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）

2.6. 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

Apr 13 2015 13:38:19

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. 4
2.6.2.3 副次的薬理試験	2.6.2 － p. 38
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
2.6.2.7 図表	2.6.2 － p. 49
2.6.2.8 参考文献	2.6.2 － p. 49
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. 52
2.6.2.1 まとめ	2.6.2 － p. 52
2.6.2.2 効力を裏付ける試験	2.6.2 － p. 53
2.6.2.3 副次的薬理試験	2.6.2 － p. 66
2.6.2.4 安全性薬理試験	2.6.2 － p. 67
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験	2.6.2 － p. 68
2.6.2.6 考察及び結論	2.6.2 － p. 68
2.6.2.7 図表	2.6.2 － p. 70
2.6.2.8 参考文献	2.6.2 － p. 70
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. 5
2.6.3.3 副次的薬理試験	2.6.3 － p. 6
2.6.3.4 安全性薬理試験	2.6.3 － p. 6
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験	2.6.3 － p. 7
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. 8
2.6.3.1 薬理試験：一覧表	2.6.3 － p. 8
2.6.3.2 効力を裏付ける試験	2.6.3 － p. 9
2.6.3.3 副次的薬理試験	2.6.3 － p. 9
2.6.3.4 安全性薬理試験	2.6.3 － p. 9
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験	2.6.3 － p. 9

2.6.1、2.6.2 及び 2.6.3 の略号等一覧

略語（略称）	内容
ALK5	Activin receptor-like kinase 5
ATP	アデノシン三リン酸
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
BRK	Breast tumor kinase (protein tyrosine kinase 6)
CaMKI	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I
CDK	サイクリン依存性キナーゼ
cDNA	相補的 DNA
CFU	Colony forming unit
CI	コンビネーションインデックス
CK1	Casein kinase 1
Cmax	最高血漿中濃度
CRC	結腸直腸癌
DMSO	ジメチルスルホキシド
DNA	デオキシリボ核酸
EC50	50%有効濃度
EGFR	上皮増殖因子受容体
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EOHSA	Excess over highest single agent
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GM-CSF	顆粒球単球コロニー刺激因子
GSK3	Glycogen synthase kinase-3
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-10	Interferon-γ-inducing protein 10
Lck	Lymphocyte cellular kinase
LIMK	LIM kinase
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
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTV	腫瘍体積中央値
NEK	NIMA (never in mitosis gene A)-related kinase
PBMC	末梢血単核細胞
PEK	Pancreatic eIF2α kinase
PERK	Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinases
pIC50	IC50 の値の常用対数の絶対値
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PK/PD	薬物動態学的／薬力学的
PKC	Protein kinase C

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
PKD	Protein kinase D
ppt	Percentage points
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
RB	Retinoblastoma
RI	ラジオアイソトープ
RNA	リボ核酸
SIK	Salt-inducible kinase
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
TdP	トルサード・ド・ポアント (多形性心室性頻拍)
TGF-β	Transforming growth factor-β
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
XC50	IC50 又は EC50

2.6.1.　緒言

ダブラフェニブ（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 in vitro において、V600 遺伝子変異（BRAF V600E、V600K 及び V600D）を有する BRAF キナーゼを強力かつ選択的に阻害することにより、BRAF の活性化による MEK 及び ERK のリン酸化を阻害し、BRAF V600 変異を有するヒト腫瘍由来細胞株の増殖を抑制した。また、GSK2118436 は BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株を移植したマウスにおいて、腫瘍増殖抑制作用を示すことが確認された。

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、ダブラフェニブメシル酸塩（GSK2118436B、図 2.6.1-1）の承認申請を行った。

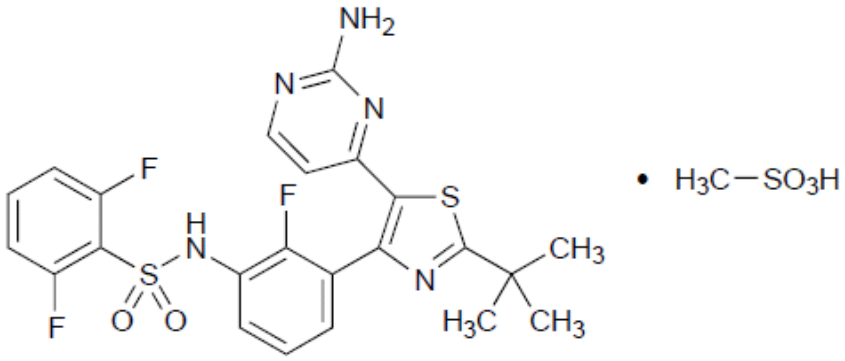


図 2.6.1-1　ダブラフェニブメシル酸塩（GSK2118436B）の構造式

「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、成人にはダブラフェニブとして 1 回 150 mg を 1 日 2 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

GSK2118436 は、強力かつ選択的な RAF 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 RAF 阻害作用、悪性黒色腫をはじめとする BRAF V600 遺伝子変異陽性（以下、BRAF V600 変異陽性）の各種ヒト腫瘍由来細胞株における 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、並びに 3 種類の代謝物の薬理作用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、酵素及びイオンチャネル等に対する親和性並びに正常細胞の増殖に及ぼす影響の試験成績を示した。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、並びに臨床試験において GSK2118436 を投与した一部の患者でみられた発熱への影響の機序を検討するためのフォローアップ試験として実施した、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検討するための in vitro 試験の成績を示した。

なお、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。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 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）。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。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。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。

BRAF V600E 変異陽性の悪性黒色腫由来細胞株を含む種々のヒト腫瘍由来細胞株を用いた検討で、GSK2118436 は MAPK 経路において RAF の下流に存在する MEK 及び ERK のリン酸化を濃度依存的に阻害した（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）。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）と同程度で抑制した（IC50＝3 nM）。108 種類のヒト腫瘍由来細胞株パネル（19 種類の組織由来）を用いた in vitro 試験において、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り、それらの腫瘍細胞株の多くは組織の由来にかかわらず GSK2118436 に対して高感受性であった（BRAF V600E/D 変異陽性の腫瘍細胞株 20 株中 13 株が高感受性（IC50＜10 nM）、一方、野生型 BRAF 又は BRAF に V600 以外の変異を有する腫瘍細胞株 88 株では高感受性株なし）。また、17 種類の BRAF V600 変異陽性の腫瘍細胞株を用いた検討では、17 株中 14 株が感受性を示した（IC50＝5～171 nM）。

BRAF V600E 変異陽性のヒト腫瘍細胞株を GSK2118436 で処理したところ、G0/G1 期で細胞周期が停止する細胞が濃度依存的に増加し、アポトーシスが誘導された。一方、野生型 BRAF を有する細胞に対しては、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。

ヒト悪性黒色腫由来の A375P F11 細胞株（V600E 変異陽性）又は YUSIT1 細胞株（V600K 変異陽性）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サブ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 の欠失又は P387S 変異）が検出された。また、耐性細胞クローンでは、親細胞株とは異なり、GSK2118436 で処理しても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 リン酸化阻害並びにサイクリン D1 発現レベルの低下）は認められなかった。

In vivo 試験

GSK2118436 は、BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を移植したマウスへの単回及び反復経口投与のいずれにおいても、腫瘍中の ERK リン酸化を阻害した。その作用は用量依存的であり、阻害作用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 を種々の投与スケジュール（異なる用量及び投与期間）で投与したところ、いずれの試験においても腫瘍増殖抑制作用がみられた。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。30 mg/kg を 1 日 1 回 90 日間経口投与する試験では、投与 14 日目に腫瘍の退縮がみられた（腫瘍増殖抑制率 TGI＞100%）が、その後は投与を継続しても腫瘍は再び増殖した。他のいずれの試験においても投与を中止すると腫瘍は再び増殖した。検討したすべての投与スケジュールの中で、100 mg/kg/日の静脈内投与群を除くすべての投与条件で、GSK2118436 を投与したマウスに体重減少はみられず、忍容性は良好であり一般状態の悪化も認められなかった。

代謝物の薬理作用

GSK2118436 のヒト血漿中主代謝物として同定されている 3 種類の代謝物（水酸化体、カルボン酸体及び脱メチル体）のうち脱メチル体及び水酸化体は、in vitro において GSK2118436 と同程度の RAF 阻害活性を示した。また、BRAF V600E 変異陽性のヒト腫瘍細胞株において GSK2118436 と同程度の ERK リン酸化阻害作用を示し、BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株のうち GSK2118436 が増殖抑制作用を示したすべての細胞株に対して GSK2118436 と同程度の腫瘍増殖抑制作用を示した。野生型 BRAF を有する細胞株に

対してはいずれの代謝物も増殖抑制作用を示さなかった。カルボン酸体の RAF 阻害活性、ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用は他の 2 種類の代謝物と比較して弱かった。

A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 を投与すると、血中に 3 種類の代謝物が検出された。各代謝物を 20 mg/kg までの用量で A375P F11 細胞株移植マウスに静脈内投与すると、水酸化体又はカルボン酸体の投与では最大 50～60%程度、脱メチル体の投与では最大約 60%の ERK リン酸化阻害作用が認められ、代謝物の in vivo での活性が確認された。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。

副次的薬理試験

GSK2118436 は、13 種類の受容体、7 種類のイオンチャネル、3 種類のトランスポーター、1 種類のキナーゼ及び 2 種類の酵素に対して阻害作用も活性化作用も示さなかった（XC50＞5000 nM）。α2C-アドレナリン受容体に対しては弱いアゴニスト作用を示し（EC50＝300 nM）、3 種類のキナーゼ（Lck、GSK3β 及び Aurora B）に対する阻害作用（IC50＝600～3200 nM）も認められたが、これらの蛋白に対する活性はいずれも、BRAF に対する阻害活性の 1/100 以下であった。

GSK2118436 の正常細胞（HUVEC 及び骨髄前駆細胞）に対する増殖抑制作用は弱く、それぞれの IC50 は＞20000 及び 3600 nM であった。

安全性薬理試験

GSK2118436 は、200 mg/kg までの単回経口投与でラットの中枢神経系及び呼吸系に対して影響を及ぼさなかった。GSK2118436 は hERG テール電流を 5 μM 以上で濃度依存的に抑制したが、抑制作用は弱く、IC25 は 11.7 μM（6.1 μg/mL）、IC50 及び IC75 はいずれも 30 μM（15.6 μg/mL）超であった。また、3 種類のヒト血漿中主代謝物（水酸化体、カルボン酸体及び脱メチル体）の抑制作用も弱かった（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、GSK2118436 の 1～30 μM により QT 間隔及び貫壁性再分極相のばらつき（Tp-e）の濃度依存的な短縮（それぞれ 30 μM で最大約 30%及び 47%の短縮）並びに心筋収縮力の低下（30 μM で最大 64%の低下）が認められたが、TdP スコアは陰性（－1.3～－2 点の範囲）であった。ラットの心血管系に対して、5 mg/kg 以上の単回経口投与で用量に依存した軽度～中程度の心拍数増加（9～48 bpm、最大で 18%の増加）が認められた。イヌの心血管系に対して、50 mg/kg の単回経口投与で軽度の心拍数増加（最大で 18 bpm、28%の増加）及び軽度の PR 間隔の短縮（最大で 7 msec、7%の短縮）が認められたが、投与 24 時間後までに回復した。

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への影響を検討するためフォローアップ試験として、2 種類の in vitro 試験（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）を実施した。GSK2118436、3 種類の代謝物及び 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。また、GSK2118436 及び 3 種類の代

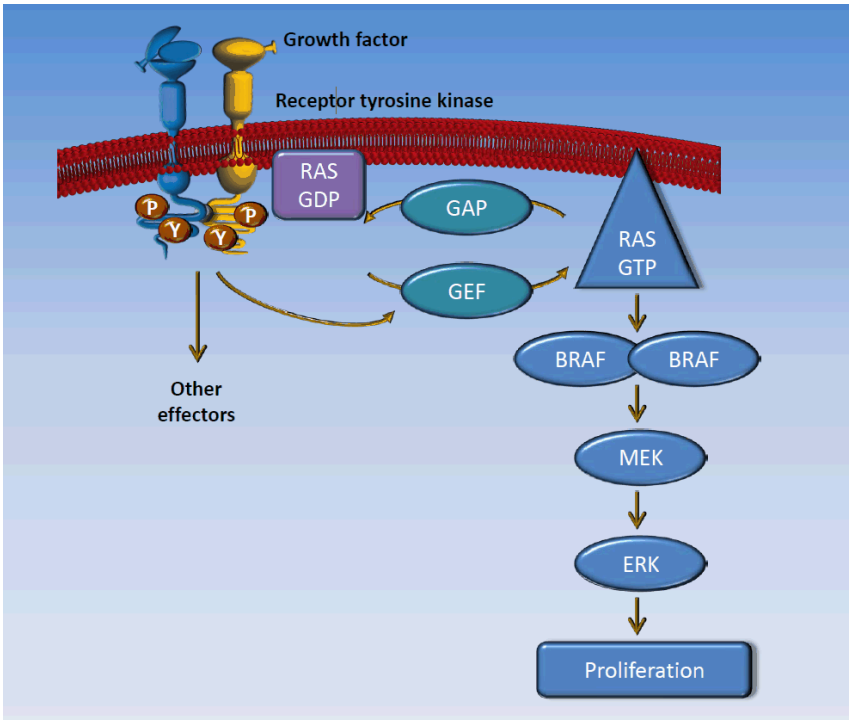
謝物はいずれも、発熱に関連すると考えられる 9 種類のサイトカイン（IFNα、IFNγ、IP-10、IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70 及び TNF-α）の遊離を促進させなかった。

2.6.2.2.　効力を裏付ける試験

RAS/RAF/MEK/ERK（MAPK）経路は、正常細胞及び種々のがん細胞の分化・増殖に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 種類のサブタイプ（ARAF、BRAF 及び CRAF）が知られており、ホモ又はヘテロ 2 量体を形成して下流の MEK へシグナルを伝達させるが、種々のがん種において BRAF 遺伝子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約 60%[Davies, 2002]、甲状腺癌の 30～50%、結腸直腸癌（CRC）の 5～20%、卵巣癌の約 30%の患者が変異型 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各種の BRAF 遺伝子変異が同定されており、その変異の多くは BRAF の立体構造の変化をもたらし、下流シグナルである MEK-ERK を活性化する。中でも約 90%と最も頻度の高い変異は Exon15 における 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する（V600E、V600D 又は V600K）[Wellbrock, 2004; Wan, 2004; Bello, 2013]。V600 変異陽性の BRAF は野生型と比較して 100 倍以上の高い活性を持つこと及び RAS の活性化に関係なく恒常的に MEK-ERK を活性化することが報告されている[Wan, 2004]。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てがん細胞の増殖を促進させること、並びにアポトーシス関連因子の発現及び機能を調節することによりアポトーシスを抑制する[Bello, 2013]ことが報告されている。このことから、MEK-ERK は分子標的薬を用いた治療の重要な標的となると考えられる。

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（約 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、変異型 BRAF を特異的に阻害する GSK2118436 は、BRAF V600E/K 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。



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る。その後、活性化シグナルが RAS／RAF／MEK1/2／ERK1/2 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、MEK1/2 の 2 つのセリン残基をリン酸化して活性化させる。活性化された MEK1/2 は、ERK1/2 のスレオニン及びセリン残基をリン酸化する。リン酸化 ERK は核内へ移行し、細胞周期及び細胞増殖等に関連する遺伝子の転写を制御する[Lito, 2013; Cargnello, 2011]。

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

GSK2118436 のヒト野生型及び変異型 BRAF に対する阻害作用及び選択性、作用機序並びに悪性黒色腫を含む各種ヒト腫瘍細胞株における ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用について検討した。また、RAF 阻害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、獲得耐性に関する検討も実施した。

2.6.2.2.1.1.　　RAF キナーゼ阻害活性

2.6.2.2.1.1.1.　　ヒト野生型 BRAF、切断型 CRAF 及び V600 変異を有する BRAF に対する阻害活性

方法

バキュロウイルスに発現させたヒト野生型 BRAF、切断型 CRAF（アミノ酸 306 番目以降）及び変異型 BRAF（V600E、V600K 又は V600D）を精製し、GSK2118436 並びに MEK1

及び ATP を含む緩衝液を添加して反応させ、RAF のシグナル伝達の下流に位置する MEK ATPase の活性を反映する NADH の酸化反応を吸光度法で測定し、酵素活性を算出した（UH2008/00147/01 及び UH2010/00028/02）。

結果

GSK2118436 は、ヒト野生型 BRAF 及び切断型 CRAF に対して強力な阻害作用を示し、IC50 はそれぞれ 3.2 及び 5.0 nM であった（表 2.6.2-1）。同様に、V600E、V600K 及び V600D の変異型 BRAF に対しても強力な阻害作用を示し、IC50 はそれぞれ 0.65～0.8、0.5 及び 1.84 nM であった。

表 2.6.2-1　　GSK2118436 のヒト RAF に対する阻害活性

酵素	IC50 (nM)	
	試験 1	試験 2
野生型 BRAF	3.2	-
切断型 CRAF	5.0	-
BRAF V600E	0.8	0.65
BRAF V600K	-	0.5
BRAF V600D	-	1.84

n=3～4 (試験 1)、n=2 (試験 2)、- : 実施せず
Data source: UH2008/00147/01 の Table 1 (試験 1) 及び UH2010/00028/02 の Table 1 (試験 2)

2.6.2.2.1.1.2.　　各種動物の野生型 BRAF に対する阻害活性

方法

HEK293 細胞に一過性に発現させたヒト、ラット、イヌ及びサルの野生型 BRAF を精製した後、2.6.2.2.1.1.1.と同様の方法で酵素阻害活性の IC50 を算出した（UH2008/00147/01）。

結果

GSK2118436 は、ラット、イヌ及びサルの野生型 BRAF に対して阻害作用を示し（IC50＝4.0～4.3 nM）、その強さはヒト野生型 BRAF に対する阻害活性（IC50＝4.8 nM）と同程度であった（表 2.6.2-2）。

表 2.6.2-2　　GSK2118436 の各種動物の野生型 BRAF に対する阻害活性

動物種	IC50 (nM)
ヒト	4.8
ラット	4.3
イヌ	4.0
サル	4.1

n=2
Data source: UH2008/00147/01 の Table 2

2.6.2.2.1.2.　　RAF 以外のキナーゼに対する阻害作用（選択性の検討）

2.6.2.2.1.2.1.　　ヒトキナーゼパネルを用いた検討

方法

45 及び 270 種類のプロテインキナーゼ及び脂質キナーゼで構成されるパネルを用いて GSK2118436 のヒトキナーゼに対する阻害活性を測定し、BRAF に対する阻害活性と比較し

た（UH2008/00147/01）。一部のキナーゼについては、再度試験を実施して IC50 を算出した。また、別の 17 種類のキナーゼに対する阻害活性も検討した（2011N111729_00）。

結果

GSK2118436 は 45 種類のヒトキナーゼのうち 42 種類に対しては阻害活性を示さなかった（最高濃度 10 又は 25 μM での阻害率：≦50%、BRAF V600E 阻害活性に対する選択性：≧400 倍）。一方、CRAF、ALK5 及び SIK2 に対しては阻害活性を示し、IC50 はそれぞれ 5、12 及び 76 nM、BRAF V600E 阻害活性に対する選択性はそれぞれ 7、17 及び 109 倍であった。

また、270 種類のヒトキナーゼパネルを用いた検討では、206 種類に対して阻害活性を示さなかった（0.3 又は 3 μM いずれの濃度でも阻害率：＜50%）。GSK2118436 が 50%超の阻害率を示したキナーゼは 0.3 及び 3 μM の両濃度で 21 種類、0.3 μM のみで 3 種類、3 μM のみで 40 種類であった。0.3 μM の濃度で 75%以上の阻害率を示した 15 種類中 14 種類に対しては追加試験を実施して IC50 を算出した結果、6 種類のキナーゼ（ヒト BRK、LIMK1、NEK11、PKD2 及び SIK 並びに yeast CK1）に対しては IC50 が 100 nM 未満の阻害作用を示した（表 2.6.2-3）。

新たに追加した 17 種類のキナーゼに対しては、0.3 μM の濃度で阻害作用を示さなかった。

表 2.6.2-3　　BRAF 以外のキナーゼに対する GSK2118436 の阻害作用

キナーゼ	IC50 (nM)
BRK	79
CaMKI	117
CK1	41
CRAF	770
EGFR (L861Q)	3511
EGFR (T790M,L858R)	5188
LIMK1	15
NEK11	20
PKCμ	131
PKD2	57
PTK5	368
SIK	27
Tie2 (R849W)	123
Yes	1633

n=1、CK1 は yeast 由来、その他はヒトキナーゼ
Data source: UH2008/00147/01 の Table 8

2.6.2.2.1.2.2.　　類薬であるベムラフェニブとの比較

方法

14 種類のヒトキナーゼに対する GSK2118436 の阻害活性を、類薬であるベムラフェニブの阻害作用と比較した（2012N139510_00）。

結果

GSK2118436 及びベムラフェニブはいずれも、CRAF 及び BRK に対して阻害作用を示し、CRAF に対する IC50 はそれぞれ 70 及び 69 nM、BRK に対する IC50 はそれぞれ 109 及び 44 nM であった（表 2.6.2-4）。

また、GSK2118436 は LIMK1、PERK、NEK11、SIK 及び変異型 Tie2（R849W）に対して阻害作用を示したのに対し（IC50＝13～84 nM）、ベムラフェニブのこれらのキナーゼ活性に対する影響は GSK2118436 と比較して弱かった（IC50≧391 nM）。一方、ベムラフェニブは、c-Kit、ACK1 及び Lck に対して阻害作用を示した（IC50＝11～90 nM）が、GSK2118436 のこれらのキナーゼ活性に対する影響はベムラフェニブと比較して弱かった（IC50≧336 nM）。

表 2.6.2-4　　14 種類のヒトキナーゼに対する阻害作用の比較

キナーゼ	IC50 (nM)	
	GSK2118436	ベムラフェニブ
ACK1	469	32
AMPKα2	1085	6327
BRK	109	44
c-Kit	1246	11
CRAF	70	69
Fgr	2057	371
Lck	336	90
LIMK1	13	>10000
NEK11	44	861
PERK	46	>10000
PDGFRα (V561D)	2887	248
SIK	21	391
Tie2 (R849W)	84	>10000
Tie2 (Y897S)	270	>10000

n=1
Data source: 2012N139510_00 の p.24～25 の Table

2.6.2.2.1.2.3.　　PERK 阻害作用

Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinases（PERK）は eukaryotic initiation factor 2α kinase 3（eIF2αK3）又は pancreatic eIF2α kinase（PEK）としても知られており、翻訳開始因子である eIF2α をリン酸化させ、蛋白合成を停止させることにより、小胞体ストレス応答（折りたたみが不正な蛋白の蓄積を抑制する）に関与している[工藤, 2012]。キナーゼパネルを用いた検討（2.6.2.2.1.2.2.）において、GSK2118436 はヒト PERK に対して阻害作用を示したのに対し、類薬のベムラフェニブは阻害作用を示さなかった。そこで、マウス、ラット及びイヌ PERK に対する GSK2118436 の阻害活性について検討し、ベムラフェニブの作用と比較した。

方法

大腸菌に発現させたマウス、ラット及びイヌ PERK のキナーゼドメインを精製し、GSK2118436 又はベムラフェニブ存在下で 60 分間インキュベートした後、時間分解蛍光-蛍光共鳴エネルギー転移法（TR-FRET 法）によりキナーゼ活性を測定した（2012N153146_00）。

結果

GSK2118436 は、マウス、ラット及びイヌの PERK に対して阻害作用を示した（IC50 はヒトの 2～2.6 倍）（表 2.6.2-5）。一方、ベムラフェニブは、マウス、ラット及びイヌのいずれの PERK に対しても阻害作用を示さなかった。

表 2.6.2-5　　GSK2118436 及びベムラフェニブの PERK 阻害作用の比較

動物種	IC50 (nM)	
	GSK2118436	ベムラフェニブ
ヒト	46	>10000
マウス	92.5	＞10000
ラット	116	3310
イヌ	119	＞10000

平均値 (n≥2)
Data source: 2012N153146_00 の Table 3 及び表 2.6.2.-4. (ヒト)

2.6.2.2.1.2.4.　　ALK5 の細胞内シグナル伝達に及ぼす影響

GSK2118436 は TGF-βI 型受容体であるヒト ALK5 に対して阻害作用を示した（IC50＝12 nM）ことから（2.6.2.2.1.2.1.）、細胞内 ALK5 シグナル伝達に及ぼす影響を検討した。TGF-β1 が TGF-βⅡ型受容体に作用すると TGF-βI 型受容体がリクルートされ、受容体複合体が形成される[Lan, 2011]。その後、TGF-βI 型受容体である ALK5 がリン酸化され、続いて細胞内シグナル伝達分子である Smad2/3 がリン酸化されることを利用して、GSK2118436 の Smad2/3 のリン酸化に対する作用を検討した。

方法

TGF-β 受容体を発現しているヒト肝細胞癌由来 HepG2 細胞株に GSK2118436（0.13～10 μM）を添加し、37℃で 45 分間インキュベートした後、TGF-β を添加して更に 1 時間インキュベートした（UH2008/00132/02）。細胞を可溶化し、TGF-βI 型受容体のシグナル伝達経路に存在する Smad2/3 のリン酸化の程度をウエスタンブロット法により測定した。

結果

TGF-β で刺激した HepG2 細胞株において、GSK2118436 は TGF-βI 型受容体のシグナル伝達経路に存在する Smad2/3 のリン酸化を阻害したが、その IC50 は 3900 nM であり、ALK5 活性阻害作用（IC50＝12 nM）に比べて弱かった。

2.6.2.2.1.3.　　RAF に対する阻害様式

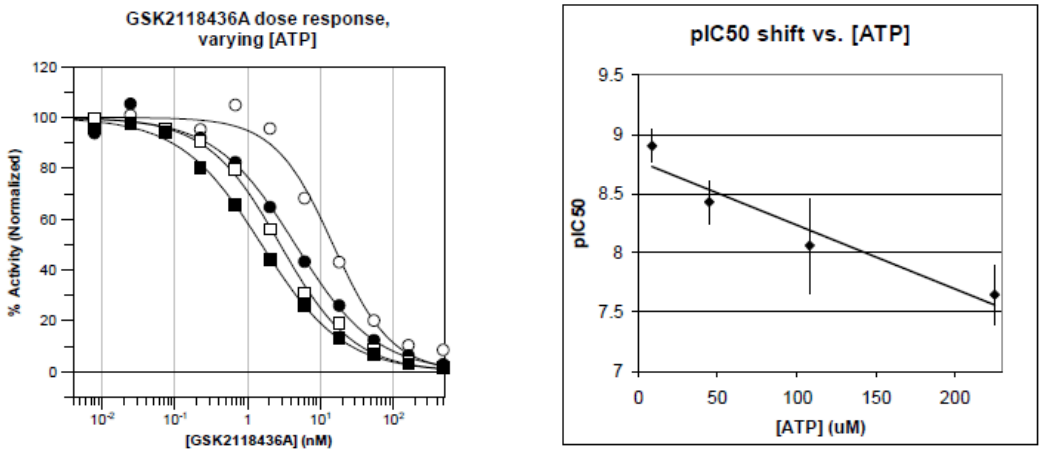
2.6.2.2.1.3.1.　　野生型 CRAF での検討

方法

GSK2118436（0.01～500 nM）を CRAF（0.5 nM）、MEK1（1 μM）、MEK 阻害薬である GSK1120212B（2 μM）及び[γ-^{33}P]ATP（ATP 濃度として 9、45、108 又は 225 μM）を含む溶液中で 120 分間インキュベートした後、リン酸化により放射性標識された MEK1 量を SDS-PAGE で分離し、その放射線量を RI 測定システムを用いて測定してリン酸化 MEK 量を算出した（UH2008/00147/01）。GSK2118436 の CRAF 活性（MEK をリン酸化する活性）に対する阻害作用を MEK1 リン酸化レベルを指標として評価した。各濃度の ATP 存在下における CRAF 阻害活性（pIC50）を算出して ATP 濃度に対してプロットし、阻害活性の ATP 依存性を検討した。

結果

GSK2118436 の MEK リン酸化阻害（CRAF 阻害）の濃度反応曲線は ATP 濃度の上昇に伴い右方に平行移動し（図 2.6.2-2 の左図）、ATP 濃度の上昇に反比例して pIC50 は低下した（図 2.6.2-2 の右図）。このことから、GSK2118436 は ATP と競合的に CRAF を阻害することが示唆された。



% Activity：媒体（DMSO）群におけるリン酸化 MEK1 量に対する相対値（%）
ATP 濃度
■：9 μM、□：45 μM、●：108 μM、○：225 μM
n=2

図 2.6.2-2　　ヒト野生型 CRAF に対する阻害作用の ATP 依存性

Data source: UH2008/00147/01 の Figure 2

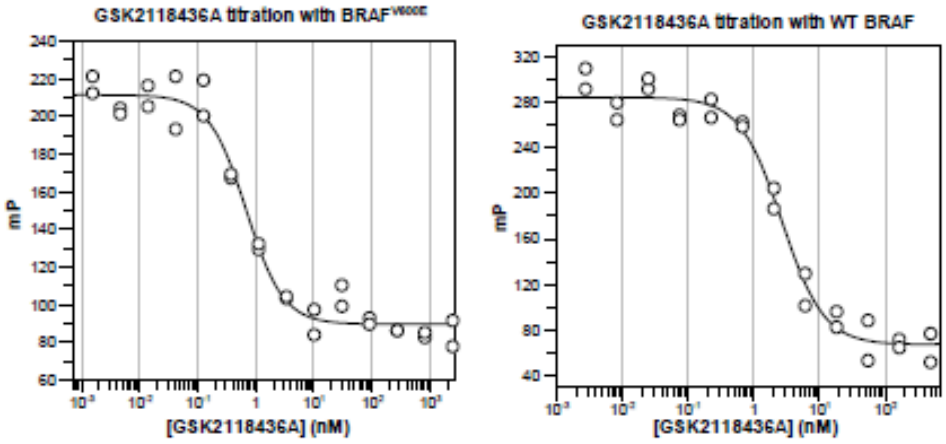
2.6.2.2.1.3.2.　　野生型 BRAF 及び変異型 BRAF（V600E）での検討

方法

精製したヒト野生型 BRAF 又は変異型 BRAF V600E にローダミングリーン標識 GSK369717A（BRAF の ATP 結合ポケットに結合するリガンド）の 1 nM を添加して 15 分間プレインキュベートした後、GSK2118436（0.001～2000 nM）を添加して更に 120 分間インキュベートした（UH2008/00147/01）。蛍光分光装置を用いて種々の濃度の GSK2118436 存在下での偏光度を測定し、偏光度の変化を指標に GSK2118436 がローダミングリーン標識 GSK369717A の結合を置換するか否かについて検討した（蛍光偏光法）。

結果

野生型 BRAF 及び変異型 BRAF V600E のいずれにおいても、GSK2118436 の濃度依存的に偏光は減少し、GSK369717A 結合を阻害した（それぞれ IC50＝0.7 及び 2.7 nM）（図 2.6.2-3）。このことから、GSK2118436 は BRAF の ATP 結合ポケットへの GSK369717A 結合を競合的に阻害することが示唆された。



左図：変異型 BRAF V600E、右図：野生型 BRAF
縦軸：ミリ偏光単位（mP）、n=2

図 2.6.2-3　　ヒト野生型又は変異型 BRAF（V600E）への GSK369717A 結合に対する GSK2118436 の阻害作用

Data source: UH2008/00147/01 の Figure 3

まとめ

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）。同様に、ヒト野生型 BRAF 及び 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、イヌ及びサル由来の野生型 BRAF に対して、ヒトと同程度の阻害活性を示した。GSK2118436 は RAF 以外の多く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（IC50＜100 nM）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、RAF キナーゼに対する高い選択性が示された。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）。GSK2118436 の IC50 が 100 nM 未満であるキナーゼ（LIMK、PERK、NEK11、SIK 及び変異型 Tie2（R849W））に対するベムラフェニブの阻害作用は弱く（IC50≧391 nM）、一方で GSK2118436 の阻害作用が弱かった（IC50≧336 nM）c-Kit、ACK1 及び Lck に対するベムラフェニブの IC50 は 100 nM 未満であった。

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。

2.6.2.2.1.4.　　MAPK シグナル伝達に及ぼす影響

MAPK 経路において MEK 及び ERK は RAF キナーゼの下流に存在する基質蛋白である[Alcala, 2012]ことから、BRAF 活性が阻害されると、MEK 及び ERK のリン酸化が阻害され

ると考えられる。そこで、野生型又は変異型 BRAF を有する各種ヒト腫瘍由来細胞株における GSK2118436 の MEK 及び ERK のリン酸化に及ぼす影響について検討した。

2.6.2.2.1.4.1.　MEK 及び ERK リン酸化阻害作用

2.6.2.2.1.4.1.1.　各種組織由来のヒト腫瘍細胞株における ERK リン酸化阻害作用

方法

野生型 BRAF あるいは変異型 BRAF（V600E 変異陽性）又は野生型あるいは変異型 RAS のいずれかを有する各種組織由来のヒト腫瘍細胞株を GSK2118436 とともにインキュベートした後、in-cell Western、Meso‐Scale Discovery technology を利用した電気化学発光免疫測定法又はウエスタンブロット法によりリン酸化 ERK 量を測定し、GSK2118436 の影響を検討した（UH2008/00132/02）。

結果

GSK2118436 は由来組織にかかわらず BRAF V600E 変異陽性のすべての細胞株において ERK リン酸化を強力に阻害した（表 2.6.2-6）。しかし、野生型 BRAF を有する細胞株においては、RAS 変異の有無にかかわらず、GSK2118436 は ERK リン酸化阻害作用を示さなかった（IC50＞1111 nM）。

表 2.6.2-6　野生型又は変異型 BRAF を有するヒト腫瘍由来細胞株における GSK2118436 の ERK リン酸化阻害作用

腫瘍細胞株	由来組織	BRAF 遺伝子	KRAS 遺伝子	IC50 (nM)	n
A375P F11	皮膚	BRAF V600E	野生型	4	5
SK-MEL-28	皮膚	BRAF V600E	野生型	5	13
ES-2	卵巣	BRAF V600E	野生型	4	1
Colo205	結腸直腸	BRAF V600E	野生型	3	6
RKO	結腸直腸	BRAF V600E	野生型	<120	2
HCT116	結腸直腸	野生型	KRAS G13D	>3333	1
HepG2	肝臓	野生型	KRAS Q61L	>370[b]	1
SK-MEL-2	皮膚	野生型	KRAS Q61R	>1111	1
HN5	頭頸部	野生型	野生型	>2500	2
HFF[a]	包皮	野生型	野生型	>3597	5
HeLa	子宮頸部	野生型	野生型	>10000	1
LNCaP	前立腺	野生型	野生型	>10000	1

a. ヒト正常包皮線維芽由来細胞株
b: GSK2118436 存在下で 45 分間インキュベートし、TGF-β を添加して更に 60 分間インキュベートした
Data source: UH2008/00132/02 の Table 1

2.6.2.2.1.4.2.　BRAF V600E 変異陽性のヒト卵巣癌由来 ES-2 細胞株における MEK 及び ERK リン酸化阻害作用

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト卵巣癌由来 ES-2 細胞株を GSK2118436（0.2 nM～10 μM）とともに 1 時間インキュベートした後、細胞を可溶化した（UH2008/00132/02）。電気泳動後、ウエスタンブロット法により、MEK 及びリン酸化 MEK 並びに ERK 及びリン酸化 ERK を検出し、MEK 及び ERK のリン酸化に及ぼす影響を検討した。

結果

BRAF V600E 変異陽性のヒト卵巣癌由来 ES-2 細胞株を GSK2118436 で処理するとリン酸化 ERK 及びリン酸化 MEK は濃度依存的に減少し、120 nM 以上ではほぼ完全にリン酸化が阻害されたが、MEK 及び ERK の総蛋白量に変化は認められなかった（図 2.6.2-4）。

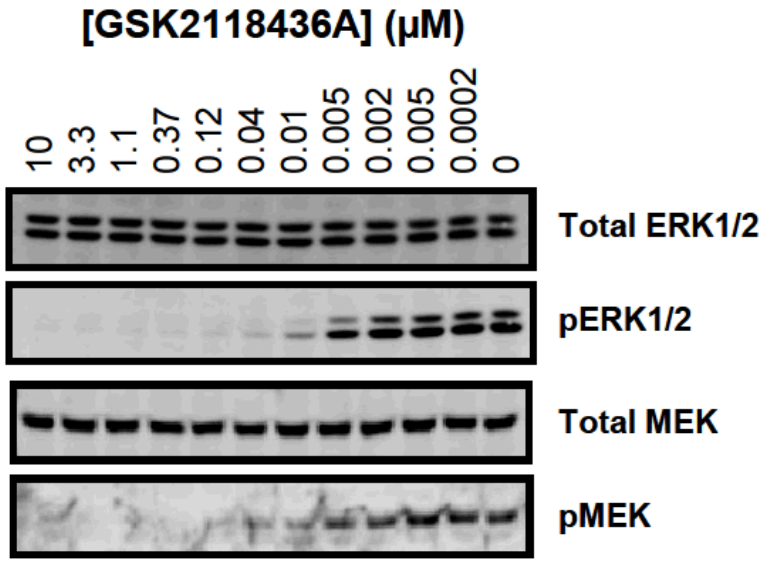


図 2.6.2-4　　ヒト卵巣癌由来 ES-2 細胞株における GSK2118436 の MEK 及び ERK リン酸化阻害作用

Data source: UH2008/00132/02 の Figure 1

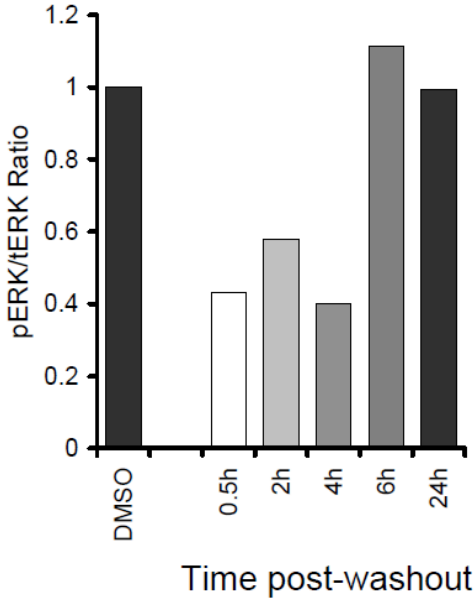
2.6.2.2.1.4.3.　　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株における GSK2118436 の ERK リン酸化阻害作用の持続性及び可逆性

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株を GSK2118436 の 300 nM（ERK リン酸化に対する IC50 の 60 倍の濃度）で 1 時間処理した後、被験物質を除去した（UH2008/00132/02）。その直後並びに 0.5、2、4、6 及び 24 時間後に細胞を可溶化させ、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て ERK リン酸化阻害作用の持続性及び可逆性を検討した。

結果

GSK2118436 の ERK リン酸化阻害作用は、被験物質除去 4 時間後まで持続した（図 2.6.2-5）。しかし、その作用は 6 時間後には完全に消失したことから、GSK2118436 の ERK リン酸化阻害作用は可逆的であることが示された。



n=1
縦軸：媒体群における総 ERK 量 (tERK) に対するリン酸化 ERK (pERK) 量の比を 1 としたときの相対値を示す
DMSO：ジメチルスルホキシド (媒体)

図 2.6.2-5　　ヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株における GSK2118436 の ERK リン酸化阻害作用の持続性及び可逆性

Data source: UH2008/00132/02 の Figure 2

まとめ

BRAF V600E 変異陽性のヒト腫瘍細胞株において、GSK2118436 は組織の由来にかかわらず MEK 及び ERK のリン酸化を濃度依存的に阻害した。また、GSK2118436 の ERK リン酸化阻害作用は GSK2118436 の除去により消失することから、可逆的であることが示された。一方、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。

2.6.2.2.1.5.　　細胞増殖抑制作用

野生型 BRAF 又は変異型 BRAF（V600 変異陽性）を有する各種ヒト腫瘍由来細胞株（悪性黒色腫を含む）の増殖に及ぼす影響を検討した。

2.6.2.2.1.5.1.　　BRAF 野生型又は V600E 変異を有するヒト腫瘍由来細胞株の増殖に及ぼす影響

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株及び野生型 BRAF を有するヒト頭頸部扁平上皮癌由来 HN5 細胞株を GSK2118436（0.1～20000 nM）存在下で 72 時間培養した（UH2008/00132/02）。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 は BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株の増殖を抑制し、IC50 は 3 nM であった（表 2.6.2-7）。一方、野生型 BRAF を有するヒト頭頸部扁平上皮癌由来 HN5 細胞株に対しては増殖抑制作用を示さなかった（IC50＞10000 nM）。

表 2.6.2-7　　BRAF 野生型又は V600E 変異を有するヒト腫瘍由来細胞株に対する GSK2118436 の増殖抑制作用

腫瘍細胞株	由来組織	BRAF 遺伝子	増殖抑制作用
			IC50 (nM)
SK-MEL-28	皮膚	V600E 変異陽性	3
HN5	頭頸部	野生型	>10000

n=1
Data source: UH2008/00132/02 の Figure 3

2.6.2.2.1.5.2.　　ヒト腫瘍由来細胞株パネルを用いた検討

方法

BRAF 及び RAS の変異の有無が確認されている 108 種類のヒト腫瘍由来細胞株パネル（19 種類の組織由来）を用い、GSK2118436（10 μM までの種々の濃度）存在下で腫瘍細胞株を 72 時間培養した後、2.6.2.2.1.5.1.と同様の方法で生細胞数を計測した。培養する細胞株の密度を高及び低細胞密度とする 2 種類の条件下で検討し、それぞれの条件下での細胞増殖抑制作用の IC50 を算出した（UH2008/00132/02）。増殖抑制作用の IC50 を算出した本試験における GSK2118436 に対する感受性の程度は IC50 を指標に、高感受性（IC50＜10 nM）、比較的高い感受性（IC50＝10～＜100 nM）、中程度の感受性（IC50＝100～1000 nM）及び感受性なし（IC50＞1000 nM）と定義した（高及び低細胞密度とする 2 種類の条件下の検討で、IC50 が低い方の値で判定）。

結果

BRAF V600E/D 変異陽性の腫瘍細胞 20 株（BRAF V600E：19 株、BRAF V600D：1 株）中 13 株が GSK2118436 に高感受性、2 株が比較的高い感受性を示し、計 15 株（75%）が高感受性及び比較的高い感受性であった（表 2.6.2-8）。その他の腫瘍細胞 5 株中 2 株（CRC 由来 SW1417 及び脂肪肉腫由来 SW872 細胞株）は中程度の感受性を示し、3 株は感受性を示さなかった。

野生型 BRAF 又は BRAF に V600 以外の変異を有する腫瘍細胞株（88 株）では、高感受性を示す株は認められず、1 株が比較的高い感受性（卵巣癌由来 OV-90；IC50 は高及び低細胞密度の条件下でそれぞれ 38 及び 19 nM）、10 株が中程度の感受性であり、その他の細胞株は感受性を示さなかった。

BRAF V600 変異陽性の細胞株では高及び低細胞密度のいずれの条件下においても GSK2118436 に感受性を示す株の割合が有意に高いことが示された（t-検定、高及び低細胞密度でそれぞれ $p=5\times10^{-9}$ 及び $p=1\times10^{-9}$）が、その他の変異と増殖抑制作用との関連は認められなかった。

表 2.6.2-8　　BRAF V600E/D 変異陽性のヒト腫瘍由来細胞株に対する GSK2118436 の増殖抑制作用

腫瘍細胞株	由来組織	BRAF 変異	IC50 (nM)	
			高細胞密度	低細胞密度
高感受性 (IC50<10 nM)				
MALME-3M	皮膚	V600E	1	1
UACC-62	皮膚	V600E	1	1
C32TG	皮膚	V600E	1	2
SK-MEL-1	皮膚	V600E	ND	2
M14	皮膚	V600E	2	3
SK-MEL-28	皮膚	V600E	2	3
A375	皮膚	V600E	3	6
SK-MEL-3	皮膚	V600E	3	11
WM-115	皮膚	V600D	3	7
Colo205	結腸直腸	V600E	4	9
UACC-257	皮膚	V600E	5	6
DU-4475	乳房	V600E	6	4
SH-4	皮膚	V600E	6	10
比較的高い感受性 (IC50＝10～<100 nM)				
ES-2	卵巣	V600E	31	91
HT-29	結腸直腸	T119S, V600E	1956	66
中程度の感受性 (IC50＝100～1000 nM)				
SW 1417	結腸直腸	V600E	158	ND
SW 872	結合組織	V600E	ND	439
感受性なし (IC50>1000 nM)				
RKO	結腸直腸	V600E	2142	2901
NCI-H292	肺	T119S, V600E	>10000	>10000
A673	筋	V600E	>10000	>10000

n=1、ND：検討せず
Data source: UH2008/00132/02 の Table 2

2.6.2.2.1.5.3.　BRAF 変異陽性（V600E、V600K 又は V600D）ヒト悪性黒色腫由来細胞株の増殖に及ぼす影響

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（0.5 nM～10 μM）を添加して 72 時間培養した後、2.6.2.2.1.5.1.と同様の方法で生細胞数を計測し、細胞増殖抑制作用の IC50 を算出した（2011N116395_00）。

結果

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞 11 株中 9 株、BRAF V600K 変異陽性の細胞 5 株中 4 株、及び BRAF V600D 変異陽性の細胞 1 株が、GSK2118436 に対して感受性を示した（IC50＝5～171 nM）（表 2.6.2-9）。

表 2.6.2-9　　BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株に対する GSK2118436 の増殖抑制作用

腫瘍細胞株	アミノ酸変異#		IC50 (nM)	IC70 (nM)
	BRAF	PTEN		
UACC-257	V600E	野生型	10 ± 2	30 ± 9
SK-MEL-1		野生型	17 ± 5	56 ± 25
COLO-829		欠損	23 ± 12	>10000
A101D		欠損	42 ± 23	>10000
SK-MEL-24		欠損	151 ± 111	>10000
SK-MEL-5		野生型	171 ± 119	>10000
SK-MEL-3		野生型	>10000	>10000
A2058[a]		欠損	>10000	>10000
SK-MEL-28[b]		T167A	10 ± 3	55 ± 33
UACC-62		欠損	12 ± 6	>10000
A375P F11		野生型	43 ± 23	>10000
WW165	V600K	野生型	5 ± 1	8 ± 2
IGR-1[c]		野生型	>10000	>10000
YUMAC		野生型	7 ± 2	169 ± 334
YULAC		野生型	18 ± 11	34 ± 22
YUSIT1		野生型	14 ± 3	>10000
WM-115	V600D	欠損	65	>10000

平均値±標準偏差 (n=3～14)
ただし、IC50 を算出した際の WM-115 細胞株（n≥2）については平均値を示す
＃：BRAF 及び PTEN の他に retinoblastoma (RB) gene1、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を検出 (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

まとめ

GSK2118436 は BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株の増殖を同じ細胞株における ERK リン酸化阻害作用の IC50（5 nM）と同程度の IC50（3 nM）で抑制した。108 種類のヒト腫瘍由来細胞株パネル（19 種類の組織由来）を用いた in vitro 試験の結果から、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り、それらの腫瘍細胞株の多くは組織の由来にかかわらず GSK2118436 に対して高感受性を示した（BRAF V600E/D 変異陽性の腫瘍細胞株 20 株中 13 株が高感受性（IC50＜10 nM）、一方、野生型 BRAF 又は BRAF に V600 以外の変異を有する腫瘍細胞株 88 株では高感受性株なし）。また、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 株が感受性を示した（IC50＝5～171 nM）。

2.6.2.2.1.6.　　細胞周期に及ぼす影響

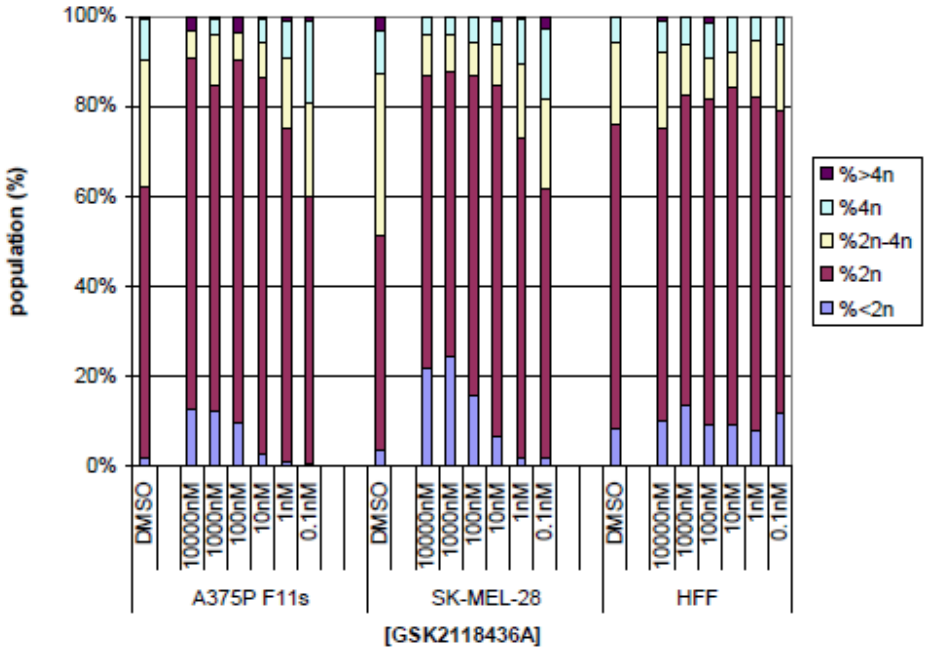
MAPK 経路は細胞周期を調節する各因子の発現を調節しており、MEK-ERK 経路が阻害されると、細胞周期促進因子であるサイクリン A、サイクリン D1 及びサイクリン E の発現が低下し、細胞周期抑制因子である p15 及び p27 等の発現が増加する[Yamaguchi, 2011]。その結果、RB 蛋白の活性化（リン酸化の抑制）、及び細胞周期促進因子の機能抑制が誘導され、細胞周期は G1 期で停止すると考えられている[Yamaguchi, 2011]。そこで、GSK2118436 の細胞周期に及ぼす影響を検討した。

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 及び SK-MEL-28 細胞株並びに野生型 BRAF を有するヒト正常包皮線維芽細胞由来 HFF 細胞株を GSK2118436（0.1 nM～10 μM）存在下で 24 又は 72 時間培養した（UH2008/00132/02）。細胞を透過処理した後、ヨウ化プロピジウムで DNA を染色し、フローサイトメトリー法により細胞周期を解析した。

結果

A375P F11 及び SK-MEL-28 細胞株を GSK2118436 で 24 時間処理すると濃度依存的な G0/G1（2N DNA）期での細胞周期の停止がみられ（データ示さず）、72 時間処理すると 2N 未満の DNA を有する細胞の蓄積が誘導された（図 2.6.2-6）。一方、野生型 BRAF を有する HFF 細胞株では、G0/G1 期での細胞周期の停止及び 2N 未満の DNA の蓄積は誘導されなかった。



n=1

図 2.6.2-6　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株及び野生型 BRAF を有するヒト正常包皮線維芽細胞由来 HFF 細胞株の細胞周期に及ぼす GSK2118436 の影響（72 時間処理）

Data source: UH2008/00132/02 の Figure 7

2.6.2.2.1.7.　アポトーシス誘導作用

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 及び SK-MEL-28 細胞株並びにヒト CRC 由来 Colo205 細胞株又は、野生型 BRAF を有するヒト頭頸部扁平上皮癌由来 HN5 細胞株及びヒト正常包皮線維芽細胞由来 HFF 細胞株を種々の濃度の GSK2118436 存在下で 24 又は 48 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（UH2008/00132/02）。媒体群のカスパーゼ 3 及び 7 活性と比較して活性を 2 倍に上昇させる GSK2118436 濃度（EC200）を算出してアポトーシス誘導作用を評価した。

結果

BRAF V600E 変異陽性の 3 種類のヒト腫瘍由来細胞株を GSK2118436 存在下で十分な活性化が得られると考えられる 48 時間培養すると EC200 は 8～141 nM であり、いずれの細胞株においても細胞増殖抑制作用を示す濃度範囲でカスパーゼ 3 及び 7 の活性化が認められた（表 2.6.2-10）。一方、野生型 BRAF を有する HN5 及び HFF 細胞株ではカスパーゼ 3 及び 7 の活性化は認められなかった（EC200＝5476～＞20000 nM）。

表 2.6.2-10　BRAF 野生型又は V600E 変異を有するヒト細胞株における GSK2118436 のカスパーゼ 3 及び 7 に対する活性化作用

細胞株	由来組織	BRAF のタイプ	EC200[a] (nM)	
			24 時間 [b]	48 時間
A375P F11	皮膚	V600E	87	8
			1813	134
SK-MEL-28	皮膚		＞20000	49
			615	141
Colo205	結腸直腸		7	8
			65	78
HN5	頭頸部	野生型	＞13200	＞13200
HFF	正常包皮線維芽細胞		＞20000	＞20000
			5476	11901

n=1
a: 媒体群 (DMSO) のカスパーゼ 3 及び 7 活性と比較して活性を 2 倍に上昇させる濃度
b: 培養時間
Data source: UH2008/00132/02 の Table 3

まとめ

BRAF V600E 変異陽性のヒト腫瘍細胞株を GSK2118436 で処理したところ、濃度依存的に G0/G1 期での細胞周期の停止が誘導され、アポトーシスが誘導された。一方、野生型 BRAF を有するヒト細胞株では、細胞周期の停止及びアポトーシス誘導作用はみられなかった。

2.6.2.2.1.8.　獲得耐性に関する検討

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（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 で 1 週間以上処理して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。

2.6.2.2.1.8.1.　耐性細胞クローンの獲得変異の種類、並びに GSK2118436、GSK1120212B 及び GSK2126458A に対する感受性

2.6.2.2.1.8.1.1.　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し、限界希釈法により GSK2118436 に耐性を獲得した 9 種類のクローンを単離した後、各耐性細胞クローンの 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）、GSK1120212B（MEK 阻害薬、0.05～1000 nM）又は GSK2126458A（PI3K/mTOR 阻害薬、0.05～1000 nM）存在下で 72 時間培養した後、2.6.2.2.1.5.1.と同様の方法で細胞数を計測し、細胞増殖抑制作用の 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；表 2.6.2-11）は、別の RAF 阻害薬であるベムラフェニブに対して交差耐性を示し（IC50＞10000 nM）、GSK1120212B に対する感受性も 1/10 以下に低下していた。一方、GSK2126458A に対する感受性にはほとんど変化がみられなかった。

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が検出された（NRAS：Q61K 及び A146T 変異、MEK1：K59 の欠失（インフレーム変異；K59del）又は P387S 変異）が、KRAS、HRAS、ARAF、CRAF、PTEN 及び PIK3CA に変異はみられなかった。

表 2.6.2-11　A375P F11 細胞株より単離した耐性細胞クローンの獲得変異の種類、並びに GSK2118436、GSK1120212B 及び GSK2126458A に対する感受性

細胞株	獲得変異		IC50 (nM)			
	NRAS	MEK1	GSK2118436	ベムラフェニブ	GSK1120212B	GSK2126458A
A375P F11 (親細胞株)	野生型	野生型	28 ± 16	ND	5 ± 3	50 ± 17
12R5-3	A146T	野生型	>10000	>10000	107 ± 46	130 ± 106
12R8-1	A146T	野生型	>10000	>10000	62 ± 31	128 ± 37
12R8-3	A146T	野生型	>10000	>10000	82 ± 30	167 ± 41
16R6-3	A146T	P387S	>10000	>10000	147 ± 64	131 ± 75
16R5-5	Q61K	P387S	>10000	>10000	121 ± 42	142 ± 93
16R6-2	Q61K	P387S	>10000	>10000	123 ± 65	65 ± 47
16R6-4	Q61K, A146T	P387S	>10000	>10000	>900	161 ± 140
12R5-1	野生型	K59del	>10000	>10000	>1000	177 ± 99
12R5-5	野生型	K59del	>10000	>10000	>900	162 ± 83

平均値±標準偏差 (n≥3)、ND：実施せず
Data source: 2011N116394_00 の Table 1

2.6.2.2.1.8.1.2.　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 細胞株を 0.1 μM の GSK2118436 存在下で培養し、限界希釈法により GSK2118436 に耐性を獲得した 12 種類の耐性細胞クローンを単離した後、各耐性細胞クローンの 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、各耐性細胞クローンの GSK2118436、GSK1120212B 又は GSK2126458A に対する感受性を 2.6.2.2.1.5.1.と同様の方法で検討した。

結果

GSK2118436 に耐性を獲得した細胞クローン（12 種類）の GSK2118436 に対する感受性は親細胞株と比較して 1/38 以下に低下していた（表 2.6.2-12）。これらの耐性細胞クローンは MEK 阻害薬である GSK1120212B に対する感受性も約 1/7～1/3 に低下した。一方、PI3K/mTOR 阻害薬である GSK2126458A に対する感受性にはほとんど変化がみられなかった。

耐性細胞クローンでは NRAS に Q61K 変異が検出された。

表 2.6.2-12　YUSIT1 細胞株より単離した耐性細胞クローンの獲得変異の種類、並びに GSK2118436、GSK1120212B 及び GSK2126458A に対する感受性

細胞株	NRAS 獲得変異	IC50 (nM)		
		GSK2118436	GSK1120212B	GSK2116458A
YUSIT1 (親細胞株)	野生型	14 ± 3	0.7 ± 0.2	31 ± 7
YUSIT1-B11	Q61K	527 ± 146	2.3 ± 0.8	24 ± 8
YUSIT1-B29	ND	658 ± 250	2.6 ± 1.1	25 ± 2
YUSIT1-B27	Q61K	850 ± 160	2.9 ± 0.7	24 ± 3
YUSIT1-B10	Q61K	979 ± 353	2.8 ± 0.8	25 ± 7
YUSIT1-B31	Q61K	997 ± 154	2.6 ± 0.5	36 ± 6
YUSIT1-B25	Q61K	2058 ± 1079	2.6 ± 0.4	48 ± 23
YUSIT1-B24	Q61K	>1000	2.4 ± 0.5	33 ± 3
YUSIT1-B4	Q61K	>1000	4.1 ± 0.3	32 ± 5
YUSIT1-B5	Q61K	>2000	4.9 ± 1.7	47 ± 10
YUSIT1-B14	Q61K	>4000	4.6 ± 1.6	26 ± 6
YUSIT1-B7	Q61K	>10000	3.1 ± 0.3	42 ± 11
YUSIT1-B6	Q61K	>10000	5.0 ± 2.1	47 ± 18

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

2.6.2.2.1.8.2.　GSK2118436 に耐性を獲得した細胞クローンにおける細胞内シグナル伝達の変化

方法

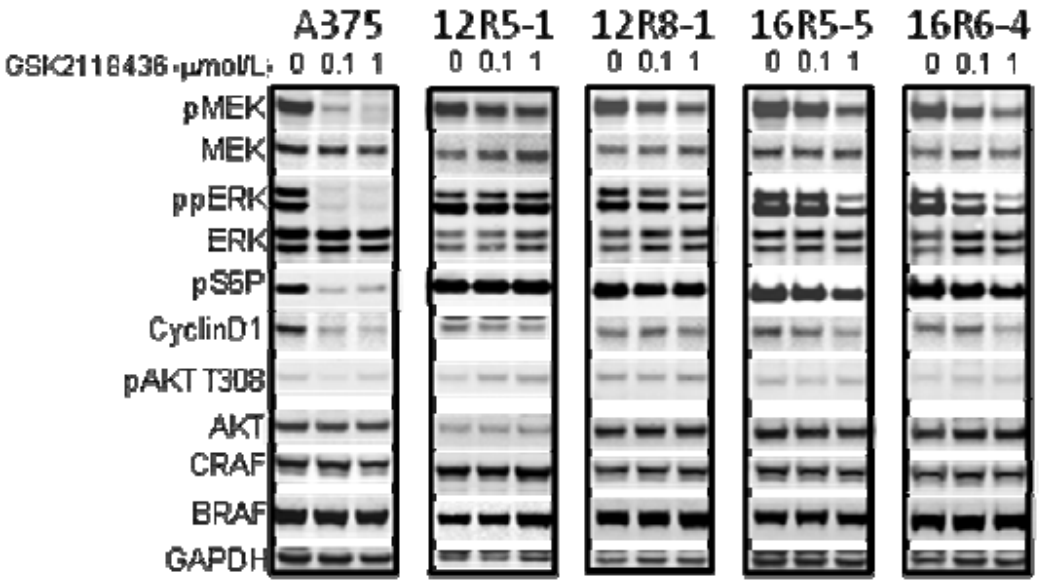
2.6.2.2.1.8.1.1.で A375P F11 細胞株より単離した耐性細胞クローンのうち 4 種類（12R5-1（MEK1 変異陽性）、12R8-1（NRAS 変異陽性）並びに 16R5-5 及び 16R6-4（MEK1 及び NRAS 変異陽性））の MEK、ERK、S6P 及び AKT（T308）のリン酸化レベル並びにサイクリン D1、RAF（BRAF 及び CRAF）の発現レベルをウエスタンブロット法により測定し、親細胞である A375P F11 細胞株と比較した（2011N116394_00）。また、各耐性細胞クローンを GSK2118436（0.1 及び 1 μM）で 24 時間処理したときの MEK、ERK 及び S6P のリン酸化

レベル並びにサイクリン D1 及び RAF（BRAF 及び CRAF）蛋白レベルに及ぼす影響についても検討した。

結果

親細胞株（A375P F11 細胞株）及びいずれの耐性細胞クローンにおいても、MEK、ERK、S6P のリン酸化レベルは高かったが、AKT（T308）のリン酸化レベルは低かった（図 2.6.2-7）。また、BRAF 及び CRAF の発現レベルは同程度であり、A375P F11 細胞株と耐性細胞クローンとの間で MAPK 経路のシグナル伝達に関連する蛋白レベルに相違は認められなかった。

A375P F11 細胞株を GSK2118436（0.1 及び 1 μM）で処理すると、MEK、ERK 及び S6P のリン酸化レベルは 75%以上低下し、サイクリン D1 蛋白レベルも 65%以上低下した。一方、耐性細胞クローンでは、いずれにおいても GSK2118436 の阻害作用は減弱し、MEK のリン酸化に対しては 30～70%、ERK 及び S6P のリン酸化に対してはそれぞれ 50 及び 25%以下の阻害作用しか示さず、サイクリン D1 蛋白レベルを低下させる作用は認められなかった。



A375: A375P F11 細胞株（親細胞株）、12R5-1: MEK1 K59del 変異陽性、
12R8-1: NRAS A146T 変異陽性、16R5-5: NRAS Q61K 及び MEK1 P387S 変異陽性、
16R6-4: NRAS Q61K/A146T 及び MEK1 P387S 変異陽性

図 2.6.2-7　A375P F11 細胞株より単離した耐性細胞クローンにおける GSK2118436 の MEK-ERK シグナルに及ぼす影響

Data source: 2011N116394_00 の Figure 2

まとめ

BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来の A375P F11 細胞株（V600E 変異陽性）又は YUSIT1 細胞株（V600K 変異陽性）を高濃度の GSK2118436 存在下で長期間培養し、GSK2118436 に対して耐性を獲得したサブクローンを単離した。こ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 の欠失又は P387S 変異）が検出された。また、耐性細胞クローンでは、親細胞株とは異なり、GSK2118436 で処理しても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 リン酸化阻害並びにサイクリン D1 蛋白レベルの低下）は弱い又はほとんど認められなかった。耐性細胞クローンにおける獲得変異の種類（NRAS 又は MEK1 の単独変異もしくは二重変異）による GSK2118436 の細胞内シグナル伝達に対する影響の違いはみられなかった。

2.6.2.2.2.　In vivo 試験

GSK2118436 の in vivo における ERK リン酸化阻害作用及び腫瘍増殖抑制作用を、BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株（in vitro で GSK2118436 に高い感受性を示した株の一つ）を用いたマウス異種移植モデルにおいて検討した。

2.6.2.2.2.1.　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作用

2.6.2.2.2.1.1.　腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用

2.6.2.2.2.1.1.1.　単回投与試験

方法

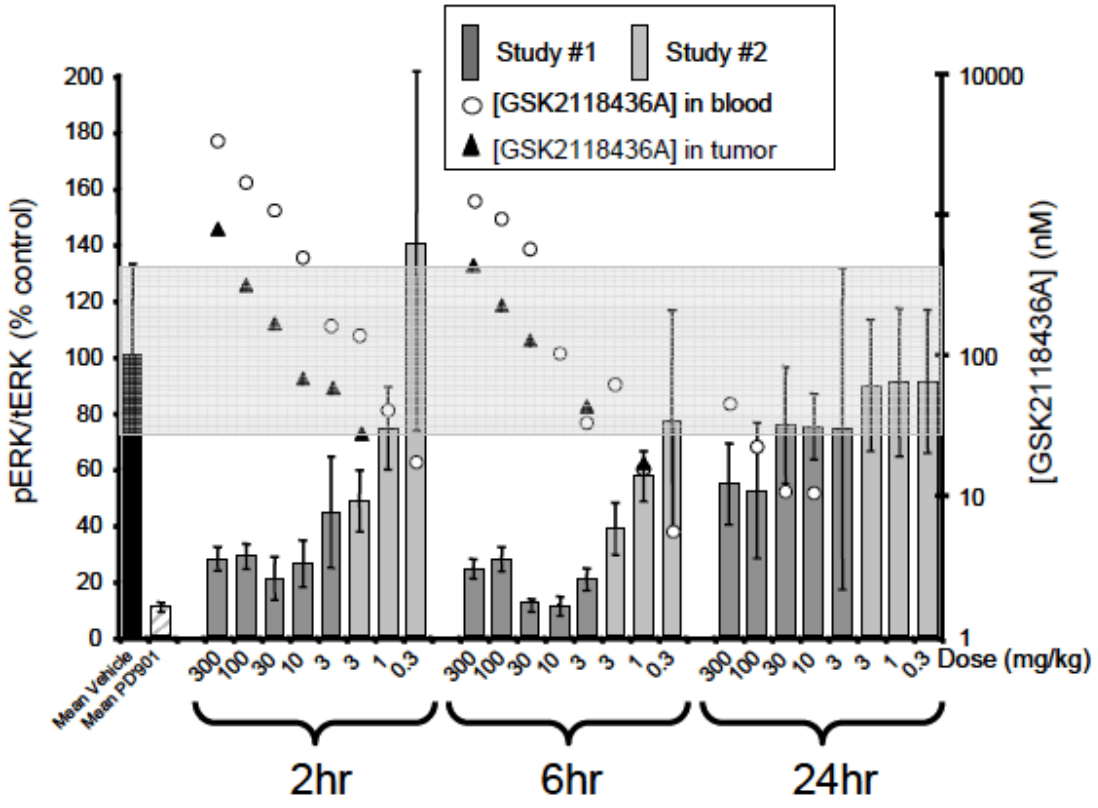
A375P F11 細胞株を 8～10 週齢の雌 CD-1 ヌードマウスの皮下に移植し、約 2～4 週間後に腫瘍が定着して一定の大きさ（約 150～200 mm^3）に増殖した時点で、GSK2118436（試験 1：3～300 mg/kg、試験 2：0.3～3 mg/kg）を単回経口投与した（UH2008/00145/03）。投与 2、6 及び 24 時間後に血液及び腫瘍サンプルを採取し、血中及び腫瘍中 GSK2118436 濃度並びに腫瘍中リン酸化 ERK 量を ELISA キットを用いて測定した。ERK リン酸化に及ぼす影響は、媒体群における総 ERK 量（tERK）に対するリン酸化 ERK（pERK）量の比（pERK/tERK）に対する相対値（%）で示した。

結果

GSK2118436 の血中濃度は投与 2 時間後において全投与量の範囲（0.3～300 mg/kg）で投与量に比例して増加した。腫瘍中濃度は血中濃度と比較して低かったものの、同様に投与量に比例して増加した（図 2.6.2-8）。

GSK2118436 の投与 2 時間後において、3 mg/kg で約 50%、30 mg/kg でほぼ最大に達する用量依存的な pERK/tERK 低下作用が認められた。投与 6 時間後において、1～30 mg/kg では 2 時間後よりも強い pERK/tERK 低下が認められた。投与 24 時間後ではいずれの投与量においても作用が減弱し、30 mg/kg 以下では低下作用はほとんど消失した。

腫瘍中 GSK2118436 濃度と血中 GSK2118436 濃度及び pERK/tERK 低下作用との間には関連性が認められ、約 30～500 nM の腫瘍中 GSK2118436 濃度の範囲で濃度依存的な pERK/tERK 低下作用が示された。



Study #1: GSK2118436 の 3～300 mg/kg を投与、Study #2: GSK2118436 の 0.3～3 mg/kg を投与
2, 6, 24 hr : それぞれ投与 2、6 及び 24 時間後に測定した結果
Vehicle (媒体) : 0.5% HPMC-0.2% Tween 80 溶液
PD901 (陽性対照) : MEK 阻害薬 PD0325901 の 10 mg/kg を経口投与し、2 時間後に腫瘍サンプルを採取して pERK 量を測定
平均値±標準偏差 (n=7～8)、図の網掛け部分は、媒体群におけるばらつきの範囲を示している。

図 2.6.2-8　A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 を単回投与したときの ERK リン酸化阻害作用

Data source: UH2008/00145/03 の Figure 1

2.6.2.2.2.1.1.2.　反復投与試験（14 日間経口投与）

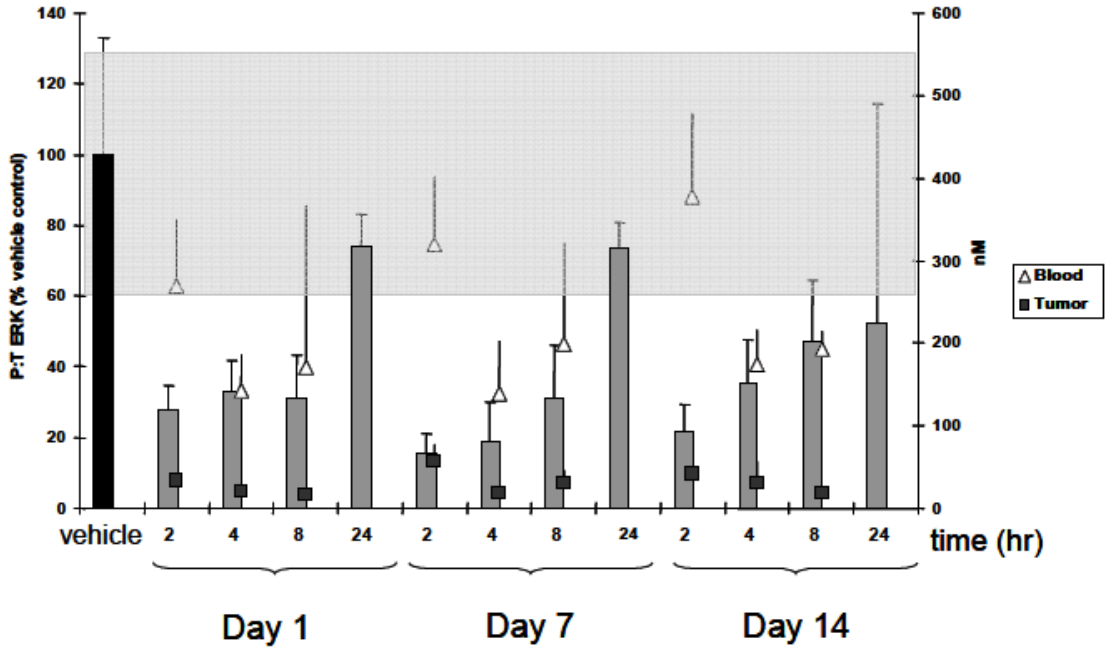
方法

2.6.2.2.2.1.1.1.と同様の方法で A375P F11 細胞株を移植したマウスに GSK2118436 の 3、10 及び 30 mg/kg/日を 1 日 1 回 14 日間経口投与し、投与 1、7 及び 14 日の 2、4、8 及び 24 時間後に血液及び腫瘍サンプルを採取し、血中及び腫瘍中 GSK2118436 濃度並びに腫瘍中の ERK リン酸化レベルを ELISA キットを用いて測定した（UH2008/00145/03）。

結果

A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 の 3、10 及び 30 mg/kg/日を 1、7 及び 14 日間反復経口投与すると、各最終投与の 2、4 及び 8 時間後において腫瘍中の ERK リン酸化が阻害され、24 時間後ではその作用はほとんど消失した（図 2.6.2-9 は 30 mg/kg 投与群の例）。投与 1、7 及び 14 日の同一時点間で血中及び腫瘍中 GSK2118436 濃度は同程度であり、各投与 24 時間後では血中及び腫瘍中で GSK2118436 は検出されなかった。これは、24 時間後に

おいて ERK リン酸化阻害作用が認められなかったことと一致していた。また、3、10 及び 30 mg/kg/日投与群において、血中 GSK2118436 の曝露量は投与量増加に伴い増加し、腫瘍中の ERK リン酸化阻害作用も増大した。



Vehicle (媒体) : 0.5% HPMC-0.2% Tween 80 溶液
平均値±標準偏差 (n=7～8)、図の網掛け部分は、媒体群におけるばらつきの範囲を示している。

図 2.6.2-9　A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 の 30 mg/kg/日を反復経口投与したときの ERK リン酸化阻害作用並びに血中及び腫瘍中 GSK2118436 濃度

Data source: UH2008/00145/03 の Figure 4

まとめ

GSK2118436 は、BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を移植したマウスへの単回及び反復経口投与のいずれにおいても、腫瘍中の ERK リン酸化を阻害した。その作用は用量依存的であり、阻害作用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。

2.6.2.2.2.1.2.　腫瘍増殖抑制作用

A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルにおいて、GSK2118436 の腫瘍増殖抑制作用を評価するための一連の試験を実施した（表 2.6.2-13）。

方法

A375P F11 細胞株を 8～11 週齢の雌 CD-1 ヌードマウスの皮下に移植し、約 2～4 週間後に腫瘍が定着して一定の大きさ（経口投与の試験：約 150～200 mm^3、静脈内投与の試験：約 120～450 mm^3）に増殖した後、媒体又は GSK2118436 を表 2.6.2-13 に示すスケジュールで経口又は静脈内投与した（試験 1～6）（UH2008/00145/03 及び 2011N120928_00）。一般状

態観察、体重並びに腫瘍の長径及び短径を週に 2 回測定して腫瘍体積（長径×短径^2×0.5）を算出した。

表 2.6.2-13　GSK2118436 の腫瘍増殖抑制作用を評価した試験の一覧（A375P F11 細胞株移植マウスを用いた検討）

試験	目的	投与量 (mg/kg)	投与方法	投与期間	n 数
試験 1	最大効果の発揮に必要な最低用量の検討	100, 300	1 日 1 回 経口投与	14 日間	7～8
			1 日 2 回 経口投与	14 日間	
試験 2	試験 1 より低用量での有効性の検討	0.1, 1, 10, 100	1 日 1 回 経口投与	14 日間	7～8
試験 3-1	適切な投与量及び投与スケジュールについての検討	5, 15	1 日 2 回 経口投与	14 日間	7～8
		10, 30	1 日 1 回 経口投与	14 日間	
試験 3-2		10, 30	1 日 1 回 経口投与	14 日間×2 サイクル [a]	
試験 3-3		10, 30	1 日 1 回 経口投与	90 日間 [b]	
試験 4	PK/PD 試験 (2.6.2.2.2.1.1.2 の試験)	3, 10, 30	1 日 1 回 経口投与	14 日間	7～8
試験 5	GSK2118436 の異なる 2 ロット間での腫瘍増殖抑制作用の比較 (2.6.2.2.2.1.3.の試験)	30	1 日 1 回 経口投与	22 日間	12
試験 6	静脈内投与による有効性の検討	30, 100→60[c]	静脈内投与 (持続投与)	14 日間	6～8
	静脈内投与による最小有効量の検討	3, 10, 30			

媒体：0.5% HPMC-0.2% Tween 80 溶液 (経口投与)、20%エンカプシン-1% DMSO 溶液 (静脈内投与)
a：14 日間投与し、腫瘍増殖抑制率 (TGI) を算出した。投与中止後、腫瘍を約 500 mm^3 まで再増殖させた後、再び 10 及び 30 mg/kg の用量で 1 日 1 回 14 日間投与した。
b：90 日間投与したが、TGI は 14 日間投与後に算出した。
c：100 mg/kg/日は忍容性が認められなかったことから、4 日間投与した後中止した (4 例)。残りのマウスは 10 日間の回復期間後、60 mg/kg/日の用量で 7 日間投与した。最終投与後に TGI を算出した。
Data source: UH2008/00145/03 (試験 1～4 及び 6)、2011N120928_00 (試験 5)

結果

A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルに種々の投与スケジュールで GSK2118436 を経口投与することにより、いずれの投与スケジュールにおいても腫瘍の増殖が抑制された（表 2.6.2-14）。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。投与を中止すると腫瘍は再び様々な速度で増殖した。30 mg/kg を 1 日 1 回 90 日間経口投与した試験では（試験 3-3）、投与 14 日目に腫瘍の退縮がみられた（腫瘍増殖抑制率 TGI＞100%）が、それ以後腫瘍は再び増殖した（図 2.6.2-10）。

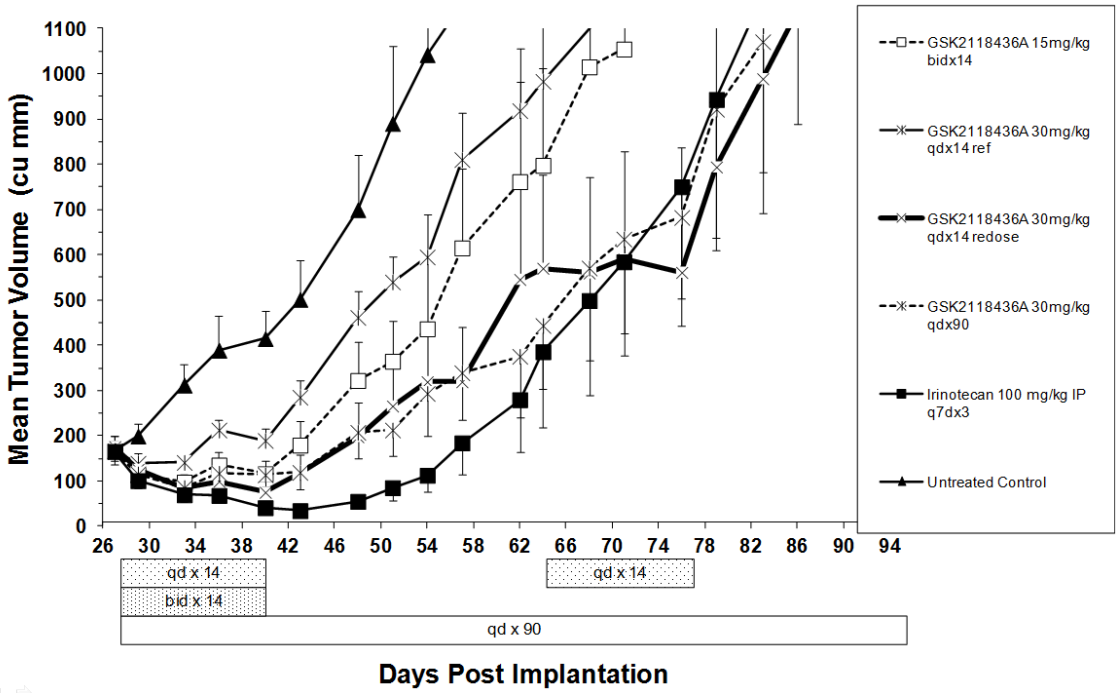
GSK2118436 を静脈内投与したときの腫瘍退縮作用の最小有効量は 3 mg/kg/日であった。

100 mg/kg/日の静脈内投与群を除くすべての投与条件で、マウスに体重減少はみられず、忍容性は良好であり一般状態の悪化も認められなかった。

表 2.6.2-14　　A375P F11 細胞株移植マウスにおける腫瘍増殖抑制作用のまとめ

試験	投与量 (mg/kg)	投与方法	投与期間	TGI (%)	結果
試験 1	100, 300	1 日 1 回経口投与	14 日間	113, 120	いずれの投与スケジュールでも腫瘍増殖抑制作用は同程度であった。試験の後期では、300 mg/kg の 1 日 1 回投与群及び 100 mg/kg の 1 日 2 回投与群の各 1 例で死亡が確認されたが、300 mg/kg の 1 日 2 回投与群では死亡例は認められなかった。
		1 日 2 回経口投与	14 日間	124, 127	
試験 2	0.1, 1, 10, 100	1 日 1 回経口投与	14 日間	29, 51, 97, 118	用量依存的な腫瘍増殖抑制作用を示し、100 mg/kg では腫瘍の退縮 (TGI>100%) がみられた。しかし、ほとんどのマウスでは投与を中止すると、腫瘍は再び増殖したが、観察終了時 (100 日目) において、0.1 及び 1 mg/kg 群の各 1 例、100 mg/kg の 2 例では腫瘍が退縮した状態のままであった。
試験 3-1	5, 15	1 日 2 回経口投与	14 日間	93.8, 120.4	5 又は 15 mg/kg の 1 日 2 回投与と 10 又は 30 mg/kg の 1 日 1 回投与による腫瘍増殖抑制作用は同程度であった。
	10, 30	1 日 1 回経口投与	14 日間	116.2, 90.2	
試験 3-2	10, 30	1 日 1 回経口投与	14 日間×2 サイクル [a]	104.7, 140.8 (1 サイクル目)	2 サイクル目は一時的な腫瘍増殖の停滞がみられたがその後は増殖した。
試験 3-3	10, 30	1 日 1 回経口投与	90 日間 [b]	51.6, 121.5 (14 日目)	TGI 算出後は投与を継続していても腫瘍は増殖した。
試験 4 (PK/PD 試験; 2.6.2.2.2.1.1.2.)	3, 10, 30	1 日 1 回経口投与	14 日間	30, 82, 131	他の試験と異なり、試験開始時に各群が平均的な腫瘍サイズとなるような群分けはしなかった [d] が、用量依存的な腫瘍増殖抑制作用が認められ、TGI は他の試験と同程度の値であった。
試験 5 (2.6.2.2.2.1.3.)	30	1 日 1 回経口投与	22 日間	85, 88 (2 ロットの検討)	媒体群と比較して両ロットとも統計学的に有意に腫瘍体積中央値を減少させた。
試験 6	30, 100→60[C]	静脈内投与 (持続投与)	14 日間	153, 118[c]	腫瘍の退縮が認められたが、投与を中止すると腫瘍は再び増殖した。
	3, 10, 30			146, 157, 167	いずれの用量群でも腫瘍退縮作用は同程度であった。

a：14 日間投与し、TGI を算出した。投与中止後、腫瘍を約 500 mm^3 まで再増殖させた後、再び 10 及び 30 mg/kg の用量で 1 日 1 回 14 日間投与した。
b：90 日間投与したが、TGI は 14 日間投与後に算出した。
c：100 mg/kg/日は忍容性が認められなかったことから、4 日間投与した後中止した (4 例)。残りのマウスは 10 日間の回復期間後、60 mg/kg/日を 7 日間投与した。最終投与後に TGI を算出した。
d：試験終了までに腫瘍が過剰に大きくならないように、媒体及び低用量群には試験開始時に相対的に小さい腫瘍を有するマウスを、抗腫瘍効果が期待される高用量群には相対的に大きな腫瘍を有するマウスを振り分けた。
Data source: UH2008/00145/03 (試験 1～4 及び 6)、2011N120928_00 (試験 5)



Untreated Control (媒体) :0.5% HPMC-0.2% Tween 80 溶液
対照薬として、イリノテカンの 100 mg/kg を週 1 回計 3 回腹腔内投与した。
平均値±標準誤差 (n=7～8)

図 2.6.2-10　種々の投与スケジュールで GSK2118436（30 mg/kg/日）を投与した A375P F11 細胞株移植マウスにおける腫瘍増殖曲線

Data source: UH2008/00145/03 の Figure 15

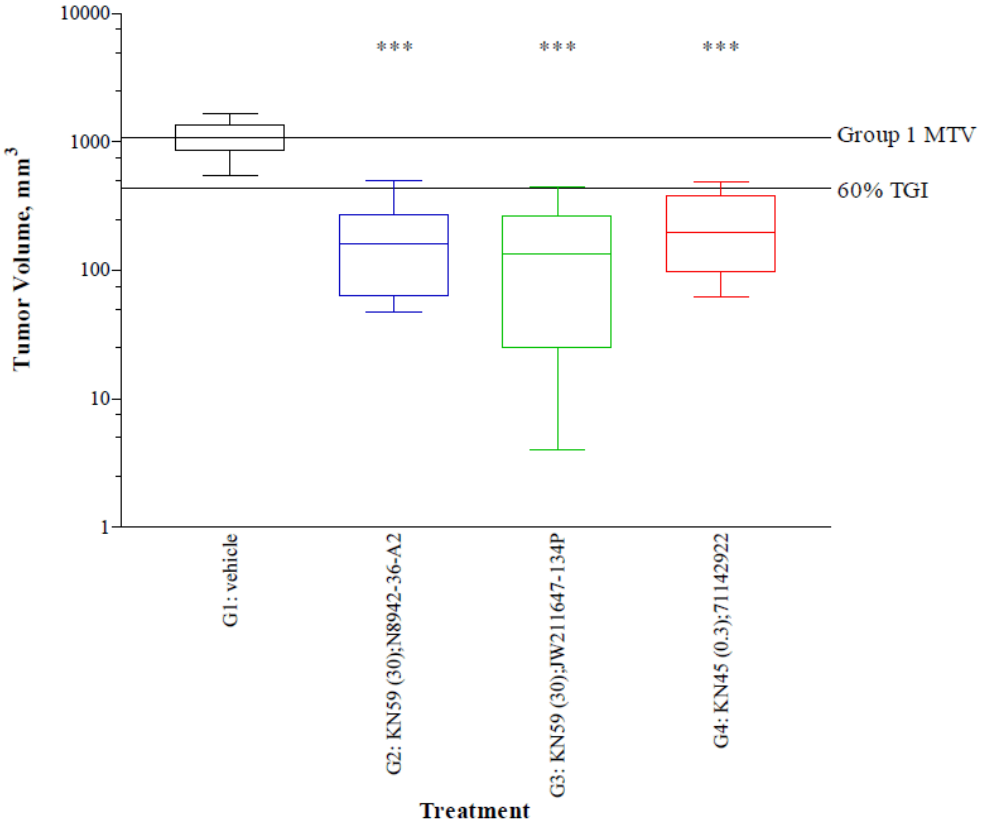
2.6.2.2.2.1.3.　GSK2118436 の 2 種類のロット間での腫瘍増殖抑制作用の比較

方法

A375P F11 細胞株を 10～11 週齢の雌 CD-1 ヌードマウス（10～12 例／群）の皮下に移植し、腫瘍が定着して一定の大きさ（約 150～200 mm^3、各群の平均 175～178 mm^3）に増殖した時点（試験 28 日）で、媒体、2 種類のロットの GSK2118436（ロット番号 N8942-36-A2 及び JW211647-134P）の 30 mg/kg 又は GSK1120212B の 0.3 mg/kg を 1 日 1 回 22 日間経口投与した（2011N120928_00）。腫瘍体積が 2000 mm^3 に達するか又は投与 22 日目まで週に 2 回、腫瘍の長径及び短径を測定して、腫瘍体積（長径×短径 ^{2}×0.5）を算出した。体重を投与 5 日目までは連日及びそれ以降は投与 22 日目まで週に 2 回測定し、試験期間を通して一般状態を観察した。

結果

媒体群の投与 22 日目における腫瘍体積中央値（MTV）は 1090 mm^3（550～1666 mm^3）であったのに対し、GSK2118436 の 30 mg/kg 群では 2 種類のロットの MTV は 161 mm^3（48～500 mm^3）及び 136 mm^3（4～446 mm^3）であり、媒体群と比較していずれも統計学的に有意に減少した（図 2.6.2-11）。最終投与時点（投与 22 日目）に算出した TGI は 85 及び 88%であり、2 種類のロット間で腫瘍増殖抑制作用に相違はみられなかった（表 2.6.2-15）。



G1：媒体群
G2 及び G3：2 種類のロットの KN59 (GSK2118436) 30 mg/kg 投与群
G4：KN45 (GSK1120212B) 0.3 mg/kg 投与群
***: p<0.001 vs 媒体群 (G1) (Kruskal-Wallis Dunn's test: G2 及び G3、Mann-Whitney U test: G4) (n=10～12)
60% TGI：本試験における「抗腫瘍効果あり」の判定基準

図 2.6.2-11　　2 種類のロット間での GSK2118436 の腫瘍体積中央値（MTV）の比較

Data source: 2011N120928_00 の Figure 1

表 2.6.2-15　　2 種類のロット間での GSK2118436 の腫瘍増殖抑制作用（TGI）の比較

被験物質	ロット	用量 (mg)	%TGI
GSK2118436	N8942-36-A2	30	85
	JW211647-134P	30	88
GSK1120212B	-	0.3	82

n=10～12
%TGI＝[1-（$MTV_{drug\text{-}treated}/MTV_{control}$）]×100
Data source: 2011N120928_00 の Table 2

まとめ

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 は種々の投与スケジュール（異なる用量及び投与期間）で実施したいずれの試験においても腫瘍増殖抑制作用を示した。GSK2118436 は 1 日 1 回又は 2 回 14 日間の反復経口投与及び静脈内持続投与において、TGI は 100%超（腫瘍退縮作用）であった（経口投与での TGI は最大 141%、静脈内投与での TGI は最大 167%）。しかしながら、

30 mg/kg を 1 日 1 回 90 日間経口投与する試験では、投与 14 日目以降は投与を継続しても腫瘍は再び増殖した。他のいずれの試験においても投与を中止すると腫瘍の再増殖がみられた。GSK2118436 の 2 種類のロット間での腫瘍増殖抑制作用を比較した試験では、GSK2118436 は両ロットとも媒体群と比較して統計学的に有意に MTV を減少させ、ロット間の腫瘍増殖抑制作用は同程度であった。安全性に関しては、検討したすべての投与スケジュールの中で、100 mg/kg/日の静脈内投与群を除いて、GSK2118436 を投与したマウスに体重減少はみられず、忍容性は良好であり一般症状の悪化も認められなかった。

2.6.2.2.3.　代謝物の薬理作用

2.6.2.2.3.1.　In vitro 試験

GSK2118436 のヒト血漿中主代謝物である水酸化体、カルボン酸体及び脱メチル体（2.7.2.2.1.1.2.1.）の in vitro における薬理活性を評価するために、RAF キナーゼ阻害活性及び選択性並びに BRAF V600 変異陽性の各種腫瘍細胞株における ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用について検討し、GSK2118436 の作用と比較した。

2.6.2.2.3.1.1.　代謝物の RAF キナーゼ阻害作用

方法

2.6.2.2.1.1.1.及び 2.6.2.2.1.1.2.と同様の方法で 3 種類の代謝物の RAF 阻害作用を測定し、GSK2118436 の活性と比較した（UH2010/00045/02）。

結果

脱メチル体は、ヒト野生型 BRAF 及び切断型 CRAF に対して GSK2118436 と同程度の阻害活性を示した。水酸化体の阻害活性はやや弱く（IC50 は約 6 倍高値）、カルボン酸体の阻害活性は更に弱かった（IC50 は約 21～47 倍高値）（表 2.6.2-16）。

ラット、イヌ及びサルの野生型 BRAF に対する阻害活性はヒト野生型 BRAF に対する阻害活性と同程度であった。

水酸化体及び脱メチル体の変異型 BRAF に対する阻害活性は GSK2118436 と同程度であったが、カルボン酸体の阻害活性はいずれの変異型 BRAF に対してもこれらの阻害活性より低かった（IC50 は 13～27 倍高値）。

表 2.6.2-16　　代謝物の RAF 阻害活性（GSK2118436 との比較）

	GSK2118436	水酸化体	カルボン酸体	脱メチル体
ヒト BRAF 及び CRAF に対する IC50 (nM)				
野生型 BRAF	2.2	12.3 (5.6)	102.3 (46.5)	3.2 (1.5)
切断型 CRAF	2.5	14.8 (5.9)	51.3 (20.5)	3.1 (1.2)
各動物種の野生型 BRAF に対する IC50 (nM)				
ラット	2.1	14.8 (7)	117.5 (56)	3.4 (2)
イヌ	2.0	12.3 (6)	109.6 (55)	3.2 (2)
サル	1.9	12.3 (6)	95.5 (50)	3.0 (2)
V600 変異陽性のヒト BRAF に対する IC50 (nM)				
BRAF V600E	0.65	1.9 (3)	16.6 (26)	1.1 (2)
BRAF V600K	0.50	1.3 (3)	6.3 (13)	0.56 (1)
BRAF V600D	1.86	6.3 (3)	50.1 (27)	2.8 (2)

n=2
括弧内は GSK2118436 の IC50 に対する各代謝物の IC50 の相対値
Data source: UH2010/00045/02 の Table 1A、1B、3A、3B、4A 及び 4B

2.6.2.2.3.1.2.　　選択性の検討

方法

試験 1：272 種類のヒトキナーゼ及び 16 種類の動物由来キナーゼで構成されるキナーゼパネルを用いて、水酸化体及び脱メチル体（それぞれ 300 nM）のキナーゼ阻害活性を測定した（2011N111729_00）。一部のキナーゼに対しては複数濃度で阻害活性を再測定し、IC50 を算出して GSK2118436 の IC50 と比較した。

試験 2：282 種類のヒトキナーゼ及び 17 種類の動物由来キナーゼから構成されるパネルに対するカルボン酸体（300 nM 及び 3 μM）の阻害作用を検討した（2012N139510_00）。一部のキナーゼに対しては複数濃度で 3 種類の代謝物の阻害活性を再測定し、IC50 を算出して GSK2118436 の IC50 と比較した。

試験 3：GSK2118436 が阻害活性を示すヒト ALK5（IC50＝12 nM；2.6.2.2.1.2.1.）に対する 3 種類の代謝物の阻害活性を測定した（2013N178509_00）。

結果

試験 1 では、水酸化体及び脱メチル体が 300 nM で 5 種類のキナーゼに対して 70%超の阻害を示した。試験 2 では、カルボン酸体が 300 nM で 7 種類のキナーゼに対して 50%超の阻害活性を示した。それらの IC50 並びに、ベムラフェニブが 300 nM で 50%超の阻害活性を示す 6 種類のキナーゼ（2.6.2.2.1.2.2.）及び SIK に対する IC50 を表 2.6.2-17 に示した。

3 種類のいずれの代謝物も、CRAF 及び BRK に対して GSK2118436 の阻害活性（IC50＝70 及び 92/109 nM）と同程度の阻害作用を示した（IC50 の範囲は 55～98 nM 及び 93～260 nM）。また、水酸化体及び脱メチル体は GSK2118436 と同様に LIMK1、NEK11、PERK 及び SIK に対して阻害作用（IC50＜100 nM）を示し、その活性は GSK2118436 と比較して、

LIMK1、NEK11 及び PERK では同程度、SIK では約 1/14～1/2 であった。これらのキナーゼに対するカルボン酸体の阻害活性は、水酸化体及び脱メチル体と比較すると弱かった。Tie2（R849W）に対する水酸化体及び脱メチル体の IC50 は 100 nM 超であったものの、GSK2118436 と比較して、それぞれ約 2/5 及び同程度の阻害作用を示した。Tie2（Y897S）に対するカルボン酸体の IC50 は 100 nM 未満であり、その活性は GSK2118436、水酸化体及び脱メチル体と比較して 2～5 倍であった。

試験 3 では、いずれの代謝物も ALK5 に対して阻害活性を示さなかった（IC50＞750 nM）。

表 2.6.2-17　　14 種類のヒトキナーゼに対する GSK2118436 及び代謝物の阻害作用

キナーゼ	GSK2118436		水酸化体		脱メチル体		カルボン酸体
	IC50 (nM)						
	試験 1	試験 2	試験 1	試験 2	試験 1	試験 2	試験 2
ACK1[a]	-	469	-	1738	-	1061	3040
AMPKα2	-	1085	-	2465	-	2249	2311
BRK[a]	92	109	148	156	93	114	260
c-Kit[a]	-	1246	-	2070	-	1391	5085
CRAF[a]	-	70	-	71	-	98	55
Fgr	-	2057	-	4428	-	1901	＞10000
Lck[a]	367	336	255	436	313	142	1607
LIMK1	10	13	27	38	17	20	103
NEK11	21	44	35	66	30	32	113
PERK	-	46	-	81	-	22	153
PDGFRα (V561D)[a]	-	2887	-	1884	-	3446	>10000
SIK	10	21	144	48	104	39	543
Tie2 (R849W)	-	84	-	201	-	104	155
Tie2 (Y897S)	-	270	-	446	-	178	89

n=1
-: 実施せず
a: ベムラフェニブが 300 nM で 50%超の阻害活性を示す 6 種類のキナーゼ (2.6.2.2.1.2.2.)
Data source: 2011N111729_00 (試験 1) の p.306 の Table 及び 2012N139510_00 (試験 2) の p.24～25 の Table

まとめ

3 種類の主代謝物のうち脱メチル体及び水酸化体は、野生型 BRAF 及び切断型 CRAF 並びに変異型 BRAF 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が示された。また、各代謝物はラット、イヌ及びサル由来の野生型 BRAF に対し、ヒト BRAF と同程度の阻害活性を示すことが確認された。種々のキナーゼに対する阻害作用についても検討した結果、3 種類の代謝物は多くのキナーゼに阻害活性を示さず、GSK2118436 と同様に RAF に対して高い選択性を示すことが確認された。

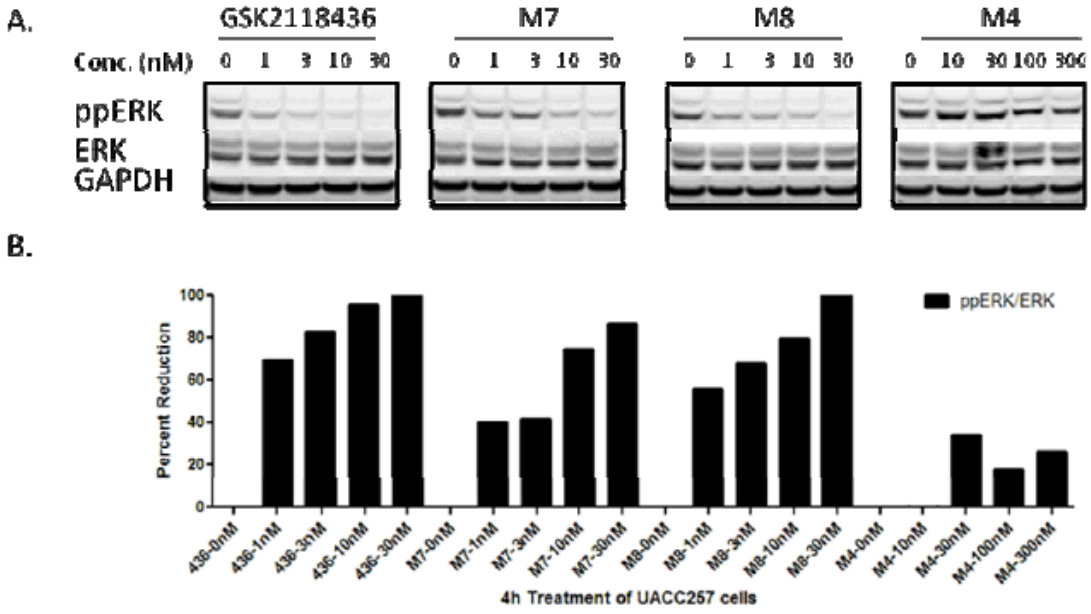
2.6.2.2.3.1.3.　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 UACC-257 細胞株における代謝物の ERK リン酸化阻害作用

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 UACC-257 細胞株に GSK2118436 及び 3 種類の代謝物（水酸化体、脱メチル体又はカルボン酸体）（それぞれ 1～30 nM、カルボン酸体のみ 10～300 nM）を添加し、4 時間インキュベートした後、ウエスタンブロット法により pERK 生成量に及ぼす影響を検討した（2012N147468_00）。

結果

脱メチル体及び水酸化体の ERK リン酸化阻害作用は濃度依存的で GSK2118436 よりわずかに弱かった。一方、カルボン酸体の ERK リン酸化阻害作用は他の代謝物より弱く、10～300 nM で濃度依存的な阻害作用を示さなかった（図 2.6.2-12）。



A: ウエスタンブロットの結果
B: Untreated control (媒体群) における pERK 量を総 ERK 量 (ERK) に対して標準化した値 (ppERK/ERK と記載) に対する相対値 (%) で示した。
M7：水酸化体、M8：脱メチル体、M4：カルボン酸体
n=1

図 2.6.2-12　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 UACC-257 細胞株における代謝物の ERK リン酸化阻害作用

Data source: 2012N147468_00 の Figure 2

2.6.2.2.3.1.4.　ヒト腫瘍由来細胞株に対する代謝物の増殖抑制作用

2.6.2.2.3.1.4.1.　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

方法

SK-MEL-28 細胞株における、3 種類の代謝物の ERK リン酸化及び細胞増殖に及ぼす影響を、それぞれ 2.6.2.2.1.4.2.及び 2.6.2.2.1.5.1.と同様の方法で検討し、GSK2118436 の作用と比較した（UH2009/00016/01 及び UH2010/00045/02）。

結果

SK-MEL-28 細胞株において、水酸化体及び脱メチル体は GSK2118436 と同程度の ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用を示した。一方、カルボン酸体はいずれの作用も GSK2118436 より弱かった（IC50 は 17 倍以上）（表 2.6.2-18）。

表 2.6.2-18　BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株における代謝物の ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用

被験物質	IC50 (nM)			
	ERK リン酸化阻害		細胞増殖抑制	
	試験 1	試験 2	試験 1	試験 2
GSK2118436	1.5	9	3.7	8
水酸化体	4	7	17.7	14
脱メチル体	-	8	-	9
カルボン酸体	-	156	-	258

n=2 (試験 1)、n=1～2 (試験 2 の ERK リン酸化阻害)、n=3～7 (試験 2 の細胞増殖抑制)
-: 実施せず
Data source: UH2009/00016/01 (試験 1) の Table 4 及び 5 並びに UH2010/00045/02 (試験 2) の Table 5 及び 7

2.6.2.2.3.1.4.2.　BRAF 野生型又は V600E 変異を有する腫瘍細胞株における代謝物の増殖抑制作用の比較

方法

BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 及びヒト CRC 由来 Colo205 細胞株並びに野生型 BRAF を有するヒト腫瘍由来細胞株の増殖に及ぼす 3 種類の代謝物の影響を、2.6.2.2.1.5.1.と同様の方法で検討し、GSK2118436 の作用と比較した（UH2009/00016/01 及び UH2010/00045/02）。

結果

水酸化体及び脱メチル体は BRAF V600E 変異陽性の 2 種類のヒト腫瘍細胞株に対して GSK2118436 と同程度の増殖抑制作用を示し、カルボン酸体は GSK2118436 より弱い阻害作用（1/30 以下）を示した（表 2.6.2-19）。野生型 BRAF を有するヒト頭頸部扁平上皮癌由来 HN5 及びヒト CRC 由来 HCT116 細胞株（KRAS 変異陽性）に対しては、GSK2118436 と同様に 3 種類の代謝物はいずれも、増殖抑制作用を示さなかった（IC50＞20000 nM）。

表 2.6.2-19　　BRAF 野生型又は V600E 変異を有する腫瘍細胞株における代謝物の増殖抑制作用

被験物質	IC50 (nM)					
	A375P F11 (BRAF V600E)	Colo205 (BRAF V600E)		HN5 (WT RAS/WT BRAF)		HCT116 (変異型 RAS/WT BRAF)
	試験 1	試験 1	試験 2	試験 1	試験 2	試験 1
GSK2118436	5.3	9.0	9	>20000	>20000	>20000
水酸化体	25.1	27.1	26	>20000	>20000	>20000
脱メチル体	-	-	11	-	>20000	-
カルボン酸体	-	-	139	-	>20000	-

n=2 (試験 1)、n=3～5 (試験 2)、-：実施せず、WT：野生型
Data source: UH2009/00016/01 (試験 1) の Table 5 並びに UH2010/00045/02 (試験 2) の Table 7

2.6.2.2.3.1.4.3.　　BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株における代謝物の増殖抑制作用

方法

11 種類の BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株の増殖に及ぼす 3 種類の代謝物の影響を、2.6.2.2.1.5.1.と同様の方法で検討し、GSK2118436 の作用と比較した（2012N147468_00）。

結果

脱メチル体及び水酸化体は、BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫細胞株 11 株中 8 株に対して GSK2118436 よりわずかに弱い増殖抑制作用（IC50＝10～308 nM、GSK2118436 の約 2～3 倍）を示した。カルボン酸体は非常に弱い増殖抑制作用（IC50 は約 1000～＞10000 nM）しか示さなかった。残りの 3 株の IGR-1、A2058 及び SK-MEL-3 細胞株に対しては、GSK2118436 及びいずれの代謝物も増殖抑制作用を示さなかった（IC50＞750 nM）。

表 2.6.2-20　　BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株における代謝物の増殖抑制作用

細胞株	BRAF アミノ酸変異	IC50 (nM)			
		GSK2118436	水酸化体	カルボン酸体	脱メチル体
YUMAC	V600K	5 ± 0	12 ± 0	1135 ± 41	10 ± 1
UACC-257	V600E	6 ± 1	13 ± 0	1232 ± 267	12 ± 5
COLO-829	V600E	10 ± 1	28 ± 7	1762 ± 105	19 ± 1
WM-115	V600D	12 ± 0	24 ± 2	2526 ± 983	22 ± 3
A101D	V600E	13 ± 4	30 ± 8	2089 ± 600	22 ± 3
SK-MEL-5	V600E	15 ± 7	27 ± 16	3406 ± 1018	28 ± 17
A375P F11	V600E	53 ± 3	100 ± 28	4034 ± 993	90 ± 29
SK-MEL-24	V600E	166 ± 131	308 ± 30	>10000	184 ± 171
IGR-1	V600K	>750	>10000	>10000	>10000
A2058	V600E	>10000	>10000	>10000	>10000
SK-MEL-3	V600E	>10000	>10000	>10000	>10000

平均値±標準偏差 (n≥2)
A101D、A2058、COLO-829、SK-MEL-24 及び WM-115：PTEN 欠損
A2058：MEK1 P124S 及び RB1 Q93*変異陽性、IGR-1：MEK2 E66_K68del 変異陽性
Data source: 2012N147468_00 の Table 1

まとめ

3 種類の代謝物のうち脱メチル体及び水酸化体は、いずれも GSK2118436 と同程度又はやや弱い 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細胞株）及び増殖抑制作用（BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株）を示した。野生型 BRAF を有する細胞株に対しては GSK2118436 と同様にいずれの代謝物も増殖抑制作用を示さなかった。カルボン酸体の ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用は他の 2 種類の代謝物と比較して弱かった。

2.6.2.2.3.2.　In vivo 試験

各代謝物の in vivo における薬理活性及び薬効への寄与について検討するため、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 リン酸化阻害作用並びに血漿中及び腫瘍中濃度について検討した。なお、GSK2118436 はマウス及びヒトにおいて、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（2.6.4.5.3.1.1.及び 2.7.2.3.1.1.3.）。

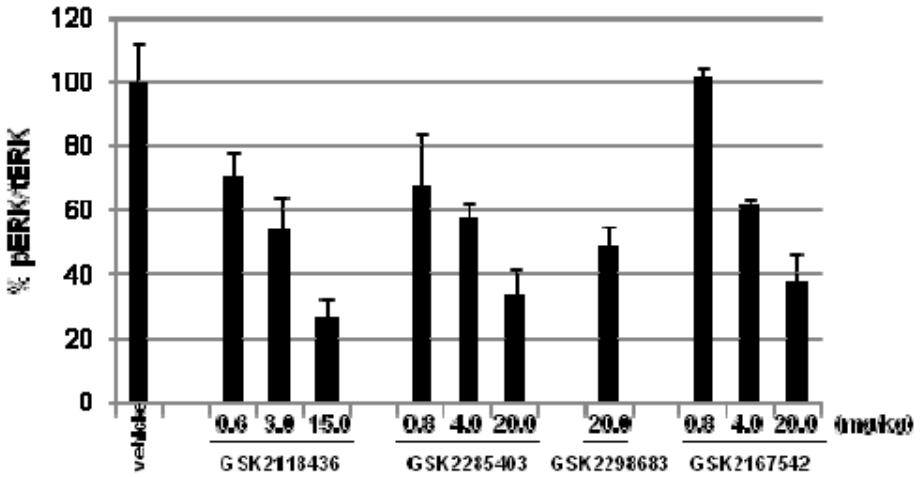
2.6.2.2.3.2.1.　A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 及び 3 種類の代謝物を静脈内投与したときの全身曝露量及び ERK リン酸化阻害作用

方法

A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436（0.6、3 及び 15 mg/kg）、カルボン酸体（20 mg/kg）、水酸化体又は脱メチル体（0.8、4 及び 20 mg/kg）を 24 時間持続的に点滴静脈内投与した（点滴速度：50 µL/hr）（UH2010/00045/02）。投与終了後、腫瘍組織を摘出して腫瘍中の ERK リン酸化レベルを測定した。また、GSK2118436 及び各代謝物の血中濃度を測定し、AUC(0-24)を算出した。

結果

GSK2118436 の 3 mg/kg を持続的に静脈内投与すると、血中に 3 種類の代謝物（水酸化体、脱メチル体及びカルボン酸体）が検出された。このとき、腫瘍中の pERK/tERK は媒体群と比較して約 50%低下した（図 2.6.2-13）。水酸化体及び脱メチル体（いずれも 0.8、4 及び 20 mg/kg）を持続的に静脈内投与すると用量依存的な ERK リン酸化阻害作用がみられ、最大用量の 20 mg/kg では 50～60%程度の pERK/tERK 低下作用が認められた。カルボン酸体（20 mg/kg）を持続的に静脈内投与すると、同用量の水酸化体及び脱メチル体と同程度（約 60%）の阻害作用を示した。



GSK2285403 (水酸化体)、GSK2298683 (カルボン酸体)、GSK2167542 (脱メチル体)
平均値±標準偏差 (n=3)、媒体：20%エンカプシン-1% DMSO 溶液

図 2.6.2-13　A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 及び代謝物を静脈内投与したときの ERK リン酸化阻害作用

Data source: UH2010/00045/02 の Figure 3

表 2.6.2-21　A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 及び代謝物を 24 時間持続的に静脈内投与したときの全身曝露量及び ERK リン酸化阻害作用

被験物質	投与量 (mg/kg)	AUC(0-24)(ng·hr/mL)			
		GSK2118436	水酸化体	カルボン酸体	脱メチル体
GSK2118436	0.6	101	-	-	-
	3	1110	227	9292	1420
	15	2725	-	-	-
水酸化体	0.8	ND	148	2770	414
	4	ND	602	14660	2332
	20	ND	2422	54920	10316
カルボン酸体	20	ND	ND	40320	785
脱メチル体	0.8	ND	ND	ND	ND
	4	36[a]	ND	ND	71
	20	ND	ND	ND	364

n=3
媒体：20%エンカプシン-1% DMSO 溶液
-：測定せず、ND：検出されず
a. 脱メチル体は GSK2118436 に代謝されないのにもかかわらず、脱メチル体の 4 mg/kg を持続的に静脈内投与した後に GSK2118436 が検出された。
Data source: UH2010/00045/02 の Figure 3 中の表

2.6.2.2.3.2.2.　A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 及び脱メチル体を経口投与したときの血中濃度及び ERK リン酸化阻害作用

方法

脱メチル体の経口投与での ERK リン酸化阻害活性を GSK2118436 と比較するため、A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 又は脱メチル体の 30 mg/kg を単回経口投与し、投与 2、6、12、18、24 時間後に腫瘍を摘出して腫瘍中の ERK リン酸化レベルを測定した（UH2010/00045/02）。また、同時点で採血し、血中濃度を測定した。

結果

GSK2118436 及び脱メチル体のいずれにおいても、投与 2 時間後に血中濃度及び腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用は最大であり、作用は同程度であった（両被験物質ともに約 80%阻害）（表 2.6.2-22）。その後、時間経過とともに、血中濃度の低下に伴い阻害作用は減弱し、いずれの被験物質も検出されなかった投与 24 時間後では pERK/tERK は媒体群の約 80%のレベルにまで減弱した。

表 2.6.2-22　A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 及び脱メチル体を単回経口投与したときの血中濃度及び ERK リン酸化阻害作用

被験物質	投与量 (mg/kg)	血中濃度 (ng/mL)					pERK/tERK[a] (%)				
		2[b]	6	12	18	24	2	6	12	18	24
GSK2118436	30	288.0	41.6	18.5	1.4	0	17.6	30.6	49.8	72.2	76.9
脱メチル体	30	108.3	21.6	12.4	0	0	22.0	28.3	53.8	75.6	76.1

n=3、媒体：0.5% HPMC-0.2% Tween 80 溶液
a. 媒体群の pERK/tERK (100%) に対する%で示した。b. 投与後の時間 (hr)
Data source: UH2010/00045/02 の Figure 4 中の表及び Table 15

まとめ

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（約 50～60%の pERK/tERK 低下）。また、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 を単回経口投与すると、両被験物質の血中濃度及び腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用はいずれの測定時点においても同程度であった。

2.6.2.3.　副次的薬理試験

2.6.2.3.1.　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

方法

14 種類の受容体、7 種類のイオンチャネル、3 種類のトランスポーター、4 種類のキナーゼ及び 2 種類の酵素（計 30 種類）に対する GSK2118436 の作用を検討した（UH2009/00010/00）。

結果

GSK2118436 は、α2C-アドレナリン受容体に対してアゴニスト作用を示し（EC50＝300 nM）、3 種類のキナーゼ（Lck、GSK3β 及び Aurora B）に対して阻害作用を示した（それぞれ IC50＝600、800 及び 3200 nM）。その他の 26 種類の蛋白に対しては、影響を及ぼさなかった（XC50＞5000 nM）。

2.6.2.3.2.　ヒト正常細胞の増殖に及ぼす影響

2.6.2.3.2.1.　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 GSK2118436（0.1 nM～20 μM）で 72 時間処理し、2.6.2.2.1.5.1.と同様の方法で細胞数を計測し、細胞増殖抑制作用の IC50 を算出した（UH2008/00132/02）。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

GSK2118436 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＞20000 nM）。一方、HUVEC の増殖因子存在下で検討した場合には、弱い増殖抑制作用を示した（IC50＝276 nM）。

2.6.2.3.2.2.　骨髄前駆細胞の増殖に及ぼす影響

方法

ヒト骨髄前駆細胞の懸濁液にヒト組換え GM-CSF 及び GSK2118436（0.01～10 μM）を添加して 10 日間培養した後、顕微鏡下で CFU（細胞数 50 個超のコロニー）をカウントした（UH2008/00132/02）。

結果

GSK2118436 は 1000 nM 以上の高濃度で CFU 形成を抑制した（IC50＝3600 nM）が、IC90 は算出できなかった。

まとめ

GSK2118436 の正常細胞（HUVEC 及び骨髄前駆細胞）に対する増殖抑制作用は弱く、それぞれの IC50 は＞20000 及び 3600 nM であった。

2.6.2.4.　安全性薬理試験

安全性薬理試験として、GSK2118436 の中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した。また、GSK2118436 に加えて 3 種類のヒト血漿中主代謝物の hERG 電流に及ぼす影響についても検討した。In vivo 試験では、0.5% HPMC-0.1% Tween 80 溶液で GSK2118436A（微粉化製剤）の懸濁液を調製し、動物に経口投与した。

2.6.2.4.1.　中枢神経系に及ぼす影響

雄 SD ラット（8 匹／群）に GSK2118436 の 5、20 及び 200 mg/kg を単回投与したときに、投与 24 時間後までいずれの用量でも体温への影響並びに中枢及び末梢神経系に関する神経行動学的影響は認められなかった（VD2008/00869/00）。

2.6.2.4.2.　心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1.　hERG アッセイ

hERG cDNA を安定的にトランスフェクトした HEK293 細胞において、GSK2118436 は 1.5～30 μM（0.8～15.6 μg/mL）で hERG テール電流を濃度依存的に抑制したが、抑制作用は弱く、IC25 は 11.7 μM（6.1 μg/mL）、IC50 及び IC75 はいずれも 30 μM（15.6 μg/mL）超であった（FD2008/00376/00）。また、各代謝物（水酸化体、カルボン酸体及び脱メチル体）の抑制作用も弱かった（IC50 はいずれも＞30 μM）（UH2010/00045/02）。

2.6.2.4.2.2.　ウサギ左心室ウェッジ標本における影響

雌ウサギの左心室ウェッジ標本において、GSK2118436 は 1～30 μM で QT 間隔を濃度依存的に短縮した（最高濃度の 30 μM では約 30%の短縮）が、QRS 間隔には有意な影響は認められなかった（UD2009/00043/00）。同様に、Tp-e の濃度依存的な短縮が認められた（30 μM で約 47%）が、TdP スコアは陰性（－1.3～－2 点の範囲）であった。また、1～30 μM で濃度依存的な心筋収縮力の低下が認められた（30 μM で最大 64%の低下）。

2.6.2.4.2.3.　ラットの心血管系に及ぼす影響

無麻酔の雄 SD ラット（4 匹／群）に GSK2118436 の 5、20 及び 200 mg/kg を単回経口投与し（ラテン方格式クロスオーバー法（投与間隔 7 日間以上））、動脈圧（平均動脈圧、収縮期血圧、拡張期血圧及び脈圧）、心拍数及び体温を投与 24 時間後まで連続的に測定した（CD2008/01717/00）。その結果、全投与群で用量依存的な軽度～中程度の心拍数増加（9～48 bpm（最大で 18%）の増加）が認められ、その作用は 5 mg/kg では投与 2～7 時間後まで、20 mg/kg 以上では投与 2～24 時間後まで持続した。

2.6.2.4.2.4.　イヌの心血管系に及ぼす影響

覚醒雄ビーグル犬（4 匹／群）に GSK2118436 の 1、5 及び 50 mg/kg を単回経口投与し（ラテン方格式クロスオーバー法（投与間隔 7 日間））、血圧、心拍数、心電図波形の間隔及び体温を投与 24 時間後までテレメトリー法で測定した（CD2008/01280/00）。50 mg/kg 群の心電図検査では、波形異常及び不整脈の有無についても評価した。その結果、50 mg/kg で軽度な心拍数の増加（最大で 18 bpm（28%）の増加）及び PR 間隔の短縮（最大で 7 msec（7%）の短縮）が認められたが、投与 24 時間後までに回復した。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対する影響は認められなかった。

2.6.2.4.3.　呼吸系に及ぼす影響

無麻酔の雄 SD ラット（4 匹／群）に GSK2118436 の 5、20 及び 200 mg/kg を単回経口投与したときに（ラテン方格式クロスオーバー法（投与間隔 7 日間））、投与 24 時間後までいずれの用量でも換気機能（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）、気道抵抗（総肺抵抗）及び体温への影響は認められなかった（CD2008/01279/00）。

2.6.2.4.4.　　体温に及ぼす影響

臨床試験において GSK2118436 を投与した一部の患者で認められた発熱への影響（2.5.5.2.4.2.）の機序を検討するためのフォローアップ試験として、発熱に関与していることが知られているプロスタグランジン E2 の受容体（プロスタノイド受容体）[Furuyashiki, 2009]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。

2.6.2.4.4.1.　　プロスタノイド受容体 EP1、EP2、EP3 及び EP4 に対する作用

ヒトプロスタノイド受容体（EP1、EP2、EP3 及び EP4）に対する GSK2118436、3 種類の代謝物（水酸化体、カルボン酸体及び脱メチル体）並びにベムラフェニブの影響について検討した結果、いずれの被験物質も 10 μM までの濃度で各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（2013N159876_00）。

2.6.2.4.4.2.　　サイトカイン遊離に及ぼす影響

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）（0.0001～10 μM；一部の被験物質は 30 μM まで）を添加し、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）。

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）（濃度範囲 0.01～36.6 μg/mL）を添加し、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）。

試験 1 及び試験 2 のいずれにおいても、GSK2118436 及び 3 種類の代謝物は、検討したすべてのサイトカイン遊離に対して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 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。

2.6.2.6.　　考察及び結論

2.6.2.6.1.　　効力を裏付ける試験

In vitro 試験

GSK2118436 はキナーゼ阻害アッセイにおいて、ヒト変異型 BRAF（V600E、V600K 又は V600D 変異陽性）に対してな強力な阻害作用を示した（IC50＝0.5～1.84 nM）。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）。約 300 種類のプロテインキナーゼ及び脂質キナーゼパネルを用いた検討で、RAF 以外では 10 種類のキナーゼ（ヒト ALK5、SIK2、BRK、LIMK1、NEK11、PKD2、

SIK、PERK 及び変異型 Tie2（R849W）並びに yeast CK1）に対してのみ IC50 が 100 nM 未満の阻害作用を示した。その中で GSK2118436 が最も強力な阻害作用（IC50＝12 nM）を示した TGF-βI 型受容体である ALK5 に関して機能アッセイにより細胞内 ALK5 シグナル伝達に及ぼす影響を検討したところ、IC50 は 3900 nM と弱く（キナーゼアッセイにおける ALK5 阻害作用の IC50 の 325 倍）、RAF キナーゼに対する IC50 との比較では 780 倍超であった（2.6.2.2.1.1.1.で最も IC50 が高値（5.0 nM）であった切断型 CRAF との比較）。これらのことから、GSK2118436 は選択的 RAF 阻害薬であること、及びその阻害様式は ATP と競合的であることが示された。

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 ERK 及び MEK のリン酸化阻害作用を指標）を検討した試験では、BRAF V600 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）。また、ERK リン酸化阻害作用は、GSK2118436 を除去した 4 時間後まで持続したが 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）。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。また、BRAF V600 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）。

BRAF V600E 変異陽性の腫瘍細胞株を 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。一方、野生型 BRAF を有する細胞株に対しては、GSK2118436 は細胞周期の停止及び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、腫瘍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。

GSK2118436 の野生型 RAF に対するキナーゼ阻害作用の IC50 は変異型 BRAF（V600 変異陽性）の約 1.7～10 倍であり阻害作用に顕著な差はみられなかった。一方で、腫瘍細胞株のシグナル伝達及び細胞増殖に及ぼす影響を検討した試験では、GSK2118436 は BRAF V600 変異陽性の腫瘍細胞株に対してのみ阻害作用を示し、野生型 BRAF を有する腫瘍細胞株に対しては阻害作用を示さなかった。このように精製キナーゼと細胞株において GSK2118436 の作用が異なる理由として、野生型 RAF を有する細胞では RAS-GTP 依存的に RAF 蛋白の 2 量体形成が誘発され、これにより 2 量体中で RAF 阻害薬の結合した RAF が他方の RAF を活性化させるというパラドキシカル機構の関与が考えられている[Poulikakos, 2010;

Hatzivassiliou, 2010; Bollag, 2012; Cichowski, 2010]。このパラドキシカル機構が野生型 RAF にのみ認められる理由として、野生型と V600 変異を有する BRAF 間でのコンフォメーションの違い及び RAS の活性化状態（BRAF V600 変異陽性の細胞では RAS は活性化していない）によると考えられている[Poulikakos, 2010; Hatzivassiliou, 2010; Bollag, 2012; Cichowski, 2010]。すなわち、野生型 RAF を有する細胞では GSK2118436 で処理しても RAF の活性化が起こるため ERK リン酸化阻害及び増殖抑制作用はみられず、結果として GSK2118436 の ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用は BRAF V600 変異陽性の細胞に選択的に発現すると考えられる。

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 が悪性黒色腫の治療において重要な標的であると考えられている。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用を有することが示唆された。

In vivo 試験

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。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。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。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。30 mg/kg を 1 日 1 回 90 日間経口投与する試験において、投与 14 日目に TGI を算出したところ腫瘍退縮作用（TGI＞100%）がみられたが、その後は投与を継続しても腫瘍は再び増殖した。他のいずれの投与スケジュールにおいても投与中止により腫瘍の再増殖がみられた。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。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。また、安全性に関しては、検討したすべての投与スケジュールの中で、100 mg/kg/日の静脈内投与群を除いて、GSK2118436 を投与したマウスに体重減少はみられず、忍容性は良好であり一般状態の悪化も認められなかった。

A375P F11 細胞株移植マウスにおける GSK2118436 の 14 日間反復経口投与での腫瘍増殖抑制作用は、15 mg/kg の 1 日 2 回投与と 30 mg/kg の 1 日 1 回投与（いずれも 1 日投与量は同じ）との間で同程度であった。A375P F11 細胞株移植マウスに 30 mg/kg を 1 日 1 回 14 日

間反復経口投与したときの血中 GSK2118436 濃度の AUC(0-24)は、1604.8～2954 ng· hr/mL であった（UH2008/00145/03 の Table 1 及び UH2010/00045/02 の Table 11）。この曝露量は、日本人の BRAF V600 変異陽性の固形癌患者に予定臨床用量である 150 mg を 1 日 2 回（300 mg/日）21 日間投与したときの AUC(0-24)の推定値 11804 ng· hr/mL（BRF116056 試験で 150 mg を 1 日 2 回投与したときの幾何平均 AUC(0-12)である 5902 ng· hr/mL（表 2.7.2.3-8）より算出）より低値であった。GSK2118436 は本マウス異種移植モデルにおいて、ヒトよりも低い曝露量で腫瘍増殖抑制作用を示したことから、BRAF V600 変異陽性の悪性黒色腫患者に対する GSK2118436 の治療効果が期待される。

耐性に関する検討

自然耐性

BRAF V600 変異陽性腫瘍細胞株の増殖抑制作用に及ぼす影響を検討した 2 試験において、ヒト各種腫瘍由来細胞 20 株中 3 株（約 15%；2.6.2.2.1.5.2.）及び 17 株中 3 株（約 18%；2.6.2.2.1.5.3.）が GSK2118436 に対して感受性を示さなかった。2.6.2.2.1.5.3.の試験では各悪性黒色腫由来細胞株の CDK4、PTEN 及び MEK1／MEK2 遺伝子の変異の有無を調べ、それらの変異の有無が GSK2118436 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、GSK2118436 に対して非感受性であった 3 株中 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 GSK2114386 に対する感受性に影響を与えた可能性が考えられる。PTEN に関して、欠損は 17 株中 6 株であり、そのうち 5 株は GSK2118436 に対して感受性を示し、PTEN 欠損型と野生型との間に明らかな感受性の差は認められなかったことから、PTEN の欠損は耐性化の要因ではないと考えられる。なお、野生型 PTEN を有する細胞株の 10 株中 5 株では IC70 が算出されたのに対し、PTEN 欠損型の 6 株はいずれにおいても IC70 は算出できなかった（表 2.6.2-9）ことから、野生型 PTEN を有する細胞株の方がより GSK2118436 に対して高い感受性を有している可能性が考えられる。CDK4 遺伝子に関しては、変異の有無と感受性との間に関連性は認められなかった。また、2.6.2.2.1.5.3.の試験で GSK2118436 に対して感受性及び非感受性であった細胞株での細胞内シグナル伝達に及ぼす影響を比較したところ（2011N116395_00）、感受性／非感受性にかかわらず、いずれの細胞株でも GSK2118436 処理により MEK 及び ERK リン酸化阻害作用並びにサイクリン D1 蛋白レベルの低下がみられた。一方、すべての感受性細胞株で GSK2118436 により AKT シグナルの下流に存在する S6P のリン酸化が阻害されたのに対し、非感受性細胞株では阻害作用は弱い又はみられなかった。S6P はリン酸化により細胞の増殖及び生存に関与する蛋白の翻訳を促進させること[Gao, 2012; Corcoran, 2013]、また、MAPK 経路の活性化により S6P のリン酸化及び AKT 経路の活性化（mTOR の活性化）が促進されることも知られている[Anjum, 2008; Cargnello, 2011; Corcoran, 2013]。これらのことから、感受性細胞株では GSK2118436 による RAF 阻害作用によって MAPK 経路が抑制される結果、S6P のリン酸化が阻害されるのに対し、非感受性細胞株では何らかの要因により AKT 経路が活性化しているため、GSK2118436 によって MAPK 経路が阻害されても AKT 経路を介する S6P のリン酸化が阻害されないことが考えられ、このため GSK2118436 により増殖が抑制されない可能性が考えられる[Corcoran, 2013]。このような RAF 阻害薬非感受性細胞株

での持続的な S6P リン酸化は、類薬であるベムラフェニブ存在下でも報告されている[Corcoran, 2013]。

獲得耐性

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）。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 で長期間曝露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。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ような 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。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）。MEK1 K59 は MEK1 の不活性化コンフォメーションを安定化させると考えられている negative regulatory herix の近傍に位置する[Emery, 2009]。MEK1 の negative regulatory herix 内に存在する Q56 の変異（Q56P）は、negative regulatory herix の安定化に影響を及ぼして MEK1 キナーゼ活性を増強させること、並びに MEK1 Q56P 変異陽性のヒト腫瘍細胞株は RAF 阻害薬である PLX4720 及び MEK 阻害薬である AZD6244 に対して耐性を示すことが報告されていることから[Emery, 2009]、その近傍に位置する MEK1 K59del 変異も Q56P 変異と同様に negative regulatory herix の安定化に影響を及ぼし、それにより RAF 阻害薬及び MEK 阻害薬に対する感受性が低下した可能性が考えられる。一方、MEK1 P378 は MEK1 の C 末端部分に存在しており、近接する T386 は MEK1 の negative regulation に関与するとの報告がある[Fischmann, 2009]が、耐性細胞クローンでみられた P378S 変異を親細胞株に導入しても感受性に影響はみられなかったことから、RAF 阻害薬及び MEK 阻害薬に対する感受性の低下には関与していないと考えられた。

以上のことから、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]。

なお、これらの耐性株に GSK2118436 及び GSK1120212B を併用して BRAF 及び MEK1/2 の両方を阻害すると、感受性が回復し、親細胞株（A375P F11 細胞株）を GSK2118436 で単独処理したときと同程度の増殖抑制作用がみられ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）。

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。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。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。

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が、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（2.6.4.5.3.1.1.）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。

2.6.2.6.2.　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、26 種類の受容体、酵素、イオンチャネル、キナーゼ及び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）。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。

282 種類のヒトキナーゼ及び 17 種類の動物由来キナーゼから構成されるパネルを用いて GSK2118436 及びベムラフェニブのキナーゼ阻害活性について比較したところ（2.6.2.2.1.2.2.）、両被験物質はいずれも検討した多くのキナーゼに対して阻害作用を示さなかった。GSK2118436 が 100 nM 未満の IC50 で阻害作用を示した 5 種類のキナーゼ（LIMK1、PERK、NEK11、SIK 及び変異型 Tie（R849W））に対してベムラフェニブは阻害作用を示さず、一方で GSK2118436 が阻害作用を示さなかった c-Kit、ACK1 及び Lck に対しては 100 nM 未満の IC50 で阻害作用を示し、両阻害薬間で一部のキナーゼに対する阻害プロファイルは異なっていた。

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。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。

2.6.2.6.3.　　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。

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。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。また、Tp-e の短縮（30 μM で最大約 47%）が認められたが、TdP スコアは最大で－1.3～2 点の範囲と陰性であり、スコアが 3 点の場合に TdP 発現の可能性があるという基準[Lu, 2006]以下であることから 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～中程度の心拍数増加（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。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。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対する

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 2.7.2.3-4）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 GSK2118436 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血漿中 GSK2118436 の Cmax（2.4 μg/mL）（表 2.7.2.3-4）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 GSK2118436 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.）。

発熱に対する影響

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。GSK2118436、3 種類のヒト血漿中主代謝物及び 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。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）の遊離を促進させなかった。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。

2.6.2.6.4.　　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

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。

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.

Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:747-58.

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.

Bollag G, Tsai J, Zhang J, et al. Vemurafenib: the first drug approved for *BRAF*-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11:873-86.

Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011;75:50-83.

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

Corcoran RB, Rothenberg SM, Hata AN, et al. TORC1 suppression predicts responsiveness to RAF and MEK inhibition in *BRAF*-mutant melanoma. *Sci Transl Med.* 2013;5:196ra98.

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

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.

Fischmann TO, Smith CK, Mayhood TW, et al. Crystal structures of MEK1 binary and ternary complexes with nucleotides and inhibitors. *Biochemistry.* 2009;48:2661-74.

Furuyashiki T, Narumiya S. Roles of prostaglandin E receptors in stress responses. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:31-8.

Gao W, Li JZH, Chan JYW, et al. mTOR pathway and mTOR inhibitors in head and neck cancer. *ISRN Otolaryngol.* 2012;Article ID 953089:.

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.

Lan HY. Diverse roles of TGF-β/Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci.* 2011;7:1056-67.

Le K, Blomain ES, Rodeck U, et al. Selective RAF inhibitor impairs ERK1/2 phosphorylation and growth in mutant NRAS, vemurafenib-resistant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26:509-17.

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

Lu HR, Vlaminckx E, Van de Water A, et al. *In-vitro* experimental models for the risk assessment of antibiotic-induced QT prolongation. *Eur J Pharmacol.* 2006;553:229-39.

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.

Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, et al. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature.* 2010;464:427-30.

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.

工藤 喬. 小胞体ストレスと精神神経疾患. *精神経誌*. 2012;114:115-23.

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]。

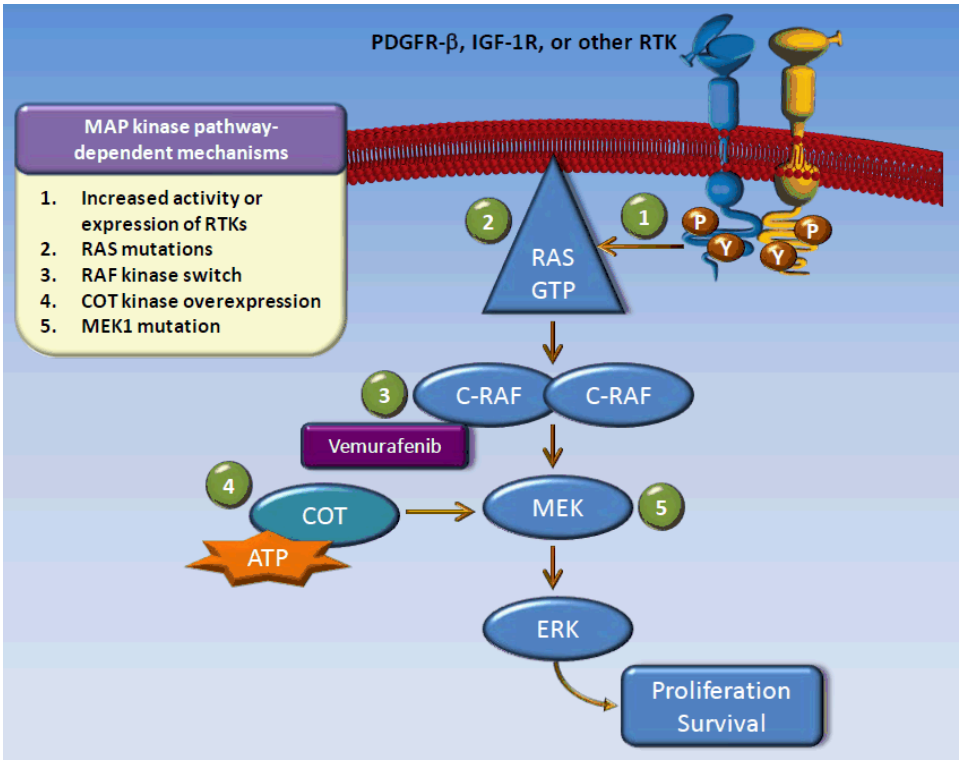
RAF 阻害薬に対する耐性発現機序の一つとして、MAPK 経路の再活性化が関与していると考えられている（図 2.6.2-1）[Alcala, 2012]。BRAF V600 変異陽性の悪性黒色腫に対して最初に承認されたベムラフェニブ及びそのアナログである PLX4720 に対して耐性を獲得した腫瘍細胞では、MAPK 経路において RAF の上流に存在する NRAS 又は下流に存在する MEK1 の二次的活性化変異、あるいは CRAF 及び COT の過剰発現を介した再活性化がみられることが報告されている[Nazarian, 2010; Alcala, 2012; Emery, 2009]。また、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

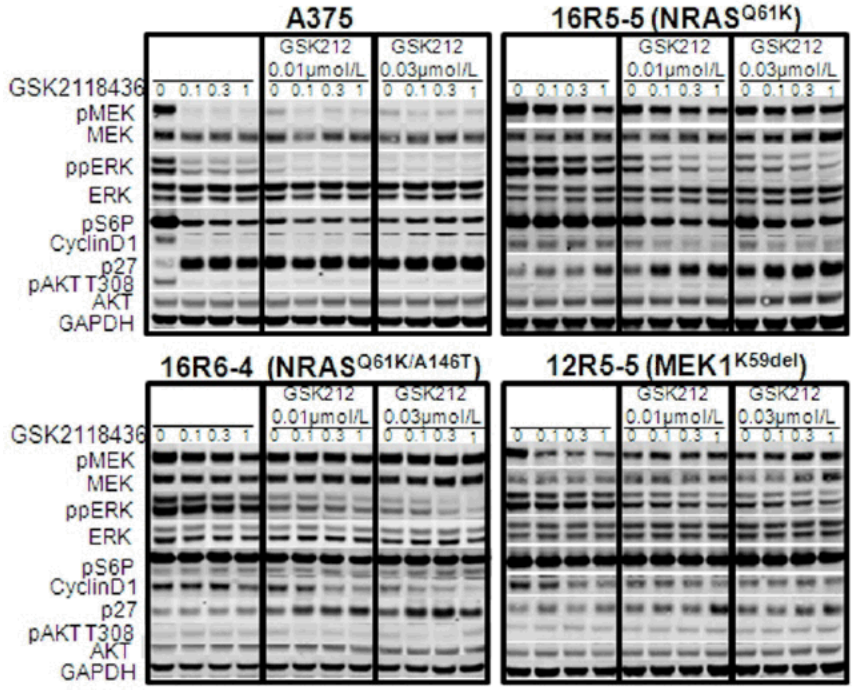
方法

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）

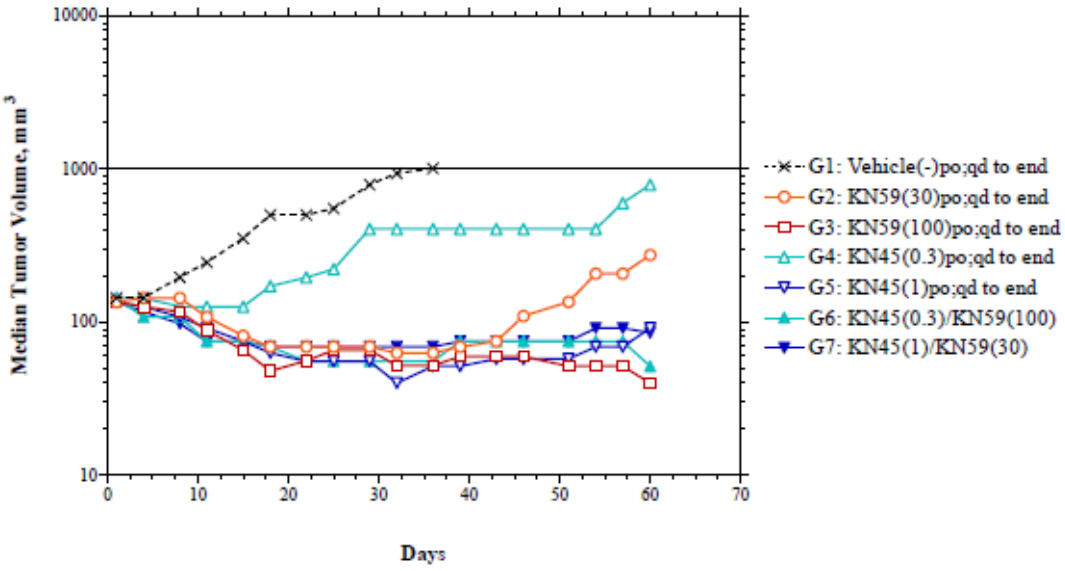
BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を用いたマウス異種移植モデルを用いて、GSK2118436 及び GSK1120212B の種々の投与スケジュールでの併用投与による一連の試験（試験 1～7）を実施し、腫瘍増殖抑制作用を評価した（表 2.6.2-6）。腫瘍増殖抑制作用だけでなく、生存についても検討した試験 1 の方法及び結果を以下に示し、全試験の併用投与での結果を表 2.6.2-6 に要約した。

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

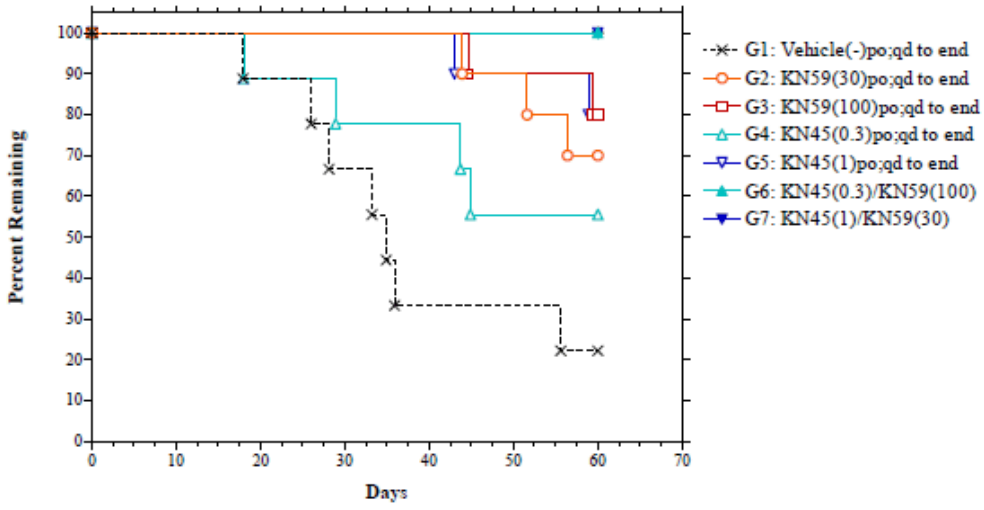
媒体群では移植直後から持続的な腫瘍体積の増加がみられたのに対して、すべての被験物質投与群で腫瘍増殖は抑制された（図 2.6.2-3）。GSK1120212B の 0.3 mg/kg の単独投与群では増殖抑制期間は短く、投与約 16 日目以降に腫瘍の再増殖がみられた。試験 29 日目に算出した MTV（表 2.6.2-5）及び生存曲線に媒体群との有意差はみられなかった。
GSK2118436 の 30 mg/kg 単独投与群では、投与約 42 日目以降に腫瘍の再増殖がみられたが（図 2.6.2-3）、試験 29 日目に算出した MTV は媒体群と比較して有意に低く（表 2.6.2-5）、生存曲線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

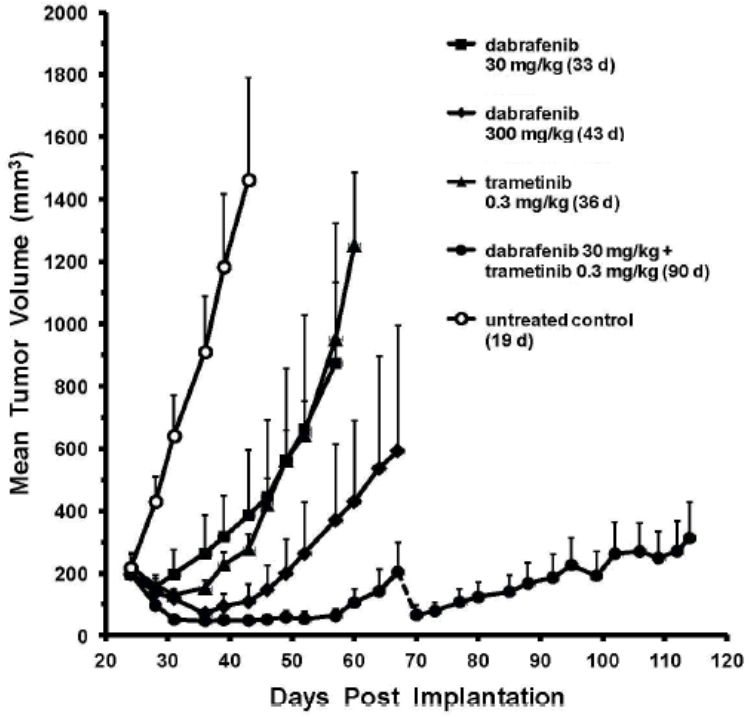
被験物質	投与量 (mg/kg)	MTV (mm^3) (試験 29 日目に算出)
媒体	-	726
GSK2118436	30	69*
	100	66*
GSK1120212B	0.3	405
	1	56**
GSK2118436 / GSK1120212B	100 / 0.3	56**
	30 / 1	69**

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%)。	2012N 132871_ 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%)。	2012N 139280_ 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。	2012N 139280_ 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。	2012N 139280_ 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。	2012N 139280_ 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。	2012N 139280_ 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)。	2012N 152372_ 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：GSK2118436A、GSK2118436B

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					
RAF キナーゼ阻害活性					
ヒト野生型 BRAF、切断型 CRAF 及び V600 変異を有する BRAF に対する阻害活性	ヒト野生型及び変異型 BRAF (V600E)、切断型 CRAF	In vitro	GSK、[redacted] (スコットランド)、[redacted] (スコットランド)	UH2008/00147/01	4.2.1.1.
	ヒト変異型 BRAF (V600E、V600K 又は V600D)	In vitro	GSK	UH2010/00028/02	4.2.1.1.
各種動物の野生型 BRAF に対する阻害活性	ヒト、ラット、イヌ及びサル野生型 BRAF	In vitro	GSK、[redacted] (スコットランド)、[redacted] (スコットランド)	UH2008/00147/01	4.2.1.1.
RAF 以外のキナーゼに対する阻害作用 (選択性の検討)					
ヒトキナーゼパネルを用いた検討	各種キナーゼ	In vitro	GSK、[redacted] (スコットランド)、[redacted] (スコットランド)	UH2008/00147/01	4.2.1.1.
	各種キナーゼ	In vitro	[redacted] (英国)	2011N111729_00	4.2.1.1.
類薬であるベムラフェニブとの比較	各種キナーゼ	In vitro	[redacted] (英国)	2012N139510_00	4.2.1.1.
PERK 阻害作用	マウス、ラット及びイヌ PERK	In vitro	GSK	2012N153146_00	4.2.1.1.
ALK5 の細胞内シグナル伝達に及ぼす影響	ヒト肝細胞癌由来 HepG2 細胞株	In vitro	GSK	UH2008/00132/02	4.2.1.1.

GSK：GlaxoSmithKline

Apr 13 2015 09:40:14

被験物質：GSK2118436A、GSK2118436B

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
RAF に対する阻害様式					
野生型 CRAF での検討	ヒト野生型 CRAF	In vitro	GSK [redacted] (スコットランド)、[redacted] (スコットランド	UH2008/00147/01	4.2.1.1.
野生型 BRAF 及び変異型 BRAF (V600E) での検討	野生型及び変異型 BRAF	In vitro			
MAPK シグナル伝達に及ぼす影響					
MEK 及び ERK リン酸化阻害作用					
各種組織由来のヒト腫瘍細胞株における ERK リン酸化阻害作用	各種組織由来のヒト腫瘍細胞株 (BRAF 野生型又は V600E 変異陽性)	In vitro	GSK	UH2008/00132/02	4.2.1.1.
BRAF V600E 変異陽性のヒト卵巣癌由来 ES-2 細胞株における MEK 及び ERK リン酸化阻害作用	ヒト卵巣癌由来 ES-2 細胞株	In vitro			
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 GSK2118436 の ERK リン酸化阻害作用の持続性及び可逆性	ヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株	In vitro			
細胞増殖抑制作用					
BRAF 野生型又は V600E 変異を有するヒト腫瘍由来細胞株の増殖に及ぼす影響	ヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 (BRAF V600E 変異陽性)、ヒト頭頸部扁平上皮癌由来 HN5 細胞株 (BRAF 野生型)	In vitro	GSK	UH2008/00132/02	4.2.1.1.
ヒト腫瘍由来細胞株パネルを用いた検討	BRAF 及び RAS の変異の有無が確認されている各種ヒト腫瘍細胞株	In vitro			
BRAF 変異陽性 (V600E、V600K 又は V600D) 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.

GSK：GlaxoSmithKline

Apr 13 2015 09:40:14

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表（つづき）

被験物質：GSK2118436A、GSK2118436B

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
細胞周期に及ぼす影響	各種組織由来のヒト腫瘍細胞株 (BRAF 野生型又は V600E 変異陽性)	In vitro	GSK	UH2008/00132/02	4.2.1.1.
アポトーシス誘導作用	各種組織由来のヒト腫瘍細胞株 (BRAF 野生型又は V600E 変異陽性)	In vitro	GSK	UH2008/00132/02	4.2.1.1.
獲得耐性に関する検討					
耐性細胞クローンの獲得変異の種類、並びに GSK2118436、GSK1120212B 及び GSK2126458A に対する感受性					
A375P F11 細胞株より単離した耐性細胞クローンでの検討	BRAF V600E 変異陽性の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.
YUSIT1 細胞株より単離した耐性細胞クローンでの検討	BRAF V600K 変異陽性の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			
GSK2118436 に耐性を獲得した細胞クローンにおける細胞内シグナル伝達の変化	BRAF V600E 変異陽性の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			
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ける作用					
腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用 単回投与投与試験 反復投与投与試験	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	GSK	UH2008/00145/03	4.2.1.1
腫瘍増殖抑制作用		経口			
GSK2118436 の 2 種類のロット間での腫瘍増殖抑制作用の比較		経口	[redacted] (米国)	2011N120928_00	4.2.1.1

GSK：GlaxoSmithKline

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表（つづき）

被験物質：GSK2118436A、GSK2118436B

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
代謝物の薬理作用					
In vitro 試験					
代謝物の RAF キナーゼ阻害作用	ヒト、ラット、イヌ及びサルの野生型 BRAF、ヒト切断型 CRAF、ヒト変異型 BRAF (V600E、V600K 又は V600D)	In vitro	GSK	UH2010/00045/02	4.2.1.1.
選択性の検討	各種キナーゼ	In vitro	[redacted](英国)	2011N111729_00	4.2.1.1.
		In vitro	[redacted](英国)	2012N139510_00	4.2.1.1.
		In vitro	[redacted](英国)	2013N178509_00	4.2.1.1.
BRAF V600E 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来 UACC-257 細胞株における代謝物の ERK リン酸化阻害作用	ヒト悪性黒色腫由来 UACC-257 細胞株	In vitro	GSK	2012N147468_00	4.2.1.1.
ヒト腫瘍由来細胞株に対する代謝物の増殖抑制作用					
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	ヒト悪性黒色腫由来 SK-MEL-28 細胞株	In vitro	GSK	UH2009/00016/01	4.2.1.1.
		In vitro	GSK	UH2010/00045/02	4.2.1.1.
BRAF 野生型又は V600E 変異を有する腫瘍細胞株における代謝物の増殖抑制作用の比較	各種組織由来のヒト腫瘍細胞株	In vitro	GSK	UH2009/00016/01	4.2.1.1.
		In vitro	GSK	UH2010/00045/02	4.2.1.1.
BRAF V600 変異陽性のヒト悪性黒色腫由来細胞株における代謝物の増殖抑制作用	各種ヒト悪性黒色腫由来細胞株	In vitro	GSK	2012N147468_00	4.2.1.1.
In vivo 試験					
A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 及び 3 種類の代謝物を静脈内投与したときの全身曝露量及び ERK リン酸化阻害作用	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)	静脈内	GSK	UH2010/00045/02	4.2.1.1.
A375P F11 細胞株移植マウスに GSK2118436 及び脱メチル体を経口投与したときの血中濃度及び ERK リン酸化阻害作用		経口			

GSK：GlaxoSmithKline

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表（つづき）

被験物質：GSK2118436A、GSK2118436B

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
副次的薬理試験					
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	各種受容体、イオンチャネル、トランスポーター、酵素及びキナーゼ	In vitro	GSK	UH2009/00010/00	4.2.1.2.
ヒト正常細胞の増殖に及ぼす影響					
HUVEC の増殖に及ぼす影響	HUVEC	In vitro	GSK	UH2008/00132/02	4.2.1.2.
骨髄前駆細胞の増殖に及ぼす影響	ヒト骨髄前駆細胞	In vitro	GSK		
安全性薬理試験					
中枢神経系に及ぼす影響	SD ラット	経口	[redacted] (フランス)	VD2008/00869/00	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	FD2008/00376/00	4.2.1.3.
hERG アッセイ (3 種類の代謝物)	hERG cDNA 導入 HEK293 細胞	In vitro	GSK	UH2010/00045/02	4.2.1.3.
ウサギ左心室ウェッジ標本における影響	ウサギ左心室ウェッジ標本	In vitro	GSK	UD2009/00043/00	4.2.1.3.
ラットの心血管系に及ぼす影響	SD ラット	経口	GSK	CD2008/01717/00	4.2.1.3.
イヌの心血管系に及ぼす影響	ビーグル犬	経口	GSK	CD2008/01280/00	4.2.1.3.
呼吸系に及ぼす影響	SD ラット	経口	GSK	CD2008/01279/00	4.2.1.3.
体温に及ぼす影響					
プロスタノイド受容体 EP1、EP2、EP3 及び EP4 に対する作用	ヒト EP1、EP2、EP3 及び EP4 受容体	In vitro	[redacted] (ドイツ)	2013N159876_00	4.2.1.3.
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.

HUVEC：ヒト臍帯静脈血管内皮細胞, GSK：GlaxoSmithKline,[redacted]:[redacted]

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：GSK2118436A、GSK2118436B

試験の種類	動物種、系統及び性別	投与方法	用量及び濃度	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	5, 20, 200 mg/kg	8	体温並びに中枢及び末梢神経系に関する神経行動学的影響はなし。	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	1.5, 5, 15, 30 μM	3～6	IC25 は 11.7 μM (6.1 μg/mL)、IC50 及び IC75 は 30 μM (>15.6 μg/mL)超であった。	適	4.2.1.3.
hERG アッセイ (3 種類の代謝物)	hERG cDNA 導入 HEK293 細胞	In vitro	各種濃度の GSK2118436, 水酸化体, カルボン酸体及び脱メチル体	4～13	GSK2118436 及び 3 種類の代謝物は hERG 電流に対して影響なし (IC50 はいずれも ＞30 μM) 。	非適	4.2.1.3.
ウサギ左心室ウェッジ標本における影響	雌ウサギ左心室ウェッジ標本	In vitro	1, 3, 10, 30 μM	4	1～30 μM で QT 間隔の濃度依存的な短縮 (30 μM で約 30%の短縮）及び Tp-e の濃度依存的な短縮 (30 μM で約 47%の短縮)。TdP スコアは陰性。濃度依存的な心筋収縮力の低下 (30 μM で最大 64%の低下)。	非適	4.2.1.3.
ラットの心血管系に及ぼす影響	雄 SD ラット	経口	5, 20, 200 mg/kg	4	用量依存的な軽度～中程度の心拍数増加（9～48 bpm（最大で 18%）の増加）。5 mg/kg では投与 2～7 時間後まで、20 mg/kg 以上では投与 2～24 時間後まで持続。動脈圧及び体温には影響なし。	非適	4.2.1.3.

2.6.3.4. 安全性薬理試験（つづき）

被験物質：GSK2118436A、GSK2118436B

試験の種類	動物種、系統及び性別	投与方法	用量及び濃度	例数及び標本数/群	結果	GLP適用	添付場所
イヌの心血管系に及ぼす影響	雄ビーグル犬	経口	1, 5, 50 mg/kg	4	50 mg/kg で軽度で可逆的な心拍数の増加(最高で 28%の増加）、軽度 (最大で 7%の短縮) で可逆的な PR 間隔の短縮。心電図の波形異常及び不整脈はみられず(50 mg/kg)。いずれの用量を投与した場合も、動脈圧及び体温にも影響なし。	適	4.2.1.3.
呼吸系に及ぼす影響	雄 SD ラット	経口	5, 20, 200 mg/kg	4	呼吸数、1 回換気量、分時換気量、気道抵抗及び体温に影響なし。	適	4.2.1.3.
体温に及ぼす影響							
プロスタノイド受容体に対する作用 (GSK2118436 及び 3 種類の代謝物)	ヒト EP1, EP2, EP3 及び EP4 受容体	In vitro	～10 μM	1	いずれの被験物質も 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なし。	非適	4.2.1.3.
サイトカイン遊離に及ぼす影響 (GSK2118436 及び 3 種類の代謝物)	ヒト PBMC	In vitro	～30 μM	3	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) 遊離量に対して影響なし。	非適	4.2.1.3.
	ヒト全血	In vitro	0.03～9.1 μg/mL	10	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) 濃度に影響なし。	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

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

Apr 13 2015 09:40:16

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