4.7. ツカチニブの経口投与胃刺激性試験 42
5. 薬力学的薬物相互作用試験 43
6. 考察及び結論 43
6.1. ツカチニブの HER2 チロシンキナーゼ選択的阻害能 43
6.2. ツカチニブの HER2 阻害による細胞毒性作用 44
6.3. HER2 陽性腫瘍移植モデルにツカチニブを単独または併用投与したときの抗腫瘍効果 44
6.4. 頭蓋内 HER2 陽性腫瘍に対するツカチニブの効果 45
6.5. ツカチニブの安全性薬理試験成績 46
6.6. 結論 46
7. 図表 46
参考文献 47

LIST OF TABLES

Table 1. HER2，EGFR および HER4 に対するツカチニブの効力 10
Table 2. BT-474 細胞における HER2，HER3，AKT，ERK1/2 および MEK1 のリン酸化に対するツカチニブの EC_{50} 値 13
Table 3. 各種 HER2 陽性乳癌由来細胞株に対するツカチニブおよび T-DM1 の細胞毒性活性 19
Table 4. BT-474 細胞および A431 細胞に対するツカチニブの細胞毒性活性 21

Table 5. 3T3-rErbB2 腫瘍同種移植マウスを用いたツカチニブの腫瘍中 ErbB2 チロシンキナーゼリン酸化阻害 24
Table 6. 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 25
Table 7. BT-474 腫瘍異種移植モデルに対し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きの抗腫瘍効果 30
Table 8. HER2 陽性のヒト腫瘍細胞または患者由来腫瘍異種移植モデルにおけるツカチニブ，トラスツズマブ，またはツカチニブ/トラスツズマブ併用の抗腫瘍効果 33
Table 9. HER2 および EGFR に対する ONT-993 の効力 35
Table 10. BT-474 細胞における HER2 リン酸化に対するツカチニブおよび ONT-993 エナンチオマーの阻害活性：IC_{50} 値 36
Table 11. ツカチニブおよび ONT-993 エナンチオマーの BT-474 細胞および A431 細胞毒性作用 38
Table 12. ツカチニブが 75%超の阻害活性を示したキナーゼ 39
Table 13. ONT-993 が 50%超の阻害活性を示したキナーゼ 39
Table 14. ツカチニブの安全性薬理試験一覧 40

LIST OF FIGURES

Figure 1. ツカチニブの構造 10
Figure 2. BT-474 細胞における HER2 リン酸化に対するツカチニブの阻害能 11
Figure 3. 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 12
Figure 4. HER2 介在性の細胞内シグナル伝達に対して想定されるツカチニブの作用機序 13
Figure 5. BT-474 細胞における HER2，HER3，AKT，ERK1/2 および MEK1 のリン酸化に対するツカチニブの影響 14
Figure 6. BT-474 細胞をツカチニブ単独またはトラスツズマブと併用で処理したときの HER3 リン酸化への影響 15
Figure 7. BT-474 細胞をツカチニブ単独またはトラスツズマブと併用で処理したときの AKT リン酸化への影響 15
Figure 8. BT-474 細胞をツカチニブ単独またはトラスツズマブと併用で処理したときの HER2 リン酸化への影響 16
Figure 9. BT-474 細胞をツカチニブ単独またはトラスツズマブと併用で処理したときの ERK1/2 リン酸化への影響 16
Figure 10. BT-474 細胞をツカチニブ単独またはトラスツズマブと併用で処理したときの MEK1 リン酸化への影響 17

Figure 11. ツカチニブ単独またはトラスツズマブとの併用処理による BT-474 細胞のアポトーシス亢進 18
Figure 12. 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 20
Figure 13. 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 21
Figure 14. 3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルにツカチニブを 1 日 2 回投与したときの腫瘍増殖抑制 22
Figure 15. 3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルにツカチニブを 1 日 1 回投与したときの腫瘍増殖抑制 23
Figure 16. 3T3-rErbB2 腫瘍同種移植マウスにおけるツカチニブの ErbB2 リン酸化阻害の濃度反応性 24
Figure 17. BT-474 腫瘍異種移植モデルにおけるツカチニブの用量依存的な抗腫瘍効果 26
Figure 18. 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 27
Figure 19. 頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを経口投与したときの脳中リン酸化 HER2 レベルの変化 28
Figure 20. 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 31
Figure 21. BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを単独投与，またはドセタキセルと併用投与したときの抗腫瘍効果 31
Figure 22. ツカチニブの水酸化代謝物 ONT-993 およびエナンチオマーの化学構造 34
Figure 23. BT-474 細胞における HER2 リン酸化に対するツカチニブおよび ONT-993 エナンチオマーの阻害活性：濃度反応曲線 36
Figure 24. A431 細胞における EGFR リン酸化に対するツカチニブおよび ONT-993 エナンチオマーの阻害活性：濃度反応曲線 37
Figure 25. ONT-993 エナンチオマーの BT-474 細胞および A431 細胞に対する細胞毒性の濃度反応性 38

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
ATP	adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
BCRP	breast cancer resistance protein
CDX	cell line derived xenograft：ヒト腫瘍細胞株異種移植モデル
CR	complete regression：完全奏功
DMSO	dimethylsulfoxide：ジメチルスルホキシド
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
HPLC	high-performance liquid chromatography：高速液体クロマトグラフィー
HRP	horseradish peroxidase：西洋ワサビペルオキシダーゼ
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration：50%阻害濃度
IC_{90}	90% inhibitory concentration：90%阻害濃度
IP	Intraperitoneal：腹腔内投与
IV	Intravenous：静脈内投与
Km	ミカエリス定数
MAP	mitogen-activated protein：分裂促進因子活性化タンパク質
MFI	mean fluorescence intensity：平均蛍光強度
MTV	mean tumor volume：平均腫瘍体積
NA	not applicable：該当なし
ND	not determined：測定せず
Net TGI	net tumor growth inhibition：腫瘍増殖抑制率（比ベースライン）
NOEL	no observed effect level：無影響量
PDX	patient derived xenograft：患者由来腫瘍異種移植モデル
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
PO	Orally：経口投与
PR	partial regression：部分奏功
Q3D	once every three days：3 日に 1 回
QD	once daily：1 日 1 回
qFACS	quantitative flow cytometry：定量的フローサイトメトリー

略号，用語	省略していない表現または定義
QT	time from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave in the electrocardiogram：心電図上の QRS 群の開始から T 波の終了までの時間
QTc	QT interval, corrected for heart rate：心拍数で補正した QT 間隔
QW or QWK or Q7D	once weekly：1 週間に 1 回
T-DM1	trastuzumab emtansine：トラスツズマブ・エムタンシン
TFS	tumor-free survivors：無腫瘍生存例
%TGD	% of tumor growth delay：腫瘍増殖遅延率
TGI	tumor growth inhibition：腫瘍増殖抑制率
TTE	time to endpoint：腫瘍が既定の体積に達するまでの期間

1. まとめ

ツカチニブ（一部の図表において ONT-380，ARRY-380 または AR00432380 とも表記）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。In vitro 試験において HER2 に対する強力な阻害作用を示し，細胞内シグナル伝達の評価試験では，HER2 と同じく ErbB キナーゼファミリーに属するチロシンキナーゼである上皮増殖因子受容体（EGFR）と比較し，HER2 に対する選択性は 1000 倍を上回った。

ツカチニブは，in vitro 試験および in vivo 試験（ツカチニブ単独投与，もしくはトラスツズマブまたはドセタキセルとの併用投与）において抗腫瘍活性を示した。また，マウス頭蓋内腫瘍異種移植モデルにおいても効果が認められた。

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，ツカチニブの作用機序を検討した。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，もしくはドセタキセルまたはトラスツズマブと併用投与し，ツカチニブの薬効薬理を評価した。これらの試験から，ツカチニブは HER2 の強力かつ選択的な阻害薬であり，ErbB キナーゼファミリーに属する EGFR および HER4（ErbB4）に対する活性は限られていることが示された。また，HER2 陽性腫瘍異種移植モデルでは，ツカチニブの単独投与，もしくはドセタキセルまたはトラスツズマブとの併用投与により，良好な忍容性を示す用量での腫瘍増殖抑制または退縮が認められた。マウス頭蓋内腫瘍モデルでは，ツカチニブは HER2 がリン酸化するのを阻害し，生存率の改善が示された。

1.1. ツカチニブの HER2 チロシンキナーゼ選択性

精製組換えプロテインキナーゼを用いた生化学的評価では，HER2 に加え，ErbB キナーゼファミリーに属する EGFR および HER4 に対する阻害能を評価した（試験報告書：TRN-5457）。なお，HER3（ErbB3）はキナーゼ活性を欠くことから評価の対象としなかった。また，各種セリン/スレオニンキナーゼおよびチロシンキナーゼを含む 223 種の精製ヒトプロテインキナーゼに対するツカチニブの阻害能を評価した（試験報告書：TRN-5457）。これらの試験の結果，ツカチニブは，EGFR や HER4 を含む他のキナーゼと比較して，HER2 に対して強力かつ選択的な阻害作用を有することが示された。

HER2 を過剰発現するヒト乳癌由来細胞株 BT-474 または EGFR を過剰発現するヒト上皮様細胞癌由来細胞株 A431 を用い，細胞内シグナル伝達試験を実施して HER2 および EGFR に対するツカチニブの阻害活性を評価した。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（試験報告書：TRN-5444，TRN-5477，TRN-5480）。さらに，ツカチニブによる HER2 キナーゼ活性化の選択的阻害により，HER2 過剰発現細胞における HER3 リン酸化の抑制，ならびに MAP キナーゼ（ERK1/2 および MEK1）および PI3 キナーゼ（AKT）シグナル伝達経路を介した下流シグナル伝達の抑制が認められた（試験報告書：TRN-5517）。ERK1/2 および MEK1 リン酸化抑制は HER2 ホモ二量体の阻害に，AKT リン酸化抑制は HER2/HER3 ヘテロ二量体の阻害によるものと考えられた。HER2 を標的とし，HER3 のリン酸化を阻害する抗体であるトラスツズマブとツカチニブの併用を評価した細胞内シグナル伝達試験では，BT-474 細胞における HER3 リン酸化が併用によりさらに減少し，アポトーシスが増加した（試験報告書：TRN-5517）。この試験結果は，トラスツズマブと

ツカチニブを併用投与することでさらなる抗腫瘍効果がもたらされた in vivo 試験の成績と符合するものであった（試験報告書：TRN-5452，TRN-5550，TRN-5551，TRN-5552，TRN-5553）。

以上の試験成績から，ツカチニブが EGFR と比較して HER2 を選択的に阻害し，それにより，細胞の増殖や生存に寄与するシグナル伝達物質のリン酸化を抑制することが示された。一方，ラパチニブ[1]やネラチニブ[2]などの HER2 チロシンキナーゼ阻害薬は，HER2 と EGFR に対して同程度の酵素阻害を示し，HER2 過剰発現細胞と EGFR 過剰発現細胞におけるシグナル伝達因子のリン酸化阻害の程度は類似していたことが報告されており，ツカチニブの選択性に関する試験成績はこれらの HER2 チロシンキナーゼ阻害薬とは異なるものであった。

1.2. ツカチニブの HER2 選択的阻害を介した細胞毒性作用

HER2 に対するツカチニブの効力と選択性は，BT-474 細胞の増殖が数 nmol/L レベルの低濃度のツカチニブによって阻害されるのに対し，A431 細胞では，細胞増殖を阻害するために必要なツカチニブ濃度が 500 倍以上高かったことを示す試験成績によってさらに裏付けられた（試験報告書：TRN-5456，TRN-5444）。また，種々の HER2 発現レベルを示す 22 種類の乳癌由来細胞株を用いた細胞毒性活性評価において，ツカチニブの効力は細胞の HER2 発現レベルに相関した（試験報告書：TRN-5430）。これらの試験成績は，1.1 項の細胞内シグナル伝達試験の結果と合わせて，ツカチニブが in vitro において HER2 の選択的阻害を介して強力な抗腫瘍効果をもたらすことを示している。

1.3. HER2 陽性腫瘍移植モデル動物におけるツカチニブの作用

種々の in vivo 薬理試験において，ツカチニブの単独投与，および他の抗がん剤との併用投与により，マウスに移植された HER2 陽性腫瘍細胞の増殖に対するツカチニブの阻害能が示された。ツカチニブは，活性型 ErbB2 発現 NIH 3T3（3T3-rErbB2）細胞移植マウスにおいて腫瘍細胞増殖を阻害し（試験報告書：TRN-5453），HER2 リン酸化阻害の IC_{90} 値は 1830 ng/mL であった（試験報告書：TRN-5458）。また，BT-474 腫瘍異種移植モデルマウスにツカチニブを 25，50 または 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回単独投与したところ，いずれの用量群においても腫瘍増殖抑制が認められた（試験報告書：TRN-5454）。ツカチニブは頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルでも有効であり，生存率の上昇がみられた。また，ツカチニブ投与群の脳中のリン酸化 HER2 量が対照群と比べて減少しており，ツカチニブによる BT-474 腫瘍組織における HER2 リン酸化阻害が示唆された（試験報告書：TRN-5455）。

BT-474 腫瘍異種移植モデルマウスにツカチニブとトラスツズマブまたはドセタキセルを併用投与したところ，各被験物質の単独投与と比べて顕著な抗腫瘍効果が示され，腫瘍退縮が認められた（試験報告書：TRN-5452）。乳癌腫瘍モデルに加えて，HER2 陽性の大腸癌（試験報告書：TRN-5550），食道癌および胆管癌（試験報告書：TRN-5551）ならびに胃癌（試験報告書：TRN-5552，TRN-5553）由来細胞株移植モデルマウス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場合においても抗腫瘍活性が示され，概ね単独投与と比べて併用投与でより顕著な効果が認められた。

上記のとおり，in vitro および in vivo 薬効薬理試験の結果から，ツカチニブは HER2 キナーゼ活性の強力かつ選択的な阻害薬であり，ツカチニブによる HER2 シグナル伝達の選択的阻害が，

中枢神経系転移のモデルを含む HER2 陽性腫瘍モデル動物において抗腫瘍効果をもたらすことが示された。

なお，ツカチニブに加え，ツカチニブの主要な代謝物である ONT-993（ヒト曝露量は総薬物関連物質の 10%未満）についても，生化学的評価および細胞を用いた in vitro 試験を実施した。これらの試験の結果，ツカチニブには劣るものの，ONT-993 は HER2 キナーゼ活性に対する選択的な阻害作用を有し（試験報告書：TRN-5457），HER2 過剰発現細胞における HER2 シグナル伝達および細胞増殖の阻害作用を有することが示された（試験報告書：TRN-5444）。

1.4. ツカチニブの安全性薬理試験

ツカチニブの安全性薬理試験として，心血管系［human ether-à-go-go-related gene（hERG）チャネル，in vivo テレメトリー］，消化器系（胃液分泌，消化管輸送能および胃刺激性），中枢神経系（Irwin 法）ならびに呼吸系（プレチスモグラフィー）の機能に対する影響を検討するために計 7 試験の Good Laboratory Practice（GLP）試験を実施した。ツカチニブの hERG チャネル機能に対する阻害作用は弱く（試験報告書：1140-031），サルを用いたテレメトリー試験において心機能異常は認められなかった（試験報告書：JAY00082）。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（試験報告書：AA37826）。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（試験報告書：AA37828），胃刺激性が示されたが（試験報告書：AA37827），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（試験報告書：AA37824）および呼吸系（試験報告書：AA37825）への影響を示さなかった。

2. 効力を裏付ける試験

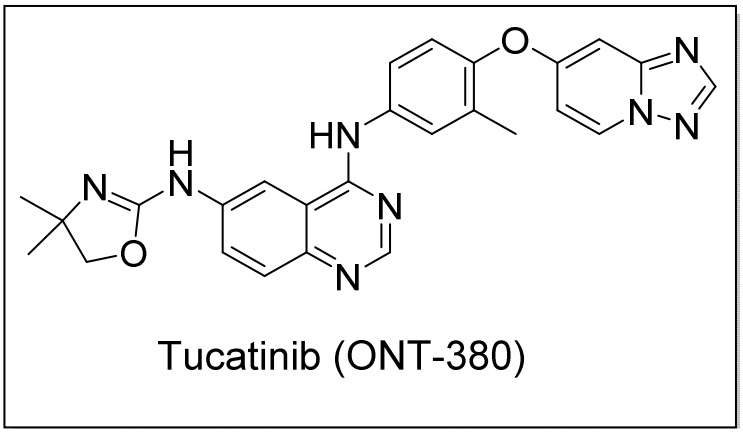
2.1. ツカチニブの作用機序

2.1.1. ツカチニブの HER2 キナーゼ活性に対する選択的阻害能

試験報告書：TRN-5457，概要表：CTD 2.6.3.3

ツカチニブは，4,6-キナゾリンジアミン構造を有するチロシンキナーゼ阻害薬であり（Figure 1），キナゾリンコアを有する他のチロシンキナーゼ阻害薬（例えばゲフィチニブ，エルロチニブ，ラパチニブ，アファチニブなどの ErbB キナーゼファミリー受容体に対する阻害薬）と構造的に類似している[3]。

Figure 1.　ツカチニブの構造



ツカチニブの化学式：(N4-(4-([1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-7-yloxy)-3-methylphenyl)-N6-(4,4-dimethyl-4,5-dihydrooxazol-2-yl)quinazoline-4,6-diamine)

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。HER3 はキナーゼ活性を欠くことから[4]，評価の対象にしなかった。試験には精製完全長 EGFR，HER2 プロテインキナーゼ領域（691～1255 番目アミノ酸）および HER4 プロテインキナーゼ領域（706～991 番目アミノ酸）を使用した。15 µmol/L のアデノシン三リン酸（ATP）および基質として poly-Glu:Tyr を用いて反応させ，西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）を結合させたリン酸化チロシン特異的モノクローナル抗体 PY20 を用いてリン酸化チロシン量を酵素結合免疫吸着（ELISA）法により測定した。2 バッチのツカチニブを評価に用いた。Ki 値は，50%阻害濃度（IC_{50}）値を計算式 $Ki = IC_{50}/(1+[ATP]/Km)$ に当てはめて求めた。

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（Table 1）。この結果から，ツカチニブは HER2 に対して強力な阻害作用を有し，EGFR および HER4 と比較して HER2 に対して選択性が高いことが示された。

Table 1.　HER2，EGFR および HER4 に対するツカチニブの効力

バッチ番号	HER2 IC_{50} (nmol/L)	HER2 Ki (nmol/L)	EGFR IC_{50} (nmol/L)	EGFR Ki (nmol/L)	HER4 IC_{50} (nmol/L)	HER4 Ki (nmol/L)
AR00432380-[redacted]	22	2.6	94	73	289	239
	22	2.6			331	273
AR00432380-[redacted]	6.9	0.8	91	70	ND	ND

ND = 測定せず
生化学的手法によりツカチニブの HER2，EGFR および HER4 に対する阻害能を検討した。IC_{50} 値を求め，計算式 $Ki = IC_{50}/(1+[ATP]/Km)$ から各キナーゼに対する Ki 値を算出した。
出典：試験報告書 TRN-5457

また，種々の濃度のツカチニブ存在下での基質のリン酸化を経時的に測定することにより，ツカチニブによる HER2 阻害の時間依存性を検討した。分析の結果，ツカチニブの結合速度は緩徐であり，HER2 阻害の効力が高く nmol/L レベルであることを考えると，結果はツカチニブの

解離速度が非常に遅いことをとも一致した。ツカチニブと類似した構造を持つラパチニブは HER2 キナーゼドメインとの解離速度が非常に遅いことが報告されており[5]，本試験結果と一致した。

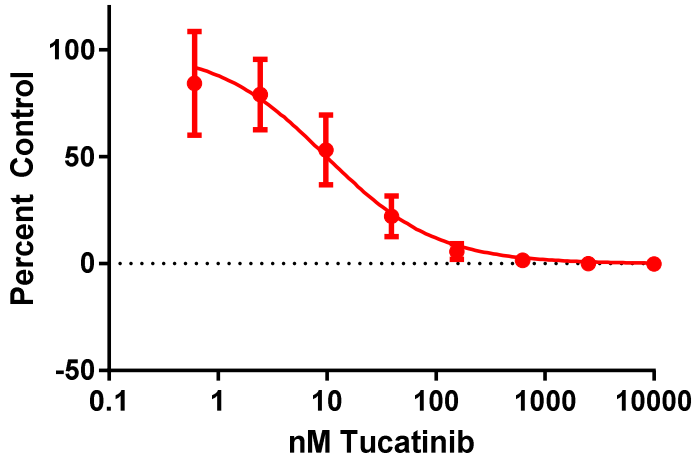
2.1.2. BT-474 細胞における HER2 キナーゼ活性に対するツカチニブの阻害能

試験報告書：TRN-5480，概要表：CTD 2.6.3.2

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するため，BT-474 細胞を用いた in vitro 試験を実施した。BT-474 細胞はヒト乳癌由来であり，HER2 遺伝子のゲノム重複（遺伝子増幅）を有し，細胞表面に HER2 タンパク質を高発現する[6]。このことから，HER2 チロシンキナーゼ阻害能の評価に適した細胞株と考えられ，ラパチニブ [1] およびネラチニブ [2] の評価においても BT-474 細胞が用いられている。

BT-474 細胞をツカチニブ（濃度範囲 0.61 nmol/L～10,000 nmol/L，4 倍段階希釈）で処理したのち，細胞抽出液中の総 HER2 タンパク質を HER2 抗体で捕捉し，リン酸化チロシン特異的モノクローナル抗体 PY20 を用いてリン酸化チロシン量を ELISA 法によって測定した。4 パラメータ非線形曲線に当てはめた濃度反応データから IC_{50} 値を算出した。IC_{50} 値は 9.88 nmol/L であり，ツカチニブは BT-474 細胞株における HER2 キナーゼ活性に対して強力な阻害能を有することが示された（Figure 2）。

Figure 2.　BT-474 細胞における HER2 リン酸化に対するツカチニブの阻害能



図中のプロットは 16 回の測定結果の平均値（±標準偏差）を示す。
出典：試験報告書 TRN-5480

なお，ツカチニブの主要代謝物である ONT-993 について，BT-474 細胞における HER2 リン酸化に対する阻害能を検討した試験（2.4.2 項）において，ツカチニブの HER2 リン酸化に対する IC_{50} 値は 12 nmol/L であり，当該試験と同程度の結果が得られた。

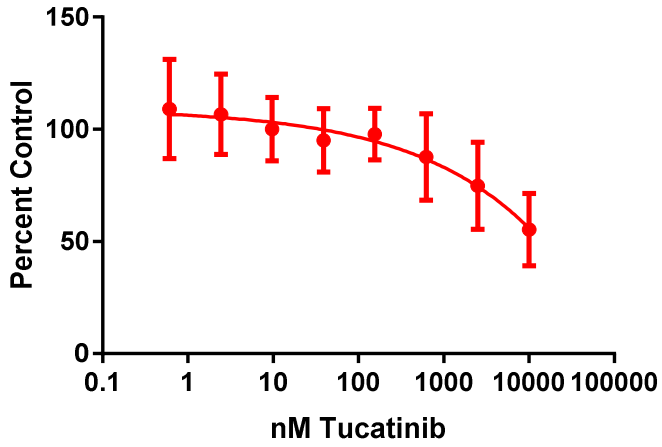
2.1.3. A431 細胞における EGFR キナーゼ活性に対するツカチニブの阻害能

試験報告書：TRN-5477，概要表：CTD 2.6.3.2

EGFR リン酸化に対するツカチニブの阻害能を，ヒト上皮様細胞癌由来細胞株 A431 を用いて評価した。A431 細胞は EGFR 遺伝子のゲノム重複を有し，EGFR タンパク質を高発現する[7]。

A431 細胞をツカチニブ（濃度範囲 0.61 nmol/L～10,000 nmol/L，4 倍段階希釈）で処理したのち，細胞抽出液中の総 EGFR タンパク質を EGFR 抗体で捕捉し，リン酸化チロシン特異的モノクローナル抗体 PY20 を用いてリン酸化チロシン量を ELISA 法によって測定した。4 パラメータ非線形曲線に当てはめた濃度反応データから IC_{50} 値を算出した。A431 細胞株における EGFR のキナーゼ活性に対するツカチニブの阻害能は弱く，IC_{50} 値は 13,220 nmol/L と推定された。

Figure 3.　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



図中のプロットは 13 回の測定結果の平均値（±標準偏差）を示す。
出典：試験報告書 TRN-5477

なお，A431 細胞における EGFR リン酸化に対する ONT-993 の阻害能を検討した試験（2.4.2 項）において，ツカチニブの EGFR リン酸化に対する IC_{50} 値は 10,000 nmol/L 超であり，当該試験の結果と符合するものであった。

2.1.4. HER2 キナーゼ下流シグナル伝達に対するツカチニブの影響

試験報告書：TRN-5517，概要表：CTD 2.6.3.2

ツカチニブは，HER2 チロシンキナーゼ活性を阻害し，HER2 および HER3 の下流シグナル因子である AKT，ERK1/2，MEK1 キナーゼのリン酸化を減少させることで，細胞の増殖や生存の促進シグナル伝達を阻害することが想定される（Figure 4）。このことを検証するために，BT-474 細胞をツカチニブで処理して，HER2，HER3，AKT，ERK1/2，および MEK1 キナーゼのリン酸化を測定した。

HER2，HER3，AKT，ERK1/2，および MEK1 キナーゼのリン酸化に対するツカチニブの作用を，Luminex 技術に基づくマルチプレックス抗体捕捉法により検討した。HER2 および HER3 のリン酸化は，各キナーゼの総リン酸化チロシン量を測定することによって決定した。AKT は，

AKT キナーゼ活性化により 473 番目のセリン残基（Ser473）のリン酸化を受け，PI3 キナーゼ経路を介したシグナル伝達に関連する[8]。また，ERK1/2 および MEK1 のリン酸化は，それぞれ 185 番目のトレオニン／187 番目のチロシン残基（Thr185/Tyr187）および 222 番目のセリン残基（Ser222）のリン酸化に基づく。BT-474 細胞におけるこれらのシグナル伝達因子に対するツカチニブの影響を検討した結果，いずれの因子もリン酸化が顕著に抑制された（Table 2 および Figure 5）。以上の結果，ツカチニブによる HER2 の選択的阻害が，HER2 ホモ二量体を起点とする MAP キナーゼ経路（ERK1/2，MEK1）および HER2/HER3 ヘテロ二量体を起点とする PI3 キナーゼ経路（AKT）の両方のシグナル伝達の抑制をもたらすことが示唆された。

Figure 4.　HER2 介在性の細胞内シグナル伝達に対して想定されるツカチニブの作用機序

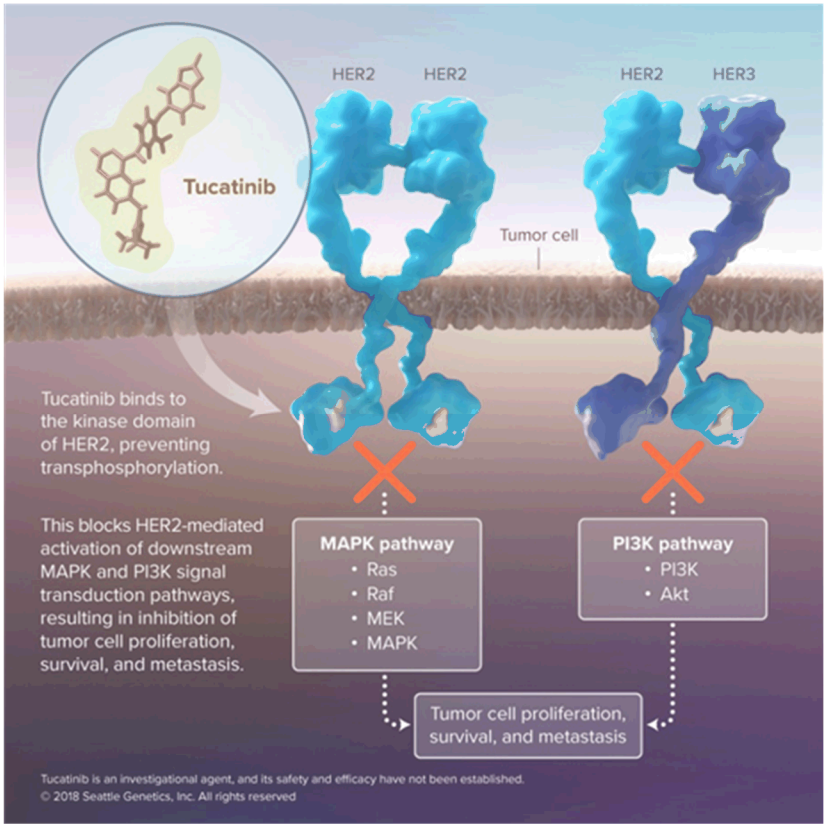
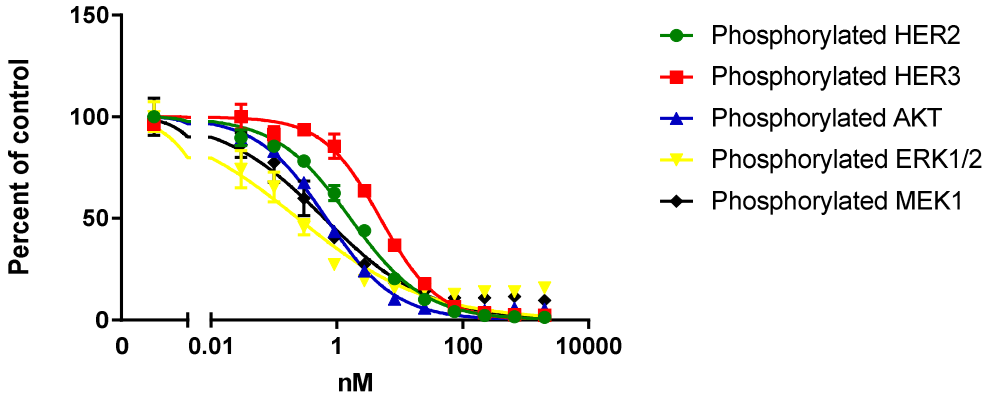


Table 2.　BT-474 細胞における HER2，HER3，AKT，ERK1/2 および MEK1 のリン酸化に対するツカチニブの EC_{50} 値

pHER2 EC_{50} (nmol/L)	pHER3 EC_{50} (nmol/L)	pAKT EC_{50} (nmol/L)	pERK1/2 EC_{50} (nmol/L)	pMEK1 EC_{50} (nmol/L)
1.63	4.9	0.68	0.24	0.63

EC_{50} 値は，BT-474 細胞における pHER2（総チロシンリン酸化 HER2），pHER3（総チロシンリン酸化 HER3），pAKT（リン酸化 Ser473），pERK1/2（リン酸化 Thr185/Tyr187）および pMEK1（リン酸化 Ser222）量のツカチニブ濃度反応曲線に基づく。
出典：試験報告書 TRN-5517

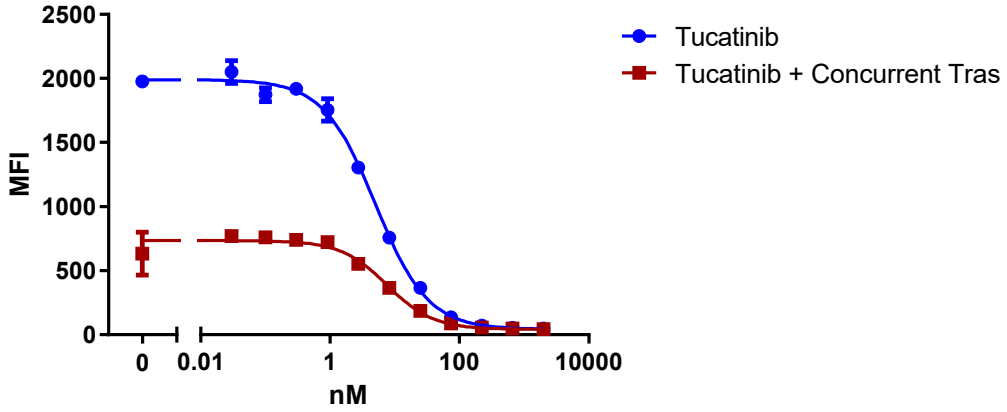
Figure 5.　BT-474 細胞における HER2，HER3，AKT，ERK1/2 および MEK1 のリン酸化に対するツカチニブの影響



BT-474 細胞にツカチニブを添加後，37°C で 2 時間インキュベートした。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5517

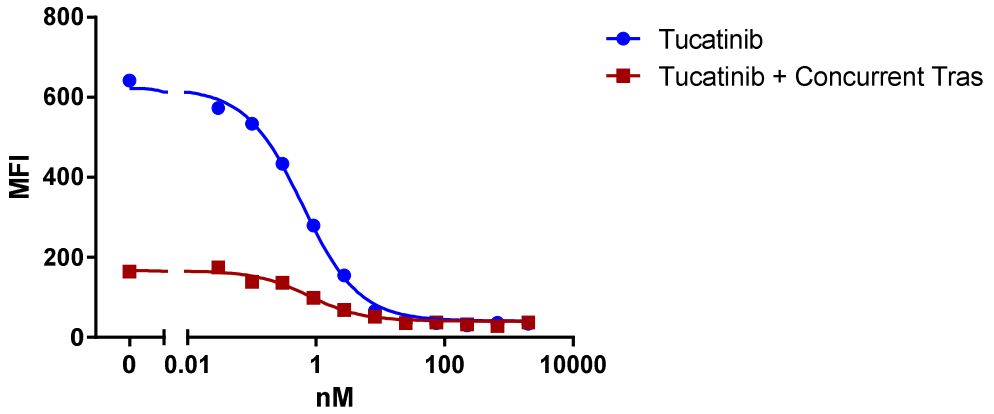
ツカチニブを HER2 抗体であるトラスツズマブ 150 µg/mL（1 µmol/L）と併用で BT-474 細胞を処理したときの HER2 下流シグナル伝達への影響について検討した。その結果，ツカチニブとトラスツズマブの併用により，単独での処理に比べて HER3 および AKT の両方のリン酸化のさらなる減少が認められた（Figure 6 および Figure 7）。一方，短時間のトラスツズマブ処理がホスファターゼ活性を誘導することを示す公表データ[9]と一致するような現象として，トラスツズマブは，2 時間のインキュベーション処理により HER2 リン酸化を促進し，下流因子である ERK1/2 および MEK1 のリン酸化を増加させた。しかしながら，ツカチニブとトラスツズマブの併用により，トラスツズマブによって促進された HER2，ERK1/2 および MEK1 のリン酸化のツカチニブ濃度に依存した減少が認められた（Figure 8，Figure 9 および Figure 10）。

Figure 6.　BT-474 細胞をツカチニブ単独またはトラスツズマブと併用で処理したときの HER3 リン酸化への影響



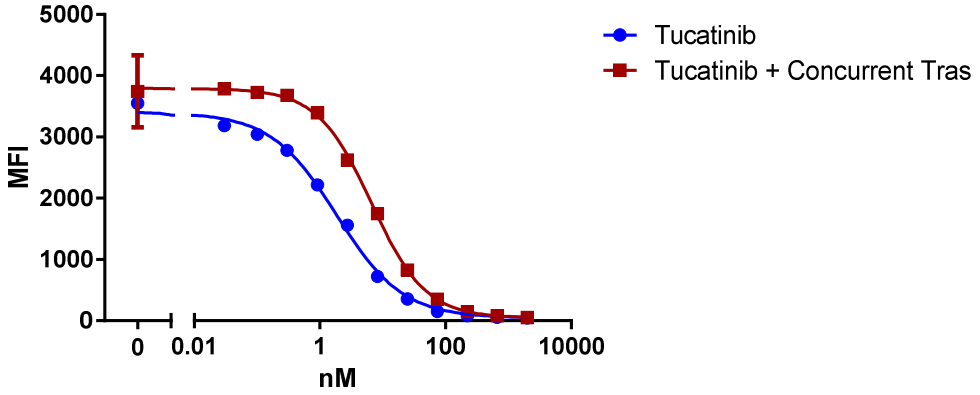
MFI：平均蛍光強度，Tras：トラスツズマブ
BT-474 細胞にツカチニブ単独，またはトラスツズマブ（1 µmol/L）と併用で添加後，37°C で 2 時間インキュベートした。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5517

Figure 7.　BT-474 細胞をツカチニブ単独またはトラスツズマブと併用で処理したときの AKT リン酸化への影響



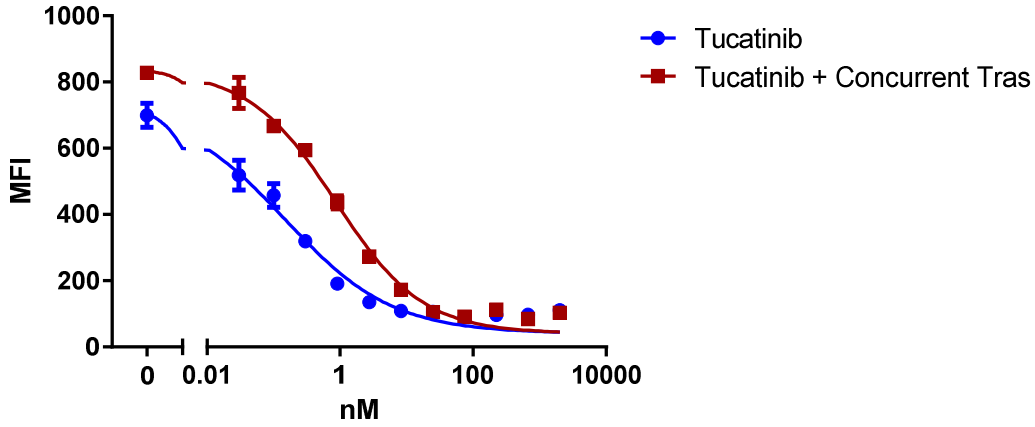
MFI：平均蛍光強度，Tras：トラスツズマブ
BT-474 細胞にツカチニブ単独，またはトラスツズマブ（1 µmol/L）と併用で添加後，37°C で 2 時間インキュベートした。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5517

Figure 8.　BT-474 細胞をツカチニブ単独またはトラスツズマブと併用で処理したときの HER2 リン酸化への影響



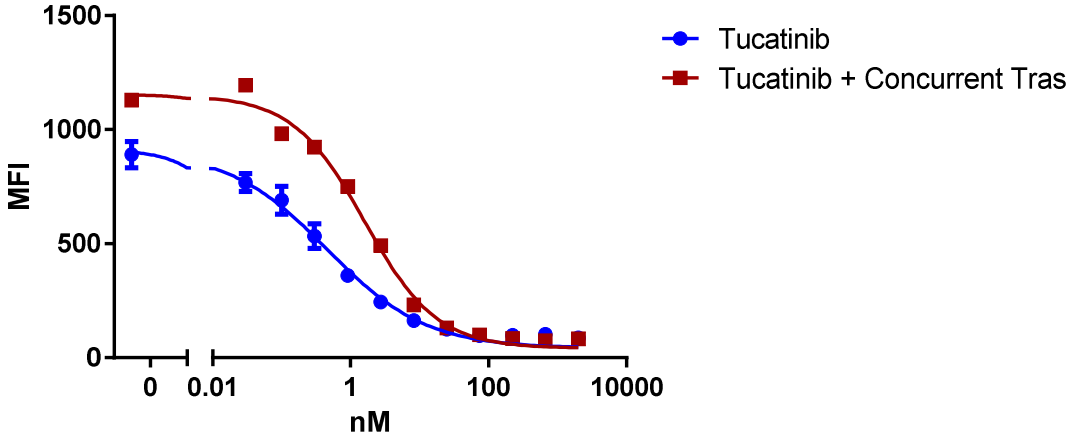
MFI：平均蛍光強度，Tras：トラスツズマブ
BT-474 細胞にツカチニブ単独，またはトラスツズマブ（1 µmol/L）と併用で添加後，37°C で 2 時間インキュベートした。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5517

Figure 9.　BT-474 細胞をツカチニブ単独またはトラスツズマブと併用で処理したときの ERK1/2 リン酸化への影響



MFI：平均蛍光強度，Tras：トラスツズマブ
BT-474 細胞にツカチニブ単独，またはトラスツズマブ（1 µmol/L）と併用で添加後，37°C で 2 時間インキュベートした。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5517

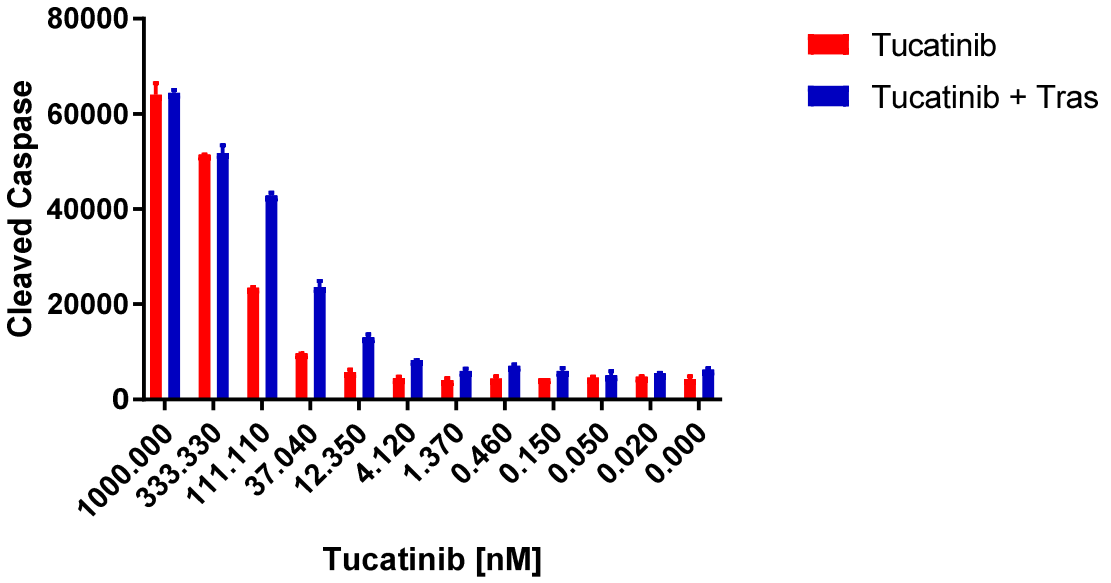
Figure 10.　BT-474 細胞をツカチニブ単独またはトラスツズマブと併用で処理したときの MEK1 リン酸化への影響



MFI：平均蛍光強度，Tras：トラスツズマブ
BT-474 細胞にツカチニブ単独，またはトラスツズマブ（1 µmol/L）と併用で添加後，37°C で 2 時間インキュベートした。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5517

さらに，種々の濃度のツカチニブを単独，またはトラスツズマブ（1 µmol/L）と併用で BT-474 細胞に添加し，細胞アポトーシスへの影響を検討した。各被験物質を添加後 18 時間にアポトーシスのマーカーであるカスパーゼ 3/7 切断を測定したところ，ツカチニブの濃度依存的な BT-474 細胞のアポトーシス亢進がみられ，トラスツズマブとの併用によりアポトーシスの誘導がさらに促進された（Figure 11）。

Figure 11.　ツカチニブ単独またはトラスツズマブとの併用処理による BT-474 細胞のアポトーシス亢進



BT-474 細胞にツカチニブ単独，またはトラスツズマブ（Tras：1 µmol/L）と併用で添加後，37°C で 18 時間インキュベートした。エラーバーは標準偏差を示す。
出典：試験報告書 TRN-5517

以上の試験成績より，ツカチニブによる BT-474 細胞における HER2 の選択的阻害が，PI3 キナーゼ経路（AKT）および MAP キナーゼ経路（MEK1，ERK1/2）の両経路の HER2 下流シグナル伝達の抑制をもたらすことが示された。ツカチニブとトラスツズマブの併用により，BT-474 細胞のアポトーシスの亢進が認められ，公表データ[10]と一致する結果が得られた。ツカチニブとトラスツズマブの併用によるアポトーシスの亢進は，細胞の生存に重要な調節因子である PI3 キナーゼ経路[11]の阻害が関与するものと考えられた。すなわち，HER3 リン酸化が阻害されることで（Figure 6）HER2 シグナル伝達に対する PI3 キナーゼ調節サブユニット p85 の応答が妨げられ，それに伴い PI3 キナーゼ活性のマーカーである AKT（Ser473）のリン酸化（Figure 7）が減少すると考えられた[11]。

2.2. ツカチニブの抗腫瘍効果を評価する in vitro 試験

2.2.1. 各種 HER2 陽性乳癌細胞株に対するツカチニブの増殖抑制作用

試験報告書：TRN-5430，概要表：CTD 2.6.3.2

HER2 発現数が異なる種々のヒト乳癌由来細胞株を用い，細胞の HER2 発現数とツカチニブに対する感受性の相関性について検討した。HER2 の発現は定量的フローサイトメトリー（qFACS）によって決定し，Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay により細胞内 ATP 量を定量することで，ツカチニブの各腫瘍細胞株の細胞生存能への影響を評価した。本試験に用いた各乳癌由来細胞株の細胞表面 HER2 発現数を Table 3 に示す。HER2 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）を陽性対照に用いた。

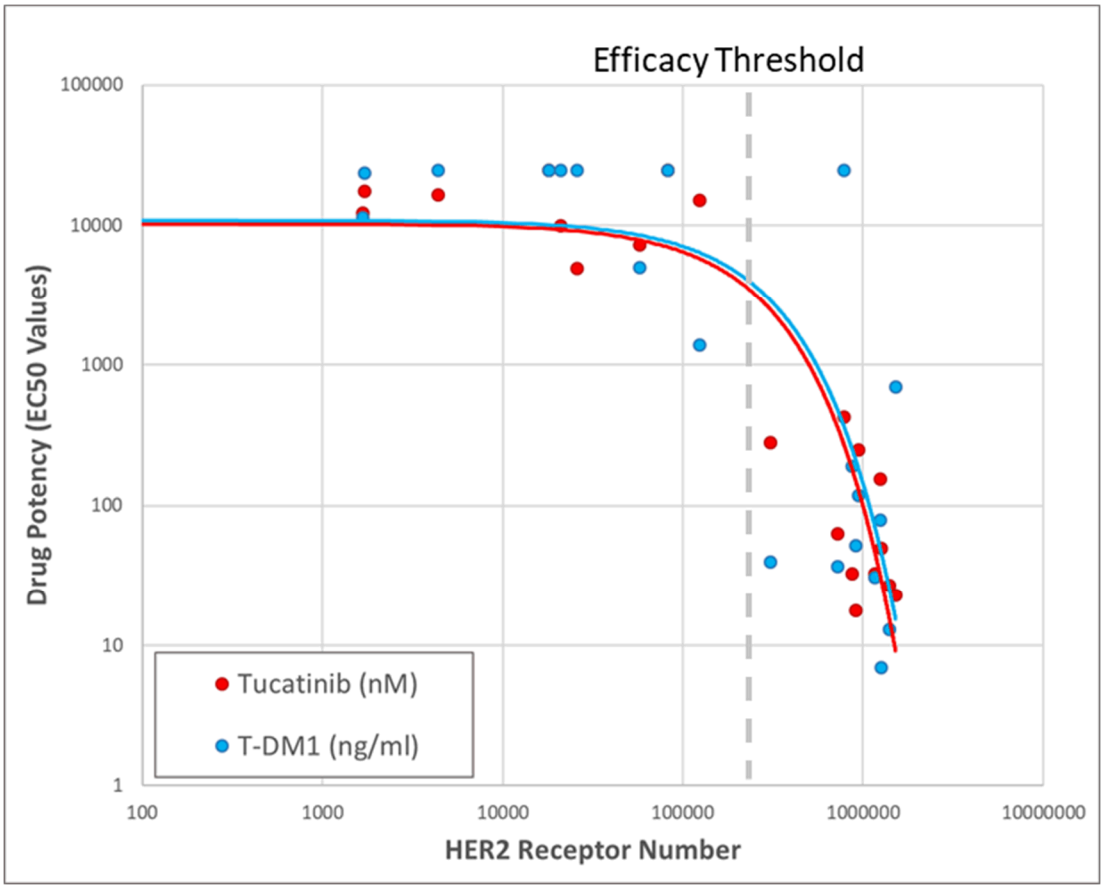
試験の結果，1 細胞あたり 300,000 以上の HER2 を発現する細胞株に対して強力な細胞毒性活性（EC_{50} 値：500 nmol/L 未満）を示した（Table 3 および Figure 12）。HER2 発現が 1,000,000 前後（700,000～1,500,000）の細胞株に対しては，EC_{50} 値は 100 nmol/L を下回った。一方，HER2 低発現および HER2 陰性の細胞株に対する細胞毒性活性は低かった。ツカチニブの今回の試験成績は陽性対照である T-DM1 と類似しており，さらに，ツカチニブの細胞毒性作用が細胞の HER2 発現レベルに依存することが示された。以上よりツカチニブが HER2 シグナル伝達の選択的な阻害作用を有することが示唆され，今回の結果は，HER2 シグナル誘導性の腫瘍を特異的に標的とすることを示すこれまでの試験成績（2.1.2 項および 2.1.3 項）と符合するものであった。

Table 3.　各種 HER2 陽性乳癌由来細胞株に対するツカチニブおよび T-DM1 の細胞毒性活性

細胞株	HER2 発現レベル	HER2 発現数	ツカチニブ EC_{50} (nmol/L)	T-DM1 EC_{50} (nmol/L)
HCC-1419	高	1,515,661	23	704
SK-BR-3	高	1,384,157	27	13
HCC-1954	高	1,259,398	50	7
ZR-75-30	高	1,240,426	156	79
AU-565	高	1,153,419	33	31
HCC-1569	高	938,858	249	118
HCC-2218	高	905,340	18	52
BT-474	高	864,064	33	191
UACC-893	高	775,719	431	>25,000
UACC-812	高	722,241	64	37
HCC-202	高	303,584	282	40
JIMT-1	低	123,626	15,147	1395
BT-483	低	82,187	>25,000	>25,000
CAMA-1	低	57,568	7309	4997
T47D	低	25,797	4938	>25,000
MCF7 (ATCC)	低	20,855	10,020	>25,000
MCF7 (NCI)	低	17,859	>25,000	>25,000
MDA-MB-231	低	4350	16,482	>25,000
MDA-MB-436	陰性	1702	17,601	23,878
HS-578T	陰性	1663	12,394	11,493
MDA-MB-468	陰性	1[a]	9617	7695
DU-4475	陰性	1[a]	8973	>25,000

ATCC: American Type Culture Collection, NCI: National Cancer Institute
a. 定量下限未満の場合は 1 とした。
ツカチニブおよび HER2 抗体薬物複合体であるトラスツズマブ・エムタンシン（T-DM1）の細胞毒性活性を Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて評価した。各種ヒト乳癌由来細胞株の HER2 発現レベルは，定量的フローサイトメトリー（qFACS）で測定した HER2 の細胞表面発現密度に基づき，HER2 高発現（300,000/細胞以上），HER2 低発現（2000/細胞以上 300,000/細胞未満）または陰性（2000/細胞未満）に分類した。
出典：試験報告書 TRN-5430

Figure 12.　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

2.2.2. HER2 発現細胞株および EGFR 発現細胞株に対するツカチニブの細胞毒性作用

試験報告書：TRN-5456，概要表：CTD 2.6.3.2

BT-474 細胞および A431 細胞を用い，2.1.2 項および 2.1.3 項に示した HER2 または EGFR リン酸化に対するツカチニブの阻害能が腫瘍細胞の増殖や分裂に与える影響について評価した。細胞生存率を Cell Titer Blue を用いて測定した。3 日間の試験期間中に細胞分裂が持続する細胞密度で，96 ウェルプレートに細胞を播種した（試験 0 日）。試験 1 日に，0.15～10,000 nmol/L（4 倍段階希釈）の濃度のツカチニブを添加した。陽性対照としてドセタキセルを用いた。試験 0 日および試験 3 日に細胞数を測定し，試験 3 日の測定結果を試験 0 日の値で補正した。BT-474 細胞および A431 細胞におけるツカチニブの細胞毒性活性について，4 パラメータ非線形曲線に当てはめた濃度反応データから IC_{50} 値を算出した。

その結果，ツカチニブは A431 細胞と比較して BT-474 細胞に対してより顕著に細胞毒性作用を示した（Table 4 および Figure 13）。なお，BT-474 細胞および A431 細胞に対する ONT-993 の細胞毒性活性を検討した試験（2.4.3 項）において，ツカチニブの BT-474 細胞および A431 細胞

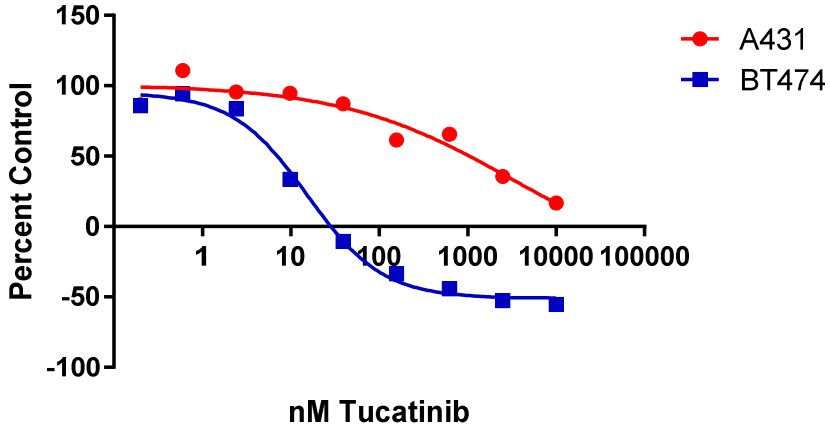
における IC_{50} 値はそれぞれ 27 nmol/L および 15,000 nmol/L 超であり，本試験と同様の結果が得られた。Rusnak らの報告によると HER2/EGFR 阻害薬ラパチニブの BT-474 細胞および A431 細胞に対する増殖阻害 IC_{50} 値はそれぞれ 100 nmol/L および 160 nmol/L と類似しており[1]，ツカチニブとラパチニブは HER2 に対して異なる選択性を有することが示唆された。

Table 4.　BT-474 細胞および A431 細胞に対するツカチニブの細胞毒性活性

	A431 細胞	BT-474 細胞
ツカチニブ IC_{50} 値（nmol/L）	2981	15.45
ドセタキセル IC_{50} 値（nmol/L）	0.6374	4.94

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

Figure 13.　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

2.3. ツカチニブの抗腫瘍効果を評価する in vivo 薬理試験

2.3.1. 3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルにツカチニブを単独投与したときの抗腫瘍効果

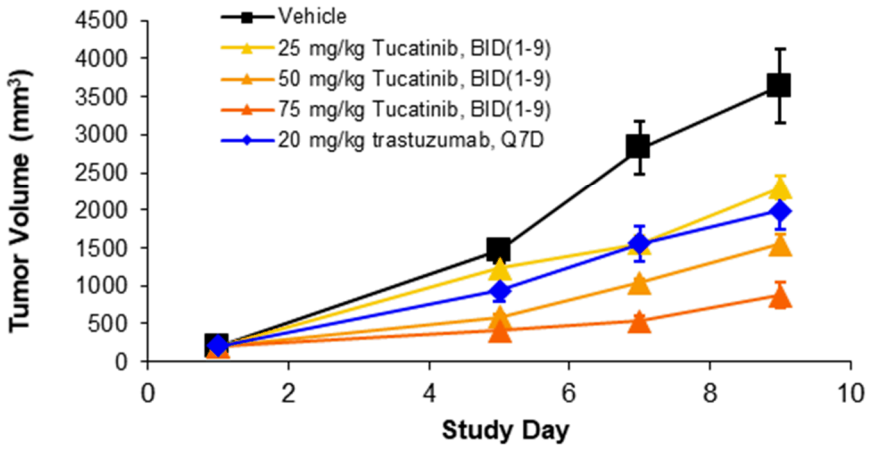
試験報告書：TRN-5453，概要表：CTD 2.6.3.2

3T3-rErbB2 細胞株は，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 マウス線維芽細胞である[12]。HER2 シグナル誘導性の腫瘍に対するツカチニブの効果を in vivo で検討するために，3T3-rErbB2 腫瘍同種移植マウスにツカチニブを 25，50 または 75 mg/kg の用量で 1 日 2 回，または 50，75，100 または 150 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した（8 匹/群）。また，トラスツズマブを 20 mg/kg の用量で週 1 回腹腔内投与する群を設けた。

試験の結果，忍容性がみられる用量で，ツカチニブは ErbB2 シグナル誘導性の腫瘍の増殖を阻害することが示された。いずれの投与群においてもツカチニブ投与に起因する死亡例はみられず，体重への影響も認められなかった。腫瘍増殖抑制率（TGI）は 32%～80%であった（Figure 14 および Figure 15）。トラスツズマブ投与群における TGI は 45%であり，ツカチニブ 75 mg/kg

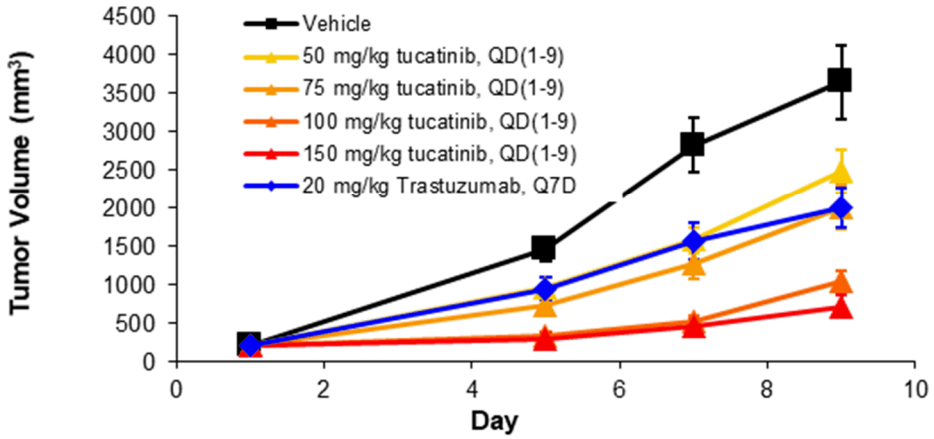
（1 日 1 回）群の TGI と同程度であった。1 日 1 回投与，1 日 2 回投与ともに用量依存的な腫瘍増殖抑制がみられ，本試験においては 150 mg/kg（1 日 1 回）投与群で最も効果が示された。なお，いずれの投与群においても明確な腫瘍退縮はみられなかった。1 日 1 回投与群と 1 日 2 回投与群の結果から，本モデルにおけるツカチニブの抗腫瘍効果は 1 日当たりの投与回数に依存しないことが示唆された。3T3-rErbB2 移植モデルに対するツカチニブの用量反応性は，ErbB2 リン酸化の阻害と符合するものであった（2.3.2 項）。

Figure 14.　3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルにツカチニブを 1 日 2 回投与したときの腫瘍増殖抑制



雌 nu/nu ヌードマウスに 3T3-rErbB2 細胞を移植し，3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルを作製した。ツカチニブを凡例に示す用量で 1 日 2 回（BID）経口投与した。また，トラスツズマブを週 1 回（Q7D）腹腔内投与する群を設けた。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5453

Figure 15.　3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルにツカチニブを 1 日 1 回投与したときの腫瘍増殖抑制



雌 nu/nu ヌードマウスに 3T3-rErbB2 細胞を移植し，3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルを作製した。ツカチニブを凡例に示す用量で 1 日 1 回（QD）経口投与した。また，トラスツズマブを週 1 回（Q7D）腹腔内投与する群を設けた。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5453

2.3.2. 3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルにおけるツカチニブの ErbB2 リン酸化阻害

試験報告書：TRN-5458，概要表：CTD 2.6.3.2

ツカチニブの曝露量と薬理作用の関連性を検討するため，3T3-rErbB2 腫瘍同種移植マウス（2.3.1 項）にツカチニブを単回投与し，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。リン酸化 ErbB2 はリン酸化チロシン特異的モノクローナル抗体を用いた免疫ブロット法を用い，3T3-rErbB2 腫瘍における ErbB2 タンパク質の総リン酸化チロシン量を測定することにより検討した。ツカチニブをモデルマウスに 25，50 または 100 mg/kg の用量で経口投与し，その 1，4，12 または 24 時間後に腫瘍中の完全長 ErbB2 またはタンパク質分解により切断された ErbB2 断片（p95）のリン酸化チロシン量を測定した。検討は 5 回行った（Table 5）。

ツカチニブを 3T3-rErbB2 腫瘍同種移植マウスに単回投与したところ，いずれの検討試験においても忍容性は良好であり，死亡例および一般状態の変化はみられなかった。ErbB2 のリン酸化に対するツカチニブの用量依存的な阻害が認められ，最も顕著な阻害が観察されたのは 50 mg/kg 以上の投与群における投与後 1～4 時間であり，阻害率は 90%以上（溶媒対照比）であった（Table 5）。ツカチニブ 100 mg/kg 投与後 4 時間のリン酸化 ErbB2 量を測定した検討試験において，p95 のリン酸化は 44%阻害された。ツカチニブとラパチニブの ErbB2 リン酸化阻害を比較した検討試験において，ツカチニブ 50 mg/kg 投与後の ErbB2 リン酸化阻害率はラパチニブ 100 mg/kg を上回った。ツカチニブのトルエンスルホン酸塩と遊離塩基の ErbB2 リン酸化阻害は同程度であった。

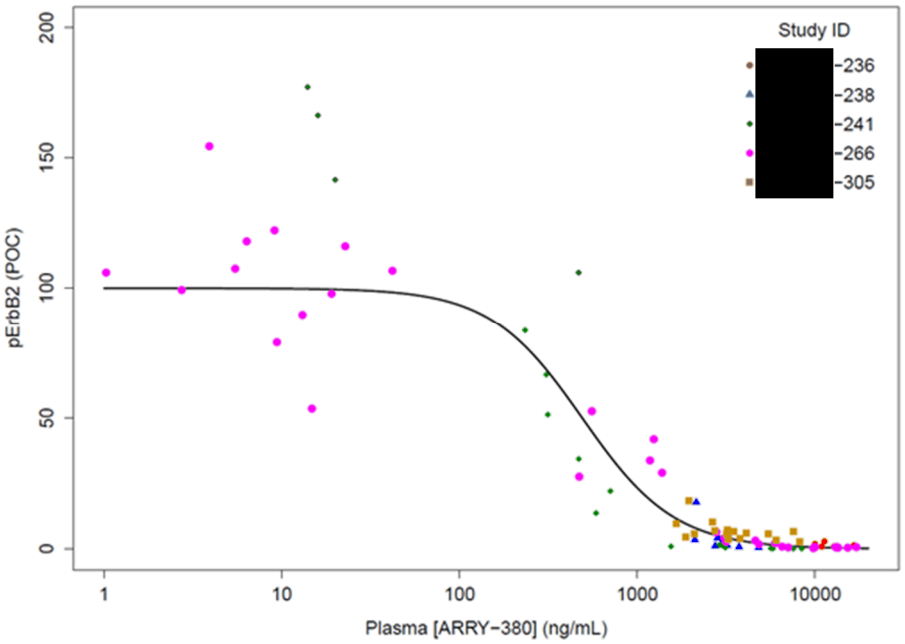
ツカチニブの血漿中濃度と腫瘍中リン酸化 ErbB2 量を照らし合わせたところ両者の関連性が示唆され（Figure 16），IC_{50} 値および IC_{90} 値はそれぞれ 490 ng/mL および 1830 ng/mL と算出された。

Table 5.　3T3-rErbB2 腫瘍同種移植マウスを用いたツカチニブの腫瘍中 ErbB2 チロシンキナーゼリン酸化阻害

検討試験 ID	被験物質バッチ	投与量（mg/kg）	投与後腫瘍摘出時間（時間）	リン酸化阻害率（溶媒対照比）
[redacted]-236	AR00432380-[redacted]	100	4	98%阻害 44%阻害（p95）
[redacted]-238	AR00432380-[redacted]	50	4	93%阻害
		100	4	99%阻害
	ラパチニブ	100	4	82%阻害
[redacted]-241	AR00432380-[redacted]	25	4	77%阻害
		50	4, 12	99%, 0%阻害
		100	4, 12	99%, 0%阻害
[redacted]-266	AR00432380-[redacted]	25	1, 4, 12, 24	97%, 65%, 0%, 0%阻害
		50	1, 4, 12, 24	99%, 96%, 0%, 0%阻害
		100	1, 4, 12, 24	99%, 96%, 0%, 0%阻害
[redacted]-305	AR00432380-[redacted]（トルエンスルホン酸塩）	50	1, 4	95%, 95%阻害
	AR00432380-[redacted]（遊離塩基）	50	1, 4	99%, 96%阻害

出典：試験報告書 TRN-5458

Figure 16.　3T3-rErbB2 腫瘍同種移植マウスにおけるツカチニブの ErbB2 リン酸化阻害の濃度反応性



横軸を血漿中ツカチニブ濃度，縦軸をリン酸化 ErbB2 量（POC：対照比）とし，計 5 回の検討試験結果をプロットして反応曲線を引いた。
出典：試験報告書 TRN-5458

2.3.3. BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを単独投与したときの抗腫瘍効果

試験報告書：TRN-5454，概要表：CTD 2.6.3.2

HER2 を過剰発現する乳癌モデルとして，ヒト乳癌由来 BT-474 細胞[6]をマウスに異種移植し，ツカチニブの in vivo 活性を検討した。BT-474 細胞株は HER2 の遺伝子増幅[6]を有し，BT-474 腫瘍異種移植マウスは低分子薬および抗体薬の抗腫瘍作用を評価するための in vivo モデルとして用いられている[1,13]。

BT-474 細胞を皮下移植したマウスに，ツカチニブまたはトラスツズマブを 23 日間にわたって投与した。ツカチニブは，25，50 または 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与し，トラスツズマブは 20 mg/kg の用量で 3 日に 1 回腹腔内投与した。腫瘍サイズおよび体重を試験 1（初回投与前：ベースライン），6，13，16，20 および 23 日に測定した。

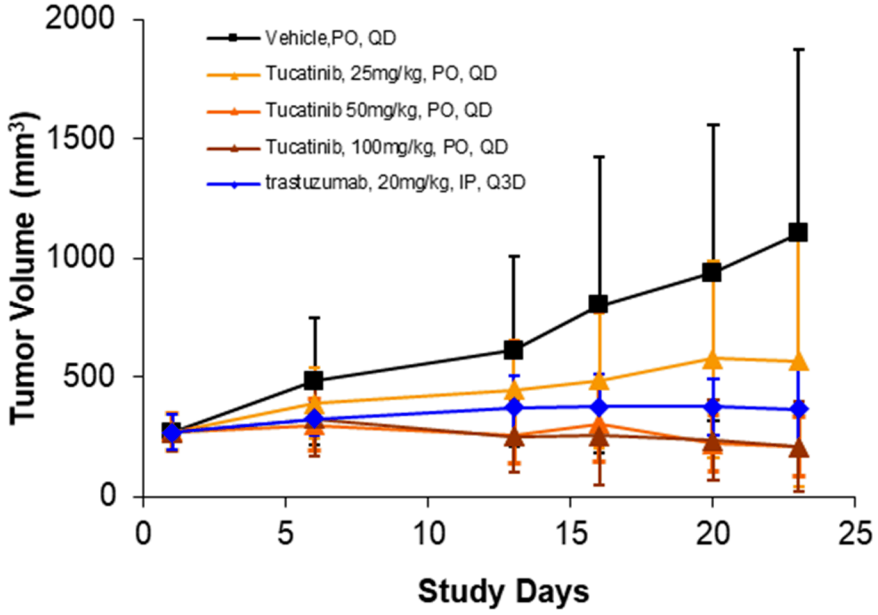
試験期間中，いずれの投与群においても死亡例および一般状態の変化はみられず，忍容性が示された。ツカチニブ 100 mg/kg 群において試験 13 日をピークとした体重減少がみられた（Table 6）。ツカチニブ 25 mg/kg 群およびトラスツズマブ群に比べ，ツカチニブ 50 mg/kg 群および 100 mg/kg 群における腫瘍増殖抑制は顕著であり，それらの群の一部の動物では部分奏功が認められた（Table 6 および Figure 17）。本試験で確認されたツカチニブの抗腫瘍効果は，BT-474 細胞に対するツカチニブの細胞毒性作用が示された in vitro 試験の結果（2.2.2 項）と符合するものであった。以上の結果から，ツカチニブによる HER2 キナーゼ活性および HER2 下流シグナル伝達の選択的阻害が，マウスにおいて良好な忍容性を示す用量で HER2 陽性腫瘍の増殖抑制または退縮をもたらすことがさらに示された。

Table 6.　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

被験物質	投与量（mg/kg）	投与頻度/経路	最大体重減少率（%）	TGI（%）	Net TGI（%）	CR/PR（例数）
溶媒	0	QD/PO	4.44 (試験 6 日)	0	0	0/0
ツカチニブ	25	QD/PO	1.47 (試験 6 日)	48.7	64.6	0/0
	50	QD/PO	4.40 (試験 13 日)	81.21	>100	0/2
	100	QD/PO	9.27 (試験 13 日)	81.27	>100	0/4
トラスツズマブ	20	Q3D/IP	3.94 (試験 13 日)	67.05	88.53	0/0

TGI = 腫瘍増殖抑制率（溶媒対照比），Net TGI =腫瘍増殖抑制率（比ベースライン），CR = 完全奏功（腫瘍体積が 100%減少），PR = 部分奏功（腫瘍体積が 30%以上減少），QD = 1 日 1 回，Q3D = 3 日に 1 回，PO = 経口投与，IP = 腹腔内投与
出典：試験報告書 TRN-5454

Figure 17.　BT-474 腫瘍異種移植モデルにおけるツカチニブの用量依存的な抗腫瘍効果



雌 nu/nu ヌードマウスに BT-474 細胞を移植し，BT-474 腫瘍異種移植モデルを作製した。ツカチニブを凡例に示す用量で 1 日 1 回（QD）経口投与（PO）した。また，トラスツズマブを 3 日に 1 回（Q3D）腹腔内投与（IP）する群を設けた。図中のプロットは腫瘍体積の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5454

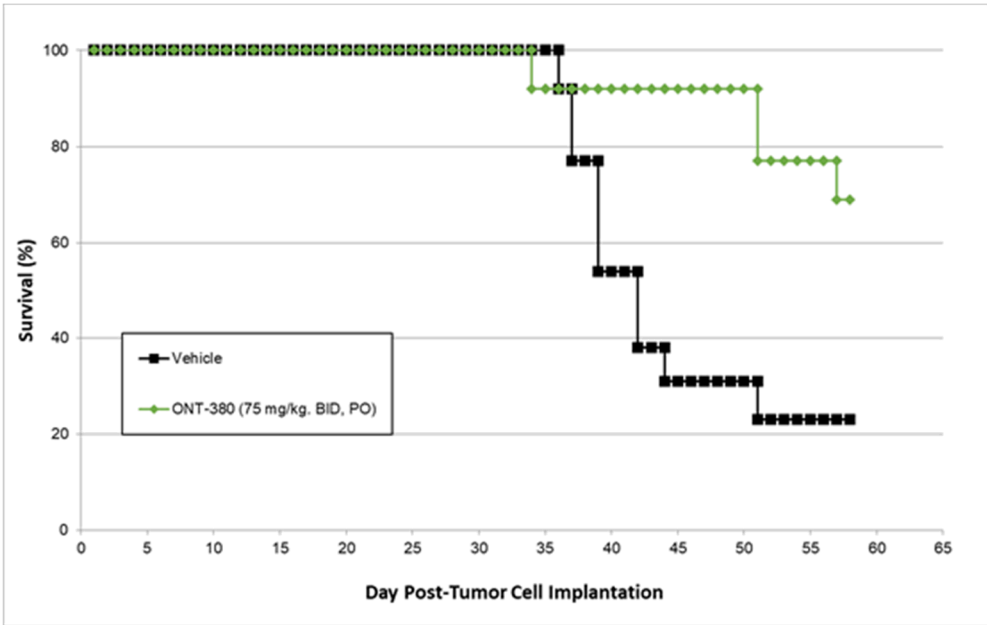
2.3.4. 頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルにおけるツカチニブの抗腫瘍効果

試験報告書：TRN-5455，概要表：CTD 2.6.3.2

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[14]。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，その 2 日後から，ツカチニブを 75 mg/kg の用量で 1 日 2 回，最長 8 週間経口投与した。一般状態（神経学的症状の有無）を 1 日 2 回観察し，体重測定を週 2 回実施した。神経学的症状の発現または 20%の体重減少が認められた時点で該当するマウスを安楽殺して脳を採取し，脳ホモジネート中の HER2 およびリン酸化 HER2 レベルをウェスタンブロット法により測定した。

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 18）。

Figure 18.　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

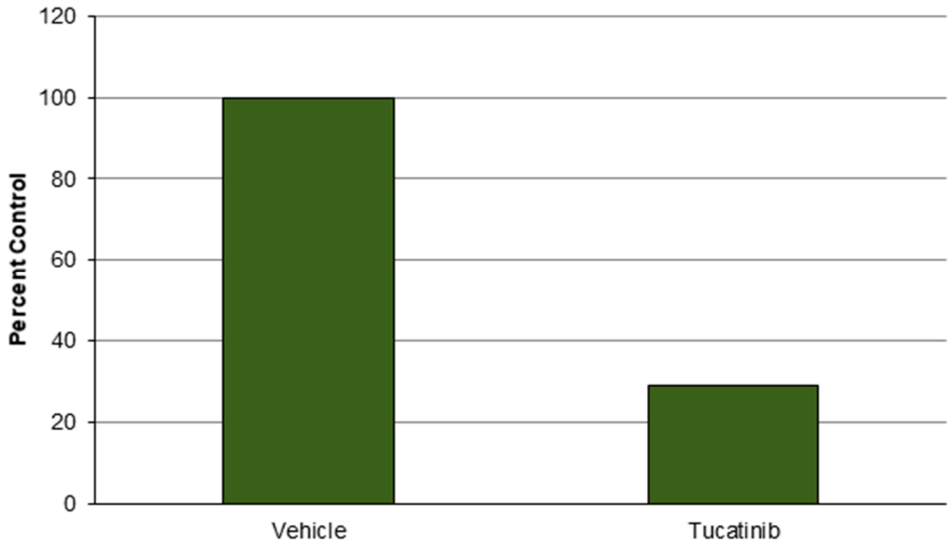


雌 nu/nu ヌードマウスに BT-474 細胞を頭蓋内移植し，頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルを作製した。ツカチニブを 75 mg/kg の用量で 1 日 2 回（BID）経口投与（PO）した。
出典：試験報告書 TRN-5455

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。溶媒対照群に比べ，ツカチニブ投与群の脳ホモジネート中のリン酸化 HER2 レベルは低値であった（Figure 19）。

以上の結果から，経口投与されたツカチニブが中枢神経領域において増殖した腫瘍に到達し，HER2 キナーゼ活性を阻害することで，溶媒対照と比較してマウスの生存率が改善したと示唆された。本試験成績は，頭蓋内に BT-474 腫瘍を異種移植したモデルを用いたツカチニブの分布試験の結果と符合するものであった（CTD 2.6.4.4.4）。分布試験において，マウスの頭蓋内移植 BT-474 腫瘍への[^{14}C]ツカチニブの分布量は正常中枢神経組織の最大約 11 倍であった。

Figure 19.　頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを経口投与したときの脳中リン酸化 HER2 レベルの変化



頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルに最長 8 週間ツカチニブを経口投与（75 mg/kg の用量で 1 日 2 回）し，脳ホモジネート中のリン酸化 HER2 レベルをウェスタンブロット法により測定した。
出典：試験報告書 TRN-5455

2.3.5. BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブとトラスツズマブまたはドセタキセルを併用投与したときの抗腫瘍効果

試験報告書：TRN-5452，概要表：CTD 2.6.3.2

BT-474 腫瘍異種移植モデル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，抗腫瘍効果を評価した。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，21 日間経口投与し，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（計 3 回）腹腔内投与するか，ドセタキセルを 10 mg/kg の用量で週 1 回（計 3 回）静脈内投与した。また，トラスツズマブまたはドセタキセル単独投与群も設けた。

皮下に BT-474 細胞を移植し，生着を確認した（平均腫瘍体積：254 mm^3）C.B.-17 SCID マウス（n=12/群）を試験に供した。短期的な効果の検討として，試験 14 日に腫瘍体積を測定し，対照群の平均腫瘍体積（911 mm^3）との比較に基づき各投与群の TGI を求めた。得られた中央値について，ノンパラメトリック Kruskal-Wallis 検定および post hoc Dunn の多重比較検定により統計処理した。

ドセタキセル単独投与群において体重減少を伴う死亡が 1 例で認められたことを除き死亡例はみられず，ツカチニブの投与に対して良好な忍容性が示された。ツカチニブ，トラスツズマブおよびドセタキセルのいずれかの単独投与と比較して，ツカチニブとトラスツズマブ（Figure 20）またはドセタキセル（Figure 21）を併用投与することで，より顕著な抗腫瘍効果が認められた。ツカチニブ 52.7 mg/kg および 105.4 mg/kg 投与群における TGI はそれぞれ 62%および 93%であり，105.4 mg/kg 投与群では溶媒対照群と比較して統計的に有意であった（P<0.001）。トラスツズマブ単独投与における TGI は 45%であり，統計的有意差は示されなかった。ツカチ

ニブ 52.7 mg/kg または 105.4 mg/kg とトラスツズマブの併用投与における TGI はそれぞれ 95%または 100%であり，それぞれの単独投与群と比較して統計的に有意であった（比ツカチニブ 52.7 mg/kg 群：P<0.01，比ツカチニブ 105.4 mg/kg 群：P<0.05，比トラスツズマブ群：P<0.001）。ドセタキセル単独投与での TGI は 49%であり，統計的有意差は示されなかった。ツカチニブとドセタキセルの併用投与群における TGI は 81%であり，ツカチニブ（P<0.05）およびドセタキセル（P<0.01）単独投与群と比較して統計的に有意であった。

試験期間（87 日間）を通じての各被験物質による腫瘍の転帰の評価指標として，腫瘍増殖遅延率（%TGD）を算出した。%TGD は，各被験物質投与群の腫瘍が既定の体積に達するまでの期間（time to endopoint: TTE）の延長率（溶媒対照群との比）と定義した。ツカチニブ 52.7 mg/kg 投与群，ツカチニブ 105.4 mg/kg 投与群，トラスツズマブ投与群およびドセタキセル投与群の%TGD はそれぞれ 97，299，133 および 91 であった（Table 7）。

ツカチニブ 52.7 mg/kg または 105.4 mg/kg とトラスツズマブの併用投与群の%TGD はそれぞれ 437 および 469 であり，対応する単独投与群と比較して統計的有意に高値であった（P<0.001）。ツカチニブ 52.7 mg/kg とドセタキセルの併用により%TGD は 207 となり，それぞれの単独投与群の値を有意に上回った（P<0.01）。ツカチニブ 52.7 mg/kg およびトラスツズマブの単独投与群では，試験 87 日における生存例はみられず腫瘍退縮例も認められなかったが，それらの併用投与では有意な奏効率の上昇が示され（P<0.001：Fisher の正確確率検定），試験 87 日の無腫瘍生存例（TFS）は 10/12 例であった。ツカチニブ 105.4 mg/kg 投与群では，部分奏功（PR）および一過性の完全奏功（CR）がそれぞれ 8/12 例および 1/12 例で認められた。また，試験 87 日の生存例は 2 例であった。ツカチニブ 105.4 mg/kg とトラスツズマブの併用投与群では 12/12 例の TFS がみられ，それぞれの単独投与と比べて奏効率の上昇が認められた（P<0.001）。ドセタキセル投与群では腫瘍退縮はみられなかったが，ツカチニブ 52.7 mg/kg との併用により，PR および TFS がそれぞれ 1 例で認められた。

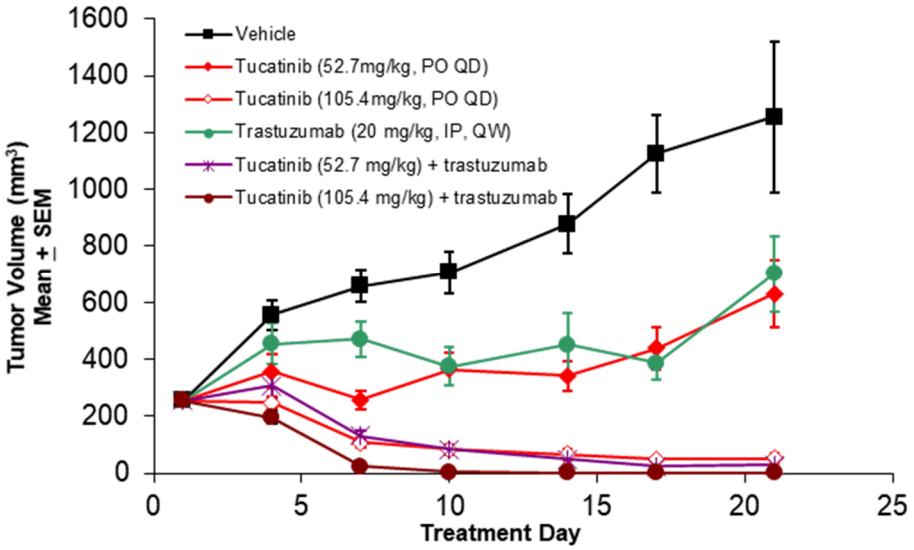
以上の結果より，BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブ，トラスツズマブまたはドセタキセルを単独投与したところ，モデル動物の生存期間の延長がみられた。しかしながら，ツカチニブ 52.7 mg/kg，トラスツズマブおよびドセタキセル投与群では腫瘍の退縮は示されず，ツカチニブ 105.4 mg/kg 投与群で認められたのは部分奏功または一過性の完全奏功（計 9/12 例）であった。一方，ツカチニブ 52.7 mg/kg または 105.4 mg/kg とトラスツズマブの併用投与により，試験 87 日にそれぞれ 10/12 例または 12/12 例で TFS が示された。またツカチニブ 52.7 mg/kg とドセタキセルの併用投与群では，PR および TFS が各 1 例でみられた。

Table 7.　BT-474 腫瘍異種移植モデルに対し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きの抗腫瘍効果

群	例数	被験物質 1			被験物質 2			TTE (日)	T-C (日)	%TGD	PR (例数)	CR (例数)	TFS (例数)	最大体重減少率(%) (試験日)
			投与量 (mg/kg)	投与頻度/経路		投与量 (mg/kg)	投与頻度/経路							
1	12	溶媒	-	QDx21 /PO	-	-	-	15.3	-	-	0	0	0	--
2	12	ツカチニブ	52.7	QDx21 /PO	-	-	-	30.1	14.8	97	0	0	0	7.4 (31)
3	12	ツカチニブ	105.4	QDx21 /PO	-	-	-	61.0	45.7	299	8	1	0	11.8 (59)
4	12	トラスツズマブ	20	QWKx3 /IP	-	-	-	35.6	20.3	133	0	0	0	11.0 (35)
5	12	ツカチニブ	52.7	QDx21 /PO	トラスツズマブ	20	QWKx3 /IP	82.2	66.9	437	1	10	10	12.6 (70)
6	12	ツカチニブ	105.4	QDx21 /PO	トラスツズマブ	20	QWKx3 /IP	87.0	71.7	469	0	12	12	13.0 (63)
7	12	ドセタキセル	10	QWKx3 /IV	-	-	-	29.2	13.9	91	0	0	0	19.0 (17)
8	12	ツカチニブ	52.7	QDx21 /PO	ドセタキセル	10	QWKx3 /IV	47.0	31.7	207	1	1	1	16.7 (49)

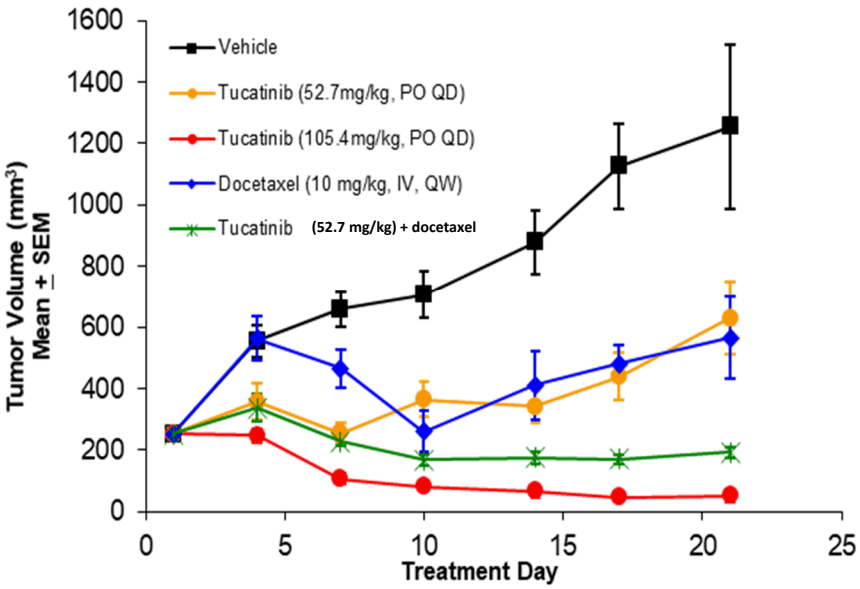
TTE =腫瘍が既定の体積に達するまでの期間の平均値，T-C = 溶媒対照群との TTE の差，%TGD = 溶媒対照群と比較したときの TTE の延長率，PR = 部分奏功（3 回以上連続の測定で初回測定時と比較して 50%超の腫瘍退縮がみられ，その間 1 回でも腫瘍体積が 13.5 mm^3 超だった場合），CR = 完全奏功（3 回以上連続の測定で腫瘍体積が 13.5 mm^3 未満だった場合），TFS =無腫瘍生存例［試験最終日（試験 87 日）に CR と判断された例］，QDx21/PO = 1 日 1 回経口投与（計 21 回），QWKx3/IP = 週 1 回腹腔内投与（計 3 回），QWKx3/IV =週 1 回静脈内投与（計 3 回）
出典：試験報告書 TRN-5452

Figure 20.　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

Figure 21.　BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを単独投与，またはドセタキセル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）した。併用投与群においては，ツカチニブを 52.7 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与したのに加え，ドセタキセルを 10 mg/kg の用量で週 1 回（QW）静脈内投与（IV）した。
出典：試験報告書 TRN-5452

2.3.6. 種々の HER2 陽性腫瘍異種移植モデルにツカチニブとトラスツズマブを併用投与したときの抗腫瘍効果

試験報告書：TRN-5550，TRN-5551，TRN-5552，TRN-5553，概要表：CTD 2.6.3.2

BT-474 腫瘍異種移植モデルを用いたツカチニブとトラスツズマブの併用の検討結果（2.3.5 項）に基づき，他の HER2 陽性腫瘍異種移植モデルにおいてもこの 2 つの異なる HER2 標的薬の併用が有効であるか否か検討した。評価には，ヒト胃癌由来の HER2 過剰発現細胞である N87 細胞株[15]を用いた異種移植モデル（試験報告書：TRN-5552）に加え，3 種の大腸癌（試験報告書：TRN-5550），2 種の食道癌（試験報告書：TRN-5551），3 種の胃癌（研究報告書：TRN-5553）および 1 種の胆管癌（試験報告書：TRN-5551）患者腫瘍組織を用いて作製した患者由来 HER2 陽性腫瘍異種移植（PDX）モデルを用いた。各試験において，ツカチニブ（50 mg/kg の用量で 1 日 2 回）またはトラスツズマブ（20 mg/kg の用量で 3 日に 1 回）を単独投与，もしくはツカチニブ（50 mg/kg の用量で 1 日 2 回）とトラスツズマブ（20 mg/kg の用量で 3 日に 1 回）を併用投与する群を設けた。

各試験で得られた腫瘍体積データを用い，統一した計算式および基準で TGI および腫瘍退縮例数を求めた（Table 8）。評価に用いた 10 種の移植モデルのうち，9 種においてツカチニブ/トラスツズマブの併用による腫瘍退縮（部分奏功または完全奏功）がみられたのに対し、ツカチニブまたはトラスツズマブの単独投与により腫瘍退縮が認められたのは 7 種であった（そのうち，トラスツズマブ単独投与により腫瘍退縮がみられたのは 3 種）。ツカチニブ/トラスツズマブの併用により腫瘍退縮が認められた移植モデルのうち，胃癌 PDX の 1 種（GXA3038）においてのみ，ツカチニブ単独群とツカチニブ/トラスツズマブ併用群の TGI が同程度であったが，残りの 8 種では両単独群と比較してツカチニブ/トラスツズマブ併用群で顕著な腫瘍増殖抑制が認められた。これらの試験成績は，BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブ（52.7 mg/kg）またはトラスツズマブを単独投与したとき，腫瘍増殖遅延が生じたものの腫瘍の退縮が認められなかった一方，ツカチニブ（52.7 mg/kg）/トラスツズマブ併用投与では有意な腫瘍退縮が示されたことと符合するものであった（2.3.5 項）。

Table 8.　HER2 陽性のヒト腫瘍細胞または患者由来腫瘍異種移植モデルにおけるツカチニブ，トラスツズマブ，またはツカチニブ/トラスツズマブ併用の抗腫瘍効果

試験	移植腫瘍	癌種	TGI（%）[a]			腫瘍退縮（例数）[b]		
			ツカチニブ	トラスツズマブ	ツカチニブ/トラスツズマブ	ツカチニブ	トラスツズマブ	ツカチニブ/トラスツズマブ
TRN-5452	BT-474	乳癌 CDX	86	68	133	1/12 PR	0	1/12 PR 10/12 CR
TRN-5552	NCI-N87	胃癌 CDX	101	87	130	4/10 PR	0	7/10 PR 2/10 CR
TRN-5550	CTG-0121	大腸癌 PDX	104	109	124	6/10 PR	8/10 PR	10/10 PR
TRN-5550	CTG-0383	大腸癌 PDX	117	80	137	6/9 PR	5/10 PR	10/10 PR
TRN-5550	CTG-0784	大腸癌 PDX	50	36	103	1/10 PR	0	0
TRN-5551	CTG-0137	食道癌 PDX	49	55	85	0	0	1/10 PR
TRN-5551	CTG-0138	食道癌 PDX	68	-34	120	1/10 PR	0	9/10 PR
TRN-5551	CTG-0927	胆管癌 PDX	48	63	86	0	0	1/10 PR
TRN-5553	GXA3038	胃癌 PDX	110	50	116	6/10 PR 3/10 CR	0	4/10 PR 6/10 CR
TRN-5553	GXA3039	胃癌 PDX	48	38	103	0	0	3/7 PR
TRN-5553	GXA3054	胃癌 PDX	63	93	137	1/10 PR	4/10 PR 3/10 CR	2/10 PR 8/10 CR

TGI＝ 腫瘍増殖抑制率，CDX＝ ヒト腫瘍細胞株異種移植モデル，PDX＝ 患者由来腫瘍異種移植モデル，PR＝ 部分奏功，CR＝ 完全奏功

a: TGI は，BT-474 CDX および CTG-0137 PDX を除いて，ツカチニブ最終投与後 0～2 日の腫瘍体積に基づいて算出した。BT-474 CDX および CTG-0137 PDX については，それぞれ試験 14 日および 15 日の腫瘍体積に基づいて TGI を算出した。本表作成に当たり，いずれの試験においても以下の計算式を用いてあらためて TGI を算出した。TGI (%) = 1-[(試験 X 日における被験物質投与群の平均腫瘍体積 - 試験 0 日における被験物質投与群の平均腫瘍体積) / (試験 X 日における溶媒対照群の平均腫瘍体積 - 試験 0 日における溶媒対照群の平均腫瘍体積)]。

b: 本表作成に当たり，それぞれの試験の各個体について，初回測定日から各測定時点までの腫瘍体積変化率［(試験 X 日の腫瘍体積 - 試験 0 日の腫瘍体積) / 試験 0 日の腫瘍体積 x 100（%）］をあらためて求め，2 回以上連続で初回測定時と比較して 30%以上の腫瘍退縮がみられた個体を PR，2 回以上連続で腫瘍が検出されなかった個体を CR と定義した。

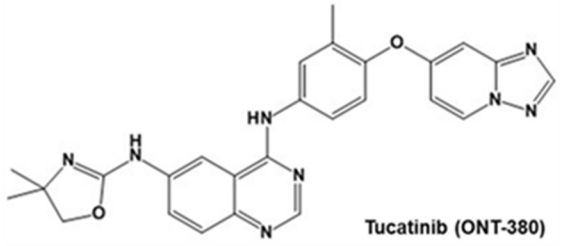
TRN-5452 試験を除き，ツカチニブ（50 mg/kg の用量で 1 日 2 回）またはトラスツズマブ（20 mg/kg の用量で 3 日に 1 回）を単独投与，もしくはツカチニブ（50 mg/kg の用量で 1 日 2 回）とトラスツズマブ（20 mg/kg の用量で 3 日に 1 回）を併用投与した。TRN-5452 試験ではツカチニブを 52.7 mg/kg の用量で 1 日 1 回投与した。

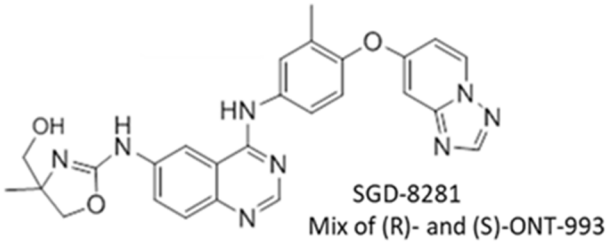
データ出典：試験報告書 TRN-5452，TRN-5550，TRN-5551，TRN-5552 および TRN-5553

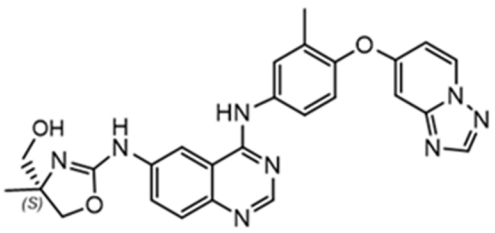
2.4. ツカチニブの水酸化代謝物 ONT-993 の薬理活性評価

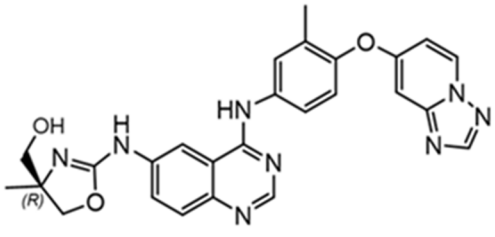
ONT-993（別称：AR00440993）は，ツカチニブのジメチルジヒドロオキサゾール環におけるメチル基が水酸化された構造を有するヒト主要代謝物である（CTD 2.6.4.1.3）。代謝の際に単一のキラル中心が生成され，その結果ラセミ混合物が生じる可能性がある（Figure 22）。ONT-993 の HER2 チロシンキナーゼ阻害活性を検討するため，ONT-993 のエナンチオマー（*R* 体：SGD-8288，*S* 体：SGD-8289）またはそのラセミ混合物（SGD-8281）を用いて生化学的および細胞生物学的手法による各種 in vitro 試験を実施した。なお，ヒト定常状態血漿中の主要な代謝物である ONT-993 の総薬物関連物質曝露量中での割合は 6.46%と算出された（CTD 2.6.4.1.3）。また，以下の項に示すように，ONT-993 の効力はツカチニブと比較して低かった。これらのことから，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なものと結論付けた。

Figure 22.　ツカチニブの水酸化代謝物 ONT-993 およびエナンチオマーの化学構造









2.4.1. ONT-993 の HER2 キナーゼ活性阻害能

試験報告書：TRN-5457，概要表：CTD 2.6.3.3

ONT-993 の HER2 キナーゼ活性に対する阻害能を検討するため，ONT-993 を合成し，2.1.1 項で示した実験と同一の条件で生化学的手法による評価を実施した。Ki 値は，試験で得られた IC_{50} 値を計算式 $Ki = IC_{50}/(1+[ATP]/Km)$ に当てはめて求めた。評価の結果，ONT-993 は，ツカチニブと同様，EGFR と比較して HER2 に対して高い効力を有することが示された（Table 9）。

Table 9.　HER2 および EGFR に対する ONT-993 の効力

バッチ番号	HER2 IC_{50} (nmol/L)	HER2 Ki (nmol/L)	EGFR IC_{50} (nmol/L)	EGFR Ki (nmol/L)
AR00440993-[redacted]	6.5	0.7	46.6	36

生化学的手法により ONT-993 の HER2 および EGFR に対する阻害能を検討した。IC_{50} 値を求め，計算式 $Ki = IC_{50}/(1+[ATP]/Km)$ から各キナーゼに対する Ki 値を算出した。
出典：試験報告書 TRN-5457

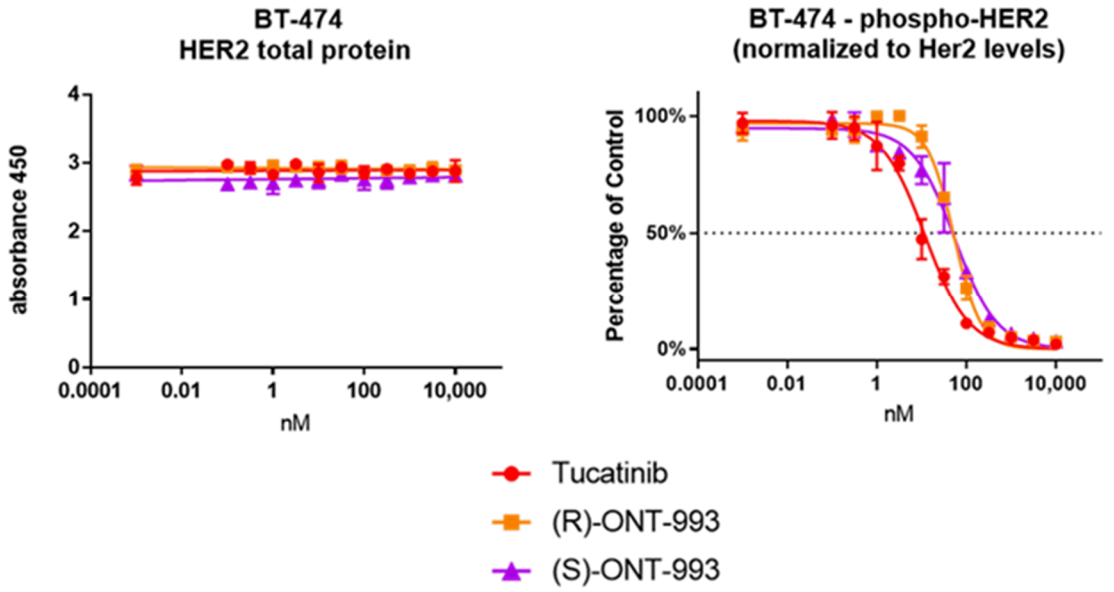
2.4.2. BT-474 細胞における HER2 キナーゼ活性に対する ONT-993 エナンチオマーの阻害能

試験報告書：TRN-5444，概要表：CTD 2.6.3.2

ONT-993 の各エナンチオマーの活性を検討するために，キラル高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて ONT-993 のエナンチオマー*S* 体である SGD-8289 および *R* 体である SGD-8288 を精製した。ツカチニブを対照とし，各エナンチオマーの HER2 リン酸化に対する効力について BT-474 細胞株を用いて評価した。HER2 リン酸化活性は，まず HER2 特異的抗体を用いて可溶性細胞抽出物中の総 HER2 タンパク質を捕捉し，リン酸化チロシンを特異的抗体によって検出するサンドイッチ ELISA 法によって測定した。リン酸化チロシン量を測定した同一試料を用いて総 HER2 量を測定し，総 HER2 量で正規化した値を最終的なリン酸化 HER2 値とした。各被験物質の濃度範囲は 0.1 nmol/L～10,000 nmol/L（half-log 段階希釈）とした。

4 パラメータ非線形曲線に当てはめた濃度反応データからツカチニブおよび各エナンチオマーの IC_{50} 値を算出したところ，両エナンチオマーの IC_{50} 値は同程度であり，ツカチニブの効力はそれらを上回った（Figure 23 および Table 10）。生化学的評価において求められた ONT-993 の HER2 に対する IC_{50} 値がツカチニブよりもわずかに高値であった原因として（2.1.1 項および 2.4.1 項），ジェミナルなメチル基の水酸化に伴う極性表面積の増加によって ONT-993 の細胞透過性が低下した可能性が考えられた。

Figure 23.　BT-474 細胞における HER2 リン酸化に対するツカチニブおよび ONT-993 エナンチオマーの阻害活性：濃度反応曲線



リン酸化 HER2 の値は，サンドイッチ ELISA 法を用いて総リン酸化チロシンを測定し，HER2 捕捉 ELISA 法によって測定された総 HER2 タンパク質の値で正規化した。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5444

Table 10.　BT-474 細胞における HER2 リン酸化に対するツカチニブおよび ONT-993 エナンチオマーの阻害活性：IC_{50} 値

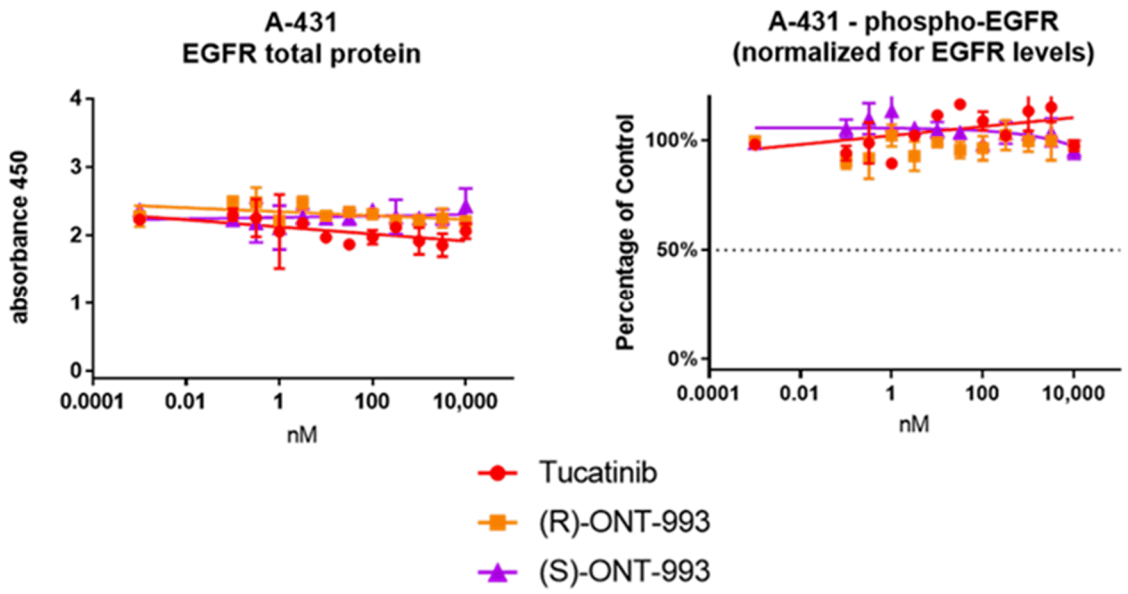
被験物質	リン酸化 HER2 IC_{50} 値（nmol/L）
ツカチニブ	12
(R)-ONT-993（SGD-8288）	53
(S)-ONT-993（SGD-8289）	55

出典：試験報告書 TRN-5444

次に，A431 細胞を用い，ツカチニブおよび各エナンチオマーの EGFR リン酸化に対する効力を評価した。EGFR リン酸化活性は，EGFR 特異的抗体を用いて可溶性細胞抽出物中の総 EGFR タンパク質を捕捉し，リン酸化チロシン特異的抗体を用いて総リン酸化チロシンを検出するサンドイッチ ELISA 法によって測定した。リン酸化チロシン量を測定した同一試料を用いて総 EGFR 量を測定し，総 EGFR 量で補正した値を最終的なリン酸化 EGFR 値とした。各被験物質の濃度範囲は 0.1 nmol/L～10,000 nmol/L とした（half-log 段階希釈）。

HER2 リン酸化に対する効力の検討結果とは対照的に，ツカチニブおよび各エナンチオマーは EGFR リン酸化に顕著な影響を及ぼさず，IC_{50} 値は得られなかった（Figure 24）。

Figure 24.　A431 細胞における EGFR リン酸化に対するツカチニブおよび ONT-993 エナンチオマーの阻害活性：濃度反応曲線



リン酸化 EGFR の値は，サンドイッチ ELISA 法を用いて総リン酸化チロシンを測定し，FGFR 捕捉 ELISA 法によって測定された総 EGFR タンパク質の値で正規化した。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5444

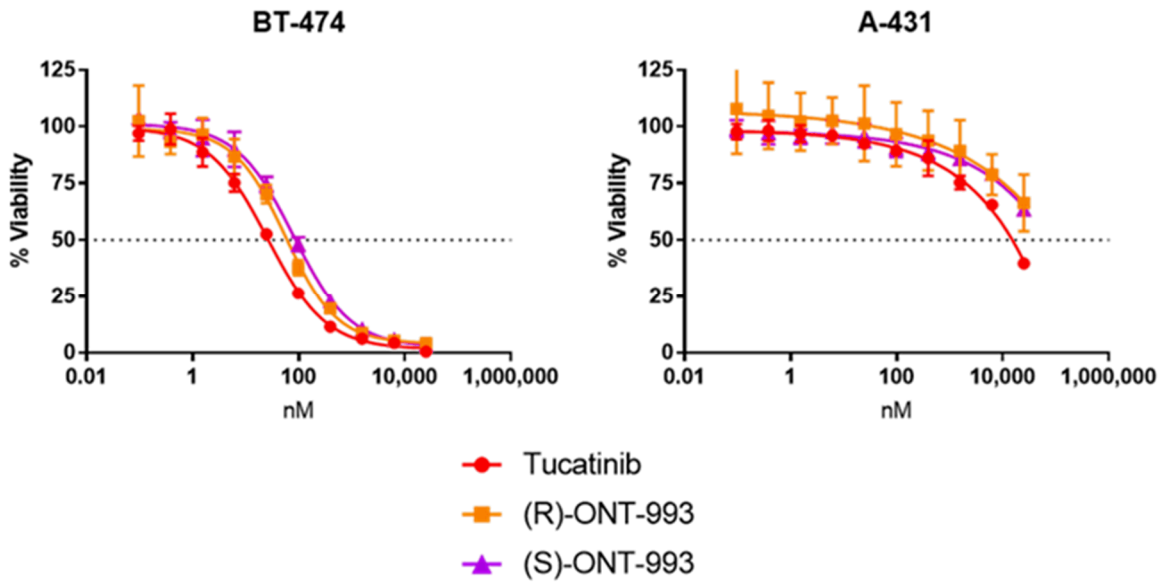
2.4.3. BT-474 細胞および A431 細胞に対する ONT-993 エナンチオマーの細胞毒性作用

試験報告書：TRN-5444，概要表：CTD 2.6.3.2

BT-474 細胞および A431 細胞を用い，ONT-993 の各エナンチオマーの細胞毒性作用について検討した。ツカチニブ（対照），ONT-993 の *R* 体または *S* 体を細胞に曝露後 96 時間の細胞生存率を Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて測定した。各被験物質の濃度範囲は 0.0128 nmol/L～25,000 nmol/L とした（5 倍段階希釈）。

ツカチニブの BT-474 細胞および A431 細胞に対する細胞毒性作用に関する EC_{50} 値はそれぞれ 27 nmol/L および 15,214 nmol/L であり，HER2 選択的な阻害が示唆され，2.2.2 項と符合する結果が得られた（Figure 25 および Table 11）。ONT-993 の *R* 体および *S* 体においても BT-474 細胞に対する選択的な細胞毒性作用が示され，EC_{50} 値はそれぞれ 60 nmol/L および 87 nmol/L であった。2.4.2 項に示した試験結果と同様に，各エナンチオマーの効力がツカチニブに比べて低い傾向がみられ，水酸化による細胞透過性の低下が寄与している可能性が考えられた。なお，両エナンチオマーの A431 細胞の細胞毒性作用に関する EC_{50} 値はいずれも 25,000 nmol/L 超であった。

Figure 25.　ONT-993 エナンチオマーの BT-474 細胞および A431 細胞に対する細胞毒性の濃度反応性



ツカチニブおよび ONT-993 エナンチオマーの細胞毒性活性を Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay により評価した。図中のプロットは測定結果の平均値（±標準偏差）を表す。
出典：試験報告書 TRN-5444

Table 11.　ツカチニブおよび ONT-993 エナンチオマーの BT-474 細胞および A431 細胞毒性作用

被験物質	細胞毒性作用 EC_{50} 値（nmol/L）	
	A431 細胞	BT-474 細胞
ツカチニブ	15,214	27
(R)-ONT-993（SGD-8288）	>25,000	60
(S)-ONT-993（SGD-8289）	>25,000	87

出典：試験報告書 TRN-5444

3. 副次的薬理試験

3.1. 各種キナーゼに対するツカチニブの作用

試験報告書：TRN-5457，概要表：CTD 2.6.3.3

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。それぞれ 2 回測定して平均値を算出し，対照値と比較して作用の有無を評価した。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（2.1.1 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，EGFR，HER4 および EGFR の 4 つの変異型，計 6 種のキナーゼに対して 75%超の酵素阻害（対照値の 25%未満）が示された（Table 12）。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。

Table 12.　ツカチニブが 75%超の阻害活性を示したキナーゼ

キナーゼ	ツカチニブ濃度（μmol/L）	対照値に対する比率（%）
EGFR	1	5.2
	10	6.75
EGFR (L858R)	1	24
	10	6.4
EGFR (L861Q)	1	8.45
	10	10.55
EGFR (T790M)	10	11.25
EGFR (T790M, L858R)	10	17.3
HER4	1	22.45
	10	5.4

出典：試験報告書 TRN-5457

3.2. 各種キナーゼに対する ONT-993 の作用

試験報告書：TRN-5457，概要表：CTD 2.6.3.3

KinaseProfiler を用いて，257 種のキナーゼに対する ONT-993 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。それぞれ 2 回測定して平均値を算出し，対照値と比較して作用の有無を評価した。各測定に用いた ONT-993 の濃度は，ONT-993 の HER2 に対する Ki 値（2.4.1 項）の約 1000 倍に当たる 1 μmol/L とした。

評価の対象としたキナーゼのうち，EGFR，HER4 および EGFR の 3 つの変異型，計 5 種のキナーゼに対し 50%超の酵素阻害（対照値の 50%未満）が示された（Table 13）。なお，HER2 は本試験の対象キナーゼに含めなかった。

Table 13.　ONT-993 が 50%超の阻害活性を示したキナーゼ

キナーゼ	ツカチニブ濃度（μmol/L）	対照値に対する比率（%）
EGFR	1	26
EGFR (L858R)	1	33.5
EGFR (L861Q)	1	1.5
EGFR (T790M, L858R)	1	46.5
HER4	1	35.5

出典：試験報告書 TRN-5457

4. 安全性薬理試験

心血管系，中枢神経系，呼吸系および消化器系に対するツカチニブの影響を検討するために，7 試験の安全性薬理試験を実施した。結果の概略を Table 14 に示す。いずれの試験も GLP 基準に準拠して実施した。

Table 14.　ツカチニブの安全性薬理試験一覧

試験	報告書番号	結果
hERG 試験	1140-031	ツカチニブは0.3，1，3および10 µmol/Lの濃度でhERGカリウム電流をそれぞれ0.3%，2.9%，8.6%および42%阻害し，IC_{50}値は13.51 µmol/Lと算出された。
サルテレメトリー試験	JAY00082	QT および QTc を含む心電図パラメータ，心拍数ならびに平均動脈圧に有意な影響はみられなかった。NOEL は 45 mg/kg（1 日 2 回投与）であった。
ラット Irwin 試験	AA37824	影響は認められず，NOEL は 100 mg/kg であった。
ラット呼吸機能評価試験	AA37825	影響は認められず，NOEL は 100 mg/kg であった。
ラット胃液分泌評価試験	AA37828	100 mg/kg 投与後 4 時間で胃液分泌量が増加し，酸度が顕著に上昇した。NOEL は 30 mg/kg であった。
ラット消化管輸送能評価試験	AA37826	影響は認められず，NOEL は 100 mg/kg であった。
ラット消化管忍容性試験	AA37827	100 mg/kg 投与において胃刺激性が示された。NOEL は 30 mg/kg であった。

4.1. hERG チャネルに対する影響の評価

試験報告書：1140-031，概要表：CTD 2.6.3.4

HEK293 細胞に安定的に発現させた hERG チャネルのカリウム電流に対するツカチニブの影響を評価するため，パッチクランプ法による in vitro 試験を実施した。

30 µmol/L の濃度では沈殿が認められたことから，評価に用いたツカチニブの濃度は 0（溶媒対照：0.1%DMSO 含有生理食塩液），0.3，1.0，3.0 または 10 µmol/L とした。また，シサプリド（0.1 µmol/L）を陽性対照とした。

溶媒対照では hERG カリウム電流の阻害はほとんど認められず，阻害率は 1.33%であった。また，シサプリドの hERG カリウム電流阻害率は 75.77%であった。ツカチニブは，0.3～10 µmol/L の範囲において hERG カリウム電流を最大 42.35%阻害した（10 µmol/L）。IC_{50} 値は 13.51 µmol/L と推定され，試験に用いた濃度範囲を上回った。

4.2. テレメトリーを用いたサルにおける心血管系評価

試験報告書：JAY00082，概要表：CTD 2.6.3.4

テレメトリーを埋設した非拘束の覚醒カニクイザル（雄 6 例）に，ツカチニブを試験 1，2，7 および 12 日にそれぞれ 0（溶媒対照），10，30 および 45 mg/kg の用量で 1 日 2 回（1 日投与量として 0，20，60 および 90 mg/kg）経口（経鼻胃管）投与した。試験期間中に一般状態観察ならびに体重および摂餌量測定を実施し，各投与前後に体温，血行動態パラメータ測定および心電図測定を行った。また，各投与前後の複数時点で血漿を採取し，血漿中ツカチニブ濃度測定に供した。

カニクイザルにツカチニブを投与した結果，最高用量の 45 mg/kg まで忍容性が示された。ツカチニブ投与に関連する変化として，試験 7 日（30 mg/kg の 2 回目投与後）に 5/6 例で腹部膨満が観察されたが，特に処置は行わず，投与後 24 時間以内に解消された。体重，摂餌量，体温，心拍数，平均動脈圧および心電図パラメータのツカチニブ投与に起因する変化は認められなかった。各例各投与後の血漿においてツカチニブが検出され，曝露が確認された。血漿中ツカチニブ濃度は 10，30 および 45 mg/kg の投与後 2 時間においてはそれぞれ 0.350，3.22 および 3.10 µg/mL であり，投与後 12 時間においてはそれぞれ 0.003，0.042 および 0.099 µg/mL であった。

4.3. Irwin 法による行動および生理学的機能への影響の評価

試験報告書：AA37824，概要表：CTD 2.6.3.4

Sprague Dawley ラット（雄 6 例/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），10，30 または 100 mg/kg の用量で単回経口投与し，中枢神経系および末梢神経系の機能への影響を行動観察および生理学的パラメータ測定により評価した。評価の比較対象として，溶媒対照群に加えて無処置群を設けた。

投与後 24 時間の観察において，急性または遅発性の死亡例は認められなかった。30 および 100 mg/kg 群において体重増加量の減少傾向および直腸温低下傾向がみられたが，統計的有意差は示されなかった。いずれの用量群においても，感覚運動機能，神経行動機能および自律神経機能について，未処置群および溶媒対照群との差異はみられず，中枢神経系および末梢神経系の機能への影響を示唆する行動変化は認められなかった。

4.4. 呼吸系への影響の評価

試験報告書：AA37825，概要表：CTD 2.6.3.4

非拘束の覚醒 Sprague Dawley ラット（雄 8 例/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），10，30 または 100 mg/kg の用量で単回経口投与し，気圧プレチスモグラフィーにより呼吸機能への影響を評価した。投与前では，絶食動物をプレチスモグラフィーチャンバー内で少なくとも 60 分間順化させたのち，呼吸パラメータを 30 分間記録してこれをベースラインとした。ツカチニブ投与後に再びチャンバーに動物を移し少なくとも 240 分間パラメータを記録した。

いずれの投与群においても，ツカチニブの単回投与による呼吸パラメータ［呼吸数，一回換気量，分時換気量，吸気時間，呼気時間，弛緩時間，ピーク吸気流量，ピーク呼気流量およびPenh（enhanced pause）］の有意な変化は認められなかった。

4.5. 胃液分泌への影響の評価

試験報告書：AA37828，概要表：CTD 2.6.3.4

Sprague Dawley ラット（雄 10 例/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），10，30 または 100 mg/kg の用量で単回経口投与し，胃液分泌への影響を評価した。陽性対照としてペンタガストリンを 32 µg/kg の用量で皮下投与した。ツカチニブ投与後 3 時間およびペンタガストリン投与後 15 分に麻酔下で胃幽門を結紮し，その 4 時間後に胃液の分泌量，pH および酸度を測定した。酸度は，胃液に対して 0.01 N NaOH 溶液で pH 7 まで滴定することによって測定した。

各被験物質投与による死亡は認められなかった。10 または 30 mg/kg 投与による胃液の分泌量，pH および酸度の変化はみられなかった。100 mg/kg 群では，胃液分泌量が溶媒対照群と比べて 48%増加したが，統計的有意差は示されなかった。pH に変化はなかった。溶媒対照群に比べ，酸度の統計的有意な増加（+90%）が認められた。陽性対照であるペンタガストリン投与により，胃液の分泌量（+192%）および酸度（+256%）が有意に増加した。

4.6. 消化管輸送能への影響の評価

試験報告書：AA37826，概要表：CTD 2.6.3.4

ラットを用いて小腸炭末輸送に対するツカチニブの影響を評価した。覚醒 Sprague Dawley ラット（雄 10 例/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），10，30 または 100 mg/kg の用量で単回経口投与，あるいは陽性対照としてモルヒネを 20 mg/kg の用量で単回皮下投与した。ツカチニブ投与後 3 時間またはモルヒネ投与後 45 分に，2.5 mL の 10%炭末懸濁液（5%アラビアゴム含有滅菌水で調製）をラットに投与した。炭末懸濁液を与えた 20 分後にラットを二酸化炭素により安楽殺し，幽門括約筋から回盲部までの小腸を摘出した。炭末輸送距離を摘出小腸の全長当たりの割合として求め，評価に用いた。

被験物質投与による死亡は認められなかった。ツカチニブはいずれの用量においても小腸炭末輸送に有意な影響を及ぼさなかった。一方，モルヒネ投与群においては，溶媒対照群と比較して統計的に有意な炭末輸送距離の減少が認められた。

4.7. ツカチニブの経口投与胃刺激性試験

試験報告書：AA37827，概要表：CTD 2.6.3.4

Sprague Dawley ラット（雄 10 例/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），10，30 または 100 mg/kg の用量で単回経口投与，あるいは陽性対照としてアスピリンを 250 mg/kg の用量で単回経口投与した。被験物質投与後 4 時間に動物を安楽殺して胃の病変を観察してスコアリングした。10 および 30 mg/kg 群では胃の刺激性は誘発されなかった。100 mg/kg 群およびアスピリン投与群の胃刺激性スコアは溶媒対照群と比較して有意に高値であった。

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。

6. 考察及び結論

6.1. ツカチニブの HER2 チロシンキナーゼ選択的阻害能

各種キナーゼに対する作用を検討した生化学的評価において，ツカチニブは HER2 酵素活性に対する選択的な阻害能を有することが示された（2.1.1 項および 3.1 項）。ツカチニブの HER2 に対する Ki 値（2.1.1 項）の約 500 倍および 5000 倍に当たる濃度で 223 種のキナーゼに対するツカチニブの作用を検討した試験では，ErbB ファミリーに属するキナーゼにのみ阻害作用を示した。さらに，ツカチニブは HER2 に対して強力な阻害作用を有し，ErbB キナーゼファミリーの他のメンバーである EGFR および HER4 と比較して HER2 に対して選択性が高いことが示された。

EGFR または HER2 を過剰発現する腫瘍由来細胞株を用いた検討では，ツカチニブによる EGFR 阻害活性は軽微であったのに対し，HER2 に対しては強力な阻害作用を示し，ツカチニブの HER2 選択性はさらに裏付けられた（2.1.2 項および 2.1.3 項）。これらの結果は，生化学的手法による評価および細胞内シグナル伝達試験において EGFR および HER2 を同程度阻害するラパチニブ[1]やネラチニブ[2]などの HER2 チロシンキナーゼ阻害薬とは異なるものであった。

生化学的評価におけるツカチニブの HER2 に対する効力が EGFR の 28～88 倍であったのに対し，細胞内シグナル伝達試験では 1000 倍を上回った。この違いは，生化学的評価で用いた組み換えタンパク質と，細胞内シグナル伝達試験で用いた細胞の標的キナーゼドメインにおける ATP 結合ポケットの構造の違いが反映された可能性が考えられた。類薬においても酵素レベルと細胞レベルでの結果の差異は報告されており，例えば，エルロチニブは生化学的評価では HER2 に比べて EGFR に対する選択性が高いが，細胞内シグナル伝達試験では両者に対して同等の効力を示す[16]。また，HER2 に対する共有結合的阻害能を有する TAS0728 の生化学的評価では，HER2 および EGFR に対する IC_{50} 値の差異は 5 倍程度であったが，細胞（それぞれ SK-BR-3 細胞および A431 細胞）を用いた評価では，HER2 に対する選択性がより顕著に高かったことが報告されている[17]。加えて，BT-474 細胞および A431 細胞に対する TAS0728 の細胞毒性作用に関する EC_{50} 値はそれぞれ 3.6 nmol/L および 450 nmol/L であった[17]。

BT-474 細胞において，ツカチニブは HER2 リン酸化を阻害することで，HER3 に加え，シグナル伝達の下流因子である AKT，ERK1/2 および MEK1 のリン酸化の抑制をもたらした（2.1.4 項）。ツカチニブとトラスツズマブの併用により，HER3 および AKT のリン酸化のさらなる減少が認められ，BT-474 細胞のアポトーシス誘導が増強された（2.1.4 項）。Schwill らは，ツカチニブとトラスツズマブの併用の効果を in vitro 試験で評価しており，HER2 陽性乳癌細胞におけるシグナル伝達阻害の持続時間延長とアポトーシスの亢進をもたらしたことを報告している[10]。これらの結果は，HER2 活性の選択的阻害が，細胞の増殖および生存に関与する HER2 下流の主要なシグナル伝達経路の阻害をもたらすという仮説を支持している。HER2 および HER3 と比較して，AKT，ERK1/2 および MEK1 のリン酸化阻害に関する EC_{50} 値が低値であった理由は不明であるが，HER2/EGFR 阻害薬であるネラチニブについても同様の現象が認められている[18]。

6.2. ツカチニブの HER2 阻害による細胞毒性作用

種々の HER2 発現レベルを示す乳癌由来細胞株を用いた in vitro 試験において，ツカチニブの細胞毒性作用は細胞株の HER2 発現レベルに依存し，HER2 発現が低値または陰性の細胞株に対しては細胞毒性活性が低かった一方，HER2 過剰発現細胞株に対しては強力な細胞毒性作用を示した（2.2.1 項）。この結果は，陽性対照として用いた T-DM1 と類似していた。また，HER2 過剰発現細胞 BT-474 および EGFR 過剰発現細胞 A431 に対するツカチニブの細胞毒性活性を評価した試験において，ツカチニブは A431 細胞と比較して BT-474 細胞に対してより顕著に細胞毒性作用を示し（2.2.2 項），HER2 と EGFR のリン酸化に対するツカチニブの効力の差と一致していた。この結果は，BT-474 細胞と A431 細胞の増殖阻害 IC_{50} 値が同程度（それぞれ 100 nmol/L および 160 nmol/L）であった HER2/EGFR 阻害薬ラパチニブの公表データとは異なるものであった [1]。HER2 および EGFR に対する共有結合性阻害薬であるネラチニブは，HER2 および EGFR のリン酸化阻害能は同等であったのに対し，A431 細胞（IC_{50} 値：81 nmol/L）に比べて BT-474 細胞（IC_{50} 値：2 nmol/L）に対して強力な増殖阻害能を示した結果が報告されており [2]，HER2 および EGFR に対する選択性を示すデータに不一致があるものの，BT-474 細胞に対しより抗腫瘍効果を示す可能性が考えられている。ツカチニブにおいては，これら 2 つの細胞株を用いたシグナル伝達への影響および細胞毒性の両評価において，一貫して HER2 選択性を示す結果が得られており，ツカチニブが HER2 に対して高い選択性を有するチロシンキナーゼ阻害薬であり，ゆえにツカチニブの抗腫瘍効果は HER2 阻害と密接に関連しているという主張を支持するものと考えられた。

2.2.2 項で示したツカチニブの BT-474 細胞に対する細胞毒性作用の検討の結果，ツカチニブ添加後の細胞数が播種細胞数を下回ったことや，BT-474 細胞のアポトーシスを誘導したことから（2.1.4 項），ツカチニブが腫瘍細胞の細胞死を引き起こす可能性が考えられた。これらの in vitro 試験の結果は，BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを単独投与したときに腫瘍退縮をもたらしたことと符合するものであり（2.3.3 項），これらのデータから，ツカチニブは単独でも HER2 陽性腫瘍細胞に対して細胞毒性作用を示すと考えられた。さらに，ツカチニブとトラスツズマブの併用効果を検討した in vitro および in vivo 試験により，ツカチニブ単独に比べてトラスツズマブと併用することにより細胞毒性作用が増強されることが示された（2.3.5 項および 2.3.6 項）。また，ツカチニブの細胞アポトーシスへの影響を評価した試験では，トラスツズマブとの併用によりアポトーシスの誘導がさらに促進され（2.1.4 項），先に示した Schwill らの報告（ツカチニブとトラスツズマブの併用による HER2 陽性乳癌細胞におけるシグナル伝達阻害の持続時間延長とアポトーシスの亢進）[10] と符合する結果であった。ツカチニブとトラスツズマブの併用により細胞死の誘導が促進されるというコンセプトは，種々の HER2 陽性腫瘍異種移植モデルにおいて，ツカチニブとトラスツズマブの併用投与により，いずれかの単独投与と比較して腫瘍制御が改善され，腫瘍退縮が増加したことによっても裏付けられた（2.3.5 項および 2.3.6 項）。

6.3. HER2 陽性腫瘍移植モデルにツカチニブを単独または併用投与したときの抗腫瘍効果

HER2 陽性腫瘍モデルである 3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルおよび BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを単独投与したところ，用量に伴う腫瘍増殖抑制が認められ，その効果はトラスツズマブと同等またはそれ以上であった（2.3.1 項および 2.3.3 項）。BT-474 腫瘍異種移植モデルにツカチニブを 50 または 100 mg/kg の用量で反復投与したところ，一部の動物では腫瘍退縮

が認められ，in vitro 試験においてツカチニブが BT-474 細胞に対して細胞毒性活性を示したことと符合するものであった（2.1.4 項および 2.2.2 項）。3T3-rErbB2 腫瘍同種移植モデルでは 50 mg/kg 以上のツカチニブ投与により HER2 リン酸化が 90%以上阻害され（2.3.2 項），抗腫瘍効果の評価結果と符合する結果が示された。

BT-474 腫瘍異種移植モデル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て抗腫瘍効果を評価した（2.3.5 項）。ツカチニブ，トラスツズマブおよびドセタキセルのいずれかの単独投与と比較して，ツカチニブとトラスツズマブまたはドセタキセルを併用投与することで，より顕著な抗腫瘍効果が認められた。特に，ツカチニブとトラスツズマブの併用投与群のほとんどの例において完全奏功が示された。また，大腸癌，食道癌，胃癌および胆管癌由来 HER2 陽性腫瘍異種移植モデルにおいてもツカチニブとトラスツズマブの併用投与によってより顕著な抗腫瘍効果がもたらされ，いずれかの単独投与と比較して腫瘍増殖抑制および部分または完全奏功例は増加した（2.3.6 項）。ラパチニブとトラスツズマブの併用による効果を示す非臨床[19]および臨床試験結果[20,21]が報告されており，ツカチニブにおいてもこれらの試験成績と一致する結果が得られた。

HER2 標的チロシンキナーゼ阻害薬とトラスツズマブの併用効果の機序は明確でないものの，それぞれの作用機序（HER2 シグナル伝達阻害および HER2 陽性腫瘍に対する免疫応答の誘導）を相互に補う可能性が考えられる。トラスツズマブは HER2 のリン酸化を促進し，弱いながらも HER2 シグナル伝達のアゴニスト活性を有することが知られている[9,22,23]。一方で HER3 のリン酸化は阻害し，それに伴い AKT への下流のシグナル伝達を抑制する[24]。実際，ツカチニブとトラスツズマブの併用を評価した in vitro 試験では，HER3 および AKT の両方のリン酸化が併用により完全に阻害され，BT-474 細胞のアポトーシスは増強された（2.1.4 項）[10]。これらのデータは，ツカチニブとトラスツズマブの併用が，HER2 陽性腫瘍細胞の主要な腫瘍形成シグナル伝達経路であると考えられている HER2/HER3 ヘテロ二量体の下流のシグナル伝達[25,26]をより効果的に阻害するという仮説を支持している。

細胞の分裂および生存に関わるシグナル伝達の阻害に加えて，ツカチニブとトラスツズマブの併用は，宿主免疫系の誘導をより効果的なものにする可能性がある。トラスツズマブの抗腫瘍活性は，HER2 および HER3 を介するシグナル伝達への作用と，Fc 受容体との相互作用を介した自然免疫エフェクター機能の誘導の両方によるものと考えられており，さらには HER2 陽性腫瘍に対する獲得免疫を促進する可能性もある[27]。ツカチニブによる腫瘍細胞死の誘導が免疫エフェクター細胞の腫瘍への浸潤を促進することで，T 細胞の腫瘍細胞抗原へのプライミングが顕著となり，より効果的な自然免疫活性化を促す可能性が考えられる。

6.4. 頭蓋内 HER2 陽性腫瘍に対するツカチニブの効果

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，生存率の改善が認められた（2.3.4 項）。この結果は，BT-474 細胞皮下移植モデルを用いた試験で示されたツカチニブの作用と一致しており，中枢神経系領域に転移した腫瘍に対してツカチニブが効果を発揮する可能性を示唆するものであった。[^{14}C]ツカチニブを頭蓋内 BT-474 腫瘍異種移植モデルに経口投与した生体内分布試験（CTD 2.6.4.4.4.1）において，ツカチニブは正常な脳組織に比べて腫瘍組織への分布が顕著であった。正常ラット（CTD 2.6.4.4.4.2）およびマウス（CTD 2.6.4.4.4.1）を用いた分布

試験ではツカチニブの中枢神経組織への分布は限定的であった一方，BT-474 腫瘍頭蓋内移植モデルでは腫瘍組織への分布が認められたことは，BT-474 腫瘍が頭蓋内に存在することでもたらされる血液脳腫瘍関門の病理学的な環境が影響した可能性が考えられた。また，中枢神経組織の腫瘍にツカチニブがとどまるのは，ツカチニブが HER2 キナーゼドメインとの乖離速度が緩徐であることが一因である可能性が考えられた（2.1.1 項）。

正常な中枢神経系への分布が限られているにもかかわらず，中枢神経系への移植腫瘍における HER2 活性を阻害するツカチニブの作用は，HER2 を標的とする他の低分子および高分子薬にも認められる特性であり[28,29]，ラパチニブの非臨床試験[30]および臨床使用[31,32]においても報告されている。ツカチニブの脳への移行の機構は検討しておらず不明であるが，P-gp 基質が血液脳関門および血液腫瘍関門を通過することが報告されている[33,34]。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 を介した排出クリアランスは減少する。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タンパク質の発現は低下する。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[28,34,35,36]。このような要因から，ヒト脳転移腫瘍へのツカチニブの分布が正常な中枢神経系への分布と比較して増強する可能性がある。

6.5. ツカチニブの安全性薬理試験成績

hERG チャネルに対する影響を評価した in vitro 試験において，ツカチニブの IC_{50} 値は 13.51 µmol/L と推定された（4.1 項）。一方，BT-474 細胞株における HER2 キナーゼ活性に対する阻害に関する IC_{50} 値は 9.88 nmol/L であり（2.1.2 項），目的とする薬理学的標的と hERG チャネルの阻害能に 1000 倍以上の乖離が認められた。また，臨床用量を投与したヒトにおける非結合型ツカチニブの C_{max} は 0.040 µmol/L であり（ONT-380-012，part D），hERG チャネルに対する IC_{50} 値の約 330 分の 1 であった。これらの結果は，サルに最大 45 mg/kg の用量で 1 日 2 回経口投与した試験で，QT および QTc を含む心電図パラメータに有意な影響をもたらさなかったことと符合するものであった（4.2 項）。加えて，サルの試験では心拍数や平均動脈圧に対しても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（4.3 項）および呼吸系（4.4 項）への影響を示さなかった。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（4.6 項）。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（4.5 項），胃刺激性が示されたが（4.7 項），30 mg/kg 群では影響はみられなかった。これらの安全性薬理試験において，ツカチニブの潜在的なリスクは認められなかった。

6.6. 結論

効力を裏付ける試験および副次的薬理試験において，ツカチニブは HER2 キナーゼ活性に対して高い選択性を有する阻害能を示し，HER2 陽性腫瘍に対する抗腫瘍効果を示した。また，安全性薬理試験ではツカチニブによる影響はみられず，潜在的なリスクは特定されなかった。以上の薬理試験成績は，ツカチニブの HER2 陽性乳癌患者への投与を支持するものと考えられた。

7. 図表

図表は本文中または概要表に示した。

参考文献

[1] Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther. 2001;1(2):85-94.

[2] Rabindran SK, Discafani CM, Rosfjord EC, et al. Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. Cancer Res. 2004;64(11):3958-65.

[3] Shagufta, Ahmad I. An insight into the therapeutic potential of quinazoline derivatives as anticancer agents. Medchemcomm. 2017;8(5):871-85.

[4] 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.

[5] Wood ER, Truesdale AT, McDonald OB, et al. A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. Cancer Res. 2004;64(18):6652-9.

[6] Szollosi J, Balazs M, Feuerstein BG, et al. ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. Cancer Res. 1995;55(22):5400-7.

[7] Merlino GT, Xu YH, Ishii S, et al. Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. Science. 1984;224(4647):417-9.

[8] Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. Cell. 2017;169(3):381-405.

[9] Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. Cancer Cell. 2004;6(2):117-27.

[10] Schwill M, Tamaskovic R, Gajadhar AS, et al. Systemic analysis of tyrosine kinase signaling reveals a common adaptive response program in a HER2-positive breast cancer. Sci Signal. 2019;12(565):eaau2875.

[11] Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. Annu Rev Med. 2016;67:11-28.

[12] Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. Nature. 1986;319(6050):226-30.

[13] Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. Cancer Res. 2008;68(22):9280-90.

[14] 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.

[15] Kasprzyk PG, Song SU, Di Fiore PP, et al. Therapy of an animal model of human gastric cancer using a combination of anti-erbB-2 monoclonal antibodies. Cancer Res. 1992;52(10):2771-6.

[16] Schaefer G, Shao L, Totpal K, et al. Erlotinib directly inhibits HER2 kinase activation and downstream signaling events in intact cells lacking epidermal growth factor receptor expression. Cancer Res. 2007;67(3):1228-38.

[17] Irie H, Ito K, Fujioka Y, et al. TAS0728, A Covalent-binding, HER2-selective Kinase Inhibitor Shows Potent Antitumor Activity in Preclinical Models. Mol Cancer Ther. 2019;18(4):733-42.

[18] Canonici A, Gijsen M, Mullooly M, et al. Neratinib overcomes trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancer. Oncotarget. 2013;4(10):1592-605.

[19] Scaltriti M, Verma C, Guzman M, et al. Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. Oncogene. 2009;28(6):803-14.

[20] Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. Lancet. 2012;379(9816):633-40.

[21] Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, et al. Overall survival benefit with lapatinib in combination with trastuzumab for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: final results from the EGF104900 study. J Clin Oncol. 2012;30(21):2585-92.

[22] Gijsen M, King P, Perera T, et al. HER2 phosphorylation is maintained by a PKB negative feedback loop in response to anti-HER2 herceptin in breast cancer. PLoS Biol. 2010;8(12):e1000563.

[23] Sarup JC, Johnson RM, King KL, et al. Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. Growth Regul. 1991;1(2):72-82.

[24] 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.

[25] 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.

[26] Dey N, Williams C, Leyland-Jones B, et al. A critical role for HER3 in HER2-amplified and non-amplified breast cancers: function of a kinase-dead RTK. Am J Transl Res. 2015;7(4):733-50.

[27] Bianchini G, Gianni L. The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. Lancet Oncol. 2014;15(2):e58-68.

[28] 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.

[29] Askoxylakis V, Kodack DP, Ferraro GB, et al. Antibody-based therapies for the treatment of brain metastases from HER2-positive breast cancer: time to rethink the importance of the BBB? Breast Cancer Res Treat. 2017;165(2):467-8.

[30] Taskar KS, Rudraraju V, Mittapalli RK, et al. Lapatinib distribution in HER2 overexpressing experimental brain metastases of breast cancer. Pharm Res. 2012;29(3):770-81.

[31] Morikawa A, Peereboom DM, Thorsheim HR, et al. Capecitabine and lapatinib uptake in surgically resected brain metastases from metastatic breast cancer patients: a prospective study. Neuro Oncol. 2015;17(2):289-95.

[32] Saleem A, Searle GE, Kenny LM, et al. Lapatinib access into normal brain and brain metastases in patients with Her-2 overexpressing breast cancer. EJNMMI Res. 2015;5:30.

[33] Raub TJ, Wishart GN, Kulanthaivel P, et al. Brain Exposure of Two Selective Dual CDK4 and CDK6 Inhibitors and the Antitumor Activity of CDK4 and CDK6 Inhibition in Combination with Temozolomide in an Intracranial Glioblastoma Xenograft. Drug Metab Dispos. 2015;43(9):1360-71.

[34] 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.

[35] 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.

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

TABLE OF CONTENTS

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS 6
2.6.3.3. SECONDARY PHARMACOLOGY 14
2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY 15

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Tucatinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics				
Effect of Tucatinib (ARRY-380) in Blocking HER2 Phosphorylation in the BT-474 Tumor Derived Cell Line	HER2 phosphorylation in the BT-474 cell line	In vitro	Array Biopharma, Cascadian Therapeutics	**TRN-5480**
Effect of Tucatinib (ARRY-380) in Blocking EGFR Phosphorylation in the A431 Tumor Derived Cell Line	EGFR phosphorylation in the A431 cell line	In vitro	Array Biopharma, Cascadian Therapeutics	**TRN-5477**
HER2-Mediated Signal Transduction Inhibition & Apoptosis Induction with Tucatinib & Trastuzumab Combination Treatment in the BT-474 Cell Line	BT-474 cell line	In vitro	Cascadian Therapeutics	**TRN-5517**
Cytotoxic Activity of the HER2-specific Tyrosine Kinase Inhibitor Tucatinib Against a Panel of Breast Carcinoma Cell Lines with a Range of HER2 Expression	Breast cancer cell lines HCC-1419, SK-BR-3, HCC-1954, ZR-75-30, AU-565, HCC-1569, HCC-2218, BT-474, UACC-893, UACC-812, HCC-202, HS-578T, JIMT-1, BT-483, CAMA-1, T47D, MCF7 (ATCC), MCF7 (NCI), MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, DU-4475	In vitro	Seattle Genetics	**TRN-5430**
Activity of Tucatinib (ARRY-380) in A431 and BT-474 Cells	A431 and BT-474 cell lines	In vitro	Array Biopharma, Cascadian Therapeutics	**TRN-5456**
Analysis of the Breast Carcinoma Cytotoxicity and HER2 Inhibition Activity of Tucatinib Hydroxylated Metabolite (ONT-993) Enantiomers	A431 and BT-474 cell lines	In vitro	Seattle Genetics	**TRN-5444**
Efficacy of ErbB Inhibitors in 3T3-rErbB2 Tumor Model in Nude Mice	Nu/nu nude mouse NIH-3T3 rHER2 subcutaneous allograft tumor model	Vehicle control, Tucatinib PO BID 25, 50, or 75 mg/kg Tucatinib PO QD 50, 75, 100 or 150 mg/kg Trastuzumab IP Q7D 20 mg/kg	Array Biopharma	**TRN-5453**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Exploratory (non-GLP) study examining the pharmacokinetic pharmacodynamic effects of AR00432380 administered to 3T3-rErbB2 tumor-bearing mice	Nu/nu nude mouse NIH-3T3 rHER2 subcutaneous allograft tumor model	Tucatinib PO 25, 50, or 100 mg/kg	Array Biopharma	TRN-5458
Anti-tumor Efficacy of Tucatinib in BT-474 Xenograft Model	Nu/nu nude mouse BT-474 subcutaneous xenograft tumor model	Vehicle control Tucatinib PO QD 25, 50, 100 mg/kg Trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg	Array Biopharma, [redacted]	TRN-5454
Exploratory (non-GLP) study evaluating the inhibition of BT-474 breast carcinoma xenograft growth in female nu-nu NCr mice implanted intracranially and treated with ONT-380	Nu/nu NCr mouse BT-474 intracranial xenograft tumor model	Vehicle control Tucatinib PO BID 75 mg/kg	Array Biopharma, Cascadian Therapeutics	TRN-5455
Evaluation of ARRY-380 (NF12) Monotherapy and Dual Combinations with Trastuzumab and Docetaxel against the BT-474 Human Breast Carcinoma in C.B.-17 SCID Mice	C.B.-17 SCID mouse BT-474 subcutaneous xenograft tumor model	Vehicle control Tucatinib PO QD 52.7, 105.4 mg/kg Trastuzumab IP QW 20 mg/kg Tucatinib PO QD 52.7 or 105.4 mg/kg + trastuzumab IP QW 20 mg/kg Tucatinib PO QD 52.7 or 105.4 mg/kg + docetaxel IV QW 10 mg/kg	[redacted], Array Biopharma	TRN-5452
Efficacy of Tucatinib alone or in combination with trastuzumab in a NCI-N87 HER2 Amplified Gastric Tumor Xenograft Model	Nude mouse N87 xenograft tumor model	Vehicle control Tucatinib PO BID 50 mg/kg Trastuzumab IP BIW 20 mg/kg Tucatinib PO BID 50 mg/kg + trastuzumab IP BIW 20 mg/kg	Cascadian Therapeutics	TRN-5552
In Vivo Evaluation of Cascadian Therapeutics Agent, ONT-380, in Low Passage Champions TumorGraft® Models of Human Colorectal Cancer in Immunocompromised Mice	Nu/nu nude mouse PDX models CTG-0121, CTG-0383, CTG-0784	Vehicle control Tucatinib PO BID 50 mg/kg Trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg Tucatinib PO BID 50 mg/kg + trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg	[redacted], Cascadian Therapeutics	TRN-5550

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
In Vivo Evaluation of Cascadian Therapeutics Agent, ONT-380, in Low Passage Champions TumorGraft® Models of Human Esophageal and Cholangiocarcinoma Cancer in Immunocompromised Mice	Nu/nu nude mouse PDX models CTG-0137, CTG-0138, CTG-0927	Vehicle control Tucatinib PO BID 50 mg/kg Trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg Tucatinib PO BID 50 mg/kg + trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg	[redacted], Cascadian Therapeutics	TRN-5551
Assessment of the In Vivo Anti-Tumor Efficacy of an Investigational Small-Molecule Inhibitor in Monotherapy and in Combination with Trastuzumab in the Patient-Derived Asian Gastric Cancer Models GXA3054, GXA3038 and GXA3039 Implanted Subcutaneously in Female NMRI Nude Mice	NMRI nu/nu mouse PDX models GXA3038, GXA3039, GXA3054	Vehicle control Tucatinib PO BID 50 mg/kg Trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg Tucatinib PO BID 50 mg/kg + trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg	[redacted], Cascadian Therapeutics	TRN-5553
Secondary Pharmacodynamics				
Non-GLP Studies Characterizing the Biochemical Activity of ARRY-380 (AR00432380) and its Active Metabolite AR00440993	In vitro enzymatic kinase assays	In vitro	Array Biopharma	TRN-5457
Safety Pharmacology				
Cardiac potassium channel	cloned hERG channels expressed in HEK293 cells	In vitro	[redacted]	1140-031
Gastric Secretion	Rat	Tucatinib PO 0, 10, 30, and 100 mg/kg single dose	[redacted]	AA37828
Intestinal Transit	Rat	Tucatinib PO 0, 10, 30, and 100 mg/kg single dose	[redacted]	AA37826
Gastrointestinal tolerance	Rat	Tucatinib PO 0, 10, 30, and 100 mg/kg single dose	[redacted]	AA37827
Behavior and Physiologic parameters	Rat	Tucatinib PO 0, 10, 30, and 100 mg/kg single dose	[redacted]	AA37824
Respiratory	Rat	Tucatinib PO 0, 10, 30, and 100 mg/kg single dose	[redacted]	AA37825
Cardiovascular	Cynomolgus Monkey	Tucatinib PO 0, 10, 30, and 45 mg/kg/dose twice daily (0, 20, 60, and 90 mg/kg/day) on Days 1, 2, 7, and 12	[redacted]	JAY00082

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Pharmacodynamic Drug Interactions				
None				

Abbreviations: BID=twice daily; BIW=twice weekly; EGFR=epidermal growth factor receptor; GLP=Good Laboratory Practice; HEK= Human Embryonic Kidney; HER2=Human Epidermal Receptor Type 2; hERG= human ether-a-go-go-related gene; IP=intraperitoneal; IV=intravenous; PDX= patient derived xenograft; PO=orally; Q3D=once in three days; Q7D or QW=once weekly; QD=once daily

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Tucatinib

Objective	Species/Test System	Regimen	Key Results	Study Number
In vitro				
Effect of Tucatinib (ARRY-380) in Blocking HER2 Phosphorylation in the BT-474 Tumor Derived Cell Line	HER2 phosphorylation in the BT-474 cell line	In vitro	Results from 16 independent assays performed in the HER2 amplified cell line BT-474 demonstrate tucatinib inhibits HER2 phosphorylation with a mean IC_{50} of 9.88 nmol/L.	TRN-5480
Effect of Tucatinib (ARRY-380) in Blocking EGFR Phosphorylation in the A431 Tumor Derived Cell Line	EGFR phosphorylation in the A431 cell line	In vitro	Results from 13 independent assays performed in the EGFR amplified cell line A431 demonstrate tucatinib inhibits EGFR phosphorylation with a mean IC_{50} of greater than 13,000 nmol/L.	TRN-5477
HER2-Mediated Signal Transduction Inhibition and Apoptosis Induction with Tucatinib & Trastuzumab Combination Treatment in the BT-474 Cell Line	BT-474 cell line	In vitro	Results from these studies demonstrate tucatinib potently inhibits the phosphorylation of HER2, HER3, AKT, ERK1/2, and MEK in the HER2+cell line BT-474. When tested in combination with 150 µg/mL of trastuzumab, a HER2 targeted antibody, tucatinib potently inhibited the phosphorylation of HER3 and AKT and resulted in enhanced apoptosis in BT-474 cells, as measured by caspase 3/7 cleavage. These data demonstrate tucatinib is a potent inhibitor of HER2, and that this results in the inhibition of downstream signal transduction including phosphorylation of HER3 and kinases in the MAPK and PI3K pathways. In combination with trastuzumab, the phosphorylation of HER3 and AKT was potentiated and apoptosis in BT-474 cells was stimulated by the combination of tucatinib and trastuzumab.	TRN-5517

Objective	Species/Test System	Regimen	Key Results	Study Number
Cytotoxic Activity of the HER2-specific Tyrosine Kinase Inhibitor Tucatinib Against a Panel of Breast Carcinoma Cell Lines with a Range of HER2 Expression	Breast cancer cell lines HCC-1419, SK-BR-3, HCC-1954, ZR-75-30, AU-565, HCC-1569, HCC-2218, BT-474, UACC-893, UACC-812, HCC-202, HS-578T, JIMT-1, BT-483, CAMA-1, T47D, MCF7 (ATCC), MCF7 (NCI), MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, DU-4475	In vitro	The results from this study demonstrate the cytotoxic activity of tucatinib in breast cancer derived cell lines is closely associated with HER2 expression levels. A panel of 22 breast cancer cell lines having a range of HER2 expression levels was used to characterize tucatinib potency. HER2 receptor levels were determined using quantitative flow cytometry. Tucatinib displayed potent antitumor activity (EC_{50} values 18–431 nmol/L) in all evaluated HER2-high (>300,000 HER2 receptors/cell) breast cancer cell lines. In contrast, tucatinib lacked potent cytotoxic activity in HER2-low and HER2-negative breast cancer cell lines. When evaluated in parallel, tucatinib showed a similar cytotoxic activity to HER2 expression level relationship with the anti-HER2 antibody drug conjugate TDM-1 (trastuzumab emtansine) in these breast cancer cell lines. We conclude that the antitumor activity of tucatinib against breast cancer cells is dependent upon the amplification and overexpression of cell surface HER2 kinase.	TRN-5430
Activity of Tucatinib (ARRY-380) in A431 and BT-474 Cells	BT-474 and A431 cell lines	In vitro	The results of this study demonstrate tucatinib is a more potent inhibitor of cell proliferation in the HER2+ cell line BT-474 compared to the EGFR driven cell line A431. Tucatinib was evaluated using 4-fold serial dilutions covering a range from 0.15 to 10,000 nmol/L. Docetaxel was used as a positive control in the assays and was evaluated using 3-fold serial dilutions covering a concentration range of 0.02–100 nmol/L. The IC_{50} for tucatinib in BT-474 cells was 15.45 nmol/L and in A431 cells was 2981 nmol/L. Docetaxel demonstrated an IC_{50} of 0.64 nmol/L in A431 cells and 4.94 nmol/L in BT-474 cells.	TRN-5456

Objective	Species/Test System	Regimen	Key Results	Study Number
Analysis of the Breast Carcinoma Cytotoxicity and HER2 Inhibition Activity of Tucatinib Hydroxylated Metabolite (ONT-993) Enantiomers	A431 and BT-474 cell lines	In vitro	This study was conducted to determine the HER2 specificity and inhibitory activity of tucatinib and the R/S enantiomers of its hydroxylated metabolite ONT-993 (SGD-8288 and SGD-8289). The results show the R/S enantiomers of the ONT-993 metaboliteshave very similar HER2-dependent cytotoxic activity and kinase inhibitory profiles for HER2 and EGFR, but are slightly less potent than tucatinib. Both enantiomers inhibit the proliferation of BT-474 cells (EC_{50} values of 60 and 87 nmol/L, respectively) less potently than tucatinib (EC_{50} 27 nmol/L). The ONT-993 enantiomers had negligible cytotoxicity activity against the EGFR-driven A431 squamous carcinoma cell line (EC_{50} >25,000 nmol/L) whereas tucatinib displayed an EC_{50} of 15,214 nmol/L in A431 cells. Phospho-HER2 and phospho-EGFR ELISA assays demonstrated the enantiomers have similar inhibitory activity towards Phospho-HER2 (IC_{50} values of 53 and 55 nmol/L), but are less potent than tucatinib (IC_{50} 12 nmol/L) in BT-474 cells. ONT-993 enantiomers and tucatinib had minimal activity against phospho-EGFR in A431 cells, with IC_{50} values >10,000 nmol/L for each.	TRN-5444
In vivo				
Efficacy of ErbB Inhibitors in 3T3-rErbB2 Tumor Model in Nude Mice	Nu/nu nude mouse NIH-3T3 rHER2 subcutaneous allograft tumor model	Vehicle control, Tucatinib PO BID 25, 50, or 75 mg/kg Tucatinib PO QD 50, 75, 100, or 150 mg/kg Trastuzumab IP Q7D 20 mg/kg	In this study, ARRY-380 (Tucatinib) was evaluated in vivo in mice bearing 3T3-rErbB2 tumor allografts. Mice were administered test articles, 25–150 mg/kg ARRY-380 on once or twice daily schedules or 20 mg/kg trastuzumab (weekly) as single agents for 9 days. The doses and schedules employed in this study were well tolerated in all groups with body weight <1% for any treatment group and no deaths attributed to test article administration. Both test articles were effective at inhibiting tumor growth. ARRY-380 exhibited 32% to 80% tumor growth inhibition depending on dose and schedule. Trastuzumab administered at 20 mg/kg, weekly, resulted in 45% tumor growth inhibition which was equivalent to ARRY-380 when administered 75 mg/kg QD. Neither test article had significant effects on tumor regression. Dose related tumor growth inhibition for ARRY-380 was apparent overall for both BID and QD schedules with 150 mg/kg QD being the most effective regimen tested in this study. Comparison of the total daily dose delivered either once or twice daily showed that tumor growth inhibition was independent of schedule in this model at these doses.	TRN-5453

Objective	Species/Test System	Regimen	Key Results	Study Number
Exploratory (non-GLP) study examining the phamacokinetic pharmacodynamic effects of AR00432380 administered to 3T3-rErbB2 tumor-bearing mice	Nu/nu nude mouse NIH-3T3 rHER2 subcutaneous allograft tumor model	Tucatinib PO 25, 50, or 100 mg/kg	In this study, the pharmacodynamic effects of ARRY-380 (Tucatinib) were evaluated using the NIH-3T3 rHER2 subcutaneous allograft model and employing the phosphorylation of ErbB2 (pErbB2) as an endpoint. ARRY-380 was well tolerated in all studies at the doses noted per protocol. No clinical observations or deaths were observed with this single dose schedule. Both time and dose-dependent effects were observed with maximal inhibition of pErbB2 occurring at 50 mg/kg and above from 1 to 4 hrs. Equivalent inhibition observed when comparing salt form versus free base at an equivalent dose. The plasma concentration required to inhibit pErbB2 by 50% (IC_{50}) or 90% (IC_{90}) was modeled by combining the data from all studies. The resulting values were 490 ng/mL and 1830 ng/mL for IC_{50} and IC_{90}, respectively.	TRN-5458
Anti-tumor Efficacy of Tucatinib in BT-474 Xenograft Model	Nu/nu nude mouse BT-474 subcutaneous xenograft tumor model	Vehicle control Tucatinib PO QD 25, 50, 100 mg/kg Trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg	In this study, the activity of tucatinib was evaluated in mice bearing BT-474 tumor xenografts. Mice were administered test articles; vehicle control, tucatinib, or Herceptin over the course of 23 days. Tumor size and body weight were measured at baseline (Day 1), and Days 6, 13, 16, 20, and 23. Overall, tucatinib at 50 mg/kg and 100 mg/kg QD showed superior tumor growth inhibition relative to control. When dosed at 50 mg/kg QD, tucatinib produced a percentage Tumor Growth Inhibition (%TGI) of 81.21 and 2 partial regressions. When tucatinib was dosed QD at 100 mg/kg, %TGI was 81.27 with 4 partial regressions. When dosed at 25 mg/kg tucatinib produced a %TGI of 48.7 with no regressions. 20 mg/kg trastuzumab on Q3D dosing schedule produced a %TGI of 67.05 with no regressions. The high dose group animals experienced a maximum body weight loss of 9.27% during the study, peaking on Day 13. No deaths or clinical observations were noted.	TRN-5454

Objective	Species/Test System	Regimen	Key Results	Study Number
Exploratory (non-GLP) study evaluating the inhibition of BT-474 breast carcinoma xenograft growth in female nu-nu NCr mice implanted intracranially and treated with ONT-380	Nu/nu NCr mouse BT-474 intracranial xenograft tumor model	Vehicle control Tucatinib PO BID 75 mg/kg x 56 days	In this study ONT-380 (Tucatinib) was studied in an intracranial BT-474 tumor model. Mice received intracranial injections of BT-474 cells, and starting two days after the implantation, mice started daily treatment with test article (ONT-380) for up to 8 weeks. The mice were sacrificed upon showing signs of neurological problems, or body weight loss of 20%. By Day 56, mice treated with ONT-380 showed increased survival (69%) compared to the dose group receiving vehicle (23%). Intracranial levels of ErbB2 confirmed successful engraftment and treatment with ONT-380 resulted in reduced levels of phosphorylated ErbB2 in brain homogenate compared with the vehicle treated group. ONT-380 significantly enhanced survival in this intracranial xenograft model.	TRN-5455

Objective	Species/Test System	Regimen	Key Results	Study Number
Evaluation of ARRY-380 (NF12) Monotherapy and Dual Combinations with Trastuzumab and Docetaxel against the BT-474 Human Breast Carcinoma in C.B.-17 SCID Mice	C.B.-17 SCID mouse BT-474 subcutaneous xenograft tumor model	Vehicle control Tucatinib PO QD 52.7 or 105.4 mg/kg x 21 days Trastuzumab IP QW 20 mg/kg x 3 weeks Tucatinib PO QD 52.7 or 105.4 mg/kg x 21 days + trastuzumab IP QW 20 mg/kg x 3 weeks Tucatinib PO QD 52.7 or 105.4 mg/kg x 21 days + docetaxel IV QW 10 mg/kg x 3 weeks	In this study ARRY-380 (Tucatinib) was evaluated either alone, or in combination with trastuzumab or docetaxel in the BT-474 human breast carcinoma xenograft model. ARRY-380 (in 30% Captisol®) was given orally at 52.7 and 105.4 mg/kg once daily for twenty-one days (QD x 21). Trastuzumab was given intraperitoneally at 20 mg/kg once weekly for three weeks (qwk x 3). Docetaxel was given intravenously at 10 mg/kg qwk x 3. ARRY-380 monotherapies at 52.7 and 105.4 mg/kg resulted in 62% and 93% Tumor Growth Inhibition (TGI), respectively. Trastuzumab monotherapy resulted in 45% TGI. Combinations of 52.7 and 105.4 mg/kg ARRY-380 with trastuzumab resulted in 95% and 100% TGI, respectively, and were significantly superior to the corresponding ARRY-380 monotherapies ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively) as well as trastuzumab ($P<0.001$) monotherapy. Docetaxel monotherapy resulted in 49% TGI and non-significant activity. The combination of ARRY-380 and docetaxel resulted in 81% TGI and was significantly superior to ARRY-380 ($P<0.05$) and docetaxel ($P<0.01$) monotherapies. Combinations of 52.7 and 105.4 mg/kg ARRY-380 with trastuzumab produced supra-additive respective mean %TGDs of 437 and 469, significantly outperforming the monotherapies ($P<0.001$). Combination of 52.7 mg/kg ARRY-380 and docetaxel yielded a supra-additive mean %TGD of 207, significantly outperforming both monotherapies ($P<0.01$). Monotherapies with 52.7 mg/kg ARRY-380 and trastuzumab yielded no D87 survivors or regressions; their combination yielded a significantly higher total regression rate ($P<0.001$; Fisher's exact test) with 10 tumor-free survivors (TFS). ARRY-380 at 105.4 mg/kg yielded one D87 survivor, 8 partial regressions (PRs), and 1 transient complete regression (CR); combination with trastuzumab yielded 12 TFS, a significant improvement over the total regression rate with trastuzumab ($P<0.001$), and a significant improvement over the TFS rate with 105.4 mg/kg ARRY-380 ($P<0.001$). In summary, each monotherapy caused significant survival extension in the BT-474 breast carcinoma xenograft model and the combinations of 52.7 and 105.4 mg/kg ARRY-380 plus trastuzumab yielded 10/12 and 12/12 TFS, respectively, on D87; 52.7 mg/kg ARRY-380 plus docetaxel yielded 1 PR and 1 TFS. Each combination was tolerable and significantly superior to both corresponding monotherapies.	TRN-5452

Objective	Species/Test System	Regimen	Key Results	Study Number
Efficacy of Tucatinib alone or in combination with trastuzumab in a NCI-N87 HER2 Amplified Gastric Tumor Xenograft Model	Nude mouse N87 xenograft tumor model	Vehicle control Tucatinib PO BID 50 mg/kg x 21 days Trastuzumab IP BIW 20 mg/kg x 3 weeks Tucatinib PO BID 50 mg/kg x 21 days+ trastuzumab IP BIW 20 mg/kg x 3 weeks	The purpose of this study was to evaluate the anti-tumor efficacy of tucatinib as a single agent or in combination with trastuzumab in a NCI-N87 HER2 amplified gastric cancer tumor xenograft model. The anti-tumor effect and tolerability of tucatinib, either alone or in combination with trastuzumab was compared with trastuzumab alone versus vehicle control in the athymic nude mice bearing subcutaneous N87 tumor implants. Tucatinib when administered to athymic nude mice twice daily for 21 consecutive days (42 doses total) by oral gavage at a dose of 50 mg/kg either alone or in combination with Trastuzumab (dosed intraperitoneally twice weekly for a total of 6 doses at 20 mg/kg/dose) shows a potent anti-tumor growth effect in the HER2 amplified NCI-N87 human gastric cancer tumor xenograft model and was well tolerated.	TRN-5552
In Vivo Evaluation of Cascadian Therapeutics Agent, ONT-380, in Low Passage Champions TumorGraft® Models of Human Colorectal Cancer in Immunocompromised Mice	Nu/nu nude mouse PDX models CTG-0121, CTG-0383 or CTG-0784	Vehicle control Tucatinib PO BID 50 mg/kg x 28 days Trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg x 9 doses Tucatinib PO BID 50 mg/kg x 28 days + trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg x 9 doses	In this study, the activity of ONT-380 (Tucatinib) was evaluated in three HER2+ PDX models of colorectal cancer in nu/nu mice. Treatment with 50 mg/kg/dose ONT-380 PO BID for 56 doses or 20 mg/kg/dose Trastuzumab IP Q3D for 9 doses was well tolerated and resulted in significant anti-tumor activity in colorectal cancer models CTG-0121 ($p<0.001$) and CTG-0383 ($p<0.01$) but not in CTG-0784 ($p>0.05$). Treatment with the ONT-380/Trastuzumab combination resulted in significant anti-tumor growth activity in all 3 models.	TRN-5550

Objective	Species/Test System	Regimen	Key Results	Study Number
In Vivo Evaluation of Cascadian Therapeutics Agent, ONT-380, in Low Passage Champions TumorGraft® Models of Human Esophageal and Cholangiocarcinoma Cancer in Immunocompromised Mice	Nu/nu nude mouse PDX models CTG-0137, CTG-0138, CTG-0927	Vehicle control Tucatinib PO BID 50 mg/kg x 28 days Trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg x 9 doses Tucatinib PO BID 50 mg/kg x 28 days + trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg x 9 doses	In this study, the activity of ONT-380 (Tucatinib) was evaluated in two HER2+ PDX models of esophageal cancer and one model of HER2+ cholangiocarcinoma in nu/nu mice. Treatment with 50 mg/kg ONT-380 PO BID up to 56 doses or 20 mg/kg Trastuzumab IP Q3D up to 9 doses was well tolerated and resulted in significant ($p<0.01$) anti-tumor activity in esophageal cancer model CTG-0137 and in cholangiocarcinoma model CTG-0927 but not in esophageal cancer model CTG-0138. Treatment with the ONT-380/Trastuzumab combination resulted in significant ($p<0.001$) anti-tumor activity in all 3 models.	TRN-5551
Assessment of the In Vivo Anti-Tumor Efficacy of an Investigational Small-Molecule Inhibitor in Monotherapy and in Combination with Trastuzumab in the Patient-Derived Asian Gastric Cancer Models GXA3054, GXA3038 and GXA3039 Implanted Subcutaneously in Female NMRI Nude Mice	NMRI nu/nu mouse PDX models GXA3038, GXA3039, GXA3054	Vehicle control Tucatinib PO BID 50 mg/kg x 28 days Trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg x 9 doses Tucatinib PO BID 50 mg/kg x 28 days + trastuzumab IP Q3D 20 mg/kg x 9 doses	In this study, the activity of ONT-380 (Tucatinib) was evaluated in three HER2+ PDX models of gastric cancer in nu/nu mice. Treatments included 50 mg/kg ONT-380 PO BID x 28 days or 20 mg/kg Trastuzumab IP Q3D up to 9 doses or the combination of both ONT-380 and trastuzumab at the same dose schedules. Treatment with ONT-380 or the combination of ONT-380 with trastuzumab in the GXA-3038 gastric cancer model resulted in %TGI of 110 and 116, respectively, and produced 6 partial regressions with, and 3 complete regressions with ONT-380 alone and 4 partial and 6 complete regressions with the combination. Trastuzumab alone produced a %TGI of 50 and did not lead to any tumor regressions. In the GXA-3039 model, the combination of ONT-380 with trastuzumab resulted in a %TGI of 103 and resulted in 3 partial regressions. ONT-380 alone resulted in a %TGI of 48 and trastuzumab a %TGI of 38. Neither drug alone resulted in tumor regressions. In the GXA-3054 model, the combination of ONT-380 and trastuzumab resulted in a %TGI of 137 and produced 2 partial and 8 complete regressions. Trastuzumab alone resulted in a %TGI of 93 and produced 4 partial regressions and 3 complete regressions. ONT-380 alone produced a %TGI of 63 with 1 partial tumor regression.	TRN-5553

Abbreviations: BID=twice daily; BIW=twice weekly; CR= complete regression; EGFR=epidermal growth factor receptor; GLP=Good Laboratory Practice, HER=Human Epidermal Receptor; IC_{50}=half maximal inhibitory concentration, TGI=Tumor Growth Inhibition; IP=intraperitoneal; IV=intravenous; PDX= patient derived xenograft; PO=orally; PR=partial regression; Q3D=once in three days; Q7D or QW=once weekly; QD=once daily; TFS= tumor-free survivors; TGD= tumor growth delay

2.6.3.3. SECONDARY PHARMACOLOGY

Test Article: Tucatinib

Objective	Species/Test System	Regimen	Key Results	Study Number
Non-GLP Studies Characterizing the Biochemical Activity of ARRY-380 (AR00432380) and its Active Metabolite AR00440993	In vitro enzymatic kinase assays	In vitro	Results from this study demonstrate tucatinib is a potent and selective inhibitor of HER2 compared with related tyrosine kinases EGFR and HER4 and screen of 223 serine/threonine and tyrosine kinases. Based on Ki calculations, tucatinib demonstrated a 28- to 88-fold increase in potency for HER2 relative to EGFR, and a 92–105-fold increase in potency for HER2 relative to HER4. When evaluated at 1 and 10 μM in a panel of protein kinases, only 6 kinases showed >75% inhibition, and each were members of the ErbB kinase family (EGFR, EGFR mutants HER4). Similar experiments in this study also demonstrated the racemic hydroxylated metabolite of tucatinib, ONT-993, is also a selective HER2 inhibitor.	TRN-5457

Abbreviations: EGFR=epidermal growth factor receptor; HER=Human Epidermal Receptor; GLP=Good Laboratory Practice

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Tucatinib

Organ System Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiac potassium channel	cloned hERG channels expressed in HEK293 cells	In vitro incubation	0.3, 1.0, 3.0, 10 and 30 µmol/L in physiologic salt solution	NA	Tucatinib inhibited the hERG channel 0.3% at 0.3 µmol/L, 2.9% at 1 µmol/L, 8.6% at 3 µmol/L, and 42% at 10 µmol/L, respectively, and was not soluble at 30 µM. The calculated IC_{50} was 13.5 µmol/L.	Yes	1140-031
Gastric Secretion	Rat	Oral gavage	0, 10, 30, and 100 mg/kg single dose	10 males/ group	No effects at 10 or 30 mg/kg. At 100 mg/kg, there was a trend for increased secretion volume and significant increase in gastric secretion and acidity 4 hr postdose. NOEL=30 mg/kg.	Yes	AA37828
Intestinal Transit	Rat	Oral gavage	0, 10, 30, and 100 mg/kg single dose	10 males/ group	No effects on intestinal transit up to 100 mg/kg single dose. NOEL=100 mg/kg.	Yes	AA37826
Gastrointestinal tolerance	Rat	Oral gavage	0, 10, 30, and 100 mg/kg single dose	10 males/ group	Gastric irritation was significantly higher at 100 mg/kg than in the vehicle control group. NOEL=30 mg/kg.	Yes	AA37827
Behavior and Physiologic parameters	Rat	Oral gavage	0, 10, 30, and 100 mg/kg single dose	6 males/ group	No neurobehavioral or physiologic effects except for slightly lower body weights at 100 mg/kg. NOEL=100 mg/kg.	Yes	AA37824
Respiratory	Rat	Oral gavage	0, 10, 30, and 100 mg/kg single dose	8 males/ group	No alterations in respiratory parameters. NOAEL=100 mg/kg.	Yes	AA37825
Cardiovascular	Cynomolgus Monkey	Oral gavage	0, 10, 30, and 45 mg/kg/dose twice daily (0, 20, 60, and 90 mg/kg/day) on Days 1, 2, 7, and 12	6 males/ group	No alterations in cardiac parameters; transient distension of abdomen at 60 mg/kg/day only after the second dose on Day 7. NOEL=45 mg/kg/dose (90 mg/kg/day).	Yes	JAY00082

Abbreviations: hERG=human ether-a-go-go-related gene; NA=not applicable; IC_{50}= half maximal inhibitory concentration; NOEL=no observed effect level; NOAEL=no observed adverse effect level