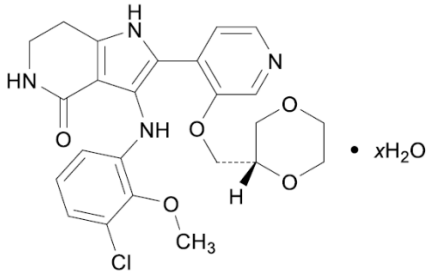
2.6.1 緒言

セバベルチニブ（以下、BAY 2927088 と表記する）はヒト上皮成長因子受容体 2（HER2）のチロシンキナーゼに対する可逆的阻害剤であり、*HER2* 遺伝子エクソン 20 挿入（ex20ins）変異及び点変異を有する HER2 を阻害し、リン酸化を抑制することにより下流のマイトジェン活性化プロテインキナーゼ経路へのシグナル伝達を阻害する。BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌に対する治療薬として開発中である。

理化学的性状に関する情報を以下に記載する。申請効能・効果及び申請用法・用量は 1.5 を参照。

構造式	
化学名	3-(3-chloro-2-methoxyanilino)-2-(3-{[(2S)-1,4-dioxan-2-yl] methoxy} pyridin-4-yl)-1,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrrolo[3,2-c] pyridin-4-one-hydrate
分子式	$C_{24}H_{25}ClN_4O_5 \cdot xH_2O$
分子量	484.93（無水物）
化合物番号	BAY 2927088（無水物）

抗悪性腫瘍薬としての開発及び承認申請を支持する非臨床試験成績は 2.6.2 以降に詳細に示す。また、非臨床試験の概括評価（2.4）及び非臨床試験の概要（2.6.1～2.6.7）に使用した略語の一覧を以下に示す。

略語一覧

略語	英語名称	日本語名称
2-AA	2-aminoantharcene (Anthracene-2-amine)	2-アミノアントラセン
2-NF	2-Nitrofluorene (2-nitro-9H-fluorene)	2-ニトロフルオレン
2QD, BID	2 times daily (2 quaque die/bis in die)	1日2回
4-NPDA	4-Nitro-1,2-phenylene diamine	4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン
5-HT_{2B}	5-hydroxytryptamine 2B receptor	5-ヒドロキシトリプタミン2B受容体
%	percent	パーセント
^{14}C	carbon 14 labeled	^{14}C標識
℃	degree Celsius	セルシウス度
A	apical membrane	頂端膜
AGP	α1-acid glycoprotein	α1-酸性糖タンパク
ALP	alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ANOVA	analysis of variance	分散分析
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC, $AUC_{(0-\infty)}$	area under curve (from time 0 to infinity)	(0時間から無限大時間までの) 濃度－時間曲線下面積
AUC_{norm}	dose normalized AUC	用量及び体重で正規化したAUC
AUC(0-tlast)	AUC from time 0 to last timepoint > lower limit of quantitation	0時間から定量可能であった最終時点までのAUC
AUC(0-x)	AUC from time 0 to x h	0時間からx時間までのAUC
$AUC(0-x)_{norm}$	AUC(0-x), normalized	用量及び体重で正規化したAUC(0-x)
AUC(tlast-inf)	AUC from last timepoint > lower limit of quantitation to infinity	定量可能であった最終時点から無限大時間までのAUC
AUC(t1-tlast)	AUC from first timepoint to last timepoint > lower limit of quantitation	初回試料採取時点から定量可能であった最終時点までのAUC
AUCR	AUC ratio	AUC比
AUC_u	area under curve of unbound fraction	非結合型濃度のAUC
B	basal membrane	基底膜
Balb/c	Bagg's albino C (mouse strain)	Bagg albino系統マウス
BCS	biopharmaceutical classification system	生物薬剤学分類システム
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク
BDC	bile-duct cannulated	胆管カニューレ挿入
Bid , BID	bis in die (twice a day)	1日2回
BP	blood pressure	血圧

略語	英語名称	日本語名称
BQL	below quantitation limit	定量下限未満
BSA	body surface area	体表面積
BSA	bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
BSP	sulfobromophthalein	スルホブロモフタレイン
BUN	Blood urea nitrogen	血中尿素窒素
BW	body weight	体重
C_{24}	drug concentration in plasma at 24 h after administration	投与後 24 時間における血漿中薬物濃度
C(x)	concentration at time point x	投与後 x 時間における濃度
Caco-2	human colon adenocarcinoma cell line	ヒト結腸腺癌由来細胞
CA-T	carnitine acetyl transferase	カルニチンアセチルトランスフェラーゼ
C_B / C_b / C_{blood}	concentration in blood	血液中濃度
CD-1	Charles River Durhams-1 strain (mouse strain)	Charles River Durhams 系統マウス
$C_{eq,max}$	maximum concentration of radioactivity	最高放射能濃度
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	欧州医薬品委員会
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CL	clearance	クリアランス
CL_B / Cl_b / CL_{Blood}	blood clearance	血液クリアランス
C_{max}	maximum concentration after single dose administration	単回投与後の最高濃度
$C_{max,norm}$	C_{max}, normalized	用量及び体重で正規化した C_{max}
$C_{max,u}$	maximum concentration of unbound fraction	非結合型薬物の C_{max}
$C_{max,ss,u}$	unbound C_{max} at steady state	定常状態における $C_{max,u}$
CNS	central nervous system	中枢神経系
COX	cyclooxygenase	シクロオキシゲナーゼ
C_P / C_p / C_{plasma}	concentration in plasma	血漿中濃度
CREA	creatinine	クレアチニン
$C_{trough,ss}$	concentration before next administration at steady state	定常状態における次投与直前の血漿中濃度
$C_{trough,u}$	concentration of unbound fraction before next administration at steady state	定常状態における次投与直前の非結合型薬物の血漿中濃度
CTD	Common Technical Document	国際共通化資料
C_{tint}	Concentration of TK evaluation interval	TK 測定最終時点の血中濃度
Cumene	Cumene hydroperoxide	クメンヒドロペルオキシド
CV	coefficient of variation	変動係数
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450

略語	英語名称	日本語名称
d	day	日
D	dose	用量
DDI	drug-drug interaction	薬物相互作用
demin.	demineralized	脱イオン
delins	deletion-insertion	欠失挿入
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DPBS	Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline	ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水
DRF	dose range finding	用量設定
dup	duplication	重複
EC_{50}	concentration at which there is a 50% maximal induction effect	最大効果の 50%をもたらす濃度
ECG	electrocardiogram	心電図
E_{max}	maximum effect	最大効果
E_{max}	maximal fold induction	最大誘導作用
ECOD	7-ethoxycoumarin-deethylase	7-エトキシクマリンデエチラーゼ
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
e.g.	exempli gratia, for example	例えば
EGFR	epidermal growth factor receptor	上皮成長因子受容体
EFD	Embryo-fetal development	胚・胎児発生
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
Ep	enantiomeric purity	鏡像異性体純度
eq	equivalent	等量
ER	efflux ratio	排出比
ERK	extracellular signal-regulated kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
ERY	erythrocyte	赤血球
EROD	7-ethoxyresorufin-deethylase	7-エトキシレゾルフィンデエチラーゼ
ESD	Escalating single dose	漸増単回投与
EtOH	ethanol	エタノール
ex19del	exon19 deletion	エクソン 19 欠失
ex20ins	exon20 insertion	エクソン 20 挿入
F	bioavailability	バイオアベイラビリティ
F, f	female(s)	雌
F_a	fraction absorbed	吸収率
FCS	fetal calf serum	ウシ胎児血清
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
F_g	Intestinal availability	消化管アベイラビリティ
f_m	fraction metabolized	消失に対する代謝寄与率
FRET	fluorescence resonance energy transfer	蛍光共鳴エネルギー移動
f_u	fraction of free (unbound) drug	薬物の非結合型分率
g	gram	グラム
GCP	Good Clinical Practice	医薬品の臨床試験の実施に関する基準

略語	英語名称	日本語名称
GD/GD X	gestation day	妊娠日数／妊娠X日目
GIT	gastrointestinal tract	消化管
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
GLU-T	UDP-Glucuronyltransferase	ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
GS-T	glutathione S-transferase	グルタチオンS-トランスフェラーゼ
GTPγS	guanosine-5'-O-(gamma-thio] triphosphate	グアノシン-5'-O-(3-チオ)三リン酸
h	hour(s)	時間
HB	hemoglobin	ヘモグロビン
hCav	human voltage-gated calcium channel	ヒト電位依存性カルシウムチャネル
HCl	hydrochloric acid	塩酸
HD	hypodiploid nuclei	低二倍体
HDL	High-density lipoprotein	高密度リポ蛋白
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	ヒト上皮成長因子受容体2
HER4	human epidermal growth factor receptor 4	ヒト上皮成長因子受容体4
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
Hg	mercury	水銀
hiPSCs	human induced pluripotent stem cells	ヒト人工多能性幹細胞
hKir	human inwardly rectifying potassium channel	ヒト内向き整流カリウムチャネル
hKvLQT1	human potassium voltage-gated channel subfamily Q member1	ヒト電位依存性カリウムチャネルサブファミリーQメンバー1
HLM	human liver microsomes	ヒト肝ミクロソーム
hNav	human voltage-gated sodium channel	ヒト電位依存性ナトリウムチャネル
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma	頭頚部扁平上皮がん
HNSTD	highest non-severely toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HR	heart rate	心拍数
HRMS	high resolution mass spectrometry	高分解能質量分析
HSA	human serum albumin	ヒト血清アルブミン
HTRF	homogenous time resolved fluorescence	均一時間分解蛍光
IC_{20}	concentration required for 20% inhibition	20%阻害濃度

略語	英語名称	日本語名称
IC_{50}	concentration required for 50% inhibition	50%阻害濃度
$[I]_g$	pre-systemic inhibitory concentration in the enterocyte	消化管上皮細胞において全身循環に入る前の阻害剤濃度
$[I]_{gut}$	theoretical maximum gastrointestinal drug concentration	消化管での阻害剤の予測最高濃度
$[I]_{in,max,u}$	Maximum unbound plasma concentration at the inlet of the liver	肝臓入り口における最高血漿中非結合型濃度
I_{max}	maximal tumor growth inhibition achievable	達成可能な最大の腫瘍増殖抑制効果
$[I]_{max,u}$	unbound maximum plasma concentration	最高血漿中非結合型濃度
$IAUC50_u$	AUC_u resulting in half-maximal tumor growth inhibition	最大の腫瘍増殖抑制効果の 50%を引き起こす AUC_u
$IAUC80_u$	AUC_u resulting in 80% of the maximal tumor growth inhibition	最大の腫瘍増殖抑制効果の 80%を引き起こす AUC_u
ICH	International Conference on Harmonization	医薬品規制調和国際会議
ie, i.e.	id est, that is	すなわち
inf	infusion	持続投与
ISTD	internal standard	内標準物質
IV, iv, i.v.	intravenous(ly)	静脈内
k_a	absorption rate constant	吸収速度定数
k_{deg}	apparent first-order degradation rate constant	みかけの一次分解速度定数
k_e	elimination rate constant	消失速度定数
kg	kilogram	キログラム
K_i	inhibition constant	阻害定数
K_m	Michaelis-Menten constant	ミカエリスメンテン定数
Ko143	potent and selective BCRP inhibitor	BCRP 阻害剤
L	liter	リットル
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／質量分析
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析
LDL	low-density lipoprotein	低密度リポタンパク質
LLC-PK1	Lilly laboratory cancer porcine kidney-1 cell line	-
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
L-MDR1	cell line expressing MDR1 transporter protein	MDR1 トランスポータータンパクを発現している細胞株
LOAEL	lowest observed adverse effect level	最小毒性量

略語	英語名称	日本語名称
LOD	Limit of detection	検出限界
LOQ	Limit of quantitation	定量限界（下限）
LOX	lipoxygenase	リポキシゲナーゼ
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーション計数
LSF	liquid service formulation	液剤
LVP	left ventricular pressure	左心室圧
M, m	male(s)	男性、雄
M	molar concentration	モル濃度
MATE	Multidrug and toxin extrusion protein	多剤排出トランスポーター
Mx	metabolite x (x = 1 to n)	代謝物 x (x＝1～n)
MBq	mega Becquerel	メガベクレル
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells	Madin-Darby イヌ腎臓
MDR1	multiple drug resistance transporter protein	多剤耐性タンパク 1
MEC	molar extinction coefficient	モル吸光係数
M/E (ratio)	myeloid erythroid ratio	骨髄球／赤芽球比率
mg	milligram	ミリグラム
min	minute(s)	分
mL	milliliter	ミリリットル
mm Hg	millimeter of mercury	ミリメートル水銀柱
MoE	multiples of exposure	曝露量比
MN	micronuclei	微小核
MN-RET	micronucleated reticulocytes	小核網状赤血球
MR	metabolic ratio	代謝比率
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MRP	Multidrug resistance-associated protein	多剤耐性関連タンパク
MRT	Mean residence time	平均滞留時間
ms	millisecond(s)	ミリ秒
MS	mass spectrometry	質量分析
MS/MS	tandem mass spectrometry	タンデム質量分析
MSD	Meso Scale Discovery	メソスケールディスカバリー電気化学発光
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
mut	mutant	変異
µ	micro	マイクロ
n / No. / Nos.	number	数
n.a.	not applicable	該当なし
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
n.d.	not determined	検出されていない
n.c. / NC	not calculated	計算されていない
NEURO	neutrophile	好中球
ng	nanogram	ナノグラム
nm	nanometer	ナノメートル

略語	英語名称	日本語名称
nM	nanomolar	ナノモル
NMR	nuclear magnetic resonance spectroscopy	核磁気共鳴
NMRI	Naval Medical Research Institute (mouse strain)	マウスの系統、名前は Naval Medical Research Institute に由来
NOAEL	no-observed-adverse-effect-level	無毒性量
NOEL	no-observed-effect-level	無影響量
NOD/SCID	nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency	非肥満糖尿病／重症複合免疫不全
4-NPDA	4-Nitro-1,2-phenylene diamine	4-ニトロソ-1,2-フェニレンジアミン
NRU	neutral red uptake	ニュートラルレッド取り込み
n.s.	no sample	試料なし
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小細胞肺がん
n.t.	not tested	試験せず
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
p.a.／p.appl.	post administration	投与後
PALS	peri-arteriolar lymphocyte sheath	動脈周囲リンパ鞘
P_{app}	apparent permeability coefficient	透過係数
PBPK	physiologically-based PK	生理学的薬物速度論
PD	pharmacodynamics	薬力学
PDE	phosphodiesterase enzyme	ホスホジエステラーゼ
PDx	patient-derived xenograft	患者由来がん組織移植モデル
PEG	polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
pEGFR	phosphorylated epidermal growth factor receptor	リン酸化 EGFR
pERK	phosphorylated extracellular signal-regulated kinase	リン酸化 ERK
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク
pH	negative log of hydrogen ion concentration	水素イオン濃度の負の対数
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine	2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ［4,5-b］ピリジン
PIF	photo-irritation-factor	光毒性（刺激性）係数
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PO, po, p.o.	per os (by mouth, orally)	経口
PopPK	population pharmacokinetics	母集団薬物動態
PR	PR interval in ECG	ECG における PR 間隔

略語	英語名称	日本語名称
PSC 833	valspodar	バルスポダール
PTO	post treatment observation	投与後の観察
Q2D	every second day	2 日に 1 回
QCS	quality control sample (bioanalytics)	品質管理用試料（生体試料分析）
QD	once a day	1 日 1 回
Q_{en}	blood flow through enterocytes	腸管血流速度
Q_h	hepatic blood flow	肝血流速度
QRS	QRS complex in ECG	ECG における QRS 間隔
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
QT	QT interval in ECG	ECG における QT 間隔
QTc	corrected QT interval in ECG	ECG における補正 QT 間隔
QWBA	quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RAAUC	accumulation ratio (AUC(0-24), SS / AUC(0-24), Day 1)	蓄積比 = $AUC(0\text{-}24)_{ss}$ / $AUC(0\text{-}24)_{Day1}$
RA_AUC_{all}	accumulation ratio for AUC ((AUC on Day 24)/(AUC on Day 1) *100)	AUC の蓄積比 = (Day24 における AUC/ Day1 における AUC) ×100
RA_C_{max} / RAC_{max}	accumulation ratio for Cmax ((Cmax on Day 24)/(Cmax on Day 1) *100)	C_{max} の蓄積比 = (Day24 における C_{max}/ Day1 における C_{max}) ×100
RA_MP	ratio metabolite/parent	代謝比　代謝物／未変化体
RA_MF	ratio male/female	曝露量比= 雄/雌
RB	blood-to-plasma ratio	血液中濃度／血漿中濃度比
RET	reticulocytes	網状赤血球
RIS	relative induction scores	相対誘導スコア
s	second(s)	秒
s.c.	subcutaneous(ly)	皮下
SD / S.D.	standard deviation	標準偏差
SEM	standard error of mean	平均値の標準誤差
SOP	standard operation procedure	標準作業手順書
ss	steady state	定常状態
STD10	severely toxic dose 10	げっ歯類での供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量
T	duration of infusion	注入時間
$t_{1/2}$	half-life	半減期
$t_{1/2app}$	apparent half-life	みかけの半減期
$t_{1/2,term}$	terminal half-life	終末相半減期
$t_{1/2,eff}$	effective half-life	有効半減期
T/C	treatment/control	BAY 2927088 投与群／媒体投与群
TCA	taurocholic acid	タウロコール酸
TDI	time dependent inhibition	時間依存的阻害
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TKI	tyrosine kinase inhibitor(s)	チロシンキナーゼ阻害剤

略語	英語名称	日本語名称
t_{lag}	lag time: time of delay between drug administration and beginning of absorption	薬物投与から吸収開始までの遅延時間
t_{last}, t_n	time of last concentration above LLOQ	薬物動態評価での最終測定時
t_{max}	time to reach maximum drug concentration in plasma	最高薬物濃度到達時間
TR-FRET	time resolved fluorescence resonance energy transfer	時間分解蛍光測定法
UGT	uridine-5'-diphospho glucuronosyltransferase	ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
uHPLC	ultra high performance liquid chromatography	超高速液体クロマトグラフィー
ULOQ	upper limit of quantitation	定量上限
unb	unbound	非結合型
USA	United States of America	アメリカ合衆国
UV	ultraviolet	紫外線
UV/VIS	ultraviolet/visible	紫外可視分光法
V, vol	volume	容積
v/v, v/v/v	volume ratio	容積比
V_{max}	maximum reaction rate	最大反応速度
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態の分布容積
$V_{ss,u}$	volume of distribution of unbound fraction at steady state	定常状態における非結合型分画の分布容積
V_z	apparent volume of distribution during terminal phase after iv administration	静脈内投与後の終末相における見かけの分布容積
w	weight	重量
WFI	water for injection	注射用水
WT	wildtype	野生型
w/v	weight/volume	重量／容積

2.6.2 薬理試験の概要文の目次

2.6.2 薬理試験の概要文の目次 1
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験 3
2.6.2.1.2 副次的薬理試験 4
2.6.2.1.3 安全性薬理試験 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.2.1 *In vitro* 試験 6
2.6.2.2.1.1 生化学的アッセイによる HER2 及び EGFR キナーゼ阻害作用 6
2.6.2.2.1.2 細胞増殖阻害作用 7
2.6.2.2.1.2.1 *HER2* 遺伝子野生型及び *HER2* 遺伝子変異導入細胞株 7
2.6.2.2.1.2.2 共有結合型 HER2 阻害薬に対する耐性変異導入細胞株 8
2.6.2.2.1.2.3 *EGFR* 遺伝子野生型及び *EGFR* 遺伝子変異導入細胞株 9
2.6.2.2.1.2.4 *EGFR* 遺伝子野生型及び *EGFR* 遺伝子変異陽性細胞株 10
2.6.2.2.1.3 HER2 のリン酸化及び下流シグナル伝達経路の阻害作用 11
2.6.2.2.1.4 EGFR リン酸化阻害作用 12
2.6.2.2.1.5 代謝物 13
2.6.2.2.1.5.1 細胞増殖阻害作用 13
2.6.2.2.2 *In vivo* 試験 14
2.6.2.2.2.1 がん患者由来組織移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果 14
2.6.2.2.2.1.1 *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異陽性 NSCLC 患者由来がん組織移植片:CTG-2543 14
2.6.2.2.2.1.2 *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性患者由来がん組織移植マウス 15
2.6.2.2.2.1.2.1 *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性 NSCLC 患者由来がん組織移植片：LU0387 15
2.6.2.2.2.1.2.2 *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性 HNSCC 患者由来がん組織移植片：HNXF700 17
2.6.2.2.2.1.2.3 *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性 NSCLC 患者由来がん組織移植片：CTG-2842 18
2.6.2.2.2.1.2.4 *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性 NSCLC 患者由来がん組織移植片：LXFE2478 19
2.6.2.2.2.2 細胞株移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果 20
2.6.2.2.2.2.1 *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性 HNSCC 細胞株：SCCNC4 20
2.6.2.2.2.2.2 *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異陽性ヒト NSCLC 細胞株：PC-9 22
2.6.2.2.2.2.3 *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異及び *EGFR* C797S 変異導入細胞株：Ba/F3-*EGFR* ex19del/C797S 23

2.6.2.2.2.2.4 *EGFR*遺伝子野生型ヒトNSCLC細胞株：A431..... 25
2.6.2.2.2.3 SCCNC4移植マウスモデルを用いた作用機序検討試験..... 26
2.6.2.2.3 ヒト有効曝露量の推定..... 27
2.6.2.3 副次的薬理試験..... 30
2.6.2.3.1 オフターゲット作用..... 30
2.6.2.3.1.1 酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験..... 30
2.6.2.3.1.2 フォローアップ試験..... 30
2.6.2.3.2 キナーゼに対する特異性..... 30
2.6.2.3.3 心筋イオンチャネルに対する作用..... 31
2.6.2.3.3.1 遺伝子導入HEK及びCHO細胞..... 31
2.6.2.3.3.2 ランゲンドルフ灌流心臓..... 31
2.6.2.3.4 代謝物..... 32
2.6.2.3.4.1 オフターゲット作用..... 32
2.6.2.3.4.1.1 酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験..... 32
2.6.2.3.4.1.2 フォローアップ試験..... 32
2.6.2.3.4.2 心筋イオンチャネルへの作用..... 32
2.6.2.3.4.2.1 遺伝子導入HEK及びCHO細胞..... 32
2.6.2.4 安全性薬理試験..... 33
2.6.2.4.1 *In vitro*試験..... 33
2.6.2.4.1.1 hERGチャネルに及ぼす影響..... 33
2.6.2.4.2 *In vivo*試験..... 33
2.6.2.4.2.1 イヌの心血管系機能に及ぼす影響..... 33
2.6.2.4.2.2 ラットの呼吸器系機能に及ぼす影響（単回経口投与）..... 34
2.6.2.4.2.3 ラットの呼吸器系機能に及ぼす影響（4週間反復投与毒性試験）..... 35
2.6.2.4.2.4 ラットの中枢神経系機能に及ぼす影響（単回経口投与）..... 35
2.6.2.4.2.5 ラットの中枢神経系機能に及ぼす影響（4週間反復投与毒性試験）..... 36
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用..... 37
2.6.2.6 考察及び結論..... 38
2.6.2.7 図表..... 41
引用文献一覧..... 42

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

セバベルチニブ（以下、BAY 2927088 と表記する）は、経口投与可能で可逆的かつ高い選択性を有するヒト上皮成長因子受容体 2（HER2）及び上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼに対する阻害薬である。

BAY 2927088 の有効性を検討するために一連の効力を裏付ける試験を、特異性及び安全性を検討するために、副次的薬理試験及び安全性薬理試験を実施した。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

BAY 2927088 の標的キナーゼに対する阻害作用を *in vitro* 試験では生化学的アッセイ、細胞増殖阻害アッセイ及び細胞機能アッセイを用いて評価し、*in vivo* 試験では *HER2* 遺伝子変異陽性及び *EGFR* 遺伝子変異陽性の腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果を評価した。更に、ヒトにおける BAY 2927088 の有効曝露量を検討するために薬物動態／薬力学（PK/PD）解析を実施した。

生化学的アッセイにおいて、BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子野生型及び *EGFR* 遺伝子変異のキナーゼに対して阻害作用を示した。

細胞増殖阻害アッセイにおいて、*HER2* 遺伝子エクソン 20 挿入（ex20ins）変異を導入した細胞株 Ba/F3-*HER2* Y772_A775dup、Ba/F3-*HER2* G776delinsVC 及び Ba/F3-*HER2* G778_P780dup の 50%阻害濃度（IC_{50}）値は、それぞれ 8.31、6.73 及び 2.34nmol/L であった。同様に、*HER2* 遺伝子の点変異を導入した Ba/F3-*HER2* S310F、Ba/F3-*HER2* S310Y 及び Ba/F3-*HER2* L755P の IC_{50} 値は、それぞれ 2.47、0.98 及び 5.29nmol/L であった。よって、BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異及び *HER2* 遺伝子の点変異に対して細胞増殖阻害作用を示すことが明らかになった。更に、BAY 2927088 は共有結合型 HER2 阻害薬に対する耐性変異である *HER2* C805S 変異が *HER2* 遺伝子変異と共存するがん細胞に対しても、細胞増殖阻害作用を示すことが明らかになった。BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子野生型（IC_{50} 値：5.3nmol/L）と *HER2* 遺伝子変異の間では選択性を示さなかった。更に、臨床において高頻度で認められる *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異を導入した Ba/F3-*EGFR* V769_D770insASV、*EGFR* 遺伝子エクソン 19 欠失（ex19del）変異を導入した Ba/F3-*EGFR* E746_A750del 及び *EGFR* 獲得耐性遺伝子変異を導入した Ba/F3-*EGFR* E746_A750del/C797S の IC_{50} 値は、それぞれ 4.66、0.16 及び 0.22nmol/L であった。よって、BAY 2927088 は *EGFR* 遺伝子野生型（IC_{50} 値：221nmol/L）と比べると *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異、*EGFR*ex19del 変異及び *EGFR* 獲得耐性遺伝子変異陽性のがん細胞に対して選択的に細胞増殖阻害作用を示すことが明らかになった。同様に、内在性の *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異陽性のがん細胞株を用いた試験でも、*EGFR*遺伝子野生型のがん細胞株と比べて選択的に細胞増殖阻害作用が認められた。

細胞機能アッセイにおいて、内在性の *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異陽性のがん細胞株を用いて EGFR のリン酸化阻害作用を検討した結果、これら変異陽性のがん細胞株では *EGFR* 遺伝子野生型と比べて選択的にリン酸化阻害作用が認められた。

In vivo 試験において、BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異陽性又は *EGFR* 遺伝子変異陽性患者由来がん組織移植片又はがん細胞株を移植したマウスモデルに対して抗腫瘍効果を示した。これらの抗腫瘍効果は *EGFR* 遺伝子野生型のがん細胞株を移植したマウスモデルと比較しても強かったことから、*in vitro* 試験で認められた *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異及び *EGFR* 遺伝子変異に対する BAY 2927088 の選択性は *in vivo* 試験においても確認できた。更に、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変

異陽性のがん細胞株を移植したマウスモデルにおいて、*in vitro* 試験と同様に、BAY 2927088 による EGFR のリン酸化阻害作用も顕著に認められた。

BAY 3306572（M1）は BAY 2927088 の主代謝物である。*HER2* 遺伝子変異又は *EGFR* 遺伝子変異を導入した Ba/F3 細胞株の増殖阻害アッセイを実施したところ、BAY 3306572 は弱い細胞増殖阻害作用を示した。

EGFR 遺伝子 ex20ins 変異陽性のヒト副鼻腔扁平上皮がん細胞株 SCCNC4 移植マウスモデルを用いて PK/PD 解析を実施した結果、ヒトにおける 1 日あたりの有効曝露量は 500nmol/L･h（242 μg･h/L）と推定された。

一連の効力を裏付ける試験成績から、BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異、*HER2* 遺伝子の点変異、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び古典的 *EGFR* 遺伝子変異陽性のがん細胞に対して、標的キナーゼを阻害することで細胞増殖を抑制し、抗腫瘍効果を示すことが示唆される。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

BAY 2927088 及び BAY 3306572 のオフターゲット作用を評価するために、酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験を実施した。更に、有意な相互作用が認められた標的についてはフォローアップ試験を実施し、IC_{50} 値及び阻害係数（K_i）を評価した。BAY 2927088 はヒトアデノシン A1 受容体〔K_i 値：0.52 μmol/L（放射性リガンド結合試験）、IC_{50} 値：4.3 μmol/L（GTPγS 結合試験）〕、ヒトアデノシン A3 受容体〔K_i 値：1.03 μmol/L（放射性リガンド結合試験）〕、ヒトモチリン〔K_i 値：1.32 μmol/L（放射性リガンド結合試験）、IC_{50} 値：4.9 μmol/L（細胞内カルシウム動員試験）〕及びヒトホスホジエステラーゼ（PDE）4D2〔IC_{50} 値：2.77 μmol/L（酵素分析試験）〕に対してオフターゲット作用を示した。BAY 3306572 はヒトシクロオキシゲナーゼ（COX）-2〔IC_{50} 値：2.2 μmol/L（酵素分析試験）〕、ヒト 15-リポキシゲナーゼ（LOX）-2〔IC_{50} 値：0.25 μmol/L（酵素分析試験）〕、ヒトアデノシントランスポーター〔IC_{50} 値：0.46 μmol/L（アデノシン取り込み試験）〕、ヒトアデノシン A1 受容体〔IC_{50} 値：4.0 μmol/L（GTPγS 結合試験）〕及びヒトアデノシン A3 受容体〔IC_{50} 値：2.7 μmol/L（GTPγS 結合試験）〕に対して、オフターゲット作用を示した。

BAY 2927088（1 μmol/L）のキナーゼに対する特異性を [redacted] 社の [redacted] パネルを用いて評価した結果、EGFR、HER2 及び上皮成長因子受容体 4（HER4）の 3 種類を含む 18 種類のヒトのキナーゼに対して 80%以上の阻害作用を示した。

心筋イオンチャネル〔ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（hERG）チャネル、ヒト電位依存性ナトリウムチャネル（hNav）1.5、ヒト電位依存性カルシウムチャネル（hCav）1.2、ヒト電位依存性カリウムチャネルサブファミリーQ メンバー1（hKvLQT1）及びヒト内向き整流カリウムチャネル（hKir）2.1〕に及ぼす影響を評価した結果、BAY 2927088 及び BAY 3306572 は、いずれも hERG チャネル阻害作用を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 2.2 及び 3.5 μmol/L であった。なお、hERG チャネル以外のチャネルに対しては、BAY 2927088 及び BAY 3306572 のいずれも阻害作用を示さなかった。ウサギのランゲンドルフ灌流心臓を用いた *ex vivo* 試験において、BAY 2927088 は 1 μmol/L まで血行動態や心電図パラメーターに影響を及ぼさなかった。その一方で、10 μmol/L では左心室圧及び収縮能の低下が認められ、心電図パラメーターである QTcF 短縮及び QRS 延長も認められた。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

BAY 2927088 が生命維持に重要な器官系（中枢神経系、心電図所見を含む心血管系、呼吸器系）に及ぼす影響について、複数の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。ICH S7A、ICH S7B 及び

ICH S9 ガイドラインに従い GLP に準拠し、*in vivo* 試験ではラット及びイヌの単回経口投与試験（イヌを用いた試験では媒体及び BAY 2927088 の 3 用量をラテン方格法により投与）を実施すると共に、ラットの 4 週間反復投与毒性試験に安全性薬理エンドポイント（呼吸器系及び中枢神経系）を組み込んで実施した。

単回経口投与試験において、ラットでは BAY 2927088 の投与に関連した中枢神経系機能（一般症状観察、体温及び自発運動量）及び呼吸器系機能（呼吸数、一回換気量及び分時換気量）に対して生理学的に問題となる急性の影響は認められなかった。また、イヌにおいても、BAY 2927088 投与に関連した心血管系機能〔動脈圧、左心室圧、心拍数及び心電図（PR 間隔及び QRS 間隔）〕に対して生理学的に問題となる急性の影響は認められなかった。

ラットの 4 週間反復投与毒性試験においても、BAY 2927088 投与に関連した中枢神経系機能（一般症状観察及びオープンフィールド行動観察）及び呼吸器系機能（呼吸状態）に対して投与 2 日目まで生理学的に問題となる急性の影響は認められなかった。

ヒトにおける QT 間隔延長リスクを検討した安全性薬理試験において、BAY 2927088 は hERG チャネルを阻害し（IC_{50} 値：2.4 μmol/L）、無影響量（IC_{50} 値の 1/30 と仮定）は 80nmol/L と推定された。また、イヌを用いた単回経口投与試験では 15mg/kg の投与量で有意な QTc 間隔の延長が認められた。現在進行中の *HER2* 及び／又は *EGFR* 遺伝子変異陽性の進行性の非小細胞肺がん患者を対象とした第 I/Ⅱ相試験（試験 21607）において、BAY 2927088 20mg を 1 日 2 回投与した患者における最高血漿中濃度（C_{max}）は 873.6 μg/L（1.80 μmol/L）であり（5.3.3.5.1 の Table8-9）、このときの非結合型薬物の最高血漿中濃度（$C_{max,u}$）は 85nmol/L であった〔非結合型分率（f_u）：4.71%〕。イヌに 15mg/kg 投与後の $C_{max,u}$（1062nmol/L）は、BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$（85nmol/L）の 12 倍であったが、hERG チャネルの無影響量（80nmol/L）は BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ と同程度であった。

安全性薬理試験成績より、BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与した際に、生命維持に重要な器官系機能（中枢神経系、心電図所見を含む心血管系、呼吸器系）に対して生理学的に問題となる急性の影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。QT 間隔延長については BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の血漿中濃度以上で認められる可能性がある。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

2.6.2.2.1.1 生化学的アッセイによる HER2 及び EGFR キナーゼ阻害作用

参照項目：4.2.1.1.1 PH-42059

BAY 2927088 の HER2 及び EGFR キナーゼに対する阻害作用を生化学的アッセイにより検討した。

BAY 2927088（0.07～20000nmol/L）と HER2 又は EGFR のキナーゼ反応部位を結合させるために、グルタチオン-S-トランスフェラーゼのタグを付加した *HER2* 遺伝子野生型、*EGFR* 遺伝子野生型、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び *EGFR* 獲得耐性遺伝子変異のリコンビナントタンパク（n＝2）と BAY 2927088 を 22℃で 15 分間インキュベートした。酵素反応を誘導するために 3.33mmol/L アデノシン三リン酸（ATP、最終濃度：2mmol/L）と 1.67μmol/L ビオチン化ペプチド基質（Biotin-Ahx-AEEEEYFELVAKKK）を添加し、22℃で 30 分間インキュベートした。その後、ビオチン化されたリン酸化 HER2 又は EGFR とストレプトアビジン-XL665 を結合させるために、83.3nmol/L ストレプトアビジン-XL665 及び 1.67nmol/L PT66-Tb-Cryptate（Tb-Cryptate-リン酸化チロシン特異的抗体）を含有する均一時間分解蛍光（HTRF）検出液を添加し、22℃で 1 時間インキュベートした。リン酸化タンパクに対して、ストレプトアビジン-XL665 及び PT66-Tb-Cryptate が近接に結合することで蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）シグナルが発生し、その FRET シグナルを HTRF 検出器で測定した。同一の実験手法で実施した 2～28 試験のデータを基に IC_{50} 値の中央値を算出した。

BAY 2927088 は、生体内で通常認められる ATP 濃度（2mmol/L）において、*HER2* 遺伝子野生型のキナーゼに対して阻害作用を示した（表 2.6.2.2- 1）。更に、*EGFR* 遺伝子野生型、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び *EGFR* 獲得耐性遺伝子変異のキナーゼに対して強い阻害作用を示した（表 2.6.2.2- 1）。*EGFR* 遺伝子野生型と *EGFR* 遺伝子変異の間で BAY 2927088 の選択性が認められなかったが、これは時間分解蛍光測定法（TR-FRET）を用いて測定した蛍光強度が検出限界未満であったためと考えられる。

表 2.6.2.2- 1 BAY 2927088 のキナーゼ阻害作用

EGFR and HER2 status	Kinase	IC_{50} [nmol/L] Median
EGFR wildtype	Wild-type *EGFR*	0.15
EGFR exon20 insertion mutation	mut*EGFR* (V769_D770insASV)	0.21
	mut*EGFR* (D770_N771insSVD)	0.12
EGFR acquired resistance mutation	mut*EGFR* (E746_A750del/C797S)	0.11
	mut*EGFR* (E746_A750del/T790M)	0.34
	mut*EGFR* (E746_A750del/T790M/C797S)	0.22
	mut*EGFR* (L858R/T790M)	0.30
	mut*EGFR* (L858R/T790M/C797S)	0.28
HER2 wildtype	Wild-type *HER2*	2.94

Overview of the IC_{50} of BAY 2927088 in human EGFR and HER2 kinase assays. IC_{50} = concentration required for 50% inhibition. 4.2.1.1.1, PH-42059.

2.6.2.2.1.2　細胞増殖阻害作用

2.6.2.2.1.2.1　*HER2*遺伝子野生型及び*HER2*遺伝子変異導入細胞株

参照項目：4.2.1.1.2 B003066

*HER2*遺伝子野生型及び*HER2*遺伝子変異を導入した細胞株を用いて、BAY 2927088 の細胞増殖阻害作用を検討した。

*HER2*遺伝子野生型、*HER2*遺伝子 ex20ins 変異及び*HER2*遺伝子の点変異を導入したマウス前駆 B リンパ球 Ba/F3 細胞株を 3200 個/well で播種した（n＝3）。播種後、BAY 2927088〔媒体：ジメチルスルホキシド（DMSO）、最終濃度 0.2%〕を 0.158～1000nmol/L で添加し、37℃で 48 時間インキュベートした。インキュベート後に CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Reagent を添加し混合後に遠心分離し、暗条件下で 8～10 分インキュベートをして発光強度を計測した。同一の実験手法を 1 又は複数回実施し、複数回実施した場合は IC_{50} 値の中央値を算出した。

*HER2*遺伝子 ex20ins 変異を導入した Ba/F3-*HER2* Y772_A775dup、Ba/F3-*HER2* G776delinsVC 及び Ba/F3-*HER2* G778_P780dup の IC_{50} 値は、それぞれ 8.31、6.73 及び 2.34nmol/L であった（表 2.6.2.2- 2）。また、*HER2*遺伝子の点変異を導入した Ba/F3-*HER2* S310F、Ba/F3-*HER2* S310Y 及び Ba/F3-*HER2* L755P の IC_{50} 値は、それぞれ 2.47、0.98 及び 5.29nmol/L であった（表 2.6.2.2- 2）。したがって、BAY 2927088 は*HER2*遺伝子 ex20ins 変異及び*HER2*遺伝子の点変異を導入した細胞株に対して増殖阻害作用を示すことが明らかになった。

*HER2*遺伝子野生型を導入した Ba/F3-*HER2*wt の IC_{50} 値は 5.3nmol/L（表 2.6.2.2- 2）であったことから、*HER2* 遺伝子野生型と *HER2* 遺伝子変異の間で選択性は認められなかった。その一方で、*EGFR*遺伝子野生型（表 2.6.2.2- 4）と比較すると、*HER2*遺伝子変異に対して選択性を示した。

表 2.6.2.2- 2 *HER2*遺伝子野生型及び *HER2*遺伝子変異を導入した Ba/F3 での細胞増殖阻害作用

HER2 status		Ba/F3 cell line	Cellular IC_{50} [nmol/L]
HER2 wildtype		Ba/F3 - *HER2*wt	5.30
HER2 exon20 insertion mutation		Ba/F3 - *HER2* Y772_A775dup	8.31
		Ba/F3 - *HER2* G776delinsVC	6.73
		Ba/F3 - *HER2* G778_P780dup	2.34
		Ba/F3 - *HER2* V777_G778insV	0.94
HER2 activating point mutation	Extracellular domain	Ba/F3 - *HER2* G309E	2.47
		Ba/F3 - *HER2* S310F	2.47
		Ba/F3 - *HER2* S310Y	0.98
		Ba/F3 - *HER2* S335C	6.73
	Transmembrane domain	Ba/F3 - *HER2* S653C	5.85
		Ba/F3 - *HER2* V659E	8.13
		Ba/F3 - *HER2* G660D	6.14
	Tyrosine-kinase domain	Ba/F3 - *HER2* G776V	2.94
		Ba/F3 - *HER2* L755A	6.8
		Ba/F3 - *HER2* L755P	5.29
		Ba/F3 - *HER2* L755S	4.9
		Ba/F3 - *HER2* V777A	5.88
		Ba/F3 - *HER2* V777L	0.54
		Ba/F3 - *HER2* V777M	1.68
		Ba/F3 - *HER2* T798M	13.9
		Ba/F3 - *HER2* V842I	2.25

Anti-proliferative effect of BAY 2927088 was assessed in a Ba/F3 cell line panel stably overexpressing the depicted *HER2* mutant variants. IC_{50} = concentration required for 50% inhibition. 4.2.1.1.2, B003066.

2.6.2.2.1.2.2 共有結合型 HER2 阻害薬に対する耐性変異導入細胞株

参照項目：4.2.1.1.14 B004402

HER2 C805S 変異は、共有結合型 HER2 阻害薬に対する主要な耐性メカニズムとして知られており[1)]、ゾンゲルチニブに対する耐性変異になり得ると考えられる。*HER2* C805S 変異を導入した細胞株を用いて、BAY 2927088 の細胞増殖阻害作用を検討した。

*HER2*遺伝子 ex20ins 変異、*HER2*遺伝子の点変異、及び *HER2* C805S 変異と *HER2*遺伝子 ex20ins 変異又は *HER2*遺伝子の点変異の両変異を導入した Ba/F3 細胞株を 4000 個/well で播種した（n＝3）。播種後、BAY 2927088〔媒体：ジメチルスルホキシド（DMSO）、最終濃度 0.2%〕を 0.00013～10000nmol/L で添加し、37℃で 48 時間インキュベートした。インキュベート後に CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Reagent を添加し混合後に遠心分離し、暗条件下で 30 分インキュベートをして発光強度を計測した。同一の実験手法を 3 回実施し、IC_{50} 値の平均値を算出した。

HER2 C805S 変異と *HER2*遺伝子 ex20ins 変異を導入した Ba/F3-*HER2* Y772_A775dup/C805S 及び Ba/F3-*HER2* G778_P780dup/C805S、並びに *HER2* C805S 変異と *HER2* 遺伝子の点変異を導入した Ba/F3-*HER2* S310F/C805S は、単一変異を導入した Ba/F3 細胞株と同程度の細胞増殖阻害作用が認められた（表 2.6.2.2- 3）。したがって、BAY 2927088 は共有結合型 HER2 阻害薬に対する耐性変異である *HER2* C805S 変異が *HER2*遺伝子変異と共存するがん細胞に対しても、細胞増殖阻害作用を示すことが明らかになった。

表 2.6.2.2- 3 *HER2* C805S 変異を導入した Ba/F3 での細胞増殖阻害作用

HER2 status	Ba/F3 cell line	Cellular IC_{50} [nmol/L]
HER2 exon20 insertion mutation	Ba/F3 - *HER2* Y772_A775dup	15.4
	Ba/F3 - *HER2* G778_P780dup	1.77
HER2 activating point mutation	Ba/F3 - *HER2* S310F	0.671
HER2 acquired resistance mutation	Ba/F3 - *HER2* Y772_A775dup/C805S	22.0
	Ba/F3 - *HER2* G778_P780dup/C805S	2.09
	Ba/F3 - *HER2* S310F/C805S	1.5

The depicted cell lines ectopically express the *HER2* exon 20 insertions (Y772_A775dup, G778_P780dup) or point mutation (S310F) coupled with the *HER2* C805S mutation, predicted to drive tyrosine kinase inhibitor resistance. IC_{50} = concentration required for 50% inhibition. 4.2.1.1.14, B004402

2.6.2.2.1.2.3 *EGFR*遺伝子野生型及び *EGFR*遺伝子変異導入細胞株

参照項目：4.2.1.1.3 PH-42058

EGFR 遺伝子野生型及び *EGFR* 遺伝子変異を導入した細胞株を用いて、BAY 2927088 の細胞増殖阻害作用を検討した。

EGFR 遺伝子野生型、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異、古典的 *EGFR* 遺伝子変異及び *EGFR* 獲得耐性遺伝子変異を導入した Ba/F3 細胞株を 3200 個/well で播種した（n＝3）。播種後、BAY 2927088（媒体：DMSO、最終濃度 0.2%）を 1.58～10000nmol/L（*EGFR*遺伝子野生型）又は 0.158～1000nmol/L（*EGFR* 遺伝子変異）で添加し、37℃で 48 時間インキュベートした。インキュベート後に CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Reagent を添加し混合後に遠心分離し、暗条件下で 8～10 分インキュベートをして発光強度を計測した。同一の実験手法を 1 又は 2 回実施し、2 回実施した場合は IC_{50} 値の平均値で評価した。

EGFR V769_D770insASV 変異は高頻度で認められる *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異であり、IC_{50} 値は 4.66nmol/L であった（表 2.6.2.2- 4）。更に、古典的 *EGFR* 遺伝子変異を導入した Ba/F3-*EGFR* E746_A750del 及び Ba/F3-*EGFR* L858R の IC_{50} 値は、それぞれ 0.16 及び 0.53nmol/L であった（表 2.6.2.2- 4）。*EGFR* 遺伝子野生型の IC_{50} 値（221nmol/L）は、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び古典的 *EGFR* 遺伝子変異の IC_{50} 値の 8～47 倍及び 417～1381 倍であった。したがって、BAY 2927088 は *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び古典的 *EGFR* 遺伝子変異を導入した細胞株に対して選択的に細胞増殖阻害作用を示すことが明らかになった。

EGFR 獲得耐性遺伝子変異を導入した Ba/F3-*EGFR* E746_A750del/C797S に対しては高い細胞増殖阻害作用を示した（IC_{50} 値：0.22nmol/L）一方で、*EGFR* E746_A750del 変異がゲートキーパー変異（*EGFR* T790M 変異）と共存すると細胞増殖阻害作用が低下した（IC_{50} 値：21.9nmol/L、表 2.6.2.2- 4）。

表 2.6.2.2- 4 *EGFR*遺伝子野生型及び *EGFR*遺伝子変異を導入した Ba/F3 での細胞増殖阻害作用

EGFR status	Ba/F3 cell line	Cellular IC_{50} [nmol/L]
Ba/F3 parental cells	Ba/F3 - vector control	1000
EGFR wildtype	Ba/F3 - *EGFR*wt	221
EGFR exon20 insertion mutation	Ba/F3 - *EGFR* V769_D770insASV	4.66
	Ba/F3 - *EGFR* D770_N771insSVD	4.81
	Ba/F3 - *EGFR* H773_V774insNPH	25.2
EGFR classical activating mutation	Ba/F3 - *EGFR* E746_A750del	0.16
	Ba/F3 - *EGFR* L858R	0.53
EGFR acquired resistance mutation	Ba/F3 - *EGFR* E746_A750del/C797S	0.22
	Ba/F3 - *EGFR* L858R/C797S	0.60
	Ba/F3 - *EGFR* E746_A750del/T790M	21.9
	Ba/F3 - *EGFR* E746_A750del/T790M/C797S	53.9
	Ba/F3 - *EGFR* L858R/T790M	174
	Ba/F3 - *EGFR* L858R/T790M/C797S	481

Anti-proliferative effect of BAY 2927088 was assessed in a Ba/F3 cell line panel stably overexpressing the depicted *EGFR* mutant variants. IC_{50} = concentration required for 50% inhibition. *EGFR* E746_A750del = *EGFR* ex19del. 4.2.1.1.3, PH-42058.

2.6.2.2.1.2.4 *EGFR*遺伝子野生型及び *EGFR*遺伝子変異陽性細胞株

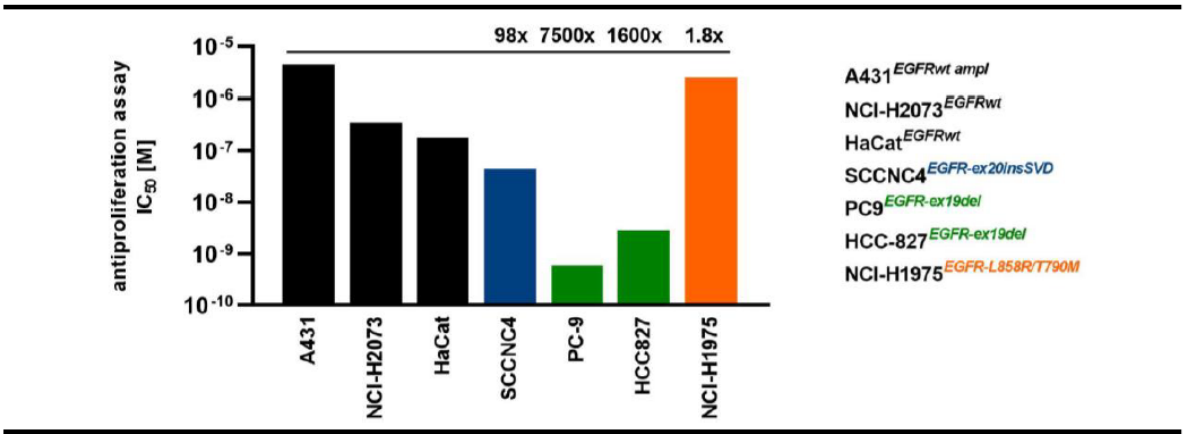
参照項目：4.2.1.1.4 PH-42056

*EGFR*遺伝子変異を内在する細胞株を用いて BAY 2927088 の細胞増殖阻害作用を検討した。

細胞株には *EGFR* 遺伝子野生型のヒト非小細胞肺がん（NSCLC）細胞株 NCI-H2073、ヒト類表皮がん細胞株 A431 及びヒト不死化角化細胞株 HaCaT、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性のがん細胞株 SCCNC4、*EGFR*遺伝子 ex19del 変異陽性のヒト NSCLC 細胞株 PC-9 及び HCC827、そして *EGFR*ゲートキーパー変異（*EGFR* L858R/T790M 変異）陽性のヒト NSCLC 細胞株 NCI-H1975 を用いた。SCCNC4 は 800 個/well で、それ以外のがん細胞株は 400 個/well で播種した（n＝3）。播種後 24 時間で 0.01～30000nmol/L の BAY 2927088（媒体：DMSO、最終濃度 0.3%）を添加し、37℃で 72 時間インキュベートした。インキュベート後に CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Reagent を添加し混合後に遠心分離した。その後、暗条件下で 30 分インキュベートをして発光強度を計測し、IC_{50} 値の平均値を算出した。

*EGFR*遺伝子変異陽性がん細胞株である SCCNC4、PC-9 及び HCC827 の IC_{50} 値は、それぞれ 48.8、0.64 及び 3nmol/L であった一方で、*EGFR* 遺伝子野生型がん細胞株である NCI-H2073、A431 及び HaCaT の IC_{50} 値は、それぞれ 368、4800 及び 198nmol/L であった（図 2.6.2.2- 1）。特に、A431 の IC_{50} 値は *EGFR* 遺伝子変異陽性がん細胞株の IC_{50} 値の 98 倍（SCCNC4）、7500 倍（PC-9）及び 1600 倍（HCC827）であった（図 2.6.2.2- 1）。したがって、BAY 2927088 は *EGFR*遺伝子 ex20ins 変異及び *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異陽性のがん細胞に対して選択的に増殖阻害作用を示すことが明らかになった。なお、NCI-H1975 の IC_{50} 値は 2700nmol/L であったことから（図 2.6.2.2- 1）、*EGFR*ゲートキーパー変異陽性のがん細胞に対する増殖阻害作用は弱かった。

図 2.6.2.2- 1　*EGFR* 遺伝子野生型及び *EGFR* 遺伝子変異陽性がん細胞株での細胞増殖阻害作用



Proliferation inhibition of BAY 2927088 in *EGFR*-mutant vs. *EGFR*wt human cell lines. Bar graphs depict mean IC_{50} of three technical replicates. Fold-changes indicate selectivity ratios of respective cell line vs. A431. IC_{50} = concentration required for 50% inhibition. *EGFR* ex19del = *EGFR* E746_A750del. 4.2.1.1.4, PH-42056.

2.6.2.2.1.3　HER2 のリン酸化及び下流シグナル伝達経路の阻害作用

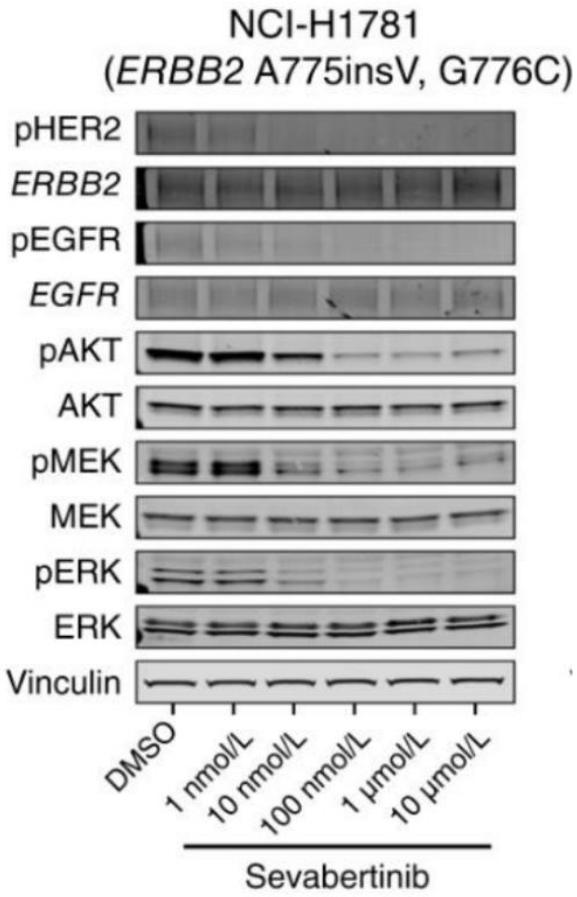
参照項目：4.2.1.1.15 Cancer Discov 2026:16:81-94

HER2 遺伝子 ex20 挿入変異（*HER2* A775insV 変異）及び *HER2* 遺伝子の点変異（*HER2* G776C 変異）を有する肺がん細胞株 NCI-H1781 を用いて、BAY 2927088 の HER2 リン酸化阻害作用を検討した。

NCI-H1781 に DMSO（対照群）及び 1～10000nmol/L の BAY 2927088 を添加してインキュベート後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、溶解バッファーに再懸濁した。Bicinchoninic Acid（BCA）法を用いてタンパク質濃度を測定した後、還元型 Laemmli SDS サンプルバッファーを加えて加熱し、タンパク質を変性させた。サンプルを Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis（SDS-PAGE）にて分離し、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜へと転写した。PVDF 膜はブロッキングバッファーでブロッキング後、HER2、AKT、Mitogen-activated protein kinase kinase（MEK）及び Extracellular signal-regulated kinase（ERK）のリン酸化型及び非リン酸化型に対する一次抗体を加えて 4℃で一晩インキュベートした。更に、二次抗体を加えて室温で 1 時間インキュベート後、Odyssey M Imaging システムを用いて画像を取得した。

BAY 2927088 で処理した NCI-H1781 において、濃度依存的に HER2 キナーゼ、MEK、ERK 及び AKT のリン酸化が阻害された（図 2.6.2.2- 2）。よって、BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子変異を有するがん細胞において、HER2 キナーゼを阻害することで、その下流シグナル経路に関与するキナーゼ AKT、MEK 及び ERK のリン酸化を阻害することが明らかになった。

図 2.6.2.2- 2　*HER2* A775insV 変異及び *HER2* G776C 変異の両変異を有する肺がん細胞株 NCI-H1781 における HER2、MEK、ERK 及び AKT のリン酸化阻害



Sevabertinib = BAY 2927088

2.6.2.2.1.4　EGFR リン酸化阻害作用

参照項目：4.2.1.1.5 PH-42057

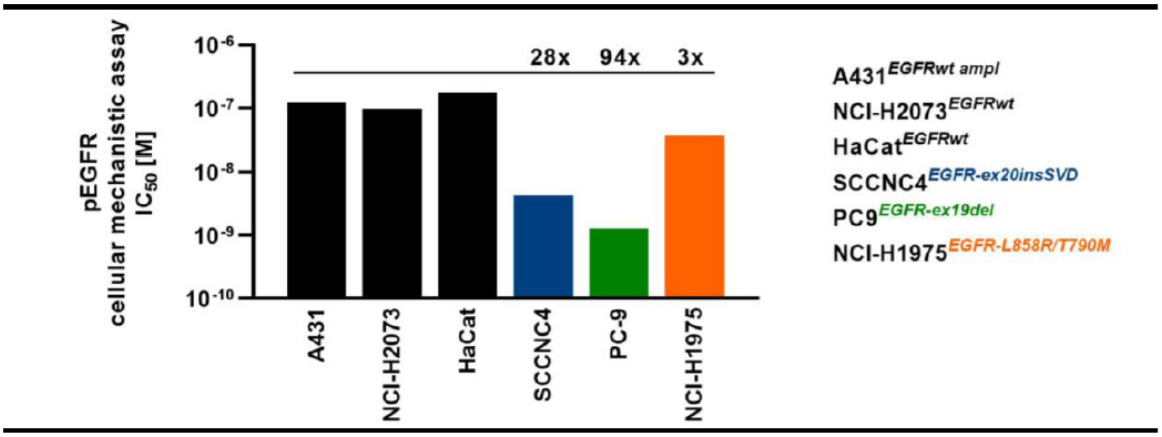
EGFR 遺伝子変異を内在する細胞株〔2.6.2.2.1.2.4 と同様の細胞株（HCC827 を除く）〕を用いて、BAY 2927088 の EGFR リン酸化阻害作用を検討した。

NCI-H2073、HaCat、PC-9 及び NCI-H1975 は 10000 個/well、A431 は 20000 個/well、SCCNC4 は 30000 個/well で播種した（n＝3）。播種後 24 時間で 0.03～30000nmol/L の BAY 2927088 を添加して 37℃で 1.5 時間インキュベートした。インキュベート後に HTRF Phospho-EGFR (Tyr1068) 検出キット（Revvity、Part #64EG1PEH）を用いて、製造元の手順書に従って HTRF 測定を実施し、IC_{50} 値の平均値を算出した。

EGFR 遺伝子変異陽性がん細胞株である SCCNC4 及び PC-9 の IC_{50} 値は、それぞれ 4.6 及び 1.4nmol/L であった一方で、*EGFR* 遺伝子野生型がん細胞株である NCI-H2073、A431 及び HaCaT の IC_{50} 値は、それぞれ 103、131 及び 189nmol/L であった（図 2.6.2.2- 3）。特に、A431 の IC_{50} 値は *EGFR* 遺伝子変異陽性がん細胞株の IC_{50} 値の 28 倍（SCCNC4）及び 94 倍（PC-9）であった。したがって、BAY 2927088 は *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異陽性のがん細

胞に対して選択的に EGFR リン酸化阻害作用を示すことが明らかになった。なお、NCI-H1975 の IC_{50} 値は 39.1nmol/L であったことから（図 2.6.2.2- 3）、ゲートキーパー変異に対する BAY 2927088 の EGFR リン酸化阻害作用は弱かった。

図 2.6.2.2- 3　*EGFR* 遺伝子野生型及び *EGFR* 遺伝子変異陽性がん細胞株でのリン酸化阻害作用



Quantitative determination of cellular mechanistic activity (pEGFR inhibition) of BAY 2927088 in *EGFR*-mutant vs. *EGFR*wt human cell lines. Fold-changes indicate selectivity ratios of respective cell line vs. A431. Measurements were performed in triplicate (mean depicted). IC_{50} = concentration required for 50% inhibition. *EGFR* ex19del = *EGFR* E746_A750del. 4.2.1.1.5, PH-42057.

2.6.2.2.1.5　代謝物

2.6.2.2.1.5.1　　細胞増殖阻害作用

参照項目：4.2.1.1.6 B003067

HER2 遺伝子野生型、*EGFR* 遺伝子野生型、*HER2* 遺伝子変異及び *EGFR* 遺伝子変異を導入した細胞株を用いて、BAY 2927088 の主要代謝物である M1（BAY 3306572）の細胞増殖阻害作用を検討した。

HER2 遺伝子野生型、*EGFR* 遺伝子野生型、*HER2* 遺伝子 ex20ins 変異、*HER2* 遺伝子の点変異、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び古典的 *EGFR* 遺伝子変異を導入した Ba/F3 細胞株を 3200 個/well で播種した（n＝3）。播種後、BAY 3306572（媒体：DMSO、最終濃度 0.2%）を 1.58～10000nmol/L（*EGFR* 遺伝子野生型）又は 0.158～1000nmol/L（*HER2* 遺伝子野生型、*HER2* 遺伝子変異及び *EGFR* 遺伝子変異）で添加し、37℃で 48 時間インキュベートした。インキュベート後に CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Reagent を添加し混合後に遠心分離した。暗条件下で 8～10 分インキュベートをして発光強度を計測した。同一の実験手法を 1 又は 5 回実施し、5 回実施した場合は IC_{50} 値の中央値で評価した。

BAY 3306572 の IC_{50} 値を表 2.6.2.2- 5 に示す。

検討したすべての *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異及び *HER2* 遺伝子の点変異について、BAY 3306572 の IC_{50} 値の中央値は、それぞれ 58.6nmol/L（範囲：13.3～100nmol/L）及び 29.9nmol/L（範囲：2.99～236nmol/L）であった（表 2.6.2.2- 5 及び 4.2.1.1.6 の Table4-1）。同様に、BAY 2927088 の IC_{50} 値の中央値は、それぞれ 4.54nmol/L（範囲：0.941～8.31nmol/L）及び 5.10nmol/L（範囲：0.54～13.9nmol/L）であった（表 2.6.2.2- 2）。これらの中央値より、BAY 3306572 の IC_{50}

値は、BAY 2927088 の IC_{50} 値の 13 倍（*HER2* 遺伝子 ex20ins 変異）及び 6 倍（*HER2* 遺伝子の点変異）であった。

更に、検討したすべての *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び古典的 *EGFR* 遺伝子変異に対する BAY 3306572 の IC_{50} 値の中央値は、それぞれ 65.3nmol/L（範囲：17.1～998nmol/L）及び 5.17nmol/L（範囲：2.85～7.49nmol/L）であった（表 2.6.2.2- 5 及び 4.2.1.1.6 の Table4-1）。同様に、BAY 2927088 の IC_{50} 値の中央値は、それぞれ 6.15nmol/L（範囲：4.44～717nmol/L）及び 0.34nmol/L（範囲：0.16～0.52nmol/L）であった（表 2.6.2.2- 4 及び 4.2.1.1.3 の Table4-1）。これらの中央値より、BAY 3306572 の IC_{50} 値は、BAY 2927088 の IC_{50} 値の 11 倍（*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異）及び 15 倍（古典的 *EGFR* 遺伝子変異）であった。

したがって、BAY 3306572 は *HER2* 遺伝子変異及び *EGFR* 遺伝子変異陽性のがん細胞に対して細胞増殖阻害作用を示す可能性があるが、その作用は BAY 2927088 の細胞増殖阻害作用と比較して弱かった。なお、*EGFR* 遺伝子野生型及び *HER2* 遺伝子野生型に対する BAY 3306572 の増殖阻害作用も、BAY 2927088 と比較すると弱かった（表 2.6.2.2- 2、表 2.6.2.2- 4、表 2.6.2.2- 5）

表 2.6.2.2- 5　BAY 3306572 の細胞増殖阻害作用

EGFR/ HER2 status	Ba/F3 cell line	Cellular IC_{50} [nmol/L]
Ba/F3 parental cells	Ba/F3 - vector control	>1000
EGFR wildtype *HER2* wildtype	Ba/F3 – *EGFR*wt Ba/F3 - *HER*wt	558 53
HER2 exon20 insertion mutation	Ba/F3 - *HER2* Y772_A775dup Ba/F3 - *HER2* G776delinsVC Ba/F3 - *HER2* G778_P780dup	100 95.3 21.9
HER2 activating point mutation	Ba/F3 - *HER2* S310F Ba/F3 - *HER2* S310Y Ba/F3 - *HER2* S653C Ba/F3 - *HER2* L755A Ba/F3 - *HER2* L755P Ba/F3 - *HER2* V777L Ba/F3 - *HER2* V842I	4.84 7.66 89.7 25.3 30.5 2.99 29.2
EGFR exon20 insertion mutation	Ba/F3 - *EGFR* V769_D770insASV Ba/F3 - *EGFR* D770_N771insSVD Ba/F3 - *EGFR* H773_V774insNPH	61.7 45.0 235
EGFR classical activating mutation	Ba/F3 - *EGFR* E746_A750del Ba/F3 - *EGFR* L858R	2.85 7.49

Anti-proliferative effect of BAY 3306572 was assessed in a Ba/F3 cell line panel stably overexpressing the depicted *EGFR* and *HER2* mutant variants. IC_{50} = concentration required for 50% inhibition. 4.2.1.1.6, B003067.

2.6.2.2.2　*In vivo* 試験

2.6.2.2.2.1　がん患者由来組織移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果

2.6.2.2.2.1.1　*HER2* 遺伝子 ex20ins 変異陽性 NSCLC 患者由来がん組織移植片:CTG-2543

参照項目：4.2.1.1.7 R-13868

NSCLC 患者において、*HER2* 遺伝子活性化変異は 2%の患者で認められ、そのうちの 90%以上の患者で *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異が認められる[2)]。*HER2* Y772_A775dup 変異（*HER2* ex20insYVMA 変

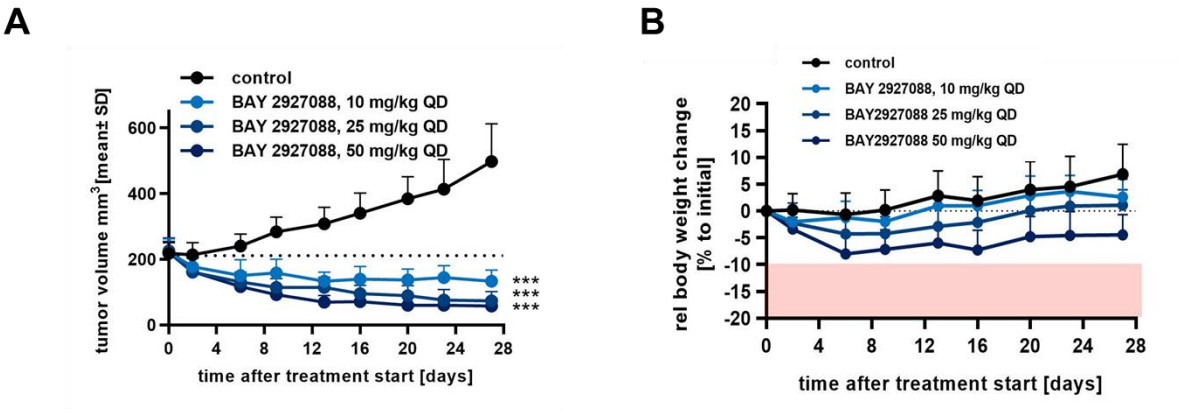
異）陽性のがん細胞に対する BAY 2927088 の抗腫瘍効果について NSCLC 患者由来がん組織移植片 CTG-2543 を用いて評価した。

CTG-2543 を 6～8 週齢の雌性ヌードマウス（Athymic Nude-*Foxn1*^{nu}）の左側腹部に皮下移植した。腫瘍体積が 150～300mm^3 に到達後、BAY 2927088 を 10、25 及び 50mg/kg で 1 日 1 回経口投与した群（媒体：40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）又は媒体投与群（40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）に群分けを行い（各群 10 例）、群分け日から 28 日間、BAY 2927088 及び媒体を投与した。腫瘍の長径及び短径の計測、並びに体重測定は週 2 回及び試験最終日に実施し、腫瘍体積は 0.52×長径×（短径）^{2} にて算出した。体重の変化は各測定日における群分け日からの体重変化率を基に評価した。腫瘍体積及び体重の変化率は平均値±標準偏差で示す。統計解析については、一元配置分散分析に続き Dunnett の多重比較検定を実施し、$p<0.05$ の場合を統計学的に有意であると判断した。

BAY 2927088 投与群では媒体投与群と比較して、いずれの群においても統計学的に有意な抗腫瘍効果が認められた（いずれの投与群でも $p<0.001$、図 2.6.2.2- 4）。抗腫瘍効果を評価する指標である T/C_{volume}（投与最終日における BAY 2927088 投与群の腫瘍体積を媒体投与群の腫瘍体積で除した値）は、10mg/kg 投与群で 0.27、25mg/kg 投与群で 0.15 及び 50mg/kg 投与群で 0.12 であった。BAY 2927088 投与による顕著な体重減少は認められなかったことから（図 2.6.2.2-4）、忍容性は良好であった。

したがって、BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異である *HER2* Y772_A775dup 変異陽性のがん細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

図 2.6.2.2- 4　CTG-2543 移植マウスにおける抗腫瘍効果



CTG-2543 tumor fragments were transplanted s.c. into female Athymic Nude-*Foxn1*^{nu} mice. At 150-300 mm^3 tumor size, treatment started for a 28-day treatment period. Animals received either vehicle (Solutol/EtOH/water 40/10/50, pH4.0) or BAY 2927088 at 10mg/kg QD, 25mg/kg QD, or 50mg/kg QD, p.o. (A) Time course of tumor growth. (B) Time course of relative body weight change. Asterisks indicate statistical significance (*** p<0.001). SD = standard deviation. QD = once daily. 4.2.1.1.7, R-13868.

2.6.2.2.2.1.2　*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性患者由来がん組織移植マウス

2.6.2.2.2.1.2.1　*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性 NSCLC 患者由来がん組織移植片：LU0387

参照項目：4.2.1.1.8 R-13870

EGFR H773_V774insNPH 変異は *EGFR* 遺伝子のエクソン 20 の C 末端近傍に位置し、高頻度で認められる *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異の一つである[3)]。*EGFR* H773_V774insNPH 変異陽性のがん細胞に対

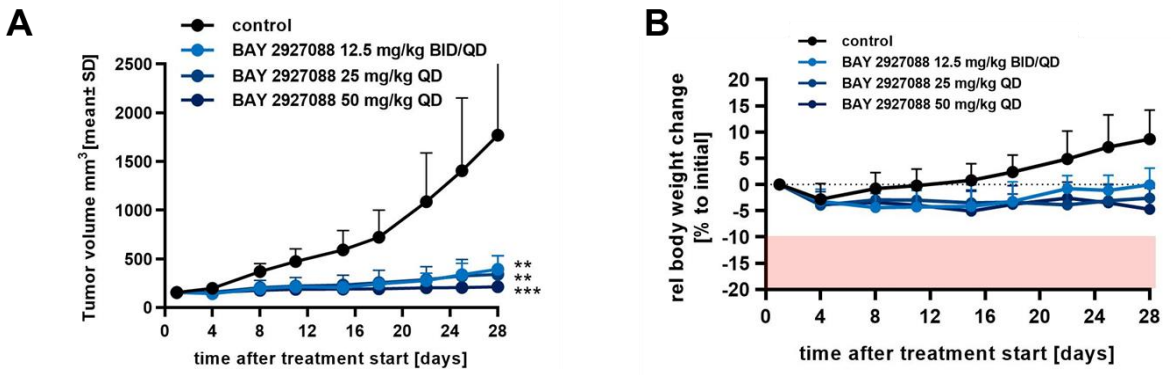
する BAY　2927088 の抗腫瘍効果について NSCLC 患者由来がん組織移植片 LU0387 を用いて評価した。

LU0387 を 8～9 週齢の雌性ヌードマウス（Balb/c　nude　mice）の右上背側部に皮下移植した。腫瘍体積が 153mm^3 に到達後、BAY 2927088 を 12.5mg/kg で 1 日 2 回経口投与（第 1 日目～第 14 日目）後に 1 日 1 回経口投与（第 15 日目～第 28 日目）へと変更した群（12.5mg/kg　BID/QD 投与群）、25 及び 50mg/kg で 1 日 1 回経口投与した群（媒体：40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）又は媒体投与群（40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）に群分けを行い（各群 10 例）、群分け日（第 1 日目）から 28 日間 BAY　2927088 及び媒体を投与した。腫瘍の長径及び短径の計測、並びに体重測定は週 2 回実施し、腫瘍体積は 0.5×長径×（短径）^{2} にて算出した。体重の変化は各測定日における群分け日からの体重変化率を基に評価した。腫瘍体積及び体重の変化率は平均値±標準偏差で示す。統計解析については、最初に Bartlett 検定を実施し、その結果、p≧0.05 の場合は一元配置分散分析を行った。一元配置分散分析が p＜0.05 の際は、更に Tukey's　HSD 検定及び Dunnett 検定を実施した。一方で、Bartlett 検定で p＜0.05 となった場合は、Kruskal-Wallis 検定を行った。Kruskal-Wallis 検定が p＜0.05 の際は、Conover's　non-parametric 検定を実施した。p＜0.05 の場合を統計学的に有意であると判断した。

BAY　2927088 投与群では媒体投与群と比較して、いずれの群においても統計学的に有意な抗腫瘍効果が認められた（いずれの投与群でも p＜0.01、図 2.6.2.2- 5）。更に、12.5mg/kg を 1 日 1 回投与時よりも 1 日 2 回投与時で抗腫瘍効果を示した（図 2.6.2.2- 5）。T/C_{volume} は、12.5mg/kg BID/QD 投与群で 0.22、25mg/kg 投与群で 0.19 及び 50mg/kg 投与群で 0.12 であった。BAY 2927088 投与による顕著な体重減少は認められなかったことから（図 2.6.2.2- 5）、忍容性は良好であった。

したがって、BAY　2927088 は *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異である *EGFR*　H773_V774insNPH 変異陽性のがん細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

図 2.6.2.2- 5　LU0387 移植マウスにおける抗腫瘍効果



Fresh tumor tissue harvested from LU0387 tumor bearing donor animals were cut into small tumor fragments and transplanted s.c. into female Balb/c nude mice. At ~153 mm^3 tumor size, animals were randomized into study groups (n=10) and treatment was initiated for a 28-day treatment period. Animals received either vehicle (Solutol/EtOH/water 40/10/50, pH4.0) or BAY 2927088 at 12.5 mg/kg BID/QD, 25 mg/kg QD, or 50 mg/kg QD, p.o. (A) Time course of tumor growth. (B) Time course of body weight change expressed as a percentage of the starting weight of the animal. Asterisks indicate statistical significance (** p<0.01, *** p<0.001). SD = standard deviation. QD = once daily. BID = twice daily. 4.2.1.1.8, R-13870.

2.6.2.2.2.1.2.2 *EGFR*遺伝子 ex20ins 変異陽性 HNSCC 患者由来がん組織移植片：HNXF700

参照項目：4.2.1.1.9 R-13869

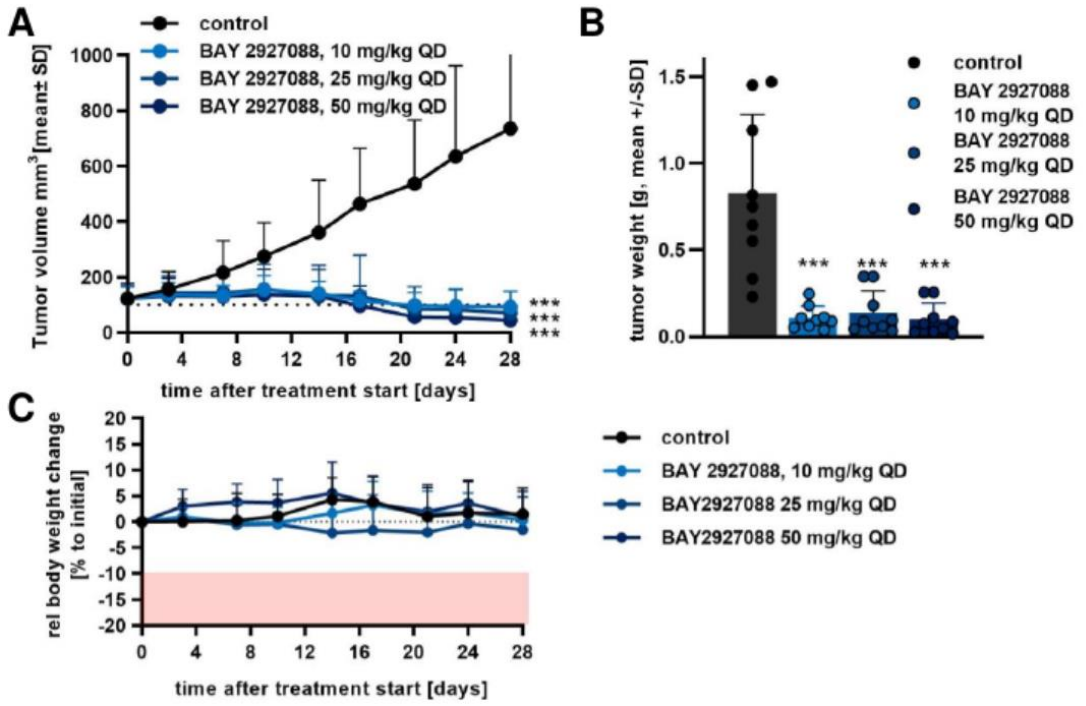
NSCLC 以外の *EGFR*遺伝子 ex20ins 変異陽性のがん腫に対する BAY 2927088 の抗腫瘍効果について検討するために、*EGFR* N771_H773dupNPH 変異陽性の頭頚部扁平上皮がん（HNSCC）患者由来がん組織移植片 HNXF700 を用いて評価した。

HNXF700 を 6～8 週齢の雌性 NOD/SCID マウス（NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/NCrCrl）の片側腹部に皮下移植した。腫瘍体積が 50～250mm^3（主に 80～200mm^3）に到達後、BAY 2927088 を 10、25 及び 50mg/kg で 1 日 1 回経口投与した群（媒体：40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）又は媒体投与群（40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）に群分け（第 0 日目）を実施した（各群 10 例）。群分け翌日から 28 日間 BAY 2927088 及び媒体を経口投与した。腫瘍の長径及び短径の計測は週 2 回実施し、腫瘍体積は 0.5×長径×（短径）^{2} にて算出した。体重測定は第 0～17 日目、第 21、24 及び 28 日目に実施し、体重の変化は各測定日における群分け日からの体重変化率を基に評価した。腫瘍重量は最終投与後 1、3、7 及び 24 時間でそれぞれ 2～3 例ずつ腫瘍を摘出して測定した。腫瘍体積、腫瘍重量及び体重の変化率は平均値±標準偏差で示す。なお、媒体投与群及び 10mg/kg 投与群では、いずれも第 8 日目に 1 例が、25mg/kg 投与群では、それぞれ第 14 及び 19 日目に 1 例ずつ死亡した。50mg/kg 投与群では第 6 日目に 1 例を安楽死させ、第 13 日目に 1 例が死亡した。よって、各計測日に生存していたマウスを用いて、これらの値を算出した。統計解析については、non-parametric Kruskal-Wallis 検定に続き Dunn の多重比較検定を用いて実施し、$p<0.05$ の場合を統計学的に有意であると判断した。

BAY 2927088 投与群では媒体投与群と比較して、いずれの群においても統計学的に有意な抗腫瘍効果及び腫瘍重量の減少が認められた（いずれの投与群でも $p<0.001$、図 2.6.2.2- 6）。T/C_{volume} は、10mg/kg 投与群で 0.11、25mg/kg 投与群で 0.06 及び 50mg/kg 投与群で 0.05 であった。BAY 2927088 投与による顕著な体重減少は認められなかったことから（図 2.6.2.2- 6）、忍容性は良好であった。

したがって、NSCLC 以外のがん腫についても、BAY 2927088 は *EGFR*遺伝子 ex20ins 変異である *EGFR* N771_H773dupNPH 変異陽性のがん細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

図 2.6.2.2- 6 HNXF700 移植マウスにおける抗腫瘍効果



HNXF 700 tumor fragments were transplanted s.c. into female NOD/SCID mice. At 50-250 mm^3 (preferably 80-200 mm^3) tumor size, animals were randomized into study groups (n=10) and treatment started for a 28-day treatment period. Animals received vehicle (Solutol/EtOH/water 40/10/50, pH4.0) or BAY 2927088 at 10 mg/kg QD, 25 mg/kg QD, or 50 mg/kg QD, p.o. (A) Time course of tumor growth. (B) Final tumor weight on day 28 (study termination). Depicted are the individual tumor weights as well as the mean tumor weight per study group, represented by the bar graph. (C) Time course of body weight change expressed as a percentage of the starting weight of the animal. Asterisks indicate statistical significance (*** p<0.001). SD = standard deviation. QD = once daily. 4.2.1.1.9, R-13869.

2.6.2.2.2.1.2.3 *EGFR*遺伝子 ex20ins 変異陽性 NSCLC 患者由来がん組織移植片：CTG-2842

参照項目：4.2.1.1.7 R-13868

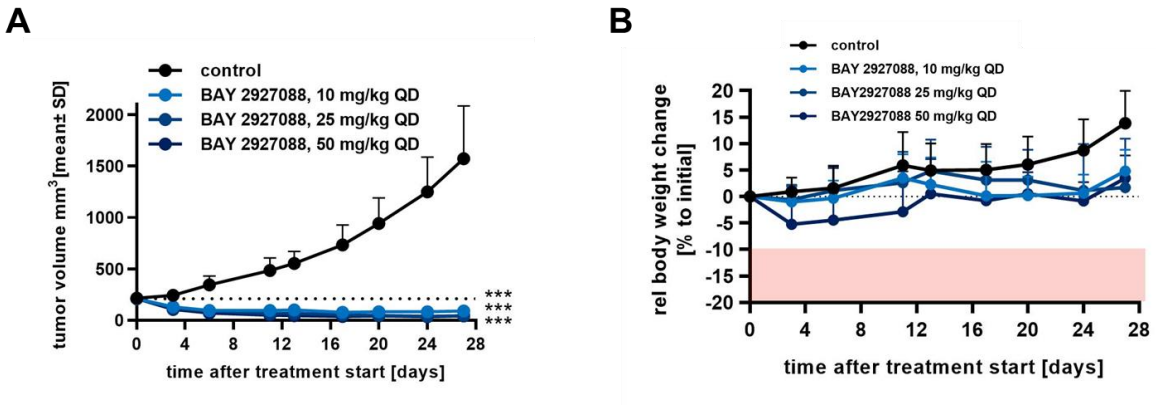
EGFR V769_D770insASV 変異は *EGFR* ex20insASV 変異の一つであり、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異の中でも高頻度で認められる変異の一つである[3)]。*EGFR* V769_D770insASV 変異陽性のがん細胞に対する BAY 2927088 の抗腫瘍効果について NSCLC 患者由来がん組織移植片 CTG-2842 を用いて評価した。

CTG-2842 を 6～8 週齢の雌性ヌードマウス（Athymic Nude-*Foxn1*^{nu}）の左側腹部に皮下移植した。腫瘍体積が 150～300mm^3 に到達後、BAY 2927088 を 10、25 及び 50mg/kg で 1 日 1 回経口投与した群（媒体：40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）又は媒体投与群（40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）に群分けを行い（各群 10 例）、群分け日から 28 日間 BAY 2927088 及び媒体を投与した。腫瘍の長径及び短径の計測、並びに体重測定は週 2 回及び試験最終日に実施し、腫瘍体積は 0.52×長径×（短径）^{2} にて算出した。体重の変化は各測定日における群分け日からの体重変化率を基に評価した。腫瘍体積及び体重の変化率は平均値±標準偏差で示す。統計解析については、一元配置分散分析に続き Dunnett の多重比較検定を実施し、$p<0.05$ の場合を統計学的に有意であると判断した。

BAY 2927088 投与群では媒体投与群と比較して、いずれの群においても統計学的に有意な抗腫瘍効果が認められた（いずれの投与群でも $p<0.001$、図 2.6.2.2- 7）。T/C_{volume} は、10mg/kg 投

与群で 0.06、25mg/kg 投与群で 0.03 及び 50mg/kg 投与群で 0.03 であった。BAY 2927088 投与による顕著な体重減少は認められなかったことから（図 2.6.2.2- 7）、忍容性は良好であった。

図 2.6.2.2- 7　CTG-2842 移植マウスにおける抗腫瘍効果



CTG-2842 tumor fragments were transplanted s.c. into female Athymic Nude-*Foxn1*^{nu} mice. At 150-300 mm^3 tumor size, treatment started for a 28-day treatment period. Animals received either vehicle (Solutol/EtOH/water 40/10/50, pH4.0) or BAY 2927088 at 10mg/kg QD, 25mg/kg QD, or 50mg/kg QD, p.o. (A) Time course of tumor growth. (B) Time course of relative body weight change. Asterisks indicate statistical significance (*** p<0.001). SD = standard deviation. QD = once daily. 4.2.1.1.7, R-13868.

2.6.2.2.2.1.2.4　*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性 NSCLC 患者由来がん組織移植片：LXFE2478

参照項目：4.2.1.1.9 R-13869

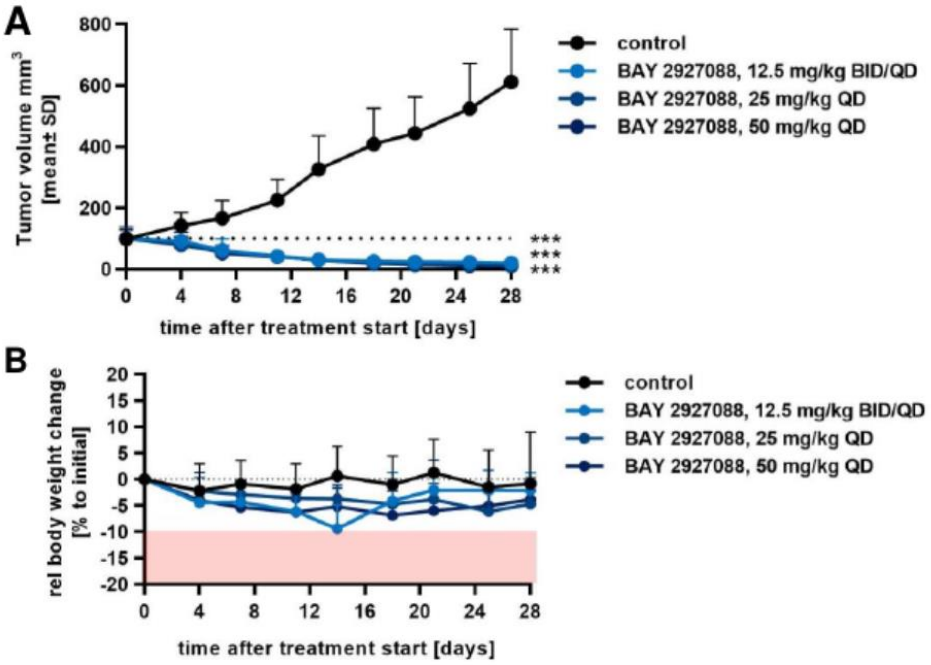
EGFR V769_D770insASV 変異陽性のがん細胞に対する BAY 2927088 の抗腫瘍効果について NSCLC 患者由来がん組織移植片 LXFE2478 を用いて評価した。

LXFE2478 を 5～7 週齢の雌性 NMRI nu/nu マウス（Crl:NMRI-*Foxn1*^{nu}）の片側腹部に皮下移植した。腫瘍体積が 50～250mm^3（主に 80～200mm^3）に到達後、BAY 2927088 を 12.5mg/kg で 1 日 2 回経口投与（第 1 日目～第 14 日目）後に 1 日 1 回経口投与（第 15 日目～第 28 日目）へと変更した群（12.5mg/kg BID/QD 群）、25 及び 50mg/kg で 1 日 1 回経口投与した群（媒体：40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）又は媒体投与群（40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）に群分け（第 0 日目）を実施した（各群 10 例）。群分け翌日（第 1 日目）から 28 日間 BAY 2927088 及び媒体を経口投与した。腫瘍の長径及び短径の計測は週 2 回実施し、腫瘍体積は 0.5×長径×（短径）^{2} にて算出した。体重測定は第 0 日目及び第 4～28 日目に実施し、体重の変化は各測定日における群分け日からの体重変化率を基に評価した。腫瘍体積及び体重の変化率は平均値±標準偏差で示す。なお、BAY 2927088 12.5mg/kg BID/QD 群及び 50mg/kg QD 投与群では、いずれも第 21 日目に 1 例が死亡した。25mg/kg 投与群では、第 15 日目に 1 例が死亡し、第 21 日目に 1 例を安楽死させた。よって、各計測日に生存していたマウスを用いて、これらの値を算出した。統計解析については、non-parametric Kruskal-Wallis 検定に続き Dunn の多重比較検定を用いて実施し、$p<0.05$ の場合を統計学的に有意であると判断した。

BAY 2927088 投与群では媒体投与群と比較して、いずれの群においても統計学的に有意な抗腫瘍効果が認められた（いずれの投与群でも $p<0.001$、図 2.6.2.2- 8）。更に、12.5mg/kg を 1 日 1 回投与時よりも 1 日 2 回投与時で抗腫瘍効果を示した（図 2.6.2.2- 8）。T/C_{volume} は、12.5mg/kg BID/QD 投与群で 0.02、25mg/kg 投与群で 0.02 及び 50mg/kg 投与群で 0.01 であった。更に、BAY 2927088 投与による顕著な体重減少は認められなかったことから（図 2.6.2.2- 8）、忍容性は良好であった。

したがって、BAY 2927088 は *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異である *EGFR* V769_D770insASV 変異陽性のがん細胞に対しても抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

図 2.6.2.2- 8　LXFE2478 移植マウスにおける抗腫瘍効果



LXFE2478 tumor fragments were transplanted s.c. into female NMRI nu/nu mice. At 50-250 mm^3 (preferably 80-200 mm^3) tumor size, animals were randomized into study groups (n=10) and treatment was initiated for a 28-day treatment period. Animals received either vehicle (Solutol/EtOH/water 40/10/50, pH4.0) or BAY 2927088 at 12.5 mg/kg BID/QD, 25 mg/kg QD, or 50 mg/kg QD, p.o. (A) Time course of tumor growth. (B) Time course of body weight change expressed as a percentage of the starting weight of the animal. Asterisks indicate statistical significance (*** p<0.001). SD = standard deviation. QD = once daily. BID = twice daily.4.2.1.1.9, R-13869.

2.6.2.2.2.2　細胞株移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果

2.6.2.2.2.2.1　　*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性 HNSCC 細胞株：SCCNC4

参照項目：4.2.1.1.10 PH-42101

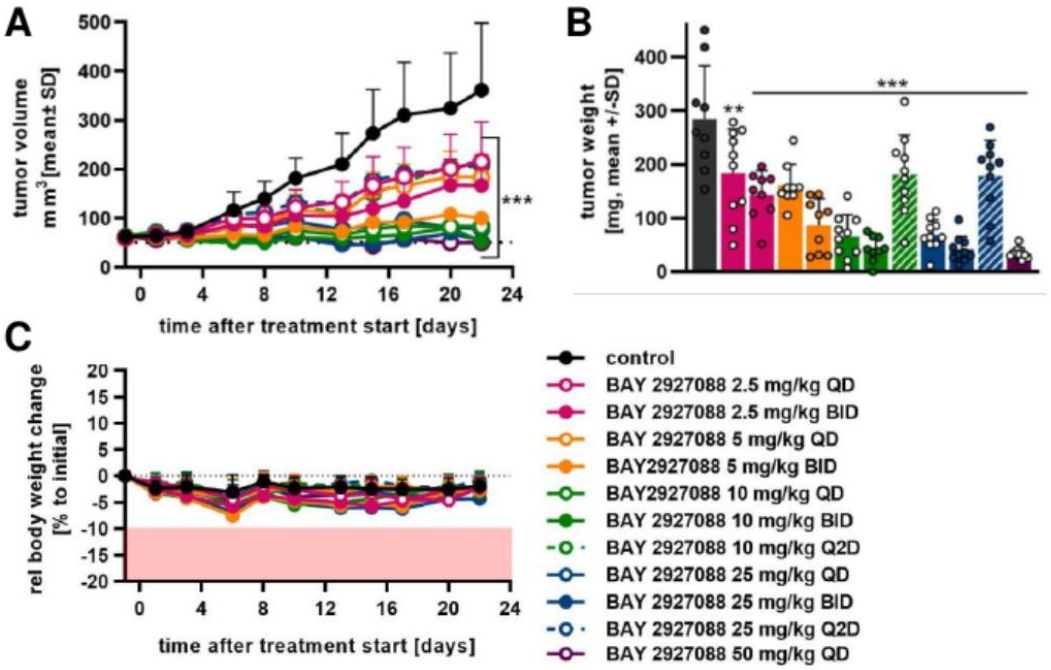
EGFR ex20insSVD 変異陽性のがん細胞に対する BAY 2927088 の抗腫瘍効果について SCCNC4 を用いて検討した。

当該細胞株を 8～10 週齢の雌性 NMRI nu/nu マウス（Crl:NMRI-*Foxn1*^{nu}）の左側腹部皮下に移植した。腫瘍体積が 61mm^3 に到達後、BAY 2927088 2.5、5、10、25 及び 50mg/kg を 1 日 1 回経口投与した群、2.5、5、10 及び 25mg/kg を 1 日 2 回経口投与した群、10 及び 25mg/kg を隔日経口投与した群（媒体：40％ソルト―ル、10％エタノール、50％滅菌水、pH4.0）又は媒体投与群（40％ソルト―ル、10％エタノール、50％滅菌水、pH4.0）に群分けを実施した（各群 10 例）。群分け日から 23 日間 BAY 2927088 及び媒体を投与した。腫瘍の長径及び短径の計測、並びに体重測定は週 2 回実施し、腫瘍体積は 0.5×長径×（短径）^{2} にて算出した。体重の変化は各測定日における群分け日からの体重変化率を基に評価した。腫瘍重量は最終投与後 1、3、7 及び 24 時間で、それぞれ 2～3 例ずつ腫瘍を摘出して測定し、採血も同時に実施した。腫瘍体積、腫瘍重量及び体重の変化率は平均値±標準偏差で示す。なお、媒体群及び 10mg/kg BID 群では、いずれも第 21 日目に 1 例を、2.5mg/kg BID 群では第 15 日目に 1 例を、5mg/kg QD 群では第 10 日目に 1 例を、5mg/kg BID 群では第 17 日目に 1 例を安楽死させた。よって、各計測日に生存していたマ

ウスを用いて、これらの値を算出した。統計解析については、順位に基づく一元配置分散分析に続き Dunn 検定を用いて実施し、$p<0.05$ の場合を統計学的に有意であると判断した。

BAY 2927088 投与群では媒体投与群と比較して、いずれの群においても統計学的に有意な抗腫瘍効果及び腫瘍重量の減少が認められた（いずれの投与群でも $p<0.01$、図 2.6.2.2- 9）。更に、T/C_{volume} 及び T/C_{weight}（投与最終日における BAY 2927088 投与群の腫瘍重量を媒体投与群の腫瘍重量で除した値）は、同一の投与スケジュールの中で用量依存性を示した一方で、隔日投与群では抗腫瘍効果が弱かった（表 2.6.2.2- 6）。1 日 1 回投与群では 10mg/kg 投与群で、1 日 2 回投与群でも 10mg/kg 投与群で抗腫瘍効果が頭打ちの傾向を示し、これ以上の用量では有効性が顕著に向上しなかった。

図 2.6.2.2- 9　SCCNC4 移植マウスにおける抗腫瘍効果



SCCNC4 cells were transplanted s.c. into female NMRI nu/nu mice. At ~61 mm^3 tumor size, animals were randomized into study groups (n=10) and treatment started for a 23-day treatment period. Animals received vehicle (Solutol/EtOH/water 40/10/50, pH4.0) or BAY 2927088 at indicated doses and schedules. (A) Time course of tumor growth. (B) Final tumor weight on day 22 (study termination). Depicted are the individual tumor weights as well as the mean tumor weight per study group, represented by the bar graph. (C) Time course of body weight change expressed as a percentage of the starting weight of the animal. Asterisks indicate statistical significance (** $p<0.01$, *** $p<0.001$). SD = standard deviation. QD = once daily. BID = twice daily. Q2D = every other day. 4.2.1.1.10, PH-42101.

表 2.6.2.2- 6 SCCNC4 移植マウスにおける T/C_{volume} 及び T/C_{weight}

Treatment	T/C_{volume}[a]	T/C_{weight}[b]
Control	1.00	1.00
BAY 2927088, 2.5mg/kg QD p.o.	0.60***	0.65**
BAY 2927088, 2.5mg/kg BID p.o.	0.46***	0.50***
BAY 2927088, 5mg/kg QD p.o.	0.51***	0.57***
BAY 2927088, 5mg/kg BID p.o.	0.28***	0.30***
BAY 2927088, 10mg/kg QD p.o.	0.23***	0.23***
BAY 2927088, 10mg/kg BID p.o.	0.14***	0.15***
BAY 2927088, 10mg/kg Q2D p.o.	0.60***	0.64***
BAY 2927088, 25mg/kg QD p.o.	0.22***	0.24***
BAY 2927088, 25mg/kg BID p.o.	0.15***	0.15***
BAY 2927088, 25mg/kg Q2D p.o.	0.58***	0.63***
BAY 2927088, 50mg/kg QD p.o.	0.14***	0.12***

All treatments were administered p.o. Statistically significant vs. vehicle control (** p<0.01; *** p<0.001). [a] T/C_{volume} = Treatment/Control ratio, calculated from mean tumor volumes on day of study termination. [b] T/C_{weight} = Treatment/Control ratio, calculated from mean tumor wet weights on day of study termination. QD = once daily. BID = twice daily. Q2D = every other day. 4.2.1.1.10, PH-42101.

2.6.2.2.2.2 *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異陽性ヒト NSCLC 細胞株：PC-9

参照項目：4.2.1.1.11 PH-42104

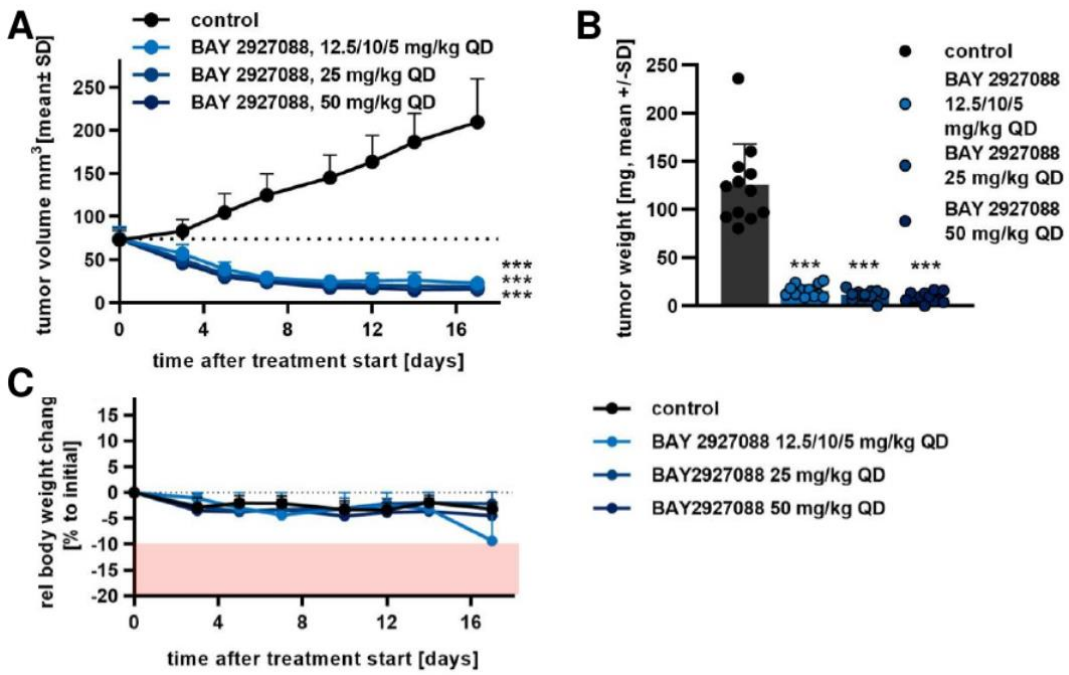
EGFR E746_A750del 変異は *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異の一つであり、*EGFR* 遺伝子 ex19del 変異の中でも高頻度で認められる古典的 *EGFR* 遺伝子変異である[4)]。*EGFR* E746_A750del 変異に対する BAY 2927088 の抗腫瘍効果について NSCLC 細胞株 PC-9 を用いて評価した。

当該細胞株を 8～10 週齢の雌性 NMRI nu/nu マウス（Crl:NMRI-*Foxn1*^{nu}）の左側腹部に皮下移植した。腫瘍体積が 74mm^3 に到達後、BAY 2927088 12.5mg/kg で 1 日 1 回経口投与（第 0 日目～第 6 日目）後に 10mg/kg を 1 日 1 回投与（第 7 日目～第 13 日目）そして 5mg/kg を 1 日 1 回投与（第 14 日目～第 17 日目）へと変更した群（12.5/10/5mg/kg 群）、25 及び 50mg/kg で 1 日 1 回経口投与した群（媒体：40％ソルトール、10％エタノール、50％滅菌水、pH4.0）又は媒体投与群（40％ソルトール、10％エタノール、50％滅菌水、pH4.0）に群分け（第 0 日目）を実施した（各群 12 例）。群分け日から 18 日間 BAY 2927088 及び媒体を投与した。腫瘍の長径及び短径の計測、並びに体重測定は週 2 回実施し、腫瘍体積は 0.5×長径×（短径）^{2} にて算出した。体重の変化は各測定日における群分け日からの体重変化率を基に評価した。腫瘍重量は最終投与後 1、3、7 及び 24 時間で、それぞれ 3 例ずつ腫瘍を摘出して測定した。腫瘍体積、腫瘍重量及び体重の変化率は平均値±標準偏差で示す。統計学的解析については、順位に基づく一元配置分散分析に続き Dunn 検定を用いて実施し、$p<0.05$ の場合を統計学的に有意であると判断した。

BAY 2927088 投与群では媒体投与群と比較して、いずれの群においても統計学的に有意な抗腫瘍効果及び腫瘍重量の減少が認められた（いずれの投与群でも $p<0.001$、図 2.6.2.2- 10）。更に、5 及び 10mg/kg を 1 日 1 回投与時よりも 12.5mg/kg を 1 日 1 回投与時で抗腫瘍効果を示した（図 2.6.2.2- 10）。T/C_{volume} 及び T/C_{weight} は、12.5/10/5mg/kg 投与群でそれぞれ 0.11 及び 0.13、25mg/kg 投与群でそれぞれ 0.09 及び 0.09、50mg/kg 投与群でそれぞれ 0.07 及び 0.07 であった。BAY 2927088 投与による顕著な体重減少は認められなかったことから（図 2.6.2.2- 10）、忍容性は良好であった。

したがって、BAY 2927088 は *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異である *EGFR* E746_A750del 変異陽性のがん細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

図 2.6.2.2- 10 PC-9 移植マウスにおける抗腫瘍効果



PC-9 human NSCLC cells were transplanted s.c. into female NMRI nu/nu mice. At ~74 mm^3 tumor size, animals were randomized into study groups (n=12) and treatment started for a 18-day treatment period. Animals received vehicle (Solutol/EtOH/water 40/10/50, pH4.0) or BAY 2927088 at 12.5/10/5 mg/kg QD, 25 mg/kg QD, or 50 mg/kg QD, p.o. (A) Time course of tumor growth. (B) Final tumor weight on day 17 (study termination). Depicted are the individual tumor weights as well as the mean tumor weight per study group, represented by the bar graph. (C) Time course of body weight change expressed as a percentage of the starting weight of the animal. Asterisks indicate statistical significance (*** $p<0.001$). SD = standard deviation. QD = once daily. 4.2.1.1.11, PH-42104.

2.6.2.2.2.3 *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異及び *EGFR* C797S 変異導入細胞株：Ba/F3-*EGFR* ex19del/C797S

参照項目：4.2.1.1.12 PH-42103

EGFR C797S 変異は、第 3 世代の共有結合型 EGFR 阻害薬に対する主要な耐性メカニズムの一つとして知られている[5),6)]。*EGFR* 遺伝子 ex19del 変異及び *EGFR* C797S 変異をいずれも導入した Ba/F3-*EGFR* ex19del/C797S 変異に対する BAY 2927088 の抗腫瘍効果を評価した。

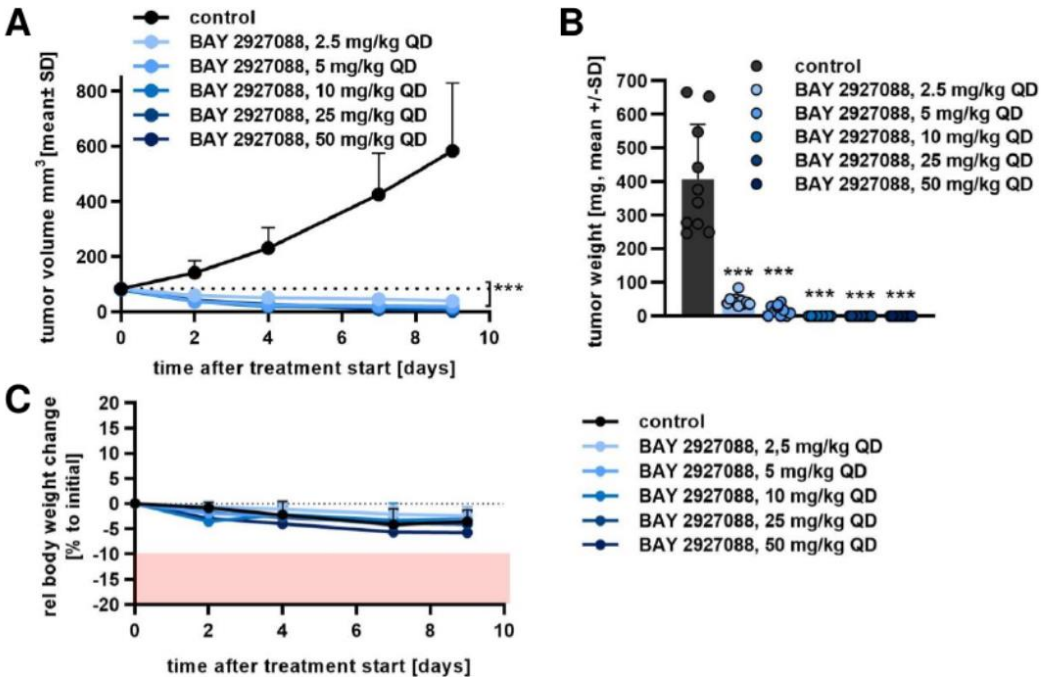
Ba/F3-*EGFR* ex19del/C797S を 8～10 週齢の雌性 NMRI nu/nu マウス（Crl:NMRI-*Foxn1*^{nu}）の左側腹部皮下に移植した。腫瘍体積が 84mm^3 に到達後、BAY 2927088 を 2.5、5、10、25 及び 50mg/kg

で 1 日 1 回経口投与した群（媒体：40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）又は媒体投与群（40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）に群分けを実施した（各群 10 例）。群分け日から 10 日間 BAY 2927088 及び媒体を投与した。腫瘍の長径及び短径の計測、並びに体重測定は週 2 回実施し、腫瘍体積は 0.5×長径×（短径）^{2}にて算出した。体重の変化は各測定日における群分け日からの体重変化率を基に評価した。腫瘍重量は最終投与後 1、3、7 及び 24 時間で、それぞれ 2～3 例ずつ腫瘍を摘出して測定した。腫瘍体積、腫瘍重量及び体重の変化率は平均値±標準偏差で示す。なお、10mg/kg QD 群では、第 2 日目に 1 例を安楽死させた。よって、各計測日に生存していたマウスを用いて、これらの値を算出した。統計学的解析については、順位に基づく一元配置分散分析に続き Dunn 検定を実施し、$p<0.05$ の場合を統計学的に有意であると判断した。

BAY 2927088 投与群では媒体投与群と比較して、いずれの群においても統計学的に有意な抗腫瘍効果及び腫瘍重量の減少が認められた（いずれの投与群でも $p<0.001$、図 2.6.2.2- 11）。T/C_{volume} 及び T/C_{weight} は、2.5mg/kg 投与群でそれぞれ 0.07 及び 0.11、5mg/kg 投与群でそれぞれ 0.03 及び 0.04、10mg/kg 投与群でそれぞれ 0.02 及び 0、25mg/kg 投与群でそれぞれ 0.01 及び 0、並びに 50mg/kg 投与群でそれぞれ 0.01 及び 0 であった。BAY 2927088 投与による顕著な体重減少は認められなかったことから（図 2.6.2.2- 11）、忍容性は良好であった。

したがって、BAY 2927088 は *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異及び *EGFR* C797S 変異が共存するがん細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

図 2.6.2.2- 11　Ba/F3-*EGFR* ex19del/C797S 移植マウスにおける抗腫瘍効果



Ba/F3-*EGFR* ex19del/C797S cells were transplanted s.c. into female NMRI nu/nu mice. At 84 mm^3 tumor size, animals were randomized into study groups (n=10) and treatment started for a 10-day treatment period. Animals received vehicle (Solutol/EtOH/water 40/10/50, pH4.0) or BAY 2927088 at 2.5 mg/kg QD, 5 mg/kg QD, 10 mg/kg QD, 25 mg/kg QD, or 50 mg/kg QD, p.o. (A) Time course of tumor growth. (B) Final tumor weight on day 9 (study termination). Depicted are the individual tumor weights as well as the mean tumor weight per study group, represented by the bar graph. (C) Time course of body weight change expressed as a percentage of the starting weight of the animal. Asterisks indicate statistical significance (*** p<0.001). SD = standard deviation. QD = once daily. 4.2.1.1.12, PH-42103.

2.6.2.2.2.2.4 *EGFR*遺伝子野生型ヒトNSCLC細胞株：A431

参照項目：4.2.1.1.13 PH-42102

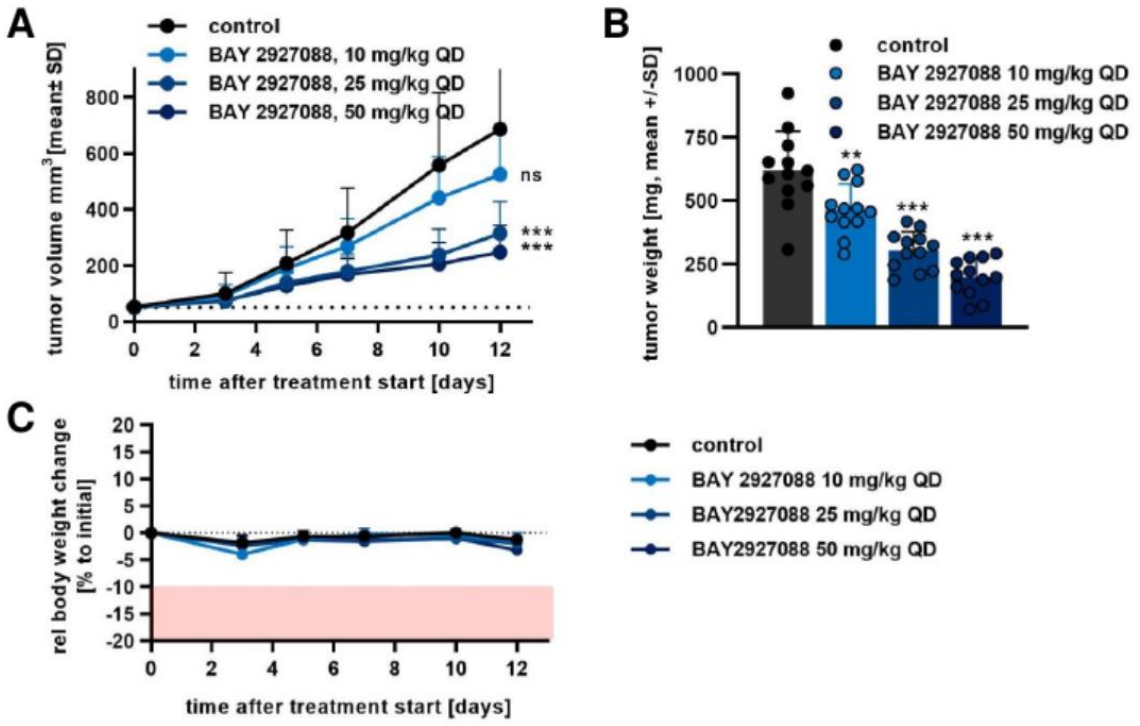
*In vitro*試験において、BAY 2927088は*EGFR*遺伝子野生型と比較して、*EGFR*遺伝子変異に対して増殖抑制作用が認められた（2.6.2.2.1.2.3及び2.6.2.2.1.2.4）。*In vivo*試験においても、BAY 2927088の選択性が認められるか検討するために、*EGFR*遺伝子野生型NSCLC細胞株A431を用いてBAY2927088の抗腫瘍効果を評価した。

当該細胞株を8～10週齢の雌性CB17-SCIDマウス（Crl:CB17/Icr-*Prkdc*^{scid}/IcrCrl）の左側腹部皮下に移植した。腫瘍体積が52mm^{3}に到達後、BAY 2927088を10、25及び50mg/kgで1日1回経口投与した群（媒体：40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）又は媒体投与群（40%ソルトール、10%エタノール、50%滅菌水、pH4.0）に群分けし（各群12例）、群分け日から13日間BAY 2927088及び媒体を投与した。腫瘍の長径及び短径の計測、並びに体重測定は週2回実施し、腫瘍体積は0.5×長径×（短径）^{2}にて算出した。体重の変化は各測定日における群分け日からの体重変化率を基に評価した。腫瘍重量は最終投与後1、3、7及び24時間で、それぞれ3例ずつ腫瘍を摘出して測定した。腫瘍体積、腫瘍重量及び体重の変化率は平均値±標準偏差で示す。統計学的解析については、順位に基づく一元配置分散分析に続きDunn検定を用いて実施し、$p<0.05$の場合を統計学的に有意であると判断した。

25及び50mg/kg投与群では媒体投与群と比較して、統計学的に有意な抗腫瘍効果が認められた（いずれの投与群でも$p<0.001$、図2.6.2.2- 12）一方で、*EGFR*遺伝子変異陽性患者由来がん組織移植片及びがん細胞株を移植したマウスモデルと比較すると抗腫瘍効果は弱かった。更に、*EGFR*遺伝子変異陽性がん細胞株を移植したモデルで有効性が認められた10mg/kgの用量において、本モデルでは顕著な有効性が認められなかった。T/C_{volume}及びT/C_{weight}は、10mg/kg投与群でそれぞれ0.77及び0.75、25mg/kg投与群でそれぞれ0.46及び0.49、50mg/kg投与群でそれぞれ0.36及び0.32であった。BAY 2927088投与による顕著な体重減少は認められなかったことから、忍容性は良好であった（図2.6.2.2- 12）。

したがって、*in vitro*試験で認められた*EGFR*遺伝子変異陽性がん細胞に対するBAY 2927088の選択性は*in vivo*試験においても確認できた。

図 2.6.2.2- 12 A431 移植マウスにおける抗腫瘍効果



A431 cells were transplanted s.c. into female CB17-SCID mice. At 52 mm^3 tumor size, animals were randomized into study groups (n=12) and treatment started for a 13-day treatment period. Animals received vehicle (Solutol/EtOH/water 40/10/50, pH4.0) or BAY 2927088 at 10 mg/kg QD, 25 mg/kg QD, or 50 mg/kg QD, p.o. (A) Time course of tumor growth. (B) Final tumor weight on day 12 (study termination). Depicted are the individual tumor weights as well as the mean tumor weight per study group, represented by the bar graph. (C) Time course of body weight change expressed as a percentage of the starting weight of the animal. Asterisks indicate statistical significance (ns; not significant; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$). SD = standard deviation. QD = once daily. 4.2.1.1.13, PH-42102.

2.6.2.2.2.3 SCCNC4 移植マウスモデルを用いた作用機序検討試験

参照項目：4.2.1.1.10 PH-42101

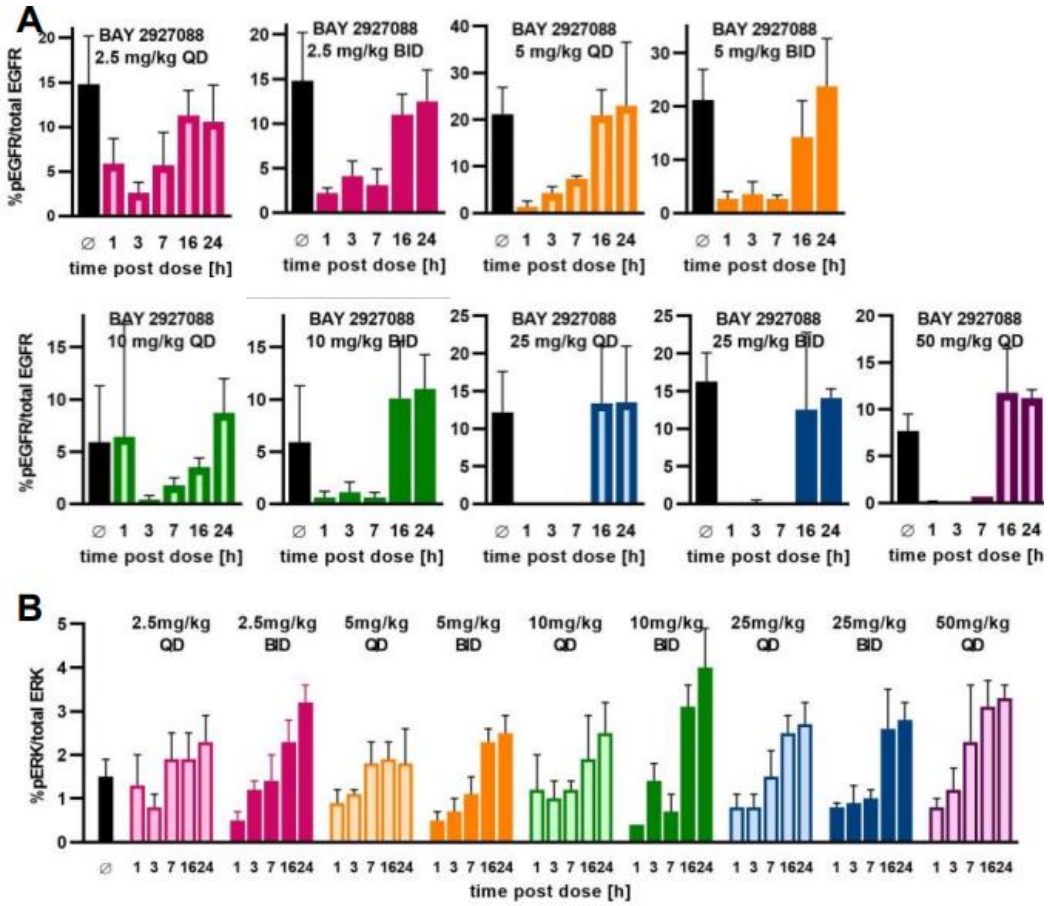
SCCNC4 移植マウスモデルを用いて実施した抗腫瘍効果検討試験（2.6.2.2.2.2.1）と同用量及び投与経路（隔日投与群を除く）で BAY 2927088 の作用機序を評価した。

本試験では腫瘍体積が 250～300mm^3 に到達後に群分けを行った（各群 15 例）。初回投与後 1、3、7、16 及び 24 時間で、それぞれ 3 例ずつがん組織の摘出及び採血を実施した。摘出したがん組織における総 EGFR タンパク及びリン酸化 EGFR（pEGFR）タンパクはウェスタンブロッティング法で、総 extracellular signal-regulated kinase（ERK）タンパク及びリン酸化 ERK（pERK）タンパクはサンドイッチイムノアッセイの原理を用いた Meso Scale Discovery（MSD）アッセイにより検出を行った。検出後に総 EGFR タンパクに対する pEGFR タンパクの割合及び総 ERK タンパクに対する pERK タンパクの割合を算出し、平均値±標準偏差で示す。

1 日 1 回投与群及び 1 日 2 回投与群では、いずれの用量でも総 EGFR に対する pEGFR の割合が減少し、この減少は投与後 1、3 及び 7 時間で顕著に認められ、投与後 16 時間で媒体投与群と同程度の割合になった（図 2.6.2.2- 13）。更に、25mg/kg を 1 日 1 回又は 1 日 2 回投与した群及び 50mg/kg を 1 日 1 回投与した群では、投与後 1、3 及び 7 時間で EGFR のリン酸化が完全に阻害された（図 2.6.2.2- 13）。その一方で、ERK のリン酸化阻害作用は、EGFR のリン酸化阻害作用と比較して弱いものの、認められた（図 2.6.2.2- 13）。

以上の結果より、BAY 2927088 は、*EGFR* 遺伝子 *ex20*ins 変異陽性のがん細胞において EGFR のリン酸化を顕著に阻害し、下流シグナル分子である ERK のリン酸化を阻害することが明らかになった。

図 2.6.2.2- 13　EGFR 及び ERK リン酸化に対する阻害作用



SCCNC4 tumor bearing animals were treated with BAY 2927088 as indicated and tumors were harvested at 1, 3, 7, 16 and 24h post dose. Tumor samples (n=3 per time point) were lysed and analyzed for (A) phosphorylated and total EGFR protein levels by western blotting and (B) phosphorylated and total ERK levels by MSD assay. Ø: Tumor samples of control group at 24h post dose (n=3). The y-axes denote phosphorylated protein levels relative to total protein levels. QD = once daily. BID = twice daily. 4.2.1.1.10, PH-42101.

2.6.2.2.3　　ヒト有効曝露量の推定

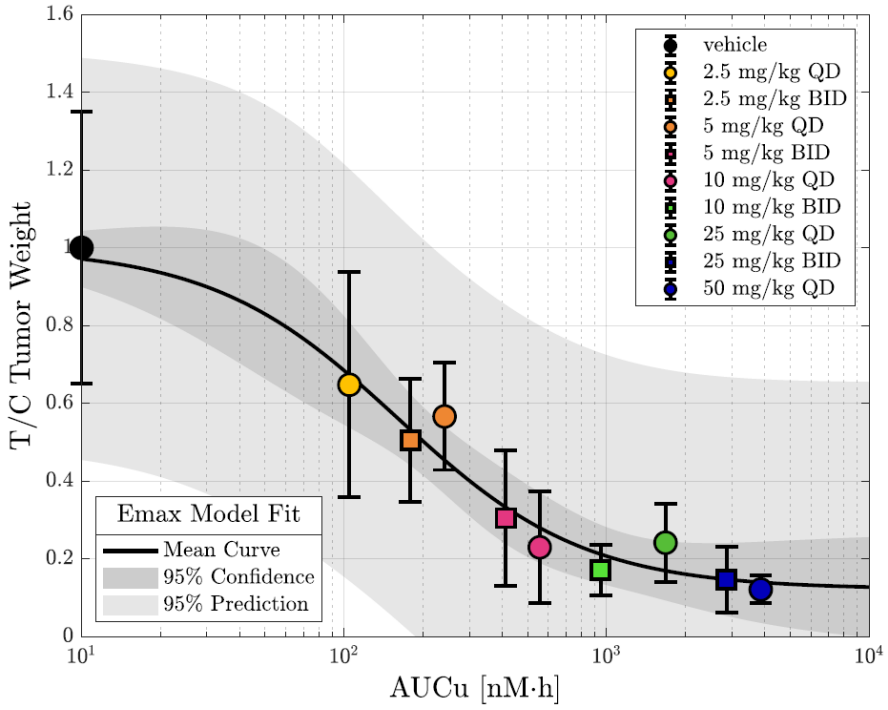
参照項目：4.2.1.1.10 PH-42101

BAY 2927088 の有効性と曝露量との関係を検討するために、SCCNC4 移植マウスモデルの試験成績（2.6.2.2.2.2.1 及び 2.6.2.2.2.3）を用いて薬物動態／薬力学（PK/PD）解析を実施した。1 日あたりの非結合型血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_u）の推定値と試験終了時点における T/C_{weight} が強い相関を示し、この相関関係は 1 日 1 回投与群及び 1 日 2 回投与群では認められたが、隔日投与群では認められなかった。EGFR の不可逆的阻害薬であるオシメルチニブは、EGFR の新規合成により薬力学的半減期が約 27 時間となるために連日投与が必要である[7]ことからも、この解析結果は支持される。

ヒトにおける有効曝露量を検討するために、1 日 1 回投与群及び 1 日 2 回投与群から得られた AUC_u 及び T/C_{weight} のデータを用いて、次式より曝露反応モデル〔薬物に起因する最大効果（E_{max}）〕を構築した（図 2.6.2.2- 14）。I_{max} は最大腫瘍増殖阻害作用を、$IAUC50_u$ は I_{max} の 50%に達する AUC_u を、γ は PK/PD 関係の傾きを示す。

$$T/C = 1 - I_{max} \times AUC_u^{\gamma}/(IAUC50_u^{\gamma}+AUC_u^{\gamma})$$

図 2.6.2.2- 14　SCCNC4 マウスモデルにおける曝露量－反応曲線



Estimated exposure–response relation for all QD and BID treatment groups in the efficacy arm of the SCCNC4 human HNSCC xenograft model in mice. T/C_{weight} = Treatment/Control ratio calculated from mean tumor wet weights on day of study termination. QD = once daily. BID = twice daily. 4.2.1.1.10, PH-42101.

上記の E_{max} モデルを基に推定されたパラメーターの平均推定値と変動係数を表 2.6.2.2- 7 に示す。

表 2.6.2.2- 7　曝露－反応関係の推定パラメーター値

Parameter	Unit	Mean Estimate	CV%
$IAUC50_u$	nM·h	161	16
γ	1	1.2	26
Imax	1	0.88	5.8

Estimated parameter values of exposure–response relation. I_{max}: the maximal tumor growth inhibition achievable. $IAUC50_u$: AUC_u resulting in half-maximal tumor growth inhibition. γ: the slope factor. 4.2.1.1.10, PH-42101.

E_{max} モデルに基づき、最大腫瘍増殖抑制率の 80%に達するために必要な 1 日あたりの非結合型曝露量（$IAUC80_u$）を算出した。このときの T/C_{weight} は 0.3 に相当し、$IAUC80_u$ は 500nmol/L･h（242 μg･h/L）と推定される。SCCNC4 移植マウスモデルでは 1 日あたりの投与量が 10mg/kg 以上で

$IAUC80_u$ に達した。よって、ヒトにおける 1 日あたりの有効曝露量の目標値として 500nmol/L･h（242μg･h/L）を設定した（2.7.2.3.4.1）。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 オフターゲット作用

BAY 2927088 の酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験を実施し（2.6.2.3.1.1）、有意な相互作用が認められた標的についてはフォローアップ試験（2.6.2.3.1.2）を実施した。

2.6.2.3.1.1 酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験

参照項目：4.2.1.2.1 R-13832

放射性リガンド結合試験及び酵素分析試験により、合計 76 種類の G タンパク質共役受容体、核内受容体、イオンチャネル及びトランスポーターを含むオフターゲットに対する 10μmol/L BAY 2927088 の作用を検討した（n＝2）。受容体に対する影響は放射性リガンド結合試験で、酵素活性に対する影響は酵素分析試験で評価を行い、50%以上の阻害作用若しくは刺激作用が認められた場合を「有意な相互作用」と判定した。

BAY 2927088 は、72 種類の標的について、10μmol/L の濃度までオフターゲットに対する有意な相互作用（≧50%）は認められなかった。10μmol/L の BAY 2927088 はヒトアデノシン A1 受容体（94%）、ヒトアデノシン A3 受容体（87%）、ヒトモチリン（80%）及びヒト PDE4D2（70%）に対して有意な相互作用を示した。

2.6.2.3.1.2 フォローアップ試験

参照項目：4.2.1.2.2 R-13833
4.2.1.2.3 R-13933

BAY 2927088 の酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験（2.6.2.3.1.1）で有意な相互作用が認められた 4 種類について、フォローアップ試験として酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験を実施した（n＝2）。更に、ヒトアデノシン A1 受容体及びヒトモチリンについては機能的な相互作用を評価するために、それぞれ GTPγS 結合試験及び細胞内カルシウム動員試験を実施した。酵素分析試験、放射性リガンド結合試験及び GTPγS 結合試験では 0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10μmol/L の BAY 2927088 を、細胞内カルシウム動員試験では 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10μmol/L の BAY 2927088 を添加して IC_{50} 値及び K_i 値を算出した。

放射性リガンド結合試験におけるアデノシン A1 受容体、アデノシン A3 受容体及びモチリンの K_i 値は、それぞれ 0.52、1.03 及び 1.32μmol/L であった。酵素分析試験におけるヒト PDE4D2 の IC_{50} 値は 2.77μmol/L であった。更に、GTPγS 結合試験におけるアデノシン A1 受容体の IC_{50} 値は 4.3μmol/L、及び細胞内カルシウム動員試験におけるモチリンの IC_{50} 値は 4.9μmol/L であり、BAY 2927088 はいずれの標的に対しても機能的拮抗作用を示した。オフターゲット作用が認められた標的タンパクの K_i 値又は IC_{50} 値は、試験 21607 で BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ の 6 倍以上であった。

2.6.2.3.2 キナーゼに対する特異性

参照項目：4.2.1.2.4 R-13813

BAY 2927088 のキナーゼに対する特異性は [redacted] 社の [redacted] パネルを用いて、合計 373 種類のキナーゼに対する BAY 2927088 の作用を検討し特異性を評価した。

1μmol/L の BAY 2927088 は EGFR、HER2 及び HER4 の 3 種類を含む 18 種類のヒトキナーゼに対して 80%以上の阻害作用を示した。

2.6.2.3.3 心筋イオンチャネルに対する作用

2.6.2.3.3.1 遺伝子導入 HEK 及び CHO 細胞

参照項目：4.2.1.2.5 PH-42086

心臓の脱分極に関与する hNav1.5、並びに心臓の再分極に関与する hERG チャネル、hCav1.2、hKvLQT1 及び hKir2.1 に対する BAY 2927088 の影響を評価した。

hNav1.5、hERG、hKvLQT1 又は hKir2.1 を遺伝子導入した human embryonic kidney (HEK) 293 細胞株及び hCav1.2 を遺伝子導入した Chinese hamster ovary (CHO) 細胞株に BAY 2927088 を添加した。hERG に対する影響を評価した試験では 0.1、1.0 及び 10μmol/L の BAY 2927088 を、それ以外のチャネルに対する影響を評価した試験では 10μmol/L の BAY 2927088 を添加した。それぞれの陽性対照は、キニジン (hERG) 、ニフェジピン (hCav1.2) 、HMR-1556 (hKvLQT1) 及びバリウム塩 (hKir2.1) とした。BAY 2927088 及び陽性対照群を灌流し、ホールセルパッチクランプ法を用いて各種電流を測定した。同一の実験手法で実施した 4～10 試験のデータを基に IC_{50} 値の平均値を算出した。

BAY 2927088 は hERG チャネルに対して阻害作用を示し、IC_{50} 値は 2.2μmol/L であった。それ以外のチャネル (hNav1.5、hCav1.2、hKvLQT1 及び hKir2.1) に対しては 10μmol/L の濃度で阻害作用が認められなかった。hERG チャネルの IC_{50} 値は、試験 21607 で BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ の 26 倍であった。

2.6.2.3.3.2 ランゲンドルフ灌流心臓

参照項目：4.2.1.2.6 PH-42110

11 週齢の雌性ウサギ (Crl:CHB、Chinchilla bastard、2.2～2.7kg) の 7 例より摘出した心臓をランゲンドルフ灌流システムに装着後、36℃の酸素化 (95%O_2 及び 5%CO_2) された Krebs-Henseleit 溶液を用いて灌流した。生理学的なモニタリングのためにランゲンドルフ心臓の右心房に電気刺激を与えるセンサー、左心房及び左心室に単相動作電位信号を捉えるセンサー、左心室に心電図 (大動脈から左心室間) を取得するセンサー及び左心室圧を測定するためのバルーンを装着した。灌流開始 60 分後、BAY 2927088 を段階的に増加させる濃度 (0.1、1 及び 10μmol/L) で添加を開始し、各濃度 20 分間灌流した後に 30 分間灌流液で洗い流した。心拍数、左室圧及び心電図間隔などを測定した。

BAY 2927088 は 1μmol/L まで血行動態や心電図パラメーターに影響を及ぼさなかった。その一方で、10μmol/L では左心室圧及び収縮能の低下が認められ、心電図パラメーターである QTcF 短縮及び QRS 延長も認められた。試験 21607 で BAY 2927088 20mg を 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ の 118 倍に相当する濃度 (10μmol/L) で影響が認められた一方で、12 倍に相当する濃度 (1μmol/L) では影響が認められなかった。

2.6.2.3.4 代謝物

2.6.2.3.4.1 オフターゲット作用

主要代謝物である BAY 3306572 のオフターゲット作用を評価するために、酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験を実施し（2.6.2.3.4.1.1）、有意な相互作用が認められた標的についてはフォローアップ試験（2.6.2.3.4.1.2）を実施した。

2.6.2.3.4.1.1 酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験

参照項目：4.2.1.2.7 R-14379

放射性リガンド結合試験及び酵素分析試験により、合計 77 種類の G タンパク質共役受容体、核内受容体、イオンチャネル及びトランスポーターを含むオフターゲットに対する 10μmol/L BAY 3306572 の作用を検討した（n＝2）。受容体に対する結合については放射性リガンド結合試験を、酵素活性に対する影響については酵素分析試験を実施し、50%以上の阻害作用若しくは刺激作用が認められた場合を「有意な相互作用」と判定した。

BAY 3306572 は、68 種類の標的について、10μmol/L の濃度までオフターゲットに対する有意な相互作用（≧50%）は認められなかった。ヒト COX-1（52%）、ヒト COX-2（74%）、ヒト 15-LOX-2（115%）、ヒト PDE4D2（66%）、ヒトアデノシン A1 受容体（95%）、ヒトアデノシン A2A 受容体（68%）、ヒトアデノシン A3 受容体（104%）、ヒト 5-ヒドロキシトリプタミン 2B 受容体（5-HT_{2B}、53%）及びヒトアデノシントランスポーター（70%）に対して有意な相互作用を示した。

2.6.2.3.4.1.2 フォローアップ試験

参照項目：4.2.1.2.8 B002421

BAY 3306572 の酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験（2.6.2.3.4.1.1）で有意な相互作用が認められた標的のうち、10μmol/L で 70%以上のオフターゲット作用が認められたヒト COX-2、ヒト 15-LOX-2、ヒトアデノシン A1 受容体、ヒトアデノシン A3 受容体及びヒトアデノシントランスポーター、並びにオフターゲット作用によって中枢神経系に影響を与える可能性があるヒト 5-HT_{2B} の 6 種類についてフォローアップ試験を実施した。COX-2、15-LOX-2 及び 5-HT_{2B} は酵素分析試験を、アデノシントランスポーターはアデノシン取り込み試験を、アデノシン A1 受容体及びアデノシン A3 受容体では GTPγS 結合試験を実施した。5-HT_{2B} 以外の標的に対する酵素分析試験、アデノシン取り込み試験及び GTPγS 結合試験では 0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10μmol/L の BAY 3306572 を、5-HT_{2B} の酵素分析試験では 0.1、0.3、1、3、10 及び 30μmol/L の BAY 3306572 を添加して IC_{50} 値を算出した（n＝2）。

COX-2、15-LOX-2 及びアデノシントランスポーターの IC_{50} 値は、それぞれ 2.2、0.25 及び 0.46 μmol/L であった。更に、アデノシン A1 受容体及びアデノシン A3 受容体の IC_{50} 値は、4.0 及び 2.7μmol/L であり、BAY 3306572 はいずれの標的に対しても機能的拮抗作用を示した。なお、5-HT_{2B} では検討したすべての用量で≧50%の阻害作用は認められず、IC_{50} 値も算出できなかった。

2.6.2.3.4.2 心筋イオンチャネルへの作用

2.6.2.3.4.2.1 遺伝子導入 HEK 及び CHO 細胞

参照項目：4.2.1.2.9 B002455

心筋イオンチャネルに対する BAY 3306572（10μmol/L）の影響を評価した。本試験では BAY 2927088 で検討した細胞株と同じ細胞株（hKvLQT1 は CHO 細胞株に遺伝子導入）を用いて同様の試験を実施した（2.6.2.3.3.1）。それぞれの陽性対照は、キニジン（hERG 及び hNav1.5）、ニフェジピン（hCav1.2）、HMR-1556（hKvLQT1）及びバリウム塩（hKir2.1）とした。同一の実験手法で実施した 3～6 試験のデータを基に IC_{50} 値の平均値を算出した。

BAY 3306572 は hERG 電流に対して阻害作用を示し、IC_{50} 値は 3.5μmol/L であった。それ以外のチャネル（hNav1.5、hCav1.2、hKvLQT1 及び hKir2.1）に対しては 10μmol/L の濃度で阻害作用が認められなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

BAY 2927088 が生命維持に重要な器官系（中枢神経系、心電図所見を含む心血管系、呼吸器系）に及ぼす影響について、複数の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。ICH S7A、ICH S7B 及び ICH S9 ガイドラインに従い GLP に準拠した、独立した安全性薬理試験を実施すると共に、ラットの 4 週間反復投与毒性試験に安全性薬理エンドポイント（呼吸器系及び中枢神経系）を組み込んで実施した。

2.6.2.4.1 *In vitro* 試験

2.6.2.4.1.1 hERG チャネルに及ぼす影響

参照項目：4.2.1.3.1 R-13892
4.2.1.3.2 R-13864

hERG チャネルを遺伝子導入した CHO-K1 細胞株を用い、BAY 2927088 のヒトカリウムチャネルに及ぼす影響を検討した。hERG 遺伝子導入 CHO-K1 細胞株（4 細胞／群）を用い、BAY 2927088 を 0.073、0.81 及び 8.57μmol/L の濃度（名目濃度：0.1、1.0 及び 10μmol/L）で灌流し、ホールセルパッチクランプ法により hERG 介在性外向きテール電流を測定した。対照灌流群として、媒体灌流群及び陽性対照灌流群（3μmol/L のシサプリド）を灌流した。BAY 2927088 灌流群、媒体灌流群及び陽性対照灌流群の媒体は、いずれも DMSO（0.1％、v/v）及びウシ血清アルブミン（0.01％、w/v）を含有するダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を用いた。hERG チャネルの阻害率は平均値±標準誤差で示す。

0.81 及び 8.57μmol/L 添加群における hERG チャネル阻害率は、それぞれ 20.4±3.4％及び 83.8±4.1％であったことから、hERG チャネルに対する阻害作用が認められた。hERG チャネルに対する IC_{50} 値は 2.4μmol/L と算出された。更に、IC_{50} 値の 1/30 を無影響量と仮定すると無影響量は 80nmol/L と推定され、この無影響量は試験 21607 で BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ と同程度であった。

なお、陽性対照群では hERG チャネルに対する既知の薬理作用と同様に阻害作用が認められたことから、当該試験系の感度が確認された。

2.6.2.4.2 *In vivo* 試験

2.6.2.4.2.1 イヌの心血管系機能に及ぼす影響

参照項目：4.2.1.3.3 R-13898
4.2.1.3.4 R-14051

覚醒下でテレメーターを装着した1歳8ヵ月齢の雄性ビーグルイヌ（体重：9.4～10.5kg、4例／群）の動脈圧、左心室圧、心拍数及び心電図に対してBAY 2927088が及ぼす影響を検討した。媒体〔10%エタノール、50%ポリエチレングリコール（PEG）400、40%蒸留水、pH4.0〕、並びにBAY 2927088（媒体：10%エタノール、50%PEG400、40%蒸留水、pH4.0）を2、5及び15mg/kgの用量で単回経口投与した。各個体の投与順序はラテン方格法を用いて決定し、1、4、8及び11日目にそれぞれ投与した。更に、BAY 2927088の血中濃度測定のため、投与後1、4及び24時間で採血を行った。なお、BAY 2927088投与群については、1.0mg/mL（2mg/kg投与群）、2.5mg/mL（5mg/kg投与群）及び7.5mg/mL（15mg/kg投与群）のBAY 2927088をいずれも2.0mL/kgの容量で投与し、対照群についても 2.0mL/kg の容量で投与した。動脈圧、左心室圧、心拍数及び心電図（PR間隔、QRS間隔及びQT/QTc間隔）は投与前2時間から投与後24時間まで継続して測定を実施した。統計学的解析は、各パラメーターについて反復測定分散分析を用い、更に、媒体投与群とBAY 2927088投与群の比較はStudent's t検定で評価した。

BAY 2927088を単回経口投与後の最高血漿中薬物濃度（C_{max}）は投与後1時間で到達し、それぞれ0.335mg/L（2mg/kg投与群）、1.33mg/L（5mg/kg投与群）及び5.49mg/L（15mg/kg投与群）であった。この時の非結合型薬物の最高血漿中濃度（$C_{max,u}$）はそれぞれ65nmol/L、257nmol/L及び1062nmol/Lであった〔イヌのf_u：9.38%、分子量：484.9g/mol〕。

15mg/kgまでの投与用量において、動脈圧、左心室圧、心拍数及び心電図（PR間隔及びQRS間隔）を指標とした心血管系機能に対して、BAY 2927088に関連した影響又は投与用量に依存した影響は認められなかった。15mg/kgの投与量では、投与後1.5～4時間で、媒体投与群と比較して統計学的に有意なQTc間隔の延長が認められた（平均 8.6ms、$p<0.05$）。このときの$C_{max,u}$（1062nmol/L）は、試験21607でBAY 2927088 20mgを患者に1日2回投与後の$C_{max,u}$の12倍であった。

2.6.2.4.2.2 ラットの呼吸器系機能に及ぼす影響（単回経口投与）

参照項目：4.2.1.3.5 PH-42756

覚醒下で10～14週齢の雌性ラット（HsdCpb:WU、体重206～274g、8例／群）の呼吸数、一回換気量及び分時換気量に対してBAY 2927088が及ぼす影響を検討した。BAY 2927088（媒体：10%エタノール、40%Kolliphor HS15、50%蒸留水、pH4.0）を5、15及び45mg/kgの用量で単回経口投与した。対照群には媒体（10%エタノール、40%Kolliphor HS15、50%蒸留水、pH4.0）を投与した。更に、BAY 2927088の血中濃度及び脳中濃度の測定を実施するサテライト群〔6例／群（2グループに分け3例／グループ）〕を設定し、同用量のBAY 2927088を投与した。投与後1時間（グループ1：3例／群）、そして投与後2、4、7及び24時間で採血（グループ2：3例／群）を行い、脳組織は投与後1時間（グループ1）及び24時間（グループ2）で採取した。BAY 2927088投与群については、0.5mg/mL（5mg/kg投与群）、1.5mg/mL（15mg/kg投与群）及び4.5mg/mL（45mg/kg投与群）のBAY 2927088をいずれも10mL/kgの容量で投与し、対照群についても10mL/kgの容量で投与した。動物の呼吸数、一回換気量及び分時換気量は投与後24時間まで全身プレチスモグラフィーチャンバー内で計測した。統計学的解析は線形混合モデルを用いてデータ分析後、不等分散を考慮したDunnett's t-testの多重比較検定を行った。

BAY 2927088を単回経口投与後のC_{max}は、それぞれ404μg/L（5mg/kg投与群）、1350μg/L（15mg/kg投与群）及び4320μg/L（45mg/kg投与群）であった。このときの$C_{max,u}$（雌性ラットのf_u：9.97%）はそれぞれ83nmol/L、278nmol/L及び888nmol/Lであった。脳ホモジネート中のBAY 2927088の平均最大濃度は低く、脳／血漿間薬物濃度比が3.5%～4.8%であったことから、脳移行性は低いことが示唆される。

BAY 2927088 は、いずれの用量でも呼吸数、一回換気量及び分時換気量を指標とした呼吸器系機能に対して影響を及ぼさなかったことから、呼吸器系機能に対する無影響量は 45mg/kg であると考えられる。45mg/kg 投与後の $C_{max,u}$（888nmol/L）は試験 21607 で BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ の 10 倍であった。

2.6.2.4.2.3 ラットの呼吸器系機能に及ぼす影響（4 週間反復投与毒性試験）

参照項目：4.2.3.2.3 PH-42111

ラットの呼吸器系機能に及ぼす影響を 4 週間反復投与毒性試験に組み込んで評価した。

覚醒下で 7 週齢の雌雄ラット〔Crl:WI(Han)、体重：200～239g（雄）及び 135～175g（雌）、いずれも 10 例／群〕の呼吸器系機能に BAY 2927088 が及ぼす影響を検討した。BAY 2927088（媒体：10%エタノール、40%Kolliphor HS15、50%蒸留水、pH4.0）を 5、10 及び 15mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。対照群には媒体（10%エタノール、40%Kolliphor HS15、50%蒸留水、pH4.0）を投与した。BAY 2927088 投与群については、0.5mg/mL（5mg/kg 投与群）、1.0mg/mL（10mg/kg 投与群）及び 1.5mg/mL（15mg/kg 投与群）の BAY 2927088 をいずれも 10mL/kg の容量で投与し、対照群についても 10mL/kg の容量で投与した。ラットの一般症状観察（呼吸状態）は投与前及び投与後 60～90 秒に実施した。

BAY 2927088 は、いずれの用量でも投与 2 日目まで一般症状観察（呼吸状態）を指標とした呼吸器系機能に対して影響を及ぼさなかった。15mg/kg 投与後の $C_{max,u}$ は 126nmol/L（雄）及び 286nmol/L（雌）であり、これらの $C_{max,u}$ は試験 21607 で BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ の 1.5 倍（雄）及び 3.4 倍（雌）であった。

2.6.2.4.2.4 ラットの中枢神経系機能に及ぼす影響（単回経口投与）

参照項目：4.2.1.3.6 PH-42619

覚醒下で 10～12 週齢の雌性ラット（HsdCpb:WU、体重 208～254g、6 例／群）の一般症状観察、自発運動量及び体温に対して BAY 2927088 が及ぼす影響を検討した。BAY 2927088（媒体：10%エタノール、40%Kolliphor HS15、50%蒸留水、pH4.0）を 5、15 及び 45mg/kg の用量で単回経口投与した。媒体投与群には媒体（10%エタノール、40%Kolliphor HS15、50%蒸留水、pH4.0）を投与した。BAY 2927088 投与群については、0.5mg/mL（5mg/kg 投与群）、1.5mg/mL（15mg/kg 投与群）及び 4.5mg/mL（45mg/kg 投与群）の BAY 2927088 をいずれも 10mL/kg の容量で投与し、媒体投与群についても 10mL/kg の容量で投与した。

ラットの一般症状観察及び体温は投与前、投与後 1、2、4、7 及び 24 時間に実施し、オープンフィールドにおける自発運動量（移動距離、安静時間及び立ち上がり行動）の測定は投与後 1 及び 24 時間に実施した。体温及びオープンフィールドにおける自発運動量の統計学的解析は二元配置分散分析に続き Duncan の多重比較検定法で評価した。

BAY 2927088 は、45mg/kg まで一般症状に対して影響を及ぼさなかった。BAY 2927088 投与群及び媒体投与群いずれにおいても軟便が認められ、これは媒体に関連した影響と考えられる。更に、15mg/kg 投与群の 1 例で興奮及び驚愕反応が、5 及び 45mg/kg 投与群の 1 例で尿量の増加が認められたが、偶発的な所見であり、BAY 2927088 投与に関連した影響ではないと考えられる。

BAY 2927088 は、45mg/kg まで自発運動量の指標である移動距離及び安静時間に対して影響を及ぼさなかった。その一方で、15mg/kg 投与群及び 45mg/kg 投与群では、媒体投与群と比較して投与後 1 時間の立ち上がり回数が有意に増加した（$p < 0.05$）。15mg/kg 投与後の $C_{max,u}$

（278nmol/L）は、試験 21607 で BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ の 3 倍であった。

更に、45mg/kg 投与群では、媒体投与群と比較して投与後 1 時間の体温が有意に低下した（$p<0.05$）。これは、BAY2927088 投与前後の体温の変化量が、媒体投与前後の体温変化量と比較して有意に大きかったことからも明らかである（$p<0.05$）。このときの $C_{max,u}$（888nmol/L）は試験 21607 で BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ の 10 倍であった。

したがって、立ち上がり回数が BAY 2927088 15mg/kg 以上の投与群で有意に増加したことから、中枢神経系機能に対する BAY 2927088 の無影響量は 5mg/kg であると考えられる。

2.6.2.4.2.5　ラットの中枢神経系機能に及ぼす影響（4 週間反復投与毒性試験）

参照項目：4.2.3.2.3 PH-42111

ラットの中枢神経系機能に及ぼす影響を 4 週間反復投与毒性試験に組み込んで評価した。

呼吸器系機能を評価した同一の雌雄ラットを用いて、同様の投与経路、投与用量及び容量で（2.6.2.4.2.3）、一般症状観察（姿勢及び排泄など）及びオープンフィールド行動観察を実施した。ラットの一般症状観察は、投与期間中は各投与日に投与前及び投与後 60～90 秒の計 2 回実施し、回復期間中は 1 日 1 回のケージ内観察に加えて週 1 回の詳細な観察を実施した。オープンフィールド行動観察は初回投与前に実施し、その後は投与期間及び回復期間を通じて週 1 回実施した。

BAY 2927088 はいずれの投与量においても投与 2 日目まで一般症状観察及びオープンフィールド行動観察を指標とした中枢神経系機能に対して影響を及ぼさなかった。15mg/kg 投与後の $C_{max,u}$ は試験 21607 で BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ の 1.5 倍（雄）及び 3.4 倍（雌）であった。

3 日目以降では、特に 15mg/kg を投与した雌性ラットにおいて、立毛、しゃがみ込み姿勢、活動性の亢進及び高足歩行が認められたが、これらの症状は最大耐量（MTD）を超えたことによる非特異的な毒性所見であると考えられる。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

効力を裏付ける試験

BAY 2927088 の有効性を検討するために、BAY 2927088 の標的キナーゼに対する阻害作用を *in vitro* 試験では生化学的アッセイ、細胞増殖阻害アッセイ及び細胞機能アッセイを用いて評価し、更に *in vivo* 試験では *HER2* 遺伝子変異陽性及び *EGFR* 遺伝子変異陽性の腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果を評価した。

生化学的アッセイにおいて、BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子野生型及び *EGFR* 遺伝子変異のキナーゼに対して阻害作用を示した。

HER2 遺伝子変異及び *EGFR* 遺伝子変異を導入した Ba/F3 細胞株を用いた細胞増殖阻害アッセイにおいて、BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異及び *HER2* 遺伝子の点変異を導入した Ba/F3 細胞株に対して、細胞増殖阻害作用を示した。更に、BAY 2927088 は共有結合型 HER2 阻害薬に対する耐性変異である *HER2* C805S 変異が *HER2* 遺伝子変異と共存するがん細胞に対しても、細胞増殖阻害作用を示すことが明らかになった。同様の試験系において、BAY 2927088 は *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異、古典的 *EGFR* 遺伝子変異（*EGFR* 遺伝子 ex19del 変異及び *EGFR* L858R 変異）及び *EGFR* 獲得耐性遺伝子変異陽性に対しても細胞増殖阻害作用を示した。*EGFR* 遺伝子野生型の IC_{50} 値は、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異の IC_{50} 値の 8～47 倍及び 1381 倍であった。よって、BAY 2927088 は *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び古典的 *EGFR* 遺伝子変異陽性のがん細胞に対して選択的に細胞増殖阻害作用を示すことが明らかになった。更に、内在性の *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性がん細胞株（SCCNC4）及び *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異陽性がん細胞株（PC-9 及び HCC827）を用いた試験においても、*EGFR* 遺伝子野生型のがん細胞株と比べて高い細胞増殖阻害作用が認められた。細胞増殖阻害作用で使用したがん細胞株を用いて、BAY 2927088 による EGFR のリン酸化阻害作用を検討した。その結果、*EGFR* 遺伝子野生型と比べて *EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性がん細胞株及び *EGFR* 遺伝子 ex19del 変異陽性がん細胞株に対して選択的にリン酸化阻害作用を示した。

In vivo 試験において、BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異陽性、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性、古典的 *EGFR* 遺伝子変異陽性及び *EGFR* 獲得耐性遺伝子変異陽性患者由来がん組織移植片又はがん細胞株を移植したマウスモデルに対して抗腫瘍効果を示した。これらの抗腫瘍効果は *EGFR* 遺伝子野生型のがん細胞株を移植したマウスモデルと比較しても強かったことから、*in vitro* 試験で認められた *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異及び *EGFR* 遺伝子変異に対する BAY 2927088 の選択性は *in vivo* 試験においても確認できた。更に、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異陽性のがん細胞株（SCCNC4）を移植したマウスモデルにおいて、*in vitro* 試験と同様に、BAY 2927088 による EGFR のリン酸化阻害作用も顕著に認められた。

EGFR 遺伝子変異又は *HER2* 遺伝子変異を導入した Ba/F3 細胞株の増殖阻害アッセイにおいて、BAY 3306572 は弱い細胞増殖阻害作用を示した。*HER2* 遺伝子変異及び *EGFR* 遺伝子変異に対する BAY 3306572 の細胞増殖阻害作用は BAY 2927088 の 1/15～1/6 と考えられる（2.6.2.2.1.5.1）。更に、*EGFR* 遺伝子変異陽性又は *HER2* 遺伝子変異陽性 NSCLC 患者に BAY 2927088 40mg の錠剤を投与したときの BAY 2927088 及び BAY 3306572 の AUC_u（試験 21607）は、それぞれ 994nmol・h/L（総 AUC：21100nmol・h/L、f_u：4.71%）及び 248nmol・h/L（総 AUC：13400 nmol・h/L、f_u：1.85%）であった（表 2.6.4.5-9）ことからも、臨床において BAY 3306572 の抗腫瘍効果に対する寄与は限定的であると推察される。

SCCNC4 移植マウスモデルを用いて薬物動態／薬力学（PK/PD）解析を実施した結果、ヒトにおける 1 日あたりの有効曝露量は 500nmol/L･h（242μg･h/L）と推定され、ヒト目標曝露量として設定した（2.7.2.3.4.1）。

一連の効力を裏付ける試験成績から、BAY 2927088 は *HER2* 遺伝子 ex20ins 変異、*HER2* 遺伝子の点変異、*EGFR* 遺伝子 ex20ins 変異及び古典的 *EGFR* 遺伝子変異陽性のがん細胞に対して、標的キナーゼを阻害することで細胞増殖を抑制し、抗腫瘍効果を示すことが示唆される。更に、BAY 2927088 は *in vitro* 及び *in vivo* 試験の成績より *EGFR* 遺伝子野生型と比較して *EGFR* 遺伝子変異及び *HER2* 遺伝子変異に対して選択性を示すことから、非選択性 EGFR チロシンキナーゼ阻害薬で一般的に認められるオンターゲット作用に関連した副作用のリスクが低減される可能性がある。

副次的薬理試験

BAY 2927088 及び BAY 3306572 のオフターゲット作用を評価するために、酵素分析試験及び放射性リガンド結合試験を実施した。更に、有意な相互作用が認められた標的についてはフォローアップ試験を実施し、IC_{50} 値又は K_i 値を評価した。BAY 2927088 はヒトアデノシン A1 受容体〔K_i 値：0.52μmol/L（放射性リガンド結合試験）、IC_{50} 値：4.3μmol/L（GTPγS 結合試験）〕、ヒトアデノシン A3 受容体〔K_i 値：1.03μmol/L（放射性リガンド結合試験）〕、ヒトモチリン〔K_i 値：1.32μmol/L（放射性リガンド結合試験）、IC_{50} 値：4.9μmol/L（細胞内カルシウム動員試験）〕及びヒト PDE4D2〔IC_{50} 値：2.77μmol/L（酵素分析試験）〕に対してオフターゲット作用を示した。BAY 3306572 はヒト COX-2〔IC_{50} 値：2.2μmol/L（酵素分析試験）〕、ヒト 15-LOX-2〔IC_{50} 値：0.25μmol/L（酵素分析試験）〕、ヒトアデノシントランスポーター〔IC_{50} 値：0.46μmol/L（アデノシン取り込み試験）〕、ヒトアデノシン A1 受容体〔IC_{50} 値：4.0μmol/L（GTPγS 結合試験）〕及びヒトアデノシン A3 受容体〔IC_{50} 値：2.7μmol/L（GTPγS 結合試験）〕に対して、オフターゲット作用を示した。

BAY 2927088（1μmol/L）のキナーゼに対する特異性を [redacted] 社の [redacted] パネルを用いて評価した結果、EGFR、HER2 及び HER4 の 3 種類を含む 18 種類のヒトキナーゼに対して 80%以上の阻害作用を示した。

心筋イオンチャネル（hERG チャネル、hNav1.5、hCav1.2、hKvLQT1 及び hKir2.1）に及ぼす影響を評価した結果、BAY 2927088 及び BAY 3306572 は、いずれも hERG チャネル阻害作用を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 2.2 及び 3.5μmol/L であった。なお、hERG チャネル以外のチャネルに対しては、BAY 2927088 及び BAY 3306572 のいずれも阻害作用を示さなかった。ウサギのランゲンドルフ灌流心臓を用いた *ex vivo* 試験において、BAY 2927088 は 1μmol/L まで血行動態や心電図パラメーターに影響を及ぼさなかった。その一方で、10μmol/L では左心室圧及び収縮能の低下が認められ、心電図パラメーターである QTcF 短縮及び QRS 延長も認められた。

副次的薬理試験成績より、BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$（85nmol/L）において、BAY 2927088 は選択性を示すと考えられる。なお、BAY 2927088 を 40mg/日（液剤）で反復経口投与した探索試験（試験 21607）において、BAY 3306572 の $C_{max,u,ss}$ は 18.5nmol/L（f_u：1.85%）であった（表 2.6.4.5-10）。

安全性薬理試験

BAY 2927088 が生命維持に重要な器官系（中枢神経系、心電図所見を含む心血管系、呼吸器系）に及ぼす影響について、複数の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。ICH S7A、ICH S7B 及び ICH S9 ガイドラインに従い GLP に準拠し、*in vivo* 試験ではラット及びイヌの単回経口投与試験（イヌを用いた試験では媒体及び BAY 2927088 の 3 用量をラテン方格法により投与）を実施する

と共に、ラットの 4 週間反復投与毒性試験に安全性薬理エンドポイント（呼吸器系及び中枢神経系）を組み込んで実施した。

単回経口投与試験において、ラットでは BAY 2927088 の投与に関連した中枢神経系機能（一般症状観察、体温及び自発運動量）及び呼吸器系機能（呼吸数、一回換気量及び分時換気量）に対して生理学的に問題となる急性の影響は認められなかった。また、イヌにおいても、BAY 2927088 投与に関連した心血管系機能〔動脈圧、左心室圧、心拍数及び心電図（PR 間隔及び QRS 間隔）〕に対して生理学的に問題となる急性の影響は認められなかった。

ラットの 4 週間反復投与毒性試験において、BAY 2927088 投与に関連した中枢神経系機能（一般症状観察及びオープンフィールド行動観察）及び呼吸器系機能（呼吸状態）に対して投与 2 日目まで生理学的に問題となる急性の影響は認められなかった。

ヒトにおける QT 間隔延長リスクを検討した安全性薬理試験において、BAY 2927088 は hERG チャネルを阻害し、このときの IC_{50} 値（2.4μmol/L）は、副次的薬理試験で得られた IC_{50} 値（2.2μmol/L）と近似していた。更に、無影響量を IC_{50} 値の 1/30 と仮定すると、無影響量は 80nmol/L と推定された。また、イヌを用いた単回経口投与試験では 15mg/kg の投与量で有意な QTc 間隔の延長が認められた。イヌに 15mg/kg 投与後の $C_{max,u}$（1062nmol/L）は、BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$（85nmol/L）の 12 倍であったが、hERG チャネルの無影響量（80nmol/L）は BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の $C_{max,u}$ と同程度であった。

安全性薬理試験成績より、BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与した際に、生命維持に重要な器官系機能（中枢神経系、心電図所見を含む心血管系、呼吸器系）に対して生理学的に問題となる急性の影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。QT 間隔延長については BAY 2927088 20mg を患者に 1 日 2 回投与後の血漿中濃度以上で認められる可能性があるため、臨床でのモニタリングが推奨される。なお、試験 21607 において、血漿中濃度－QTc 解析を含む心機能の安全性を評価した結果、BAY 2927088 20mg を 1 日 2 回、21 日間反復投与後に臨床的に重要な QTc 間隔延長の兆候は認められなかった。よって、臨床において QTc 間隔延長に関連する心血管イベントのリスクは最小限又は許容可能であると考えられる（2.7.2.2.3.3）。

2.6.2.7　図表

図表は本文中に記載した。

引用文献一覧

1) Wilding B et al., Nat Cancer 2022:3:821-836
2) Vyse S et al., Signal Transduct Target Ther 2019:4:5
3) Arcila ME et al., Mol Cancer Ther 2013:12:220-229
4) Su J et al., Oncotarget 2017:8:111246-111257
5) Leonetti A et al., Br J Cancer 2019:121:725-737
6) Passaro A et al., Nat Cancer 2021:2:377-391
7) Yates JWT et al., Mol Cancer Ther 2016:15:2378-2387

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表

試験一覧表は、2.6.3.2、2.6.3.3、2.6.3.4 及び 2.6.3.5 を参照。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article： BAY 2927088**,** BAY 3306572 (M1 of BAY 2927088)

Primary Pharmacodynamics – Overview

Type of Study/Description	**GLP**	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number Location in CTD (Report ID)**
In vitro					
Inhibition of EGFR kinase activity	No	*In vitro* biochemical activity on *EGFR*wt and mutant variants	*In vitro*	Bayer AG, Germany	4.2.1.1.1 (PH-42059)
Anti-proliferative activity in a Ba/F3 *HER2*mut cell line panel	No	Murine pro-B cell line panel, stably overexpressing human *HER2*wt or mutant variants thereof	*In vitro*	Bayer AG, Germany [redacted], Germany	4.2.1.1.2 (B003066)
Anti-proliferative activity in a Ba/F3 *EGFR*mut cell line panel	No	Murine pro-B cell line panel, stably overexpressing human *EGFR*wt, *HER2*wt or mutant variants thereof	*In vitro*	Bayer AG, Germany	4.2.1.1.3 (PH-42058)
Inhibition of proliferation in human *EGFR*mut tumor cell lines	No	Panel of human tumor cell lines with either *EGFR*wt or *EGFR* mutant background	*In vitro*	Bayer AG, Germany	4.2.1.1.4 (PH-42056)
Activity in cellular mechanistic studies: Inhibition of EGFR phosphorylation	No	Panel of human tumor cell lines with either *EGFR*wt or *EGFR* mutant background	*In vitro*	Bayer AG, Germany	4.2.1.1.5 (PH-42057)
Anti-proliferative activity of BAY 3306572 (M1 of BAY 2927088) in a Ba/F3 *EGFR*mut and *HER2*mut cell line panel	No	Murine pro-B cell line panel, stably overexpressing human *EGFR*wt, *HER2*wt or mutant variants thereof	*In vitro*	Bayer AG, Germany [redacted], Germany	4.2.1.1.6 (B003067)
Anti-proliferative activity of BAY2927088 in Ba/F3 cells carrying the C805S acquired resistance mutation	No	Murine pro-B cell line panel, stably overexpressing human *HER2*wt or mutant variants thereof	*In vitro*	Bayer AG, Germany Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA	4.2.1.1.14 (B004402)

Test Article： BAY 2927088**,** BAY 3306572 (M1 of BAY 2927088)

Primary Pharmacodynamics – Overview (Continued)

Type of Study/Description	**GLP**	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number Location in CTD (Report ID)**
In vitro					
Inhibition of HER2 phosphorylation and downstream signaling pathways	No	Human lung cancer cell line NCI-H1781 harboring *HER2* mutant variants	*In vitro*	Bayer AG, Germany	4.2.1.1.15 (Cancer Discov 2026:16:81-94)
In vivo					
Efficacy in the NSCLC PDx model CTG-2543 (*HER2* ex20insYVMA) in mice	No	CTG-2543 patient-derived subcutaneous xenograft on female Athymic Nude-*Foxn1^{nu}* mice	*In vivo* p.o. by gavage	[redacted]	4.2.1.1.7 (R-13868)
Efficacy in the NSCLC PDx model CTG-2842 (*EGFR* ex20insASV) in mice	No	CTG-2842 patient-derived subcutaneous xenograft on female Athymic Nude-*Foxn1^{nu}* mice	*In vivo* p.o. by gavage	[redacted]	4.2.1.1.7 (R-13868)
Efficacy in the NSCLC PDx model LU0387 (*EGFR* ex20insNPH) in mice	No	LU0387 patient-derived subcutaneous xenograft on female Balb/c nude mice	*In vivo* p.o. by gavage	[redacted]	4.2.1.1.8 (R-13870)
Efficacy in the head and neck cancer PDx model HNXF700 (*EGFR* ex20insNPH) in mice	No	HNXF700 patient-derived subcutaneous xenograft on female NOD/SCID mice	*In vivo* p.o. by gavage	[redacted]	4.2.1.1.9 (R-13869)
Efficacy in the NSCLC PDx model LXFE2478 (*EGFR* ex20insASV) in mice	No	LXFE2478 patient-derived subcutaneous xenograft on female NMRI nu/nu mice	*In vivo* p.o. by gavage	[redacted]	4.2.1.1.9 (R-13869)

Test Article： BAY 2927088**,** BAY 3306572 (M1 of BAY 2927088)

Primary Pharmacodynamics – Overview (Continued)

Type of Study/Description	**GLP**	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number Location in CTD (Report ID)**
In vivo					
Efficacy and PK/PD relationship of BAY 2927088 in the SCCNC4 (*EGFR* ex20insSVD) human HNSCC xenograft model in mice	No	SCCNC4 cell line-derived subcutaneous xenograft on female NMRI nu/nu mice	*In vivo* p.o. by gavage	Bayer AG, Germany	4.2.1.1.10 (PH-42101)
Efficacy in the PC-9 (*EGFR* ex19del) human NSCLC xenograft model in mice	No	PC-9 cell line-derived subcutaneous xenograft on female NMRI nu/nu mice	*In vivo* p.o. by gavage	Bayer AG, Germany	4.2.1.1.11 (PH-42104)
Efficacy in the Ba/F3-*EGFR* ex19del/C797S model of acquired resistance in mice	No	Ba/F3-*EGFR* ex19del/C797S cell line-derived subcutaneous xenograft on female NMRI nu/nu mice	*In vivo* p.o. by gavage	Bayer AG, Germany	4.2.1.1.12 (PH-42103)
Efficacy in the A431 (*EGFR*wt) human NSCLC xenograft model in mice	No	A431 cell line-derived subcutaneous xenograft on female CB17-SCID mice	*In vivo* p.o. by gavage	Bayer AG, Germany	4.2.1.1.13 (PH-42102)

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test Article： BAY 2927088**,** BAY 3306572 (M1 of BAY 2927088)

Secondary Pharmacodynamics – Overview

Type of Study/Description	**GLP**	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number Location in CTD (Report ID)**
In vitro					
Radioligand binding and enzyme assays	No	Various	*In vitro*	[redacted], Taiwan	4.2.1.2.1 (R-13832)
Radioligand binding, enzyme and functional assays	No	Various	*In vitro*	[redacted], Taiwan	4.2.1.2.2 (R-13833)
Cellular and nuclear receptor functional assays	No	Human recombinant CHO cells	*In vitro*	[redacted], France	4.2.1.2.3 (R-13933)
Kinase panel profiling	No	Various	*In vitro*	[redacted], France	4.2.1.2.4 (R-13813)
Whole-cell voltage-clamp assay: Interaction with human cardiac ion channels	No	Transfected HEK293 and CHO cells	*In vitro*	Bayer AG, Germany	4.2.1.2.5 (PH-42086)
Radioligand binding and enzyme assays [a]	No	Various	*In vitro*	[redacted], Taiwan	4.2.1.2.7 (R-14379)

[a] study conducted with BAY 3306572, the major human metabolite M1 of BAY 2927088

Test Article： BAY 2927088**,** BAY 3306572 (M1 of BAY 2927088)

Secondary Pharmacodynamics – Overview (Continued)

Type of Study/Description	**GLP**	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number Location in CTD (Report ID)**
In vitro					
Functional and enzyme assays [a]	No	Various	*In vitro*	[redacted], Taiwan	4.2.1.2.8 (B002421)
Whole-cell voltage-clamp assay: Interaction with human cardiac ion channels [a]	No	Transfected HEK293 and CHO cells	*In vitro*	Bayer AG, Germany	4.2.1.2.9 (B002455)
Ex vivo					
Effects on hemodynamic and electrical parameters in Langendorff heart	No	Rabbit	*Ex vivo*	Bayer AG, Germany	4.2.1.2.6 (PH-42110)

[a] study conducted with BAY 3306572, the major human metabolite M1 of BAY 2927088

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article： BAY 2927088

Safety Pharmacology – Overview

Type of Study/Description	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number Location in CTD (Report ID)
In vitro					
Effects on hERG K^+ current	Yes	Transfected CHO-K1 cells	*In vitro*	[redacted], U.K.	4.2.1.3.1 (R-13892)
Determination of BAY 2927088 in hERG dose formulations	Yes	uHPLC method validation	*In vitro*	[redacted], U.K.	4.2.1.3.2 (R-13864)
Determination of BAY 2927088 in dose formulations	Yes	uHPLC method validation	*In vitro*	[redacted], U.K.	4.2.1.3.3 (R-13898)
In vivo					
Effects on cardiovascular system including systemic exposure	Yes	Conscious, telemetered dog	Oral (gavage)	[redacted], U.K.	4.2.1.3.4 (R-14051)
Effects on respiratory system including systemic exposure	Yes	Rat	Oral (gavage)	Bayer AG, Germany	4.2.1.3.5 (PH-42756)
Effects on central nervous system (CNS)	Yes	Rat	Oral (gavage)	Bayer AG, Germany	4.2.1.3.6 (PH-42619)
Effects on vital organ function, CNS endpoints, and clinical signs (detailed clinical observations) including systemic exposure within the scope of a pivotal 4-week repeated dose toxicity study	Yes	Rat	Oral (gavage)	Bayer AG, Germany	4.2.3.2.3 (PH-42111)

Test Article: BAY 2927088

Safety Pharmacology – *In vitro* studies

Organ Systems Evaluated	Test System	Concentration [µmol/L]	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Electrophysiology					
Whole-cell voltage-clamp assay: Interaction with hERG K^+ current	Transfected CHO-K1 cells	0 (vehicle) [a] - 0.1 - 1 - 10 (nominal), 0.073 - 0.81 - 8.57 (measured) Reference compound cisapride: 3	IC_{50} 2.4 µmol/L, estimated IC_{20} 0.8 µmol/L hERG K^+ current inhibition >90%	Yes	4.2.1.3.1 (R-13892)

[a] dimethyl sulfoxide (DMSO)

Test Article: BAY 2927088

Safety Pharmacology – *In vivo* studies

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses [a] [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Cardiovascular system							
Arterial blood pressure (BP), left ventricular pressure (LVP), heart rate (HR), electrocardiogram (ECG, incl. QT/QTc intervals), and body temperature including systemic plasma exposure	Tele-metered dog/ Beagle	Oral (gavage) using a partial Latin square treatment design	0 (vehicle) [b] - 2 - 5 - 15	male (4)	No effects on hemodynamic parameters, PR/QRS intervals, and body temperature. At 15 mg/kg, slight, but significant prolongation of QT/QTc; no arrhythmias Exposure levels $C_{max,u}$[nmol/L]: 65 (low), 257 (mid), 1062 (high dose)	Yes	4.2.1.3.4 (R-14051)
Respiratory system							
Pulmonary function (respiratory frequency, tidal volume, and minute volume) using whole-body plethysmography including plasma/brain exposure	Rat/ HsdCpb: WU	Oral (gavage)	0 (vehicle) [c] - 5 - 15 - 45	Main groups: female (8) Satellite groups: female (2*3)	No effects on respiration rate, tidal and minute volume Plasma exposure levels $C_{max,u}$[nmol/L]: 83 (low), 278 (mid), 888 (high dose); brain to plasma ratios ranged between 3.5% and 4.8%	Yes	4.2.1.3.5 (PH-42756)

[a] single dose unless specified otherwise

[b] ethanol/polyethylene glycol (PEG) 400/ultra-pure water (10/50/40, v/v/v), pH 4.0

[c] ethanol/Kolliphor®HS15/water for injection (10/40/50, v/v/v), pH 4.0

Test Article: BAY 2927088

Safety Pharmacology – *In vivo* studies (Continued)

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses [a] [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Central nervous system							
Behavior (modified Irwin test), locomotor activity (open field test), and body temperature	Rat/ HsdCpb: WU	Oral (gavage)	0 (vehicle) [b] - 5 - 15 - 45	female (6)	No effects on behavior; slightly lowered body temperature in high dose animals; increased rearing activity at mid/high dose	Yes	4.2.1.3.6 (PH-42619)
Pivotal 4-Week Repeated Dose Toxicity Study							
Detailed clinical observations and clinical signs including central nervous system endpoints (behavior, posture, and breathing; in-cage and open-field observations)	Rat/ Wistar Crl:WI (Han)	Oral (gavage) once daily over 4 weeks	0 (vehicle) [b] - 5 - 10 - 15	Main groups: male & female (10) PTO [c] groups: male & female (6) Satellite groups: male & female (6 or 3 receiving vehicle)	No acute abnormalities. From day 3 onwards, mostly in females, piloerection, squatting position, increased motility, high-stepping gait	Yes	4.2.3.2.3 (PH-42111)

[a] single dose unless specified otherwise

[b] ethanol/Kolliphor®HS15/water for injection (10/40/50, v/v/v), pH 4.0

[c] PTO: post treatment observation

2.6.3.5 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。