メキニスト錠 0.5mg
メキニスト錠 2mg

製造販売承認申請書添付資料

第２部（モジュール２）CTD の概要（サマリー）

2.6. 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1. 緒言
2.6.2. 薬理試験の概要文
2.6.3. 薬理試験概要表

ノバルティスファーマ株式会社

非臨床概要薬理試験の目次

	項目 － 頁
2.6.1 緒言	2.6.1 － p. 1
2.6.2 薬理試験の概要文	2.6.2 － p. 1
2.6.2.1 まとめ	2.6.2 － p. 1
2.6.2.2 効力を裏付ける試験	2.6.2 － p. 5
2.6.2.3 副次的薬理試験	2.6.2 － p. 39
2.6.2.4 安全性薬理試験	2.6.2 － p. 39
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験	2.6.2 － p. 41
2.6.2.6 考察及び結論	2.6.2 － p. 41
2.6.2 薬理試験の概要文（タフィンラー／メキニスト併用）	2.6.2 － p. 50
2.6.2.1 まとめ	2.6.2 － p. 50
2.6.2.2 効力を裏付ける試験	2.6.2 － p. 51
2.6.2.3 副次的薬理試験	2.6.2 － p. 64
2.6.2.4 安全性薬理試験	2.6.2 － p. 65
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験	2.6.2 － p. 66
2.6.2.6 考察及び結論	2.6.2 － p. 66
2.6.2.7 図表	2.6.2 － p. 68
2.6.2.8 参考文献	2.6.2 － p. 68
2.6.3 薬理試験概要表	2.6.3 － p. 1
2.6.3.1 薬理試験：一覧表	2.6.3 － p. 1
2.6.3.2 効力を裏付ける試験	2.6.3 － p. 4
2.6.3.3 副次的薬理試験	2.6.3 － p. 4
2.6.3.4 安全性薬理試験	2.6.3 － p. 5
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験	2.6.3 － p. 6
2.6.3 薬理試験概要表（タフィンラー／メキニスト併用）	2.6.3 － p. 7
2.6.3.1 薬理試験：一覧表	2.6.3 － p. 7
2.6.3.2 効力を裏付ける試験	2.6.3 － p. 8
2.6.3.3 副次的薬理試験	2.6.3 － p. 8
2.6.3.4 安全性薬理試験	2.6.3 － p. 8
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験	2.6.3 － p. 8

2.6.1、2.6.2 及び 2.6.3 の略号等一覧

略語（略称）	内　容
ANCOVA	Analysis of covariance
ATP	アデノシン三リン酸
CDK	サイクリン依存性キナーゼ
cDNA	相補的 DNA
CI	コンビネーションインデックス
Cmax	最高血漿中濃度
CR	Complete response
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	ジメチルスルホキシド
DNA	デオキシリボ核酸
ECG	心電図
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EOHSA	Excess over highest single agent
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GAP	GTPase activating proteins
GDP	グアノシン二リン酸
GEF	Guanosine-nucleotide exchange factor
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GTP	グアノシン三リン酸
HEK293	Human embryonic kidney 293
hERG	Human ether-a-go-go related gene
HPMC	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
HUVEC	ヒト臍帯静脈血管内皮細胞
IC50	50%阻害濃度
IFN	インターフェロン
IL	インターロイキン
IP	腹腔内投与
IP-10	Interferon-γ-inducing protein 10
Ki	阻害定数
Km	ミカエリス定数
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー質量分析法
LPS	リポポリサッカライド
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase
mRNA	メッセンジャーRNA
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBMC	末梢血単核細胞
PDGF	血小板由来増殖因子
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
P-MEK	活性型 MEK
ppt	Percentage points
PR	Partial response
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
RB	Retinoblastoma

2.6.1、2.6.2 及び 2.6.3 の略号等一覧（つづき）

略語（略称）	内　容
RNA	リボ核酸
SD ラット	Sprague Dawley ラット
SDS-PAGE	ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
S6P	S6 リボソーム蛋白質
siRNA	small interfering RNA
TGI	腫瘍増殖抑制率
Tp-e	貫壁性再分極相のばらつき
TNF-α	腫瘍壊死因子-α
U-MEK	不活性型 MEK

2.6.1.　緒言

トラメチニブ　ジメチルスルホキシド付加物（GSK1120212B、図 2.6.1-1）は、強力かつ選択的な MEK 阻害薬である。悪性黒色腫では BRAF V600 変異が高頻度でみられ、本変異により MAPK シグナル伝達経路が恒常的に活性化することから、RAF の下流に存在する MEK を阻害する GSK1120212B の BRAF V600 変異を有する悪性黒色腫に対する有効性が期待される。

GSK1120212B は in vitro において MEK1/2 を阻害し、ERK リン酸化を阻害することにより、各種腫瘍細胞株に対して増殖抑制作用を示した。また、BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株を移植したマウスにおいて、腫瘍増殖を抑制した。

今回、「BRAF V600 遺伝子変異を有する悪性黒色腫」を効能・効果として承認申請を行った。

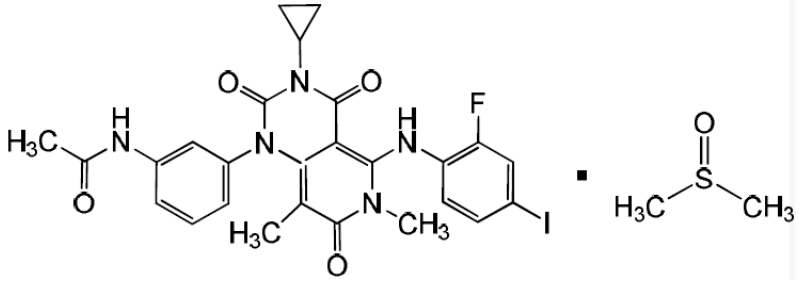


図 2.6.1-1　トラメチニブ　ジメチルスルホキシド付加物（GSK1120212B）の構造式

「BRAF V600 遺伝子変異を有する悪性黒色腫」における申請用法・用量は以下のとおりである。

【用法・用量】

通常、成人にはトラメチニブとして 2 mg を 1 日 1 回経口投与する。

2.6.2.　薬理試験の概要文

2.6.2.1.　まとめ

トラメチニブ　ジメチルスルホキシド付加物（GSK1120212B）は、強力かつ選択的なMEK 阻害薬である。今回申請する「BRAF V600 遺伝子変異を有する悪性黒色腫」に対する効力を裏付ける試験として、in vitro における MEK 阻害作用、各種キナーゼに及ぼす影響、BRAF V600 遺伝子変異陽性（以下、BRAF V600 変異陽性）の悪性黒色腫を含む各種ヒト腫瘍由来細胞株に対する増殖抑制作用及び ERK リン酸化阻害作用、細胞周期に及ぼす影響、アポトーシス誘導作用、耐性獲得メカニズム、代謝物の薬理活性並びにサロゲートマーカーに関する試験、in vivo における BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株を用いたマウス異種移植モデルでの試験及びサロゲートマーカーに関する試験の成績を示した。また、副次的薬理試験として、各種受容体、チャネル、酵素及びキナーゼに及ぼす影響に関する試験成績を示した。更に、安全性薬理試験として、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する影響を検討した試験の成績を示した。

なお、試験には主に GSK1120212B を、一部の試験には GSK1120212A（遊離塩基）を使用した。投与量及び濃度はすべて遊離塩基に換算して記載した。

2.6.2.1.1.　効力を裏付ける試験

2.6.2.1.1.1.　In vitro 試験

MEK 阻害作用

GSK1120212B は不活性型の U-MEK1 及び U-MEK2 の活性化（キナーゼ活性の発現）を阻害し、IC50 はそれぞれ 0.7 及び 0.9 nM であった。U-MEK1 のキナーゼ活性の発現に必要な Ser218 及び Ser222 のリン酸化のうち、GSK1120212B は Ser218 のリン酸化を阻害したが、Ser222 のリン酸化には影響を及ぼさなかった。U-MEK1 に対する結合動態パラメータ（k(off)）から、GSK1120212A の解離は ATP 非競合的なアロステリック阻害薬である PD0325901 と比較して極めて遅いことが示された。また、GSK1120212B は活性型の P-MEK1 及び P-MEK2 活性（ERK をリン酸化するキナーゼ活性）を阻害し、IC50 はそれぞれ 13.2 及び 10.7 nM であった。P-MEK1 に対する阻害様式は、ATP との非競合的阻害であった。GSK1120212B は PD0325901 と P-MEK1 の結合部位において、競合的に結合を阻害した。GSK1120212B の MEK1/2 以外の各種キナーゼ（43 及び 171 種類のパネル）に対する阻害作用は弱く、MEK1/2 と最も相同性の高い MEK5 のリン酸化に対しても阻害作用を示さなかったことから、MEK1/2 に対する高い選択性が示された。

腫瘍細胞増殖抑制作用

計 320 種類（CellTiterGlo アッセイ及び核を 4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）染色し、リアルタイムイメージ法で解析した細胞株数の合計）のヒト腫瘍細胞株パネルを用いた網羅的解析において、BRAF 変異陽性細胞株の 88%及び RAS 変異陽性細胞株の 72%の細胞株が GSK1120212B に高い感受性を示した。一方、野生型 BRAF 及び RAS を有する細胞株では、28%の細胞株だけが高い感受性を示した。また、218 種類のヒト腫瘍細胞株パネル（固形癌

由来）を用いた網羅的解析においても、BRAF 及び RAS 変異陽性細胞株の 80%を超える細胞株が GSK1120212B に対して高い感受性を示した。一方、野性型 BRAF 及び RAS を有する細胞株では、高い感受性を示した細胞株は 40%未満であった。また、組織別では、特に、悪性黒色腫、膵臓癌及び結腸癌由来の 80%を超える細胞株が GSK1120212B に対して高い感受性を示した。

ERK リン酸化レベルと GSK1120212B に対する感受性との間に完全な関連性は認められなかったが、21 株中 ERK リン酸化（Thr202/Tyr204）レベルの高い 5 株のうち 4 株は GSK1120212B に感受性を示した。その他の 16 株については、ERK リン酸化（Thr202/Tyr204）レベルと GSK1120212B に対する感受性との間に関連性は認められなかった。また、DUSP6（ERK を不活性化させる働きを有している）mRNA を発現している細胞株の多くは GSK1120212B に対して高い感受性を示し、DUSP6 mRNA を発現していない細胞株の多くは GSK1120212B に対する感受性が低かった。BRAF V600 変異陽性の 17 種類のヒト悪性黒色腫細胞株のうち、14 種類の細胞株は GSK1120212B に対して高い感受性を示し、増殖抑制作用の IC50 は 0.3～9.5 nM であった。BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株に対する GSK1120212B の増殖抑制作用の可逆性を検討した結果、増殖抑制作用はウォッシュアウトすることにより減弱することが示された。

BRAF V600E 又は V600K 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来のそれぞれ A375P F11 又は YUSIT1 細胞株を高濃度の GSK2118436（BRAF 阻害薬）存在下で 1 週間以上培養し、その中から単離した GSK2118436 に対して耐性を獲得した耐性細胞クローンでは NRAS 又は MEK1 あるいはその両方に変異（NRAS：Q61K 及び A146T 変異、MEK1：K59 の欠失（インフレーム変異；K59del）又は P387S のミスセンス変異）が検出された。これらの耐性細胞クローンは、GSK1120212B に対する感受性も 1/200 未満～約 1/3 に低下した。

細胞周期に及ぼす影響及びアポトーシス誘導作用

BRAF V600E 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HT29 細胞株において、GSK1120212A は MEK 及び ERK のリン酸化レベルを低下させ、細胞周期抑制因子である p15 及び p27 蛋白レベルの増加並びに細胞周期促進因子である c-Myc、サイクリン A、D1 及び D2 蛋白レベルの低下を誘導した。また、サイクリン E、CDK2、CDK4 及び retinoblastoma（RB）の蛋白レベルをわずかに低下させ、細胞周期の停止にかかわる RB リン酸化レベルを低下させた。ヒト結腸直腸癌由来 HT29 及び Colo205 細胞株（BRAF V600E 変異陽性）において、GSK1120212A は G0/G1 期のピークを増加させ細胞周期の停止を誘導した後、サブ G1 分画（DNA の断片化を検出）を増加させた。また、GSK1120212A はカスパーゼ 3、7 及び 9 並びに PARP の切断（活性化）を誘導し、カスパーゼの活性化は、サブ G1 分画の増加と関連していた。

GSK1120212B に対する獲得耐性に関する検討

KRAS 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HCT116 細胞株を高濃度の GSK1120212B で 2 週間以上曝露し、GSK1120212B に耐性を獲得した HCT116（212-Res）細胞株に対する GSK1120212B の増殖抑制作用の IC50 は 3.3 μM であり、親細胞株（HCT116 細胞株）に対す

る IC50（2 nM）と比較して感受性は 1/1650 に低下した。HCT116（212-Res）細胞株から単離した GSK1120212B 耐性細胞クローンの遺伝子配列解析を行った結果、MEK2 における L119P のアミノ酸置換を起こす単一点突然変異がみられた。GSK1120212B 耐性細胞クローン（クローン 4）に non-silencing small interfering RNA（siRNA）を処理しても、GSK1120212B に対する耐性は維持されたままであったが（IC50＝2565 nM）、MEK2 をノックダウンさせる siRNA を導入することにより、GSK1120212B に対する感受性は回復した（IC50＝72 nM）。

代謝物の薬理活性

ヒトでの主な血漿中代謝物は GSK1790627（M5：脱アセチル体）及び GSK3002415A（M7：M5 の酸化体）である。M5 の in vitro における U-MEK1 の活性化（キナーゼ活性の発現）に対する阻害作用、P-MEK1 活性（ERK をリン酸化する活性）に対する阻害作用、BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株における ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用は、GSK1120212B と同程度であった。また、M7 の P-MEK1 活性に対する阻害作用の IC50 は 73 nM であり、阻害活性は未変化体（GSK1120212B：IC50＝7.0 nM）の約 1/10 と弱かった。

サロゲートマーカーの検討

GSK1120212B は phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）刺激ヒト PBMC における ERK リン酸化を濃度依存的に阻害した。同様にイヌ及びラットの PBMC（PMA 刺激）においても ERK リン酸化を阻害し、IC50 はヒト及びラットは同程度であり、イヌではヒトと比較して低値であった。

2.6.2.1.1.2.　In vivo 試験

ERK リン酸化阻害作用

GSK1120212B（0.1～3 mg/kg、単回～14 日間経口投与）は BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルの腫瘍組織において、ERK のリン酸化を用量依存的に阻害することが示された。また、ERK リン酸化阻害作用の持続がみられた 8 時間後の血中未変化体濃度は 100 nM を超えており、作用がみられなかった 24 時間後では 100 nM を下回っていた。更に、GSK1120212B の ERK リン酸化阻害作用は 14 日間経口投与しても、減弱しないことが示された。

p27 蛋白レベル増加作用

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて、GSK1120212B は 3 mg/kg の 1 日 1 回 7 日間経口投与により、腫瘍組織において G1 期停止のマーカーである p27 蛋白レベルを増加させた。

腫瘍増殖抑制作用

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて、GSK1120212B は 1 及び 3 mg/kg の 1 日 1 回 14 日間経口投与により、腫瘍増殖を有意に抑制した。

サロゲートマーカーの検討

GSK1120212B を経口投与したマウスから単離した PBMC の ERK リン酸化レベルは、用量（0.03～3 mg/kg）に依存して低下した。

2.6.2.1.2.　副次的薬理試験

23 種類の各種受容体及びチャネル並びに 7 種類の各種酵素に対し、GSK1120212A は 10 μM で 50%を超える阻害作用を示さなかった。各種キナーゼ（43 及び 171 種類のパネル）に及ぼす影響を検討した結果、GSK1120212A 及び GSK1120212B は 10 μM で 50%を超える阻害作用を示さなかった。

GSK1120212B は増殖因子非存在下の HUVEC（正常細胞）の細胞数に影響を及ぼさなかった（IC50＝10000 nM）。

2.6.2.1.3.　安全性薬理試験

雄 SD ラットにおいて、GSK1120212B の 100 mg/kg の単回経口投与により、体重増加の抑制、自発運動量の減少、腹臥位、眼瞼下垂、下痢、立毛及び散瞳が認められた。

覚醒雄 SD ラットにおいて、GSK1120212B の 0.016、0.0625 及び 0.125 mg/kg（0.125、0.5 及び 1 mg/m^2）の単回経口投与により、0.125 mg/kg で軽度で一過性の体温低下（最大で 0.8°C、投与 1 時間後）がみられた。換気機能及び気道抵抗に影響は認められなかった。

GSK1120212B は hERG cDNA を導入した HEK293 細胞において、hERG チャネルテール電流を抑制し、IC25、IC50 及び IC75 はそれぞれ 0.448、1.54 及び 5.30 μM（275.7、947.7 及び 3261.7 ng/mL）であった。

ウサギ左心室ウェッジ標本において、GSK1120212B は 0.3、1、10 及び 30 μM（約 180、620、6150 及び 18450 ng/mL）の濃度で（18450 ng/mL は溶解限界濃度）、QT 間隔に影響を及ぼさなかった。GSK1120212B は 10 及び 30 μM で等尺性収縮力をそれぞれ 16.3 及び 64.8%低下させ、30 μM で Tp-e 間隔を約 26%短縮させた。

麻酔雄ビーグル犬において（非 GLP 試験）、GSK1120212A は 1 mg/kg の静脈内投与（10 分間持続投与）により心電図パラメータ、血圧及び心拍数に影響を及ぼさなかった。血漿中 GSK1120212 濃度は投与開始 10 分後まで増加し、最高血漿中 GSK1120212 濃度は 2.5 μM（約 1500 ng/mL）であった。覚醒雄ビーグル犬において（GLP 試験）、GSK1120212B は 0.025、0.038 及び 0.075 mg/kg（0.5、0.75 及び 1.5 mg/m^2）の単回経口投与により、動脈圧、心拍数、ECG パラメータ（波形異常、不整脈及び間隔）及び体温に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.1.4.　　薬力学的薬物相互作用試験

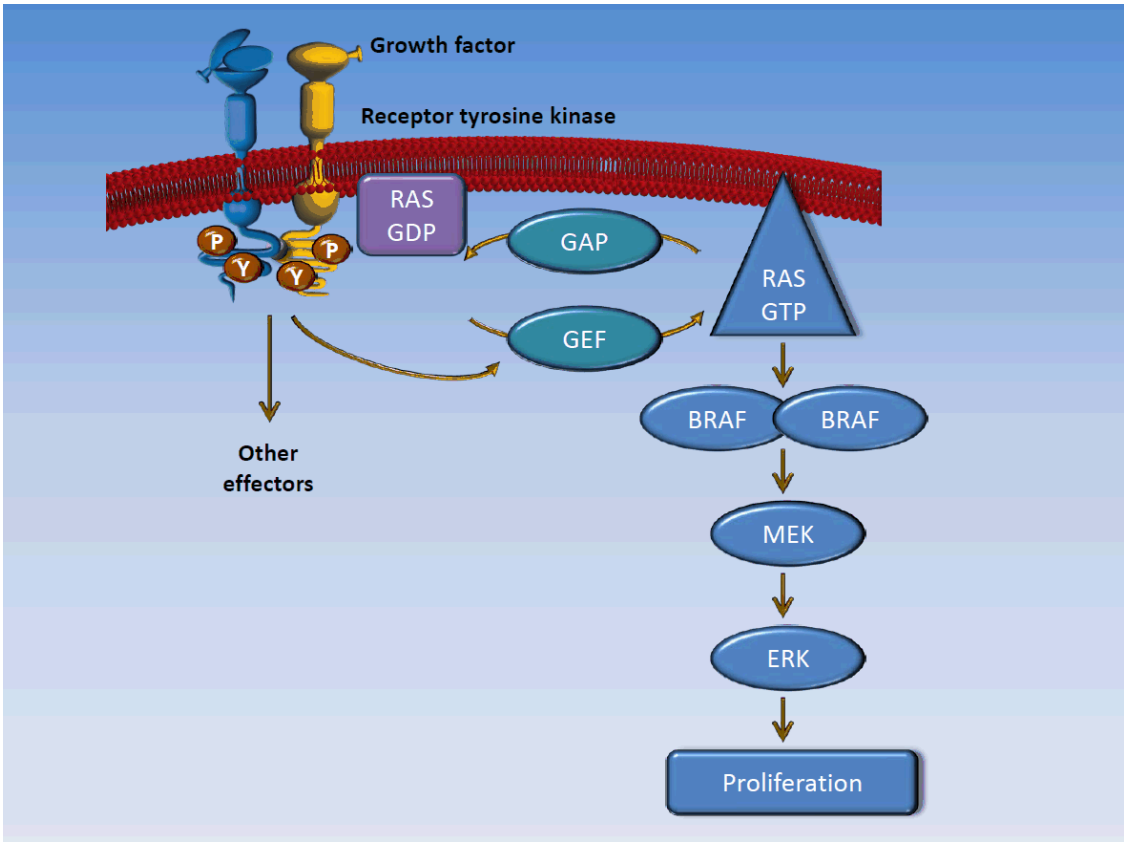
臨床において併用される GSK2118436 との併用による薬理作用を検討した in vitro 及び in vivo の試験成績は CTD 併用パートの 2.6.2（2.6.2.タフィンラー／メキニスト併用）に記載した。

2.6.2.2.　　効力を裏付ける試験

RAS/RAF/MEK/ERK（MAPK）経路は、正常細胞及び種々のがん細胞の分化・増殖おいて重要なシグナル伝達経路である（図 2.6.2-1）。RAF には 3 種類（A、B 及び C）のサブタイプが知られており、2 量体を形成して下流の MEK へシグナルを伝達させるが、種々のがんにおいて BRAF の変異が高頻度に認められており、外国人では悪性黒色腫の 60%[Davies, 2002]、甲状腺癌の 30～50%、大腸癌の 5～20%、卵巣癌の約 30%が変異型 BRAF を有することが報告されている[Wellbrock, 2004]。

これまでにがんに関連する BRAF 遺伝子変異の多くは BRAF の構造変化をもたらし、下流シグナルである MEK-ERK 経路を異常に活性化する。中でも約 90%と最も頻度の高い変異は Exon15 の T1799 塩基置換型の点突然変異であり、キナーゼドメイン内に位置する 600 番目のアミノ酸であるバリン（V600）が主にグルタミン酸、アスパラギン酸又はリジンに変異している（V600E、D 又は K）[Wan, 2004; Wellbrock, 2004; Bello, 2013]。V600 変異を有する BRAF は野生型と比較して高い活性を持つことが報告されており[Wan, 2004]、RAS の活性化に関係なく恒常的に MEK/ERK を活性化してがん細胞の増殖を促進すると考えられている。

MEK/ERK の恒常的な活性化は、サイクリン D1 等の細胞周期促進因子のアップレギュレーション及び p27 等の細胞周期抑制因子のダウンレギュレーションを誘導し、アポトーシス関連因子の機能を調節することにより、悪性黒色腫の増殖を促進させると考えられていることから[Bello, 2013]、BRAF の下流に存在する MEK は BRAF V600 変異陽性のがんに対する分子標的薬の重要な標的になると考えられる[Nissan, 2011]。今回申請する適応症である悪性黒色腫の日本人患者での BRAF V600 遺伝子変異陽性の割合は外国人患者（60%）と比べて低い（約 20～30%）ことが報告されているが、外国人と同様に日本人でも V600E 及び V600K の 2 種類の変異が悪性黒色腫における BRAF 遺伝子変異の大部分を占めると考えられる[Sasaki, 2004; Ashida, 2012]ことから、選択的 MEK 阻害薬である GSK1120212B は BRAF V600 変異陽性の悪性黒色腫に対する治療薬としての可能性を有している。



増殖因子が受容体に結合すると、受容体のチロシン残基がリン酸化され、その後、活性化シグナルが RAS／RAF／MEK／ERK へと伝達される。
GSK2118436 の標的である RAF は、RAS によって活性化（リン酸化）された後、MEK をリン酸化して活性化させる。
GSK1120212B の標的である MEK は、RAF によってリン酸化された後、ERK をリン酸化する。
GDP：guanosine diphosphate (グアノシン二リン酸)、GTP：guanosine triphosphate (グアノシン三リン酸)
GAP：GTPase activating proteins、GEF：guanine-nucleotide exchange factor

図 2.6.2-1　　増殖因子受容体を介した細胞内シグナル伝達（MAPK 経路）

Data source: [Alcala, 2012]の Figure 1

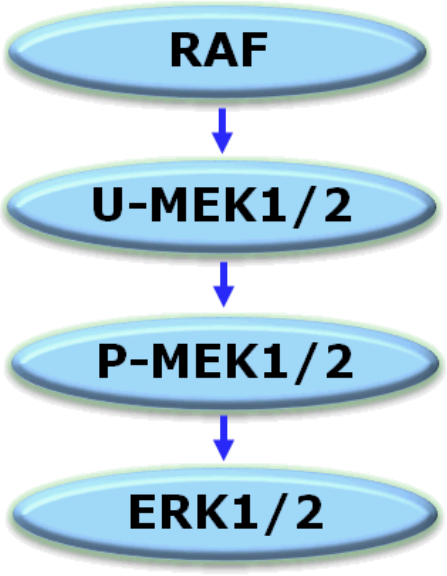
2.6.2.2.1.　　In vitro 試験

In vitro 試験において、主に GSK1120212B の MEK に対する阻害作用及び阻害様式並びに BRAF V600E 変異陽性を含む各種ヒト腫瘍細胞株及びヒト悪性黒色腫由来 GSK2118436 耐性細胞クローンに対する増殖抑制作用を検討した。また、GSK1120212B に対する耐性獲得メカニズム、代謝物の薬理活性及びサロゲートマーカーについて検討した。

2.6.2.2.1.1.　　MEK 阻害作用

U-MEK1 並びに U-MEK2 は RAF により、それぞれ Ser218 及び Ser222 残基並びに Ser222 及び Ser226 残基がリン酸化され、活性化（キナーゼ活性の発現）される（P-MEK）[Roskoski, 2012]。その後、P-MEK は ERK1/2 のスレオニン及びセリン残基をリン酸化する（図 2.6.2-2）。

そこで、GSK1120212B の MEK 阻害作用を検討する目的で、BRAF による U-MEK1/2 の活性化に対する阻害作用（2.6.2.2.1.1.1.）及び P-MEK1/2 活性（ERK1/2 をリン酸化する活性）に対する阻害作用（2.6.2.2.1.1.4.）を検討した。



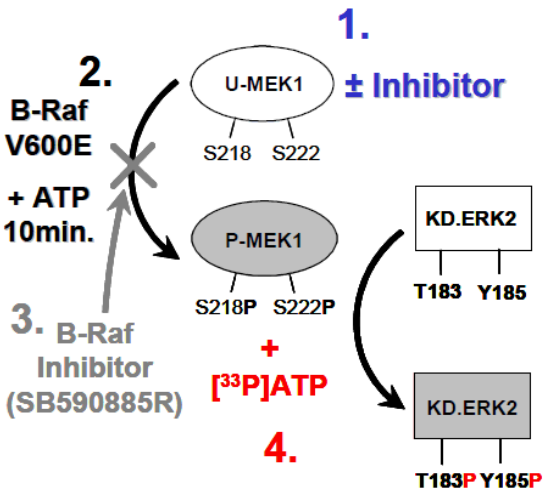
U-MEK (unphosphoryalted-MEK)：不活性型 MEK
P-MEK (phosphoryalted-MEK)：リン酸化 MEK (活性型)

図 2.6.2-2　　RAF/MEK/ERK 経路

2.6.2.2.1.1.1.　　BRAF による U-MEK1/2 の活性化に対する阻害作用

方法

本試験系の模式図を図 2.6.2-3 に示す（UH2008/00021/00）。U-MEK1（0.3 nM）又は U-MEK2（0.6 nM）に各種濃度の GSK1120212B を添加し、室温で 40 分間インキュベートした。その後、変異型 BRAF（V600E 変異陽性）（20 nM）及び ATP（30 μM）を添加して 10 分間反応させ、GSK1120212B に結合していない U-MEK をリン酸化した（P-MEK1/2）。この反応液中に不活性型 ERK2（4 μM）、[γ^{33}P]-ATP（30 μM；0.08 μCi/μL）及び SB590885R（BRAF 阻害薬、400 nM）を添加し、P-MEK1 は 90 分間、P-MEK2 は 120 分間反応させて ERK2 をリン酸化した。ERK2 に取り込まれた[γ^{33}P]-ATP の放射活性を測定し、GSK1120212B に結合していない U-MEK1/2 由来の P-MEK1/2 による ERK2 リン酸化活性を測定し、BRAF V600E による U-MEK の活性化（キナーゼ活性の発現）に対する阻害作用を検討した。



1：U-MEK1 に GSK1120212B を処理
2：U-MEK1 をリン酸化させるために変異型 BRAF (V600E 変異陽性) 及び ATP を添加 (GSK1120212B が結合していない U-MEK はリン酸化されるが、結合している U-MEK はリン酸化されない)
3：選択的 BRAF 阻害薬である SB590885R を添加して BRAF の活性を阻害し、反応を停止させる
4：不活性型 ERK2 (kinase dead K52R マウス ERK2) 及び ATP を添加し、生成された P-MEK1 の活性 (ERK をリン酸化するキナーゼ活性) を ERK リン酸化レベルから評価 (GSK1120212B が結合していない U-MEK はリン酸化 (P-MEK) され、それに続き ERK がリン酸化されるが、GSK1120212B が結合している U-MEK は、リン酸化されないため、P-MEK による ERK のリン酸化が起こらないという原理を利用)
図には U-MEK1 の活性化に対する阻害作用を検討した試験系を示したが、U-MEK2 についても同様の試験系で検討を行った。

図 2.6.2-3　　U-MEK に対する阻害作用を検討した試験系

Data source: UH2008/00021/00 の Figure 4 (A)

結果

GSK1120212B は U-MEK1 及び U-MEK2 の活性化を阻害し、IC50 はそれぞれ 0.7 及び 0.9 nM であった（表 2.6.2-1）。

表 2.6.2-1　　U-MEK に対する阻害作用

酵　素	IC50 (nM)	n
U-MEK1	0.7	19
U-MEK2	0.9	2

Data source: UH2008/00021/00 の Table 1

2.6.2.2.1.1.2.　　U-MEK1 の Ser218 及び Ser222 のリン酸化へ及ぼす影響

U-MEK1 のキナーゼ活性の発現には、Ser218 及び Ser222 のリン酸化が必要であることが報告されている[Yan, 1994]。本試験では、GSK1120212B が U-MEK1 の Ser218 及び Ser222 をリン酸化させるか否かを検討した。

方法

U-MEK1（30 nM）及び GSK1120212B（75 nM）を室温で 40 分間プレインキュベートし、変異型 BRAF（V600E 変異陽性）（20 nM）及び ATP（30 μM）を添加して更に室温で 1 時

間インキュベートした（UH2008/00021/00）。SDS-PAGE 用緩衝液を添加して反応を停止させ、SDS-PAGE により MEK1 のバンドを分離した後、mass spectrometry 法により U-MEK1 のリン酸化部位及びレベルを解析し、Ser218 及び Ser222 のリン酸化率を算出した。

結果

GSK1120212B（75 nM）は変異型 BRAF V600E による U-MEK1 の Ser218 のリン酸化を阻害したが、Ser222 のリン酸化を阻害しなかった（表 2.6.2-2）。

表 2.6.2-2　U-MEK1 の Ser218 及び Ser222 のリン酸化に及ぼす影響

試験群	Ser218 のリン酸化率 (%)	Ser222 のリン酸化率 (%)
U-MEK1 (BRAF V600E 非添加)	0	0
U-MEK1＋BRAF V600E	60	88
U-MEK1＋BRAF V600E＋GSK1120212B (75 nM)	3	92

Data source: UH2008/00021/00 の Table 2

2.6.2.2.1.1.3.　U-MEK1 に対する結合動態パラメータ

PD0325901 は ATP 非競合的なアロステリック MEK 阻害薬である[Akinleye, 2013]。GSK1120212A の U-MEK1 に対する結合動態を PD0325901 と比較検討した。

方法

U-MEK1 を含む反応用緩衝液中に GSK1120212A（8、16、31 及び 63 nM）又は PD0325901（8、16、31、63、125 及び 250 nM）を添加し、25°C で 60（association phase）及び 180（dissociation phase）秒間反応させ、結合動態パラメータを Biacore S51 ソフトウェアを用いて解析した（UH2008/00046/00）。

結果

GSK1120212A 及び PD0325901 の U-MEK1 に対する結合動態パラメータを表 2.6.2-3 に示す。k(off)のデータから、GSK1120212A の解離は、PD0325901 と比較して極めて遅いことが示された。

表 2.6.2-3　U-MEK1 に対する結合動態パラメータ

被験物質	K_D (M)	k(on) (1/Ms)	k(off) (1/s)
GSK1120212A	1.9×10^{-11}	2.7×10^{5}	3.6×10^{-6}
PD0325901	6.1×10^{-8}	1.8×10^{6}	1.1×10^{-1}

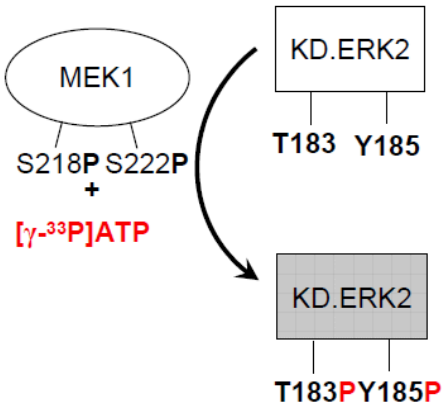
各パラメータの値は、2 回の試験の平均値
K_D：解離定数、k(on)：結合速度、k(off)：解離速度
Data source: UH2008/00046/00 の Table 1

2.6.2.2.1.1.4.　P-MEK1/2 活性に対する阻害作用

方法

本試験系の模式図を図 2.6.2-4 に示す（UH2008/00021/00）。P-MEK1（0.5 nM）又は P-MEK2（0.5 nM）、不活性型 ERK2（1 μM）、ATP（40 μM）及び[γ^{33}P]-ATP（0.6 μCi）を含む反応用緩衝液に各種濃度の GSK1120212B を添加し、室温で 40 分間反応させた。45 分間放置した後、ERK2 に取り込まれた[γ^{33}P]-ATP の放射活性を測定することにより、P-MEK1

及び P-MEK2 による ERK2 のリン酸化反応を測定した。GSK1120212B の P-MEK1/2 活性（ERK をリン酸化する活性）に対する阻害作用を ERK2 のリン酸化レベルを指標として評価した。



図には P-MEK1 活性 (ERK をリン酸化する活性) に対する阻害作用を検討した試験系を示したが、P-MEK2 活性についても同様の試験系で検討を行った。

図 2.6.2-4　　P-MEK 活性に対する阻害作用を検討した試験系

Data source: UH2008/00021/00 の Figure 1 (A)

結果

GSK1120212B は P-MEK1 及び P-MEK2 活性を阻害し、IC50 はそれぞれ 13.2 及び 10.7 nM であった（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-4　　P-MEK 活性に対する阻害作用

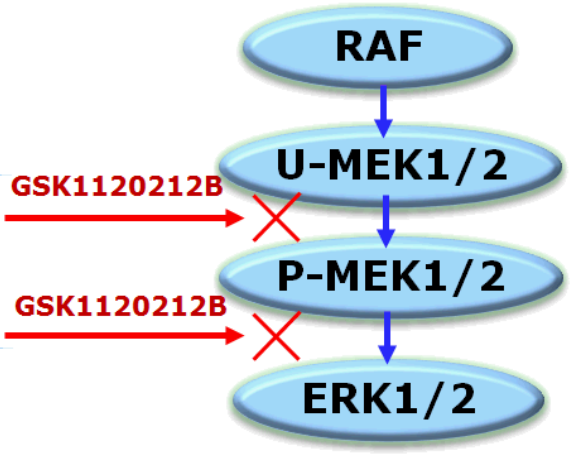
酵　素	IC50 (nM)	n
P-MEK1	13.2	20
P-MEK2	10.7	2

Data source: UH2008/00021/00 の Table 1

まとめ

GSK1120212B は U-MEK1/2（不活性型）の活性化（キナーゼ活性の発現）を阻害し、U-MEK1 のキナーゼ活性の発現に必要な Ser218 及び Ser222 のリン酸化のうち、Ser218 のリン酸化を阻害したが、Ser222 のリン酸化には影響を及ぼさなかった。U-MEK1 に対する結合動態パラメータ（k(off)）から、GSK1120212A の解離は ATP 非競合的なアロステリック阻害薬である PD0325901 と比較して極めて遅いことが示された。また、GSK1120212B は P-MEK1/2（活性化 MEK）活性（ERK をリン酸化するキナーゼ活性）も阻害することが示された（図 2.6.2-5）。

酵素	IC50 (nM)
U-MEK1	0.7
U-MEK2	0.9
P-MEK1	13.2
P-MEK2	10.7



U-MEK：不活性型 MEK、P-MEK：活性型 MEK

図 2.6.2-5　GSK1120212B の U-MEK 及び P-MEK 阻害作用の模式図

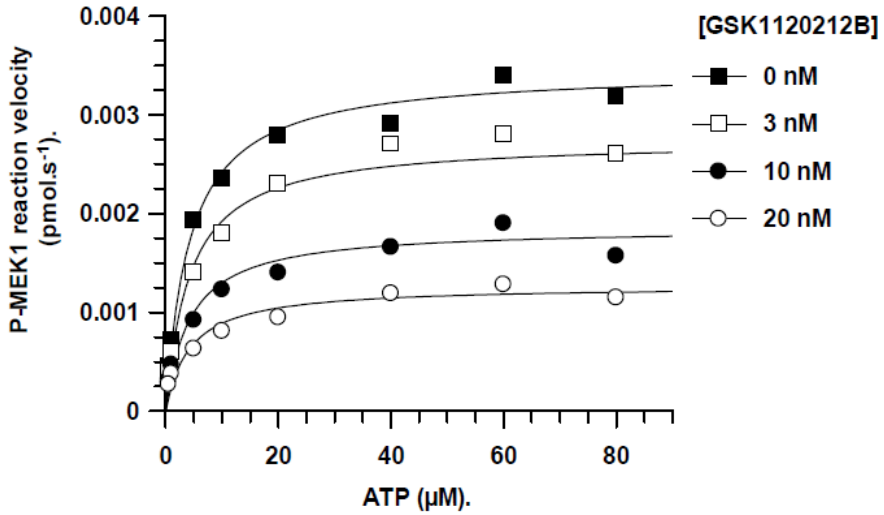
2.6.2.2.1.1.5.　P-MEK1 に対する阻害様式

方法

P-MEK1 に対する阻害作用を 2.6.2.2.1.1.4.と同様の方法で検討し、不活性化 ERK 濃度を一定（1 μM）とし、ATP 及び GSK1120212B の濃度を変動させて反応させ、ATP 濃度－反応速度曲線、ミカエリスメンテンの数式及び各種数式モデル（competitive、non-competitive、mixed 及び uncompetitive モデル）により阻害様式を解析し、Ki 及び $K_{m, ATP}$ を算出した（UH2008/00021/00）。

結果

ATP 濃度－反応速度曲線、ミカエリスメンテンの数式及び各種数式モデルから、GSK1120212B の P-MEK1 に対する阻害様式は、ATP との非競合的（non-competitive）であることが示された（図 2.6.2-6）。$K_{m, ATP}$ は 4.3 μM であり、Ki は 11.6 nM であった。



縦軸：P-MEK1 反応速度、横軸：ATP 濃度

図 2.6.2-6　　P-MEK1 に対する ATP との阻害様式

Data source: UH2008/00021/00 の Figure 2

2.6.2.2.1.1.6.　　P-MEK1 における PD0325901 との競合様式

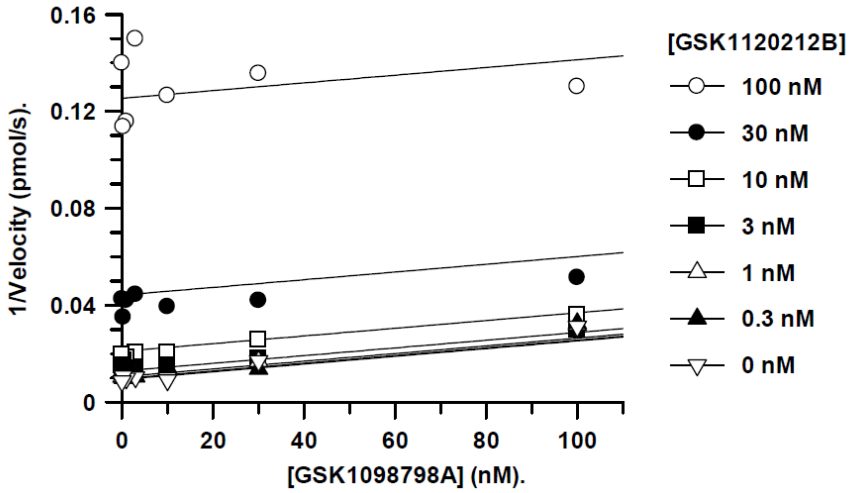
GSK1120212B の P-MEK1 に対する阻害様式の検討において、ATP との非競合的阻害であることが示されていることから（2.6.2.2.1.1.5.）、本試験では、P-MEK1 における結合部位が GSK1120212B 及び PD0325901 で同一であるか否かを明らかにする目的で、両被験物質の競合様式を検討した。

方法

GSK1120212B 及び PD0325901 の二次元濃度マトリクスを調製し、P-MEK1 に対する阻害作用を 2.6.2.2.1.1.4.と同様の方法で検討した（UH2008/00021/00）。PD0325901 との競合様式は、Yonetani-Theorell の数式により解析した。

結果

1/Velocity（反応速度）及び PD0325901 濃度をプロットしたデータは（図 2.6.2-7）、相互排他的結合を解析する Yonetani-Theorell モデルの数式にフィットしたことから、GSK1120212B 及び PD0325901 は P-MEK1 の結合部位において、相互排他的に競合的に阻害することが示された。



縦軸：1/反応速度、横軸：GSK1098798A：PD0325901 濃度

図 2.6.2-7　　P-MEK1 における PD0325901 との競合様式

Data source: UH2008/00021/00 の Figure 3

2.6.2.2.1.2.　　各種キナーゼに及ぼす影響（選択性）

2.6.2.2.1.2.1.　　キナーゼパネルにおける検討

方法

GSK1120212A 又は B（10 μM）の各種キナーゼパネル（43 種類）に対する阻害活性を、fluorescence polarization アッセイ、LEADseeker scintillation proximity アッセイ、IMAP technology fluorescence depolarization アッセイ又は time resolved-fluorescence resonance energy transfer アッセイにより測定した（UH2008/00021/00）。また、171 種類のキナーゼパネルを用いて GSK1120212A（10 μM）のキナーゼ阻害活性を測定した（UH2008/00047/00）。

結果

GSK1120212A 又は B は 10 μM で 43 種類のキナーゼに対して 50%を超える阻害作用を示さなかった（IC50＞10 μM）。

また、GSK1120212A は 10 μM で 171 種類のキナーゼに対して 50%を超える阻害作用を示さなかった（IC50＞10 μM）。

2.6.2.2.1.2.2.　　MEK5 に及ぼす影響

MEK5 は MEK1/2 とキナーゼドメインで 85%以上、ATP 結合部位では 98%以上の相同性を有する（UH2007/00097/02）。GSK1120212B の MEK5 活性（ERK5 をリン酸化する活性）に対する阻害作用を ERK5 のリン酸化レベルを指標として評価し、ERK1/2 リン酸化に及ぼす影響と比較した。

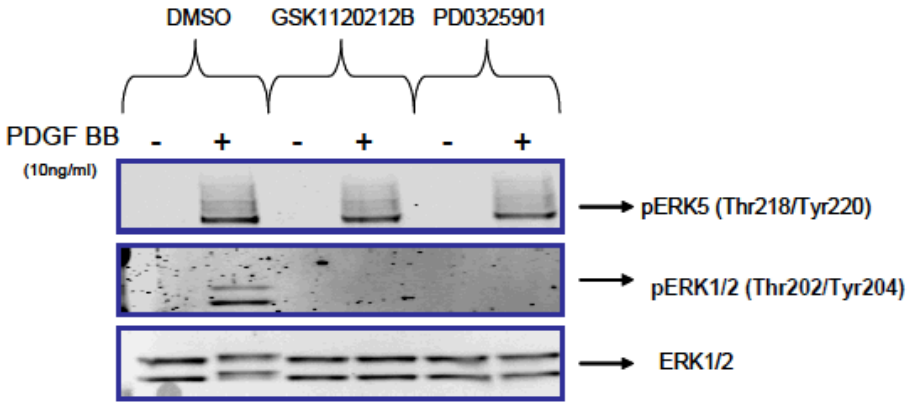
方法

マウス胎児皮膚由来 NIH3T3 細胞株に GSK1120212B（1 μM）を 37°C で 1 時間処理した。その後、MEK5 経路を刺激するために、マウス組換え血小板由来増殖因子（PDGF）-BB を

37°C で 5 分間処理した。細胞株を溶解後、pERK5（Thr218/Tyr220）抗体及び pERK1/2（Thr202/Tyr204）抗体を用いてリン酸化 ERK5 及びリン酸化 ERK1/2 をウエスタンブロット法により検出した。比較対照物質として PD0325901 の MEK5 及び MEK1/2 に及ぼす影響も同様に検討した。

結果

ERK5 は PDGF-BB で刺激された MEK5 によりリン酸化されることが示された（図 2.6.2-8）。GSK1120212B は ERK5 のリン酸化レベルを変化させなかったことから（図 2.6.2-8）、MEK5 に対して影響を及ぼさないことが示された。一方、GSK1120212B は ERK1/2 のリン酸化を阻害したことから（図 2.6.2-8）、本試験系においても MEK1/2 に対して阻害作用を有することが確認された。比較対照物質である PD0325901 も GSK1120212B と同様に、ERK1/2 のリン酸化を阻害したが、ERK5 のリン酸化レベルに対しては影響を及ぼさなかった（図 2.6.2-8）。



PDGF BB：血小板由来増殖因子-BB、PD0325901：MEK 阻害薬

図 2.6.2-8　　NIH3T3 細胞株における MEK5 及び MEK1/2 に及ぼす影響

Data source: UH2007/00097/02 の Figure 11

まとめ

GSK1120212B の P-MEK1 に対する阻害様式は、ATP との非競合的であり、GSK1120212B は P-MEK1 の結合部位において、ATP 非競合的なアロステリック阻害薬である PD0325901 の結合を競合的に阻害した。GSK1120212B は MEK1/2 以外の各種キナーゼ（43 及び 171 種類のパネル）に対してほとんど阻害作用を示さず、MEK1/2 と最も相同性の高い MEK5 の ERK5 リン酸化活性に対しても阻害作用を示さなかったことから、MEK1/2 に対する高い選択性が示された。

2.6.2.2.1.3.　腫瘍細胞増殖抑制作用

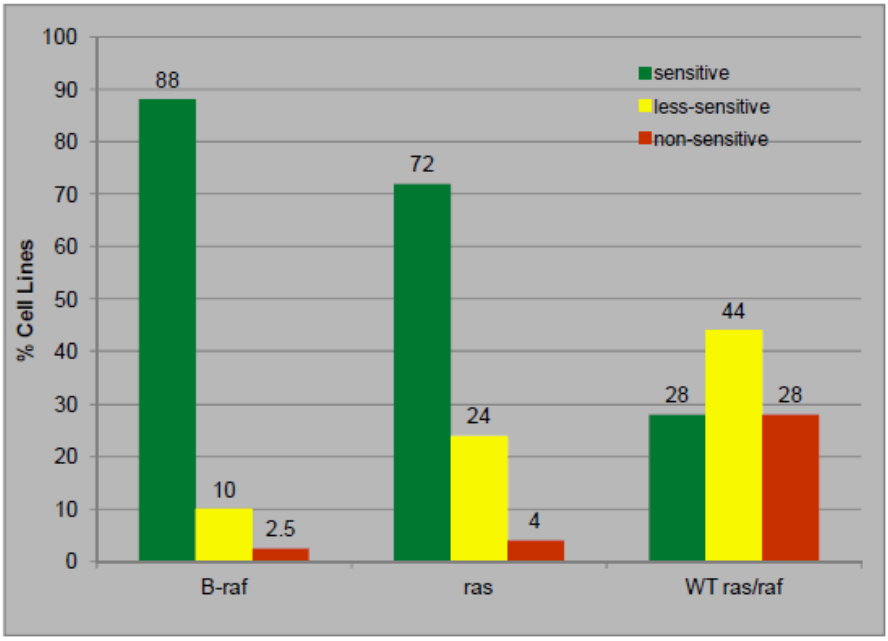
2.6.2.2.1.3.1.　各種ヒト腫瘍細胞株における BRAF 及び RAS の変異と GSK1120212B に対する感受性との関連の網羅的解析（試験 1）

方法

BRAF あるいは RAS 変異陽性又は野生型 BRAF/RAS を有する各種ヒト腫瘍細胞株パネル（計 320 種類；後述の 2 つの測定方法での合計）に GSK1120212B（0.014 nM～7.3 μM）を添加して 72 時間培養した（UH2007/00097/02）。CellTitierGlo アッセイ又は核を DAPI 染色し、リアルタイムイメージ法で解析することにより生細胞数を計測し、各細胞株の GSK1120212B に対する感受性を検討した。本試験における GSK1120212B に対する感受性の程度は IC50 を指標に、高感受性（IC50＜50 nM 又は殺細胞作用を示した場合）及び低感受性（IC50＞50 nM 又は高濃度で処理したときに無処理のときと比較して 50%超まで増殖可能な場合）と定義し、検討したいずれの濃度でも影響を受けなかった場合は感受性なしと定義した。

結果

計 320 種類のヒト腫瘍細胞株パネルを用いた網羅的解析において、BRAF 変異陽性細胞株の 88%及び RAS 変異陽性細胞株の 72%の細胞株が GSK1120212B に対して高い感受性を示した（図 2.6.2-9）。一方、野生型 BRAF 及び RAS を有する細胞株では 28%の細胞株だけが高い感受性を示した（図 2.6.2-9）。



縦軸：細胞株の割合 (%)
B-raf：BRAF 変異陽性の細胞株、ras：RAS 変異陽性の細胞株
WT ras/raf：野生型 RAS 及び RAF を有する細胞株
sensitive：高感受性 (IC50＜50 nM 又は殺細胞作用を示した場合)
less-sensitive：低感受性 (IC50＞50 nM 又は高濃度で処理したときに無処理のときと比較して 50%超まで増殖可能な場合)
non-sensitive：感受性なし (検討したいずれの濃度でも影響を受けなかった場合)
IC50：50%増殖阻害濃度

図 2.6.2-9　各種ヒト腫瘍細胞株における BRAF 及び RAS の変異と GSK1120212B に対する感受性との関連

Data source: UH2007/00097/02 の Figure 5

2.6.2.2.1.3.2.　各種ヒト腫瘍細胞株における ERK リン酸化レベルと GSK1120212B に対する感受性との関連性

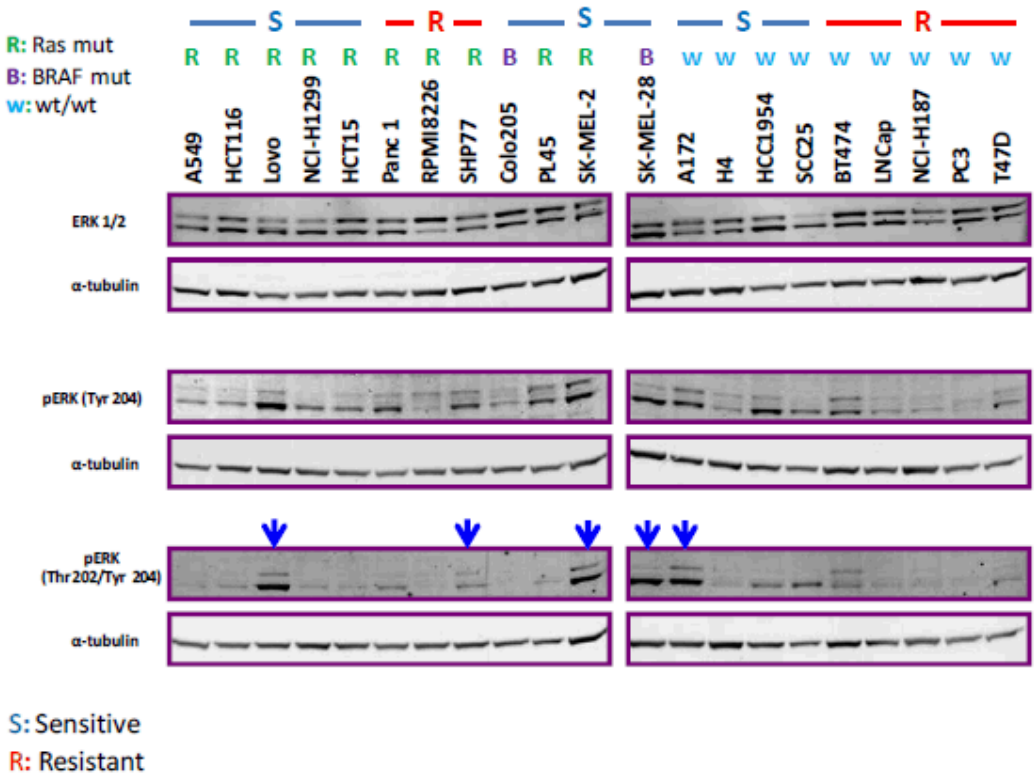
2.6.2.2.1.3.1.の試験において、GSK1120212B に対して感受性あり（高あるいは低感受性）又は感受性なしとされた細胞株を用いて、細胞内 ERK リン酸化レベルと GSK1120212B に対する感受性との関連性を検討した。

方法

BRAF あるいは RAS 変異陽性又は野生型 BRAF/RAS を有する各種ヒト腫瘍細胞株を溶解し、ERK1/2、pERK（Tyr204）又は pERK（Thr202/Tyr204）抗体を用いてウエスタンブロット法によりリン酸化 ERK を検出した（UH2007/00097/02）。各細胞株におけるリン酸化 ERK のウエスタンブロットのバンドを近赤外蛍光法により検出し、蛍光強度を Odyssey reader™ により定量化した。定量化した ERK リン酸化レベルの高い順から 25%の細胞株を高いと判断した。

結果

21 株中 ERK リン酸化（Thr202/Tyr204）レベルの高い 5 株（Lovo：RAS 変異陽性；ヒト結腸直腸癌由来、SHP77：RAS 変異陽性；ヒト肺癌由来、SK-MEL-2：RAS 変異陽性；ヒト悪性黒色腫由来、SK-MEL-28：BRAF 変異陽性；ヒト悪性黒色腫由来及び A172：野生型 BRAF/RAS；ヒト神経膠芽腫由来）のうち 4 株（Lovo、SK-MEL-2、SK-MEL-28 及び A172）は GSK1120212B に感受性を示した（図 2.6.2-10）。その他の 16 株については、ERK リン酸化（Thr202/Tyr204）レベルと GSK1120212B に対する感受性との間に関連性は認められなかった。



S：感受性あり、R：感受性なし
R：Ras mut：RAS 変異陽性の細胞株、B：BRAF mut：BRAF 変異陽性の細胞株
W：wt/wt：野生型 BRAF 及び RAS を有する細胞株
矢印は ERK リン酸化（Thr202/Tyr204）レベルが“高い”と定義した 5 株を示す。

図 2.6.2-10　ヒト腫瘍細胞株における ERK リン酸化（Thr202/Tyr204）レベルと GSK1120212B に対する感受性との関連性

Data source: UH2007/00097/02 の Figure 8

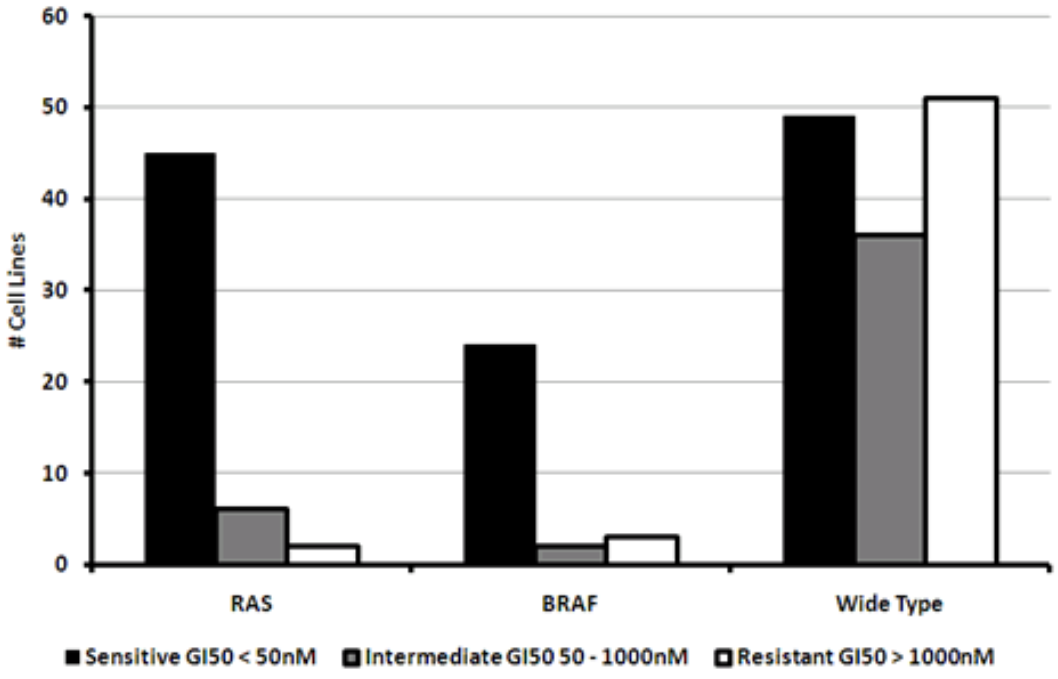
2.6.2.2.1.3.3.　各種ヒト腫瘍細胞株における BRAF 及び RAS の変異と GSK1120212B に対する感受性との関連の網羅的解析（試験 2）

方法

BRAF あるいは RAS 変異陽性又は野生型 BRAF/RAS を有する 218 種類の各種ヒト腫瘍細胞株パネル（固形癌由来）に GSK1120212B（0.16 nM～5 μM）を添加して 72 時間培養した（2014N205857_00）。核を DAPI 染色し生細胞数を計測し、GSK1120212B の増殖抑制作用を検討した。本試験における GSK1120212B に対する感受性の程度は IC50 を指標に、高感受性（IC50＜50 nM）、中程度の感受性（IC50＝50～1000 nM）と定義し、IC50＞1000 nM の細胞株は感受性なしと定義した。

結果

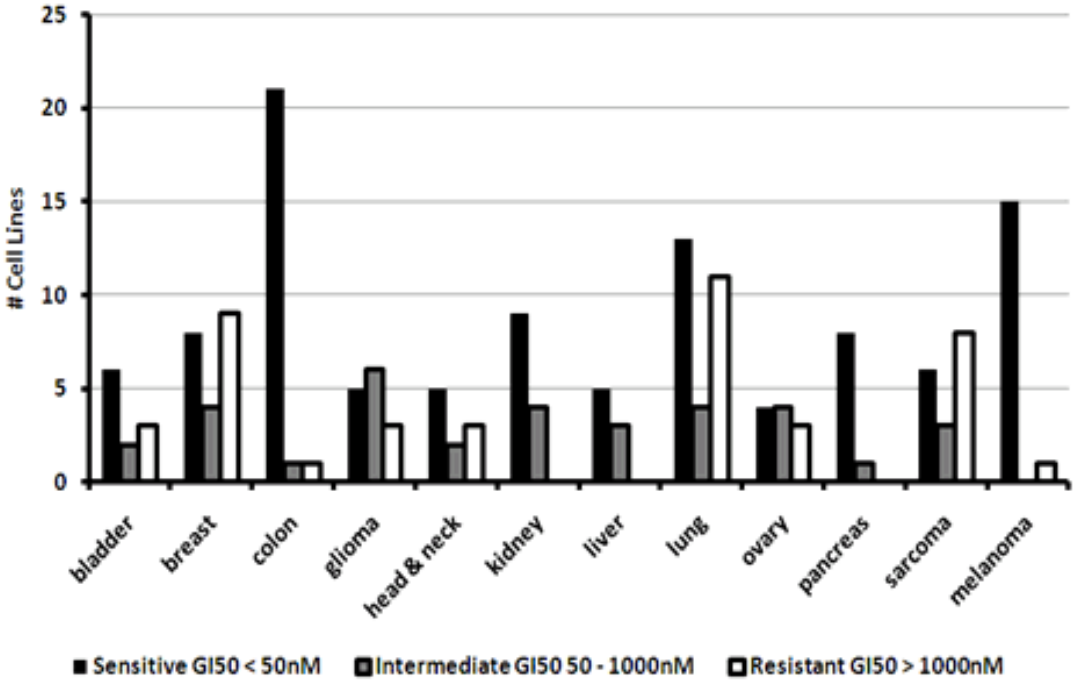
218 種類のヒト腫瘍細胞株パネル（固形癌由来）を用いた網羅的解析において、BRAF 及び RAS 変異陽性細胞株の 80%を超える細胞株が GSK1120212B に対して高い感受性を示した（図 2.6.2-11）。一方、野性型 BRAF 及び RAS を有する細胞株では、高い感受性を示した細胞株は 40%未満であった。また、組織別では、特に、悪性黒色腫、膵臓癌及び結腸癌由来の 80%を超える細胞株が GSK1120212B に対して高い感受性を示した（図 2.6.2-12）。



縦軸：細胞株数
RAS：RAS 変異陽性の細胞株、BRAF：BRAF 変異陽性の細胞株
Wild Type：野生型 RAS 及び RAF を有する細胞株
Sensitive：高感受性、Intermediate：中程度の感受性、Resistant：抵抗性 (感受性なし)
GI50：50%増殖阻害濃度

図 2.6.2-11　各種ヒト腫瘍細胞株（固形癌由来）における BRAF 及び RAS の変異と GSK1120212B に対する感受性との関連

Data source: 2014N205857_00 の Figure 1A



縦軸：細胞株数
Sensitive：高感受性、Intermediate：中程度の感受性、Resistant：抵抗性 (感受性なし)
GI50：50%増殖抑制濃度
bladder：膀胱癌、breast：乳癌、colon：結腸癌、glioma：神経膠腫、head&neck：頭頸部癌
kidney：腎癌、liver：肝臓癌、lung：肺癌、ovary：卵巣癌、pancreas：膵臓癌、sarcoma：肉腫
melanoma：悪性黒色腫

図 2.6.2-12　各種ヒト腫瘍細胞株（固形癌由来）の GSK1120212B に対する感受性及び由来組織との関連

Data source: 2014N205857_00 の Figure 1B

2.6.2.2.1.3.4.　各種ヒト腫瘍細胞株における DUSP6 mRNA レベルと GSK1120212B に対する感受性との関連性

DUSP6 はホスファターゼの 1 種であり、RAF/RAS/MEK/ERK 経路の活性化によりアップレギュレーションされることが知られ[Furukawa, 2008]、ERK を脱リン酸化させ、不活性化させる働きを有している[Caunt, 2013]。ERK は MEK の基質であり、DUSP6 発現レベルは GSK1120212B に対する感受性に影響を及ぼす可能性が考えられることから、2.6.2.2.1.3.3.の試験で用いた 218 種類のヒト腫瘍細胞株における DUSP6 mRNA レベルと GSK1120212B に対する感受性との関連性を検討した。

方法

218 種類の各種ヒト腫瘍細胞株（固形癌由来）を溶解し、DUSP6 mRNA レベルをマイクロアレイ法により測定し、MAS5 アルゴリズム（Affymetrix）を用いてデータを正規化した（2014N205857_00）。本試験における DUSP6 mRNA の発現に関しては、MAS5 アルゴリズムを用いて正規化した値が 100 超を発現あり、100 未満を発現なしと定義した。

また、229 種類のヒト腫瘍細胞株*の DUSP6 mRNA 発現レベルと GSK1120212B に対する感受性の試験成績から、これらの間の関連性について統計学的検討を行った。GSK1120212B に対する感受性の有無（感受性あり（IC50＜50 nM）又は感受性なし（IC50＞1000 nM））並びに DUSP6 の mRNA 発現の有無（発現あり（MAS5＞100）及び発現なし（MAS5＜100））に従って細胞を 4 つのカテゴリー（真の陽性（DUSP6 mRNA の発現あり及び GSK1120212B に対して感受性あり）、偽陽性（DUSP6 mRNA の発現あり及び GSK1120212B に対して感受性なし）及び偽陰性（DUSP6 mRNA の発現なし及び GSK1120212B に対して感受性あり）及び真の陰性（DUSP6 mRNA の発現なし及び GSK1120212B に対して感受性なし）に分類し、それぞれに属する細胞株数から DUSP6 の mRNA 発現の有無と感受性との関連を以下のように解析した。

Sensitivity：真の陽性/（真の陽性＋偽陰性）×100

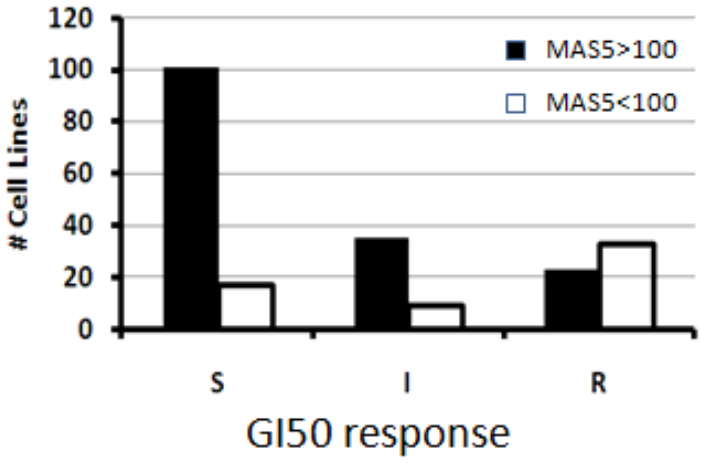
Specificity：真の陽性/（真の陽性＋偽陽性）×100

p 値：Fisher’s exact test（two-tailed）により算出

*: DUSP6 mRNA レベルと GSK1120212B に対する感受性との関連性についての試験はヒト腫瘍細胞株における BRAF 及び RAS の変異と GSK1120212B に対する感受性との関連の網羅的解析（2.6.2.2.1.3.3.）の一環として実施し、この網羅的解析には当初 229 種類のヒト腫瘍細胞株を用いた。しかし、そのうち 11 種類の細胞株では BRAF 及び RAS の変異の情報が得られなかったため、これらの 11 種類の細胞株を除く 218 種類の細胞株を用いて一連の試験を実施し、その結果を 2.6.2.2.1.3.3.及び 2.6.2.2.1.3.4.に示した。DUSP6 の mRNA 発現の有無と感受性との関連を検討した統計学的解析に関しては、BRAF 及び RAS の変異の情報は必ずしも必要でなかったことから、当初本試験に用いた 229 種類のヒト腫瘍細胞株のすべてを対象に実施した。

結果

218 種類の各種ヒト腫瘍細胞株において、DUSP6 mRNA を発現している細胞株の多くは GSK1120212B に対して高い感受性を示したが、DUSP6 mRNA を発現していない細胞株の多くは GSK1120212B に対する感受性が低かった（図 2.6.2-13）。また、229 種類の細胞株を対象とした統計学的解析において、DUSP6 mRNA 発現の有無と GSK1120212B に対する感受性との間に有意な相関性が認められた（sensitivity：79%、specificity：82%、p＝0.0027）。



縦軸：細胞株数、S：高感受性、I：中程度の感受性、R：抵抗性 (感受性なし)
GI50：50%増殖抑制濃度、
MAS5＞100：DUSP6 mRNA の発現あり、MAS5＜100：DUSP6 mRNA の発現なし

図 2.6.2-13　　ヒト腫瘍細胞株（固形癌由来）における DUSP6 mRNA レベルと GSK1120212B に対する感受性との関連性

Data source: 2014N205857_00 の Figure 5A

2.6.2.2.1.3.5.　　BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用

BRAF の下流に存在する MEK は BRAF V600 遺伝子変異を有する腫瘍に対する分子標的薬の重要な標的となると考えられる[Nissan, 2011]。各種ヒト腫瘍細胞株のパネルを用いた検討において、GSK1120212B は BRAF 変異陽性の細胞株の増殖を抑制することが示されている（2.6.2.2.1.3.1.及び 2.6.2.2.1.3.3.）。今回申請する適応症である悪性黒色腫は BRAF 遺伝子変異の頻度が高く、その変異の 90%以上が V600E 変異である[Nissan, 2011]ことから、GSK1120212B の BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用を検討した。

方法

BRAF 変異陽性（V600E、V600K 又は V600D）のヒト悪性黒色腫細胞株（17 種類）に GSK1120212B（0.05 nM～1 μM）を添加して 72 時間培養した（2011N116395_00）。CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を計測し、細胞増殖抑制作用の IC50 を算出した。

結果

BRAF V600 変異陽性の 17 種類のヒト悪性黒色腫細胞株のうち、14 種類の細胞株は GSK1120212B に対して高い感受性を示し、増殖抑制作用の IC50 は 0.3～9.5 nM であった（表 2.6.2-5）。

GSK1120212B に対して高い感受性を示した 14 種類の細胞株（IC50 は 0.3～9.5 nM）と比較して、IGR-1 細胞株の感受性は低く（IC50＝62.3 nM）、SK-MEL-3 及び A2058 細胞株は感受性を示さなかった（＞1000 nM）（表 2.6.2-5）。

表 2.6.2-5　　BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用

細胞株#	BRAF 遺伝子変異の種類	PTEN の種類	IC50 (nM)
UACC-257	V600V/E	野生型	1.4 ± 0.3
SK-MEL-1	V600V/E	野生型	2.5 ± 0.7
COLO-829	V600V/E	欠失	4.2 ± 1.7
A101D	V600V/E	欠失	5.6 ± 2.0
SK-MEL-24	V600V/E	欠失	9.5 ± 8.9
SK-MEL-5	V600V/E	野生型	4.0 ± 1.8
SK-MEL-3	V600V/E	野生型	> 1000
A2058[a]	V600V/E	欠失	> 1000
SK-MEL-28[b]	V600E	T167A 変異型	1.7 ± 0.5
UACC-62	V600E	欠失	2.4 ± 2.1
A375P F11	V600E	野生型	6.7 ± 4.2
WW165	V600V/K	野生型	0.3 ± 0.0
IGR-1[c]	V600V/K	野生型	62.3 ± 43.8
YUMAC	V600K	野生型	0.5 ± 0.1
YULAC	V600K	野生型	0.8 ± 0.4
YUSIT1	V600K	野生型	0.7 ± 0.2
WM-115	V600V/D	欠失	9.3 ± 6.7

平均値±標準偏差 (n=4～11)
#：retinoblastoma (RB) gene 1、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 4、MEK1 又は MEK2 遺伝子に関する遺伝子変異の有無を検討した。
a：MEK1 P124S, RB1 Q93*変異陽性、b：CDK4 R24C 変異陽性、c：MEK2 E66_K68del 変異陽性
Data source: 2011N116395_00 の Table 1

2.6.2.2.1.3.6.　　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株に対する増殖抑制作用の可逆性

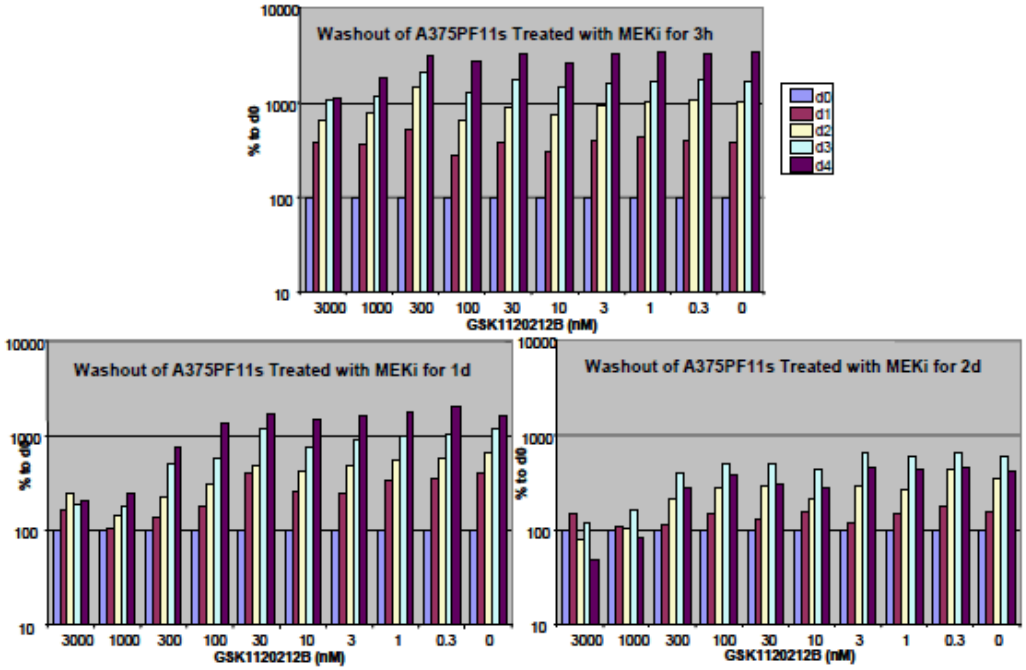
BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫細胞株に対する GSK1120212B の増殖抑制作用の可逆性を検討した。

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株に GSK1120212B（0.3、1、3、10、30、100、300、1000 及び 3000 nM）を添加し、3 時間又は 1 あるいは 2 日間培養した（UH2007/00097/02）。GSK1120212B を除去（ウォッシュアウト：1～4 日間）し、培養液を交換し、培養液交換直後、1、2、3 及び 4 日後（day 0～4）に CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を計測した。

結果

各種濃度の GSK1120212B を 3 時間又は 1 あるいは 2 日間培養し、いずれも 1～4 日間のウォッシュアウト期間を設けて GSK1120212B の A375P F11 細胞株に対する増殖抑制作用の可逆性を検討した結果、高濃度である 1000 及び 3000 nM を除き、増殖抑制作用はウォッシュアウトすることにより減弱することが示された（図 2.6.2-14）。



d0：ウォッシュアウト直後、d1：ウォッシュアウト翌日、d2：ウォッシュアウト 2 日後
d3：ウォッシュアウト 3 日後、d4：ウォッシュアウト 4 日後
GSK1120212B を 3 時間処理 (上段)、1 日間処理 (下段左)、2 日間処理 (下段右)
縦軸：ウォッシュアウト直後の生細胞数に対する各濃度での生細胞数の割合

図 2.6.2-14　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株に対する増殖抑制作用の可逆性

Data source: UH2007/00097/02 の Figure 10

まとめ

計 320 種類並びに 218 種類のヒト腫瘍細胞株パネルを用いた網羅的検討において、それぞれ BRAF 変異陽性細胞株の 88%及び RAS 変異陽性細胞株の 72%の細胞株並びに BRAF 及び RAS 変異陽性細胞株の 80%を超える細胞株が GSK1120212B に高い感受性を示した。一方、野生型 BRAF 及び RAS を有する細胞株では、それぞれ 28%及び 40%未満の細胞株だけが高い感受性を示した。組織別では、特に、悪性黒色腫、膵臓癌及び結腸癌由来の 80%を超える細胞株が GSK1120212B に対して高い感受性を示した。

ERK リン酸化レベルと GSK1120212B に対する感受性との間に完全な関連性は認められなかったが、21 株中 ERK リン酸化（Thr202/Tyr204）レベルの高い上位 25%の 5 株のうち 4 株は GSK1120212B に感受性を示した。また、DUSP6（ERK を不活性化させる働きを有している）mRNA を発現している細胞株の多くは GSK1120212B に対して高い感受性を示し、DUSP6 mRNA を発現していない細胞株の多くは GSK1120212B に対する感受性が低かった。BRAF V600 変異を有する 17 種類のヒト悪性黒色腫細胞株のうち、14 種類の細胞株は GSK1120212B に対して高い感受性を示し、増殖抑制作用の IC50 は 0.3～9.5 nM であった。GSK1120212B のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株に対する増殖抑制作用の可逆性を検討した結果、増殖抑制作用は GSK1120212B をウォッシュアウトした後に減弱した。

2.6.2.2.1.3.7.　ヒト悪性黒色腫由来 GSK2118436 耐性細胞クローンに対する増殖抑制作用

臨床において RAF 阻害剤の使用による耐性腫瘍の出現が報告されていることから[Alcala, 2012; Lito, 2013]、BRAF V600 変異陽性の 2 種類のヒト悪性黒色腫由来細胞株（BRAF V600E 変異陽性の A375P F11 細胞株及び BRAF V600K 変異陽性の YUSIT1 細胞株）を高濃度の GSK2118436（BRAF 阻害薬）で 1 週間以上処理して耐性細胞株を誘導し、その細胞クローンを単離し、GSK1120212B の GSK2118436 耐性細胞クローンの増殖に対する抑制作用を検討した。

2.6.2.2.1.3.7.1.　A375P F11 細胞株より単離した耐性細胞クローンでの検討

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株に GSK2118436 を 1.2 又は 1.6 μM の濃度まで増加させて曝露することにより耐性を誘導した単一細胞クローン（9 株）を限界希釈法により単離した後、これらの RAS、RAF、MEK、PIK3CA 及び PTEN 遺伝子における変異の有無を確認した（2011N116394_00）。

GSK2118436 耐性細胞クローンを GSK2118436（0.5～10000 nM）及び GSK1121212B（0.05～1000 nM）存在下で 72 時間培養した後、CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を計測し、増殖抑制作用の IC50 を算出した。

結果

GSK2118436 に耐性を獲得した細胞クローン（IC50＞10000 nM）は、GSK1120212B に対する感受性も 1/200 未満～約 1/12（IC50＝62～＞1000 nM）に低下した（表 2.6.2-6）。

耐性細胞クローンでは NRAS 又は MEK1 あるいはその両方に変異（NRAS：Q61K 及び A146T 変異、MEK1：K59 の欠失（インフレーム変異；K59del）又は P387S のミスセンス変異）が検出されたが、KRAS、HRAS、ARAF、CRAF、PTEN 及び PIK3CA に変異はみられなかった。

表 2.6.2-6　　A375P F11 細胞株由来 GSK2118436 耐性細胞クローンに対する増殖抑制作用

細胞株	獲得変異		IC50 (nM)	
	NRAS	MEK1	GSK2118436	GSK1120212B
A375P F11 (親細胞株)	野生型	野生型	0.028 ±0.016	5 ± 3
12R5-3	A146T	野生型	>10000	107 ± 46
12R8-1	A146T	野生型	>10000	62 ±31
12R8-3	A146T	野生型	>10000	82 ±30
16R6-3	A146T	P387S	>10000	147 ± 64
16R5-5	Q61K	P387S	>10000	121 ± 42
16R6-2	Q61K	P387S	>10000	123 ± 65
16R6-4	Q61K, A146T	P387S	>10000	>900
12R5-1	WT	K59del	>10000	>1000
12R5-5	WT	K59del	>10000	>900

平均値±標準偏差 (n≥3)
Data source: 2011N116394_00 の Table 1

2.6.2.2.1.3.7.2.　　YUSIT1 細胞株より単離した耐性細胞クローンでの検討

方法

BRAF V600K 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 YUSIT1 細胞株に 0.1 μM の GSK2118436 を曝露することにより耐性を誘導した単一細胞クローンを限界希釈法により単離した後、これらの RAS、RAF、MEK、PIK3CA 及び PTEN 遺伝子における変異の有無を確認した（2011N116394_00）。また、CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を計測し、増殖抑制作用の IC50 を算出した。

結果

GSK2118436 に耐性を獲得した細胞クローン（GSK2118436 に対する感受性は親細胞株の 1/35 以下）は、GSK1120212B に対する感受性も約 1/7～1/3（IC50＝2.3～5.0 nM）に低下した（表 2.6.2-7）。

表 2.6.2-7　YUSIT1 細胞株由来 GSK2118436 耐性細胞クローンに対する増殖抑制作用

細胞株	NRAS 獲得変異	IC50 (nM)	
		GSK2118436	GSK1120212B
YUSIT1 (親細胞株)	野性型	14 ± 3	0.7 ± 0.2
YUSIT1-B11	Q61K	527 ± 146	2.3 ± 0.8
YUSIT1-B29	ND	658 ± 250	2.6 ± 1.1
YUSIT1-B27	Q61K	850 ± 160	2.9 ± 0.7
YUSIT1-B10	Q61K	979 ± 353	2.8 ± 0.8
YUSIT1-B31	Q61K	997 ± 154	2.6 ± 0.5
YUSIT1-B25	Q61K	2058 ± 1079	2.6 ± 0.4
YUSIT1-B24	Q61K	>1000	2.6 ± 0.5
YUSIT1-B4	Q61K	>1000	4.1 ± 0.3
YUSIT1-B5	Q61K	>2000	4.9 ± 1.7
YUSIT1-B14	Q61K	>4000	4.6 ± 1.6
YUSIT1-B7	Q61K	>10000	3.1 ± 0.3
YUSIT1-B6	Q61K	>10000	5.0 ± 2.1

平均値±標準偏差 (n≥3)、ND：実施せず、親細胞株は BRAF V600K 変異及び MEK2 E27K 変異陽性
Data source: 2011N116394_00 の Table 2

まとめ

BRAF V600E 又は V600K 変異陽性ヒト悪性黒色腫由来のそれぞれ A375P F11 又は YUSIT1 細胞株を高濃度の GSK2118436 存在下で 1 週間以上培養し、GSK2118436 に対して耐性を獲得した単一細胞クローンを単離した。それらの耐性細胞クローンでは NRAS 又は MEK1 あるいはその両方に変異（NRAS：Q61K 及び A146T 変異、MEK1：K59 の欠失（インフレーム変異；K59del）又は P387S のミスセンス変異）が検出された。これらの耐性細胞クローンは、GSK1120212B に対する感受性も 1/200 未満～約 1/3 に低下していた。

2.6.2.2.1.4.　細胞周期に及ぼす影響

MEK-ERK 経路は細胞周期を調節する各因子の発現を調節しており、MEK-ERK 経路が阻害されると、細胞周期抑制因子である p15 及び p27 の発現が増加し、細胞周期促進因子であるサイクリン A、D1 及び E の発現が低下する[Yamaguchi, 2011]。その結果、細胞周期抑制因子である retinoblastoma（RB）蛋白の活性化（リン酸化の抑制）及び細胞周期促進因子の機能抑制が誘導され、細胞周期は G1 期で停止すると考えられている[Yamaguchi, 2011; Dick, 2013]。そこで、GSK1120212A の細胞周期に関連する因子（サイクリン A、D1、D2 及び E 並びに CDK2、CDK4、CDK6、p15、p18、p27、p53、p57、c-Myc 及び RB）に及ぼす影響を検討した。

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HT29 細胞株に GSK1120212A（10 nM）を添加し、15 分間又は 1、2、4、8、16、24、48 あるいは 72 時間培養した（UH2008/00045/00）。サイクリン A、D1、D2 及び E 並びに CDK2、CDK4、CDK6、p15、p18、p27、p53、p57、c-Myc、RB、MEK 及び ERK の蛋白レベル、また、RB、MEK 及び ERK のリン酸化レベルをウエスタンブロット法により測定した。

結果

ヒト結腸直腸癌由来 HT29 細胞株において、ERK リン酸化レベルは GSK1120212A の添加 15 分後に低下し、MEK リン酸化レベルは 1 時間後に低下した。GSK1120212A の添加 2 時間後に c-Myc 蛋白レベル並びに 4 時間後にサイクリン D1 及び D2 蛋白レベルが低下し、16 時間後に p15 及び p27 蛋白レベルが増加し、サイクリン A 蛋白レベルが低下した。また、16 時間後には RB のリン酸化レベルが低下し、24 時間後にサイクリン E、CDK2、CDK4 及び RB の蛋白レベルがわずかに低下した。MEK、ERK、p53、p18、p57 及び CDK6 の蛋白レベルには変化は認められなかった。

2.6.2.2.1.5.　アポトーシス誘導作用

MEK-ERK 経路はアポトーシスの誘導に関与していると考えられている[Santarpia, 2012]。そこで、GSK1120212A のアポトーシス誘導作用を検討した。

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HT29 並びに Colo205 細胞株をそれぞれ 10 及び 100 nM 並びに 1 及び 10 nM の GSK1120212A 存在下で 1、2、3 又は 4 日間培養した（UH2008/00045/00）。Propidium iodide で細胞内 DNA を染色し、アポトーシスのマーカーであるサブ G1 分画（DNA の断片化を検出）をフローサイトメトリーにより測定した。また、ウエスタンブロット法によりアポトーシスのマーカーであるカスパーゼ 3、7 及び 9 並びに PARP の切断（活性化）を検討した。

結果

GSK1120212A はいずれの細胞株においても培養 1 日目に G0/G1 期のピークを増加させ、細胞周期の停止を誘導した。その後、G0/G1 期のピークは減少し、HT29 細胞株では 100 nM で、Colo205 細胞株では 10 nM でサブ G1 分画が出現し、培養 3 及び 4 日目にその増加が認められた。また、GSK1120212A はカスパーゼ 3、7 及び 9 並びに PARP の切断（活性化）を誘導した。GSK1120212A によるカスパーゼの活性化は、サブ G1 分画の増加が誘導される濃度で認められ、時間経過も一致していた。

まとめ

ヒト結腸直腸癌由来 HT29 細胞株において、GSK1120212A は MEK 及び ERK のリン酸化レベルを低下させ、細胞周期抑制因子である p15 及び p27 蛋白レベルの増加並びに細胞周期促進因子である c-Myc 並びにサイクリン A、D1 及び D2 蛋白レベルの低下を誘導した。また、サイクリン E、CDK2、CDK4 及び RB の蛋白レベルをわずかに低下させ、細胞周期の停止にかかわる RB リン酸化レベルを低下させた。

ヒト結腸直腸癌由来 HT29 及び Colo205 細胞株において、GSK1120212A は G0/G1 期のピークを増加させ細胞周期の停止を誘導した後、サブ G1 分画（DNA の断片化を検出）を増加させた。また、GSK1120212A はカスパーゼ 3、7 及び 9 並びに PARP の切断（活性化）を誘導し、カスパーゼの活性化は、サブ G1 分画の増加と関連していた。

2.6.2.2.1.6.　　獲得耐性に関する検討

アロステリック MEK 阻害薬の耐性獲得メカニズムは報告されていないため、KRAS 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HCT116 細胞株を高濃度の GSK1120212B で 2 週間以上処理して耐性細胞クローンを単離し、耐性化にかかわる要因について検討した。

2.6.2.2.1.6.1.　　耐性細胞クローンの遺伝子配列解析

GSK1120212B に対する耐性メカニズムを解明する一環として、耐性を示す細胞クローンの遺伝子配列解析を行った。

方法

KRAS 変異陽性であり、ミスマッチ修復機構を欠損しているヒト結腸直腸癌由来 HCT116 細胞株を数週間かけて GSK1120212B の濃度を 100 nM～1 μM まで段階的に増加させながら処理し、高濃度である 1 μM でも増殖可能な GSK1120212B 耐性の細胞集団である HCT116（212-Res）細胞株を単離した（UH2008/00029/00）。その後、限界希釈法により耐性細胞クローン（4 種類）を単離した。

GSK1120212B に対する耐性の獲得を確認するために、HCT116（212-Res）細胞株に GSK1120212B を添加して 72 時間培養した後、CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を計測し、親細胞株（HCT116 細胞株）に対する感受性と比較した。また、耐性細胞クローンの 1 種類（クローン 4）について ERK リン酸化レベルをウエスタンブロット法により測定し、親細胞株と比較した。耐性化にかかわる要因を検討するために、耐性細胞クローンの MEK1、MEK2、ERK1 及び ERK2 遺伝子の配列解析を行った。

結果

GSK1120212B に耐性を獲得した HCT116（212-Res）細胞株に対する GSK1120212B の増殖抑制作用の IC50 は 3.3 μM であり、親細胞株に対する IC50（2 nM）と比較して感受性は 1/1650 に低下した。HCT116（212-Res）細胞株は PD325901 に対しても耐性を示した（IC50 ＞10 μM）。また、耐性細胞クローン（クローン 4）に対して、GSK1120212B は ERK リン酸化阻害作用を示さなかった。

GSK1120212B 耐性細胞クローンの配列解析を行った結果、MEK2 における L119P のアミノ酸置換を起こす単一点突然変異がみられたが、MEK1 及び ERK1/2 にアミノ酸変異は認められなかった（表 2.6.2-8）。

表 2.6.2-8　GSK1120212B に耐性を示す HCT116（212Res）細胞株から単離した耐性細胞クローンにおける遺伝子及びアミノ酸変異

遺伝子	サンプル	塩基対変異	アミノ酸変異
MEK1	HCT116 親細胞株	変異なし	変異なし
	耐性細胞クローン 1, 3, 4, 5	変異なし	変異なし
MEK2	HCT116 親細胞株	*C192C/T*	サイレント
	耐性細胞クローン 1, 3, 4, 5	*T356T/C*	L119P
ERK1	HCT116 親細胞株	*G156G/A*	サイレント
	耐性細胞クローン 1, 3, 4, 5	*G156G/A*	サイレント
ERK2	HCT116 親細胞株	変異なし	変異なし
	耐性細胞クローン 1, 3, 4, 5	変異なし	変異なし

Data source: UH2008/00029/00 の Table 1

2.6.2.2.1.6.2.　MEK2 RNA 干渉による検討

GSK1120212B に対する耐性化にかかわる要因を解明するために、MEK2 における単一点突然変異により耐性を獲得した耐性細胞クローン（2.6.2.2.1.6.1.）に対する MEK2 ノックダウンの影響を検討した。

方法

GSK1120212B 耐性細胞クローン（クローン 4）に MEK2 siRNA（100 nM）又はコントロールとして non-silencing siRNA をトランスフェクトした（UH2008/00029/00）。トランスフェクトの 24 時間後に CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を測定した。

結果

GSK1120212B 耐性細胞クローン（クローン 4）に non-silencing siRNA を導入しても、GSK1120212B に対する耐性を維持していたが（IC50＝2565 nM）、MEK2 をノックダウンさせる siRNA を導入することにより、GSK1120212B に対する感受性は回復した（IC50＝72 nM）。

まとめ

HCT116 細胞株を高濃度の GSK1120212B で 2 週間以上曝露し、GSK1120212B に耐性を獲得した HCT116（212-Res）細胞株に対する GSK1120212B の増殖抑制作用の IC50 は 3.3 μM であり、親細胞株に対する IC50（2 nM）と比較して感受性は 1/1650 に低下した。HCT116（212-Res）細胞株は PD325901 に対しても耐性を示した（IC50＞10 μM）。GSK1120212B 耐性細胞クローンの遺伝子配列解析を行った結果、MEK2 における L119P のアミノ酸置換を起こす単一点突然変異がみられた。MEK2 のノックダウンにより、GSK1120212B 耐性細胞クローン（クローン 4）（IC50＝2565 nM）の GSK1120212B に対する感受性は回復した。

2.6.2.2.1.7.　代謝物の薬理活性

GSK1120212B のヒトでの主な血漿中代謝物は GSK1790627（M5：脱アセチル体）及び GSK3002415A（M7：M5 の酸化体）である（2.6.4.1.及び 5.3.3.2.：2012N134931_00）。M5 の in vitro における薬理活性を評価するため、MEK 阻害作用並びに BRAF V600E 変異陽性 SK-MEL-28 細胞株における ERK リン酸化阻害作用及び細胞増殖抑制作用を検討し、未変化

体（GSK1120212B）の作用と比較した。また、M7 の in vitro における P-MEK1 活性に対する阻害作用を検討し、M5 及び未変化体の作用と比較した。

2.6.2.2.1.7.1.　　M5 の薬理活性

方法

MEK 阻害作用

GSK1120212B 又は M5 の U-MEK1 の活性化（キナーゼ活性の発現）及び P-MEK1 活性（ERK をリン酸化する活性）に対する阻害作用を、それぞれ 2.6.2.2.1.1.1.及び 2.6.2.2.1.1.4.と同様の方法で検討した（2012N139081_00）。

ERK 阻害作用

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株を一連の濃度の GSK1120212B 又は M5 で 1 時間処理した。細胞を洗浄後、リン酸化 ERK に対する抗体を用いたウエスタンブロット法により、ERK リン酸化レベルを測定した。

細胞増殖抑制作用

SK-MEL-28 細胞株を 0.014 nM～7.3 μM の GSK1120212B 又は M5 存在下で 72 時間培養し、CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を測定した。

結果

M5 の U-MEK1 の活性化に対する阻害作用の IC50（1.01 nM）は GSK1120212B の IC50（0.72 nM）の 1.4 倍であった（表 2.6.2-9）。また、M5 の P-MEK1 活性に対する阻害作用の IC50（34.55 nM）は、GSK1120212B の IC50（14.10 nM）の 2.5 倍であったことから（表 2.6.2-9）、M5 の MEK 阻害作用は、GSK1120212B と同程度であることが示された。

同様に、M5 の SK-MEL-28 細胞株における ERK リン酸化阻害作用の IC50（2.0 nM）は、GSK1120212B の IC50（1.6 nM）の 1.3 倍であり、M5 の細胞増殖抑制作用の IC50（1.7 nM）は、GSK1120212B の IC50（0.9 nM）の 1.9 倍であったことから（表 2.6.2-9）、M5 の ERK リン酸化阻害作用及び細胞増殖抑制作用も、GSK1120212B と同程度であることが示された。

表 2.6.2-9　　代謝物 M5 の薬理活性

被験物質	IC50 (nM)			
	全長キナーゼにおける検討		SK-MEL-28 細胞株における検討	
	U-MEK1 活性化阻害作用	P-MEK1 活性阻害作用	ERK リン酸化阻害作用	細胞増殖抑制作用
GSK1120212B	0.72 ± 0.01 (21)	14.10 ± 0.35 (24)	1.6 ± 0.6 (2)	0.9 ± 0.3 (4)
M5	1.01 ± 0.05 (2)	34.55 ± 6.15 (2)	2.0 ± 0.1 (2)	1.7 ± 0.1 (2)

平均値±標準偏差、括弧内の数値は例数
Data source: 2012N139081_00 の Table 1

2.6.2.2.1.7.2.　　M7 の薬理活性

方法

GSK1120212B、M5 又は M7 の P-MEK1 活性（ERK をリン酸化する活性）に対する阻害作用を 2.6.2.2.1.1.4.と同様の方法で検討した（2012N148387_00）。

結果

M7 の P-MEK1 活性に対する阻害作用の IC50 は 73 nM であり、阻害活性は未変化体（GSK1120212B；IC50＝7.0 nM）の約 1/10 と弱かった（表 2.6.2-10）。なお、M5 の P-MEK1 活性に対する阻害作用の IC50 は 9.0 nM であり、未変化体の活性と同程度であった（表 2.6.2-10）。

表 2.6.2-10　　代謝物 M7 の薬理活性

被験物質	P-MEK1 活性阻害作用：IC50 (nM)
GSK1120212B (未変化体)	7.0 ± 0.1
M5	9.0 ± 1.0
M7	73 ± 4

平均値±標準偏差 (n=2)
Data source: 2012N148387_00 の Table 1

まとめ

ヒトでの主な代謝物である M5 及び M7 の in vitro における薬理活性を GSK1120212B と比較した。M5 の U-MEK1 の活性化（キナーゼ活性の発現）及び P-MEK1 活性（ERK をリン酸化する活性）に対する阻害作用、並びにヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株における ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用は、いずれも GSK1120212B と同程度であった。一方、M7 の P-MEK 活性に対する阻害作用は GSK1120212B の約 1/10 と弱かった。

2.6.2.2.1.8.　　ラット、イヌ及びヒト末梢血単核細胞を用いた in vitro におけるサロゲートマーカーの検討

GSK1120212B の薬理活性を評価するサロゲートマーカーとして、末梢血単核細胞（PBMC）における ERK リン酸化レベルが利用できるか否かを in vitro において検討した。

方法

ラット、イヌ及びヒトの血液に、GSK1120212B（0.13 nM～2.5 μM）を添加した後、PMA（1 μM）で 30 分間（37°C）刺激した（UH2008/00030/00）。その後、PBMC を単離し、ERK リン酸化レベルを ELISA 法により測定した。

結果

GSK1120212B は、PMA 刺激ヒト PBMC における ERK リン酸化を濃度依存的に阻害し、その IC50 は 60.44 及び 24.5 nM であった（表 2.6.2-11）。

PMA 刺激イヌ PBMC における GSK1120212B の ERK リン酸化阻害作用の IC50 はヒトの 1/3 未満であり、ヒト PBMC と比較して有意に低かった。一方、PMA 刺激ラット PBMC における GSK1120212B の IC50 はヒトと同程度であった。

表 2.6.2-11　　ラット、イヌ及びヒト PBMC における ERK リン酸化阻害作用

動物種	IC50 (nM)	
	試験 1	試験 2
ヒト	60.44 ± 28.79	24.5 ± 4.95
イヌ	18.55 ± 7.88*	-
ラット	-	30.25 ± 6.70

平均値±標準偏差 (n=2～4)、- : 実施せず
* : p<0.05 vs ヒト PBMC (t-検定)
Data source: UH2008/00030/00 の Table 1 及び 2

まとめ

GSK1120212B は PMA 刺激ヒト、イヌ及びラット PBMC における ERK リン酸化を濃度依存的に阻害した。阻害作用の IC50 はヒト及びラットでは同程度であり、イヌではヒトと比較して低値であった。

2.6.2.2.2.　In vivo 試験

2.6.2.2.2.1.　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおける検討

2.6.2.2.2.1.1.　ERK リン酸化阻害作用（単回経口投与による作用持続時間）

方法

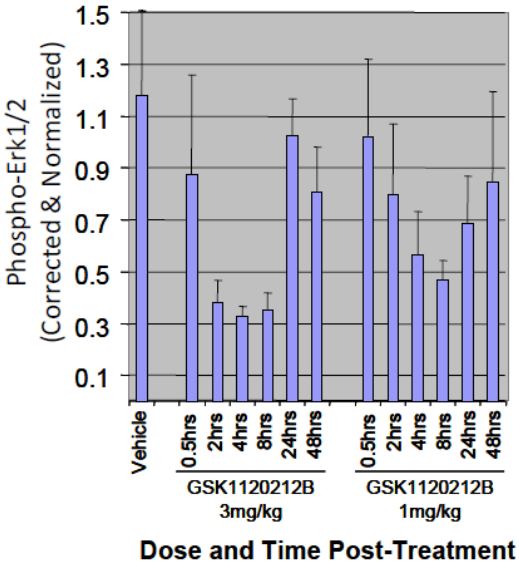
BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株の懸濁液を雌無胸腺ヌードマウス（CD1 *nu/nu*）の皮下に移植し、腫瘍を 1～4 週間増殖（腫瘍塊の体積は 120～450 mm^3）させた後、GSK1120212B（1 又は 3 mg/kg）を単回経口投与した（UH2008/00051/03）。投与 0.5、2、4、8、24 又は 48 時間後に腫瘍組織を採取し、ERK 及びリン酸化 ERK 量をウエスタンブロット法により測定し、総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の比を算出した。また、腫瘍組織採取時に採血し、LC-MS/MS 法により血中 GSK1120212 濃度を測定した。

結果

GSK1120212B は 1 mg/kg の経口投与により投与 4 時間後から腫瘍組織において ERK リン酸化阻害作用を示し、阻害作用は 8 時間後まで持続したが、24 時間後では作用が減弱する傾向がみられた（図 2.6.2-15）。

3 mg/kg では投与 2 時間後から ERK リン酸化阻害作用が認められ、阻害作用は 8 時間後まで持続したが、24 時間後では阻害作用は認められなかった（図 2.6.2-15）。また、3 mg/kg では 1 mg/kg と比較してより強い阻害作用がみられた（図 2.6.2-15）。

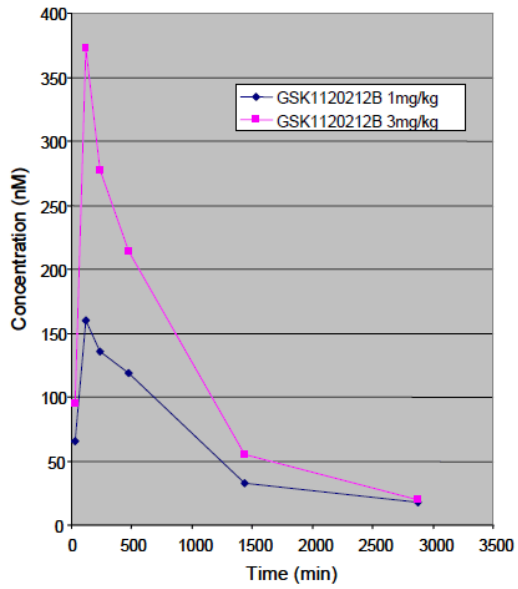
GSK1120212B の 1 及び 3 mg/kg を単回経口投与したとき、作用の持続がみられた 8 時間（480 分）後の血中 GSK1120212 濃度は 100 nM を超えており、作用がみられなかった 24 時間（1440 分）後では 100 nM を下回っていた（図 2.6.2-16）。



平均値±標準偏差 (n=4)
縦軸：総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の比
Vehicle：媒体 (0.5% HPMC-0.1% Tween 80 溶液)

図 2.6.2-15　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおける ERK リン酸化阻害作用

Data source: UH2008/00051/03 の Figure 1



平均値 (n=4)

図 2.6.2-16　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおける単回投与後の血中 GSK1120212 濃度推移

Data source: UH2008/00051/03 の Figure 2

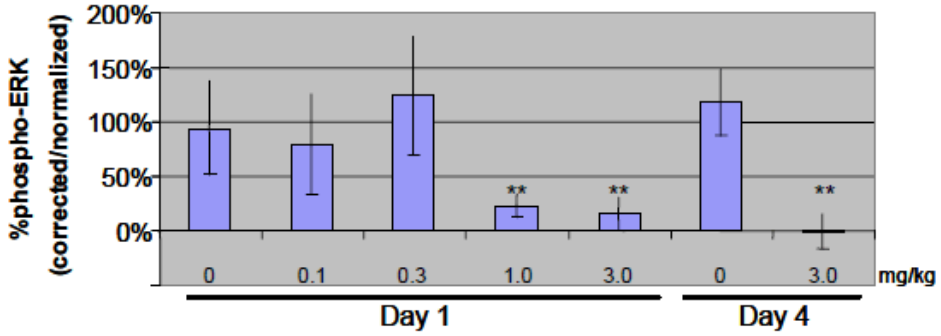
2.6.2.2.2.1.2.　ERK リン酸化阻害作用（単回経口投与による用量反応性及び 4 日間経口投与）

方法

2.6.2.2.2.1.1.と同様の方法で腫瘍を増殖させた後、GSK1120212B の 0.1、0.3、1 あるいは 3 mg/kg を単回又は 3 mg/kg を 1 日 1 回 4 日間経口投与した（UH2008/00051/03）。1 又は 4 日目の投与 4 時間後に腫瘍組織を採取し、ERK 及びリン酸化 ERK 量を ELISA 法により測定し、総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の割合を算出した。

結果

GSK1120212B は 1 及び 3 mg/kg の単回経口投与並びに 3 mg/kg の 4 日間経口投与により、媒体投与と比較して総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の比を有意に低下させた（図 2.6.2-17）。4 日間経口投与したときの ERK リン酸化阻害作用は、単回経口投与したときと比較してより強い傾向がみられた（図 2.6.2-17）。



平均値±標準偏差 (n=3)
**：p<0.01 vs 媒体群 (t-検定)
縦軸：総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の割合
0 (媒体)：0.5% HPMC-0.1% Tween 80 溶液

図 2.6.2-17　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおける単回及び 4 日間経口投与後の ERK リン酸化阻害作用

Data source: UH2008/00051/03 の Figure 10

2.6.2.2.2.1.3.　ERK リン酸化阻害作用（単回並びに 7 及び 14 日間経口投与）

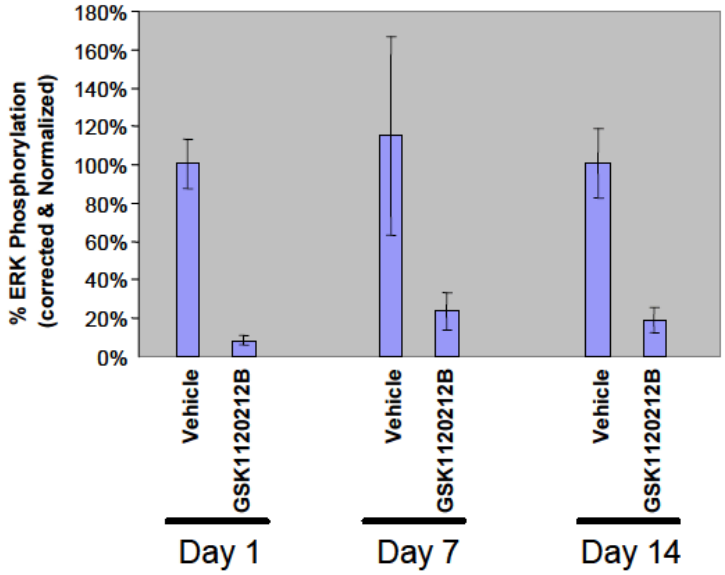
方法

2.6.2.2.2.1.1.と同様の方法で腫瘍を増殖させた後、GSK1120212B（3 mg/kg）を単回又は 1 日 1 回 7 あるいは 14 日間経口投与した（UH2008/00051/03）。1、7 又は 14 日目の投与 4 時間後に腫瘍組織を採取し、ERK 及びリン酸化 ERK 量を ELISA 法により測定し、総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の割合を算出した。

結果

GSK1120212B は 3 mg/kg の単回並びに 1 日 1 回 7 及び 14 日間経口投与により、総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の比を低下させた（図 2.6.2-18）。また、14 日間経口投与にお

いても、単回経口投与と同程度の ERK リン酸化阻害作用がみられ、阻害作用は減弱しないことが示された（図 2.6.2-18）。



平均値±標準偏差 (n=3)
GSK1120212B の用量：3 mg/kg
Vehicle：媒体 (0.5% HPMC-0.1% Tween 80 溶液)
縦軸：総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の割合

図 2.6.2-18　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおける単回並びに 7 及び 14 日間経口投与後の ERK リン酸化阻害作用

Data source: UH2008/00051/03 の Figure 3

2.6.2.2.2.2.　p27 蛋白レベル増加作用

p27 は細胞周期抑制因子であり、細胞周期を G1 期で停止させることが知られている[Khattar, 2010]。また、MAPK 及び PI3K 経路のいずれも、p27 の発現調節に関与していることが報告されている[Khattar, 2010]。そこで、BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルの腫瘍組織において、GSK1120212B の p27 蛋白レベルに及ぼす影響を検討した。

方法

2.6.2.2.2.1.1.と同様の方法で腫瘍を増殖させた後、GSK1120212B の 3 mg/kg を 1 日 1 回 7 日間経口投与し、投与 4 時間後に腫瘍組織を採取し、ウエスタンブロット法により p27 蛋白を検出した（UH2008/00051/03）。

結果

GSK1120212B は 3 mg/kg の 1 日 1 回 7 日間経口投与により G1 期停止のマーカーである p27 蛋白レベルを増加させた（図 2.6.2-19）。



GSK1120212B の 3 mg/kg を 1 日 1 回 7 日間経口投与し、最終投与の 4 時間後に測定
Tumor#1～3：各群 n=3
Vehicle：媒体 (0.5% HPMC-0.1% Tween 80 溶液)
上図：マウス抗 p27 抗体、下図：ウサギ抗 p27 抗体を用いて検討

図 2.6.2-19　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルの腫瘍組織における p27（G1 期停止のマーカー）蛋白レベル増加作用

Data source: UH2008/00051/03 の Figure 5

2.6.2.2.2.3.　腫瘍増殖抑制作用

方法

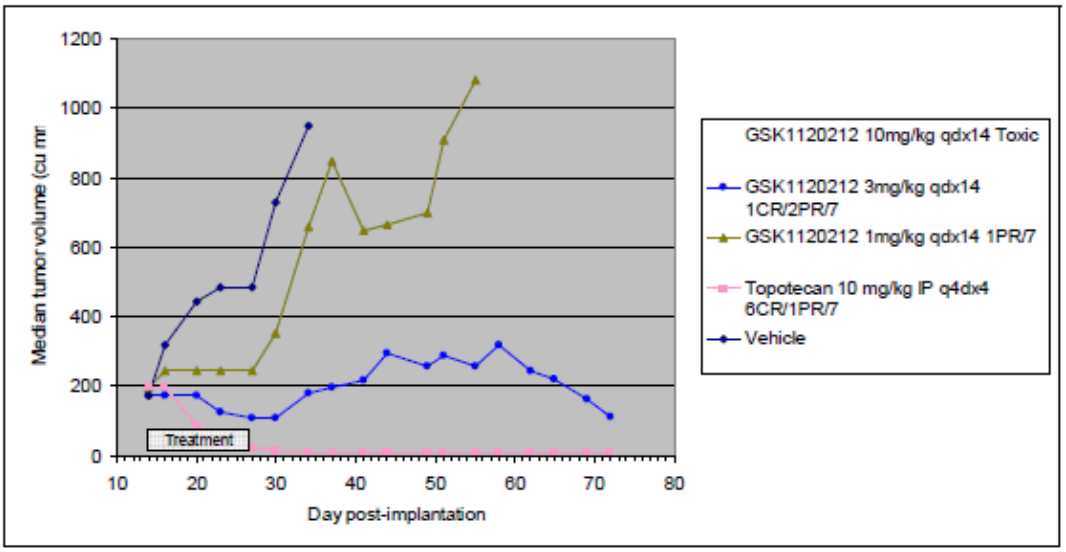
2.6.2.2.2.1.1.と同様の方法で腫瘍を増殖させた後、GSK1120212B の 1、3 又は 10 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間経口投与した（UH2008/00051/03）。比較対照薬として、ノギテカンの 10 mg/kg を 4 日間隔で 4 回腹腔内投与した。腫瘍の長径と短径を週 2 回測定し、腫瘍体積（長径×短径^2×0.5）を算出した。本薬の投与 13 日目に、媒体群に対する腫瘍増殖抑制率を算出した。最終測定時の腫瘍体積について、ANCOVA 検定法及び Stepdown Bonferroni 検定法により、媒体群との間で統計解析を行った。

腫瘍の完全退縮は個々の腫瘍体積が 13 mm^3 未満の場合と定義し、部分的退縮は個々の腫瘍体積が投与開始時の 50%程度の場合と定義した。

結果

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて、GSK1120212B の 1 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間経口投与することにより、7 例中 1 例で部分的退縮が認められ、抑制率は 49.6%であり、統計学的有意差が認められた（図 2.6.2-20、表 2.6.2-12）。3 mg/kg では、7 例中 1 例で完全退縮が、2 例で部分的退縮が認められ、抑制率は 77.8%であり、統計学的有意差が認められた（図 2.6.2-20、表 2.6.2-12）。10 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間経口投与したときには忍容性が認められなかった。

ノギテカンは 10 mg/kg の 4 日間隔 4 回腹腔内投与により、腫瘍の退縮が全例にみられた（図 2.6.2-20）。



縦軸：腫瘍体積中央値 (mm^3)、横軸：腫瘍移植後の日数
平均値 (n=7)
qd：1 日 1 回投与、CR：完全退縮、PR：部分的退縮、Topotecan：ノギテカン
Vehicle：媒体 (0.5% HPMC-0.1% Tween 80 溶液)
10 mg/kg の 1 日 1 回 14 日間経口投与は忍容性を示さず

図 2.6.2-20　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用（腫瘍体積中央値）

Data source: UH2008/00051/03 の Figure 13

表 2.6.2-12　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用（腫瘍増殖抑制率）

群	腫瘍体積 中央値 (mm^3)	腫瘍増殖 抑制率 (%)	ANCOVA p 値	Stepdown Bonferroni p 値	CR/PR (7 例中)
媒体	486	0	-	-	-
GSK1120212B、1 mg/kg 1 日 1 回 14 日間経口投与	245	49.6	0.0033	0.0066	1PR
GSK1120212B、3 mg/kg 1 日 1 回 14 日間経口投与	108	77.8	<0.0001	0.0006	1CR/2PR
GSK1120212B、10 mg/kg 1 日 1 回 14 日間経口投与	忍容性なし	-	-	-	-
ノギテカン、10 mg/kg 4 日間隔 4 回腹腔内投与	23	95.4	-	-	6CR/1PR

腫瘍増殖抑制率は、投与 13 日目の腫瘍体積から算出した。p 値は $p<0.05$ を有意差ありと判断した。
CR：完全退縮、PR：部分的退縮、-：該当せず又は実施せず
Data source: UH2008/00051/03 の Table 4

まとめ

V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルの腫瘍組織において、GSK1120212B は ERK のリン酸化を用量依存的に阻害し、ERK リン酸化

阻害作用が持続していた 8 時間後の血中 GSK1120212 濃度は 100 nM を超えており、作用が認められなかった 24 時間後では 100 nM を下回っていた。GSK1120212B の ERK リン酸化阻害作用は 14 日間経口投与においても、減弱しなかった。また、GSK1120212B は 3 mg/kg の 1 日 1 回 7 日間経口投与により、腫瘍組織において G1 期停止のマーカーである p27 蛋白レベルを増加させた。更に、GSK1120212B は 1 及び 3 mg/kg の 1 日 1 回 14 日間経口投与により、腫瘍増殖を有意に抑制した。

2.6.2.2.2.4.　　サロゲートマーカーの検討

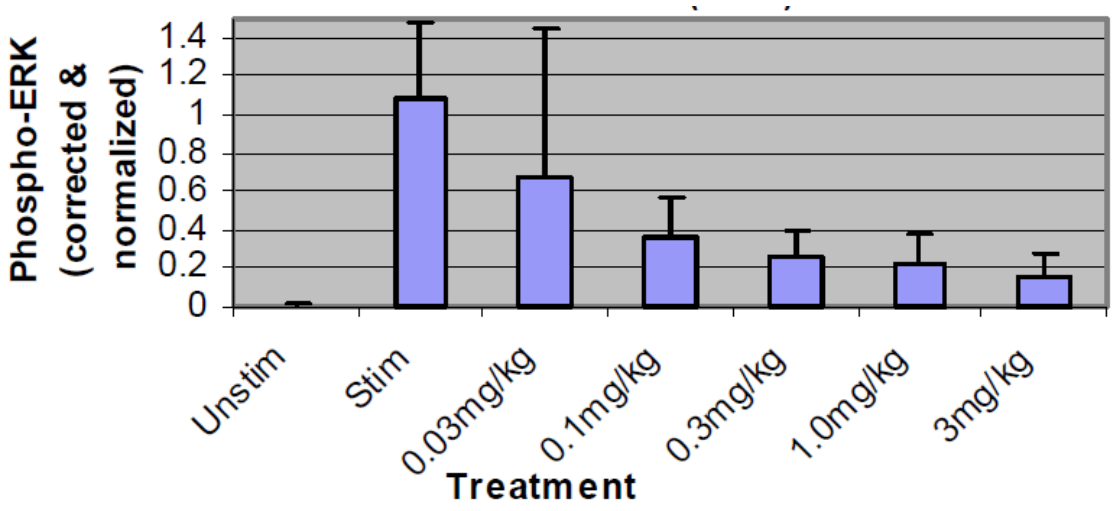
PBMC における ERK リン酸化阻害作用が GSK1120212B の薬理活性を評価するためのサロゲートマーカーとして利用できるか否かを in vivo において評価するため、GSK1120212B を経口投与したマウスから PBMC を単離して ERK リン酸化阻害作用を検討した。

方法

雌無胸腺ヌードマウス（CD1 *nu/nu*）に GSK1120212B（0.03、0.1、0.3、1 及び 3 mg/kg）を単回経口投与し、4 時間後に採血した。その後、2.6.2.2.1.8.と同様の方法で PBMC を単離し、PMA（20 μM）で 30 分間刺激した後、ERK 及びリン酸化 ERK 量を ELISA 法により測定し、総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の比を算出した（UH2008/00030/00）。

結果

GSK1120212B（0.03～3 mg/kg）を経口投与したマウスから単離した PBMC における総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の比は、GSK1120212B の用量に依存して低下した（図 2.6.2-21）。



平均値±標準偏差 (n=3)
Unstim：刺激なし、Stim：PMA で刺激
縦軸：総 ERK 量に対するリン酸化 ERK 量の比

図 2.6.2-21　　GSK1120212B を投与したマウスから単離した PBMC における ERK リン酸化阻害作用

Data source: UH2008/00030/00 の Figure 3

まとめ

GSK1120212B を投与したマウスから単離した PBMC の ERK リン酸化レベルは、GSK1120212B の用量に依存して低下した。

2.6.2.3.　副次的薬理試験

2.6.2.3.1.　各種受容体、チャネル、酵素及びキナーゼに及ぼす影響

23 種類の各種受容体及びチャネル並びに 7 種類の各種酵素に及ぼす GSK1120212A の影響を検討した（CD2007/01300/00）。GSK1120212A は 10 μM で 50%を超える阻害作用を示さなかった（IC50＞10 μM）。

各種キナーゼに及ぼす影響（選択性）の項（2.6.2.2.1.2.）に記載したとおり、43 種類の各種キナーゼ（UH2008/0021/00）及び 171 種類の各種キナーゼ（UH2008/00047/00）に及ぼす影響をパネル法により検討した結果、GSK1120212A 及び GSK1120212B は 10 μM で 50%を超える阻害作用を示さなかった（IC50＞10 μM）。

2.6.2.3.2.　正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）の増殖に及ぼす影響

方法

HUVEC を GSK1120212B（0.014 nM～7.3 μM）存在下で 72 時間培養し、CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を測定し、増殖抑制作用の IC50 を算出した（UH2007/00097/02）。なお、HUVEC に対する影響は、増殖因子非存在下及び存在下の条件下で検討した。

結果

GSK1120212B は増殖因子非存在下において HUVEC の細胞数に影響を及ぼさなかった（IC50＝10000 nM）。一方、増殖因子存在下では、増殖抑制作用を示した（IC50＝4 nM）。

2.6.2.4.　安全性薬理試験

2.6.2.4.1.　中枢神経系に及ぼす影響

雄 SD ラット（4 匹）に GSK1120212B の 100 mg/kg を単回経口投与し、Irwin 試験の変法により投与 1、2、3、4 及び 24 時間後の一般状態及び行動を評価した（CD2007/01303/00）。

100 mg/kg で体重増加の抑制がみられた（体重増加は媒体群の 1/3）。また、自発運動量の減少（投与 2 及び 24 時間後）、腹臥位（投与 2 及び 3 時間後）、眼瞼下垂（投与 3、4 及び 24 時間後）、下痢（投与 4～24 時間後）、立毛（投与 24 時間後）及び散瞳（投与 24 時間後）が認められた。

2.6.2.4.2.　呼吸系に及ぼす影響

覚醒雄 SD ラット（4 匹、ラテン方格クロスオーバー法）に GSK1120212B の 0.016、0.0625 及び 0.125 mg/kg（0.125、0.5 及び 1 mg/m^2）を単回経口投与し、換気機能（一回換気量、呼吸数及び分時換気量）、気道抵抗（総肺抵抗）及び体温を投与 5 日後まで測定した（CD2007/00963/00）。

0.125 mg/kg で軽度で一過性の体温低下（最大 0.8°C、投与 1 時間後）がみられた。換気機能及び気道抵抗に影響は認められなかった。

2.6.2.4.3.　心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.3.1.　hERG アッセイ

GSK1120212B は hERG cDNA を導入した HEK293 細胞（n=5）において、hERG チャネルテール電流を抑制し、IC25、IC50 及び IC75 はそれぞれ 0.448、1.54 及び 5.30 μM（275.7、947.7 及び 3261.7 ng/mL）であった（FD2007/00151/00）。

2.6.2.4.3.2.　ウサギ左心室ウェッジ標本を用いた試験

雌ウサギ左心室ウェッジ標本（n=4）において、0.3、1、10 及び 30 μM（約 180、620、6150 及び 18450 ng/mL）の濃度で（18450 ng/mL は溶解限界濃度）、GSK1120212B の QT 間隔及び Tp-e 間隔への影響並びに早期後脱分極の誘発の可能性を評価した（UH2007/00108/00）。

GSK1120212B は QT 間隔に影響を及ぼさなかった。GSK1120212B は 10 及び 30 μM で等尺性収縮力をそれぞれ 16.3 及び 64.8%低下させ、いずれも有意差がみられた（t-検定）。また、30 μM で Tp-e 間隔を約 26%短縮させ、有意差がみられた（t-検定）。

2.6.2.4.3.3.　イヌにおける in vivo 試験

2.6.2.4.3.3.1.　静脈内投与（非 GLP 試験）

麻酔雄ビーグル犬（3 匹、クロスオーバー法）において GSK1120212A の 1 mg/kg（20 mg/m^2）を静脈内投与（10 分間持続投与）し、心電図パラメータ（PR 間隔、QRS 幅、RR 間隔、QT 間隔及び QTc 間隔）、血圧及び心拍数に及ぼす影響を検討した（CD2007/01301/00）。投与前、投与 1、3、5、10、15 及び 30 分後にこれらの評価項目並びに血漿中 GSK1120212 濃度を測定した。

GSK1120212A は心電図パラメータ、血圧及び心拍数に影響を及ぼさなかった。血漿中 GSK1120212 濃度は投与開始 10 分後まで増加し、最高血漿中 GSK1120212 濃度は 2.5 μM（約 1500 ng/mL）であった。

2.6.2.4.3.3.2.　経口投与（GLP 試験）

覚醒雄ビーグル犬（4 匹、ラテン方格クロスオーバー変法）に GSK1120212B の 0.025、0.038 及び 0.075 mg/kg（0.5、0.75 及び 1.5 mg/m^2）を単回経口投与し、テレメトリー法により動脈圧、心拍数、体温及び ECG 間隔を投与 5 日後まで測定した（CD2007/00962/00）。

GSK1120212B は動脈圧、心拍数、ECG パラメータ（波形異常、不整脈及び間隔）及び体温に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.5.　　薬力学的薬物相互作用試験

臨床において併用される GSK2118436 との併用による薬理作用を検討した in vitro 及び in vivo の試験成績は CTD 併用パートの 2.6.2（2.6.2.タフィンラー／メキニスト併用）に記載した。

2.6.2.6.　　考察及び結論

2.6.2.6.1.　　効力を裏付ける試験

2.6.2.6.1.1.　　In vitro 試験

MEK 阻害作用

GSK1120212B は U-MEK1/2 の活性化（キナーゼ活性の発現）を阻害した。U-MEK1 の活性化（MEK1 のキナーゼ活性の発現）には、MEK1 の Ser218 及び Ser222 の 2 ヵ所のリン酸化が必要であることが報告されている[Yan, 1994]。GSK1120212B は変異型 BRAF V600E の存在下で MEK1 の Ser218 のリン酸化を阻害したが、Ser222 のリン酸化には影響を及ぼさなかったことから、GSK1120212B の MEK 阻害作用の発現には、MEK1 の Ser218 のリン酸化阻害作用が重要であると考えられる。また、GSK1120212B は P-MEK1/2 活性（ERK をリン酸化する活性）を阻害し、P-MEK1 に対する阻害様式は、ATP との非競合的阻害であった。GSK1120212B は ATP 非競合的なアロステリック阻害薬である PD0325901 と P-MEK1 の結合部位において、相互排他的に競合的に結合を阻害することが示された。このことから、PD0325901 と同様に GSK1120212B は ATP 非競合的なアロステリック阻害薬であると考えられた。GSK1120212B は MEK1/2 を阻害したのに対して、43 及び 171 種類の各種キナーゼ（パネル）に対する阻害作用は弱く（IC50 の比較で＞758 倍）、MEK1/2 と最も相同性の高い MEK5 のリン酸化に対しても阻害作用を示さなかったことから、MEK1/2 に対する高い選択性が示された。これらの結果から、GSK1120212B は U-MEK の活性化（キナーゼ活性の発現）及び P-MEK 活性（ERK をリン酸化する活性）の両方を阻害する強力かつ選択的な MEK1/2 阻害薬であり、ATP 非競合的なアロステリック阻害薬として作用することが示された。

腫瘍細胞増殖抑制作用

計 320 種類（CellTiterGlo アッセイ及び DAPI 染色法による検討で用いた細胞株数の合計）のヒト腫瘍細胞株パネルを用いた網羅的検討において、BRAF 変異陽性細胞株の 88%及び RAS 変異陽性細胞株の 72%の細胞株が GSK1120212B に対して高い感受性を示した。一方、野生型 BRAF 及び RAS を有する細胞株では、28%の細胞株だけが高い感受性を示した。また、218 種類のヒト腫瘍細胞株パネル（固形癌由来）を用いた網羅的解析においても、BRAF 及び RAS 変異陽性細胞株の 80%を超える細胞株が GSK1120212B に対して高い感受性を示した。一方、野性型 BRAF 及び RAS を有する細胞株では、高い感受性を示した細胞株は 40%未満であった。また、組織別では、特に、悪性黒色腫、膵臓癌及び結腸癌由来の 80%を超える細胞株が GSK1120212B に対して高い感受性を示した。

21 株中 ERK リン酸化（Thr202/Tyr204）レベルの高い上位 25%の 5 株のうち 4 株は GSK1120212B に感受性を示した。このことから、ベースラインの ERK リン酸化レベルが非

常に高い細胞株は、GSK1120212B に対する感受性を有する可能性が考えられるが、その他の 16 株での ERK リン酸化レベルと感受性との関連性は明らかではなかったことから、効果予測因子としての有用性は高くはないと考えられる。また、DUSP6（ERK を不活性化させる働きを有している）mRNA レベルが高い細胞株の多くは GSK1120212B に対して高い感受性を示し、DUSP6 mRNA レベルが低い細胞株の多くは GSK1120212B に対する感受性が低かった。これらの試験成績から、RAF 及び RAS 変異の有無並びに ERK リン酸化レベル及び DUSP6 mRNA レベルは GSK1120212B の効果予測因子となる可能性が示された。

BRAF V600 変異陽性の 17 種類のヒト悪性黒色腫細胞株のうち、14 種類の細胞株は GSK1120212B に対して高い感受性を示し、増殖抑制作用の IC50 は 0.3～9.5 nM であった。

In vitro における薬効発現濃度（標的濃度）に関して、2.6.2.2.1.3.1.の試験で検討した細胞株のうち、4 種類の代表的な BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫細胞株に対する GSK1120212B の増殖抑制作用の IC50 を、この 4 種類のうちの 1 種類である SK-MEL-3 細胞株における ERK リン酸化阻害作用に対する高濃度ヒト血清の影響（ヒト蛋白結合の影響）を考慮した係数（11.9）を用いて補正し、GSK1120212B の薬効発現濃度（標的濃度）を算出したところ、その値は 10.40 ng/mL（15.00 nM）であることが示された（表 2.6.2-13）[2012N139008_00]

表 2.6.2-13　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用及びヒト蛋白結合を考慮した補正により算出した薬効発現濃度（標的濃度）

細胞株	由来組織	BRAF 変異	IC50 (nM)
A375	悪性黒色腫	V600E	1.25
A375	悪性黒色腫	V600E	1.22
SK-MEL-28	悪性黒色腫	V600E	1.46
SK-MEL-28	悪性黒色腫	V600E	1.68
SK-MEL-3	悪性黒色腫	V600E	0.904
SK-MEL-3	悪性黒色腫	V600E	0.901
MALME3M	悪性黒色腫	V600E	1.39
MALME3M	悪性黒色腫	V600E	1.28
平均値			1.26
ERK リン酸化阻害アッセイにおけるヒト蛋白結合を考慮した補正係数			11.9
薬効発現濃度 (nM)			15.00
薬効発現濃度 (ng/mL)			10.40

Data source: [2012N139008_00]の Table 1

これらの成績から、GSK1120212B は BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫細胞株の増殖を抑制することが示された。一方、BRAF V600 変異陽性であっても 17 種類のうち 3 種類の細胞株が GSK1120212B に対して感受性を示さなかった（2.6.2.2.1.3.5.）。当該試験ではヒト悪性黒色腫由来細胞株の RB、CDK4、PTEN 及び MEK1/2 の遺伝子変異の有無を調べ、その変異の有無が GSK1120212B に対する感受性に及ぼす影響について検討した（2011N116395_00）。その結果、GSK1120212B に対して非感受性であった 3 株のうち 2 株では MEK1 又は MEK2 に変異を有していたことから、MEK 変異が GSK1120212B の感受性に影響を与えた可能性が考えられる。CDK4 及び PTEN に関しては、変異と感受性との間に関連性は認められなかった。

GSK1120212B のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株に対する増殖抑制作用の可逆性を検討した結果、高濃度である 1000 及び 3000 nM を除き、増殖抑制作用はウォッシュアウトすることにより減弱することが示された。このことから、持続的な増殖抑制作用を発現させるためには、GSK1120212B の持続的な曝露が必要であることが示唆された。

BRAF V600 変異陽性の 2 種類のヒト悪性黒色腫由来細胞株（A375P F11 細胞株（V600E）及び YUSIT1 細胞株（V600K））を高濃度の GSK2118436 で 1 週間以上培養して耐性細胞クローンを単離し（IC50≧527 nM）、これらの GSK2118436 耐性細胞クローンに対する GSK1120212B に対する感受性を検討した結果、1/200 未満～約 1/3 以下に低下していた。GSK2118436 耐性細胞クローンでは NRAS あるいは MEK1 又はその両方に変異（NRAS：Q61K 及び A146T 変異、MEK1：K59 の欠失（インフレーム変異；K59del）又は P387S のミスセンス変異）が検出されたが、KRAS、HRAS、ARAF、CRAF、PTEN 及び PIK3CA に変異はみられなかった。なお、これらの耐性細胞クローンに GSK2118436 及び GSK1120212B を併用して BRAF 及び MEK1/2 の両方を阻害すると、感受性が回復することが示されている（2.6.2.タフィンラー／メキニスト併用）。

細胞周期に及ぼす影響及びアポトーシス誘導作用

BRAF V600E 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HT29 細胞株において、GSK1120212A は MEK 及び ERK のリン酸化レベルを低下させ、細胞周期抑制因子である p15 及び p27 蛋白レベルの増加並びに細胞周期促進因子である c-Myc 並びにサイクリン A、D1 及び D2 蛋白レベルの低下を誘導した。また、サイクリン E、CDK2、CDK4 及び RB の蛋白レベルをわずかに低下させ、細胞周期の停止にかかわる RB リン酸化レベルを低下させた。ヒト結腸直腸癌由来 HT29 及び Colo205 細胞株（BRAF V600E 変異陽性）において、GSK1120212A は G0/G1 期のピークを増加させ細胞周期の停止を誘導した後、サブ G1 分画（DNA の断片化を検出）を増加させた。また、GSK1120212A はカスパーゼ 3、7 及び 9 並びに PARP の切断（活性化）を誘導し、カスパーゼの活性化は、サブ G1 分画の増加と関連していた。これらのことから、GSK1120212A のアポトーシス誘導作用は、G0/G1 期停止後のカスパーゼの活性化と関連しており、GSK1120212A の細胞増殖抑制作用には、アポトーシス誘導作用が関与していると考えられる。

GSK1120212B に対する獲得耐性発現メカニズム

KRAS 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HCT116 細胞株を高濃度の GSK1120212B で 2 週間以上処理して耐性細胞株（HCT116（212-Res）；感受性は 1/1650 に低下）を単離し、また、この耐性細胞株から耐性細胞クローンを単離して耐性化にかかわる遺伝子変異について検討した。なお、この耐性細胞株は他のアロステリック MEK 阻害薬である PD0325901 に対しても耐性を示した（感受性は 1/909 未満に低下）（UH2008/00029/00）。GSK1120212B 耐性細胞クローンの遺伝子配列解析を行った結果、MEK2 における L119P のアミノ酸置換を起こす単一点突然変異が認められた。siRNA を用いて MEK2 をノックダウンさせることにより、耐性細胞クローンの GSK1120212B に対する感受性は回復することから、GSK1120212B に対する耐性発現メカニズムには MEK2 における L119P の単一点突然変異が関与していること

が示された。他の MEK 阻害薬である PD 184352 の耐性にも、MEK1 遺伝子の L115P の変異が関与していることが報告されており、L115 は PD 184352 の結合ポケット内に存在していることが示唆されていることから[Delaney, 2002]、GSK1120212B に対する耐性の発現にも結合部位における MEK の変異が深く関与している可能性が考えられる。なお、GSK1120212B 等の MEK 阻害薬を患者に投与したときに、MEK2 における L119P の変異が患者から検出された報告はない。

代謝物の薬理活性

ヒトでの主な血漿中代謝物は GSK1790627（M5：脱アセチル体）及び GSK3002415A（M7：M5 の酸化体）である（2.6.4.1 及び 5.3.3.2.：2012N134931_00）。M5 の in vitro における U-MEK1 の活性化（キナーゼ活性の発現）に対する阻害作用、P-MEK1 活性（ERK をリン酸化する活性）に対する阻害作用、BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株における ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用は、GSK1120212B と同程度であった。また、M7 の P-MEK1 活性に対する阻害作用の IC50 は 73 nM であり、阻害活性は未変化体（GSK1120212B：IC50＝7.0 nM）の約 1/10 と弱かった。ヒトにおける M5 及び M7 の薬理活性はそれぞれ同程度及び約 1/10 であったが、それぞれの血漿中濃度はいずれも未変化体の約 1/7 以下であることから（5.3.3.2.：2012N134931_00）、GSK1120212B の薬効における M5 及び M7 の寄与の程度は低いと考えられる。

2.6.2.6.1.2.　In vivo 試験

ERK リン酸化阻害作用

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて、GSK1120212B は 1 及び 3 mg/kg の単回経口投与により、腫瘍組織における ERK リン酸化を阻害した。GSK1120212B の 3 mg/kg では、投与 2 時間後から ERK リン酸化阻害作用が認められ、阻害作用は 8 時間後まで持続した。ERK リン酸化阻害作用の持続がみられた 8 時間後の血中 GSK1120212 濃度は 100 nM を超えており、作用がみられなかった 24 時間後では 100 nM を下回っていた。これらの結果から、血中 GSK1120212 濃度が 100 nM を超えたときに ERK リン酸化阻害作用が発現すると考えられた。反復経口投与の検討では、GSK1120212B は 3 mg/kg を 1 日 1 回 4、7 又は 14 日間経口投与することにより、ERK リン酸化を阻害した。このことから、GSK1120212B による ERK リン酸化阻害作用は反復投与しても減弱しないことが示された。

p27 蛋白レベル増加作用

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて、GSK1120212B は 3 mg/kg を 1 日 1 回 7 日間経口投与することにより、G1 期停止のマーカーである p27 蛋白レベルを増加させ、細胞周期を G1 期で停止させることが示唆された。本試験成績は、in vitro 試験成績（2.6.2.2.1.4.）と一致しており、GSK1120212A 及び GSK1120212B は MEK を阻害し、p27 及びサイクリン D1 等の細胞周期調節因子の発現を

調節し、RB の機能を阻害して細胞周期を G1 期で停止させ、カスパーゼ 3 等の活性化を誘導してアポトーシスを誘導することが示唆された。

腫瘍増殖抑制作用

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて、GSK1120212B は 1 及び 3 mg/kg の 1 日 1 回 14 日間経口投与により、腫瘍増殖を有意に抑制した。腫瘍増殖抑制作用を示した用量は、同モデルで ERK リン酸化阻害作用（1 及び 3 mg/kg）及び p27 蛋白レベル増加作用（3 mg/kg）を示した用量と同程度であったことから、GSK1120212B は ERK のリン酸化を阻害し、細胞周期を停止させることにより腫瘍増殖を抑制したと考えられる。

このような in vivo における用量依存的な腫瘍増殖抑制作用は BRAF V600E 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HT-29 及び Colo205 細胞株並びに KRAS 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HCT116 細胞株を用いたマウス異種移植モデルでも認められた（UH2008/0051/02）ことから、in vitro 試験の成績と同様に、GSK1120212B は組織の由来にかかわらず BRAF V600 変異陽性及び KRAS 変異陽性の腫瘍の増殖を抑制する可能性が考えられる。

ヒト血漿中 GSK1120212 濃度及びマウス異種移植モデルにおける薬効発現濃度の比較

マウスにおける in vivo 試験において、血中 GSK1120212 濃度が 100 nM（61.5 ng/mL）を超えたときに十分な ERK リン酸化阻害作用を発現し（2.6.2.2.2.1.1.）、腫瘍増殖抑制作用は ERK リン酸化阻害作用により発現することが示唆されている。BRAF V600 変異陽性固形癌の日本人患者に予定臨床用量である 2 mg を 1 日 1 回 15 日間経口投与したときの定常状態における血漿中 GSK1120212 濃度（トラフ濃度）は約 11.7 ng/mL であり（2.7.2.2.1.2.2.3.；MEK114784 試験）、乖離は大きくないことから、GSK1120212B は予定臨床用量において効果を発現すると考えられる。

サロゲートマーカーの検討

GSK1120212B は in vitro において PMA 刺激ヒト、イヌ及びラット PBMC における ERK リン酸化を濃度依存的に阻害し（2.6.2.2.1.8.）、GSK1120212B を経口投与したマウスから単離した PBMC における ERK リン酸化レベルは、用量（0.03～3 mg/kg）に依存して低下した。GSK1120212B は BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株 A375P F11 を用いたマウス異種移植モデルで腫瘍増殖抑制作用を示した用量（1 及び 3 mg/kg）で PBMC における ERK 阻害作用を示したことから、臨床において血液サンプル中の PBMC の ERK リン酸化レベルは、GSK1120212B の MEK 阻害作用を評価するサロゲートマーカーとして有用であると考えられる。

2.6.2.6.2.　副次的薬理試験

各種受容体、チャネル、酵素及びキナーゼに及ぼす影響

23 種類の各種受容体及びチャネル並びに 7 種類の各種酵素に及ぼす GSK1120212A の影響を検討した。GSK1120212A は 10 μM で 50%を超える阻害作用を示さなかった。また、各種

キナーゼ（43 及び 171 種類のパネル）に及ぼす影響を検討した結果、GSK1120212A 及び GSK1120212B は 10 μM で 50%を超える阻害作用を示さなかった。これらの結果から、GSK1120212B は選択的な MEK 阻害薬であることが示された。

HUVEC の増殖に及ぼす影響

増殖因子存在下及び非存在下での HUVEC の増殖に及ぼす GSK1120212B の影響を検討したところ、GSK1120212B は増殖因子非存在下の HUVEC（正常細胞）の細胞数に影響を及ぼさず（IC50＝10000 nM）、増殖因子存在下の HUVEC の増殖を抑制した（IC50＝4 nM）。増殖因子非存在下と存在下での IC50 は 2500 倍の乖離がみられたことから、GSK1120212B は正常細胞の増殖には影響を及ぼさないが血管内皮細胞増殖因子等によって増殖が促進している細胞に対しては増殖抑制作用を示すと考えられた。

また、BRAF V600 変異を有するヒト腫瘍細胞株に対する増殖抑制作用の IC50 は 0.3～9.5 nM であり（2.6.2.2.1.3.5.）、正常細胞の増殖に及ぼす影響の代表として検討した増殖因子非存在下の HUVEC に対する IC50（10000 nM）と比較すると 1053～33333 倍の乖離がみられたことから、高い腫瘍選択性を有することが示唆された。

2.6.2.6.3.　　安全性薬理試験

雄 SD ラットに GSK1120212B の 100 mg/kg を単回経口投与することにより、体重増加の抑制（体重増加は媒体群の 1/3）、自発運動量の減少（投与 2 及び 24 時間後）、腹臥位（投与 2 及び 3 時間後）、眼瞼下垂（投与 3、4 及び 24 時間後）、下痢（投与 4～24 時間後）、立毛（投与 24 時間後）及び散瞳（投与 24 時間後）が認められた。影響が認められた用量である 100 mg/kg は予定臨床用量である 2 mg を体重 50 kg の患者に投与した場合の 2500 倍に相当することから、臨床において GSK1120212B が中枢神経系に対する重篤な副作用を誘発する可能性は低いと考えられる。

雄 SD ラットにおいて、GSK1120212B の 0.016、0.0625 及び 0.125 mg/kg（0.125、0.5 及び 1 mg/m^2）の単回経口投与により、0.125 mg/kg で軽度で一過性の体温低下（最大 0.8°C、投与 1 時間後）がみられた。雄ラットに GSK1120212B の 0.125 mg/kg を単回経口投与したときの血漿中 GSK1120212 濃度は 5.48 ng/mL であり（2.6.4.3.1.2.2.1.）、日本人患者に GSK1120212B の予定臨床用量である 2 mg を 1 日 1 回 15 日間経口投与（n=5）したときの Cmax（25.5 ng/mL；表 2.7.2.3-16）よりも低く、イヌの 10 日間経口投与の毒性試験において 0.125 mg/kg/日で体温低下がみられているが（2.6.6.3.4.）、安全性薬理試験では軽度で一過性の影響であったことから臨床において重篤な中枢性の副作用を誘発する可能性は低いと考えられる。また、0.125 mg/kg を単回経口投与したときに、換気機能及び気道抵抗には影響は認められなかったことから、GSK1120212B が臨床において呼吸系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

GSK1120212B は hERG cDNA を導入した HEK293 細胞において、hERG チャネルテール電流を抑制し、IC25、IC50 及び IC75 はそれぞれ 0.448、1.54 及び 5.30 μM（275.7、947.7 及び 3261.7 ng/mL）であった。

ウサギ左心室ウェッジ標本において、GSK1120212B は 30 μM（約 18450 ng/mL；溶解限界濃度）までの濃度で QT 間隔に影響を及ぼさなかった。GSK1120212B は 10 及び 30 μM で等尺性収縮力をそれぞれ 16.3 及び 64.8%低下させ、30 μM で Tp-e 間隔を約 26%短縮させた。

麻酔雄ビーグル犬において、GSK1120212A は 1 mg/kg の静脈内投与（10 分間持続投与）により心電図パラメータ、血圧及び心拍数に影響を及ぼさなかった。血漿中 GSK1120212 濃度は投与終了時（投与開始 10 分後）に最高濃度の 2.5 μM（約 1500 ng/mL）に達した。覚醒雄ビーグル犬において、GSK1120212B は 0.025、0.038 及び 0.075 mg/kg の単回経口投与により、動脈圧、心拍数、ECG パラメータ（波形異常、不整脈及び間隔）及び体温に影響を及ぼさなかった。

心血管系への影響を検討した試験において、in vitro の電気生理学的試験である hERG アッセイでは IC50＝1.54 μM（947.7 ng/mL）で阻害作用がみられ、ウサギ左心室ウェッジ標本を用いた試験では、10 μM 以上で影響が認められた。これらの影響がみられた 1.54 μM（947.7 ng/mL）及び 10 μM（6154 ng/mL）は日本人患者に GSK1120212B の予定臨床用量である 2 mg を 1 日 1 回 15 日間経口投与（n=5）したときの Cmax（25.5 ng/mL）（表 2.7.2.3-16）及びヒトにおける血漿蛋白結合率（97.4%；2.6.4.4.2.1.1.）から推定される非結合型 GSK1120212 濃度である 0.66 ng/mL の 1400 倍超であると推定されることから、ヒトで QT 延長を含む心臓の伝導異常を誘発する可能性は低いと考えられた。また、イヌの in vivo 試験では、最高血漿中 GSK1120212 濃度が 2.5 μM（約 1500 ng/mL）に達する 1 mg/kg の静脈内投与（10 分間持続投与）でも影響は認められなかった。このイヌにおける最高血漿中 GSK1120212 濃度である 2.5 μM（約 1500 ng/mL）は日本人患者に予定臨床用量である 2 mg を 1 日 1 回経口投与したときの Cmax（25.5 ng/mL）（表 2.7.2.3-16）の約 60 倍であった。一方、イヌの in vivo 試験では影響は認められなかったが、臨床試験において観察された左室駆出率低下（2.5.5.2.2.4.）のメカニズムを検討するための毒性試験において左室機能（心拍出量、1 回拍出量、駆出率、左室内腔面積変化率及び左室内径短縮率）の低下がみられた（2.6.6.8.1.2.）。

2.6.2.6.4.　　薬力学的薬物相互作用試験

臨床において併用される GSK2118436 との併用による薬理作用に関しては、CTD 併用パートの 2.6.2（2.6.2 タフィンラー／メキニスト併用）に記載した。

2.6.2.6.5.　　結論

GSK1120212B は MEK1/2 に対する選択的阻害薬であり、BRAF V600E 遺伝子変異を有する悪性黒色腫に対して増殖抑制作用を発現することから、「BRAF V600 遺伝子変異を有する悪性黒色腫」に対する治療薬として期待される。

参考文献

Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, et al. MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol.* 2013;6:27(1-11).

Alcala AM, Flaherty KT. BRAF inhibitors for the treatment of metastatic melanoma: clinical trials and mechanisms of resistance. *Clin Cancer Res.* 2012;18:33-9.

Ashida A, Uhara H, Kiniwa Y, et al. Assessment of *BRAF* and *KIT* mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci.* 2012;66:240-2.

Bello DM, Ariyan CE, Carvajal RD. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. *Cancer Control.* 2013;20:261-81.

Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J.* 2013;280:489-504.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417:949-54.

Delaney AM, Printen JA, Chen H, et al. Identification of a novel mitogen-activated protein kinase kinase activation domain recognized by the inhibitor PD 184352. *Mol Cell Biol.* 2002;22:7593-602.

Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:297-306.

Furukawa T, Tanji E, Xu S, et al. Feedback regulation of *DUSP6* transcription responding to MAPK1 via ETS2 in human cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377:317-20.

GlaxoSmithKline Document Number 2012N139008_00 Study ID 2012N139008_00. Estimating the minimum biologically active target concentration of GSK1120212B for *in vivo* activity in sensitive BRAF mutant lines (melanoma and CRC). Report Date 10-May-2012.

Khattar E, Kumar V. Mitogenic regulation of $p27^{Kip1}$ gene is mediated by AP-1 transcription factors. *J Biol Chem.* 2010;285:4554-61.

Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med.* 2013;19:1401-9.

Nissan MH, Solit DB. The “SWOT” of BRAF inhibition in melanoma: RAF inhibitors, MEK inhibitors or both?. *Curr Oncol Rep.* 2011;13:479-87.

Roskoski R Jr. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417:5-10.

Santarpia L, Lippman SL, El-Naggar AK. Targeting the mitogen-activated protein kinase RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16:103-19.

Sasaki Y, Niu C, Makino R, et al. BRAF point mutations in primary melanoma show different prevalences by subtype. *J Invest Dermatol.* 2004;123:177-83.

Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 2004;116:855-67.

Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:875-85.

Yamaguchi T, Kakefuda R, Tajima N, et al. Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol.* 2011;39:23-31.

Yan M, Templeton DJ. Identification of 2 serine residues of MEK-1 that are differentially phosphorylated during activation by *raf* and MEK kinase. *J Biol Chem.* 1994;269:19067-73.

2.6.2.　薬理試験の概要文（タフィンラー／メキニスト併用）

2.6.2.1.　まとめ

GSK2118436 及び GSK1120212B の併用療法に関連する in vitro 及び in vivo の効力を裏付ける試験成績について以下に示した。また、臨床試験において GSK2118436 を投与した一部の患者でみられた発熱の機序を検討するため、安全性薬理試験のフォローアップ試験として、サイトカイン遊離に及ぼす影響を検討するための in vitro 試験を実施しており（タフィンラーCTD 2.6.2.4.4.2.）、その試験成績のうち GSK2118436 及び 3 種類の代謝物並びに GSK1120212B を併用処理したときの成績を記載した。

なお、試験には GSK2118436A（遊離塩基）及び GSK1120212B（ジメチルスルホキシド付加物）を使用した。投与量及び濃度はすべて遊離塩基に換算して記載した。

効力を裏付ける試験

In vitro 試験

GSK2118436 及び GSK1120212B のいずれに対しても感受性を示す BRAF V600E、V600K 又は V600D 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株を GSK2118436 及び GSK1120212B 存在下で培養したときに、14 株中 13 株で併用効果が認められた。一方、両被験物質の単独処理に対して感受性を示さなかった 2 株では、併用処理しても増殖抑制作用に変化はみられなかった。

GSK2118436 に対する耐性を獲得した BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来の細胞クローンを GSK2118436 及び GSK1120212B の併用下で培養すると、検討したすべての耐性細胞クローンにおいて併用効果が認められた。耐性細胞クローンを GSK2118436 で単独処理しても ERK リン酸化レベル並びにサイクリン D1 及び p27 蛋白レベルに変化はみられなかったが、GSK2118436 及び GSK1120212B の併用処理では、ERK のリン酸化が阻害され、G1 期停止のマーカーとなるサイクリン D1 蛋白レベルの低下及び p27 蛋白レベルの増加が認められた。また、GSK2118436 に対する耐性を獲得した BRAF V600K 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来の細胞クローンにおいても、検討したすべての耐性細胞クローンにおいて併用効果が認められた。

ヒト悪性黒色腫由来細胞株及び GSK2118436 耐性細胞クローンのいずれにおいても、両被験物質併用によるアポトーシスの誘導への併用効果はみられなかった。

In vivo 試験

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて、GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果を様々な投与方法及び投与期間で投与して検討した（試験 1～7）。その結果、GSK2118436 及び GSK1120212B を最大効果発現用量未満の用量で最長 90 日間併用投与することにより、腫瘍増殖抑制作用は単独投与に比べて増強され、作用がより長期間持続した。生存について検討した試験では、GSK2118436 の 30 及び 100 mg/kg 並びに GSK1120212B の 1 mg/kg の各単独投与群と媒体群の生存曲線との間に有意差がみられた。各単独投与群では試験終了までに 10 例中 2～5 例が死亡したのに対し、いずれの併用投与群も試験終了時点まで全例が生存し、媒体群と各併用群の生存曲線の間に

有意差がみられた。試験 1～7 のいずれの試験においても、併用投与の忍容性は良好であった。

安全性薬理試験

臨床試験において GSK2118436 及び GSK1120212B を併用投与することにより発熱の発現頻度の増加がみられたことから、発熱の機序を検討するためのフォローアップ試験の一環として、ヒト PBMC 又は血液を GSK2118436 及び 3 種類の代謝物並びに GSK1120212B を併用処理したときのサイトカイン遊離量又は血漿中サイトカイン濃度に及ぼす影響を in vitro で検討した。その結果、GSK2118436 及び 3 種類の代謝物並びに GSK1120212B は、それぞれを単独処理したときと同様にいずれの組合わせの併用処理においても、発熱に関連すると考えられる 9 種類のサイトカイン（IFNα、IFNγ、IP-10、IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70 及び TNF-α）の遊離を促進させなかった。

2.6.2.2.　効力を裏付ける試験

RAF 阻害薬は効果発現が早く、高い奏効率を示すことから BRAF V600E 変異陽性の転移性悪性黒色腫患者の治療を著しく進歩させた[Chapman, 2011]。しかし、治療開始の 1 年以内に RAF 阻害薬に対する耐性腫瘍が出現し、効果が減弱することが報告されている[Lito, 2013; Alcala, 2012; Sullivan, 2013]。

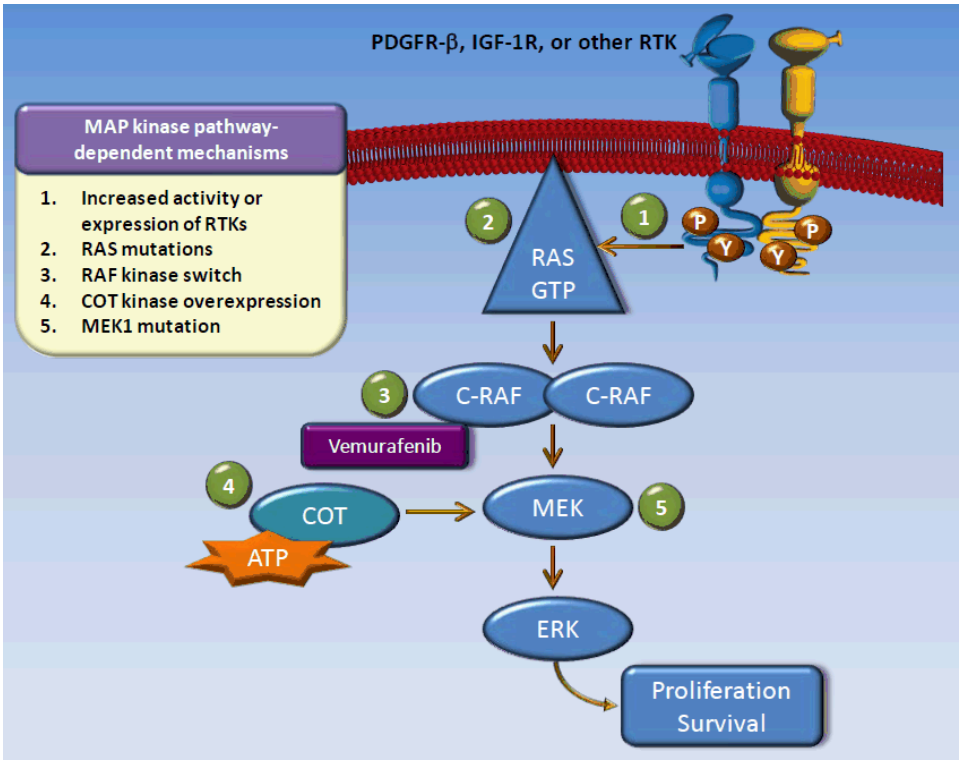
RAF 阻害薬に対する耐性発現機序の一つとして、MAPK 経路の再活性化が関与していると考えられている（図 2.6.2-1）[Alcala, 2012]。BRAF V600 変異陽性の悪性黒色腫に対して最初に承認されたベムラフェニブ及びそのアナログである PLX4720 に対して耐性を獲得した腫瘍細胞では、MAPK 経路において RAF の上流に存在する NRAS 又は下流に存在する MEK1 の二次的活性化変異、あるいは CRAF 及び COT の過剰発現を介した再活性化がみられることが報告されている[Nazarian, 2010; Alcala, 2012; Emery, 2009]。また、インスリン様増殖因子-1 受容体（IGF-1R）及び血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）等の RAF 上流の受容体チロシンキナーゼ（RTK）の活性化も報告されている[Alcala, 2012]。

BRAF V600 変異陽性のヒト腫瘍細胞株を高濃度の GSK2118436 で 1 週間以上処理して耐性細胞クローンを単離し、耐性化にかかわる遺伝子変異及び耐性細胞クローンにおける細胞内シグナル伝達の変化について検討した試験成績もこれらの知見を支持しており、NRAS 及び MEK1 の変異による MAPK 経路の再活性化が GSK2118436 に対する耐性獲得機序に関与していると考えられた（タフィンラーCTD 2.6.2.2.1.8.1.）。

以上より、RAF 阻害薬及び MEK 阻害薬を併用投与して BRAF/MEK を同時に阻害することで、以下の可能性が考えられる。

1. MAPK 経路を介した増殖シグナルをより確実に抑制することにより、BRAF V600 変異陽性の腫瘍細胞に対する増殖抑制作用が増強される。
2. 耐性発現機序の一つと考えられている MAPK 経路の再活性化を抑制し、耐性の発現を遅延させる。

以下に、RAF 阻害薬である GSK2118436 及び MEK1/2 阻害薬である GSK1120212B を併用投与したときの腫瘍増殖抑制作用に関する試験成績を示した。



PDGFR-β：血小板由来増殖因子受容体-β
IGF-1R：インスリン様増殖因子-1 受容体
RTK：受容体型チロシンキナーゼ
GTP：guanosine triphosphate (グアノシン三リン酸)

図 2.6.2-1　BRAF V600 変異陽性の悪性黒色腫細胞における RAF 阻害薬に対する耐性発現機序

Data source: [Alcala, 2012]の Figure 2

2.6.2.2.1.　In vitro 試験（GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果）

BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株及び GSK2118436 耐性細胞クローンの増殖に対する GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果について検討した。

2.6.2.2.1.1.　BRAF V600 変異陽性ヒト悪性黒色腫由来細胞株の増殖に及ぼす影響

2.6.2.2.1.1.1.　細胞増殖抑制作用

方法

BRAF V600 変異陽性（V600E、V600K 又は V600D）の 17 種類のヒト悪性黒色腫由来細胞株に GSK2118436 又は GSK1120212B の単独、あるいは GSK2118436 及び GSK1120212B の併用（モル濃度比 10：1）処理の条件下で 72 時間培養した。CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を計測し、併用処理したときの細胞増殖抑制作用を単独処理した場合と比較した（2011N116395_00）。併用効果は、以下の 2 種類の独立した解析方法により評価した。

コンビネーションインデックス（CI）法：Chou&Talalay の方法[Chou, 1984]により CI を算出し、CI＜0.9（相乗効果）、0.9～1.1（相加効果）及び＞1.1（拮抗作用）と定義した。相加又は相乗効果がみられた場合に、併用効果ありと判断した。

Excess Over Highest Single Agent（EOHSA）解析：併用によりどの程度細胞増殖抑制作用が増強したのかを定量した（併用処理及び単独処理（GSK2118436 又は GSK1120212B の効果の高かった方）時の反応率の差を percentage points（ppt）で表した）[Liu, 2011]。単独での作用と比較して作用の増強がみられた（プラスの ppt が得られた）場合に、併用効果ありと判断した。

結果

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株 11 株のうち、GSK2118436 及び GSK1120212B のいずれに対しても感受性を示した 9 株すべてに対して両被験物質の併用効果が認められた（CI 法：相乗的な増殖抑制作用（CI＝0.40～0.87）、EOHSA 解析：細胞増殖抑制作用が増強（EOHSA＝14.1～25.4 ppt））（表 2.6.2-1）。一方、GSK2118436 又は GSK1120212B のいずれに対しても感受性を示さなかった SK-MEL-3 及び A2058 細胞株に対しては、併用効果は認められなかった。

BRAF V600K 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株のうち、GSK2118436 及び GSK1120212B のいずれに対しても感受性を示した 4 株中 3 株では併用効果が認められた（CI 法：相加効果又は中程度の相乗効果（CI＝0.83～0.91））、EOHSA 解析：細胞増殖抑制作用が増強（EOHSA＝16.5～29.6 ppt））。一方、残りの 1 株（WW165）に対しては併用により CI 法での評価においてわずかではあるが各被験物質の単独処理に比べて細胞増殖抑制作用が減弱した（CI＝1.18）。また、GSK2118436 に耐性（IC50 は＞10000 nM）及び GSK1120212B に低感受性（IC50＝45.4 nM）であった IGR-1 細胞株に対しては、併用により増殖抑制作用が増強した（EOHSA＝10.2 ppt）（GSK2118436 単独処理時の IC50 が算出できなかったため、CI 法では評価できず）。

BRAF V600D 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 WM-115 細胞株に対しても GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果が認められた（CI 法：相乗効果（CI＝0.64）、EOHSA 解析：細胞増殖抑制作用が増強（EOHSA＝13.7 ppt））。

表 2.6.2-1　　BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株に対する増殖抑制作用（GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果）

腫瘍細胞株#	BRAF アミノ酸変異	IC50 (nM)			CI	EOHSA (ppt)
		GSK2118436	GSK1120212B	併用‡		
UACC-257	V600E (ヘテロ変異体)	11 ± 1	4.1 ± 6.5	5 ± 2	0.75 ± 0.13	25.0 ± 9.5
SK-MEL-1		18 ± 7	2.3 ± 0.6	5 ± 2	0.53 ± 0.06	25.4 ± 4.0
COLO-829		26 ± 11	4.3 ± 1.4	9 ± 2	0.66 ± 0.16	24.5 ± 4.5
A101D		33 ± 7	5.3 ± 1.2	10 ± 2	0.56 ± 0.09	14.4 ± 1.5
SK-MEL-24		78 ± 72	5.8 ± 2.8	10 ± 3	0.40 ± 0.20	15.5 ± 0.6
SK-MEL-5		188 ± 174	3.5 ± 1.6	11 ± 4	0.57 ± 0.37	18.8 ± 5.3
SK-MEL-3		>10000	>1000	>10000	NA	NA
A2058[a]		>10000	>1000	>10000	NA	NA
SK-MEL-28[b]	V600E (ホモ変異体)	10	1.4	4	0.76	24.3
UACC-62		11 ± 2	2.6 ± 2.6	5 ± 2	0.87 ± 0.06	14.4 ± 3.9
A375P F11		49	6.3	16	0.65	14.1
WW165	V600K (ヘテロ変異体)	5	0.3	2	1.18	16.5
IGR-1[c]		>10000	45.4	96	NA	10.2
YUMAC	V600K (ホモ変異体)	7	0.5	2	0.91	29.6
YULAC		17	0.8	4	0.90	29.6
YUSIT1		13	0.7	3	0.83	22.2
WM-115	V600D (ヘテロ変異体)	41 ± 6	6.4 ± 4.1	14 ± 4	0.64 ± 0.03	13.7 ± 4.1

平均値±標準偏差（n=4～8）
ただし、SK-MEL-28、WW165、IGR-1、YUMAC、YULAC 及び YUSIT1 細胞株（n=2）並びに A375P F11 細胞株（n≥2）については平均値を示す
‡：GSK2118436 及び GSK1120212B を 10:1 のモル濃度比で併用したときの GSK2118436 成分の IC50
NA：単独処理時の IC50 が検討した濃度範囲外であったため、CI は算出できず
a：MEK1 P124S, RB1 Q93*変異陽性、b：CDK4 R24C 変異陽性、c：MEK2 E66_K68del 変異陽性
Data source: 2011N116395_00 の Table 2

2.6.2.2.1.1.2.　　アポトーシス誘導作用

方法

2.6.2.2.1.1.1.で細胞増殖抑制作用を検討したヒト悪性黒色腫由来細胞株 17 株のうち BRAF V600E 変異陽性の 7 株及び V600K 変異陽性の 1 株（GSK2118436 及び GSK1120212B に対して感受性株 6 株及び非感受性株 2 株）に GSK2118436 又は GSK1120212B の単独、あるいは GSK2118436 及び GSK1120212B の併用（モル濃度比 10：1）処理の条件下で 24 時間培養した後、CaspaseGlo アッセイによりアポトーシス誘導の指標となるカスパーゼ 3 及び 7 活性を測定した（2011N116395_00）。

結果

両被験物質に感受性を示した V600E 又は V600K 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株 6 株中 1 株（BRAF V600E 変異陽性の SK-MEL-1 細胞株）では両被験物質をそれぞれ単独処理したときに、また、他の 1 株（BRAF V600K 変異陽性の YUMAC 細胞株）では GSK1120212B を単独処理したときにアポトーシスの誘導がみられた（それぞれの細胞株におけるカスパーゼ 3 及び 7 活性は媒体群と比較して約 5 及び 3 倍）。それ以外の 4 株（UACC-257、A101D、UACC-62 及び A375P F11 細胞株）及び両被験物質に対して非感受性の 2 株（SK-MEL-3 及び A2058 細胞株）ではいずれの被験物質によってもアポトーシスの誘導はみられなかった。上述の 8 株を GSK2118436 及び GSK1120212B で併用処理しても、それぞれを単独処理した場合と比較してアポトーシス誘導作用の増強はみられなかった。

2.6.2.2.1.2.　BRAF V600E 変異陽性ヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株より単離した GSK2118436 耐性細胞クローンに対する併用効果

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株（親細胞株）及び A375P F11 細胞株を高濃度の GSK2118436 で 1 週間以上培養して得た GSK2118436 耐性細胞クローンを GSK2118436 及び GSK1120212B で処理し、細胞増殖抑制作用、細胞内シグナル伝達経路に及ぼす影響及びアポトーシス誘導作用に対する併用効果について検討した。

2.6.2.2.1.2.1.　細胞増殖抑制作用

方法

GSK2118436 耐性細胞クローンの増殖に対する GSK1120212B の単独及び GSK2118436 との併用効果を検討するために、高濃度の GSK2118436 での 1 週間以上の培養により GSK2118436 に対して耐性を獲得した 9 種類のサブクローン（タフィンラーCTD 2.6.2.2.1.8.1.1.及びメキニスト CTD 2.6.2.2.1.3.7.1.）に GSK2118436 又は GSK1120212B の単独、あるいは GSK2118436 及び GSK1120212B の併用（モル濃度比 10:1）処理の条件下で 72 時間培養し、2.6.2.2.1.1.と同様の方法で増殖抑制作用の IC50、CI 及び EOHSA を算出し、A375P F11 細胞株（親細胞株）に対する作用と比較した（2011N116394_00）。

結果

A375P F11 細胞株（親細胞株）では各被験物質の単独処理により濃度依存的に細胞増殖が抑制され、GSK2118436 及び GSK1120212B で併用処理すると、併用効果が認められた（CI 法：相乗的な増殖抑制作用（CI＝0.49）、EOHSA 解析：細胞増殖抑制作用が増強（EOHSA ＝19 ppt））（表 2.6.2-2）。

GSK2118436 耐性細胞クローン（GSK2118436 の IC50＞10000 nM）を GSK2118436 及び GSK1120212B で併用処理したときの GSK2118436 の IC50 は 178～392 nM であり、いずれの耐性細胞クローンにおいても単独処理時と比較して IC50 は低下した（表 2.6.2-2）。GSK1120212B に対しても感受性を示さなかった 3 種類の耐性細胞クローンを含む 9 種類すべての耐性細胞クローンに対して併用効果を EOHSA 解析で評価したところ、GSK2118436 の細胞増殖抑制作用は単独処理したときに比べて高く、細胞増殖抑制作用は併用処理によって増強された（EOHSA＝19～＞50 ppts）（耐性細胞クローンでは GSK2118436 単独処理時の IC50 が算出できなかったため、CI 法では評価できず）。

表 2.6.2-2　A375P F11 細胞株より単離した耐性細胞クローンにおける GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果（増殖抑制作用）

細胞株	獲得変異		IC50 (nM)			CI	EOHSA (ppt)
	NRAS	MEK1	GSK2118436	GSK1120212B	併用 [a]		
A375P F11 (親細胞株)#	WT	WT	28 ± 16	5 ± 3	7 ± 5	0.49 ± 0.28	19 ± 1
12R5-3	A146T	WT	>10000	107 ± 46	252 ± 70	NA	28 ± 5
12R8-1	A146T	WT	>10000	62 ± 31	266 ± 136	NA	29 ± 8
12R8-3	A146T	WT	>10000	82 ± 30	178 ± 182	NA	27 ± 1
16R6-3	A146T	P387S	>10000	147 ± 64	280 ± 123	NA	36 ± 9
16R5-5#	Q61K	P387S	>10000	121 ± 42	268 ± 72	NA	36 ± 3
16R6-2	Q61K	P387S	>10000	123 ± 65	242 ± 57	NA	28 ± 8
16R6-4#	Q61K, A146T	P387S	>10000	>900	380 ± 169	NA	>50
12R5-1	WT	K59del	>10000	>1000	392 ± 149	NA	19 ± 1
12R5-5#	WT	K59del	>10000	>900	383 ± 101	NA	46 ± 12

平均値±標準偏差 (n=≥3)
NA：単独処理時の IC50 が検討した濃度範囲外であったため、CI は算出できず
a：GSK2118436 及び GSK1120212B を 10:1 のモル濃度比で併用したときの GSK2118436 成分の IC50
＃：シグナル伝達に及ぼす影響についても検討（図 2.6.2-2）
Data source: 2011N116394_00 の Table 1

2.6.2.2.1.2.2.　細胞内シグナル伝達に及ぼす影響

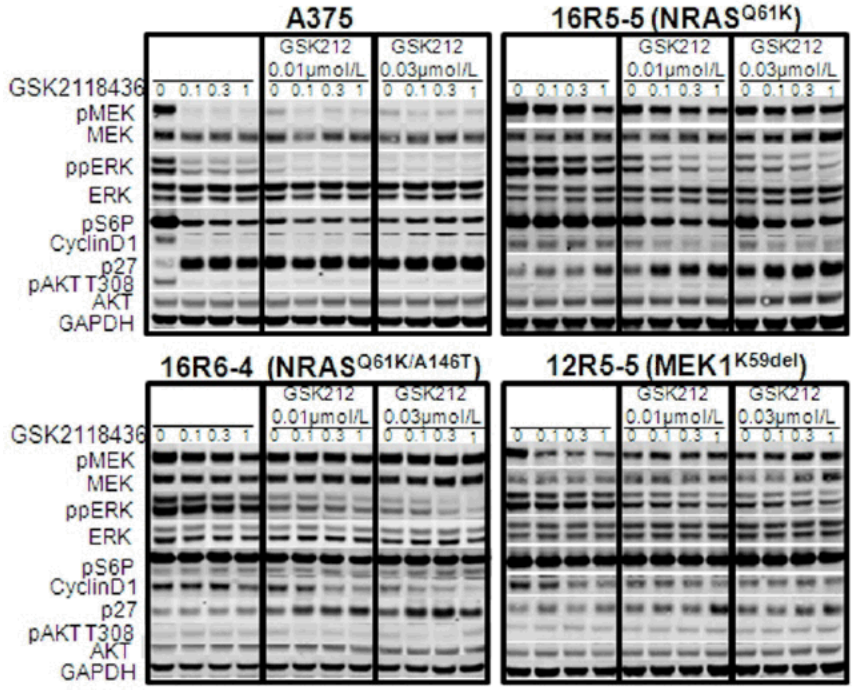
方法

A375P F11 細胞株（親細胞株）及び 3 種類の耐性細胞クローン（16R5-5：NRAS Q61K 変異及び MEK1 P387S 変異陽性、GSK1120212B に対する感受性も 1/20 以下に低下、16R6-4：NRAS Q61K、A146T 変異及び MEK1 P387S 変異陽性、GSK1120212B に対しても耐性、12R5-5：MEK1 K59del 変異陽性、GSK1120212B に対しても耐性）を GSK2118436（100、300 又は 1000 nM）及び GSK1120212B（10 又は 30 nM）の単独又はそれらの併用で 24 時間培養した後、ウエスタンブロット法により MEK、ERK、S6 リボソーム蛋白質（S6P）及び AKT（T308）のリン酸化レベル並びにサイクリン D1 及び p27 蛋白レベルを測定した（2011N116394_00）。

結果

A375P F11 細胞株（親細胞株）では、ERK 及び S6P のリン酸化阻害、G1 期停止のマーカーとなるサイクリン D1 蛋白レベルの低下及び p27 蛋白レベルの増加がみられた（図 2.6.2-2 の左上）。

3 種類の耐性細胞クローン（NRAS 又は MEK1 変異陽性であり、GSK1120212B に対しても感受性が低下あるいは耐性を示す）のいずれにおいても、GSK2118436 は単独処理では ERK 及び S6P リン酸化並びにサイクリン D1 及び p27 蛋白レベルに影響を及ぼさなかった（図 2.6.2-2 の右上及び下段）。一方、いずれの耐性細胞クローンに対しても、両被験物質は併用により GSK1120212B の単独処理と比較して ERK リン酸化阻害作用を増強し、G1 期停止のマーカーとなるサイクリン D1 蛋白レベルの低下及び p27 蛋白レベルの増加がみられた。また、AKT のリン酸化をわずかに阻害した。しかし、併用しても S6P のリン酸化に対してはわずかに阻害するか又はまったく阻害作用を示さなかった。



A375：A375P F11 細胞株、GSK212：GSK1120212B (レーン 5 及び 9 が GSK1120212B の単独処理に該当)

図 2.6.2-2　A375P F11 細胞株より単離した耐性細胞クローンにおける GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果（細胞内シグナル伝達に及ぼす影響）

Data source: 2011N116394_00 の Figure 13

2.6.2.2.1.2.3.　アポトーシス誘導作用

方法

A375P F11 細胞株（親細胞株）及び耐性細胞クローンを GSK2118436 又は GSK1120212B の単独、あるいは GSK2118436 及び GSK1120212B の併用（モル濃度比 10:1）処理の条件下で 24 時間培養した後、2.6.2.2.1.1.と同様の方法でカスパーゼ 3/7 活性を測定した（2011N116394_00）。

結果

親細胞株及び耐性細胞クローンのいずれにおいても、各被験物質は単独及び併用処理のいずれでもアポトーシスを誘導しなかった。

2.6.2.2.1.3.　BRAF V600K 変異陽性ヒト悪性黒色腫由来 YUSIT1 細胞株より単離した GSK2118436 耐性細胞クローンに対する併用効果

方法

BRAF V600K 変異陽性ヒト悪性黒色腫由来 YUSIT1 細胞株及び YUSIT1 細胞株を高濃度の GSK2118436 で 1 週間以上培養して得た GSK2118436 耐性細胞クローンの増殖に対する GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果を 2.6.2.2.1.1.と同様の方法で検討し、増殖抑制作用の IC50、CI 及び EOHSA を算出した（2011N116394_00）。

結果

BRAF V600K 変異陽性の YUSIT1 細胞株より単離した 12 種類の耐性細胞クローンのうち、GSK2118436 に対する IC50 が算出可能であった 6 種類では GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果を CI 法で評価したところ、3 種類の耐性細胞クローンで相乗効果（CI＝0.80～0.81）、3 種類で相加効果が認められた（CI＝0.92～0.98）。GSK2118436 の IC50 が 1 μM 超の耐性細胞クローンを含めたすべての耐性細胞クローンにおける併用効果を EOHSA 解析で評価したところ、GSK1120212B を単独処理したときに比べて併用による増殖抑制作用は増強された（EOHSA＝1.4～12.1 ppt）（表 2.6.2-3）。

表 2.6.2-3　BRAF V600K 変異陽性ヒト悪性黒色腫由来 YUSIT1 細胞株より単離した耐性細胞クローンにおける GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果

細胞株	NRAS 獲得変異	IC50 (nM)			CI	EOHSA (ppt)
		GSK2118436	GSK1120212B	併用 [b]		
YUSIT1 (親細胞株 [a])	野生型	14 ± 3	0.7 ± 0.2	3 ± 1	0.83 ± 0.21	22.2 ± 0.1
YUSIT1-B11	Q61K	527 ± 146	2.3 ± 0.8	19 ± 9	0.92 ± 0.10	3.4 ± 2.1
YUSIT1-B29	ND	658 ± 250	2.6 ± 1.1	20 ± 10	0.81 ± 0.06	6.5 ± 2.0
YUSIT1-B27	Q61K	850 ± 160	2.9 ± 0.7	21 ± 6	0.80 ± 0.04	6.4 ± 0.6
YUSIT1-B10	Q61K	979 ± 353	2.8 ± 0.8	17 ± 2	0.92 ± 0.10	7.5 ± 2.6
YUSIT1-B31	Q61K	997 ± 154	2.6 ± 0.5	17 ± 4	0.80 ± 0.13	6.2 ± 3.3
YUSIT1-B25	Q61K	2058 ± 1079	2.6 ± 0.4	27 ± 12	0.98 ± 0.26	1.4 ± 5.5
YUSIT1-B24	Q61K	>1000	2.4 ± 0.5	16 ± 3	NA	8.0 ± 1.5
YUSIT1-B4	Q61K	>1000	4.1 ± 0.3	41 ± 10	NA	1.7 ± 6.4
YUSIT1-B5	Q61K	>2000	4.9 ± 1.7	34 ± 6	NA	6.6 ± 3.2
YUSIT1-B14	Q61K	>4000	4.6 ± 1.6	29 ± 14	NA	12.1 ± 3.8
YUSIT1-B7	Q61K	>10000	3.1 ± 0.3	23 ± 1	NA	6.5 ± 1.3
YUSIT1-B6	Q61K	>10000	5.0 ± 2.1	26 ± 8	NA	11.7 ± 0.9

平均値±標準偏差 (n=≥3)
ND：実施せず
NA：単独処理時の IC50 が検討した濃度範囲外であったため、CI は算出できず
a：親細胞株は BRAF V600K 及び MEK2 E27K 変異陽性
b：GSK2118436 及び GSK1120212B を 10:1 のモル濃度比で併用したときの GSK2118436 成分の IC50
Data source: 2011N116394_00 の Table 2

まとめ

GSK2118436 及び GSK1120212B のいずれに対しても感受性を示す BRAF V600E、V600K 又は V600D 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株 14 株中 13 株において両被験物質を併用すると、CI 法及び EOHSA 解析のいずれにおいても併用効果が認められたが、1 株ではわずかに抑制作用が減弱した。両被験物質の単独処理に対して感受性を示さなかった 2 株では、併用処理しても増殖抑制作用に変化はみられなかったが、GSK2118436 に耐性（IC50＞10000 nM）／GSK1120212B に低感受性（IC50＝45.4 nM）であった 1 株では、併用によりわずかに増殖抑制作用が増強された。

高濃度の GSK2118436 で 1 週間以上培養することにより GSK2118436 に対して耐性を獲得した BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来の細胞クローンを GSK2118436 及び GSK1120212B で併用処理すると、検討したすべての耐性細胞クローンにおいて併用効果が認められた。耐性細胞クローンの細胞内シグナル伝達について検討した結果、GSK2118436

の単独処理ではERKリン酸化レベル並びにサイクリンD1及びp27蛋白レベルに変化はみられなかったのに対し、GSK2118436とGSK1120212Bを併用すると、ERKのリン酸化レベル並びにG1期停止のマーカーとなるサイクリンD1蛋白レベルの低下及びp27蛋白レベルの増加がみられた。また、GSK2118436に対する耐性を獲得したBRAF V600K変異陽性のヒト悪性黒色腫由来のクローン細胞においても、検討したすべての耐性細胞クローンにおいてGSK2118436及びGSK1120212Bの併用効果が認められた。

ヒト悪性黒色腫由来細胞株及びGSK2118436耐性細胞クローンのいずれにおいても、アポトーシスの誘導に対して併用効果はみられなかった。

表 2.6.2-4　BRAF V600変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株をGSK2118436及びGSK1120212Bで併用処理したときの細胞増殖抑制作用のまとめ

試験系	BRAFアミノ酸変異	試験成績
ヒト悪性黒色腫由来細胞株	V600E (11種類)	両被験物質に対して感受性の9種類ではいずれの評価方法でも併用効果あり。 CI法：9種類すべてで相乗効果 EOHSA解析：細胞増殖抑制作用の増強 (EOHSA=14～25 ppt)。 両被験物質に対して非感受性の2株に対しては併用効果なし。
	V600K (5種類)	両被験物質に対して感受性の4種類中3種類ではいずれの評価方法でも併用効果あり。 CI法：相加効果又は中程度の相乗効果 EOHSA解析：細胞増殖抑制作用の増強 (EOHSA=22～30 ppt) GSK2118436耐性及びGSK1120212Bに低感受性であった1種類*で、併用によりわずかに増殖抑制作用が増強 (EOHSA＝10 ppt)。 両被験物質に感受性を示した1種類で併用によりわずかに細胞増殖抑制作用が減弱。
	V600D (1種類)	検討した1種類に対していずれの評価方法でも併用効果あり。 CI法：相乗効果 EOHSA解析：細胞増殖抑制作用の増強 (EOHSA=14 ppt)
GSK2118436耐性ヒト悪性黒色腫由来細胞クローン*	V600E (9種類)	9種類すべてにおいてEOHSA解析で併用効果あり (EOHSA=19～>50 ppt)。
	V600K (12種類)	GSK2118436に対するIC50が算出可能であった6種類はいずれの評価方法でも併用効果あり。 CI法：3種類で相乗効果、3種類で相加効果 EOHSA解析：細胞増殖抑制作用の増強 (EOHSA=1.4～7.5 ppt) GSK2118436に対するIC50が算出不可であった6種類はEOHSA解析で併用効果あり (EOHSA=1.7～12.1 ppt)。

*：IC50が算出できなかった耐性細胞クローンではCI法による評価不可。

2.6.2.2.2.　　In vivo 試験（GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果）

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルを用いて、GSK2118436 及び GSK1120212B の種々の投与スケジュールでの併用投与による一連の試験（試験 1～7）を実施し、腫瘍増殖抑制作用を評価した（表 2.6.2-6）。腫瘍増殖抑制作用だけでなく、生存についても検討した試験 1 の方法及び結果を以下に示し、全試験の併用投与での結果を表 2.6.2-6 に要約した。

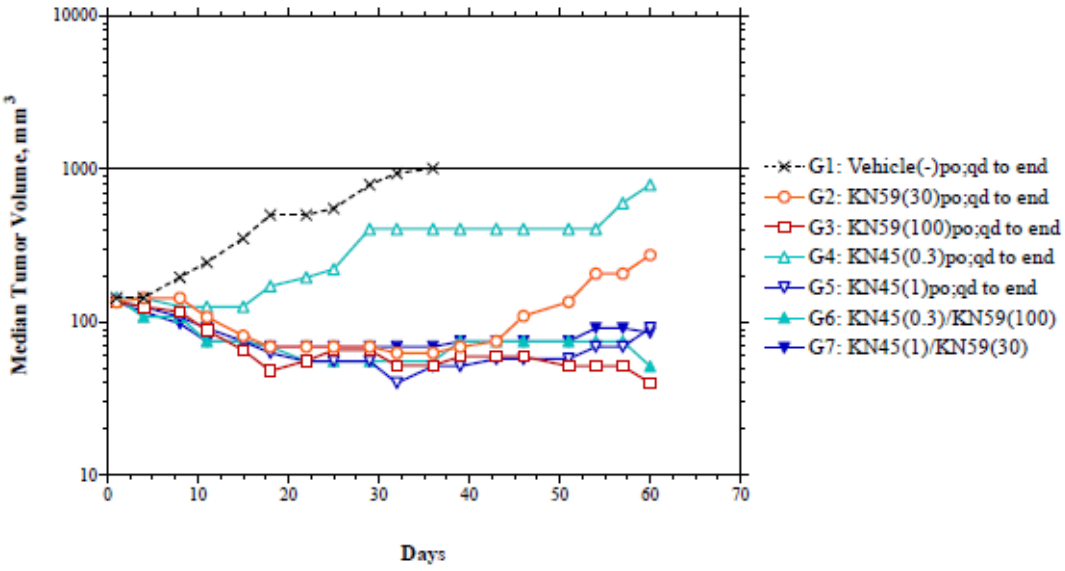
方法

試験 1：A375P F11 細胞株を 9～10 週齢の雌 CD-1 ヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍が定着して一定の大きさに増殖した（約 108～221 mm^3；各群の平均 150～154 mm^3）移植 21 日後に、GSK2118436（30 及び 100 mg/kg）、GSK1120212B（0.3 及び 1 mg/kg）の単独又は両被験物質（GSK2118436/GSK1120212B：100/0.3 及び 30/1 mg/kg/日）を 1 日 1 回 60 日間経口投与し、投与期間中に腫瘍体積が 1000 mm^3 に達した場合はその時点で投与を終了した（2012N132871_01）。週に 2 回、腫瘍の長径及び短径を測定して腫瘍体積を算出（長径×短径 ^{2}×0.5）し、試験 29 日目の腫瘍体積から腫瘍体積中央値（MTV）及び TGI を算出した。また、試験終了時に生存率及び MTV を算出した。体重は投与 1～5 日目は連日、それ以降は週に 2 回測定した。試験 29 日目の MTV 及び生存曲線について、媒体群との間で統計解析を行った（それぞれ Kruskal-Wallis Dunn's test 及び Logrank test）。

結果

媒体群では移植直後から持続的な腫瘍体積の増加がみられたのに対して、すべての被験物質投与群で腫瘍増殖は抑制された（図 2.6.2-3）。GSK1120212B の 0.3 mg/kg の単独投与群では増殖抑制期間は短く、投与約 16 日目以降に腫瘍の再増殖がみられた。試験 29 日目に算出した MTV（表 2.6.2-5）及び生存曲線に媒体群との有意差はみられなかった。

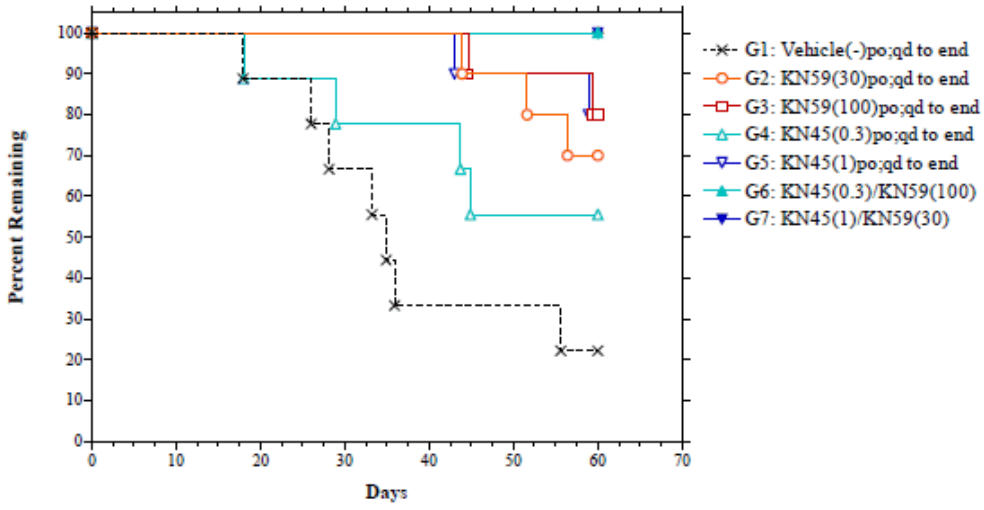
GSK2118436 の 30 mg/kg 単独投与群では、投与約 42 日目以降に腫瘍の再増殖がみられたが（図 2.6.2-3）、試験 29 日目に算出した MTV は媒体群と比較して有意に低く（表 2.6.2-5）、生存曲線においても媒体群との間に有意差がみられた（$p < 0.05$ vs 媒体群：Logrank test）。GSK2118436 の 100 mg/kg 及び GSK1120212B の 1 mg/kg の単独投与群では試験期間を通して腫瘍体積は増加せず、十分な腫瘍増殖抑制作用が認められる（図 2.6.2-3）とともに、各単独投与群と媒体群の生存曲線の間に有意差がみられた（$p < 0.01$ vs 媒体群：Logrank test）。一方、両被験物質の併用群（GSK2118436/GSK1120212B：100/0.3 及び 30/1 mg/kg/日）における腫瘍増殖抑制作用は GSK2118436 の 100 mg/kg 及び GSK1120212B の 1 mg/kg の単独投与群と同程度であったが（図 2.6.2-3）、生存に関しては、各単独投与群では試験終了までに 10 例中 2～5 例が死亡したのに対し、いずれの併用投与群も試験終了時点まで全例が生存し（図 2.6.2-4）、媒体群と各併用群の生存曲線の間に有意差がみられた（$p < 0.001$ vs 媒体群： Logrank test）（図 2.6.2-3）。すべての投薬群において、良好な忍容性が示された。



n=10
G1：Vehicle (媒体) 群 (0.5% HPMC-0.2% Tween 80 溶液)
G2 及び G3：KN59 (GSK2118436) 30 及び 100 mg/kg 投与群
G4 及び G5：KN45 (GSK1120212B) 0.3 及び 1 mg/kg 投与群
G6 及び G7：併用投与群 (GSK2118436/GSK1120212B：100/0.3 及び 30/1 mg/kg)

図 2.6.2-3　A375P F11 細胞株移植マウスの腫瘍増殖に対する GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果（MTV）

Data source: 2012N132871_01 の Figure 2



n=10
G1：Vehicle (媒体) 群 (0.5% HPMC-0.2% Tween 80 溶液)
G2 及び G3：KN59 (GSK2118436) 30 及び 100 mg/kg 投与群
G4 及び G5：KN45 (GSK1120212B) 0.3 及び 1 mg/kg 投与群
G6 及び G7：併用投与群 (GSK2118436/GSK1120212B：100/0.3 及び 30/1 mg/kg)

図 2.6.2-4　A375P F11 細胞株移植マウスの生存に対する GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果

Data source: 2012N132871_01 の Figure 2

表 2.6.2-5　　A375P F11 細胞株移植マウスの MTV に及ぼす影響

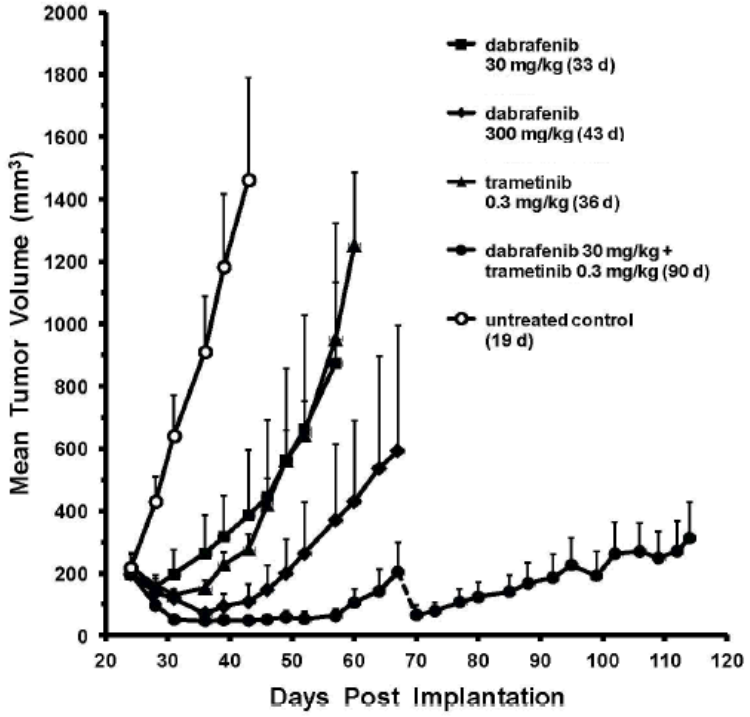
被験物質	投与量 (mg/kg)	MTV (mm^3) (試験 29 日目に算出)
媒体	-	726
GSK2118436	30	69*
	100	66*
GSK1120212B	0.3	405
	1	56**
GSK2118436 / GSK1120212B	100 / 0.3	56**
	30 / 1	69**

n=9～10
媒体：0.5% HPMC-0.2% Tween 80 溶液
* : $p < 0.01$, ** : $p < 0.001$ vs 媒体群 (Kruskal-Wallis Dunn's test)
Data source: 2012N132871_01 の Table 3

表 2.6.2-6　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおける GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果
（腫瘍増殖抑制作用又は生存率）

試験	投与群 (経口投与; mg/kg)	投与日数	併用効果 [a]	報告書番号
試験 1	GSK2118436 (30, 100) GSK1120212B (0.3, 1) 併用 (30 / 1, 100 / 0.3)	60 日間	併用群では媒体群と比較して有意に生存率が高かった。 各被験物質の高用量群で十分な腫瘍増殖抑制作用 (TGI≥90%) が認められたため、併用効果は評価できず (併用時の TGI≥90%)。	2012N132871_01
試験 2	GSK2118436 (10, 30) GSK1120212B (0.3, 1, 3) 併用 (10 / 0.3, 10 / 1, 30 / 0.3, 30 / 1)	14 日間	GSK1120212B の単独投与時ではいずれの用量でも十分な腫瘍増殖抑制作用 (TGI>100%) が認められたため、併用効果は評価できず (併用時の TGI は 112～124%)。	2012N139280_00
試験 3	GSK2118436 (30) 及び GSK1120212B (3)	14 日間ずつ交互に投与 ×3 クール (3 クール目の GSK1120212B のみ 7 日間投与)	TGI は 107%、試験期間を通して腫瘍増殖抑制作用は持続。	2012N139280_00
試験 4	GSK2118436 (10, 30, 300) GSK1120212B (0.1, 0.3) 併用 (10 / 0.1, 10 / 0.3, 30 / 0.1, 30 / 0.3)	90 日間	併用投与により各単独投与群と比較して TGI は上昇 (95～112%)、試験終了時まで作用持続。	2012N139280_00
試験 5	GSK2118436 (30) GSK1120212B (0.1, 0.3, 3) 併用 (30 / 0.1, 30 / 0.3)	56 日間	併用投与により各単独投与群と比較して TGI は上昇 (併用群の TGI はいずれも>100%)、試験終了時まで作用持続。	2012N139280_00
試験 6	GSK2118436 (30) 又は GSK1120212B (3) GSK2118436 (30) 及び GSK1120212B (3)	7 日間ずつ交互に投与 (単独投与群は隔週投与) ×4 クール	各被験物質単独の隔週投与と比較して、併用投与により TGI は上昇 (TGI=104 ～ 112%)、作用は長期間持続。	2012N139280_00
試験 7	GSK2118436 (30) GSK1120212B (0.3, 1) 併用 (30 / 0.3, 30 / 1)	14 又は 28 日間 (腫瘍細胞株移植の 1 週間後から投与開始)	併用投与群の腫瘍増殖抑制作用 (一定の腫瘍体積に達するまでの日数) は、最も効果の高い単独投与群 (GSK1120212B の 1 mg/kg) と比較して延長傾向 (有意差なし)。	2012N152372_01

n=10 (試験 1)、n=8 (試験 2～6)、n=15 (試験 7)
TGI：腫瘍増殖抑制率 (%) は最終投与日又は媒体群の腫瘍体積を最後に測定した日に算出
媒体：0.5% HPMC-0.2% Tween 80 溶液
a：各試験のいずれの併用投与群も忍容性は良好



Dabrafenib：GSK2118436
Trametinib：GSK1120212B
Untreated control：媒体 (0.5% HPMC-0.2% Tween 80 溶液)
平均値±標準誤差 (n=8)
用量の後に記載されている括弧内の数字は、投与日数 (平均腫瘍体積が 1200 mm^3 に達するか又は死亡がみられた場合、投与を中止した)

図 2.6.2-5　A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 又は GSK1120212B を最長 90 日間単独又は併用投与したときの腫瘍増殖曲線（試験 4 の一部）

Data source: [King, 2013]の Figure 7B (2012N139280_00 の Figure 3 の公表文献)

まとめ

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて、最大効果発現用量未満の GSK2118436（10 又は 30 mg/kg）及び GSK1120212B（0.1 又は 0.3 mg/kg）を 56 又は 90 日間併用投与することにより、腫瘍増殖抑制作用は各被験物質の単独投与と比較して増強され、より長期間持続した。生存について検討した試験（試験 1）では、GSK2118436 の 30 及び 100 mg/kg 並びに GSK1120212B の 1 mg/kg の各単独投与群と媒体群の生存曲線との間に有意差がみられた。各単独投与群では試験終了までに 10 例中 2～5 例が死亡したのに対し、いずれの併用投与群も試験終了時点まで全例が生存し、媒体群と各併用群の生存曲線の間に有意差がみられた。試験 1～7 のいずれの試験においても、併用投与の忍容性は良好であった。

2.6.2.3.　副次的薬理試験

GSK2118436 及び GSK1120212B の併用投与による副次的薬理試験は実施していない。

2.6.2.4.　　安全性薬理試験

臨床試験において GSK2118436 を投与した一部の患者で発熱が認められており、GSK2118436 及び GSK1120212B を併用投与することにより発現頻度の増加がみられたことから（2.5.5.2.4.2.）、発熱の機序を検討するためのフォローアップ試験の一環として、GSK2118436 及びその 3 種類の代謝物並びに GSK2118436 と GSK1120212B との併用処理におけるサイトカイン遊離に及ぼす影響を in vitro で検討した。

2.6.2.4.1.　　サイトカイン遊離に及ぼす影響

方法

試験 1：健康成人（3 名）より採取した PBMC に被験物質（GSK2118436 及び 3 種類の代謝物並びに GSK1120212B）を表 2.6.2-7 の 1～6 の組合わせで添加し、37℃で 20 時間インキュベートした後、培養液上清中の 9 種類のサイトカイン（IFNα、IFNγ、IP-10、IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70 及び TNF-α）の各濃度を MSD 電気化学発光免疫測定法により測定した（2013N160976_00）。

表 2.6.2-7　　試験 1 に用いた被験物質の濃度及び組合わせ

組合わせ	濃度 (μM)				
	GSK2118436	GSK1120212B	水酸化体	カルボン酸体	脱メチル体
1	9	0.06	-	-	-
2	3	0.02	-	-	-
3	9	-	9	33	3
4	3	-	3	11	1
5	9	0.06	9	33	3
6	3	0.02	3	11	1
臨床での定常状態における Cmax	3.9	0.037	2.1	11	0.87

Data source: 2013N160976_00 の Table 2

試験 2：健康成人（10 名）の血液をヘパリン処理し、被験物質（GSK2118436 及び 3 種類の代謝物並びに GSK1120212B）を表 2.6.2-8 の 1～9 の組合わせで添加し、37℃で 24 時間インキュベートした後、血漿中の 6 種類のサイトカイン（IFNα2、IFNγ、IP-10、IL-1β、IL-6 及び TNF-α）濃度を multiplex bead-based assay により測定した（2012N153974_00）。また、同様に LPS（0.3 ng/mL）刺激によるサイトカイン遊離に及ぼす影響についても検討した。

表 2.6.2-8　　試験 2 に用いた被験物質の濃度及び組合わせ

組合わせ	濃度 (μg/mL)				
	GSK2118436	GSK1120212B	水酸化体	カルボン酸体	脱メチル体
1	9.1	0.07	-	-	-
2	1	0.0078	-	-	-
3	0.03	0.0003	-	-	-
4	9.1	-	9.3	36.6	3.2
5	1	-	1	4.1	0.4
6	0.03	-	0.03	0.2	0.1
7	9.1	0.07	9.3	36.6	3.2
8	1	0.0078	1	4.1	0.4
9	0.03	0.0003	0.03	0.2	0.1

Data source: 2012N153974_00 の Table 38

結果

試験 1 及び 2 のいずれにおいても、GSK2118436 及び 3 種類の代謝物並びに GSK1120212B は、それぞれを単独処理したときと同様に併用処理のいずれの組合わせにおいても、PBMC からのサイトカイン遊離量及び血漿中サイトカイン濃度を上昇させず、LPS 刺激によるサイトカイン遊離も促進しなかった。GSK2118436 及び GSK1120212B の併用群では GSK2118436 の代謝物の存在下／非存在下にかかわらず、LPS 刺激による IP-10、IL-1β、IL-6 及び TNF-α の遊離は抑制されたが、IFNα2 及び IFNγ の遊離には影響はみられなかった。

2.6.2.5.　　薬力学的薬物相互作用試験

GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果を検討するため、種々の in vitro 及び in vivo 試験を実施した。これらの試験については、効力を裏付ける試験の項に記載した。

2.6.2.6.　　考察及び結論

2.6.2.6.1.　　効力を裏付ける試験

In vitro 試験

BRAF V600 変異陽性（V600E、V600K 又は V600D）の 17 種類のヒト悪性黒色腫由来細胞株を用いて GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果を検討した。その結果、GSK2118436 及び GSK1120212B のいずれに対しても感受性を示す 14 株中 13 株に対して、両被験物質を併用すると 2 種類の評価法のいずれにおいても併用効果が認められたが、1 株ではわずかに抑制作用が減弱した。両被験物質の単独処理に対して感受性を示さなかった 2 株では、併用処理しても増殖抑制作用はほとんど認められなかったが、GSK2118436 に耐性（IC50＞10000 nM）／GSK1120212B に低感受性（IC50＝45.4 nM）であった 1 株では、併用により増殖抑制作用がわずかに増強された。

高濃度の GSK2118436 で 1 週間以上培養することにより GSK2118436 に対して耐性を獲得した BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来の細胞クローンを GSK2118436 及び GSK1120212B で併用処理すると、検討したすべての耐性細胞クローンにおいて併用効果が認められた。耐性細胞クローンの細胞内シグナル伝達について検討した結果、GSK2118436 の単独処理では ERK リン酸化レベル並びにサイクリン D1 及び p27 蛋白レベルに変化はみ

られなかったが、GSK2118436 と GSK1120212B で併用処理すると、ERK のリン酸化レベル及び G1 期停止のマーカーとなるサイクリン D1 蛋白レベルの低下及び p27 蛋白レベルの増加が認められた。また、GSK2118436 に対する耐性を獲得した BRAF V600K 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来の細胞クローンにおいても、検討したすべての耐性細胞クローンにおいて併用効果が認められた。

ヒト悪性黒色腫由来細胞株及び GSK2118436 耐性細胞クローンのいずれにおいても、両被験物質併用によるアポトーシスの誘導への併用効果はみられなかった。

これらの結果から、GSK2118436 及び GSK1120212B を併用処理することで MAPK 経路がそれぞれの単独処理よりも効果的に抑制され、BRAF V600 変異陽性の腫瘍細胞の増殖をより強力に抑制するとともに、RAF 阻害薬に対する耐性を克服できる可能性が考えられた。

In vivo 試験

GSK2118436 又は GSK1120212B の単独投与により腫瘍増殖抑制作用を示すことが確認されている BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて、GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果を検討した。その結果、各被験物質の単独投与での最大効果発現用量未満の用量の GSK2118436（10 又は 30 mg/kg）及び GSK1120212B（0.1 又は 0.3 mg/kg）を 56 又は 90 日間併用投与することにより、各被験物質の単独投与と比較して増殖抑制作用は増強され、より長期間持続した。生存について検討した試験（試験 1）では、GSK2118436 の 30 及び 100 mg/kg 並びに GSK1120212B の 1 mg/kg の各単独投与群と媒体群の生存曲線との間に有意差がみられた。各単独投与群では試験終了までに 10 例中 2～5 例が死亡したのに対し、いずれの併用投与群も試験終了時点まで全例が生存し、媒体群と各併用群の生存曲線の間に有意差がみられた。試験 1～7 のいずれの試験においても、併用投与の忍容性は良好であった。

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて GSK2118436 及び GSK1120212B の併用投与により認められたこれらの強力かつ持続的な腫瘍増殖抑制作用の成績から、BRAF V600 変異陽性の悪性黒色腫患者における GSK2118436 及び GSK1120212B の併用療法の妥当性が支持された。

2.6.2.6.2.　安全性薬理試験

サイトカイン遊離に及ぼす影響

臨床試験において GSK2118436 を投与した一部の患者で発熱が認められており、GSK2118436 及び GSK1120212B を併用投与することにより発現頻度の増加がみられたことから（2.5.5.2.4.2.）、発熱の機序を検討するためのフォローアップ試験の一環として、ヒト PBMC 又は血液を GSK2118436 及び 3 種類の代謝物並びに GSK1120212B を併用処理したときのサイトカイン遊離量又は血漿中サイトカイン濃度に及ぼす影響を in vitro で検討した。

種々の組合わせで併用による影響を検討した結果、GSK2118436 及び 3 種類の代謝物並びに GSK1120212B は、それぞれを単独処理したときと同様にいずれの組合わせの併用処理においても、PBMC からのサイトカイン遊離量及び血漿中サイトカイン濃度の上昇は認められ

なかった。このことから、単独処理の試験成績と同様に併用処理の試験成績からも臨床試験でみられた発熱の発現機序を解明することはできなかった。

2.6.2.6.3.　　結論

GSK2118436（選択的 RAF 阻害薬）及び GSK1120212B（選択的 MEK1/2 阻害薬）の併用効果を検討した一連の in vitro 及び in vivo 試験により、併用により MAPK 経路がより効果的に抑制され、BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫に対してより強力な腫瘍増殖抑制作用を発現することが示された。また、GSK2118436 に耐性を示す細胞クローンに対しても増殖抑制作用を示し、マウス異種移植モデルにおいて持続的な腫瘍増殖抑制作用を示したことから、併用投与により RAF 阻害薬に対する耐性発現を遅延させる可能性が考えられた。

これらの試験成績から、GSK2118436 及び GSK1120212B は併用投与により、BRAF V600 変異を有する悪性黒色腫患者において単独投与より強力に腫瘍増殖を抑制できる可能性とともに、RAF 阻害薬に対する耐性の発現を遅延させる可能性が示唆される。

2.6.2.7.　　図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8.　　参考文献

Alcala AM, Flaherty KT. BRAF inhibitors for the treatment of metastatic melanoma: clinical trials and mechanisms of resistance. *Clin Cancer Res.* 2012;18:33-9.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364:2507-16.

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27-55.

Cichowski K, Jänne PA. Drug discovery: inhibitors that activate. *Nature.* 2010;464:358-9.

Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:20411-6.

King AJ, Arnone MR, Bleam MR, et al. Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions. *PLoS One.* 2013;8:e67583.

Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med.* 2013;19:1401-9.

Liu L, Shi H, Liu Y, et al. Synergistic effects of foretinib with HER-targeted agents in MET and HER1- or HER2-coactivated tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 2011;10:518-30.

Nazarian R, Shi H, Wang Q, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* 2010;468:973-7.

Sullivan RJ, Flaherty KT. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur J Cancer.* 2013;49:1297-304.

2.6.3. 薬理試験概要表

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表

被験物質：GSK1120212A、GSK1120212B

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
効力を裏付ける試験					
In vitro 試験					
BRAF による U-MEK1/2 の活性化に対する阻害作用	U-MEK1/2	In vitro	GSK	UH2008/00021/00	4.2.1.1.
U-MEK1 の Ser218 及び Ser222 のリン酸化へ及ぼす影響	U-MEK1				
U-MEK1 に対する結合動態パラメータ	U-MEK1	In vitro	[redacted](日本)	UH2008/00046/00	4.2.1.1.
P-MEK1/2 活性に対する阻害作用	P-MEK1/2	In vitro	GSK	UH2008/00021/00	4.2.1.1.
P-MEK1 に対する阻害様式	P-MEK1				
P-MEK1 における PD0325901 との競合様式	P-MEK1				
各種キナーゼに及ぼす影響 (選択性)					
キナーゼパネルにおける検討	各種キナーゼ	In vitro	GSK	UH2008/00021/00	4.2.1.1.
			[redacted](米国)	UH2008/00047/00	4.2.1.1.
MEK5 に及ぼす影響	マウス胎児皮膚由来 NIH3T3 細胞株	In vitro	GSK	UH2007/00097/02	4.2.1.1.
腫瘍細胞増殖抑制作用					
各種ヒト腫瘍細胞株における BRAF 及び RAS の変異と GSK1120212B に対する感受性との関連の網羅的解析 (試験 1)	各種ヒト腫瘍細胞株 (BRAF あるいは RAS 変異陽性又は BRAF/RAS 野性型)	In vitro	GSK	UH2007/00097/02	4.2.1.1.
各種ヒト腫瘍細胞株における ERK リン酸化レベルと GSK1120212B に対する感受性との関連性	各種ヒト腫瘍細胞株 (BRAF あるいは RAS 変異陽性又は BRAF/RAS 野性型)	In vitro			
各種ヒト腫瘍細胞株における BRAF 及び RAS の変異と GSK1120212B に対する感受性との関連の網羅的解析 (試験 2)	各種ヒト腫瘍細胞株 (BRAF あるいは RAS 変異陽性又は BRAF/RAS 野性型)	In vitro	GSK	2014N205857_00	4.2.1.1.

GSK：GlaxoSmithKline、U-MEK：不活性型 MEK、P-MEK：リン酸化 MEK

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表（つづき）

被験物質：GSK1120212A、GSK1120212B

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
各種ヒト腫瘍細胞株における DUSP6 mRNA レベルと GSK1120212B に対する感受性との関連性	各種ヒト腫瘍細胞株 (BRAF あるいは RAS 変異陽性又は BRAF/RAS 野性型)	In vitro	GSK	2014N205857_00	4.2.1.1.
BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用	各種ヒト悪性黒色腫細胞株	In vitro	GSK	2011N116395_00	4.2.1.1.
BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株に対する増殖抑制作用の可逆性	各種ヒト悪性黒色腫細胞株	In vitro	GSK	UH2007/00097/02	4.2.1.1.
ヒト悪性黒色腫由来 GSK2118436 耐性細胞クローンに対する増殖抑制作用	BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 及び BRAF V600K 変異陽性の YISIT1 細胞株並びに GSK2118436 耐性細胞クローン	In vitro	GSK	2011N116394_00	4.2.1.1.
細胞周期に及ぼす影響	BRAF V600E 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HT29 細胞株	In vitro	[redacted](日本)	UH2008/00045/00	4.2.1.1.
アポトーシス誘導作用	BRAF V600E 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HT29 及び Colo205 細胞株				
獲得耐性に関する検討					
耐性細胞クローンの遺伝子配列解析	KRAS 変異陽性のヒト結腸直腸癌由来 HCT116 細胞株、GSK1120212B 耐性 HCT116 (212-Res) 細胞株及び耐性細胞クローン	In vitro	GSK	UH2008/00029/00	4.2.1.1.
MEK2 RNA 干渉による検討	KRAS 変異陽性の HCT116 細胞株由来 GSK1120212B 耐性細胞クローン				

GSK：GlaxoSmithKline

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表（つづき）

被験物質：GSK1120212A、GSK1120212B

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
代謝物の薬理活性					
M5 の薬理活性	U-MEK1、P-MEK1 及びヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株	In vitro	GSK	2012N139081_00	4.2.1.1.
M7 の薬理活性	P-MEK1	In vitro	GSK	2012N148387_00	4.2.1.1.
ラット、イヌ及びヒト末梢血単核細胞を用いた in vitro におけるサロゲートマーカーの検討	ラット、イヌ及びヒト末梢血単核細胞	In vitro	GSK	UH2008/00030/00	4.2.1.1.
In vivo 試験					
BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおける検討					
ERK リン酸化阻害作用 (単回経口投与による作用持続時間；単回経口投与による用量反応性及び 4 日間経口投与；単回並びに 7 及び 14 日間経口投与)	マウス異種移植モデル (雌 CD1 ヌードマウス及びヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株	経口	GSK	UH2008/00051/03	4.2.1.1.
p27 蛋白レベル増加作用					
腫瘍増殖抑制作用					
サロゲートマーカーの検討	雌 CD1 ヌードマウス	経口	GSK	UH2008/00030/00	4.2.1.1.
副次的薬理試験					
各種受容体、チャネル、酵素及びキナーゼに及ぼす影響	各種受容体、チャネル、酵素及びキナーゼ	In vitro	[redacted]（フランス）	CD2007/01300/00	4.2.1.2.
			GSK	UH2008/00021/00	4.2.1.2.
			[redacted]（米国）	UH2008/00047/00	4.2.1.2.
正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の増殖に及ぼす影響	HUVEC	In vitro	GSK	UH2007/00097/02	4.2.1.2.

GSK：GlaxoSmithKline、U-MEK：不活性型 MEK、P-MEK：リン酸化 MEK

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表（つづき）

被験物質：GSK1120212A、GSK1120212B

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
安全性薬理試験					
中枢神経系に及ぼす影響	雄 SD ラット	経口	[redacted](日本)	CD2007/01303/00	4.2.1.3.
呼吸系に及ぼす影響	雄 SD ラット	経口	GSK	CD2007/00963/00	4.2.1.3.
心血管系に及ぼす影響					
hERG アッセイ	hERG cDNA 導入 HEK293 細胞	In vitro	GSK	FD2007/00151/00	4.2.1.3.
ウサギ左心室ウェッジ標本を用いた試験	雌ウサギ左心室ウェッジ標本	In vitro	[redacted](米国)	UH2007/00108/00	4.2.1.3.
イヌにおける in vivo 試験 (静脈内投与、非 GLP 試験)	雄ビーグル犬	静脈内	[redacted](日本)	CD2007/01301/00	4.2.1.3.
イヌにおける in vivo 試験 (経口投与、GLP 試験)	雄ビーグル犬	経口	[redacted](カナダ)	CD2007/00962/00	4.2.1.3.

GSK：GlaxoSmithKline

2.6.3.2. 効力を裏付ける試験

2.6.3.1.参照

2.6.3.3. 副次的薬理試験

2.6.3.1.参照

2.6.3.4. 安全性薬理試験

被験物質：GSK1120212A、GSK1120212B

試験の種類	動物種、系統及び性別	投与方法	用量又は濃度	例数及び標本数/群	結果	GLP適用	添付場所
中枢神経系に及ぼす影響	雄 SD ラット	経口	100 mg/kg	4	100 mg/kg で体重増加の抑制がみられた (体重増加は媒体群の 1/3)。また、自発運動量の減少 (投与 2 及び 24 時間後)、腹臥位 (投与 2 及び 3 時間後)、眼瞼下垂 (投与 3、4 及び 24 時間後)、下痢 (投与 4～24 時間後)、立毛 (投与 24 時間後) 及び散瞳 (投与 24 時間後) が認められた。	非適	4.2.1.3.
呼吸系に及ぼす影響	雄 SD ラット	経口	0.016、0.0625、0.125 mg/kg (それぞれ 0.125、0.5、1 mg/m^2)	4	0.125 mg/kg で軽度で一過性の体温低下 (最大 0.8°C、投与 1 時間後) がみられた。換気機能及び気道抵抗に影響は認められなかった。	適	4.2.1.3.
心血管系に及ぼす影響							
hERG アッセイ	hERG cDNA 導入 HEK293 細胞	In vitro	0.0327、0.1091、0.3272、1.0908、3.2724、10.9079 μM (それぞれ 20.1、67.1、201.4、671.3、2013.9、6712.8 ng/mL)	5	IC25、IC50 及び IC75 はそれぞれ 0.448、1.54 及び 5.30 μM (275.7、947.7 及び 3261.7 ng/mL) であった。	適	4.2.1.3.
ウサギ左心室ウェッジ標本を用いた試験	雌ウサギ左心室ウェッジ標本	In vitro	0.3、1、10、30 μM (それぞれ 180、620、6150、18450 ng/mL)	4	QT 間隔に影響を及ぼさなかった。10 及び 30 μM で等尺性収縮力をそれぞれ 16.3 及び 64.8%低下させた (いずれも有意差あり、t-検定)。また、30 μM で Tp-e 間隔を約 26%短縮させた (有意差あり、t-検定)。	非適	4.2.1.3.
イヌにおける in vivo 試験 (静脈内投与、非 GLP 試験)	雄ビーグル犬	静脈内	1 mg/kg (20 mg/m^2)	3	心電図パラメータ、血圧及び心拍数に影響を及ぼさなかった。血漿中 GSK1120212 濃度は投与開始 10 分後まで増加し、最高血漿中 GSK1120212 濃度は 2.5 μM (1500 ng/mL) であった。	非適	4.2.1.3.
イヌにおける in vivo 試験 (経口投与、GLP 試験)	雄ビーグル犬	経口	0.025、0.038、0.075 mg/kg (それぞれ 0.5、0.75、1.5 mg/m^2)	4	動脈圧、心拍数、心電図パラメータ (波形異常、不整脈及び間隔) 及び体温に影響を及ぼさなかった。	適	4.2.1.3.

2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし

2.6.3. 薬理試験概要表（タフィンラー／メキニスト併用）

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表

被験物質：GSK2118436A、GSK1120212B

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
効力を裏付ける試験 (GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果)					
In vitro 試験					
BRAF V600 変異陽性ヒト悪性黒色腫由来細胞株の増殖に及ぼす影響	各種ヒト悪性黒色腫由来細胞株	In vitro	GSK	2011N116395_00	4.2.1.1.
BRAF V600E 変異陽性ヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株より単離した GSK2118436 耐性細胞クローンに対する併用効果	ヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株及び GSK2118436 耐性細胞クローン	In vitro	GSK	2011N116394_00	4.2.1.1.
BRAF V600K 変異陽性ヒト悪性黒色腫由来 YUSIT1 細胞株より単離した GSK2118436 耐性細胞クローンに対する併用効果	ヒト悪性黒色腫由来 YISIT1 細胞株及び GSK2118436 耐性細胞クローン	In vitro			
In vivo 試験					
ヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおける GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果	マウス異種移植モデル (雌 CD-1 ヌードマウス及び BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株)	経口	[redacted](米国)	2012N132871_01	4.2.1.1.
		経口	GSK	2012N139280_00	4.2.1.1.
		経口	GSK	2012N152372_01	4.2.1.1.
安全性薬理試験					
サイトカイン遊離に及ぼす影響	ヒト PBMC	In vitro	GSK	2013N160976_00	4.2.1.3.
	ヒト全血	In vitro	GSK	2012N153974_00	4.2.1.3.

GSK：GlaxoSmithKline

2.6.3.2. 効力を裏付ける試験

2.6.3.1.参照

2.6.3.3. 副次的薬理試験

該当試験なし

2.6.3.4. 安全性薬理試験

被験物質：GSK2118436A、GSK1120212B

試験の種類	試験系	投与方法	濃度	標本数/群	結果	GLP 適用	添付場所
サイトカイン遊離に及ぼす影響 (併用効果)	ヒト PBMC	In vitro	GSK2118436 及び 3 種類の代謝物並びに GSK1120212B を種々の濃度で組み合わせて実施	3	併用処理のいずれの組合わせにおいても、PBMC からのサイトカイン遊離量を上昇させず。	非適	4.2.1.3.
	ヒト全血	In vitro		10	併用処理のいずれの組合わせにおいても、血漿中サイトカイン濃度を上昇させず。	非適	4.2.1.3.

2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし