2.4 非臨床試験の概括評価

目　次

目　次 2
図 一 覧 2
略号一覧 3
1 緒言 4
2 非臨床試験計画の概要 4
3 薬理試験 4
3.1 効力を裏付ける試験 6
3.1.1 BRAF V600 遺伝子変異陽性ヒト NSCLC 細胞に対する作用 6
4 薬物動態試験 6
4.1 分布 6
4.2 代謝 6
4.3 薬物動態学的薬物相互作用 7
5 毒性試験 7
6 不純物及び分解物 7
7 安全性の総合評価 7
8 総括及び結論 7
9 参考文献 7

図 一 覧

Figure 3-1 増殖因子受容体チロシンキナーゼを解した細胞内シグナル伝達（MAPK 経路） 5

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
ARAF	A-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase	—
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
BRAF	B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase	—
CRAF	C-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase	—
ERK	extracellular signal-regulated kinase	—
IC50	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
MAPK	mitogen-activated protein kinase	—
MEK	mitogen-activated extracellular signal-related kinase	マイトジェン活性化細胞外シグナル関連キナーゼ
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小細胞肺癌
RAF	Serine threonine-protein kinase activating downstream effectors involved in tumorigenesis	—
RAS	Protein activating signaling cascades （promoting cell proliferation, neoplastic transformation and oncogenesis）	—

1 緒言

ダブラフェニブメシル酸塩（以下，ダブラフェニブ）は，BRAF の選択的阻害薬であり，アデノシン三リン酸（ATP）との競合阻害により，その作用を発揮する。本邦ではタフィンラー®の販売名で「BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫」の効能・効果で承認を得ている。トラメチニブ ジメチルスルホキシド付加物（以下，トラメチニブ）は，MEK1/2（以下，MEK）の活性化及び同キナーゼ活性に対する選択的阻害薬である。本邦ではメキニスト®の販売名で「BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫」の効能・効果でダブラフェニブとの併用において承認を得ている。今回，BRAF V600 遺伝子変異陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌（NSCLC）患者においてダブラフェニブ及びトラメチニブの併用による有効性及び安全性が確認されたことから，その治療薬としての効能・効果追加の製造販売承認事項一部変更承認申請を行う。

2 非臨床試験計画の概要

ダブラフェニブ及びトラメチニブに関する 薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験の成績は，悪性黒色腫承認申請時に既提出である（1.13-1 悪性黒色腫承認時資料）。本項では，新たに得られた 薬理試験として BRAF V600 遺伝子変異陽性ヒト NSCLC 細胞に対する作用，薬物動態試験として分布・代謝及び相互作用を示す。

3 薬理試験

細胞増殖因子により，受容体チロシンキナーゼが刺激されると，RAS，続いて RAF，MEK さらに ERK（MAPK シグナル伝達経路）が活性化される（Figure 3-1）。RAF には 3 種類のサブタイプ（ARAF，BRAF 及び CRAF）が知られており，ホモ又はヘテロ二量体を形成して，下流に位置する MEK の 2 つのセリン残基をリン酸化する。MEK は，セリン/スレオニンキナーゼであり，RAF により活性化した MEK は，ERK 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関連遺伝子の転写を制御することにより，細胞の成長，増殖や生存を調節する（Cargnello and Roux 2011，Lito et al. 2013）。

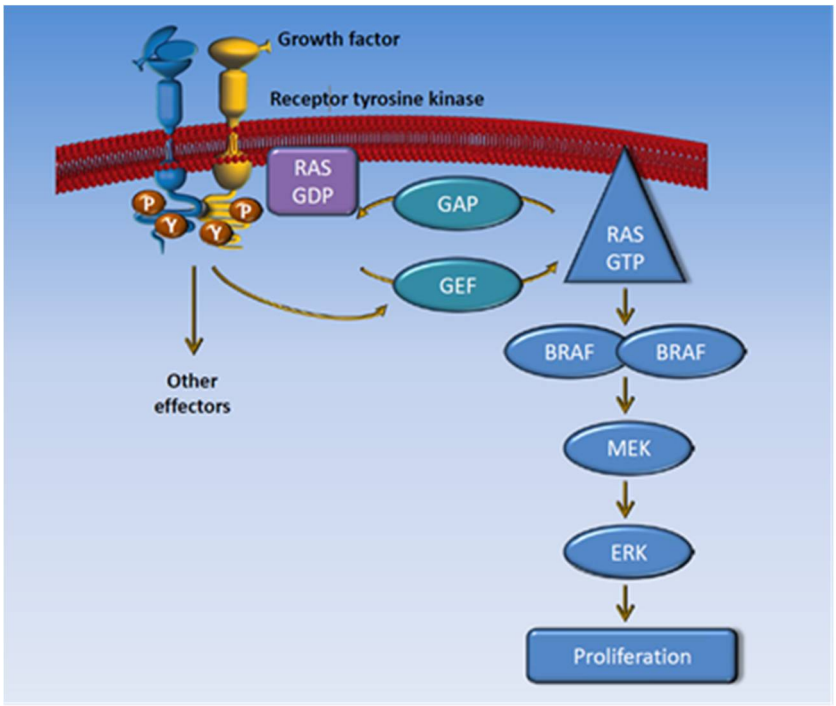
種々のがん種において BRAF 遺伝子の変異が高頻度に認められており，その変異の多くは BRAF の立体構造の変化をもたらし，その下流に存在する MEK 及び ERK を異常に活性化する。中でも最も高頻度の変異は Exon15 における T1799 塩基置換型の点突然変異であり，キナーゼドメイン内に位置する 600 番目のアミノ酸であるバリン（V600）が主にグルタミン酸，アスパラギン酸又はリジンに変異する（V600E，V600D 又は V600K）（Wellbrock et al. 2004, Wan et al. 2004, Bello et al. 2013）。V600 遺伝子変異陽性の BRAF は野生型と比較して高い活性を持つことが報告されており（Wan et al. 2004），RAS の活性化に関係なく恒常的に MEK 及び ERK を活性化すると考えられている。MEK 及び ERK の恒常的な活性化は，細胞周期促進因子（サイクリン D1 等）の発現上昇及び細胞周期抑制因子（p27 等）の発現低下を誘導すること，及びアポトーシス関連

因子の機能を調節することにより，がん細胞の増殖を促進すると考えられる（Bello et al. 2013）。このことから，BRAF および MEK は BRAF V600 遺伝子変異陽性のがんに対する分子標的薬のターゲットになると考えられている（Sasaki et al. 2004; Ashida et al. 2012）。事実，非臨床及び臨床試験において BRAF V600 遺伝子変異陽性の悪性黒色腫に対し，ダブラフェニブにおける腫瘍増殖抑制効果が認められている。さらに，トラメチニブとの併用により MAPK 経路の BRAF 及び MEK を同時に阻害することで，より強力かつ持続的な腫瘍増殖抑制効果が認められており，併用療法の妥当性が支持されている。

今回申請の NSCLC においても，BRAF 遺伝子変異を有する患者が認められており，BRAF 遺伝子変異の約 50%を BRAF V600E 遺伝子変異が占めることが報告されている（Marchetti et al.2011, Cardarella et al. 2013）。既に承認を取得している BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫と同様に，BRAF V600 遺伝子変異陽性の NSCLC においても BRAF V600 を分子標的とすることで治療効果の優れた新たな治療薬を 臨床現場に提供可能と考えられる。

本申請資料では BRAF V600 遺伝子変異陽性 NSCLC に対するダブラフェニブ及びトラメチニブの薬理試験結果の概説を記載する。

Figure 3-1　増殖因子受容体チロシンキナーゼを解した細胞内シグナル伝達（MAPK 経路）



Source : (Alcala and Flaherty 2012 を改変)

3.1 効力を裏付ける試験

3.1.1 BRAF V600 遺伝子変異陽性ヒト NSCLC 細胞に対する作用

ダブラフェニブ及びトラメチニブは，いずれも単独で BRAF V600E 遺伝子変異陽性のヒト NSCLC 由来 MV522 細胞株（以下，MV522 細胞株）に対して増殖抑制作用を示し，その 50%阻害濃度（IC50）はそれぞれ 4.3 nM 及び 1.3 nM であった。さらに，ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用（モル濃度比 10:1）では，MV522 細胞株に対して単独より強い増殖抑制作用を示し，その IC50 はダブラフェニブとして 2.3 nM 及びトラメチニブとして 0.2 nM であった。ダブラフェニブ及びトラメチニブの単独又は併用において MV522 細胞株でみられた増殖抑制作用は，BRAF V600E 遺伝子変異陽性の悪性黒色腫由来 A375 細胞株（以下，A375 細胞株）でみられた効果と同等であった。

ダブラフェニブは MV522 細胞株に対して，MAPK 経路の MEK 及び ERK，その下流に位置する S6 のリン酸化を濃度依存的に抑制した。また，アポトーシスの指標である切断型 parp が誘導され，その作用はトラメチニブとの併用でより顕著であった。さらに，ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用において，細胞周期抑制因子 p27 の発現が亢進し，細胞周期促進因子サイクリン D1 の発現が低下した[Table 2.6.3.1-2013N169244_00]。

4 薬物動態試験

4.1 分布

ヒト悪性黒色腫由来 A375P F11 細胞株を皮下移植したマウスにダブラフェニブ 30 mg/kg/日を 22 日間反復投与及び正常マウスに 150 mg/kg/日を 14 日間反復投与したときのダブラフェニブ及び代謝物（カルボン酸体 [M4，GSK2298683]，水酸化体[M7，GSK2285403]及び脱メチル体[M8，GSK2167542]）の組織分布を用いて検討した。ダブラフェニブ及び代謝物（カルボン酸体，水酸化体及び脱メチル体）は，担癌マウス腫瘍内に多く分布していた。特に，カルボン酸体は最も多く分布し，ダブラフェニブに比べて約 7 倍高い濃度であった。いずれの化合物も肺や脳への分布は非常に小さかった[2.6.4-4.1 項]。

4.2 代謝

マウスに[^{14}C]ダブラフェニブ 100 mg/kg を単回投与したときの代謝を検討した。投与後 30 分では血漿中においてダブラフェニブ濃度が最も高かったが，その後はカルボン酸体が最も高かった。代謝物は主に胆汁を介して，糞中に排出された。胆汁中の主代謝物はカルボン酸体であり，胆汁中及び尿中にダブラフェニブ未変化体は検出されなかった[2.6.4-5.1 項]。

同様に，マウスに[^{14}C]トラメチニブ 0.3 mg/kg を単回投与したときの代謝を検討した。投与後 2～24 時間のいずれの時点においても，血漿中においては未変化体のトラメチニブの放射能が最も

高かった。代謝物として，脱アセチル体である M5 が血漿中で検出された。トラメチニブ及び代謝物は主に糞中に排泄され，そのほとんどが未変化体のトラメチニブであった[2.6.4-5.2 項]。

4.3 薬物動態学的薬物相互作用

ヒト試料を用いた *in vitro* 薬物相互作用試験の結果の詳細は 2.7.2 臨床薬理試験に記載した。主な結果は以下のとおりである。

- ダブラフェニブ，水酸化体及び脱メチル体はヒト BCRP の基質であるが，カルボン酸体は基質では ないことが示された。
- 水酸化体及び脱メチル体は OCT1 の基質ではないことが示された。
- 水酸化体及び脱メチル体は OATP2B1 の基質ではないことが示された。

5 毒性試験

該当なし。

6 不純物及び分解物

該当なし。

7 安全性の総合評価

該当なし。

8 総括及び結論

ダブラフェニブ及びトラメチニブの BRAF V600 遺伝子変異陽性 NSCLC に対する作用について，ヒト NSCLC 由来 MV522 細胞株を用いた *in vitro* 試験により検討した。その結果，悪性黒色腫由来 A375 細胞株と同様にダブラフェニブとトラメチニブの併用による増殖抑制効果が認められ，MAPK 経路及び下流の分子，並びにアポトーシス及び細胞周期関連分子の変化が確認されたことから，NSCLC に対しても悪性黒色腫と同様の優れた効果が期待される。

9 参考文献

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

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

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

[Cardarella S, Ogino A, Nishino M, et al. (2013)] Clinical, Pathological, and Biological Features Associated with BRAF Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res; 19(16):4532-40.

[Cargnello M and Roux PP (2011)] Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. Microbiol Mol Biol Rev; 75(1):50-83.

[Lito P, Rosen N, Solit DB, et al. (2013)] Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. Nat Med; 19(11):1401-9.

[Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, et al. (2011)] Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations. J Clin Oncol; 29(26):3574-9.

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

[Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, et al. (2004)] Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell; 116(6):855-67.

[Wellbrock C, Karasarides M, Marais R (2004)] The RAF proteins take centre stage. Mol Cell Biol. 2004;5:875-85.