タフィンラーカプセル50mg
タフィンラーカプセル75mg

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）

2.4.　非臨床試験の概括評価

ノバルティスファーマ株式会社

Apr 14 2015 15:13:53

非臨床試験の概括評価の目次

頁

2.4. 非臨床試験の概括評価 1

2.4.1. 非臨床試験計画概略 1

2.4.2. 薬理試験 2

2.4.2.1. 効力を裏付ける試験 2

2.4.2.2. 副次的薬理試験 6

2.4.2.3. 安全性薬理試験 7

2.4.2.4. 薬力学的薬物相互作用試験 8

2.4.3. 薬物動態 8

2.4.3.1. 吸収 8

2.4.3.2. 分布 9

2.4.3.3. 代謝 10

2.4.3.4. 排泄 11

2.4.3.5. 薬物動態学的薬物相互作用 11

2.4.4. 毒性試験 13

2.4.4.1. 急性毒性 13

2.4.4.2. 反復投与毒性 13

2.4.4.3. 遺伝毒性 18

2.4.4.4. 生殖発生毒性 18

2.4.4.5. その他の毒性 19

2.4.5. 総括及び結論 20

2.4.6. 図表 22

2.4.7. 参考文献 22

2.4 の略号等一覧

略語（略称）	内容
ALK5	Activin receptor-like kinase 5
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	アデノシン三リン酸
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	ヒト breast cancer resistance protein
Bcrp1	マウス breast cancer resistance protein 1
BDC	胆管カニュレーション処置
BRK	Breast tumor kinase (protein tyrosine kinase 6)
CAR	Constitutive androstane receptor
CK1	Casein kinase 1
CLb	血液クリアランス
Cmax	最高血漿中濃度
CRC	結腸直腸癌
CYP	チトクローム P450
DMBA	7,12-dimethylbenz-(a)anthracene
EC50	50%有効濃度
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
F	経口バイオアベイラビリティ
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GSK3	Glycogen synthase kinase-3
hERG	Human ether-a-go-go related gene
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-10	Interferon-γ-inducing protein 10
Lck	Lymphocyte cellular kinase
LIMK	LIM kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase
NEK	NIMA (never in mitosis gene A)-related kinase
mRNA	メッセンジャーリボ核酸
OAT	ヒト organic anion transporter
OATP	ヒト organic anion transporting polypeptide
OCT	ヒト organic cation transporter
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
PERK	Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinases
Pgp	P-糖蛋白質
PKD	Protein kinase D
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
PXR	Pregnane X receptor
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー
SIK	Salt-inducible kinase
S6P	S6 リボソーム蛋白質
TdP	トルサード・ド・ポアント(多形性心室性頻拍)

2.4 の略号等一覧（つづき）

略語（略称）	内容
TGF-β	Transforming growth factor-β
TNF-α	腫瘍壊死因子-α
TPA	12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
Tp-e	貫壁性再分極相のばらつき
UGT	UDP-グルクロン酸転移酵素
Vdss	定常状態における分布容積
XC50	IC50 又は EC50

2.4.　非臨床試験の概括評価

2.4.1.　非臨床試験計画概略

GSK2118436 は、V600 遺伝子変異（以下、V600 変異）を有する BRAF キナーゼを強力かつ選択的に阻害する RAF 阻害薬である。BRAF V600 変異は悪性黒色腫に高頻度でみられ、腫瘍増殖シグナルにおいて重要な役割を担っていることから、GSK2118436 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。GSK2118436 は選択的 MEK1/2 阻害薬である GSK1120212B との併用により、BRAF V600 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株を用いた in vitro 及び in vivo 試験で相加又は相乗的な腫瘍増殖抑制作用を示し、RAF 阻害薬の副作用として知られる皮膚の増殖性病変（扁平上皮癌等）の発現を軽減できる可能性が示唆されることから、「BRAF V600 遺伝子変異を有する悪性黒色腫」の治療を目的として、GSK1120212B との併用での開発が進められた。以下に、GSK2118436 単独の薬理、薬物動態及び毒性試験成績に加え、GSK1120212B との併用による試験計画についても記載する。なお、非臨床試験における投与量及び濃度は、すべて遊離塩基に換算して表記した。

薬理試験では、GSK2118436 の悪性黒色腫に対する効力を裏付ける試験として、in vitro において BRAF（野生型及び V600 変異陽性）に対するキナーゼ阻害活性及びその阻害様式、RAF キナーゼに対する選択性、並びに BRAF V600 変異陽性の悪性黒色腫を含む各種ヒト腫瘍細胞株における ERK リン酸化阻害作用、増殖抑制作用及び獲得耐性機序を検討した。また、in vivo において、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 ERK リン酸化阻害作用及び腫瘍増殖抑制作用を検討した。また、3 種類のヒト血漿中主代謝物の薬理作用についても in vitro 及び in vivo で検討した。副次的薬理試験として、各種受容体、イオンチャネル、トランスポーター、キナーゼ及び酵素に対する作用、in vitro におけるヒト正常細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。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及ぼす影響を検討した。なお、主要な安全性薬理試験は GLP 適用試験として実施した。試験には主に GSK2118436A（遊離塩基）を、一部には GSK2118436B（メシル酸塩）を使用した。

GSK1120212B との併用での効力を裏付ける試験として、in vitro における 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並びに BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株より単離した GSK2118436 耐性細胞クローンの増殖に対する併用効果について検討した。また、BRAF V600E 変異陽性の悪性黒色腫由来細胞株を用いたマウス異種移植モデルを用いて、併用投与したときの腫瘍増殖抑制作用についても検討した。併用試験には、GSK2118436A 及び GSK1120212B（ジメチルスルホキシド付加物）を使用した。

臨床において GSK2118436 を投与した一部の患者で発熱がみられ、その発現頻度は GSK1120212B と併用投与することにより増加したことから、発熱の機序を検討するためのフォローアップ試験として、GSK2118436 の単独処理又は GSK2118436 及び 3 種類のヒト血漿中主代謝物並びに GSK1120212B を併用処理したときのプロスタノイド受容体に対する作用及びサイトカイン遊離に及ぼす影響を in vitro で検討した。

薬物動態試験では、マウス、ラット、イヌ、ブタ及びサルを用いて、GSK2118436 並びに一部の試験では、ヒト血漿中主代謝物であるカルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体の薬物動態について評価した。非臨床薬物動態試験での投与経路は臨床投与経路の経口とし、一部の試験では静脈内投与で実施した。

毒性試験では、GSK2118436A 又は GSK2118436B のラット及びイヌの単回投与／最大耐量試験、マウス、ラット及びイヌを用いたそれぞれ最長 26、13 及び 13 週間反復経口投与毒性試験、in vitro／in vivo 遺伝毒性試験、並びにラットの雌受胎能及び胚・胎児発生に関する試験を実施した。その他の毒性試験として、皮膚への影響及び発熱に関する検討、in vitro／in vivo 光毒性試験及びイヌを用いた MEK 阻害薬である GSK1120212B（臨床使用時の併用薬）との併用投与試験を実施した。重要な試験のほとんどは GLP 適用試験として実施した。

GSK2118436B の対象疾患が悪性黒色腫であることから、「がん原性試験ガイドライン」[薬食審査発第 1127001 号通知, 2008]及び「抗悪性腫瘍薬の非臨床試験に関するガイドライン」[薬食審査発 0604 第 1 号通知, 2010]に基づき、がん原性試験、並びに出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験は実施していない。また、ラットの雌受胎能及び胚・胎児発生に関する試験において 300 mg/kg/日で胚致死及び催奇形性がみられたことから、「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」[薬食審査発 0604 第 1 号, 2010]に従い、第二の動物種を用いた胚・胎児発生に関する試験は実施していない。

2.4.2.　薬理試験

2.4.2.1.　効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1.　GSK2118436 の薬理作用

GSK2118436 はキナーゼ阻害アッセイにおいて、ヒト変異型 BRAF（V600E、V600K 及び V600D）に対して強力な阻害作用を示した（IC50＝0.5～1.84 nM）（2.6.2.2.1.1.1.）。同様に、ヒト野生型 BRAF 及び切断型 CRAF に対しても強力な阻害作用を示した（それぞれの IC50＝3.2 及び 5.0 nM）。また、ラット、イヌ及びサルの野生型 BRAF に対して、ヒトの野生型 BRAF と同程度の阻害活性を示した（2.6.2.2.1.1.2.）。GSK2118436 は RAF 以外の 250 種類以上のキナーゼに対してはほとんど阻害活性を示さず、阻害活性が認められたのは 10 種類のキナーゼ（ヒト ALK5、SIK、SIK2、BRK、LIMK1、NEK11、PKD2、PERK 及び変異型 Tie2（R849W）並びに yeast CK1）のみであり（IC50＜100 nM）、RAF キナーゼに対する高い選択性が示された（2.6.2.2.1.2.）。阻害活性が認められたキナーゼの中で GSK2118436 は TGF-βI 型受容体である ALK5 に対して最も強力な阻害作用を示した（IC50＝12 nM）が、機能アッセイで細胞内 ALK5 シグナル伝達に及ぼす影響を検討した結果、IC50 は 3900 nM と弱かった（キナーゼアッセイにおける ALK5 阻害作用の IC50 と比較して 325 倍）。また、GSK2118436 の RAF に対する阻害様式は、ATP 結合ポケットにおける ATP との競合的阻害であることが示された（2.6.2.2.1.3.）。

ヒト腫瘍細胞株のシグナル伝達に及ぼす影響（RAF の下流に存在する MEK 及び ERK のリン酸化阻害作用を指標）を検討した試験では、BRAF V600E 変異陽性の種々のヒト腫瘍由来細胞株において濃度依存的な MEK／ERK リン酸化阻害作用を示した（IC50＝3～＜

120 nM）のに対し、野生型 BRAF を有する細胞株においては ERK リン酸化阻害作用を示さなかった（IC50＞1111 nM）（2.6.2.2.1.4.1.）。また、ERK リン酸化阻害作用は、GSK2118436 の除去 6 時間後には完全に消失したことから、可逆的であることが示された。

腫瘍細胞株の増殖に及ぼす影響について検討した試験では、BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株の増殖を ERK リン酸化阻害作用（IC50＝5 nM）と同程度の濃度で抑制した（IC50＝3 nM）（2.6.2.2.1.5.1.）。108 種類のヒト腫瘍由来細胞株パネルを用いた検討では、GSK2118436 の腫瘍増殖抑制作用は BRAF V600 変異陽性の腫瘍細胞株に選択的であった（2.6.2.2.1.5.2.）。また、BRAF V600E 変異陽性腫瘍細胞株の GSK2118436 に対する感受性は組織の由来にかかわらず同程度であることが示された（高感受性株（IC50＜10 nM）は BRAF V600E/D 変異陽性の腫瘍細胞株で 20 株中 13 株であったのに対し、野生型 BRAF 又は V600 以外の BRAF 変異を有する腫瘍細胞株 88 株では高感受性株なし）。17 種類の BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株を用いた検討では、17 株中 14 株（82%）が GSK2118436 に対して感受性を示した（IC50＝5～171 nM）（2.6.2.2.1.5.3.）。

また、BRAF V600E 変異陽性のヒト腫瘍由来細胞株を GSK2118436 で処理したところ、濃度依存的に G0/G1 期で細胞周期が停止する細胞が増加し、アポトーシスが誘導された（2.6.2.2.1.6.及び 2.6.2.2.1.7.）。一方、野生型 BRAF を有する細胞株に対しては、GSK2118436 は細胞周期を停止させず、アポトーシス誘導を示さなかった。これらのことから、GSK2118436 のヒト腫瘍由来細胞株に対する増殖抑制作用は、腫瘍組織の由来にかかわらず BRAF V600E 変異陽性の腫瘍細胞株に選択的であり、増殖抑制作用の機序として細胞周期を G0/G1 期で停止させることによるアポトーシスの誘導が関与していると考えられる。

In vitro で GSK2118436 に高い感受性を示した 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、GSK2118436 の ERK リン酸化及び腫瘍増殖に及ぼす影響を検討したところ、GSK2118436 は単回及び反復経口投与により腫瘍中の ERK リン酸化を阻害した（2.6.2.2.2.1.1.）。その作用は用量依存的（30 mg/kg でほぼ最大作用）であり、ERK リン酸化阻害の程度と血中及び腫瘍中濃度との間に関連性がみられた。また、A375P F11 細胞株移植マウスにおいて、GSK2118436 の有効性を異なる投与経路及び種々の投与スケジュール（異なる用量及び投与期間）で検討したところ、いずれの試験においても腫瘍増殖抑制作用がみられた（2.6.2.2.2.1.2.）。用量依存性を検討した試験では、0.1～100 mg/kg/日の経口投与で用量依存的な腫瘍増殖抑制作用がみられた。このような in vivo における用量依存的な ERK リン酸化阻害作用及び腫瘍増殖抑制作用は BRAF V600E 変異陽性のヒト CRC 由来 Colo205 細胞株及びヒト卵巣癌由来 ES-2 細胞株（ERK リン酸化阻害作用のみ検討）を用いたマウス異種移植モデルでも認められた（UH2008/00145/03）ことから、in vitro 試験の成績と同様に、GSK2118436 は腫瘍組織の由来にかかわらず BRAF V600E 変異陽性の腫瘍細胞株に対して選択的に腫瘍増殖抑制作用を発揮することが示唆された。

V600 変異陽性の BRAF は悪性黒色腫で発現の頻度が高く、キナーゼ活性が亢進しており [Davies, 2002]、MAPK 経路を恒常的に活性化させることから、V600 変異陽性の BRAF が悪性黒色腫治療において重要な標的であると考えられている。以上の成績から、GSK2118436

は経口投与で強力かつ選択的に RAF を阻害し、BRAF V600 変異陽性の腫瘍細胞株の増殖を抑制することが示された。

2.4.2.1.2.　　獲得耐性機序

臨床において RAF 阻害剤の使用により、それらの薬剤に対する耐性腫瘍の出現が報告されている[Alcala, 2012; Lito, 2013]ことから、BRAF V600 変異陽性の 2 種類のヒト悪性黒色腫由来細胞株を高濃度の GSK2118436 で 1 週間以上処理し、耐性細胞出現の有無を検討した。出現した耐性細胞をクローン化して単離し、耐性化にかかわる遺伝子変異及び細胞内シグナル伝達の変化について検討した。

BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を高濃度の GSK2118436 で 1 週間以上処理し、GSK2118436 に対して耐性を獲得したサブクローンを単離した（IC50＞10000 nM）（2.6.2.2.1.8.1.）。この耐性細胞クローンを用いて、耐性化にかかわる遺伝子変異及び細胞内シグナル伝達の変化について検討した結果、これらの耐性細胞クローンは、別の RAF 阻害薬であるベムラフェニブに対しても交差耐性を示し（IC50＞10000 nM）、MEK 阻害薬である GSK1120212B に対する感受性も 1/10 以下に低下していた。同様に、BRAF V600K 変異陽性の YUSIT1 細胞株を GSK2118436 で 1 週間以上処理することにより得た GSK2118436 に耐性を示す細胞クローン（感受性が親細胞株の 1/38 以下に低下）においても、GSK1120212B に対する感受性は約 1/7～1/3 に低下していた（2.6.2.2.1.8.1.2.）。耐性細胞クローンにおける細胞内シグナル伝達への GSK2118436 の影響について検討した結果、親細胞株でみられた MAPK 経路に対する抑制作用（MEK、ERK 及び S6P リン酸化阻害作用並びにサイクリン D1 発現レベルの低下）は耐性細胞クローンでは弱い又はほとんど認められなかった（2.6.2.2.1.8.2.）。また、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。耐性細胞クローンの NRAS（NRAS Q61K 及び NRAS A146T 変異陽性）をショートヘアピン RNA（shRNA）で処理して NRAS を安定的にノックダウンさせると、GSK2118436 に対する感受性が回復した。また、親細胞株に MEK1 K59del 変異を導入すると、GSK2118436 に対する感受性の低下が認められたが、MEK1 P378S 変異を導入しても感受性に影響はみられなかった（2011N116394_00）。

これらのことから、BRAF V600 変異陽性の腫瘍細胞株における GSK2118436 に対する耐性獲得には、NRAS 及び MEK1 の変異による MAPK 経路の再活性化が関与していると考えられる。類薬であるベムラフェニブ及び PLX4720 に対する耐性獲得にも、NRAS 及び MEK1 の変異による MAPK 経路の再活性化が関与していることが報告されている[Emery, 2009; Nazarian, 2010]。

2.4.2.1.3.　　代謝物の薬理作用

GSK2118436 のヒト血漿中主代謝物として 3 種類（水酸化体、カルボン酸体及び脱メチル体）が同定されており、そのうち脱メチル体及び水酸化体は野生型及び変異型の RAF キナーゼに対して GSK2118436 と同程度又はやや弱い阻害活性を示したが、カルボン酸体はこれらのキナーゼに対する阻害活性が弱いこと（IC50 は GSK2118436 の約 21～47 倍）が示され

た（2.6.2.2.3.1.1.）。代謝物の野生型 BRAF に対する阻害活性は、GSK2118436 と同様に、ラット、イヌ、サル及びヒト由来の野生型 BRAF 間で同程度であり、BRAF 阻害作用に種差はほとんどないことが示された。

3 種類の主代謝物の種々のヒトキナーゼに対する阻害作用についても検討したところ、IC50 が 100 nM 未満の阻害作用を示したキナーゼはカルボン酸体で 1 種類、水酸化体で 4 種類及び脱メチル体で 5 種類のみであり、RAF に対する高い選択性が確認された（2.6.2.2.3.1.2.）。また、TGF-βI 型受容体（ALK5）阻害作用を検討したところ、いずれの代謝物もほとんど阻害活性を示さなかった（IC50≧300 nM）。これらのことから、3 種類の代謝物は GSK2118436 と同様に RAF に対する選択性を有することが示された。

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株移植マウスに各代謝物を静脈内投与したところ、最大用量である 20 mg/kg を投与したときの ERK リン酸化阻害作用は 3 種類の代謝物間で同程度であった（2.6.2.2.3.2.1.）。GSK2118436 はマウスにおいて、水酸化体、カルボン酸体及び脱メチル体へと順次代謝されると考えられている（2.6.4.5.5.）ことから、水酸化体又はカルボン酸体を投与したときの ERK リン酸化阻害作用には、生成した脱メチル体（表 2.6.2-21）の作用も関与していると考えられる。A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 及び脱メチル体のそれぞれ 30 mg/kg を単回経口投与して作用を比較した結果、両被験物質間で血中濃度及び ERK リン酸化阻害作用は同程度であった（2.6.2.2.3.2.2.）ことから、GSK2118436 を投与したときにみられる ERK リン酸化阻害作用における脱メチル体の寄与は大きいと考えられる。

GSK2118436 はヒトにおいても、水酸化体、カルボン酸体及び脱メチル体へと順次代謝されると考えられており（2.7.2.3.1.1.3.）、GSK2118436 をヒトに反復投与したときの AUC（平均値）に関する各代謝物と未変化体の比（代謝物 AUC(0-tau)／未変化体 AUC(0-tau)）は、水酸化体で約 0.7、カルボン酸体で約 13.5、脱メチル体で約 0.8 であった（2.7.2.2.1.1.2.4.）。水酸化体及び脱メチル体は in vitro において GSK2118436 と同程度のキナーゼ阻害活性、ERK リン酸化阻害作用及び細胞増殖抑制作用を示しており、in vivo においても阻害活性が確認されていることから、GSK2118436 を投与したときの薬理活性には、GSK2118436 に加えて、水酸化体及び脱メチル体の寄与が大きいと考えられる。

2.4.2.1.4.　GSK2118436／GSK1120212B 併用の薬理試験

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、腫瘍細胞に対する増殖抑制作用が増強されるとともに、RAF 阻害薬の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[Alcala, 2012; Lito, 2013]を抑制し、耐性の発現を遅延させる可能性が考えられる。そこで、GSK2118436 及び GSK1120212B を併用投与したときの腫瘍増殖抑制作用を in vitro 及び in vivo で検討した。

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ところ、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（2.6.2.2.1.1.タフィンラー／メキニスト併用）。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（2.6.2.2.1.2.1.タフィンラー／メキニスト併用）。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（2.6.2.2.1.2.2.タフィンラー／メキニスト併用）。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（2.6.2.2.1.3.タフィンラー／メキニスト併用）。

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、in vivo における GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果を検討した（試験 1～7）（2.6.2.2.2.タフィンラー／メキニスト併用）。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では、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。

2.4.2.2.　副次的薬理試験

GSK2118436 及び 3 種類のヒト血漿中主代謝物は、270 種類を超えるプロテインキナーゼ及び脂質キナーゼに対してほとんど影響を示さなかった（2.6.2.2.1.2.及び 2.6.2.2.3.1.2.）。また、GSK2118436 は、13 種類の受容体、2 種類の酵素、7 種類のイオンチャネル、1 種類のキナーゼ及び 3 種類のトランスポーターを含む各種蛋白に対しては影響を及ぼさなかった（XC50＞5000 nM）（2.6.2.3.1.）。活性が認められたのは 4 種類のみであり、α2C-アドレナリン受容体に対する弱いアゴニスト作用（EC50＝300 nM）、Lck、GSK3β 及び Aurora B キナーゼに対する阻害作用（IC50＝600～3200 nM）が認められた。しかしながら、これらの蛋白に対する活性はいずれも、IC50 の比較で BRAF に対する阻害活性の 1/100 以下であったことから、GSK2118436 は、強力かつ選択的な RAF 阻害薬であり、臨床で問題となるような非特異的な作用を示さないと考えられる。

GSK2118436 のヒト正常細胞（HUVEC 及び骨髄前駆細胞）に対する増殖抑制作用を検討した結果、IC50 はそれぞれ＞20000 及び 3600 nM であった（2.6.2.3.2.）。BRAF V600 変異陽性のヒト腫瘍細胞株に対する IC50 は 1～439 nM であり（2.6.2.2.1.5.）、HUVEC 及び骨髄前駆細胞に対する IC50 と比較すると 8.2～＞20000 倍の乖離がみられたことから、正常細胞に対する影響は腫瘍細胞よりも弱いと考えられる。

2.4.2.3.　安全性薬理試験

ラットに GSK2118436 を 200 mg/kg まで単回経口投与しても、中枢神経系及び呼吸系への影響は認められなかった（2.6.2.4.1.及び 2.6.2.4.3.）。

GSK2118436 は、hERG アッセイにおいて hERG テール電流を抑制し、IC25 は 11.7 μM（6.1 μg/mL）であり、IC50 は 30 μM 超であった（2.6.2.4.2.1.）。3 種類のヒト血漿中主代謝物も hERG テール電流に有意な抑制作用を示さなかった（IC50 はいずれも＞30 μM）。ウサギ左心室ウェッジ標本を用いたアッセイにおいて、QT 間隔の短縮（30 μM で最大約 30%）が認められたが、QRS 間隔には有意な影響は認められなかった（2.6.2.4.2.2.）。また、Tp-e の短縮（30 μM で最大約 47%）が認められたが、TdP スコアは－1.3～2 点の範囲と陰性であったことから TdP を発現するリスクは低いと考えられた。ラットに 5 mg/kg 以上の GSK2118436 を単回経口投与すると、用量に依存した軽度～中等度の心拍数増加（最大で 18%の増加）が認められたが、動脈圧及び体温に対する影響は認められなかった（2.6.2.4.2.3.）。心拍数の増加は 5 mg/kg では投与 24 時間後までに回復したが、20 mg/kg 以上では投与 24 時間後でも持続していた。イヌでは、GSK2118436 の 50 mg/kg で軽度の心拍数増加（最大で 28%の増加）及び軽度の PR 間隔の短縮（最大で 7%の短縮）が認められたが、投与 24 時間後までに回復した（2.6.2.4.2.4.）。心電図の波形異常及び不整脈は認められず（50 mg/kg 群でのみ評価）、いずれの用量においても動脈圧及び体温に影響は認められなかった。また、イヌの 13 週間までの反復投与毒性試験においても、心電図波形の変化及び心エコー検査に変化はみられなかった（2.6.6.3.3.2.）。

このように、in vitro において QT 間隔に対する影響がみられたが、イヌにおいて単回及び反復投与のいずれの試験においても QT 間隔への影響は認められなかったこと、並びに in vitro で hERG テール電流及びウサギ左心室ウェッジ標本において影響がみられた最低濃度（それぞれ 5 及び 1 μM（2.6 及び 0.52 μg/mL））は、ヒトに予定臨床用量である 150 mg を単回経口投与した際の Cmax（2.4 μg/mL）（表 2.7.2.4-4）から推定される非結合型未変化体の Cmax（ヒトにおける血漿蛋白結合率は 98.6%（2.6.4.4.2.1.1.）であることから、0.034 μg/mL=2.4 μg/mL×0.014）のそれぞれ 76 及び 15 倍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起こす可能性は低いと考えられた。ラット及びイヌの心血管系に及ぼす試験でそれぞれ 5 mg/kg 以上及び 50 mg/kg で軽度～中程度の心拍数増加がみられた。雄ラットに 5 mg/kg を単回経口投与したときの血漿中未変化体の Cmax は 0.983 μg/mL（表 2.6.6-3）であり、心拍数への影響は日本人患者に 150 mg を単回経口投与したときの血漿中未変化体の Cmax（2.4 μg/mL）（表 2.7.2.4-4）を下回る曝露量（0.4 倍）からみられたが、イヌではヒトでの曝露量を上回る用量（3.7 倍）でのみ認められ（雄イヌに 50 mg/kg を単回経口投与したときの血漿中未変化体の Cmax は 8.87 μg/mL（表 2.6.4-3））、

その程度は軽度であり、投与 24 時間後までに回復したことから、臨床において心拍数に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。なお、臨床において現時点までにこれらの所見と関連する問題となるような影響はみられていない（2.5.5.2.1.）。

臨床試験において GSK2118436 を投与した一部の患者で認められた発熱（2.5.5.2.4.2.）への影響を検討するためのフォローアップ試験として、in vitro においてプロスタノイド受容体及びサイトカイン遊離に及ぼす影響を検討した（2.6.2.4.4.）。サイトカイン遊離に及ぼす影響については、GSK2118436 及び 3 種類のヒト血漿中主代謝物並びに GSK1120212B を併用処理したときの影響についても検討した（2.6.2.4.1.タフィンラー／メキニスト併用）。

GSK2118436、3 種類の主代謝物、RAF 阻害薬のベムラフェニブはいずれも 10 μM までの濃度でヒト EP1、EP2、EP3 及び EP4 受容体に対してアゴニスト作用もアンタゴニスト作用も示さなかった（2.6.2.4.4.1.）。また、GSK2118436 及び 3 種類の代謝物はいずれも、検討した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）の遊離を促進させず（2.6.2.4.4.2.）、GSK2118436 及びその代謝物並びに GSK1120212B を併用しても、それぞれを単独処理したときと同様に、いずれの組合わせにおいても、末梢血単核細胞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（2.6.2.4.1.タフィンラー／メキニスト併用）。

これらのことから、臨床においてみられる発熱にプロスタノイド受容体への影響及びサイトカインの遊離促進作用は関与していないと考えられる。また、安全性薬理試験において体温への影響はみられておらず、毒性試験においても 1000 mg/kg/日（最大ヒト曝露量の 2 倍）までの用量で 29 日間経口投与しても体温への影響は認められなかった（2.6.6.8.2.）ことから、臨床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。

2.4.2.4.　薬力学的薬物相互作用試験

臨床において併用される GSK1120212B 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。

2.4.3.　薬物動態

2.4.3.1.　吸収

マウス、ラット、イヌ及びサルに GSK2118436A を単回経口投与したときの F は 46～82%であり、吸収は良好であると考えられた（2.6.4.3.1.1.）。マウス、ラット、イヌ及びサルでの GSK2118436A の CLb は、マウス、ラット及びサルでは肝血流量の 32～50%であったことから中程度であり、イヌでは肝血流量の 12%であったことから低いと考えられた。同様に Vdss は総体液量の 0.6～1.4 倍であったことから、低～中程度であると考えられた。また、ラットに未微粉化又は微粉化した GSK2118436B の 20 mg/kg を単回経口投与したときの Cmax はそれぞれ 1.73 及び 10.6 μg/mL、AUC(0-t)はそれぞれ 8.70 及び 22.1 μg･hr/mL であり、微粉化により曝露量が高くなると考えられた（2.6.4.3.1.2.）。

ラット及びイヌに GSK2118436A 及び GSK2118436B をそれぞれ単回経口投与したときの未変化体の曝露量は、ラットでは GSK2118436B 投与時の方が高かった（Cmax：約 7.5 倍、

AUC：約 1.9 倍）が、イヌではばらつきが大きく明らかな差はみられなかった（2.6.4.3.1.3.）。

GSK2118436A をラットに 20～400 mg/kg/日（13 週間）及びイヌに 1～50 mg/kg/日（4 週間）を 1 日 1 回反復経口投与したときの曝露量は、おおむね投与量増加の割合を下回って増加した（2.6.4.3.2.）。また、曝露量に明らかな性差及び反復投与による明らかな影響はみられなかった。なお、ラットに 13 週間反復経口投与したときの曝露量が、投与 1 日に比べて投与 4 週では低下し、投与 13 週では投与 1 日と同程度になった理由については明らかではないが、投与 4 週では未変化体及び代謝物の曝露量が低下していることから、少なくとも投与 4 週での曝露量の低下は吸収量の減少が原因である可能性が考えられる。

雌雄イヌに GSK2118436B と GSK1120212B を 4 週間併用反復経口投与したときの GSK2118436、カルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体並びに GSK1120212 の曝露量は、それぞれを単独投与したときと同程度であったことから、併用投与しても互いの曝露量及び GSK2118436 の代謝物の曝露量に影響しないと考えられた（2.6.4.3.3.）。

2.4.3.2.　　分布

雄の有色ラットに[^{14}C]GSK2118436A の 10 mg/kg を単回経口投与したときの薬物関連物質は広く組織に分布し、組織内濃度は多くの組織で投与 24 時間後までに、すべての組織で投与 35 日後には定量下限（0.040 µg eq./g）未満となったことから、薬物関連物質は生体内に残留しないと考えられた（2.6.4.4.1.1.）。また、ブドウ膜、髄膜及び有色部皮膚の薬物関連物質は投与 24 時間後までに定量下限未満となったことから、未変化体及び代謝物はいずれもメラニン含有組織と特異的な結合はしないと考えられた。ラットでの組織内分布に明らかな性差はみられなかった。担癌マウスに GSK2118436A の 30 mg/kg を 5 日間反復経口投与したときの腫瘍中には未変化体、カルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体が検出されたことから、未変化体及び代謝物は腫瘍中に移行すると考えられた（2.6.4.4.1.2.）。

有色ラットに[^{14}C]GSK2118436A の 10 mg/kg を単回経口投与したときの薬物関連物質は脳内に検出されなかった（2.6.4.4.1.3.）。また、ブタに[^{18}F]GSK2118436 の 1.6 mg/kg を単回静脈内投与したとき、未変化体、カルボン酸体及び水酸化体はいずれも脳内へ移行しなかった。したがって、ラット及びブタにおいて GSK2118436、カルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体は血液脳関門を通過して脳実質細胞に移行する可能性は低く、ヒトにおいても同様に GSK2118436 及びその代謝物が血液脳関門を通過する可能性は低いと考えられた。

In vitro における GSK2118436 の血漿蛋白結合率は、動物では 98.4～99.7%、ヒトでは 99.7%であったことから、GSK2118436 の血漿蛋白結合率は高いと考えられた（2.6.4.4.2.1.1.）。また、カルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体の血漿蛋白結合率も GSK2118436 と同様におおむね高く、濃度に関わらず一定であった（2.6.4.4.2.1.2.）。マウス、ラット、イヌ及びサルの GSK21185436、カルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体の血液／血漿比は 0.7 以下であったことから、血球移行性はいずれも低いと考えられた（2.6.4.4.3.）。

Pgp 阻害薬存在下での GSK2118436、水酸化体及び脱メチル体の見かけの透過係数はいずれも 50 nm/s を超えていたことから、受動的膜透過性が高いと考えられたが、カルボン酸体の透過係数は 5 nm/s 未満であり、受動的膜透過性は低いと考えられた（2.6.4.4.4.）。

GSK2118436 は Pgp 及び Bcrp1 の基質であり、OCT1、OATP1A2、OATP1B1、OATP1B3 及び OATP2B1 の基質ではないと推測された（2.6.4.4.5.）。また、水酸化体及び脱メチル体は Pgp の基質であり、OATP1A2、1B1 及び 1B3 の基質ではないこと、カルボン酸体は OAT1 及び 3、OATP1A2、1B1 及び 1B3 の基質であり、Pgp の基質ではないと推測された。

2.4.3.3.　　代謝

GSK2118436 は動物及びヒト肝細胞とインキュベートした際に、t-ブチル基の水酸化及び更なる酸化により、それぞれ酸化体及びカルボン酸体に代謝された。なお、ヒト肝細胞では M14（ヘキソース抱合体）、M10 及び M13（いずれも酸化体のヘキソース抱合体）並びに M11（N-グルクロン酸抱合体）の生成が 3 例中 1 例で少量みられた。また、M6（t-ブチル基の二酸化体）は動物でのみ、脱メチル体はイヌ以外で、M5（N-グルクロン酸抱合体）はマウス及びサル以外で生成した（2.6.4.5.1.）。ラット単離肝臓灌流モデルでは、胆汁中に未変化体は検出されなかったが、8 種類の代謝物及び構造未知の代謝物 1 種類が検出された（2.6.4.5.2.）。以上のことから、肝細胞中で生成する代謝物は動物とヒトでおおむね同様であると考えられた。

マウス、ラット及びイヌに[^{14}C]GSK2118436A を単回経口投与したときの血漿中には未変化体以外に、カルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体（イヌを除く）が検出され、マウスではカルボン酸体、ラットでは水酸化体及びイヌでは未変化体が主であった（2.6.4.5.3.1.）。ラット及びイヌの糞中には主に未変化体（それぞれ投与量の約 59 及び 92%）が検出され、代謝物としてはカルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体が検出された（いずれもラットでは投与量の 2～13%、イヌでは 1.5%以下）（2.6.4.5.3.2.）。雌雄の血漿及び糞中代謝物プロファイルに明らかな差はみられなかったことから、ラット及びイヌの代謝には性差はないと考えられた。BDC ラットの胆汁中にはカルボン酸体など数種の代謝物が検出されたが、未変化体は検出されなかったことから、ラットの糞中に排泄された未変化体は主に未吸収の GSK2118436 であると考えられた。

ヒト肝ミクロソームと[^{14}C]GSK2118436A とのインキュベーションにより生成した共有結合量はアセトアミノフェン（陽性対照）で生成した量に比べて少なかったことから、GSK2118436 の投与により臨床で反応性代謝物に関連した予期せぬ有害事象が起こる可能性は低いと考えられた（2.6.4.5.4.）。

肝ミクロソーム及び CYP 発現系による検討の結果、GSK2118436 は主に CYP2C8 及び 3A4 により水酸化体に代謝され、CYP2C9 の寄与はわずかであると考えられた（2.6.4.5.5.1.）。水酸化体は CYP3A4 により代謝されたが、ヒト肝サイトソールでは代謝されなかったことから、水酸化体の代謝にサイトソール酵素であるアルコール脱水素酵素及びアルデヒド脱水素酵素は寄与していないと考えられた（2.6.4.5.5.3.）。カルボン酸体はいずれの CYP 発現系でも代謝されなかったことから、カルボン酸体は CYP を介さず脱メチル体に代謝されると考えられた。脱メチル体は主に CYP3A4 及び一部は CYP2C9 及び 2C19 により代謝された。

2.4.3.4.　　排泄

マウス、ラット及びイヌに[^{14}C]GSK2118436A 又は[^{14}C]GSK2118436B を単回経口投与したとき、薬物関連物質の糞中排泄率は 90%以上であり、尿中排泄率は 3%以下であったことから、主排泄経路は糞中であると考えられた（2.6.4.6.1.）。尿糞中排泄率に明らかな性差はみられなかったことから、排泄速度及び経路に性差はないと考えられた。また、BDC マウス及びラットに[^{14}C]GSK2118436A 又は[^{14}C]GSK2118436B を単回経口投与したときの胆汁中排泄率はマウスでは投与量の約 79%で、ラットでは約 32%であったことから、吸収された薬物関連物質は、代謝物として胆汁を介して糞中に排泄されると考えられた（2.6.4.6.2.）。マウス及びラットでは胆汁及び尿中排泄率から、それぞれ少なくとも投与量の約 81 及び 36%が吸収されると考えられた。

2.4.3.5.　　薬物動態学的薬物相互作用

In vitro において、GSK2118436 は BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2 を阻害した。カルボン酸体は OATP1B1、OATP1B3 及び OAT3 を、水酸化体は BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1 及び OAT3 を、並びに脱メチル体は BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2 を阻害した（2.6.4.4.6.）。しかしながら、日本人固形癌患者にダブラフェニブの 150 mg を 1 日 2 回 21 日間投与したときの GSK2118436 及び代謝物（カルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体）の非結合型の Cmax はそれぞれ 0.040、0.169、0.081 及び 0.011 μM であり、それぞれの IC50 を大きく下回ったことから、本薬及び代謝物が薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられた。更に、GSK2118436 のトランスポーターに対する阻害作用を薬物相互作用のガイドライン（最終案）[MHLW, 2014]に基づき評価したところ、いずれの阻害作用も臨床薬物相互作用試験の実施を考慮する必要はなく、GSK2118436 が薬物相互作用を起こす可能性は低いと判断された。

In vitro において、GSK2118436 は 30 μM で CYP2B6 及び 3A4 の mRNA 量を増加させ、その誘導は陽性対照であるフェニトイン及びリファンピシンのそれぞれ 3.2 及び 1.5 倍であったことから、臨床でも CYP2B6 及び 3A4 を誘導する可能性が考えられた（2.6.4.5.7.1.）。更に、CYP2B6 及び CYP3A4 はそれぞれ核内受容体である CAR 及び PXR の活性化により誘導され、これらの核内受容体は CYP2C8、CYP2C19、UGT、Pgp 等の誘導にも関与していること[Chai, 2013]から、臨床において、これらの CYP 及びトランスポーターを誘導する可能性も考えられる。また、GSK2118436B は CYP1A2、2C9 及び 2C19 を阻害し、IC50 はそれぞれ 87、7.2 及び 22.4 μM であり、GSK2118436A は CYP2C8、2C9、2C19 及び 3A4 を阻害し、IC50 はそれぞれ 8.2、10.9、11 及び 15.6～32 μM であった。カルボン酸体はいずれの CYP も阻害しなかったが、水酸化体は CYP1A2、2C9 及び 3A4（基質：ミダゾラム）を阻害し、IC50 はそれぞれ 83、29 及び 44 μM、脱メチル体は CYP2C9 及び CYP3A4 を阻害し、IC50 はそれぞれ 83、29 及び 44 μM、脱メチル体は CYP2B6、2C8、2C9、2C19 及び 3A4 を阻害し、IC50 はそれぞれ 78、47、6.3、36 及び 17～28 μM であった（2.6.4.5.7.2.）。しかしながら、日本人固形癌患者にタフィンラーの 150 mg を 1 日 2 回 21 日間投与したときの GSK2118436 及び代謝物（カルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体）の Cmax はそれぞれ 4.0、16.9、2.2 及び 1.1 μM であり、それぞれの IC50 を下回ったことから、GSK2118436 及び代謝

物が CYP を阻害することにより薬物動態学的薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられた。また、 GSK2118436 及び脱メチル体は CYP3A4（基質：ミダゾラム及びニフェジピン）に対して代謝依存的な阻害を示したが、カルボン酸体及び水酸化体はいずれの CYP に対しても代謝依存的な阻害を示さなかった。これらの結果を受け、ミダゾラム（CYP3A4 の基質）又はワルファリン（S 体；CYP2C9 の基質、R 体；CYP1A2 及び 3A4 の基質）との臨床薬物相互作用試験を実施したところ、ミダゾラム、S-ワルファリン及び R-ワルファリンの曝露量が低下したことから、GSK2118436 は臨床において CYP2C9 及び 3A4 を阻害するのではなく、誘導することが確認された（2.7.2.2.1.1.4.）。

2.4.4.　毒性試験

GSK2118436 のラット及びイヌの単回投与／最大耐量試験、マウスの最長 26 週間、ラット及びイヌの最長 13 週間経口投与毒性試験、in vitro／in vivo 遺伝毒性試験、ラットの雌受胎能及び胚･胎児発生に関する試験、in vitro／in vivo 光毒性試験、皮膚への影響及び発熱に関する検討試験、並びにイヌの GSK2118436B 及び GSK1120212B の併用投与試験を実施した。また、不純物の安全性評価を実施した。

動物を用いた主要な反復投与毒性試験における曝露量及びヒトとの曝露量比を表 2.4.4-1 に示した。

2.4.4.1.　急性毒性

ラット及びイヌに GSK2118436B のそれぞれ 600 及び 80 mg/kg までを単回経口投与した結果、いずれの動物種においても死亡はみられず、概略の致死量はラット及びイヌでそれぞれ 600 mg/kg 超及び 80 mg/kg 超であった。

2.4.4.2.　反復投与毒性

マウスの最長 26 週間並びにラット及びイヌの最長 13 週間経口投与毒性試験において、死亡／瀕死状態、心血管系、精巣／精巣上体、上皮組織、肝臓、造血／リンパ組織及び呼吸器系に主要な毒性所見が認められた。以下にその詳細を示す。

2.4.4.2.1.　死亡／瀕死状態及び最大耐量

マウス 14 日間投与毒性試験の 500 mg/kg/日（臨床曝露量（AUC）の約 7 倍）以上の群で体重減少及び一般状態の変化（円背位、冷感、行動抑制、腹部膨満等）がみられたため、数例を早期切迫屠殺した（2012N140412_00）。ラットでは薬物に関連した死亡は認められなかった。イヌでは、7 日間投与毒性試験の 300 mg/kg/日群の雌 1 例（臨床曝露量の約 14 倍）において、主に重度の腹部膨満によると考えられる体調不良がみられたため、本例を切迫屠殺した。また、イヌ 13 週間投与毒性試験の 60/100 mg/kg/日（雄/雌）（雌雄ともに臨床曝露量の約 10 倍）群において、顕著な体重減少、食欲不振、削痩、脱水症状、液状便及び嘔吐等がみられたことから、早期（試験 14/15 日）に投与を中止した。

マウス、ラット及びイヌの反復投与毒性試験における最大耐量は、それぞれ 150、400 及び 20 mg/kg/日であった。

2.4.4.2.2.　心血管系への影響

イヌでは、7 日間投与毒性試験の 300 mg/kg/日群で右心房又は乳頭筋に軽度～重度の冠動脈変性及び壊死並びにこれに関連した心筋変性／壊死が認められた（2.6.7.6.）。4 週間投与毒性試験の 50 mg/kg/日群の雄 1 例（臨床曝露量の約 4 倍）では右房室弁（三尖弁）の限局性の出血及び肥厚（重度の血管新生及び粘液腫様基質増加等を特徴とする）がみられた。13 週間投与毒性試験の 60 mg/kg/日群の雄 1 例及び 20 mg/kg/日群の雌 1 例（臨床曝露量の約 10 倍）では右心房壁に線維血管性増殖が認められたが、いずれの動物においても心室及び弁に

薬物に関連した変化はみられず、血清心筋トロポニン I、心電図波形及び心エコー検査において影響は認められなかった。

ラットでは、10 日間投与毒性試験の 30 mg/kg/日（臨床曝露量の約 1.0 倍）以上の群で肝臓の血管周囲に炎症細胞浸潤を伴った動脈変性の発現頻度増加（用量との関連性なし）がみられ、1000 mg/kg/日群の 1 例で腸間膜に軽度の限局性血管周囲炎が観察された（CD2008/00951/02）。4 及び 13 週間投与毒性試験では、それぞれ 200 及び 400 mg/kg/日までを投与しても心血管系への悪影響は認められなかった。マウス 26 週間投与毒性試験の 15 mg/kg/日（臨床曝露量の約 0.5 倍）以上の群では、様々な組織にときに血管壁の壊死を伴う血管／血管周囲炎が認められた。

動物に認められた心血管系病変の発現機序は不明だが、マウス Braf 欠損胚では、心血管系への影響として心臓に血管拡張、出血及び血管内皮でのアポトーシスのパターン異常が報告されている[Wojnowski, 1997]ことから、これらの変化は BRAF 阻害が関与している可能性が考えられる。

2.4.4.2.3.　　上皮への影響

マウスでは 15 mg/kg/日（臨床曝露量の 0.8 倍）以上の群で舌･食道･前胃に、ときに炎症／潰瘍を伴う粘膜上皮過形成／角化亢進が観察された。ラットでは、4 週間投与毒性試験の 5 mg/kg/日（臨床曝露量の約 0.2 倍）以上の群で前胃／腺胃境界縁の粘膜上皮に軽微～軽度の変性、13 週間投与毒性試験の 20 mg/kg/日（臨床曝露量の約 0.7 倍）以上の群で前胃に軽微～重度の粘膜上皮の過形成及び下層増殖が認められた。ラットにおいて休薬後は回復／回復傾向を示し、胃粘膜上皮の下層増殖は認められなかった。

同様の上皮に対する影響として、ラット 13 週間投与毒性試験の 20 mg/kg/日以上の群で足蹠及び趾間皮膚に表皮肥厚及び角化亢進がみられ、イヌの 4 及び 13 週間投与毒性試験（それぞれ 50 mg/kg/日及び 5 mg/kg/日以上の群）においても乳頭腫、表皮肥厚又は角化亢進が認められた。これらの皮膚病変はラット及びイヌともに休薬により回復／回復傾向を示した。なお、リアルタイム PCR 分析及び電子顕微鏡検査の結果、イヌの皮膚病変はウイルス感染によるものではないことが確認された。

マウス及びラットの前胃及びその他の組織（皮膚、心臓、食道、膀胱、腎盂等）における上皮過形成は他の RAF 阻害薬でもみられている[Wisler, 2011; Carnahan, 2010]。BRAF 野生型細胞において、RAF 阻害は CRAF の活性化を介して MEK/ERK 経路のシグナル伝達を逆説的に活性化（パラドキシカル機構）し、その結果、細胞増殖を促進すると考えられている[Hatzivassiliou, 2010]。これらのことから、皮膚及び前胃上皮の増殖性変化は GSK2118436 の薬理作用に関連したものと考えられる。しかしながら、MEK 阻害薬である GSK1120212B とのイヌ 4 週間併用投与毒性試験（20 mg/kg/日まで）では、GSK2118436 のイヌ 4 週間単独投与毒性試験において皮膚病変の発現用量（50 mg/kg/日）を投与したときの曝露量を上回る曝露においても増殖性変化又は角化亢進を示す皮膚病変は認められなかった。このことは、BRAF 阻害によるパラドキシカル機構を介した MEK/ERK 経路のシグナル伝達を GSK1120212 が遮断した結果と考えられる。他の BRAF 阻害薬においても、MEK 阻害薬との併用投与によりマウスにおいて同様の結果が示されており[Carnahan, 2010]、RAF 阻害薬

PLX4720 では、DMBA-TPA 誘発マウス皮膚癌モデルにおいて HRAS 変異陽性の皮膚癌の発現を促進させるが、MEK 阻害薬である PD184352 を併用投与することにより腫瘍形成促進作用が抑制されることが報告されている[Su, 2012]。なお、臨床においても GSK2118436B 単独投与患者において皮膚有棘細胞癌、扁平上皮癌等が認められており（2.5.5.2.1.2.及び 2.5.5.2.4.）、この発現にもパラドキシカル機構が関与していると考えられる。

2.4.4.2.4.　造血系及びリンパ組織への影響

ラット 10 日間投与毒性試験の 30 mg/kg/日（臨床曝露量の約 1.1 倍）以上の群で赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット）の低値がみられ、イヌ 13 週間投与毒性試験の 60 mg/kg/日（臨床曝露量の約 10 倍）群でも赤血球系パラメータ及び網状赤血球数の低値が認められた。マウス 26 週間投与毒性試験の 15 mg/kg/日（臨床曝露量の 0.6 倍）以上の群では脾臓の髄外造血増加又は重量高値並びに骨髄細胞密度の増加が認められたが、本薬投与に関連した炎症性変化に対する二次的な適応反応と考えられた。また、マウス、ラット及びイヌでそれぞれ 15、20 及び 20 mg/kg/日（臨床曝露量のそれぞれ約 0.6、0.9 及び 8.4 倍）以上で白血球系パラメータ（好中球、リンパ球、好酸球又は単球数等）の高値が認められた。ラット及びイヌともにこれらの変化は休薬により回復した。赤血球系パラメータへの影響の発現機序は不明だが、造血前駆細胞の分化及び巨核球産生には BRAF の発現及びこれに関連した ERK の活性化が不可欠であること[Chung, 2011; Kamata, 2005]から、GSK2118436 の薬理作用に関連したものと考えられる。白血球系パラメータの増加は、前胃（ラット）、皮膚（ラット、イヌ）、肺（イヌ）又は肝臓・リンパ組織（マウス）等での炎症に関連した変化と考えられた。臨床においても血球減少（好中球、リンパ球、白血球数）や貧血が認められている（2.5.5.2.1.2.及び 2.5.5.2.1.3.）。

一方、リンパ組織への影響として、マウスでは 50 mg/kg/日以上の最長 26 週間投与、イヌでは 5～100 mg/kg/日の最長 13 週間投与により、軽微～重度の胸腺のリンパ球減少及び器官重量低値がみられ、マウスの 50 mg/kg/日以上の群ではいくつかのリンパ節で軽微～中等度の壊死及び炎症が認められた。これらの所見はヒトでの免疫系への影響を示唆するものであり、臨床試験においても血球減少（好中球、リンパ球、白血球数）が認められている。しかしながら、GSK2118436 を投与した健康成人又は患者において、末梢 T 細胞の機能･生存性、更には腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導に悪影響は認められていない[Vella, 2014; Schilling, 2014; Hong, 2012]。

2.4.4.2.5.　肝臓への影響

マウス 26 週間投与毒性試験の 15 mg/kg/日（臨床曝露量の約 0.5 倍）以上の群で用量相関的な肝臓への影響（肝細胞の壊死／炎症・肥大、有糸分裂像の増加、クッパー細胞の肥大／過形成、胆管周囲炎、色素沈着）がみられ、150 mg/kg/日群（臨床曝露量の約 4.7 倍）ではときに上皮過形成／肥大を伴った胆嚢炎が認められた。マウスにおいて観察された肝臓への影響の発現機序については不明である。ラット及びイヌでは GSK2118436 投与による肝臓への悪影響は認められていないが、臨床においては ALT／AST 増加等の肝機能検査値異常が観察されている（2.5.5.2.1.3.）。

2.4.4.2.6.　　呼吸器系への影響

マウス 26 週間投与毒性試験の 15 mg/kg/日（臨床曝露量の約 0.6 倍）以上の群（ほとんどは 150 mg/kg/日群）において気道（肺、気管及び鼻腔上皮）に上皮内好酸性小体及び細気管支上皮の肥大が認められた。イヌ 13 週間投与毒性試験の 20 mg/kg/日（臨床曝露量の約 8.4 倍）以上の群においても軽度～重度の気管支肺胞の炎症がみられ、一般状態観察では浅呼吸及び努力呼吸が観察された。

マウス及びイヌで認められた呼吸器系への影響の発現機序は不明であり、臨床試験において GSK2118436B 投与により観察された呼吸器系の有害事象との関連性も明らかではないが、その重症度はほとんどがグレード 1 又は 2 であった（2.5.5.2.1.2.）。

2.4.4.2.7.　　精巣・精巣上体への影響

マウス 26 週間投与毒性試験の 15 mg/kg/日（臨床曝露量の約 0.8 倍）以上の群で精細管内の精子細胞滞留、細胞残渣増加及び精巣網拡張がみられた。ラットでは、4 週間投与毒性試験の 5 mg/kg/日（臨床曝露量の約 0.2 倍）以上の群で軽微～軽度の伸長精子細胞変性及び精子細胞滞留、13 週間投与毒性試験の 20 mg/kg/日（臨床曝露量の約 0.5 倍）以上の群で軽微～重度の精細管変性／精子数減少及び精巣上体の精子数減少が認められた。また、イヌ 13 週間投与毒性試験の 5 mg/kg/日（臨床曝露量の約 2.4 倍）以上の群で精細管上皮の軽微～中等度の変性／消失及び精巣上体の精子数減少が認められた。ラット及びイヌともに精巣への影響は最長 4 週間の休薬後においても認められた。

BRAF は減数分裂後の生殖細胞に発現しており、精子形成期の細胞分化に重要な役割を担っている可能性が示唆され[Barnier, 1995]、また、マウスにおいて BRAF は円形精子細胞にわずかに、伸長精子細胞では強く発現するが、成熟精子では発現しておらず[Berruti, 2000]、精子尾形成不全を示す *hop* 及び hop^{hpy} 変異マウスの精巣では BRAF キナーゼの活性が低下している[Wojnowski, 1998]ことから、上述した精子形成に関わる影響はいずれも薬理作用に関連した変化と考えられた。

2.4.4.2.8.　　代謝物の安全性評価

マウスの 26 週間並びにラット及びイヌの 13 週間投与毒性試験の最大耐量における GSK2118436 及びその主代謝物（カルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体）の曝露量並びに臨床曝露量を比較した（表 2.4.4-2）。

カルボン酸体及び水酸化体については、いずれかの動物種において臨床曝露量よりも高値を示した。脱メチル体については、ラット及びイヌでは臨床曝露量よりも低値であったが、マウスではおおむね同程度であった。

以上より、マウス、ラット又はイヌの反復投与毒性試験において、GSK2118436 の主代謝物であるカルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体の曝露量は臨床曝露量と同程度又はそれを上回っていたことから、これらの代謝物の安全性については確認されているものと判断した。

表 2.4.4-1　　主要な毒性試験における曝露量及びヒトとの曝露量比

試験の種類 (投与期間)	用量 (mg/kg/日)	性	Cmax (μg/mL)		AUC (μg.hr/mL)		動物/ヒト 曝露量比 [a]	
			投与 1 日	投与終了時	投与 1 日	投与終了時	Cmax	AUC
反復投与毒性試験								
マウス (26 週間)[b]	15	M	NA	7.25	NA	9.60	3.5	0.8
		F	NA	5.39	NA	5.44	2.6	0.5
	50	M	NA	20.6	NA	23.5	9.9	2.0
		F	NA	19.3	NA	20.3	9.3	1.7
	150	M	NA	50.5	NA	64.4	24	5.5
		F	NA	42.6	NA	47.4	20	4.0
ラット (4 週間)[c]	5	M	0.983	0.755	3.64	1.91	0.4	0.2
		F	1.01	1.07	2.96	3.42	0.5	0.3
	20	M	1.58	1.27	9.43	4.39	0.6	0.4
		F	1.80	1.53	7.74	6.01	0.7	0.5
	200	M	2.50	1.62	23.0	12.6	0.8	1.1
		F	3.73	3.80	27.1	28.3	1.8	2.4
ラット (13 週間)[c]	20	M	1.42	1.16	11.7	6.32	0.6	0.5
		F	1.78	1.93	11.2	10.1	0.9	0.9
	200	M	1.46	1.94	14.5	18.4	0.9	1.6
		F	1.95	5.83	17.3	21.2	2.8	1.8
	400	M	1.76	1.69	31.5	16.8	0.8	1.4
		F	1.76	3.19	24.6	26.8	1.5	2.3
イヌ (4 週間)[c]	1	M	1.13	0.893	4.47	4.10	0.4	0.3
		F	1.21	0.841	5.83	4.48	0.4	0.4
	5	M	3.69	2.73	19.2	10.5	1.3	0.9
		F	3.23	2.62	17.3	14.0	1.3	1.2
	50	M	8.87	8.41	48.9	40.2	4.0	3.4
		F	6.58	6.85	35.7	45.2	3.3	3.8
イヌ (13 週間)[b]	5	M	2.08	2.65	21.9	28.7	1.3	2.4
		F	1.13	1.96	8.88	13.4	0.9	1.1
	20	M	8.27	8.07	76.3	79.4	3.9	6.7
		F	5.09	11.6	49.3	118	5.6	10
	60	M	10.7	NA	120	NA	NA	NA
	100	F	12.0	NA	116	NA	NA	NA
GSK1120212B との併用投与毒性試験								
イヌ (4 週間)[b]	5	M	4.05	2.38	36.2	23.1	1.1	2.0
		F	3.12	2.86	25.7	31.1	1.4	2.6
	20	M	8.38	6.18	76.5	82.1	3.0	7.0
		F	7.30	7.13	81.0	82.6	3.4	7.0
生殖発生毒性試験								
ラット [c,d]	5	F	1.18	0.765	3.93	2.62	0.4	0.2
	20	F	1.37	1.17	7.24	4.10	0.6	0.3
	300	F	3.47	2.17	38.3	22.6	1.0	1.9
ヒト [e]	150 mg BID	M+F	NA	2.08	NA	11.8	NA	NA

a = 投与終了時の Cmax 及び AUC を基に算出
b = GSK2118436B を用いて実施
c = GSK2118436A を用いて実施
d = 投与終了時の Cmax 及び AUC は妊娠 10 日のデータを使用
e= 国内第 I 相試験(BRF116056)において日本人の BRAF V600 変異陽性の固形癌患者に 150 mg/回を 1 日 2 回 21 日間反復投与したときのデータ。AUC は AUC(0-12)より算出 (2.7.2.4.付録 表 2.7.2.4-4)
NA = 該当せず

表 2.4.4-2　　動物及びヒトにおける GSK2118436 及びその代謝物の曝露量比

試験の種類 (投与期間)	最大耐量 (mg/kg/日)	性	動物／ヒト曝露量比 [a]							
			GSK2118436		カルボン酸体		水酸化体		脱メチル体	
			Cmax	AUC	Cmax	AUC	Cmax	AUC	Cmax	AUC
マウス (26 週間)[b]	150	M F	24 20	5.5 4.0	11 15	2.3 2.9	11 13	1.8 2.1	2.3 4.6	0.5 0.8
ラット (13 週間)[c]	400	M F	0.8 1.5	1.4 2.3	0.2 0.3	0.2 0.2	2.2 4.7	3.9 8.3	0.1 0.1	0.1 0.1
イヌ (13 週間)[b]	20	M F	3.9 5.6	6.7 10	0.03 0.03	0.03 0.03	1.4 2.3	2.5 4.1	0.3 0.4	0.2 0.3
ヒト [d]	150 mg BID	M+F	2.08	11.8	9.04	168	1.18	8.92	0.56	8.82

a = 投与終了時の Cmax 及び AUC を基に算出
b = GSK2118436B を用いて実施
c= GSK2118436A を用いて実施
d = 国内第 I 相試験(BRF116056)において日本人の BRAF V600 変異陽性の固形癌患者に 150 mg/回を 1 日 2 回 21 日間反復投与したときの Cmax (μg/mL)及び AUC(0-12)(μg.hr/mL)。
AUC は AUC(0-12)より算出 (2.7.2.4.付録 表 2.7.2.4-4、表 2.7.2.4-5、表 2.7.2.4-6 及び表 2.7.2.4-7))

2.4.4.3.　　遺伝毒性

GSK2118436A 及び GSK2118436B の細菌を用いる復帰突然変異試験、並びに GSK2118436A のマウスリンフォーマ TK 試験及びラット小核試験の結果はいずれも陰性であった。なお、GSK2118436B の対イオンであるメシル酸についてはイマチニブメシル酸塩においても用いられており、遺伝毒性は認められていない[グリベックカプセル 100mg 公開資料概要, 2001]。

以上のことから、GSK2118436 は遺伝毒性を有していないと考えられた。

2.4.4.4.　　生殖発生毒性

雄受胎能に関する試験は実施していないが、マウス、ラット及びイヌの反復投与毒性試験において精巣への悪影響がみられ、ラット及びイヌでは休薬後においても明らかな回復性は認められなかったため、GSK2118436 はヒトの受胎能に対して悪影響を及ぼす可能性が考えられる。

ラットを用いた雌受胎能、胚･胎児発生に関する試験において、300 mg/kg/日まで投与した結果、20 mg/kg/日（臨床曝露量の約 0.3 倍）以上で母体毒性、300 mg/kg/日（臨床曝露量の約 2 倍）で黄体数減少がみられたが、性周期、交尾･受胎率に影響は認められなかった。これらのことから､GSK2118436 は雌受胎能に悪影響を及ぼす可能性が考えられる｡また､発生毒性として、20 mg/kg/日以上で骨化遅延及び体重低値、300 mg/kg/日で胚致死、胸腺分離及び催奇形性を示唆する心室中隔欠損が認められた。

BRAF 欠損マウスでは胚致死がみられ、BRAF 欠損胚において血管への影響、神経変性、成長遅延並びに肝臓、脳及び心臓のアポトーシスのパターン異常が報告されている[Wojnowski, 1997; Galabova-Kovacs, 2006]。また、BRAF 欠損マウスでは胎盤異常（胎盤層の不連続性、血管拡張及び出血を含む）も確認されており[Galabova-Kovacs, 2006]、BRAF が正常な胎盤形成及び胚発生に重要であることが示されている。

以上より、GSK2118436 は受胎能に対する悪影響並びに催奇形性を含む胚・胎児毒性を示す可能性が考えられる。

2.4.4.5.　その他の毒性

2.4.4.5.1.　発熱に関する検討

マウス及びラットに GSK2118436A のそれぞれ 1000 mg/kg/日（29 日間）及び 200 mg/kg（単回）までを投与しても体温への影響は認められなかった（それぞれ 2.6.6.8.2.及び 2.6.2.4.）。このように､マウス及びラットではがん患者でみられた発熱を再現できず、発熱の発現機序については不明であった。しかしながら、GSK2118436A 及び 3 種の代謝物を用いた in vitro 試験において、プロスタノイド受容体の直接的な活性化／阻害、又は未刺激のヒト末梢血単核細胞からのサイトカイン放出を介して発熱を誘発する可能性は低いことが示唆されている（2.6.2.4.4.）。

2.4.4.5.2.　GSK1120212B（MEK 阻害薬）との併用投与による影響

臨床において GSK2118436B は MEK 阻害薬である GSK1120212B と併用投与されることから、イヌを用いた 4 週間併用経口投与試験を実施して、併用投与による各薬物単独投与時の毒性に対する影響の有無について検討した。

併用投与試験で GSK1120212B（0.0225 mg/kg/日）及び GSK2118436B（20 mg/kg/日）を 28 日間併用経口投与したときの AUC は、それぞれ 202.5 ng･hr/mL 及び 82.35 µg･hr/mL であった（2.6.7.16.3.）。一方、ほぼ同用量の GSK1120212B（0.025 mg/kg/日）及び GSK2118436B（20 mg/kg/日）を単独でそれぞれ 21 及び 28 日間投与したときの AUC はそれぞれ 182 ng･hr/mL（メキニスト CTD 2.6.7.7.4.）及び 81.8 µg･hr/mL（2.6.7.7.4.）であった。このことから、併用投与により各薬物の曝露量が影響を受ける可能性は低いと考えられる。

病理組織学的検査で観察された主要所見について、GSK1120212B（メキニスト CTD 2.6.6.9.）及び GSK2118436B を単独で反復投与したときの所見と比較した結果、結腸及び直腸粘膜の好中球性炎症は GSK1120212B 単独投与での既知所見、貫壁性・血管周囲性の好中球性・組織球性炎症を伴う右冠動脈外膜変性／壊死、精巣上皮変性、並びに精巣上体精子数減少及び管腔内変性精巣胚細胞は GSK2118436B 単独投与での既知所見、胸腺リンパ球減少は両薬物での既知所見であった。しかしながら、胃幽門部粘膜上皮で観察された肉芽腫性炎症（ときに好酸球浸潤及び多核巨細胞内異物蓄積を伴う）、並びに腸間膜リンパ節の組織球症及び組織球内異物蓄積は、併用投与時にのみ発現したもので、白血球数、好中球数及び単球数の高値を伴っていた。肉芽腫性胃炎の原因は不明だが、本所見は生存例での所見であり、後述の切迫屠殺例における一般状態悪化の原因ではなく、GSK1120212B の単独投与で観察された胃腸管の病理組織学的変化とも形態的に異なっていた。

併用投与試験では GSK1120212B/GSK2118436B の 0.0225/20 mg/kg/日を投与した雄 1 例を切迫屠殺したが、ほぼ同用量の GSK1120212B（0.023 mg/kg/日; メキニスト CTD 2.6.6.3.5.）及び GSK2118436B（20 mg/kg/日）のそれぞれ 10 及び 13 週間の単独経口投与において死亡は認められなかった。また、併用投与試験において GSK1120212B によると考えられる大腸の好中球性炎症は 0.0225/20 mg/kg/日群で観察されたが、GSK1120212B の 13 週間経口投与

試験においてほぼ同用量の 0.023 mg/kg/日群では認められなかった（メキニスト CTD 2.6.6.3.5.）。一方、GSK2118436A（GSK2118436B の遊離塩基）を投与した 4 週間経口投与試験（2.6.7.7.4.）では、50 mg/kg/日群（投与 28 日の AUC は 42.7 μg･hr/mL）で皮膚病変（乳頭腫、表皮肥厚、角化亢進）が観察されたが、併用投与試験ではその約 2 倍の AUC を示した 0.0225/20 mg/kg/日群においても皮膚の病理組織学的変化は認められなかった。

以上のように、GSK1120212B 及び GSK2118436B の併用経口投与により、全身毒性及び大腸の好中球性炎症の増強、並びに新たな所見として肉芽腫性胃炎が発現したが、GSK2118436B で既知の皮膚障害は認められなかった。

なお、GSK2118436B を単独投与又は GSK1120212B と併用投与した臨床試験（MEK115306 試験；2.7.4.2.1.1.3.3.）では、単独投与群と併用投与群で胃炎との関連性が示唆される悪心や嘔吐の発現率に大きな差はみられず、GSK1120212B の併用投与によるこれらの所見の増悪は認められていないが、併用投与により過角化、皮膚乳頭腫及び掌蹠角皮症の発現率の低下が認められている。

2.4.4.5.3.　光安全性

GSK2118436B は 3T3 線維芽細胞を用いた in vitro 光毒性試験で陽性を示し、また、ヘアレスマウスにおいて臨床曝露量（Cmax：2.08 μg/mL；表 2.6.6-3）の約 31 倍以上で光毒性が認められた（2014N193267_00）。有色ラットに[^{14}C]GSK2118436 を単回経口投与した定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験において、薬物関連物質は広く組織に分布し、眼及び皮膚の組織内濃度は血液中よりも低く、メラニン含有組織への選択的な結合はみられなかった（2.6.4.4.1.1.、2.6.5.5.1.1.及び 2.6.5.5.1.2.）。

また、光線過敏症の発現頻度及び発現率は、海外第 III 相試験（BRF113683 試験及び MEK115306 試験）のダブラフェニブ単独投与群でそれぞれ 3/187 例（2%）及び 6/211 例（3%）であり、海外第 III 相試験（MEK115306 試験及び MEK116513 試験）のダブラフェニブ及びトラメチニブ併用投与群でそれぞれ 5/209 例（2%）及び 13/350 例（4%）であった。

以上より、GSK2118436B は in vitro 及び in vivo 光毒性試験において陽性を示したが、これまでの臨床試験における光線過敏性反応の発現頻度は低く、重篤な事象は認められていない（2.7.4.2.1.1.1.）ことから、臨床使用により重篤な光線過敏症が発現するリスクは低いと考えられる。

2.4.4.5.4.　不純物の安全性評価

原薬中において安全性の確認が必要である 不純物A*（[redacted]%）について安全性を評価した結果、反復投与毒性試験における最大耐量投与時又は遺伝毒性試験における陰性用量での推定曝露量はヒト推定曝露量を上回っていたことから、安全性は確認されていると判断した。

2.4.5.　総括及び結論

GSK2118436 は in vitro 試験成績から、強力かつ可逆的な選択的 RAF 阻害薬であり、BRAF V600 変異陽性の腫瘍細胞株に対して選択的な ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作

＊新薬承認情報提供時に置き換えた

用を有することが示唆され、BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来腫瘍細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて経口投与により腫瘍増殖抑制作用を示したことから、「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。また、GSK2118436 及び GSK1120212B の併用効果を検討した一連の in vitro 及び in vivo 試験成績から、併用により MAPK 経路が強力に抑制され、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。更に、GSK2118436 耐性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単独投与したときと比較し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 阻害薬の耐性発現を遅延させる可能性が考えられた。

マウス、ラット、イヌ及びサルに単回静脈内投与したときの吸収は良好であった。ラット及びイヌに反復経口投与したときの曝露量は、おおむね投与量増加の割合を下回って増加し、曝露量に明らかな性差はみられなかった。イヌに GSK2118436B と GSK1120212B を併用反復経口投与したときの GSK2118436 及び GSK1120212 の曝露量はそれぞれを単独投与したときと同程度であった。

ラットに[^{14}C]GSK2118436A を単回経口投与したとき、薬物関連物質は広く組織に分布し、組織内への残留及びメラニン含有組織との特異的な結合はみられなかった。組織内分布に明らかな性差はみられなかった。雌の担癌マウスでは反復経口投与したときの腫瘍中には未変化体及び代謝物が検出された。ラット及びブタでは中枢移行性はみられなかった。GSK2118436 及び代謝物の血漿蛋白結合率は高く、血球移行性は低かった。受動的膜透過性は GSK2118436、水酸化体及び脱メチル体で高く、カルボン酸体では低かった。In vitro において、GSK2118436 は Pgp 及び Bcrp1 の基質であった。また、水酸化体及び脱メチル体は Pgp の基質であり、カルボン酸体は OAT1 及び 3、OATP1A2、1B1 及び 1B3 の基質であった。

マウス、ラット及びイヌに[^{14}C]GSK2118436A を単回経口投与したときの血漿中には、カルボン酸体、水酸化体及び脱メチル体（イヌを除く）が検出された。ラット及びイヌに[^{14}C]GSK2118436A を単回経口投与したときの糞中の主な成分は未変化体であった。GSK2118436 は主に CYP2C8 及び 3A4 により水酸化体に代謝され、更に、水酸化体は CYP3A4 によりカルボン酸体に代謝された。カルボン酸体は CYP を介さずに脱メチル体となった。脱メチル体は主に CYP3A4 により代謝された。

マウス及びラットにそれぞれ[^{14}C]GSK2118436B 及び[^{14}C]GSK2118436A を単回経口投与したとき、薬物関連物質は主に胆汁を介して糞中に排泄され、尿中排泄はわずかであった。胆汁及び尿中排泄率の合計から、マウス及びラットでそれぞれ少なくとも投与量の約 81 及び 36%が吸収されたと考えられた。

GSK2118436 を他剤と併用投与してもトランスポーター及び CYP の阻害により、薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられた。一方、in vitro において CYP2B6 及び 3A4 を誘導したことから薬物相互作用を起こす可能性が考えられた。

マウス、ラット及びイヌを用いた GSK2118436 の反復投与毒性試験における主要所見は心血管系、上皮（皮膚及び胃）、造血／リンパ組織、肝臓、呼吸器系及び精巣・精巣上体への影響であった。

心血管系への影響として、イヌで冠動脈／心筋の変性／壊死、右房室弁の出血／肥厚、右心房壁の線維血管性増殖がみられ、ラットでも血管周囲炎（肝臓、腸間膜）、肝動脈変性及び心筋症、マウスでは様々な組織にときに血管壁の壊死を伴う血管・血管周囲炎が観察された。

上皮への影響として、マウス（消化管）、ラット（前胃、皮膚）及びイヌ（皮膚）においてGSK2118436の薬理作用に関連すると考えられる上皮の増殖性及び過角化性変化が認められたことから、ヒトにおいてもこれらの事象について注意が必要と考える。なお、これらの変化は休薬により回復／回復傾向が認められた。

マウス、ラット及びイヌにおいて精巣毒性がみられ、ラット及びイヌでは休薬後においても明らかな回復性は示されなかった。そのため、GSK2118436Bはヒトにおいて雄受胎能に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。また、ラットを用いた生殖発生毒性試験から、GSK2118436Bはヒトにおいて催奇形性及び母体毒性を含む胚･胎児への悪影響を示す可能性が考えられることから、妊婦への投与は避けるべきと考える。

GSK1120212B及びGSK2118436Bの併用経口投与により、全身毒性及び大腸好中球性炎症の増強並びに胃炎が発現する可能性が示唆された。両薬物の併用投与による臨床試験において一致する事象は報告されていないが、注意すべきと考える。また、GSK2118436の単独投与では、RAF阻害薬が野生型BRAFを有する細胞に作用する結果として生じるMEK-ERK経路の活性化（パラドキシカル機構）によると考えられる皮膚の増殖性変化がみられた。しかしながら、MEK阻害薬（GSK1120212B）との併用投与において、同様の所見は認められなかった。このことは、パラドキシカル機構により活性化したMEK-ERK経路がMEK阻害薬により遮断された結果と考えられる。実際に、GSK2118436を含むBRAF阻害薬を服用した患者でも、皮膚悪性腫瘍（有棘細胞癌等）の発現が報告されているが、MEK阻害薬の併用によりその発現リスクの軽減が認められている。これらのことから、MEK阻害薬の併用により、GSK2118436の臨床使用において懸念される皮膚増殖性病変の発現リスクを軽減できる可能性が示唆された。

なお、非臨床試験ではいずれの動物においても体温への影響はみられなかったが、ヒトにおいて発熱がみられていることから、臨床使用においてはモニタリングが必要と考える。

2.4.6.　図表

図表は本文中に示した。

2.4.7.　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.

Barnier JV, Papin C, Eychène A, et al. The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem.* 1995;270:23381-9.

Berruti G. A novel Rap1/B-Raf/14-3-3 θ protein complex is formed in vivo during the morphogenetic differentiation of postmeiotic male germ cells. *Exp Cell Res.* 2000;257:172-9.

Carnahan J, Beltran PJ, Babij C, et al. Selective and potent Raf inhibitors paradoxically stimulate normal cell proliferation and tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 2010;9:2399-410.

Chai X, Zeng S., Xie W. Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2013;9:253-66.

Chung E, Kondo M. Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development. *Immunol Res.* 2011;49:248-68.

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.

Galabova-Kovacs G, Matzen D, Piazzolla D, et al. Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:1325-30.

Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature.* 2010;464:431-5.

Hong DS, Vence L, Falchook G, et al. BRAF(V600) inhibitor GSK2118436 targeted inhibition of mutant BRAF in cancer patients does not impair overall immune competency. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2326-35.

Kamata T, Kang J, Lee TH, et al. A critical function for B-Raf at multiple stages of myelopoiesis. *Blood.* 2005;106:833-40.

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

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.

Schilling B, Sondermann W, Zhao F, et al. Differential influence of vemurafenib and dabrafenib on patients' lymphocytes despite similar clinical efficacy in melanoma. *Ann Oncol.* 2014;25:747-53.

Short BG, Louden C, Schwartz LW, et al. Degeneration and periarteritis of hepatic arteries in young Sprague-Dawley rats. *Toxicologic Pathology.* 1998;26:843.

Su F, Viros A, Milagre C, et al. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med.* 2012;366:207-15.

Vella LJ, Pasam A, Dimopoulos N, et al. MEK inhibition, alone or in combination with BRAF inhibition, affects multiple functions of isolated normal human lymphocytes and dendritic cells. *Cancer Immunol Res.* 2014;2:351-60.

Wisler JA, Afshari C, Fielden M, et al. Raf inhibition causes extensive multiple tissue hyperplasia and urinary bladder neoplasia in the rat. *Toxicol Pathol.* 2011;39:809-22.

Wojnowski L, Berna R, Park CM, et al. Reduced activity of BRAF protein kinase in hop and hop^{hpy} mouse mutants. *Mamm Genome.* 1998;9:905-6.

Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, et al. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet.* 1997;16:293-7.

グリベックカプセル 100mg 公開資料概要. (イマチニブメシル酸塩). *平成 13 年 11 月承認.* 2001

厚生労働省 (MHLW). *医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン(最終案).* 医薬食品局審査管理課, 東京; 2014. .

薬食審査発 0604 第 1 号通知. 抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン. *平成 22 年 6 月 4 日付.* 2010:.

薬食審査発第 1127001 号通知. 医薬品のがん原性に関するガイドライン. *平成 20 年 11 月 27 日付.* 2008:.